

IHMISEN PARVOVIRUKSEN (B19) ELINKIERTO JA AUTOFAGOSYTOOSIN ROOLI

Pro Gradu – tutkielma

Jyväskylän Yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Biokemian osasto

Elokuu 2007

Laura Immonen

ALKUSANAT

Tämä Pro gradu-tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella biokemian osastolla kevään 2007 aikana. Tutkimusprojekti oli osin The Schwartz Foundationin (Leona Gilbert) rahoittama.

Haluan kiittää professori Matti Vuentoja ja FT Leona Gilbertiä mahdollisuudesta työskennellä osana biokemian tutkimusryhmää. Kiitokseni myös Stanley J. Naidesille MD. (Quest Diagnostics, Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, USA), joka tarjosi B19-positiiviset seerumit tähän tutkimukseen.

Suuret kiitokset FT Sanna Kirjavaiselle erittäin hyvästä ohjauksesta. Kiitos myös kaikille biokemian tutkimusryhmän jäsenille avoimen ja kannustavan ilmapiirin luomisesta, sekä lukuisista neuvoista tutkimuksen tekemisen aikana. Kiitos laboratoriomestarillemme Pirjo Kauppiselle korvaamattomasta avusta laboratorion arkipäiväisten ongelmatilanteiden selvittelyssä.

Lopuksi haluan vielä kiittää kaikkia läheisiäni ja ystäviäni tuesta ja kannustuksesta näiden vuosien aikana. Rakkaimmat kiitokseni Antille kärsivällisyydestä ja avusta lukuisten ongelmatilanteiden edessä.

Helsingissä 13.8.2007

Laura Immonen

Tekijä:	Laura Immonen
Tutkielman nimi:	Ihmisen parvoviruksen (B19) elinkierto ja autofagosytoosin rooli
English title:	Life cycle of human parvovirus and role of autophagy
Päivämäärä:	13.8.2007 Sivumäärä: 54 + 5
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Kemiallinen biologia
Tutkielman ohjaaja(t):	FT Sanna Kirjavainen

Tiivistelmä:

Ihmisen parvovirus B19 on maailmanlaajuisesti levinnyt ihmispatogeeni, joka lisääntyy ensisijaisesti punasolujen esiasteissa, kantasoluissa. B19-virus aiheuttaa lukuisia sairauksia, joista yleisin on parvorokko, *Erythema infectiosum*. Ihmisen parvoviruksen kapsidi muodostuu pääosin kahdesta virusproteiinista, VP1 ja VP2, sekä kahdesta pienemmästä proteiinista, 7.5 kDa ja 11 kDa. Viruksen ei-rakenteellinen proteiini, NS1, aiheuttaa apoptoosia, ohjelmoitua solukuolemaa, sekä estää solukasvua pysäyttämällä solusyklin G₂/M-vaiheeseen. Soluille B19-infektio on yleensä lyttinen. On kuitenkin löydetty todisteita B19-infektoitujen solujen selviämisestä solunsisäisen autofagosytoosin avulla. Autofagosytoosi on eukaryoottisolujen tapa hajottaa solunsisäisiä proteiineja vasteena nälkiintymiseen ja muihin solun kohtaamiin stressitekijöihin. Autofagosytoosi kierrättää pitkäikäisiä sytoplasmien makromolekyylejä sekä poistaa vahingoittuneet tai ylimääräiset organelit suojelemaan soluja vääränaikaiselta apoptoosilta. Virusinfektiossa autofagosytoosin rooli on tapauskohtainen, virus voi inhiboida proteiiniensa avulla autofagosytoosia, tai hyödyntää sitä replikaatiossaan. Ihmisen parvoviruksen infektoimista soluista on löydetty mitokondriaalista autofagosytoosia ja se on liitetty infektoituneiden solujen selviämiseen. Autofagosytoosin biologista tärkeyttä ei ole kuitenkaan vielä osoitettu.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää B19-viruksen solunsisäistä reittiä ja kartoittaa missä vaiheessa infektiota autofagosytoosilla on mahdollisesti rooli permissiivisissä (MB02) ja semipermissiivisissä (HepG2) soluissa. Tutkimme myös onko autofagosytoosin rooli tuottoisan infektion kannalta merkittävä eli vaikuttaako autofagosytoosin inhibointi tai aktivointi merkittävästi B19-infektion etenemiseen. B19-viruksen solunsisäistä reittiä tutkittiin konfokaalimikroskoopilla käyttäen erilaisia solumarkkereita. Kokeet suoritettiin kolmella solulinjalla: NLFK, MB02 ja HepG2. Autofagosytoosin roolia B19-virusinfektiossa tutkittiin erilaisilla autofagosytoosia inhiboivilla aineilla (rapamysiini, wortmanniini ja 3-MA) ja saatuja tuloksia tulkittiin tilastotieteellisesti T-testin avulla. Analysoimme myös autofagosomien vesikkelien lukumäärää ja tilavuutta selvittääksemme indusoiko B19-infektio autofagosomien muodostusta tai muuttaako se niiden morfologiaa esim. kasvattamalla niitä. Tuloksena saatiin selville, että B19-virus ei käytä klatrinivälitteistä endosytoosia tunkeutuessaan soluun. Tulevaisuudessa asiaa tulee tutkia eri reittien, esim. makropinosytoosin, solumarkkereilla. Kolmen tunnin kuluttua infektion alkamisesta virus kolokalisoi golgimarkkerin kanssa, joka vahvisti aikaisemmin saatuja tuloksia muilla parvovirusilla. 12 tuntia infektion jälkeen virus kolokalisoi LC3-positiivisten rakenteiden kanssa. Tämä osoittaa, että virus on replikaationsa jälkeen sisällä autofagosomeissa, mutta sen tarkempaa tehtävää ei pystytty osoittamaan. Autofagosytoosin rooli virusinfektiossa osoittautui olevan kaksijakoinen; rapamysiinillä suoritettavat kokeet osoittivat autofagosytoosin hillitsevän virusinfektiota permissiivisissä soluissa, kun taas wortmanniinilla suoritettavat kokeet viittasivat viruksen tarvitsevan autofagosytoosia jo ennen viruksen replikaatiota. Tuloksia tulee kuitenkin tarkastella varauksella rapamysiinin ja wortmanniinin epäspesifisyyden takia. Jatkotutkimuksia tulisi tehdä pidemmällä infektoajoilla ja solumäärän tulisi olla suurempi.

Avainsanat: Ihmisen parvovirus (B19), endosytoosi, autofagosytoosi, LC3

Author: Laura Immonen
Title of thesis: Life cycle of human parvovirus (B19) and role of autophagy
Finnish title: Ihmisen parvoviruksen (B19) elinkierto ja autofagosytoosin rooli
Date: 13.8.2007 **Pages:** 54 + 5
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Chemical Biology
Supervisor(s): PhD Sanna Kirjavainen

Abstract:

Human Parvovirus B19 is a worldwide spread human pathogen and it replicates primarily in erythroid (progenitor) cells. B19 virus causes several diseases, most common of which is *Erythema infectiosum*. The capsid of human parvovirus consists mainly of two major capsid proteins, VP1 and VP2 and two minor ones, 7.5 kDa and 11 kDa. Virus's non-structural protein NS1 causes apoptosis, programmed cell death, and inhibits cell growth by stopping cell cycle to G₂/M phase. B19-infection is usually lytic to cells. However, there is some evidence that B19-infected cells can survive by cellular autophagy. Autophagy is a way for eukaryotic cells to degrade cellular proteins as a response to starving and cellular stress. Autophagy recycles long-lived cytoplasmic macromolecules and removes damaged or excess organelles. This protects cells from apoptosis taking place at an incorrect time. In an infection the role of autophagy depends on the virus, some use their proteins to inhibit autophagy and others use it when they replicate. Mitochondrial autophagy has been found from B19-infected cells and it has been related to survival of infected cells. Biological importance of autophagy has not yet been shown.

In this research we investigated the endocytotic route of human parvovirus with a confocal microscope and different cell markers. Experiments were done with three different cell lines: NLFK, MB02 and HepG2. The role of autophagy in B19-viral infection was examined with different drugs that inhibit autophagy (rapamycin, wortmannin and 3-MA) in permissive (MB02) and semipermissive (HepG2) cell lines. Results were interpreted statistically with T-test. We also investigated if the role of autophagy was significant in productive infection and if inhibition or activation of autophagy had an effect in progressive infection. The amount and size of autophagosomal vesicles was analysed to see if B19-infection induces formation or changes morphology of autophagosomes. As a result, we discovered that B19-virus is not using chathrin mediated endocytosis while entering the cell. In the future this has to be investigated with other endocytotic, e.g. macropinocytosis, markers. Three hours post infection the virus was colocalizing with golgi-marker, which supported earlier findings with other parvoviruses. After 12 hours the virus was colocalizing with LC3 positive structures. This shows that the virus enters autophagosomes after it has been replicated, but we were not able to indicate its function there. In this research autophagy turned out to have two roles; experiments done with rapamycin showed that autophagy inhibits B19-infection in the permissive cell line while experiments done with wortmannin showed that the virus needs autophagy before replication. However, the results should be interpreted with reservation due to the non-specific nature of rapamycin and wortmannin. Follow-up investigation should be done with higher amount of cells and longer infection times.

Keywords: Human parvovirus (B19), endocytosis, autophagy, LC3

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET	6
1. JOHDANTO	8
1.1. <i>Parvoviridae</i>	8
1.1.1. <i>Parvovirinae</i> , Parvovirukset	8
1.2. Ihmisen parvovirus B19.....	11
1.2.1. Genomi.....	11
1.2.2. Kapsidi.....	11
1.2.3. Patogeneesi	12
1.2.4. Taudinkuva	13
1.3. Endosytoosi.....	15
1.3.1. Klatriinivälitteinen endosytoosi.....	15
1.3.2. Kaveolivälitteinen endosytoosi.....	16
1.3.3. Klatriinista ja kaveolista riippumaton endosytoosi.....	16
1.3.3. Makropinosytoosi	17
1.3.4. Viruksen elinkierto solussa.....	17
1.4. Autofagosytoosi.....	20
1.4.1. Makroautofagosytoosi	22
1.4.2. Mikroautofagosytoosi	22
1.4.3. ”Esiliina”-välitteinen autofagosytoosi	23
1.4.4. Autofagosytoosiin liittyvät geenit ja proteiinit	23
1.4.5. Autofagosytoosin yhteys sairauksiin	24
2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....	26
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	27
3.1. Soluviljely.....	27
NLFK.....	27
HepG2.....	27
MB02	28
3.2. Viruksen puhdistus	28
3.3. Viruksen kaltaisten partikkelien (VLP) tuotto ja puhdistus.....	30
3.4. Näytteiden valmistus konfokaalimikroskooppisia tutkimuksia varten.....	31
3.5. Inhibiitiokokeet.....	32
4. TULOKSET.....	34
4.1. B19-viruksen solun sisäisen reitin tutkiminen.....	34
4.1.1. Kolokalisaatiokuvaajat.....	36
4.1.2. Konfokaalimikroskooppikuvat	38
5. TULOSTEN TARKASTELU.....	46
KIRJALLISUUSVIITTEET	52
LIITTEET	55

LYHENTEET

AAV	(Adeno-associated virus) adeno assosioitunut virus
Atg	(Autophagy-related gene) autofagosytoosiin liittyvä geeni
BEVS	(Baculovirus expression system) bakulovirustuottosysteemi
BSA	(Bovine serum albumin) naudan seerumin albumiini
B19	(Human parvovirus) ihmisen parvovirus
CsCl₂	Cesiumkloridi
D	Dalton, molekyylipainoyksikkö
DMEM	Dulbeccon modifioitu Eagle- kasvatusmedium
DNA	(Deoxyribonucleic acid) deoksiribonukleinihappo
EEA-1	(Early endosomal antigen 1) Varhaisen endosomin antigeeni 1
Egfp	(Enhanced green fluorescent protein) vahvistettu vihreä fluoresoiva proteiini
EM	Elektronimikroskopia
ER	(Endoplasmic reticulum) endoplastinen kalvo
EtOH	Etanoli
FBS	(Fetal bovine serum) syntymättömän naudan seerumi
GM-CSF	(Granulo macrophage colony-stimulating factor) granulaarisia magrofagikolonnoja stimuloiva tekijä
HepG2	(Human hepatocyte cell line) ihmisen maksan syöpäsolulinja
hSCF	(Human stem cell factor) ihmisen kantasolutekijä
Ig	Immunoglobuliini
IgG	Immunoglobuliini G
ITR	(Inverted terminal repeats) palindromiset lopputoistot
Kb	(Kilobase) kiloemäs
LAMP	(Lysosome-associated membrane protein) lysosomaalinen kalvoproteiini
LC3	(Microtubulus associated protein 1 light chain 3) mikrotubulaarinen 1-proteiinin kevyt ketju 3
3-MA	(3-methyladenine) 3-metyyliadeniini

MB-02	(Mekakaryotic leukemia cell line) mekakaryoottinen ihmisen leukemia solulinja
MPR	(Mannose-6-phosphate receptor) mannoosi-6-fosfaatti reseptori
NLFK	(Norden laboratory`s feline kidney cells) Nordisk laboratoriossa tuotetut kissan munuaissolut /sekvensoinnissa paljastuneet minkin soluiksi
NLS	(Nuclear localization signal) tumakuljetussignaali
NS1	(Non-structural protein-1) ei-rakenteellinen proteiini-1
p.i.	(Post infection) infektion jälkeen
PI3	(Phosphatidyl inositol 3) fosfatidyyl-inositoli 3
PBS	(Phosphate buffered saline) fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos
PCD	(Programmed cell death) ohjelmoitu solukuolema, apoptoosi
PCR	(Polymerase chain reaction) polymeerasiketjureaktio
PFA	Paraformaldehydi
PLA₂	(Phospholipase A ₂) fosfolipaasi A ₂
RNA	(Ribonucleic acid) ribonukleiinihappo
RPMI	RPMI-mediumi
SDS-PAGE	(Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) natriumdodekyylisulfaatti polyakryyliamidi geelielektroforeesi
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> -solut
SLE	(Systemic Lupus erythematosus) systeeminen lupus erythematosus
TENT	(Tris-, NaCl-, EDTA-buffer) Tris-puskuroitu fysiologinen suolaliuos
Tor	(”Target of Rapamycin”) ”Rapamysiinin kohde”, säätelee autofagosytoosia
UT7	(Human erythroleukemia cell line) ihmisen punasoluleukemia solulinja
VLP	(Virus-like particle) viruksen kaltainen partikkeli
VP	Virusproteiini

1. JOHDANTO

1.1. *Parvoviridae*

Parvoviridae- heimoon kuuluvat kaikki pienet, vaipattomat DNA-virukset, joilla on lineaarinen ja yksijuosteinen genomi. Jokaisen virionin sisältämä genomi on kooltaan 4-6 kb ja päättyy lyhyeen palindromi-sekvenssiin, joka voi itsestään kääntyä takaisin muodostaen hiusneulamaisen rakenteen. Tällä rakenteella on elintärkeä rooli viruksen epätavallisessa replikaatiossa ja sitä voidaan käyttää tämän heimon tuntomerkinä. *Parvoviridae*- heimo voidaan jakaa kahteen alaheimoon isäntäspesifisyyden perusteella. *Parvovirinae*- alaheimoon kuuluvat virukset infektoivat nisäkkäitä ja *Densovirinae*- virukset hyönteisiä ja muita niveljalkaisia. (Tattersall, 2006)

1.1.1. *Parvovirinae*, Parvovirukset

Parvovirinae- alaheimoon kuuluvat *Parvo*-, *Dependo*-, *Erythro*-, *Amdo*- ja *Bocavirus* sukujen virukset. *Parvo*-, *Erythro*-, *Amdo*- ja *Bocavirus* – sukuihin kuuluvat virukset lisääntyvät soluissa itsenäisesti, *Dependo*- sukuun kuuluvat virukset tarvitsevat auttajaviruksen. Parvovirukset ovat erittäin kestäviä ja yksinkertaisia rakenteeltaan ja kykenevät replikoitumaan itsenäisesti. Parvovirusiin kuuluu useita eläinpatogeenisiä, jotka infektoivat mm. koiria, kissoja, jyrsijöitä, nautoja ja sikoja. (Tattersall, 2006)

Dependovirukset ovat pienimpiä tunnettuja viruksia, kooltaan n. 20 nm. Dependovirukset infektoivat ihmisiä ja muita nisäkkäitä. Pystyäkseen infektiioon ne tarvitsevat auttajaviruksen (adeno-associated virus), joka tarjoaa niille tarpeellisia proteiineja replikaation aikaansaamiseksi. Auttajaviruksena toimii joko adenovirus tai herpesvirus. AAV-viruksia on tällä hetkellä pystytty tunnistamaan 7 erilaista (AAV1-6 ja AAV3b). AAV kykenee pääsemään soluun sisään ilman auttajavirusta. Solussa se integroituu tiettyyn paikkaan

isäntäsolun kromosomissa ja jää sinne odottamaan auttajaviruksen tuloa. Koska dependovirukset eivät yksinään ole infektiivisiä, parvoviruksista niitä on helpoin käyttää geeniterapiavektoreina. (Bowles ym. 2006)

Erythroviruksiin kuuluva ihmisen parvovirus (Human Parvovirus, B19) on ainoa *Parvoviridae*-heimoon kuuluva ihmispatogeeni. Erythro-liite tulee virusten spesifisyydestä lisääntyä ensisijaisesti punasolujen esiasteissa. B19 aiheuttaa useita sairauksia ihmisillä, rokkotaudeista keskenmenoihin. (Brown, 2006) Amdo- ja Bocavirukset ovat uusia sukuja *Parvovirinae*- alaheimossa. Niiden on todettu infektoivan mm. kissoja, koiria ja nautakarjaa (Tattersall, 2006).

Taulukko 1.1. *Parvovirinae*-alaheimoon kuuluvia viruksia (Muokattu Heegaard ja Brown, 2002; Tattersall, 2006)

(* mahdollisia jäseniä)

Suku	Virus (lyhenne)	Isäntä	Kliiniset oireet
Parvovirus	Aleutian mink disease virus (AMDV)	Minkki, haisunäättä, hilleri, pesukarhu	Immuunitaudit, sikiön kuolema
	Canine parvovirus (CPV)	Koira	Suolitulehdus, sydänlihastulehdus
	Minute virus of mice (MVM)	Hiiri, rotta	Ei tunnettua sairautta
	Porcine parvovirus (PPV)	sika	Abortti, sikiön kuolema
Dependovirus	Adeno-associated virus 1-6, 3b (AAV)	Ihminen	Ei tunnettua sairautta
	Avian adeno-associated virus (AAAV)	Linnut	Ei tunnettua sairautta
	Canine adeno-associated virus (CAAV)	Koira	Ei tunnettua sairautta
	Bovine adeno-associated virus (BAAV)	Lehmä	Ei tunnettua sairautta
Erythrovirus	Parvovirus B19 (B19)	Ihminen	Parvorokko, aplastinen kriisi, niveleoireet, keskenmeno ym.
	Parvovirus V9*	Ihminen	Aplastinen kriisi?
	Simian parvovirus* (SPV)	Apina	Anemia
	Pig-tailed macaque parvovirus* (PTPV)	Makaki	Anemia
	Rhesus parvovirus* (RHPV)	Rhesusapina	Anemia
	Chipmunk parvovirus*	Maaorava	Ei tunnettua sairautta
Amdovirus	Aleutian mink disease virus (AMDV)	Pesukarhu, haisunäättä	Aleutian tauti, keuhkokuume, immuunijärjestelmän häiriöt
Bocavirus	Bovine parvovirus type 1 (BPV-1)	Nauta	Suolitulehdus, ripuli
	Canine minute virus (CnMV)	Koira	Ripuli, anoreksia, hengitysvaikeudet

1.2. Ihmisen parvovirus B19

Ihmisen parvovirus B19 on merkittävä ihmispatogeeni, joka löydettiin terveen verenluovuttajan seerumista Englannissa vuonna 1975 (Cossart ym. 1975). Aluksi virusta ei pystytty yhdistämään mihinkään sairauteen, mutta jo muutaman vuoden kuluttua raportoitiin ensimmäisistä tautitapauksista, ja 1980-luvun kuluessa paljastui virusinfektion yhteys useisiin ihmissairauksiin (Brown, 2006).

1.2.1. Genomi

Parvovirus B19 on pieni, yksijuosteista DNA:ta sisältävä vaipaton virus, jonka genomien pituus on 5596 nukleotidia. Genomin päissä sijaitsevat 383 nukleotidin pituiset ITR:t (inverted terminal repeats, palindromiset lopputoistot), joista kauimmaisat 365 nukleotidia muodostavat epätäydellisen palindromirakenteen. B19 genomien transkriptiota säädellään yhdellä promoottorilla (p6), joka kontrolloi kaikkien transkriptiotuotteiden synteesiä. Yksi näistä transkriptiotuotteista koodaa ei-rakenteellista proteiinia (NS1) ja loput kahdeksan koodaavat kahta kapsidiproteiinia (VP1 ja VP2) sekä kahta pienempää proteiinia, joiden tehtävä on vielä osin tuntematon. (Zhi ym. 2006)

1.2.2. Kapsidi

Parvoviruksen kapsidi muodostuu pääosin kahdesta proteiinista VP1 (83 kDa) ja VP2 (58 kDa). Kapsidin rakenne noudattaa ikosaedraalista T=1 symmetriaa ja se on halkaisijaltaan noin 22-24 nm. Kapsidin 60 proteiiniyksiköstä VP2-proteiini muodostaa 95% ja VP1 5%. VP1- ja VP2-proteiineja voidaan ekspressoida bakteeri-, hyönteis- ja nisäkäsoluissa. Nisäkä- ja hyönteissoluissa tuotetut VP2:t kykenevät muodostamaan tyhjiä kapsideja, joita kutsutaan viruksen kaltaisiksi partikkeleiksi (VLPs) sekä sitoutumaan P-antigeenireseptoriin, joka toimii reseptorina B19-virusproteiineille. Virusproteiini-1, jonka aminohappokoostumus eroaa

VP2:sta sen aminopäässä olevan 227 aminohapon verran (VP1-uniikki alue, VP1u) vastaa B19-viruksen infektiivisyydestä. Hiljattain on löydetty parvoviruksille tyypillinen fosfolipaasi A (sPLA₂)-aktiivisuudesta vastaava alue B19:sta VP1-uniikista osiosta. (Zhi ym. 2006)

Ei-rakenteellinen proteiini NS1 (71 kDa) on ratkaisevassa roolissa virusinfektiossa ja sitä voidaan pitää B19-infektion tunnusmerkkinä (Poole ym. 2006; Nakashima ym. 2006). Vaikka suurin osa ihmisen kudoksista ei salli B19-replikaatiota, monet sallivat viruksen NS1:n transkription ja translaation. NS1:n sytotoksisuus verisoluille vaikeuttaa sen ekspressointia soluviljelmissä. (Poole ym. 2006) NS1 aiheuttaa apoptoosia, ohjelmoitua solukuolemaa (Poole ym. 2006) sekä saa solusyklin pysähtymään G₂/M-vaiheeseen, joka johtaa solukasvun estymiseen (Morita ym. 2003; Morita ja Sugamura, 2002). B19-genomin koodaamat kaksi pienempää proteiinia (7.5 kDa ja 11 kDa) ovat tunnusomaisia vain B19-virukselle. Näiden proteiinien tarkkaa toimintaa ei vielä hyvin tunneta, mutta inhiboimalla proteiinin ekspressiota todettiin 11 kDa proteiinin vaikuttavan merkittävästi viruksen infektiivisyyteen. Sen huomattiin myös olevan tärkeässä roolissa VP2 kapsidin muodostuksessa sekä solun sisällä tapahtuvassa kuljetuksessa. (Zhi ym. 2006)

1.2.3. Patogeneesi

B19-virus infektoi ainoastaan ihmisiä ja lisääntyy luuytimen punasolujen esiasteissa (kantasoluissa) sekä sikiön maksakudoksessa. Soluille infektio on yleensä lyyttinen. (Morita ja Sugamura, 2002) On kuitenkin viitteitä siitä, että B19-infektoidut solut pystyvät selviämään solunsisäisen autofagosytoosin avulla (Nakashima ym. 2006). Useimmat B19-infektioon liittyvät sairauksien ilmenemismuodot liittyvät punasolujen esiasteiden vaurioitumiseen. Tämä johtuu B19-viruksen sytotoksisuudesta sekä kyvystä inhiboida punasolujen erilaistumista. (Morita ja Sugamura, 2002) B19-virus käyttää ainakin kolmea solun reseptoria soluun kiinnittymisessä ja sisäänmenossa. Solun pinnalla sijaitseva reseptori on glykolipidi, globosidi, joka tunnetaan myös veriryhmän P-antigeenina. (Brown ym. 1993; 1994) P-antigeeni on läsnä punasolujen esiasteissa, erythroplasteissa ja mekakaryosyyteissä, sekä monissa muissa soluissa

(Cooling ym. 1995). P-antigeenin olemassaolo on virukselle välttämätöntä, mutta tuottoisan infektion aikaansaamiseksi B19-virus tarvitsee ko-reseptoreita apuna soluun kiinnittymisessä ja sisään menossa. Näitä ko-reseptoreita on tunnistettu 2 erilaista: $\alpha 5\beta 1$ -integriini, joka ekspressoituu verisolujen esiasteissa sekä Ku80-autoantigeeni. (Weigel-Kelley ym. 2001; 2003; Munakata ym. 2005)

1.2.4. Taudinkuva

Parvovirus B19 on levinnyt maailmanlaajuisesti. Immuunivaste ihmisillä kasvaa iän myötä, niin että 15 % lapsista, 50 % nuorista aikuisista ja 85 % vanhuksista on sairastanut B19-viruksen aiheuttaman infektion. Virus tarttuu yleensä hengitysteitse mutta se voi myös siirtyä elinsiirtojen ja verituotteiden välityksellä sekä suoraan äidiltä sikiöön. (Katsausartikkelissa Broliden ym. 2006) Parvovirus B19 on kestävä useissa kudoksissa ja aiheuttaa siksi monimuotoisia sairauksia (Poole ym. 2004). Yleisin näistä on parvorokko (*Erythema infectiosum*), jonka oireina on kohonnut ruumiinlämpö ja punaista läiskämäistä ihottumaa. Muita sairauksia ovat mm. aplastinen kriisi, maksan vajaatoiminta sekä akuutit ja krooniset niveloireet. Infektio voi myös olla kliinisesti täysin oireeton, noin 50 % lapsista ja 25 % aikuisista sairastaa parvovirusinfektion tietämättään. (Katsausartikkelissa Broliden ym. 2006; Kerr ja Modrow, 2006)

Niveloireet esiintyvät yleisemmin keski-ikäisillä naisilla ja voivat muistuttaa reuman kaltaisia oireita. Infektio ei aiheuta nivelissä eroosiota ja on todennäköisesti immuunivälitteinen, koska se ilmenee samanaikaisesti veressä kiertävien vasta-aineiden kanssa. B19-viruksella on osoitettu olevan yhteyksiä autoimmuunisairauksiin kuten nivelreumaan (rheumatoid arthritis) ja SLE:n (systeminen lupus erythematosus, *Systemis lupus erythrematosus*). Raskaana oleville naisille B19-infektio voi aiheuttaa keskenmenon, jolloin kuolleen sikiön tyyppilöydöksenä on sikiöpöhö (*Hydrops fetalis*). Potilaille, joilla on heikentynyt immuunivaste, parvovirusinfektio voi olla hengenvaarallinen ja aikaisen diagnoosin teko on tärkeää. Infektio voi myös jäädä pysyväksi, jolloin se aiheuttaa kroonista anemiaa, hepatiittia

ja autoimmuunisia oireita. (Katsausartikkelissa Broliden ym. 2006 ; Peterlana ym. 2006; Kerr ja Modrow, 2006)

B19-infektio todetaan testaamalla B19 positiivisten IgG- ja IgM-vasta-aineiden läsnäolo verestä ja/tai määrittämällä PCR:n avulla B19 DNA verestä tai kudoksenäytteestä. IgM- vasta-aineet, jotka on kohdistettu VP2:sta vastaan, ovat havaittavissa 10-12 päivää infektion jälkeen ja yleensä häviävät 3-4 kuukauden kuluttua infektiosta. IgM korvataan IgG:llä, joka on kohdistettu molempia kapsidiproteiineja (VP1 ja VP2) vastaan ja välittää elinikäistä immuniteettia B19-infektiota vastaan. B19-infektiota vastaan ei ole olemassa antiviraalista lääkettä ja terveellä ihmisellä infektio ei normaalisti vaadi hoitoa. Potilaita, joilla on heikentynyt immuunivaste (esim. HIV-infektiopotilaat, syöpäpotilaat ja elinsiirtopotilaat) voidaan hoitaa antamalla suonensisäisesti IgG-vasta-aineita. Raskaana oleville naisille viikoittaiset ultraääniseurannat ovat yleensä suositeltavia. (Katsausartikkelissa Broliden ym. 2006)

1.3. Endosytoosi

Nisäkässolut käyttävät useita eri tapoja viedäkseen solun ulkopuolista materiaalia soluun sisään. Näitä eri tapoja kutsutaan yhteisesti endosytoosiksi. Endosytoosi voidaan jakaa fagosytoosiin (ns. solusyönti) ja pinosytoosiin (ns. solujuonti). Fagosytoosi on menetelmä, jossa solu nielaisee sisäänsä isoja partikkeleja, kuten bakteereja. Pinosytoosissa pieni alue solukalvoa kuroutuu sytoplasmaan päin ja ottaa sisäänsä solukalvon pinnalla oleva nesteen ja siihen liuenneet molekyylit. Muodostunut endosomi (halkaisijaltaan n. 0.1 μm) irtoaa solukalvolta ja kuljettaa sitomansa molekyylit syvälle sytoplasmaan. Pinosytoosi voidaan jakaa neljään eri perusmekanismiin: makropinosytoosi, klatriini-välitteinen endosytoosi, kaveoli-välitteinen endosytoosi sekä klatriinista ja kaveolista riippumaton endosytoosi. (Conner ja Schmid, 2003) Endosytoottiset mekanismit palvelevat tärkeitä solun toimintoja, esim. solun ulkoisten ravintoaineiden sisäänottoa, reseptoriekspression säätelyä ja antigeenien ilmenemistä. Myös virukset, myrkyt ja mikro-organismit käyttävät endosytoottisia reittejä päästäkseen soluun sisään. (Mukherjee ym. 1997)

1.3.1. Klatriinivälitteinen endosytoosi

Klatriinivälitteinen endosytoosi on pääreitti solun ulkopuolisten ligandien ja solukalvon komponenttien kierrättämiseen. Sitä tapahtuu kaikissa nisäkässoluissa ja se vastaa välttämättömien ravintoaineiden jatkuvasta sisäänotosta. Reseptorivälitteisessä, klatriinista riippuvaisessa endosytoosissa molekyylit sitoutuvat soluun spesifisten reseptorimolekyylien avulla. Muodostunut reseptori-ligandikompleksi saa aikaan klatriinipäällysteisen kuopakkeen kuroutumisen irti solukalvolta. Klatriinipäällyste on kolmihaarainen rakenne, joka muodostuu kolmesta klatriinin raskaasta ja kevyestä ketjusta. Ketjut muodostavat häkkimäisen rakenteen, jonka kokoamisessa avustavat kokoajaproteiinit (AP, assembly proteins). (Conner ja Schmid, 2003)

Klatriini avustaa kuopakkeen muodostuksessa sekä kuljetettavien molekyylien valitsemisessa. Muodostunut vesikkeli fuusioituu aikaisen endosomin kanssa, jonka jälkeen reseptorit voidaan kierrättää takaisin solukalvolle. Aikaisten endosomien sisältö kuljetetaan myöhäisille endosomeille mikrotubulusten avustamana, jonka jälkeen myöhäinen endosomi fuusioituu lysosomin kanssa. Jos reseptoria ei ole kierrätetty aikaisilta endosomeilta, se hajotetaan lysosomilla muun hajotettavan materiaalin mukana. (Flint ym. 2000) Klatriinivälitteinen endosytoosi on elintärkeä solun sisäiselle kommunikaatiolle kudosten ja elinten kehityksen aikana. Sen lisäksi se vaikuttaa kontrolloimalla solun pinnan signalointireseptorien määrää ja aktiivisuutta sekä säätelemällä erilaisten kalvopumppujen toimintaa. (Conner ja Schmid, 2003)

1.3.2. Kaveolivälitteinen endosytoosi

Kaveolit ovat solukalvosta muodostuneita pyöreitä kuopakkeita, jotka ovat kooltaan 50-80 nm. Niiden koostumus, ilmeneminen ja toiminta ovat solutyypistä riippuvaisia. Kuopakkeita peittää kaveoliini-1 niminen markkeriproteiini (21 kDa), joka sitoo kolesterolia, muodostaa silmukan solukalvon sisäpuolelle ja peittää kuopakkeen juovamaisella rakenteella. Kaveolivälitteistä endosytoosia käyttävät mm. solukomponentit (esim. glykosfingolipidit), solun ulkoiset ligandit (esim. albumiini), bakteerimyrkyt sekä monet vaipattomat virukset (esim. Simian virus 40). (Pelkmans ja Helenius, 2002) Kaveolin irrottua solukalvolta se vaeltaa ER:ään, josta sen sisältö jatkaa edelleen määränpäähänsä. (Flint ym. 2000)

1.3.3. Klatriinista ja kaveolista riippumaton endosytoosi

Klatriinista ja kaveolista riippumaton endosytoosi on vielä huonosti tunnettu. Endosytoosiin liittyvät rakenteet, "lautat" ovat pieniä, 40-50 nm halkaisijaltaan ja sijaitsevat hajanaisesti solun pinnalla. Klatriinista riippumatonta endosytoosia tapahtuu mm. neuroneissa ja imusoluissa. (Conner ja Schmid, 2003)

1.3.3. Makropinosytoosi

Makropinosytoosi alkaa useissa solutyypeissä vasteena kasvutekijöihin tai muihin signaaleihin, jotka laukaisevat aktiini-välitteisen kalvon ulostyöntymisen.

Makropinosytoosissa kalvo ei kuitenkaan kuroudu ligandin ympärille vaan työntyy ulos ja painuu kasaan, samalla sulautuen solukalvoon. Muodostuvia suuria endosytoottisia vesikkelejä kutsutaan makropinosomeiksi. Makropinosytoosi toimii mm. signalointimolekyylien aktivaation säännöstelyssä, soluvaelluksessa ja osana hermosolujen immuunipuolustusta. Jotkut bakteerit injektoivat/erittävät myrkkyä, joka aktivoi makropinosytoosia, ja näin varmistavat pääsyn soluun sisään. (Conner ja Schmid, 2003)

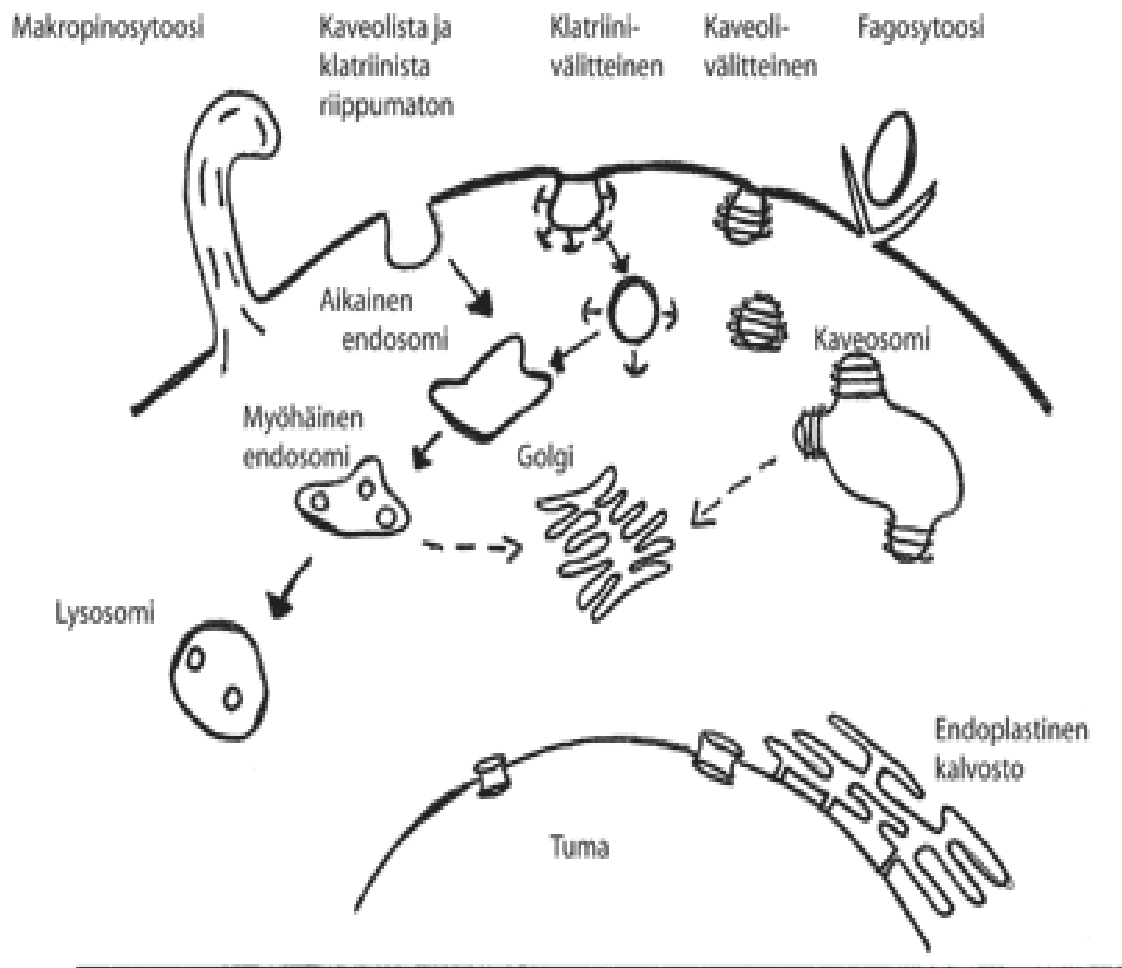
1.3.4. Viruksen elinkierto solussa

Virukset replikoituvat elävissä soluissa ja käyttävät solun koneistoa hyväksi syntetisoidessaan genominsa ja muita komponentteja. Viruksen sisäänmeno alkaa sitoutumisella solun pinnan reseptoriin, joka on yleensä spesifinen ko. virukselle. Joissain tapauksissa virus tarvitsee myös ko-reseptorin avuksi, joko erottamaan viruksen kohdesolun muista reseptoria ilmentävistä soluista tai lisäämään reseptorin antigeenin sitomiskykyä. (Katsausartikkelissa Smith ja Helenius, 2004; Flint ym. 2000)

Menestyksellistä infektiota varten viruksen on läpäistävä solukalvo sekä replikoituessaan tumassa tumakalvo. Vaipalliset virukset voivat fuusioitua solukalvolle ja vapauttaa genominsa soluun sisään. Solukalvo ei ole itsessään läpäisevä viruksille, joten vaipattoman viruksen tulee käyttää solun omia kuljetusmekanismeja (endosytoosi) päästäkseen soluun sisään.

Endosytoottisen vesikkelin sisällä virus pääsee ohittamaan kaikki solun normaalit esteet sekä piiloutumaan immuunipuolustukselta. Viruksesta riippuen sen reitti voi kulkeutua endosomaalisissa rakenteissa, lysosomeissa, ER:ssä (endoplasmic reticulum, endoplastinen kalvosto) ja toisinaan myös golgin laitteessa. (Katsausartikkelissa Smith ja Helenius, 2004; Flint ym. 2000)

Jotta viraalinen genomi saadaan sytoplasmaan (RNA-virukset) tai vaihtoehtoisesti tumaan (DNA-virukset), tulee viruspartikkelien purkautua. Esim. alhainen pH tai tiettyyn reseptoriin sitoutuminen saa aikaan viruksessa konformaatiomuutoksia, jotka johtavat partikkelin hajoamiseen ja genomien vapautumiseen suojaavasta proteiiniukuorestaan tai lipidi-vaipasta. Viruksen on myös saatava targetoitua nukleiinihapponsa oikeaan osaan solua (tuma tai sytoplasma). Tumassa replikoituvat virukset käyttävät apunaan tumankuljetussignaalia (NLS, nuclear localization signal) ja ankkuroituvat reseptorin avulla tumakalvolle. Kalvolta virukset joko injektioivat viraalisen genominsa tumahuokosen läpi tai pääsevät kokonaisina tumaan. Tumahuokonen läpäisee partikkeleja, joiden halkaisija on korkeintaan 39 nm. Parvovirukset ovat pienimpiä ikosaedrisiä viruksia (halkaisija 18-24 nm) ja niiden arvellaankin pääsevän tumaan vahingoittumattomina. (Katsausartikkelissa Smith ja Helenius, 2004; Flint ym. 2000) Uusien viruspartikkelien kokoaminen tapahtuu viruksesta riippuen tumassa tai sytoplasmassa. Rakenneyksiköt muodostetaan yksittäisistä virusproteiineista. Viraalinen nukleiinihappo ja muut tärkeät viruskomponentit (esim. entsyymit, proteiinit, NS1) pakataan koottavan proteiiniukuoren sisään, jonka jälkeen viruspartikkelit vapautuvat solusta. Vaipalliset virukset tunkeutuvat ulos solukalvosta saaden samalla kalvon ympärilleen. Monet vaipattomat virukset aiheuttavat solun lyysin ja kuoleman ja sitä kautta oman vapautumisen. Osa viruksista voi vapautua myös ilman solun lyysiä, joka hyödyttää sekä solua että virusta. (Flint ym. 2000)



Kuva 1.1. Virusten käyttämiä endosytoottisia reittejä (toteutettu Marsh ja Helenius, 2006; Conner ja Schmid, 2003 mukaan)

1.4. Autofagosytoosi

Solun sisäistä tasapainoa säädellään proteiinien biosynteesin ja hajotuksen välisellä tasapainolla. Eukaryoottisolut käyttävät kolmea eri tapaa hajottaakseen solunsisäisiä proteiineja: ubiquitiini/proteasomi-, lysosomi- ja autofagosomi-välitteinen hajotus. Suurin osa lyhytikäisistä proteiineista leimataan ubiquitiiniketjulla ja kohdistetaan proteasomien hajotettavaksi, kun taas proteiinit, joilla on suhteellisen pitkä elinikä, lajitellaan solunsisäisiin vesikkeleihin (endosomit ja lysosomit) ja hajotetaan siellä proteaasien avulla. (Nakashima ym. 2006)

Solun kohdatessa erilaisia stressitekijöitä, kuten ravintoaineiden loppuminen tai patogeeni-infektio, kolmas hajotusreitti, autofagosytoosi, aktivoituu. (Wang ja Klionsky, 2003)

Autofagosytoosi kierrättää pitkäikäisiä sytoplasman makromolekyylejä (esim. proteiineja) tukeakseen solun anabolisia tarpeita ja elinkykyä nälkiintymisen aikana. Autofagosytoosi poistaa vahingoittuneet tai ylimääräiset organelit (esim. mitokondrio, peroksisomi, osia golgista tai tumasta (Katsausartikkelissa Cuervo, 2004b)) ja siten suojelee soluja väärän aikaiselta apoptoosilta (Deretic, 2006). Autofagosytoosi toimii nisäkässoluille tärkeänä selviytymismekanismina ja sitä säädellään ravintoaineiden ja hormonien avulla. (Deretic, 2006; Mizushima ym. 2001)

Autofagosytoosilla on myös rooli ohjelmoidussa solukuolemassa (PCD, programmed cell death). Kaspaasista riippumattomassa solukuolemassa (tyyppi 2, PCDII) tunnusmerkkinä on autofagosomisten vesikkeleiden kasautuminen. Autofaginen solukuolema on ei-apoptoottista, jossa golgin laite, polyribosomit ja endoplastinen kalvosto hajotetaan ennen tuman hajotusta. Erona apoptoosiin on solun tukirangan säilyminen suurilta osin ehjänä. Inhiboimalla kaspaasi-aktiivisuutta on myös saatu viitteitä siitä, että molemmat, PCDI ja PCDII, hyödyntävät autofagosytoosia ja joskus molemmat PCD:n tyypit voivat sijaita samaan aikaan samassa solussa. (Nakashima ym. 2006; Katsausartikkelissa Cuervo, 2004b)

Autofagosytoosi osallistuu solun homeostaasiin lihaksissa, maksassa ja haimassa sekä on osallisena kehityksessä, kasvun säätelyssä ja kestävyudessa. Ennen autofagosytoosia pidettiin soluille haitallisena reittinä, mutta uudet tulokset osoittavat myös sen suojelevan roolin, johtuen siitä, että autofagosytoosin häirintä johtaa sairauksiin. Autofagosytoosin induktiolla on jopa osoitettu olevan syövältä suojaava sekä elinikää pidentävä vaikutus. (Katsausartikkelissa Eskelinen, 2005) Autofagosytoosi on osallisena synnynnäisessä ja hankitussa immuniteetissa (Deretic, 2006).

Virusinfektiossa autofagosytoosin rooli on viruksesta riippuva, toiset virukset (esim. Herpes simplex virus 1) inhiboivat proteiiniensa avulla autofagosytoosia, kun taas toiset virukset (esim. polio) käyttävät autofagosytoosia viraalisen replikaation apuna. Ihmisen parvoviruksen, B19, infektoimista soluista on löydetty mitokondriaalista autofagosytoosia ja se on liitetty infektoituneiden solujen selviämiseen. B19-infektoituneet solut on kooltaan suurentuneita, joka nähdään infektion edettyä 48 tuntia. Autofagosytoosin biologista tärkeyttä ei ole kuitenkaan vielä osoitettu. On mahdollista, että solut inhiboivat B19-virusta eristämällä viraalisen komponentin tai että solut selviävät mitokondriaalisen hajotuksen ja ravintoaineiden jakamisen avulla. (Nakashima ym. 2006)

Solun sisäisen materiaalin (soluneste ja organelit) eristys alkaa vasteena autofagosytoosia induktoivaan signaaliin, jonka jälkeen kalvo kääriytyy materiaalin ympärille, muodostaen kaksoiskalvosta rakentuneen suljetun vakuolin (halkaisija 300-900 nm). Tämä vakuoli on nimeltään autofagosomi ja se ei sisällä lainkaan lysosomaalisia proteiineja. Kehittyvän autofagosomin kypsyminen tapahtuu asteittaisesti ja sisältää fuusioitumista endosomaalisten ja lysosomaalisten vesikkeliin kanssa. Kypsymisen aikana eristetty sytoplasma kuljetetaan endosomaaliselle/lysosomaaliselle kalvolle, jonka jälkeen sytoplasma ja sitä ympäröivä kalvo hajotetaan lysosomaalisten hydrolaasien avulla. Alun perin neutraali pH muuttuu kypsymisen aikana happamaksi. (Katsausartikkelissa Eskelinen, 2005; Yorimitsu ja Klionsky, 2005) Autofagosytoosin tuloksena substraatit pilkkoutuvat alkuperäisiin rakenneseoksiinsa (esim. proteiinit aminohapoiksi) (Katsausartikkelissa Cuervo, 2004b), jonka jälkeen hajotustuotteet kierrätetään takaisin sytoplasmaan, josta ne voidaan käyttää uudelleen aineenvaihdunnan

tarpeisiin (Katsausartikkelissa Eskelinen, 2005). Autofagosytoosin aloituksen säätelyssä merkittävin komponentti on proteiinikinaasi Tor ("target of rapamycin"), joka inhiboi autofagosytoosia normaaleissa ja ravintorikkaissa olosuhteissa (Klionsky 2005). Kun ravintoaineet eivät stimuloi Tor:ia tai tietyt inhibiittorit (esim. rapamycin) inhiboivat sen toimintaa, autofagosomien muodostuminen kasvaa.

Autofagosytoosi voidaan jakaa kolmeen eri tapaan, riippuen reitistä, jota käytetään sytoplasmisen materiaalin kuljetuksessa lysosomaaliselle kalvolle: makroautofagosytoosi, mikroautofagosytoosi ja "esiliina"-välitteinen autofagosytoosi. (Cuervo, 2004a)

1.4.1. Makroautofagosytoosi

Makroautofagosytoosista käytetään usein vain nimeä autofagosytoosi. Siinä hajotettava sytoplasmien osa kiedotaan ensin kaksoiskalvoisen autofagosomin sisään, joka sen jälkeen fuusioituu endosomaalisten ja lysosomaalisten vesikkelien kanssa (Katsausartikkelissa Eskelinen, 2005) ja muodostaa näin autolysosomin. Lysosomaaliset hydrolaasit hajottavat autofagosomin sisällön ja kalvon (Mizushima ym. 2001). Makroautofagosytoosi aktivoituu ravintoaineiden puutteen aikana ja toimii aminohappojen ja muiden elintärkeiden makromolekyylien (esim. lipidit, sokerit, nukleotidit) tärkeimpänä lähteenä nälkiintymisen aikana (Cuervo, 2004a).

1.4.2. Mikroautofagosytoosi

Mikroautofagosytoosi ei aktivoitu vasteena mihinkään stressitekijään, vaan toimii solussa jatkuvasti. Mikroautofagosytoosin suurimpana erona autofagosytoosiin on, että kalvo jonka avulla eristetään ja hajotetaan sytoplasmien osia, on itse lysosomaalinen kalvo. Prosessi muistuttaa fagosomin tai pinosomin "nivistystä" kalvolta. Myöskään väliaikaisia vesikkelejä ei tarvita tässä prosessissa. (Katsausartikkelissa Eskelinen, 2005; Cuervo, 2004a)

1.4.3. ”Esiliina”-välitteinen autofagosytoosi

”Esiliina” (chaperoni) - välitteinen autofagosytoosi on valikoiva prosessi, joka aktivoituu vasteena nälkiintymiseen tai muuhun solun stressiin (Klionsky, 2005). Siinä sytoplasmasta eristetään vain proteiinit, joilla on tietty sekvenssisignaali. Proteiinit sitoutuvat lysosomaaliseen kalvoreseptoriin, joka välittää proteiinien kuljetuksen lysosomaaliselle lumenille lysosomaalisen kalvon kautta, ilman väliaikaisten vesikkelien muodostumista. Substraatin paikallistamiseen tarvitaan toisen, spesifisen, chaperonin läsnäolo lysosomaalisella lumenilla. (Katsausartikkelissa Cuervo, 2004b; Cuervo 2004a)

1.4.4. Autofagosytoosiin liittyvät geenit ja proteiinit

Autofagosytoosiin liittyvät geenit nimetään Atg (autophagy-related)- etuliitteellä. Nisäkässoluissa Atg12-Atg5 konjugaatti on läsnä kalvoissa, jotka ovat muodostamassa autofagosomeja, mutta kun vakuoli on sulkeutunut, konjugaatti häviää. (Mizushima ym. 2001)

Beclin-1 geeniä (ihmishomologi Atg6:sta) ja LC3:ta (mikrotubulus associated protein 1 light chain 3) tarvitaan autofagosomien muodostumisprosessissa (Katsausartikkelissa Eskelinen, 2005; Cuervo, 2004b). Ennen liittymistä autofagosomiseen kalvoon, LC3:n tulee konjugoitua lipidiin, fosfatidylylietanoliamiiniin, jolloin se hajotetaan LC3-I muodosta LC3-II lipidoituun muotoon. LC3-II/LC3-I suhde korreloi muodostuneiden autofagosomien lukumäärän kanssa. (Nakashima ym. 2006) Kun autofagosomi sulkeutuu, ulkopuolella oleva LC3 irtoaa ja voidaan luultavasti uudelleen käyttää, mutta autofagosomin sisään jäävä LC3 pystytään havaitsemaan immunofluoresenssin avulla ennen kuin lysosomaaliset entsyymit hajottavat sen (Katsausartikkelissa Eskelinen, 2005).

Pieni GTPaasi Rab7 tarvitaan autofagosomin kypsymiseen. Autofagosomin fuusio endosomin kanssa ei häiriinny, jos Rab7 poistetaan, mutta fuusio lysosomin kanssa estyy.

Lysosomaalisen kalvoproteiini LAMP1:n ja LAMP2:n puute aiheuttaa aikaisten ja myöhäisten autofagisten vakuolien kasautumisen sekä estää autofagosomin fuusiota lysosomiin. (Katsausartikkelissa Eskelinen, 2005) Myös t-SNARE ja v-SNARE-proteiineilla on todettu olevan osuutta autolysosomin muodostumisessa (Cuervo, 2004a).

1.4.5. Autofagosytoosin yhteys sairauksiin

Autofagosytoosi on elintärkeä soluille auttaen niitä sopeutumisessa sekä selviämässä äärimmäisistä oloista. Autofagosytoosin aktivaatio voi suojella monelta sairaudelta niiden alkuvaiheessa. Sairauden aikana autofagosytoosi voi toimia soluissa sekä suojelevana että tuhoavana mekanismina, riippuen sairauden vakavuudesta, solun ympäristöstä ja käytetyistä lääkehoidoista (Katsausartikkelissa Cuervo, 2004b). Autofagosytoosi on osoitettu osalliseksi mm. syöpään, hermoston rappeuma-sairauksiin (Huntingtonin- ja Parkinsonin tauti), lihasoireisiin, maksasairauksiin sekä normaaliin ikääntymiseen. (Shintani ja Klionsky, 2004; Cuervo, 2004a)

Autofagosytoosilla on rooli synnynnäisessä immunitetissa. Se poistaa solunsisäisiä patogenejä samalla mekanismilla, jolla se pyydystää ja hajottaa solunsisäisiä organelleja. Autofagosytoosi aktivoituu lähes aina bakteeri-infektion aikana. Toisaalta autofagosytoosi voi myös tukea patogeenin selviämistä solun sisällä, tarjoten suojaa ja energiaa selviämisen tueksi. Patogeeni voi myös hyödyntää autofagosytoosia replikoitumalla autofagosomin sisällä ennen sen fuusioitumista lysosomiin. Tämä kuitenkin edellyttää patogeeniltä sopeuttavia mekanismeja autofagiaa vastaan sekä kykyä valjastaa se omiin tarpeisiinsa. (Deretic, 2006; Katsausartikkelissa Cuervo, 2004b).

Syövässä autofagosytoosi voi toimia sekä edistämällä että estämällä syöpäkasvaimen kasvua. Autofagosytoosin inhibointi sallii esisyöpäsolujen jatkuvan kasvun ja näin tukee syövän kasvua. Kasvaimen suurentuessa syöpäsolut tarvitsevat autofagosytoosia, jotta ne selviäisivät vähäravinteikkaista ja vähähappisista olosuhteista. Tämä on erityisen tärkeää kasvaimen sisäosissa, jossa huono verisuonitus ei pysty tarjoamaan tarpeeksi ravinteita kasvaimelle. Autofagosytoosi voi myös suojella joitakin syöpäsoluja säteilyltä poistamalla sädehoidon takia vahingoittuneet organellit ja välttämällä näin solun tuhoutumisen solun ohjelmoidun kuoleman, apoptoosin, avulla. (Katsausartikkelissa Cuervo, 2004b)

2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ihmisen parvoviruksen elinkiertoa sekä autofagosytoosin roolia virusinfektiossa. B19-viruksen elinkiertoa solussa ei ole aiemmin kuvattu ja siksi tutkimus oli tarpeellinen. Aikaisemmissa tutkimuksissa oli osoitettu, että B19-infektioituneet leukemiasolut (UT7) selviäisivät autofagosytoosin avulla (Nakashima ym 2006). Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selventää B19-viruksen solunsisäistä reittiä ja kartoittaa missä vaiheessa infektiota autofagosytoosilla on mahdollisesti rooli permissiivisissä (MB02) ja semipermissiivisissä (HepG2) soluissa ja toisaalta, onko autofagosytoosin rooli tuottoisan infektion kannalta merkittävä eli vaikuttaako autofagosytoosin inhibointi tai aktivointi merkittävästi B19-infektion etenemiseen.

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1. Soluviljely

NLFK

Kokeissa käytettiin kolmea eri solulinjaa, joista NLFK (Norden Laboratory Feline Kidney) – solulinja toimi negatiivisena kontrollina. Soluja kasvatettiin DMEM-kasvatusmediumissa (PAA Laboratories GmbH), johon lisättiin 10% syntymättömän vasikan seerumia (Fetal Bovine Serum, Gibco), 1% aminohapposeosta (MEM non-essential amino acids, Gibco) ja 1% antibioottiseosta (10 000 U/ml penisilliini, 10 mg/ml streptomysiini, 25 µl/ml amfoterisiini B, Gibco). Soluja kasvatettiin 50 cm²:n kasvatuspulloissa (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA), +37° C inkubaattorissa, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5%. Solut siirrostettiin kaksi kertaa viikossa ja konfokaalimikroskoopilla suoritettavia tutkimuksia varten niitä kasvatettiin halkaisijaltaan 13 mm:n peitinlaseilla.

HepG2

HepG2 (Human hepatocyte) soluja käytettiin tutkimuksissa semi-permissiivisenä solulinjana. HepG2-solut sallivat B19-viruksen NS1:n tuoton, mutta ei uusien partikkelien tuottoa. Soluja kasvatettiin Hepatocyte Wash Medium-mediumissa (Gibco), johon oli lisätty 10% syntymättömän vasikan seerumia (Fetal Bovine Serum, Gibco), 1% antibioottiseosta (penisilliini 10 000 U/ml, streptomysiini 10 mg/ml) ja 1% L-glutamiinia (200 mM, Gibco). Soluja kasvatettiin 50 cm²:n kasvatuspulloissa, +37° C inkubaattorissa, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5%. Solut siirrostettiin 2 kertaa viikossa ja mikroskooppisia tutkimuksia varten soluja kasvatettiin 13 mm:n peitinlaseilla.

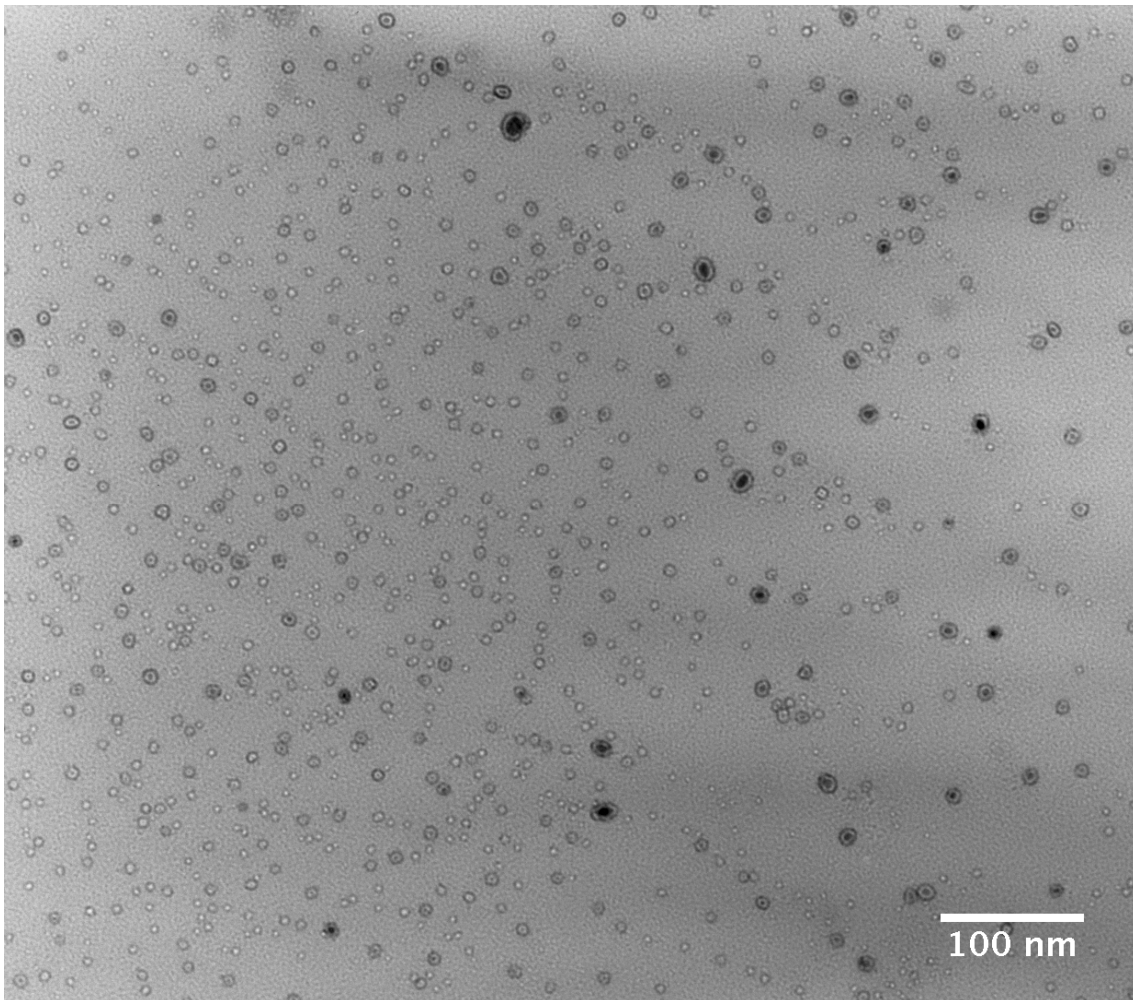
MB02

Tutkimuksissa ainut B19-virukselle permissiivinen solulinja oli MB02 (Mekakaryotic leukemia). Soluja kasvatettiin suspensioviljelmänä RPMI 1640-mediumissa (Gibco), johon lisättiin 5% antibioottiliuosta (10 000 U/ml penisilliini, 10 mg/ml streptomysiini, Gibco) sekä 1% L-glutamiiniliuosta (200 mM, Gibco). Soluja kasvatettiin 24-kuoppalevyllä (Nalge nunc International, Rochester, NY, USA), jossa niiden tilavuus oli 1,5 ml/kuoppa. Solut tarvitsevat elääkseen mediumin lisäksi GM-CSF (granulaarisia makrofagikolonnoja stimuloiva tekijä, granulo-macrophage colony-stimulating factor, Sigma) sekä B19-vasta-aine negatiivista ihmisseerumia, joka on inaktivoitu kuumentamalla 30 min, +56° C. Nämä lisättiin tarvittavaan määrään mediumia siten, että GM-CSF:n pitoisuudeksi tuli 200 U/ml ja seerumin 10%. Solut jaettiin noin kaksi kertaa viikossa $0,8-1,0 \times 10^6$ tiheyteen. Soluja kasvatettiin +37° C inkubaattorissa, jossa CO₂ pitoisuus oli 5%. Konfokaalikuvauksia ja inhibiitiokeiteita varten soluja erilaistettiin eryhtroidaalisuuntaan, jolloin kasvatusmediumiin lisättiin erytropoetiinia (epoetin-alfa, Janssen-Cilag) 4 U/ml sekä kantasolukasvutekijää (hSCF, Stem cell factor, R&D Systems) 25 ng/ml. Erilaistumisen annettiin tapahtua ≥ 5 vrk.

3.2. Viruksen puhdistus

B19-positiiviset humaaniseerumit (1-3 ml) ajettiin 20% sakkaroosipatjan päällä, Beckman ultrasentrifuugilla, SW41Ti-roottorilla (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) 27 000 rpm, 6 h, + 8° C. Supernantti poistettiin ja viruksesta muodostunut sakka liuotettiin 100-300 µl:aan PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) (riippuen puhdistettavasta seerumimäärästä) + 4° C, yön yli ravistuksessa. Liuennut virus siirrettiin ohutseinäisiin putkiin (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) ja sentrifugoitiin CsCl₂- gradientissa, Beckman ultrasentrifuugilla, SW55Ti swing-out roottorilla, 46 000 rpm, 4 h, + 4° C. Gradientti

purettiin neulalla kahteen eri fraktioon (heavy ja light) ja fraktiot sentrifugoitiin erikseen Beckman ultrasentrifuugilla SW55Ti swing-out roottorissa 45 000 rpm, 2 h, + 4° C. Fuugauksen jälkeen supernantti poistettiin ja viruksesta muodostunut sakka liuotettiin 100-200 µl:n PBS:ssä, +4° C, yön yli ravistuksessa. Puhdistetuista fraktiosta määritettiin viruspartikkelien pitoisuus elektronimikroskopiolla (JEOL JEM-1200EX) negatiivivärjäyksen avulla. Partikkelien määrä laskettiin seuraavasti: lkm elektronimikroskopiakuvasta (1/10 hilan aukosta) $\times 10 \times 200$ (hilan aukkojen kokonaislkm). Virusta käytettiin kokeisiin n. 50 virusta / solu (1-2 µl / solu).



Kuva 3.1. Elektronimikroskopiakuva B19-viruspartikkeleista

3.3. Viruksen kaltaisten partikkelien (VLP) tuotto ja puhdistus

Viruksen kaltaisia partikkeleja (VP1/VP2, VP2, Egfp-VP2) tuotettiin baculovirusekspressio-systeemillä (BEVS) sf9-soluissa. Solut infektoitiin ko. proteiinia tuottavalla baculoviruksella, ja infektion annettiin vaikuttaa 48 tuntia. Optimaalinen aika infektiolle oli aiemmin testattu keräämällä näytteitä 24 tunnin välein infektion edetessä ja ajamalla näytteet SDS-PAGE:ssa sekä immunoblottauksessa. Infektioajan päätyttyä solut sentrifugoitiin 1500 rpm, 3 min, Hermle Z 513 K- sentrifuugilla (MidSci, St.Louis, MO, USA) ja muodostunut solupelletti suspensoitiin 4 ml:aan kylmää TENT-puskuria.

Suspensiota sulatettiin ja jäädytettiin 3 kertaa nestetyössä ja +25° C vesihauteessa. Suspensioon lisättiin TRITON-X100, siten että TRITON-pitoisuudeksi tuli 0.2%. Suspensiot fuugattiin 10 000 g, +4° C, 1 tunnin ajan Sorwall RC5C (Sorwall Instruments, Du Pont) sentrifuugilla, SS-34-roottorilla. Supernantit konsentroidiin 20 ml:n konsentrintiputkissa, joissa oli 50 000 D:n kalvo (Vivascience AG, Hannover, Germany) 4000 g, 15 min ajan, +4° C, Hermle Z 513 K- sentrifuugilla. Konsentroidut proteiinit ajettiin sakkaroosigradientissa (valmistettu 10% ja 40% sakkaroosista gradientinsekoittajalla) Beckman ultrasentrifuugilla, SW41Ti-roottorilla, 26 000 rpm, +4° C, 4 tunnin ajan. Gradientit purettiin neulalla ja fraktiot konsentroidiin konsentrintiputkissa (Vivascience, kalvo 10 000 D) 3000 g, +4° C, 4 × 20 min Hermle Z 513 K-sentrifuugilla. Konsentroidut VLP:t liuotettiin 200 µl:n PBS.

3.4. Näytteiden valmistus konfokaalimikroskooppisia tutkimuksia varten

NLFK ja HepG2-soluja kasvatettiin 13 mm:n peitinlaseilla tutkimuksia varten, n. 20 000 solua/lasi. Solut infektoitiin ko. VLP:llä tai viruksella, n. 75 partikkelia/solu. Virusten annettiin edetä 5 min, 30 min, 1 tunti, 3 tuntia, 6 tuntia ja 12 tuntia +37° C inkubaattorissa, jossa CO₂ pitoisuus oli 5%. B19-viruksella tehdyistä infektiokokeista 3 h, 6h ja 12h aikapisteet tehtiin myös sykloheximidin (myrkky, joka estää proteiinisynteesiä) läsnä ollessa. Cykloheximidin pitoisuus kokeissa oli 50 µg/ml. Infektioajan päätyttyä solut huuhdeltiin PBS:llä ja fiksattiin 3% PFA:lla (paraformaldehydi, Merck) 30 min. Solukalvo läpäistiin 0.01% Triton, 1% BSA-puskurilla 3 × 5 min, jonka jälkeen solut käsiteltiin primäärivasta-aineella 45 minuuttia.

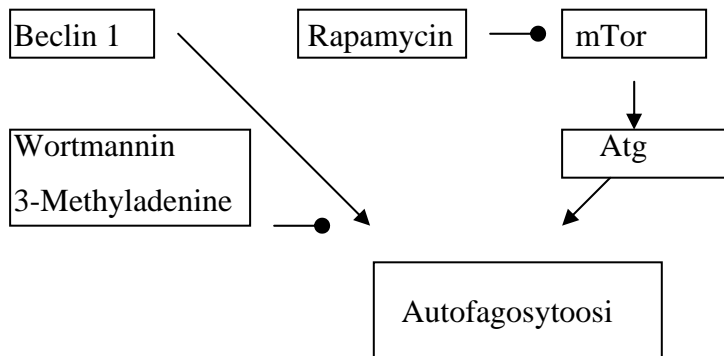
Vasta-aineet oli testattu aiemmin kahdella eri laimennoksella, jotta tiedettiin oikea laimennos kokeita varten. Solut pestiin läpäisypuskurilla 3 × 5 min ja inkuboitiin sekundäärivasta-aineessa 45 minuuttia. Ylimääräinen vasta-aine pestiin PBS:llä ja solut pedattiin objektilaseille Mowiol-DABCO:n (20 mg/ml Mowiol; 25mg/ml DABCO, Sigma).

MB-02 soluja pipetoitiin eppendorf-putkiin 250-750 µl kokeita varten. Yhdessä putkessa oleva solumäärä oli n. 200 000. Suspension kasvat MB02 solut sentrifugoitiin (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) pelletiksi (5000 rpm, 10 min) värjäyksien ja pesujen välillä. MB02 solujen kanssa ei käytetty sekundäärivasta-aineen tumaväriä Hoechst:a vaan solut pedattiin Vectashield mounting mediumiin (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA), joka sisälsi DAPI:n (H-1200). Näytteitä tarkasteltiin Olympus Fluoview-konfokaalimikroskoopilla (FV10-Asw, Olympus Europa GMBH, Hamburg, Germany) 60× objektiivilla. Näytteistä otettiin leikkelekuvia (3D) ja kolokalisaatio-kuvaajat sekä määritettiin Pearsonin vakio.

3.5. Inhibiitokokeet

Autofagosytoosin osuutta B19-infektioon tutkittiin käyttämällä autofagosytoosia inhiboivia aineita. Inhibiitokokeet suoritettiin HepG2- ja MB02-soluille. Kokeissa käytetyt aineet, ja niiden konsentraatiot:

- Wortmannin (Sigma-Aldrich), 100 nM (Rich ym. 2003)
- 3-Methyladenine (Sigma-Aldrich), 5 mM (Nakashima ym. 2006)
- Rapamycin (Sigma-Aldrich), 100 nM (Takeuchi ym. 2005)



kuva 3.2. Autofagosytoosin inhibiitioon osallistuvat aineet (kuva toteutettu Klionsky ja Shintani 2004 mukaan)

Soluja esi-inkuboitiiin myrkyllä 30 min, jonka jälkeen lisättiin virus (50 partikkelia/solu) ja infektion annettiin edetä 24 tuntia, +37° C. Wortmanniinilla käsitellyille soluille vaihdettiin medium 6 tunnin välein, koska Wortmanninin on todettu hajoavan inkubaation edetessä. Inkubaation jälkeen solut fiksattiin 3% PFA:lla ja käsiteltiin läpäisyyspuskurilla (0.01% Triton, 1% BSA) 3 × 5 min. Soluja inkuboitiiin primäärivasta-aineen kanssa, 45 min RT, jonka jälkeen solut pestiin läpäisyyspuskurilla 3 × 5 min. Sekundäärivasta-aineen kanssa inkubointi 45 min RT, jonka jälkeen solut pestiin 3 × 5 min PBS. Peitinlasit pedattiin Mowiol-Dabkoon (HepG2-solut) ja Novacastraan (MB02-solut) objektilaseille.

Laseilta laskettiin infektioprosentit fluoresenssimikroskoopin (Leitz DMRBE, Leica Nilomark Oy, Espoo) avulla. Laskuissa huomioitiin B19-kapsidin läsnäolo tumassa sekä NS1:n olemassaolo solussa.

Taulukko 3.1. Kokeissa käytetyt primäärivasta-aineet:

Antigeeni	Vasta-aine tuotettu	konsentraatio	Vasta-aineen lähde
EEA1	Hiiri	2 µl (1:100)	Abcam, Cambridge, UK
B19	Kani	1 µg/ml (1:200)	Dako, Carpinteria, CA
MPR	Hiiri	0.1 nM (1:200)	Invitrogen
LAMP-1	Hiiri	1:500	Developmental Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, Iowa City, IA
LC3	Hiiri	2 µg/ml (1:100)	Immuno Diagnostic Oy
Golgin97	Hiiri	0.1 µg/ml (1:1000)	Molecular Probes
NS1	Hiiri	1:500	Colin Parrish

Taulukko 3.2. Kokeissa käytetyt sekundäärivasta-aineet:

Antigeeni	Vasta-aine tuotettu	Konsentraatio	Vasta-aine konjugoitu	Vasta-aineen lähde
Hiiri IgG	Vuohi	6.6 µg/ml (1:300) 10 µg/ml (1:200)	Alexa fluor-488	Molecular Probes
Kani IgG	Vuohi	10 µg/ml (1:200)	Alexa fluor- 633	Molecular Probes
Kani IgG	Vuohi	10 µg/ml (1:200)	Alexa fluor-594	Molecular Probes
Hoechst 33258		1 µg/ml (1:1000)		Sigma-Aldrich

4. TULOKSET

4.1. B19-viruksen solun sisäisen reitin tutkiminen

Ihmisen parvoviruksen (B19) solun sisäistä reittiä tutkittiin konfokaalimikroskoopilla. Soluista määritettiin viruksen ja tutkittavan rakenteen (EEA-1, MPR, LAMP-1, LC3, Golgi) mahdollinen kolokalisaatio sekä Pearsonin vakio, joka kuvaa kahden muuttujan (virus ja rakenne) välistä yhteyttä. Pearsonin vakio (r) voi saada arvoja $-1 \rightarrow 1$, jolloin arvo 1 kuvaa lineaarista riippuvuutta muuttujien välillä ja arvo 0 kertoo, että muuttujien välillä ei ole lineaarista riippuvuutta.

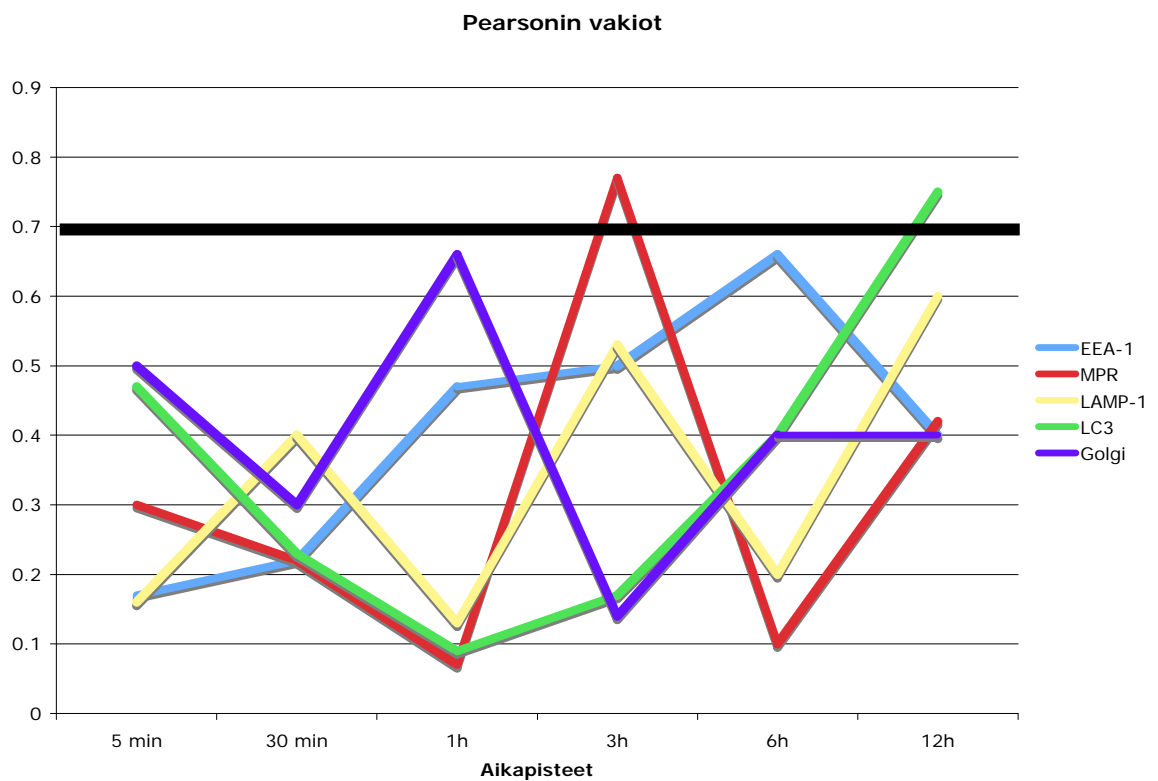
$$r = \frac{\sum Z_x Z_y}{(n-1)}$$

Kuvien analysointivaiheessa niistä jätettiin huomioimatta tumaleima (DAPI), koska värjäytyminen oli suurilta osin erittäin epäspesifistä ja häiritsi kuvien tulkintaa. Viruksen ja rakenteen välistä yhteyttä analysoitaessa huomioitiin vain ne Pearsonin vakiot, jotka ylittivät arvon 0.7. MB02-soluista otetuista kuvista ei voitu osoittaa miten ihmisen parvoviruksen solun sisäinen reitti alkaa. Kun infektiota oli edennyt 3 tuntia, nähtiin kolokalisaatiota MPR-positiivisten rakenteiden kanssa (myöhäiset endosomit) ($r = 0.77$). Infektion edettyä 12 tuntia kolokalisaatiota nähtiin autofagosomien kanssa ($r = 0.75$). Cykloheximidillä suoritettiin vastaavat kokeet ja huomattiin että sykloheximidillä käsittely ei aiheuttanut eroa virusmäärän kanssa. Viruksen solun sisäinen reitti oli sama, joten voimme olettaa että soluissa tuotetut uudet partikkelit eivät häirinneet reitin tutkimista.

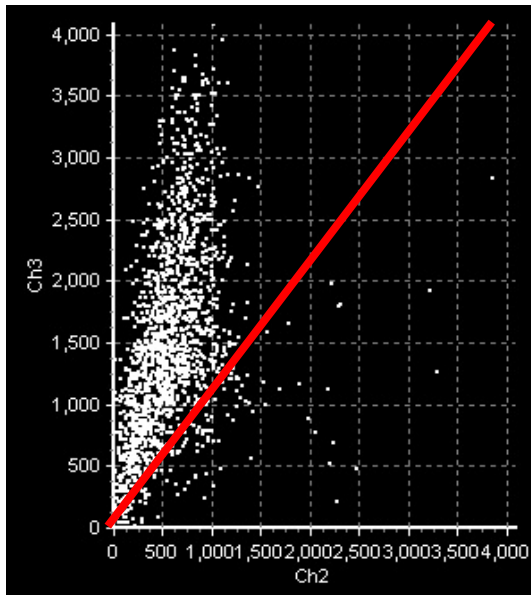
NLFK- ja HepG2- soluilla suoritettiin samat kokeet, samoilla aikapisteillä. NLFK- soluissa nähtiin B19-virusta, paikoitellen runsaastikin, joka todettiin voimakkaana fluoresenssina. Kolokalisaatiota ei todettu minkään tutkitun markkerin ja viruksen välillä ($p \leq 0.2$).

HepG2-soluissa virusta oli solun sisällä tai se oli jäänyt solun ulkopuolelle. Virusta ei nähty tumassa, vaan se oli tuman ympärille kerääntyneenä. Mahdollinen kolokalisaatio nähtiin infektion edettyä 30 minuuttia, MPR-positiivisten rakenteiden kanssa ($r = 0.7$). Kun infektiio oli edennyt 12 tuntia, ei nähty kolokalisaatiota minkään rakenteen kanssa ja virus sijaitti solun ulkopinnalla.

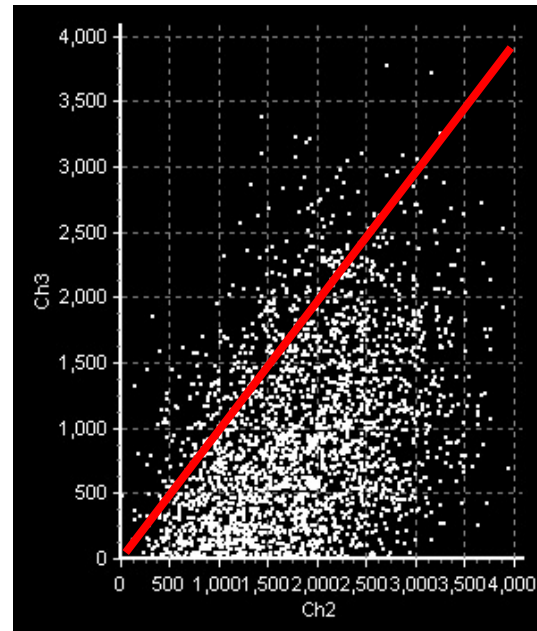
Taulukko 4.1. Rakenteen ja viruksen kolokalisaatiota kuvaavat Pearsonin vakiot (MB02-solut)



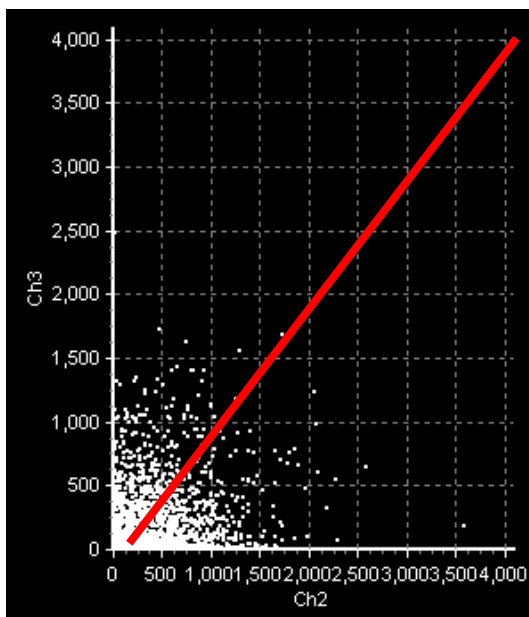
4.1.1. Kolokalisaatiokuvaajat



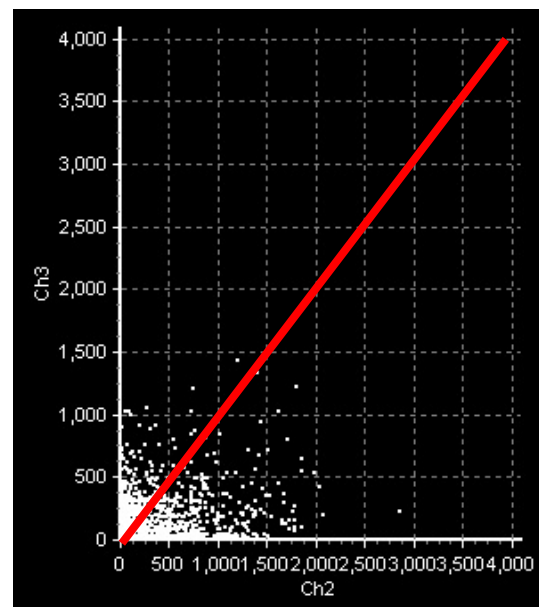
Kuva 4.1. MB02 5 min p.i.
ch2=LC3, ch3=B19
Hieman kolokalisaatiota



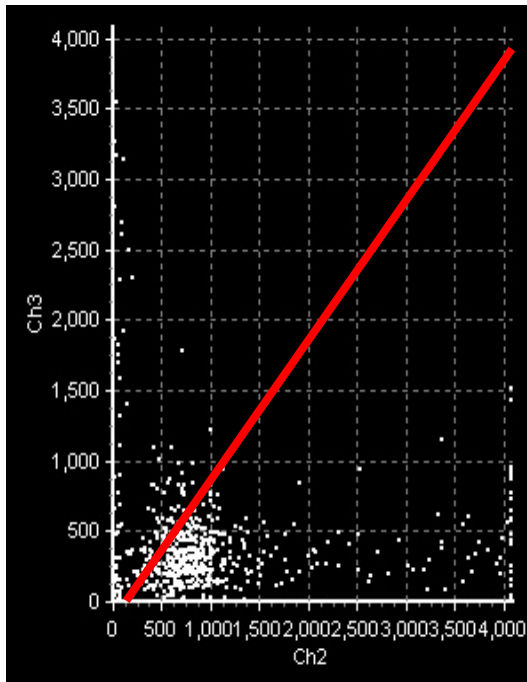
Kuva 4.2. MB02 1h p.i.
ch2=golgi, ch3=B19
Kolokalisaatio



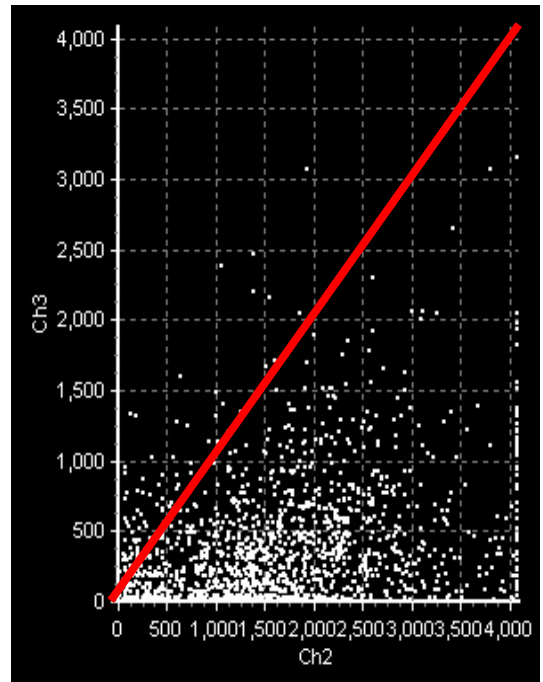
Kuva 4.3. MB02 3h p.i.
ch2=MPR, ch3=B1
Vähäistä kolokalisaatiota



Kuva 4.4. MB02 6h p.i.
ch2=EEA, ch3=B19
Ei kolokalisaatiota

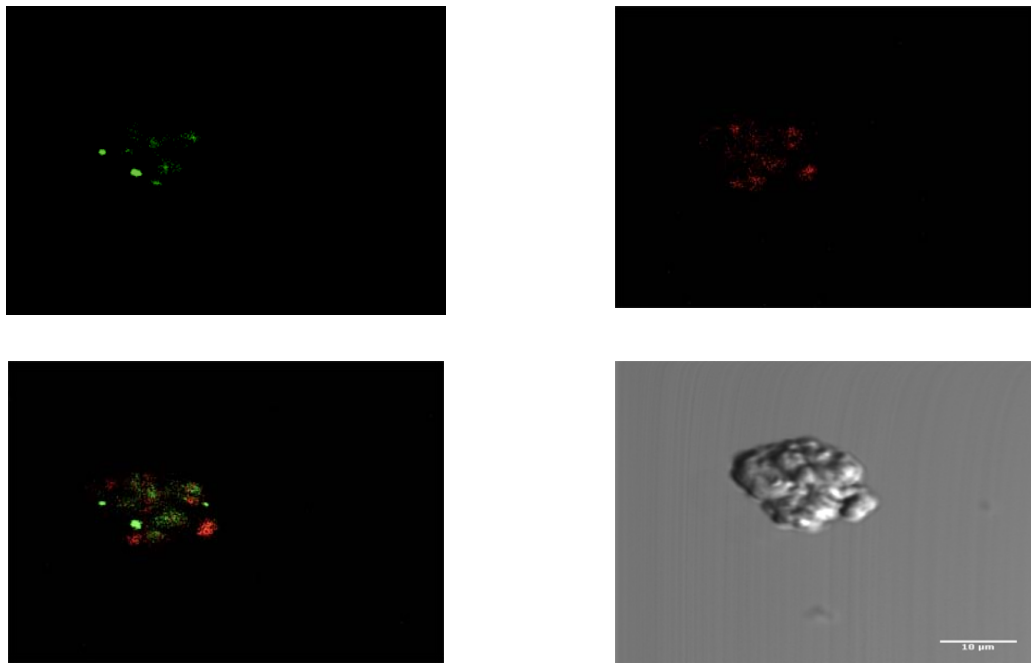


Kuva 4.5. MB02 12h p.i.
ch2=LAMP-1, ch3=B19
Vähäistä kolokalisaatiota

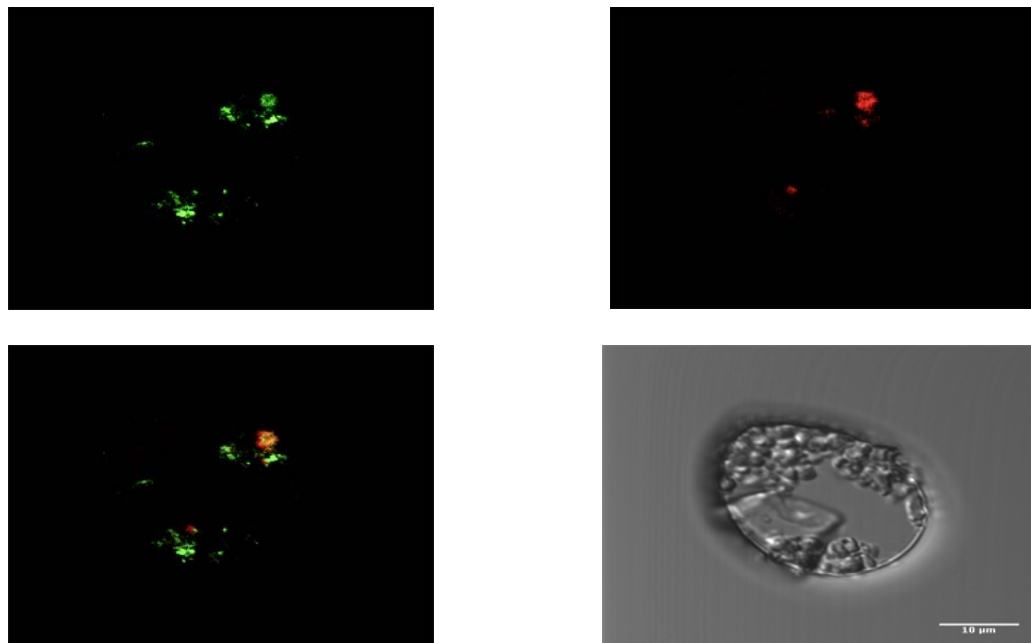


Kuva 4.6. MB02 12h p.i.
ch2=LC3, ch3=B19
Vähäistä kolokalisaatiota

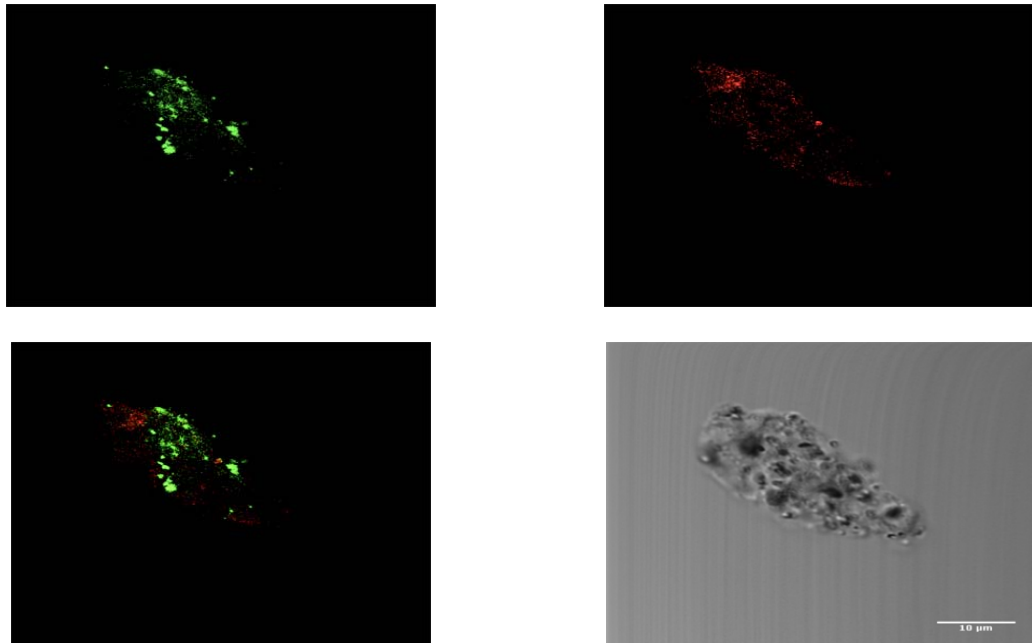
4.1.2. Konfokaalimikroskooppikuvat



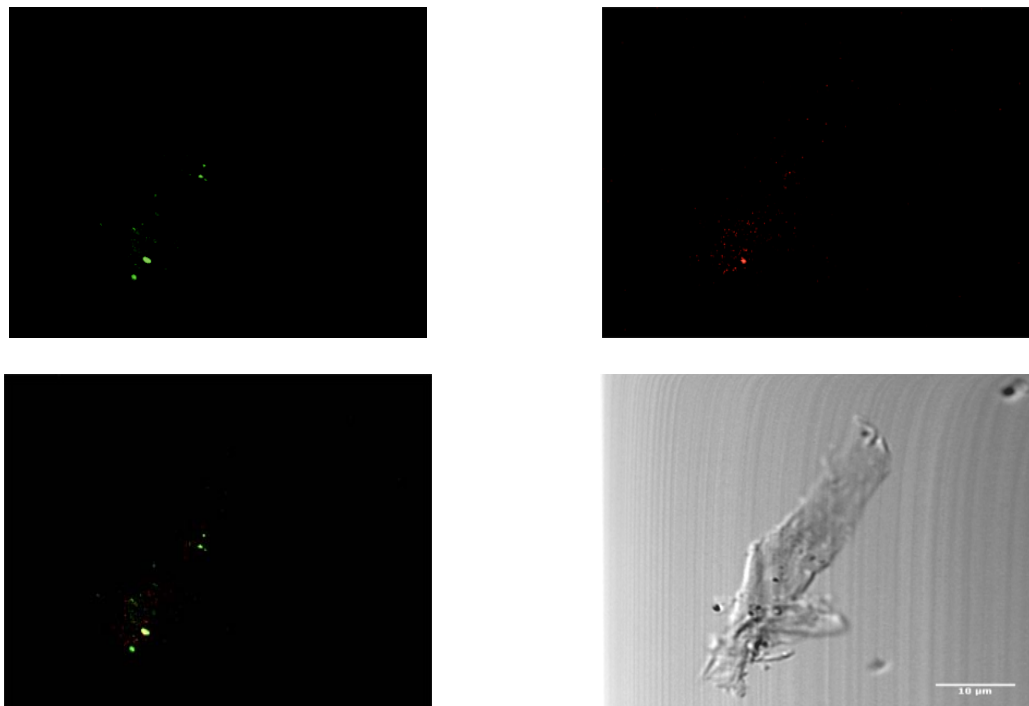
Kuva 4.7. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organellimarkkeriin (golgi) PFA-fiksoiduissa soluissa 1h p.i. golgi = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.



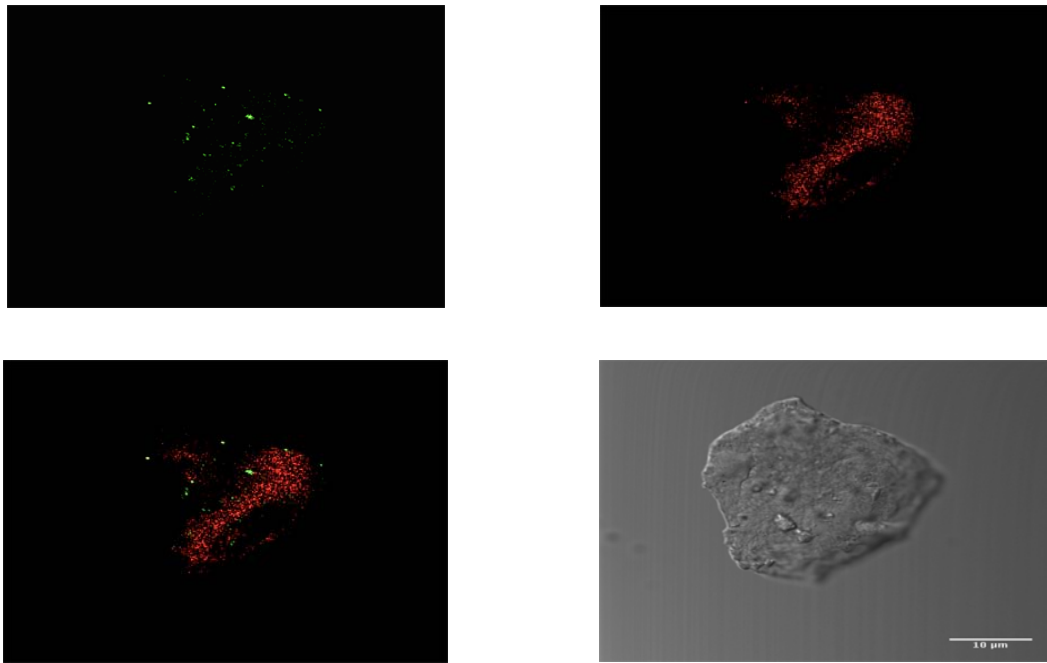
Kuva 4.8. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organellimarkkeriin (EEA-1) PFA-fiksoiduissa soluissa 3h p.i. EEA-1 = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.



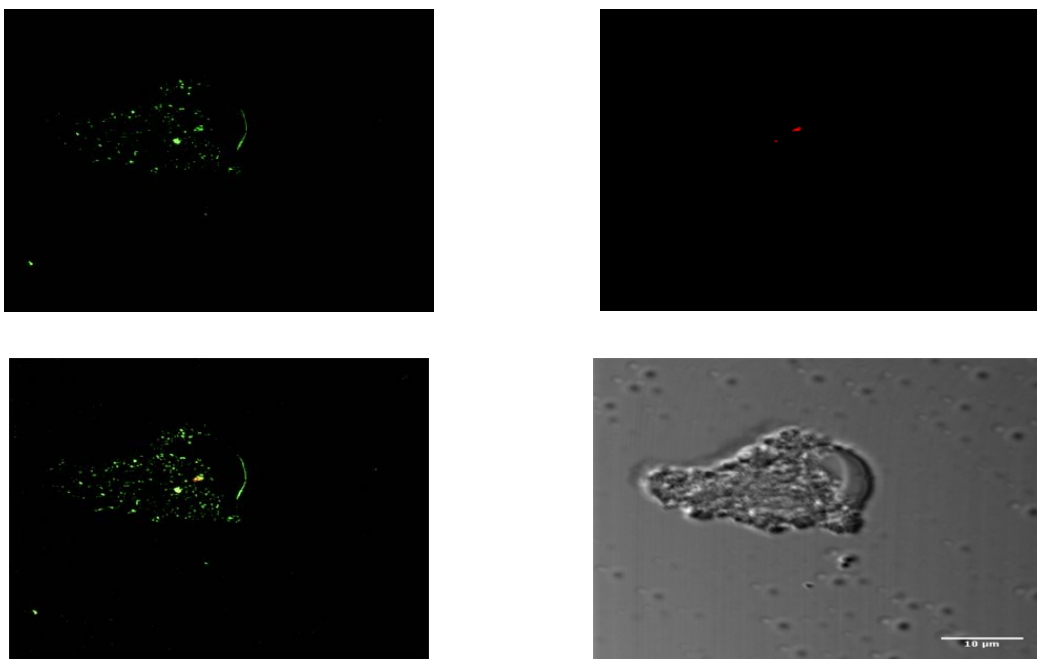
Kuva 4.9. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organelimarkkeriin (LAMP-1) PFA-fiksoiduissa soluissa 3h p.i. LAMP-1 = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.



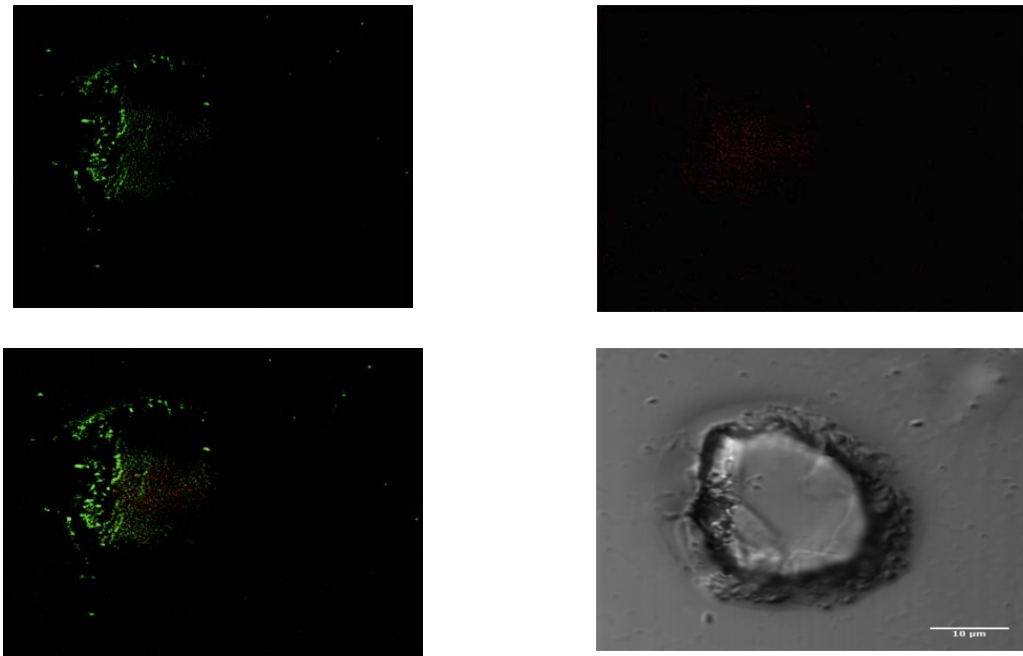
Kuva 4.10. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organelimarkkeriin (LC3) PFA-fiksoiduissa soluissa 3h p.i. LC3 = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.



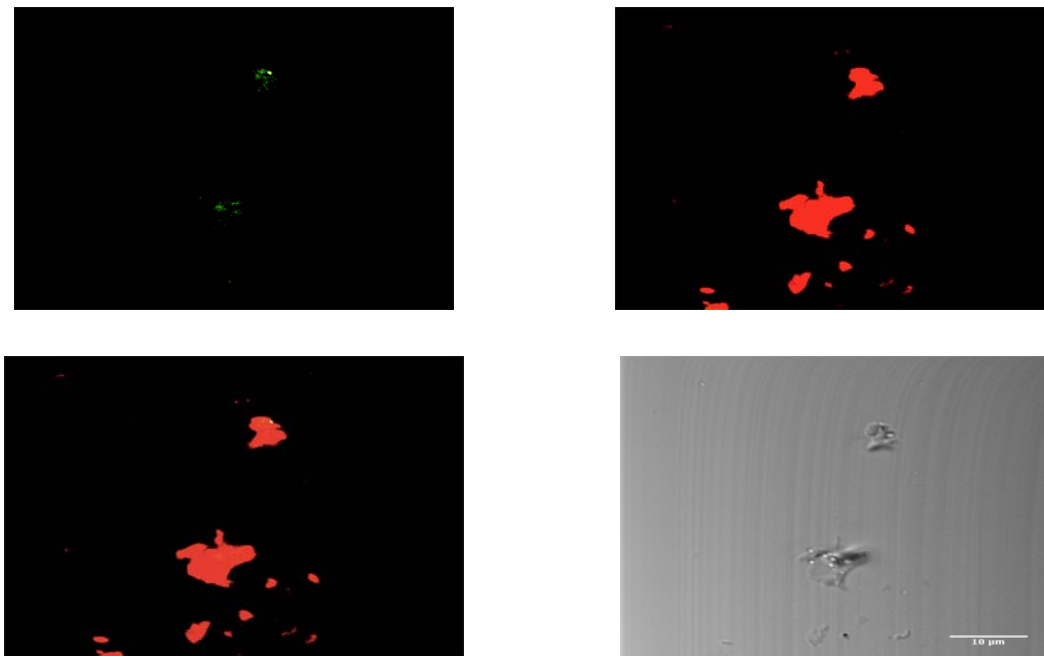
Kuva 4.11. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organellimarkkeriin (golgi) PFA-fiksoiduissa soluissa 3h p.i. golgi = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.



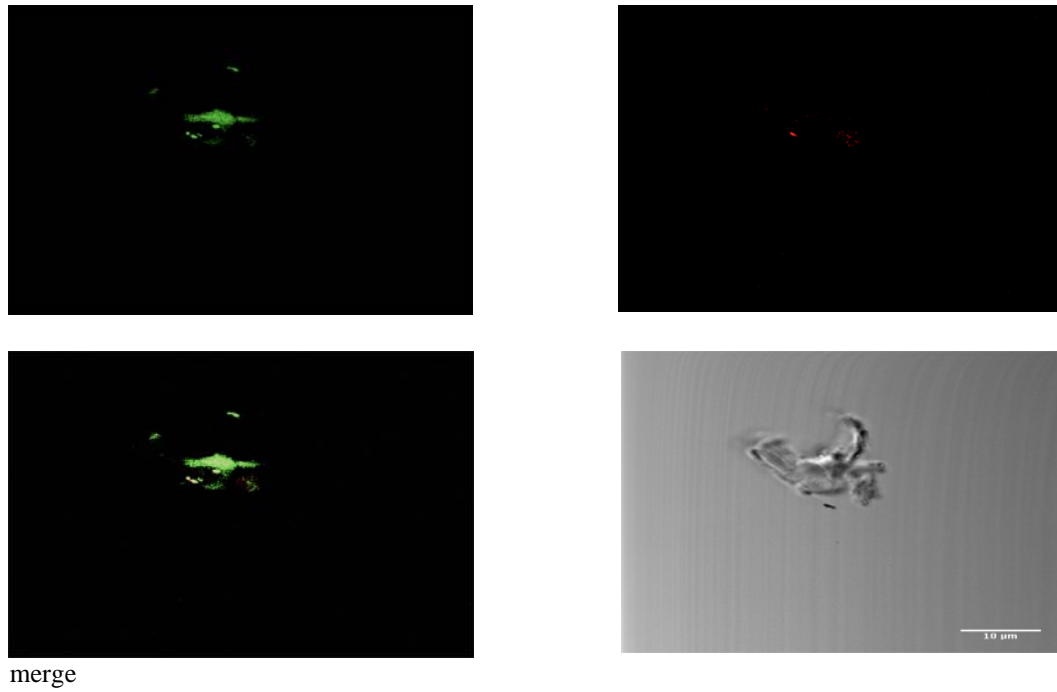
Kuva 4.12. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organellimarkkeriin (EEA-1) PFA-fiksoiduissa soluissa 12h p.i. EEA-1 = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.



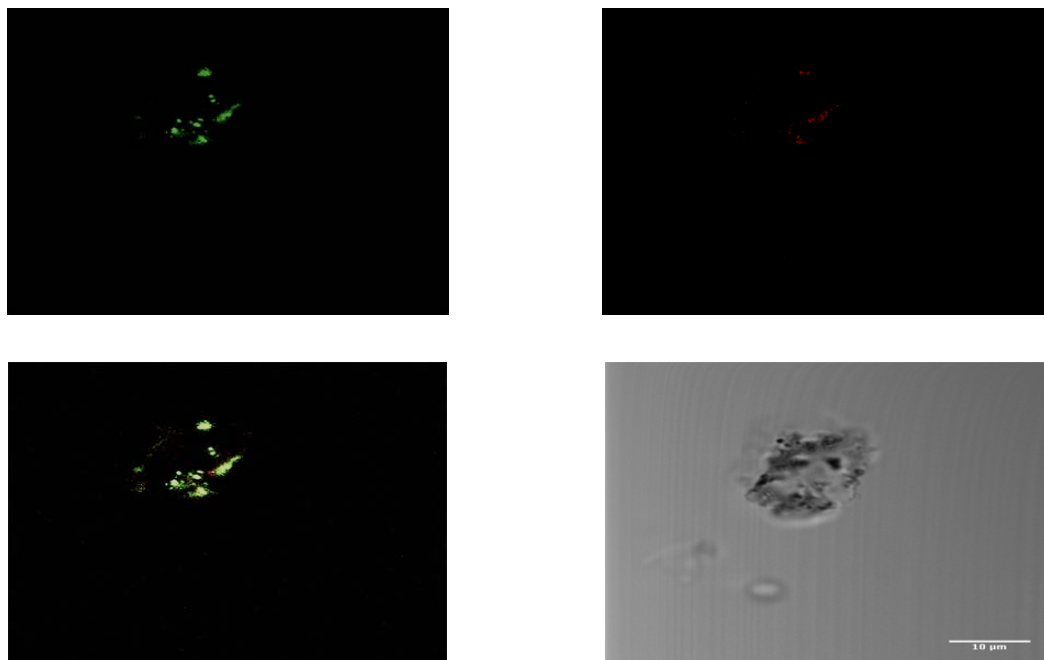
Kuva 4.13. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organellimarkkeriin (MPR) PFA-fiksoiduissa soluissa 3h p.i. MPR = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.



Kuva 4.14. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organellimarkkeriin (LAMP-1) PFA-fiksoiduissa soluissa 12h p.i. LAMP-1 = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.



Kuva 4.15. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organellimarkkeriin (LC3) PFA-fiksoiduissa soluissa 12h p.i. LC3 = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.

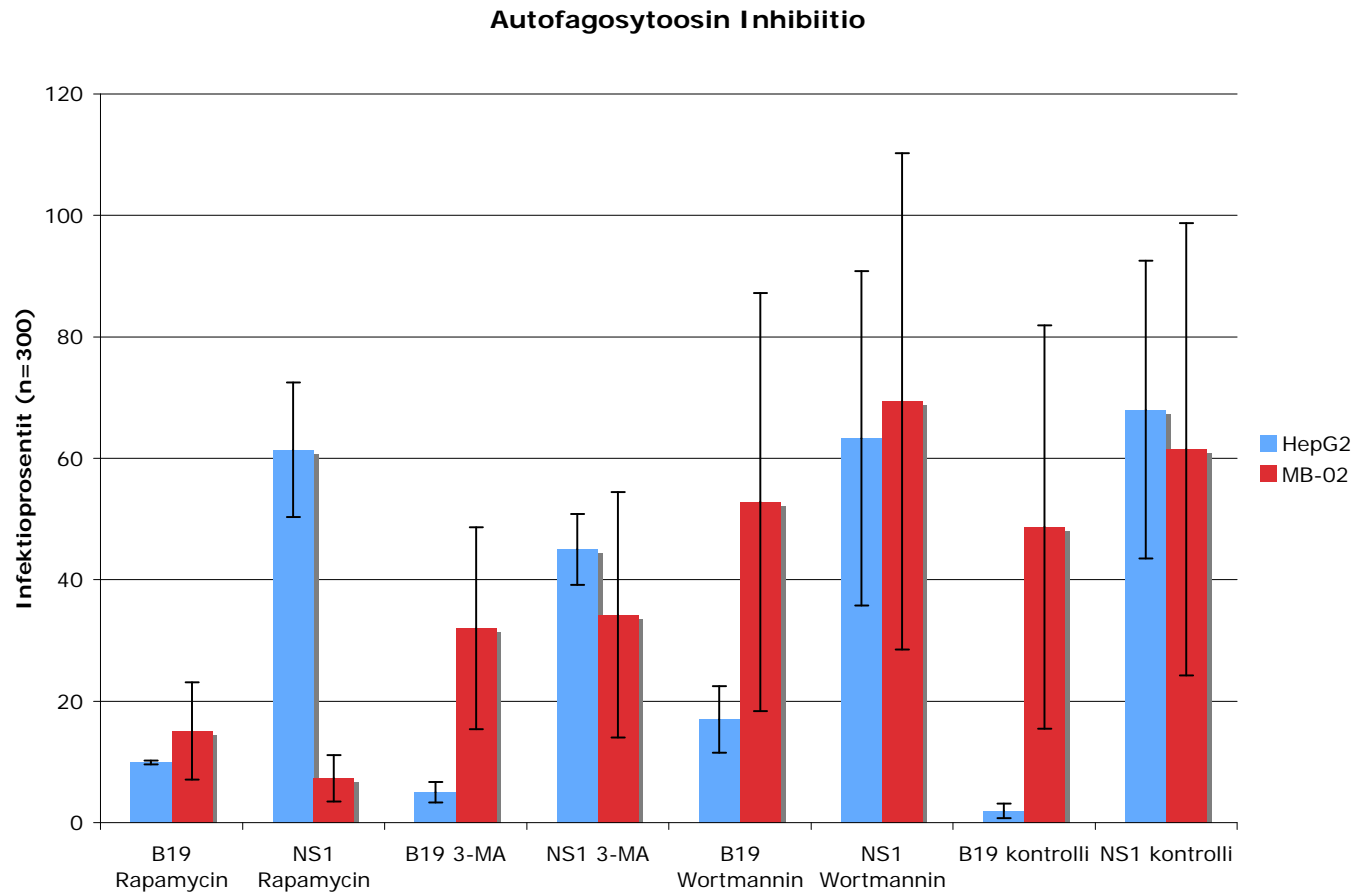


Kuva 4.16. B19-virusproteiinin lokalisaatio suhteessa organellimarkkeriin (golgi) PFA-fiksoiduissa soluissa 12h p.i. golgi = vihreä, B19 = punainen, kolokalisaatio = keltainen. Mittajana 10 µm.

Autofagosytoosin inhibiitiokokeet suoritettiin MB02- ja HepG2- soluille kolmella eri autofagosytoosiin vaikuttavalla aineella: wortmannin, 3-MA ja rapamysiini. Rapamysiini vaikuttaa säätelemällä autofagosytoosin aloitusta proteiinikinaasi Tor:n ("target of rapamycin") välityksellä. Normaaleissa olosuhteissa Tor inhiboi autofagosytoosia, mutta Tor:n inhiboiminen saa aikaan autofagosomien kasaantumisen. (Klionsky 2005)

3-metyyliadeniini (3-MA) inhiboi sisäsyntyisten proteiinien hajotusta toimien erityisesti autofagosomaalisella/lysosomaalisella hajotusreitillä (Seglen ja Gordon, 1981; Nakashima ym. 2006). Wortmannin on biologisessa tutkimuksessa laajasti käytetty penisilliini, joka inhiboi mm. PI3-kinaaseja. Sitä voidaan käyttää inhiboimaan solun sisäisen materiaalin eristystä ja estämään autofagosomin muodostusta. (Rich ym. 2003) Infektioprosenteista piirrettiin pylväsdiagrammit, joihin laskettiin myös tulosten keskihajonnat. Keskihajonta kuvaa havaintoarvojen ryhmittymistä keskiarvonsa ympärille; mitä pienempi hajonta, sitä lähempänä havaintoarvot ovat toisiaan. Tuloksia analysoitiin vertaamalla infektioprosentteja kontrolliarvoihin. Kuvaajasta nähtiin, että 3-MA inhiboi virusinfektiota vähentämällä B19-kapsidiproteiinien tuottoa MB02-soluissa ja NS1:n tuottoa molemmissa solulinjoissa. Wortmannin lisäsi B19-kapsidiproteiinien määrää molemmissa solulinjoissa ja vähensi NS1:n tuottoa HepG2 soluissa. B19-kapsidiproteiinien määrän kasvu HepG2-soluissa merkitsi myrkyä lisäävän soluun sisään pääsevien kapsidien määrää, koska vain MB02-soluissa voi tapahtua uusien kapsidien tuottoa. MB02-soluissa NS1:n tuotto lisääntyi hieman wortmanniinilla käsittelyn jälkeen. Rapamysiini vähensi huomattavasti NS1:n ja B19-kapsidiproteiinien tuottoa MB02-soluissa. HepG2-soluissa B19-kapsidiproteiinien tuotto lisääntyi ja NS1:n tuotto pysyi ennallaan rapamysiinin vaikutuksesta.

Tuloksia analysoitiin tilastotieteellisesti T-testin avulla ja saaduista p-arvoista tulkittiin tuloksen merkittävyys (raja-arvo 0.05). T-testissä tutkittavina olivat kaksi riippumatonta otosta, joilla on erisuuruinen varianssi. T-testissä verrattiin ko. myrkyä ja kontrollin välistä yhteyttä molemmilla solulinjoilla. HepG2-soluilla merkittävyyttä ($p \leq 0.05$) havaittiin B19-kapsidiproteiinien määrässä, kun soluja oli käsitelty wortmanniinilla. MB02-soluilla merkittävyyttä B19-kapsidiproteiinien ja NS1:n määrään aiheutti solujen käsittely rapamysiinillä.

Taulukko 4.2. Autofagosytoosin inhibiitio; infektioprosentit ja niiden keskihajonnat**Taulukko 4.3.** T-testin p-arvot (t-testit liitteenä)

HepG2	p-arvo	MB02	p-arvo
B19 Rapamycin	0.1071	B19 Rapamycin	0.02477
B19 Wortmannin	0.0357	B19 Wortmannin	0.8271
B19 3-MA	0.0681	B19 3-MA	0.2174
NS1 Rapamycin	0.7002	NS1 Rapamycin	0.005849
NS1 Wortmannin	0.8374	NS1 Wortmannin	0.7048
NS1 3-MA	0.2426	NS1 3-MA	0.1126

Autofagosomisten vesikkelien tilavuutta (μm^3) analysoitiin Image J-ohjelman particle analysis-sovelluksen avulla. Tarkoituksena oli selvittää kasvaako LC3-positiivisten vesikkelien tilavuus ja lukumäärä B19-virusinfektion jälkeen. Analyysissa infektoituneiden MB02- ja HepG2-solujen LC3-positiivisten vesikkelien tilavuutta verrattiin kontrollisoluihin.

Analysoitavien vesikkelien lukumäärät MB02-soluissa erosivat huomattavasti: B19-infektoituneessa solussa vesikkelejä oli keskimäärin 8 kpl/solu, kontrollisolussa 36 kpl/solu. HepG2-soluissa ei ollut yhtä huomattavaa eroa, B19-infektoituneessa solussa vesikkelejä oli 24 kpl/solu ja kontrollisolussa 30 kpl/solu. B19-infektoituneissa HepG2-soluissa LC3-positiivisten vesikkelien tilavuus vaihteli 21-282 μm^3 välillä ja tilavuuksien keskiarvo oli 87 μm^3 . HepG2-kontrollisolujen LC3-positiivisten vesikkelien tilavuus vaihteli välillä 21-680 μm^3 ja keskiarvo oli 106 μm^3 . B19-infektoituneissa MB02-soluissa autofagosomisten vesikkelien tilavuus vaihteli 27-279 μm^3 välillä ja tilavuuksien keskiarvo oli 105 μm^3 . Vastaavat arvot olivat MB02 kontrollisoluilla 20-570 μm^3 ja 84 μm^3 .

5. TULOSTEN TARKASTELU

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ihmisen parvoviruksen solun sisäistä reittiä sekä autofagosytoosin mahdollista roolia virusinfektion etenemisessä. Ihmisen parvoviruksen solunsisäistä reittiä ei ole aiemmin näin laajasti tutkittu, joten tulokset olivat mielenkiintoisia. Oletuksena oli, että MB02-soluissa B19-virus replikoituu ja tuottaa uusia viruspartikkeleja mutta HepG2-soluissa tapahtuu vain ei-rakenteellisen proteiinin, NS1:n, tuottoa. NLFK-solut otettiin tutkimukseen mukaan kontrollisolulinjaksi, koska niissä ei oletettu tapahtuvan viruksen sisäänottoa. Kuitenkin tulokset osoittivat oletuksemme NLFK-soluista vääräksi ja niiden rooli negatiivisena kontrollina muuttui tutkimusten edetessä.

B19-viruksen solunsisäistä reittiä kartoitettiin kolmoisleimatuilla näytteillä, joita tutkittiin konfokaalimikroskoopilla. Visuaalisen tarkastelun apuna käytettiin kolokalisaatioanalyysiä virusproteiinin paikannuksessa. Konfokaalimikroskoopilla kuvatuissa MB02-solujen 3D-kuvissa B19-virus nähtiin rakenteissa, jotka olivat mahdollisesti lähellä LC3-positiivisia rakenteita (autofagosomit) ja golgin laitetta, kun virusinfektio oli edennyt 5 minuuttia. Pearsonin vakio molemmille rakenteille oli 0.5. Tätä ei kuitenkaan pidetty merkittävänä, koska kolokalisaatiota tarkoittavaksi Pearsonin vakion rajaksi oli aiemmin määritelty 0.7. HepG2-soluissa virus oli solun ulkopuolella 5 minuuttia infektion alkamisesta. NLFK soluissa virus oli päässyt soluun sisään. Tästä voidaan päätellä, että B19-virus pääsee NLFK-soluihin todennäköisesti epäspesifisen endosytoosin seurauksena, koska NLFK-soluilta puuttuu vaadittava reseptori viruksen normaaliin sisäänottoon. Missään tutkituista kolmesta solulinjasta ei havaittu kolokalisaatiota viruksen ja varhaisten endosomien markkerin (EEA-1) kanssa. Nämä tulokset osoittavat, että B19-virus ei käytä klatrinivälitteistä endosytoosia (markkeri EEA-1) soluun sisään menossa. Ihmisen parvoviruksen sisäänoton alkuvaihetta tulee tulevaisuudessa tutkia eri markkerien avulla.

Infektion edettyä 30 minuuttia MB02-soluissa ei nähty kolokalisaatiota minkään rakenteen ja viruksen välillä. HepG2-soluissa kolokalisaatiota havaittiin myöhäisten endosomien (MPR, $r=0.7$) kanssa ja siitä voitiin päätellä viruksen käyttävän endosytoottista reittiä HepG2-soluihin sisään menossa. NLFK-soluissa virus ei kolokalisoinut minkään rakenteen kanssa 30 minuutin jälkeen. Tunti infektion aloituksesta virus ei kolokalisoinut minkään rakenteen kanssa ja tulos oli kaikilla solulinjoilla sama. 3 tuntia infektion alkamisesta MB02-soluissa kolokalisaatiota nähtiin MPR-positiivisten rakenteiden kanssa, joka voi tarkoittaa myöhäisiä endosomeja tai trans-golgia. Tämä tukee tuloksia, joita on saatu aiemminkin parvovirusten kanssa; AAV-5-viruksen on nähty kasautuvan 3 tuntia infektion jälkeen golgin laitteen alueelle. (Bantel-Schaal ym. 2002) NLFK- ja HepG2-soluissa ei havaittu kolokalisaatiota. 6 tuntia infektion aloituksesta, virus ei kolokalisoinut minkään rakenteen kanssa millään kolmesta solulinjasta.

12 tuntia infektion alkamisesta B19-viruksen nähtiin kolokalisoiivan LC3-positiivisten rakenteiden kanssa MB02-soluissa. HepG2- ja NLFK-soluissa kolokalisaatiota ei ollut. Autofagosytoosin eri muodoista makroautofagosytoosissa tapahtuu autofagosomien ja lysosomien fuusioitumista. (Katsausartikkelissa Cuervo 2004b; Eskelinen 2006) Aiemmissä tutkimuksissa (UT7-solut) oli havaittu B19-viraalisen DNA:n läsnäolo sytoplasmisissa rakenteissa sekä tumassa 2 tuntia infektion jälkeen. Kolokalisaatio tumarakenteiden kanssa vahvistui kun infektion annettiin edetä 6 tuntia. (Gallinella ym. 2000) Saamamme tulokset osoittivat, että virus oli päässyt/joutunut autofagosomien sisään permissiivisen MB02-solulinjan soluissa, mutta semipermissiivisissä (HepG2) soluissa ja non-permissiivisissä (NLFK) soluissa viruksen kerääntymistä autofagosomaalisiin rakenteisiin ei havaittu. Tulos viittaa siihen, että virus kulkeutuu autofagosomeihin vasta replikaatiovaiheen jälkeen, mitä semipermissiivisissä ja non-permissiivisissä soluissa ei tapahdu. Virus saattaa olla autofagosomeissa piilossa solun omalta immuunipuolustukselta tai se voi olla tulossa solusta ulos autofagosomien sisällä. On myös mahdollista, että solu on eristänyt B19-viruksen autofagosomin sisään ja hajottaa sen siellä lysosomaalisten hydrolaasien avulla. (Nakashima ym. 2006).

Autofagosytoosin roolia B19-infektiossa tutkittiin käsittelemällä HepG2- ja MB02-soluja autofagosytoosia inhiboivilla aineilla. Soluista määritettiin B19-kapsidiproteiinin ja NS1:n läsnäolo ja tuloksia verrattiin kontrollisoluihin. Infektioprosenteista laskettiin keskihajonnat, joiden avulla määritettiin tuloksen merkittävyys (raja-arvo 0.05) T-testillä.

Rapamysiini vaikuttaa säätelemällä autofagosytoosin aloitusta proteiinikinaasi Tor:n ("target of rapamycin") välityksellä. Normaaleissa olosuhteissa Tor inhiboi autofagosytoosia, mutta Tor:n inhiboiminen saa aikaan autofagosomien kasaantumisen (Klionsky 2005).

Infektioprosenteista piirretystä kuvaajasta voidaan nähdä NS1:n ja B19-kapsidiproteiinien tuoton vähentyneen MB02-soluissa rapamysiinillä käsittelyn jälkeen. T-testistä saadut p-arvot (B19 0.02 ja NS1 0.005) tukevat myös tuloksen merkittävyyttä. Tästä voidaan päätellä autofagosytoosin hillitsevän/vähentävän B19-virusinfektiota. On kuitenkin hyvä huomioida, että rapamysiini ei ole kovin spesifinen ja voi vaikuttaa myös jossain muussa vaiheessa endosytoottista reittiä.

3-metyyliadeniini (3-MA) inhiboi sisäsyntyisten proteiinien hajotusta toimien erityisesti autofagosomaalisella/lysosomaalisella hajotusreitillä. Tutkimuksissa 3-MA:ta voidaan käyttää autofagosytoosin spesifisenä inhibiittorina. (Seglen ja Gordon, 1981; Nakashima ym. 2006) Tutkimuksissamme 3-MA vähensi B19-kapsidiproteiinien tuottoa MB02-soluissa sekä NS1:n tuottoa molemmissa solulinjoissa. Tulosta ei kuitenkaan voitu pitää merkittävänä. Kuvaajasta nähtiin molempien solulinjojen NS1:n ja B19-kapsidiproteiinien keskihajontojen sijoittuvan päällekkäin vastaavien kontrolliarvojen kanssa. Tästä jo voitiin päätellä, että tuloksilla ei ole merkittävyyttä ja tämä tulos vahvistui T-testin suorituksen jälkeen (p-arvot > 0.05).

Wortmannin on biologisessa tutkimuksessa laajasti käytetty penisilliini, joka inhiboi mm. PI3-kinaaseja. Autofagosytoosin tutkimuksissa sitä voidaan käyttää inhiboimaan solun sisäisen materiaalin eristystä ja siten estämään autofagosomin muodostumisen. (Rich ym. 2003) MB02-soluissa ei havaittu merkittävyyttä wortmannin-käsittelyn jälkeen. HepG2-soluissa wortmanniinilla käsittely aiheutti tumassa olevan B19-kapsidiproteiinin määrän rajun

vähenevän. Tuloksen analysointi T-testillä vahvisti tuloksen merkittävyyden ($p=0.0357$). Tästä voidaan päätellä, että virus tarvitsee autofagosytoosia mahdollisesti jo sisääntulovaiheessa ennen replikoitumistaan. On myös tietenkin mahdollista, että Wortmannin vaikuttaa johonkin muuhun vaiheeseen viruksen soluun tunkeutumisessa ja siten estää viruksen pääsyä tumaan.

Autofagosytoosin manipulaatiokokeen tulokset viittaavat siihen, että autofagosytoosilla saattaa olla rooli tuottoisan B19-infektion synnyssä permissiivisissä soluissa. Toisaalta, koska vain rapamysiini esti sekä NS1-tuoton että virusproteiinin kerääntymisen tumaan ja vain wortmanniini vaikutti semipermissiivisissä soluissa viruksen tumalokalisatioon, eivät tulokset anna suoraa vastausta autofagosytoosin tarpeellisuudesta virusinfektiossa. Lisäksi on muistettava, että rapamysiini ja wortmanniini ovat epäspesifisiä myrkyjä autofagosytoosille, joten näiden myrkyjen virusinfektiota hillitsevä vaikutus voi kohdistua myös toisaalle solunsisäisessä kuljetuskoneistossa. Koska autofagosytoosille spesifisimmän 3-MA:n vaikutus infektiin jäi melko merkityksettömäksi tilastotieteellisen analyysin seurauksena, jää autofagosytoosin tarpeellisuus B19-infektiossa vielä epäselväksi näiden kokeiden jälkeen.

Selvittääksemme indusoiko B19-infektio autofagosomien muodostusta tai muuttaako se niiden morfologiaa esim. kasvattamalla niitä analysoimme autofagosomisten vesikkelien lukumäärää ja tilavuutta Image J-ohjelman avulla. Aiemmissä tutkimuksissa oli huomattu autofagosomisten vesikkelien koon ja lukumäärän kasvavan 5 päivää B19- infektion jälkeen. Vastaavaa ei tapahtunut kontrollisoluissa. (Nakashima ym. 2006) Tässä tutkimuksessa soluja tutkittiin 12 tuntia infektion jälkeen. B19-infektoiduissa HepG2-soluissa LC3-positiivisten vesikkelien tilavuuksien keskiarvo ($87 \mu\text{m}^3$) oli pienempi kuin kontrollisoluissa ($106 \mu\text{m}^3$), eli koon kasvua ei nähty. MB02-soluissa tilanne oli päinvastainen, B19-infektoiduissa soluissa vesikkelien tilavuuksien keskiarvo ($105 \mu\text{m}^3$) oli suurempi kuin kontrollisoluissa ($84 \mu\text{m}^3$). Tulokseen tulee kuitenkin suhtautua varauksellisesti, koska analysoitavien vesikkelien lukumäärä, joista keskiarvo laskettiin, oli eri B19-infektoituneissa soluissa (8 kpl) ja kontrollisoluissa (36 kpl). Tämä johtui B19-infektoituneiden MB02-solujen mahdollisesta

hajoamisesta tutkimuksen eri vaiheiden aikana sekä vaikeudesta pedata ja säilyttää solut objektilasilla.

Halusimme myös tietää, kuinka monta autofagosomia löytyy infektoiduista soluista verrattuna ei infektoituihin (vesikkeliä/ solu). B19-infektoiduissa MB02-soluissa LC3-positiivisten vesikkeliien määrä oli huomattavasti pienempi (8 kpl) kuin kontrollisoluissa (36 kpl). HepG2-soluissa ero oli pienempi, infektoiduissa soluissa oli 24 kpl LC3-positiivista vesikkeliä, ja kontrollisoluissa 30. Autofagosomien määrä näyttäisi laskevan B19 permissiivisissä soluissa, mutta pysyvän lähes samana semipermissiivisissä soluissa 12 h inokulaation jälkeen. Tämä voisi viitata autofagosomien hajoamiseen, fuusioitumiseen muihin kalvorakenteisiin tai autofagosomien tuoton vähenemiseen B19-infektion seurauksena. Koska vain permissiiviset solut reagoivat infektiioon, voidaan olettaa, että autofagosomien määrän väheneminen sekä autofagosomien koon suureneminen liittyvät viruksen replikaatioon ja uusien viruspartikkelien tuottoon, eivät pelkkään NS1-tuottoon tai viruksien läsnäoloon solussa. Aiemmat tulokset (Nakashima ym. 2006), jotka osoittivat autofagosomien määrän kasvaneen, oli saatu paljon pidemmällä infektiotaajalla (2 ja 5 päivää). Tämän kokeen tuloksena nähtiin B19-infektion kasvattavan autofagosomien kokoa, mutta autofagosomien lukumäärä ei suurentunut B19-infektion seurauksena. Mielenkiintoista olisi tutkia soluja pidemmällä infektiotaajalla ja verrata kasvaako autofagosomien koko edelleen ja toisaalta, vaikuttaisiko se autofagosomien lukumäärää kasvattavasti. Tulevaisuudessa kokeita suorittaessa solujen määrä olisi myös hyvä olla suurempi.

Yhteenvedona tämän tutkimuksen tuloksista havaittiin, että ihmisen parvovirus ei käytä klatriinivälitteistä endosytoosia soluun sisään menossa, koska viruksella ei havaittu kolokalisaatiota EEA1-markkerin kanssa. Viruksen kolokalisaatio 3 tunnin jälkeen MPR-positiivisten rakenteiden kanssa, sekä 12 tunnin jälkeen LC3-positiivisten rakenteiden kanssa osoittaa viruksen kulkeutuvan mahdollisesti myöhäisten endosomien kautta soluihin ja päätyvän replikaation jälkeen autofagosomaalisiin rakenteisiin, mikä vahvistaa aiemmissa tutkimuksissa saatuja tuloksia. (Bantel-Schaal ym. 2002; Nakashima ym. 2006) Viruksen solun sisäinen reitti, etenkin alku, jäi kuitenkin vielä osittain selvittämättä ja siksi

lisätutkimukset ovat tarpeellisia. Autofagosytoosin rooli virusinfektiossa osoittautui olevan kaksijakoinen, rapamysiinillä suoritettavat kokeet osoittivat autofagosytoosin hillitsevän virusinfektiota permissiivisissä soluissa, mutta toisaalta wortmanniinilla sekä 3-MA:lla ei näyttänyt olevan vaikutusta B19-infektiivisyyteen permissiivisissä soluissa. Sen sijaan wortmanniinilla suoritettavat inhibiitiokokeet semipermissiivisissä soluissa, joissa havaittiin kapsidien tumalokalisaation väheneminen, viittaavat viruksen tarvitsevan autofagosytoosia jo ennen viruksen replikaatiota. Virusten kyky manipuloida ja käyttää hyväksi autofagosytoosia on tunnistettu jo aiemmissä tutkimuksissa, mutta B19-viruksen kohdalla aihe vaatii vielä paljon lisää tutkimuksia. Autofagosytoosiin vaikuttaminen lääkekeinoin voisi mahdollisesti olla osana vähentämässä tulevaisuuden B19-infektioita.

KIRJALLISUUSVIITTEET

- Bantel-Schaal, U., Hub, B. ja Kartenbeck, J.** (2002) Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J Virol.* 76: 2340-2349.
- Bowles, DE., Rabinowitz, JE. ja Samulski, R.J.** (2006) "The genus *Dependovirus*". Parvoviruses (Kerr, JR., Cotmore, SF., Bloom, ME., Linden, RM., Parrish, CR.) 1. painos. Oxford University Press Inc. NY. 2: 15-21.
- Broliden, K., Tolfvenstam, T. ja Norbeck, O.** (2006) Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J Intern Med.* 260: 285-304.
- Brown, KE., Anderson, SM. ja Young, NS.** (1993) Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science.* 262: 114-117.
- Brown, KE., Hibbs, JR., Gallinella G., ym.** (1994) Resistance to parvovirus B19 infection due to the lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl. J Virol.* 330: 1192-1196.
- Brown, KE.** (2006) "The genus *Erythrovirus*". Parvoviruses (Kerr, JR., Cotmore, SF., Bloom, ME., Linden, RM., Parrish, CR.) Oxford University Press Inc. NY. 3: 25-26.
- Connor, SD. Ja Schmid, SL.** (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.
- Cooling, LL., Koerner, TA. Ja Naides, SJ.** (1995) Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *J Infect Dis.* 172: 1198-1205.
- Cossart, YE., Field, AM., Cant, B. ja Widdows, D.** (1975) Parvoviruslike particles in human sera. *Lancet.* 1: 72-73.
- Cuervo, AM.** (2004)a Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell Biochem* 263: 55-72.
- Cuervo, AM.** (2004)b Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14: 2
- Deretic, V.** (2006) Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol.* 18: 375-382.
- Dunn, W.A. Jr.** (1990) Studies on the mechanism of autophagy: Maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol.* 110: 1935-1945.
- Eskelinen, E-L.** (2005) Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* 1:1 1-10.
- Eskelinen, E-L.** (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med.* 27:495-502.
- Flint, SJ., Enquist, LW., Krug, RM., Racaniello, VR., Skalka, AM.** (2000) Principles of Virology, 1. painos, American Society of Microbiology. Washington, DC. 133-161.
- Gallinella, G., Manaresi, E., Zuffi, E., Venturoli, S., Bonsi, L., Bagnera, G.P., Musiani, M. ja Zerbini, M.** (2000) Different patterns of restriction to B19 parvovirus replication in human blast cell lines. *Virology.* 278: 361-367.

- Glaumann, H.** (1989) Crinophagy as a means for degrading excess secretory proteins in rat liver. *Revis Biol. Cellular* 20: 97-110.
- Heegaard, ED. ja Brown, KE.** (2002) Human Parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev.* 15: 485-505.
- Kerr, JR. ja Modrow, S.** (2006) "Human and primate erythrovirus infections and associated disease". Parvoviruses (Kerr, JR., Cotmore, SF., Bloom, ME., Linden, RM., Parrish, CR.) 1. painos. Oxford University Press Inc. NY. 27: 385-416.
- Klionsky, DJ.** (2005) The molecular machinery of autophagy : unanswered questions. *J Cell Sci.* 118: 7-18.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., Yoshimori, T.** (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 152: 657-667.
- Morita, E., Nakashima, A., Asao, H., Sato, H. ja Sugamura, K.** (2003) Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G₁ phase. *J Virol.* 77: 2915-2921.
- Morita, E ja Sugamura, K.** (2002) Human parvovirus B19-induced cell cycle arrest an apoptosis. *Springer Semin Immunopathol.* 24: 187-199.
- Mukherjee, S., Ghosh, N. ja Maxfield, FR.** (1997) Endocytosis. *Physiol Rev.* 77: 759-803.
- Munakata, Y., Saito-Ito, T., Kumura-Ishii, K., Huang, J., Koder, T., Ishii, T., Hirabayashi, Y., Koyanagi, Y., Sasaki, T.** (2005) Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 106: 3449-3456.
- Nakashima, A., Tanaka, N., Tamai, K., Kyuuma, M., Ishikawa, Y., Sato, H., Yoshimori, T., Saito, S. ja Sugamura, K.** (2006) Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology* 349: 254-263.
- Pelkmans, L, ja Helenius, A.** (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3: 311-320.
- Peterlana, D., Puccetti, A., Corrocher, R. ja Lunardi, C.** (2006) Serologic and molecular detection of human parvovirus B19 infection. *Clin Chim Acta.* 372: 14-23.
- Poole, BD., Zhou, J., Grote, A., Schiffenbauer, A. ja Naides, SJ.** (2006) Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein. *J Virol.* 80: 4114-4121.
- Poole, BD., Karetnyi, YV. ja Naides, SJ.** (2004) Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. *J Virol.* 78: 7775-7783.
- Rich, KA., Burkett, C. ja Webster, P.** (2003) Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol.* 5(7): 455-468.
- Seglen, P.O. ja Gordon, P.B.** (1981) 3-methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Cell Biol.* 79: 1889-1892.
- Shintani, T., ja Klionsky, DJ.** (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306: 990-995.
- Smith, AE. ja Helenius, A.** (2004) How viruses enter animal cells. *Science.* 304: 237-241.

Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G.B. ja Kondo, S. (2005) Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase b inhibitors. *Cancer Res.* 65: 3336-3346.

Tattersall, P. (2006) "The evolution of parvovirus taxonomy". Parvoviruses (Kerr, JR., Cotmore, SF., Bloom, ME., Linden, RM., Parrish, CR.) Oxford University Press Inc. NY. 1: 6-12.

Vihinen-Ranta, M., Suikkanen, S., Parrish, C.R. (2004) Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J Virol.* 78: 6709-6714.

Wang, C. ja Klionsky, D. (2003) The Molecular Mechanism of Autophagy. *Mol Med.* 9: 65-75.

Weigel-Kelley, KA., Yoder, MC. ja Srivastava A. (2001) Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J Virol.* 75: 4110-4116.

Weikel-Kelley, KA., Yoder, MC. ja Srivastava A. (2003) $\alpha 5\beta 1$ -integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of $\beta 1$ integrin for viral entry. *Blood* 102: 3927-3933.

Yorimitsu, T. ja Klionsky, DJ. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 12: 1542-1552.

Zhi, N., Mills, IP., Lu, J., Wong, S., Filippone, C. ja Brown, KE. (2006) Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1 and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virol.* 80: 5941-5959.

LIITTEET

Liite I. Autofagosytoosin inhibiitiokokeiden T-testit

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: HepG2 Rapamycin B19

Group 2: HepG2 ei myrkkyä B19

	Group 1	Group 2
Count	3	3
Mean	9.9	1.93333
Variance	26.17	1.52333
Std. Dev.	5.11566	1.23423
Std. Err	2.95353	0.712585
Mean Difference	7.96667	
Degrees of Freedom	2	
t Value	2.6221	
t Probability	0.1071	

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: HepG2 Rapamycin NS1

Group 2: HepG2 ei myrkkyä NS1

	Group 1	Group 2
Count	3	3
Mean	61.3667	68
Variance	123.213	600.67
Std. Dev.	11.1002	24.5086
Std. Err	6.40867	14.15
Mean Difference	-6.63334	
Degrees of Freedom	2	
t Value	-0.42703	
t Probability	0.7002	

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: HepG2 3-MA NS1

Group 2: HepG2 ei myrkkyä NS1

	Group 1	Group 2
Count	3	3
Mean	45.0333	68
Variance	34.1633	600.67
Std. Dev.	5.84494	24.5086
Std. Err	3.37458	14.15
Mean Difference	-22.9667	
Degrees of Freedom	2	
t Value	-1.5788	
t Probability	0.2426	

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: HepG2 Wortmannin NS1

Group 2: HepG2 ei myrkkyä NS1

	Group 1	Group 2
Count	3	3
Mean	63.3333	68
Variance	759.063	600.67
Std. Dev.	27.5511	24.5086
Std. Err	15.9066	14.15
Mean Difference	-4.66667	
Degrees of Freedom	3	
t Value	-0.2192	
t Probability	0.8374	

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: HepG2 3-MA B19

Group 2: HepG2 ei myrkkyä B19

	Group 1	Group 2
Count	3	3
Mean	5.03333	1.93333
Variance	2.86333	1.52333
Std. Dev.	1.69214	1.23423
Std. Err	0.976957	0.712585

Mean Difference	3.1
Degrees of Freedom	3
t Value	2.5636
t Probability	0.0681

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: HepG2 Wortmannin B19

Group 2: HepG2 ei myrkkyä B19

	Group 1	Group 2
Count	3	3
Mean	16.9667	1.93333
Variance	29.7633	1.52333
Std. Dev.	5.45558	1.23423
Std. Err	3.14978	0.712585

Mean Difference	15.0333
Degrees of Freedom	2
t Value	4.6552
t Probability	0.03573

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: MB02 Rapamycin B19

Group 2: MB02 ei myrkkyä B19

	Group 1	Group 2
Count	7	8
Mean	15.1286	48.6625
Variance	63.739	1104.55
Std. Dev.	7.98367	33.2347
Std. Err	3.01755	11.7503

Mean Difference	-33.5339
Degrees of Freedom	7
t Value	-2.7642
t Probability	0.02477

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: MB02 3-MA B19

Group 2: MB02 ei myrkkyä B19

	Group 1	Group 2
Count	6	8
Mean	32.0167	48.6625
Variance	113.822	1104.55
Std. Dev.	10.6687	33.2347
Std. Err	4.35549	11.7503

Mean Difference	-16.6458
Degrees of Freedom	8
t Value	-1.3283
t Probability	0.2174

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: MB02 Wortmannin B19

Group 2: MB02 ei myrkkyä B19

	Group 1	Group 2
Count	7	8
Mean	52.5714	48.6625
Variance	1184.97	1104.55
Std. Dev.	34.4233	33.2347
Std. Err	13.0108	11.7503

Mean Difference	3.90893
Degrees of Freedom	12
t Value	0.22297
t Probability	0.8271

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: MB02 Rapamycin NS1

Group 2: MB02 ei myrkkyä NS1

	Group 1	Group 2
Count	5	8
Mean	10.26	61.525
Variance	14.483	1389.32
Std. Dev.	3.80565	37.2735
Std. Err	1.70194	13.1782

Mean Difference	-51.265
Degrees of Freedom	7
t Value	-3.8581
t Probability	0.005849

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: MB02 3-MA NS1

Group 2: MB02 ei myrkkyä NS1

	Group 1	Group 2
Count	6	8
Mean	34.15	61.525
Variance	482.023	1389.32
Std. Dev.	21.955	37.2735
Std. Err	8.9631	13.1782

Mean Difference	-27.375
Degrees of Freedom	11
t Value	-1.7177
t Probability	0.1126

Student t Test for unpaired data with unequal variance

Group 1: MB02 Wortmannin NS1

Group 2: MB02 ei myrkkyä NS1

	Group 1	Group 2
Count	7	8
Mean	69.4	61.525
Variance	1670.94	1389.32
Std. Dev.	40.8771	37.2735
Std. Err	15.4501	13.1782

Mean Difference	7.875
Degrees of Freedom	12
t Value	0.3878
t Probability	0.7048