

# AIVOJEN KANTASOLUJEN NEUROGENEESI CLN5-TAUDISSA

HENNA KONTTINEN

Pro gradu -tutkielma  
Itä-Suomen yliopisto  
Biologian laitos  
2015

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO

Biologian laitos

KONTTINEN, HENNA: Aivojen kantasolujen neurogeneesi CLN5-taudissa

Pro gradu -tutkielma, 90 s., liitteitä 1

Huhtikuu 2015

---

Neuronaaliset seroidilipofuskinoosit, eli NCL-taudit, ovat joukko geneettisesti periytyviä hermorappeumasairauksia, joille yhteisiä oireita ovat epileptiset kohtaukset, psykomotoristen taitojen taantuminen, sokeutuminen ja ennenaikainen kuolema. Sairauksien taustalla olevat geenimutaatiot tunnetaan hyvin, mutta niiden roolia neuronien surkastumisessa ja oireiden synnyssä ei tunneta. Hermokantasolujen toiminnassa on havaittu muutoksia monissa hermorappeumasairauksissa ja on saatu viitteitä, että NCL-tauteihin liittyvät geenit voivat osallistua uusien neuronien tuotannon eli neurogeneesin säätelyyn. Neurogeneesi on voimakkainta sikiönkehityksen aikana, mutta se hidastuu syntymän jälkeen eikä se pysty korjaamaan sairauden aiheuttamaa neuronien surkastumista aivoissa.

Tässä työssä tutkittiin aivojen kantasolujen toimintaa ja neurogeneesiä CLN5-taudissa, joka on lapsuusiässä alkava NCL-tautimuoto ja kuuluu suomalaiseen tautiperintöön. *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirimallin avulla tutkittiin, kuinka tauti vaikuttaa sikiön kehityksen loppuvaiheessa hippokampuksesta eristettyjen kantasolujen jakautumiseen, liikkumiseen ja erilaistumiseen soluviljelmissä. Menetelminä käytettiin *in vitro* -soluviljelytekniikoita ja solujen ominaisuuksia analysoitiin immunosytokemiallisilla vasta-aineväryyksillä, joissa määritettiin uusien neuronien, kypsien neuronien ja astrosyyttien immunoreaktiivisuutta. Lisäksi tutkittiin CLN5-taudissa häiriintyneiden soluprosessien – tulehdusvasteen ja lipidimetabolian – osuutta neurogeneesiin altistamalla soluja interleukiini 33:lle sekä synteettisille GW0742- ja HX600-molekyyleille. Interleukiini 33 on solujen luonnollinen sytokiini, joka säätelee Th2/M2-tulehdusvastetta. HX600 toimii retinoidihapon tavoin RXR-tumareseptorin agonistina ja osallistuu tulehdusvasteen säätelyyn lisäksi muun muassa solujen erilaistumisen ja jakautumisen ohjaamiseen. GW0742 aktivoi PPAR $\delta$ -tumareseptoria, jonka oletetaan osallistuvan lipidimetabolian, tulehdusvasteen ja aivojen kehityksen säätelyyn.

Tutkimustulosten perusteella neurogeneesi on muuntunut CLN5-taudissa siten, että solujen jakautuminen ja neuronaalinen erilaistuminen ovat kiihtyneet. Yhdessä voimistuneen solukuoleman kanssa nämä huomiot viittaavat hermokantasolujen solusyklin nopeutumiseen CLN5-taudissa. Lisäksi interleukiini 33:n havaittiin tukevan hermokantasolujen neuronaalista erilaistumista ja lisäävän solujen migraatiota. Sitä vastoin tumareseptoreita aktivoivien GW0742:n ja HX600:n vaikutus oli vaihteleva ja genotyypistä riippuvainen, joten osa niiden useista kohdeprosesseista voi olla muuntunut CLN5-taudissa. Kaiken kaikkiaan tulokset viittaavat siihen, että hermokantasolujen toiminta on muuntunut CLN5-sairaudessa ja neurogeneesiin osallistuvat signaalintireitit ovat potentiaalisia varhaisen hoidon kohteita tulevaisuudessa.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

Department of Biology

KONTTINEN, HENNA: Neurogenesis and neural stem cells in CLN5 disease

MSc. Thesis, 90 pp., Appendices 1

April 2015

---

Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL diseases) are a group of genetically inherited neurodegenerative diseases which share common symptoms including seizures, retardation of psychomotor skills, blindness and premature death. Although the underlying gene mutations of the diseases are known, their role in neuronal atrophy and occurrence of symptoms is not clear. New neurons are constantly being formed from neural stem cells in a process of neurogenesis. Neurogenesis is most efficient during embryonic development, but it slows down after the birth and can not compensate for the damage caused by the disease. Furthermore, in many neurodegenerative diseases the function of neural stem cells is altered, and the genes that are mutated in NCL diseases may normally participate in the regulation of neurogenesis during embryonic development.

In this master's thesis, neurogenesis and the properties of brain stem cells were studied in CLN5 disease, which is a childhood variant of NCL diseases and is considered to belong to the Finnish heritage diseases. *Cln5*<sup>-/-</sup> knockout mouse model was used to study how the disease affects proliferation, migration and differentiation of neural stem cells isolated from hippocampus during the final stages of fetal development. Immunocytochemistry techniques were used for analysing the differentiation of cells. In addition, the role of inflammation and lipid metabolism – dysfunctional cellular processes in CLN5 disease – were studied by exposing cell cultures to interleukin 33 and to synthetic nuclear receptor agonists GW0742 and HX600. Interleukin 33 is a natural cytokine involved in Th2/M2 inflammatory response. HX600 functions similarly as a retinoic acid by activating RXR nuclear receptor that is involved not only in inflammatory response but also cell differentiation and proliferation. GW0742 activates PPAR $\delta$  nuclear receptor, which presumably is involved in lipid metabolism, inflammatory response, and regulation of brain development.

The results obtained in this thesis indicate that neurogenesis is altered in CLN5 disease, since the proliferation of stem cells and their differentiation into the neuronal lineage were increased in *Cln5*<sup>-/-</sup> genotype compared to the wild type. Together with the implications of accelerated cell death in the *Cln5*<sup>-/-</sup> genotype, these observations suggest that the cell cycle is faster in *Cln5*<sup>-/-</sup> genotype. Furthermore, interleukin 33 was found to support neuronal differentiation and migration in both *Cln5*<sup>-/-</sup> and wild type cells. By contrast, nuclear receptor agonists, GW0742 and HX600, had inconsistent genotype dependent effects, which could indicate that these substances may have an effect on various signaling pathways and some of them may be altered in CLN5 disease. Altogether, these results suggest that the function of neural stem cells is altered in the CLN5 disease, hence signaling pathways related to neurogenesis may be potential targets of treatment in the future.

## LYHENTEET

AD	Alzheimerin tauti
ALS	Amyotrofinen lateraaliskleroosi
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
Bcl6	B-solun lymfooma 6-proteiini, onkogeeni-proteiini
BDNF	Aivoperäinen hermokasvutekijä
bFGF	Hapan fibroblastikasvutekijä
BrdU	5-bromo-2'-deoksiuridiini, synteettinen tymidiini-nukleosidin analogi
C57BL/6JRcc	Eläinkokeissa yleisesti käytetty hiirikanta
cDNA	RNA:sta syntetisoitu komplementaarinen DNA
CLN	NCL-tautien geenilokus
CPT1A	Karnitiinipalmitoyylitransferaasi 1A
CTSD/F	Katepsiini D/F
DCX	Mikrotubuluksiin liittyvä proteiini (doublecortin)
DG	Pykäläpoimu ( <i>gyrus dentatus</i> )
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
E15	Sikiöpäivä 15, sikiön ikä
EGF	Epidermaalikasvutekijä
EPMR	Pohjoinen epilepsia
ER	Endoplasminen solulimakalvosto
ES	Embryonaalinen eli alkion kantasolu
FBS	Naudan sikiön seerumi
G1-S-G2-M	Solusyklin vaiheet
GABA	Gamma-aminovoihappo
GalCer	$\alpha$ -galaktosyylikeramidi
GFAP	Gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini
GFP	Vihreä fluoresoiva proteiini
GLAST	Glutamaatti-aspartaatti -transportteriproteiini
GRN	Progranuliini
GROD	Rakeinen osmiofiilinen (osmiumtetroksidilla värjäytyvä) saostuma
GW0742	PPAR $\delta$ -tumareseptorin agonisti
HD	Huntingtonin tauti
HX600	RXR-tumareseptorin agonisti
IL-1RAcP	IL-1R avustava proteiini
IL-33	Interleukiini 33
IP	Välimuotoinen neuronin esiasestolu
iPS	Indusoitu pluripotentti kantasolu
KCTD7	Kaliumkanavan tetramerisaatiidomeeni 7
LV	Lentivirus
lncRNA	Pitkä ei-koodaava RNA-molekyyli (> 200 nukleotidia)
MAP-2	Neuro- ja aktiinifilamentteihin liittyvä proteiini
MAPK	Mitogeenien aktivoima proteiinikinaasi
MCP-1	Monosyyttien kemotaktinen proteiini 1
MFSD8	MFS-proteiiniperheen domeeni 8
miRNA	MikroRNA, lyhyt ei-koodaava RNA-molekyyli (< 22 nukleotidia)
MP	Mannoosi-6-fosfaatti

MPR	Mannoosi-6-fosfaattireseptori
MS	Multippeliskleroosi, keskushermoston pesäkekovettumatauti
M1	M1-tyypin makrofagi, joka edistää tulehdusta
M2	M2-tyypin makrofagi, joka edistää kudosten korjausta
NCL	Neuronaalinen seroidilipofuskiinosis, NCL-tauti
NF-κB	Tumatekijä κB
NEC	Neuroepiteelisolu
NGS	Normaali vuohen seerumi
NPC	Hermosolun esiastesolu
NSC	Hermokantasolu
Nurr	Tumareseptoriin liittyvä NR4A-perheen proteiini
OB	Hajukäämi ( <i>bulbus olfactorius</i> )
O4	Oligodendrosyytti -vasta-aine
Olig	Oligodendrosyyttispesifinen proteiini
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PD	Parkinsonin tauti
Pol II	DNA-polymeraasi II
PPAR	Peroksisomin proliferaattoriaktivoitu reseptori
PPT1	Palmitoyyiliproteiini-esteriäsi 1
RAR	Retinoidihapporeseptori
RGC	Radiaaligliasolu
ROS	Reaktiivinen happiradikaali
SAP	Sfingolipidiä aktivoiva proteiini, saposiini
SCMAS	Mitokondrion ATPsyntaasin alayksikkö c
SGZ	Subgranulaarinen alue hippokampuksessa
SOD	Superoksididismutaasi-entsyymi
SVZ	Subventrikulaarinen alue aivokammion reunalla
Th2	Tyypin 2 T-auttajasolu
TNF	Tuumorinekroositekijä
TPP1	Tripeptidyylipeptidaasi 1
TUJ1	Neuronien mikrotubulusten luokan III β-tubuliiniit
UPR	Laskostumattomien proteiinien hajotus
UPS	Ubikitiini-protosomi-systeemi
VEGF	Verisuonen endoteelin kasvutekijä
WT	Villityyppi
9cRA	9-cis-retinoidihappo

## SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	2
2 NCL-TAUTI.....	3
2.1 Esiintyvyys ja genetiikka.....	4
2.2 CLN5-tautimuoto.....	6
2.3 Keskeiset patologiset piirteet.....	11
3 AIVOJEN KANTASOLUT.....	17
3.1 Kantasolujen lähteet ja tyypit.....	18
3.2 Neurogeneesi.....	19
3.3 Neurogeneesin säätely.....	22
3.4 Kantasolujen häiriintynyt toiminta.....	25
4 HOITOMUODOT JA TERAPEUTTISET YHDISTEET.....	26
4.1 NCL-tautien hoitomuodot.....	26
4.2 Terapeuttiset yhdisteet.....	28
5 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEESIT.....	34
6 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	34
6.1 Hermokantasolujen eristys ja viljely.....	35
6.2 Terapeuttisten yhdisteiden altistuskokeet.....	38
6.3 BrdU-proliferaatiokoe.....	39
6.4 Solujen immunovärjäys.....	40
6.5 Analysointi ja tilastollinen käsittely.....	42
7 TULOKSET.....	44
7.1 Neurosfeerien viljely ja pakastaminen.....	44
7.2 Genotyypin vaikutus solujen kasvuun, liikkumiseen ja erilaistumiseen.....	45
7.3 Terapeuttisten yhdisteiden vaikutukset.....	51
8 TULOSTEN TARKASTELU.....	66
8.1 Menetelmien rajoitteet.....	67
8.2 CLN5-taudin vaikutus hiiren kantasoluihin.....	68
8.3 Interleukiini 33.....	69
8.4 GW0742.....	70
8.5 HX600.....	72
9 JOHTOPÄÄTÖKSET.....	73
KIITOKSET.....	74
LÄHDELUETTELO.....	75
LIITTEET.....	

## 1 JOHDANTO

Hermosolujen tuotanto ja kuolema ovat keskeisessä osassa hermoston ja aivojen erilaistumisessa sikiönkehityksen aikana, mutta myös niiden ylläpidossa aikuisena (Winner ym. 2011). Uusia hermosoluja muodostuu neurogeneesiksi kutsutussa prosessissa. Neurogeneesissä havaitaan muutoksia hermorappeumasairauksien yhteydessä ja muutokset liittyvät jo varhaisiin oireisiin, kuten masennukseen, ahdistuneisuuteen ja hajuaistin häiriöihin (Sahay & Hen 2007, Simuni & Sethi 2008). Neurogeneesin häiriöillä näyttääkin olevan rooli kroonisissa keskushermostoa vaurioittavissa sairauksissa (Arvidsson ym. 2002, Rice ym. 2003, Parent 2003).

Hemorappeumasairauksissa hitaasti etenevät prosessit johtavat aivojen ja selkäytimen neuronien ja hermotukisolujen toiminnan häiriintymiseen ja surkastumiseen (Glass ym. 2010). Vaikka sairauksien kirjo on laaja ja neuronien surkastuminen alkaa yleensä sairaudelle ominaisista solupopulaatioista (dopaminergisistä neuroneista Parkinsonin taudissa, aivojuovion neuroneista Huntingtonin taudissa, liikeneuroneista ALS-taudissa ja kortikaalisista ja hippokampuksen neuroneista Alzheimerin taudissa), on hermorappeumasairauksilla monia yhteisiä piirteitä, joihin kuuluvat muun muassa tulehdusvaste, epänormaalit proteiinikertymät ja solukuolema (Winner ym. 2011). Lisäksi neurogeneesi on vähentynyt ja häiriintynyt, minkä vuoksi hermosoluja tuottavat alueet ovat erityisen alttiita rappeumalle.

Hermokantasolujen toimintaa säätelevät mekanismit ovat edelleen huonosti tunnettuja, eikä tiedetä, kuinka hermorappeumasairaudet vaikuttavat kantasolujen toimintaan. Joissakin tautimalleissa mutatoituneiden geenien on kuitenkin havaittu osallistuvan neurogeneesin säätelyyn (Luo & O' Leary 2005, Paridaen & Huttner 2014). Neurogeneesin ymmärtäminen voi johtaa hermorappeumasairauksille ominaisten signaalintireittien ja niitä muokkaavien molekyylien tunnistamiseen. Lisäksi hermokantasoluja stimuloimalla voidaan tulevaisuudessa kenties lisätä sisäsyntyistä neurogeneesiä ja siten jopa kumota sairauksien aiheuttamia vaurioita.

Tässä tutkielmassa tarkastellaan hermosolujen uusiutumista suomalaisen tautiperintöön kuuluvassa lasten hermorappeumasairaudessa, CLN5-taudissa, joka on CLN5-variantin aiheuttama myöhäinen infantiili neuronaalinen seroidilipofuskiinosis (INCL). Hermosolujen jakautumista (proliferaatio), vaellusta (migraatio) ja erilaistumista tutkitaan hiirimallien ja soluviljelmien avulla. Lisäksi tarkastellaan kolmen mahdollisesti terapeuttisen yhdisteen, interleukiini 33:n, GW0742:n ja HX600:n, vaikutusta neurogeneesiin.

## 2 NCL-TAUTI

Neuronaaliset seroidilipofuskinoosit eli NCL-taudit ovat ryhmä usein lapsuusiässä ilmeneviä keskushermostoa rappeuttavia sairauksia, jotka johtavat kehitysvammaisuuteen ja varhaiseen kuolemaan (Mole ym. 2011, [www.ucl.ac.uk/ncl](http://www.ucl.ac.uk/ncl)). Tyypillisiä oireita ovat henkinen ja motorinen taantuminen, dementia, epileptiset kohtaukset sekä silmänpohjan rappeutuminen ja siitä johtuva sokeutuminen (Boustany, Alroy ja Kolodny 1988, Rider & Rider 1988). Vaikka NCL-taudit ovat oirekuvaltaan samankaltaisia, ne eroavat oireiden vakavuuden, alkamisiän ja etenemisnopeuden suhteen. Suomessa NCL-taudit ovat yleisimpiä progressiivisia lasten aivosairauksia ja ne kuuluvat tautiperintöömme (Mole ym. 2011).

Kaikissa tautimuodoissa kudoksiin, erityisesti neuroneihin, kerääntyy aineita, jotka muistuttavat ulkonäöltään ikääntymisen seurauksena kertyviä lipopigmenttejä, seroidia ja lipofuskiinia (Palmer ym. 2013). Neuronaaliset seroidilipofuskinoosit -nimi on säilynyt, vaikka tekniikan kehittymisen myötä kertymien koostumuksen on havaittu poikkeavan ikääntymisen seurauksena muodostuvista kertymistä (Boustany 2013). Oirekuvan perusteella NCL-taudit on luokiteltu yhteen myös Niemann-Pickin ja Tay–Sachs tautien kanssa. Lisäksi sairautta tutkineiden henkilöiden – Batten, Vogt, Janský ja Bielschowsky – nimiä on käytetty kuvaamaan tautien eri muotoja. Nykyisin kaikki edellä mainitut sairaudet luokitellaan lysosomaalisten kertymäsairauksien kattotermin alle, koska niissä haitalliset aineet kerääntyvät solunsisäisesti erityisesti lysosomeihin, jotka ovat kalvon ympäröimiä soluorganelleja (Boustany 2013).

NCL-taudeille ei ole parantavaa hoitoa ja nykyisillä hoitomuodoilla voidaan lähinnä lieventää taudin oireita. Muiden lysosomaalisten kertymäsairauksien ja joidenkin NCL-tautimuotojen hoidossa on kuitenkin saatu lupaavia tuloksia entsyymikorvaushoidolla, geeniterapialla ja kantasoluterapialla (Wong ym. 2010). NCL-tautien taustalla olevat geenimutaatiot tunnetaan melko hyvin ja niitä hyödynnetään varsinkin sairauden diagnosoinnissa. Tautigeenien koodaamien proteiinien toimintaa ei kuitenkaan tunneta tarkasti, minkä vuoksi tarvitaan edelleen tutkimusta sairauksien molekyylipatologian ymmärtämiseksi ja parempien hoitomuotojen kehittämiseksi.



## 2.1 Esiintyvyys ja genetiikka

NCL-tauti luokitellaan harvinaiseksi sairaudeksi ja sen keskimääräinen maailmanlaajuinen esiintyvyys on 1:12 500 syntynyttä lasta kohden (Rider & Rider 1988, Mole ym. 2011). Sairautta tavataan kaikkialla maailmassa, mutta esiintyvyys vaihtelee maantieteellisen sijainnin mukaan ja Suomessa NCL-taudit ovat yleisimpiä eteneviä lasten aivosairauksia (Varilo ym. 1996, Mole ym. 2011). Myös muualla Skandinavian alueella tavataan runsaasti tiettyjä tautimuotoja (CLN1, 3, 5 ja 8), mutta esimerkiksi Islannissa taudin yleisyys on vain 1:14 000. Muualla Euroopassa taudin ilmeneminen on harvinaisempaa ja esimerkiksi Italiassa ja Saksassa esiintyvyys on 1:67 000. NCL-tauti ei ole rajoittunut vain ihmisiin, vaan sitä esiintyy myös eläimillä kuten koirilla ja lampailla (Jalanko & Braulke 2009).

Geneettisesti NCL-taudit ovat monimuotoisia (taulukko 1). Tällä hetkellä tunnetaan ainakin 14 geneettisesti erillistä tautimuotoa, jotka johtuvat eri kromosomeissa sijaitsevien CLN-geenien (ceroid-lipofuscinosis, neuronal) mutaatioista (Boustany 2013). Historiallisten nimitysten kirjavuuden vuoksi tautimuotoja kutsutaan nykyisin niiden geenipaikan mukaisilla symboleilla: CLN1-CLN14. Näissä neljässätoista geenissä on tunnistettu yli 400 taudin aiheuttavaa mutaatiota ja saman geenin erilaiset mutaatiot, riippuen mutaation sijainnista proteiinituotteen aktiiviseen kohtaan verrattuna, voivat aiheuttaa eri iässä alkavia tai toista tautimuotoa vastaavia oireita (Warrier ym. 2013). Lisäksi on olemassa epätyypillisiä tautimuotoja, kuten CLN9, joiden genetiikkaa ei ole vielä selvitetty. Suurin osa CLN-geeneistä on autosomaalisia ja ne periytyvät resessiivisesti, mutta aikuisiässä puhkeava CLN4-tautimuoto on dominoivasti periytyvä (Haltia & Goebel 2012).

Vaikka CLN-geenit ja niiden mutaatiot tunnetaan suhteellisen hyvin, niiden proteiinituotteiden tehtävät ovat suurelta osin tuntemattomia (taulukko 1). CLN-proteiinit voidaan jakaa karkeasti kahteen luokkaan: liukoisiin lysosomaalisiin proteiineihin ja kalvoproteiineihin (Hughes ym. 2014). Liukoisten proteiinien (CLN1, 2, 4, 5, 10, 11, 13, 14) toiminta tunnetaan ainakin osittain ja monet niistä osallistuvat proteiinien entsyymaattiseen hajotukseen. Kalvoproteiinien (CLN3, 6, 7, 8, 12) toimintaa ei tunneta yhtä hyvin, mutta niissä on kalvon läpäiseviä domeeneja, jotka ovat kiinnittyneet endoplasmiseen solulimakalvostoon (ER) tai kalvon ympäröimiin soluorganelleihin, kuten endosomeihin, lysosomeihin tai synapsirakkuloihin (Kollmann ym. 2013). Kalvoproteiinien arvellaan osallistuvan kuljetusvesikkelien ja kalvojen

*Taulukko 1: NCL-tautimuodot, niihin liittyvät proteiinit ja näiden tehtävät, kertyvän aineen pääkomponentit ja kliininen fenotyyppi. SAP = saposiini, SCMAS = mitokondrion ATP syntaasin alayksikkö c. Ilmeneminen: C = syntymässä, I = infantiili (6-18 kk), LI = myöhäinen infantiili (2-4 v.), vLI = vaihteleva myöhäinen infantiili, J = juveniili (5-10 v.), A = aikuisiän. (Muokattu: Mole ym. 2005, Kollmann ym. 2013, Boustany 2013, Shacka 2012, Smith ym. 2012).*

Geeni	Proteiini	Proteiinin tehtävä	Kertyvä aine	Muita nimityksiä ja yleisin alkamisikä
CLN1	PPT1 Liukoinen	Palmitoyylitioesteraasi (palmitoyyyliproteiinitioesteraasi)	SAP	Santavuori–Haltian tauti / INCL (6-18 kk)
CLN2	TPP1 Liukoinen	Seriiniproteaasi (tripeptidyylipeptidaasi)	SCMAS	Jansky–Bielschowskyn tauti / LINCL (2-4 v.)
CLN3	CLN3 Kalvoproteiini	Tuntematon (kuljetusvesikkelit)	SCMAS	Battenin / Spielmeier–Sjögrenin / Vogt– Spielmeierin tauti / JNCL (4-10 v.)
CLN4	DNAJC5/ CSP $\alpha$ Liukoinen	Hsc70 ko-kaperoni, neuronien synapsien eksosytoosi, endosytoosi	SCMAS	Kufsin tauti / Parry'n tauti / Aikuisiän autosomaalinen dominantti / CLN4B / ANCL (15-50 v.)
CLN5	CLN5 Liukoinen	Tuntematon (kuljetusvesikkelit)	SCMAS	Suomalainen myöhäinen infantiili variantti / vLINCL (4-7 v.)
CLN6	CLN6 Kalvoproteiini	Tuntematon	SCMAS	CLN6 vLINCL (2-6 v.) ; CLN4A / aikuisiän autosomaalinen resessiivinen Kufsin taudin tyyppi A
CLN7	MFSD8 Kalvoproteiini	Tuntematon (kalvotransporterit)	SCMAS	Turkkilainen myöhäinen infantiili variantti / vLINCL (2-7 v.)
CLN8	CLN8 Kalvoproteiini	Tuntematon (lipidimetabolia)	SCMAS	Pohjoinen epilepsia (EPMR) / vLINCL (3-7 v.)
CLN9	–	Tuntematon (keramidisynteesi)	SCMAS	JNCL
CLN10	Katepsiini D (CTSD) Liukoinen	Aspartyyliendopeptidaasi	SAP	Synnynnäinen / CNCL
CLN11	Progranuliini (GRN) Liukoinen	Tuntematon (tulehdusvaste, embryogeneesi, solujen liikkuvuus, tuumorogeneesi)	-	Aikuisiän / ANCL
CLN12	ATP13A2 Kalvoproteiini	Tuntematon (ionihomeostasia)	-	Kufor–Rakeb syndrooma / Parkinsonin tauti 9 (PARK9) / vJNCL / ANCL
CLN13	Katepsiini F (CTSF) Liukoinen	Kysteiiniproteaasi	-	Aikuisiän Kufsin taudin tyyppi B / ANCL
CLN14	KCTD7 Liukoinen	Tuntematon (ionikanavat)	-	Progressiivinen myokloninen epilepsia 3 (EPM3) / INCL

transportterien toimintaan sekä lipidimetaboliaan (Haltia & Goebel 2012). CLN-proteiinien on havaittu vuorovaikuttavan keskenään, mutta ei tiedetä, mikä on mahdollinen yhteinen signaalintireitti, joka selittäisi useiden eri geenien mutaatioiden aiheuttamat samankaltaiset patologiset fenotyypit (Persaud-Sawin ym. 2007).

## 2.2 CLN5-tautimuoto

CLN5-tauti on myöhäisellä lapsuusiällä ilmenevä ja hitaasti etenevä NCL-muoto ( $vLINCL_{Fin}$ ), jonka aiheuttaa suomalainen valtamutaatio *CLN5*-geenissä ( $CLN5_{Fin\ major}$ ) (Savukoski ym. 1998). Suomessa taudin esiintyvyys on yksi 2.6 miljoonaa asukasta kohden ja viallisen geenin kantajien osuus on 1:100, mutta Länsi-Suomessa esiintyvyys on jopa 1:1500 ja viallisen geenin kantajien osuus on 1:24 (Varilo ym. 1996, Mole ym. 2011). Tautia on tavattu myös muualla maailmassa lukuisten mutaatioiden aiheuttamana, mutta usein vain muutamissa perheissä.

Yleensä CLN5-taudin ensimmäisenä oireena havaitaan psykomotorisen kehityksen hidastuminen 4-7-vuoden iässä (Santavuori ym. 1982, 1993, Tyynelä ym. 1997, Xin ym. 2010). Kuten muissakin NCL-tautimuodoissa, oireiden ilmaantumisikä ja järjestys vaihtelee jonkin verran. Kognitiivisten kykyjen heikkeneminen ilmenee dementiana ja älykkyydosamäärän alenemisena. Motoristen taitojen taantumiseen liittyy aluksi kömpelyyttä, hallitsemattomia lihasnykäyksiä ja ataksiaa eli tahdonalaisten liikkeiden koordinaation häiriötä, joka voi ilmetä esimerkiksi tasapainovaikeutena, haparointina ja leveäraiteisena kävelynä (Santavuori ym. 1991). Myöhemmin lihasjäykkyys lisääntyy eikä potilas kykene enää kävelemään. Myös puheen tuottaminen vaikeutuu ja nielemisen vaikeutuminen voi johtaa painon laskuun ja ravinnonsaannin alentumiseen. Lisäksi taudille ovat tyypillistä epileptiset oireet sekä sokeuteen johtava nopeasti etenevä silmänpohjan rappeuma ja näköhermon surkastuminen. Suurimmalla osalla CLN5-potilaista ei ole käytöksen häiriötä, mutta univalverytmin muutokset ovat yleisiä. Sairaus johtaa ennenaikaiseen kuolemaan 14-36 -vuoden ikään mennessä.

*CLN5*-geeni ilmenee kaikissa kudoksissa, mutta sairauteen liittyvät makroskooppiset poikkeavuudet rajoittuvat lähinnä aivoihin, silmänpohjaan ja näköhermoon (Savukoski ym. 1998, Birch 1999, Jardim 2010). Aivoissa esiintyy vakavaa aivokuoren ja pikkuaivojen surkastumista sekä muutoksia hippokampuksen eli aivoturson neuronien selviytymisessä (Autti ym. 1992, Savukoski ym. 1998, Haltia 2003, Tyynelä ym. 2004). Neuronikato on runsasta

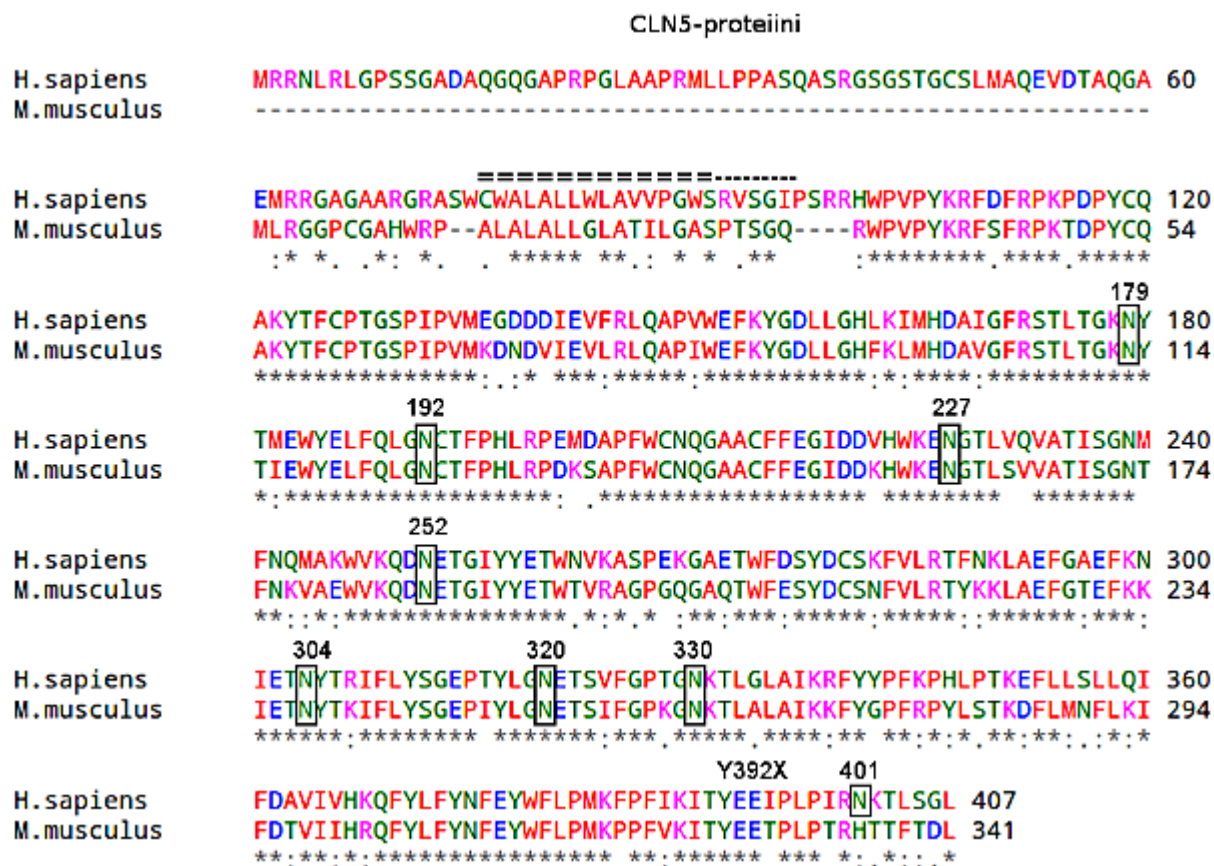
myös talamuksissa, mutta muissa aivokuoren alapuolisissa kerroksissa se on vähäisempää. Surkastumisen seurauksena aivokammiot suurentuvat ja niihin voi kertyä nestettä (Tyynelä ym. 1997). Silmänpohjan rappeumaa havaitaan varsinkin keltatäplän eli makulan kohdalla, jossa näköaistinsolujen tiheys on suurin (Birch 1999, Mole ym. 2011). Silmänpohjan solukerrosten paksuus ohenee ja neuronien määrä vähenee gangliokerroksessa. Sen sijaan valoreseptorikerroksessa ja pigmenttiepiteelissä on vain vähäisiä muutoksia. Lisäksi aivojen valkoisen aineen eli aksonien määrä ja niiden myelinaatio vähentyy, kun taas tuledusvasteesta ja immuunipuolustuksesta vastaavien astrosyyttien, mikrogliaisolujen ja makrofagien määrä lisääntyy (Tyynelä ym. 1997).

### 2.2.1 *CLN5*-geeni ja proteiinituotteet

Ihmisellä *CLN5*-geeni sijaitsee 13q21-q32 kromosomissa ja koostuu neljästä eksonista (Savukoski ym. 1994, 1998, Varilo ym. 1996). Se koodaa 407 aminohapon polypeptidiä, jonka molekyyli­massa on 46 kDa (kuva 1) (Savukoski ym. 1998, Schmiedt 2012). Geenin koodaama *CLN5*-proteiini ei ole homologinen minkään tunnetun proteiinin kanssa, eikä sen tarkkaa tehtävää tunnetta. Alun perin se kuvattiin joko kalvon läpäiseväksi tai liukoiseksi proteiiniksi, sillä siinä on kaksi hydrofobista jaksoa, jotka voidaan määrittää kalvon läpäiseviksi helikseiksi (Savukoski ym. 1998, Vesa ym. 2002, Kyttälä ym. 2006, Bessa ym. 2006). Sitten­min proteiini on osoitettu olevan liukokoinen lysosomaalinen glykoproteiini eli glykaani (Isosomppi ym. 2002, Holmberg ym. 2004, Sleat ym. 2006, Schmiedt ym. 2010, Larkin ym. 2013).

*CLN5*-proteiini syntetisoidaan prekursorimuodossa, jolloin sen N-terminaalisis­sa päässä oleva kalvon läpäisevä domeeni on kiinnittynyt lysosomin kalvoon. Prekursori kuitenkin glykosyloituu nopeasti ja se katkaistaan kalvon läpäisevän domeenin kohdalta, minkä seurauksena lopullinen proteiinituote vapautuu lysosomiin. C-terminaalisen hydrofobisen jakson on puolestaan osoitettu ottavan amfipaattisen muodon, joten se ei ole kalvon läpäisevä. Aminohappojärjestyksen perusteella *CLN5*-proteiinissa on kahdeksan N-glykolysaatiokohtaa, ja solumalleilla on havaittu 60-75 kD painoisen glykosyloituneen polypeptidin olemassaolo (Isosomppi ym. 2002, Vesa ym. 2002). Kolmen glykaanin on havaittu sisältävän mannoosi-6-fosfaattia (MP) kohdissa N320, N330 ja N401 (Isosomppi ym. 2002, Sleat ym. 2006, Schmiedt ym. 2010). Mannoosin lisäksi *CLN5*-proteiiniin voi liittyä myös monimutkaisempia sokereita.

Muita mahdollisia proteiinin modifikaatioita ovat fosforylaatio ja myristoilylaatio eli myristoilyli-rasvahapon kovalenttinen liittyminen proteiiniin.



Kuva 1: Ihmisen (*H. Sapiens* NP\_006484.1) ja hiiren (*M. Musculus* NP\_001028414.1) ortologisten CLN5-proteiinien aminohapposekvenssien vertailu ClustalW2-ohjelmalla. Ennustettu hydrofobinen signaalisekvenssi on merkitty yhtäsuuruusmerkillä (=), mahdollinen N-terminaalinen leikkauskohta katkoviivalla (-) ja suomalaisen valtamutaation sijainti Y392X-merkinnällä. Mustat laatikot osoittavat konservoituneet N-glykosylaatiokohdat. Identtiset aminohapot (\*), vahvasti samankaltaiset aminohapot (:), heikosti samankaltaiset aminohapot (Holmberg ym. 2004, Moharir ym. 2013).

CLN5-taudin aiheuttava suomalainen valtamutaatio on kahden emäksen deleetio neljännessä eksonissa (c.1175delAT) ja se aiheuttaa muutoksen vastaavassa polypeptidin kohdassa p.Tyr392X (Savukoski ym. 1998, Holmberg ym. 2000). Deleetio johtaa lukukehyyksen muutokseen ja geenin koodaaman polypeptidiketjun lyhentymiseen 407 aminohaposta 391 aminohappoon. CLN5-geenistä on raportoitu yhdeksän luonnollisesti esiintyvää polymorfismia, joista osaa on tavattu myös CLN6 ja CLN7 tautimuodoissa (Savukoski ym. 1998, Xin ym.

2010). Lisäksi geenissä on havaittu useita muita mutaatioita, joista ainakin 35 on tunnistettu (Savukoski ym. 1998, Holmberg ym. 2000, Bessa ym. 2006, Sleat ym. 2006, Lebrun ym. 2009, Xin ym. 2010, <http://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN5mutationtable.htm>). Määritettyihin mutaatioihin kuuluu missense-mutaatioita, jossa kodoni koodaa eri aminohappoa, lukukehyksen muutoksen aiheuttavia pieniä deleetioita tai insertioita, laajoja deleetioita ja nonsense-mutaatioita, joissa mutaatio aiheuttaa polypeptidiketjun syntetisoinnin päättävän stop-kodonin.

CLN5 ilmenee normaalisti lysosomeissa, mutta myös muualla solussa (Isosomppi ym. 2002, Vesa ym. 2002, Holmberg ym. 2004). Sairauteen liittyvät mutaatiot eivät vaikuta CLN5-proteiinin sijaintiin, mutta ne häiritsevät proteiinin kuljetusta lysosomeihin ja joissakin tapauksessa aiheuttavat proteiinin palautumisen ER:lle tai Golgin laitteelle (Lebrun ym. 2009, Schmiedt ym. 2010, Isosomppi ym. 2002). Tämä viittaa siihen, että mutaatio ei välttämättä aiheuta proteiinin vääränlaista laskostumista, vaan voi suoraan vaikuttaa sen toimintakykyyn.

CLN5-proteiinin kuljetusmekanismia lysosomeihin ei tunneta, mutta koska CLN5-proteiinin on osoitettu sitovan MP:tä, on mannoosi-6-fosfaattireseptori (MPR) välitteistä kuljetusreittiä ehdotettu siirtomekanismiksi (Sleat ym. 2006). Yleensä liukoiset proteiinit kuljetetaan lysosomeihin MPR-reittiä käyttäen, ja tällöin MP-merkitty proteiini tunnistetaan Golgin laitteella ja ohjataan endosomin kautta lysosomille (Rouille ym. 2000, Pohl ym. 2009). Toisaalta CLN5-proteiinin on havaittu vuorovaikuttavan myös toisen lysosomaalisen sortiliini-kuljetusproteiinin kanssa. Kummankaan mekanismin ei ole kuitenkaan todistettu siirtävän CLN5-proteiinia lysosomiin, minkä lisäksi CLN5 siirtyy lysosomiin myös näistä kuljetusproteiineista riippumattomalla, edelleen tuntemattomalla tavalla (Schmiedt ym. 2010, Mamo ym. 2012).

Lysosomaalisten kuljetusproteiinien ja CLN5:n välille onkin ehdotettu vaihtoehtoista vuorovaikutusmekanismia. CLN5-proteiinin on esitetty ohjaavan MPR:n ja sortiliinin kuljetusta säätelemällä retromeerien käyttöönottoa endosomeissa (Mamo ym. 2012). Retromeerit siirtävät molekyyliä endosomeista Golgin laitteelle. Tätä mallia tukee se, että soluissa, joissa CLN5:n toiminta on estetty, sortiliini ja MPR hajotetaan lysosomeissa, koska retromeerin käyttöönotto on estynyt ja siten reseptoreja ei voida palauttaa Golgin laitteelle. Myös retromeerejä aktivoivassa järjestelmässä on havaittu häiriöitä sairauden yhteydessä. CLN5:n muita mahdollisia tehtäviä soluissa ei tunneta.

### 2.2.2 Cln5-hiirimalli

NCL-tauteja tavataan ihmisen lisäksi myös muilla selkärankaisilla eläimillä ja nisäkkäillä *Cln5*-geenisekvenssi on melko konservoitunut (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/animal.shtml>). Sairausten aiheuttavia luonnollisesti esiintyviä mutaatioita on havaittu *Cln5*-geenin ortologeissa muun muassa koirilla, lampailla ja muilla sorkkaeläimillä (Melville ym. 2005, Houweling 2006, Frugier ym. 2008). Eläinmallit ovat korvaamattomia NCL-tautien mekanismien selvittämisessä ja useille tautimuodoille on kehitetty transgeenisia hiirimalleja, joiden avulla aivojen hermorappeuman syitä voidaan tutkia. Myös CLN5-taudille on kehitetty poistogeeninen *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirimalli (Kopra ym. 2004).

Hiiren *Cln5*-geeni koodaa 341 aminohapon mittaista polypeptidiä, jonka sekvenssi on hyvin samanlainen ihmisen CLN5-proteiinin kanssa 102:sta aminohaposta lähtien (kuva 1) (Holmberg ym. 2004, Kopra ym. 2004). Lisäksi hiiren CLN5-proteiini on toiminnaltaan samankaltainen kuin ihmisellä, sillä se on liukoinen, siinä on havaittu vaihtoehtoisia silmukointia ja se ilmentyy samoilla aivojen alueilla (Autti ym. 1992, Heinonen ym. 2000, Holmberg ym. 2004). *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirimallissa *Cln5*-geeni on tehty toimimattomaksi siirtämällä kolmanteen eksoniin neomysiini-geenisegmentti (Kopra ym. 2004). Tämä aiheuttaa geenin lukukehyyksen muutoksen ja ennen aikaisen stop-kodonin muodostumisen, mikä johtaa lyhentyneen proteiini-tuotteen syntymiseen. Mutaatio muistuttaa ihmisen CLN5-geenin Glu253Stop-mutaatiota (Holmberg ym. 2000).

Neurologisen fenotyypin kehittyminen *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirimallissa on suhteellisen hidasta, mistä poikkeuksena on jo varhaisessa vaiheessa alkava näkökyvyn heikkeneminen, joka johtaa nopeasti sokeuteen (Kopra ym. 2004, Shacka 2012). Hiirillä ei ole raportoitu poikkeavaa käyttäytymistä, motoristen kykyjen heikkenemistä tai epileptisiä kohtauksia, eikä niiden elinikää ole raportoitu kirjallisuudessa, vaikkakin fenotyyppiä on kuvattu 12 kuukauden ikäisissä yksilöissä (Kopra ym. 2004, von Schantz ym. 2009). *Cln5*-geenin puuttuminen aiheuttaa kuitenkin useiden immuunipuolustukseen, tulehdusvasteeseen ja neurodegeneraatioon liittyvien geenien voimistunutta ilmentymistä hiirten aivoissa (Kopra ym. 2004). Lisäksi havaitaan myelinaation, lipidimetabolian, fosforylaation, RNA-prosessoinnin, sytoskeletonin ja soluadheesion häiriintymistä (von Schantz ym. 2008, Schmiedt ym. 2010).

Aivojen surkastuminen on merkittävää vasta iäkkäillä *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirillä, mutta muutoksia so-

lujen toiminnassa havaitaan jo varhaisessa vaiheessa (Kopra ym. 2004, Shacka 2012). Autofluoresoivaa ainetta kertyy perifeerisiin kudoksiin ja keskushermostoon samoille alueille kuin CLN5-potilailla. Erityisesti GABAergisten välineuronien tuhoutuminen on voimakasta Cln5<sup>-/-</sup>-hiirten aivokuorella, hippokampuksessa, keskiaivoissa ja pikkuaivoissa. Jäljelle jäävien GABAergisten välineuronien kasvu voimistuu ja niiden dendriittien morfologia muuttuu (Cooper 2003). Pikkuaivojen Purkinjen solujen katoon saattaa liittyä glutamaattireseptorien aktivoitumista ja synapsien patologiaa (Yue ym. 2002, Mennini ym. 2002, von Schantz ym. 2009). Kudopatologia talamokortikaalisilla alueilla tapahtuu Cln5<sup>-/-</sup>-hiirillä päinvastaisessa järjestyksessä verrattuna muihin NCL-tautimalleihin, sillä kortikaaliset neuronit surkastuvat ennen kuin vaikutukset talaamisissa neuroneissa näkyvät (von Schantz ym. 2009).

Kaiken kaikkiaan Cln5<sup>-/-</sup>-hiirten patologia vastaa CLN5-taudin potilaiden kliinistä taudinkuvaa (Kopra ym. 2004, Autti ym. 1992, Haltia 2003, von Schantz ym. 2009). Verrattuna esimerkiksi CLN1-tautimuodon hiirimalliin, Cln5<sup>-/-</sup>-hiiret osoittavat lievää sairauden fenotyyppejä (Gupta ym. 2001). Cln5<sup>-/-</sup>-hiirimallissa havaittavia muutoksia esiintyy myös ikääntymisen myötä, ja koska Cln5<sup>-/-</sup>-hiirillä ei havaita merkittävää aivojen atrofiaa, on sitä ehdotettu myös ikääntymiseen liittyvien molekulaaristen prosessien tutkimukseen (Kopra ym. 2004).

### 2.3 Keskeiset patologiset piirteet

Useat solujen prosessit ovat häiriintyneet NCL-taudeissa ja yhdessä häiriöt saavat aikaan neuronien kuolemaan johtavien signaalintireittien aktivoitumisen, mistä seuraa aivokudoksen surkastumista (Puranam 1999, Persaud-Sawin ym. 2002, Persaud-Sawin 2007, Ballabio & Gieselmann 2009). CLN-geenien koodaamat proteiinit eivät itse muodosta kertymiä lysosomeihin, mikä viittaa siihen, että proteiinit osallistuvat prosesseihin, kuten kalvojen uusiutumiseen tai endosomien ja lysosomien toimintaan, mikä johtaa toissijaisten aineiden kertymiseen (Ballabio & Gieselmann 2009, Schultz ym. 2011). Suuri osa tautimuodoista aiheutuukin kalvoproteiinien toiminnan häiriintymisestä. Tyypillisiä häiriöitä ovat myös tulehdusvaste ja solutason stressi (Jalanko ym. 2005, Maiuri 2007, Schultz ym. 2011). Lisäksi NCL-tautien yhteydessä on havaittu häiriöitä lipidien kuljetuksessa ja kalsiumin homeostasiassa ER:lla (Ciechanover 2012, Platt & Lachmann 2009). Myös neuronien viestintää nopeuttavien myeliinituppien rakenteessa tapahtuu muutoksia, mikä aiheuttaa aksonien surkastumista.



### 2.3.1 Lysosomaaliset proteiinikertymät

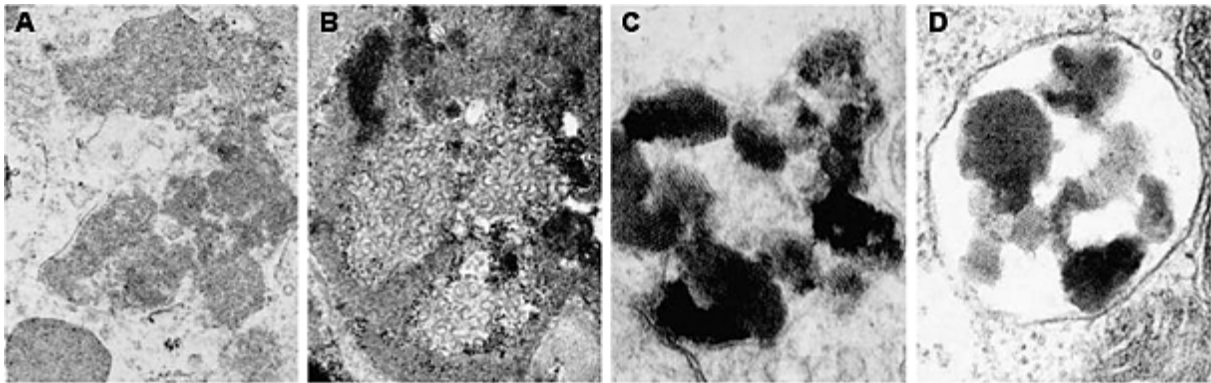
Keskeisin patologinen piirre NCL-taudeissa on post-mitoottisten solujen lysosomeihin muodostuvat kertymät (Mole ym. 2011, Palmer ym. 2013). Kertymiä muodostuu kaikkialle kehoon, mutta erityisen runsaasti aivojen neuroneihin ja silmänpohjan pigmenttiepiteelisoluihin. Kertymät havaitaan kellertävän ruskeina, autofluoresoivina ja elektronitiheinä jyväsinä ja ne muistuttavat histokemiallisesti rasvojen hapettumisessa muodostuvia lipopigmenttejä, seroidia ja lipofuskiinia, jotka koostuvat lipideistä, sokereista ja metalleista (Mole ym. 2011, Palmer ym. 2013, Palmer ym. 2013, Petkau & Leavitt 2014). Seroidia ja lipofuskiinia kertyy soluihin myös muissa lysosomaalisissa kertymäsaairauksissa, aliravitsemuksen ja kasvainten yhteydessä, sekä normaalin ikääntymisen myötä (Porta 2002, Boustany 2013).

NCL-taudeissa kertyvä aine koostuu pääasiassa proteiineista, joita ovat 1) mitokondrion ATP-syntaasin alayksikkö C (SCMAS) ja 2) saposiinit (SAP) eli sfingolipidien aktivaattoriproteiinit A ja D (Tyynelä ym. 1993, Goebel ym. 1996, Elleder ym. 1997). Kertyvän aineen merkittävin komponentti määrää kertymien hienorakenteen ulkonäön, jota voidaan käyttää tautimuodon tunnistamisessa. Saposiinit muodostavat rakeisia osmiofiilisiä (osmiumtetroksidilla värjäytyviä) saostumia, joita kutsutaan GROD:ksi, kun taas ATP-syntaasin alayksiköt muodostavat kaarevia, suoraa ja sormenjälkeä muistuttavia kuvioita (kuva 2). CLN5-taudissa esiintyy niitä kaikkia (Tyynelä ym. 1997).

Neuroneissa kertymien pääkomponentti on SCMAS, mutta niissä on jonkin verran myös SAP:ja (Goebel ym. 1996, Tyynelä ym. 1997). Osa kertymistä sisältää runsaasti proteolytyttistä katepsiini D:tä, joka estää autofluoresenssin. Neuroneissa tapahtuu lisäksi kertymien tiivistymistä, jolloin niihin kertyy laktosyylikeramidia eli vahamaista sfingolipidiä, johon on kiinnittynyt laktoosimolekyylillä ja sokereita sitovan konkanavaliini A -glykoproteiinin reaktiivisia yhdisteitä (Elleder 1989, Hulková ym. 2005). Lysosomeihin muodostuvien proteiinikertymien lisäksi neuroneihin kerääntyy nestettä ja mitokondrioita, minkä seurauksena neuronit suuren-  
tuvat ja kuolevat (Kimura & Goebel 1987, Walter & Goebel 1988, Mole ym. 2011, Palmer ym. 2013).

### 2.3.2 Apoptoosi ja autofagia

Lysosomien toiminta on keskeisessä roolissa CLN5-taudin patogeneesissa. Normaalisti toimiessaan nämä kalvon ympäröimät soluorganellit varastoivat ja hajottavat solujen makromolekyylejä entsyymaattisesti uudelleen käytettävään muotoon (Maiuri 2007). Siten lysosomit auttavat ylläpitämään solujen homeostaasia ja säätelevät tulehdusvastetta muun muassa hajottamalla immuunipuolustukseen liittyviä molekyylejä (Boustany 2013). Lisäksi lysosomit osallistuvat yhdessä endosomien eli solun aktiivisesta aineenotosta huolehtivien kalvorakkuloiden kanssa autofagian ja apoptoosiin säätelyyn. Lysosomi–endosomi -järjestelmä osallistuu myös neurotransmission säätelyyn kierrättämällä reseptoreja.



Kuva 2: NCL-tauteihin liittyvien kertymien hienorakenteita. (A) Osmiofilisia saostumia (GROD) silmänpohjan pigmenttiepiteelisolussa, INCL. (B) Kaarevia kuvioita verisuonen sisällä lihaksen solussa, LINCL. (C) Sormenjälkikuvioita lymfosyytissä, vLINCL. (D) Sormenjälkikuvioita lymfosyytin lysosomissa, JNCL. (Muokattu Mole ym. 2005)

Neuronien tärkeimmät kuolemaan johtavat prosessit ovat apoptoosi, autofagia ja nekroosi (Fayaz ym. 2014). Apoptoosissa eli ohjelmoidussa solukuolemassa aktivoidaan proteolyttisiä kaspaseja joko ulkosyntyisesti solukalvon reseptorien välityksellä tai sisäsyntyisesti mitokondrioista vapautuvien pro-apoptoottisten entsyymien, kuten sytokromi-c:n, vapautumisen seurauksena (Mattson 2000, Yuan ym. 2003, Danial & Korsmeyer 2004). Autofagiassa eli solujen omien osien syönnissä lysosomaaliset entsyymit hajottavat solun rakenneosia uudelleen käytettävään muotoon (B'chir ym. 2013). Autofagia toimii selviytymiskeinona stressitilanteissa, kuten ravinnonpuutteen aikana, mutta solun kuolemaan johtavassa autofagiassa normaali molekyylien hajotus kiihtyy ja soluun muodostuu lysosomaalista alkuperää olevia vakuoleja, minkä lisäksi mitokondriot, ER ja Golgin laite laajentuvat. Kolmanteen solukuolematyyppiin,

nekroosiin, ei liity lysosomaalista toimintaa, vaan siinä soluorganellit laajentuvat muodostaen lopulta aukkoja soluun. NCL-taudeissa lipidimetaboliaan liittyvät apoptoosi ja autofagia vaikuttavat olevan pääasialliset neuronien kuolemaan johtavat mekanismit, minkä lisäksi aivojen tulehdusvaste aktivoi prosesseja (Puranam 1999, Wyss-Coray & Mucke 2002, Koike 2005, Persaud-Sawin & Boustany 2005, Kim ym. 2006).

### 2.3.3 Tulehdusvaste ja immuunipuolustus

Neuronien degeneraation lisäksi NCL-taudeille ovat tyypillisiä pitkittynyt tulehdusvaste ja immuunipuolustuksen aktivoituminen (Boustany 2013). Neuronien vaurioituminen saa aikaan keskushermoston immuunipuolustuksesta vastaavien hermotukisolujen (astrozyttien ja mikrogliaisolujen) aktivaatioon, jolloin ne vapauttavat tulehdusvälittäjäaineita eli sytokiineja. Tulehdusvaste voimistuu entisestään käynnistyvien singalointikaskadien seurauksena (Czeh ym. 2011). Gliasolujen aktivaatio on selviytymiskeino, ja joissakin tapauksissa kuten aivokalvontulehduksessa tai pään vammassa, prosessi pysähtyy kun haitta poistuu. NCL-taudeissa havaitaan jatkuvaa gliasolujen aktivaatiota ja tulehdusta, jotka edistävät neuronien tuhoutumista. Vaikka tulehdus saattaa olla toissijainen oire NCL-taudeissa, se vaikuttaa hermorappeumaan ja on siten lupaava hoidon kohde (Seehafer ym. 2011).

Astrogliaosissa hermotukisolut eli astrozytit aktivoituvat ja lisääntyvät. Astrogliaosia tapahtuu jo neljän kuukauden ikäisten  $Cln5^{-/-}$ -hiirten aivoissa, etenkin talamuksessa, ennen kuin neuronien surkastuminen on merkittävää (von Schantz ym. 2009). Vaikka astrogliaosia on kauan pidetty hermorappeumasairauksien merkinä, gliasolujen vaste ennakoi neuronien katoa ja se voi olla neuronien toiminnan häiriintymisen seurausta (Raivich ym. 1999). Useissa NCL-taudeissa ja muissa lysosomaalisissa kertymäsairauksissa varhain ilmenevä gliavaste ennustaakin tarkasti, missä neuronikatoa tulee tapahtumaan (von Schantz ym. 2009).

Mikrogliaojen aktivaatio on voimakkainta myöhäisessä vaiheessa 12 kuukauden ikäisten  $Cln5^{-/-}$ -hiirten talamuksissa, mutta ilmiö on havaittavissa jo kolmen kuukauden ikäisillä hiirillä (Kielar ym. 2007, von Schantz ym. 2009, Schmiedt 2012). Lisäksi kymmenien immuunipuolustukseen ja tulehdusvasteeseen osallistuvien geenien (muun muassa interleukiini 16, beeta-2-mikroglobuliini ja gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini, GFAP) ilmentymisen on havaittu lisääntyvän jo kolmen kuukauden ikäisillä  $Cln5^{-/-}$ -hiirillä, mikä viittaa siihen, että tu-

lehdusvaste ennakoi myöhemmin tapahtuvaa neuronien surkastumista (Kopra ym. 2004). Riskitirittaisesti *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirten aktiivisten mikroglion ei ole havaittu tuottavan sytokiineja poikkeavia määriä *in vitro* -kokeissa, mutta mikroglion aktivoitumisen on osoitettu lisäävän *Cln5*-geenin ilmentymistä myös normaalisti toimivissa soluissa (Schmiedt 2012).

#### 2.3.4 Oligodendrosyyttien hypomyelinaatio

NCL-taudeissa neuronien viestintää nopeuttavien myeliinituppien rakenteessa tapahtuu muutoksia, mikä aiheuttaa valkoisen aineen vähenemistä ja aksonien kuolemaa (Kopra ym. 2004, Schmiedt ym. 2010). Myeliiniä tuottavat oligodendrosyytit ja niiden erilaistumisen ja kehittymisen on havaittu olevan hitaampaa *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirillä. Myeliinin vähentyminen tapahtuu samaan aikaan kuin astrogliaosi voimistuu, mutta ei tiedetä liittyvätkö nämä prosessit toisiinsa. Toisaalta on osoitettu, että reaktiivinen astrogliaosi lisää myelinaatiota ja että GFAP-proteiinin mutaatiot aiheuttavat hypomyelinaatiota (Shields ym. 2000, Talbott ym. 2005). Joka tapauksessa astrogliaosi ja oligodendrosyyttien erilaistumisen häiriintyminen ennakoivat neuronien katoa *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirimallissa.

#### 2.3.5 CLN-proteiinien vuorovaikutus

NCL-tautien yhteiset piirteet viittaavat siihen, että CLN-proteiinit toimivat samalla signaalintireitillä tai osallistuvat samoihin solun prosesseihin, vaikka tautien molekyyllitason mekanismeja ei tunnetakaan tarkasti (Suopanki ym. 2000, Lyly ym. 2009). CLN5-taudilla on yhteisiä piirteitä varsinkin nuoruusiän CLN3-tautimuodon kanssa ja niiden proteiinien toiminta liittyy keramideihin eli vahamaisiin sfingolipideihin (Haddad 2012). CLN3-proteiinin toiminta tunnetaan melko hyvin ja sen viallisuus aiheuttaa apoptoosia lipidilauttojen keramidien välityksellä (International Batten Disease Consortium 1995, Lane ym. 1996, Kyttälä ym. 2006). Normaalisti toimiva CLN3 avustaa  $\alpha$ -galaktosyylikeramidin (GalCer) siirrossa Golgin laitteelta lipidilautoille (Rusyn 2003). Viallisen CLN3:n seurauksena GalCer:n määrä vähenee, mikä aiheuttaa proteolyttisiä kaspaseja aktivoivan keramidin muodostumisen, ja johtaa apoptoosiin. Siirtämällä *CLN3* cDNA:ta tai GalCer:iä viallisiin soluihin voidaan apoptoosi pysäyttää ja palauttaa solujen kasvu normaaliksi (Boustany 2013). Myös CLN5- ja CLN8-taudeissa so-

lukuolema voi olla keramideihin liittyvä ja sfingolipidiaktivoitu (Haddad 2012). CLN6 ja CLN8 ovat endoplasmakalvoston proteiineja, joiden mutaatiot aiheuttavat erilaisia tautimuotoja, kuten Kuffsin taudin tyyppiä A ja Pohjoisen epilepsiaa (Haltia & Goebel 2012).

Häiriöt SCMAS:n hajotuksessa yhdessä mitokondrioiden määrän lisääntymisen kanssa voivat olla syynä SCMAS:n kertymiin lysosomeissa (Sikora ym. 2007). Synnynnäisessä CLN10- ja aikuisiän CLN13-tautimuodoissa mutatoituneet geenit koodaavat katepsiineja D ja F, jotka ovat kysteiiniproteaaseja ja merkittäviä lysosomien protealyyttisen järjestelmän komponentteja (Nagler ym.1999, Tyynelä ym. 2004, Arsov 2011, Haltia & Goebel 2012, Haddad 2012, Repnik 2012, Smith ym. 2013). Katepsiini D aktivoituu pro-apoptoottisen keramidin ja tuumorinekroositekijän (TNF) vaikutuksesta, mikä saa aikaan muiden pro-apoptoottisen tekijöiden ja sytokromi c:n vapautumisen sekä kaspasien aktivoitumisen. Lapsuusiän CLN2-taudin aiheuttavat puolestaan muutokset tripeptidyylipeptidaasi 1 proteiinissa (TPP1), joka on peptidien kataboliaan osallistuva karboksyylipeptidaasi (Ezaki ym. 1999). Normaalisti TPP1 aloittaa SCMAS:n hajotuksen ja katepsiini D viimeistelee sen.

Solujen lipidimetaboliassa ja lipidien kuljetuksessa havaitaan muutoksia CLN5-taudissa. Esimerkiksi seerumin kolesterolin haitallisen HDL-muodon on osoitettu kohonneen kuukauden ikäisillä *Cln5<sup>-/-</sup>*-hiirillä (Schmiedt ym. 2010). Paremmin tunnetaan lapsuusiän CLN1-taudissa havaittavat lipidimetabolian muutokset, jotka liittyvät apoptoosin aktivoitumiseen (Hofmann ym. 2002, Wei ym. 2008). Normaalisti toimiessaan palmitoyyiliproteiinitioesteraasi 1 -proteiini (PPT1) pilkkoo rasvahappoja irti proteiineista, mutta mutaatio estää rasvahappojen pilkkomisen, mistä seuraa häiriöitä kalvojen uusiutumisessa (Koike 2005). Lisäksi CLN1-potilaiden soluissa on havaittu ER-kalvoston kalsium-tasapainon häiriöitä, joiden syytä ei tunneta, mutta jotka aiheuttavat kiihtynyttä laskostumattomien proteiinien hajotusta (UPR). Tämä puolestaan laukaisee ER-stressin ja apoptoosin (Kim ym. 2006).

Muiden tautimuotojen yhteys CLN5-tautiin ei ole yhtä selkeä. Aikuisiän dominantissa CLN4-tautimuodossa DNAJC5-geeni on mutatoitunut (Noskova ym. 2011). Normaalisti toimiessaan sen koodaama CSP $\alpha$ -proteiini osallistuu muun muassa neuronien synaptisten vesikkelien toimintaan. Aikuisiän CLN11-tautimuotoon liittyvän liukoisen proteiinin, progranuliinin (GRN), tehtävää ei tunneta tarkkaan, mutta sen on havaittu osallistuvan useisiin solujen prosesseihin (Smith ym. 2012). Myöskään progressiiviseen epilepsiaan eli CLN14-tautimuotoon liittyvän liukoisen KCTD7-proteiinin tehtävää ei tiedetä, joskin sen on havaittu osallistu-

van ionikanavien toimintaan (Kousi ym. 2012). Turkkilaiseen tautimuotoon on yhdistetty CLN7-geeni, joka koodaa mahdollisesti kalvotransportterina toimivaa MFSD8-proteiinia (Ranta ym. 2004, Siintola ym. 2007). CLN12-taudissa on mutatoitunut ATPaasia koodava ATP13A2-geeni, jonka mutaatiot aiheuttavat myös Kufor-Rakeb syndroomaksi kutsutun varhaisen Parkinsonin taudin tyyppin (Bras ym. 2012). CLN9-taudin aiheuttavaa geeniä ja sen koodamaa proteiinia ei ole karakterisoitu, mutta sen arvellaan osallistuvan kalvojen lipidien synteesiin (Schulz ym. 2006).

CLN5-proteiinin saattaa muodostaa toiminnallisia komplekseja muiden NCL-proteiinien kanssa ja sen on havaittu vuorovaikuttavan varsinkin CLN1, 2, ja 3 proteiinien kanssa (Lyly ym. 2009). Proteiinien yhteistä metaboliareittiä tukee se, että 1) niiden mutaatiot aiheuttavat NCL-taudin puhkeamisen kutakuinkin samassa iässä, 2) CLN5-potilailla on havaittu edellä mainittujen proteiinien aktiivisuuden kasvua, 3) muut proteiinit kompensoivat CLN5-valtamutaation aiheuttamia häiriöitä, ja 4) CLN5 ja PPT1 vuorovaikuttavat molemmat F1-ATP-syntaasin alayksiköiden kanssa (Sleat ym. 1997, Vesa ym. 2002, Lyly ym. 2009). Tautimuotojen patologiassa voi kuitenkin olla suuriakin eroja, sillä yhtäläisyyksistä huolimatta geenien ilmentyminen ja niiden vaikutukset aivoissa vaihtelevat voimakkaasti neuronien, astroosyyttien ja mikrogliojen välillä (Cooper 2010, Sharifi ym. 2010).

### 3 AIVOJEN KANTASOLUT

NCL-taudeissa hermosolut rappeutuvat, mikä on erityisen vahingollista aivoille, sillä hermosolujen uusiutumiskyky on rajoittunutta (Collins ym. 1989, Huebner & Strittmatter 2009, Boustany 2013). Vaikka uusien neuronien muodostuminen jatkuu koko elämän ajan tietyillä aivojen alueilla, neurogeneesi ei pysty korvaamaan hermorappeumasairauksissa menetettyjä soluja (Alvarez-Buylla & Lim 2004, Lie ym. 2004). Neuronikadon hoidossa on saatu toivoa kantasoluterapioista, joissa uusia kantasoluja siirretään vaurioituneelle alueelle, tai aivojen omia kantasoluja indusoidaan lääkeaineiden avulla jakautumaan ja korjaamaan vaurioituneita alueita (Teknologiakatsaus 148/2003: Väänänen). Kantasolujen toiminnasta ja aivojen uusiutumisen säätelyyn liittyvistä kudosspesifisistä olosuhteista tarvitaan kuitenkin lisää tietoa, jotta kantasoluja voitaisiin käyttää potilaiden hoitoon. Erityisesti tarvitaan parempaa ymmärrystä sekä kantasolujen jakautumista stimuloivista tekijöistä että erilaistumisen säätelystä.

### 3.1 Kantasolujen lähteet ja tyypit

Kantasoluja voidaan eristää alkioista, sikiöstä, napaverestä, luuytimeistä ja pieniä määriä myös verestä ja muista kudoksista (Gage 2000, Kornblum 2007). Alkion kantasoluista (ES), joita saadaan ihmisellä noin 5 vuorokauden ikäisen alkion rakkulavaiheen eli blastokystin sisäsolu-massasta, voidaan edelleen erilaistaa hermokantasoluja. Hermokantasoluja voidaan eristää myös suoraan abortoitujen sikiöiden kudoksista; tai niitä voidaan tuottaa ohjelmoimalla so-maattisia soluja indusoiduiksi pluripotenteiksi kantasoluiksi (iPS) (Kärkkäinen 2012). Abortoitujen sikiöiden ja ES-kantasolujen saanti voi olla hankalaa, minkä lisäksi kantasolujen eris-täminen ja tuottaminen herättää eettisiä kysymyksiä. Käytännön tutkimuksen kannalta aikuisen solujen käyttö on helpointa, koska niitä saadaan suuria määriä aikuisilta yksilöiltä.

Kantasolut jaotellaan niiden erilaistumiskyvyn mukaan totipotentteiksi, pluripotenteiksi ja multipotentteiksi (Teknologiakatsaus 148/2003: Lehenkari & Oikarinen). Embryonaaliset kan-tasolut syntyvät alkiovaiheessa hedelmöittyneen munasolun jakautuessa ja ne ovat totipotent-teja, kaikkikykyisiä, eli ne kykenevät muodostamaan kaikkia elimistön solutyyppejä. Sikiön lisäksi ES-solut muodostavat myös istukan rakenteita. Muutaman päivän iässä ihmisen alkion solut eivät enää pysty kasvamaan uudeksi yksilöksi, mutta ne voivat edelleen muodostaa kaik-kia solutyyppejä, jolloin ne ovat pluripotenteja, täyskykyisiä, kantasoluja. Aikuisen kantasolut ovat yleensä multipotentteja eli monikykyisiä, jolloin ne voivat muodostaa useiden, mutta eivät kaikkien, kudostyyppien soluja.

Aivojen monikykyiset hermokantasolut (neural stem cell, NSC) tuottavat jakautuessaan kahdenlaisia tytärsoluja, uuden monikykyisen hermokantasolun ja pidemmälle erilaistuneen hermosolun esiastesolun (neural progenitor cell, NPC), joka voi erilaistua neuroniksi tai glia-soluksi (Gage ym. 2002, Galli ym. 2003, Bull & Bartlett 2005, Kornblum 2007). NPC-solut menettävät kyvyn muodostaa teratoomia eli kasvaimia. Ensimmäistä kertaa hermokantasoluja eristettiin aikuisten hiirten aivoista vuonna 1992, minkä jälkeen havaittiin, että viljeltäessä NPC-solut kykenevät muodostamaan pallomaisia vapaasti kelluvia solurykelmiä, neurosfere-jä (Reynolds & Weiss 1992, Doetsch ym. 2002).

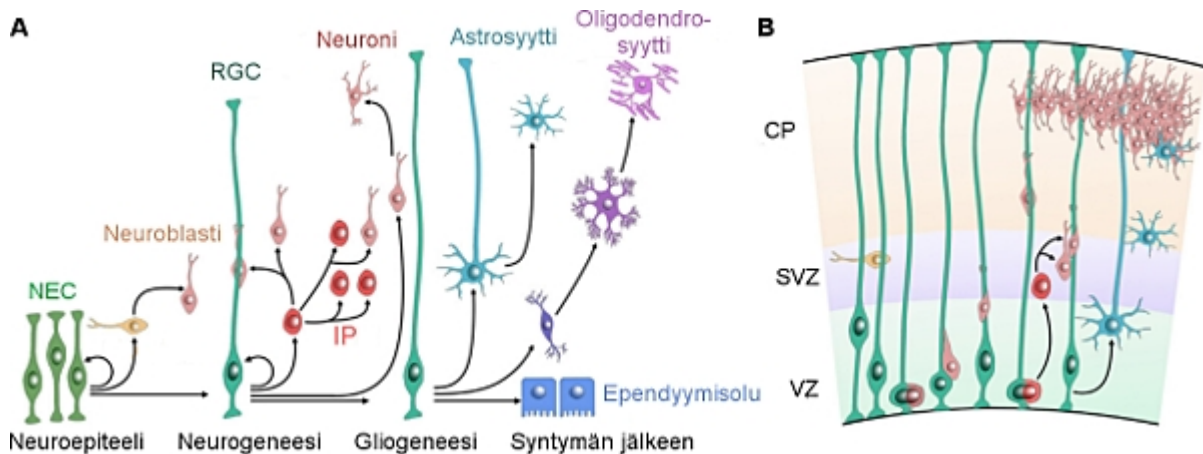
## 3.2 Neurogeneesi

Hermokantasolut saavat alkunsa neuroepiteelisoluista, joita muodostuu nisäkkään alkionkehityksen alkuvaiheessa ektodermista (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009, Barry ym. 2014). neuroepiteelisolut jakautuvat symmetrisesti ja muodostavat hermostolevyn, joka taipuu sisäänpäin hermostoputkeksi neurulaatioksi kutsutussa prosessissa. Kehityksen jatkuessa neuroepiteelisolut muodostavat keskushermoston neurogeeniset eli hermosoluja tuottavat alueet. Neurogeneesin alkuvaiheessa neuroepiteelisolut muuttuvat radiaaligliasoluiksi, jotka toimivat hermokantasoluina ja laajentavat keskushermostoa uusiutumalla ja muodostamalla aluksi neuroneita ja myöhemmin gliasoluja (Paridaen & Huttner 2014). Neuroepiteeli- ja radiaaligliasoluja kutsutaan myös hermokantasoluiksi ja NPC-soluiksi.

Neurogeneesi koostuu useista vaiheista, joihin kuuluvat hermokantasolujen lisääntyminen, erilaistuminen, liikkuminen ja neuronien välisten synaptisten yhteyksien muodostuminen (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009, Kärkkäinen 2012, Barry ym. 2014, Paridaen & Huttner 2014). Hermokantasolut ja niistä erilaistuvat solutyypit voidaan tunnistaa immunohistokemiallisesti vasta-ainemerkkiaineiden avulla, sillä solujen pinnalla tai niiden sisällä ilmentään kehitysvaiheelle tyypillisiä proteiineja, joihin vasta-aineet sitoutuvat (liite1).

Neuronaalisen erilaistumisprosessin alkuvaiheessa hermokantasolut tuottavat nopeasti jakautuvia NPC-soluja, jotka ilmentävät radiaaligliasolujen morfologiaa ja jakautuvat epäsymmetrisesti tuottaen uuden radiaaligliasolun ja erilaistuvan solun (kuva 3). Radiaaligliasolut ovat bipolaarisia ja niiden solukeskuksesta lähtee pitkä uloke, jonka arvellaan ohjaavan uusien neuronien liikkumista aivokammioista aivokalvolle (Rakic 1972, Xu ym. 2013, Barry ym. 2014). Radiaaligliasoluista saavat alkunsa lukuiset neuronin- ja gliasolutyypit, minkä lisäksi radiaaligliasolujen arvellaan osallistuvan myös aivojen kehityksellisiin prosesseihin, mutta niiden kaikkia tehtäviä ei tunneta täysin (Noctor ym. 2004, Lui ym. 2011, Franco ym. 2012, Malatesta & Gotz 2013, Pilz ym. 2013, Barry ym. 2014). Radiaaligliasolut ilmentävät tyypillisiä Nestin-, Sox2-, GFAP- ja GLAST-proteiineja, mutta NPC-soluista kehittyvät nopeasti ei-radialisia soluja, jotka eivät enää ilmennä GFAP:ta (Levitt & Rakic 1980, Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009).





Kuva 3: Hermokantasolujen erilaistuminen aivojen soluiksi. (A) Neuroepiteelisolut (NEC) jakautuvat ja muodostavat neuronien esiasteita ja varhaisia hermosoluja, neuroblasteja. Myöhemmin erilaistuvat radiaaligliasolut (RGC) jakautuvat ja kasvavat pituutta. Ne osallistuvat neurogeneesiin joko suoraan tai neuronien välimuotoisten esiastesolujen (IP) kautta. Radiaaligliasolut osallistuvat myös gliogeneesiin muodostaen astrocyyttejä ja mahdollisesti myös oligodendrosyyttejä. Osa radiaaligliasoluista erilaistuu endyymisoluiksi, jotka reunustavat aivokammioita. (B) Aivokammion reunalla radiaaligliasolut jakautuvat ventrikulaarisen alueen (VZ) pinnalla ja toimivat uusien neuronien migraatioreitteinä subventrikulaarisen alueen (SVZ) läpi kuorikerrokseen (CP). Myös astrocytyt saattavat hyödyntää tätä migraatioreittiä (Muokattu: Barry ym. 2014).

NPC-soluista kehittyvät varhaiset hermosolut eli neuroblastit, jotka kulkeutuvat määrättyille aivojen alueille ja erilaistuvat siellä alueelle tyypilliseksi neuroneiksi. Neuroblastit ilmentävät muun muassa doublecortin-proteiinia (DCX), joka säätelee ja vakauttaa mikrotubulusten järjestystä solulimassa ja ohjaa siten solujen liikkumista (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1641>, Seki & Arai 1993, Francis ym. 1999, Gleeson ym. 1999, Fukuda ym. 2003, Seri ym. 2004). Lisäksi tietyillä aivojen alueilla, kuten nisäkkäiden neokorteksilla, muodostuu tarkemmin määrättyneitä neuronien välimuotoisia esiastesoluja (intermediate progenitor, IP), jotka jakautuvat symmetrisesti tuottaen joko kaksi neuronaa tai gliasolujen ominaisuuksia ilmentävää uusiutumiskykyistä esiastesolua.

Uudet neuronit muodostavat vähitellen toiminnallisesti kypsän hermoverkoston luomalla synaptisia yhteyksiä ympäröiviin soluihin. Vain pieni osa tuhansista päivittäin muodostuvista neuroneista jää henkiin ja yhdistyy hermoston toimivaksi osaksi. Pidemmälle kehittyneet neuronit ilmentävät mikrotubulusten luokan III  $\beta$ -tubuliineja (TUJ1) ja neuro- ja aktiinifilamentteihin liittyvää proteiinia (MAP-2), jonka lokalisaatio rajoittuu solunsisäisesti neuronin solukeskukseen ja dendriitteihin (Cáceres ym. 1986, Dotti ym. 1987, von Bohlen Und Halbach

2007, Jouhilahti ym. 2008, Winner ym. 2002, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10381>). Eri-  
laisia neuronityyppejä on yli 200 ja ne ovat erilaistuneet tiedon siirtoon neurotransmission väli-  
tyksellä (Zhao ym. 2006).

### 3.2.1 Gliogeneesi

Hermokantasoluista erilaistuvat myös neuronien toimintaa avustavat hermotukisolut eli glia-  
solut, joiden päätyypit ovat astrozyytit ja oligodendrosyytit (Kriegstein & Alvarez-Buylla  
2009). Tätä prosessia kutsutaan gliogeneesiksi ja se alkaa myöhemmässä sikiönkehityksen  
vaiheessa kuin neurogeneesi ja jatkuu pidempään syntymän jälkeen. Aluksi kantasoluista  
muodostuu hermotukisolujen esiasteita eli glioblasteja, jotka erilaistuvat edelleen kypsiksi  
gliasoluiksi (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009, Barry ym. 2014, Paridaen & Huttner 2014).  
Samasta kantasolusta voi muodostua ensin hermosoluja ja sitten gliasoluja.

Astrozyytit antavat hermokudokselle mekaanista tukea ja ovat osa veri-aivoestettä. Ne  
osallistuvat myös ionien ja kemiallisen tasapainon säätelyyn. Hermokudoksen vaurioituessa  
astrozyytit vaeltavat paikalle ja muodostavat arpikudosta, minkä lisäksi ne fagosytoivat kuol-  
leita neuroneita (Lu ym. 2014). Astrozyyttejä luonnehditaan usein tähdenmuotoisiksi soluiksi,  
mutta ne koostuvat joukosta morfologisesti erilaisia soluja, joihin luetaan kuitumaiset valkoi-  
sen aineen ja protoplasmiset harmaan aineen astrozyytit sekä radiaaligliasolut (Fiacco ym.  
2014, Moraga-Amaro ym. 2014). Astrozyyttien tunnistamiseen käytetään yleensä sytoplasmis-  
ta välikokoista säieproteiinia, GFAP:ia (gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini), joka on osa  
astrozyyttien tukirankaa (Eng ym. 2000, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2670>). GFAP:n on  
havaittu kuitenkin ilmenevän useissa solutyypeissä, kuten kantasoluina toimivissa NPC-so-  
luissa, joten GFAP:hen perustuva tunnistaminen niputtaa yhteen erilaisia gliasoluja.

Oligodendrosyytit tukevat hermoimpulssin nopeaa etenemistä neuroneissa muodostamalla  
aksonien ympärille eristävän myeliinitupen (Szuchet 1995). Myös oligodendrosyyttien ala-  
tyyppien morfologia ja tehtävät ovat moninaisia. Oligodendrosyyttejä tavataan erityisesti ai-  
vojen valkoisessa aineessa, missä ne muodostavat myeliiniä, mutta myös harmaassa aineessa  
havaitaan ”satelliittioligodendrosyyttejä”, joiden tehtävänä voi olla tuottaa neuroneille sopiva  
mikroympäristö ja toimia tarpeen vaatiessa myeliinin tuottajina (Dewar ym. 2003). Oligo-  
dendrosyyttien pinnalla olevaan antigeeniin sitoutuvaa O4-vasta-ainetta käytetään solujen tun-

nistamiseen varhaisessa kehityksen vaiheessa (Behar 2001). Myös oligodendrosyyttispesifinen proteiini (Olig) sijaitsee solukalvolla, ja se osallistuu solujen väliseen tiiviiseen liitokseen.

### 3.2.2 Neurogeneesin ilmentyminen aikuisen aivoissa

Aikuisen nisäkkään aivoissa uusia hermo- ja gliasoluja muodostuu pääasiassa kahdella aivojen alueella: sivukammioissa ja hippokampuksessa (Reynolds & Weiss 1992, Richards ym. 1992, Gage 2002). Myös muualta aivoista kuten aivojuoviosta, aivokuorelta, näköhermosta, aivojen väliseinästä, aivokurkiaisesta, selkäytimestä, silmänpohjasta, hypotalamuksesta ja jopa alueilta, joissa ei esiinny neuroneja, on eristetty soluja, jotka ovat erilaistuneet neuroneiksi *in vitro*, mutta näiden alueiden *in vivo* neurogeneesi on edelleen kiistanalainen aihe (Gage 2002, Weiss ym. 1996, Shihabuddin ym. 2000, Kondo & Raff 2000, Lie ym. 2004).

Aikuisilla neurogeneesi on nopeinta sivukammioiden reunalla sijaitsevalla subventrikulaarisella (SVZ) alueella, jossa nuorilla aikuisilla rotilla muodostuu jopa 30 000 neuroblastia vuorokaudessa (Alvarez-Buylla ym. 2000). Neuroblastit kulkeutuvat SVZ:lta rostraalista migraatioreittiä pitkin hajukäämille, jossa ne muodostavat uusia välineuroneita korvaamaan kuolevia soluja (Reynolds & Weiss 1992, Richards ym. 1992, Alvarez-Buylla ym. 1994, Doetsch & Alvarez-Buylla 1996, Gage 2002). Toiseksi eniten neuroneita tuotetaan hippokampuksen pykäläpoimun (*gyrus dentatus*, DG) subgranulaarisella alueella (SGZ) – nuorilla aikuisilla rotilla noin 9 000 neuroblastia vuorokaudessa (Cameron & McKay 2001). SGZ:lta neuroblastit vaeltavat vain lyhyen matkan sisemmälle granulaariselle solukerrokselle, jossa ne erilaistuvat alueelle tyypilliseksi glutamatergisiksi jyväishermosoluiksi.

### 3.3 Neurogeneesin säätely

Neurogeneesiä säätelevät geneettiset, farmakologiset ja ympäristön tekijät. Sikiönkehityksen aikana neurogeneesiä ohjaavat solun sisäiset ja ympäristön tekijät, jotka osallistuvat aivojen kehityksen säätelyyn (Paridaen & Huttner 2014). Näitä tekijöitä ovat solusyklin ja solun jakautumisen säätelijät, transkriptiotekijät, epigeneettinen säätely ja näihin liittyvät signaalinvälitysreitit (Zhao ym. 2008). Solun ulkoisten morfogeenien eli kasvutekijöiden jakaumat aiheuttavat hienovaraisia alueellisia eroja, joiden seurauksena solut reagoivat eri tavoin myö-

hempiin signaaleihin (Paridaen & Huttner 2014). Neurogeneesin kannalta tärkeitä kasvutekijöitä ovat Notch, Wnt, Shh, FGF, BDNF ja VEGF, mutta solun polaarisuuden säätelyyn osallistuu paljon muitakin molekyylejä.

Notch- ja Wnt-signalointireitit ylläpitävät radiaaligliasolujen kantasoluominaisuuksia. Notch-ligandit (Delta ja Jagged) aktivoivat viereisten solujen Notch-reseptoreja, mikä aiheuttaa NICD-transkriptiotekijän vapautumisen ja HES-geenien transkription. Nämä puolestaan inhiboivat neuronaalista erilaistumista tukevia geenejä (Ngn ja Ascl) ja säilyttävät näin solun jakautumiskykyisenä. Ristiriitaisesti Notch-molekyylin on havaittu olevan aktiivinen myös uusissa neuroneissa, mikä voi selittyä epigeneettisellä säätelyllä, sillä esimerkiksi Bcl6-transkriptiotekijän on havaittu estävän solujen jakautumista Notchin läsnäollessa. Wnt:llä puolestaan on kaksijakoinen tehtävä neurogeneesin säätelyssä. Neurogeneesin alkuvaiheessa Wnt-signalointireitti lisää radiaaligliasolujen symmetristä jakautumista ja hidastaa välineuronien erilaistumista, mutta myöhemmässä vaiheessa Wnt voimistaa välineuronien muodostumista. Neuronaalista erilaistumista tukeva vaikutus perustuu siihen, että Wnt lisää Notch-signalointia inhiboivan N-myc-transkriptiotekijän määrää.

Keskushermoston suuntautumisessa Shh (sonic hedgehog) ja FGF (fibroblastikasvutekijä) ovat oleellisessa osassa (Paridaen & Huttner 2014). Shh määrää dorsoventraalia suuntautumista ja osallistuu radiaaligliasolujen solusyklin säätelyyn. Sen inhibitio on tarpeen välineuronien erilaistumisessa. FGF ohjaa aivojen etu-takaosien muodostumista ja myös se osallistuu radiaaligliasolujen symmetriseen jakautumiseen. Lisäksi BDNF (aivoperäinen hermokasvutekijä) tukee neuronien selviytymistä ja edistää uusien neuronien ja synapsien erilaistumista (Nakatomi ym. 2002, Blurton-Jones ym 2009). Poistogeeniset hiiret, jotka eivät tuota BDNF:ää, kärsivät aivojen kehityshäiriöstä ja kuolevat pian syntymän jälkeen. VEGF (verisuonen endoteelin kasvutekijä) lisää angiogeneesiä eli uusien verisuonten muodostumista, minkä lisäksi sen on havaittu olevan myös neuroprotektiivinen ja tukevan neurogeneesiä. Morfogeenit vuorovaikuttavat keskenään, minkä vuoksi neurogeneesin ymmärtäminen haasteellista.

Morfogeenien lisäksi myös muut tekijät vaikuttavat radiaaligliasolujen jakautumiseen. Solujen välisiin liitoksiin osallistuvat adheesioproteiinit, kadheriinit ja kateniinit, sekä niiden säätelijät, joita ovat RhoA, cdc42 ja Rac1, ovat tärkeässä osassa solujen erilaistumisessa (Paridaen & Huttner 2014). Kadheriinit sijaitsevat solun pinnalla ja ne muodostavat soluliitoksen kiinnittymällä samanlaiseen molekyyliin toisen solun pinnalla. Kateniini puolestaan sijaitsee

solun sisäpuolella ja se kiinnittää kadheriinin solun tukirankaan. Lisäksi mitoosisukkulun ja sentrosomin orientaatio sekä muiden solun sisäisten komponenttien jakautuminen aiheuttavat eroja muodostuvien tytärsolujen välille. Solusyklin G1-S-G2-M -vaiheiden keston on myös arveltu vaikuttavan erilaistumiseen. Esimerkiksi S-vaihe, jolloin DNA replikoidaan, on pidempi radiaaligliasolujen jakautuessa uusia kantasoluja tuottaen verrattuna neuronaaliseen jakautumiseen (Arai ym. 2011, Paridaen & Huttner 2014).

Kasvutekijöiden alueelliset pitoisuudet vaikuttavat NPC-solujen erilaistumista ohjaavien transkriptiotekijöiden ilmenemiseen (Paridaen & Huttner 2014). Esimerkiksi Pax6-transkriptiotekijä lisää solujen jakautumista ja ohjaa mitoosisukkulun orientaatiota. Toisaalta Pax6:n vaihtoehtoinen silmukointi ja vuorovaikutus muiden transkriptiotekijöiden, kuten Sox2 ja Hes1, kanssa aktivoi myös neuronaaliseen erilaistumiseen osallistuvia geenejä, kuten neurogeeniinejä. Muita neuronaalisia transkriptiotekijöitä ovat Pou-homeodomeenit (Brn1/2) ja SoxC:t (Sox4, Sox11), jotka aloittavat neuronaalisen erilaistumisen ja estävät muita prosesseja. Lisäksi neurogeneesin kannalta oleellisten geenien ilmentymiseen vaikuttavat epigeneettiset tekijät, kuten DNA metylaatio, histonien modifikaatio ja kromatiinien pakkautuminen, sekä post-transkriptionaalinen säätely, johon kuuluvat mRNA:n vaihtoehtoinen silmukointi, miRNA:t ja lncRNA:t.

### 3.3.1 Neurogeneesin säätely aikuisiällä

Aikuisiällä neurogeneesiä säätelevät pitkälti samat tekijät kuin sikiönkehityksen aikana, mutta neurogeneesi on hitaampaa ja myös olemassa oleva neuronaalinen verkko osallistuu säätelyyn (Duan ym. 2008). Aikuisiällä neurogeneesin säätelyyn vaikuttaa voimakkaimmin NPC-solujen välitön ympäristö eli niin sanottu neurogeeninen *niche*. Se muodostuu useista eri solutyypeistä (endoteelisolut, astrocytit, ependymaalisolut, mikroglia, neuronit, verisuonen solut jne.), niiden erittämistä aineista, paikallisen neuroniverkon aktiivisuudesta ja näiden kaikkien vuorovaikutuksesta (Ming & Song 2011, Piatti ym. 2011). Ympäröivän kudoksen erittämiin säätelijöihin kuuluvat muun muassa hormonit, välittäjäaineet, sytokiinit ja kasvutekijät mukaan lukien neurotrofiinit (Emerit ym. 1992, Gould ym. 1999, Nquyen ym 2001, Sahay & Hen 2007, Warner-Schmidt & Duman 2006, Hagg 2009, Platel ym. 2010, Pathania ym. 2010).

*Nichen* neurogeneettisen kapasiteetin määräävät a) hermokantasolujen alkuperäinen määrä,

b) uusien neuronien tuotantotahti, joka perustuu hermokantasolujen solusyklien määrään tai uusien NPC-solujen muodostumiseen, ja c) neurogeenisen jakson pituus (Paridaen & Huttner 2014). Aikuisiän neurogeneesi ja sitä säätelevät tekijät ja niiden hienovaraiset muutokset ovat edelleen huonosti ymmärrettyjä.

### 3.4 Kantasolujen häiriintynyt toiminta

Neurogeneesi hidastuu ikääntymisen myötä samaan aikaan kun kognitiiviset taidot heikentyvät (Winner ym. 2011). Myös stressi, tulehdukset, masennus ja toksiinit heikentävät neurogeneesiä (Kuhn ym. 1996, Lemaire ym. 2000, Ekdahl ym. 2003, Sahay & Hen 2007). Toisaalta neurogeneesiä kiihdyttäviä tekijöitä ovat esimerkiksi liikunta, oppiminen, virikkeellinen ympäristö ja masennuksen hoitoon käytetyt lääkkeet (Kempermann ym. 1997, Gould ym. 1999, van Praag ym. 1999, Malberg ym. 2000, Manev ym. 2001, Zhao ym. 2006, Wang ym. 2008). Neurogeneesin voimistuminen johtaa muistitoimintojen paranemiseen, minkä perusteella neurogeneesin on arveltu olevan yhteydessä oppimiseen ja muistiin (Kemperman ym. 1997, Gould ym. 1999, Imayoshi ym. 2008).

Aivojen vaurioituessa NPC-solut voivat vähäisissä määrin aktivoitua, vaeltaa kohti vaurioitunutta aluetta ja erilaistua neuroneiksi (Arvidsson ym. 2002, Nakatomi ym. 2002, Parent 2003, Yoneyama ym. 2011). Monet akuutit patologiset tilat, kuten epileptiset kohtaukset, aivoiskemia ja aivoinfarkti aiheuttavat neurogeneesin voimistumista (Kokaia & Lindvall 2003). Iskemiaa ja aivoinfarktia seuraa kiihtynyt NPC-solujen jakautuminen hippokampuksen pykäläpoimussa (*gyrus dentatus*) ja sivukammion SVZ-alueella, mutta uusia neuroneita havaitaan myös muilla aivojen alueilla, mikä voi olla seurausta neuronien vaeltamisesta vaurioituneille alueille, tai patologisen tilan laukaisemasta neurogeneesistä alueilla, joissa sitä ei normaalisti esiinny (Kokaia & Lindvall 2003, Rice ym. 2003, Zhang ym. 2004, Ming & Song 2005).

Useissa hermorappeumasairauksissa on havaittu muutoksia uusien neuronien muodostumisessa. Esimerkiksi Alzheimerin taudissa (AD) NPC-solujen jakautumisen on havaittu lisääntyvän (Nagy ym. 1997, Gould ym. 1999, Haughey 2002, Jin ym. 2004, Wharton ym. 2005, Ziabreva ym. 2006). Toisaalta uusien neuronien selviytyminen ja liikkuminen ovat heikentyneet, minkä vuoksi lisääntynyt solujen jakautuminen ei riitä kompensoimaan sairauden aiheuttamaa neuronien surkastumista, ja lopputuloksena on neuronikato. Neurodegeneraation on ha-

vaittu lisääntyneen myös muissa dementian oireita ilmentävissä sairauksissa, kuten Downin syndroomassa ja Pickin taudissa (Nagy ym. 1997). Huntingtonin taudissa (HD) neurogeneesin on puolestaan havaittu vähentyneen joidenkin eläinmallien hippokampuksessa, mutta tuloksia ei ole pystytty luotettavasti toistamaan, ja toisaalta NPC-solujen jakautumisen on havaittu lisääntyneen SVZ-alueella HD-potilailla (Curtis ym. 2003, Lazic ym. 2004, Gil ym. 2005, Gil-Mohapel ym. 2011). Myös Parkinsonin taudissa (PD) on havaittu vähentynyttä neurogeneesia ja NPC-solujen jakautumista, mutta myös ristiriitaisia tuloksia on saatu, eikä neurogeneesin muutoksia taudissa ymmärretä täysin (Hoglinger ym. 2004, Winner ym. 2004, Marxreiter ym. 2013). Poikkeavuudet eläinmallien avulla ja potilaita tutkimalla saatujen tulosten välillä voivat johtua tutkittujen kantasolupopulaatioiden ja niiden välittömän ympäristön eroista.

Neurogeneesi on muuntunut useissa hermorappeumasairauksissa, mutta muutosten yksityiskohdat eroavat toisistaan sairaudesta riippuen (Glass ym. 2010). Lisäksi tulehdusvasteen aktivoitumisen on havaittu vaikuttavan neurogeneesiin. NCL-taudilla on monia yhteisiä piirteitä muiden hermorappeumasairauksien kanssa, minkä vuoksi neurogeneesi voi olla muuntunut myös tässä sairaudessa.

#### 4 HOITOMUODOT JA TERAPEUTTISET YHDISTEET

Haastavinta NCL-tautien hoidossa on se, että ne aiheuttavat kudonvaurioita aivoissa, minkä vuoksi neuronien tuho ja kudoksen arpeutuminen ovat jo käynnissä sairauden diagnosoinnin hetkellä (Hobert & Dawson 2006, Wong ym. 2010). Lisäksi veri-aivoeste asettaa rajoitteen lääkkeiden kuljetukselle vauriopaikalle. Suoraan aivokudokseen annettavilla lääkkeillä on saatu positiivisia tuloksia eläinkokeissa, mutta menetelmien invasiivinen luonne ja mahdolliset kirurgiset komplikaatiot vähentävät niiden soveltuvuutta ihmisten hoidossa. NCL-tautia parantavaa hoitomuotoa ei ole, mutta kehitteillä olevia hoitumuotoja ovat entsyymikorvaushoito, kantasoluterapia ja muihin farmakologisiin menetelmiin perustuvat hoidot.

##### 4.1 NCL-tautien hoitomuodot

NPC-soluihin perustuvalla hermokantasoluterapialla on saatu lupaavia tuloksia eläinmalleilla. Terapiassa aivojen neurogeneesikykyä pyritään lisäämään siirtämällä terveitä NPC-soluja suo-

raan vaurioituneella alueella, jolloin kantasolut voivat joko suoraan korvata menetettyjä soluja tai tukea olemassa olevia soluja, ja siten lisätä sisäsyntyistä neurogeneesiä (Hobert & Dawson 2006, Wong ym. 2010, Park ym. 2010). Lisäksi NPC-solut soveltuvat neurogeneesin tutkimiseen yksittäisten geenimutaatioiden aiheuttamien sairauksien kuten CLN5-taudin yhteydessä. Tällöin solujen lähteenä voidaan käyttää geneettisesti muunneltuja hiirimalleja, joista eristettyjä NPC-soluja viljellään *in vitro*, ja joita voidaan käsitellä erilaisilla yhdisteillä ja siten tutkia lääkkeiden vaikutusta neurogeneesiin. Hermokantasoluterapiaa tutkitaan esimerkiksi CLN3-taudin hoidossa (Kohan ym. 2011).

Eläinmalleilla on saatu lupaavia tuloksia myös entsyymikorvaushoidosta CLN1- ja CLN2-tautimuodoissa, jotka aiheutuvat liukoisten PPT1- ja TPP1-proteiinien häiriintyneestä toiminnasta (Koike 2005). Kuten kantasoluterapiassa myös entsyymikorvaushoidossa on ongelmia, sillä molemmat voivat aiheuttaa immuunipuolustuksen aktivoitumista. Hoidon tehon aleneminen on kuitenkin usein ohimenevää ja vastetta voidaan vähentää immuunipuolustusta muokkaavilla lääkkeillä. Entsyymikorvaushoito vaatii lisäksi toimivia reseptoreita, mikä voi olla ongelmallista, mikäli kudostuho on jo ehtinyt pitkälle. Kyseenalaisia tuloksia on saatu myös virusvälitteisestä geeninsiirrosta, jonka soveltaminen ihmisten hoitoon on osoittautunut hankalaksi, kuten CLN2-potilaiden hoitoyritykset ovat osoittaneet (Crystal 2004, Schultz ym. 2011).

Geeniterapia ja kantasoluhoidot ovat ongelmallisia CLN3, CLN5, CLN6 ja CLN8 tautimuodoissa, joissa viallinen proteiini on integraalinen kalvoproteiini. Näiden tautimuotojen hoidossa voivat olla merkittäviä antiapoptoottiset ja anti-inflammatoriset lääkeaineet, jotka läpäisevät aivo-veriesteen. Anti-apoptoottiset lääkeaineet perustuvat siihen, että apoptoitaviksi määrätty neuronit voidaan vielä pelastaa, mikäli väliintulo tapahtuu ennen kuin mitokondrion kalvojen välistä vapautuu apoptoosia indusoivia proteiineja (Dhar ym. 2002, Maiuri 2007, Seehafer ym. 2011). Antiapoptoottista lääkettä, flupirtiinimaleaattia, on käytetty CLN3-taudin hoitoon ja koekäytössä oleva tulehdusta vähentävä lääkeaine, mykofenolaatti mofetil, on osoittautunut hyödylliseksi CLN3-hiirimallissa (Dhar ym. 2002, Seehafer ym. 2011).

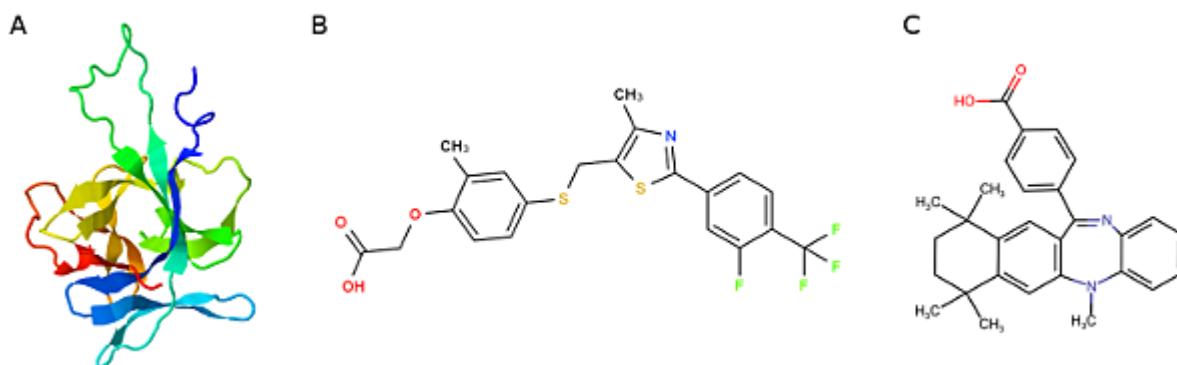
Aivoen sisäsyntyisen neurogeneesin aktivoiminen voi olla yksi mahdollisuus neuronien rappeuman hoidossa. Tällöin aivojen omia NPC-soluja stimuloidaan farmakologisesti lisääntymään, erilaistumaan ja korvaamaan vaurioituneita neuroneita (Ma ym. 2009, Mu & Gage 2011). Neurogeneesin stimulaatio tarjoaa monia hyviä puolia verrattuna solusiirtoihin, koska sen avulla voidaan välttää hylkimisreaktiot, paikkakohtainen käyttö on helpommin saavutetta-



vissa ja tuotetut NPC-solut kypsyvät ja integroituvat luultavasti paremmin. Esimerkiksi BDNF:stä on todettu olevan hyötyä AD:n eläinmalleissa (Blurton-Jones ym. 2009). Kasvutekijöiden lisäksi myös sytokiinit ja muut neurogeneesiin vaikuttavat aineet voisivat olla hyödyllisiä stimuloivassa hoidossa (Mu & Gage 2011). Ennen näiden hoitomuotojen toteutumista täytyy kuitenkin ymmärtää paremmin neurogeneesin mekanismeja.

## 4.2 Terapeuttiset yhdisteet

Tässä pro gradussa tutkittiin kolmen mahdollisesti terapeuttisen yhdisteen – interleukiini 33, GW0742 ja HX600 – vaikutusta NPC-solujen kasvuun, liikkumiseen ja erilaistumiseen (kuva 4). Interleukiini 33 (IL-33) on solujen luonnollinen sytokiini, joka säätelee tulehdusvastetta (Yasuoka ym. 2011). GW0742 on synteettinen PPAR-reseptoria aktivoiva molekyyli, jolla on havaittu olevan neuroprotektiivisia vaikutuksia (Kuang ym. 2012). Synteettinen HX600 puolestaan aktivoi retinoidihapporeseptoria, joka osallistuu solujen erilaistumisen ja jakautumisen sekä sikiönkehityksen säätelyyn (Umemiya ym. 1997). CLN5-taudissa havaitaan muutoksia, jotka voivat olla yhteydessä näiden molekyylien säätelmiin prosesseihin (Mole ym. 2011).

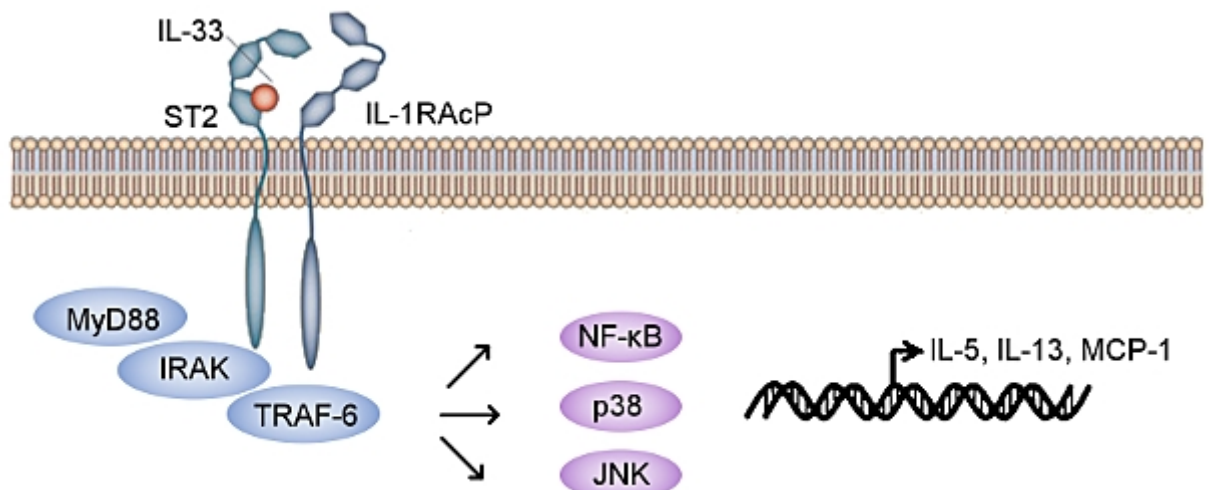


*Kuva 4: Altistuskokeissa käytettyjen yhdisteiden rakenteet. (A) Nauhamallina esitetty IL-33 on solujen luonnollinen sytokiini. (B) Tikkumallina esitetty GW0742 on synteettinen PPAR-reseptorin agonisti. (C) Tikkumallina esitetty HX600 on synteettinen retinoidihapporeseptorin agonisti. (RCSB PDB ID 2KLL, PubChem Compound CID 9934458, Chemidplus RN 172705-89-4)*

#### 4.2.1 Interleukiini 33

IL-33 on IL1-perheeseen kuuluva sytokiini, jonka vaikutus keskushermoston sairauksiin on kiistanalainen (Schmitz ym. 2005, Hudson ym 2008, MIM: 608678). Sytokiinit ovat hormonien kaltaisia polypeptidejä, jotka osallistuvat immuunisolujen väliseen viestintään sitoutumalla kohdesolun reseptoriin ja saaden aikaan muutoksen kohdesolun toiminnassa (Tirri ym. 2001). Interleukiinit ovat leukosyyttien erittämiä sytokiineja, jotka edistävät tulehdusreaktiota ja aiheuttavat suurina määrinä kuumeen. IL-33 toimii sekä sytokiinina että geeniekspressiota säätelevänä tumatekijänä (Yasuoka ym. 2011, Ali ym. 2011). Sitä ilmennetään runsaimmin epiteeli- ja endoteelisoluissa. IL-33 vapautuu solukuolemassa ja sen arvellaan varoittavan immuunipuolustusta kudosaivuriosta.

IL-33 sitoutuu kohdesolun pinnalla sijaitseviin ST2- ja IL-1RAcP-reseptoreihin (Yasuoka ym. 2011). Molempia reseptoreita esiintyy useissa solutyypeissä, mutta erityisen runsaasti niitä tavataan immuunipuolustuksen tyyppin 2 T-auttajasoluissa (Th2). IL-33:n sitoutuminen aktivoi NF- $\kappa$ B- ja MAPK-signaalireittejä, jotka saavat aikaan Th2-sytokiinien (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 ja IL-17) vapautumisen ja immuunivasteen aktivoitumisen (kuva 5) (Schmitz ym. 2005, Liu ym. 2013). Lisäksi IL-33 voi houkutelaa Th2-soluja vauriopaikalle (Komai-Koma ym. 2007, Moussion ym. 2008). IL-33:n on osoitettu edistävän patogeneesiä Th2-välitteisissä sairauksissa kuten astmassa, reumassa ja atooppisessa ihottumassa (Kakkar & Lee 2008).



*Kuva 5: IL-33 aktivoi ST2/IL-1RAcP -reseptorikompleksia, minkä seurauksena MyD88, IRAK-1/4 ja TRAF-6 aktivoituvat. Tämä johtaa transkriptiotekijänä toimivan NF- $\kappa$ B:n ja MAPK-proteiinikinaasin (p38, JNK) signalointireittien aktivoitumiseen ja saa aikaan Th2-sytokiinien ja kemokiinien tuotannon. (Muokattu: Miller 2011, Palmer & Gabay 2011)*

IL-33:lla on havaittu kuitenkin myös suojaavia vaikutuksia sydän- ja verisuonisairauksissa, kuten valtimonrasvoittumistaudissa ja tyypin 2 diabeteksessä. Suojaavaa mekanismia ei tunneta, mutta tiedetään, että solunsisäinen IL-33:n muoto voi hiljentää NF- $\kappa$ B-välitteistä tulehdusta (Ali ym. 2011). Hiljentäminen tapahtuu ST2-reseptorista riippumattomasti siten, että IL-33 liittyy kromatiiniin ja estää transkription. Solun sisäinen muoto katoaa nopeasti esimerkiksi angiogeenisessä ja tulehduksen yhteydessä (Kuchler ym. 2008). Toisaalta myös solun ulkoisella IL-33:lla on havaittu suojaavia vaikutuksia. IL-33:n vaikutus on joko tulehdusta lisäävä tai hillitsevä riippuen sairaudesta.

Keskushermoston tuottama IL-33 aktivoi mikroglia-soluja ja voi toimia hermosolujen tulehduksen välittäjänä hermorappeumasairauksissa (Yasuoka ym. 2011). IL-33 indusoi mikroglia-solujen jakautumista, fagosytoosia ja tulehdusta edistävien sytokiinien (IL-1 $\beta$  ja TNF $\alpha$ ), kemokiinien ja typpioksidin (NO) tuotantoa. Toisaalta IL-33 lisää myös mikroglion tulehdusta vähentävän IL-10-sytokiinin tuotantoa. Mikroglioissa ja astrozyyteissä ilmennetään sekä ST2-että IL-1RAcP-alayksiköitä (*in vitro*), mutta neuroneissa vain IL-1RAcP-alayksikköä, mikä viittaa siihen, että mikroglia ja astrozyytit ovat IL-33:n pääasiallisia kohdesoluja (Yasuoka ym. 2011). Lisäksi IL-33:a tuottavat aivojen endoteelisolut ja astrozyytit, mutta eivät mikroglia-solut ja neuronit (Hudson ym. 2008, Yasuoka ym. 2011). Hiiren keskushermostossa ilmennetään runsaasti IL-33:a, mutta sen sijainti soluissa on kiistanalainen (Schmitz ym. 2005).

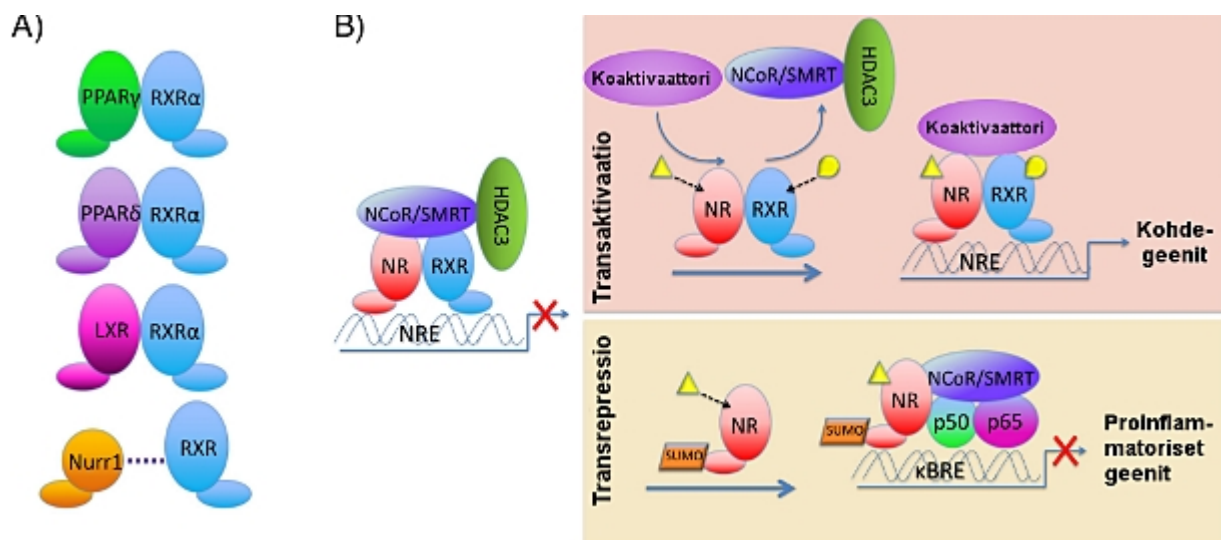
IL-33:n ilmentymisen on osoitettu alentuneen AD:ssa, mutta lisääntyneen MS-taudin potilailla ja hiirimalleissa (Chapuis ym. 2009, Christophi ym. 2012). Toisaalta IL-33:n on osoitettu suojaavan sydän- ja hermosoluja sydän- ja verisuonisairauksissa, AD:ssa, MS:ssä ja selkäydinvammassa (Kazufumi & Tomohiro 2014, Pomeschchik ym. 2014). Suojaavan vaikutuksen on esitetty perustuvan tulehdusta vähentävien Th2-sytokiinien tuotantoon ja makrofagien muutokseen neurotoksisesta M1-tyypistä tulehdusta hillitsevään M2-tyyppiin (Miller ym. 2010, Pomeschchik ym. 2014). Koska CLN5-taudissa havaitaan tulehdusvasteen aktivoitumista, voi IL-33 suojata hermosoluja myös tässä sairaudessa.

#### 4.2.2 Tumareseptorit PPAR ja RXR

GW0742 ja HX600 ovat tumareseptorien toimintaa aktivoivia agonisteja. Tumareseptorit ovat ligandien aktivoimia transkriptiotekijöitä, jotka säätelevät erilaisia homeostaasin prosesseja

(Castrillo & Tontonoz 2004, Chawla ym. 2001). Tyypin I tumareseptoreihin kuuluvat muun muassa estrogeeni- ja progesteronireseptorit (Skerrett ym. 2014). Tyypin II reseptorit puolestaan toimivat lipidi- ja energiametaboliassa ja ne ovat tärkeitä aivojen biologiassa, koska aivot ovat metabolisesti aktiivisin kehon elin ja niissä on runsaasti lipidejä. Aivojen merkittävimmät tyypin II reseptorit ovat peroksisomien proliferaattoriaktivoitunut reseptorit (PPAR)  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  ja  $\gamma$ , sekä maksan-X-reseptorit (LXR)  $\alpha$  ja  $\beta$ . PPAR:t toimivat lipidisensoreina ja LXR:t kolesterolisensoreina. Ne yhdistävät metabolisen koneiston metaboliseen tarpeeseen toimimalla yhdessä geenien promoottorielementtien kanssa.

Tyypin II tumareseptorit muodostavat heterodimeerejä retinoidihappo-X-reseptorien (RXR)  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$  kanssa, jolloin ne voivat toimia transkriptiotekijöinä (kuva 6) (Skerrett ym. 2014). Dimeeriset reseptorit, joihin ei ole sitoutunut ligandia, ovat transkription kannalta hiljennettyjä, koska ne ovat yhteydessä ko-repressoreihin. Ligandin sitoutuminen saa aikaan ko-repressorikompleksin irtoamisen, jolloin ko-aktivaattorikompleksit pääsevät sitoutumaan dimeeriseen reseptoriin, mikä saa aikaan kohdegeenien transkription (Saijo ym. 2013). Tästä mekanismista poikkeavat kuitenkin NR4A-reseptorit, jotka voivat toimia myös pelkkänä RXR-heterodimeerinä ilman ligandin sitoutumista.



Kuva 6: Tumareseptorit ovat ligandin aktivoimia transkriptiotekijöitä. (A) Tyypin II tumareseptorit (NR) muodostavat heterodimeerejä retinoidihappo-X-reseptorien (RXR) kanssa. (B) Dimeeriset reseptorit, joihin ei ole sitoutunut ligandia, ovat ko-repressorien (NCoR tai SMRT ja HDAC3) hiljentämiä. Ligandien sitoutuminen saa aikaan ko-repressorikompleksin irtoamisen ja ko-aktivaattorikompleksin sitoutumisen, mikä johtaa kohdegeenien transkriptioon. (D) Sumoylaatio saa aikaan liittymisen NF- $\kappa$ B:aan (p50 ja p65), joka sijaitsee tulehdusta edistävien geenien kohdalla, mikä estää ko-repressorien irtoamisen ja siten transkription. (Muokattu: Skerrett ym. 2014).

### 4.2.3 GW0742

GW0742 (4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometyyli)-fenyyli]-4-metyyli-5-tiatsolyyli]metyyli]tio]-2-metyylifenoksi]-etikkahappo) on selektiivinen agonisti transkriptiotekijänä toimivalle peroksisomin proliferaattoriaktivoitulle reseptorille  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) (Sznajdman ym. 2003). Toisin sanoen GW0742:n sitoutuminen PPAR $\delta$ -reseptoriin saa aikaan reseptorin aktivoitumisen. PPAR:ja on kolmea isotyyppeä ( $\alpha$ ,  $\delta$  ja  $\gamma$ ) ja ne toimivat heterodimeereinä 9-*cis*-retinoidihapporeseptorin (RXR) kanssa toimien lipidisensoreina ja säädellen lipidi- ja hiilihydraattimetaboliaa (Heneka & Landreth 2007). PPAR:t osallistuvat geeniekspression säätelyyn ja voivat suojata neurotoksisuudelta esimerkiksi estämällä tulehdusta edistävien geenien ilmentymistä. PPAR:eja ilmennetään sikiönkehityksen aikana ja ne voivat osallistua rasvakudoksen, ihon ja aivojen kehitykseen ja toimintaan (Desvergne & Wahli 1999).

PPAR:t osallistuvat useiden keskushermoston sairauksien patogeneesiin ja erityisesti PPAR $\delta$  isotyyppi vaikuttaa aivoissa (Heneka & Landreth 2007). Koska PPAR:it vähentävät perifeeristen makrofagien välittämää ja autoimmuunisairauksiin liittyvää tulehdusta, on niiden vaikutusta tutkittu myös tulehduksellisissa aivosairauksissa. Reseptorien aktivaation on havaittu olevan eduksi AD:ssa, PD:ssa, MS:ssa ja ALS:ssa (Iwashita ym. 2007). PPAR $\delta$ :n on arveltu osallistuvan erityisesti aivojen lipidimetabolian säätelyyn ja aksonien myelinaatioon (Cimini ym. 2003, Saluja ym. 2001).

GW0742 on neuroprotektiivinen lyhyillä vaikutusajoilla, mutta pidempi aikainen altistus aiheuttaa neurotoksisuutta (Smith ym. 2004). Neuroneita suojaavan vaikutuksen on havaittu olevan merkittävä ja tapahtuvan PPAR $\delta$ -aktivaation välityksellä rottien globaalissa aivoinfarktissa, minkä lisäksi sen tulehdusta lieventävän vaikutuksen on havaittu perustuvan NF- $\kappa$ B-signaalireitin inhibiitioon hippokampuksessa (Kuang ym. 2012). GW0742:n on havaittu vähentävän tulehdusvastetta myös AD:n hiirimalleissa (Kalinin ym. 2009). Lisäksi se on vähentänyt hippokampuksen mikroglia-aktivaatiota hiirten aivojen säteilytyksen jälkeen palauttamatta kuitenkaan neurogeneesiä ennalleen (Schnegg ym. 2013). MS:n hiirimallissa GW0742 on lieventänyt taudin oireita ja vähentänyt astrosyyttien ja mikrogliasolujen aktivaatiota (Polak ym. 2005).

#### 4.2.4 HX600

HX600 (4-[5H-2,3-(2,5-dimetyyli-2,5-heksano)-5-metyylidibentso[b,e][1,4]diatsepiini-11-yyli]-bentsoehappo) on dibentsodiatsepiinin synteettinen johdannainen, joka sitoutuu retinoidihapon tavoin tumareseptoreihin ja aktivoi niitä (Umemiya ym. 1997). Retinoidihapot säätelevät monia biologisia toimintoja kuten solujen erilaistumista, jakautumista ja sikiönkehitystä aktivoimalla retinoidihapporeseptoreita (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ja retinoidi-X-reseptoreita (RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). RAR:t aktivoituvat sekä trans-retinoidihappojen (RA), että 9-cis-retinoidihapon (9cRA) ansiosta, kun taas RXR:t aktivoituvat vain 9cRA:n sitoutumisen seurauksena. Aktivoituneet reseptorit dimerisoituvat joko homo- tai heterodimeereiksi ja toimivat transkription säätelijöinä. Heterodimerisaatio tehostaa reseptorien toimintaa ja RXR dimerisoituu RAR:n lisäksi myös muiden tumareseptorien kuten kilpirauhashormonin ja D-vitamiinin sekä PPAR, LXR ja FXR- reseptorien kanssa (Ishizawa ym. 2012).

HX600 on selektiivinen RXR-agonisti heterodimeereille Nur77/RXR ja Nurr1/RXR (Morita ym. 2005). Nur77 ja Nurr1 kuuluvat NR4A-tumareseptorien perheeseen. Perheen molekyylejä ilmennetään useissa kudoksissa, erityisesti hermostossa, ja niiden on osoitettu säätelevän geeniekspressiota hypotalamus–aivolisäke–lisämunuainen -akselilla. Tästä huolimatta Nur77/RXR- ja Nurr1/RXR-heterodimeerien kohdegeenejä ei tunneta tarkasti. HX600:n on havaittu indusoivan karnitiinipalmitoyylitransferaasi 1A:ta (CPT1A), joka osallistuu rasvahappojen  $\beta$ -oksidointiin, joten Nur77/RXR ja Nurr1/RXR saattavat säädellä tämän geenin ilmentymistä (Ishizawa ym. 2012).

Hemorappeumasairauksissa RXR-tumareseptorien agonisteja tutkimalla on saatu ristiriitaisia tuloksia (Skerrett ym. 2014). Monet tutkimukset varsinkin AD:hen ja PD:hen liitteyn viittaavat kuitenkin positiiviseen vaikutukseen, vaikka mekanismit, joilla tumareseptorien agonistit vaikuttavat sairauksien patologiaan ovat edelleen epäselviä. Kaiken kaikkiaan tumareseptorien toiminta on liitetty pääasiassa aivojen lipidimetaboliaan, mutta niiden on arveltu osallistuvan myös hermosolujen erilaistumiseen ja surkastumiseen sekä tulehdusvasteeseen.

## 5 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEESIT

Tämän pro gradun tavoitteena on tutkia neurogeneesiä NCL-taudin myöhäislapsuuden CLN5-tautimuodossa. Tarkoitus on selvittää, kuinka tauti vaikuttaa  $Cln5^{-/-}$ -hiirimallista sikiön kehityksen loppuvaiheessa eristettyjen hermokantasolujen jakautumiseen, liikkumiseen ja erilaistumiseen. Ensimmäisen hypoteesin mukaan neurogeneesi on muuntunut  $Cln5^{-/-}$  kantasoluissa verrattuna villityypin soluihin. Lisäksi pyritään selvittämään tulehdusvasteen ja lipidimetabolian osuutta mahdollisesti häiriintyneeseen neurogeneesiin altistamalla soluja kolmelle potentiaalisesti terapeuttiselle aineelle, jotka ovat IL-33, GW0742 ja HX600. Toisen hypoteesin mukaan nämä terapeuttiset yhdisteet vaikuttavat neurogeneesiin  $Cln5^{-/-}$  kantasoluissa, mikä viittaisi niiden kohdeprosessien häiriintyneen taudissa.

Hermokantasolujen toiminnan ja CLN5-taudin mekanismien ymmärtäminen on tärkeää uusien lääkkeiden kehittämiseksi, sillä vaikka taudin aiheuttavat geenimutaatiot on nykyään karakterisoitu, ei niiden koodaamien proteiinien tehtäviä ja siten taudin mekanismeja tunneta. Lisäksi mekanismien tunnistaminen jo varhaisessa kehityksen vaiheessa voi nopeuttaa sairauden diagnosointia, jolloin hoito voidaan aloittaa ennen kuin hermorappeuma on edennyt liian pitkälle. Tulevaisuudessa hermokantasolujen avulla voidaan kenties korjata jopa rappeutuneita aivojen alueita.

## 6 AINEISTO JA MENETELMÄT

Aineistona käytettiin hermokantasoluja ja hermosolujen esiaestesoluja (NPC), jotka eristettiin hiirten sikiöiden hippokampuksista. Hiirimalleina käytettiin villityypin C57BL/6JRcc -kantaa ja tästä kehitettyä poistogeenistä  $Cln5^{-/-}$ -kantaa, joka ilmentää lievää CLN5-sairauden fenotyyppiä (Kopra ym. 2004). Kantasoluja pidettiin yllä soluviljelmissä neurosfäärimenetelmällä ja niitä säilöttiin pakastamalla. IL-33-sytokiinin sekä synteettisten GW0742- ja HX600-yhdisteiden vaikutusta tutkittiin soluviljelmissä pääasiassa 3 ja 7 päivän pituisissa erilaistumiskoikeissa ja jakautumista tutkittiin BrdU-kokeella. Lopuksi kokeiden tuloksia analysoitiin immunosytokemiallisilla vasta-ainevärjäyksillä.

## 6.1 Hermokantasolujen eristys ja viljely

Kantasoluja kasvatettiin primääriviljelmänä neurosfeerimenetelmällä (Reynolds & Weiss 1992, Gritti ym. 1996). Hiirten solut eristettiin sikiöiden hippokampuksista kehityspäivänä E15 tai E18. NPC-viljelmissä (I-VI) käytettyjen solujen alkuperä on esitetty taulukossa 2.

*Taulukko 2: Viljeltyjen NPC-solujen alkuperä ja jakoerien lukumäärä.*

Viljelmä	Laji	Genotyyppi	Kudos	Ikä	Jakoerä (lkm)
I	<i>Mus Musculus</i>	Cln5 <sup>-/-</sup>	Hippokampus	E18	4
	<i>Mus Musculus</i>	C57BL/6JRcc	Hippokampus	E18	4
II	<i>Mus Musculus</i>	C57BL/6JRcc	Hippokampus	E18	3
III	<i>Mus Musculus</i>	Cln5 <sup>-/-</sup>	Hippokampus	E18	6
	<i>Mus Musculus</i>	C57BL/6JRcc	Hippokampus	E18	6
IV	<i>Mus Musculus</i>	C57BL/6JRcc	Hippokampus	E15	3
V	<i>Mus Musculus</i>	C57BL/6JRcc	Hippokampus	E15	7
	<i>Mus Musculus</i>	Cln5 <sup>-/-</sup>	Hippokampus	E15	7
VI	<i>Mus Musculus</i>	C57BL/6JRcc	Hippokampus	E18	2
	<i>Mus Musculus</i>	Cln5 <sup>-/-</sup>	Hippokampus	E18	2

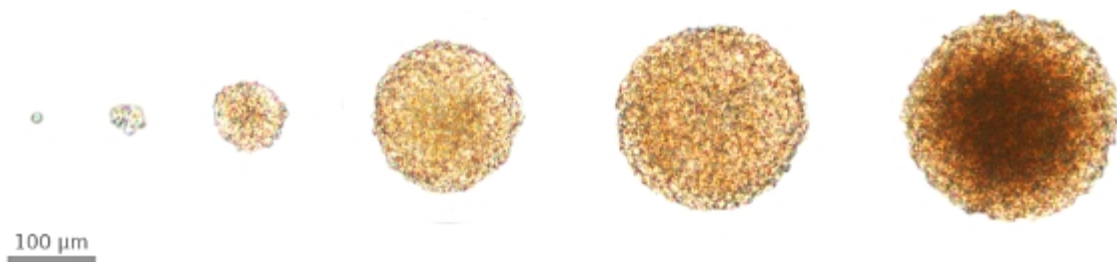
Hermokantasolujen eristämiseksi tiineenä olevan hiiren kohdusta poimittiin 3-5 sikiötä. Sikiöiden aivoista irrotettiin hippokampukset ja kudokappaleet siirrettiin solujen erottamiseksi entsyymiliuokseen, joka sisälsi 1.33 mg/ml trypsiiniä (Sigma T4665), 0.7 mg/ml hyaluronidaasia (Sigma H3884) ja 0.2 mg/ml kynereeniä (Sigma K3375) liuotettuna 30 mM glukosia sisältävään HBSS:ään (Hank's balanced salt solution, Gibco 14060). Kudoksia inkuboitiin entsyymiliuoksessa 15 minuuttia +37 °C:ssa, minkä jälkeen kudospartikkeleita hajotettiin pienemmiksi pipetoitavalla liuosta varovasti edestakaisin 10 kertaa 5 ml pipetillä ja inkubaatiota jatkettiin vielä 15 minuuttia. Liuokseen erottuneita soluja sentrifugoitiin 1500 rpm, 5 min, minkä jälkeen supernatantti poistettiin ja solupelletti liuotettiin 4 ml:aan 0.9 M sakkarosi-HBBS:ää (ICN-Biomedicals 821713 ja Gibco14060). Soluja sentrifugoitiin 2000 rpm, 10 min, supernatantti poistettiin ja solupelletti liuotettiin 2 ml:aan EBSS:ää (Earl's balanced salt solution, Gibco 24010) ja sentrifugoitiin 4 % naudan seerumialbumiinia sisältävän EBSS-gradientin läpi 1500 rpm, 7 min. Supernatantti poistettiin ja solut resuspensoitiin kasvatus-



liuokseen (DMEM/F-12, GlutaMAX™-1, Gibco 21331-028), johon oli lisätty 15 mM HEPES:iä (Sigma H0887), 100 U/ml penisiliiniä ja 100 mg/ml streptomysiiniä (Penicillin-Streptomycin, Gibco 15140-122), 1 % B-27 -ravintolisää (Gibco 17504-044), 20 ng/ml epidermaalikasvutekijää (EGF, PeproTech 100-15) ja 10 ng/ml fibroblastikasvutekijää (FGF, PeproTech 100-18B).

### 6.1.1 Neurosfeerien viljely

Kudoksesta eristetyt yksittäiset solut siirrettiin kasvamaan primääriwiljelmänä 10 cm:n kasvatusmaljoille (Sarstedt, 83.1802) tiheyteen  $10^5$  solua/10 ml DMEM/F-12/B27-liuoksessa. Soluviljelmiä kasvatettiin 37 °C:n lämpötilassa ja 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa soluviljelykaapissa (Thermo Scientific Steri-Cycle® CO<sub>2</sub> Incubator 371, Ohio, USA), jonka ilmankosteutta pidettiin yllä kaappiin sijoitetulla vesiastianalla. Soluviljelmille lisättiin kasvutekijöitä (EGF 20 ng/ml ja FGF 10 ng/ml) joka kolmas päivä ja kasvatusliuosta joka 3-4 päivä. Kasvutekijöiden läsnä ollessa hermokantasolut jakautuvat erilaistumatta muodostaen vapaasti kelluvia solurykelmiä, neurosfeerejä, jotka koostuvat pluripotentista hermokantasoluista, multipotentista NPC-soluista ja kuolleista tai kuolevista soluista (kuva 7) (Reynolds & Weiss 1992, Galli ym. 2003).



*Kuva 7: Valomikroskooppikuvat 10x suurennoksella hiirestä eristetyyn yksittäiseen hermokantasolun kasvusta neurosfeeriksi. Sfeerit vasemmalta oikealle on kuvattu 1-6 päivinä jakamisen jälkeen. Oikeanpuoleisin sfääri on kasvanut jo liian suureksi, minkä erottaa sen tummasta väristä. Mittakaavajana = 100 µm.*

Kasvaneet neurosfeerit hajotettiin eli dissosioitiin joka 5-10 päivä käyttäen trypsiinin kaltaista entsyymiä TrypLE:ä (Gibco 12604-013). Neurosfeerit siirrettiin 15 ml:n koeputkeen, sentrifugoitiin 1000 rpm, 1 min ja supernatantti poistettiin. Neurosfeeripelletti resuspensoitiin varovasti 200 µl:aan TrypLE:ä ja neurosfeerejä inkuboitiin entsyymiliuoksessa 37 °C:ssa vesihauteella 3-5 minuuttia. Kasvatusliuosta lisättiin 1 ml, sentrifugoitiin 1000 rpm 1 min, ja supernatantti poistettiin. Kasvatusliuosta lisättiin 1 ml ja suspensiota pipetoitiin edestakaisin varovasti 200 µl:n pipetillä yksittäisten solujen erottamiseksi. Solususpension annettiin tasoittua noin 30 sekunnin ajan, minkä jälkeen solutiheys laskettiin Bürkerin kammiota käyttäen. Uusille 10 ml:n kasvatusmaljoille siirrettiin  $10^5$  solua. Hermokantasolut jatkoivat jakautumista uusilla maljoilla muodostaen uuden neurosfeeriviljelmän. Neurosfeerien dissosiaatio voidaan toistaa useita kertoja eksponentiaalisesti kasvavan solupopulaation saavuttamiseksi (Galli ym. 2003). Jakokerrat on esitetty taulukossa 2.

### 6.1.2 Neurosfeerien pakastus

Hiiren neurosfeerien pakastamista testattiin käyttäen kahta erilaista kasvatusliuosta. Molemmissa liuksissa käytettiin normaalia kasvatusliuosta (DMEM/F12/B27), johon oli lisätty soluja vahingoittavien jääkiteiden muodostumista estävää 10 % DMSO:ta (Dimethyl Sulfoxide Hybri-Max™, Sigma D2650). Lisäksi vain toiseen kasvatusliukseen lisättiin 10 % naudan siikion seerumia (FBS, Gibco 10270-106). Pakastuksen testaamiseen käytettiin neurosfeerejä II-viljelmän (C57BL/6JRcc) jakoerästä P3.

Kahdelta kasvatusmaljalta kerättiin neurosfeerit 15 ml:n koeputkiin, jotka sentrifugoitiin 1100 rpm, 5 min. Supernatantit poistettiin, koeputkiin lisättiin erilaiset kasvatusliukset ja neurosfeerit suspensoitiin uudelleen liukseen, minkä jälkeen suspensiot siirrettiin kierrekorkillisiin 2 ml pakastusputkiin (Cryo.s™, Greiner Bio-One). Putket asetettiin isopropanolilla täytettyyn 18-paikkaiseen Mr. Frosty -jäädyytimeen (Nalgene™ 5100-0001, Nalge Company), joka siirrettiin heti -70 °C:een pakastimeen. Jäädyytimessä solujen lämpötilan pitäisi laskea noin 1 °C minuutissa. Seuraavana päivänä solut siirrettiin nestetyypeen pidempää varastointia varten.

Näytteet sulatettiin 33 vuorokautta myöhemmin siirtämällä nestetyypestä otetut pakastusputket nopeasti +37 °C:n vesihauteeseen, jossa putkia käännettiin varovasti, jotta sulaminen ta-

pahtuisi nopeasti ja tasaisesti. Putkiin lisättiin hitaasti 1 ml kasvatusliuosta, johon oli lisätty kasvutekijät (EGF 20 ng/ml ja FGF 10 ng/ml). Solususpensiot siirrettiin 15 ml:n koeputkiin ja ne sentrifugoitiin 1100 rpm, 3 min. Supernatantit poistettiin ja solut suspensoitiin 2 ml:aan kasvatusliuosta ja soluja eroteltiin toisistaan pipetoimalla edestakaisin kolme kertaa. Kasvatusmaljoille lisättiin 8 ml kasvutekijöitä sisältävää kasvatusliuosta, minkä jälkeen solususpensiot pipetoitiin maljoille ja maljat siirrettiin solukasvatuskaappiin. Seuraavana päivänä maljoilla oli runsaasti kuolleita soluja ja osa neurosfereistä oli epäsymmetrisen muotoisia. Molemmilta maljoilta siirrettiin parhaimman muotoiset neurosfeerit uusille maljoille 200 µl:n pipetillä, mutta kaikki maljat jätettiin vielä kasvamaan ja niille lisättiin normaalisti kasvutekijöitä ja kasvatusliuosta. Neurosfeerit kuvattiin ja niiden kasvatus lopetettiin 12 vuorokauden kulluttua.

## 6.2 Terapeuttisten yhdisteiden altistuskokeet

Altistuskokeita varten  $10^5$  yksittäistä solua tai 10 halkaisijaltaan keskikokoista ( $\varnothing$  200–400 µm) neurosfeeriä siirrettiin 48-kuoppalevyille (Thermo Scientific Nunc® 150687), jotka oli päällystetty steriiliin veteen laimennetulla 0.5 mg/ml poly-DL-ornitiinilla (Sigma P8638). Yksittäisiä soluja käytettiin erilaistumisen kvantitoimiseen. Neurosfereistä tutkittiin erilaistumisen lisäksi sferien morfologiaa sekä solujen kulkemaa etäisyyttä neurosfeerin reunasta. Solujen annettiin erilaistua kuoppalevyillä ilman kasvutekijöitä kasvatusliuoksessa, joka sisälsi tutkittavaa yhdistettä. Kasvutekijöiden puuttuessa solut kiinnittyivät kuopan pohjaan, erilaistui-  
vat ja alkoivat liikkua neurosfereistä pois päin. Kasvatusliuosta lisättiin tai osa siitä vaihdettiin joka kolmas päivä. Tutkittavia yhdisteitä lisättiin joko pelkästään käsittelyn alussa tai myös kolmantena päivänä. Solutyyppien erilaistumisen ja kehittymisen seuraamiseksi altistusten ajalliseksi kestoksi valittiin 3 ja 7 päivää.

Altistuksissa käytettiin kolmea mahdollisesti solujen kasvuun ja erilaistumiseen vaikuttavaa yhdistettä: IL-33 (hiiren interleukiini 33 -proteiini, Biorbyt Ltd. orb82806), HX600 (4-[5H-2,3-(2,5-dimetyyli-2,5-heksano)-5-metyylidibentso[b,e][1,4]diazepiini-11-yyli]-bentsoehappo) ja GW0742 (4-[[[2-[3-fluoro-4-(trifluorometyyli)-fenyyli]-4-metyyli-5-tiatsolyyli]metyyli]tio]-2-metyylifenoksi]-etikkahappo, Cayman Chemical Company). IL-33-sytokiinin vaikutuksia tutkittaessa käytettiin pitoisuuksia 10 ng/ml ja 100 ng/ml, joita verrattiin kontrolliin,

johon lisättiin sytokiinin sijasta vastaava tilavuus DPBS-liuosta (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma D8537). HX600:n vaikutuksia tutkittiin 100 nM:n pitoisuudella, mutta kokeiden edetessä kokeiltiin myös 10 nM:n pitoisuutta. Myös GW0742:n vaikutuksia tutkittiin aluksi suuremmilla 10 nM:n ja 100 nM:n pitoisuuksilla, mutta myös pienempiä 1 ja 10 nM:n annoksia kokeiltiin. HX600 ja GW0742 liuotettiin DMSO:hon (Dimethyl Sulfoxide HybridMax™, Sigma D2650), minkä vuoksi kontrollisoluille lisättiin tutkittavan yhdisteen sijasta DMSO:ta. Käytetyt pitoisuudet on esitetty taulukossa 3 ja ne perustuivat Katja Kannisen ja Tarja Malmin aikaisemmin tekemiin kokeisiin.

*Taulukko 3: Altistuskokeissa käytettyjen yhdisteiden pitoisuudet.*

Koeaine	Kontrolli	Pitoisuus 1	Pitoisuus 2	Pitoisuus 3
IL-33	0	10 ng/ml	100 ng/ml	-
HX600	0	10 nM	100 nM	-
GW0742	0	1 nM	10 nM	100 nM

### 6.3 BrdU-proliferaatiokoe

BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) on synteettinen nukleosidi, joka on tymidiinin analogi. Se voi sitoutua solusyklin S-vaiheessa DNA:han korvaten tymidiinin solujen jakautuessa (Lehner yms. 2011). BrdU voidaan paikantaa spesifisellä BrdU-vasta-ainevärjäyksellä ja siten voidaan arvioida solujen jakautumisen nopeutta. Koetta varten neurosfeerit dissosioitiin normaalisti. Yksittäisiä soluja siirrettiin  $1.5 \times 10^5$  solua/kaivo 24-kuoppalevyille ja inkuboitiin 24 h 3 µg/ml BrdU:ta (Roche Diagnostics), tutkittuja yhdisteitä ja kasvutekijöitä sisältävässä kasvatusliuoksessa, jotta BrdU sitoutuisi jakautuvien solujen DNA:han. Suhteellisen lyhyen (2-4 h) BrdU-altistuksen aikana vain osa soluista ehtii M-vaiheeseen, minkä pitäisi estää uudelleen jakautuneiden tumien värjäytyminen. Soluerä, jolle BrdU-koe suoritettiin, oli kuitenkin jakautunut alusta saakka hitaasti, minkä vuoksi inkubaatioaikaa pidennettiin 24 tuntiin. Seuraavana päivänä soluille vaihdettiin tuore kasvatusliuos, joka ei sisältänyt BrdU:ta, tutkittuja yhdisteitä tai kasvutekijöitä. Solujen annettiin kiinnittyä vuorokauden ajan kuopan pohjaan, minkä jälkeen solut fiksoitiin 4 % paraformaldehydillä.

BrdU-immunovärjäystä varten solukalvo tehtiin puoliläpäiseväksi eli permeabilisoitiin metanolilla 30 minuutin ajan, minkä jälkeen soluja pestiin kolme kertaa 0.1 M fosfaattipuskurilla, eli PBS (phosphate-buffered saline) -liuksella pH 7.4, kuten tästä eteenpäin jokaisen vaiheen jälkeen. Soluja käsiteltiin 2 N HCl:llä DNA:n denaturomiseksi yksijuosteiseksi, jotta primaarinen BrdU-vasta-aine pääsisi sitoutumaan. Vasta-aineen epäspesifinen sitoutuminen estettiin inkuboimalla soluja 10 % normaalilla vuohen seerumilla (NGS, Chemicon/Millipore S26) PBS-liuksessa 2h huoneenlämmössä. Tämän jälkeen solut immunovärjättiin käyttäen primaarista BrdU-vasta-ainetta (Roche 11170376001, 1:50) ja sekundaarista goat anti-mouse IgG-vasta-ainetta (Molecular Probes A-11004, 1:300) sekä Hoechst-tumaväriä. Immunovärjäys-menetelmä on esitetty tarkemmin seuraavassa kappaleessa.

#### 6.4 Solujen immunovärjäys

Altistuskokeiden jälkeen neurosfeerit ja yksittäiset solut fiksattiin 4 % paraformaldehydillä 20 minuutin ajan. Tämän jälkeen paraformaldehydi huuhdeltiin pois 3 x 5 min käyttäen 0.1 M PBS-liusota ja solukalvo permeabilisoitiin 20 minuutin metanolikäsittelyllä. Myös metanoli huuhdeltiin PBS-liuksella, minkä jälkeen vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen estettiin käsittelemällä soluja 10 % NGS-liuksella 1–2 tunnin ajan huoneenlämmössä.

Seuraavaksi solut immunovärjättiin lisäämällä niille 5 % NGS-liukseen laimennettu primaarinen vasta-aine, jonka annettiin sitoutua tutkittuun antigeeniin yön yli +4 °C:ssa. Primaarisina vasta-aineina käytettiin DCX:ää (Cell Signaling Technology, 1:200) uusien neuroneiden tunnistamiseen, TUJ1:a (Covance, 1:2000) kypsien neuronien tunnistamiseen ja GFAP:ta (DAKO, 1:500) astroosyyttien määrittämiseen. Lisäksi testattiin oligodendrosyyttimarkkeria O4 (R&D Systems) ja oligodendrosyyttispesifistä proteiinia Olig (Abcam) sekä neuronimarkkeria MAP-2 (Merck Millipore). Käytetyt vasta-aineet, laimennokset ja valmistajien tiedot on esitetty taulukossa 4.

*Taulukko 4: Primaariset ja sekundaariset vasta-aineet, niiden valmistajat, alkuperä, spesifisyys ja vasta-aineen merkitsemän solun fenotyyppi.*

Primaariset vasta-aineet					
Vasta-aine	Valmistaja (koodi)	Alkuperä	Laimennos	Spesifisyys	Solutyyppi
TUJ1	Covance (#MMS-435P)	Monoclonal mouse	1:2000	Neuroniluokan III $\beta$ -tubuliini	Neuroni
DCX	Cell Signaling Technology, Inc. (#4604)	Polyclonal rabbit	1:100 1:200 1:400	Mikrotubuluksiin liittyvä proteiini doublecortin	Uusi neuroni
GFAP	DAKO (Z0334)	Polyclonal rabbit	1:500	Gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini	Astroosyytti
MAP-2	Merck Millipore (MAB3418)	Monoclonal mouse	1:200	Mikrotubuluksiin liittyvä proteiini 2	Neuroni
O4	R&D Systems, Inc. (MAB1326)	Monoclonal mouse	1:200	Oligodendrosyytti-spesifinen proteiini	Oligodendrosyytti
Olig	Abcam (ab53041)	Polyclonal rabbit	1:200 1:2000	Oligodendrosyytti-spesifinen proteiini	Oligodendrosyytti
BrdU	Roche Diagnostics (11170376001)	Monoclonal mouse	1:50	Bromodeoksiuridiini	Jakautunut solu
Sekundaariset vasta-aineet					
Vasta-aine		Valmistaja (koodi)		Laimennos	
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)		Molecular Probes (A-11001)		1:500	
Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)		Molecular Probes (A-11004)		1:500	
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)		Molecular Probes (A-11008)		1:500	
Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)		Molecular Probes (A-11011)		1:500	

Seuraavana päivänä sitoutumaton primaarinen vasta-aine pestiin pois PBS-liuoksella (3 x 5 min) ja soluille lisättiin 5% NGS-liuokseen 1:500 laimennettu fluoresoiva sekundaarinen vasta-aineväri, jonka annettiin sitoutua kahden tunnin ajan huoneenlämmössä valolta suojattuna. Sekundaarisina vasta-aineina käytettiin goat anti-rabbit tai goat anti-mouse IgG -vasta-aineita (Molecular Probes), jotka oli leimattu Alexa Fluor® 488 (vihreä) tai 568 (punainen) fluoresoivilla väriaineilla. Lisäksi sekundaarinen vasta-aine lisättiin kontrollikuopalle, johon ei ollut lisätty primaarista vasta-ainetta, jolloin pystyttiin identifioimaan mahdollinen sekundaarisesta vasta-aineesta johtuva epäspesifinen sitoutuminen eli taustakohina. Sitoutumattomat sekundaariset vasta-aineet huuhdeltiin pois pesemällä soluja 3 x 5 min PBS-liuoksella.

Tumat värjättiin lisäämällä DNA:han sitoutuva Hoechst-väriaine (Sigma-Aldrich, bisBen-

zimide 33342, 2.5µg/ml, 1:2000) 5 minuutiksi. Bisbenzimidide läpäisee solukalvon ja sitoutuu A-T -rikkaille DNA-alueille muodostaen sinisellä aallonpituudella fluoresoivan yhdisteen ( $\lambda_{ex}$  346 nm,  $\lambda_{em}$  460 nm) (Sigma-Aldrich). Sitoutumaton bisbenzimidide huuhdeltiin PBS-liuoksella kolme kertaa. Lopuksi kuoppiin lisättiin PBS-liuos säilytystä varten ja kuoppalevyt säilytettiin jääkaapissa.

## 6.5 Analysointi ja tilastollinen käsittely

Kvantitatiivista analysointia varten immunovärjätetyt solut kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla (Olympus Ix70 S8-F2, Japani), joka oli yhdistetty valaistusjärjestelmään (Olympus U-RFL-T) ja digitaaliseen kameraan (Nikon, DS-U2/L2 USB). Kuvien ottamiseen käytettiin NIS Elements (v. AR 4.00.07) ohjelmaa. Erilaisia suodattimia käyttäen saatiin kuvat eri aallonpituuksilla fluoresoivista väriaineista, jotka olivat sitoutuneet eri solutyyppeihin kiinnittyneisiin vasta-aineisiin.

### 6.5.1 Liikkuminen

Solujen liikkumisen arvioimiseksi immunovärjätetyt neurosfeerit kuvattiin käyttäen 4x-objektiveja ja solujen Hoechst-värjättyneiden tumien etäisyys neurosfeerin reunasta mitattiin. Yhdestä kuopasta laskettiin keskiarvot kolmen neurosfeerin 30:n kauimmaksi vaeltaneiden solujen etäisyyksille. Kutakin konsentraatiota kohden laskettiin 3–4 rinnakkaista kuoppaa.

### 6.5.2 Erilaistuminen

Immunovärjätetyt neurosfeerit ja yksittäiset solut kuvattiin käyttäen 20x-objektiveja. Kutakin konsentraatiota kohden laskettiin 4 rinnakkaista kuoppaa ja yhdestä kuopasta kuvattiin kolme näkymää sattumanvaraisista kohdista. Neurosfeeri sijoitettiin kuvan reunaan siten, että kuvaan saatiin mahdollisimman monta erillään vaeltanutta solua. Myös yksittäiset solut kuvattiin valikoiden näkymä satunnaisesti kuitenkin välttämällä solurykelmiä. Kuvista määritettiin kullekin vasta-aineelle positiivisten solujen lukumäärä tai immunoreaktiivisen alueen pinta-ala suhteessa vastaavaan Hoechst-arvoon (tumien lukumäärä tai pinta-ala) käyttäen CellCounter1.2,

ImageJ tai Image Pro Plus (Media Cybergenics, Silver Spring, MD) ohjelmia. Epäspesifisen sitoutumisen aiheuttama taustakohina poistettiin säätämällä värikanavan kynnsarvoja sopiviksi negatiiviseen kontrolliin vertaamalla.

### 6.5.3 Toksisuus

Altistuskokeissa käytettyjen yhdisteiden toksisuutta määritettiin Hoechst-positiivisten tumien koon perusteella, koska solujen kuollessa nekroottisesti niiden tumat pienentyvät ja tiivistyvät. Siten solut, joilla oli suuri tuma luokiteltiin eläviksi. Kuolleiksi puolestaan luokiteltiin solut, joiden tuma oli pieni ja kirkas. Toksisuutta arvioitiin vertaamalla kuolleiden solujen määrää kaikkien solujen määrään. Menetelmällä saatiin suuntaa antava arvio toksisuudesta, mutta koska soluissa on myös muuta kuin tuman DNA:ta, esimerkiksi mitokondrion DNA:ta, ovat pienet Hoechst-positiiviset keskittymät voineet sisältää myös tuman ulkopuolista DNA:ta. Tämän vuoksi saadut tulokset tulisi varmistaa vielä sytotoksisuuden kvantitoimiseen tarkoitettulla kohdennetulla testillä, kuten propidiumjodidi-, syto13- tai resatsuriini-värjäyksellä.

### 6.5.4 Tilastollinen käsittely

Tulokissa on esitetty keskiarvo  $\pm$  keskivirhe (SEM). Tilastollinen analysointi suoritettiin GraphPad Prism -ohjelmalla (GraphPad Software, San Diego, CA). Genotyyppien välistä eroa tai kontrollin ja käsittelyn eroa verrattiin Studentin t-testillä. Tutkittujen yhdisteiden eri pitoisuuksien vaikutusta verrattiin yksisuuntaisella ANOVA:lla käyttäen lisäksi Tukeyn post-hoc testiä. Altistusaineiden ja genotyyppien yhteisvaikutusta analysoitiin kaksisuuntaista ANOVA:a ja Bonferronin post-hoc testiä käyttäen. Tilastollinen merkitsevyys on ilmaistu seuraavasti: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  ja \*\*\* $p < 0.001$ .

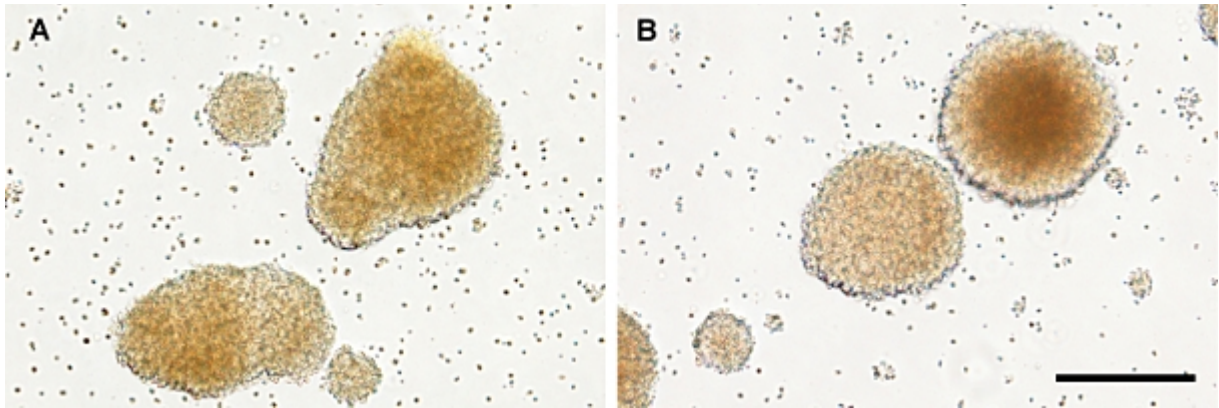


## 7 TULOKSET

### 7.1 Neurosfeerien viljely ja pakastaminen

Hiiren sikiöiden hippokampuksista eristetyt NPC-solut jakautuivat bFGF- ja EGF-kasvutekijöiden läsnäollessa ja muodostivat noin viikossa jaettavissa olevia vapaasti kelluvia neurosfeerejä. Neurosfeerien kasvu kuitenkin hidastui jakokertojen myötä ja viljely lopetettiin ennen kymmenettä jakokertaa. Lisäksi III-viljelmän neurosfeerit kasvoivat huomattavan hitaasti verrattuna muihin viljelmiin ja maljoilla oli runsaasti yksittäisiä kuolleita soluja. Parhaimpia neurosfeerejä siirrettiin uusille maljoille, jotta solujen laatu olisi parantunut. Tämä ei kuitenkaan nopeuttanut kasvua. Heikon kasvun lisäksi III-viljelmän immunovärjäykset poikkesivat muista viljelyeristä, sillä niissä oli runsaasti kuolleita soluja, neurosfeerit olivat suuria ja epäsymmetrisiä, ja solut olivat liikkuneet vain lyhyen matkan neurosfeerien reunasta. Tämän koe-erän poikkeavuuden vuoksi siitä saadut tulokset hylättiin ja kokeet toistettiin uusista sikiöistä eristetyillä soluilla.

Koska neurosfeerien kasvu hidastui jakokertojen myötä, testattiin solujen pakastamista pidempiaikaista säilytystä ja käyttöä varten. Neurosfeeriviljelmiä pakastettiin kahdessa eriliuoksessa, joissa molemmissa oli kasvatusliuosta, kasvutekijöitä ja 10 % DMSO:ta. Toisessa liuoksessa oli näiden lisäksi 10 % FBS-liuosta. Sulatuksen jälkeisenä päivänä molemmissa viljelmissä oli runsaasti kuolleita soluja ja jonkin verran epäsymmetrisen muotoisia neurosfeerejä. Epäsymmetristen sferien määrä oli kuitenkin selvästi pienempi FBS-liuoksen kanssa pakastetuissa viljelmissä. Ero neurosfeerien muodossa ei ollut enää selkeä 12 vuorokauden kasvatuksen kuluttua, jolloin neurosfeerit kuvattiin (kuva 8). Pakastuksen todettiin soveltuvan neurosfeerien pitkäaikaiseen säilyttämiseen ja FBS-liuosta sisältävän pakastusliuoksen todettiin ylläpitävän neurosfeerien kuntoa parhaiten pakastuksen aikana.



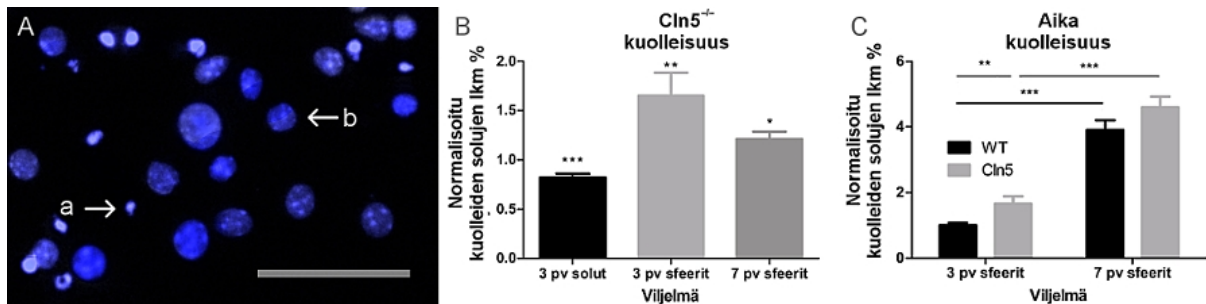
*Kuva 8: Valomikroskooppikuva pakastetuista hiiren NPC-neurosfeereistä 12 vuorokautta sulatuksen jälkeen. Yksittäiset solut ovat kuolleita. (A) Neurosfeerit, jotka pakastettiin 10 % DMSO-liuosta sisältävässä kasvatusliuoksessa, poikkeavat selvästi normaalista pallomaisesta muodosta. (B) Neurosfeerit, jotka pakastettiin 10 % DMSO-liuosta ja 10% FBS-liuosta sisältävässä kasvatusliuoksessa ovat muodoltaan pallomaisempia. Mittakaavajana = 200  $\mu$ m.*

## 7.2 Genotyypin vaikutus solujen kasvuun, liikkumiseen ja erilaistumiseen

Hiiren NPC-solujen selviytymistä, jakautumista, erilaistumista ja liikkumista tutkittiin kahdessa rinnakkaisessa kokeessa (koe I ja koe V), joista ensimmäisessä käytettiin sikiöpäivänä E18 ja toisessa sikiöpäivänä E15 eristettyjä soluja. Kummassakin kokeessa ylläpidettiin ja käsiteltiin yhtä aikaa villityypin ja  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin soluja samalla tavalla, minkä vuoksi näiden kokeiden tuloksia on vertailtu rinnakkaisina ja ne on yhdistetty normalisoimalla.

### 7.2.1 Solujen selviytyminen ja kuolleisuus

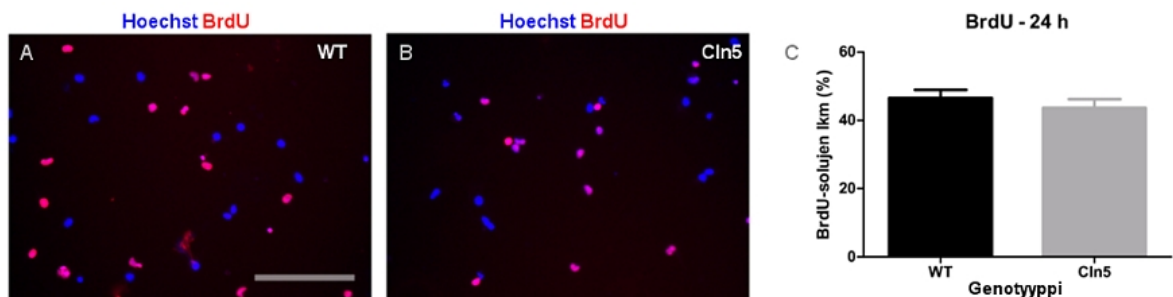
Solujen selviytymistä erilaistuskokeissa tarkasteltiin tumien ulkonäön perusteella. Eläviksi luokiteltiin solut, joiden Hoechst-värjäytyneet tumat olivat suuria ja sävyltään tummia, kun taas kuolleiksi määritettiin solut, joiden tumat olivat pieniä, kondensoituneita ja kirkkaita (kuva 9). Kaikista kokeista yhteen kootuissa normalisoiduissa tuloksissa havaittiin kuolleisuuden olevan merkittävästi pienempi  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin kolmen päivän yksittäisten solujen viljelmissä verrattuna villityypin viljelmiin, mutta kolmen ja seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä kuolleisuus oli suurempi  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin viljelmissä verrattuna villityypin viljelmiin. Molemmassa genotyypissä kuolleiden solujen osuus oli merkittävästi suurempi seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä verrattuna kolmen päivän viljelmiin.



Kuva 9: Genotyypin ja ajan vaikutus kuolleiden solujen määrään. (A) Fluoresenssimikroskooppikuva Hoechst-värjätystä (sininen) tumista yksittäisten solujen kolmen päivän viljelmässä, jossa a = kuolleen solun pieni ja kirkas tuma, ja b = elävän solun suuri ja sävyltään tumma tuma. Mittakaavajana = 50  $\mu$ m. (B) Rinnakkaisten kokeiden kuolleiden solujen osuus verrattuna kaikkien solujen lukumäärään on yhdistetty normalisoimalla kunkin viljelmän viljelytyn tulos arvoon 1, joista pylväänä esitetyt Cln5<sup>-/-</sup>-viljelmien tulokset poikkeavat. Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypissä kuolleiden solujen osuus on merkittävästi pienempi kolmen päivän soluviljelmissä, mutta neurosfeeriviljelmissä niiden osuus on merkittävästi suurempi. (C) Neurosfeeriviljelmissä kuolleiden solujen osuus oli molemmissa genotyypeissä suurempi seitsemän päivän viljelmissä verrattuna kolmen päivän viljelmiin, joiden viljelytyn tulos normalisoitiin arvoon 1. Tilastollinen merkitsevyys \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

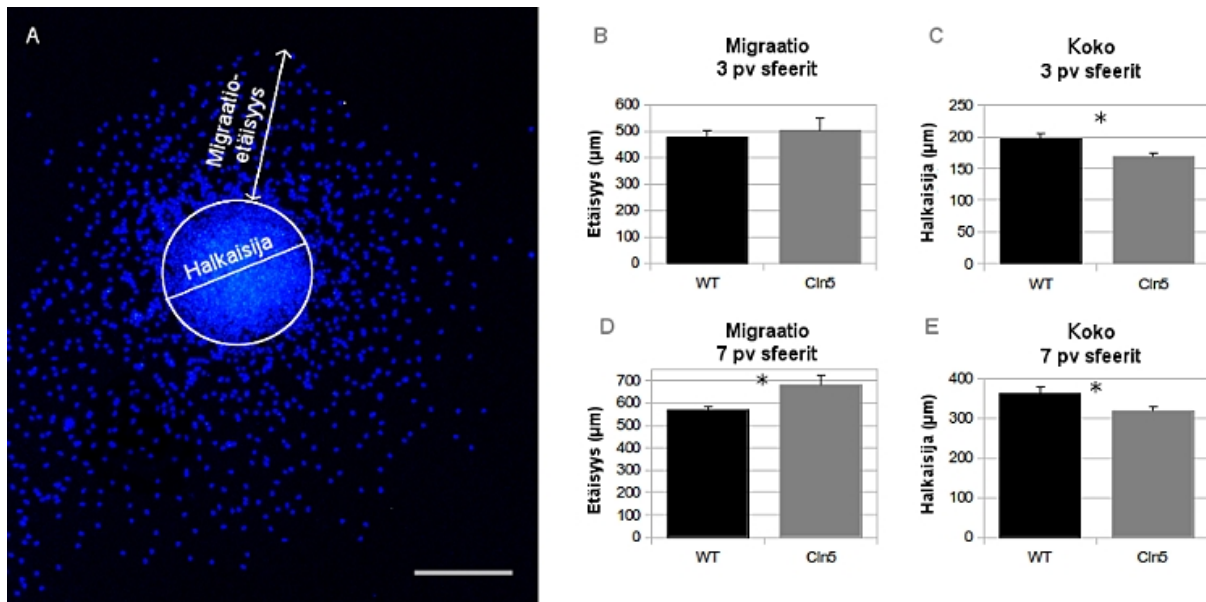
## 7.2.2 Solujen jakautuminen ja liikkuminen

Solujen jakautumista tutkittiin BrdU-värjäyksellä. Siinä eläviä soluja altistettiin 24 tunnin ajan BrdU-väriaineelle, joka sitoutuu jakautuvien solujen DNA:han. Altistuksia tehtiin kokeen IV-soluille, joiden kasvussa havaittiin poikkeavuuksia verrattuna muihin viljelmiin. Villityypin soluista oli jakautunut keskimäärin  $46.5 \pm 2.42$  %, kun taas Cln5<sup>-/-</sup>-solut olivat jakautuneet hieman vähemmän  $43.6 \pm 2.25$  % (kuva 10). Genotyyppien välillä ei havaittu merkitsevää eroa solujen jakautumisessa ( $p=0.4102$ ).



Kuva 10: Genotyypin vaikutus solujen jakautumiseen. Fluoresenssimikroskooppikuvat Hoechst (sininen) ja BrdU (punainen) -immunovärjätystä (A) villityypin (WT) ja (B) Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin soluviljelmistä 24 h BrdU-inkubaation jälkeen. Mittakaavajana = 100  $\mu$ m. (C) Jakautuneiden solujen osuudessa ei ollut eroa genotyyppien välillä.

Solujen liikkumista tutkittiin mittaamalla solujen kulkema etäisyys neurosfeerin reunasta ja samalla mitattiin neurosfeerin halkaisija ensimmäisessä kokeessa (n=15) (kuva 11). Solujen liikkuma etäisyys oli sekä kolmen päivän että seitsemän päivän kokeissa suurempi  $Cln5^{-/-}$ -genotyypissä, mutta ero oli merkitsevä vain seitsemän päivän kokeessa (p= 0.0282). Neurosfeerin halkaisija oli puolestaan pienempi  $Cln5^{-/-}$ -genotyypissä sekä kolmen (p=0.0200) että seitsemän päivän (p=0.0336) aikapisteissä. Negatiivinen korrelaatio solun liikkuman matkan ja neurosfeerin koon välillä voi johtua siitä, että reunimmat solut ovat siirtyneet neurosfeerin ulkopuolelle.



Kuva 11: Genotyypin vaikutus neurosfeerien kokoon ja solujen kulkemaan etäisyyteen. (A) Neurosfeerin halkaisijan ja vaeltaneiden solujen etäisyyden määrittämistapa. Mittakaavajana = 200 μm. Kolmen päivän kokeessa (B) solujen kulkemassa etäisyydessä ei ollut merkitsevää eroa, mutta (C) neurosfeerien halkaisija oli merkitsevästi pienempi  $Cln5^{-/-}$ -genotyypissä. Seitsemän päivän kokeessa (D) solujen vaeltama matka oli merkitsevästi pidempi ja (E) neurosfeerien halkaisija pienempi  $Cln5^{-/-}$ -genotyypissä. Tilastollinen merkitsevyys: \*p<0.05, n=15.

### 7.2.3 Kantasolujen erilaistuminen

Hermokantasolujen erilaistumista eri solutyypeiksi tutkittiin immunovärjäyksillä, joissa käytettiin DCX-vasta-ainetta uusien neuronien, TUJ1-vasta-ainetta kypsien neuronien ja GFAP-vasta-ainetta astroosyyttien tunnistamiseen. DCX-vasta-aineesta ei ollut aikaisempaa kokemusta, joten immunovärjäystä testattiin kolmella primaarisen vasta-aineen laimennossuhteella,

joita olivat 1:100, 1:200 ja 1:400. Näistä 1:200 osoittautui parhaaksi, sillä immunoreaktiivisuus oli riittävän voimakasta ja samalla taustakohina vähäistä, joten DCX-positiiviset solut erottuivat selkeästi. Lisäksi kokeiltiin erilaisia sekundaaristen vasta-aineiden laimennoksia, joista 1:500 todettiin soveltuvan parhaiten.

Solujen erilaistumista kvantitoitiin fluoresenssimikroskooppikuvista aluksi kahdella tavalla: a) laskemalla kullekin vasta-aineelle positiivisten solujen lukumääriä suhteessa kaikkien Hoechst-positiivisten tumien lukumäärään, ja b) määrittämällä kunkin vasta-aineen immunoreaktiivisen alueen osuutta Hoechst-positiivisten tumien immunoreaktiivisen alueen osuudesta. Immunoreaktiivinen alue ei suoraan ilmaise solujen lukumäärää, sillä solujen koko ja vasta-aineen intensiteetti voi vaihdella huomattavasti. Kummallakin tavalla saatiin kuitenkin samansuuntaisia tuloksia, joten immunoreaktiivisen alueen katsottiin korreloivan myös solujen lukumäärän kanssa. Lisäksi immunoreaktiivisen alan määrittäminen oli huomattavasti nopeampaa kuin solujen manuaalinen laskeminen, joten se valittiin kvantitointimenetelmäksi.

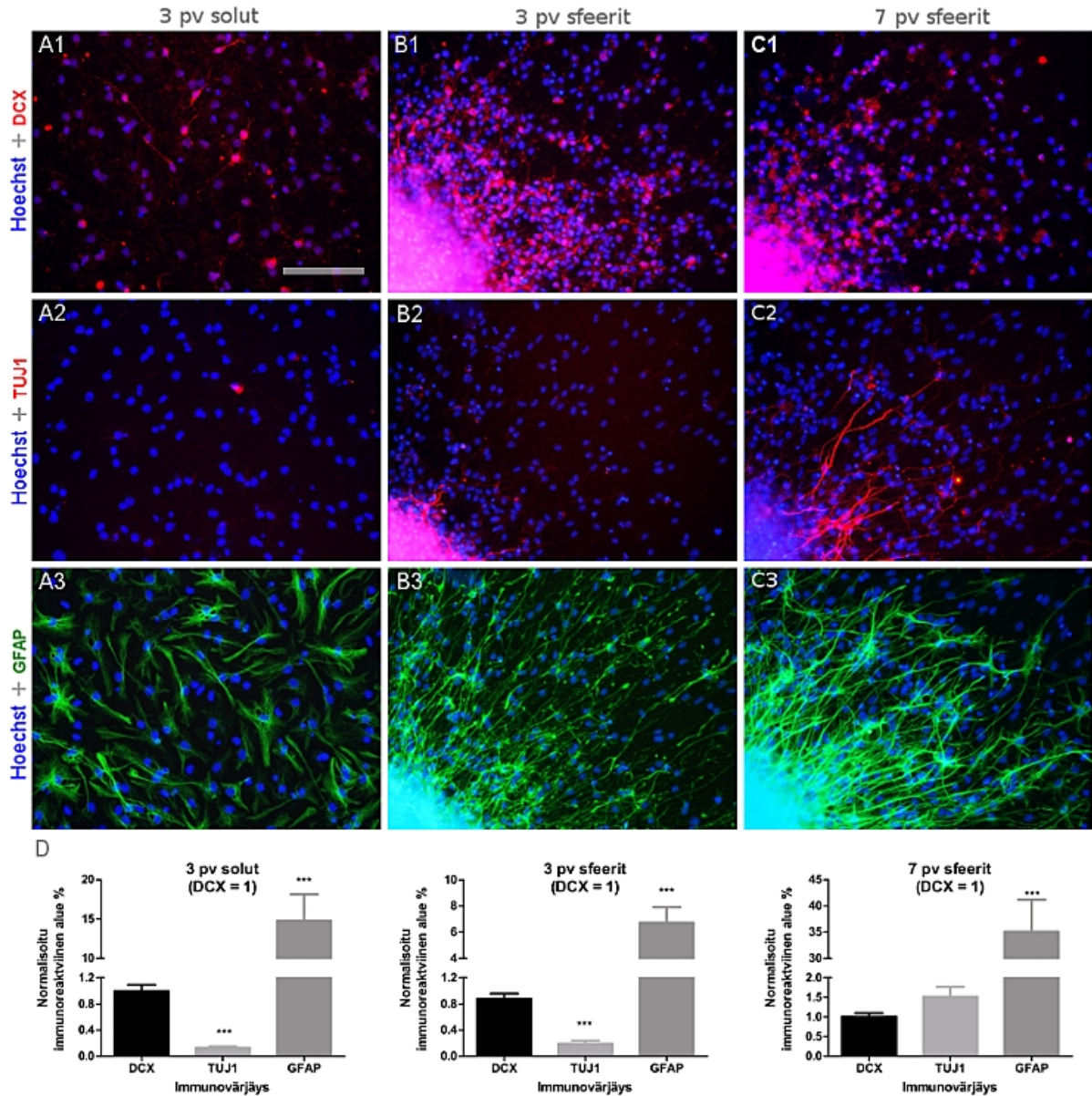
#### 7.2.3.1 Villityypin viljelmät

Villityypin kokeissa solut erilaistuivat kaikissa viljelmätyypeissä voimakkaimmin GFAP-positiivisiksi soluiksi. GFAP-positiivisen immunoreaktiivisen alueen osuus suhteessa Hoechst-positiivisten tumien alaan oli jopa kymmeniä kertoja suurempi verrattuna vastaavaan DCX- tai TUJ1-positiiviseen alaan. Joskin viljelmästä V tehdyssä kolmen päivän erilaistuskokeessa GFAP-positiivisten solujen määrä oli huomattavan alhainen ja DCX-positiivisten solujen määrä oli niitä runsaampi. Tämä oli kuitenkin yksittäinen poikkeus ja yhdistettäessä kaikkien kokeiden tulokset normalisoimalla GFAP-positiivisten solujen määrä oli selkeästi suurin tutkituista solutyypeistä.

DCX-positiivisia uusia neuroneita oli runsaimmin kolmen päivän aikapisteissä sekä yksittäisten solujen että neurosfeerien viljelmissä (kuva 12). Seitsemän päivän neurosfeeriviljelmässä uusien neuronien määrä oli sen sijaan laskenut verrattuna kolmen päivän aikapisteisiin. TUJ1-positiivisia kypsiä neuroneja ei sitä vastoin ollut juuri lainkaan kolmen päivän viljelmässä, mutta seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä niitä oli runsaammin. Uusien neuronien määrän väheneminen ja samalla kypsien neuronien määrän lisääntyminen ajan myötä luultavasti viittaa siihen, että hermokantasolut kehittyvät ensin DCX-immunoreaktiiviksi uusiksi



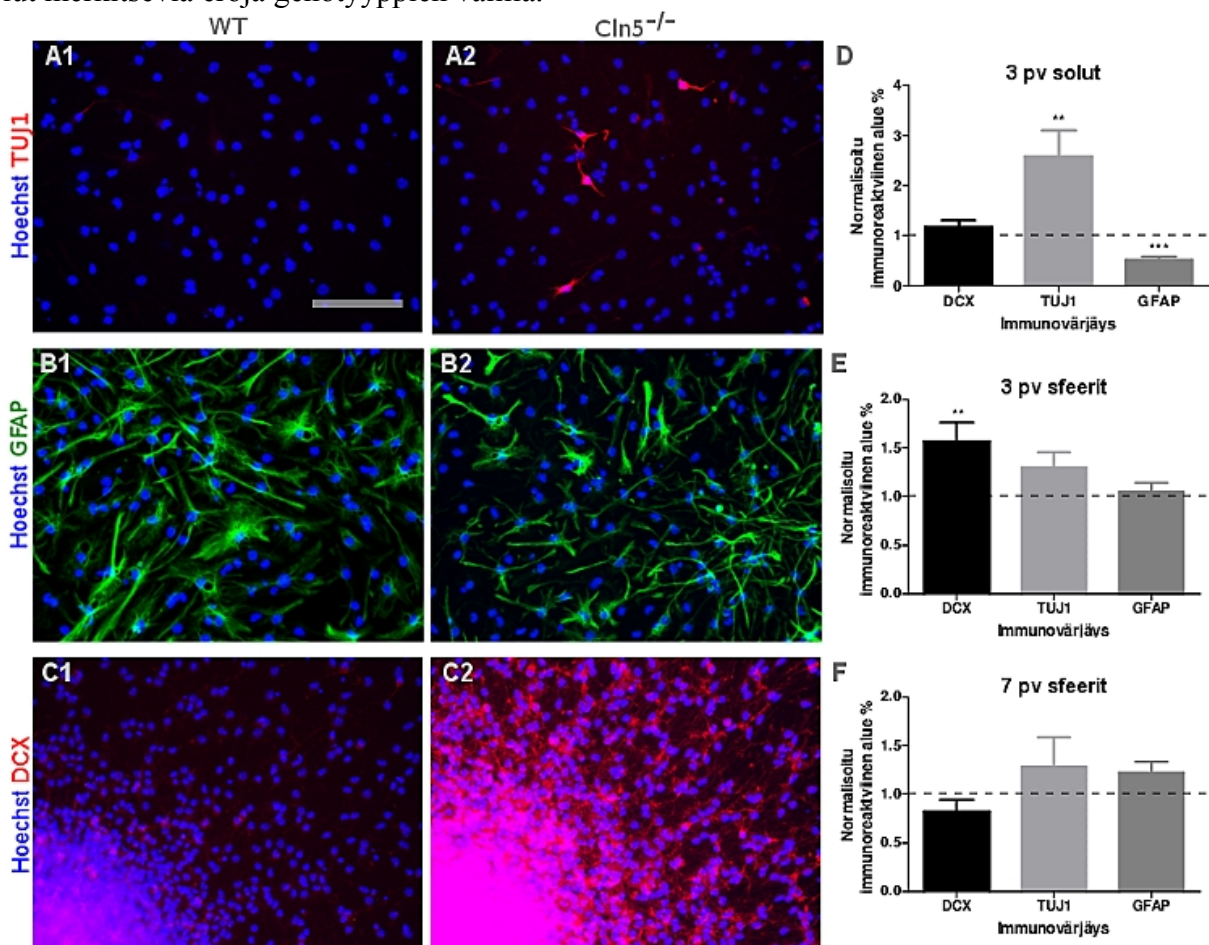
neuroneiksi, joista osa kehittyi seitsemään päivään mennessä TUJ1-reaktiivisiksi kypsiksi neuroneiksi.



Kuva 12: Villityypin NPC-solujen erilaistuminen neuroneiksi ja astrosyyteiksi. Immunofluorenssikuvat hiiren E18 sikiöiden hippokampuksen solujen NPC-soluvielmistä, jotka ovat erilaistuneet ilman kasvutekijöitä (A) yksittäisinä soluina kolmen päivän ajan sekä (B) neurosfereinä kolmen ja (C) seitsemän päivän ajan. (1) DCX-vasta-aineella (punainen) värjättyt uudet neuronit, (2) TUJ1- värjättyt (punainen) kypsät neuronit, (3) GFAP-värjättyt (vihreä) astrosyytit. Tumat on värjätty Hoechst-väriaineella (sininen). Mittakaavajana = 100 µm. (D) Yhdistetyt tulokset eri kokeiden vasta-aineelle immunoreaktiivisen alueen osuudesta Hoechst-positiivisten tumien alaan, joissa DCX:n saama arvo on normalisoitu 1:ksi. Astrosyyttien osuus oli kaikissa erilaistuskokeissa suurin. Uusien neuronien osuus oli kolmen päivän kokeissa suurempi kuin seitsemän päivän kokeissa. Tilastollinen merkitsevyys: \*\*\* $p < 0.001$ .

### 7.2.3.2 Cln5<sup>-/-</sup>-viljelmät

Cln5<sup>-/-</sup>-hiirten hermokantasolujen erilaistuminen neuroneiksi ja astroosyyteiksi oli samankaltaista kuin villityypin soluviljelmissä, mutta joitakin merkitseviä eroja oli havaittavissa. Normalisoiduissa tuloksissa TUJ1-positiivisten kypsien neuronien määrä oli suurempi ja GFAP-positiivisten astroosyyttien määrä oli pienempi Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypissä kolmen päivän yksittäisten solujen viljelmissä (kuva 13). Kolmen päivän neurosfeereissä DCX-positiivisten uusien neuronien määrä oli merkitsevästi suurempi, mutta seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä ei ollut merkitseviä eroja genotyyppien välillä.

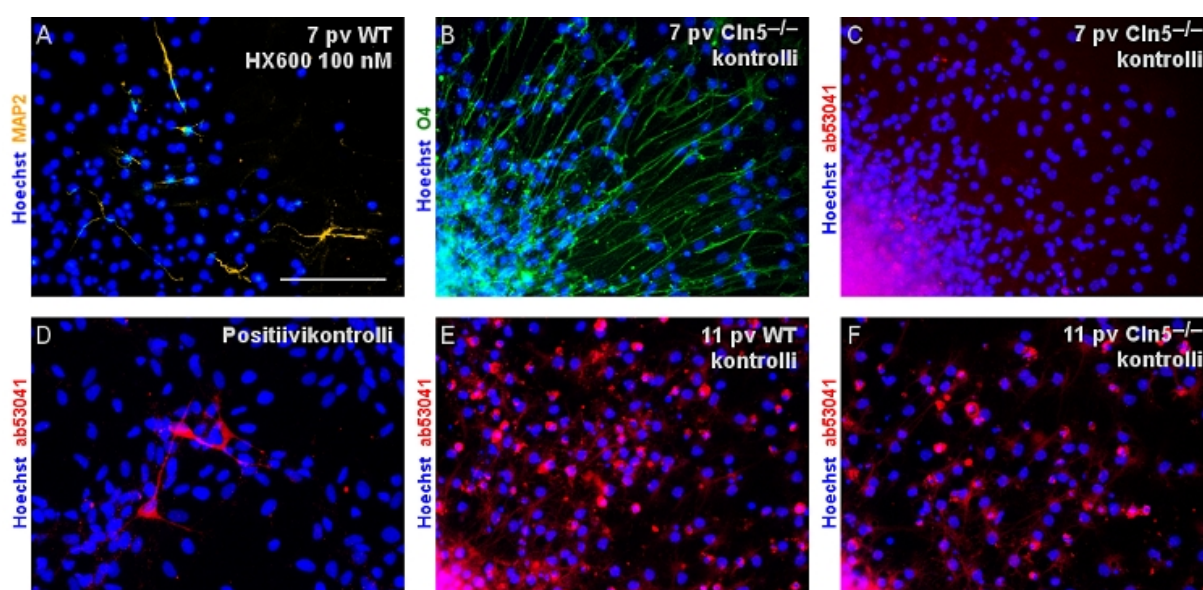


Kuva 13: Ero villityypin ja Cln5<sup>-/-</sup> NPC-solujen erilaistumisessa uusiksi ja kypsiksi neuroneiksi sekä astroosyyteiksi. Fluoresenssimikroskooppikuvat (1) villityypin ja (2) Cln5<sup>-/-</sup> genotyypin viljelmistä. (A) TUJ1-värijätyt (punainen) kypsät neuronit ja (B) GFAP-värijätyt (vihreä) astroosyytit yksittäisten solujen kolmen päivän viljelmissä. (C) DCX-värijätyt (punainen) uudet neuronit kolmen päivän neurosfeeriviljelmässä. Tumat on värjätty Hoechst-väriellä (sininen). Mittakaavajana = 100 µm. (E-F) Vasta-aineen immunoreaktiivisen alueen osuus on normalisoitu villityypissä arvoon yksi (katkoviiva). Kuvaajissa on esitetty pylväinä Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin saamat arvot. Tilastollinen merkitsevyys verrattuna villityypiin: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



### 7.2.3.3 Muut vasta-ainevärjäykset: MAP-2, O4 ja Olig

DCX:n, TUJ1:n ja GFAP:n lisäksi testattiin kypsien neuronien tunnistamiseen käytettyä MAP-2 vasta-ainetta sekä kahta oligodendrosyyttien tunnistamiseen käytettyä vasta-ainetta, O4 ja Olig (kuva 14). MAP-2:lla saatiin samanlaisia tuloksia kuin TUJ1:lla, joten näistä vain jälkimmäinen valittiin kvantitatiivisiin kokeisiin. Oligodendrosyyttivasta-aineilla (O4 ja Olig) havaittiin voimakasta epäspesifistä sitoutumista tai ei lainkaan positiivisia soluja, minkä vuoksi niitä ei käytetty varsinaisissa kvantitatiivisissa kokeissa.



Kuva 14: Muut testatut vasta-ainevärjäykset, joita ei käytetty epäspesifisen sitoutumisen vuoksi kvantitointiin. MAP-2 käytetään kypsien neuronien tunnistamisessa ja O4 sekä Olig käytetään oligodendrosyyttien tunnistamisessa.

## 7.3 Terapeuttisten yhdisteiden vaikutukset

Altistuskokeissa tutkittiin IL-33-sytokiinin sekä HX600- ja GW0742-aineiden vaikutuksia yksittäisten solujen ja neurosfeerien erilaistumiseen kolmen ja seitsemän päivän aikapisteissä samoin kuin tutkittaessa villityypin ja  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin eroja. Lisäksi tutkittiin IL-33:n vaikutusta solujen jakautumiseen 24 tunnin BrdU-kokeessa.

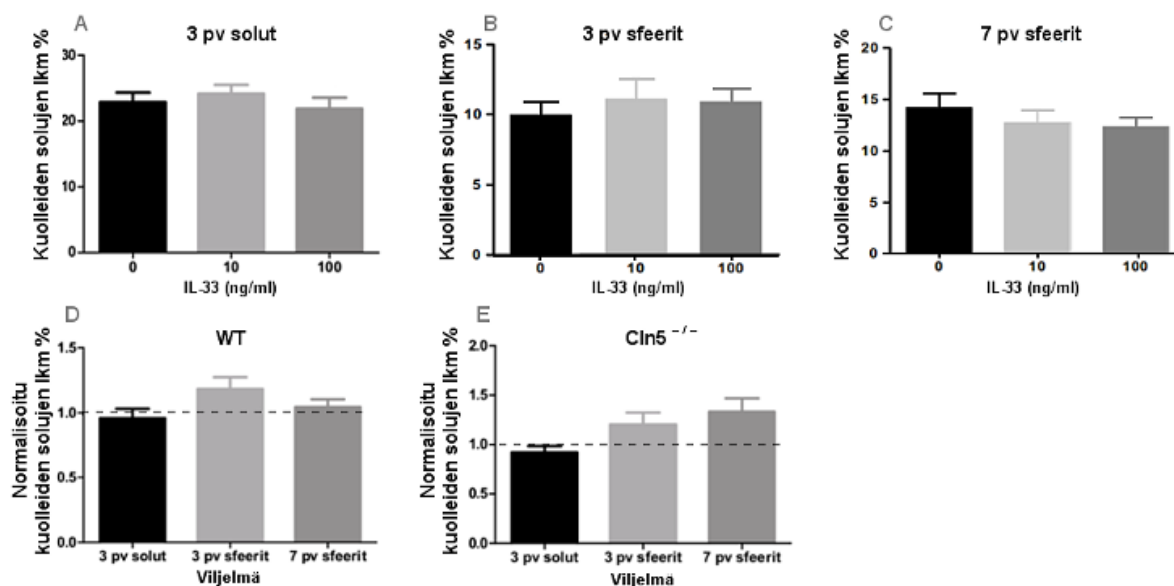


### 7.3.1 IL-33-sytokiinin vaikutus hiiren kantasoluihin

Immuunivasteeseen osallistuvan sytokiinin, IL-33:n, vaikutuksia tutkittaessa käytettiin ensimmäisessä kokeessa konsentraatioina 10 ng/ml ja 100 ng/ml. Koska pienemmällä konsentraatiolla ei havaittu selvää vastetta erilaistumisessa ja koska kumpikaan konsentraatio ei ollut merkittävän toksinen, käytettiin toisessa kokeessa vain 100 ng/ml konsentraatiota. IL-33-käsittelyä verrattiin kontrollikäsittelyyn, johon lisättiin sytokiinin sijasta vastaava tilavuus DPBS-liuosta. Kaikista kokeista yhdistettiin tulokset normalisoimalla kontrollikäsittely arvoon yksi – näin 100 ng/ml IL-33-käsittely sai yhdestä poikkeavan arvon.

#### 7.3.1.1 Toksisuus

IL-33-käsittelyjen toksisuutta arvioitiin vertaamalla kuolleiden solujen lukumäärää elävien solujen määrään. Ensimmäisessä kokeessa tarkasteltiin 10 ng/ml ja 100 ng/ml pitoisuuksien vaikutusta kuolleiden solujen osuuteen (kuva 15). Villityypin viljelmissä kuolleiden solujen

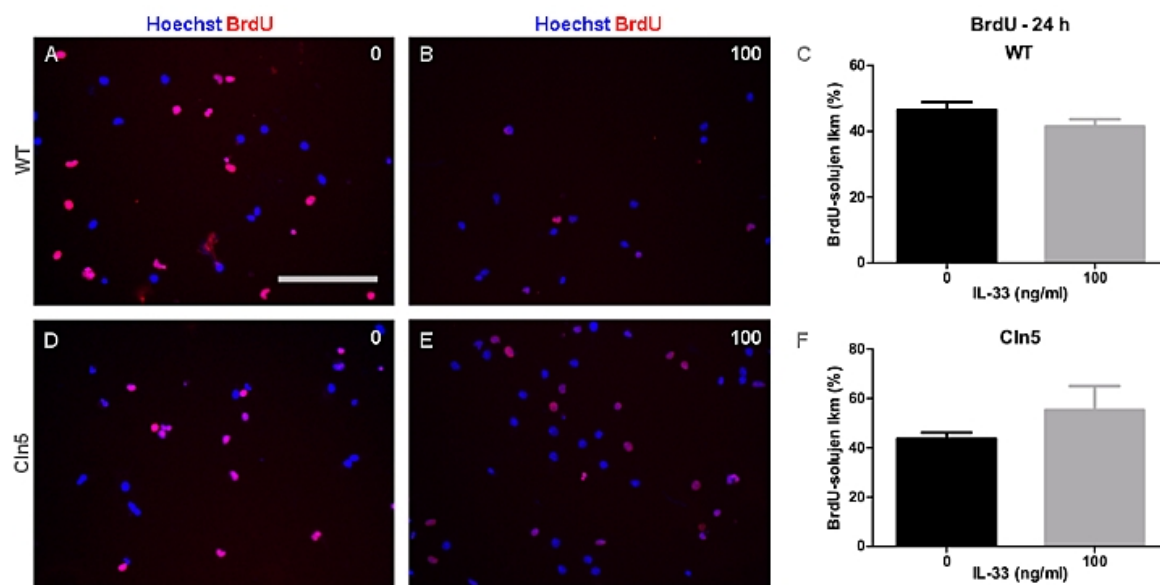


Kuva 15: IL-33-sytokiinin toksisuus NPC-viljelmissä. Kuolleiden solujen tumien immunoreaktiivisen alueen osuus kaikkien tumien alasta verrattuna kontrollikäsittelyyn (0) villityypin (A) kolmen päivän yksittäisten solujen, (B) kolmen päivän neurosfeerien ja (C) seitsemän päivän neurosfeerien erilaistuskokeissa. Normalisoimalla yhdistetyt rinnakkaisten kokeiden tulokset, joissa esitetty kontrollin arvosta 1 poikkeavat 100 ng/ml saamat arvot (D) villityypin ja (E) Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin viljelmissä.

osuus oli noin 20 % yksittäisten solujen viljelmissä ja 10-15 % neurosfeeriviljelmissä. Missään kokeista ei havaittu merkitsevää eroa IL-33 käsittelyjen ja kontrollin välillä. Myöskään normalisoiduissa tuloksissa ei ollut merkitsevää eroa kuolleiden solujen osuudessa 100 ng/ml IL-33-käsittelyn ja kontrollin välillä. Mielenkiintoisesti kuolleiden solujen osuus normalisoiduissa IL-33-käsittelyssä villityypin viljelmissä oli pienempi seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä verrattuna kolmen päivän viljelmiin, mikä voisi merkitä sitä, että elävien solujen määrä kasvoi ajan ja IL-33 käsittelyn myötä näissä viljelmissä. Tämä voisi tarkoittaa sitä, että IL-33 lisäsi solujen jakautumista villityypin neurosfeeriviljelmissä.

### 7.3.1.2 Solujen jakautuminen ja liikkuminen

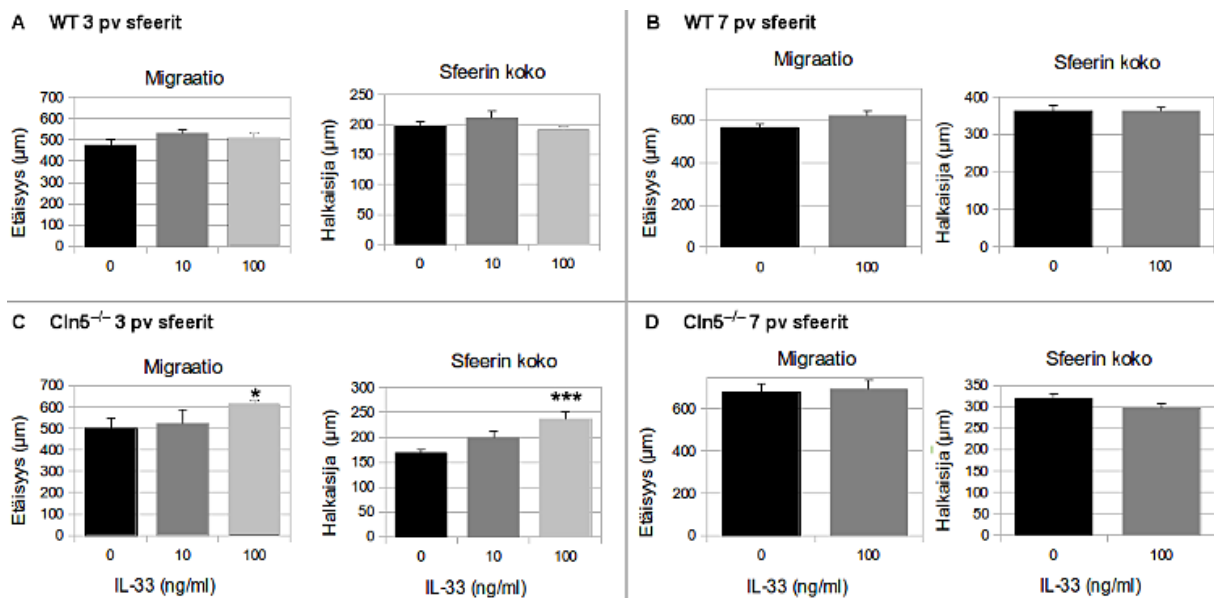
IL-33-sytokiinin vaikutusta solujen jakautumiseen tutkittiin 24 tunnin BrdU-kokeessa, joka tehtiin III-viljelmän soluille (kuva 16). BrdU-immunovärjäyksessä villityypin jakautuneiden solujen osuus vaikutti olevan pienempi 100 ng/ml IL-33-pitoisuudella, kun taas *Cln5*<sup>-/-</sup>-viljelmissä jakautuneiden solujen osuus vaikutti suuremmalta 100 ng/ml pitoisuudella. Erot eivät kuitenkaan olleet merkitseviä.



Kuva 16: IL-33-sytokiinin vaikutus NPC-solujen jakautumiseen pitoisuudella 100 ng/ml. Fluoresenssimikroskooppikuvat Hoechst (sininen) ja BrdU (punainen) -immunovärjätyistä (A, B) villityypin (WT) ja (D, E) *Cln5*<sup>-/-</sup>-genotyypin soluviljelmistä 24 h BrdU-inkubaation jälkeen kokeessa III. IL-33-käsittely (C) vähentää villityypin jakautuneiden solujen osuutta (%) kaikista soluista, mutta (F) lisää *Cln5*<sup>-/-</sup>-solujen jakautumista. Mittakaavajana = 100  $\mu$ m.

Solujen vaeltamaa matkaa ja neurosfeerien kokoa verrattaessa ei havaittu merkitsevää eroa villityypin kontrollin tai IL-33 käsittelyjen välillä. Kolmen päivän aikapisteessä 10 ng/ml pitoisuus vaikutti lisäävän sekä liikutun matkan pituutta että sfeerien kokoa, mutta ero ei ollut merkitsevä kummassakaan (kuva 17). Seitsemän päivän aikapisteessä tutkittiin vain 100 ng/ml pitoisuuden vaikutusta, mutta sytokiinilla ei havaittu olevan merkitsevää vaikutusta solujen liikkumiseen eikä sfeerin kokoon.

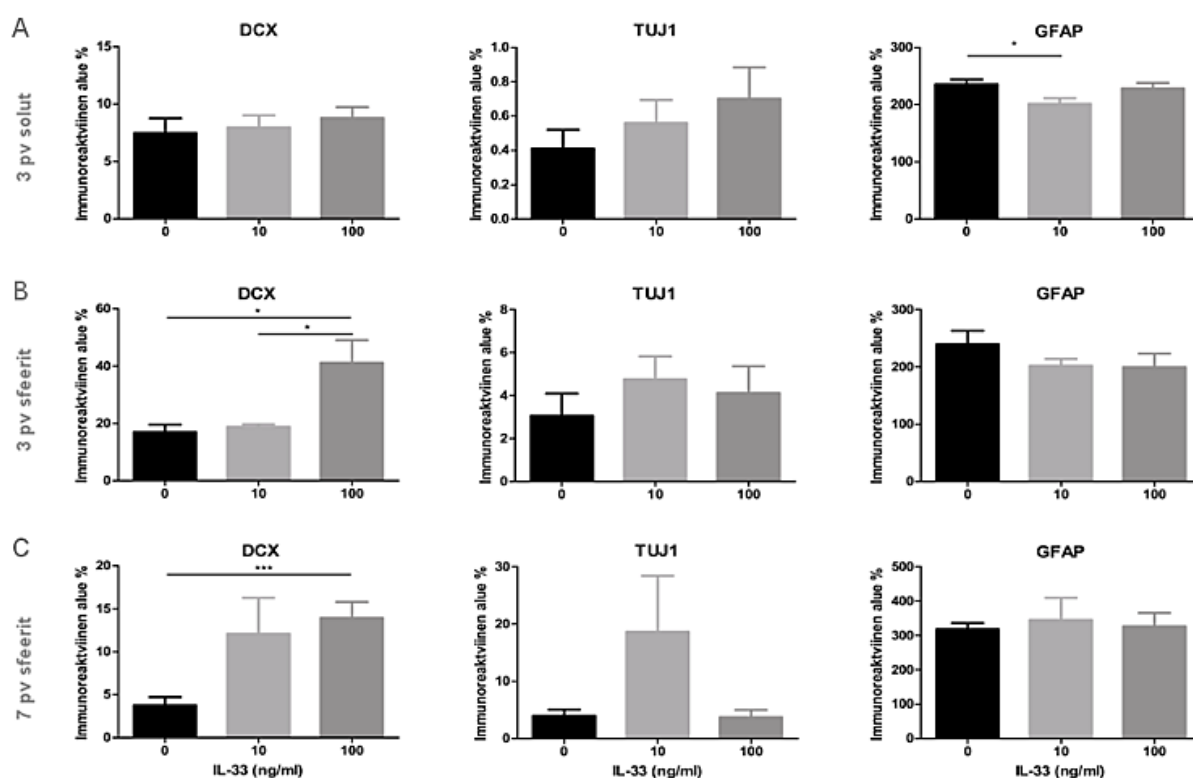
$Cln5^{-/-}$ -genotyypin neurosfereissa havaittiin sitä vastoin merkitseviä eroja IL-33-käsittelyjen ja kontrollin välillä kolmen päivän aikapisteessä (kuva 17). IL-33 näytti lisäävän solujen liikkumista molemmilla pitoisuuksilla, mutta ero oli merkitsevä vain suuremmalla 100 ng/ml pitoisuudella verrattuna kontrolliin ( $p=0.0499$ ). Myös sfeerien koossa havaittiin kasvava trendi pitoisuuden kasvaessa, mutta jälleen ero oli merkitsevä vain suuremmalla pitoisuudella 100 ng/ml verrattaessa kontrolliin ( $p=0.0001$ ). Seitsemän päivän aikapisteessä verrattiin vain suurempaa pitoisuutta kontrolliin, mutta merkitsevää eroa ei havaittu solujen kulkemassa etäisyydessä eikä sfeerien koossa.



Kuva 17: IL-33-käsittelyn vaikutus neurosfeerien kokoon ja solujen kulkemaan etäisyyteen. (A) Kolmen päivän villityypin neurosfeerit. (B) Seitsemän päivän villityypin neurosfeerit. (C) Kolmen päivän  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin neurosfeerit. (D) Seitsemän päivän  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin neurosfeerit. Tilastollinen merkitsevyys: \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ .  $n=15$ .

### 7.3.1.3 Erilaistuminen

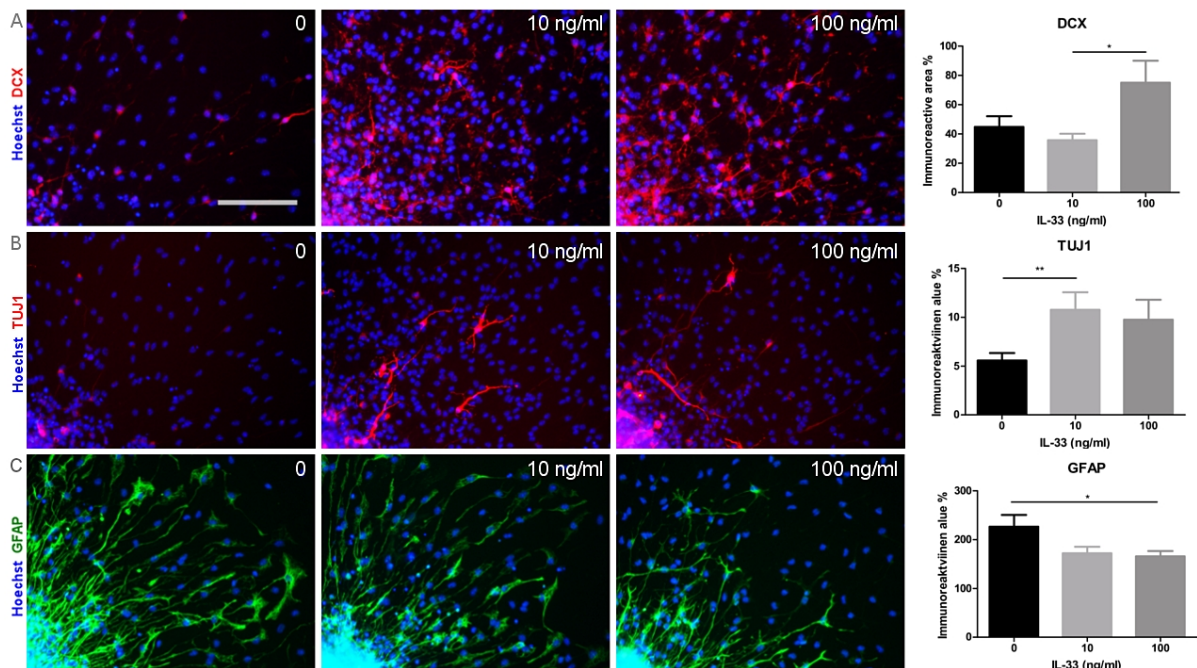
IL-33:n vaikutusta solujen erilaistumiseen tutkittiin immunovärjäyksillä, joissa käytettiin DCX-, TUJ1- ja GFAP-vasta-aineita. Ensimmäisessä kokeessa havaittiin IL-33-käsittelyn lisäävän DCX-positiivisten uusien neuronien määrää kaikissa villityypin viljelmissä (kuva 18). Merkittävästi uusien neuronien määrä kasvoi kolmen ja seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä IL-33-konsentraatiolla 100 ng/ml. Myös TUJ1-positiivisten kypsien neuronien määrä kasvoi IL-33-altistuksen myötä, mutta muutos ei ollut merkitsevä. GFAP-positiivisten solujen määrä sen sijaan vaikutti vähenevän kolmen päivän aikapisteissä IL-33-käsittelyn seurauksena, ja merkittävästi niiden määrä väheni yksittäisten solujen viljelmissä 10 ng/ml IL-33-altistuksessa. Seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä IL-33-käsittelyllä ei ollut vaikutusta GFAP-positiivisten solujen määrään.



Kuva 18: IL-33-sytokiinin vaikutus villityypin NPC-soluviljelmien erilaistumiseen uusiksi neuroneiksi (DCX), kypsiksi neuroneiksi (TUJ1) ja astrosyyteiksi (GFAP) 10 ng/ml ja 100 ng/ml pitoisuuksilla kokeessa I. Solujen määrä on ilmaistu vasta-aineen immunoreaktiivisen alueen osuutena tumien alasta. IL-33 (A) vähentää astrosyyttien määrää 10 ng/ml pitoisuudella kolmen päivän yksittäisten solujen viljelmässä ja lisää uusien neuronien määrää (B) kolmen päivän ja (C) seitsemän päivän neurosfeeriviljelmässä 100 ng/ml pitoisuudella. Tilastollinen merkitsevyys: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

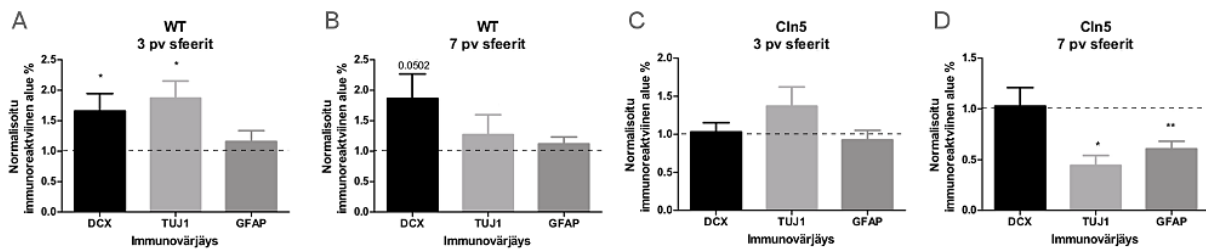
Rinnakkaisessa kokeessa saadut tulokset villityypin viljelmien erilaistumisesta IL-33-altistuksissa poikkesivat ensimmäisen kokeen tuloksista. Päinvastoin kuin ensimmäisessä kokeessa DCX-positiivisten solujen määrä näytti vähenevän ja GFAP-positiivisten solujen määrä kasvavan neurofeeriviljelmissä. Määrissä ei kuitenkaan ollut merkitsevää eroa. Sitä vastoin TUJ1-positiivisten solujen määrä kasvoi merkitsevästi kolmen päivän neurosfereissa, minkä lisäksi kasvava trendi oli havaittavissa myös seitsemän päivän neurosfereissa.

Ensimmäisessä kokeessa IL-33-altistuksen vaikutus oli *Cln5*<sup>-/-</sup>-genotyypin viljelmissä samansuuntainen kuin villityypin viljelmissä, mutta vaikutus oli neurofeeriviljelmissä voimakkaampi, sillä lähes kaikkien tutkittujen solutyypin määrässä havaittiin merkitsevä ero (kuva 19). Rinnakkaisessa kokeessa 100 ng/ml IL-33-käsittely ei vaikuttanut merkitsevästi *Cln5*<sup>-/-</sup>-solujen erilaistumiseen, mutta kaikkien tutkittujen solutyypin määrässä näytti olevan laskeva trendi seitsemän päivän neurofeeriviljelmissä.



Kuva 19: IL-33-käsittelyn vaikutus *Cln5*<sup>-/-</sup>-genotyypin solujen erilaistumiseen kolmen päivän neurofeeriviljelmissä kokeessa I. Fluoresenssimikroskooppikuvat neurosfereista kontrollikäsitellyssä (0) sekä IL-33-käsittelyissä pitoisuuksilla 10 ng/ml ja 100 ng/ml. (A) DCX-värjättyjen (punainen) uusien neuronien immunoreaktiivisen alan osuus kasvaa IL-33 pitoisuuden myötä. (B) TUJ1- värjättyjen (punainen) kypsien neuronien osuus lisääntyy IL-33-pitoisuuden kasvaessa. (C) GFAP- värjättyjen (vihreä) astrozyttien osuus vähenee IL-33-pitoisuuden kasvaessa. Mittakaavajana = 100  $\mu$ m. Tilastollinen merkitsevyys: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Rinnakkaisten kokeiden tulokset yhdistettiin normalisoimalla kunkin vasta-aineen kontrollikäsittelyn saama tulos arvoon 1, jolloin 100 ng/ml IL-33-käsittely poikkesi tästä arvosta (kuva 20). Normalisoitujen tulosten perusteella IL-33-käsittely pitoisuudella 100 ng/ml lisäsi merkitsevästi DCX- ja TUJ1-positiivisten solujen osuutta kaikista soluista villityypin neurosfeeriviljelmissä kolmen päivän erilaistuskokeissa. Lisäksi seitsemän päivän villityypin neurosfeeriviljelmissä havaittiin lähes merkitsevä ( $p=0.0502$ ) DCX-positiivisten solujen määrän kasvu.  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin normalisoiduissa tuloksissa puolestaan havaittiin merkitsevä lasku TUJ1- ja GFAP-positiivisten solujen määrässä verrattuna kontrollikäsittelyyn seitsemän päivän neurosfeeriviljelmien erilaistuskokeissa.



*Kuva 20: Normalisoidut rinnakkaisten kokeiden tulokset kolmen ja seitsemän päivän neurosfeeriviljelmien erilaistumisesta uusiksi neuroneiksi (DCX), kypsiksi neuroneiksi (TUJ1) ja astrosyyteiksi (GFAP). Kunkin vasta-aineen immunoreaktiivisen alueen osuus kontrollikäsittelyssä on normalisoitu arvoon yksi, johon kuvaajissa esitettyjä 100 ng/ml IL-33-käsittelyn saamia arvoja verrataan. (A) Kolmen päivän villityypin viljelmissä IL-33-käsittely lisää DCX:n ja TUJ1:n määrää. (B) Seitsemän päivän villityypin viljelmissä IL-33-käsittely lisää DCX:n määrää lähes merkitsevästi. (C) Kolmen päivän  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin viljelmissä ei havaita vaikutusta IL-33-käsittelyllä. (D) Seitsemän päivän  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin viljelmissä TUJ1- ja GFAP-positiivisten solujen määrä vähenee IL-33-käsittelyn seurauksena. Tilastollinen merkitsevyys verrattuna kontrolliin: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .*

Kaiken kaikkiaan IL-33-sytokiinin vaikutus oli samansuuntainen villityypin ja  $Cln5^{-/-}$ -genotyypin viljelmissä, mutta kaikissa tapauksissa ei havaittu merkitseviä eroja. Sytokiinin toksisuus kasvoi ajan myötä ja sen havaittiin olevan lievästi toksinen seitsemän päivän  $Cln5^{-/-}$ -viljelmissä. Solujen jakautumiseen IL-33:lla ei havaittu olevan vaikutusta, mutta erilaistumiseen se vaikutti. IL-33 vaikutti suotuisasti uusien ja kypsien neuronien erilaistumiseen kolmen päivän aikapisteissä, mutta vaikutti epäedullisesti astrosyyttien erilaistumiseen seitsemän päivän aikapisteessä varsinkin  $Cln5^{-/-}$ -genotyypissä.

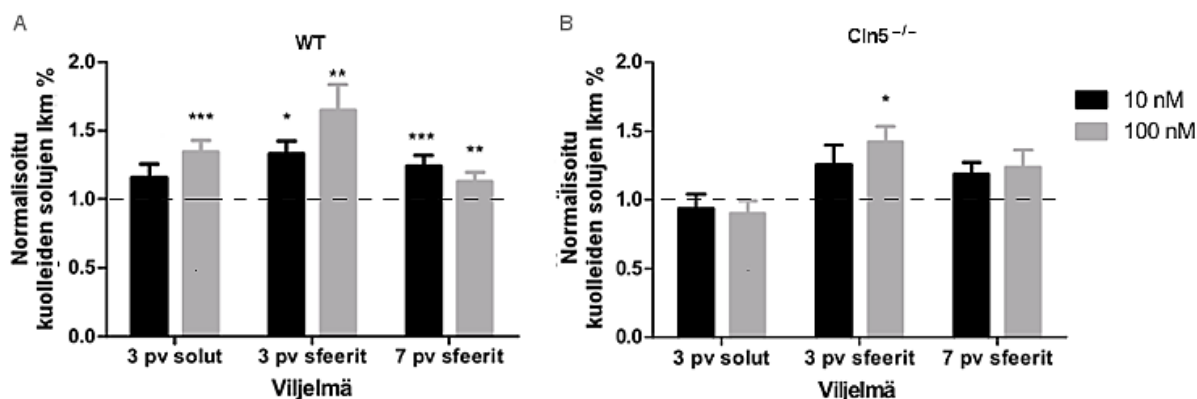


### 7.3.2 GW0742:n vaikutus hiiren kantasoluihin

NPC-soluja altistettiin mahdollisesti neuroprotektiiviselle PPAR $\delta$ -tumareseptoria aktivoivalle GW0742:lle samalla periaatteella kuin IL-33-sytokiinille, mutta konsentraatioina käytettiin 10 nM ja 100 nM. Myös pienempiä 1 ja 10 nM:n pitoisuuksia testattiin kokeessa III, mutta tämän kokeen tulokset hylättiin, sillä solut eivät kasvaneet normaalisti. Kontrollikäsittelyyn lisättiin vastaava tilavuus DMSO:ta, koska GW0742 oli liuotettu tähän.

#### 7.3.2.1 Toksisuus

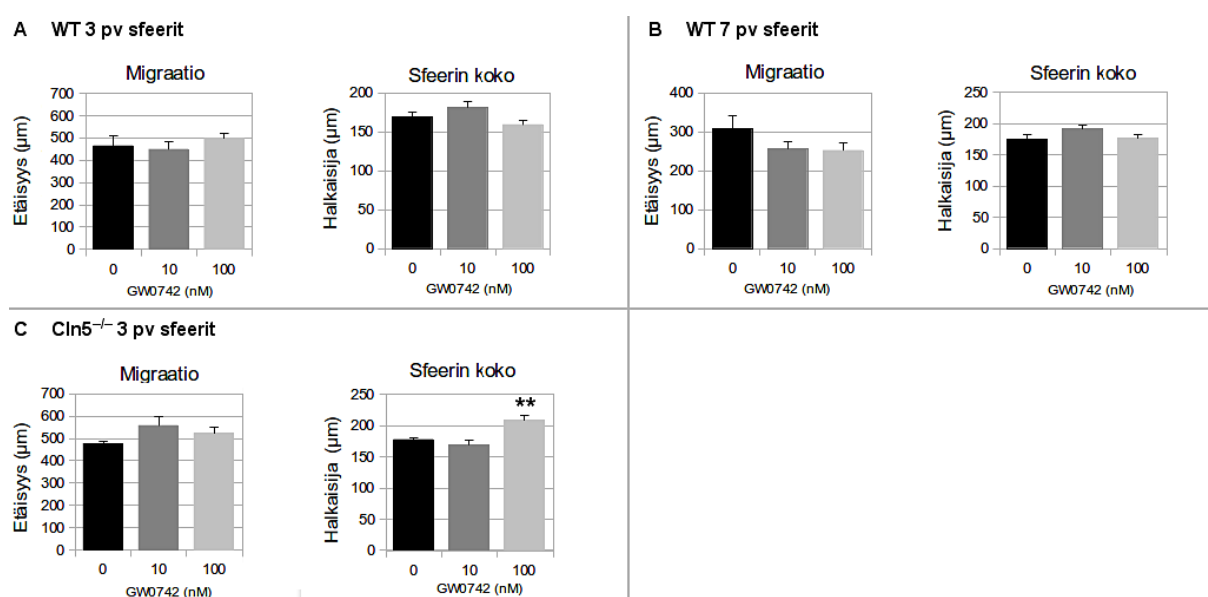
Molemmissa rinnakkaisissa kokeissa havaittiin GW0742:n olevan toksinen, eli lisäävän kuolleiden solujen osuutta verrattuna kontrollikäsittelyyn. Toksisuudessa oli kuitenkin vaihtelua eri viljelmien välillä, joten tulokset yhdistettiin normalisoimalla kontrollikäsittely arvoon yksi, johon GW0742-käsittelyjen saamia arvoja verrattiin. Normalisoiduissa tuloksissa havaittiin GW0742:n lisäävän kuolleiden solujen määrää kaikissa villityypin viljelmissä molemmilla pitoisuuksilla (kuva 21). *Cln5*<sup>-/-</sup>-genotyypin viljelmissä GW0742 oli merkitsevästi toksinen vain kolmen päivän neurosfeerien viljelmissä pitoisuudella 100 nM, mutta ei enää seitsemän päivän altistuksissa, mikä voi tarkoittaa sitä, että soluja suojaava vaikutus ilmeni viiveellä.



Kuva 21: GW0742:n toksisuus 10 nM ja 100 nM pitoisuuksilla hiiren NPC-solujen kolmen päivän yksittäisten solujen viljelmissä sekä kolmen ja seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä. Kunkin viljelmän kontrollikäsittelyn kuolleiden solujen osuus on normalisoitu arvoon yksi ja tähän verratut GW0742-käsittelyjen saamat arvot on esitetty kuvaajissa (A). GW0742 on merkitsevästi toksinen kaikissa villityypin viljelmissä. (B) *Cln5*<sup>-/-</sup>-genotyypin viljelmissä GW0742 on merkitsevästi toksinen vain kolmen päivän neurosfeeriviljelmässä pitoisuudella 100 nM. Tilastollinen merkitsevyys verrattuna kontrolliin: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 7.3.2.2 Liikkuminen

Solujen vaeltamaa etäisyyttä ja neurosfeerien kokoa tarkasteltaessa ei havaittu merkitsevää eroa villityypin kontrollin ja GW0742-käsittelyjen välillä. Kummassakin aikapisteessä 10 nM pitoisuus vaikutti lisäävän sferien kokoa, mutta ero ei ollut merkitsevää, eikä samaa vaikutusta ollut havaittavissa suuremmalla pitoisuudella (kuva 22). Seitsemän päivän aikapisteessä kontrollisolujen liikkuma etäisyys oli  $307 \pm 35 \mu\text{m}$  ( $n=12$ ), mikä oli huomattavasti alhaisempi verrattuna aikaisempien kokeiden tulokseen  $679 \pm 43$  ( $n=15$ ), jossa verrattiin genotyyppiin ja IL-33-käsittelyn vaikutusta (kuva 11 ja 17). Lisäksi kontrollikäsitellyn sferien koko tässä aikapisteessä oli keskimäärin  $175 \pm 8 \mu\text{m}$  ( $n=12$ ), mikä oli myös pienempi verrattuna aikaisempien kokeiden kontrollikäsitteeseen  $318 \pm 11$  ( $n=15$ ).  $Cln5^{-/-}$ -genotyyppissä neurosfeerien kokoa ja solujen liikkumaa etäisyyttä mitattiin vain kolmen päivän aikapisteessä ja GW0742-käsittely vaikutti positiivisesti molempiin muuttujiin. Vaikutus oli kuitenkin merkitsevää ainoastaan 100 nM pitoisuudella neurosfeerien kokoa tarkasteltaessa ( $p=0.0055$ ).

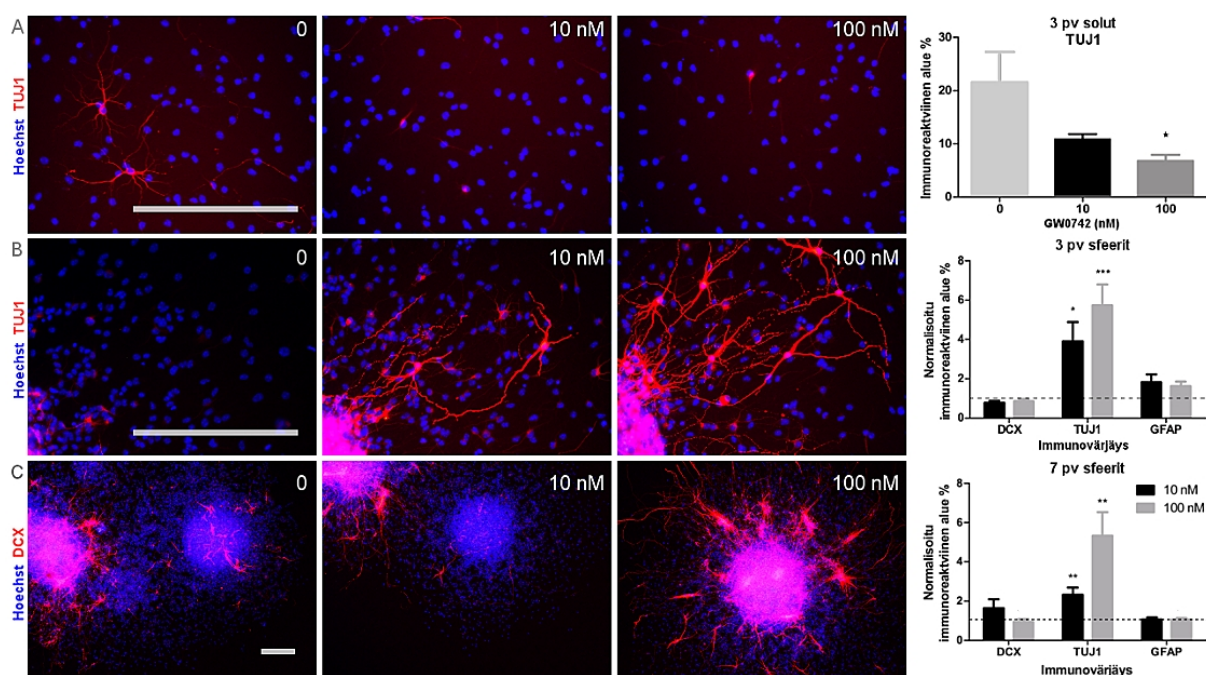


Kuva 22: GW0742-käsittelyn vaikutus neurosfeerien kokoon ja solujen kulkemaan etäisyyteen neurosfeerin reunasta mitattuna. (A) Kolmen päivän villityypin neurosfeerit. (B) Seitsemän päivän villityypin neurosfeerit. (C) Kolmen päivän  $Cln5^{-/-}$ -genotyyppiin neurosfeerit. Tilastollinen merkitsevyys:  $**p < 0.01$ ,  $n = 12$ .



### 7.3.2.3 Erilaistuminen

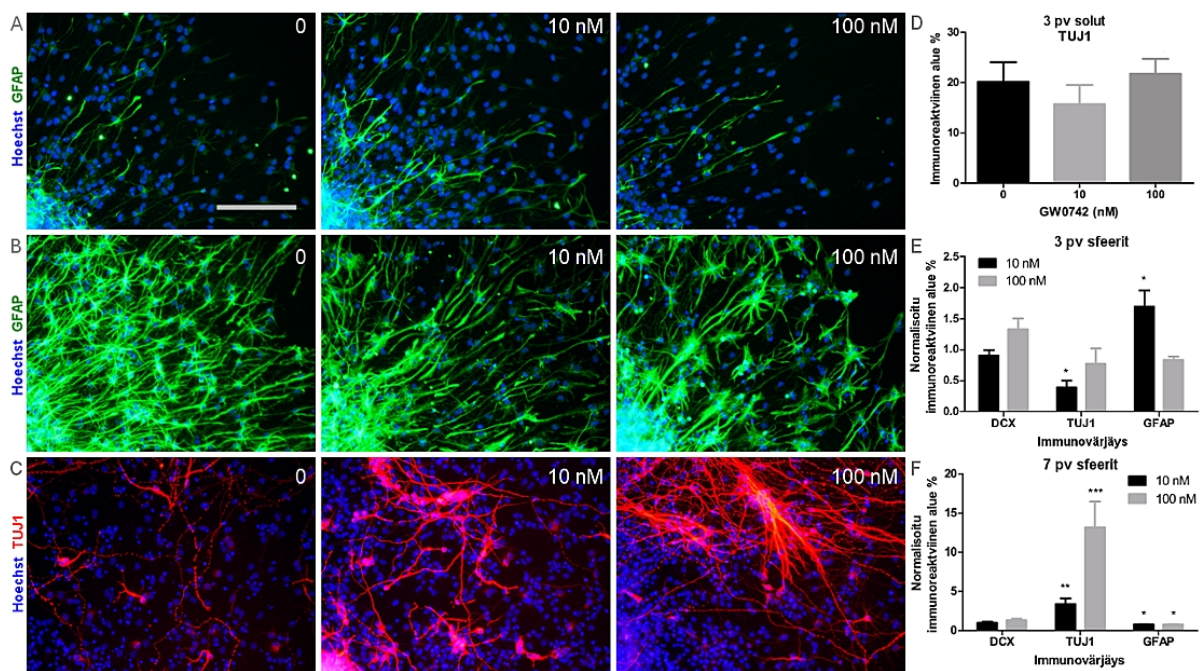
GW0742:n vaikutusta solujen erilaistumiseen tutkittiin immunovärjäyksin samoin kuin IL-33-sytokiniin vaikutusta. Ensimmäisessä kokeessa havaittiin TUJ1-positiivisten kypsien neuronien määrän laskevan villityypin viljelmissä (kuva 23). Rinnakkaisessa kokeessa ei tutkittu lainkaan yksittäisten solujen viljelmiä, joten näitä tuloksia ei voitu normalisoida. Ensimmäisen kokeen kolmen päivän neurosfeerien tuloksissa ei nähty GW0742-käsittelyllä olevan vaikutusta DCX-positiivisten uusien neuronien määrään, mutta rinnakkaisessa kokeessa DCX-positiivisten solujen määrä väheni. Samalla TUJ1-positiivisten solujen määrä kasvoi merkittävästi ja GFAP-positiivisten solujen määrä kasvoi, mutta ei merkittävästi. Molemmissa rinnakkaisissa kokeissa TUJ1-positiivisten kypsien neuronien määrä kasvoi seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä GW0742:n vaikutuksesta, mutta DCX- tai GFAP-alueessa ei havaittu merkittäviä muutosta.



Kuva 23: GW0742:n vaikutus villityypin NPC-solujen erilaistumiseen. Fluoresenssimikroskooppikuvat TUJ1-vasta-aineella (punainen) ja Hoescht-tumavärillä (sininen) värjätystä soluviljelmistä 0 nM, 10 nM ja 100 nM pitoisuuden GW0742-käsittelyissä. (A) Kolmen päivän yksittäisten solujen viljelmässä GW0742 vähentää kypsien neuronien immunoreaktiivista osuutta. Normalisoiduissa neurosfeeriviljelmien tuloksissa GW0742-käsittely lisää kypsien neuronien osuutta (B) kolmen ja (C) seitsemän päivän aikapisteissä. Mittakaavajana = 200µm. Tilastollinen merkitsevyys verrattuna kontrolliin: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Rinnakkaisten kokeiden kolmen ja seitsemän päivän neurosfeeriviljelmien tulokset normalisoitiin siten, että kontrollikäsitteily sai aina arvon yksi, johon 10 ja 100 nM pitoisuuksien GW0742-käsitteilyjä verrattiin (kuva 23). Villityypin viljelmissä GW0742 lisäsi kypsien neuronien määrää merkittävästi sekä 10 nM että 100 nM pitoisuuksilla molemmissa aikapisteissä. Uusien neuronien määrä kasvoi 10 nM pitoisuudella seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä, mutta muutos ei ollut merkittävä. GFAP-positiivisten solujen määrä kasvoi puolestaan kolmen päivän erilaistumiskokeissa altistuksen myötä, mutta muutos ei ollut merkittävä.

Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin kolmen päivän yksittäisten solujen viljelmissä ei havaittu GW0742-käsitteilyllä olevan vaikutusta TUJ1-positiivisten solujen määrään (kuva 24). Ensimmäisessä kokeessa kolmen päivän neurosfeereissä nähtiin vastaava tulos kuin villityypin soluissa, mutta TUJ1-positiivisten neuronien määrä kasvoi huomattavasti voimakkaammin Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin



Kuva 24: GW0742:n vaikutus Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin solujen erilaistumiseen NPC-viljelmissä. Fluoresenssimikroskooppikuvat DCX- (punainen), TUJ1- (punainen) ja GFAP-vasta-aineilla värjätystä neurosfeeristä 0 nM, 10 nM ja 100 nM GW0742-pitoisuuksilla. (A) Kolmen päivän viljelmissä GW0742 lisää GFAP-positiivisten astrosyyttien määrää 10 nM pitoisuudella. Seitsemän päivän viljelmissä GW0742-käsitteily (B) vähentää astrosyyttien määrää 10 nM pitoisuudella ja (C) lisää TUJ1-positiivisten kypsien neuronien määrää molemmilla pitoisuuksilla. Mittakaavajana = 100 µm. (D) TUJ1 -immunoreaktiivisen alueen osuus tumien alasta kolmen päivän yksittäisten solujen viljelmissä. Normalisoidut tulokset DCX-, TUJ1- ja GFAP-vasta-aineille immunoreaktiivisen alueen osuuksista tumien alasta (E) kolmen ja (F) seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä. Tilastollinen merkittävyys verrattuna kontrolliin: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

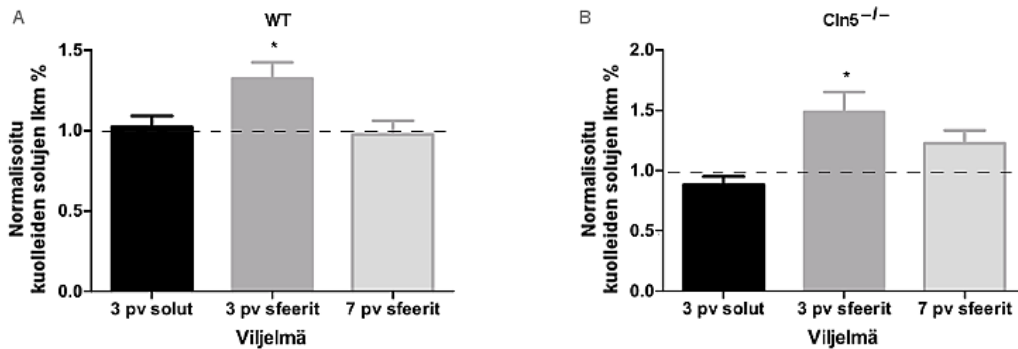
viljelmissä. Rinnakkaisessa kokeessa saatiin kuitenkin villityypin tuloksiin verrattaessa päinvastaisia tuloksia, joiden mukaan DCX-positiivisten solujen määrä kasvoi 100 nM pitoisuudella ja TUJ1-positiivisten solujen määrä väheni merkitsevästi 10 nM pitoisuudella. GFAP-positiivisten solujen määrä kasvoi 10 nM pitoisuudella, mikä puolestaan oli samansuuntainen tulos kuin ensimmäisessä kokeessa. *Cln5<sup>-/-</sup>*-genotyypin seitsemän päivän neurosfeeriviljelmässä havaittiin merkittävää kasvua TUJ1-positiivisten solujen määrässä. DCX-solujen määrässä havaittiin pientä viitettä kasvusta ja GFAP-positiivisten solujen määrä väheni merkitsevästi.

### 7.3.3 HX600:n vaikutus hiiren kantasoluihin

Solujen erilaistumiseen, jakautumiseen ja sikiönkehitykseen osallistuvan retinoidihappo-tumareseptorin synteettisen agonistin HX600:n vaikutuksia NPC-soluihin tutkittiin 100 nM:n pitoisuudella. Myös pienempää 10 nM:n pitoisuutta testattiin kokeessa III, mutta tulokset jouduttiin hylkäämään, koska solut eivät kasvaneet normaalisti. Muuten käsittelyt suoritettiin samalla tavalla kuin GW0742-altistuksissa.

#### 7.3.3.1 Toksisuus

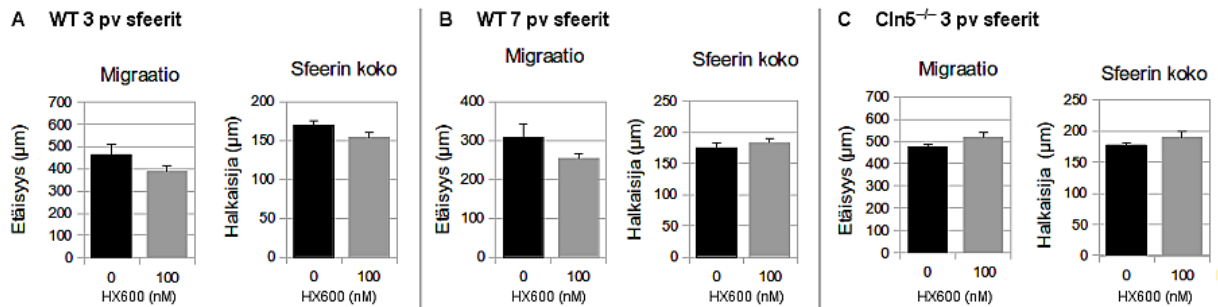
HX600:n toksisuutta tarkasteltiin kuolleiden solujen lukumäärän perusteella vertaamalla 100 nM pitoisuutta kontrollikäsittelyyn. HX600:n havaittiin lisäävän kuolleiden solujen osuutta etenkin *Cln5<sup>-/-</sup>*-genotyypin neurosfeeriviljelmissä. Rinnakkaisista kokeista normalisoimalla yhdistetyistä tuloksista havaittiin, että HX600 lisäsi merkitsevästi kuolleiden solujen määrää molempien genotyyppien kolmen päivän neurosfeeriviljelmissä (kuva 26). Kolmen päivän yksittäisten solujen viljelmissä ja seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä aine ei kuitenkaan ollut toksinen. HX600:n vaikutus oli samansuuntainen kummassakin genotyypissä.



Kuva 25: Normalisoitu HX600:n toksisuus 100 nM pitoisuuksilla hiiren NPC-solujen yksittäisten solujen ja neurosfeeriviljelmissä. Kunkin viljelmän kontrollikäsitellyn kuolleiden solujen osuus on normalisoitu arvoon yksi, johon kuvaajissa esitettyjä 100 nM käsittelyn arvoja on verrattu. HX600 on toksinen (A) villityypin ja (B) Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin kolmen päivän neurosfeeriviljelmissä. Tilastollinen merkitsevyys verrattuna kotrolliin: \* $p < 0.05$ .

### 7.3.3.2 Liikkuminen

HX600-käsittelyllä ei havaittu olevan merkitsevää vaikutusta solujen liikkumiseen tai neurosfeerien kokoon (kuva 26). Vaikka merkitseviä eroja ei ollut havaittavissa, oli solujen kulkema matka lyhyempi HX600-käsitellyissä neurosfeereissä verrattuna kontrolliin villityypin kolmen ja seitsemän päivän kokeissa.



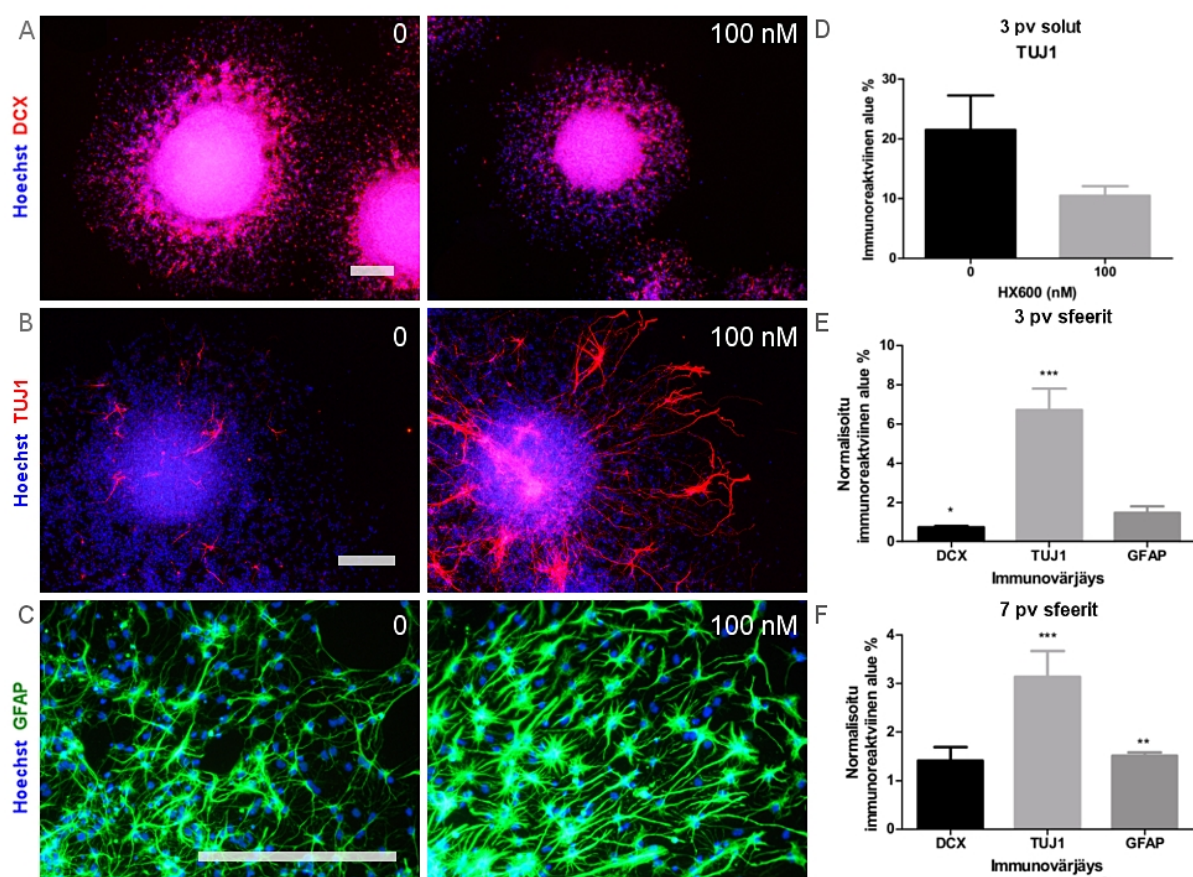
Kuva 26: HX600-käsittelyn vaikutus neurosfeerien kokoon ja solujen kulkemaan etäisyyteen neurosfeerin reunasta mitattuna. (A) Kolmen päivän villityypin neurosfeerit. (B) Seitsemän päivän villityypin neurosfeerit. (C) Kolmen päivän Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin neurosfeerit.  $n = 12$ .

### 7.3.3.3 Erilaistuminen

HX600:n vaikutusta erilaistumiseen tutkittiin käyttäen 100 nM pitoisuutta ja samoja immunovärjäyksiä kuin muidenkin yhdisteiden vaikutusta tutkittaessa. Yksittäisten solujen kolmen

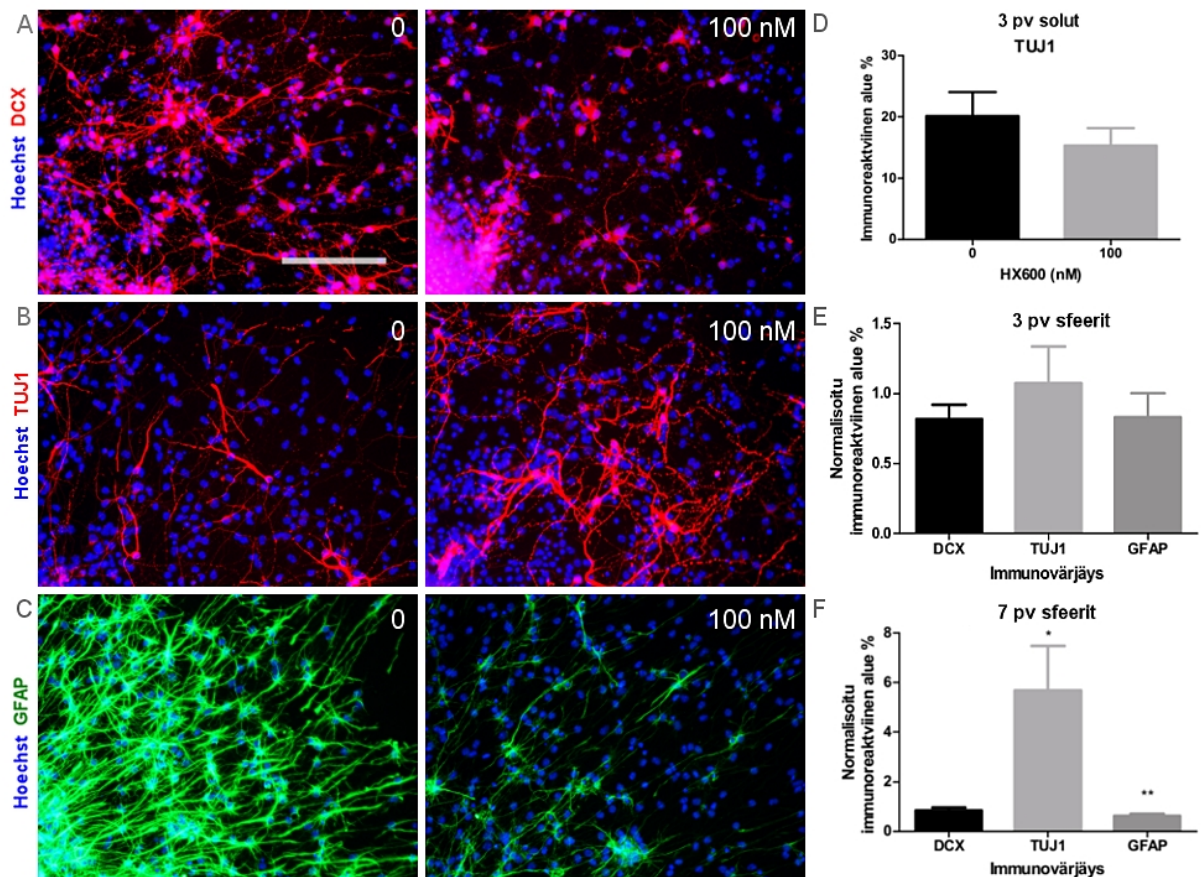


päivän viljelmiä immunovärjättiin pelkästään ensimmäisessä kokeessa ja vain TUJ1-vasta-aineella. Tässä värjäyksessä havaittiin kypsien neuronien määrän laskevan villityypin viljelmässä, joskin vaikutus ei ollut tilastollisesti merkitsevää (kuva 27). TUJ1-positiivisten solujen määrä kuitenkin kasvoi merkitsevästi rinnakkaisten kokeiden normalisoiduissa tuloksissa kolmen ja seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä kuten GW0742-käsittelyssäkin. DCX-positiivisten uusien neuronien määrä väheni kolmen päivän neurosfeeriviljelmissä HX600:n vaikutuksesta, mutta seitsemän päivän viljelmissä oli havaittavissa pieni kasvava trendi pitoisuuden kasvaessa. GFAP-positiivisten solujen määrä kasvoi molemmissa aikapisteissä, mutta merkitsevästi vain seitsemän päivän kohdalla.



Kuva 27: HX600:n vaikutus villityypin solujen erilaistumiseen NPC-viljelmissä. Fluoresenssimikroskooppikuvat DCX- (punainen), TUJ1- (punainen) ja GFAP-vasta-aineilla (vihreä) sekä Hoescht-tumavärillä (sininen) immunovärjätystä soluviljelmistä 0 nM ja 100 nM pitoisuuden HX600-käsittelyissä. (A) Kolmen päivän neurosfeeriviljelmässä HX600 vähentää DCX-positiivisten uusien neuronien immunoreaktiivisen alueen osuutta. (B) HX600-käsittely lisää (B) TUJ1-positiivisten kypsien neuronien ja (C) GFAP-positiivisten astrosyyttien osuutta seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä. Mittakaavajana = 200µm. Tilastollinen merkitsevyys verrattuna kontrolliin: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypin solujen erilaistuminen oli samankaltaista kuin villityypin viljelmissä (kuva 28). Kolmen päivän yksittäisten Cln5<sup>-/-</sup>-soluviljelmien TUJ1-positiivisten solujen määrä laski, muttei merkitsevästi, samoin kuin villityypin viljelmissäkin. Ensimmäisessä kokeessa myös DCX-positiivisten solujen määrä väheni kolmen päivän neurosfeeriviljelmissä, ja TUJ1-positiivisten solujen määrä kasvoi seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä samoin kuin villityypin viljelmissä.



Kuva 28: HX600:n vaikutus Cln5<sup>-/-</sup>-solujen erilaistumiseen NPC-viljelmissä. Fluoresenssi-mikroskooppikuvat DCX- (punainen), TUJ1- (punainen) ja GFAP-vasta-aineella (vihreä) sekä Hoescht-tumavärillä (sininen) immunovärjätystä seitsemän päivän neurosfeeriviljelmistä 0 nM ja 100 nM pitoisuuden HX600-käsittelyissä. HX600 (A) vähentää DCX-positiivisten uusien neuronien määrää, (B) lisää TUJ1-positiivisten kypsien neuronien määrää ja (C) vähentää GFAP-positiivisten astroosyyttien määrää. Mittakaavajana = 100µm. Kuvaajissa (E-D) vasta-aineiden immunoreaktiivisen alueen osuus tumien alasta rajatulla alueella kolmen päivän yksittäisissä soluviljelmissä sekä normalisoiduissa (E) kolmen ja (F) seitsemän päivän neurosfeeriviljelmien tuloksissa. Tilastollinen merkitsevyys verrattuna kontrolliin: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Rinnakkaisessa kokeessa ei kuitenkaan havaittu HX600:lla olevan lainkaan vaikutusta kolmen päivän neurofeeriviljelmien solujen erilaistumiseen. Seitsemän päivän viljelmissä sen sijaan oli viitteitä DCX- ja TUJ1-positiivisten solujen vähenemisestä ja GFAP-positiivisten solujen määrä väheni merkitsevästi. Normalisoimalla yhdistetyissä tuloksissa havaittiin merkitseviä muutoksia vain seitsemän päivän viljelmissä, joissa TUJ1-positiivisten neuronien määrä kasvoi ja GFAP-positiivisten solujen määrä väheni.

## 8 TULOSTEN TARKASTELO

Vaikeaan vammaisuuteen, sokeuteen ja ennenaikaiseen kuolemaan johtava CLN5-tauti on yleisin suomalaisen tautiperintöön kuuluva lasten aivosairaus (Mole ym. 2011). Uusien hoitomuotojen kehittäminen on tärkeää, koska neuronaalisiin seroidilipofuskiineihin ei ole parantavia hoitomuotoja. CLN5-taudin oireet johtuvat aivojen neuronien ja gliasolujen surkastumisesta, mikä on erityisen vahingollista näiden solujen rajoittuneen uusiutumiskyvyn vuoksi. Surkastumista tapahtuu varsinkin hippokampuksessa, jossa muodostetaan normaaleissa olosuhteissa uusia neuroneita hermokantasoluista. Tämän pro gradun tavoitteena oli tutkia, onko poistogeenisen *Cln5*<sup>-/-</sup>-hiirimallin hippokampuksesta eristettyjen kantasolujen neurogeneesi muuntunut solujen jakautumisen, erilaistumisen tai liikkumisen suhteen. Tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että nämä neurogeneesin ensimmäiset vaiheet ovat voimistuneet CLN5-taudissa sikiön kehityksen aikana, mutta samalla solukuolema on myös kiihtynyt.

Neuronien surkastumista lisäävät häiriintyneet soluprosessit ovat mahdollisia hoidon kohteita CLN5-taudissa. Tulehdusvasteen ja lipidimetabolian yhteyttä neurogeneesiin selvitettiin kantasolujen *in vitro*-altistuskokeilla. Tulehdusvasteen osuutta tutkittiin altistamalla soluja luonnolliselle IL-33-sytokiinille, jonka tiedetään muun muassa säätelevän Th2/M2-tulehdusvastetta, ja sillä havaittiin olevan positiivinen vaikutus neurogeneesiin molemmissa genotyypeissä (Schmitz ym. 2005). Tumareseptoreja aktivoivien synteettisten GW0742:n ja HX600:n, vaikutusta tutkittiin, koska ne voivat ohjata lipidien metaboliaa ja solujen erilaistumista sekä suojata neuroneita solukuolemalta (Sznajdman ym. 2003, Morita ym. 2005). Näillä aineilla saatiinkin genotyyppi riippuvia tuloksia, mikä viittaa siihen, että ne voivat vaikuttaa soluprosesseihin, jotka ovat häiriintyneet CLN5-taudissa.

## 8.1 Menetelmien rajoitteet

Materiaalina käytettiin  $Cln5^{-/-}$ -hiirikantaa, joka ilmentää CLN5-taudin potilailla havaittavia oireita ja aivojen patologiaa (Kopra ym. 2005). Solujen eristyksessä, viljelyssä ja kokeissa käytettiin menetelmiä, jotka ovat yleisesti hyväksytyjä hermokantasolujen tutkimuksessa, minkä lisäksi rinnakkaisissa kokeissa noudatettiin samoja protokollia ja pyrittiin minimoimaan mahdollisia muuttujia (Reynolds & Weiss 1992, Gritti ym. 1996). Siitä huolimatta tuloksissa havaittiin runsaasti vaihtelua. Vaihtelua ovat voineet aiheuttaa hiiriyksilöiden erot ja vaihtelun vaikutusta tuloksiin voitaisi vähentää suuremmalla otoskoolla, mikä ei ollut tämän gradun puitteissa mahdollista. Lisäksi kokeissa käytettiin eri ikäisiä sikiöitä, joita eristettiin kehityspäivinä E15 ja E18. Nämä ajankohdat valittiin siksi, että CLN5-geeniä ilmennetään hiiren aivoissa tasaisesti E14.5-päivästä syntymän jälkeiseen päivään saakka (Fabritius ym. 2014). Myös solujen eristyksen tilannekohtaiset vaihtelut, kuten toimenpiteiden kesto ja vuorokauden aika ovat voineet vaikuttaa solujen kasvuun. Lisäksi solujen pakastus ja neurosfäärin jakaminen voivat muuttaa geenien ilmentymistä. Pakastusmenetelmien havaittiinkin vaikuttavan muun muassa solujen selviytymiseen ja neurosfäärin kasvuun.

Immunosytokemiallisissa värjäyksissä tutkittiin pääasiassa kolmen vasta-aineen, DCX:n, GFAP:n ja TUJ1:n immunoreaktiivisuutta, sillä niitä käytetään yleisesti uusien neuronien, astrozyttien ja kypsien neuronien tunnistamisessa (von Bohlen Und Halbach 2007). Vasta-aineet ovat kuitenkin harvoin täysin spesifisiä vain yhdelle solutyypille ja myös muut solutyypit voivat ilmentää vasta-aineen antigeeniä. Esimerkiksi GFAP:ia käytetään astrozyttien tunnistamisessa, mutta myös kantasoluina toimivat radiaaligliasolut ovat immunoreaktiivisia GFAP:lle, joten osa positiivisista soluista on voinut olla erilaistumattomia radiaaligliasoluja. Tämän vuoksi solujen tunnistamisen varmistamiseksi olisi hyvä käyttää vasta-aineiden yhdistelmiä, ja esimerkiksi astrozyttien tunnistamiseen voitaisi käyttää GFAP:n lisäksi CD44-vasta-ainetta. Lisäksi solujen morfologian muuttumista ja kehitystä voitaisi seurata tarkemmin reaaliaikaisella videokuvaamisella ja kvantitointi voisi olla tehokkaampaa esimerkiksi virtausytometrian avulla.



## 8.2 CLN5-taudin vaikutus hiiren kantasoluihin

CLN5-taudin havaittiin aiheuttavan muutoksia aivojen kantasolujen toiminnassa jo sikiövaiheessa. Neuronien apoptoosi on merkittävin CLN5-sairauden patologinen piirre, mutta yleensä se havaitaan vasta oireiden ilmaannuttua (Mole ym. 2011, Haddad ym. 2012). Tämän tutkimuksen perusteella on mahdollista, että solukuolema ja kantasolujen jakautuminen ovat voimistuneet jo sikiön kehityksen aikana. CLN5-geeniä ilmennetään sikiönkehityksen aikana neurogeenisten alueiden hermokantasoluissa (Heinonen ym. 2000, Fabritius ym. 2014). Yhdessä nämä huomiot viittaavat siihen, että CLN5-geeni saattaisi osallistua hermokantasolujen toiminnan säätelyyn ja sen viallisuus voisi aiheuttaa solusyklin nopeutumista. Tämä puolestaan voisi saada aikaan solun metabolian ja mitokondrioiden toiminnan voimistumista, minkä seurauksena muodostuisi mitokondrioiden ATP-syntaasin C alayksiköiden kertymiä. Toisaalta CLN5-geenin toiminnan on esitetty olevan suoraan yhteydessä voimistuneeseen metaboliaan ja mitokondrioiden toimintaan (Jolly ym. 2002).

Myös Alzheimerin taudissa kantasolujen jakautuminen on voimistunut, mutta neuronien selviytyminen heikentynyt (Nagy ym. 1997, Gould ym. 2009, Haughey 2002, Jin ym. 2004, Wharton ym. 2005, Ziabreva ym. 2006). Tässä työssä seurattiin solujen toimintaa pisimmillään seitsemän päivän ajan, joten solujen selviytymisestä tämän jälkeen ei saatu tietoa. Lisäksi muiden hermorappeumasairauksien, kuten Huntingtonin ja Parkinsonin tautien yhteydessä on havaittu hermokantasolujen toiminnan häiriöitä, mutta tuloksien yksiselitteinen toistaminen on ollut vaikeaa (Curtis ym. 2003, Lazic ym. 2004, Gil ym. 2005, Gil-Mohapel ym. 2011, Hoglinger ym. 2004, Winner ym. 2004, Marxreiter ym. 2013).

CLN5-geenin puuttumisen havaittiin vaikuttavan kantasolujen erilaistumiseen siten, että solut erilaistuvat vahvemmin neuroneiksi, kun taas GFAP-positiivisten solujen kunto huononee ja niiden määrä vähenee. Löydös viittaa siihen, että astrozyttien erilaistuminen ja toiminta ovat häiriintyneet. Astrozyttien toiminnan onkin havaittu häiriintyneen CLN5-taudissa varsinkin syntymän jälkeen, mutta muutos on ollut päinvastainen, sillä gliogeneesi ja astrozyttien tulehduskellinen toiminta ovat lisääntyneet (Jalanko ym. 2004). Toinen tulkintavaihtoehto onkin, että GFAP-positiiviset solut edustavat ainakin osittain kantasoluina toimivia radiaaligliasoluja. Tämä tarkoittaisi sitä, että kantasolut menettävät jakautumiskykynsä ja erilaistuvat neuroneiksi CLN5-taudissa. Tätä tukee myös se, että solusykli on nopeampi neuronaaalissa

erilaistumisessa verrattuna proliferatiiviseen jakautumiseen (Arai ym. 2011). Lisäksi CLN5-geenin ilmeneminen voimistuu sikiön kantasolujen erilaistuessa neuroneiksi (Fabritius ym. 2014). Tämä johtopäätös tukee CLN5-geenin merkitystä sikiönkehityksen säätelyssä.

### 8.3 Interleukiini 33

Altistuskokeissa saatiin viitteitä siitä, että IL-33:n säätelemä tulehdusvaste ei ole merkittävässä roolissa sikiön kantasolujen häiriöissä CLN5-poistogeenisissä hiirissä, sillä IL-33 vaikutti molempiin genotyyppeihin samalla tavalla vähentäen GFAP-positiivisten solujen osuutta ja lisäten neurogeneesiä. IL-33 on solujen oma sytokiini, jonka tiedetään osallistuvan Nf-KB-tulehdusvasteen aktivoimiseen immuunisoluissa, jotka ilmentävät runsaasti ST2/IL-1RAcP -reseptoreja (Schmitz ym. 2005, Hudson ym 2008, Yasuoka ym. 2011, Liu ym. 2013). Tässä työssä kantasolut erilaistuivat pääasiassa astrozyyteiksi tai neuroneiksi, eikä immuunisoluja tutkittu.

Pääsiallisten kohdesolujen puuttumisesta huolimatta IL-33:lla havaittiin neuroneita tukeva vaikutus ja samalla se ei vaikuttanut lisäävän tulehduksen aktivoitumiseen liittyvää astrogliaosia. Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että hiiren neuroneissa ilmenetään IL-1RAcP-reseptoria, kun taas astrozyyteissä ja mikroglia soluissa ilmenetään sekä ST2- että IL-1RAcP-alayksiköitä (Yasuoka ym. 2011). Keskushermoston tuottaman IL-33:n on havaittu aktivoivan mikroglia solujen jakautumista, fagosytoosia ja pro-inflammatoristen sytokiinien, kemokiinien ja typpioksidin (NO) tuotantoa, ja siten välittävän tulehdusta. Tässä työssä IL-33 näyttäisi toimivan kantasoluissa vaihtoehtoisella tavalla mahdollisesti hilliten tulehdusvastetta. Myös muissa tutkimuksissa on havaittu, että IL-33 voi lisätä myös tulehdusta vähentävien sytokiinien, kuten IL-10 tuotantoa ja, että solun sisäinen IL-33:n muoto voi hiljentää NF-κB-välitteistä tulehdusta ST2-reseptorista riippumattomasti kromatiiniin liittyneenä transkriptiota repressoivana tumatekijänä (Yasuoka ym. 2011, Ali ym. 2011). Lisäksi muissa hermoston sairauksissa, kuten AD:ssa ja MS:ssa sekä selkäydinvauriossa on IL-33:lla havaittu olevan suojaavia vaikutuksia, joiden tosin on ehdotettu perustuvan tulehdusta vähentävien Th2-sytokiinien tuotantoon ja makrofagien muutokseen neurotoksisesta M1-tyypistä tulehdusta hillitsevään M2-tyyppiin (Miller ym. 2010, Kazufumi & Tomohiro 2014, Pomeschchik ym. 2014).

Tässä työssä ei tutkittu tarkemmin mekanisme, jolla IL-33 signaloi solussa, mutta vaikut-

taa siltä, että IL-33 voi hillitä tulehdusta aktivoivia signalointireittejä kantasoluissa, neuroneissa ja astrosyyteissä ja siten tukea neuronien selviytymistä. Tämän johtopäätöksen varmistamiseksi voitaisi tutkia solujen sytokiinien tuotantoa ja selvittää tulehdusta lisäävien ja sitä hillitsevien sytokiinien osuuksia soluviljelmissä. Mielenkiintoisena huomiona IL-33:n havaittiin lisäävän solujen liikkumiskykyä vain CLN5-genotyypissä, mikä viittaisi sen mahdollisiin hoitovaikutuksiin. Kenties tulehdusvasteen aktivoima taudin patologia on merkittävämmässä roolissa vasta kantasoluvaiheen jälkeen. Tässä tutkimuksessa havaittiin kuitenkin, että CLN5-taudissa solukuolema on voimistunut jo kantasoluvaiheessa, mikä viittaa siihen, että se voi olla seurausta muista häiriintyneistä prosesseista kuin tulehdusvasteesta.

#### 8.4 GW0742

GW0742 on selektiivinen agonisti transkriptiotekijänä toimivalle PPAR $\delta$ -tumareseptorille (Sznajdman ym. 2003). PPAR $\delta$  osallistuu lipidimetabolian, myelinaation, tulehdusvasteen ja aivojen kehityksen säätelyyn, minkä lisäksi sillä on havaittu olevan pieninä pitoisuuksina neuroprotektiivinen vaikutus (Desvergne & Wahli 1999, Saluja ym. 2001, Cimini ym. 2003, Smith ym. 2004, Heneka & Landreth 2007). Edellä mainitut prosessit ovat häiriintyneet CLN5-taudissa ja tässä työssä GW0742:n vaikutuksen havaittiin olevan genotyypiriippuvainen, mikä viittaa siihen, että PPAR $\delta$  voi indusoida prosesseja, jotka olisivat häiriintyneet CLN5-taudin patologiassa. Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypissä GW0742:n havaittiin tukevan aluksi kantasoluominaisuuksia ja myöhemmin solujen selviytymistä sekä vähentävän astrogliaosia. Hoitovaste voi perustua kahteen PPAR $\delta$ :välitteiseen mekanismiin joko a) estäen kaspasasi-välitteistä apoptoosia aktivoimalla keramidien ja sfingolipidien hajotusta, tai b) vähentäen tulehdusta inhiboimalla NF- $\kappa$ B -välitteistä tulehdusta.

Villityypin viljelmissä GW0742 oli lievästi toksinen kaikissa kokeissa, kun taas Cln5<sup>-/-</sup>-genotyypissä sen havaittiin lisäävän kuolleiden solujen osuutta vain kolmen päivän neurosfeeriviljelmissä. Tämä voi tarkoittaa sitä, että GW0742 lisää kantasolujen jakautumista ja tukee viiveellä solujen selviytymistä CLN5-taudissa. Lisäksi PPAR-reseptorien aktivaation on havaittu olevan eduksi myös muissa aivojen tulehduksellisissa sairauksissa, kuten AD:ssa, PD:ssa, MS:ssa ja ALS:ssa sekä aivoinfarktissa (Iwashita ym. 2007, Kalinin ym. 2009, Kuang ym. 2012). Toisaalta tutkittavaa yhdistettä lisättiin vain kokeen alussa, jolloin sen solukuolemaa li-

säävä vaikutus saattoi vähentyä ajan kuluessa. Tällöin kuolleiden solujen osuuden olisi kuitenkin pitänyt vähentyä ajan myötä myös villityypin viljelmissä.

GW0742:n vaikutus solujen erilaistumiseen oli ristiriitainen eikä sillä havaittu olevan yksiselitteistä vaikutusta solujen liikkumiseen. GW0742 lisäsi kypsien neuronien osuutta villityypin neurosfeeriviljelmissä, mutta vähensi niiden osuutta yksittäisten solujen viljelmissä. Tämä viittaa siihen, että solujen välinen signalointi ja ympäristö vaikuttavat GW0742:n toimintaan. *Cln5<sup>-/-</sup>*-genotyypin neurosfeeriviljelmissä GW0742 puolestaan vähensi kypsien neuronien määrää ja lisäsi GFAP-positiivisten solujen määrää kolmen päivän kokeissa, mutta seitsemän päivän aikapisteessä tulos oli päinvastainen. Tämä voi tarkoittaa sitä, että kolmen päivän aikapisteessä GFAP-positiiviset solut ovat radiaaligliasoluja, jotka seitsemän päivän aikapisteessä ovat erilaistuneet neuronaliselle linjalle. Siten GW0742 tukisi aluksi kantasoluominaisuuksia ja, kuten muiden sairauksien yhteydessä on havaittu, ja myöhemmin lisäisi neurogeneesiä ja vähentäisi astrogliaosia (Smith ym. 2004, Kuang ym. 2012, Schnegg ym. 2013).

GW0742:n neuroprotektiivisen vaikutuksen on esitetty perustuvan PPAR $\delta$ -aktivaation seurauksena tapahtuvaan NF- $\kappa$ B-välitteisen tulehdusvasteen hiljentämiseen (Kalinin ym. 2009, Kuang ym. 2012). Lisäksi GW0742:n osoitettu vaikuttavan hippokampuksen tulehdukseen vähentämällä astrosyyttien ja mikrogliaojen aktivaatiota (Polak ym. 2005, Schnegg ym. 2013). Nämä mekanismit voisivat selittää yhdisteen suojaavia vaikutuksia myös CLN5-poistogeenisten hiirten yhteydessä, mutta teorioiden soveltuvuuden selvittämiseksi tulisi tutkia esimerkiksi solujen erittämien sytokiinien määriä.

GW0742:n positiiviset vaikutukset voisivat toisaalta perustua myös lipidimetabolian aktivaatioon, sillä PPAR $\delta$ -reseptorien on esitetty suojaavan astrosyyttejä ja neuroneita keramidien indusoimalta solukuolemalta (Alehsin & Reiser 2014). Keramidien ylimäärän on arveltu lisäävän kaspasien ja muiden apoptoosia tukevien tekijöiden aktivoitumista, kun taas PPAR $\delta$ -reseptorin aktivaation on esitetty lisäävän keramidien hajotusta sfingosineiksi, jolloin keramidien määrä vähenee. Tämä teoria vaikuttaa lupaavalta myös siksi, että CLN5-proteiinin toimimattomuuden on havaittu aiheuttavan lipidimuutoksia, joiden on ehdotettu olevan yhteydessä keramidien ja sfingolipidien kierrätyksen häiriintymiseen (Schmiedt ym. 2010, Haddad 2012). Lisäksi CLN5-proteiinin on arveltu toimivan samalla signalointireitillä kuin paremmin tunnettu CLN3-proteiini, jonka toimimattomuus johtaa keramidivälitteisen apoptoosin aktivoitumiseen (Rusyn 2003). Myös katepsiini D, joka toiminta on rajoittunut CLN10-tautimuodossa,

aktivoituu keramidien vaikutuksesta (Repnik ym. 2012).

## 8.5 HX600

HX600 on retinoidihapon tavoin toimiva synteettinen agonisti, joka aktivoi selektiivisesti heterodimeerisiä Nur77/RXR- ja Nurr1/RXR -reseptorikomplekseja, joiden kohdegeenejä ei tunneta tarkasti (Morita ym. 2005). Tässä työssä HX600:n havaittiin lisäävän kuolleiden solujen osuutta kolmen päivän neurosfeeriviljelmissä molemmissa genotyypeissä, mutta seitsemän päivän kokeissa vaikutusta ei ollut havaittavissa, mikä viittaa siihen, että HX600 on voinut lisätä solujen jakautumista ja selviytymistä ajan myötä. Lisäksi HX600 lisäsi kypsien neuronien määrää kaikissa neurosfeeriviljelmissä. Nämä löydökset tukevat aikaisempia ehdotuksia, joiden mukaan HX600:n aktivoimat reseptorit osallistuva solujen jakautumisen, hermosolujen erilaistumisen ja solukuoleman säätelyyn (Umemiya ym. 1997, Morita ym. 2005, Ishizawa ym. 2012). Solukuoleman säätely voi tapahtua tulehduksen aiheuttamaa apoptoosia vähentämällä, sillä HX600:n sitoutumisen on arveltu estävän tulehdusaineiden aikaansaaman Nur77:n siirtymisen tumasta mitokondrioon, missä se käynnistäisi kaspasi-välitteisen apoptoosin (Mathisen ym. 2011).

HX600:n vaikutus oli osittain genotyypiriippuvainen, joten se voi vaikuttaa CLN5-taudissa häiriintyneisiin soluprosesseihin. Villityypin viljelmissä HX600 vähensi uusien neuronien määrää kolmen päivän kokeissa ja lisäsi GFAP-positiivisten solujen määrää seitsemän päivän neurosfeeriviljelmissä, mikä voisi viitata siihen, että HX600 ylläpitää solujen kantasoluominaisuuksia. Johtopäätös on kuitenkin ristiriitainen aiempien tulosten kanssa, sillä HX600:n on osoitettu edistävän hermosolujen erilaistumista (Umemiya ym. 1997). Toisaalta vaikutus oli päinvastainen Cln5<sup>-/-</sup>-viljelmissä ja HX600 vähensi GFAP-positiivisten solujen osuutta ja siten mahdollisesti edisti kantasolujen erilaistumista muiksi solutyypeiksi seitsemän päivän viljelmissä. Lisäksi GFAP-positiiviset solut voivat edustaa kantasolujen sijasta astrosyyttejä, jolloin niiden määrän lisääntyminen voisi tarkoittaa tulehdusreaktioiden aktivoitumista. Tällöin HX600 vähentäisi tulehdusvastetta CLN5-genotyypissä. Tämä tukisi teoriaa, jonka mukaan Nurr1-reseptorin aktivaatio saisi aikaan NF- $\kappa$ B-signaalintireitin inhibition ja siten tulehdusvasteen vaimenemisen (Saijo ym. 2009). Toisaalta tämä tarkoittaisi sitä, että HX600 lisäisi tulehdusvastetta villityypin soluissa.

Edellä mainittujen toimintatapojen lisäksi HX600:n reseptorien on arveltu lisäävän aivojen lipidimetabolialla indusoimalla rasvahappojen  $\beta$ -oksideaatiota ja osallistuvan toistaiseksi tuntemattomiin soluprosesseihin (Ishizawa ym. 2012). RXR-tumareseptorien agonisteja tutkimalla on saatu ristiriitaisia tuloksia myös muissa hermorappeumasairauksissa (Skerrett ym. 2014). Vaikuttaakin siltä, että HX600 osallistuu useiden soluprosessien säätelyyn ja voi vuorovaikuttaa muiden molekyylien kanssa saaden aikaan tilannekohtaisia vasteita.

## 9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän pro gradun tavoitteena oli tutkia neurogeneesiä myöhäislapsuusiän NCL-tautimuodossa  $Cln5^{-/-}$ -hiirimallia käyttäen. Yhtenä hypoteesina oli, että CLN5-tauti vaikuttaa hermokantasolujen jakautumiseen, liikkumiseen ja erilaistumiseen sikiön kehityksen loppuvaiheessa. Soluviljelmien avulla havaittiinkin neurogeneesin muuntuneen CLN5-taudin hiirimallissa siten, että hermokantasolujen jakautuminen ja neuronien erilaistuminen olivat kiihtyneet. Lisäksi saatiin viitteitä solukuoleman voimistumisesta. Yhdessä tulokset viittaavat solusyklin nopeutumiseen  $Cln5^{-/-}$ -genotyypissä.

Toisena hypoteesina oli, että IL-33-sytokiini sekä synteettiset tumareseptorien antagonistit GW0742- ja HX600 vaikuttivat neurogeneesiin mahdollisesti säätelämällä soluprosesseja, kuten tulehdusvastetta ja lipidimetabolialla, jotka ovat häiriintyneet CLN5-taudissa. Tulehdusvasteeseen osallistuvan IL-33:n havaittiin tukevan hermokantasolujen erilaistumista neuronaaliselle linjalle ja lisäävän solujen liikkumista molemmissa genotyypeissä. Tumareseptoreja aktivoivien GW0742:n ja HX600:n vaikutus oli puolestaan genotyypistä riippuvainen, mikä viittaa siihen, että niiden kohdeprosessit voivat olla muuntuneet CLN5-taudissa. Lisäksi GW0742 ja HX600:n vaikutus oli vaihteleva, mikä voi tarkoittaa sitä, että ne voivat osallistua useisiin soluprosesseihin, joiden toimintaa ohjaavat samanaikaisesti myös muut molekyylit.

Tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että CLN5-taudissa häiriintyneet soluprosessit ovat yhteydessä aivojen neurogeneesiin. Edelleen on kuitenkin selvittämättä taudissa mutatoituneen CLN5-proteiinituotteen tehtävä soluissa ja, kuinka se on yhteydessä neuronien kuolemaan ja uusiutumiseen. Tulevaisuudessa hermokantasolujen toiminnan ja CLN5-taudin mekanismien parempi ymmärtäminen toivottavasti viitoittavat uusien hoitomuotojen kehittämiseen ja mahdollistavat jopa surkastuneiden neuronien korvaamisen.

## KIITOKSET

Tein tämän pro gradu -tutkielman Itä-Suomen yliopiston biologian koulutusohjelman lopputyönä A.I. Virtanen -instituutissa vuonna 2014. Haluan kiittää ohjaajiani Katja Kannista, Katarina Lejavovaa, Matti Vornasta ja Jari Koistinahoa heidän tuestaan tutkielman teossa. Erityisesti kiitän Katja Kannista mielenkiintoisesta aiheesta ja antoisasti vuorovaikutuksesta koko prosessin aikana. Kiitän Katarina Lejavovaa tutkimusmenetelmiin perehdyttämisestä ja opastuksesta, Matti Vornasta kirjallisen osuuden kommentoinnista ja Jari Koistinahoa mahdollisuudesta suorittaa tutkielma hänen tutkimusryhmässään. Lisäksi haluan kiittää Tarja Malmia ja kaikkia muita tutkimusryhmän henkilöitä, jotka ovat osallistuneet pro graduni ohjaukseen ja käytännön työskentelyyn. Kiitos kuuluu myös läheisilleni, jotka ovat auttaneet minua monin tavoin työn eri vaiheissa.

## LÄHDELUETTELO

- Aleshin, S., Reiser, G. 2014: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ) protects against ceramide-induced cellular toxicity in rat brain astrocytes and neurons by activation of ceramide kinase. – *Molecular and cellular neurosciences* 59: 127-34.
- Ali, S., Mohs, A., Thomas, M., Klare, J., Ross, R., Schmitz, M. L., Martin, M. U. 2011: The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. – *Journal of Immunology* 187: 1609-1616.
- Alvarez-Buylla, A., Herrera, D. G., Wichterle, H. 2000: The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. – *Progress In Brain Research* 127: 1-11.
- Alvarez-Buylla, A., Lim D.A. 2004: For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. – *Neuron* 41: 683-6.
- Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nusslein, I., Calegari, F., Huttner, W. B. 2011: Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. – *Nature Communications* 2: 154.
- Arsov, T., Smith, K. R., Damiano, J., Franceschetti, S., Canafoglia, L., Bromhead, C. J., Andermann, E., Vears, D. F., Cossette, P., Rajagopalan, S., McDougall, A., Sofia, V., Farrell, M., Aguglia, U., Zini, A., Meletti, S., Morbin, M., Mullen, S., Andermann, F., Mole, S. E., Bahlo, M., Berkovic, S. F. 2011: Kufs disease, the major adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, caused by mutations in CLN6. – *American Society of Human Genetics* 88: 566-573.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O. 2002: Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. – *Nature medicine* 8: 963-970.
- Autti, T., Raininko, R., Launes, J., Nuutila, A., Santavuori, P., 1992. Jansky – Bielschowsky variant disease: CT, MRI, and SPECT findings. – *Pediatric neurology* 8: 121-126.
- Ballabio, A., Gieselmann, V. 2009: Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. – *Biochimica et biophysica acta* 1793: 684-696.
- Barry, D. S., Pakan, J. M. P., McDermott, K.W. 2014: Radial glial cells: Key organisers in CNS development. – *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 46: 76-79.
- Behar, T.N. 2001: Analysis of fractal dimension of O2A glial cells differentiating in vitro. – *Methods: a companion to Methods in enzymology* 4: 331-9.
- B'chir, W., Maurin, A. C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., Bruhat, A. 2013: The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. – *Nucleic Acids Research* 41: 7683-99.
- Bessa, C., Teixeira, C. A., Mangas, M., Dias, A., Sá Miranda, M. C., Guimãraes, A., Ferreira, J. C., Canas, N., Cabral, P., Ribeiro, M.G. 2006: Two novel CLN5 mutations in a Portuguese patient with vLINCL: insights into molecular mechanisms of CLN5 deficiency. – *Molecular genetics and metabolism* 89: 245-253
- Birch, D. G. 1999: Retinal degeneration in retinitis pigmentosa and neuronal ceroid lipofuscinosis: an overview. – *Molecular genetics and metabolism* 66: 356-366.
- Blurton-Jones, M., Kitazawaa, M., Martinez-Coria, H., Castello, N. A., Muller, F. J., Loring, J. F., Yamasakia, T. R., Poona, W. W., Green, K. N., LaFerla, F.M. 2009: Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 32.
- Boustany, R. M. N. 2013: Lysosomal storage diseases—the horizon expands. – *Nature reviews. Neurology* 9: 583-598.



- Boustany, R. M., Alroy, J., Kolodny, E. H. 1988: Clinical classification of neuronal ceroid-lipofuscinosis subtypes. – *American journal of medical genetics*. Supplement 5: 47-58.
- Bras, J., Verloes, A., Schneider, S. A., Mole, S. E., Guerreiro, R. J. 2012: Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis. – *Human molecular genetics* 21: 2646-2650.
- Bull, N. D., Bartlett, P. F. 2005: The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. – *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 10815-21.
- Cáceres, A., Banker, G. A., Binder, L. 1986: Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. – *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 6: 714-22.
- Cameron, H. A., McKay, R. D. 2001: Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. – *The Journal of comparative neurology* 435: 406-17.
- Chapuis, J., Hot, D., Hansmannel, F., Kerdraon, O., Ferreira, S., Hubans, C., Maurage, C. A., Huot, L., Bensemain, F., Laumet, G., Ayrat, A. M., Fievet, N., Hauw, J. J., DeKosky, S. T., Lemoine, Y., Iwatsubo, T., Wavrant-Devrière, F., Dartigues, J. F., Tzourio, C., Buée, L., Pasquier, F., Berr, C., Mann, D., Lendon, C., Alépérovitch, A., Kamboh, M. I., Amouyel, P., Lambert, J. C., 2009: Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. – *Molecular psychiatry* 14: 1004-1016.
- Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., Evans, R. M. 2001: PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. – *Nature Medicine* 7: 48-52.
- Castrillo, A., Tontonoz, P. 2004: Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. – *Annual review of cell and developmental biology* 20: 455-80.
- Ciechanover, A. 2012: Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. – *Biochimica et biophysica acta* 1824: 3-13.
- Cimini, A., Bernardo, A., Cifone, M.G., Di Marzio, L., Di Loreto, S. 2003: TNFalpha down-regulates PPARdelta expression in oligodendrocyte progenitor cells: implications for demyelinating diseases. – *Glia* 41: 3.
- Collins, R. C., Dobkin, B. H., Choi, D. W. 1989: Selective vulnerability of the brain: new insights into the pathophysiology of stroke. – *Annals of internal medicine* 110: 992-1000.
- Cooper, J.D. 2003: Progress towards understanding the neurobiology of Batten disease or neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Current opinion in neurology* 16: 121-128.
- Christophi, G. P., Gruber, R. C., Panos, M., Christophi, R. L., Jubelt, B., Massa, P. T. 2012: Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. – *Clinical immunology: the official journal of the Clinical Immunology Society* 142(3): 308-19.
- Curtis, M. A., Penney, E. B., Pearson, A. G., Van Roon-Mom, W. M. C., Butterworth, N. J., Dragunow, M., Connor, B., Faull, R. L. M. 2003: Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 9023-9027.
- Czeh, M., Gressens, P., Kaundl, A. M. 2011: The yin and yang of microglia. – *Developmental neuroscience* 33: 199-209.

- Crystal, R. G., Sondhi, D., Hackett, N. R., Kaminsky, S. M., Worgall, S., Stieg, P., Souweidane, M., Hosain, S., Heier, L., Ballon, D., Dinner, M., Wisniewski, K., Kaplitt, M., Greenwald, B. M., Howell, J. D., Strybing, K., Dyke, J., Voss, H. 2004: Clinical protocol. Administration of a replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Human gene therapy* 15: 1131-1154.
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. 2004: Cell death: critical control points. – *Cell* 116: 205-19.
- Desvergne, B., ja Wahli, W. 1999: Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. – *Endocrine Reviews* 20: 649.
- Dewar, D., Underhill, S., M., Goldberg, M., P. 2003: Oligodendrocytes and Ischemic Brain Injury. – *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23: 263-274.
- Dhar, S., Bitting, R. L., Rylova, S. N., Jansen, P. J., Lockhart, E., Koeberl, D. D., Amalfitano, A., Boustany, R. M. 2002: Flupirtine blocks apoptosis in batten patient lymphoblasts and in human postmitotic CLN3- and CLN2-deficient neurons. – *Annals of Neurology* 51: 448-466.
- Doetsch, F., Alvarez-Buylla, A. 1996: Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 14895-900.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. 2002: EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. – *Neuron* 36:1021-34.
- Dotti, C. G., Banker, G. A., Binder, L. I. 1987: The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. – *Neuroscience* 23: 121-30.
- Duan, X., Kang, E., Liu, C. Y., Ming, G. L., Song, H. 2008: Development of neural stem cell in the adult brain. – *Current opinion in neurobiology* 18: 108-115
- Ekdahl, C. T., Claassen, J-H., Bonde, S., Kokaia, Z., Lindvall, O. 2003: Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13632-13637.
- Elleder, M. 1978: A histochemical and ultrastructural study of stored material in neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Virchows Archiv. B: Cell pathology* 28: 167-178.
- Elleder, M. 1989: Lectin histochemical study of lipopigments with special regard to neuronal ceroid lipofuscinosis. Results with concanavalin A. – *histochemistry*, 93: 197-205.
- Emerit, M. B., Riad, M., Hamon, M. 1992: Trophic effects of neurotransmitters during brain maturation. – *Biology of the neonate* 62: 193-201.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., Lee, Y.L. 2000: Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-on years (1969-2000). – *Neurochemical research* 25: 1439-51.
- Ezaki, J., Tanida, I., Kanehagi, N., Kominami, E. 1999: A lysosomal proteinase, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene (CLN2) product, is essential for degradation of a hydrophobic protein, the subunit c of ATP synthase. – *Journal of neurochemistry* 72: 2573-82.
- Fabritius, A-L., Vesa, J. Minye, H. M., Nakano, I., Kornblum, H., Peltonen, L. 2014: Neuronal ceroid lipofuscinosis genes, CLN2, CLN3 and CLN5 are spatially and temporally co-expressed in a developing mouse brain. – *Experimental and molecular pathology pii: S0014-4800 (14) 00163-4. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.10.003.*
- Fayaz, S. M., Suvanish Kumar, V. S., Rajanikant, G. K. 2014: Necroptosis: who knew there

- were so many interesting ways to die? – *CNS & neurological disorders drug targets* 13(1): 42-51.
- Fiacco, T. A., Agulhon, C., McCarthy, K.D. 2014: Sorting Out Astrocyte Physiology from Pharmacology. – *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49: 151-174.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A. 1999: Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. – *Neuron* 23: 247-256.
- Franco, S. J., Gil-Sanz, C., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S. R., Ramos, C., Müller, U. 2012: Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. – *Science* 337: 746-749.
- Frugier, T., Mitchell, N. L., Tammen, I., Houweling, P. J., Arthur, D. G., Kay, G. W., van Diggelen, O. P., Jolly, R. D., Palmer, D. N. 2008: A new large animal model of CLN5 neuronal ceroid lipofuscinosis in Borderdale sheep is caused by a nucleotide substitution at a consensus splice site (c.571 + 1G > A) leading to excision of exon 3. – *Neurobiology of Disease* 29: 306-315.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T. 2003: Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. – *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 9357-66
- Gage, F.H. 2000: Mammalian neural stem cells. – *Science* 287:1433-38.
- Gage, F.H. 2002: Neurogenesis in the Adult Brain. – *The Journal of Neuroscience* 22: 612-613.
- Galli, R., Gritti, A., Bonfanti, L., Vescovi, A. L. 2003: Neural stem cells: an overview. – *Circulation research* 92: 598-608.
- Gil, J. M. A. C., Mohapel, P., Araújo, I. M., Popovic, N., Li, J., Brundin, P., Petersén, A. 2005: Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. – *Neurobiology of Disease* 20: 744-751.
- Gil-Mohapel, J., Simpson, J. M., Ghilan, M., Christie, B.R. 2011: Neurogenesis in Huntington's disease: Can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies? – *Brain Research* 1406: 84-105.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., Gage, F.H. 2010: Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. – *Cell* 140: 918-934.
- Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., Walsh, C.A. 1999: Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. – *Neuron* 23: 257-271.
- Goebel, H. H., Gerhard, L., Kominami, E., Haltia, M. 1996: Neuronal ceroid-lipofuscinosis – late-infantile or Jansky-Bielschowsky type – revisited. – *Brain Pathology* 6: 225-228.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T. J. 1999: Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. – *Nature Neurosciende* 2: 260-265.
- Gould, E., Reeves, A. J., Graziano, M. S. A., Gross, C.G. 1999: Neurogenesis in the of adult primates. – *Science* 286: 548-552.
- Gritti, A., Parati, E. A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D. J., Roisen, F., Nickel, D. D., Vescovi, A. L. 1996: Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. – *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 1091-1100.
- Gupta, P., Soyombo, A. A., Atashband, A., Wisniewski, K. E., Shelton, J. M., Richardson, J.

- A., Hammer, R. E., Hofmann, S. L. 2001: Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13566-13571.
- Haddad, S. E. et al. 2012: CLN5 and CLN8 protein association with ceramide synthase: biochemical and proteomic approaches. – *Electrophoresis* 33: 3798-3809.
- Hagg, T. 2009: From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. – *Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 15(1): 20-7.
- Haltia, M. 2003: The neuronal ceroid-lipofuscinoses. – *Journal of neuropathology and experimental neurology* 62(1): 1-13.
- Haltia, M., Goebel, H. H. 2012: The neuronal ceroid- lipofuscinoses: a historical introduction. – *Biochimica et biophysica acta* 1832(11): 1795-800.
- Haughey, N. J, Liu, D., Nath, A., Borchard, A. C., Mattson, M. P. 2002: Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. – *Neuromolecular Medicine* 1: 125-135.
- Heinonen, O., Salonen, T., Jalanko, A., Peltonen, L., Copp, A. 2000. CLN-1 and CLN-5, genes for infantile and variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinoses, are expressed in the embryonic human brain. – *The Journal of comparative neurology* 426: 406-412.
- Heneka, M. T., Landreth, G. E. 2007: PPARs in the brain. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1771: 1031-1045.
- Hobert, J. A., Dawson, G. 2006: Neuronal ceroid lipofuscinoses therapeutic strategies: past, present and future. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1762: 945-53.
- Hofmann, S. L., Atashband, A., Cho, S. K., Das, A. K., Gupta, P., Lu, J. Y. 2002: Neuronal ceroid lipofuscinoses caused by defects in soluble lysosomal enzymes (CLN1 and CLN2). – *Current Molecular medicine* 2: 423-37.
- Hoglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., Hirsch, E.C. 2004: Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson's disease. – *Nature neuroscience* 7: 726-735.
- Holmberg, V., Lauronen, L., Autti, T., Santavuori, P., Savukoski, M., Uvebrant, P., Hofman, I., Peltonen, L., Järvelä, I. 2000: Phenotype-genotype correlation in eight patients with Finnish variant late infantile NCL (CLN5). – *Neurology* 55: 579-581.
- Holmberg, V., Jalanko, A., Isosomppi, J., Fabritius, A. L., Peltonen, L., Kopra, O. 2004: The mouse ortholog of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 gene encodes a soluble lysosomal glycoprotein expressed in the developing brain. – *Neurobiology of disease* 16(1): 29-40.
- Houweling, P. J., Cavanagh, J. A., Palmer, D. N., Frugier, T., Mitchell, N. L., Windsor, P. A., Raadsma, H. W., Tammen, I. 2006: Neuronal ceroid lipofuscinosis in Devon cattle is caused by a single base duplication (c.662dupG) in the bovine CLN5 gene. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1762(10): 890-7.
- Hudson, C.A., Christophi, G. P., Gruber, R. C., Wilmore, J. R., Lawrence, D. A., Massa, P. T. 2008: Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. – *Journal of leukocyte biology* 84: 631-643.
- Huebner, E. A., Strittmatter, S. M. 2009: Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Results Probl. – Cell Differentiation* 48: 339-351.
- Hughes, S. M., Hope, K. M., Xu, J. B., Mitchell, N. L., Palmer, D. N. 2014: Inhibition of storage pathology in prenatal CLN5-deficient sheep neural cultures by lentiviral gene therapy.

- *Neurobiology of Disease* 62: 543-50.
- Hulková, H., Ledvinová, J., Asfaw, B., Koubek, K., Kopriva, K., Elleder, M. 2005: Lactosylceramide in lysosomal storage disorders: a comparative immunohistochemical and biochemical study. – *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 447: 31-44.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itoharu, S., Kageyama, R. 2008: Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. – *Nature Neuroscience* 11(10): 1153-61.
- International Batten Disease Consortium. 1995: Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. – *Cell* 82: 949-957.
- Ishizawa, M., Kagechika, H., Makishima, M. 2012: NR4A nuclear receptors mediate carnitine palmitoyltransferase 1A gene expression by the rexinoid HX600. – *Biochemical and biophysical research communications* 418(4): 780-5.
- Isosomppi, J., Vesa, J., Jalanko, A., Peltonen, L. 2002: Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein. – *Human molecular genetics* 11: 1-7.
- Iwashita, A., Muramatsu, Y., Yamazaki, T., Muramoto, M., Kita, Y., Yamazaki, S., Mihara, K., Moriguchi, A., Matsuoka, N. 2007: Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor delta-selective agonists in vitro and in vivo. – *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 320(3): 1087-96.
- Jalanko, A., Vesa, J., Manninen, T., von Schantz, C., Minye, H., Fabritius, A. L., Salonen, T., Rapola, J., Gentile, M., Kopra, O., Peltonen, L. 2005: Mice with Ppt1Deltaex4 mutation replicate the INCL phenotype and show an inflammation-associated loss of interneurons, – *Neurobiology of Disease* 18: 226-241.
- Jalanko, A., Bräulke, T. 2009: Neuronal ceroid lipofuscinoses. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1793: 697-709.
- Jardim, L. B., Villanueva, M. M., de Souza, C. F., Netto, C. B. 2010: Clinical aspects of neuropathic lysosomal storage disorders. – *Journal of inherited metabolic disease* 33: 315-329.
- Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C., Greenberg, D.A. 2004: Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 343-347.
- Jolly, R. D., Brown, S., Das, A. M., Walkley, S. U., 2002. Mitochondrial dysfunction in the neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). – *Neurochemistry international* 40: 565-571.
- Jouhilahti, E., Peltonen, S., Peltonen, J. 2008: Class III  $\beta$ -Tubulin Is a Component of the Mitotic Spindle in Multiple Cell Types. – *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 56: 1113-1119.
- Kakkar, R., Lee, R. T. 2008: The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. – *Nature reviews. Drug discovery* 7(10): 827-40.
- Kalinin, S., Richardson, J. C., Feinstein, D. L., 2009: A PPARdelta agonist reduces amyloid burden and brain inflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. – *Current Alzheimer Research* 6: 431-437.
- Kanninen, K., Malm, T. M., Jyrkkänen, H., Goldsteins, G., Keksa-Goldsteine, V., Tanila, H., Yamamoto, M., Ylä-Herttuala, S., Levonen, A., Koistinaho, J. 2008: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. – *Molecular and Cellular Neuroscience* 39(3): 302-313.
- Kazufumi, M., Tomohiro Y. 2014: Interleukin-33: Multifunctional Alarmin that Promotes Both Health and Disease. – *Teoksessa: Takayuki, Y. ja Tomohiro Y. (toim.), Cytokine front-*

- tiers: regulation of immune responses in health and disease: 267-299. Springer. Japan.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F.H. 1997: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. – *Nature* 386(6624): 493-495.
- Kielar, C., Maddox, L., Bible, E., Pontikis, C. C., McCauley, S. L., Griffey, M. A., Wong, M., Sands, M. S., Cooper, J. D., 2007. Successive neuron loss in the thalamus and cortex in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Neurobiology of Disease* 25: 150-162.
- Kim, S. J., Zhang, Z., Hitomi, E., Lee, Y. C., Mukherjee, A. B. 2006: Endoplasmic reticulum stress -induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Human Molecular Genetics* 15: 1826-1834.
- Kimura, S., Goebel, H. H. 1987: Electron microscopic studies on skin and lymphocytes in early juvenile neuronal ceroid-lipofuscinosis. – *Brain & Development* 9(6): 576-80.
- Kohan, R., Cismondi, I. A., Oller-Ramirez, A. M., Guelbert, N., Anzoloni, T. V., Alonso, G., Mole, S. E., de Kremer, D. R., de Halac, N. I. 2011: Therapeutic approaches to the challenge of neuronal ceroid lipofuscinoses. – *Current pharmaceutical biotechnology* 12: 867-883.
- Koike, M., Shibata, M., Waguri, S., Yoshimura, K., Tanida, I., Kominami, E., Gotow, T., Peters, C., von Figura, K., Mizushima, N., Saftig, P., Uchiyama, Y. 2005: Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). – *The American journal of pathology* 167: 1713-172.
- Kokaia, Z., Lindvall, O. 2003: Neurogenesis after ischaemic brain insults. – *Current opinion in neurobiology* 13: 127-132.
- Kollmann, K., Uusi-Rauva, K., Scifo, E., Tyynelä, J., Jalanko, A., Braulke, T. 2013: Cell biology and function of neuronal ceroid lipofuscinosis-related proteins. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1832(11): 1866-81.
- Komai-Koma M., Xu D., Li Y., McKenzie A.N., McInnes I.B., Liew F.Y. 2007: IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. – *European journal of immunology* 37: 2779-2786.
- Kondo, T., Raff, M. 2000: Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. – *Science* 289:1754-1757.
- Kornblum, H. I. 2007: Introduction to Neural Stem Cells. *Stroke*. 2007;38:810-816.
- Kousi, M., Anttila, V., Schulz, A., Calafato, S., Jakkula, E., Riesch, E., Myllykangas, L., Kalimo, H., Topcu, M., Gokben, S., Alehan, F., Lemke, J. R., Alber, M., Palotie, A., Kopra, O., Lehesjoki, A.-E. 2012: Novel mutations consolidate KCTD7 as a progressive myoclonus epilepsy gene. – *Journal of medical genetics* 49: 391-399.
- Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A. 2009: The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. – *Annual review of neuroscience* 32: 149-84.
- Kuang, G., He, Q., Zhang, Y., Zhuang, R., Xiang, A., Jiang, Q., Luo, Y., Yang, J. 2012: Modulation of Preactivation of PPAR- $\beta$  on Memory and Learning Dysfunction and Inflammatory Response in the Hippocampus in Rats Exposed to Global Cerebral Ischemia/Reperfusion. *PPAR Res.* 2012:209794.
- Kuchler A. M., Pollheimer J., Balogh J., Sponheim J., Manley L., Sorensen D. R., De Angelis P. M., Scott H., Haraldsen G. 2008: Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. – *The American journal of pathology* 173: 1229-1242.
- Kuhn, H.G, Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. 1996: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. – *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 2027.

- Kyttälä, A., Lahtinen, U., Braulke, T., Hofmann, S.L. 2006: Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1762: 920-933
- Lane, S. C., Jolly, R. D., Schmechel, D. E., Alroy, J., Boustany, R. M. 1996: Apoptosis as the mechanism of neurodegeneration in Batten's disease. – *Journal of neurochemistry* 67: 677-683.
- Larkin, H., Ribeiro, M. G., Lavoie, C. 2013: Topology and membrane anchoring of the lysosomal storage disease-related protein CLN5. – *Human mutation* 34: 1688-1697.
- Lazic, S. E., Grote, H., Armstrong, R. J. E., Blakemore, C., Hannan, A. J., Van Dellen, A., Barker, R.A. 2004: Decreased hippocampal cell proliferation in R6/I Huntington's mice. – *NeuroReport* 15 (5): 811-813.
- Lebrun, A. H., Storch, S., Rüschemdorf, F., Schmiedt, M. L., Kyttälä, A., Mole, S. E., Kitzmüller, C., Saar, K., Mewasingh, L. D., Boda, V., Kohlschütter, A., Ullrich, K., Braulke, T., Schulz, A. 2009: Retention of lysosomal protein CLN5 in the endoplasmic reticulum causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Asian sibship. – *Human Mutation* 30(5): E651-61.
- Lehner, B., Sandner, B., Marschallinger, J., Lehner, C., Furtner, T., Couillard-Despres, S., Rivera, F. J., Brockhoff, G., Bauer, H-C., Weidner, N., Aigner, L. 2011: The dark side of BrdU in neural stem cell biology: Detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. – *Cell and Tissue Research* 345 (3): 313-28.
- Levitt, P., Rakic, P. 1980: Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. – *Journal of Comparative Neurology* 193: 815-40.
- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. L., Gage, F. H. 2004: Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. – *Annual Reviews of Pharmacological Toxicology* 44: 399-421.
- Liu, X., Hammel, M., He, Y., Tainer, J. A., Jeng, U. S., Zhang, L., Wang, S., Wang, X. 2013: Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 14918-14923.
- Lui, J. H., Hansen, D. V., Kriegstein, A. R. 2011: Development and evolution of the human neocortex. – *Cell* 146: 18-36.
- Lu, J., Bradley, R. A., Zhang, S-C. 2014: Turning Reactive Glia into Functional Neurons in the Brain. – *Cell Stem Cell* 14(2): 133-4.
- Luo, L., O'Leary, D.D. 2005: Axon retraction and degeneration in development and disease. – *Annual review of neuroscience* 28: 127-156.
- Lyly, A., von Schantz, C., Heine, C., Schmiedt, M. L., Sipilä, T., Jalanko, A., Kyttälä, A. 2009: Novel interactions of CLN5 support molecular networking between Neuronal Ceroid Lipofuscinosis proteins. *BMC Cell Biology* 10:83. DOI: 10.1186/1471-2121-10-83.
- Ma, D. K., Jang, M. H., Guo, J. U., Kitabatake, Y., Chang, M. L., Pow-Anpongkul, N., Flavell, R. A., Lu, B., Ming, G. L., Song, H. 2009: Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. – *Science* 323: 1074-1077.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G. 2007: Self-eating and self-killing: cross-talk between autophagy and apoptosis. – *Nature reviews. Molecular cell biology* 8: 741-752.
- Malatesta, P., Gotz, M. 2013: Radial glia – from boring cables to stem cell stars. – *Development* 140: 483-6.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., Duman, R. S. 2000: Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. – *Journal of Neuroscience* 20: 9104-

9110.

- Mamo, A., Jules, F., Dumaresq-Doiron, K., Costantino, S., Lefrancois, S. 2012: The role of ceroid lipofuscinosis neuronal protein 5 (CLN5) in endosomal sorting. – *Molecular Cell Biology* 32: 1855-1866.
- Manev, H., Uz, T., Smalheiser, N.R., Manev, R. 2001: Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. – *European Journal of Pharmacology* 411(1-2): 67-70.
- Marxreiter, F., Regensburger, M., Winkler, J. 2013: Adult neurogenesis in Parkinson's disease. – *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 70(3): 459-73.
- Mattson, M. P. 2000: Apoptosis in neurodegenerative disorders. – *Nature reviews. Molecular cell biology* 1(2): 120-9.
- Melville, S. A., Wilson, C. L., Chiang, C. S., Studdert, V. P., Lingaas, F., Wilton, A. N. 2005: A mutation in canine CLN5 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs. – *Genomics*. 86(3): 287-94.
- Mennini, T., Bigini, P., Ravizza, T., Vezzani, A., Calvaresi, N., Tortarolo, M., Bendotti, C. 2002: Expression of glutamate receptor subtypes in the spinal cord of control and mnd mice, a model of motor neuron disorder. – *Journal of Neuroscience Research* 15: 553-560.
- Miller, A.M. 2011: Role of IL-33 in inflammation and disease. – *Journal of Inflammation* 8: 22.
- Ming, G., Song, H. 2011: Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. – *Neuron* 70: 687-702.
- Moharir, A., Peck, S. H., Budden, T., Lee, S. Y. 2013: The Role of N-Glycosylation in Folding, Trafficking, and Functionality of Lysosomal Protein CLN5. – *Public Library of Science one* 8(9): e74299.
- Mole, S.E., Williams, R.E., Goebel, H.H. 2005: Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. – *Neurogenetics* 6(3): 107-26.
- Mole, S.E., Williams, R.E., Goebel, H.H. 2011: The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease). – 444 s. Oxford University Press Inc. Yhdysvallat.
- Moraga-Amaro, R., Jerez-Baraona, J.M, Simon, F., Stehberg, J. 2014: Role of astrocytes in memory and psychiatric disorders. – *Journal of Physiology-Paris*. pii: S0928-4257(14)00039-4. DOI: 10.1016/j.jphysparis.2014.08.005.
- Morita, K., Kawana, K., Sodeyama, M., Shimomura, I., Kagechika, H., Makishima, M. 2005: Selective allosteric ligand activation of the retinoid X receptor heterodimers of NGFI-B and Nurr1. – *Biochemical pharmacology* 71: 98-107.
- Moussion C., Ortega N., Girard J.P. 2008: The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? – *Public Library of Science one* 3(10): E3331-E3331. DOI: 10.1371/journal.pone.0003331.
- Mu, Y., Gage, F. H. 2011: Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. – *Molecular Neurodegeneration* 6: 85.
- Nagler, D. K., Sulea, T., Menard, R. 1999: Full-length cDNA of human cathepsin F predicts the presence of a cystatin domain at the N-terminus of the cysteine protease zymogen. – *Biochemical and biophysical research communications* 257: 313-318.
- Nagy, Z., Esiri, M. ja Smith, A 1997: Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. – *Acta Neuropathologica* 93: 294-300.



- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., Nakafuku, M. 2002: Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. – *Cell* 110: 429-441.
- Nelson, P. T. et al. 2002: Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. – *The American journal of pathology* 160: 1201-1206.
- Nguyen, L., Rigo, J. M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., Moonen, G. 2001: Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. – *Cell and Tissue Research* 305(2): 187-202.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., Kriegstein, A. R. 2004: Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. – *Nature Neuroscience* 7: 136-44.
- Noskova, L., Stranecky, V., Hartmannova, H., Pristoupilova, A., Baresova, V., Ivanek, R., Hulikova, H., Jahnova, H., van der Zee, J., Staropoli, J. F., Sims, K. B., Tyynela, J., Van Broeckhoven, C., Nijssen, P. C. G., Mole, S. E., Elleder, M., Kmoch, S. 2011: Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. – *American Journal of Human Genetics* 89: 241-252.
- Palmer, G., Gabay, C. 2011: Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. – *Nature Reviews Rheumatology* 7: 321-329.
- Palmer, D.N., Barry, L.A., Tyynelä, J., Cooper, J.D. 2013: NCL disease mechanisms. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1832(11): 1882-93.
- Parent, J. M. 2003: Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. – *Neuroscientist* 9: 261-272.
- Paridaen, J.T.M.L., Huttner W.B. 2014: Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. – *European Molecular Biology Organization reports* 15(4): 351-64. DOI: 10.1002/embr.201438447.
- Park, D. H., Eve, D. J., Sanberg, P. R., Musso, J., Bachstetter, A. D., Wolfson, A., Schlunk, A., Baradez, M. O., Sinden, J. D., Gemma, C. 2010: Increased neuronal proliferation in the dentate gyrus of aged rats following neural stem cell implantation. – *Stem Cells and Development* 19(2): 175-80.
- Platt, F. M., Lachmann, R. H. 2009: Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1793: 737-745.
- Persaud-Sawin, D. A., VanDongen, A., Boustany, R. M. 2002: Motifs within the CLN3 protein: modulation of cell growth rates and apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2129–2142.
- Persaud-Sawin, D. A., Boustany, R. M. 2005: Cell death pathways in juvenile Batten disease. – *Apoptosis* 10: 973-985.
- Persaud-Sawin, D. A., Mousallem, T., Wang, C., Zucker, A., Kominami, E., Boustany, R. M. 2007: Neuronal ceroid lipofuscinosis: a common pathway? – *Pediatric research* 61: 146-152.
- Piatti, V. C., Davies-Sala, M. G., Espósito, M. S., Mongiat, L. A., Trincherro, M. F., Schinder, A.F. 2011: The Timing for Neuronal Maturation in the Adult Hippocampus Is Modulated by Local Network Activity. – *The Journal of Neuroscience* 31: 7715-7728.
- Pilz, G. A., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., Ninkovic, J., Snippert, H. J., Clevers, H., Godinho, L., Guillemot, F., Borrell, V., Matsuzaki, F., Götz, M. 2013: Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. – *Nature Communications* 4: 2125.

- Platel, J. C., Dave, K. A., Gordon, V., Lacar, B., Rubio, M. E., Bordey, A. 2010: NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. – *Neuron* 65: 859-872.
- Pomeshchik, Y., Kidin, I., Korhonen, P., Savchenko, E., Jaronen, M., Lehtonen, S., Wojciechowski, S., Kanninen, K., Koistinaho, J., Malm, T. 2014: Interleukin-33 treatment reduces secondary injury and improves functional recovery after contusion spinal cord injury. – *Brain, behavior, and immunity pii: S0889-1591(14) 00419-X*. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.08-.002.
- Pohl, S., Marschner, K., Storch, S., Bräulke, T. 2009: Glycosylation- and phosphorylation dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. – *Biological chemistry* 390: 521-527.
- Polak, P. E., Kalinin, S., Dello Russo, C., Gavriilyuk, V., Sharp, A., Peters, J. M., Richardson, J., Willson, T. M., Weinberg, G., Feinstein, D.L. 2005: Protective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-beta/ delta agonist in experimental autoimmune encephalomyelitis. – *Journal of neuroimmunology* 168: 65.
- Porta, E. A. 2002: Pigments in aging: an overview. *Ann N Y Acad Sci.* 959:57–65.
- Puranam, K. L., Guo, W. X., Qian, W. H., Nikbakht, K., Boustany, R. M. 1999: CLN3 defines a novel antiapoptotic pathway operative in neurodegeneration and mediated by ceramide. – *Molecular genetics and metabolism* 66: 294-308.
- Raivich, G., Jones, L. L., Werner, A., Blüthmann, H., Doetschmann, T., Kreutzberg, G. W. 1999: Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. – *Acta neurochirurgica. Supplement* 73: 21-30.
- Rakic, P. 1972: Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, 145: 61-83.
- Ranta, S., Topcu, M., Tegelberg, S., Tan, H., Ustubutun, A., Saatci, I., Dufke, A., Enders, H., Pohl, K., Alembik, Y., Mitchell, W. A., Mole, S. E., Lehesjoki, A.-E. 2004: Variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis in a subset of Turkish patients is allelic to Northern epilepsy. – *Human Mutations* 23: 300-305.
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., Turk, B. 2012: Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 22-33.
- Reynolds, B. A., Weiss, S. 1992: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. – *Science* 255(5052): 1707-10.
- Rice, A. C., Khaldi, A., Harvey, H. B., Salman, N. J., White, F., Fillmore, H., Bullock, M. R. 2003: Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. – *Experimental Neurology* 183: 406-417.
- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J., Bartlett, P. F. 1992: De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 8591-8595.
- Rider, J. A., Rider, D. L. 1988: Batten disease: past, present, and future. – *American journal of medical genetics. Supplement* 5: 21-6.
- Rouille, Y., Rohn, W., Hoflack, B., 2000: Targeting of lysosomal proteins. – *Seminars in cell & developmental biology* 11: 165-171.
- Rusyn, E., Mousallem, T., Persaud-Sawin, D. A., Miller, S., Boustany, R. M. 2008: CLN3p impacts galactosylceramide transport, raft morphology, and lipid content. – *Pediatric Research* 63: 625-631.
- Sahay, A., Hen, R. 2007: Adult hippocampal neurogenesis in depression. – *Nature Neuros-*

- cience 10: 1110-1115.
- Saijo, K., Crotti, A., Glass, C. K. 2013: Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. – *Glia* 61: 104-11.
- Saluja, I., Granneman, J.G., Skoff, R.P. 2001: PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. – *Glia* 33: 191.
- Santavuori, P., Rapola, J., Sainio, K., Raitta, C. A 1982: Variant of Jansky-Bieschowsky disease. – *Neuropaediatrics* 13: 135-141.
- Santavuori, P., Rapola, J., Nuutila, A., Raininko, R., Lappi, M., Launes, J., Herva, R., Sainio, K., 1991. The spectrum of Jansky-Bielschowsky disease. – *Neuropediatrics* 22: 92-96.
- Santavuori, P., Rapola, J., Raininko, R., Autti, T., Lappi, M., Nuutila, A., Launes, J., Sainio, K. 1993: Early juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis or variant Jansky-Bielschowsky disease: diagnostic criteria and nomenclature. – *Journal of Inherited Metabolic Disease* 16: 230-232.
- Savukoski, M., Kestilä, M., Williams, R., Järvelä, I., Sharp, J., Harris, J., Santavuori, P., Gardiner, M., Peltonen, L. 1994: Defined chromosomal assignment of CLN5 demonstrates that at least four genetic loci are involved in the pathogenesis of human ceroid lipofuscinoses. – *American journal of human genetics* 55: 695-701.
- Savukoski, M., Klockars, T., Holmberg, V., Santavuori, P., Lander, E. S., Peltonen, L. 1998: CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Nature Genetics* 19: 286-288.
- Schmiedt, M. L., Bessa, C., Heine, C., Ribeiro, M. G., Jalanko, A., Kyttala, A., 2010. The neuronal ceroid lipofuscinosis protein CLN5: new insights into cellular maturation, transport and consequences of mutations. – *Human Mutations* 31: 356-365.
- Schmiedt, M.L. 2012: The CLN5 disease – protein maturation, trafficking and pathology. – Helsinki University Biomedical Dissertations No. 166. Research 84/2012. ISSN 1457-8433.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J. F., Kastelein, R. A. 2005: IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. – *Immunity* 23: 479-90.
- Schnegg, C. I., Greene-Schloesser, D., Kooshki, M., Payne, V. S., Hsu, F. C., Robbins, M. E. 2013: The PPAR $\delta$  agonist GW0742 inhibits neuroinflammation, but does not restore neurogenesis or prevent early delayed hippocampal-dependent cognitive impairment after whole-brain irradiation. – *Free radical biology & medicine* 61: 1-9.
- Schulz, A., Mousallem, T., Venkataramani, M., Persaud-Sawin, D.-A., Zucker, A., Luberto, C., Bielawska, A., Bielawski, J., Holthuis, J. C. M., Jazwinski, S. M., Kozhaya, L., Dbaiibo, G. S., Boustany, R.-M. N. 2006: The CLN9 protein, a regulator of dihydroceramide synthase. – *The Journal of biological chemistry* 281: 2784-2794.
- Schultz, M. L., Tecedor, L., Chang, M., Davidson, B. L. 2011: Clarifying lysosomal storage diseases. – *Trends in neurosciences* 34: 401-10.
- Seehafer, S. S., Ramirez-Montealegre, D., Wong, A. M., Chan, C. H., Castaneda, J., Horak, M., Ahmadi, S. M., Lim, M. J., Cooper, J. D., Pearce, D. A. 2011: Immunosuppression alters disease severity in juvenile Batten disease mice. – *Journal of neuroimmunology* 230: 169-172.
- Seki, T., Arai, Y. 1993: Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the DG of the adult rat. – *The Journal of*

- neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 13: 2351-2358.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., Alvarez-Buylla, A. 2004: Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult DG. – *The Journal of comparative neurology* 478: 359-378.
- Shihabuddin, L. S., Horner, P. J., Ray, J., Gage, F. H. 2000: Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20:8727– 8735.
- Shields, S.A., Blakemore, W.F., Franklin, R.J., 2000. Schwann cell remyelination is restricted to astrocyte-deficient areas after transplantation into demyelinated adult rat brain. – *Journal of neuroscience research* 60: 571-578.
- Shacka, J. J. 2012: Mouse models of neuronal ceroid lipofuscinoses: Useful pre-clinical tools to delineate disease pathophysiology and validate therapeutics. – *Brain Research Bulletin* 88: 43-57
- Sharifi, A., Kousi, M., Sagne, C., Bellenchi, G.C., Morel, L., Darmon, M., Hulkova, H., Rivo, R., Debacker, C., El Mestikawy, S., et al., 2010: Expression and lysosomal targeting of CLN7, a major facilitator superfamily transporter associated with variant lateinfantile neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Human molecular genetics* 19: 4497-4514.
- Siintola, E., Topcu, M., Aula, N., Lohi, H., Minassian, B. A., Paterson, A. D., Liu, X.-Q., Wilson, C., Lahtinen, U., Anttonen, A.-K., Lehesjoki, A.-E. 2007: The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. – *American journal of human genetics* 81: 136-146.
- Sikora, J., Dvorakova, L., Vlaskova, H., Stolnaja, L., Betlach, J., Spacek, J., Elleder, M. 2007: A case of excessive autophagocytosis with multiorgan involvement and low clinical penetrance. – *Cesk Patol*, 43: 93-103.
- Simuni, T. ja Sethi, K. 2008: Nonmotor manifestations of Parkinson’s disease. – *Annals of neurology* 64(Suppl 2), S65-S80.
- Skerrett, R., Malm, T. ja Landreth, G. 2014: Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. – *Neurobiology of Disease* pii: S0969-9961(14)00137-5. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.05.019.
- Sleat, D. E., Donnelly, R. J., Lackland, H., Liu, C. G., Sohar, I., Pullarkat, R. K., Lobel, P. 1997: Association of mutation in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Science* 277: 1802-1805.
- Sleat, D.E. Zheng, H., Qian, M., Lobel, P. 2006: Identification of sites of mannose 6- phosphorylation on lysosomal proteins. – *Molecular & cellular proteomics: MCP* 5: 686-701.
- Smith, S. A., Monteith, G. R., Robinson, J. A., Venkata, N. G., May, F. J., Roberts-Thomson, S. J. 2004: Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor beta activator GW0742 in rat cultured cerebellar granule neurons. – *Journal of neuroscience research* 77: 240-9.
- Smith, K.R., Damiano, J., Franceschetti, S., Carpenter, S., Canafoglia, L., Morbin, M., Rossi, G., Pareyson, D., Mole, S. E., Staropoli, J. F., Sims, K. B., Lewis, J., Lin, W. L., Dickson, D. W., Dahl, H. H., Bahlo, M., Berkovic, S.F. 2012: Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. – *American journal of human genetics* 90: 1102-1107.
- Smith, K. R., Dahl, H.-H. M., Canafoglia, L., Andermann, E., Damiano, J., Morbin, M., Brunni, A. C., Giaccone, G., Cossette, P., Saftig, P., Grotzinger, J., Schwake, M., ja 11 muuta. 2013: Cathepsin F mutations cause type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Human molecular genetics* 22: 1417-1423.
- Sznajdman, M. L. Haffner, C. D., Maloney, P. R., Fivush, A., Chao, E., Goreham, D., Sierra, M. L., LeGrumelec, C., Xu, H. E., Montana, V. G., Lambert, M. H., Willson, T. M., Oliver,

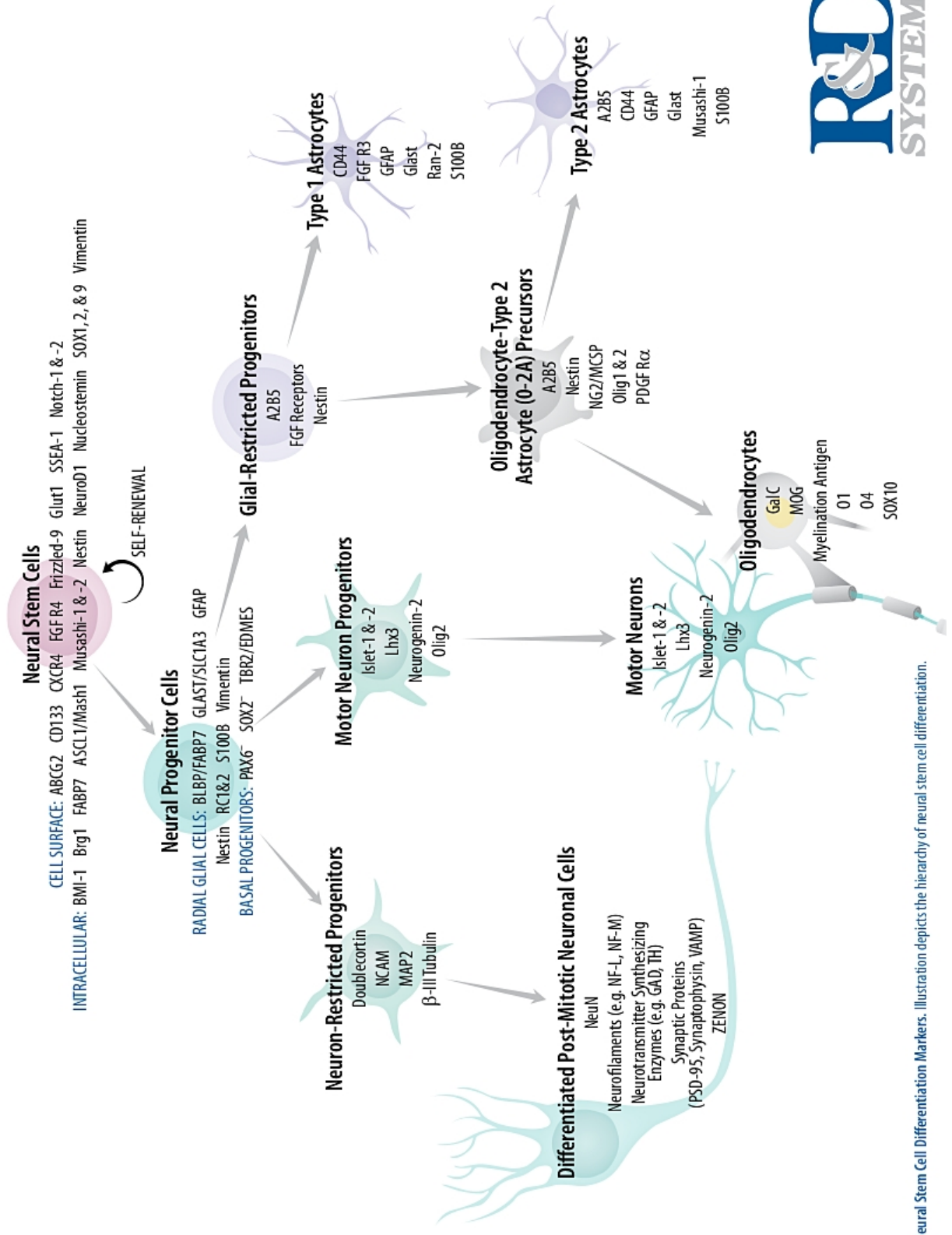
- W. R. Jr, Sternbach, D.D. 2003: Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) – synthesis and biological activity. – *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 13: 1517-21.
- Suopanki, J., Partanen, S., Ezaki, J., Baumann, M., Kominami, E., Tyynelä, J., 2000: developmental changes in the expression of neuronal ceroid lipofuscinoses-linked proteins. – *Molecular genetics and metabolism* 71: 190-194.
- Szuchet, S. 1995: The morphology and ultrastructure of oligodendrocytes and their functional implications. – Teoksessa: Kettmann, H., Ransom, B. R. (toim.), *Neuroglia*: 23-43. Oxford University Press. USA.
- Talbott, J. F., Loy, D. N., Liu, Y., Qiu, M. S., Bunge, M.B., Rao, M.S., Whittemore, S.R., 2005: Endogenous Nkx2.2+/Olig2 + oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes. – *Experimental neurology* 192: 11-24.
- Petkau, T. L., Leavitt, B. L. 2014: Progranulin in neurodegenerative disease. – *Trends in neurosciences* 37: 388-98.
- Teknologiakatsaus 148/2003: Kantasolutoimiala Suomessa – Toimijoiden näkemyksiä vuonna 2003. Osa 4: Tieteellinen katsaus. Laine, J., Lassila, O., Lehenkari, P., Oikarinen, E-L., Otonkoski, T., Salminen, M., Sariola, H., Tuuri, T., Väänänen, K. (toim.). – 29 s. Tekes.
- Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S., Portin, P. 2006: *Biologian sanakirja*. – 888. Otava. Keuruu.
- Tyynelä, J., Palmer, D. N., Baumann, M., Haltia, M. 1993: Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. – *FEBS Letters* 330: 8-12.
- Tyynelä, J., Suopanki, J., Santavuori, P., Baumann, M., Haltia, M., 1997. Variant late infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis: pathology and biochemistry. – *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56: 369-375.
- Tyynelä, J., Cooper, J. D., Khan, M. N., Shemilts, S. J., Haltia, M. 2004: Hippocampal pathology in the human neuronal ceroid-lipofuscinoses: distinct patterns of storage deposition, neurodegeneration and glial activation. – *Brain pathology* 14: 349-57.
- Umemiya, H., Kagechika, H., Fukasawa, H., Kawachi, E., Ebisawa, M., Hashimoto Y, Eisenmann, G., Erb, C., Pornon, A., Chambon, P., Gronemeyer, H., Shudo, K. 1997: Action mechanism of retinoid-synergistic dibenzodiazepines. – *Biochemical and biophysical research communications* 233: 121-5.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. H. 1999: Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. – *Nature Neuroscience* 2: 266-270.
- Varilo, T., Savukoski, M., Norio, R., Santavuori, P., Peltonen, L., Jarvela, I. 1996: The age of human mutation: genealogical and linkage disequilibrium analysis of the CLN5 mutation in the Finnish population. – *American journal of human genetics* 58: 506-512.
- Vesa, J., Hellsten, E., Verkruyse, L. A., Camp, L. A., Rapola, J., Santavuori P., Hofman, S.L., Peltonen, L. 1995: Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinoses. – *Nature* 376: 584-587.
- Vesa, J., Chin, M. H., Oelgeschläger, K., Isosomppi, J., DellAngelica, E. C., Jalanko, A., Peltonen, L. 2002: Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. – *Molecular Biology of the Cell* 13: 2410-2420.
- von Bohlen Und Halbach, O. 2007: Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. – *Cell and tissue research* 329: 409-420.

- von Schantz, C., Saharinen, J., Kopra, O., Cooper, J.D., Gentile, M., Hovatta, I., Peltonen, L., Jalanko, A., 2008: Brain gene expression profiles of Cln1 and Cln5 deficient mice unravels common molecular pathways underlying neuronal degeneration in NCL diseases. – *BMC Genomics* 9: 146.
- von Schantz, C., Kielar, C., Hansen, S.N., Pontikis, C.C., Alexander, N.A., Kopra, O., Jalanko, A., Cooper, J.D. 2009: Progressive thalamocortical neuron loss in Cln5 deficient mice: distinct effects in Finnish variant late infantile NCL. – *Neurobiology of disease* 34: 308-319.
- Walter, S., Goebel, H. H. 1988: Ultrastructural pathology of dermal axons and Schwann cells in lysosomal diseases. – *Acta neuropathologica* 76: 489-95.
- Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F., Hen, R. 2008: Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. – *Journal of neuroscience* 28: 1374-1384.
- Warner-Schmidt, J. L., Duman, R. S. 2006: Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. – *Hippocampus* 16: 239-249.
- Warrier, V., Vieira, M., Mole, S. E. 2013: Genetic basis and phenotypic correlations of the neuronal ceroid lipofusinoses. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1832: 1827-30.
- Wei, H., Kim, S. J., Zhang, Z., Tsai, P. C., Wisniewski, K. E., Mukherjee, A. B. 2008: ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. – *Human molecular genetics* 17: 469-77.
- Wharton, S. B., Williams, G. H., Stoeber, K., Gelsthorpe, C. H., Baxter, L., Johnson, A. L., Ince, P.G. 2005: Expression of Ki67, PCNA and the chromosome replication licensing protein Mcm2 in glial cells of the ageing human hippocampus increases with the burden of Alzheimer-type pathology. – *Neuroscience letters* 383: 33-38.
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C. M., Aigner, R., Winkler, J., Kuhn, H. G. 2002: Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat OB. – *The European journal of neuroscience* 16: 1681-1689.
- Winner, B., Lie, D. C., Rockenstein, E., Aigner, R., Aigner, L., Masliah, E., Kuhn, H. G., Winkler, J. 2004: Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. – *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63: 1155-1166.
- Winner, B., Kohl, Z., Gage, F.H. 2011: Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. – *The European Journal of Neuroscience* 33: 1139-1151.
- Wong, A.M.S, Rahim, A. A., Waddington, S. N., Cooper, J.D. 2010: Current therapies for the soluble lysosomal forms of neuronal ceroid lipofuscinosis. – *Biochemical Society Transactions*: 38: 1484-1488.
- Wyss-Coray, T., Mucke, L. 2002: Inflammation in neurodegenerative disease-a double-edged sword. – *Neuron* 35: 419-32.
- Xin, W., Mullen, T. E., Kiely, R., Min, J., Feng, X., Cao, Y., O'Malley, L., Shen, Y., Chu-Shore, C., Mole, S. E., Goebel, H. H., Sims, K. 2010: CLN5 mutations are frequent in juvenile and late-onset non-Finnish patients with NCL. – *Neurology* 74: 565-571.
- Xu, H., Yang, Y., Tang, X., Zhao, M., Liang, F., Xu, P., Hou, B., Xing, Y., Bao, X., Fan, X. 2013: Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. – *Molecular Neurobiology* 47: 833-44.
- Yasuoka, S., Kawanokuchi, J., Parajuli, B., Jin, S., Doi, Y., Noda, M., Sonobe, Y., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A. 2011: Production and functions of IL-33 in the central ner-

- vous system. – *Brain Research* 1385: 8-17.
- Yoneyama, M., Shiba, T., Hasebe, S., Ogita, K. 2011: Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. – *Journal of pharmacological sciences* 115: 425-32.
- Yuan, J., Lipinski, M., Degtarev, A. 2003: Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. – *Neuron* 40: 401-13.
- Yue, Z., Horton, A., Bravin, M., DeJager, P. L., Selimi, F., Heintz, N. 2002: A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. – *Neuron* 35: 921-33.
- Zhang, R., Zhang, Z., Wang, L., Wang, Y., Gousev, A., Zhang, L., Ho, K. L., Morshead, C., Chopp, M. 2004: Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. – *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24: 441-448.
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G. L., Gage, F. H. 2006: Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. – *Journal of Neurosciences* 26: 3-11.
- Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H. 2008: Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. – *Cell* 132: 645-660.
- Ziabreva, I. Perry, E., Perry, R., Minger, S.L., Ekonomou, A., Przyborski, S., Ballard, C. 2006: Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. – *Journal of Psychosomatic Research* 61: 311-316.
- Åkesson, E., Piao, J. H., Samuelsson, E. B., Holmberg, L., Kjaeldgaard, A., Falci, S., Sundstrom, E., Seiger, A. 2007: Long-term culture and neuronal survival after intraspinal transplantation of human spinal cord-derived neurospheres. – *Physiology & behavior* 92: 60-66.

Liite 1: Hermokantasolujen erilaistuminen ja vasta-aineet (R&D Systems®).

Neural Stem Cell Differentiation Markers



Neural Stem Cell Differentiation Markers. Illustration depicts the hierarchy of neural stem cell differentiation.