

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bio- ja elintarviketekniikka

Serranda Gashi

**HI-viruksen säätelyproteiinin Nef inhibiittorien etsintä
HIV-lääkkeen kehittämiseksi**

Insinööriyö 11.5.2010

Ohjaaja: filosofian tohtori Annika Järviluoma
Ohjaava opettaja: yliopettaja Marja Vaheeri

Tekijä Otsikko	Serranda Gashi HI-viruksen säätelyproteiinin Nef inhibiittorien etsintä HIV-lääkkeen kehittämiseksi
Sivumäärä Aika	75 sivua 11.5.2010
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja Ohjaava opettaja	filosofian tohtori Annika Järviluoma yliopettaja Marja Vaheri
<p>HI-virus eli ihmisen immuunikatovirus on lentivirus, joka kuuluu retrovirusperheeseen. Virus aiheuttaa immuunipuolustuksen heikkenemistä ja lisäksi tulehduksia ja kasvaimia. HIV infektoi isäntäsoluja tarttuessa kohdesolujen CD4-reseptoreihin, monosyytteihin ja makrofageihin. Retrovirukset sisältävät RNA-genomin ja käänteiskopioijaenstyymin, jonka avulla RNA-juoste kopioidaan DNA-muotoon. Muodostunut virus-DNA integroidaan isäntäsolun kromosomaaliseen DNA:han, ja näin isäntäsolu tuottaa infektiokykyisiä viruksia.</p> <p>HI-virus on ollut pitkään tuntematon, ja virusta alettiin tutkia vasta 1980-luvulla. HI-viruksen uskotaan olleen peräisin Keski-Afrikasta, ja se levisi Afrikasta Yhdysvaltoihin Haitin kautta 1960-luvun lopulla siirtolaisten mukana. Virus levisi ihmisten keskuudessa mm. suojaamattomassa seksissä ja suonensisäisten huumeiden käytön yhteydessä. Nykyään HIV on levinnyt kaikkialle maailmaan ja kasvanut yhdeksi historian pahimmista pandemiosta, jolle ei ole löydetty vielä parannuskeinoja.</p> <p>Insinööriyön tarkoituksena oli etsiä uusia lääkkeitä HI-viruksen infektiota vastaan. Työssä tutkittiin HI-viruksen Nef-proteiinin ja isäntäsolun proteiinikinaasin Hck SH3 vuorovaikutusta käyttäen ELISA-tyyppistä analyysiä. Toisena menetelmänä käytettiin solujen elävyyden mittausta, missä pyrittiin etsimään Hibertin ja Spectrum Microsource -kemikaalikirjastoista ne kemikaalit, jotka tappavat viruksen infektoimia soluja mutteivät vahingoita normaalisoluja.</p> <p>Proteiini-proteiini -interaktion inhibitiossa tarkoituksena oli löytää kemikaalit, jotka ihiboivat Nef-Hck SH3 -interaktiota mutteivät muiden SH3 -kontrolliproteiinien interaktiota. Tuloksista ilmeni, että kemikaalit vahingoittivat myös kontrolliproteiinien interaktiota, jolloin tulosten kannalta kemikaalit eivät ole hyviä inhibiittoreita spesifisessä Nef-Hck SH3 -interaktiossa. Solujen elävyyden mittauksen tuloksista löydettiin tutkittavista kemikaalikirjastoista ne kemikaalit, jotka tappoivat viruksen infektoituneita soluja, mutteivät normaalisoluja. Tulokset normalisoitiin tilastollisesti, minkä avulla saatiin luotettavimmat tulokset. Tuloksien mukaan löydettiin yhteensä 45 kemikaalia, jotka tappoivat Nef-proteiinia tuottavia soluja.</p> <p>Tutkimustuloksista saatiin lisää tietoa Nef-Hck SH3 -interaktiosta ja siitä, miten tutkittavat kemikaalit vaikuttavat interaktioon. Solujen elävyyden mittauksessa löydetyt kemikaalit voidaan näin testata sekundaariskriinuksella, jonka tarkoituksena on varmistaa, tappavatko kyseiset kemikaalit vain viruksen infektoituneita soluja, ja oliko kemikaalien tappokyky epäspesifinen saatujen tuloksien kannalta.</p>	
Hakusanat	HI-virus, retrovirus, Nef-proteiinikinaasi Hck SH3 -interaktio, solujen elävyyden mittaus, proteiini-proteiini-interaktion inhibitio

Author Title	Serranda Gashi The search of inhibitors for the Nef accessory protein of the HI virus in order to develop an HIV drug
Number of Pages Date	75 pages 11 May 2010
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor Supervisor	Annika Järviluoma, Doctor of Philosophy Marja Vaheri, Principal Lecturer
<p>HI virus, the human immunodeficiency virus is a lentivirus which is part of the retrovirus family. The virus causes a decline of immune response, which leads to infections and tumors. HIV infects host cells when attached to the CD4 receptors of target cells, monocytes and macrophages. Retroviruses include an RNA genome and a reverse transcriptase enzyme whereby the RNA strain is being copied to a DNA form. The virus DNA formed will be integrated to the chromosomal DNA of a host cell, and the cell will produce infectious viruses.</p> <p>HI virus had been unknown for long, but it was indentified in the 1980s. It is believed that the HI virus originated in Central Africa and spread from Africa to United States via Haiti at the end of the 1960s by immigrants. The Virus spread among humans through unprotected sex and intravenous use of drugs. Nowadays HIV has spread all around the world and grown to be one of the worst pandemic to which there no remedy has been found yet.</p> <p>The aim of the final year project was to seek new drugs for HI virus infection. The goal was also to explore the interaction of HI virus Nef protein and the host cell protein domain, protein kinase Hck SH3, by using an ELISA-like assay. As another assay cell viability assay was used for searching the Hibert, the US Food and Drug Administration, (FDA), Microsource Spectrum chemical libraries to find chemicals that kill the Nef protein-expressing cells but do not damage regular cells.</p> <p>The purpose of inhibiting protein-protein interaction is to find chemicals that inhibit the Nef-Hck SH3 interaction but do not inhibit the interaction of control proteins. The results showed that chemicals damaged also the interaction of control proteins, which suggests that chemicals were not good inhibitors for specifically preventing Nef-Hck SH3 interaction. The cell viability results enabled finding target chemicals in the chemical libraries used that are toxic to Nef-expressing cells but not to regular cells. The results were normalized statistically, which made them more reliable. According to the results, there were found all in all 45 chemicals that killed Nef-expressing cells.</p> <p>The results of this project gave new information on the interaction between Nef and Hck SH3 and the effects of the examined chemicals on this interaction. The target chemicals found in the cell viability assay can be tested as a secondary screen to find out whether, are those chemicals only toxic and specific to Nef-expressing cells.</p>	
Keywords	HI virus, retrovirus, Nef-protein kinase Hck SH3 interaction, cell viability assay, inhibition of protein–protein interaction

Sisällys

Alkusanat

Tiivistelmä

Abstract

1 Johdanto	8
KIRJALLINEN OSUUS	9
2 HIV-epidemia	9
2.1 HIV:n alkuperä	9
2.2 Taudin kulku ja sen aiheuttamat oireet	10
2.3 HIV-infektion hoito	12
2.3.1 Antiretroviraaliset terapiat (ART)	12
2.3.2 Rokotekehitykset	13
3 Retrovirukset	14
3.1 Retroviruksen rakenne	14
3.2 Retrovirusten elinkaari	14
3.3 Retroviruksen luokittelu	15
4 HIV:n alatyypit	16
5 Viruksen ominaisuudet	18
5.1 HIV-1:n rakenne	18
5.2 HIV:n toiminta	19
5.3 HIV-2 ja apinoissa esiintyvä virus (SIV, Simian immunodeficiency virus)	21
6 HIV:n toiminnalliset proteiinit	22
6.1 Nef-proteiini ja sen aiheuttama häiriö isäntäsolulla	23
6.1.1 HIV-reseptorien CD4:n ja MHC-molekyylien määrän vähentäminen isäntäsolun pinnalta Nef-proteiinin avulla	24
6.1.2 Nef-proteiini normaalin signaalin häiriötekijänä	25
6.2 Nef-proteiinikinaasi Hck SH3 -interaktio	25
6.2.1 Src-homologia 3 -domeenit (SH3)	25
6.2.2 Nef-proteiinin tarttuminen proteiinikinaasi Hck SH3 -domeeniin	26

KOKEELLINEN OSUUS	228
7 Työn tavoitteet ja kulku	28
7.1 Työn tausta ja tavoitteet	28
7.2 Työn kulku	28
8 Materiaalit ja menetelmät	31
8.1 Käytetyt solulinjat	31
8.1.1 Nef-geenin sisältämän virusvektorin tuotto	31
8.1.2 Nef-geenin siirto U2OS-soluihin, transfektoituneiden solujen selektointi ja viljely	32
8.2 Nef-proteiinin ilmenemisen suhteen tehty karakterisointi	33
8.2.1 <i>Mycoplasma</i> -kontaminaation testaus	36
8.3 ATP-analyysiin perustuva sytotoksisuuden mittaaminen	37
8.4 Nef-proteiinin ja sen kanssa vuorovaikuttavien ihmisen proteiinien tuotto	38
8.4.1 Tuotettujen proteiinien puhdistus bakteerisoluista	40
8.5 Proteiini-proteiini-interaktion tutkiminen	42
9 Tulokset ja tulosten tarkastelu	45
9.1 Solulinjan karakterisointi	45
9.1.1 Pwpi puro SF 2 Nef -proteiinin tuoton testaus	45
9.1.2 <i>Mykoplasma</i> -kontaminaation testaus	46
9.2 Nef-proteiinin sisältävien solujen elinkykyisyys	47
9.2.1 Solumäärän optimointi elävyystestiin	47
9.3 Kemikaalien vaikutus Nefiä tuottavien solujen elävyyden mittaaminen	49
9.3.1 Kemikaalien etsintä kemikaalikirjastoista	49
9.3.2 Matemaattinen osuus	53
9.3.2.1 Tulosten normalisointi B-score-menetelmällä	53
9.3.2.2 Haluttavuusfunktion muodostaminen	55
9.4 Proteiini-proteiini-interaktion inhibition tutkiminen pienimolekyylisiä kemikaaleja hyväksi käyttäen	57
9.4.1 Erilaisten proteiinien valinta laimennossarjan avulla ELISA-testiä käyttäen	57
9.4.2 Nef-Hck SH3 -interaktion ja kontrolliproteiinin interaktion inhibitio	59

10 Yhteenveto	64
Liitteet	72
Liite 1: R-ohjelman komennot	72
Liite 2: Kuoppalevyn muodostaminen Matlab-ohjelmassa	74
Liite 3: Haluttavuuskäyrät Nef-proteiinia tuottaville soluille ja normaalisoluille	75

1 Johdanto

Insinööriyö suoritettiin Helsingin yliopiston kliinisteoreettisen laitoksen virologian osastolla professori Kalle Sakselan tutkimusryhmässä keväällä 2009. Professori Kalle Sakselan tutkimusryhmä on perehtynyt tutkimaan virusten ja isäntäsolun vuorovaikutusta molekyylibiologian keinoin. Vuorovaikutuksen ymmärtäminen auttaa mm. syöpäsairauksien tutkimisessa. Sakselan ryhmä on keskittynyt selvittämään ihmisen immuunikatoviruksen (HIV, Human immunodeficiency virus) Nef-proteiinin vaikutuksia isäntäsolun toimintaan. (1.)

Insinööriyön tarkoituksena oli etsiä uusia lääkkeitä HIV-infektioon. Insinööriyössä tutkittiin HI-viruksen proteiinin ja isäntäsolun proteiinikinaasin Hck SH3 vuorovaikutusta käyttäen ELISA-tyyppistä analyysiä. Toisena menetelmänä kemikaalikirjastosta pyrittiin etsimään ne kemikaalit, jotka tappavat Nefiä tuottavat solut eivätkä vahingoittaisi normaalisoluja. Kemikaalikirjastot koostuivat Hibertin kemikaalikirjastosta, joka koostui noin 5000 kemikaalista, ja Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (FDA, Food and Drug Administration) Spectrum Microsource -kemikaalikirjastosta, joka koostui noin 2000 kemikaalista (2; 3).

KIRJALLINEN OSUUS

2 HIV-epidemia

Kolme vuosikymmentä sitten maapallolla levisi tuntematon tauti, joka tavattiin homoseksuaalisilla miehillä. Ihmisen immuunikatoviruksella on ollut pitkään tuntematon tausta, kuitenkin virusta vasta alettiin tutkia ja karakterisoidaan 1980-luvulla. Tautia epäiltiin olevan vain nuorilla homoseksuaalisilla miehillä, minkä jälkeen virus on levinnyt suonensisäisten huumeiden käytön yhteydessä läpi Euroopan ja Pohjois-Amerikan. (4, s. 464; 5, s.76; 15, s. 1352–1357.) Nykyään tauti on levinnyt maailmanlaajuisesti ja se esiintyy terveysongelmana yhteiskunnassa (6, s. 3).

Maailmassa tartunnan saaneita vuoden 2008 lopussa oli kaiken kaikkiaan 33,4 miljoonaa ihmistä, joista aikuisia oli 31,3 miljoonaa, naisia 15,7 miljoonaa ja alle 15-vuotiaita lapsia 2,1 miljoonaa. Uusia HIV-tartuntatapauksia vuoden 2008 lopulla on ollut 2,7 miljoonaa ihmistä lisää ja AIDSiin kuolleita on ollut 2 miljoonaa ihmistä. (14, s. 6.)

Afrikassa, Saharassa suuret valtakunnalliset epidemiat ovat pysyneet tasaisena ja alkaneet pikkuhiljaa laskemaan. Vuonna 2008 uudet HIV-tartuntatapaukset olivat laskeneet 25 prosenttia vuodesta 1995, jolloin saavutettiin epidemian huippu. Keski-Aasiassa ja Itä-Euroopassa epidemia on kasvanut nopeasti etenkin suonensisäisten huumeiden käytön keskuudessa. Ukraina ja Venäjä kärsivät eniten vaikeasta ja laajenevasta valtakunnallisesta epidemiasta. (14, s. 37, 48.)

2.1 HIV:n alkuperä

Yhdysvalloissa vuonna 1981 julkaistiin tieto uudesta immunikatotaudista, ja sitä aiheuttavan HI-viruksen löysivät vuonna 1982 ranskalainen virologi Luc Montagnier ja yhdysvaltalainen biolääketieteen tutkija Robert Gallo. (8, s. 12; 43, s. 8.)

HI-virus eli immuunikatoa aiheuttava virus on todennäköisesti peräisin Keski-Afrikasta, jossa samantyyppistä SI-virusta on tavattu myös vihreillä marakateilla ja eräillä simpanssilajeilla. Apinoille oli kuitenkin kehittynyt virukselle immuniteetti, eikä se siten sairastuttanut niitä. Tutkimusten mukaan HIV levisi Afrikasta Yhdysvaltoihin Haitin kautta 1960-luvun lopulla siirtolaisten mukana. (7, s. 150; 8, s.12.)

Kädellisten immuunikatotauti (AIDS, Acquired immunodeficiency syndrome) eli hankinnainen immuunivajaus on ihmisen immuunikatovirus (HIV) -tartunnan pitkälle edennyt muoto, mikä aiheuttaa kehon immuunijärjestelmän etenevän tuhoutumisen ja lopulta kuoleman. Virus on levinnyt ihmisten keskuudessa mm. suojaamattomassa seksissä, suonensisäisten huumeiden käytön yhteydessä sekä verensiirron välityksellä. Nykyään HIV on levinnyt kaikkialle maailmaan ja kasvanut yhdeksi historian pahimmista pandemioista, jolle ei ole löydetty vielä parannuskeinoja. (4, s. 471; 5 s. 81.)

Taulukko 1. HIV:n ja AIDS:n tilastolliset lukemat alueittain vuoden 2008 lopulla. (14)

Alue	HIV/AIDS elävillä aikuisilla ja lapsilla	Aikuiset ja lapset, uusia tartunta tapauksia	Aikuisten ja lasten kuolemat
Afrikka, Sahara	22,4 miljoonaa	1,9 miljoonaa	1,4 miljoonaa
Pohjois-Afrikka ja Lähi-Itä	31 000	35 000	20 000
Etelä- ja Kaakkois-Aasia	3,8 miljoonaa	280 000	270 000
Itä-Aasia	850 000	75 000	59 000
Oseania	59 000	3 900	2000
Latinalainen Amerikka	2,0 miljoonaa	170 000	77 000
Länsi-Intia	240 000	20 000	12 000
Etelä-Eurooppa ja Keski-Aasia	1,5 miljoonaa	110 000	87 000
Pohjois-Amerikka	1,4 miljoonaa	55 000	25 000
Länsi- ja Keski Eurooppa	850 000	30 000	13 000

2.2 Taudin kulku ja sen aiheuttamat oireet

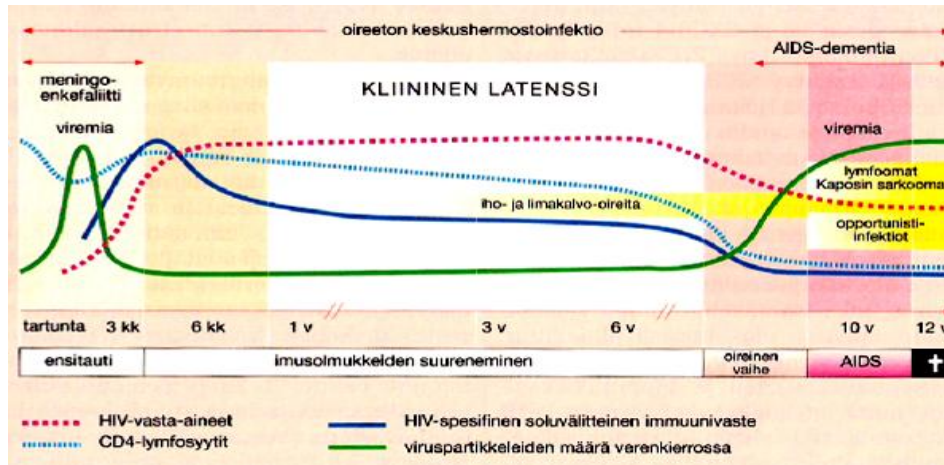
HIV:n aiheuttama krooninen infektio on monivaiheinen, ja sen kulku vaihtelee eri ihmisten välillä. AIDS-infektiossa on eri vaiheita, kuten ensitauti eli primaarisyndrooma, oireeton infektio, oireinen infektio, AIDS ja lopulta kuolema. HIV-tartunnan jälkeen AIDSin kehittyminen kestää noin kymmenen vuotta. Noin

2 – 6 viikon kuluttua HIV-tartunnasta henkilölle on muodostunut ensitauti. Tämän ensitaudin jälkeen tulee toinen vaihe, oireeton HIV-infektio, jossa imusolmukkeet suurenevat ja joka kestää pari vuotta tartunnan jälkeen. Oireettoman vaiheen lopussa immuunivasteen heiketessä henkilö saavuttaa HIV-tartunnan loppuvaiheen, AIDS-tilan. Ilman hoitoa AIDS johtaa kuolemaan noin 10 vuoden kuluttua. (5, s. 84–86.)

HIV-tartunnan saaneilla henkilöillä olevat oireet vaihtelevat eri ihmisten välillä, ja oireet johtuvat suureksi osaksi immuunipuolustukseen vähittäisestä heikkenemisestä ja sen seurauksena syntyvistä tulehduksista ja kasvaimista. HIV-tartunnan ensimmäinen vaihe, ensitauti, kestää vaihtelevasti yhdestä neljään viikkoon, ja sen oireet voivat olla lieviä, ja niitä vaikea erottaa tavallisesta flunssasta. Kuumeen lisäksi oireita voivat olla kurkkukipu, suurentuneet imusolmukkeet kaulalla, lihassäryt ja ripuli. (4, s. 468–469 ; 5, s. 84; 10, s. 575.)

Suurin osalle potilaista HIV-infektio ei aiheuta oireita moneen vuoteen, ja taudin etenemisnopeuteen vaikuttavat monet tekijät, kuten tartunnassa saadun virusannoksen suuruus ja viruksen ärhäkyys. Ensimmäisiä merkkejä alentuneesta immuunipuolustuksesta ovat iholla ja limakalvolla esiintyvät bakteeri-, virus- ja sieninfektiot. (4, s. 469; 5, s. 85.)

Oireelliseen HIV-infektion oireet saattavat olla epäspesifisiä, kuten väsymys, pitkään jatkuva kuumeilu, painonlasku, ripulijaksot, voimakas yöhikoilu tai seborrooinen ihottuma. HIV-spesifinen soluvälitteinen immuunivaste ja HIV-vasta-aineet ovat laskeneet jo oireisessa vaiheessa. AIDS-tilaan joutuessaan potilas on saanut HIV-tartunnan noin kymmenen vuotta sitten ja viruspartikkeleiden määrä on noussut korkealle. Oireita ovat mm. Kaposin sarkooma ja opportunistiset infektiot. Lopulta taudin lopussa seuraa henkilön kuolema, jos tautia ei ole hoidettu minkäänlaisin tavoin. Kuvassa 1 on esitelty HIV:n taudinkuvan eri vaiheet ja yleisimmät oireet. (5, s. 86; 10, s. 575.)



Kuva 1. HIV-infektion kulku ilman minkäänlaista hoitoa. (5, s. 80).

2.3 HIV-infektion hoito

HIV-infektion lääkehoito on viime vuosina kehittynyt merkittävästi. HIV-infektio on kuitenkin muuttunut krooniseksi, ja se vaatii seurantaa ja pitkäaikaista hoitoa. Lääkityksen tarkoituksena on hidastaa ja jopa estää viruksen lisääntymistä ja pääsemästä uusien isäntäsolujen sisään. (5, s. 101).

2.3.1 Antiretroviraaliset terapiat (ART)

Antiretroviraalisia lääkkeitä on nykyään hyväksytty 20 kappaletta, joita voidaan käyttää HIV:n terapiaa varten. Lääkkeet on jaettu kuuteen eri luokkaan, joiden tarkoituksena on häiritä viruksen lisääntyminen ja nämä eri luokat vaikuttavat HI-viruksen eri vaiheessa sen elinkierron aikana. Näitä luokkia ovat mm. nukleosidijohdannaiset käänteiskopioijan inhibiittorit (tsidovudiini, didanosini, stavudiini ym.), ei-nukleosidijohdannaiset käänteistranskriptaasi inhibiittorit (etraviriini, nevirapiini, efavirentsi), proteaasi-inhibiittorit (indinaviiri, sakinaviiri, ritonaviiri ym.), fuusioinhibiittorit (enfuvirtiidi), integraasi-inhibiittorit (raltegraviiri) ja kemokiini C5-reseptorin estäjät (maraviroki). (11, s. 527.)

HIV-lääkettä, tsidovudiinia, joka kuuluu nukleosidijohdannaisiin,

käänteiskopioijainhibiittoreihin, käytettiin ensimmäistä kertaa vuonna 1987. Tämän jälkeen HIV-infektion hoitoon oli kehitetty myös useita erilaisia nukleosidijohdannaisia lääkeaineita, mm. tsalsitabiini, didanosiiini ja stavudiini. (4, s. 472; 5, s. 99; 10, s. 579–580.)

HIV-infektiota ei voida parantaa kokonaan lääkkeillä, mutta infektion etenemistä voidaan hidastaa tehokkaalla 3 – 4 antiretroviraalisten lääkkeiden yhdistelmähoidolla (HAART-hoito, highly active antiretroviral therapy). HAART-terapia otettiin käyttöön vuonna 1996, ja sen avulla voitiin viruksen replikaatiota laskea huomattavasti ja pidentää HIV-positiivisen potilaan elinikää jopa vuosikymmenillä. Lääkkeet jaetaan kahteen eri ryhmään niiden vaikutusmekanismien mukaan, missä entsyymien estäjät vaikuttavat infektoituneen solun sisällä estäen viruksen jakautumisen. Toisessa ryhmässä olevat lääkkeet ovat fuusionestäjiä, jotka estävät viruksen kiinnittymisen ja tunkeutumisen terveisiin soluihin. (12, s. 618; 56.)

2.3.2 Rokotekehitykset

Nykypäivinä HI-viruksen rokotekehitys on edennyt hyvin hitaasti, johtuen viruksen valtavasta kapasiteetista ja lukuisista eri kantavaihteluista (11, s. 528). Ensimmäiset HIV-rokotteet oli valmistettu rekombinaatiomenetelmällä, joita olivat HIV:n vaipan glykoproteiini 120-, glykoproteiini 160- ja glykoproteiini 41 -rokotteet. Näiden tarkoituksena on saada aikaan neutraloivia vasta-aineita rokotteena käytettyjä HIV-kantaa vastaan, muttei niillä kuitenkaan ole saatu muodostettua neutraloivia vasta-aineita. (5, s. 103.)

Rokotekehitykset ovat vaikeita, koska HIV muuttaa muotoaan nopeasti. Sillä on taipumusta olla läsnä isäntäsolussa infektoimalla sen ja se voi pysyä isäntäsolussa lepotilassa, kunnes erilaisten tekijöiden aiheuttamana aktivoituu ja muodostaa virioneja. Rokotekehityksen huono puoli on myös se, että ei ole saatavilla sopivia eläinmalleja HI-virusta varten. Simpanssi on ainoa eläin, joka on altis HIV:lle. (12, s. 619.)

3 Retrovirukset

3.1 Retroviruksen rakenne

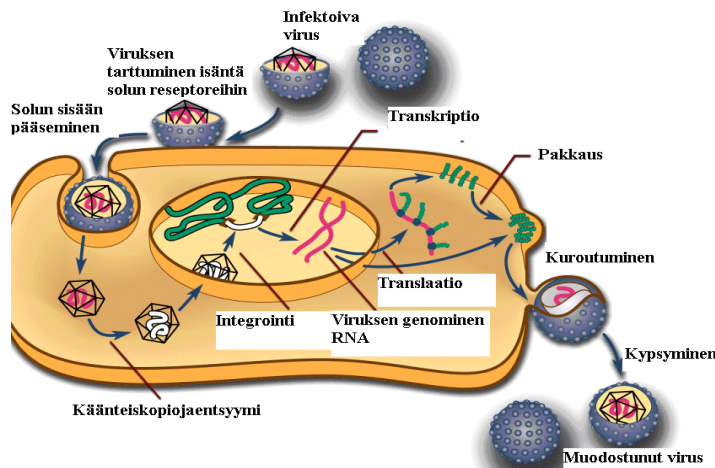
Retrovirusperhe on iso ja erilainen ryhmä muihin virusryhmiin verrattuna selkärankaisissa (26, s. 57). Retrovirusten rakenne on pyöreä ja halkaisijaltaan 80 – 100 nm, kuoreltaan sylinterimäinen. Retrovirukset sisältävät RNA-genomin ja käänteiskopioijaensytyimin eli DNA-polymeraasin, jonka avulla RNA-juoste kopioidaan cDNA-muotoon. Viruksen DNA integroidaan isäntäsolun genomiin viruksen integraasin avulla. (12, s. 589–593.)

Retroviruksen genomi muodostuu kahdesta indenttisestä yksittäisestä ja lineaarisesta RNA-positiivisesta molekyylistä, jossa kumpikin juoste on kooltaan 7 – 11 kiloemästä. Tästä RNA-genomista voi muodostua viruksen käänteiskopioijaensytyimin avulla kaksijuosteista DNA:ta, jolloin se pystyy integroitumaan isäntäsolun genomiin ja näin tuottaa retroviruksia erilaisten pakkausproteiinien (kuori- ja vaippaproteiinit) avulla. Retroviruksen partikkelit sisältävät spiraalimuotoisen ribonukleeiiniproteiinin kapsidissa, jota ympäröi ulommainen kuorikerros. Tämän ulommaisesta kuorikerroksen pinnalla on glykoproteiineja ja lipidejä. (12, s. 589–593.)

3.2 Retrovirusten elinkaari

Retrovirusten aiheuttamassa infektiossa viruspartikkelit kiinnittyvät isäntäsolun pinnan reseptoriin (kuva 2), jolloin viruksen kuori pääsee läpäisemään lipidikaksoiskerroksen ja sisältö pääsee solun sisään. Ensin tapahtuu virionin ja isäntäsolun membraanin fuusioituminen, jolloin nukleokapsidi pääsee isäntäsolun sisään (55, s. 2001–2004). Päästyään solun sisään käsiksi virus alkaa käänteiskopioijaensytyimin avulla tuottaa viruksen genomin RNA:sta DNA:ta. Tällöin muodostunut DNA integroituu sattumanvaraisesti isäntäsolun kromosomaaliseen DNA:han, jolloin sitä kutsutaan provirukseksi. Provirus transkriptoidaan isäntäsolun RNA-polymeraasilla

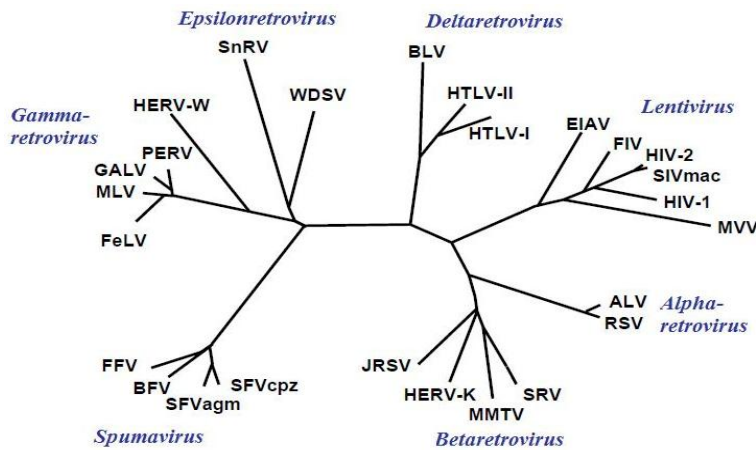
muodostamaan viruksen genomista RNA:ta ja lähetti-RNA:ta. Tämän jälkeen viruksen lähetti-RNA:sta syntetisoidaan viruksen kuori- ja vaippaproteiinit, jossa muodostuneet proteiinit ja genominen RNA pakataan ja viruspartikkeli kuroutuu ulos isäntäsolusta ja jatkaa kypsymistä. (12, s. 592–594.)



Kuva 2. Retrovirusten elinkaari. (29).

3.3 Retroviruksen luokittelu

Kaikilla retroviruksilla on samanlainen morfologia, mutta kuitenkin retroviruksilla on eroja (kuva 3) (27, s. 31). *Retroviridae*-perhe on jaettu seitsemään sukuryhmään: *Alpharetrovirus*, joka sisältää lintujen leukosyytti- ja sarkoomaviruksia, *Betaretrovirus*-sukuun kuuluu mm. hiiren kasvainvirus, *Gammaretrovirus*-sukuun kuuluu mm. erilaisia nisäkkäille syöpää aiheuttavia viruksia, *Deltaretrovirus*-sukuun kuuluu mm. ihmisen T-lymfosyyttinen virus (HTVL), *Epsilonretrovirus*-sukuun kuuluu mm. kaloille ihosyöpää aiheuttavia viruksia, *Spumavirus*-suku sisältää viruksia, joilla on kyky aiheuttaa ”vaahtomaisia” ominaisuuksia, ja *Lentivirus* sisältää viruksia, jotka kykenevät aiheuttamaan kroonisia infektiota ja hitaasti eteneviä neurologisia tauteja, kuten ihmisen immuunikatovirus. (12, s. 590; 27, s. 32–33.) Retrovirukset on luokiteltu myös yksinkertaisiin ja monimutkaisiin retroviruksiin, jotka sisältävät gag-, pro-, pol- ja env-geenin. Monimutkaisiin retrovirukset sisältävät myös säätelyproteiinit mainittujen geenien lisäksi (55, s. 2001).



Kuva 3. Retrovirusten luokittelu. (13).

4 HIV:n alatyypit

HIV pääsi ihmiskuntaan kädellisistä ei-ihmistyyppisistä yksilöistä Afrikassa ristilajien leviämisen kautta (16, s. 18;17;18;19). HIV:llä on kaksi eri tyyppiä, HIV-1 ja HIV-2, jossa molemmat tarttuvat yhdynnän tai veren kautta tai äidistä lapseen aiheuttaen lopulta AIDSin. Näillä eri tyypeillä on vielä erilaisia alatyyppejä, jotka on luokiteltu eri maiden mukaan. (20.)

HIV-1:n ryhmiä on tällä hetkellä luokiteltuna neljä, M (pääasiallinen), O (ulkopuolella oleva) ja kaksi uudempaa ryhmää, N (ei-M, ei-O) ja P. Nämä HIV-1:n ryhmät liittyvät viruksiin, jotka esiintyvät simpansseilla ja gorilloilla Länsi-Afrikassa. HIV-2 on saanut alkunsa myös Länsi-Afrikasta, ja se liittyy läheisemmin simpanssin simian-immuunikatovirukseen (SIV), luonnossa eläviin ”sooty mangabey” -apinoihin. Tällä hetkellä uskotaan HIV-2:n edustavan simpanssin SIV:n zoonoottista siirtymistä ihmiseen. Myös HIV-2:lla on kaksi ryhmää, O ja P. (11, s. 524; 16, s. 18; 20; 21, s. 8-9.)

HIV-1:n M-ryhmä sisältää yli 95 % maapallon virusisolaateista, mikä aiheuttaa suuren HIV-infektio pandemian. HIV-1:n M-ryhmällä on yhdeksän eri alatyyppeä; A, B, C, D, F, G, H, J ja K. Mainitut alatyypit on esitetty taulukossa 2. Ryhmän M yksittäiset alatyypit voivat muodostaa hybridejä, jolloin niitä kutsutaan kiertorekombinantti-

alatyypeiksi (CRF, circulating recombinant forms). (11, s. 524; 16, s.19; 20; 21, s. 8 – 9, 22.)

Ryhmän O jäsenet esiintyvät Länsi- ja Keski-Afrikassa asuvilla yksilöillä, ja tutkimuksen mukaan tämän ryhmän esiintyvyys on yleisintä Kamerunissa (24). Ryhmä N on löydetty vuonna 1998, se esiintyy vain Kamerunissa ja on hyvin harvinainen ryhmä. Vuonna 2006 todettiin, että vain 10 infektiotapauksista oli identifioitu N-ryhmälle (23, s. 83). Vuonna 2009 kamerunilaiselta naiselta identifioitiin uusi ihmisen immunikatovirus, joka on lähellä gorillan SI-virusta, eikä sillä ollut minkäänlaista yhteyttä muiden HIV-1 ryhmien kanssa. Tällöin tämä virus nimettiin P-ryhmäksi, joka kuuluu HIV-2 ryhmään. (25.)

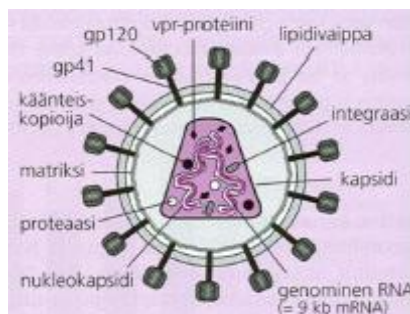
Taulukko 2. HIV-1:n M-ryhmän alatyypit. (20)

Alatyypit	Esiintyvyys
A	Länsi-Afrikka ja entinen Neuvostoliitto
B	Amerikka, Länsi-Eurooppa, Japani ja Australia
C	Etelä- ja Itä-Afrikka ja Intia
D	Itä- ja Keski-Afrikka
F	Keski-Afrikka, Etelä-Amerikka ja Itä-Eurooppa
G	Länsi- ja Keski-Eurooppa
H	Keski-Afrikka
J	Keski-Amerikka
K	Kamerun ja Kongo

5 Viruksen ominaisuudet

5.1 HIV-1:n rakenne

HI-virus eli ihmisen immuunikatovirus on retrovirus, joka kuuluu lentivirusten sukuun. HIV on 100 nm halkaisijaltaan oleva lipidivaipallinen ja pyöreäkö partikkeli, jonka uloimpana kerroksena on glykoproteiini-vaippa (kuva 4). Virus on lipidikalvon ympäröimänä, missä jokaisella viruspartikkelilla on 72 glykoproteiini-vaippaa, jotka ovat muodostuneet proteiineista gp120 ja gp41. Viruksen vaipan tärkein rakenne on gp120-molekyylit, jonka avulla se tarttuu kohdesoluihinsa. Viruspartikkelin sisällä ovat matriksi- ja ydinproteiinit sekä entsyymit (virusproteaasi, käänteiskopioija-DNA-polymeraasi, ribonukleaasi ja integraasi), joita virus tarvitsee oman lisääntymiskierronsa aloittamiseen ja kypsymiseen. Viruksen sisällä oleva matriksi on muodostunut proteiinista p17, joka muodostaa viruspartikkelin rakenteelle tärkeän ulkoseinän, jota taas ympäröi isäntäsolun ulkokalvosta peräisin oleva lipidivaippa. Kapsidi muodostuu proteiinista p24 ja ydinproteiinit (nukleokapsidit) muodostuvat proteiineista p9 ja p7. (4, s. 465–467; 5, s. 78–79; 10, s. 563–565; 30, s. 60–62.)

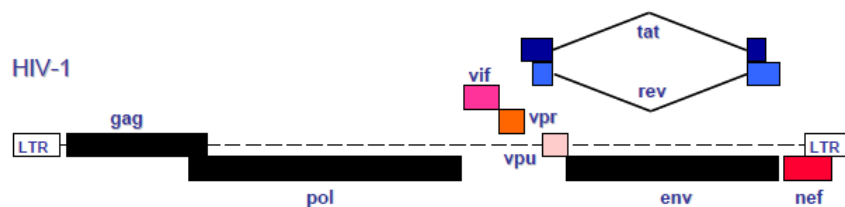


Kuva 4. HIV-1:n rakenne. (10, s. 564; 29, s.14).

HI-viruksen RNA on diploidinen, eli se koostuu kahdesta identtisestä yksisäikeisestä RNA-molekyylistä, joita ympäröi nukleokapsidiproteiini (p7). HIV-1:n genominen RNA on kooltaan 9,7 kiloemästä ja sisältää yhdeksän avointa lukuraamia (ORF) (kuva 5). Genomi koostuu kolmesta geenistä, gag, pol ja env, jotka toimivat lisääntymisen säätelijöinä ja kuudesta muusta geenistä (tat, rev, nef, vif, vpr ja vpu), jotka ovat säätelijägeenejä proteiineille. Nämä säätelygeenit säätelevät HIV-1:n kykyä infektoida

soluja tuottamalla uusia virusten kopioita tai aiheuttamalla sairautta. (4; 10; 26; 31, s. 12-14.)

Genomin kummassakin päässä on retroviruksille tyypillinen LTR-säätelyjakso (long terminal repeat), jonka jälkeen seuraa rakenneproteiinien gag-geeni, josta tuotetaan viruksen neljä eri rakenneproteiinia (p24-, p17-, p7- ja p6-proteiini viruksen proteaasista) yhteisenä polyproteiinina p55. Tämän jälkeen seuraa pol-geeni (polymeraasigeeni), jonka tarkoituksena on muodostaa viruksen entsyymit, kuten käänteiskopioija, proteaasi ja integraasi. HI-viruksen env-geeni (vaippageeni) tuottaa ulkoisen glykoproteiinin gp120 ja transmembraanin gp41 -proteiinin. Kypsä gp120/gp41-proteiini on kiinnittynyt vaippaan ei-kovalenttisilla sidoksilla, ja ne ovat vastuussa viruksen hyökkäyksestä uudelle isäntäsolukalvolle. Gag-, pol- ja env-geenit ovat yhteisiä kaikille retroviruksille, ainoastaan HIV-1:lle ominaiset proteiinit eroavat muista retroviruksista. Rakennusproteiineina toimivat mm. gag- ja env-proteiini, säätelyproteiineina toimivat pol-, rev- ja tat-proteiini ja avustusproteiinina toimivat nef-, vif-, vpr- ja vpu-proteiini. (4, s. 465–467; 12, s. 589, 605; 32, s. 5)



Kuva 5. HIV-1:n genomisen rakenne. ORF:t laatikkomuodossa. (28, s.14).

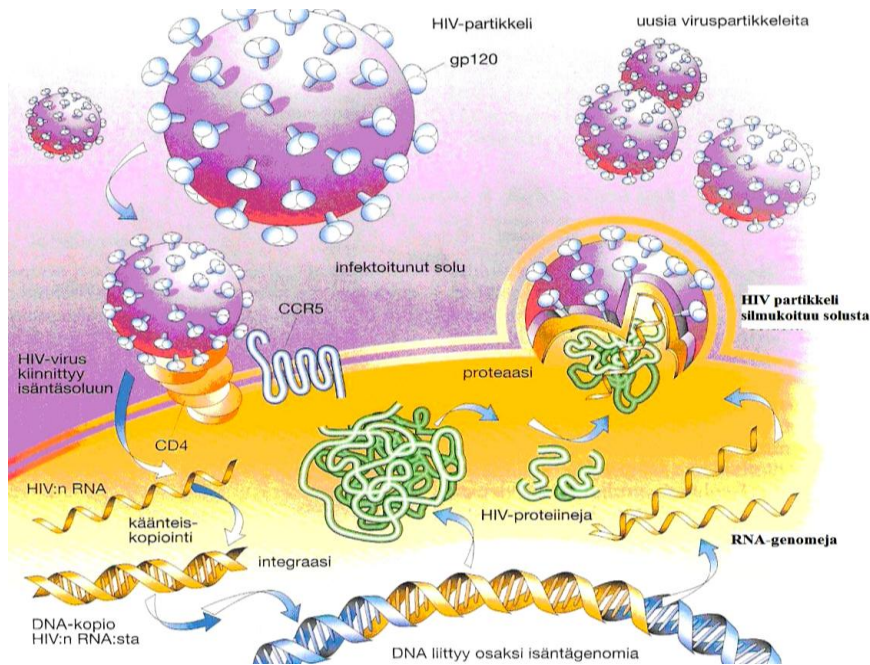
5.2 HIV:n toiminta

HI-viruksen elinsyklin aikana HIV-partikkeli kiinnittyy ja fuusioituu kohdesoluihin, mikä saa aikaan isäntäsoluille infektion. Viruksen pääasialliset kohdesolut ovat CD4-positiiviset T-auttajalymfosyytit, monosyytit ja makrofagit. CD4-positiivisten solujen eli ”T-auttajasolujen” roolina on toimia immuunivastetehtävissä, kuten viedä viestejä muille soluille, T-soluille ja B-muistisoluille suorittamaan tehtävänsä. (5, s. 78-79; 11, s. 523.)

Lentivirukset eroavat muista retroviruksista siinä mielessä, että ne voivat infektoida pitkälle erilaistuneita soluja, jotka eivät enää jakaudu (makrofagit, hermosolut) ja joilla on preintegraatiokompleksi eli viruspartikkelin proteiinit, jotka avustavat sytoplasmassa viruksen siirtymistä tumaan (10, s. 567; 12, s. 609).

HI-viruksen tärkein reseptori ihmiselimestössä on CD4-molekyylä, johon viruksen gp120-vaippaglykoproteiini tarttuu spesifisesti. HIV:n lisäreseptorina toimivat kaksi kemokiinireseptoria, β -kemokiinireseptori CCR-5 (esiintyy makrofagien pinnalla) ja α -kemokiinireseptori CXCR-4 (esiintyy lymfosyyttien pinnalla), johon jompaankumpaan CD4-molekyylä tarttuu. CD4-molekyyläin tarttunut gp-120 muuttaa muotoaan siten, että sillä on myös mahdollisuus sitoutua lisäreseptoriin (CCR-5 tai CXCR-4). Tämän seurauksena gp41 käynnistää viruksen vaipan ja kohdesolun ulkokalvon fuusion. (4, s. 467; 5, s. 79; 10, s. 566; 12, s. 610.)

Sitouduttuaan kohdesolunsa pintaan HIV tunkeutuu soluun, jossa sen ydin vapautuu ja viruksen genomä käänteiskopiointi käynnistyy heti. Viruksen genomisesta RNA:sta tehdään käänteiskopioijaentsyymien avulla kaksijuosteinen DNA-kopio. Tämä muodostunut DNA-kopio HI-viruksen RNA:sta kulkeutuu tumaan, missä osa jää sytoplasmaan integroitumattomana ja osa integroituu viruksen oman entsyymien, integraasin avulla isäntäsolun kromosomaaliseen DNA:han. Integroitu provirus alkaa toimimaan templaattina viruksen proteiinisynteesille ja lopulta tuottaa uusia infektiokykyisiä viruksia. Muodostunut provirus transkriptoidaan RNA-polymeraasilla muodostamaan viruksen genomisen RNA:n ja mRNA:t, minkä jälkeen translaatiossa tuotetaan HIV-proteiineja. Lopulta viruksen proteiinit ja genomisen RNA kootaan solukalvolla ja viruspartikkelit muodostuvat silmukoimalla solusta proteaasin avustuksella, joka käsittelee polypeptidikursorit viruksen kuoren muodostumista varten. Isäntäsolusta kuroutuneet uudet HI-viruksen partikkelit jatkavat kehittymistä ja kypsyvät HI-viruksiksi. Yksittäinen solu voi muodostaa HIV:n infektiopartikkeleita joko kroonisesti viikkojen ajan tai yksittäinen puhjenta aiheuttaa solun kuoleman. (4, s. 467; 5, s. 79; 10, s. 567; 11, s. 524–525.)



Kuva 6. HIV:n lisääntymismekanismi isäntäsolulla. (5, s. 78).

5.3 HIV-2 ja apinoissa esiintyvä virus (SIV, Simian immunodeficiency virus)

HIV-2 on yksi HIV:n tyypeistä, joka kuuluu ihmisen retrovirusryhmään. Se on läheistä sukua apinan vastaavalle virukselle SIV ja aiheuttaa immuunikadon HIV-1:n tapaan. Sen patogeenisuutta katsotaan olevan kuitenkin vähäisempi kuin HIV-1:n. SI-virus on peräisin Länsi-Afrikassa elävistä ”sooty mangabey” –apinoista, ja HIV-1:n ja HIV-2:n ajatellaan olevan peräsin esiviruksesta. HIV-2 myös aiheuttaa isäntäsolulle elinikäisen infektion, missä viruksen geneettinen materiaali on integroitunut pysyvästi isäntäsolun DNA:han. (4, s. 464–465; 12, s. 607; 26, s 131–132.)

HIV-2 on muodoltaan pyöreä ja halkaisijaltaan 100–200 nm virus, joka on morfologisesti samanlainen kuin HIV-1. HIV-2:n genomi on pituudeltaan 9 kiloemästä. Kädellisten lentivirusten (ihminen ja simian) genomi on hyvin samanlainen, mutta eroaa siitä, että HIV-1 ja simpanssin virus kantavat vpu-geenin, jota ei esiinny HIV-2:ssa, kun taas HIV-2 ja SIV kantavat vpx-geenin, mikä ei esiinny HIV-1:ssä. HIV-2 infektoi

samalla tavalla CD4-reseptoria kuten HIV-1, mutta sen affiniteettitaso on 10–100 kertaa matalampi, jolloin HIV-2 infektiota pystytään inhiboimaan tehokkaammin kuin HIV-1:n infektiota. (12, s. 607- 608; 26, s. 132.)

SIV eli simian-immuunikatovirus on myös retrovirus, jota on löydetty erilaisista Afrikassa asuvilta kädellisiltä. HIV:n uskotaan päässeen ihmiskuntaan ristilajien leviämisen kädellisten, kuten eräiden apinoiden ja simpanssien kautta, minkä seurauksena HIV-2 ja HIV-1 saivat alkunsa. Toisin kuin ihmisen HIV-1- ja HIV-2-infektiot, SIV-infektiot, jotka esiintyvät tavallisessa simian isäntäsoluissa, eivät aiheuta sairautta. (10, s. 560; 16, s. 18; 17; 18; 19; 26, s. 208.)

6 HIV:n toiminnalliset proteiinit

HIV-1:n genomi on koostunut rakennusproteiineista, joita ovat gag- ja env-proteiini, ja säätelyproteiineista, joita ovat pol-, nef-, vif-, vpr-, tat-, vpu- ja rev-proteiinit. Näitä kutsutaan myös apuproteiineiksi (accessory proteins) (4, s. 465–467; 10, s. 562-563; 12, s. 589, 605).

Vif-proteiini on infektiotekijä, jonka tyypillinen koko on 23 kDa. Vif-proteiini lisää viruksen infektiokykyä vaikuttamalla virusta tuottavassa solussa parikkelin kypsymiseen tavalla, mikä tehostaa replikaatiosyklin ensimmäisiä vaiheita viruksen tunkeuduttua uuteen kohdesoluun. (10, s. 565; 32, s. 5)

Vpr-proteiini on 14 kDa kokoinen proteiini, joka on pakattu viruspartikkeliin. Vpr-proteiini solussa sijoittuu tumaan, ja se voi pysäyttää solusyklin G2-vaiheeseen. (10, s. 565; 32, s. 6.)

Tat-proteiini on HIV-geeniekspression transaktivaattori, joka on yksi kahdesta viruksen säätelyproteiineista (tat ja rev) HIV:n geeniekspressiota varten. Tat sijaitsee ensisijaisesti tumassa. Rev-proteiini on toinen säätelyproteiinista HIV-ekspressiossa,

joka on 19 kDa kokoinen fosfoproteiini. Se sijaitsee ensisijaisesti tumassa ja sytoplasmassa. (32, s. 5.)

Vpu-proteiini on ominainen vain HIV-1:lle ja simpanssin SIV:lle. Se on 16 kDa kokoinen yhtenäinen kalvoproteiini, jolla on kaksi eri toimintaa. Se vähentää CD4:n ilmenemistä isäntäsolun pinnalla ja tehostaa muodostuneiden viruspartikkeleiden silmukoitumista ja vapautumista isäntäsolusta (10, s. 565; 32, s. 6.)

Vpx-proteiini on 12 kDa kokoinen proteiini, joka on löydetty mm. HIV-2:lta ja eräiltä apinoilta. Vpx on samankaltainen proteiini kuin vpu, joka on syntynyt ilmeisesti vpr:n kahdentumisen kautta. (32, s. 6.)

Nef-proteiini lisää HIV-partikkelien infektiokykyä ja tuotantoa ja vaikuttaa myös mm. isäntäsolun aktivaatiotilaa sääteleviin signaalinvälitysreitteihin sitoutumalla eräisiin solun proteiinikinaasientsyymeihin SH3-domeenien välityksellä. Nef-proteiini aiheuttaa HIV-reseptori CD4:n sekä infektoituneiden solujen tuhoamisessa tärkeiden heterodimeeristen transmembraaniproteiinien, MHC I-molekyylien katoamisen isäntäsolun pinnalta, indusoi kemokiinituotantoa ja auttaa T-leposolujen aktivoitumista. Nef-geeni on ominainen vain HIV-1-, HIV-2- ja SI-viruksille. (10, s. 565; 32, s. 6.)

6.1 Nef-proteiini ja sen aiheuttama häiriö isäntäsolulla

Nef on 27–35 kDa kokoinen myristyloitu säätelyproteiini, joka ilmenee ainoastaan lentiviruksissa ja on HI- ja SI-viruksen patogeeninen tekijä. (31, s. 16; 35, s. 23; 39, s. 3). Se on modifioitu N-terminaalista päästä myristyloimalla, ja tämä myristyloitu pää on liittynyt plasmamembraaniin (34, s. 1; 36; 37; 38). Aluksi Nef-proteiinilla raportoitiin olevan negatiivinen vaikutus viruksen replikaatiossa, mutta myöhemmin todistettiin eri toistojen avulla, että proteiini kuitenkin edistää viruksen lisääntymistä. Proteiini vuorovaikuttaa monen eri endogeenisen isäntäsolujen proteiinien kanssa ja näin voi muuttaa solutoimintoja ja solunsisäistä signaalia, mikä on keskeinen tekijä HIV-infektion kehittymiselle. (31, s. 16; 33; 39, s. 3.)

Nef on yksi HI-viruksen tuottamista virusproteiineista ja keskeinen tekijä HIV-infektion kehittymiselle. Useat Nef-proteiinin toiminnot edistävät viruksen selviytymistä ja lisääntymistä potilaan elimistössä, ja infektion etenemisen on havaittu hidastuvan viallisen tai puuttuvan Nef-proteiinin seurauksena sekä luonnollisen HIV-infektion yhteydessä ihmisellä että kokeellisen SIV-infektion yhteydessä rhesusapinoilla. Nef ei itsessään ole entsyymaattisesti aktiivinen proteiini, mutta sen kyky sitoutua solun omiin proteiineihin ja vaikuttaa niiden toimintaan selittää Nefin vaikutusten laajan kirjjon. (31, s. 6; 40, s. 268; 41, s. 606.)

6.1.1 HIV-reseptorien CD4:n ja MHC-molekyyliden määrän vähentäminen isäntäsolun pinnalta Nef-proteiinin avulla

Yksi ensimmäisiä luokiteltuja Nefin toimintona on se, että se kykenee dramaattisesti vähentämään CD4-reseptorin määrää isäntäsolun pinnalta. T-solut ovat lymfosyyttien eli immuunisolujen toinen päätyyppi, jotka syntyvät luuytimessä ja kypsyvät kateenkorvassa. T-soluja ovat CD4-T_{auttaja}- ja CD8-T_{tappaja} -lymfosyytit. Niiden tehtävänä on auttaa tuhoamaan solujen sisällä eläviä taudinaiheuttajia. Ihmisen CD4-reseptori häiritsee mm. viruksen replikaatiota ja silmukoinnin ja virionien muodostumista isäntäsolun ollessa jo infektoitunut. Tällöin HI-viruksen Nef-proteiinilla on kyky vähentää CD4-reseptorin säätelyä, jolloin viruksen replikaatio tehostuu. (31, s. 21; 42; s. 4.)

Nefin on osoitettu sitoutuvan CD4:n sytoplasmiseen häntään, ja samalla Nef on sitoutunut heterotetrameeriseen klatriiniliitännäiseen adaptoriproteiiniin-2 (AP-2). Nämä interaktiot lisäävät endosytoosia ja kuljettavat CD4-reseptorit lysosomiin, missä reseptorit hajotetaan viruksen lisääntyessä. (31, s. 21; 40, s. 269; 41, s. 606.)

Nef-proteiini kykenee myös vähentämään heterodimeerisiä transmembraaniproteiineja, MHC-reseptoreja isäntäsolun pinnalta (44, s. 1). MHC-proteiinit ovat elimistön omia, T-solujen toiminnan kannalta välttämättömiä proteiineja, joita on kahta luokkaa, MHC I ja MHC II, joiden avulla T-solut kykenevät tunnistamaan antigeenejä. MHC-reseptorien määrän väheneminen Nefin toimesta tapahtuu eri tavalla kuin CD4-reseptorissa. Tämän määrän väheneminen tapahtuu HIV-1 Nefin ja sytosolisen lajitteluproteiinin

interaktiossa, jonka jälkeen MHC-kompleksit kulkeutuvat lysosomiin. Täten Nef-proteiinin tuotto infektion aikaisessa vaiheessa voi auttaa virusta suojautumaan immuunipuolustuksen hyökkäykseltä. (31, s. 23; 40, s. 269; 41, s. 606; 43, s. 15; 57.)

6.1.2 Nef-proteiini normaalin signaalin häiriötekijänä

Nef-proteiini vuorovaikuttaa isäntäsolujen signaalireittiin ja indusoi niissä aktiivisen tilan, joka puolestaan voi saada aikaan isäntäsolun geeniekspression tehostumisen. HIV-1 Nef tarttuu tiukasti solun erilaisiin proteiinikinaasiin, mikä häiritsee normaalin solun signaalia ja lisää samalla HIV-1-geenien ilmenemistä. Nef on virusproteiini, joka interaktioi isäntäsolun signaali-transduktioproteiinien kanssa. Tämä interaktio mahdollistaa viruksen jatkuvaa lisääntymistä. (42, s. 6.; 45.)

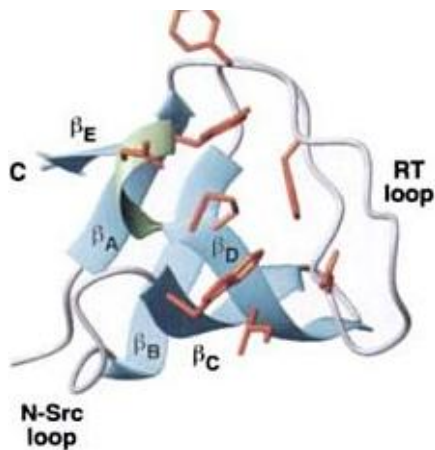
6.2 Nef-proteiinikinaasi Hck SH3 -interaktio

Nef on oletettu olevan ensimmäinen proteiini, joka käyttää hyväkseen SH3-domeenin isäntäsolun solusignaalisoinnissa ja sitoutuu SH3-proteiineihin, kuten hematopoieettisen solun tyrosiinikinaasiin Hck:hon ja saa aikaan Hck:n aktivoitumisen. Tämä sitoutumisen voimakkuus Hck:hon on paljon voimakkaampi kuin muiden sarkoomahomologia-perheenjäsenten (Src SH3) kanssa. (51, s. 1735; 50, s. 650.)

6.2.1 Src-homologia 3 -domeenit (SH3)

Src-homologia (Src SH3) 3 -domeenit ovat pieniä, 50–60 aminohappoa käsittäviä proteiinien toiminnallisia osayksiköitä. Ne esiintyvät hyvin monissa proteiineissa, joita ovat mm. solunsisäiset proteiinit, ja ne säätelevät monia soluille tärkeitä proteiinien välisiä vuorovaikutuksia, erityisesti sellaisia, joilla on merkitystä solun signaalinvälityksessä sekä kasvun ja erilaistumisen säätelyssä, kuten tyrosiinikinaasiperheet Src, Abl ja ZAP70. Myös monet mikrobit, kuten ihmisen immuunikatovirus 1 (HIV-1), osaavat käyttää hyväkseen SH3-välitteisiä tapahtumia, joilla on merkitystä muun muassa tämän viruksen aiheuttamassa immuunikadossa (AIDS). (35, s. 6, 9; 47, s. 1097; 48, s. 489–490.)

SH3-domeeni (kuva 7) on koostunut β -juosteesta, joita on viisi erilaista, β_A , β_B , β_C , β_D ja β_E . Nämä β -juosteet ovat muodostuneet tiiviisti erisuuntaisesti kolmiulotteiseksi rakenteeksi. Rakenne sisältää myös RT-silmukan, johon Nef-proteiinin PxxP-motiivi tarttuu spesifisesti, ja N-terminaalinen-Src silmukan, johon Src-homologian perhe (Hck, Lck, Fyn ja Lyn) tarttuu. (49, s. 38.)



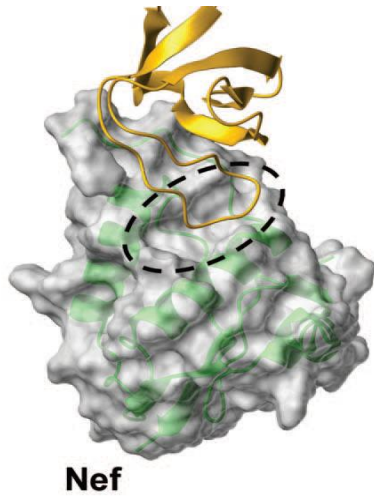
Kuva 7. SH3-domeenin rakenne. Rakenne sisältää viisi β -juostetta, RT-silmukan ja N-terminaali-Src-silmukan. (49, s. 38).

6.2.2 Nef-proteiinin tarttuminen proteiinikinaasi Hck SH3 -domeeniin

Nef-proteiinilla on kyky tarttua proliinirikkaan alueen (PxxP-motiivi) päästä spesifisesti kohdeproteiiniin Hck SH3:n vaihtelevaan silmukkaan, RT-silmukkaan, joka on tärkeä tekijä spesifisessä vuorovaikutuksessa (kuva 8). Tämä vuorovaikutus saa aikaan proteiinikinaasin aktivoitumisen, ja täten se yhdistetään HIV/AIDS patogeenisuuteen. Nef-proteiinilla on myös kyky tarttua muihin Src-homologian kinaasiperheenjäseniin, mutta vuorovaikutus on paljon heikompi kuin Hck:n. (52, s. 17899; 53, s. 5006–5007; 54, s. 27029.)

Tutkimukset HIV-1:n Nef-proteiinin ja Hck-tyrosiinikinaasin SH3 -domeenin interaktiosta ovat osoittaneet, että SH3-PxxP:n sitoutumisvoimakkuuden ja sitoutumiskumppanin valintaan vaikuttavat suuresti myös SH3-PxxP:n sitoutumisalueen ulkopuoliset molekulaariset kontaktit. Tätä interaktiota varten on kehitteillä lääkkeitä

spesifisesti kohdentamalla proteiini-interaktioita ja näin mahdollisesti inhiboimaan HIV-1:n replikaatiota isäntäsolussa. (35, s. 6, 9; 52, s. 17899; 53, s. 5006–5007; 54, s. 27029.)



Nef

Kuva 8. Hck-SH3:n sitoutuminen HIV-1 Nefiin. Nef (harmaa) on tarttunut SH3-domeeniin (keltainen). Mustalla ympyrällä on esitetty hybrofobinen tasku, missä Nef-Hck SH3:n interaktio tapahtuu, ja näin se on tärkeä kohde kemikaalien etsinnässä interaktion estämiseksi. (58, s. 19257).

KOKEELLINEN OSUUS

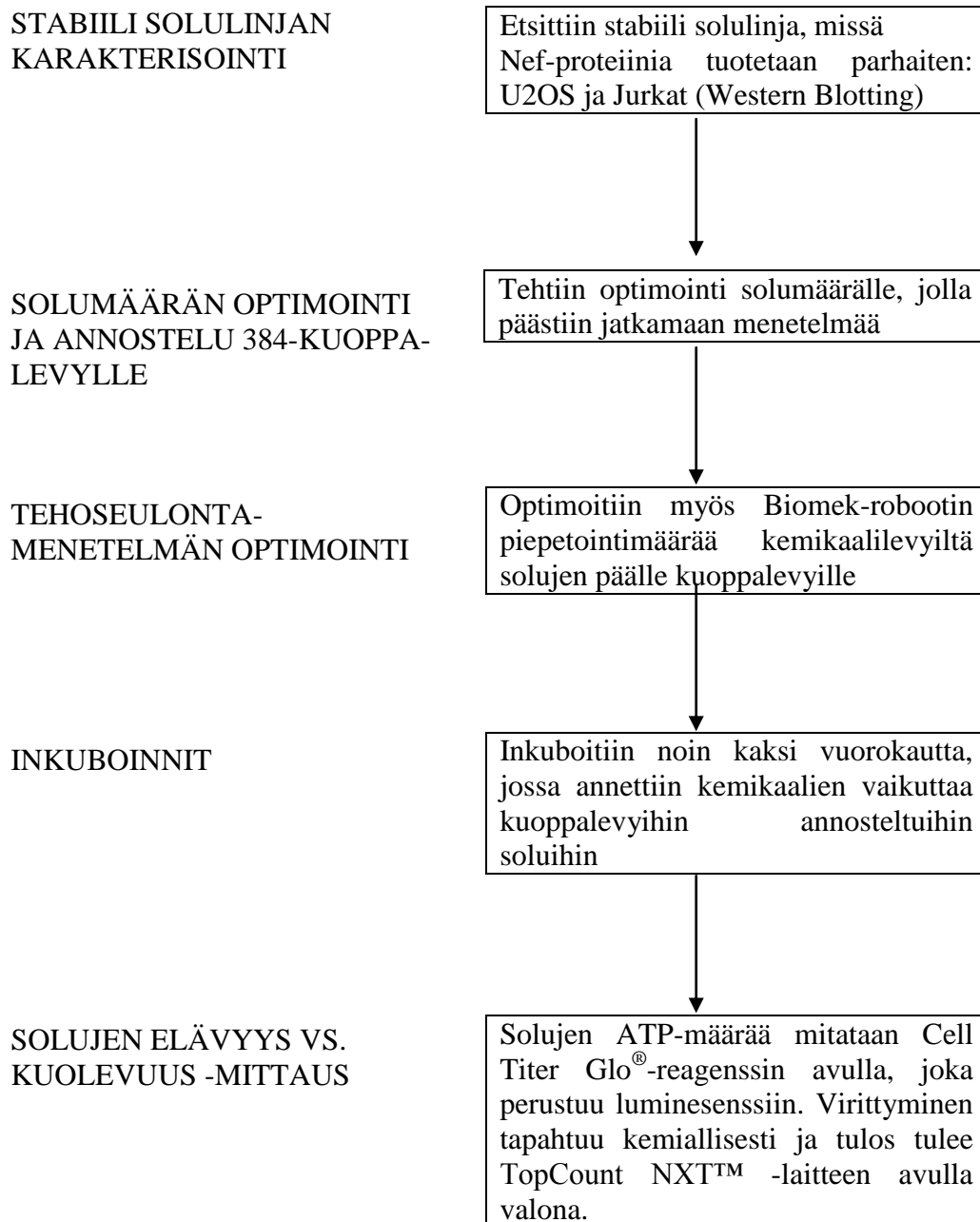
7 Työn tavoitteet ja kulku

7.1 Työn tausta ja tavoitteet

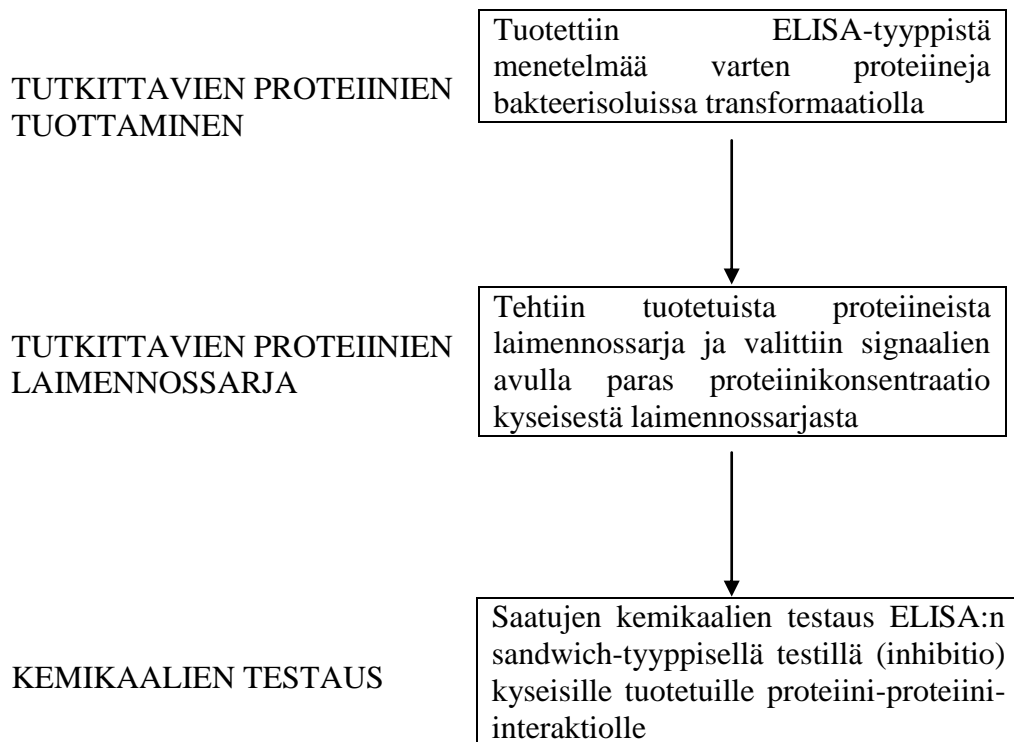
Insinööriyön tarkoituksena oli etsiä säätelyproteiini Nefin inhibiittoreita HIV-lääkkeen kehittämisessä. Työssä mitattiin virusproteiinin ja isäntäsolun kontaktia ELISA-tyyppisellä analyysillä ja sytotoksisuutta ATP-analyysillä. Pienimolekyylisillä yhdisteillä pyrittiin inhiboimaan virusproteiinin ja isäntäsolun proteiinin vuorovaikutusta. Pienimolekyylisiä inhibiittoriyhdisteitä, jotka tappaisivat viruksen infektoimia soluja, mutta eivät kuitenkaan normaalisoluja, etsittiin käyttäen Hibertin ja FDA:n Spectrum Microsource -kemikaalikirjastoja.

7.2 Työn kulku

Insinööriyön vaiheet on esitetty lyhyesti kuvassa 9 ja 10. Insinööriyössä pyrittiin etsimään erilaisia inhibiittoreita, jotka estäisivät Nef-Hck SH3 -interaktiota kuvan 10 mukaisesti. Lisäksi tutkittiin erilaisten inhibiittoreiden sytotoksisuutta kuvan 9 mukaisesti.



Kuva 9. Sytotoksisuusmenetelmän eri vaiheet.



Kuva 10. Kemikaalien testaus Nef-Hck SH3 -interaktion inhibointia varten.

8 Materiaalit ja menetelmät

8.1 Käytetyt solulinjat

Tutkimuksessa käytetyt solulinjat olivat U2OS-osteosarkoomasolulinja, joka on ihmisperäinen luun syöpätyyppinen solulinja ja Jurkat. Jurkat-solulinja on ihmisen T_{auttaja}-solun leukeminen solulinja, jonka pintarakenne on lähellä HIV:n infektoivien normaalien T_{auttaja}-solujen pintarakennetta, minkä takia se sopii tutkittavaksi solulinjaksi. U2OS-solut ovat tiukasti alustaan tarttuvia ankkuroituvia soluja. Jurkat-solut ovat suspensisoluja ja liikkuvat vapaana.

8.1.1 Nef-geenin sisältämän virusvektorin tuotto

Reagenssit ja materiaalit

- Dulbercon modifioitu Eaglen kasvatusliuos (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium), (Gibco)
 - Gibcon tuottama jauhe, joka liuotettu 400 ml steriiliin veteen ja lisätty
 - 1 mg/l D-glukoosia
 - 1 mg/l L-glutamiinia
 - 110 mg/l natriumpyruvaattia
 - 1,2 mg/l NaHCO₃
- 10 % vasikkasikiön seerumi (Fetal calf sera, FCS-500), (PromoCell)
- 100 x glutamiini ja penisilliini-streptomysiini (Invitrogen)
 - 30 g/l L-glutamiini (Sigma)
 - 6,06 g/l bentsylpenisilliini (Orion)
 - 10 g/l dihydrostreptomysiini (Sigma)
- pLP1-, pLP2- ja pLP/VSVG pakkausplasmidit (Ojalan laboratoriorryhmä, Biomedicum)
- Lentivirusvektori (Nefiä ja puromysiiniä sisältävä plasmidi) (Annika Järviluoma, Haartman Instituutti)
- Lipofektamiini-transfektioagenssi (Lipofectamine 2000 Reagent), (Invitrogen)
- Optimem-media (Gibco)

- 0,45 µm:n suodatinfilteri
- Ihmisen alkion munuaisesta eristetyt solut, 293 FT -solut

Aluksi kyseiset solulinjat infektoitiin 5 µg/reaktio lentiviruksilla, joka on HI-viruksen sukuvirus. Lentivirukset on ensin tuotettu 293 FT -soluilla ja tämän jälkeen infektoitu solulinjat. 293 FT -solut, jotka ovat lentivirustuotossa käytettäviä, alkuperältään ihmisen alkion munuaisesta eristettyjä soluja (sisältävät SV40-viruksen ison tantigeenin), kasvatettiin DMEM-kasvatusliuoksessa 24 h, johon oli lisätty 10 % seerumia, 100 x glutamiinia ja penisilliini-streptomysiiniä. Solut kasvatettiin +37 °C:ssa 5 %:n CO₂-pitoisuudessa.

Viruksen tuotossa käytettiin lentivirusvektorin lisäksi pLP1-, pLP2- ja pLP/VSVG-pakkausplasmideja. Haluttua tuottoplasmidia käytettiin 5 µg/reaktio ja pakkausplasmideja 2,83 µg (pLP1), 1,33 µg (pLP2) ja 1,84 µg (pLP/VSVG) yhteen reaktioon. Plasmidit transfektoitiin soluihin lipofektamiini-transfektioireagenssilla Optimem-mediassa. Yhtä virustuottoa varten 6 x 10⁶ FT-solua sekoitettiin 10 cm:n maljalla yhdessä median (DMEM) ja plasmidit sisältävän transfektioseoksen kanssa. Soluja kasvatettiin + 37 °C:ssa 5 %:n CO₂-pitoisuudessa 24 h, jonka jälkeen tehtiin median vaihto ja inkuboitiin taas 48 h, jonka jälkeen tehtiin viruskeräys transfektioista suodattamalla viruksen sisältävä supernatantti 0,45 µm:n filterin läpi. Virussupernatantit jaettiin 2 ml:n eppendofputkiin ja säilytettiin -70 °C:ssa.

8.1.2 Nef-geenin siirto U2OS-soluihin, transfektoituneiden solujen selektointi ja viljely

Reagenssit ja materiaalit

- Dulbercon modifioitu Eaglen kasvatusliuos (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium), (Gibco)
 - Gibcon tuottama jauhe, joka on liuotettu 400 ml steriiliin veteen ja lisätty
 - 1 mg/l D-glukoosia
 - 1 mg/l glutamiinia
 - 110 mg/l natriumpyruvaattia

- 1,2 mg/l NaHCO₃
- 10 % vasikkasikiön seerumi (Fetal calf sera, FCS-500), (PromoCell)
- 100 x glutamiini ja penisilliini-streptomysiini (Invitrogen)
 - 30 g/l L-glutamiini (Sigma)
 - 6,06 g/l bentsylpenisilliini (Orion)
 - 10 g/l dihydrostreptomysiini (Sigma)
- 1 µg/µl puromysiiniä
 - 50 mg/ml puromysiinia liuotettiin 500 µl steriiliin veteen
- Osteosarkomasolulinjan solut, U2OS-solut

U2OS-solulinjan solut on kasvatettu DMEM -kasvatuliuokseen, johon oli lisätty 10 % seerumia, 100 x glutamiinia ja penisilliini-streptomysiiniä ja 1 µg/µl puromysiiniä. 293 FT -soluissa tuotettu virus sisältää plasmidin, johon on insertoituna Nef-geeni ja puromysiinigeeni. Viruksella infektoidiin solulinjat, minkä jälkeen annettiin inkuboitua yön yli. Näin solulinjat olivat Nef-geenin sisältävällä plasmidilla, jossa oli lisäksi puromysiiniresistenssigeeni. Infektoiduneet solut jaettiin viikon aikana kaksi kertaa, jotta niiden kasvu pysyi optimina. U2OS-soluja varten käytetään trypsiiniä irrottamaan solut pinnalta, jotta soluja päästiin jakamaan eteenpäin.

8.2 Nef-proteiinin ilmenemisen suhteen tehty karakterisointi

Reagenssit ja materiaalit

- Net-hajotuspuskuri
 - 150 mM NaCl
 - 50 mM Tris pH 7,5
 - 1 mM EDTA
 - 0,2 % NP40
 - Fosfataasi-inhibiittoritabletti, liuotettuna 1 ml veteen (Complete, Roche)
 - Proteaasi-inhibiittoritabletti, liuotettuna 50 ml veteen (Complete, Roche)
- Dulbercon modifioitu Eaglen kasvatusliuos (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium), (Gibco)
 - Gibcon tuottama jauhe, joka on liuotettu 400 ml steriiliin veteen ja lisätty

- 1 mg/l D-glukoosia
- 1 mg/l glutamiinia
- 110 mg/l natriumpyruvaattia
- 1,2 mg/l NaHCO₃
- 10 % vasikkasikiön seerumi (Fetal calf sera, FCS-500), (PromoCell)
- Fosfaattipuskurointi suolaliuos, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5
 - 0,03 M KCl
 - 1,3 M NaCl
 - 0,08 M Na₂HPO₄
 - 0,01 M KH₂PO₄
- Western Blott –laite (Trans-blot SD semidry transfer cells, Bio-Rad)
- Solulinjat
 - U2OS SF2 / NL43 pwpi puro
 - U2OS pwpi puro
 - Jurkat SF2 / NL43 pwpi puro
 - Jurkat pwpi puro
- Väriliuos, Ponceaus
- 0,05 % Tween[®] 20 (ICN Biomedicals) fosfaattipuskurointi suolaliuoksessa, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5
- 5 % maitojauhe / 0,05 % Tween[®] 20 (ICN Biomedicals) fosfaattipuskurointi suolaliuoksessa, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5
- Lampaassa tuotettu α-GST-nef-vasta-aine (primäärivasta-aine) (Mark Harris, Leeds University)
- 1:10 000 kanissa tuotettu vuohivasta-aine (sekundäärivasta-aine, entsyymileima, L-COR Odyssey, Infrared Imaging System) laimennettuna 5 % maitojauhe / 0,05 % Tween[®] 20 (ICN Biomedicals) fosfaattipuskurointi suolaliuoksessa, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5
- Kvantamislaitte: Odyssey LI-COR infrared imager
- 1:5 Bradford-proteiinipitoisuuden mittausta varten (Bio-rad) kolorimetrinen reagenssipakkaus, joka sisältää
 - 450 ml värireagenssikonsentraatiota

- Naudan standardi seerumialbumiini, Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-aldrich)
- Fosfaattipuskurointi suolaliuos, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5
 - 0,03 M KCl
 - 1,3 M NaCl
 - 0,08 M Na₂HPO₄
 - 0,01 M KH₂PO₄

Solulinjan karakterisointia varten käytettiin erilaisia vasta-aineita Western-blottauksessa, jonka tarkoituksen oli varmistaa Nef-proteiinin ilmeneminen tutkittavilla solulinjoissa. Työssä käytetyt vasta-aineet ovat esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Western-blottauksessa käytetyt vasta-aineet.

Primääri vasta-aine	Lampaassa tuotettu α -Nef-vasta-aine, mikä kiinnittyy filterissä siihen kohtaan, jossa Nef-proteiini ilmenee
Primääri vasta-aine	Hiiressä tuotettu GAPDH-vasta-aine, mikä kertoo, kuinka paljon näytettä on pipetoitu kaivoihin
Sekundääri vasta-aine	α -mouse-vasta-aine, joka tunnistaa GAPDH:n ja antaa signaalin aallonpituudella (IR Dye [®]) 800
Sekundääri vasta-aine	goat- α -rabbit-vasta-aine kiinnittyy α -sheep-vasta-aineeseen ja antaa signaalin aallonpituudella (IR Dye [®]) 680

Menetelmän alussa 5 μ g/reaktio solut (pwpi puro vektori + SF2 / NL 43 -kanta) ja infektoitumattomat solut (tyhjä pwpi puro vektori) käsiteltiin 500 μ l Net hajotuspuskurilla. Ennen solujen hajotusta, vanha DMEM-kasvatusliuos poistettiin maljoilta ja pestiin kaksi kertaa 20 ml PBS:llä, jonka jälkeen lisättiin 500 μ l Net-inhibiittoripuskuria ja kaavittiin maljalta eppendorf-putkiin. Tämän jälkeen eppendorfputket siirrettiin jälle ja sekoitettiin hyvin pari sekuntia, jonka jälkeen sonikoitiin 2 x 15 sekuntia. Sonikoinnin jälkeen sentrifugoitiin + 4 °C:ssa 16 000 x g 20 min ja siirrettiin uusiin eppendorf-putkiin ja mitattiin näiden proteiinipitoisuudet Bradford-menetelmällä. Proteiinit ajettiin 12 prosenttisella geelillä SDS-PAGE:lla proteiinimääränsä mukaan 20 μ g–30 μ g, jonka jälkeen geeli siirrettiin membraanifiltterille Western Blott -laitteen avulla.

Siirrettyyn membraanifiltteriin lisättiin väriliuosta, joka värjää filtteriin punaiseksi. Se vielä pestiin tislattulla vedellä ja blokattiin 30 min ajan 5 prosenttisella maitojauheella, jossa on 0,05 % Tween[®] 20 PBS. Blokkauvaiheen jälkeen lisättiin primäärivasta-aine (lampaassa tuotettu α -Nef-vasta-aine), jossa filtteri inkuboitui 2-3 h:n ajan. Sen jälkeen suoritettiin 3 x 10 min pesut 0,05 % Tween[®] 20 PBS:llä, jonka jälkeen lisättiin 1:10 000 sekundäärivasta-aine laimennettuna 5 % maitojauhe / 0,05 % Tween[®] 20 PBS:ään antaen sen inkuboitua 30 min, jolloin sekundäärivasta-aine tarttuu primäärivasta-aineeseen. Tämä tunnistus saatiin identifioitua käyttäen kuvantamislaitetta Odyssey LI-COR infrared imager.

8.2.1 *Mycoplasma*-kontaminaation testaus

Reagenssit ja materiaalit

- Venor[®]Gem PCR Mycoplasma Detection Kit -reagenssipakkaus (Promega)
- Aluke/Nukleotidi Mix (dATP, dUTP, dGTP, dCTP)
- 10 x PCR-reaktiopuskuri
- Positiivinen kontrolli -DNA (sisältää *Mycoplasman* DNA-fragmentteja)
- Sisäinen kontrolli
- Negatiivinen kontrolli
- PCR-steriilivesi

Mycoplasma-PCR tehtiin Venor[®]Gem PCR Mycoplasma Detection Kit -reagenssipakkauksella. Venor[®]Gem PCR -työohjeen mukaan voidaan suurella herkkyydellä detektoida *Mycoplasma*- ja *Acholeplasma*-kontaminaatiot solulinjasta kolmessa tunnissa. Menetelmä vaatii negatiivisen kontrollin, jossa ei ole *Mycoplasmaa* ollenkaan, sisäisen DNA-kontrollin, joka esiintyy geelissä jokaisessa näytteessä, ja kaksi positiivista kontrollia, vahvan kontaminaation, jossa geelissä viiva erottuu paksimpana, ja heikon kontaminaation, jossa geelissä erottuu kaksi viivaa.

Taulukko 4. PCR mastermix ja reaktioseoksen määrät.

PCR mastermix:	1 x reaktio (µl)
steriilivesi	15,3
10 x reaktiopuskuri	2,5
aluke/nukleotidi mix	2,5
sisäinen kontrolli	2,5
polymeraasi (5 U/ µl)	0,2
Reaktioseos:	Määrä (µl)
valmistettu mastermix	23
negatiivinen kontrolli	2
näytteet	2
positiivinen kontrolli	2

Ensin tehtiin PCR-reaktio, joka koostui itse valmistetusta mastermixistä ja tutkittavasta näyteosasta (lopputilavuus 25 µl), ja tämä seos vietiin PCR-laitteeseen monistumaan kolmeksi tunniksi. PCR-ajon jälkeen suoritettiin 1,5 prosenttisella geelياجolla, jonka avulla pystyttiin UV-valon avulla detektoimaan, sisälsivätkö näytteet mahdollisesti kyseistä *Mycoplasmaa*.

8.3 ATP-analyysiin perustuva sytotoksisuuden mittaaminen

Reagenssit ja materiaalit

- 10 ml Cell Titer-Glo[®]-reagenssi reagenssipakkauksesta (Promega)
- Luminometri, TopCount NXT HTS (Perkin ElmerTM)
- Kemikaalien lisäyslaite, Biomek FX (Beckman Coulter)
- Fosfaattipuskurointi suolaliuos, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5, johon on lisätty Mg²⁺
 - 0,03 M KCl
 - 1,3 M NaCl
 - 0,08 M Na₂HPO₄
 - 0,01 M KH₂PO₄
 - 0,5 mM MgCl₂·6H₂O (Gibco, Invitrogen)
- Hibertin ja FDA:n kemikaalikirjasto (2; 3)
- Solumäärät: 1000 solua / kaivo
 - U2OS SF2 pwpi puro
 - U2OS pwpi puro

Sytotoksisuusmittausmenetelmässä annosteltiin 50 µl soluja, U2OS SF2 pwp-puro- ja U2OS pwp-puro-soluja. Tämän jälkeen annettiin solulevyjen inkuboitua 5 prosenttipitoisessa CO₂-tilassa, 37 °C:ssa lämpökaapissa yön yli, jonka jälkeen solujen päälle lisättiin tutkittavaa inhibiittoria 0,15 µl. Kemikaalilisäyksen jälkeen sekoitettiin parikymmentä sekuntia, jonka jälkeen levyt annettiin taas inkuboitua 48 h. Inkubointien jälkeen kuoppalevyt sentrifugoitiin, jotta kasvatuliuos saatiin pois kaivoista, koska solut olivat tarttuneena levyjen pohjaan.

Tämän jälkeen levyihin lisättiin 20 µl Cell Titer-Glo[®] -reagenssia Promegan reagenssipakkauksesta, joka oli laimennettu 1:2 PBS:llä, johon oli lisätty Mg²⁺. Tämän jälkeen lisätty laimennosreagenssi sekoitettiin 2 min ajan ja annettiin inkuboitua 10 min huoneen lämpötilassa, jonka jälkeen mitattiin luminesenssi luminometrillä.

8.4 Nef-proteiinin ja sen kanssa vuorovaikuttavien ihmisen proteiinien tuotto

Reagenssit ja materiaalit

- LB-Agar ampicilliini 100 µg/ml -malja
- Luria Broth amp 100 µg/ml -kasvatuliuos (itse tehtynä 25 mg/ml:sta ampicilliinistä)
- 0,5 mM isopropyli-beeta-D-thiogalaktopyranosiidi, IPTG, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (proteiinin indusointia varten) (Fermentas)
- Fosfaattipuskurointisuolaliuos, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5
 - 0,03 M KCl
 - 1,3 M NaCl
 - 0,08 M Na₂HPO₄
 - 0,01 M KH₂PO₄
- 10 % glyserolia
- Proteaasi-inhibiittoritabletti, joka on liuotettu 50 ml:aan veteen (Complete, Roche)
- Column-puskuri (Bio-Rad)
 - 20 mM Tris-Cl pH 7,4
 - 200 mM NaCl

- 1 mM EDTA
- 1 % Triton X100
- Maltoosisidonnainen proteiini, MBP
- Glutationisefaroositransferaasiproteiini, GST

ELISA-tyyppisen menetelmää varten tuotettiin *E. coli* -bakteerisoluuissa tutkimuksessa tarvittavat proteiinit ja sitten ne puhdistettiin. Tutkimusta varten oli itse tuotettava proteiineja, joita käytettiin menetelmässä. Tuotetut proteiinit ovat esitetty taulukkomuodossa.

Taulukko 5. Tuotetut ja puhdistetut proteiinit ELISA-tyyppiselle menetelmälle varten.

Fuusioproteiini	Vektori	E.colin bakteerikanta/ antibioottimalja	Proteiinin konsentraatio (µg/µl)
MBP-Nef	pMAL C2 Nef	BL21/XL1-BLUE/ ampisilliini	2,6
b-GST-Hck SH3	pGEX 4T 1-Hck SH3	BL21/ampisilliini	3,75; 209 µM
MBP	pMAL C2	BL21/ampisilliini	1,6 ; 178 µM
MBP-CD3 epsilon	pMAL C2 STOP CD3 epsilon	BL21 / ampisilliini	2,5
GST	pGEX 4T 1	XL1-BLUE/ampisilliini	3,1
SUMO Lyn SH3	pSUMO Lyn SH3	DE3/kanamysiini	109,5 µM
b-GST-EspFu ei- SH3	pGEX 4T 1-EspFu	BL21/kanamysiini	0,8 ; 3,4 µM
GST-EpS8L1 SH3-b	pGEX-4T-1-EpS8L1 SH3	BL21/ampisilliini	6,4

Taulukon 5 mukaan bakteerisolut transformoitiin kyseisillä plasmideilla. Plasmidit sisältävät ampicilliini/kanamysiiniresistenttiyttä aiheuttavan geenin, joten vain plasmidin sisältävät bakteerit pystyvät kasvamaan ampicilliinin/kanamysiinin läsnäollessa.

E. coli alakannan solut, BL21/DE3/ XL1-BLUE -solut otettiin -70 °C:sta sulamaan jäälle. Jäällä oleviin eppendorffputkiin pipetoitiin 100 µl bakteerisoluja ja 1- 2 µl plasmidia kaikille bakteerikannoille varten. Muodostuneen bakteri-plasmidikompleksin annettiin seistä jäällä 30 min, jonka jälkeen ne nostettiin 42 °C vesihauteeseen 60 sekunniksi ja takaisin jäälle 2 minuutiksi. Lämpöshokin aikana

bakteerisolu siirtää plasimidin sisäänsä, minkä takia korkea lämpötila saa bakteerin soluseinän ohenemaan hetkellisesti, mikä helpottaa plasmidin siirtoa bakteerin sisään. Tämän jälkeen se vietiin takaisin jälle, jotta bakteerisolu rauhoittuisi lämpöshokin jälkeisestä vaikutuksesta. Transformaation jälkeen siirrettiin transformoidut bakteerit levittämällä LB-Agar 100 µg/ml ampisilliinia sisältäville maljoille yön yli, 37 °C:ssa. Yön yli kasvaneilta bakteerimaljoilta poimittiin erillinen pesäke kutakin plasmidia sisältäviä bakteereja. Maljalla muodostuneet kaikki pesäkkeen bakteerisolut ovat keskenään samanlaisia. Kukin pesäke siirrettiin kasvamaan 5 ml:n LB-kasvatusliuosta ja 100 µg/ml ampisilliinia sisältävään putkeen ja annettiin olla sekoittajassa 180 rpm, 37 °C yön yli. Tämän jälkeen kasvatus siirrettiin suurempaan tilavuuteen (200 ml - 400 ml) kasvatusliuosta ja 100 µg/ml ampisilliinia, ja annettiin sen kasvaa OD₆₀₀-arvoon 0,8-1,0, jonka kasvua seurattiin spektrofotometria-laitteella. Tämän jälkeen lisättiin 0,5 mM IPTG:tä, joka mahdollistaa proteiinin tuoton noin 3-4 h:n aikana 200 rpm sekoittajassa 37 °C:ssa.

Indusoitunut bakteeriliuos sentrifugoitiin GSA-roottori Sorvall RC-5B:llä +4 °C:ssa 5000 rpm 15 min, jonka jälkeen muodostunut pelletti resuspesoitiin 12,5 ml ml PBS:llä, jossa on 10 % glyserolia ja Complete-proteiini-inhibiittoritabletti (1 Complete-tabletti 50 ml:aan Column-puskuria). Tämän jälkeen bakteeriliuos soinikoitiin 3 x 1 min, jotta bakteerin seinämä saadaan rikottua ja proteiinit saadaan esille. 1 prosenttisen Triton X100 -detergentin lisäys +4 °C:ssa 1 h ajan pyörittäjässä saa aikaan proteiinien lopullisen esiintulemisen bakteerisolusta. Bakteeriliuokselle tehtiin fuugaus 12000 x g 30 min ajan +4 °C:ssa, jolloin supernatantti otettiin talteen ja suoritettiin proteiinipuhdistus.

8.4.1 Tuotettujen proteiinien puhdistus bakteerisoluista

- 50 % amyloosigeelihelmet (Biolabs)
- Steriilivesi
- 50 % glutationisefaroosigeelihelmet (GE Healthcare Biosciences AB)
- 10 mM maltoosi PBS:ssä (eluointipuskuri maltoosi sidonnaiselle proteiineille, MBP)

- 10 mM glutationi Tris 50 mM pH 8:ssa (eluintipuskuri glutationi sefaroosi transferaaseille proteiineille, GST)
- 1:5 Bradford-proteiinipitoisuuden mittausta varten (Bio-rad) kolorimetrinen reagenssipakkaus, joka sisältää
 - 450 ml värireagenssikonsentraatiota
 - Naudan standardi seerumialbumiini, Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-aldrich)
 - Fosfaattipuskurointi suolaliuos, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5
 - 0,03 M KCl
 - 1,3 M NaCl
 - 0,08 M Na₂HPO₄
 - 0,01 M KH₂PO₄
- Stain for SDS-PAGE-geelin värjäämistä varten
 - 500 ml MeOH
 - 100 ml 100 % etikkahappoa
 - 0,5 g Coomassie brilliant sinistä R
- Destain for SDS-PAGE värin poistoa varten
 - 50 ml MeOH
 - 70 ml 100 % etikkahappoa
- Fosfaattipuskurointisuolaliuos, PBS, Phosphate buffer Saline pH 7,5
 - 0,03 M KCl
 - 1,3 M NaCl
 - 0,08 M Na₂HPO₄
 - 0,01 M KH₂PO₄

Tuotettujen proteiinien puhdistus perustuu affiniteetikromatografiaan, jossa proteiini sitoutuu spesifisesti johonkin pienimolekyyliseen ligandiin, joka on immobilisoitu geeliin. Proteiinit tarttuvat spesifisesti ligandeihin kolonneissa, minkä jälkeen geeli pestään. Tällöin kaikki muut kiinnittymättömät proteiinit poistuvat ja näin haluttu proteiini eluoidaan proteiinipohjaisella eluintipuskurilla.

Maltoosisidonnaisille proteiinille käytettiin amyloosigeelihelmiä ja glutationisefaroositransferaasiproteiinille glutationisefaroosigeelihelmiä, jotka ennen käyttöä pestiin PBS:llä ja steriilillä vedellä ja siirrettiin kolonneihin, jonka jälkeen myös supernatantti vietiin sinne. Kolonneille tehtiin kolme kertaa pesu 5 ml PBS:llä, jonka jälkeen proteiinit eluoiitiin 15 min välein kolme kertaa. MPB-pohjaiselle proteiinille käytettiin 3 x 500 µl 10 mM maltoosi PBS:ssä eluointipuskuria ja GST-pohjaiselle proteiinille käytettiin 3 x 500 µl 10 mM glutathione Tris 50 mM pH8:ssa eluointipuskuria. Eluoinnin jälkeen proteiineille tehtiin Bradford-menetelmällä proteiinipitoisuuden mittaaminen, jonka jälkeen proteiinit ajettiin 12 prosenttisella SDS-PAGE:lla geelissä, jolloin varmistettiin, oliko oikeaa proteiinia muodostunut.

8.5 Proteiini-proteiini-interaktion tutkiminen

Reagenssit ja materiaalit

- Maxisorp Black 384 Microplate –kuoppalevy
- Taulukon 5 mukaan valmistetut proteiinit; primääriproteiinit ja sekundääriproteiinit (biotinyloidut)
- Dimetyylisulfoksidi, DMSO, Dimethyl sulfoxide, 99,9 % (Sigma-Aldrich)
- 0,05 % TBS Tween[®] 20 (ICN Biomedicals)
 - 0,2 M Tris pH 8,0
 - 1,5 M NaCl
- 1,5 % naudan seerumialbumiini, Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-aldrich) / 0,05 % TBS Tween[®] 20 (ICN Biomedicals)
- 1:5000 SA-HRP: Strepavidini-biotinyloitu piparjuuriperoksidaasi, Strepavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (GE Healthcare Biosciences AB) / 0,05 % TBS Tween[®] 20 (ICN Biomedicals)
- 1: 10 Fluoresenssi reagenssipakkaus, QuantaBlu[™] NS/K Fluorogenic substrate (Thermo Scientific)
- 50 mM erilaiset tutkittavat kemikaalit
- Fluoresenssin mittauslaite, Fluorstar Optima 1, BMG Labtech

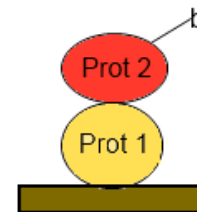
Insinöörityössä käytetty ELISA-tyyppinen tehoseulonta-analyysi perustuu siihen, että tutkitaan erilaisten inhibiittorien avulla, miten ne vaikuttavat primääriproteiinien ja sekundääriproteiinien interaktioon. Menetelmässä ensin kuoppien pohjaan sidottiin primääriproteiiniä, mikä annettiin inkuboitua yön yli +4 °C:ssa ja blokattiin 1,5 % BSA (Bovine Serum Albumin) / 0,05 % TBS Tween[®] 20 -puskurilla. Tämän jälkeen sidotun primääriproteiinin päälle lisättiin sekundääriproteiini, joka on biotinyloituna. Näiden proteiinien päälle lisättiin lisäksi testattavat kemikaalit, joiden inhibitiopitoisuutta tutkitaan proteiini-proteiini-interaktiossa. Tämän jälkeen lisättiin Streptavidini-peroksidaasientsyymikompleksi, jonka tarkoituksena oli tunnistaa sekundääriproteiinin biotinyloitu osa, jonka jälkeen lisättiin fluoresoiva substraatti, mikä taas tunnistaa streptavidini-peroksidaasientsyymi-proteiinikompleksin ja näin antaa fluoresenssituloksen käyttäen fluoresenssia mittaavaa laitetta.

ELISA-tyyppinen tehoseulonta-analyysi on sandwich-tyyppinen analyysi, jossa Maxisorp 384 -kuoppalevyn pohjaan sidottiin 20 µl / kaivo primääriproteiiniä ja annettiin inkuboitua yön yli +4°C:ssa. Tämän jälkeen lisättiin 40 µl / kaivo blokkauspuskuria 1,5 % BSA / 0,05 % TBS Tween[®] 20 ja annettiin inkuboitua 40 min huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen suoritettiin 80 µl / kaivo kolme kertaa pesut 0,05 % TBS Tween[®] 20:lla. Sidotun proteiinin päälle on sidottu vielä sekundääriproteiini, joka on itse biotinyloitu. Sekundääriproteiinin määrä on määräytynyt kemikaalilaimennosten mukaan, eli 1:4 laimennos merkitsee 15 µl / kaivo sekundääriproteiinia ja 5 µl lisättyä kemikaalia, joiden annettiin inkuboitua 1,5 h ajan. Pesut suoritettiin myös inkuboinnin jälkeen ja streptavidini-entsyymikompleksin lisäyksen jälkeenkin. Lisättiin 1:5000 streptavidini-entsyymikompleksi, joka tunnistaa sekundääriproteiinin biotinyloidun osan. Lopuksi lisättiin substraatti, joka taas tunnistaa streptavidini-entsyymikompleksin ja muodostaa tällöin fluoresoivan tuotteen, jota mitattiin Fluorstar Optima 1 -laitteella.

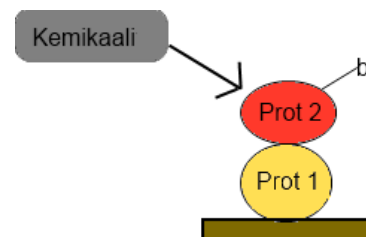
1. Ensin sidottuna primääriproteiini



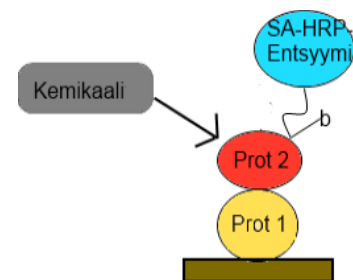
2. Seuraavaksi on primääriproteiinin päälle sidottu sekundääriproteiini, joka on biotinyloitu



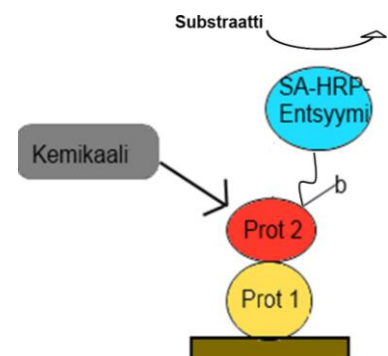
3. Tämän jälkeen muodostuneiden proteiini-proteiiniparin päälle lisätään tutkittavaa kemikaalia, jonka inhibiiovahvuutta tutkitaan



4. Lisätään streptavidini-peroksidaasi-entsyymikompleksia, joka tunnistaa sekundääriproteiinissa olevan biotiinin.



5. Lopuksi lisätään substraatti, joka muuttuu ei fluoresoivasta substraatista fluoresoivaksi lopputuotteeksi, jonka voidaan mitata fluoresenssia mittaavalla laitteella. Tämä tapahtuu kun substraatti on tarttunut streptavidini-entsyymi-proteiinikompleksiin.



Kuva 9. ELISA-tyyppisen tehoseulonta-analyysin periaate.

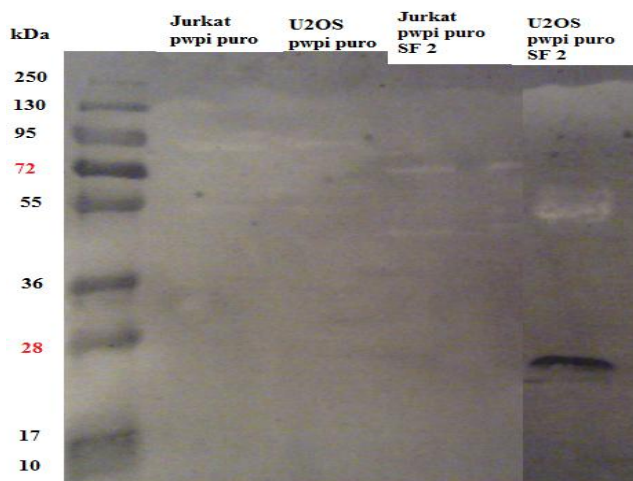
9 Tulokset ja tulosten tarkastelu

9.1 Solulinjan karakterisointi

Työn tarkoituksena oli karakterisoida Nef-proteiinia sisältävää solulinjaa, jota käytettiin hyödyksi sytotoksisuusmenetelmässä kemikaalien testauksissa. Karakterisointia varten testattiin proteiinin tuotto solulinjassa, jonka jälkeen varmistettiin solulinjan puhtaus mykoplasmaakontaminaatiotestauksella.

9.1.1 Pwpi puro SF 2 Nef -proteiinin tuoton testaus

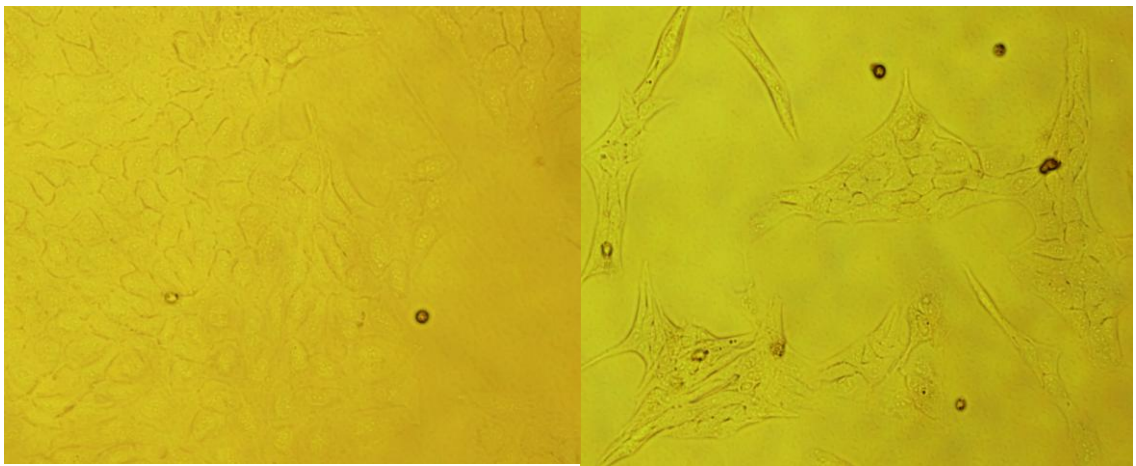
Tuotetun pwpi puro SF 2 Nef -proteiinin testaus tehtiin Western blott -menetelmällä, käyttäen eri vasta-aineita. Menetelmän tarkoituksena oli tarkistaa, sisälsikö solulinja kyseistä proteiinia.



Kuva 10. Solulinjojen karakterisointi Western blott -menetelmää hyväksi käyttäen.

Kuvasta 10 näkyy, missä solulinjassa tuotettua SF 2 Nef -proteiinia esiintyy. Jurkat pwpi puro ja U2OS pwpi puro on tyhjä vektori, jolloin siinä ei ole tarkoitus esiintyä Nef-proteiinia. Nef-proteiinin koko on 27 kDa, joten kuvasta näkyy, että ainostaan U2OS-solulinjassa se ilmenee ja Jurkat-solulinjassa ei. Tämän perusteella voitiin jatkaa U2OS-solulinjalla, jossa Nef-proteiinia ekspressoiva solulinja on karakterisoitu ja Jurkat-solulinja jouduttiin hylkäämään Nef-proteiinin ekspression puuttuessa.

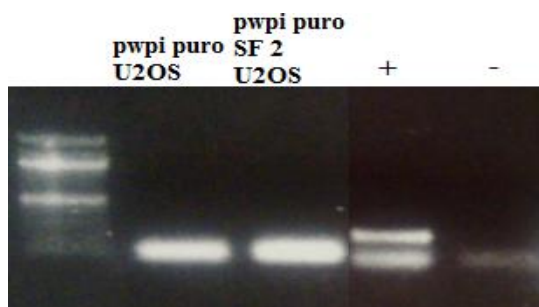
Kuvassa 11 on esitetty, miltä U2OS-solut näyttävät ilman Nef-proteiinia ja Nef-proteinilla. Soluja on jaettu parin päivän ajan. Jaettaessa niitä pidempään niiden morfologia ei eroa toisistaan. Vasemmassa kuvassa on U2OS-solulinjan soluja, jotka sisältävät tyhjän vektorin, eli solut eivät tuota Nef-proteiinia. Tällöin solut näyttävät pyöreähköiltä. Oikeassa kuvassa on myös U2OS-solulinjan soluja, mutta tässä kyseiset solut sisältävät Nef-proteiinia tuottavan vektorin. Tässä solujen pyöreä muoto on muuttanut muotoaan pitkulaiseksi.



Kuva 11. U2OS-solulinjan soluja. Vasemmalla pwpi puro ja oikealla pwpi puro SF 2.

9.1.2 *Mykoplasma*-kontaminaation testaus

Mykoplasma-PCR:n tarkoituksena oli tarkistaa, onko kyseinen karakterisoitu solulinja tarpeeksi hyvä jatkamaan ja onko se tarpeeksi puhdas. *Mykoplasma* on parasiitti eli alkueläin, joka pesii solulinjassa ja aiheuttaa muutoksia solulinjassa ja kontaminaatioita.



Kuva 12. *Mykoplasma*kontaminaation testaus *Mykoplasma*-PCR:ää hyväksi käyttäen.

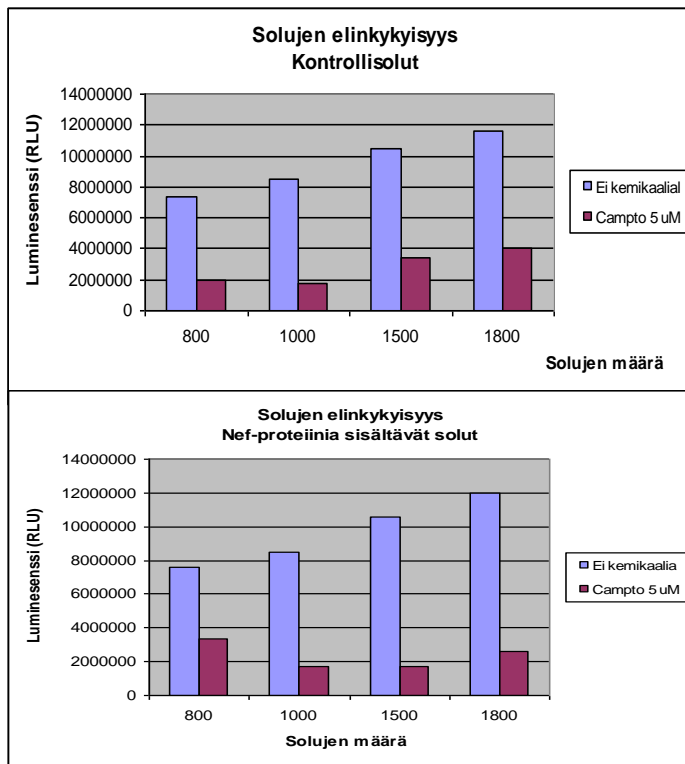
Kuvasta 12 jokaisessa näytteessä vahvempana viivana näkyvä on sisäinen kontrolli, joka on jokaisesta näytteestä monistuva kontrolligeeni. Negatiivisessa kontrollissa on lisätty näytteiden tilalle steriiliä vettä. Tutkittavissa solulinjoissa näkyy ettei mykoplasma kontaminaatiota esiinny ollenkaan, ja näin soluja voidaan käyttää sytotoksisuusmenetelmässä.

9.2 Nef-proteiinin sisältävien solujen elinkykyisyys

9.2.1 Solumäärän optimointi elävyydestiin

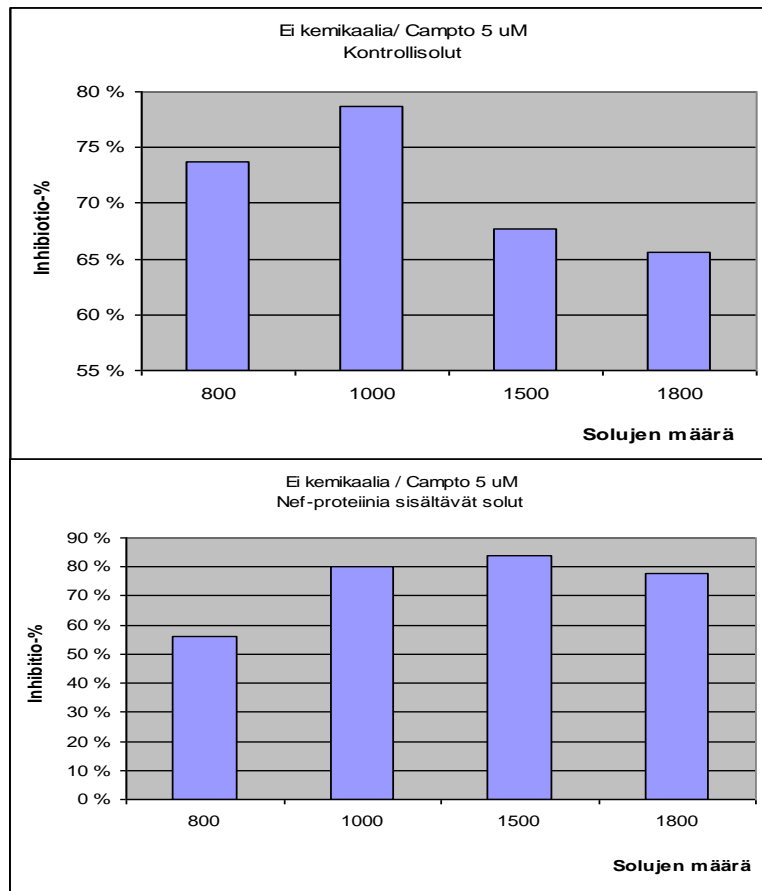
Solulinjojen U2OS pwpi puro ja U2OS pwpi puro SF 2 solumäärät optimoitiin solun elävyyden mittaamenetelmää varten. Tiedetyt solumäärät annosteltiin 384-kuoppalevyihin, jonka jälkeen lisättiin sekä Nef-proteiinia sisältävien solujen ja kontrollisolujen päälle 5 μ M kamptotesiinia. Kamptotesiini on apoptoosia aiheuttava kemikaali, jota käytetään syöpälääkkeenä. Kemikaalilisäyksen avulla voitiin selvittää optimi sekä Nef-proteiinia sisältäville soluille ja kontrollisoluille solun elävyydmittausta hyväksi käyttäen.

Nef-proteiinia sisältävien solujen optimointi lähdettiin solujakaumasta 800 – 1800 solua / kaivo, minkä välillä ajateltiin optimoinnin olevan. Solujen optimointia varten tehtiin solujen elävyyden mittausta, jonka avulla saatiin luminesenssisignaaleja (RLU). Näiden signaalien avulla nähtiin, miten paljon signaalia oli ilman kemikaalin lisäystä ja apoptoosia aiheuttavan kemikaalilisäyksen jälkeen (kuva 13). Kuten kuvasta näkyy, molemmilla soluilla ilman kemikaalin lisäystä luminesenssisignaalit ovat samanlaiset. Myös kemikaalin lisäyksen jälkeen signaalit näyttävät olevan melko samanlaiset.



Kuva 13. Solujen elinkykyisyyden mittaus Nef-proteiinia sisältävillä soluilla ja kontrollisoluilla.

Saatujen luminesenssisignaalien avulla laskettiin, kuinka paljon kyseinen apoptoosia aiheuttava kemikaali tappoi soluja (kuva 14). Kuvasta 14 nähdään, että solumäärältään 1000 solua / kaivo on optimi. Molemmilla soluilla inhibitioprosentti on melko samanlainen, Nef-proteiinia sisältävillä soluilla inhibitio oli 80 % ja kontrollisoluilla 79 %. Muilla solumäärillä, kuten 800, 1500 ja 1800 solua / kaivo, inhibitioprosentit erosivat solujen välillä hyvin paljon, minkä takia 1000 solua / kaivo oli paras saavutettu optimi pienemmällä hajonnalla. Solumäärällä 1000 solua / kaivo, solut kasvoivat tasaisesti kemikaalilisäyksen jälkeenkin, kun taas muiden solumäärän kannalta solut kasvoivat joko harvaksen tai hyvin tiheään.



Kuva 14. Nef-proteiinia sisältävien solujen ja kontrollisolujen inhibitioprosentit.

9.3 Kemikaalien vaikutus Nefiä tuottavien solujen elävyyden mittaus

Työn tarkoituksena oli etsiä kemikaalikirjastoista ne kemikaalit, jotka tappavat Nefiä tuottavat solut eivätkä vahingoittaisi normaalisoluja. Käytetyt kemikaalikirjastot koostuivat kahdesta erilaisista kirjastoista, Hibertin kemikaalikirjastosta, johon oli koottu jo aikaisemmin testatut ja kerätyt kemikaalit, ja FDA-kemikaalikirjastosta. Sytotoksisuusmenetelmä perustui ATP:n mittaukseen.

9.3.1 Kemikaalien etsintä kemikaalikirjastoista

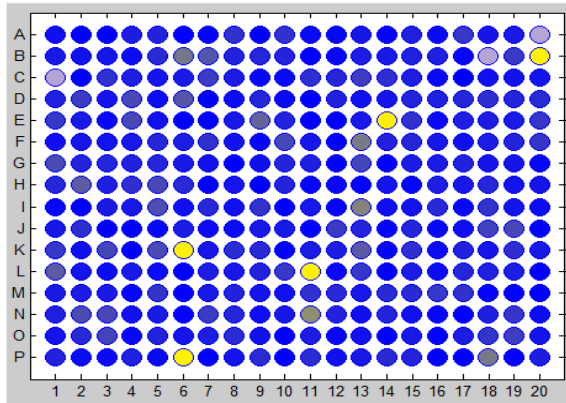
Sytotoksisuusmittausmenetelmässä käytettiin hyväksi kemikaalikirjastoja Hibert ja FDA, Spectrum Microsource, joista pyrittiin löytämään kemikaaleja, jotka olisivat enemmän toksisia Nefiä tuottaville soluille kuin tyhjää kontrollivektoria tuottaville soluille.

Menetelmässä kuoppalevyihin annosteltiin ensin 50 µl U2OS SF2 pwpi puro ja U2OS pwpi puro –soluja, joiden päälle lisättiin päivän inkubaation jälkeen 0,15 µl tutkittavaa kemikaaleja (0,3 mM) kemikaalikirjastoista. Kemikaalilisäyksen jälkeen levyjen annettiin inkuboitua 48 h. Inkubointien jälkeen solut erotettiin sentrifugoimalla erilleen kasvatusliuoksesta, minkä jälkeen tehtiin elävyystesti. Näistä luminesenssisignaalitylöksistä ilmeni, kuinka paljon soluja on kuollut kyseisten kemikaalien lisäyksen jälkeen.

Työn tarkoituksena oli etsiä ne kemikaalit, jotka antavat vähiten signaalia, eli näin ollen kyseinen kemikaali on onnistunut tappamaan soluja. Kuitenkin pyrittiin löytämään kemikaaleja, jotka tappaisivat Nef-proteiinia tuottavia soluja eivätkä normaalisoluja. Tällöin saaduista tuloksista pyrittiin tekemään mahdollisimman luotettavia käyttämällä normalisointimenetelmää.

Kemikaalikirjastoista Hibert ja FDA, Spectrum Microsource, löydettiin kemikaaleja, jotka tappoivat Nef-proteiinia tuottavia soluja. Näiden kemikaalien etsintä suoritettiin R-ohjelman määritettyjen koodien avulla (liite 1), missä laskettiin B-scoret molemmille Nef-proteiinia tuottaville soluille ja normaalisoluille. Tämän jälkeen B-score-tuloksien avulla muodostettiin haluttavuusfunktiot molemmille, missä ensin päätettiin haluttavuuskäyrät, joka on esitetty liitteessä 3. Haluttavuusfunktion avulla löydettiin kemikaalit matemaattisin keinoin ja Matlab-ohjelman avulla voitiin havainnollistaa kuvallisesti kemikaalien sijainti kyseisessä kemikaalilevyssä. Jokaista tutkittavaa kemikaalilevyä kohti tehtiin samanlainen laskenta ensin R-ohjelmalla matemaattisesti ja kuvallisesti Matlab-ohjelmalla.

Hibert-kemikaalikirjastosta löydettiin viidestätoista kemikaalilevyistä ne kemikaalit, jotka ovat tappavasti vaikuttaneet Nef-proteiinia tuottavilla soluilla. Kuvasta 15 näkyy keltaisella värillä ne kemikaalit, jotka ovat antaneet parhaan tuloksen tässä työssä. Kuoppalevykuvan 15 (kemikaalilevynumero 29 – 32) antaman tuloksen mukaan valitut kemikaalit olivat CH29/32K6, CH29/32P6, CH29/32L11, CH29/32E14 ja CH29/32B20.



Kuva 15. Kemikaalilevyn 29 – 32 valitut kemikaalit esitettynä keltaisella värillä.

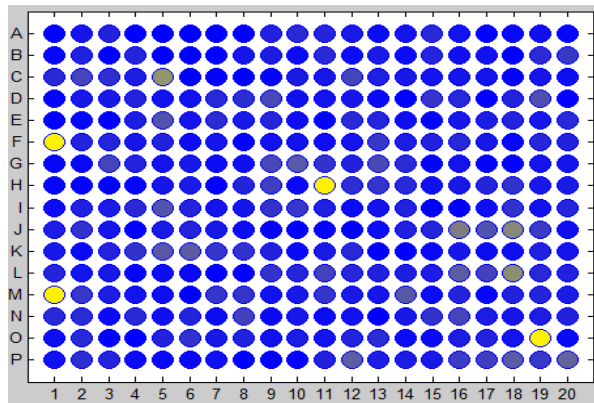
Muille Hibertin kemikaalikirjaston kemikaalilevyille tehtiin samanlainen tulostenkäsittely ja ne on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Valitut kemikaalit tutkittavissa kemikaalilevyissä.

Kemikaalilevyn numero	Kemikaalin nimi
1 - 4	CH1/4F17
5 - 8	Ei löytynyt kemikaaleja tästä levyiltä
9 – 12	CH9/12M1, CH9/12C17
13 – 16	CH13/16M19, CH13/16O19
17 – 20	Ei löytynyt kemikaaleja tästä levyiltä
21 – 24	Ei löytynyt kemikaaleja tästä levyiltä
25 – 28	CH25/28H1, CH25/28M20
29 – 32	CH29/32K6, CH29/32P6, CH29/32E14, CH29/32B20
33 – 36	CH33/36O10, CH33/36L19
37 – 40	CH37/40P18, CH37/40I2, CH37/40J7, CH37/40N20
41 – 44	CH41/44F7, CH41/44J20
45 – 48	CH45/48C3, CH45/48J20
49 – 52	CH49/52A2, CH49/52D6, CH49/52C8, CH49/52C16, CH49/52C18, CH49/52L18
53 – 56	CH53/56L1, CH53/56O8, CH53/56O12
57 – 60	CH57/60N5, CH57/60J16, CH57/60L16, CH57/60H17, CH57/60L17

Kemikaalikirjastosta FDA, Spectrum Microsource löydettiin seitsemästä kemikaalilevystä ne kemikaalit, kuten edellä Hibertin kemikaalikirjastosta, jotka tappavat ainoastaan Nef-proteiinia tuottavia soluja. Kuvasta 16 näkyy tässäkin tapauksessa kemikaalit, jotka ovat antaneet parhaan tuloksen muista kemikaaleista.

Kuoppalevykuvan 16 (kemikaalilevynumero B193) antaman tuloksen mukaan valitut kemikaalit olivat B193/F1, B193/M1, B193/H11, B193/O19.

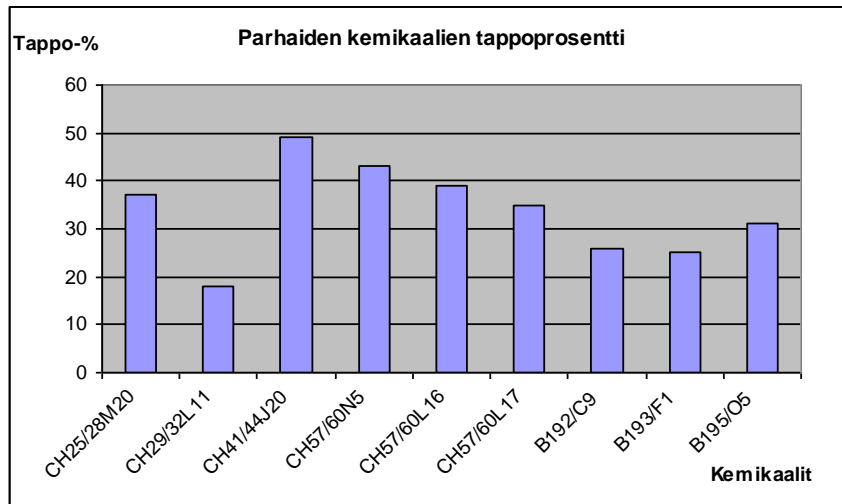


Kuva 16. Kemikaalilevyn B193 valitut kemikaalit esitettynä keltaisella värillä.

Taulukko 8. Valitut kemikaalit tutkittavissa kemikaalilevyissä.

Kemikaalilevyn numero	Kemikaalin nimi
B192	B192/C9
B193	B193/F1, B193/M1, B193/H11, B193/O19
B194	Ei löytynyt kemikaaleja tästä levyltä
B195	B195/O5
B196	B196/D1, B196/L9
B197	Ei löytynyt kemikaaleja tästä levyltä
B198	B198/O12, B198/C20

B-score-menetelmän ja haluttavuusfunktion avulla saatiin löydettyä kemikaalit, jotka tappavat Nef-proteiinia tuottavia soluja, ja näistä valittiin yhdeksän parasta kemikaalia. Parhaille kemikaaleille laskettiin tappoprosentit, kuinka paljon kyseinen kemikaali oli tappanut soluja. Lasketut tappoprosentit Hibert- ja FDA-kemikaalikirjastoista ovat esitettynä kuvassa 17.



Kuva 17. Kemikaalikirjastojen Hibert ja FDA parhaimpien kemikaalien tappoprosentit Nef-proteiinia tuottaville soluille.

9.3.2 Matemaattinen osuus

Saaduista luminesenssisignaalitylöksistä tehtiin normalisointi arvoille, minkä tarkoituksena oli vähentää tuloksien antamia taustoja ja näin minimoida väärät positiiviset ja negatiiviset tulokset. Näin saatiin luotettavimmat tulokset löytämään oikeat kemikaalit, jotka vaikuttavat tappavasti Nef-proteiinia tuottaville soluille. Tuloksista pyrittiin saamaan ainoastaan selville ne kemikaalit, jotka tappavat viruksella infektioivat solut. Näin normalisointimenetelmänä käytettiin B-score-menetelmää, jonka avulla tehtiin keskiarvon korjaus haluttavuusfunktion muodostamista varten.

Haluttavuusfunktion tarkoituksena oli antaa tuloksia, missä haluttiin vain tappaa kyseiset solut eikä kaikkia soluja. Jos kaikkia soluja haluttaisiin tappaa, haluttavuusfunktioita ei näin tarvittaisi, mutta tämän työn tarkoituksena oli kuitenkin löytää vain ne kemikaalit, jotka tappavat HI-viruksen aiheuttamaa infektiota.

9.3.2.1 Tulosten normalisointi B-score-menetelmällä

Tehoseulonta-analyysillä on tärkeä rooli lääkekehityksessä, jossa käytetään erilaisia menetelmiä estämään väärin kemikaalien löytämistä. Tämän työn tapauksessa normalisointimenetelmänä käytettiin B-score-menetelmää. Tuloksien antamat vaihtelut

voitiin minimoida keskiarvojen ja useiden rinnakkaisten levyjen avulla. Myös kontrollien avulla voitiin identifioida levyjen välistä vaihtelua ja niiden aiheuttamia tausta-arvoja. Tämän normalisointimenetelmän tarkoituksena oli poistaa systemaattista levyjen välistä vaihtelua, ja näin levyjä voitiin verrata oikeiden kemikaalien löytämisessä. (61, s. 167–169.)

Artikkelin suosituksen mukaan paras normalisointi tuloksille oli ottamatta huomioon kontrolleja. Artikkelin mukaan B-score oli paras menetelmä etenkin, kun oli epäilystä rivien ja sarakkeiden systemaattisesta virheestä. Saaduilla tuloksilla oli kaksi tekijää: kemikaalien oikea vaikutus ja satunnainen virhe. John Tukeyn kehittämän kaksipuolisen mediaanin polish-korjausmenetelmällä saadaan poistettua rivien ja sarakkeiden vaikutusta ja taustaa kemikaalien etsinnässä. B-score-menetelmää varten käytettiin seuraavanlaista mallia (61, s. 169–171) :

$$r_{ijp} = Y_{ijp} - \mu_{ijp} + R_{ip} + C_{jp} + \varepsilon_{ijp}, \quad (1)$$

missä r_{ijp} on mittauksen jäännös, Y_{ijp} on levyjen p kaivoissa havaitut raaka-arvot rivi- ja sarakekohdissa, μ_{ijp} on oikea arvo tulokselle, R ja C edustavat levykohtaisen rivi- ja sarakearvoja ja ε_{ijp} on kaikkien lähteiden virheet.

Tällöin kaavaa 1 hyväksi käyttäen saadaan jokaiselle levyille laskettua median polish-korjaus ja kaava 2 tekee tuloksille normalisoinnin (61, s. 168).

$$Bscore = \frac{r_{ijp}}{MAD_p}, \quad (2)$$

missä r_{ijp} on median polishin laskema jäännös ja MAD_p on keskiarvon absoluuttinen poikkeama, joka vähentää levyjen välistä vaihtelua.

B-score-menetelmä on Z-scoren karkea analogi, jonka tarkoituksena oli antaa tulos, jota voitiin karkeasti tulkita standardijakauman käyttäytymisen mukaan. Tämä menetelmä on epäherkempi mittausvirheille ja mittausvirheiden jakaumien eroille. B-scorella on

kolme etua: se on ei-parametrinen, mikä minimoi epänormaalin jakautumisen vaikutusta, se minimoi mittausvirheiden paikasta riippuvia vaikutuksia, ja se on vastustukykyinen tilastolliselle harhalle. B-score-menetelmää käytettiin tilastollisesti korjaamaan virheitä ja suhteellistamaan arvot hajontaan nähden. Menetelmä siis toimii vain teknisen työkaluna hyvien kemikaalien etsinnässä. (61, s. 171.)

9.3.2.2 Haluttavuusfunktion muodostaminen

Haluttavuusfunktioimenetelmän avulla pyrittiin valitsemaan oikeat kemikaalit, jotka ovat tappaneet Nef-proteiinia tuottavia soluja mutteivät normaalisoluja. Ennen haluttavuusfunktion muodostamista laskettiin tulokset Tukeyn kehittämällä B-score-menetelmällä, jonka tarkoituksena oli poistaa mahdolliset systemaattiset virheet. Myös haluttavuusfunktioimenetelmä toimii teknisenä työkaluna hyvien kemikaalien etsinnässä, kuten B-score-menetelmäkin. Haluttavuusfunktion etuna on se, että sillä voidaan hakea minkä hyvänsä tavoitteen mukaisia kemikaaleja. Derringer & Gearyn (1988) mukaan haluttavuusfunktioimenetelmän kehittäjä oli Harrington (1965), ja menetelmää ovat myöhemmin kehittäneet Derringer & Suich (1980).

Muodostettaessa haluttavuusfunktiota jokainen arvo saa haluttavuusarvon d väliltä 0–1. Haluttavuusarvo kuvaa sitä, kuinka haluttava kyseinen arvo on. Arvo 1 vastaa ihanteellista arvoa ja haluttavuusarvo 0 taas vastaa arvoa, jolla kemikaali ei ole enää hyväksyttävä. Haluttavuusfunktion muodon päättävät yleensä asiantuntijat. Lopuksi yksittäiset haluttavuusfunktiot yhdistetään kokonaishaluttavuudeksi D käyttäen niiden geometrista keskiarvoa kaavan 3 mukaisesti. Geometrisen keskiarvon käyttäminen aritmeettisen keskiarvon sijaan takaa, että kokonaishaluttavuus D on nolla, kun jonkin muuttujan arvon haluttavuus on nolla. (62, 2-3; 63, s. 215; 64. s. 349.)

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_k)^{\frac{1}{k}}, \quad (3)$$

missä D on kokonaishaluttavuus ja d on yksittäinen haluttavuusarvo.

Haluttavuusfunktioiden piirtämiseksi jokaiselle tutkittavalle kemikaalilevylle määriteltiin maksimaalinen haluttavuus. Tämä maksimaalinen haluttavuus vastaa tällöin maksimaalista yhteensopivuutta tavoitteen tappaa Nef-proteiinia tuottavia soluja muttei normaalisoluja lainkaan. Tällöin haluttavuusfunktion arvo kertoo yksinkertaisesti sen, kuinka hyvä kemikaali on määriteltyjen tavoitteiden suhteen (1 täydellinen ja 0 kelvoton).

Muodostettiin yksipuolisia haluttavuusfunktioita. Yksipuolisella haluttavuusfunktiolla haluttavuus kasvaa samassa suhteessa kuin muuttujan arvo, ja kaksipuolisella haluttavuusfunktiolla muuttujalla arvolla on määritelty ylä- ja ala-arvot. Funktion arvon (haluttavuuden) haluttiin nousevan tasaisesti arvosta nolasta yhteen, kun tahdotaan vaikuttaa vain tiettytyypisille soluille eikä kaikentyypisille. Oikeiden kemikaalien etsinnän haluttavuutta kuvaamaan käytettiin funktiota 4. (63, s. 215–216; 65.)

$$D = \sqrt{y_1 \cdot y_2} , \quad (4)$$

missä y_1 on funktio $f_1(\text{B-score}_{\text{nef}})$ ja y_2 on funktio $f_2(\text{B-score}_{\text{kontrolli}})$. Funktio $f_1(\text{B-score}_{\text{nef}})$ ja $f_2(\text{B-score}_{\text{kontrolli}})$ on muodostunut kaavan 2 mukaan. Funktioiden kuvaajat on esitetty liitteessä 3.

Työssä käytettiin DOE-functions-funktiokokoelmaan kuuluvaa des.one.sided-funktiota, johon arvot sijoitettiin muodossa des.one.sided (z,a,b) (65). Oikeat arvot a:lle ja b:lle haettiin kokeilemalla erilaisten käyrien piirtämistä R-ohjelmalla ja valitsemalla sopivimmat.

Haluttavuusfunktion piirtämisessä pyrittiin löytämään sellaiset parametrit, jotka muodostivat funktion mahdollisimman jyrkäksi. Tällöin normaalisoluille käyrä oli laskeva eli haluttavuudeksi saatiin nolla, missä kemikaalien lisäyksessä normaalisoluja ei haluttu tappaa lainkaan. Nef-proteiinia tuottaville soluille käyräksi saatiin nouseva, eli haluttavuudeksi saatiin maksimaalinen, missä kemikaalien lisäyksessä tapetaan Nef-proteiinia tuottavia soluja. Haluttavuuskäyrät on esitetty liitteessä 3.

Lasketuista haluttavuuksista tällöin tehtiin kuoppakuvat Matlab-ohjelmalla jokaiselle kemikaalilevylle identifiomaan kuvana, missä kuopassa mikäkin kemikaali on ollut valittuna haluttavusfunktion avulla.

9.4 Proteiini-proteiini-interaktion inhibition tutkiminen pienimolekyylisiä kemikaaleja hyväksi käyttäen

Tarkoituksena oli testata pienimolekyylisten kemikaalien kykyä inhiboida proteiini-proteiini interaktiota, käyttäen ELISA-tyyppistä tehoseulonta-analyysia. Tutkittavat tuotetut proteiinit on esitetty taulukossa 5. Tutkittavat sekundääriproteiinit olivat SH3-osa, tarttumista vastinproteiineihin haluttiin tutkia kemikaalien läsnä ollessa.

9.4.1 Erilaisten proteiinien valinta laimennossarjan avulla ELISA-testiä käyttäen

Tuotetuille proteiineille tehtiin laimennossarja, jossa kuoppalevyn sidottujen primääriproteiinien pitoisuudet olivat 1–8 ng. Näiden kuoppalevyihin pohjaan tarttuneiden primääriproteiinien päälle sidottiin sekundaariproteiinit, jotka ovat valmiiksi biotinyloituja ja joiden pitoisuudet olivat 0,01 μM – 5 μM (taulukot 9 – 12). Näillä pitoisuuksilla testattiin aluksi, mikä laimennoksista antaa parhaan signaalin proteiini-proteiini interaktiosta proteiini-proteiini-interaktion jatkotutkimusta varten.

Taulukko 9. Fuusioproteiinien IRTKS-b, GST-EspFu ja GST interaktiot eri laimennoksilla.

		EspFu (GST)					GST		
		1 ng/ μl	2 ng/ μl	4 ng/ μl	6 ng/ μl	8 ng/ μl			4 ng/ μl
IRTKS-b	0 μM	24	25	25	34	33	IRTKS-b	0 μM	25
	5 μM	1079	1223	1269	1147	1178		1 μM	165
	2,5 μM	1208	1017	1315	1207	1250		0,5 μM	135
	1 μM	1051	1280	1313	1248	1273		0,1 μM	70
	0,5 μM	883	1218	1339	1297	1397		0,05 μM	60
	0,1 μM	273	706	972	1142	1163		0,01 μM	39
	0,05 μM	154	427	624	825	835			
	0,01 μM	67	91	146	206,5	187			

Taulukossa 9 tehdyssä ELISA-analyysissä saatujen tuloksien mukaan paras pitoisuus fuusioproteiinien interaktiolle oli 2 ng/ μl primääriproteiinille ja 1 μM

sekundaariproteiinille. Tätä pitoisuusyhdistelmää käytettiin proteiini-proteiini-interaktion inhiboimiseen. GST toimii negatiivisena kontrollina fuusioproteiinille IRTKS-b ja GST-EspFu proteiini-proteiini-interaktiolle, minkä avulla voidaan nähdä tausta kuoppalevyssä.

Taulukko 10. Fuusioproteiinien SUMO-b, MBP-Nef ja MBP interaktiot eri laimennoksilla.

		MBP – Nef					SUMO Lyn -b	MBP	
		1 ng/µl	2 ng/µl	4 ng/µl	6 ng/µl	8 ng/µl		0 µM	2 ng/µl
SUMO Lyn -b	0 µM	22	23	25	25	30		0 µM	24
	5 µM	1432	1534	1561	1420	1344		1 µM	654
	2,5 µM	1414	1492	1630	1088	1806			
	1 µM	998	1212	1518	1660	1698			
	0,5 µM	997	993	1262	1523	1651			
	0,1 µM	223	292	579	774	901			
	0,05 µM	125	182	331	471	577			
	0,01 µM	49	58	78	93	123			

Taulukon 10 tulosten mukaan paras pitoisuus fuusioproteiinien interaktiolle oli 4 ng/µl promääriproteiinille ja 1 µM sekundaariproteiinille. Tätä fuusioproteiinia (SUMO Lyn-b) ei otettu kemikaalitestaukseen vähäisen proteiinituoton kannalta. Myös tälle fuusioproteiinin interaktiolle on otettu huomioon kontrolli (SUMO Lyn-b ja MBP) taustan huomioimisen kannalta.

Taulukko 11. Fuusioproteiinien GST-EpS8L1 SH3-b, MBP-CD3-epsilon ja MBP interaktiot eri laimennoksilla.

		MBP-CD3 epsilon					GST-EpSL1 SH3-b	MBP	
		1 ng/µl	2 ng/µl	4 ng/µl	6 ng/µl	8 ng/µl		0 µM	2 ng/µl
GST-EpS8L1 SH3-b	0 µM	38	67	63	159	58		0 µM	39
	5 µM	354	887	1081	1362	1306		1 µM	84
	2,5 µM	995	1004	1221	1192	1402			
	1 µM	1060	1353	1435	1511	1562			
	0,5 µM	1020	1349	1254	1252	1717			
	0,1 µM	644	1176	1393	1408	1459			
	0,05 µM	674	1169	1254	1294	1260			
	0,01 µM	283	672	827	842	863			

Taulukon 11 tulosten mukaan paras pitoisuus fuusioproteiinien interaktiolle oli 2 ng/ μ l primääriproteiinille ja 0,5 μ M sekundaariproteiinille. Tätä fuusioproteiinia otettiin kemikaalitestaukseen, mutta inhibitiotuloksista ei tullut järkeviä. Myös tälle fuusioproteiinin interaktiolle on otettu huomioon kontrolli (GST-EpS8L1 SH3-b ja MBP) taustan huomioimisen kannalta.

Taulukko 12. Fuusioproteiinien GST-Hck SH3-b, MBP-Nef ja MBP interaktiot laimennoksella 0 μ M ja 1 μ M.

		MBP – Nef				MBP	
GST- Hck-b			4 ng/ μ l	GST- Hck-b			2 ng/ μ l
		0 μ M	21			0 μ M	24
		1 μ M	1500			1 μ M	120

Fuusioproteiinien MBP-Nef ja GST-Hck SH3-b interaktiota (taulukko 12) on aikaisemmin tutkittu ja oletettu, että paras signaali saadaan laimennoksella 4 ng/ μ l primääriproteiinille ja 1 μ M sekundaariproteiinille. Myös kontrolli (GST-Hck SH3-b ja MBP) on otettu tässäkin huomioon taustaa varten.

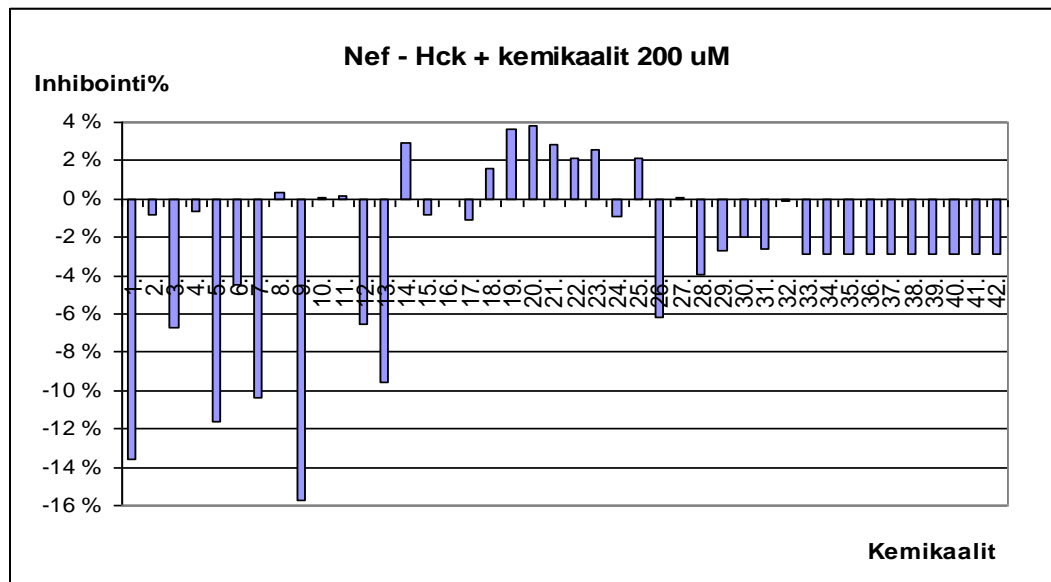
9.4.2 Nef-Hck SH3 -interaktion ja kontrolliproteiinin interaktion inhibitio

Tutkimuksen pääkohteena oli löytää kemikaaleja, jotka inhiboivat Nef-Hck SH3 -interaktiota mutta eivät kontrolliproteiinien interaktioita. Tutkittavat kemikaalit ovat johdannaisia kemikaaleja tietystä kemikaalimallista, joiden oletetaan olevan jonkinlainen inhibitio Nef-Hck SH3 -interaktiolle. Kyseiset kemikaalit on muokannut kemisti Jean-Baptiste Joos EcoSynth-nimisestä yrityksestä.

Tämän jälkeen valitulla pitoisuudella (IRTKS sekundaariproteiinilla 1 μ M ja GST-EspFu primääriproteiinille 2 ng/ μ l ja GST-Hck sekundaariproteiinilla 1 μ M ja MBP-Nef primääriproteiinille 4 ng/ μ l) testattiin millä kemikaalilaimennoksilla (välillä 12,5 – 200 μ M) päästään parhaisiin inhibitiotuloksiin.

Aluksi testattiin miten kemikaalit inhiboivat Nef-Hck SH3 -interaktiota, kuten alla kuvassa 18 on esitetty inhibitiotestaus 42 eri kemikaalilla laimennoksella 200 μ M. Kuten

kuvasta näkyikin, inhibitiot ovat hyvin matalia tai inhibitiota ei tapahtunut lainkaan, joten kemikaalien oletetaan olevan huonoja Nef-Hck SH3 -interaktion inhibointia varten. Näitä samoja kemikaalien inhibointia on testattu myös laimennoksilla 100 μM , 50 μM , 25 μM ja 12,5 μM , joka on esitettyinä taulukossa 13, jossa tulee esille myös tutkittavien kemikaalien nimet. Tuloksissa ei otettu huomioon taustaa, jolloin otettaessa niitä huomioon inhibitioprosentiksi muuttuisi jokaisen kemikaalin kohdalla 0 %:ksi eli tällöin inhibitiota ei ole tapahtunut ollenkaan tässä kemikaalitestauksessa.



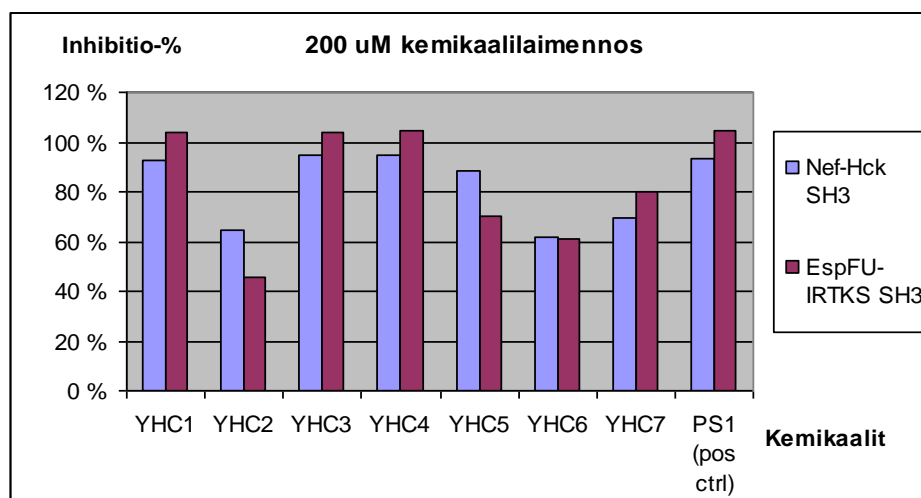
Kuva 18. Nef-Hck SH3 -interaktion inhibiointi 41 kemikaalien avulla laimennoksella 200 μM .

Taulukko 13. Kemikaalien inhibitioprosentit Nef-Hck SH3 -interaktiolle eri laimennoksilla.

Nro.	Kemikaalit	100 uM	50 uM	25 uM	12,5 uM
1.	YH01	-2 %	-6 %	0 %	-8 %
2.	YH02	3 %	-1 %	2 %	-6 %
3.	YH03	1 %	0 %	1 %	-4 %
4.	YH04	5 %	1 %	4 %	-2 %
5.	YH05	2 %	3 %	-3 %	-6 %
6.	YH06	6 %	6 %	4 %	-1 %
7.	YH07	2 %	2 %	4 %	7 %
8.	YH08	6 %	4 %	1 %	-2 %
9.	YH09	2 %	-1 %	-8 %	-8 %
10.	YH10	3 %	1 %	4 %	-2 %
11.	YH11	-1 %	2 %	3 %	45 %
12.	YH12	3 %	-1 %	3 %	-5 %
13.	YH13	1 %	0 %	-8 %	-12 %
14.	YH14	2 %	-6 %	0 %	-3 %
15.	YH15	-1 %	-4 %	-8 %	-9 %
16.	YH16	0 %	-2 %	-3 %	-11 %
17.	YH17	-2 %	-6 %	0 %	-8 %
18.	YH18	3 %	-1 %	2 %	-6 %
19.	YH19	1 %	0 %	1 %	-4 %
20.	YH20	5 %	1 %	4 %	-2 %
21.	YH21	2 %	3 %	-3 %	-6 %
22.	YH22	6 %	6 %	4 %	-1 %
23.	YH23	2 %	2 %	4 %	7 %
24.	YH24	6 %	4 %	1 %	-2 %
25.	YH25	2 %	-1 %	-8 %	-8 %
26.	YH26	3 %	1 %	4 %	-2 %
27.	YH27	-1 %	2 %	3 %	45 %
28.	YH28	3 %	-1 %	3 %	-5 %
29.	YH29	1 %	0 %	-8 %	-12 %
30.	YH30	2 %	-6 %	0 %	-3 %
31.	YH31	-1 %	-4 %	-8 %	-9 %
32.	YH32	0 %	-2 %	-3 %	-11 %
33.	YH33	0 %	-6 %	0 %	-8 %
34.	YH34	3 %	-1 %	2 %	-6 %
35.	YH35	1 %	0 %	1 %	-4 %
36.	YH36	5 %	1 %	4 %	-2 %
37.	YH37	2 %	3 %	-3 %	-6 %
38.	YH38	6 %	6 %	4 %	-1 %
39.	YH39	2 %	2 %	4 %	7 %
40.	YH40	6 %	4 %	1 %	-2 %
41.	YH41	2 %	-1 %	-8 %	-8 %
42.	PS1 (pos ctrl)	3 %	1 %	4 %	-2 %

Koska edellä olevista johdetuista kemikaaleista ei saatu minkäänlaista inhibiotta kyseiselle interaktiolle, jouduttiin testaamaan muita kemikaaleja. Seuraavat seitsemän tutkittavaa kemikaalia (taulukko 14 ja 15) testattiin Nef-Hck SH3 ja EspFu-IRTKS SH3 interaktiolle, missä jatkoon otettavat kemikaalit ovat sellaisia, jotka inhiboivat Nef-Hck SH3 interaktiot, muttei kuitenkaan kontrolliproteiineja. Kuvan 19 tulosten mukaan kemikaalit inhiboivat molempien proteiini-proteiini-interaktion kohdalla samassa suhteessa. Tämä tulos ei ole hyvä, sillä pyritään etsimään ne kemikaalit, jotka inhiboivat vain Nef-Hck SH3 -interaktiota ja muiden kontrolliproteiinien kohdalla ei.

Kuvan 19 mukaan 200 μM kemikaalilaimennoksessa kemikaaleilla YHC2 ja YHC5 näkyy olevan jonkinlaista positiivista vaikutusta, missä inhibiatio on Nef-Hck SH3 -interaktiossa paljon vahvempi kuin kontrolliproteiinien. Muiden kemikaalien kohdalla tässä laimennoksessa inhibitiotulos on huomattavasti huonompi.



Kuva 19. Nef-Hck SH3- ja EspFu-IRTKS SH3 -interaktion inhibiointi 7 kemikaalien avulla laimennoksella 200 μM .

Kemikaalit testattiin myös muilla kemikaalilaimennoksilla 100 μM , 50 μM , 25 μM ja 12,5 μM , joiden inhibitioprosentit on esitettyinä taulukossa 14 ja 15. Taulukoiden mukaan parhaimmat kemikaali-inhibitiot Nef-Hck SH3:lle olivat YHC2 (25 μM), YHC3 (25 μM ja 50 μM) ja YHC7 (25 μM).

Taulukko 14. Kemikaalien inhibitioprosentit Nef-Hck SH3 -interaktiolle eri laimennoksilla.

Kemikaalit	100 μM	50 μM	25 μM	12,5 μM
YHC1	93 %	87 %	56 %	38 %
YHC2	40 %	34 %	37 %	-5 %
YHC3	86 %	81 %	74 %	24 %
YHC4	96 %	93 %	84 %	76 %
YHC5	35 %	24 %	-21 %	8 %
YHC6	7 %	-3 %	-6 %	-15 %
YHC7	11 %	-5 %	68 %	-22 %
PS1 (pos ctrl)	89 %	57 %	30 %	28 %

Taulukko 15. Kemikaalien inhibitioprosentit EspFu-IRTKS SH3 -interaktiolle eri laimennoksilla.

Kemikaalit	100 μM	50 μM	25 μM	12,5 μM
YHC1	92 %	82 %	63 %	63 %
YHC2	57 %	62 %	15 %	17 %
YHC3	89 %	64 %	58 %	52 %
YHC4	96 %	91 %	83 %	68 %
YHC5	64 %	10 %	15 %	21 %
YHC6	30 %	11 %	51 %	26 %
YHC7	45 %	25 %	8 %	21 %
PS1 (pos ctrl)	88 %	56 %	50 %	26 %

10 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli etsiä uusia mahdollisia lääkkeitä HI-viruksen säätelyproteiinin Nef estämiseksi. Työ perustui tutkimaan HI-viruksen Nef-proteiinin ja isäntäsolun proteiinosan Hck SH3 -interaktiota ELISA-tyyppisellä analyysillä. Samanaikaisesti tutkittiin myös solujen elävyyttä, missä käytettyjen kemikaalikirjastojen kemikaalien tarkoituksena oli tappaa Nef-proteiinia tuottavia soluja muttei normaalisoluja.

Tulosten perusteella Nef-Hck SH3 -interaktion inhibointi onnistui tutkittavilla kemikaaleilla. Rinnakkaisena otettiin testattavaksi myös muut SH3-kontrolliproteiinien interaktiot, kuten EspFu-IRTKS SH3, jonka tarkoituksena oli katsoa, miten kyseiset testatut kemikaalit vaikuttivat muille SH3-proteiineille. Tuloksista ilmeni, että samat kemikaalit, jotka olivat inhiboineet spesifisesti Nef-Hck SH3 -interaktiota, olivat myös inhiboineet muita SH3-kontrolliproteiineja. Tästä seuraa se, että testatut kemikaalit eivät ole hyviä inhibiittoreita spesifisessä Nef-Hck SH3 -interaktiossa.

Tulokset osoittivat solujen elävyyden mittauksessa, että kaiken kaikkiaan kemikaalikirjastoista Hibert ja FDA, löydettiin yhteensä 45 kemikaalia, jotka tappoivat Nef-proteiinia tuottavia soluja. Tuloksista saatiin luotettavia käyttämällä B-score-menetelmää normalisointia varten, ja haluttavuusfunktion tarkoituksena oli tappaa vain kyseisiä soluja, jotka olivat tutkimuksen kannalta haluttavia.

Insinööriyön tulokset ovat suuntaa antavia, sillä Nef-Hck SH3 -interaktion tutkintaa jatketaan vielä erilaisilla SH3-proteiineilla ja ei-SH3-proteiineilla, minkä tarkoituksena on löytää sellaisia kemikaaleja, jotka inhiboivat spesifisesti ainoastaan Nef-Hck SH3 -interaktiota. Kuitenkin tuloksista saatiin lisätietoa Nef-Hck SH3 -interaktiosta ja siitä miten tutkittavat kemikaalit vaikuttivat estävästi interaktioon. Solujen elävyyden mittaamentelämässä löydetty kemikaalit, jotka on etsitty tilastollisesti, voidaan testata uudelleen sekundaariskriinuksella. Tämän tarkoituksena olisi varmistaa, olivatko kyseiset löydetty kemikaalit riittävän toksisia Nef-proteiinia tuottaville soluille, ja oliko kemikaalien tappokyky epäspesifinen saatujen tuloksien kannalta.

Lähteet

1. Irma Heiskanen-Haarala. "Miksi mikrobi hyökkää." Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. (WWW-dokumentti)
<<http://www.hus.fi/default.asp?path=1;46;14828;14829;7967;16647;16670;16671>>
Päivitetty 5.2.2007. Luettu 16.12.2009
2. Hibert Marcel. Hibert kemikaalikirjasto. Faculté de Pharmacie de Strasbourg, France. Helsinki. Suullinen lähde. 20.9.2009
3. Bespalov Maxim. FDA, Spectrum Microsource kemikaalikirjasto. Biomedicum. Suullinen lähde. Helsinki. 19.11.2009
4. Vaheri A., Valle S. & Suni J. Ihmisen immunitovirukset (HIV). Lääketieteellinen Mikrobiologia, Kustannus Oy Duodecim 2003, s. 464 – 472
5. Reunala T., Paavonen J. ja Rostila T. HIV-infektio. Sukupuolitaudit, Kustannus Oy Duodecim. 200., s. 76 – 103
6. Aldovini A. & Walker B. Techniques in HIV research. 1990, s. 3 – 18
7. Aho K. & Lassus A. AIDS. Sukupuolitaudit, Kustannus Oy Duodecim. 1986, s. 150 – 153
8. ”Milloin HIV löydettiin?”. Historia No. 18/2009, s. 12
9. Euroopan komissio. HIV/AIDS tutkimus. (WWW-dokumentti)
<http://ec.europa.eu/research/leaflets/aids/article_2872_fi.html> Luettu 22.12.2009
10. Suni J., Saksela K. & Ristola M. Ihmisen immunitovirukset. Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja I. Kustannus Oy Duodecim. 2003, s. 560 – 587

11. Klimas N., Koneru A. & Fletcher M. Overview of HIV. *Psychomatic Medicine*. 2008, s. 523 – 530
12. Brooks G., Butel J. & Morse S. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. A large medical book. 23rd edition. 2001, s. 605 – 620
13. Weiss R. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*. BioMed Central Ltd. 2006, s. 1 – 11
14. AIDS-tilasto. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) 2009, s. 2 – 100
15. Curran JW, Morgan WM, Hardy AM, Jaffe HW, Darrow WW, Dowdle WR. The epidemiology of AIDS: current status and future prospects. *Science* 1985; 229: 1352 – 1357.
16. Pia Kivelä. HIV outbreak among injecting drug users in Finland. University of Helsinki 2009, s. 1 – 98
17. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 1999, s. 436 – 441.
18. Sharp PM, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hahn BH. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?. *Biology Science* 2001, s. 867 – 876.
19. Nerrienet E, Santiago ML, Foupouapouognigni Y, Bailes E, Mundy NI, Njinku B, Kfutwah A, Muller-Trutwin MC, Barre-Sinoussi F, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH, Ayouba A. Simian immunodeficiency virus infection in wild-caught chimpanzees from Cameroon. *J Virol* 2005, s. 1312 – 1319.

20. Averting HIV and AIDS. HIV types, subtypes groups and strains. (WWW-dokumentti) <<http://www.avert.org/hiv-types.htm>> 23.12.2009. Luettu 13.2.2010
21. Euroopan patentti- ja rekisterihallitus. FI/EP1372710 T3, s. 1-124
22. McCutchan FE. Global epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology* 2006. 78 Supply 1:S7-S12.
23. Yamaguchi J., Coffey R., Vallari A., Ngansop C., Mbanya D., Ndembu N., Kaptué L., Gürtler L., Bodelle P., Schochetman G., Devare S., Brennan C. "Identification of HIV Type 1 Group N Infections in a Husband and Wife in Cameroon: Viral Genome Sequences Provide Evidence for Horizontal Transmission". *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2006, s. 83 – 92
24. Peeters M., Gueye A., Mboup S., Bibollet-Ruche F., Ekaza E., Mulanga C., Ouedrigo R., Gandji R., Mpele P., Dibanga G., Koumare B., Saidou M., Esu-Williams E., Lombart JP., Badombena W., Luo N., Vanden Haesevelde M., Delaporte E. "Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa". *AIDS*. 1997. 493–8.
25. Plantier JC., Leoz M., Dickerson JE., De Oliveira F., Cordonnier F., Lemée V., Damond F., Robertson DL., Simon F. "A new human immunodeficiency virus derived from gorillas". *Nature Medicine*. 2009. 871–2
26. Wormser G. *AIDS and other manifestations of HIV infection*. 4. painos. Elsevier Academic Press. 2004, s. 57 – 82
27. World Health Organization. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human immunodeficiency viruses and human T-cell lymphotropic viruses*. International agency of research on cancer. 1996, s. 31 – 133
28. Saksela K. HIV-luentomateriaali hammaslääketieteen opiskelijoille. 2009, s. 1 – 17

29. NCBI. Retrovirus genomes. (WWW-dokumentti). Päivitetty 6.8.2009.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/retroviruses/>> Luettu 17.2.2010
30. Hoffmann C., Rockstroh JK., Kamps BS. HIV Medicine. 15. painos. Flying publisher. 2007, s. 59 – 69
31. Pulkkinen K. HIV-1 Nef protein and Nef-associating kinase PAK2 in cell signaling. Faculty of Medicine of the University of Tampere. 2010, s. 12 – 15
32. Kuiken C., Leitner T., Foley B., Hahn B., Marx P., McCutchan F., Wolinsky S. & Korber B. HIV sequence compedium. Theoretical Biology and Biophysics. 2008, s. 4 – 6
33. Ahmad, N. & Venkatesan, S. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. Science. 1988, s. 1481 – 1485.
34. Greenway A., Azad A. & McPhee D. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Protein Inhibits Activation Pathways in Peripheral Blood Mononuclear Cells and T-Cell Lines. National Centre in HIV Virology Research. 1994, s. 1 – 9
35. Hiipakka M. Ligand recognition in SH3-mediated protein interactions. Faculty of Medicine of the University of Tampere. 2005, s. 1 – 69
36. Franchini, G., M. Robert-Guroff, J. Ghayeb, N. T. Chang, & F. Wong-Staal. Cytoplasmic localisation of the HTLV-III 39 orf protein in cultured T cells. Virology. 1986. 155:593–599.
37. Guy, B., M. P. Kieny, Y. Riviere, C. Le Peuch, K. Pott, M. Girard, L. Montagnier, & J. P. Lecoco. HIV F/39 ORF encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. Nature (London). 1987. 330:266–269
38. Kaminchik, J., N. Bashan, A. Itach, N. Sarver, M. Gorecki, and A. Panet. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene products

- translated in vitro and expressed in mammalian cells. *Journal Virology*. 1991. 65:583–588.
39. Stolp B., Abraham L., Rudolf J. & Fackler O. Lentiviral Nef proteins utilize PAK2-mediated deregulation of cofilin as a general strategy to interfere with actin remodeling. *Virology*. 2010, s. 1 – 39
40. Renkema G. & Saksela K. Interactions of HIV-1 Nef with cellular signal transducing proteins. *Frontiers in Bioscience* 5. 2000, s. 268 – 282
41. Saksela K. HIV-1 Nef and host cell protein kinases. *Frontiers in Bioscience* 2. 1997, s. 606 – 618
42. Foster J. & Garcia J. HIV-1 Nef at the crossroads. *Retrovirology*. Biomed Central. 2008, s. 1 – 13
43. Manninen A. Cellular functions of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef protein. Faculty of Medicine of the University of Tampere. 2001, s. 1 – 71
44. Saksela K. Therapeutic targeting of interactions between Nef and host cell proteins. *Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*. 2004, s. 1 – 5
45. Somple M., Silva N. & Marcey D. HIV-1 Nef. The online macromolecular museum exhibits. 2001. (WWW-dokumentti)
<<http://www.callutheran.edu/BioDev/omm/exhibits.htm#displays>> Päivitetty heinäkuussa 2009. Luettu 23.2.2010
46. Hiipakka M., Manninen A., Renkema G & Saksela K. Inhibition of cellular functions of HIV-1 Nef by artificial SH3 domains. Institute of Medical Technology. *Virology*. 2001, s. 152 – 159

47. Hiipakka M., Poikonen K. & Saksela K. SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef. *Journal of Molecular Biology*. 1999, s. 1097 – 1106
48. Briggs S., Lerner E. & Smithgall T. Affinity of Src family kinase SH3 domains for HIV Nef in vitro does not predict kinase activation by Nef in vivo. *Biochemistry*. American Chemical Society. 2000, s. 489 – 495
49. Mayer B. & Saksela K. 2004: SH3 domains. *Modular protein domains*. Wiley-VCH, s. 37 – 56
50. Moarefi I., LAFerve-Bernt M., Sicheri F., Huse M. Lee C., Kuriyan J & Miller W. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* Vol 385. 1997, s. 650 – 653
51. Hiipakka M. & Saksela K. Versatile retargeting of SH3 domain binding by modification of non-conserved loop residues. *Elsevier*. 2007, s. 1735 – 1741
52. Briggs S., Sharkey M., Stevenson M. & Smithgall T. SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 272. 1997, s. 17899 – 17902
53. Lee C., Leung B. Lemmon M. Zheng J. Cowburn D. Kuriyan J. & Saksela K. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *The EMBO Journal*. Vol 14. 1995, s. 5006 – 5015
54. Tribble R., Emert-Sedlak Lori. & Smithgall T. HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn and c-Src through direct SH3 domain interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 281. 2006, s. 27029 – 27038
55. Knip D. & Howley P. *Fields Virology*. 5. painos, s. 2001 – 2004

56. Roche. HIV-infektio. (WWW-dokumentti)
<http://www.roche.fi/portal/eipf/Finland/Finland_Portal/roche.fi/hiv> Päivitetty 2010.
Luettu 9.3.2010
57. Solunetti. Histologia. MHC-proteiinit. (WWW-dokumentti)
<<http://www.solunetti.fi/>> Päivitetty 2006. Luettu 15.3.2010
58. Betzi S., Restouin A., Opi S., Arold S., Parrot I., Guerlesquin F., Morelli X & Collette Y. Protein-protein interaction inhibition (2P2I) combining high throughput and virtual screening: Application to the HIV-1 Nef protein. PNAS Journal. 2007.
59. Promega, Technical Bulletin: CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay. Päivitetty 2009.
60. Kamata M., Wu R., An D., Saxe J., Damoiseaux R., Phelps M., Huang J., Chen I. Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. Biomedical and Biophysical Research Communications 2006. 1101-1106.
61. Malo N., Hanley J., Cerquozzi S., Pelletier J. & Nadon R. Statistical practice in high-throughput screening data analysis. Computational Biology. Nature 2006.
62. Derringer G. & Geary C. Optimization of process and products. Canadian Plastics Institute. 1988, s. 2 – 3
63. Derringer G. & Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. Batelle Columbus Laboratories. 1980, s. 215
64. Derringer G. A statistical methodology for designing elastomer formulations to meet performance specifications. Batelle Columbus Laboratories. 1983, s. 349
65. Taavitsainen V.-M. Yliopettaja. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Suullinen lähde. 31.3.2010.

Liitteet

Liite 1: R-ohjelman komennot

```

# Luetaan nef-datat
nef1 <- read.table('nef1.txt',header=TRUE)
# Luetaan kontrollidata
control1 <- read.table('control1.txt',header=TRUE)

# Lasketaan B-scoret nef:lle
nef1.medpolish <- medpolish(as.matrix(nef1[,4:23]))
Resnef1 <- nef1.medpolish$residuals
Bscorenef1 <- Resnef1/mad(Resnef1)

# Apumuuttujat identifiointiin
rivit = array(LETTERS[1:16],c(16,20))
sarakkeet = t(array(1:20,c(20,16)))

# Lasketaan B-scoret kontrollille
control1.medpolish <- medpolish(as.matrix(control1[,4:23]))
Rescontrol1 <- control1.medpolish$residuals
Bscorecontrol1 <- Rescontrol1/mad(Rescontrol1)

# Piirretään Bscoret nef1:lle ja kontrollille1

x = matrix(Bscorenef1,16*20,1)
y = matrix(Bscorecontrol1,16*20,1)
par(mfrow = c(4,1))
matplot(1:80,cbind(x[1:80],y[1:80]),type='b')
lines(c(0,80),c(0,0),col='blue')
matplot(81:160,cbind(x[81:160],y[81:160]),type='b')
lines(c(81,160),c(0,0),col='blue')
matplot(161:240,cbind(x[161:240],y[161:240]),type='b')
lines(c(161,240),c(0,0),col='blue')
matplot(241:320,cbind(x[241:320],y[241:320]),type='b')
lines(c(241,320),c(0,0),col='blue')

# Muodostetaan haluttavuusfunktio nef1:lle ja kontrollille1

z=seq(-20,4,0.1) #Bscore skaala
par(mfrow=c(1,2))
plot(z,des.one.sided(z,-3.5,-0.8),type='l',lwd=2,
      xlab='Bscore',ylab='haluttavuus') #laskeva S
title(main='Nef')
plot(z,des.one.sided(z,-0.5,0.2),type='l',lwd=2) #laskeva S

```

```
dnef1 = des.one.sided(Bscorenef1,-3.5,-0.8)
dcontrol1 = des.one.sided(Bscorecontrol1,-0.5,0.2)
D1 = sqrt(dnef1*dcontrol1)
d1 = matrix(D1,16*20,1)

k = d1>0.3 #haluttavuuden kynnyisarvo
j = 1:320

print(j[k])
print(d1[k])
print(x[k])
print(y[k])

print(rbind(rivit[k],sarakkeet[k],
           D1[k],Bscorenef1[k],Bscorecontrol1[k]))
rownames(D1) = LETTERS[1:16]
colnames(D1) = 1:20

#Korjatut tappoluvut saa käskyllä, jolloin voidaan laskea tappoprosentti valittujen
kemikaalien mukaan

nef1korj = nef1.medpolish$overall+nef1.medpolish$residuals
control1korj = control1.medpolish$overall+control1.medpolish$residuals

# Muodostetaan tiedosto MatLab-ohjelmaa ja tappoprosentin laskua varten
write.table(D1,'haluttavuudet1.txt')
write.table(nef1korj, 'nef1korjaus.txt')
write.table(control1korj, 'ctrl1korjaus.txt')
```


Liite 2: Kuoppalevyn muodostaminen Matlab-ohjelmassa

```

% Käytettävät komennot kuoppakuvan muodostamiseen
function [x,y] = kuoppakuva(levy,kynnysarvo,rowlabels,collabels)
%kuoppakuva(levy,kynnysarvo,rowlabels,collabels)
%rowlabels: oletusarvona juokseva numero
%collabels: oletusarvona kirjaimet A:sta eteenpäin

[n,m] = size(levy);
levy = flipud(levy);
if nargin == 2
    collabels = 1:m;
    rowlabels = zeros(n,1);
    for i = 1:n
        rowlabels(i) = char(n-i+1+64);
    end
end
if isempty(rowlabels)
    rowlabels = zeros(n,1);
    for i = 1:n
        rowlabels(i) = char(m-i+1+64);
    end
end
Smin = min(min(levy));
x = 1:m;
y = 1:n;
[x,y] = meshgrid(x,y);
for i = 1:n
    for j = 1:m
        taso = (1-(levy(i,j)-Smin)/(kynnysarvo-Smin))*...
            (levy(i,j) <= kynnysarvo);
        col = [1-taso 1-taso taso];
        plot(x(i,j),y(i,j),'o','MarkerSize',12,'MarkerFaceColor',col)
        hold on
    end
end
set(gca,'YTick',1:n,'YTickLabel',char(rowlabels),...
    'XTick',1:m,'XTickLabel',collabels)
axis([0 m+1 0 n+1])
hold off

```

#R-ohjelmassa muodostettu haluttavuusfunktio siirretään Matlab-ohjelmaa varten oikeaan malliin ja saadaan Matlab-ohjelman kautta identifioitua valitut kemikaali

```

>> load haluttavuudetm1.txt
>> figure (1)
>> kuoppakuva(haluttavuudetm1,0.5) , missä 0,5 on Matlab-ohjelmassa käytetty
haluttavuuden kynnysarvo

```

Liite 3: Haluttavuuskäyrät Nef-proteiinia tuottaville soluille ja normaalisoluille