

SILMÄNPOHJAN IKÄRAPPEUMA:  
LÄMPÖSOKKIPROTEIINI Hsp70  
RPE-SOLUJEN STRESSIVASTEESSA

Käsi hyväksyty 30.5.2012

Peti Jaaskelainen

Mari Helena Karjalainen  
Opinnäytetyö  
Lääketieteen koulutusohjelma  
Itä-Suomen yliopisto  
Lääketieteen laitos  
Silmätaudit  
Maaliskuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen koulutusohjelma

KARJALAINEN, MARI H: Silmänpohjan ikärappeuma: lämpösokkiproteiini Hsp70

RPE-solujen stressivasteessa

Opinnäytetyö, 38 sivua

Opinnäytetyön ohjaajat: LL Tuomas Paimela ja professori Kai Kaarniranta

Maaliskuu 2012

---

Avainsanat: silmänpohjan ikärappeuma, AMD, pigmenttiepiteelisolut, RPE, ARPE-19, lämpösokkiproteiini, Hsp70, interleukiini 8 (IL-8), lipopolysakkaridi (LPS).

Silmänpohjan ikärappeuma on tarkan näkemisen alueen sairaus, joka aiheuttaa näkökenttään puutosalueen ja voi heikentää näöntarkkuutta pysyvästi. Se on teollistuneissa maissa eniten näkövammaisuutta aiheuttava sairaus ja yleisin yli 65-vuotiailla. Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen (RPE, retinal pigment epithelium) altistumisella krooniseen oksidatiiviseen stressille sekä tulehdusreaktion syntymisellä on keskeinen merkitys ikärappeuman kehittymisessä. Häiriöt RPE-solujen toiminnassa johtavat solunsisäisten lipofuskiinikertymien ja solunulkoisten proteiinisakkautumien eli drusenien muodostumiseen ja lopulta kliinisiin oireisiin. Silmänpohjan ikärappeuma jaetaan kuivaan ja kosteaan muotoon, joista lievempään mutta yleisempään kuivaan muotoon ei toistaiseksi ole löydetty tehokasta hoitomuotoa.

Kiinnostus lämpösokkiproteiinien (HSP, heat shock protein) käyttömahdollisuuksista terapeuttisena hoitomuotona on kasvanut, kun haitallisten vaikutusten selittäjäksi on lukuisissa tutkimuksissa löydetty LPS- eli lipopolysakkaridikontaminaatio. Tämän työn tarkoituksena oli tutkia lämpösokkiproteiini Hsp70:n mahdollista suojaavaa vaikutusta pigmenttiepiteelisoluihin *in vitro*. Lämpösokkiproteiinit ovat ryhmä solujen tuottamia proteiineja, jotka korjaavat väärin laskostuneita proteiineja ja estävät näin proteiinisakkautumien muodostumista soluihin. Uusimpien tutkimusten mukaan Hsp70 voi myös hillitä solujen tulehdusreaktiota vaikuttamalla interleukiiniä tuottavaan signaalinvälitysketjuun. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia kokeellisesti Hsp70:n teoreettisia käyttömahdollisuuksia silmänpohjan ikärappeuman terapeuttisena hoitomuotona.

Hsp70:n käyttökelpoisuutta arvioitiin tutkimalla, aiheuttaako Hsp70 viljelyssä pigmenttiepiteelisoluissa tulehdusreaktion. Tulehdusmarkerina pidettiin kemokiini IL-8:aa eli interleukiini 8:aa. Hsp70:n mahdollista sytotoksisuutta tutkittiin arvioimalla Hsp70-altistuksen vaikutusta elinkelpoisten solujen määrään mittaamalla hajoavista soluista vapautuvan laktaattidehydrogenaasin määrää kasvatusliuoksesta eli -mediumista. Solulyysaateista tutkittiin elektroforeesin avulla, päätyivätkö Hsp70-proteiinit altistuksen aikana elävien pigmenttiepiteelisolujen sisään. Lisäksi kehitettiin vetyperoksidin avulla malli, jota voidaan käyttää apuna tutkittaessa hapetusstressin vaikutusta silmänpohjan pigmenttiepiteelisoluihin.

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>4</b>
<b>2 TEOREETTINEN TAUSTA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Silmänpohjan ikärappeuma .....	5
2.1.1 Patogeneesi.....	5
2.1.2 Jako kuivaan ja nesteiseen.....	6
2.1.3 Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut ja niiden rooli.....	7
2.1.4 Hoito .....	8
2.2 Lämpösokkiproteiinit (HSP).....	8
2.2.1 Rooli elimistössä.....	9
2.2.2 Lämpösokkiproteiini Hsp70.....	10
2.2.3 Sytokiinifunktio: HSP vs. kontaminantit.....	11
2.2.4 Reseptorit ja signaalivälitys.....	14
2.3. Sytokiinit ja tulehdus.....	15
2.3.1 Interleukiini 8.....	15
2.3.2 Eritysmekanismi.....	16
2.4 Vetyperoksidin vaikutukset.....	16
<b>3 TUTKIMUSTEHTÄVÄ</b> .....	<b>18</b>
<b>4 AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>19</b>
4.1 ARPE-19-solujen viljely ja altistukset .....	19
4.2 Tulehdusvaste: Interleukiini 8 (ELISA) .....	20
4.3 Sytotoksisuus: laktaattidehydrogenaasi (ELISA).....	21
4.4 Western Blotting -menetelmä .....	21
4.5 Lämpösokkiproteiinien suojavaikutus: MTT .....	23
<b>5 TULOKSET</b> .....	<b>25</b>
5.1 Tulehdusvaste .....	25
5.2 Sytotoksisuus .....	26
5.3 Western Blotting .....	27
5.4 Suojavaikutus .....	28
<b>6 TARKASTELU</b> .....	<b>30</b>
<b>LÄHTEET</b> .....	<b>33</b>

## 1 JOHDANTO

Näkökyky on aisteistamme keskeisimpiä ja sen säilyminen on oleellisesti elämänlaatuun vaikuttava tekijä. Näön heikkeneminen ja erilaiset silmäsairaudet liittyvät yleisesti vanhenemiseen. Vuonna 2010 yli 65-vuotiaita oli maamme väestöstä 17,5 % ja ennusteen mukaan vastaava osuus on vuonna 2060 jo 29 %. Samoin elinajanodote on jatkuvasti noussut: vuodesta 1990 alkaen miesten elinajanodote on muuttunut kymmenessä vuodessa 70,9:stä 76,7:ään ja naisten 78,9:stä 83,2 vuoteen (Tilastokeskus 2009). Selvää on, että vanhuuden tuomat sairaudet, silmänpohjan ikärappeuma (AMD, age-related macular degeneration) mukaan luetuna, yleistyvät edelleen. Aiheen tutkimiselle on näin ollen selvä tarve. Silmänpohjan ikärappeuman kosteaan muotoon on viime vuosina löydetty tehokkaita hoitomuotoja, mutta kuivaan muotoon ei vielä ole olemassa tehokasta hoitoa. Kuivan muodon esto- tai hoitokeinon etsiminen onkin tällä hetkellä tutkimuksessa keskeisessä asemassa.

Lämpösokkiproteiinien vaikutuksia elimistön eri soluihin on tutkittu runsaasti. Silmänpohjan pigmenttiepiteelisolujen osalta tutkimuksissa on saatu lupaavia tuloksia Hsp70-lämpösokkiproteiinin tulehdusreaktiolta suojaavista vaikutuksista. Tässä työssä esitellään tulokset kokeellisista laboratoriotöistä, joilla tutkittiin lämpösokkiproteiini Hsp70:n teoreettista suojavaikutusta silmänpohjan pigmenttiepiteelisoluihin soluviljelmien avulla. Hsp70-altistusten vaikutuksia soluihin arvioitiin mittaamalla muutoksia kasvatusmediumeissa ja solulysaateissa. Apuna merkitysten arvioinnissa ja vertailussa käytettiin LPS- eli lipopolysakkaridialtistettuja soluviljelmiä sekä vetyperoksidin avulla muodostettua mallia, joiden avulla nähtiin tunnetusti haitallisten ja sytotoksisten aineiden vaikutukset soluihin. Käytetyistä menetelmistä keskeisiä ovat ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), Western Blotting ja MTT.

## 2 TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Silmänpohjan ikärappeuma

Silmänpohjan ikärappeuma on teollistuneissa maissa eniten näkövammaisuutta aiheuttava sairaus. AMD on makulan eli tarkan näkemisen alueen sairaus, joka aiheuttaa muutoksia neljässä toisiinsa yhteydessä olevassa silmänpohjan kerroksessa: valoreseptorisoluissa, verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen (RPE, retinal pigment epithelium) kerroksessa, Bruchin kalvossa ja suonikalvon kapillaareissa. Se heikentää sekä lähi- että kaukonäköä ja aiheuttaa näkökentässä värinäköhäiriöitä ja vääristymiä (Kaarniranta ym. 2009). Pitkälle edetessään verkkokalvon ikärappeuma aiheuttaa näkökenttään laajan puutosalueen, joka vaikeuttaa lukemista, kasvojen tunnistamista ja autolla ajamista (Seitsonen ym. 2009).

#### 2.1.1 Patogeneesi

Vaikka ikärappeuman patogeneesi on vielä osin selvittämättä, sen syntyyn vaikuttavia tekijöitä tunnetaan useita. Yksi silmänpohjan ikärappeuman kehittymiseen johtavista tekijöistä on verkkokalvon solujen altistuminen jatkuvalla oksidatiiviselle stressille. Solut altistuvat hapetusstressille normaalitilanteessakin valoaltistuksen, verenvirtauksen ja tehokkaan aineenvaihdunnan vuoksi, ja ikääntymisen aiheuttamat auto-oksidatiiviset lipofuskiinikertymät lisäävät solujen hapetusstressiä entisestään. Solun sisäisten kertymien lisäksi taudin puhkeamiselle altistavat solun ulkoiset haitallisten proteiinien kertymät verkkokalvon soluissa tai niiden ympärillä (Kaarniranta 2009).

Myös geeniperimällä on vaikutusta verkkokalvon ikärappeuman puhkeamiseen (Kaarniranta ym. 2009). Koska ikärappeuma on tyypillisesti yli 60-vuotiaiden sairaus (Nowak 2006), ikääntymistä voidaan pitää yhtenä merkittävänä sairauden puhkeamisen riskitekijänä. Tupakoinnilla on todettu olevan ikärappeumaan sairastumisen riskiä suurentava vaikutus (Jager ym. 2008). Elintavoista myös vähäinen liikunta ja sen myötä ylipaino lisäävät sairastumisen riskiä, sen sijaan kalan ja vihannesten käyttö ruokavaliossa pienentävät sitä (Ambati ym. 2003).

Normaalin ikääntymisen myötä verkkokalvon ulko-osissa, pigmenttiepiteelisoluisissa, Bruchin kalvossa ja suonikalvon kapillaareissa tapahtuu monia muutoksia. Valoreseptorisolujen herkkyys pienenee ja jakautuminen hidastuu. Pigmenttiepiteelisolujen melaniiniyväset vähenevät ja solujen lysosomeihin muodostuu lipofuskiiinia ja solun aineenvaihdunnassa syntyvistä jäännöskappaleista (residual bodies) kasautuvia kertymiä. Pigmenttiepiteelin ja Bruchin kalvon väliin kertyy rasvapitoista rakeista materiaalia, ja suonikalvojen kapillaareihin ilmaantuu rappeumamuutoksia. Muutokset liittyvät normaaliin ikääntymiseen eivätkä yksin riitä ikärappeumadiagnoosiin, mutta voivat johtaa siihen (Liesegang ym. 2004).

### 2.1.2 Jako kuivaan ja nesteiseen muotoon

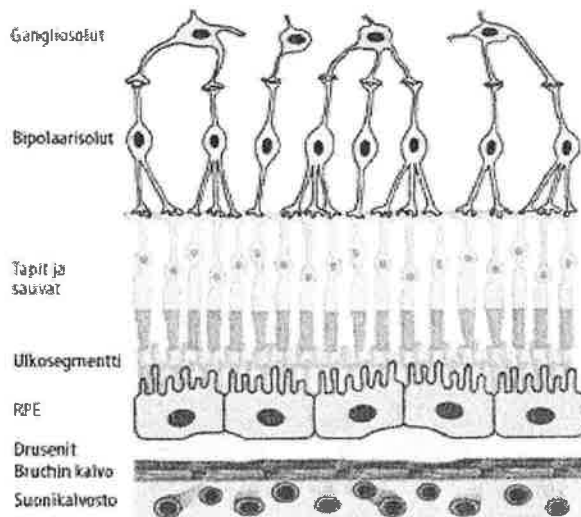
Verkkokalvon ikärappeuma jaetaan kahteen tyyppiin: kuivaan ja nesteiseen. Kuivassa muodossa verkkokalvon uudisverisuonien muodostusta ei tapahdu (Kaarniranta 2009). Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen alle kertyy proteiinipitoisia druseneita, jotka luokitellaan koviksi, pehmeiksi tai konfluoiviksi (Kaarniranta ym. 2003) sekä jaotellaan kokonsa mukaan pieniin ( $\varnothing < 64 \mu\text{m}$ ), keskikokoisiin ( $\varnothing 64\text{--}124 \mu\text{m}$ ) ja suuriin ( $\varnothing \geq 125 \mu\text{m}$ ). Drusenit ovat pieniä, pyöreitä, proteiini- ja lipidipitoisia kellertäviä rakeita, joita muodostuu makulaan ja sen ympäristöön. Muita kuivan ikärappeuman merkkejä ovat pigmenttiepiteelisolukerroksen muutokset: surkastumat ja makulan alueen pigmentin epätasaisuudet. Potilaat ovat usein oireettomia tai kärsivät vähäisestä näön heikkenemisestä tai muutoksista näkökentässä (Liesegang ym. 2004). Yli 80 % ikärappeumapotilaista sairastaa kuivaa muotoa, joka tosin voi edetä nesteiseen muotoon ja aiheuttaa merkittävää näön heikkene mistä (Nowak 2006).

Kosteassa eli nesteisessä muodossa suonikalvosta kasvaa uusia verisuonia verkkokalvoon, mikä johtaa verkkokalvon turpoamiseen ja hoitamattomana heikentää näköä ja näöntarkkuutta pysyvästi (Kaarniranta ym. 2003). Druseneiden ja muiden kuivallekin ikärappeumalle tyypillisten muutosten aiheuttama ärsytys Bruchin kalvossa lisää kalvon vioittumisriskiä. Suonikalvon kapillaareista pääsee työntymään kudosta vioittuneeseen Bruchin kalvoon. Tällöin kalvoon muodostuu uudisverisuonia, jotka aiheuttavat tuhoa Bruchin kalvossa ja pigmenttiepiteelisolujen kerrok-

sessä. Uudisverisuonten aiheuttama turvotus voi lopulta vahingoittaa valoainstinsolukerroksen normaalia rakennetta verkkokalvossa (Liesegang ym. 2004).

### 2.1.3 Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut ja niiden rooli

Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut sijaitsevat silmänpohjassa Bruchin kalvon ja valoainstinsolujen välissä (kuvio 1). RPE-solut ovat matalia, kuutiomaisia soluja, joiden halkaisija on noin 16 µm. Makulan alueella solut ovat korkeampia ja tiheämmässä kuin muualla silmänpohjassa. Pigmenttiepiteelisolut absorboivat valoa ja niissä onkin tyypillisesti runsaasti melaniinijyväsiä. Pigmenttiepiteelisolukeroksessa soluja on vain yhtenä kerroksena, ja vierekkäiset solut ovat liittyneet toisiinsa juktionaalisilla komplekseilla, jotka ovat tiiviin liitoksen, vyöliitoksen ja desmosomin muodostamia solujen välisiä liitoksia. Pigmenttiepiteelisolujen kerros toimiikin valikoivana esteenä verenkierron ja silmän sisempien osien välillä (Liesegang ym 2004). Terveessä silmässä RPE-solut huolehtivat valoainstinsolujen ylläpidosta välittämällä niille Bruchin kalvon alaisesta suonikalvosta happea, ravinteita, kasvutekijöitä ja A-vitamiinia (Kaarniranta 2009). Lisäksi RPE-solujen tärkeä tehtävä on fagosytoida valoainstinsolujen metaboliassa syntyvää ulkosegmenttiä ja tuhota sitä lysosomaalisesti (Liesegang ym. 2004).



KUVIO 1. Silmänpohjan solukerrokset (Kaarniranta ym. 2009).

Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen häiriö ilmaantuu sairauden alkuvaiheessa ja on keskeinen verkkokalvon ikärappeuman kehittymisessä (Nowak 2006, Kaarniranta ym. 2009). Ikärappeumassa RPE-solujen hajottavat ominaisuudet heikkenevät, jolloin niiden lysosomeihin kertyy hapettavaa lipofuskiinia eli ns. ikäpigmenttiä. Lipofuskiini aiheuttaa happiradikaalien määrän lisääntymisen solussa ja vaurioittaa edelleen mitokondrioita ja lysosomeja. Lisäksi RPE-solujen basolateraalipuolelle kertyy vielä tuntemattomalla mekanismilla proteiinisakkautumia eli druseneita, jolloin syntyy krooninen tulehdusreaktio, mikä johtaa nesteisen ikärappeuman syntyyn. RPE-solujen toiminnan häiriintyminen aiheuttaa täten välillisesti valoaistinso-lujen tuhoutumisen ja näön heikentymisen tai menetyksen (Kaarniranta ym. 2009).

#### 2.1.4 Hoito

Nesteistä verkkokalvon ikärappeumaa hoidetaan laser- ja lääkehoidoilla. Fotodynaamista terapiaa (PDT) käytetään makulan alueen uudisverisuonten tuhoamiseen. Uudempiä tehokkaita hoitomuotoja ovat lasiaiseen ruiskutettavat verisuonten endoteelin kasvutekijän (VEGF, vascular endothelial growth factor) estäjät pegaptanibi, bevasitsumabi ja ranibitsumabi (Mannermaa ym. 2007), jotka ovatkin suurelta osin syrjäyttäneet laserhoidon. Verkkokalvon ikärappeuman kuivaan tautityyppiin ei toistaiseksi ole löydetty tehokasta hoitomuotoa.

#### 2.2 Lämpösokkiproteiinit (HSP)

Lämpösokkiproteiinien (HSP, Heat Shock Protein) luokittelu perustuu niiden toimintaan ja kokoon. Proteiiniperheen nimi kirjoitetaan suuraakkosin (esim. HSP70) ja kyseisen proteiiniperheen jäsenet vain isolla alkukirjaimella (esim. Hsp70). HSP60, 70 ja 90 –proteiiniperheet ovat suurimmat autoimmuunitauteihin, antigeenien esittelyyn ja synnynnäiseen immunitettiin yhdistetyt lämpösokkiproteiiniperheet (Min-Fu ja Baochong 2004). Lämpösokkiproteiinin lyhenteessä oleva numero kertoo proteiinin molekyylipainon kilodaltonneina.



### 2.2.1 Rooli elimistössä

Lämpösokkiproteiinien pääasiallinen tehtävä on tunnistaa ja sitoa solun kesken-eräisiä ja jo osittain laskostuneita polypeptidiketjuja (Fink 1999) eli toimia solun sisäisenä kaperonina. Ne myös korjaavat väärin laskostuneita ja vahingoittuneita proteiineja sekä estävät proteiinien aggregaatiota. Lämpösokkiproteiinit ilmentyvät kaikissa organismeissa, ja niillä on tärkeä rooli proteiinien oikean toiminnan ylläpitämisessä (Walter ja Buchner 2002). Lämpösokkiproteiinien määrä laskee ikääntymisen myötä (Rea ym. 2001).

Lämpösokkiproteiinien määrä lisääntyy paitsi lämmön kohotessa, myös monissa patologisten, fysiologisten tai ympäristön muutosten aiheuttamissa stressitilanteissa. Lämpösokkiproteiinien määrää lisäävät esimerkiksi UV-säteily, raskasmetallit, tulehdukset, kasvutekijät ja solumuutokset (Jaattela 1999). Muita lämpösokkiproteiinien määrää lisääviä tekijöitä ovat korkea verenpaine (Pockley ym. 2000), ateroskleroosi eli valtimoiden kovettumatauti (Xu 2002) ja avoimen sydänleikkauksen jälkeinen tila (Dybdahl ym. 2002). Lämpösokkiproteiinien tehtävä on siis suojella solua ulkoista kuormitusta vastaan erilaisissa stressitilanteissa. Ilmiötä, jossa lämpösokkiproteiinien määrä kohoaa edellä mainittujen muutosten seurauksena, sanotaan stressivasteeksi (Jaattela 1999).

Jos lämpösokkiproteiinien kaperonitoiminta epäonnistuu, vialliset proteiinit merkitään ubiquitiinilla ja kuljetetaan proteasomiin hajotettaviksi (Pickart 2001). Ubiquitiini on 76 aminohapon kokoinen pieni proteiini, johon liittyy ligaasientsyymi. Ligaasit tunnistavat proteiineista hapettuneita aminohappoja, osittain denaturoituneiden proteiinien epänormaaleja hydrofobisia alueita sekä sellaisia normaalisti proteiinin sisälle kuuluvia kohtia, jotka jäävät väärin laskostuneessa proteiinissa pintaan (Meisenberg ja Simmons 2006). Iän myötä hapettuneet ja ubiquitiinilla merkityt proteiinit muodostavat kuitenkin kertymiä RPE-soluihin, minkä uskotaan johtuvan proteasomaalisen aktiivisuuden heikkenemisestä (Carrard ym. 2002). Kertymät kuljetetaan mikrotubulusverkostoa pitkin dyneiinin avulla lähelle tumaa, missä ne muodostavat aggresomeja. Aggresomien muodostaminen on solun keino suojautua väärin laskostuneilta proteiineilta. Syntyneet aggresomit solu pyrkii hajottamaan autofagisesti (Taylor ym. 2003).

Lämpösokkiproteiineja pidetään yleisesti solunsisäisinä proteiineina. Nekroottisessa solukuolemassa lämpösokkiproteiinit kuitenkin vapautuvat solunulkoiseen tilaan, mitä ei apoptoottisessa solukuolemassa tapahdu (Basu ym. 2000). Lämpösokkiproteiineja voi vapautua solunulkoiseen tilaan myös lukuisissa stressireaktioissa (Hightower ja Guidon 1989, Liao ym. 2000, Barreto ym. 2003). Lämpösokkiproteiinien vapautumisen mekanismi ja sen merkitys muuten kuin nekroottisen solukuoleman yhteydessä ei ole selvillä.

### 2.2.2 Lämpösokkiproteiini Hsp70

HSP70-proteiiniperhe sisältää tärkeitä soluliman lämpösokkiproteiineja. Näitä ovat konstitutiivinen sytosolin Hsc70 (tai Hsp73), solulimakalvoston Bip (tai Grp78), mitokondrionaalinen mt-Hsp70 sekä tässäkin tutkimuksessa käytetty stressivaikutteinen sytosolin Hsp70 (tai Hsp72) (Lindquist ja Craig 1988, Fink 1999, Hartl ja Hayer-Hartl 2002). Hsp70-proteiinin molekyylipaino on todellisuudessa noin 72 kDa, ja se nimetään siksi toisinaan Hsp70/Hsp72:ksi, mutta selkeyden vuoksi proteiinista käytetään tässä työssä lyhennettä Hsp70.

Eri silmän rakenteet ovat riippuvaisia eri lämpösokkiproteiineista (Dean ja Tytell 2001), ja Hsp70 ilmentyy normaalisti myös terveessä retinassa (Mainster ja Reichel 2000). Rakenteellisesti Hsp70 jaetaan kahteen toiminnalliseen osaan. Proteiinin aminoterminaali sitoo adenosiinitri- (ATP) ja adenosiidifosfaatin (ADP) ja hydrolysoi entsyymaattisesti ATP:ta. Karboksyylihappoterminaali taas sitoo polypeptidin (Fink 1999, Hartl ja Hayer-Hartl 2002). Tähän peptidejä sitovaan päähän sitoutuvat substraattiproteiinien hydrofobiset tähteet, ja proteiinien lisäksi siihen voi sitoutua myös muita hydrofobisen tähteen sisältäviä molekyyliä, kuten lipopolysakkaridia (TLR4:n ligandi) ja lipoproteiinia (TLR2:n ligandi) (Hedman ym. 2011).

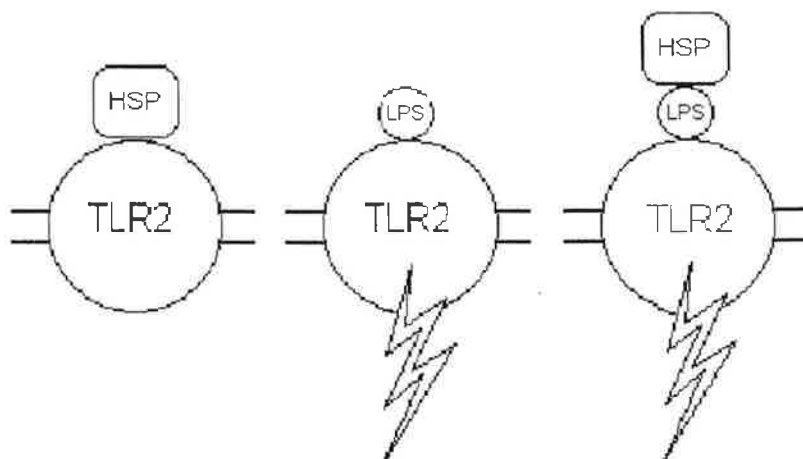
Proteasomien esto suurentaa lämpösokkiproteiinin pitoisuutta. Ryhänen ym. (2008 ja 2009) osoittivat, että proteasomien esto johti proteiinikertymien syntyyn RPE-solujen tuman ympärille ja jos proteasomien eston lisäksi Hsp70:n ilmentymistä estettiin ARPE-19-soluissa, solujen kuolemat lisääntyivät merkittävästi. Tutkimus

osoitti, että lämpösokkiproteiinien merkitys proteiinikertymien muodostumisessa verkkokalvon soluihin on suuri.

### 2.2.3 Sytokiinifunktio: HSP vs. kontaminantit

Lämpösokkiproteiineista mm. Hsp70:ää on pidetty potentiaalisena synnynnäisen immuunijärjestelmän aktivoijana, ja sen on havaittu nostavan tulehdusta ennalta-koivien sytokiinien tuotantoa (Zugol ja Kaufmann 1991, Wallin ym. 2002). Tsan ja Gao (2004 b) havaitsivat, että bakteereista tai nisäkkäistä peräisin olevat Hsp60-, Hsp70-, Hsp90- ja gp96-valmisteet tai rekombinantit aktivoivat elimistön synnynnäistä immuunijärjestelmää ja lisäävät tulehdusta edistävien sytokiinien, kuten IL-1:n, IL-6:n ja IL-12:n, tuotantoa immuunijärjestelmän soluissa, kuten monosyyteissä, makrofageissa ja dendriittisoluissa.

Sytokiinivaikutusten syynä ei välttämättä ole kuitenkaan itse lämpösokkiproteiini, vaan bakteeriperäiset kontaminantit HSP-valmisteissa (Majde 1993, Wallin ym. 2002, Tsan ja Gao 2004 a). Koska valtaosa rekombinantti-HSP-valmisteista on tuotettu *Escherichia coli* -bakteereissa, on mahdollista, että saadussa tuotteessa on bakteeriperäisiä jäämiä, kuten lipopolysakkaridia (LPS) ja lipoproteiineja (Majde 1993). Kuten aikaisemmin mainittiin, LPS on TLR4:n ligandi ja lipoproteiini TLR2:n ligandi, ja ne kumpikin voivat sitoutua Hsp70:n karboksyylihappopäähän. Niinpä rekombinantti-HSP-tuotteet voivat olla kontaminoituneita muiden muassa näillä hydrofobisen tähteen sisältävillä molekyyleillä, mikä osaltaan selittää havaittuja Hsp70:n sytokiinivaikutuksia *in vitro*. HSP-altistuksissa sytokiinituotannon aiheuttajana on pidetty lämpösokkiproteiinia, vaikka se on todellisuudessa voinut olla esimerkiksi siihen sitoutuneen LPS:n välityksellä reseptoriin kiinnittynyt, tilanteessa inaktiivinen molekyyli (kuvio 2).



KUVIO 2. Havainnekuva bakteerikontaminantin aiheuttamasta TLR2-reseptorin aktivoitumisesta.

Mainitut Toll-reseptorit kykenevät myös erottamaan lämpösokkiproteiinin lipopolysakkaridista tai lipoproteiinista (Takeuchi ym. 1999, Tapping ym. 2000, Zahringer ym. 2008) ja on epätodennäköistä, että ne erehtyisivät siinä. Lisäksi Hsp70 toimii antigeenisten peptidien kaperonina ja laskostettuaan peptidin esittelee sen MHC-1-molekyyleille, mikä selittää osan sytokiinivaikutuksista (Tsan ja Gao 2009).

Lämpösokkiproteiineista Hsp70:n lisäksi TLR2:ta ja TLR4:ta signaalivälityksessä käyttävät ainakin Hsp60 ja gp96 (Vabulas ym. 2002 a, b, Bulut ym. 2002).

Teoriaa kontaminanttien aiheuttamasta vasteesta tukee myös se, että eri lämpösokkiproteiinien sytokiinivaikutukset ovat hyvin samanlaisia riippumatta erilaisista molekyylimassoista. Lisäksi havaitut lämpösokkiproteiinien aiheuttamina pidetyt vaikutukset ovat samankaltaisia kuin lipopolysakkaridin ja bakteerien lipoproteiinin aiheuttamat vaikutukset (Majde 1993).

Tsan ja Gao (2004 b) havaitsivat, että puhdistetut bakteeriperäiset tai rekombinantti-Hsp60- ja -Hsp70-valmisteet saavat aikaan tulehdusta edistävien sytokiinien tuotannon alle 1 µg/ml-konsentraatiossa, kun taas hiiren maksasta eristetty Hsp70, Hsp90 ja gp96 saavat samat vaikutukset vasta paljon korkeammilla konsentraatioilla (10–100 µg/ml). Ilmiötä pidettiin selittämättömänä, mutta nykyisten tutkimusten valossa tämäkin voisi tukea teoriaa, jonka mukaan sytokiinivaikutusten aiheut-

tajia ovat bakteerien soluseinämän rakennekomponentit lämpösokkiproteiinien sijaan.

Valtaosan vuoden 2002 jälkeen raportoiduista HSP:n sytokiinivaikutuksista on todettu johtuvan lämpösokkiproteiineihin sitoutuneista molekyyleistä tai kontaminanteista eikä HSP:sta itsestään (Tsan ja Gao 2009). Wallin ym. (2002) havaitsivat, että hyvin puhdistetulla hiiren maksasta eristetyllä HSP:lla ei ollut sytokiinituotantoa lisäävää vaikutusta edes korkeilla (200–300 µg/ml) konsentraatioilla. Sen sijaan LPS-kontaminoitu Hsp70-valmiste aiheutti sytokiinituotannon jo konsentraatiolla 0,05–0,1 µg/ml. Samalla lämmön todettiin lisäävän LPS-kontaminoidun Hsp70:n sytokiinivaikutusta. Gao ja Tsan (2003a, b) havaitsivat, että lämpö lisää myös LPS:n aiheuttamaa sytokiinituotantoa. Tämänkin pohjalta lipopolysakkaridia voidaan siis pitää mahdollisena sytokiinituotannon aiheuttajana myös LPS-kontaminoiduissa lämpösokkiproteiineissa.

Makrofageissa syyllisiksi Hsp60- ja Hsp70-altistusten aiheuttamaan sytokiinituotannon kasvuun ovat osoittautuneet LPS ja siihen liittyvät molekyylit (Gao ja Tsan 2003a,b). Gao ja Tsan (2004) osoittivat edelleen, että kontaminoitumattomat Hsp60 ja Hsp70 eivät aiheuta kasvua 96 yleisen sytokiinigeenin ilmenemisessä makrofageissa. Lymfosyyteissä Hsp60:lla ei ole vaikutusta 113 sytokiinigeenin ilmenemiseen (Wang ym. 2005). Bausinger ym. (2002) havaitsivat, että LPS-kontaminanteista puhdistettu rhHsp70 ei aktivoi dendriittisoluja. Habich ym. (2005) osoittivat, että Hsp60 sitoo tiukasti lipopolysakkaridia ja havaittujen sytokiinivaikutusten aiheuttaja ei ole itse Hsp60, vaan muodostunut Hsp60-LPS-kompleksi. Lisäksi Hsp60:een sitoutuneella LPS:lla havaittiin olevan voimakkaampi sytokiinivaikutus kuin LPS:lla yksin. Vastaavaan tulokseen päätyivät myös Osterloh ym. (2007). Useat muut tutkimukset ovat vahvistaneet, että hyvin puhdistetut lämpösokkiproteiinit eivät lisää tulehdusta edistävien sytokiinien tuotantoa, vaan kyseisten vaikutusten aiheuttajat ovat lämpösokkiproteiinien kontaminantteja tai niihin sitoutuneita muita molekyylejä (Habich ym. 2005, Bendz ym. 2007, Ye ja Gan 2007, Osterloh ym. 2007). Hyvin puhdistetut Hsp60-, Hsp70- ja gp96-proteiinit, joiden rakenteissa ei ole LPS-kontaminantteja, toimivat normaalin biologisen tehtävänsä mukaan esim. kaperoneina ja ATPaaseina (Bausinger ym. 2002, Reed ym. 2003, Gao ja Tsan 2003a, b).

## 2.2.4 Reseptorit ja signaalivälitys

Solut käyttävät sekä lämpösokkiproteiinien että lipopolysakkaridin tunnistamiseen Toll-reseptoreja (TLR, Toll-like receptor). Ne ovat solukalvoproteiineja, jotka tunnistavat elimistölle vieraita rakenteita. Ihmisellä tiedetään olevan kymmenen erilaista Toll-reseptorityyppiä. Ne auttavat elimistöä puolustautumaan ulkoista vaaraa vastaan tunnistamalla erilaisia mikrobeja, niiden rakenneosia tai geneettistä materiaalia sekä aktivoimalla soluja (Hedman ym. 2011).

Toll-reseptori TLR4 tunnistaa gramnegatiivisia bakteereita ja niiden soluseinämien komponentteja, kuten lipopolysakkaridia (Hedman ym. 2011). TLR4 on ensisijainen lipopolysakkarideja tunnistava reseptori. Se löydettiin ensin gramnegatiivisesta bakteerista ja on ensimmäinen ihmisestä tunnistettu Toll-reseptori (Medzhitov ym. 1997). TLR4 edellyttää useiden avustavien proteiinien läsnäoloa, jotta signaalikaskadi käynnistyy. Tärkein avustava proteiini on MD-2, joka sitoutuu TLR4:n ekstrasellulaariseen osaan ja on välttämätön lipopolysakkaridin tunnistuksessa (Shimazu ym. 1999). Toinen tärkeä avustava proteiini on CD14, joita on löydetty esimerkiksi makrofagien ja monosyyttien pinnalta ja solunulkoisesta tilasta (Bazil ym. 1986). Lipopolysakkaridiin sitoutunut CD14 helpottaa LPS:n sitoutumista TLR4/MD-2-kompleksiin ja mahdollistaa sen, että TLR4 reagoi jo hyvin pieniin (< 1 ng/ml) LPS-määriin (Frey ym. 1992). TLR4 aktivoi soluja voimakkaasti ja aiheuttaa proinflammatoristen sytokiinien, kuten IL-6:n tuotannon. Signaalinvälitykseen osallistuu useita eri molekyyliä, ja lopulta solun sytokiinituotantoa ja tulehdusvastetta säätelevät geenit aktivoituvat (Hedman ym. 2011).

TLR2:n ligandeja ovat pääasiassa gram-positiivisten bakteerien peptidoglykaanit, lipopeptidit eli lipoproteiinit, teikkohappo, monet hiivat ja sienet sekä niiden pintarakenteet. Ligandin sitonut TLR2 aktivoi soluja käynnistämällä solun sisäisiä signaalintireittejä ja vaikuttamalla lopulta tulehdusvastetta säätelevien geenien säätelytekijöihin (Hedman ym. 2011). Myös TLR2 tarvitsee avustavia proteiineja aktivoituaan. MD-2 tehostaa TLR-2-välitteisiä vasteita mm. gram-negatiivisille ja gram-positiivisille bakteereille sekä proteiineja sisältäville lipopolysakkarideille (Dziarski ja Gupta 2000).

LPS:n sitoneiden Toll-reseptorien aktivoitumisen käynnistämä signaalivälityskaskadi on myös solun IL-8-tuotannon aikaan saava mekanismi ja esitellään tarkemmin luvussa 2.3.2.

### 2.3. Sytokiinit ja tulehdus

Sytokiini on yleisnimitys elimistön solujen välittäjäaineille, joita solut erittävät virusten tai muiden mikrobien aiheuttaman infektion tai stimulaation vaikutuksesta. Sytokiineja tunnetaan lähes 200, ja ne ovat tärkeitä elimistön homeostaasin säätelijöitä. Ne ohjaavat luontaisen immunitetin (innate immunity) toimintaa ja osallistuvat opitun mikrobispesifisen immunitetin (adaptive immunity) kehittymiseen. Ne säätelevät erityisesti valkosolujen kasvua ja erilaistumista sekä stimuloivat tai vaimentavat tulehdusreaktioita (Hedman ym. 2011). Sytokiinit luokitellaan kemokiineihin, pro- ja anti-inflammatorisiin sytokiineihin, interferoneihin, Th1- ja Th2-sytokiineihin sekä kasvutekijöihin (Huovinen ym. 2003).

Tulehduksella eli inflammaatiolla tarkoitetaan ulkoisten tai sisäisten ärsykkeiden aiheuttamaa ärsyntyemisreaktiota. Tulehdusreaktion tarkoituksena on käynnistää paraneminen tuhoamalla vieraita tai omia haitallisiksi käyneitä rakenteita sekä viestittämällä uhkasta ja käynnistyneistä reaktioista muille kehon osille (Hedman ym. 2011).

#### 2.3.1 Interleukiini 8

Sytokiinien osalta tässä työssä tutkittiin interleukiini-8:n (IL-8) erittymistä pigmenttiepiteelisoluista. IL-8:n synonyymi on CXCL8, CXC-kemokiiniligandi. IL-8 kuuluu kemokiineihin, jotka ovat soluja houkuttelevia eli kemotaktisia sytokiineja. Kemokiinit houkuttelevat selektiivisesti erilaisia valkosolutyyppejä tulehdusreaktion aikana perifeerisiin kudoksiin. Selektiivisyys perustuu valkosolujen pinnalla oleviin spesifisiin kemokiinireseptoreihin. IL-8 houkuttelee tulehduspaikalle neutrofiileja granulosyyttejä. Neutrofiilin pinnan reseptorit CXCR1 ja CXCR2 sitovat vahvana kemokiinina tunnettua IL-8:aa, jolloin neutrofiili pääsee nopean morfologisen muuntumisen jälkeen tunkeutumaan verisuonen endoteelin läpi kudokseen (Hedman ym. 2011). Wang ym. (2000) altistivat tutkimuksessaan monosyyttejä kolmel-

le eri bakteerituotteelle ja havaitsivat, että sytokiineista juuri kemokiinit (IL-8 ja MIP-1 $\alpha$ ) erittyvät voimakkaimmin.

### 2.3.2 Eritysmekanismi

Interleukiini 8:n tuotantoon johtava tapahtumaketju käynnistyy, kun solun pinnalla oleva reseptori tunnistaa sille ominaisen molekyylin. Jos molekyyli on lipopolysakkaridi, sen tunnistaa TLR4 tai TLR2 (Dziarski ja Gupta 2000). MD-2 ja CD14 toimivat avustavina proteiineina tunnistuksessa ja LPS:n sitomisessa reseptoriin, eikä signaalivälitysketju käynnisty ilman niiden olemassaoloa (Hedman ym. 2011). Reseptorin ekstrasellulaariseen osaan sitoutuva MD-2-proteiini avustaa sekä TLR2:ta että TLR4:ta, mutta MD-2:n yhteys TLR2:een on heikompi (Dziarski ja Gupta 2000). Kumman tahansa reseptorin aktivoituminen johtaa sytokiinituotantoon riippuen ligandista ja signaalinvälitysreitistä.

MD-2:n ja DC14:n avustuksella ligandin sitoneen TLR2:n kolme ensimmäistä signaalinvälitysketjun proteiinia ovat MyD88 (myeloid differentiation protein 88), IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) ja TRAF (TNF receptor-associated kinase). Tätä seuraa kahden kinaasin (NF- $\kappa$ B inducing kinase eli NIK ja I $\kappa$ B kinase eli IKK) aktivoituminen ja edelleen I $\kappa$ B:n,  $\kappa$ B-inhibiittorin fosforyloituminen. Tämä johtaa NF- $\kappa$ B:n vapautumiseen (Dziarski ja Gupta 2000, Wang ym. 2001).

NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) on proteiini-kompleksi, joka säätelee DNA:n transkriptiota ja kontrolloi sitä kautta proinflammatoristen sytokiinien ja kemokiinien synteesiä solussa (Kawai ja Akira 2007). Vapautunut NF- $\kappa$ B kulkeutuu tumaan ja sitoutuu DNA:han, jolloin interleukiini 8:n synteesi solussa alkaa (Dziarski ja Gupta 2000, Wang ym. 2001).

### 2.4 Vetyperoksidin vaikutukset

Solujen happea käsittelevissä reaktioissa, esimerkiksi mitokondrioiden elektroninsiirtoketjuissa, syntyy sivutuotteina hapen myrkyllisiä johdannaisia. Näitä ovat esimerkiksi hydroksyyliiradikaalit (OH $\cdot$ ) ja superoksidit (O $_2^-$ ), jotka aiheuttavat soluvau-



rioita. Happiradikaaleista muodostuu superoksididismutaasin katalysoimissa reaktioissa vetyperoksidia  $\text{H}_2\text{O}_2$ , joka hajoaa edelleen katalaasientsyymin avulla vedeksi ja hapeksi ( $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Hapen radikaalit ja vetyperoksidi aiheuttavat soluissa oksidatiivista stressiä, joka johtaa lipidien peroksidaatioon ja vaurioihin solukalvossa. Solukalvon tuhoutuminen johtaa useimmiten solun kuolemaan (Niesink ym. 1996). Tässä työssä vetyperoksidin solutuhoa aiheuttavaa vaikutusta käytettiin apuna selvittäessä lämpösokkiproteiinien mahdollisia suojavaikutuksia silmänpohjan pigmenttiepiteelisoluihin *in vitro*.

### 3 TUTKIMUSTEHTÄVÄ

Lipofuskiinin ja druseneiden syntymisen estoon etsitään ratkaisua, koska siitä uskotaan olevan apua ikärappeuman etenemisen estämisessä (Kaarniranta ym. 2009). Tässä työssä tutkittiin, kuinka pigmenttiepiteelisolut reagoivat lämpösokki-proteiinialtistukselle (Hsp70) *in vitro* ja pohjustettiin tutkimusta lämpöshokkiproteiinien käyttömahdollisuuksista ikärappeuman ehkäisevänä hoitomuotona.

Oletuksena pidettiin, että lämpösokkiproteiinit päätyvät altistuksissa ARPE-19-solujen sisään. Iän myötä proteosomaalinen aktiivisuus ja lämpösokkiproteiinien määrä laskevat. Molemmat muutokset lisäävät lipofuskiinin kertymistä soluun ja edelleen druseneiden muodostumista. Koska Hsp70 toimii elimistössä ja silmänpohjassa proteiineja laskostavana kaperonina, teoriassa pigmenttiepiteelisoluihin lisätty Hsp70 vähentäisi kaperonitoiminnallaan jätteen kertymistä soluihin.

Paimela ym. (2011) osoittivat tutkimuksessaan, että Hsp70 on tärkeä NF- $\kappa$ B:n säätelijä retinan pigmenttiepiteelisoluissa. Tutkimuksessa havainnoitiin Hsp70:n vaikutusta IL-6-synteesiin, mutta sama kohdemolekyyli (NF- $\kappa$ B) toimii tärkeänä säätelijänä myös IL-8-synteesiin johtavassa signaalivälityksessä. Tämä on teoriassa toinen pigmenttiepiteelisoluille hyödyllinen Hsp70:n ominaisuus. Jos pigmenttiepiteelisoluihin lisätty Hsp70 jarruttaisi IL-8:n ja muiden sytokiinien synteesiä, se hillitsisi näin oksidatiivisen stressin aiheuttamaa tulehdusreaktiota silmänpohjassa.

Tämän tutkimuksen ensimmäisenä tehtävänä oli tutkia, aiheuttaako Hsp70-altistus tulehdusvasteen ARPE-19-soluissa. Tulehdusmarkkerina pidettiin IL-8-kemokiinia. Seuraava tehtävä oli selvittää, säilyvätkö solut ehjinä Hsp70-altistuksen jälkeen vai aiheuttaako altistus solujen kuoleminen. Tätä tutkittiin mittaamalla kasvatusmediumin laktaattidehydrogenaasi- eli LDH-pitoisuus. Kolmas tavoite oli tutkia, päätyvätkö kasvatusmediumiin lisätyt lämpösokkiproteiinit ARPE-19-soluihin. Lisäksi muodostettiin vetyperoksidilla oksidatiivisen stressin malli, jonka avulla tutkittiin lämpösokkiproteiinien mahdollisia suojavaikutuksia ARPE-19-soluihin.

## 4 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 4.1 ARPE-19-solujen viljely ja altistukset

ARPE-19 (American retinal pigment epithelium type 19) on spontaanisti kasvava ihmisen retinan pigmenttiepiteelisolulinja. Soluja kasvatettiin 6-kuoppalevyillä DMEM/F-12 1:1-seoksessa, jossa oli 2 mM L-glutamiinia, 10 % FBS:a ja 100 IU/ml penisilliiniä/streptomysiiniä. Maljoja inkuboitiin +37 °C:ssa. Käytettyjen valmisteiden tunnistetiedot ovat taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Soluviljelyssä ja altistuksissa käytettyjen valmisteiden tunnistetiedot.

Valmiste	Tunnistetiedot
DMEM/F-12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12)	cat. no. 21331-046, Gibco, UK
L-glutamiini	cat. no. BE17-605E, Lonza, USA
FBS (fetal bovine serum)	cat. no. CH30160, Hyclone, USA
penisilliini/streptomysiini	cat. no. DE17-602E, Lonza, USA
LPS (lipopolysakkaridi)	cat. no. L-6529, Sigma–Aldrich, USA
Hsp70/Hsp72 rekombinanttiproteiini	adi-nsp-555-f, ENZO Life Sciences

Kun solut olivat konfluentteja, ne altistettiin Hsp70-proteiinille (taulukot 1 ja 2) konsentraatioilla 1 µg/ml ja 5 µg/ml ja LPS:lle (taulukko 1) konsentraatiolla 10 µg/ml. LPS eli lipopolysakkaridi on bakteerien soluseinämän komponentti, jonka tiedetään käynnistävän solujen immuunipuolustuksen. LPS-altistusten avulla voidaan siis arvioida muiden altistusten vaikutusta soluihin vertaamalla näihin varman, voimakkaan immuunivasteen aiheuttavien altistusten tuloksiin.

Kukin altistus tehtiin kolmena rinnakkaisena. Mediumnäytteet otettiin 24 tunnin ja 48 tunnin altistusten jälkeen. Kontrollinäytteet otettiin altistamattomien solumaljojen mediumista samoissa aikapisteissä. Mediumnäytteet ja solulysaatti säilytettiin eppendorf-putkissa -80 °C:ssa.

TAULUKKO 2. Työssä käytetyn lämpösokkiproteiinin ominaisuudet (ENZO Life Sciences).

Proteiini	Hsp70/Hsp72 human recombinant
Molekyylipaino	n.72 kDa
Puhdistus	Puhdistettu kromatografisesti
Puhtaus	≥95 % (SDS-PAGE; Western blot)
Lähde	Tuotettu <i>E.colissa</i>
Olomuoto	Neste (Dulbeccon PBS)
Säilytys	-80 °C

#### 4.2 Tulehdusvaste: Interleukiini 8 (ELISA)

Altistusten mahdollisesti aiheuttamat tulehdusvasteet tutkittiin näytteistä ELISA-menetelmällä (enzyme linked immunosorbent assay). Tässä työssä tulehdusmarkerina käytettiin interleukiini-8:aa ja lämpösokkiproteiineille altistettujen solujen mediumnäytteistä tutkittiin IL-8-pitoisuudet. Menetelmässä 96-kuoppalevyn kuopat päällystetään ensin liuksella, jonka sisältämä anti-human IL-8 sitoutuu kuoppalevyn muovin pintaan ja toimii kaappaavana vasta-aineena IL-8:lle. Päällystämisen jälkeen mahdolliset jäljelle jääneet tyhjät alueet blokataan Assay Diluent -liuksella. Kun näytteet lisätään kuoppiin, näytteissä mahdollisesti olevat IL-8-partikkelit sitoutuvat muovin pinnan vasta-aineisiin. Samoin levyille pipetoidaan standardit, joiden IL-8-pitoisuudet tunnetaan. Kun kuoppiin lisätään "working detector" -liuos, liuksessa oleva ilmaiseva vasta-aine (detection antibody) tunnistaa kaappaavaan vasta-aineeseen sitoutuneet IL-8-partikkelit ja sitoutuu edelleen niihin. Liuksessa mukana oleva enstyyymi (streptavidin horseradish peroxidase) sitoutuu myös kompleksiin ja muuttaa substraattiliuoksen lisäyksen jälkeen substraatin värilliseksi tuotteeksi. Reaktio pysäytetään 30 minuutin kuluttua rikkihapolla, minkä jälkeen värillisen tuotteen määrä voidaan mitata fotometrisesti 450 nm:n aallonpituudella (BD OptEIA™. Technical Data Sheet: Human IL-8 ELISA Set).

Testimittausten jälkeen päädyttiin käyttämään Hsp70-altistuksille ja kontrolleille laimennoksia 1:50 ja LPS-altistuksille laimennoksia 1:300. Näytteet laimennettiin Assay Diluentiin, jota käytettiin myös fotometrisen mittauksen nollanäytteenä.

#### 4.3 Sytotoksisuus: laktaattidehydrogenaasi (ELISA)

LDH on solunsisäinen entsyymi, joka hapettaa laktaattia eli maitohappoa pyruvaatiksi. Se vapautuu solujen hajotessa, joten sen määrän kasvaminen solumaljan kasvatusmediumissa on merkki solukuolemista maljalla. LPS- ja Hsp70-altistettujen solujen kasvatusmediumista mitattiin LDH:n määrän nousua kolorimetrisesti Sigman CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay -kitillä. Menetelmässä mediumnäytteitä pipetoidaan 96-kuoppalevylle ja lisätään LDH Substrate Mix-liuosta, jonka sisältämän laktaatin näytteen LDH muuttaa pyruvaatiksi. Samalla  $\text{NAD}^+$  pelkistyy  $\text{NADH}$ :ksi (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi-koentsyymi).  $\text{NADH}$ :n läsnäollessa tetrazolium-suola muuttuu diaforaasin katalysoimana värilliseksi formazaniksi, jolloin näyteliuoksen absorbanssit voidaan mitata 490 nm:n aallonpituudella (Promega. CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay).

#### 4.4 Western Blotting -menetelmä

Solulysaateista tutkittiin Western Blotting -menetelmällä solujen sisältämä Hsp70-määrä. Tällä voitiin arvioida, päätyivätkö Hsp70-proteiinit altistuksissa solujen sisään. Western Blotting -menetelmässä solun sisäiset proteiinit erotellaan geelielektroforeettisesti niiden molekyylikokojen perusteella. Geelielektroforeesiajon jälkeen polypeptidit siirretään nitroselluloosakalvolle, josta haluttu proteiini voidaan tunnistaa vasta-aineiden avulla ja detektion jälkeen nähdä värillisenä bändinä (Kuopion yliopiston menetelmäohje 17.11.2003). Näytteitä varten tehtiin kaksi geeliä: 24 tunnin LPS- ja Hsp70-altistetuille (A-geeli) ja 48 tunnin LPS- ja Hsp70-altistetuille (B-geeli) soluille erikseen. Altistukset oli tehty kolmena rinnakkaisena ja kukin rinnakkaisnäyte käsiteltiin erikseen ja pipetoitiin omaan kaivoonsa.

Näytteiden valmistelua varten solulysaattien proteiinipitoisuudet mitattiin ensin Bradfordin menetelmällä. Tulosten perusteella näytteet valmistettiin niin, että jokaiseen näytteeseen tuli 30  $\mu\text{g}$  proteiinia. Näytteisiin lisättiin 10  $\mu\text{l}$  5 x näytepusku-

ri-/1:20-merkaptopoetanoliuosta ja tilavuus täydennettiin Milli-Q-vedellä 30 µl:ksi. 10-prosenttisen geelin (SDS-PAGE) kaivoihin pipetoitiin koko näytemäärä (30 µl). Molekyylidikostandardia (Dual Color) pipetoitiin kaivoon 10 µl.

Geelejä pidettiin 200 V:n ajojännitteessä 2,5 tuntia. Geeliajon jälkeen näytteet siirrettiin blottauslaitteessa nitroselluloosakalvolle (Amersham, USA) 17 V:n jännitteellä. Blottausaika oli noin 16 tuntia. Kalvoille tehtiin Ponceau-S-värjäys, kalvot kuvattiin ja pestiin 1 x PBS:ssa.

Seuraavaksi kalvoille tehtiin Hsp70-immunovärjäys. Kalvoja pidettiin tunnin ajan blokkauksliuoksessa (taulukko 3) huoneen lämmössä. Tämän jälkeen kalvoja inkuboitiin tunnin ajan huoneen lämmössä primäärissä anti-Hsp70-vasta-aineessa (cat.no SPA-810, Stressgen, Canada), joka laimennettiin suhteessa 1:5000 laimennusliuokseen A (taulukko 3). 3 x 5 minuutin pesujen (0,3% tween – 1 x PBS) jälkeen kalvoja inkuboitiin tunnin ajan huoneen lämmössä anti-mouse-sekundäärissä (horseradish peroxidase linked anti-mouse IgG), joka laimennettiin suhteessa 1:40 000 laimennusliuokseen B (taulukko 3). Sekundäärin jälkeen suoritettiin samat pesut kuin primäärin jälkeen. Proteiini-vasta-aine-kompleksit värjätettiin (luminol/enhancer – stable peroxidase 1:1) ja kuvattiin.

Samoille kalvoille tehtiin vielä tubuliiniproteiinin värjäys. Tubuliini on solun tukirangan proteiini, jota on kaikissa soluissa jokseenkin sama määrä altistuksista riippumatta. Koska kaikkiin näytekaivoihin pipetoitiin sama kokonaisproteiinimäärä, tubuliinivärjäyksen avulla voitiin arvioida sitä, kuinka hyvin pienet tilavuudet oli onnistuttu pipetoimaan geelin kaivoihin. Tietokoneohjelmilla tubuliinibändien avulla voitiin myös laskea suhteutetut arvot Hsp70-proteiinimäärille, mikä korjasi mahdollisten pipetointivirheiden aiheuttamaa epätarkkuutta tuloksissa. Tubuliinivärjäyksessä primäärinä käytettiin monoklonaalista anti- $\alpha$ -tubuliinia (Sigma-Aldrich T5168) laimennettuna suhteessa 1:8000 laimennusliuokseen C (taulukko 3), ja kalvoja inkuboitiin 15 minuuttia huoneen lämmössä. Sekundääri oli sama anti-mouse kuin Hsp70-värjäyksessä, mutta laimennettuna suhteessa 1:10 000 laimennusliuokseen C (taulukko 3).

TAULUKKO 3. Immunovärjäyksessä käytetyt liuokset.

Työvaihe/käyttötarkoitus	Liuos
Blokkaus	3 % maito – 0,05 % tween – 1xPBS
laimennusliuos A	0,5 % BSA – 0,3 % tween – 1x PBS
laimennusliuos B	3 % maito – 0,3 % tween – 1x PBS
laimennusliuos C	1 % maito – 0,05 % tween – 1 x PBS

#### 4.5 Lämpösokkiproteiinien suojavaikutus: MTT

Lämpösokkiproteiinin Hsp70 mahdollisen suojavaikutuksen toteamiseksi ARPE-19-soluja kohtaan kehitettiin malli, jossa kasvatismaljan soluja altistettiin oksidatiivista stressiä aiheuttavalle vetyperoksidille ja verrattiin vetyperoksidin tuhovaikutuksia Hsp70-altistettujen ja -altistamattomien solujen välillä. Mallia varten etsittiin ensin sopiva H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentraatio, jossa ARPE-19-solukuolemia havaittiin runsaasti. Sopivan konsentraation löydyttyä soluja inkuboitiin ensin 24 tuntia 37 °C:ssa 5 µg/ml:n Hsp70-altistuksessa, minkä jälkeen sekä Hsp70-altistettuihin että -altistamattomiin viljelmiin lisättiin sytotoksiseksi todettu määrä vetyperoksidia. 24 tunnin altistuksen jälkeen vetyperoksidia lisättiin vielä toisen kerran, ja 72 tunnin kokonaisinkubaatioajan jälkeen viljelmillä tapahtuvia solutuhoja vertailemalla arvioitiin lämpösokkiproteiinien suojaavaa vaikutusta ARPE-19-soluille. Vetyperoksidialtistukset tehtiin kahdella H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentraatiolla: 0,5 mM ja 0,75 mM. Solujen kasvatus ja altistukset tehtiin 12-kuoppalevyllä.

Lyyttisen vaikutuksen arvioinnissa käytettiin MTT-menetelmää, jossa solujen elinkelpoisuutta mitataan mitokondrionaalisen dehydrogenaasi-entsyymin avulla. Mediumiin lisätty MTT-liuos on väriltään keltainen, mutta elävien solujen mitokondrioiden dehydrogenaasin halkaistessa MTT-molekyylin rakenteesta tetraoxoliumrenkaan muodostuu violetteja veteen liukenemattomia formatsaanikiteitä. Kiteet liuotetaan happamalla liuoksella ja saadun violetin liuoksen absorbanssi mitataan spektrofotometrisesti. Solumäärän pieneneminen johtaa siis vähentyneeseen formatsaanikiteiden muodostumiseen, mitä voidaan käyttää toksisuuden indikaattorina (Sigma Aldrich. In vitro toxicology assay kit, MTT based).

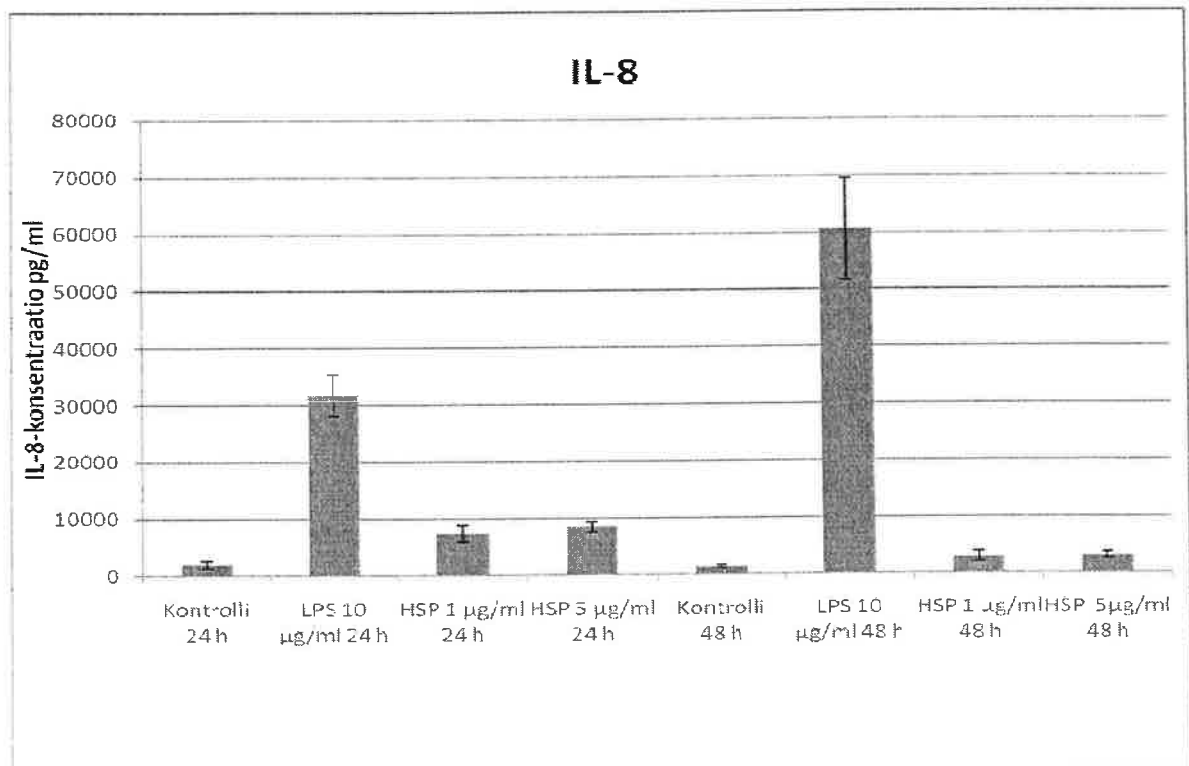
Altistusten ja inkubaatioiden jälkeen 500 µl:aan kasvatusmediumia lisättiin 25 µl MTT-liuosta (10 mg/ml PBS:ssa) ja inkuboitiin 1,5 tuntia +37 °C:ssa. Sen jälkeen kuoppiin lisättiin 525 µl puskuria (20 % SDS, 50 % dimetyyliformamidi, pH 4,7). Absorbanssit mitattiin 550 nm:n aallonpituudella microplate-lukijalla (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).



## 5 TULOKSET

### 5.1 Tulehdusvaste

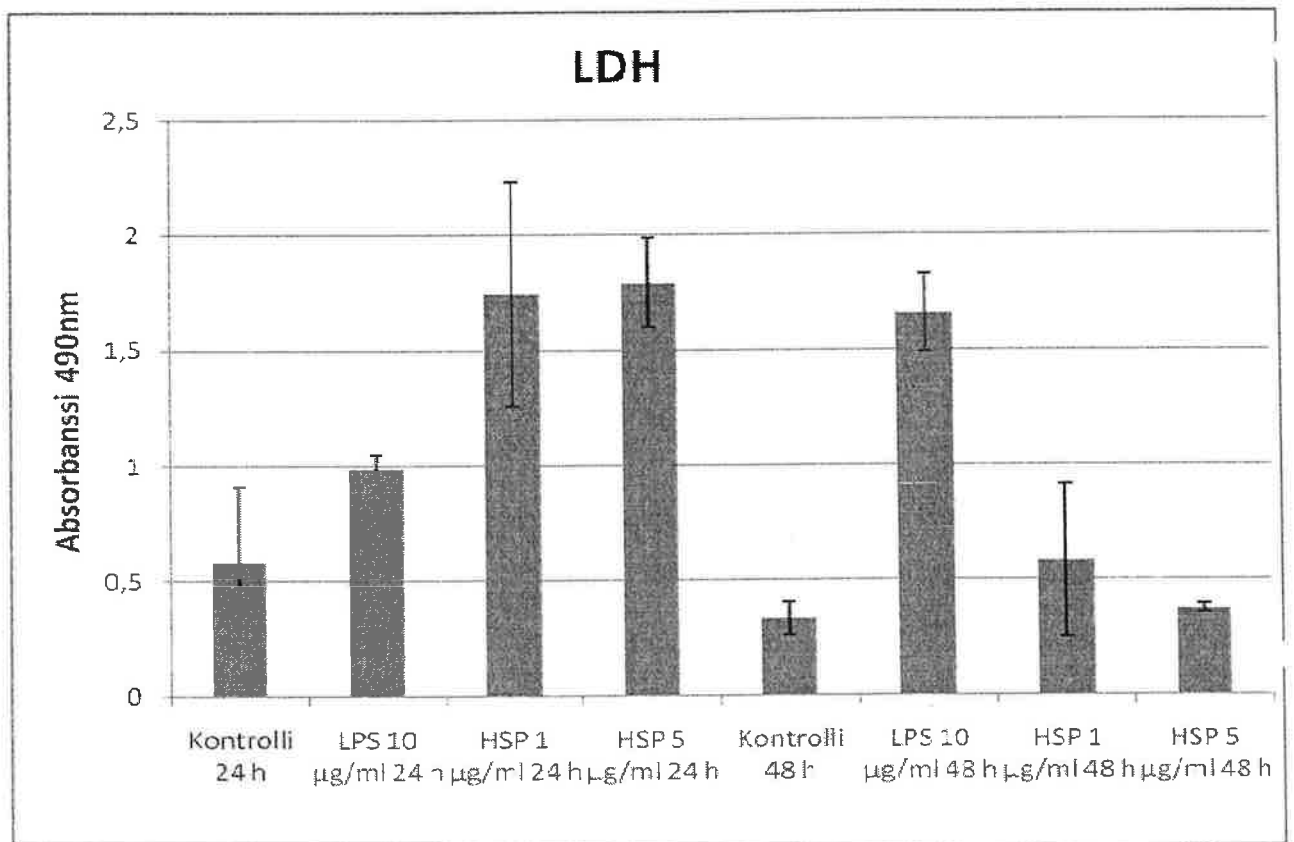
Lämpösokkiproteiini-altistus nosti lievästi solujen tulehdustasoa ensimmäisen vuorokauden aikana, mutta kahden vuorokauden kuluttua interleukiini 8:n määrä oli jo laskenut vähäiseksi (kuvio 3). LPS-altistukseen verrattuna IL-8-tuotanto oli vähäistä kummassakin aikapisteessä. Altistuskonsentraatioiden erolla ei ollut IL-8-tuotantoon juurikaan vaikutusta, vaan vasteet olivat kutakuinkin samansuuruiset sekä 1 µg/ml:n että 5 µg/ml:n Hsp70-altistuksissa. LPS-altistuksissa IL-8-tuotanto oli huomattavaa jo 24 tunnin jälkeen otetussa näytteessä ja lisääntyi edelleen voimakkaasti vuorokaudessa lähes kaksinkertaiseksi. Hsp70-altistetuilla solumaljoilla vähäinenkin tulehdusvaste sen sijaan väheni. Huomattavaa on, että myös kontrollinäytteen IL-8-pitoisuus laski ajan funktiona.



KUVIO 3. Hsp70-altistusten vaikutus IL-8-konsentraatioon RPE-solujen kasvatusmediumissa.

## 5.2 Sytotoksisuus

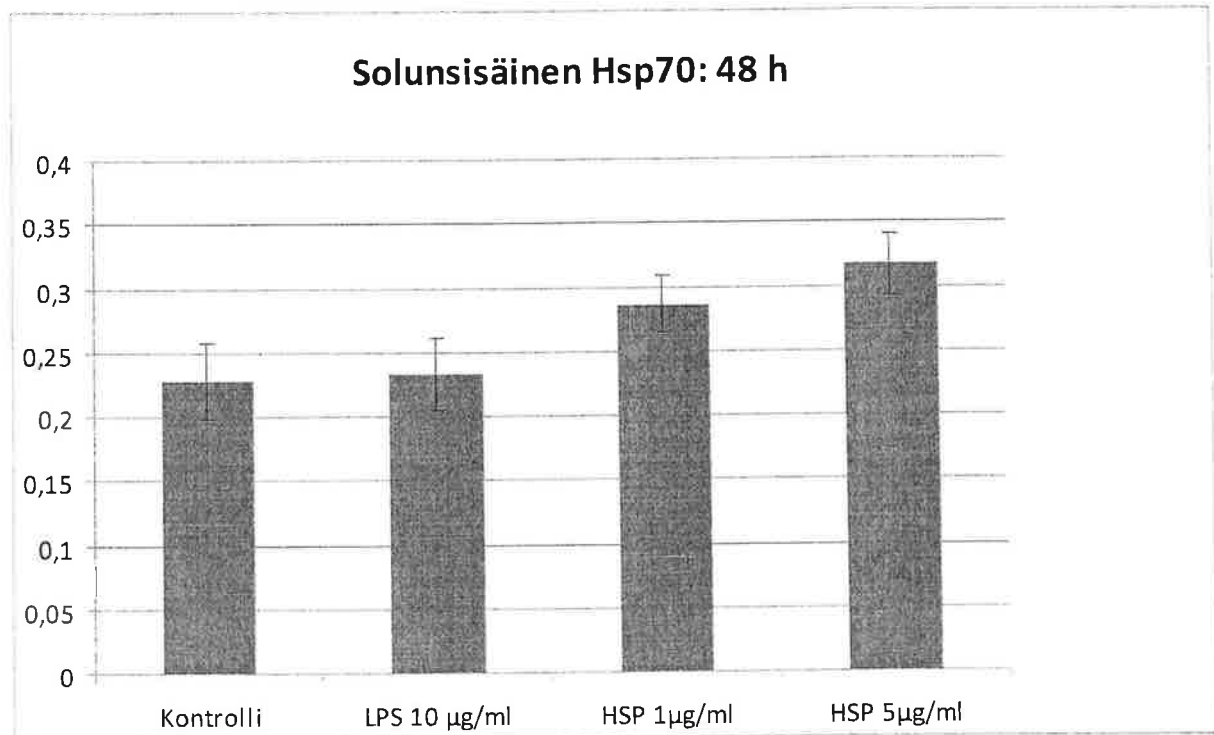
LPS-altistuksessa LDH:n määrä lähes kaksinkertaistui vuorokaudessa ja toisen vuorokauden kuluttua määrä kohosi edelleen huomattavasti (kuvio 4). 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ :n Hsp70-altistuksessa LDH:n määrä oli vuorokauden jälkeen noin kolminkertaistunut, mutta laski seuraavan vuorokauden aikana takaisin kontrollinäytteen tasolle. 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ :n Hsp70-altistuksessa ensimmäisen vuorokauden jälkeinen LDH-määrä vastasi 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -altistuksen tulosta ja 48 tunnin altistuksen jälkeen määrä oli niin ikään lähellä kontrollin mittaustulosta. Myös kontrollinäytteessä LDH:n määrä laski vuorokaudessa, joskin muutosta on hajonnan vuoksi vaikea tarkentaa.



KUVIO 4. Hsp70-altistusten vaikutus laktaattidehydrogenaasin määrään RPE-solujen kasvatusmediumissa.

### 5.3 Western Blotting

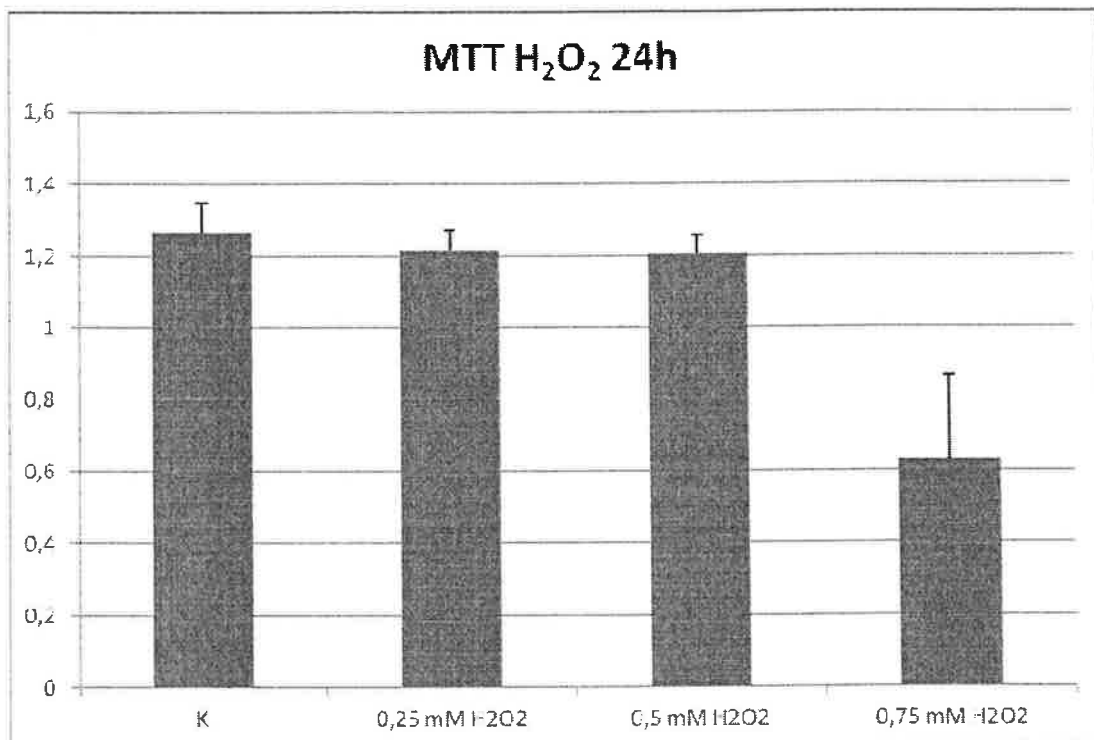
LPS-altistettujen solujen kasvatusmediumista otetussa näytteessä lämpösokkiproteiinipitoisuus vastasi kontrollinäytteen pitoisuutta (kuvio 5). 1  $\mu\text{g/ml}$ :n Hsp70-altistuksen jälkeen solunsisäinen lämpösokkiproteiininimäärä oli kohonnut, ja kohoaminen oli voimakkaampaa 5  $\mu\text{g/ml}$ :n Hsp70-altistuksen jälkeen.



KUVIO 5. Solunsisäinen Hsp70-määrä 48 tunnin Hsp70-altistuksen jälkeen. Hsp70-vasteet on suhteutettu tubuliinitasoon.

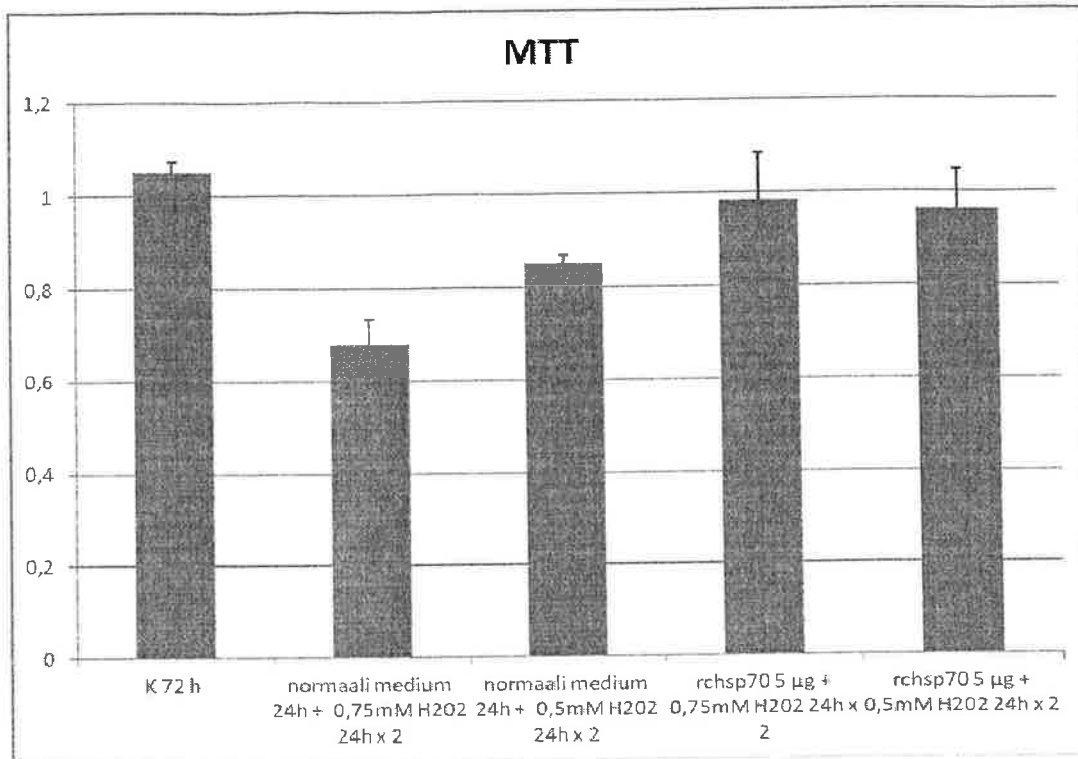
#### 5.4 Suojavaikutus

Sopivaksi solutuhoa aiheuttavaksi  $\text{H}_2\text{O}_2$  - konsentraatioksi osoittautui 0,75 mM. Tällöin soluista noin puolet kuolivat (kuvio 6).



KUVIO 6. Vetyperoksidin sytotoksinen vaikutus eri konsentraatioilla. K = kontrolli.

Suojavaikutusta tutkittaessa solut altistettiin sytotoksiseksi konsentraatioksi (0,75 mM) havaitun lisäksi vertailun vuoksi myös laimeammalle 0,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -konsentraatiolle. Vetyperoksidimallin kokeessa (kuvio 6) havaittu sytotoksisuusero käytettyjen konsentraatioiden välillä toistui varsinaista suojavaikutusta testattaessa, mikä osaltaan vahvistaa kokeen tulosten luotettavuutta. Hsp70-altistamattomiin soluihin vetyperoksidin vaikutus oli huomattavan toksinen (kuvio 7), kuten mallilla jo todettiin.



KUVIO 7. Erot H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:n vaikutuksissa Hsp70-altistettuihin ja altistumattomiin ARPE-19-soluihin.

Vetyperoksidin vaikutus Hsp70-proteiinille altistettuihin soluihin oli kontrolliin verrattuna selvästi vähäisempi kuin Hsp70-altistamattomiin soluihin (kuvio 7). Hsp70-altistamattomissa soluviljelmissä H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-altistekonsentraation nosto 0,5 mM:sta 0,75 mM:iin aiheutti merkittävän romahduksen solumäärässä, mutta Hsp70-altistetuissa soluviljelmissä samalla vetyperoksidikonsentraation nostolla sytotoksiselle tasolle ei ollut merkittävää vaikutusta elinkelpoisten solujen määrään.

## 6 TARKASTELU

Kuvion 3 osoittama lievä tulehdustason nousu voi selittyä rekombinantti-Hsp70:n mahdollisilla LPS-kontaminaatioilla. Käytetty rekombinantti-Hsp70 on voinut olla valmiiksi kontaminoitunut lipopolysakkaridilla tai on voinut sitoutua solumaljalla kontaminantteihin ennen kontaktia RPE-solujen kanssa. Mahdollinen selitys alun tulehdustason nousulle ovat myös hajonneiden solujen komponentit. Solun ulkopuolelle joutuessaan monet solun ainesosat, kuten solukalvojen ja mitokondrioiden fosfolipidit, tumakomponentit ja solujen tukirankojen säikeet aiheuttavat tulehdusta (Hedman ym. 2011). Kun tuloksia verrataan sytotoksisuusmittauksen tuloksiin (luku 5.2), havaitaan, että solukuolemia on tapahtunut merkittävästi juuri ensimmäisten 24 tunnin aikana. Tuolloin solujen ulkopuolisia solukomponentteja on ollut kasvatmediumissa runsaasti, mikä selittänee ainakin osittain havaitun tulehdustason nousun. Tulos joka tapauksessa osoittaa, ettei lämpösokkiproteiini aiheuta voimakasta IL-8-synteesiä RPE-soluissa eikä Hsp70:n käyttö terapeutisena hoitomuotona ole siltä osin poissuljettua.

Sen sijaan LDH-mittausten tulokset eivät ole yhtä suoraviivaisia. Kuvion 4 mukaan 24 tunnin Hsp70-altistus näyttäisi aiheuttavan huomattavasti suuremman LDH-tason nousun kuin vastaava LPS-altistus. Solujen hajoaminen Hsp70-altistuksissa ei siis selity pelkästään käytetyn lämpösokkiproteiinin mahdollisilla LPS-kontaminaatioilla. Hsp70-molekyylillä tai jokin muu altistukseen liittyvä tekijä hajottaa soluja altistuksen jälkeen melko voimakkaasti, mutta hajottava vaikutus häviää seuraavan vuorokauden aikana ja LDH-määrät palaavat kontrollin tasolle. Yksi mahdollinen selitys LDH-tason nousulle on samanaikaisen Hsp70-proteiiniendosytoosin aiheuttama LDH:n vuotaminen solun ulkopuolelle. 1 µg/ml:n Hsp70-altistuksen tulosten hajonnan vuoksi ei voida varmaksi sanoa, onko Hsp70-konsentraatiolla vaikutusta sytotoksisuuteen, mutta ero ei ainakaan vaikuta suurelta.

LDH:n määrän nopean vähenemisen perusteella HSP-altistuksissa voidaan päätellä, että hajoavista soluista vapautuva entsyymi hajoaa melko nopeasti solumaljalla. Toisin kuin Hsp70-altistuksissa, LPS-altistuksissa LDH:n määrä nousee alun

lievemmän kohoamisen jälkeen vielä rajusti, joten LPS:n sytotoksinen vaikutus soluihin on selvästi pitkäkestoisempi ja pysyvämpi kuin Hsp70:n. Mikäli LDH-tason nousu johtuisi suoraan Hsp70:n sytotoksisuudesta, havaittu sytotoksisuuden pieneneminen altistuksen edetessä voisi selittyä teoreettisella oletuksella, että Hsp70 siirtyy jäljelle jäävien elävien pigmenttiepiteelisolujen sisään ja konsentraatio kasvatusmediumissa näin ollen pienenee sytotoksisen tason alapuolelle. Western Blotting –menetelmän mukaan solunsisäisen Hsp70:n määrä nousi altistuksissa, vaikka nousu olikin vähäistä. Toisaalta LDH-tason muutoksen voisi selittää aiemmin mainitun endosytoosin aiheuttama vuotaminen, joka 48 tunnin altistuksen jälkeen olisi vähäisempää, koska valtaosa Hsp70-proteiinista olisi jo endosytoitu soluihin ja solukalvot pysyisivät stabiilimpina.

Hsp70:n sytotoksisuutta arvioitaessa tiheämmillä aikapisteillä (esim. 6 tunnin välein) otetut näytteet kasvatusmediumista voisivat selittää solumaljan tapahtumia paremmin. Suuremmat rinnakkaisnäytemäärät ja mittauksen toistot vähentäisivät tulosten tulkintaa nyt häirintä hajontaa. Vaikka yksittäisten solumaljojen kontaminoituminen tai muista ulkoisista tekijöistä johtuvat poikkeamat soluviljelmän elinkelpoisuudessa ovatkin epätodennäköisiä, varminta olisi myös määrittää kaikilta altistussarjaan valituilta maljoilta LDH-pitoisuudet jo ennen altistuksia, jotta lähtötilanne voitaisiin osoittaa tasavertaiseksi ja tulosten vertailukelpoisuus varmistuisi. Sytotoksisuuden varmistaminen edellyttäisi tiheämpien aikapisteiden lisäksi suuremman Hsp70-altistuskonsentraatiovalikoiman käyttöä, mikä toisi selvyyttä sytotoksiin vaikutuksiin johtavista konsentraatioista ja solujen sietokyvyn rajoista. Mikäli nekroosiin johtavien vaikutusten aiheuttajaksi varmistuisi Hsp70, olennaista olisi löytää tasapaino sytotoksisten vaikutusten ja positiivisiin vaikutuksiin riittävän solunsisäisen konsentraation saavuttamisen välille.

Jotta LPS-kontaminanttien osuus tuloksiin saataisiin aukottomasti poissuljettua, tutkimus täytyisi tehdä myös luotettavasti puhtaalla proteiinilla. E.colissa kasvatettujen sijaan käyttökelpoisempia olisivat muut kuin bakteereissa kasvatetut lämpösokkiproteiinit, tosin tällöinkin käytetty proteiini voi sitoutua kontaminantteihin vielä solumaljalla.

Kuvion 5 osoittama solunsisäisen Hsp70-pitoisuuden lievä nousu altistusten aikana voi teoriassa johtua mediumiin lisätyn rekombinantti-lämpösokkiproteiinin päätyemisestä solujen sisään, solujen oman lämpösokkiproteiinituotannon kiihtymisestä tai molemmista. Kontrolliin verrattuna LPS-altistus ei aiheuta muutoksia solun sisäiseen lämpösokkiproteiinkonsentraatioon ainakaan vielä käytetyllä 10 µg/ml:n konsentraatiolla. Mikäli vahva ärsyke – jollaisena lipopolysakkaridia voidaan epäilemättä pitää – stimuloisi kasvatustaljan solujen omaa lämpösokkiproteiinituotantoa, näkyisi Hsp70-konsentraatiossa nousua myös LPS-altistettujen solujen näytteessä. Eroa kontrolliin ei kuitenkaan ole. Todennäköisesti LPS stimuloisi Hsp70-synteesiä suuremmilla pitoisuuksilla, mutta tutkimuksessa käytettyä pitoisuutta voitaneen pitää riittävänä vertailukohtana huomattavasti pienemmillä konsentraatioilla tehtyjen Hsp70-altistusten vaikutuksille. Tämän perusteella Hsp70-altistettujen solujen solunsisäisen Hsp70-pitoisuuden nousu olisi selitettävissä sillä, että lämpösokkiproteiinit päätyivät solujen sisään kasvatustaljan mediumista. Lisäksi Western Blotting –ajo tehtiin soluille, jotka olivat olleet altistettuina 48 tuntia, jolloin sytotoksisuusmittauksen (luku 5.2) mukaan Hsp70-rekombinantin mahdollinen ärsyttävä vaikutus olisi tällöin jo tasaantunut. Havaitun Hsp70-tason nousun todennäköisenä syynä ei siis voida pitää ainakaan pelkästään solujen omaa Hsp70-synteesiä. Tältä osin tulokset ovat lupaavia.

Epäilemättä merkittävin tutkimuksen tuloksista on vetyperoksidimallin avulla osoitettu Hsp70:n suojavaikutus, jota havainnollistaa kuvio 7. Sytotoksiseksi osoitetulla vetyperoksidikonsentraatiolla ei ole juurikaan vaikutusta elinkelpoisten solujen määrään Hsp70-altistuksen jälkeen, joten lämpösokkiproteiinien suojavaikutus soluihin on ilmeinen. Kokeessa käytetty 5 µg/ml:n altistuskonsentraatio osoittautui samalla riittäväksi aiheuttamaan soluissa oksidatiiviselta stressiltä suojaavan vaikutuksen. Inkubaatioajan jälkeinen soluviljelmän elinkelpoisuus on käytännössä muuttumaton lähtötilanteeseen verrattuna.

Kokonaisuutena tulokset Hsp70:n vaikutuksista silmänpohjan pigmenttiepiteelisoluihin ovat lupaavia ja kannustavat jatkamaan tutkimuksia niiden käyttömahdollisuuksista silmänpohjan ikärappeuman hoitomuotona.



## LÄHTEET

Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis and therapeutic strategies. *Survey of Ophthalmology* 2003;48:257 – 93.

Barreto A, Gonzales JM, Kabingu E, Asea A, Fiorentino S. Stress-induced release of HSC70 from human tumors. *Cellular Immunology* 2003;222:97 – 104.

Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NK- $\kappa$ B pathway. *International Immunology* 2000;12:1539 – 46.

Bausinger H, Lipsker D, Ziyhan U ym. Endotoxin-free heat shock protein 70 fails to induce APC activation. *European Journal of Immunology* 2002;32:3708 – 13.

Bazil V, Horejsi V, Baudys M ym. Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *European Journal of Immunology* 1986;16:1583 – 9.

BD OptEIA™. Technical Data Sheet: Human IL-8 ELISA Set. Luettu 3.7.2011. [www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/tds/opteia/live/web\\_enabled/2654KI\\_555244.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/opteia/live/web_enabled/2654KI_555244.pdf)

Bendz H, Ruhland SC, Pandya MJ ym. Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282:31688 – 702.

Bulut Y, Faure E, Thomas L ym. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *Journal of Immunology* 2002;168:1435 – 40.

Carrard G, Bulteau A-L, Petropoulos I, Friguet B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2002;34(11):1461 – 74.

Dean DO, Tytell M. Hsp25 and -90 immunoreactivity in the normal rat eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2001;12:3031 – 40.

Dybdahl B, Wahba A, Lien E ym. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through Toll-like receptor-4. *Circulation* 2002;105:685 – 90.

Dziarski R, Gupta D. Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. *Journal of Endotoxin Research* 2000;5:401 – 5.

ENZO Life Sciences. Product Specification: HSP70/HSP72. Luettu 26.7.2011.  
[www.enzolifesciences.com/ADI-NSP-555/HSP70HSP72\\_human\\_recombinant/](http://www.enzolifesciences.com/ADI-NSP-555/HSP70HSP72_human_recombinant/)

Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 1999;79:425 – 49.

Frey EA, Miller DS, Jahr TG ym. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine* 1992;176:1665 – 71.

Gao B, Tsan M-F. Endotoxin contamination in recombinant human Hsp70 preparation is responsible for the induction of TNF $\alpha$  release by murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 2003 a;278:174 – 79.

Gao B, Tsan M-F. Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;317:1149 – 54.

Gao B, Tsan M-F. Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor  $\alpha$  from murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 2003 b;278:22523 – 29.

Habich C, Kempe K, van Der Zee R ym. Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *Journal of Immunology* 2005;174:1298 – 305.

Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002;195:1852 – 58.

Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S, Vaara M (toim.). *Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kirja 2.* Porvoo: Kustannus Oy Duodecim 2011.

Hightower LE, Guidon PT Jr. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *Journal of Cell Physiology* 1989;138:257 – 66.

Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheri A, Valtonen V (toim.). *Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja 1.* Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2003.

Jaattela M. Heat-shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of Medicine* 1999;31:261 – 77.

Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related Macular Degeneration. *The New England Journal of Medicine* 2008;358:2606 – 17.

Kaarniranta K, Sihvola R, Salminen A ym. Silmänpohjan ikärappeuma - vaikea ongelma sekä potilaalle että silmälääkärille. *Duodecim* 2003;119:935 – 45.

Kaarniranta K, Seitsonen S, Paimela T, Meri S, Immonen I. Silmänpohjan ikärappeuman patogeneesi. *Duodecim* 2009;125(2):145 – 53.

Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine* 2007; 13(11): 460 – 9.

Kuopion yliopisto. Neurotieteen ja neurologian laitos. Menetelmäohje: Western blotting. Laatinut TS, hyväksynyt AS. 17. 11.2003.

Liao DF, Jin ZG, Baas AS ym. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:189 – 96.

Liesegang TJ, Skuta GL, Cantor LB (toim). *Retina and Vitreous. Basic and Clinical Science Course.* USA: American Academy of Ophthalmology 2004.

Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annual Reviews of Genetics* 1988;22:631 – 77.

Llorca O, Martín-Benito J, Ritco-Vonsovici M ym. Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *The EMBO Journal* 2000;19:5971 – 79.

Li Z, Menoret A, Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Current Opinion in Immunology* 2002;14:45 – 51.

Mainster MA, Reichel E. Transpupillary thermotherapy for age-related macular degeneration: long-pulse photocoagulation, apoptosis, and heat shock proteins. *Ophthalmic Surgery & Lasers* 2000;5:359 – 73.

Majde JA. Microbial cell-wall contaminants in peptides: a potential source of physiological artifacts. *Peptides* 1993;14:629 – 32.

Meisenberg G, Simmons W. *Principles of Medical Biochemistry.* Philadelphia: Mosby 2006.

Mannermaa E, Urtti A, Kaarniranta K. Silmänpohjan nesteisen ikärappeuman uudet lääkkeet. *Duodecim* 2007;123:2229-2237.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394 – 7.

Niesink R.J.M, de Vries J, Hollinger M.A (toim.). *Toxicology. Principles and Applications.* USA: CRC Press 1996.

Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacological Reports* 2006;58:353 – 63.

Osterloh A, Kalinke U, Weiss S, Fleischer B, Breloer M. Synergistic and differential modulation of immune responses by HSP60 and LPS. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:4669 – 80.

Paimela T, Hyttinen JM, Viiri J ym. Celastrol regulates innate immunity response via NF- $\kappa$ B and Hsp70 in human retinal pigment epithelial cells. *Pharmacological Research* 2011 (painossa).

Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* 2001;70:503 – 33.

Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, Frostegard J. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* 2000;36:303 – 7.

Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 2003;362:469 – 76.

Promega. CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Introduction for use of product G1780. Päivitetty 3/09. [www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol/](http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol/)

Rea IM, McNerlan S, Pockley AG. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Experimental Gerontology* 2001;36:341 – 52.

Reed RC, Berwin B, Baker J, Nicchitta CV. GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages: a role for endotoxin contamination in NK $\kappa$ B activation and nitric oxide production. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:31853 – 60.

Ryhänen T, Hyttinen JMT, Kopitz J. Lämpösokkiproteiinit keskeisessä roolissa silmänpohjan ikärappeuman patogeneesissä. *Duodecim* 2008;124(24):2845.

Ryhänen T, Hyttinen JMT, Kopitz J ym. Crosstalk between Hsp70 molecular chaperone, lysosomes and proteasomes in autophagy-mediated proteolysis in human retinal pigment epithelial cell. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009;13(9b):3616 – 31.

Seitsonen S, Onkamo P, Immonen I, Järvelä I. Silmänpohjan ikärappeuman alttiusgeenien tunnistaminen – molekyyli-genetiikan menestystarina. *Duodecim* 2009;125(21):2360 – 4.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H ym. A molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine* 1999;189:1777 – 82.

Sigma Aldrich. In vitro toxicology assay kit, MTT based. Stock No TOX-1. Product information. Luettu 20.2.2012.  
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/tox1bul.Par.0001.File.tmp/tox1bul.pdf>

Srivastava PK. Role of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2002;2:185 – 94.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T ym. Differential role of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443 – 51.

Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharide. *Journal of Immunology* 2000;165:5780 – 7.

Taylor JP, Tanaka F, Robitschek J ym. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Human Molecular Genetics* 2003;12:7:749 – 57.

Tilastokeskus. Tuotteet ja palvelut: Suomi lukuina: Väestö. Päivitetty 22.3.2011 (Väestörakenne) ja 11.12.2009 (Väestöennuste)  
[http://www.tilastokeskus.fi/tup/suoluk/suoluk\\_vaesto.html](http://www.tilastokeskus.fi/tup/suoluk/suoluk_vaesto.html)

Tsan M-F, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 2004 a;286:C739 – 44.

Tsan M-F, Gao B. Heat Shock Protein and Innate Immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 2004 b;4:274 – 79.

Tsan M-F, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *Journal of Leukocyte Biology* 2009;85:6:905 – 10.

Vabulas RM, Braedel S, Hilf N ym. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2002 a;277:20847 – 53.

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. Hsp70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2002 b;277:15107 – 12.

Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends of Immunology* 2002; 23:130 – 5.

Walter S, Buchner J. Molecular chaperones – cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie* 2002;41:1098 – 113.

Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta d. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2→MyD88→IRAK→TRAF→NIK→IKK→NF-κB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infection and Immunity* 2001;4:2270 – 6.

Wang Z-M, Liu C, Dziarski R. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:20260 – 20267.

Xu Q, Schett G, Perschinka H ym. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation* 2000;102:14 – 20.

Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002;22:1547 – 59.

Zahringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. TLR2-promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* 2008;213:205 – 24.

Zugol U, Kaufmann SH. Immune response against heat-shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology* 1999;201:22 – 35.

Ye Z, Gan Y-H. Flagellin contamination of recombinant heat shock protein 70 is responsible for its activity on T cells. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:4479 – 84.