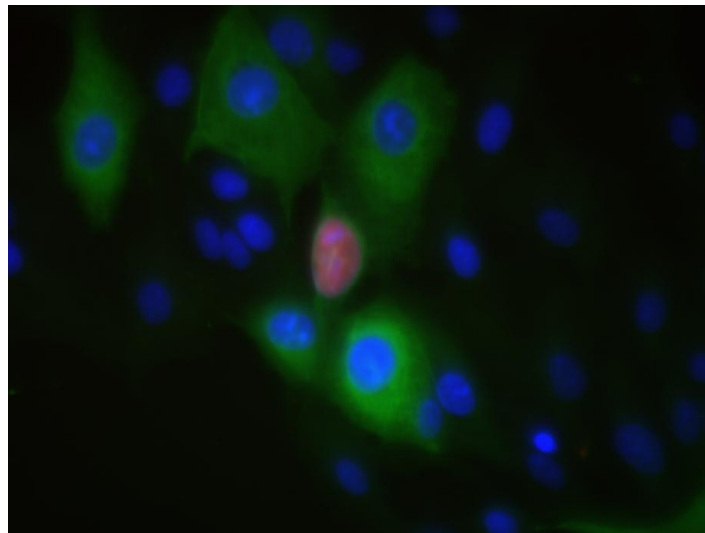


# Polyomavirus BK (BKPyV) og simian virus 40 (SV40) koinfeksjon i humane nyreepitelceller

MED – 3950 5. årsoppgaven – Profesjonsstudiet i medisin ved UiT Norges arktiske universitet



Halida Jusufovic

MK 09

Veileder: Christine Hanssen Rinaldo forsker/PhD

Avdeling for mikrobiologi og smittevern

Universitetssykehuset Nord-Norge

Tromsø, 01.06.14.

## Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse .....	1
Forord .....	2
Sammendrag .....	3
Introduksjon .....	4
2. Materiale og metoder .....	10
2. 1. Celler og virus.....	12
2. 2. Celledyrkning .....	12
2. 3. Infeksjon av celler med BKPyV – og SV40 – virussuspensjoner .....	13
2. 4. Kvantitativ PCR (qPCR) for BKPyV og SV40.....	15
2. 5. Western blot.....	16
2. 6. Immunfluorescensfarging, mikroskopering og digital bildetakning.....	19
3. Resultater .....	22
4. Diskusjon .....	39
Referanser .....	42

## Forord

Høsten 2012 begynte arbeidet med å finne oppgave og ettersom jeg er knyttet til et mikrobiologisk laboratorium var det derfor et mål for meg å finne et tema innenfor dette faget. Christine Hanssen Rinaldo, forsker/phD ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset Nord-Norge, sa ja til å være min veileder og foreslo at jeg kunne gjøre en praktisk oppgave med BKPyV og SV40 virus i cellekultur der formålet var å undersøke om replikasjon av BKPyV og SV40 påvirket hverandre. Dermed ble dette det endelige temaet for oppgaven.

Jeg har lært mye av å skrive denne oppgaven både i forhold til det å jobbe på lab siden cellene og virusene lever sitt eget liv, det å bruke PubMed til søking og innhenting av relevant informasjon til oppgaven og ikke minst det å bruke Excel til behandling av rådata.

Jeg vil takke mine veiledere, Christine Hanssen Rinaldo og Stian Henriksen, for alle gode råd og støtte og tid de har brukt under denne prosessen med labarbeid, sammenstilling av resultater og ikke minst oppgaveskriving. Setter umåtelig stor pris på det. De har mye kunnskap og lang erfaring med skriving av vitenskapelige artikler som de gjerne ville dele med meg.

Tekst til bilder på forsiden:

Bildet viser RPTEC koinfisert med BKPyV/SV40 som jeg selv har tatt i forbindelse med labarbeid.

Halida Jusufovic

Tromsø, 01. juni 2014.

## Sammendrag

Bakgrunn. Det humane BK polyomavirus (BKPyV) infiserer de fleste mennesker allerede i barndommen og etablerer en latent infeksjon i epitelceller i nyrer og urinveier. BKPyV gir vanligvis bare sykdom hos immunsupprimerte og da spesielt nyre – eller beinmargstransplanterte pasienter. Ape polyomaviruset simian virus 40 (SV40) har mest sannsynlig blitt introdusert til mennesker gjennom kontaminerte polio- og adenovirusvaksiner i årene 1955 – 1963 og ser nå ut til å spres mellom mennesker. Sannsynligvis etablerer også SV40 en latent infeksjon i epitelceller i nyrer og urinveier og viruset er av og til mistenkt i å være involvert i sykdomsutvikling hos nyre – og beinmargstransplanterte og dessuten i en del kreftformer.

Siden det er høy homologi mellom proteiner fra BKPyV og SV40 og siden disse virusene sannsynligvis etablerer infeksjon i samme organer, celletype og kanskje til og med i nøyaktig samme celler, er det mulig at infeksjon med det ene viruset kan påvirke infeksjon med det andre viruset og vice versa. Formålet med denne oppgaven er å finne ut om replikasjon av SV40 i nyreepitelceller vil påvirke replikasjon av BKPyV og vice versa.

Materiale og metode. Denne oppgavedelen er basert på labarbeid ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern ved Universitetssykehuset i Tromsø etterfulgt av behandling av resultater. Ulike metoder som celledyrkning av to ulike celletyper, virus infeksjon, kvantitativ PCR, immunfluorescensfarging etterfulgt av mikroskopi og Western blot ble brukt. Det ble til sammen utført fire forsøk.

Resultater. Våre resultater viste for BKPyV hadde det ingen betydning om SV40 var til stede eller ikke uavhengig av celletypen. Dette konkluderte vi ut fra PCR resultatene vi hadde fått fra forsøkene.

Konklusjon. Vår konklusjon er at Vero cellene var permissive for SV40 og økning i virus load var signifikant. RPTEC cellene var permissive for BKPyV og økning i virus load var signifikant. Tidsrammen var stram for flere forsøk selv om det var ønskelig.

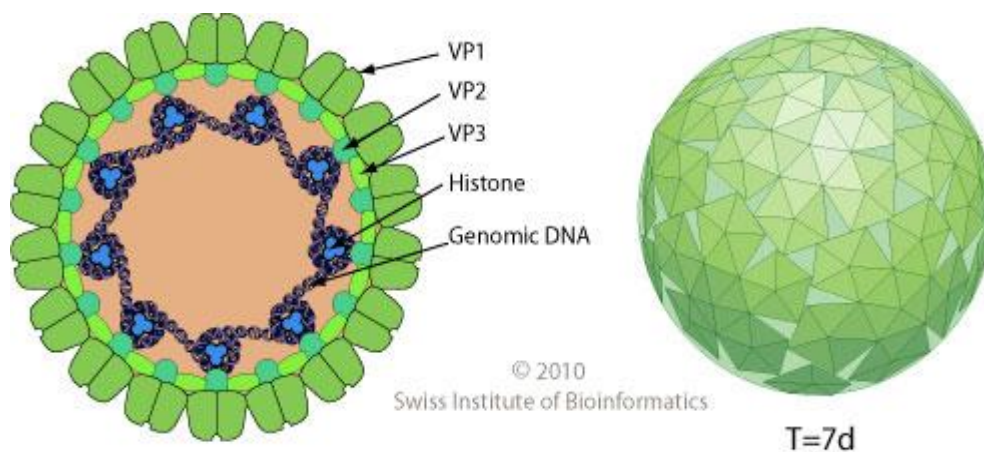
## Introduksjon

Polyomavirus, virus som tilhører familien Polyomaviridae, ble første gang oppdaget i nyfødte mus med mange tumores i 1958 (26). Polyomavirus har et nakent ikosahedral kapsid med et sirkulær dobbeltrådig DNA genom (Figur 1). De to første humane polyomavirus BK polyomavirus (BKPyV) og JC polyomavirus (JCPyV) ble første gang isolert i 1971 (7). Fra 2007 frem til i dag er det blitt oppdaget ytterligere 13 humane polyomavirus (22, 16). Selv om infeksjon med humane polyomavirus synes å være svært utbredt, gir de vanligvis bare sykdom i immunsupprimerte personer (3).

### BK polyomavirus (BKPyV)

Det humane BK polyomavirus (BKPyV) ble første gang isolert fra urinen til en nyretransplantert pasient med ureterstenose, som i urinen skilte ut (cytopatisk) endrede celler med atypisk kjernemorfologi (7). Viruset fikk navn etter pasientens initialer B.K. men ble i fra 2011 gitt navnet BKPyV (11).

Hoved kapsidprotein som bygger opp BKPyV overflaten kalles VP1, mens de mindre kapsid proteinene VP2 og VP3 sitter under kapsidoverflaten (Figur 1).



Figur 1: BKPyV virion med dobbel-trådet DNA omgitt av kapsid proteiner (<http://viralzone.expasy.org/viralzone>).

Genomet til BKPyV er pakket på innsiden av kapsidet og er en enkel kopi av dobbeltrådig, sirkulært DNA. BKPyV deler 70 % homologi med SV40 genom og ca 75 % homologi med JCPyV på protein nivå (25).

BKPyV koder for to regulatoriske proteiner og disse er large tumor antigen (LTag) og small tumor antigen (stg). Disse kalles også tidlig proteiner. LTag har flere viktige funksjoner blant annet hindrer det vertscellen fra å gå i apoptose og er essensiell for replikasjon av det virale genomet (25). I en tidlig fase av infeksjonen vil LTag akkumuleres i cellekjernen av den infiserte cellen. Her vil det interagere med flere cellulære proteiner som er involvert i DNA replikasjon, regulerer cellesyklus og metabolisme. LTag vil stimulere cellen til å gå i S – fase av cellesyklusen ved at det binder og inaktiverer tumor suppressor proteinet pRB (retinoblastomprotein) . LTag binder også tumor suppressor proteinet p53 og hindrer slik apoptose av den infiserte cellen. Den nøyaktige funksjonen til stg er ukjent men den finnes både i kjernen og i cytoplasma av infiserte celler. Det er foreslått at stg hjelper LTag under den virale replikasjonen (25).

BKPyV koder for de seine proteinene VP1, VP2 og VP3 samt agno. VP1, VP2 og VP3 transporteres til kjernen mens agno befinner seg i cytoplasma og perinukleær region. VP1 er hoved kapsid proteinet. VP1 er også hovedligand for binding til membranreseptorer på permissive (ikke – restriktive) celler. Agno er ikke et strukturelt protein, dets funksjon er fremdeles ukjent.

Primærinfeksjon med BKPyV skjer tidlig i barndommen og viruset vil deretter etablere en latent infeksjon i epitelceller i nyre og urinveiene (8). Seroprevalens hos voksne er funnet å være ca 80% (5). Flere uavhengige studier har demonstrert at BKPyV ofte reaktiveres og skilles asymptotisk ut i urin hos immunkompetente individer i lave virus mengder på  $<5 \log_{10}$  genome equivalenter ( $GE_q$ ) per ml (5, 8,12).

Hos pasienter med nedsatt immunforsvar, skilles BKPyV oftere ut og mengde BKPyV kan overstige  $7 \log_{10}$   $GE_q/ml$ . Dette betyr at viruset reaktiveres, replikeres og skilles ut i urin (8) og det skjer hos ca 50% av nyretransplanterte, multiorgan transplanterte og beinmargstransplanterte (9). Reaktivering av BKPyV hos disse kan gi BKPyV – nefropati

(PyVAN). Ved PyVAN skades transplantatet og 10 – 30 % (21) av alle med PyVAN mister transplantatet, mens resten får nedsatt nyrefunksjon. Effektiv antiviral behandling mangler og det er anbefalt å bruke screening for BKPyV replikasjon i urin og blod hos nyretransplanterte som en veiledning til reduksjon av immunsuppresjon hos pasienter med BKPyV viremi.

Reaktivering av BKPyV kan gi hemorragisk cystitt (infeksjon i blærens mukosa som gir dysuri, hematuri og alvorlig nyresvikt) hos beinmargstransplanterte. I sjeldne tilfeller kan BKPyV gi sykdom hos andre immunsupprimerte, som for eksempel AIDS pasienter.

#### Simian virus 40 (SV40)

SV40, et polyomavirus som opprinnelig kommer fra aper men nå også infiserer mennesker, ble oppdaget i 1960 (27). I likhet med andre polyomavirus, er SV40 et DNA virus som har potensiale til å forårsake tumores, men oftest persisterer det som en asymptomatisk latent infeksjon i nyrene og urinveiene (28). SV40 ble først gang identifisert av Bernice E. Eddy i 1960 i cellekulturer av Rhesus apenyreceller som da ble brukt til å produsere poliovaksiner (31). Navnet ble gitt utfra effekten viruset hadde på infiserte grønne apeceller, som utviklet et uvanlig høyt antall vakuoler (en væskefylt organelle omsluttet av en membran kalt tonoplast). Denne observasjonen ble gjentatt og konfirmert av Hillemann og Sweet som var ansatt av Merck i deres vaksinedivisjon (24). Det komplette virale genomet ble sekvensert av Walter Fiers og hans team ved University of Ghent (Belgia) i 1978 (6).

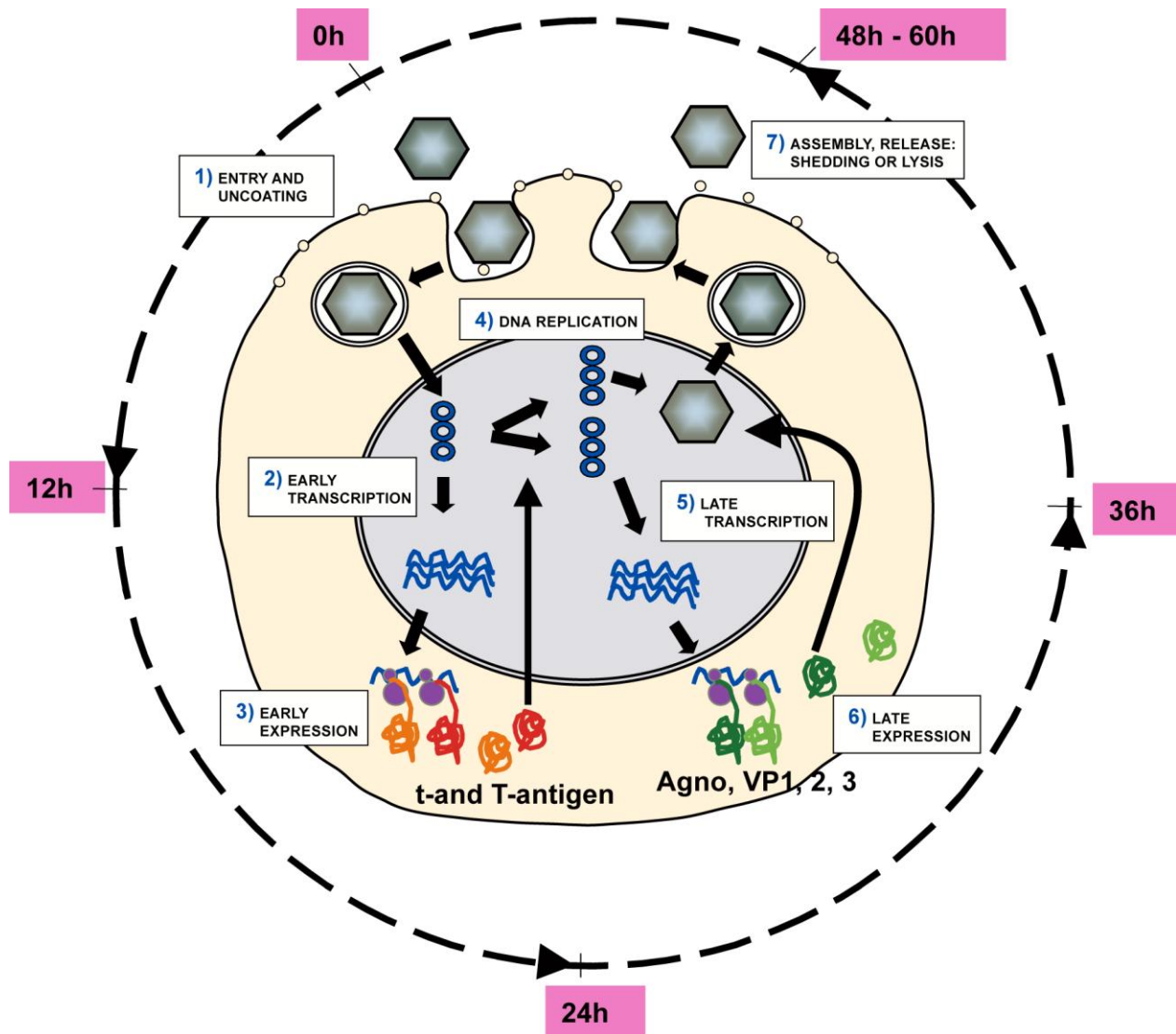
SV40 ble et meget kontroversielt tema etter at det ble avslørt at millioner av mennesker var eksponert for viruset etter å ha mottatt kontaminerte poliovaksiner produsert mellom 1955 og 1961 (31). I Norge startet poliovaksinasjonen i 1957. Opp mot én million mennesker her i landet kan ha blitt vaksinert i årene 1957-63 (33). Forurensede vaksiner kan ha blitt gitt til så mange som 100 millioner mennesker verden over.

Hos Rhesus aper gir SV40 en asymptomatisk latent infeksjon. Immunsvekkede aper vil imidlertid få nyresykdom og av og til demyeliniserende sykdom veldig likt det vi

observerer hos immunsvekkede mennesker med henholdsvis BKPyV og JCPyV sykdom. Hos andre arter, i sær hamstrer, vil SV40 forårsake en rekke tumores, generelt sarkomer. I mennesker er SV40 oppdaget i tonsiller (19) , i nyre (1, 13), i urin (3, 28, 29), PBMC (3) og avføring (30). SV40 er mistenkt å være involvert i utvikling av enkelte kreftformer men er også foreslått å være involvert i hemoragisk cystitt (3) og nefropati (13).

Forskning på SV40 har gitt kunnskaper som i stor grad har økt forståelse av genekspresjon og cellevekst regulering.





Figur 2: BKPyV replikasjonssyklus (modifisert fra Cole 1996). Angitte tidspunkt refererer til BKPyV (Dunlop) replikasjon i RPTECs.

### Replikasjonssyklus for BKPyV og SV40

Replikasjonssyklus er best studert for SV40 men er i prinsippet lik for BKPyV med unntak av valg av reseptorer og inngang i cellen.

SV40 binder til celleoverflatereseptorer av MHC klasse 1 ved hjelp av glykoprotein VP1 og penetrerer cellen via en caveolin vesikkel (17). BKPyV binder til «N-linked glycoprotein with an alpha (3,3) – linked sialic acid» (4) og enterer cellene ved hjelp av caveola mediert endocytose (17). På innsiden av cellekjernen, hvor den virale replikasjonen skjer, vil den cellulære RNA polymerase II fremme tidlig genekspressjon, kalles tidlig transkripsjon (Figur 2). Dette resulterer i et pre-mRNA som spleises til 2 delvis like mRNA som koder for henholdsvis lille T antigen (stg) og store T antigen (LTag). LTag har to funksjoner: 5% vil gå inn i celleplasmamembranen og 95% vil returnere til kjernen. Når det er i kjernen vil LTag binde til bindingssteder i det virale genomet (I, II og III). Binding av sete I og II autoregulerer tidlig RNA syntese. Binding til sete II finner sted i hver cellyklus. Binding til sete I initierer DNA replikasjon fra origin of replication (ORI). Tidlig transkripsjon gir to spleiseRNA som begge er 19s. Sen transkripsjon gir både en lengre 16s, som syntetiserer hoved kapsidprotein VP1, og en mindre 19s, som gir kapsid proteinene VP2 og VP3 gjennom så kalt «leaky scanning». I tillegg kodes det for agnoprotein som er et seint cytoplasmatisk protein med ukjent funksjon (23). Alle proteinene unntatt agnoprotein transporteres til kjernen fordi sammenstilling av viruspartikler skjer i kjernen. Frigjøring av viruspartikler er sannsynligvis cytolytisk for SV40 og resulterer i celledød (24).

Formål med oppgaven er å undersøke om SV40 alene kan replikere i primære humane nyreepitelceller (RPTECs), hovedmålceller for polyomvirus – assosiert nefropati (PyVAN), og om en koinfeksjon med BKPyV vil påvirke SV40 infeksjon og vice versa.

## 2. Materiale og metoder

### Arbeidsprosess/oversikt

Ukene 31 og 32 i 2013, som var begynnelsen på høstsemesteret på femte året, ble brukt til planlegging og forberedelse av oppgaven. Tiden ble brukt til å gjennomføre det praktiske arbeidet og øve meg på ulike metoder som jeg skulle bruke. Sammen med min biveileder, Stian Henriksen, gjorde vi pilotprosjektet som skissert i tabellen nedenfor. I disse to ukene skulle vi bestemme oss for hvordan resten av gjennomføring av oppgaven skulle gjøres vår 2014. Alt labarbeid ble utført ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern, UNN. Alt nødvendig analyseverktøy var tilgjengelig.

Mandag	Splitting av cellene, celletelling og utsåing i 48 brønners brett.
Tirsdag	Infeksjon av celler.
Onsdag	Infeksjon av koinfiserte brønner med SV40. Høsting av input fra hver av brønnene.
Fredag	Høsting av supernatant til qPCR og fiksering av celler til immunfluorescens. Tilsetting av vekstmedium.
Mandag	Høsting av supernatant til qPCR og fiksering av celler til immunfluorescens.

Vi jobbet først med en cellelinje fra ape (Vero). I senere forsøk brukte vi RPTEC også. Cellene ble dyrket i kolber men forsøkene ble utført i monolayer i 48 brønners plastbrett. Celledyrkning i våre forsøk var ganske lik for begge cellekulturene og omfattet: opptak av celler fra nitrogentank og skifte av medium (REGM /DMEM) etterfulgt av trypsinisering, telling og utsæd av celler i plastbrett. Utsæd av cellene ble alltid på en mandag. Nærmere og mer detaljert beskrivelse av den praktiske fremgangsmåten er beskrevet i oppgaven. Uke 10 til og med uke 18 med unntak av påskeferien ble brukt til labarbeid. Og det var som følger:

Uke 10: Mandag var det splitting av cellene, telling av cellene og utsåing i 48 brønners brett. Tirsdag var det infeksjon av cellene. Onsdag tok jeg av input fra hver av brønnene. Jeg slo parallellene sammen og tok dem direkte i 980 µl dH<sub>2</sub>O. Fredag: høsting av supernatant til qPCR og fiksering av celler til immunfluorescens. Hver brønn fikk nytt vekstmedium. PCR kjøring.

Uke 11: Mandag brukes til høsting av supernatant til qPCR og fiksering av celler til immunfluorescens (plate 2 og 3). Tirsdag og onsdag brukes til kjøring av qPCR og immunfluorescensfarging av platene. Torsdag opptak av RPTEC og utsæd i to flasker.

Uke 12: Mandag var det splitting av cellene, telling av cellene og utsåing i 48 brønners brett. Tirsdag var det infeksjon av cellene.

Uke 13: Tiden brukes til kjøring av qPCR og immunfluorescensfarging av platene. Undersøkelse av immunfargede brønner med Nikon TE2000 mikroskop og bildene ble tatt og behandlet med NIS elements Basic Research. Pluss høsting av celler til Western blot.

Uke 14: Tiden brukes til opplæring og bruk av Western blot metode og forbehandling av prøver. Opptak av RPTEC, klargjøring til celledyrkning.

Uke 15: Tiden brukes til repetisjon av forsøkene dvs utsæd av celler, infeksjon, fiksering av platene og qPCR kjøring.

Uke 18: Fullføring av det praktise arbeidet på laben. Behandling av rådata i excel med diverse utregninger og sammenligning av alle resultatene.

Uke 19 til og med uke 22 ble brukt til innsamling av fakta fra bøker og internet og skriving av oppgaven. Jeg hadde jevnlig kontakt med min veileder. Veiledning foregikk minimum hver 14. dag (uke 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22).

## 2. 1. Celler og virus

Vero (apenyreceller fra ATCC CRL 1587) og RPTEC (primære humane nyreepitelceller fra Science Cell) ved passasje 4 ble benyttet. Vero cellene ble dyrket i

Dulbecco'smodified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) med 10 % fetalt bovint serum (Invitrogen) mens RPTEC ble dyrket i renal epithelial cell growth medium (REGM). Pilotforsøk ble utført kun i Vero, forsøk 1 ble utført med både Vero og RPTEC mens forsøk 2 og 3 kun benyttet RPTEC.

Virus benyttet: BKPyV (Dunlop) og SV40 (strain 776).

## 2. 2. Celledyrkning

Celledyrkning er en metode for å få celler gjerne fra en flercellede organisme til å overleve utenfor kroppen. Vi jobbet med en primær human cellekultur RPTEC og en cellelinje fra ape (Vero). Cellene ble dyrket i kolber men forsøkene ble utført i monolayer i 48 brønners plastbrett. Celledyrkning i våre forsøk var ganske lik for begge cellekulturene og omfattet: opptak av celler fra nitrogentank og skifte av medium (REGM /DMEM) etterfulgt av trypsinisering, telling og utsæd av celler i plastbrett. Utsæd av cellene ble alltid på en mandag.

I 48 brønners brett ønsket vi en celletetthet på 15000 celler per brønn. Siden hver brønn inneholdt 250 µl medium ville det si 60 000 celler per ml. 250 µl celleduspensjon ble fordelt i hver brønn. Cellekultur Brettene ble inkubert i CO<sub>2</sub> inkubator til neste dag. Det var viktig at cellene fordelte seg jevnt i brettet og ikke samlet seg i midten av brønnen.

For å beregne hvor mye vi trengte av vår celleduspensjon ( $V_1$ ), brukte vi følgende formel:

$$c_1V_1=c_2V_2$$

$c_1$ = konsentrasjonen i utgangsløsningen (celler/ml) =  $n \times 10^5$

$V_1$ =det volumet som skal tilsettes utgangsløsningen

$c_2$ =ønsket sluttkonsentrasjon (celler/ml)

$V_2$ =ønsket sluttvolum

Celletetthet ble regnet ut ved å tilsette 100  $\mu$ l Trypan Blue stain 0,4 % til 100  $\mu$ l cellesuspensjonen. Celletelling ble utført ved hjelp av en celleteller (Countess™ automated cell counter) som regnet ut antall levende og døde celler. Antallet av de levende cellene brukte vi videre i formelen oppgitt ovenfor. Slik kunne vi altså regne oss frem til cellesuspensjon med ønsket celletetthet.

### 2. 3. Infeksjon av celler med BKPyV – og SV40 – virussuspensjoner

Dagen etter utsæd av celler (Vero og RPTEC) ble cellene infisert med på forhånd oppvarmede BKPyV (Dunlop) – og SV40 – virussupernatanter. Plan for infeksjonen var ulik mellom de fleste forsøkene men forsøk 2 og 3 var identisk. I pilot (forsøk 0) benyttet vi bare Veroceller, i forsøk 1 benyttet vi både Vero – og RPTEC, en plate for hver av dem. Forsøk 2 og 3 hadde vi 3 plater hver med bare RPTEC. I hvert av forsøkene ble infeksjon utført på en tirsdag. Med unntak av forsøk 2 og 3 hvor man som beskrevet over infiserte plate 3 med BKPyV på tirsdag og SV40 på onsdag (Tabell 1, Figur 4). Etter at virussupernatant (inokulum) var tilsatt, ble platene inkubert i CO<sub>2</sub> – inkubator i to timer før man fjernet inokulum, vasket cellene og tilsatte vekstmedium. De uinfiserte cellene ble behandlet på samme måte men uten tilsetning av virus . De uinfiserte cellene ble benyttet som negative kontroller.

Tabell 1: Flyt over forsøkene

	Dag -1	0	1 dpi BKPyV	3 dpi BKPyV	6 dpi BKPyV 5 dpi SV40
Pilot	Utsåing Vero	Infeksjon BKPyV og SV40		Høsting supernatant. Fiksering av celler.	
Forsøk 1	Utsåing Vero og RPTEC	Infeksjon BKPyV og SV40	Input samles	Høsting supernatant. Fiksering av celler.	
Forsøk 2 og 3	Utsåing RPTEC	Plate 1: Infeksjon BKPyV og SV40	Plate 1: Input samles	Plate 1: Høsting supernatant. Fiksering av celler.	
		Plate 2: Infeksjon BKPyV og SV40	Plate 2: Input samles		Plate 2: Høsting supernatant. Fiksering av celler.
		Plate 3: Infeksjon BKPyV	Plate 3: Input Samles Infeksjon SV40		Plate 3: Høsting supernatant. Fiksering av celler.

Plate 1: Infiseres som før og inkuberes i 72 timer.

Plate 2: Infiseres som før og inkuberes til mandag.

Plate 3: Infiseres med BKV på tirsdag og SV40 på onsdag. Inkuberes til mandag.

Uinf	Uinf		Uinf	Uinf		Uinf	Uinf
SV40 2x	SV40 2x		SV40/BKPyV 2x	SV40/BKPyV 2x		BKPyV 2x	BKPyV 2x

Figur 3: Eksempel på utsåing på 48 brønners plater i forsøkene

## 2. 4. Kvantitativ PCR (qPCR) for BKPyV og SV40

For å kvantitere ekstracellulær BKPyV mengder, ble hver prøve analysert i triplett ved kvantitativ PCR (qPCR) (Tabell 3) med primere og probe rettet mot BKPyV LTag (6) TaqMan assay på Applied instrument ble brukt i vårt forsøk. Det ble gjort på samme måte for SV40 med primere og probe rettet mot SV40 LTag (13).

I våre forsøk undersøkte vi replikasjon av BKPyV og SV40 ved å høste supernatanter fra de infiserte cellene og undersøke ekstracellulær virus load ved qPCR. Supernatantene ble fortynnet 1:100 med destillert vann for å fortynne bort hemmere av PCR reaksjon. Den fortynnede supernatanten ble kokt i 5 min ved 100°C for å inaktivere viruset og frigjøre DNA. 20 µl mastermiks (Tabell 2) per prøve ble tilsatt til en 96 brønners PCR plate. 5 µl av fortynnet og kokt supernatant ble benyttet som templat. Platen ble til slutt plassert i en 7500 Fast Real – Time PCR system og qPCR kjørt.



Tabell 2: Mastermikser for en prøve, 20 µl

Innhold	Volum
2 X Taqman Fast Universal	12.5 µl
dH <sub>2</sub> O	6.575 µl
BKPyV Forward Primer (50 µM)	0.15 µl
BKPyV Reverse Primer (50 µM)	0.15 µl
BKPyV Probe (5 µM)	0.625 µl
Total volum	20 µl

Tabell 3: qPCR syklus program

	Syklus	Temperatur	Tid
Stage 1	1	95°C	20 sekunder
Stage 2	45	95°C	3 sekunder
		60°C	30 sekunder

## 2. 5. Western blot

Western blot er en teknikk hvor man separerer og detekterer spesifikke proteiner i cellelysater. Først separerer man proteinene ved å bruke NuPAGE gel i henhold til proteinstørrelsen. Etterpå overfører man proteinene fra gelen til en membran i et elektrisk felt (25).

For å finne de ønskede proteinene bruker man primær – og sekundærantistoffer. Primærantistoff binder til et spesifikt protein og danner antigen – antistoff kompleks. Sekundærantistoff er rettet mot komplekser av primærantistoffer og har to viktige

egenskaper. Det binder spesifikt til primærantistoffet og det inneholder et enzym eller en farge som hjelper til å synliggjøre proteinet. I vårt forsøk var våre sekundærantistoffer merket med infrarød farge. Synliggjøring av proteiner ble utført med Licor Odyssey Infrared system.

Formålet med western blot i vårt forsøk var å detektere LTag, VP1, agnoprotein og GAPDH i cellelysaten.

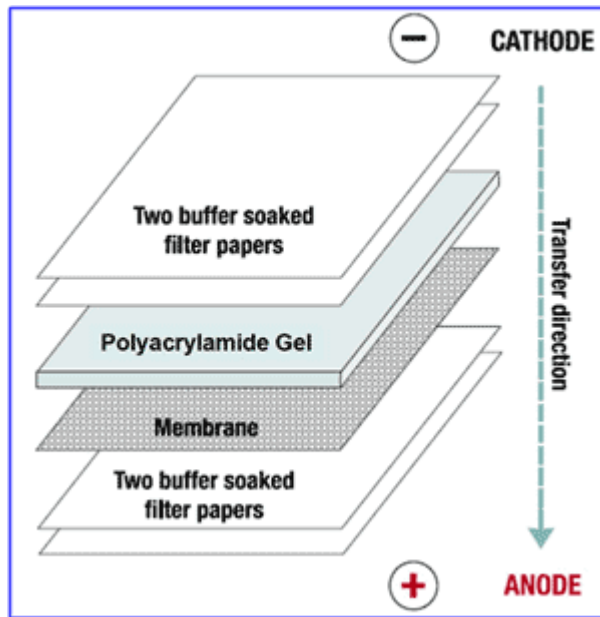
Instrument: Invitrogen Electrophoresis/Western Blotting Power Ease 500.

Mer detaljert beskrivelse av protokollen:

Cellene ble lysert i 100 µl lysisbuffer (RIPA, Lysis og ekstraksjonsbuffer; 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8.0), samlet og lagret på – 70°C frem til analyse. Cellelysater av SV40 – og BKPyV infiserte RPTEC ble applisert på en SDS – polyakrylamid gel og gelen ble kjørt ved 200 V i 35 min.

Blotting: Når proteinene var godt nok separert fjernet man forsiktig gel platene og klargjorde gelen for blotting som vist på figur 4. For å overføre proteinene til PVDF (polyvinylidenedifluoride) membranen ble en blotting buffer benyttet. Western blot buffer oppskrift inkluderer tris (30,3 g), glycin (144 g) og metanol (20 %). Elektrisk strøm (30 V) tilføres for en time for å overføre proteinene fra gelen til membranen. Etter endt blotting ble membranen lagt i blokkingsbuffer (Odyssey blokkingsbuffer fortynnet 1:2 med PBS; 1,5 ml blokkingsbuffer + 1,5 ml PBS = 3 ml) i et 50 ml Sarstedt rør. Røret ble plassert på en rotator (SB3) i en time ved romtemperatur.

Farging med primærantistoffer (Tabell 4) og Tween (detergent) ble utført direkte i det samme røret. Røret sto på rotatoren i 4 °C over natt. Påfølgende dag vasket vi fire ganger 5 min med TBST, på rotatoren i romtemperatur. Etter vask tilsatte vi sekundærantistoffer, 3 ml, plasserte røret på rotator og lot det rotere i en time ved romtemperatur. Fra nå av beskyttet vi røret fra lys med aluminiumsfolie. Igjen vasket vi fire ganger 5 min med 3 ml TBST før vi la membranen i et mindre kar hvor vi oppbevarte det i TBS ved 4 °C med aluminiumsfolie inntil vi scannet den.



Figur 4: Sammenstilling av gelen (blot sandwich). Kilde: kollewin.com

Tabell 4: Antistoffer Western blot

	Primærantistoffer:	Fortynning
Agno	polyklonalt	1:10000
	kaninserum	
	A81058/A81038	
VP1	polyklonalt	1:10000
	kaninserum V21292	
LTag SV40	monoklonalt mus pab419,	1:500

GAPDH	Abcam	
	Monoklonalt mus ab8245,	1:2000
	Abcam	(loading kontroll)
	Sekundærantistoffer:	
	Anti-mus IR Dye 680 Licor	1:10000
	Anti-kanin IR Dye 800	1:7500

Membranen ble scannet og bildet fremkalt ved hjelp av Licor Odyssey Infrared detection system. Ønskede proteiner ble bestemt ved å sammenligne med Odyssey Protein Molecular Weight Marker.

## 2. 6. Immunfluorescensfarging, mikroskopering og digital bildetakning

Immunfluorescensfarging er en teknikk som brukes for å merke spesifikke proteiner eller antigener i celler med fluorescensfarge ved å binde spesifikke antistoffer som er konjugert med en fluorescensfarge. I vårt forsøk brukte vi den indirekte metoden som går ut på å bruke fluorescensmerket sekundærantistoff som er spesifikk for et

primærantistoff for å synliggjøre proteinet eller antigenet. Vi brukte fluorescensmikroskopet for å undersøke våre prøver.

Platene ble, etter høsting av supernatantene til qPCR, fiksert med 100 % metanol ved å inkubere i 10 min i romtemperatur.

I forsøk 2 og 3 ble plate 1 inkubert i 3 dager med påfølgende metanolfiksering, mens plate 2 og 3 ble inkubert til påfølgende mandag, i henholdsvis 6 og 5 dager etter infeksjon av BKPyV og SV40 før de ble fiksert med metanol. Som beskrevet ovenfor var plate 3 infisert med BKPyV på tirsdag og deretter SV40 på onsdag. Derfor variasjon i antall dager post infeksjon.

Under immunfluorescensfarging ble det brukt primær – og sekundærantistoffer. Mer detaljert beskrivelse av protokollen:

Blokkering: blokkering utføres for å blokkere for uspesifikk binding ved å tilsette 3 % geiteserum i PBS og inkubere i 30 min i romtemperatur. Blokkering løsningen fjernes, det tilsettes primærantistoffer (Tabell 5) som er fortynnet i 1 % geiteserum i PBS og inkuberes i 30 min ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Vaskes fire ganger med PBS. Så tilsettes sekundærantistoffer (Tabell 5) fortynnet i 1 % geiteserum i PBS og inkuberes i 30 min i romtemperatur. Vaskes fire ganger med PBS.

DraQ merking (blå kjerner), kjernefarging

Dette utføres ved å tilsette DraQ, fortynnet i PBS og inkubere i 5 min ved romtemperatur. Deretter vaskes cellene to ganger med PBS. Cellene oppbevares i PBS. Merkede celler i 48 brønners brett ble undersøkt i Nikon TE2000 mikroskop og bildene ble tatt og behandlet med NIS elements Basic Research software versjon 2.2.

Tabell 5: Antistoffer immunofluorescensfarging

	Primærantistoffer	Fortynning
Agno	Polyklonalt kaninserum	1:1000
LTag SV40	Monoklonalt mus	1:100 Ab – 2 Pab416 Abcam
VP1	Polyklonalt kaninserum	1:1000
Sekundærantistoffer		
Alexa Fluor 488	Anti-kanin	1:500
Alexa Fluor 568	Anti-mus	1:500
Farge		
DraQ		1:1000

*BKPyV infiserte brønner:* agno (polyklonalt kaninserum) gjenkjenner BKPyV agno (grønn) mens Pab 416 (Ab-2 Abcam) gjenkjenner BKPyV LTag.

*SV40 infiserte brønner:* SV40 VP1 (polyklonalt kaninserum) gjenkjenner SV40 VP1 og Pab 416 gjenkjenner både SV40 LTag.

.

*Koinfiserte brønner:* agno gjenkjenner bare BKPyV og ikke SV40 agnoprotein mens Pab 419 bare gjenkjenner SV40 og ikke BKPyV LTag.

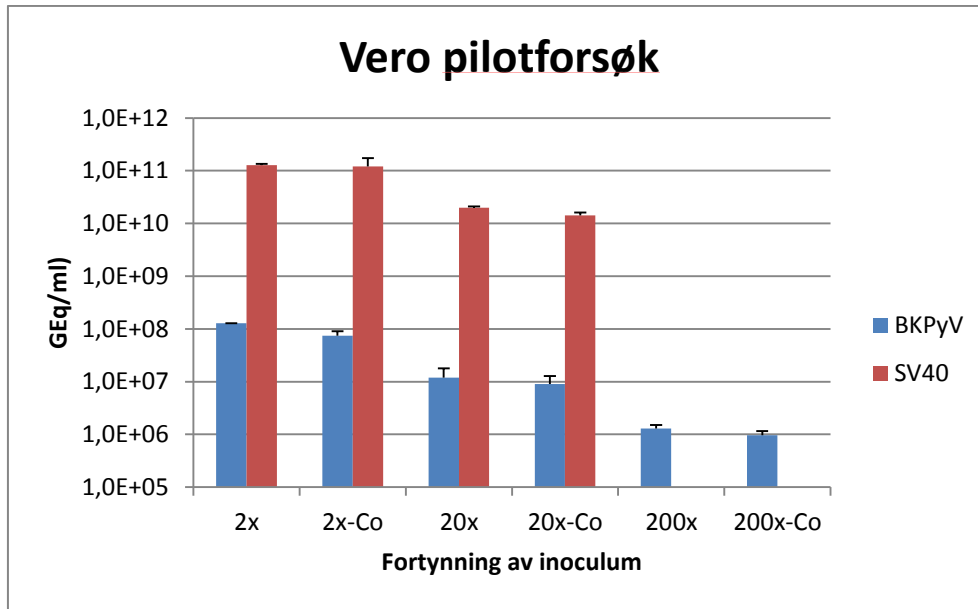
Alle antistoffene ble på forhånd fortynnet i henhold til Tabell 5.

### 3. Resultater

#### **Pilot: Mono- og koinfeksjon av Vero celler med BKPyV og SV40**

For å undersøke om Vero supernatantene med henholdsvis BKPyV og SV40 inneholdt infeksjøs virus, infiserte vi først Vero celler som er semipermissive for BKPyV og permissiv for SV40. Fordi vi ikke visste virus load, valgte vi å infisere brønnene med ulike fortynninger av supernatantene (2x, 20x og 200x). Celler ble sådd ut og infisert med BKPyV og SV40 neste dag. To timer etter infeksjonen ble inokulumet fjernet, cellene vasket og nytt vekstmedium tilsatt. Deretter ble cellene satt i CO<sub>2</sub> inkubator. Supernatantene ble høstet 3 dager post infeksjon (d.p.i.) som er tiden som trengs til å få fullført en replikasjonsyklus for BKPyV (Figur 2) og cellene ble fiksert. Deretter ble BKPyV og SV40 DNA load målt vha qPCR og cellene farget med immunfluorescensfarging.

Resultatene fra BKPyV qPCR viser en BKPyV DNA load fra 10<sup>8</sup> til 10<sup>6</sup> GEq/ml når de ulike fortynningene av virus ble brukt som inokulum. BKPyV DNA load er den samme i monoinfiserte brønner som i brønner med SV40 koinfeksjon. Resultatene fra SV40 qPCR viser en SV40 DNA load fra 10<sup>11</sup> til 10<sup>10</sup> GEq/ml. Dessverre ble det ikke utført qPCR på 200x fortynning for SV40 hverken for monoinfiserte eller koinfisererte brønner. DNA load er den samme i monoinfiserte brønner som i brønner med BKPyV koinfeksjon. Ikke rart at vi finner færre i BKPyV 2x infisert brønn med tanke på semipermissivitet til Verocellene.



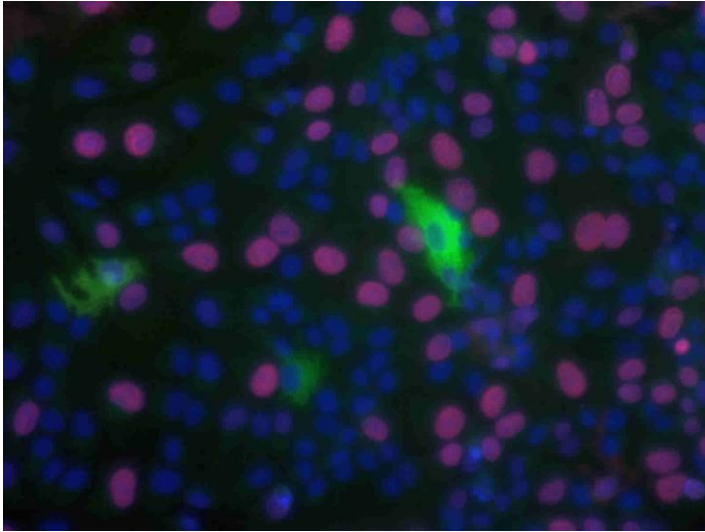
Figur 5: Vero celler virus load til BKPvV og SV40 mono/koinfisert. Resultatene er presentert som genom ekvivalenter per ml supernatant (GEq/ml) og viser gjennomsnittet av 2 brønner ± standardavvik. Hver av brønnene er analyser i triplett.

Videre ser vi på standardavvik, det vil si om det er stor variasjon mellom de to brønnene resultatene stammer fra. Standardavvikene er små som tyder på lite variasjon.

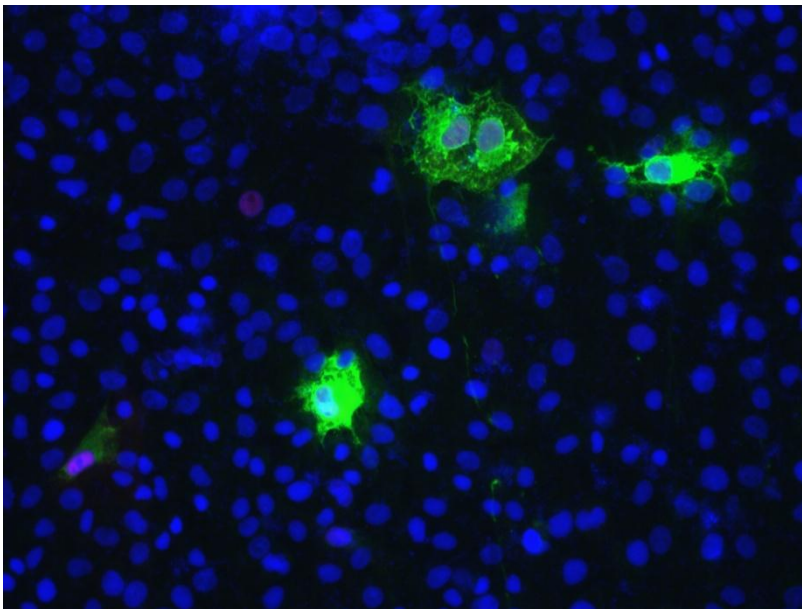
Kort oppsummert tyder qPCR resultatene på at vi har infeksjøs virus og at vi enten har mye mer SV40 enn BKPvV eller at viruset bare er mye mer infeksjøs i Vero celler enn BKPvV. Vi kan ikke se at koinfeksjon med BKPvV og SV40 påvirker verken infeksjon av BKPvV eller SV40.

For å se om cellene er blitt infisert av BKPvV og /eller SV40 og for å se om det finnes celler som er infisert med begge virus samtidig, utførte vi immunfluorescensfarging 3 d.p.i.





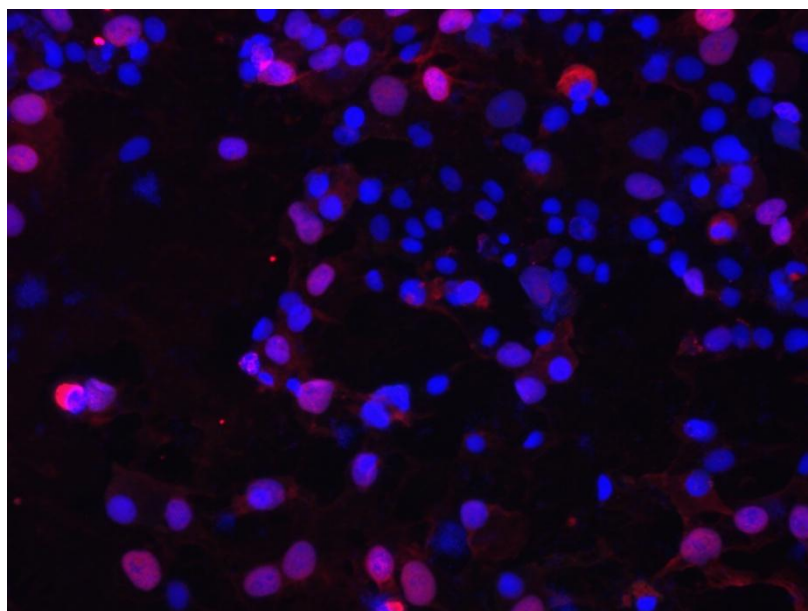
Figur 6: Koinfisert brønn med Verocelle infisert med BKPyV som uttrykker agnoprotein (grønn) og SV40 infiserte celler som uttrykker LTag (rød, Pab419). DNA (blå).



Figur 7: BKPyV infiserte Veroceller som uttrykker agnoprotein (grønn). Cellene var også farget med Pab 419 (rød) som bare skal gjenkjenne SV40 LTag. Merk at to celler tilsynelatende er farget med Pab 419.

Resultatene viser rikelig med SV40 infiserte celler (Figur 8) og noen BKPyV infiserte celler (Figur 6). Vi kunne ikke se koinfiserte celler i koinfiserte brønner. Pab 419 skal kjenne igjen SV40 LTag og ikke BKPyV LTag men i Figur 7 som viser celler fra brønn

bare infisert med BKPyV ser vi svak farging med Pab 419 i to celler og en av disse er infisert med BKPyV. Dette kan skyldes en ukjent kontaminering med SV40 eller at antistoffet delvis kryssreagerer med BKPyV LTag. Siden vi ikke på dette tidspunktet kjente virus load i inokulum, kan vi ikke si om de mange flere SV40 infiserte cellene skyldtes mer virus i inokulum, det at cellene er mer permissiv for SV40 eller en kombinasjon av dette.



Figur 8: SV40 infisert Verocelle, farget med agno (sent protein, grønn) og Pab 419 (tidlig LTag, rosa/rød) antistoffer. DNA (blå).

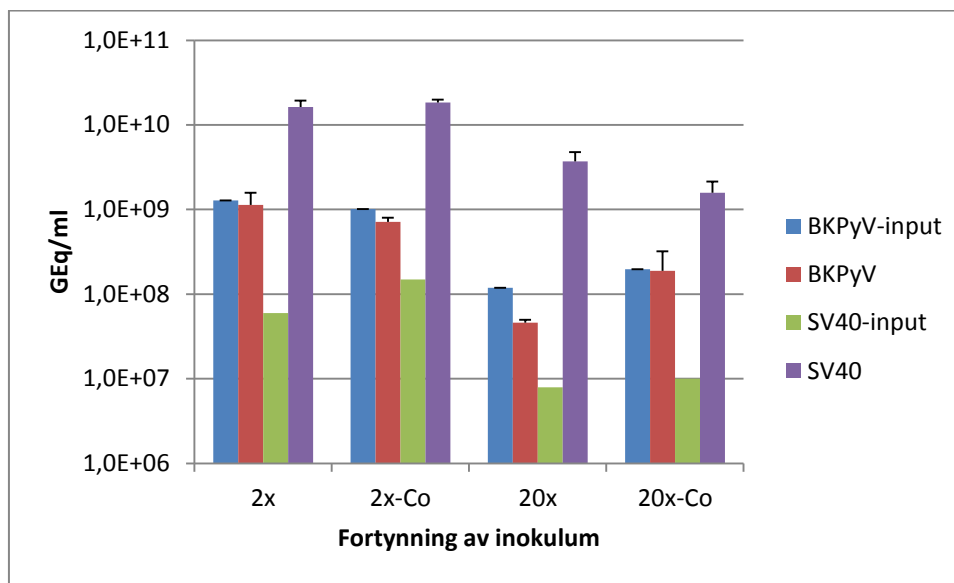
Kort oppsummert fant vi at vi hadde infeksjøs BKPyV og SV40 men at vi ikke kunne se koinfiserte celler.

Vi konkluderte med at vi hadde infeksjøs BKPyV og SV40 og at koinfeksjon i samme brønn tilsynelatende ikke påvirket virusreplikasjon av det andre viruset. Vi bestemte oss

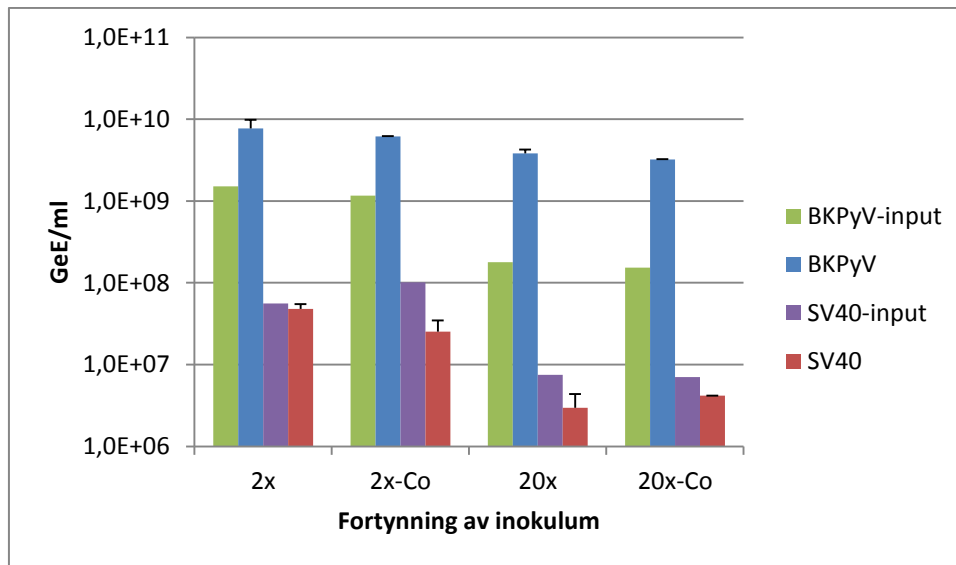
for å fortynne SV40 supernatant hundre ganger før vi fortynnet den på vanlig måte i neste forsøk.

### Forsøk 1: Mono- og koinfeksjon av Vero celler og RPTEC med BKPyV og SV40

I dette forsøket tok vi i bruk RPTEC cellene i tillegg til Vero cellene. Dette er celler som vi vet er permissiv for BKPyV men som vi aldri tidligere har prøvd å infisere med SV40. Vi jobbet med to plater, ei for Vero celler og ei for RPTEC celler. Vi brukte 2x og 20x fortynninger for SV40, BKPyV og koinfeksjon. Denne gangen høstet vi supernatant 1 d.p.i. (input) for å se hvor mye nytt virus som ble produsert. Ellers var fremgangsmåten helt lik den vi hadde i pilot forsøk.



Figur 9: Vero celler DNA load fra BKPyV og SV40, mono- og koinfiserte celler.

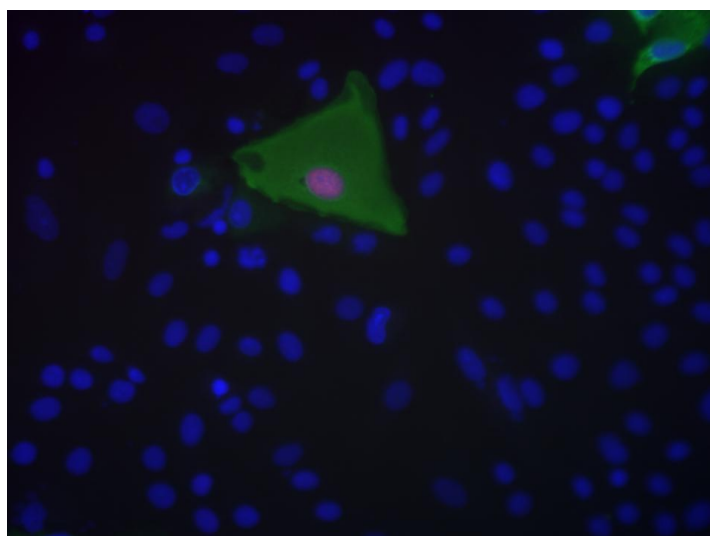


Figur 10: RPTEC virus load til BKPyV og SV40, mono/koinfisert

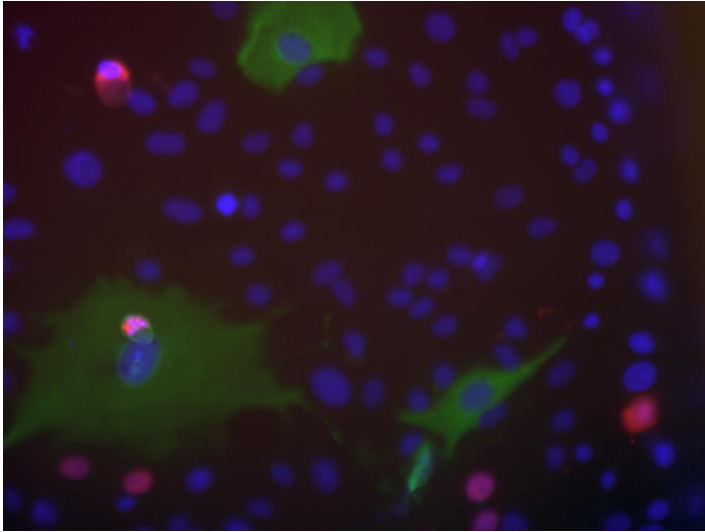
Resultatene fra Vero celler viser at BKPyV DNA load ikke øker fra input (Figur 9). I samsvar med dette er det heller ingen signifikant forskjell mellom virus load fra monoinfiserte og koinfiserte brønner. SV40 DNA load øker med mer enn 2 log fra input. Samtidig BKPyV infeksjon ser ikke ut til å påvirke SV40 infeksjonen viser at input for SV40 i 2x fortynningen er omtrent samme, og samme trend for 20x fortynning. Figuren viser også at SV40 øker mer enn 2 log i monoinfiserte og koinfiserte brønner og er langt høyere enn input. Det stemmer da disse ble høstet tre dager post infeksjon (3 d.p.i). Viruset har fått mer tid til infeksjon og replikasjon. Igjen ser vi at BKPyV tilstedeværelse ikke påvirker SV40. Forskjellen mellom 2x og 20x fortynning reflekteres i form av en log forskjellen i DNA load både for BKPyV og SV40.

Resultatene fra RPTEC viser at BKPyV DNA load øker 0.8 til 1.5 log fra input (Figur 9). Den største økning ser vi når det mest fortynnede virus brukes som inokulum. Det er ingen signifikant forskjell mellom virus load fra monoinfiserte og koinfiserte brønner. SV40 DNA load øker ikke fra input, heller tvert i mot, og i samsvar med dette er det ingen signifikant forskjell mellom virus load fra monoinfiserte og koinfiserte brønner.

Oppsummert viser qPCR resultatene at BKPyV replikerer dårlig eller ikke i det hele tatt i Vero celler men bra i RPTEC celler mens SV40 replikerer svært godt i Vero celler men ikke i det hele tatt eller i liten grad i RPTEC. Koinfeksjon ga ingen målbar forskjell verken i BKPyV DNA load eller SV40 DNA load. For å se om cellene var blitt infisert av BKPyV og /eller SV40 og for å se om det finnes celler som er infisert med begge virus samtidig utførte vi immunfluorescensfarging 3 d.p.i.

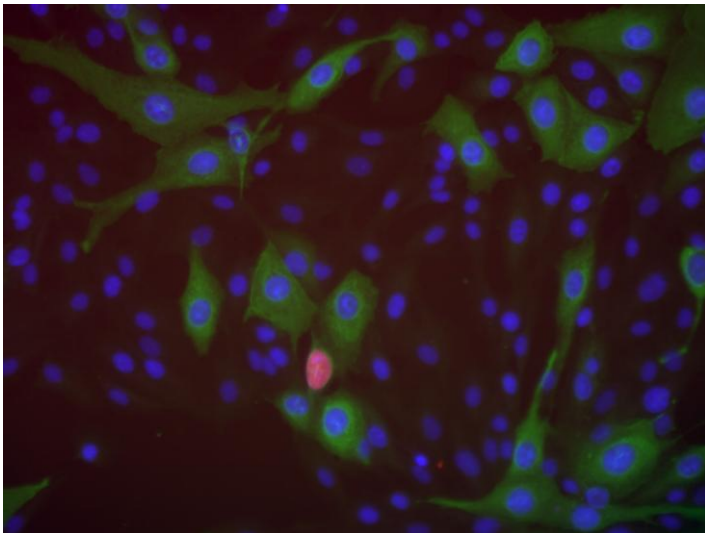


Figur 11: fra brønn med Vero celle koinfisert med SV40 og BKPyV. Merk en celle koinfisert med SV40 (rød) og BKPyV (grønn)

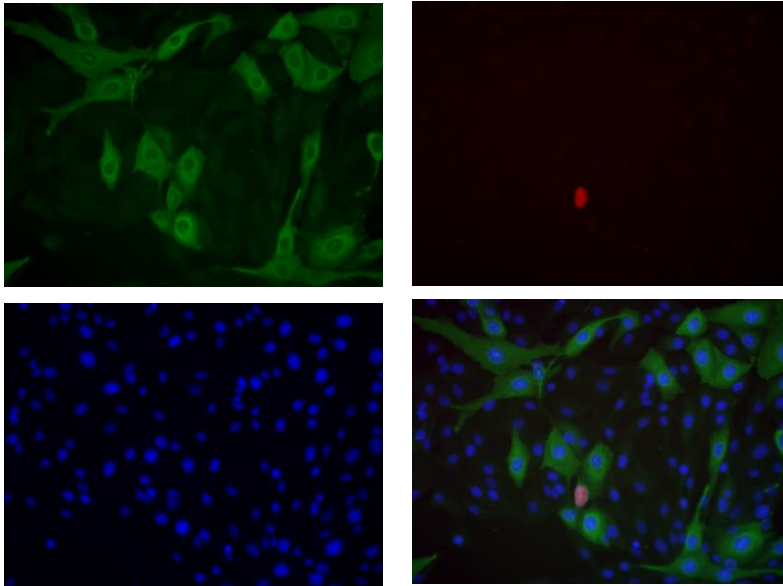


Figur 12: Monoinfiserte SV40 og BKPyV Vero celler

Resultatene fra Vero celler viser betydelig færre SV40 infiserte celler enn i pilot forsøk når 100x mer virus ble brukt. Denne gangen observerte vi en koinfisert cell som uttrykte SV40 LTag i kjernen (rosa/rød) og BKPyV agno (grønn) i cytoplasma (Figur 11). De fleste cellene var imidlertid monoinfisert (Figur 12).



Figur 13: RPTEC koinfisert med BKPyV/SV40. Merk cellen som er koinfisert med BKPyV (grønn) og SV40 (rød).



Figur 14: Samme som i figur 13 men viser BKPyV infiserte celler som uttrykker agno øverst til venstre og celle infisert med SV40 som uttrykker tidlig protein LTag øverst til høyre. Kjerner (blå) der DNA er farget med DraQ5 i nedre venstre hjørne og i nedre høyre hjørne en fusjon av de andre bildene.

Oppsummert viste immunfluorescensfarging at Vero lot seg infisere av BKPyV og SV40 og at samme celle kunne bli infisert med begge virus. RPTEC lot seg infisere med BKPyV. Vi så bare en RPTEC celle som var infisert med SV40 og den var samtidig infisert med BKPyV.

Vi konkluderte med at BKPyV infiserer både Vero celler og RPTEC men at infeksjon er mest effektiv i RPTEC der vi finner en målbar økning i virusload 3 d.p.i. SV40 infiserer Vero celler men vi kunne bare finne en infisert RPTEC og den var også infisert med BKPyV noe som kan tyde på at SV40 får hjelp av BKPyV.

### **Forsøk 2 og 3: Mono- og koinfeksjon av RPTEC celler med BKPyV og SV40**

I disse to forsøkene benyttet vi bare RPTEC. Siden vi nå hadde sett at SV40 i svært liten grad infiserer RPTEC, besluttet vi å øke mulighet for SV40 infeksjon ved å øke SV40 mengde til samme mengde som benyttet i pilot forsøk, til å la infeksjon gå noen dager lengre. Vi bestemmer oss også for å prøve å infisere RPTEC med BKPyV først og en dag seinere med SV40. Vi benyttet bare 2x fortykning av både BPyV og SV40. Disse to forsøkene er helt identiske med unntak av at 6 brønner ekstra i forsøk 3 plate 1 og 2 ble brukt til høsting av celler til Western Blot. Plate 1 ble som tidligere høstet og fiksert 3 d.p.i mens plate 2 og 3 i hvert av de forsøkene sto til dag 6 d.p.i av BKPyV dvs at høsting av supernatantene til qPCR og fiksering av celler til immunfluorescensfarging skjedde mandag i uken etter infeksjon.

En oversikt over plan for infeksjon i forsøk 2 og 3:

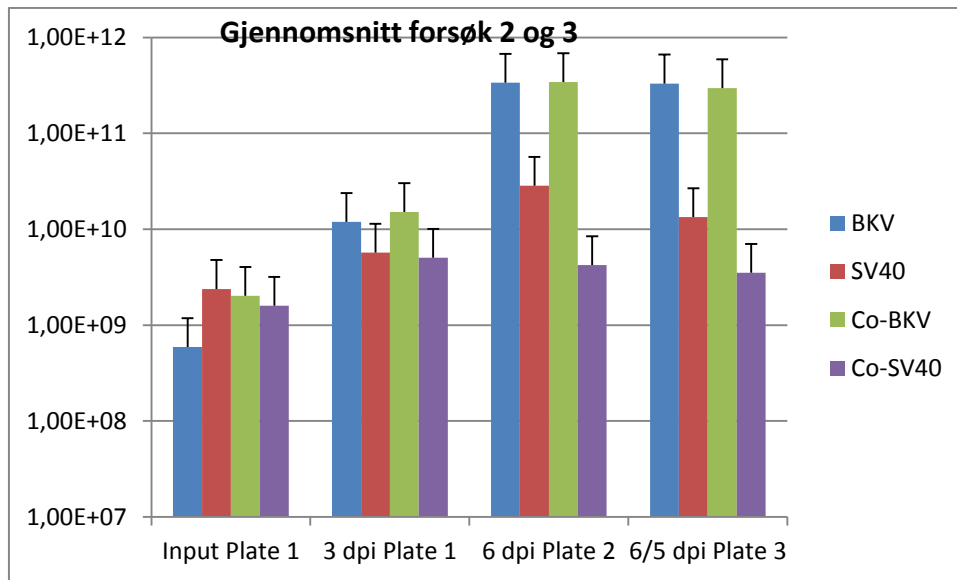
Plate 1: infiseres som før og inkuberes i 72 timer eller 3 d.p.i.

Plate 2: infiseres som før og inkuberes til mandag eller 6 d.p.i.

Plate 3: infiseres med BKPyV på tirsdag og SV40 på onsdag. Inkuberes til mandag eller 6/5 d.p.i BKPyV/SV40 infeksjon.

Ellers var fremgangsmåten lik den vi hadde i forsøk 0 og 1 med tanke på utsåing og infeksjon, høsting til qPCR.





Figur 15: RPTEC virus load fra BKPyV og SV40, mono/koinfiserte celler. Resultatene er presentert som genom ekvivalenter per ml supernatant (GEq/ml) og viser gjennomsnittet av 2 forsøk ± standardavvik. Hvert av forsøkene er utført i 2 brønner og analysert i triplett.

Resultatene fra qPCR viser at BKPyV virus load øker i takt med antall dager post infeksjon, økning mer enn 1 log fra input til 3 d.p.i. Ytterligere nesten 2 log fra dag 3 til dag 6. SV40 har også ei økning men i mindre grad sammenlignet med BKPyV. SV40 øker vel 1 log fra input til dag 6/5 post infeksjon. Det er litt høyere nivå 6 d.p.i enn 5 d.p.i med SV40.

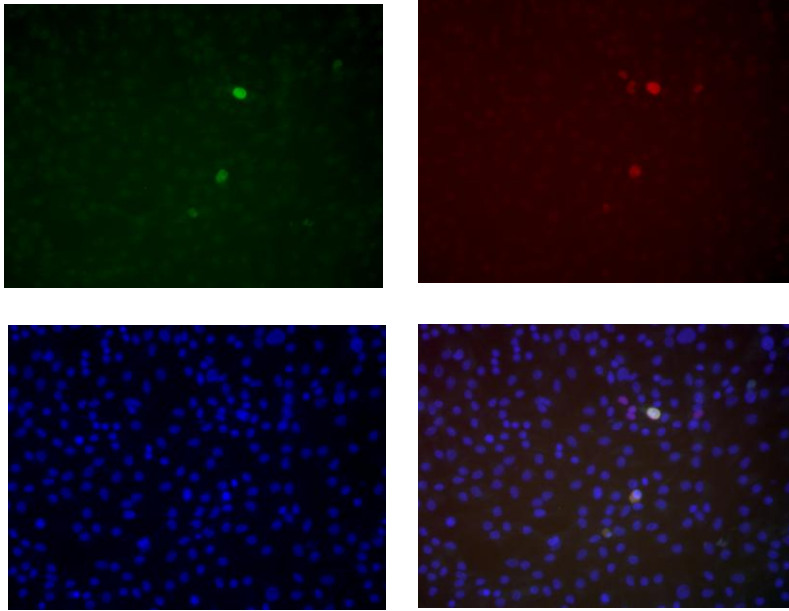
Det synes ikke som om koinfeksjon med SV40 påvirker BKPyV infeksjon verken 3 dpi eller 6 dpi (plate 2 og plate 3). For SV40 derimot er virusload i koinfiserte brønner 5 dpi (plate 3) og 6 dpi (plate 2) litt lavere enn når cellene bare ble infisert med SV40.

For input plate 1 ser vi at det er ganske jevnt mellom BKPyV og SV40, både i mono – og koinfeksjon.

Det er logaritmisk skala i diagrammet derfor støttelinjer. Standardavviket (SD) er høyere her enn i pilot og forsøk 1. Dette skyldes at resultater fra to forsøk med to paralleller hver er slått sammen. Innad for hvert forsøk er SD ikke så høyt.

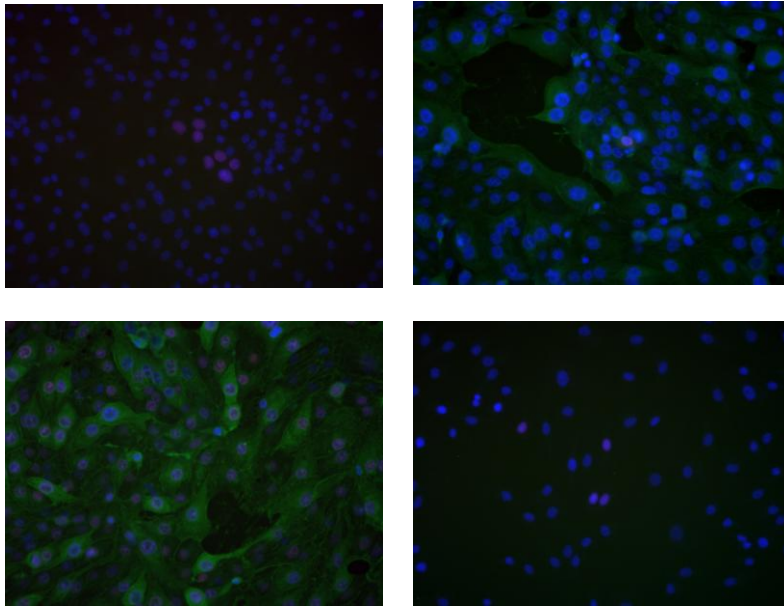
Kort oppsummert viste qPCR at RPTEC er svært permissiv for BKPyV men også at SV40 kunne replikere i RPTEC og gi en signifikant økning i DNA load 5 og 6 d.p.i. Koinfeksjon så ikke ut til å påvirke BKPyV replikasjon mens det kunne se ut til å redusere SV40 replikasjon

Fordi forsøk 1 hadde vist en SV40 infisert celle som uttrykte LTag, ønsket vi denne gang og også undersøke om SV40 infiserte brønner inneholdte celler som uttrykte SV40 seine proteiner. I og med at antistoffet mot SV40 VP1 kryssreagerer mot BKPyV kunne vi bare undersøke uttrykk av SV40 VP1 i monoinfiserte brønner.



Figur 16: SV40 infiserte RPTEC 5 d.p.i, plate 3, forsøk 3. Bilde øverst til venstre er farget med antistoff rettet mot SV40 VP1 (grønt), bildet øverst til høyre er farget med antistoff rettet mot LTag (rødt), bilde nederst til venstre viser DNA (blått) og bildet nederst til høyre er fusjon av alle bildene.

Immunfluorescensfarging av BKPyV infiserte celler viste mange infiserte celler dag 3 d.p.i og 6 d.p.i var nærmest alle cellene infisert (Figur 17). Mens immunfluorescensfarging av RPTEC 3 d.p.i ikke viste noen SV40 infiserte celler (resultatet er ikke vist), kunne vi se noen celler som uttrykte SV40 LTag (rødt) og VP1 (grønt) ved 5 d.p.i (Figur 16 ). Vi kunne også se noen koinfiserte celler 6/5 d.p.i. (Figur 17).



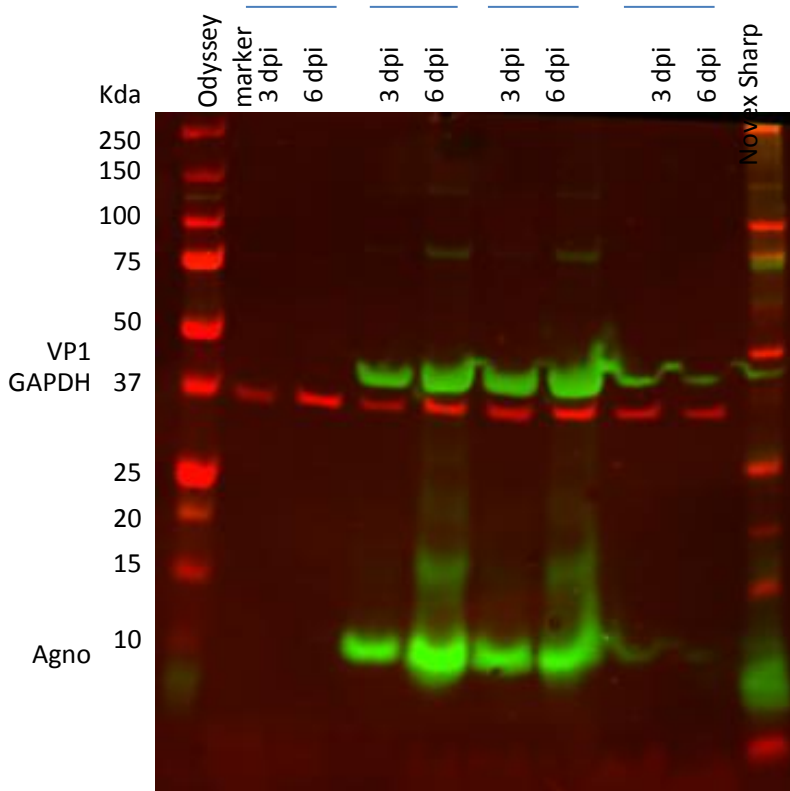
Figur 17: RPTEC fra ulike brønner infisert/koinfisert med BKPyV/SV40, forsøk 2

Bildet øverst til venstre viser SV40 infeksjon i RPTEC 5 d.p.i (plate 3). Bildet øverst til høyre viser BKPyV/SV40 koinfeksjon i RPTEC 6/5 d.p.i (plate 2). Bildet nede til venstre viser BKPyV infeksjon av RPTEC 6 d.p.i (plate 3), og bildet nede til høyre viser SV40 infeksjon av RPTEC 6 d.p.i (plate 2).

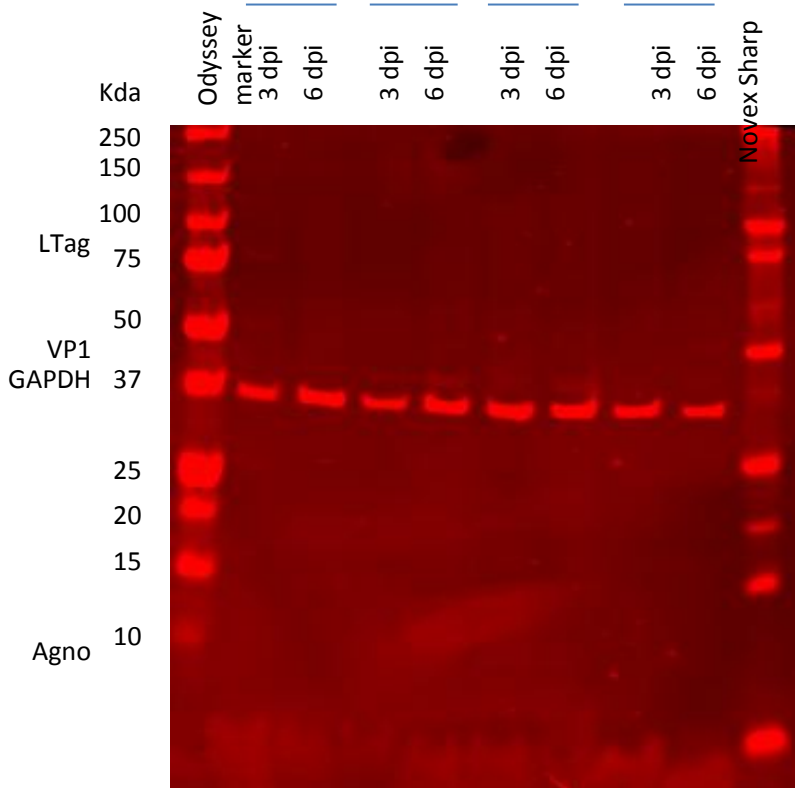
Kort oppsummert så kunne vi som forventet se mange BKPyV infiserte celler men også SV40 infiserte celler fra 5 d.p.i. Vi fant SV40 infiserte celler i mono – og koinfiserte brønner både som mono og koinfeksjon og noen av cellene uttrykte også seint protein VP1.

I forsøk 3 undersøkte vi også uttrykk av tidlige og seint proteiner ved hjelp av Western blot. Vi brukte antistoff mot SV40 VP1 som også kryssreagerer mot BKPyV VP1 og Pab419 som bare skal detektere SV40 LTag og ikke BKPyV LTag og antistoff mot agnoprotein som bare skal detektere BKPyV agnoprotein og ikke SV40 agnoprotein. Som loading kontroll benyttet vi et antistoff mot det cellulære proteinet GAPDH. Resultatene viste uttrykk av VP1 og agnoprotein i BKPyV infiserte celler 3 og 6 d.p.i og koinfiserte celler 3 og 6 d.p.i men ikke uttrykk i SV40 infiserte celler verken 3 d.p.i eller 6 d.p.i (Figur 18). I samsvar med immunfluorescensfarging er uttrykket høyest i BKPyV

infiserte celler 6 d.p.i. Fordi antistoffet mot VP1 både detekterer BKPyV og SV40 VP1 kan vi ikke si med sikkerhet om bånd i koinfiserede brønnene skyldes BKPyV eller SV40 men siden forholdet mellom uttrykk av VP1 og agnoprotein er ganske likt det vi ser i BKPyV infiserte celler antar vi at dette er VP1 fra BKPyV og ikke SV40.



Figur 18: Western blot



Figur 19: Western blot høy intensitet

Under loading av gel registrerte vi at det skjedde overloading dvs lekkasje fra brønnene merket CO 6 d.p.i til uinf 3 d.p.i, som er vår negative kontroll. Det har ført til svake bånd for VP1 og agnoprotein i brønn med uinfiserte celler. Merk at SV40 infiserte celler ikke har disse båndene.

Vi ser ikke uttrykk av SV40 LTag i figur 18. Ved overeksponering (Figur 19) kan vi skimte et svakt bånd (mellom 80 og 100 kDa) som kan være LTag men siden vi mangler en positiv kontroll for SV40 LTag er det vanskelig å konkludere.

GAPDH båndet er sterkere 6 d.p.i enn 3 d.p.i. Dette skyldes at cellene vokste mellom dag 3 og 6 og at vi høstet cellene i samme volum RIPA buffer og benyttet samme volum av celleekstrakt for loading.

Kort oppsummert så vi at det kan tyde på at Western blot ikke er sensitiv nok til å detektere proteiner fra de få SV40 infiserte cellene som vi observerte ved immunfluorescensfarging og at Western blot var «overloadet». Forsøket burde gjentas og en positiv kontroll på SV40 infiserte celler eller celler fra cellelinje som uttrykker SV40 LTag burde vært inkludert.

Vi konkluderte med at SV40 kan infisere RPTEC men at uttrykk av virale proteiner og økning i DNA load tar mer enn 3 dager. Tilstedeværelse av BKPyV før eller samtidig med SV40 synes ikke å øke SV40 infeksjon, snarere tvert i mot men vi kan observere noen få koinfiserte celler. Western blot er ikke sensitiv nok til å detektere SV40 infeksjon av RPTEC.

## 4. Diskusjon

Millioner av mennesker har fått SV40 via kontaminerte vaksiner men siden også uvaksinerte personer er smittet er det mistanke om at SV40 nå smitter fra person til person. Foreløpig vet man ikke så mye om konsekvensene av en SV40 infeksjon blant annet fordi kliniske prøver sjelden sjekkes for SV40. I en studie av 91 nyretransplanterte i USA undersøkte man alle prøvene for BKPyV, JCPyV og SV40 og fant at to pasienter med BKPyV nefropati også hadde SV40 DNA i nyrebiopsi og i celler i urin (13). I artikkelen stilles det spørsmål ved om SV40 kan være involvert i utvikling av nefropati. En måte kunne være at infeksjon med SV40 påvirket BKPyV replikasjon i nyreepitelceller eller at SV40 replikasjon ble påvirket av samtidig BKPyV infeksjon. Så vidt vi har kunnet se finnes det bare en in vitro studie av SV40 infeksjon i RPTEC og her konkluderte man med at RPTEC ikke lot seg infisere av SV40 (14). Formål med denne oppgaven var å undersøke om SV40 alene kunne replikere i primære humane nyreepitelceller (RPTECs), hovedmålceller for polyomvirus – assosiert nefropati (PyVAN), og om en koinfeksjon med BKPyV vil påvirke SV40 infeksjon og vice versa.

Våre resultater viser at SV40 alene kunne infisere RPTEC men at replikasjonsyklus tilsynelatende tok lengre tid enn for BKPyV i RPTEC og at færre celler ble infisert. SV40 uttrykte både tidlige og seint protein og ga en økning i ekstracellulær DNA load som vi antar reflekterer produksjon av nye viruspartikler. Vi fant også at SV40 og BKPyV kunne infisere samme celle både i RPTEC og Vero. I koinfiserede brønner var det en liten nedgang i SV40 DNA load som kunne tyde på at samtidig BKPyV infeksjon hemmet SV40 infeksjon. Vi kunne imidlertid ikke se at tilstedeværelse av SV40 påvirket BKPyV infeksjon.

Mens Low og kolleger (14) fant at RPTEC ikke kunne infiseres med SV40 fant vi ut at RPTEC lot seg infisere. De forskjellige resultatene kan skyldes forskjeller i cellene eller metoder benyttet. Mens de laget egne RPTECs fra kadaver vev og kalte cellene HPTE for human kidney proximal tubule epithelial cells, kjøpte vi våre celler fra ScienCell. Vi har tidligere vist at celler fra ulike donorer kan ha forskjellig permissivitet for BKPyV (upubliserte observasjoner), så forskjellene kan skyldes genetiske forhold hos donor



eller andre forhold som for eksempel vekstmedium benyttet. Som oss benyttet de Western blot men studerte cellene tom 13 d.p.i uten å finne uttrykk av LTag. Heller ikke vi kunne observere et tydelig bånd for LTag tom 6 d.p.i. Dessuten benyttet de Southern blotting 4 d.p.i uten å finne SV40 DNA. Vi benyttet qPCR som er mer følsom enn Southern blotting og i tillegg benyttet vi immunfluorescensfarging av cellekultur.

For å studere koinfeksjon med BKPyV og SV40 benyttet vi kombinasjonen av to antistoff som henholdsvis bare skulle kunne detektere BKPyV infeksjon (Agnoserum) eller bare SV40 infeksjon (Pab 419, SV40 LTag). I pilotforsøket observerte vi imidlertid noen få svakt rødfargede celler i en brønn som skulle være infisert med bare BKPyV og ikke SV40. Dette kan skyldes en kontaminering med SV40 i BKPyV monoinfisert brønn eller at Pab419 kryssreagerer med BKPyV LTag eller cellulære proteiner i Vero celler. qPCR av denne brønnen viste ingen SV40 DNA og støttet dermed ikke at dette dreide seg om en kontaminering. Samtidig kunne vi ikke observere slik farging i forsøk 1, 2 og 3 hvor vi benyttet RPTEC. Vi vet fra tidligere forsøk og fra replikasjonssyklus (Figur 2) at alle celler som uttrykker agnoprotein også uttrykker LTag. Hvis det var en kryssreaksjon med BKPyV LTag skulle alle celler med agnoutrykk også ha rød kjerne. Dette kan tyde på at om dette var en kryssreaksjon var det sannsynligvis med et cellulært protein i Vero celler. Interessant nok fant vi imidlertid en gammel artikkel fra 1987 (15) som beskriver at Pab 419 antistoff kryssreagerer med BKPyV. Ut i fra våre Western blot resultater ser det ikke ut som om Pab 419 kryssreagerer i hvertfall ikke med denaturert LTag. Ved Western blot er alle proteinene denaturert. Noen antistoffer gjenkjenner bare epitoper når proteinet har naturlige form og ikke etter denaturering . Vi kan ikke med sikkerhet forklare hvorfor noen Vero celler ble farget men fordi vi ikke så dette fenomenet i RPTEC velger vi å tro at antistoffet Pab 419 er spesifikt for SV40 LTag i hvert fall i RPTEC.

Ved koinfeksjon i RPTEC kunne det se ut som om infeksjon med BKPyV før eller samtidig med SV40 reduserte SV40 replikasjon. En forklaring på dette kan være at

BKPyV infeksjon førte til frigjøring av cytokiner som i neste omgang hindret infeksjon med SV40. På den andre siden var det svært få koinfisererte celler og hvis BKPyV hadde direkte positive effekter på SV40 replikasjon eller hvis SV40 hadde direkte positive effekter på BKPyV replikasjon kunne vi neppe ha målt dette. For å studere dette nærmere hadde det vært interessant og la infeksjonen gå lengre og se på antall dobbeltinfisererte celler og også se på hvordan virus DNA load endret seg over tid for BKPyV og SV40.

Årsaken til å studere SV40 infeksjon i RPTEC og koinfeksjon av SV40 og BKPyV i RPTEC var å få mer kunnskaper om hvordan SV40 eventuelt kan være involvert i sykdomsutvikling hos mennesker, spesielt i nefropati hos nyretransplanterte.

Hvilke implikasjoner har så våre resultater? Våre resultater tyder på at SV40 alene kan gi nyresykdom hos mennesker på samme måte som det er kjent for å gjøre hos aper (Low et al 2004 – egentlig Sheffield et al 1980). Selv om vi ikke direkte kunne påvise at SV40 replikasjon ble positivt påvirket av BKPyV replikasjon og vice versa, kan vi ikke utelukke at koinfeksjon av disse to virusene eller med noen av de andre 12 kjente humane polyomavirusene, eller helt andre virus kan ha betydning for sykdomsutvikling

Vår konklusjon er at RPTEC er semipermissive for SV40. Videre har vi sett at koinfeksjon av celler med BKPyV og SV40 finner sted men følgene av dette er fortsatt uavklart.

## Referanser

1. Butel J.S., Jafar, S., Wong, C., Arrington, A.S., Opekun, A.R., Finegold, M.J., Adam, E. 1999. Evidence of SV40 infections in hospitalized children. *Hum Pathol.* 30(12):1496-502.
2. Chesters, P.M., Heritage, J., McCance, D.J. 1983. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J. Infect. Dis.*, 147 (1983), pp. 676–684.
3. Comar, M., D'Agaro, P., Andolina, M., Maximova, N., Martini, F., Tognon, M., Campello, C. 2004. Hemorrhagic cystitis in children undergoing bone marrow transplantation: a putative role for simian virus 40. *Transplantation.* 78(4):544-8.
4. Dugan, A.S, Eash, S., Atwood, W.J. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol.* 2005 Nov;79(22):14442-5.
5. Egli, A., L. Infanti, A. Dumoulin, A. Buser, J. Samaridis, C. Stebler, R. Gosert, H.H. Hirsch. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J. Infect. Dis.*, 199 (2009), pp. 837–846
6. Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G, Ysebaert, M. 1978. Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature*, vol 273, No 5658, pp. 113-120.
7. Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman, and B. Hulme. 1971. New human papovavirus (B. K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1:1253-1257.
8. Hirsch, H. H., and J. Steiger. 2003. Polyomavirus BK. *Lancet Infect. Dis.* 3:611-623.
9. Hirsch, H.H.. 2010. Polyoma and papilloma virus infections after hematopoietic stem cell or solid organ transplantation. P. Bowden, P. Ljungman, D.R. Snyderman (Eds.), *Transplant Infections*, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 465–482
10. Johne, R., Buck, C.B., Allander, T., Atwood W.J., Garcea R.L., Imperiale M. J., Major E.O., Ramqvist T, and Norkin L.C. 2011. Taxonomical developments in the family *Polyomaviridae*. *Arch Virol.* 156(9):10.

11. Kling, C. L., Wright, A. T., Katz, S. E., McClure, G. B., Gardner, J. S., Williams, J. T., Meinerz, N. M., Garcea, R. L., Vanchiere, J. A. Dynamics of urinary polyomavirus shedding in healthy adult women. *J. Med. Virol.*, 84 (2012), pp. 1459–1463.
12. Knowles, W. A. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 577 (2006), pp. 19–45
13. Li, R.M., Mannon, R.B., Kleiner, D., Tsokos, M., Bynum, M., Kirk, A.D., Kopp, J.B. 2002. BK virus and SV40 co-infection in polyomavirus nephropathy. *Transplantation*. 74(11):1497-504.
14. Low, J., Humes, H.D., Szczypka, M., Imperiale, M. 2004. BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology*. 323(2):182-8.
15. Major, E. O., Vacante, D. A., Traub, R. G., London, W. T., Sever, J. L. Owl Monkey Astrocytoma Cells in Culture Spontaneously Produce Infectious JC Virus Which Demonstrates Altered Biological Properties. 1987. *J Virol*. 61(7):1435-41
16. Mishra, N., Pereira, M., Rhodes, R. H., An, P., Pipas, J. M., Jain, K., Kapoor, A., Briese, T., Faust, P. L., Lipkin, W. I. Identification of a Novel Polyomavirus in a Pancreatic Transplant Recipient With Retinal Blindness and Vasculitic Myopathy. *J. Infect. Dis.* 1. pii: jiu250.
17. Moriyama, T., Marquez, J. P., Wakatsuki, T., and Sorokin, A. 2007. Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *J Virol*. 81(16): 8552–8562.
18. Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J., and Dessel, B. H. 1971. Cultivation of papova – like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1:1257 – 1260.
19. Patel, N. C., Vilchez, R. A. , Killen, D. E., Zanwar, P., Sroller, V., Eldin, K. W., Lopez – Terrada, D., and Butel. J. S. 2008. Detection of polyomavirus SV40 in tonsils from immunocompetent children. *J. Clin. Virol*. 43:66-72.
20. Polo, C., Perez, J.L., Mielnichuck, A., Fedele, C.G., Niubo, J., Tenorio, A. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children *Clin. Microbiol. Infect.*, 10 (2004), pp. 640–644

21. Rinaldo, C. H., Hirsch H. H. 2007. Antivirals for the treatment of polyomavirus BK replication 1. *ExpertRevAntilInfectTher* 5(1):105-115.
22. Rinaldo, C. H., Hirsch, H. H. 2013. The human polyomaviruses: from orphans and mutants to patchwork family. *APMIS*. 121(8):681 – 684.
23. Rinaldo, C. H., Traavik, T., and Hey, A. 1998. The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *JVirol* 72(7):6233-6236.
24. Shah, K., and Nathanson, N. 1976. Human exposure to SV40: review and comment. *American journal of epidemiology* 103:1-12.
25. Sharma, B. N., Li, R., Bernhoff, E., Gutteberg, T. J., and Rinaldo, C. H. 2011. Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral Res.* 92:115-123.
26. Stewart, S. E., Eddy, B. E., and Borgese N. 1958. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 20(6):1223-1243.
27. Sweet, B. H., and Hilleman, M. R. 1960. The vacuolating virus, S.V.40. *Proc Soc Exp Biol Med* 105:420-427.
28. Thomas, L.D., Vilchez, R.A., White, Z.S., Zanwar, P., Milstone, A.P., Butel, J.S., Dummer, S. 2007. A prospective longitudinal study of polyomavirus shedding in lung-transplant recipients. *J Infect Dis.* 195(3):442-9. Epub 2006 Dec 22.
29. Vanchiere, J.A., Nicome, R.K., Greer, J.M., Demmler, G.J., Butel, J.S. 2005. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis.* 192(4):658-64. Epub 2005 Jul 12.
30. Vanchiere, J.A., Abudayyeh, S., Copeland, C.M., Lu, L.B., Graham, D.Y., Butel, J.S. 2009. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *J Clin Microbiol.* 47(8):2388-91. doi: 10.1128/JCM.02472-08. Epub 2009 Jun 3.
31. <http://www.sv40foundation.org/CPV-link.html>
32. <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>
33. [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=Content\\_6493&Main\\_6157=6287:0:25,5501&MainContent\\_6287=6493:0:25,6826&Content\\_6493=6441:68702::0:6446:19:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=Content_6493&Main_6157=6287:0:25,5501&MainContent_6287=6493:0:25,6826&Content_6493=6441:68702::0:6446:19:::0:0)

