

**MONIMUOTOISIA NEURONIN KALTAISIA SOLUJA SH-
SY5Y-SOLULINJASTA**

Jutta Siikanen
Pro gradu-tutkielma
Solubiologia
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Joulukuu 2006

1 Alkusanat

Tämän pro gradu-tutkielman empiirinen osuus on tehty Tampereen yliopiston Lääketieteen laitoksen solubiologian osastolla ja solututkimuskeskuksessa vuoden 2004 maaliskuun ja syyskuun välisenä aikana. Kirjoitustyö ja osittain myös tulosten analysointi on tehty tämän jälkeen Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella.

Haluan kiittää FM, solubiologi Riina Sarkasta käytännön työvaiheiden ohjauksesta ja opastuksesta, ohjaajiani FT, dosentti Tuula Jalosta ja FT, dosentti Varpu Marjomäkeä hyvistä neuvoista ja pitkämielisyydestä. LT, FT, professori Timo Ylikomia kiitän mahdollisuudesta työskennellä solubiologian osastolla ja solututkimuskeskuksessa. Lisäksi haluan kiittää LT, professori Markku Pelto-Huikkaa fluoresenssimikroskoopin käyttömahdollisuudesta ja FT, lehtori Heimo Syväälää imageJ -ohjelman löytymisen avustamisesta. Suuren kiitoksen ansaitsevat laboratoriomestarit: Mirja Hyppönen, joka valmisti retinolihamon sekä auttoi loputtomissa käytännön ongelmissani, Ulla Jukarainen, tyydyttäessään ainaisen mömmön tarpeeni ja Hilikka Mäkinen joka teki SDS-PAGE:n ja Western Blotting`n raskauteni aikana. Haluaisin lisäksi vielä kiittää koko solututkimuskeskuksen, solubiologian, kehitysbiologian ja anatomian osaston henkilökuntaa avusta ja kaikista neuvoista, jotka todella tulivat tarpeeseen.

Tämän lisäksi kiitän fil.yo Mette Toikkasta ja yht.yo Marko Haapamäkeä avusta kemian ja tilastotieteen kiemuroissa. Haluan myös kiittää FM Sanna Harjulaa avusta englannin kielisen tiivistelmän teossa. Merkonomi Sirpa Oikuri puolestaan on jaksanut itsekin lopputyötä tehneenä kuunnella ja ymmärtää huokailujani työn vaikeina hetkinä. Jo edesmennyttä isääni, psykologi Jouko Haapamäkeä, kiitän niistä sanoista, jotka hän tämän työn kirjoittamisen avuksi osasi sanoa jo yli seitsemän vuotta sitten. Lopuksi haluan erityisesti kiittää miestäni Mika Siikasta jaksamisesta ja tukemisesta ja appivanhempiani Kauko ja Elina Siikasta kirjoitustyön mahdollistamisesta.

Veetille ja Lennille erityiskiitos olemassaolosta ja hermoston kehityksen ihmeen esille tuomisesta.

2 Tiivistelmä

Jyväskylän yliopisto
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Pro gradu –tutkielman tiivistelmä

Tekijä:	Jutta Siikanen
Tutkielman nimi:	Monimuotoisia hermosolun kaltaisia soluja SH-SY5Y-solulinjasta.
English title:	Multiform neuron-like cells from SH-SY5Y cell line.
Päivämäärä:	21.12.2006 Sivumäärä: 58
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solubiologia
Tutkielman ohjaajat:	Tuula Jalonen, Varpu Marjomäki

Tiivistelmä:

Neurobiologinen tutkimus tarvitsee solulinjoja perustutkimukseen, kantasolujen käytön kehitykseen ja lääketieteen ongelmien ratkaisemiseen. Tässä tutkimuksessa kuvataan eri yhdisteiden vaikutuksia SH-SY5Y-solulinjan erilaistumiseen. Vaikka solulinjaa on käytetty runsaasti hermoston mallina, ei yhdisteiden vertailua ole juurikaan tehty. Yhtenä vaikuttavana yhdisteenä käytettiin kolesterolia. Kolesterolin vaikutuksista hermosoluihin ei juurikaan ole tietoa, vaikka kolesterolin vaikutukset ovat suuren kiinnostuksen kohteena. Tutkimus tarjoaa uuden näkökulman SH-SY5Y-solulinjaan ja jatkotutkimushaasteita neuroblastoomakasvaimen hoitoon ja ihmisen hermoston kehityksen tutkimiseen.

Tutkimuksen tarkoituksena oli kuvata eri yhdisteillä erilaistettujen SH-SY5Y-solujen morfologiaa ja käyttäytymistä kahden viikon viljelyn aikana. Tutkimus oli osa laajemmasta hermosolujen erilaistamiseen ja hermoverkkojen käyttäytymiseen liittyvästä tutkimuksesta. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on kehittää solumalleja käytettäväksi mm. toksisuus- ja lääkeainekokeissa.

Ihmisen neuroblastooma SH-SY5Y-soluja kasvatettiin kymmenen vuorokautta. Kasvatuksen aikana soluja käsiteltiin all-*trans*-retinolihapolla, dibutyryyli sykklisellä adenosiinimonofosfaatilla, kolesterolilla, 12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asetaatilla ja all-*trans*-retinolihapon ja kolesterolin yhdistelmällä. Tämän jälkeen soluja tutkittiin faasikontrasti- ja immunofluoresenssimikroskopiolla, sekä morfometria-analyysillä. Morfometria-analyysissä mitattiin neuriiittien lukumäärät solukeskusta kohden. Tilastollinen merkitsevyys arvioitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja sitä seuranneella Dunnetin monivertailulla. Lisäksi solut käsiteltiin viimeisessä toistossa fraktalkiiniliuoksella, jonka jälkeen ne valokuvattiin ja niistä tehtiin proteiinieritys, SDS-PAGE ja Western Blotting.

Tutkimus osoitti, että arvioitaessa hermosolun erilaistumisastetta eri menetelmillä, all-*trans*-retinolihapolla ja sen sekä kolesterolin yhdistelmällä käsitellyt solut näyttivät erilaistuneen eniten kypsän neuronin kaltaiseksi. Solujen morfologia muistutti eniten hermoluua ja synapsirakkuloita osoittavaa synaptofysiiniä havaittiin immunofluoresenssimikroskopiolla soluissa. Lisäksi neuriiittien lukumäärä solukeskusta kohden kasvoi näillä soluilla eniten ja myös tilastollinen ero kontrollisoluihin oli merkitsevä. Käsitelyn todettiin siis vaikuttavan neuriiittien lukumäärään ja kolesterolilla lisäsi tätä vaikutusta. Saatiin myös viitteitä siitä, että fraktalkiini saattaa lisätä näiden solujen elinkelpoisuutta, mutta asia vaatii vielä lisätutkimuksia.

Tulevaisuudessa olisi hyödyllistä vertailla solujen sähköistä toimintaa ja apoptoottisten solujen määrää loppukasvatuksen aikana eri tavoin erilaistetuilla soluilla. Näin saataisiin lisätietoa synapsien aktiivisuudesta ja eri yhdisteiden vaikutuksista apoptoosiherkkyyteen. Koska synteettisiä A-vitamiinijohdannaisia käytetään myös neuroblastoomakasvaimen hoitoon, olisi mielenkiintoista tietää, voisiko kolesterolilla lisätä näiden lääkkeiden tehoa, kuten se lisäsi all-*trans*-retinolihapon aiheuttamaa neuriiittien kasvua. Myös fraktalkiinin vaikutusten tutkimista kasvaimeen kannattaisi harkita tämän ja aikaisempien tutkimusten valossa.

Avainsanat: SH-SY5Y, Neuroblastooma, Erilaistuminen, Neuriiittien kasvu, Retinolihapo, Kolesterolilla

3 Abstract

University of Jyväskylä
Faculty of Mathematics and Science

Abstract of Master's Thesis

Author:	Jutta Siikanen
Title of thesis:	Multiform neuron-like cells from SH-SY5Y cell line.
Finnish title:	Monimuotoisia hermosolun kaltaisia soluja SH-SY5Y-solulinjasta.
Date:	21.12.2006 Pages: 58
Department:	Department of Biological and Environmental Science
Chair:	Cell Biology
Supervisors:	Tuula Jalonen, Varpu Marjomäki

Abstract:

Neurobiological research needs cell lines for basic study, development of stem cells and solving medical problems. The purpose of this study is to describe the impacts of different compounds on the differentiation of SH-SY5Y cell line. Even though the cell line has been widely used as the model for the nerve system, much research on comparison of different compounds has not been carried out. One of the affecting compounds in this study was cholesterol. Even though the impacts of cholesterol on nerve cells are under great interest, there is not a lot of information available on cholesterol. This study gives new insight on SH-SY5Y cell line. Furthermore, it offers challenges for further study on treating the neuroblastoma tumor and on the development of the human nerve system.

The purpose of the study is to describe the morphology of SH-SY5Y cells, which are differentiated with various compounds, and behaviour during two weeks' culture. The study was part of a larger study on differentiation of nerve cells and behaviour of nerve systems. The purpose of the larger study is to create cell models to be used, among other things, in toxic and medical substance trials.

Human's neuroblastoma SH-SY5Y cells were cultured for 10 days. They were treated with all- *trans* retinoic acid, dibutyryl cyclic adenosine monophosphate, cholesterol, 12-0- tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, and with the combination of all- *trans* retinoic acid and cholesterol. After treating, the cells were studied both with phase-contrast and immunofluorescence microscope and morphometric analysis. This measured the number of neuritis per cell soma. The statistical significance was measured with one- way variance analysis and with Dunnett's multiple comparison. In addition, the cells were treated in the last repeat with fractalkine solution. After this, they were photographed and a protein isolation, SDS-PAGE, and Western Blotting were made.

The study showed that the treated cells seemed to differentiate more like a mature neuron when differentiate stage of nerve cell was measured with retinoic acid, the combination of all- *trans* retinoic acid and cholesterol. The morphology of cells was more like a neuron and synaptophysin, which shows synaptic vesicles, was found with immunofluorescence microscope in the cells. Moreover, the number of neuritis/ cell soma grew the most with these cells. The statistical difference with the control cells was significant, i.e. the number of neurites was affected by the treating. The effect was emphasized by cholesterol. The study also showed evidence that fractalkine might add to the survival of these cells. However, this needs further study.

In further study, it would be useful to study the electrical activity of cells and the number of apoptotic cells of the cells, which are differentiated during the final culturing. This would offer further information on the activity of synapsis and the effect of different combinations on apoptotic sensitivity. Because synthetic vitamin A- derivatives are also used in treating neuroblastoma tumor, it would be interesting to know if cholesterol could add the power of these medicines. This is because, it added neuritogenesis caused by all- *trans* retinoic acid. Moreover, it could be advantageous to study, based on this and earlier studies, the impacts of fractalkine on tumor growth.

Keywords: SH-SY5Y, Neuroblastoma, Differentiation, Neurite outgrowth, Retinoic acid, Cholesterol

4 Sisällysluettelo

1	ALKUSANAT	2
2	TIIVISTELMÄ	3
3	ABSTRACT	4
4	SISÄLLYSLUETTELO	5
5	LYHENTEET	7
6	JOHDANTO	7
6.1	HERMOSTO JA HERMOSOLU	8
6.1.1	Hermoston ja hermosolun rakenne	8
6.1.2	Hermosolun toiminta	10
6.1.3	Hermoston kehitys	12
6.1.4	Ihmisen neuroblastooma SH-SY5Y-solulinja: hermosolujen mallilinja	12
6.2	SOLUJEN JAKAANTUMINEN, ERILAISTUMINEN JA APOPTOOSI	14
6.2.1	Solusykli	15
6.2.2	Erilaistuminen	16
6.2.3	Apoptoosi	19
7	TUTKIMUKSEN TARKOITUS	23
8	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	23
8.1	SOLUJEN VILJELY JA KÄSITTELYT	23
8.1.1	Soluviljely	23
8.1.2	Solujen erilaistaminen	25
8.1.3	Fraktalkiinikäsittely	25
8.2	MIKROSKOOPPISET MENETELMÄT	26
8.2.1	Faasikontrastimikroskopia ja valokuvaus	26
8.2.2	Immunofluoresenssimikroskopia	26

8.3	MORFOMETRIA-ANALYYSI	28
8.3.1	Neuriittien mittaus	28
8.3.2	Tilastolliset menetelmät	29
8.4	SDS-PAGE JA WESTERN BLOTTING	30
9	TULOKSET	31
9.1	MORFOLOGISET MUUTOKSET	31
9.2	NEURIITTIEN KASVU	35
9.2.1	Neuriittien määrät/ solukeskus	35
9.2.2	Tilastolliset tulokset	39
9.3	SYNAPSIRAKKULOIDEN ESIINTYMINEN	41
9.4	FRAKTALKIININ VAIKUTUS	43
9.4.1	Morfologiset muutokset	43
9.4.2	SDS -PAGE ja Western Blotting	45
10	TULOSTEN TARKASTELU	47
11	LÄHDELUETTELO	51
12	LIITTEET	54
12.1	LIITE 1: KASVATUSLIUOS SH-SY5Y SOLUILLE	54
12.2	LIITE 2: PETAUSAINEN FLUORESENSSIMIKROSKOPIAA VARTEN	55
12.3	LIITE 3: SDS-PAGE-LIUOKSET	56
12.4	LIITE 4: WESTERN BLOTTING-LIUOKSET	58

5 Lyhenteet

Abs	etanoli
BSA	naudan seerumin albumiini
CHOL	kolesteroli
dBcAMP	dibutyryyli syklinen adenosiinimonofosfaatti
FITC	fluoreskeiini-isotiosyanaatti
FTK	fraktalkiini
IgG	immunoglobuliini G
PBS	fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos
RA	all- <i>trans</i> -retinolihapo
RA+CHOL	all- <i>trans</i> -retinolihapo ja kolesteroli
Syp	synaptofysiini
TPA	12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asettaatti

6 Johdanto

Voidaanko tuhoutuneet hermosolut korvata tulevaisuudessa solusiirteillä? Löydetäänkö parannuskeinoja vaikeisiin ja kuolemaan johtaviin sairauksiin kuten Alzheimerin ja Parkinsonin tauti tai Multippeliskleroosi? Voiko kävelykykynsä halvauksessa menettänyt saada uudet toimivat hermot tuhoutuneiden tilalle? Selviävätkö paljon inhimillistä tuskaa aiheuttavien erilaisten hermoston kehityshäiriöiden syyt ja voidaanko niitä ehkäistä?

Nykypäivinä puhutaan paljon kantasoluista ja niiden mahdollisuuksista, kun kehitetään uusia hoitokeinoja parantumattomiin sairauksiin. Kantasoluja on kuitenkin vain rajallinen määrä ja ne ovat niin kallisarvoisia, että niiden laajamittainen käyttö tutkimukseen on mahdotonta. Tarvitaan muita solulinjoja, joiden avulla voidaan tehdä perustutkimusta, jonka pohjalta on mahdollista kehittää kantasolujen käyttöä. Tarvitaan

myös mallisolulinjoja, joiden avulla voidaan tutkia esimerkiksi lääkkeiden ja myrkyllisten aineiden vaikutuksia, sekä kehitysbiologisia tapahtumia.

Tässä tutkimuksessa kuvaillaan eri yhdisteiden vaikutuksia SH-SY5Y-solulinjan varhaishermosolujen erilaistumiseen. Se on tärkeää, sillä vaikka solulinjaa on käytetty runsaasti hermoston mallisolulinjana, ei eri yhdisteiden vertailua ole juurikaan tehty. Lisäksi tutkimuksessa on käsitelty soluja myös kolesterolilla, jonka vaikutuksista SH-SY5Y-soluihin ei ole saatavilla tietoa, vaikka kolesterolin vaikutukset hermosoluihin ovat tutkimuspiireissä juuri nyt suuren kiinnostuksen kohteena. Tutkimus tarjoaa uuden näkökulman SH-SY5Y-solulinjaan ja toisaalta myös mahdollisia jatkotutkimushaasteita neuroblastoomakasvaimen hoitoon ja ihmisen hermoston kehityksen tutkimiseen.

6.1 Hermosto ja hermosolu

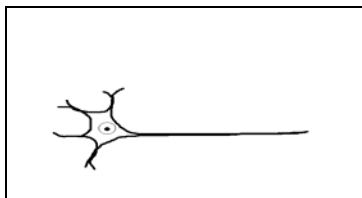
6.1.1 Hermoston ja hermosolun rakenne

Neuronit eli hermosolut ovat hermokudoksen erilaistuneita soluja, joiden erityistehtävänä elimistössä on viestinvälitys. Viesti kulkee hermosoluissa sähköisessä muodossa solukalvon jännitetilän muutoksina eli aktiopotentiaaleina. Hermokudoksessa on neuroneiden lisäksi myös muita soluja, kuten astrosyyttejä ja oligodendrosyyttejä jotka eivät johda aktiopotentiaaleja vaan osallistuvat esimerkiksi hermokudoksen aineenvaihduntaan ja tarjoavat kudokselle tukirakenteita.

Hermosolussa voidaan erottaa rakenteellisesti erilaisia osia. Neuronin sooma, eli solukeskus on pyöreähkö solun keskus, jossa sijaitsevat mm. tuma, solulimakalvostoa ja Golgin laite. Solun proteiinituotanto tapahtuu pääasiassa soomassa. Soomasta eroaa ulokkeita eli neuriitteja, joita pitkin viestit kulkevat eri hermosolujen välillä. Neuriiteissa on runsaasti solutukirankaa jota pitkin rakkulaliikenne, esimerkiksi synapsirakkulat, etenevät. Pisin haarake, aksoni, kuljettaa viestejä hermosolusta pois toisiin soluihin ja sillä voi olla yhteyksiä useisiin muihin soluihin. Lyhyemmät haarakkeet, eli dendriitit

kuljettavat viestejä toisista soluista hermosolulle. Dendriittien lukumäärä on useimmiten suurempi kuin aksonien. Neuriitti on yhteisnimitys aksoneille ja dendriiteille siinä vaiheessa kun mikroskooppisesti ei vielä voida tehdä eroa näiden välillä. Neuronissa voidaan vielä erottaa synapsi, joka muodostuu aksonin pätehaarasta, synapsiraosta ja toisen hermo-, lihas- tai rauhassolun solukalvosta. Synapsien kautta sähköiset viestit siirtyvät solusta toiseen kemiallisesti.

Hermosolun kaavamainen rakenne esitetään monesti kuvan 1. kaltaisesti ja tällainen mielikuva meillä useimmilla varmasti on hermosolusta.



kuva 1. Kaavamainen esitys hermosolusta (mukailtu perustuen Hirano ja Llena, 2006, kuva 1.).



kuva 2. Ihmisen SH-SY5Y -neuroblastoomasolu 200-krt suurennos (Siikanen 2004).

Täytyy kuitenkin muistaa, että erotuksena tähän mielikuvaan, esimerkiksi Hiranon ja Llenan mukaan dendriitit ja aksoni valtaavat paljon suuremman tilan kuin solun sooma ja onkin laskettu, että aksonin ja dendriittien sytoplasman tilavuus on huomattavasti suurempi kuin sooman (ks. yleiskatsaus Hirano ja Llena 2006).

Hermosto voidaan jakaa rakenteellisesti keskushermostoon (aivot ja selkäydin) ja ääreishermostoon (johon kuuluvat kaikki kallon ja selkäydinkanavan ulkopuolella sijaitsevat hermot), sekä toiminnallisesti tahdon alaiseen (mm. liikehermot) ja tahdosta riippumattomaan hermostoon (esim. sydämen toiminnan hermotus). Tahdosta riippumaton hermosto jakaantuu vielä sympaattiseen ja parasympaattiseen osaan. Tahdosta riippumaton hermosto säätelee kaikkien sileiden lihasten, rauhasen ja sydänlihaksen toimintaa. Se vaikuttaa mm. sydämen sykintään, hien eritykseen, ruoansulatuselinten toimintaan ja vaikkapa adrenaliinin erittymiseen pelkotilanteessa. Hermostossa on sekä vieviä hermosäikeitä, jotka kuljettavat toimintakäskyjä kohde-eliimiin, että tuovia säikeitä, jotka

kuljettavat aistitietoa hermostolle esimerkiksi veren kemiallisesta koostumuksesta. Sympaattinen osa autonomista hermostoa toimii esimerkiksi ”taistele tai pakene” tilanteessa, kuten opiskelijan tullessa jännittävään tenttiin. Se saa verenpaineen ja sydämen sykkeen nousemaan, verisuonet supistumaan, keuhkoputket laajenemaan, hengityksen kiihtymään ja ruoansulatuselimistön rauhoittumaan. Parasympaattinen osa taas toimii päinvastoin, eli pääasiassa levossa ja rentoutuneena, jolloin sydämen syke ja verenpaine laskevat ja ruoansulatus alkaa toimia.

6.1.2 Hermosolun toiminta

Hermostolujen solukalvolla vallitsee lepotilassa kalvojännite joka on suuruusluokaltaan noin $-70 - -90$ mV. Kalvojännite muodostuu solukalvon eripuolilla olevien sähköisesti varautuneiden ionien, kuten Na^+ ja K^+ , vaikutuksesta. Soluliman puolella on pienempi positiivinen varaus kuin kudosteissa ja siksi solun sisäosan sanotaan olevan negatiivisesti varautunut suhteessa ulkopintaan. Erilaiset ärsykkeet, esimerkiksi elektromagneettinen säteily silmän verkkokalvolla tai kipuärsyke ihon vapaassa hermopäätteessä, voivat muuttaa kalvojännitettä positiiviseen suuntaan ja näin aiheuttaa sähköisen ärsyksen joka leviää solukalvolla ja tunnetaan aktiopotentiaalin nimellä.

Aktiopotentiaalin syntyessä solukalvon läpäisevyys Na^+ -ioneille lisääntyy ärsyksen vaikutuksesta ja ioneita virtaa soluun solukalvolla sijaitsevien ionikanavien läpi aiheuttaen solukalvon jännitteen muuttumisen positiiviseen suuntaan. Tätä kutsutaan depolarisaatioksi. Ionikanavien aukeneminen johtaa myös viereisten ionikanavien aukenemiseen ja näin depolarisaatioaalto johtuu pitkin aksonin solukalvoa kohti päätehaaraa. Lisääntynyt Na^+ -virtaus soluun johtaa solukalvolla myös K^+ -kanavien aukenemiseen, jolloin lisääntynyt K^+ -ionien ulosvirtaus solusta johtaa kalvojännitteen alentumiseen ja puhutaan repolarisaatiosta. Lopulta kalvojännite muuttuu hieman lähtötasoa negatiivisemmaksi, jolloin puhutaan hyperpolarisaatiosta. Tämän jälkeen kalvojännite palautuu lepotilaan.

Aktiopotentialin saapuessa pätehaaraan, se aiheuttaa kalsiumin välityksellä välittäjäaineen vapautumisen synapsirakkuloista synapsirakoon, joka on ohut tila kahden solukalvon välissä. Synapsiraossa välittäjäaine sitoutuu seuraavan solukalvon reseptoreihin vaikuttaen solukalvon ominaisuuksiin. Jos rakkuloista vapautuva välittäjäaine on kiihottavaa, niin solukalvon läpäisevyys Na^+ -ioneille lisääntyy ja pyritään synnyttämään aktiopotentiali, jos se taas on estävää, niin Na^+ -kanavia sulkeutuu ja aktiopotentialin on vaikeampi muodostua. Jatkossa solukalvon entsyymit hajottavat välittäjäaineen, jolloin tilanne purkautuu ja hajotettu välittäjäaine palaa osittain takaisin endosytoosin avulla synapsirakkuloihin ja osittain diffusoituu verenkiertoon. Myös synapsirakkuloiden rakenneproteiineja kierrätetään tällä tavoin. Yhdellä neuronilla on käytössään vain yhtä välittäjäainetta, joko kiihottavaa tai estävää, joten yksi synapsi on tällöin aina joko kiihottava tai estävä. Esimerkiksi autonomisen sympaattisen hermoston solut käyttävät välittäjäaineina niin sanottuja katekoliamiineja, eli dopamiinia, adrenaliinia ja noradrenaliinia. Vastaavasti solujen sanotaan olevan dopaminergisia, adrenergisia ja noradrenergisia. Koska hermosolulla on sadoista tuhansiin kappaletta synapseja, niiden yhteisvaikutus määrää vaikutuksen koko solun tasolla.

Synaptofysiini (Syp) on synapsirakkuloissa esiintyvä 38 kDa:in proteiini, joka muodostaa noin seitsemän prosenttia rakkulan proteiineista. Siinä on neljä solukalvon läpäisevää osaa: solulimassa sijaitsevat NH_2 - ja COOH -osat ja näiden välillä kaksi hydrofiilistä rakkulan sisällä olevaa silmukkaa. Synaptofysiiniä on yleisesti käytetty synapsirakkuloita osoittavana proteiinina ja sen avulla on mahdollista seurata synapsirakkuloiden liikettä hermosolussa. (ks. yleiskatsaus Valtorta ym., 2004). Thomas ym. ovat todenneet kokeellisesti, että Syp esiintyy ei-kovalenttisenä homomultimeerisena kompleksina sisältäen kahdesta kuuteen Syp molekyyliä. Lisäksi Syp hexameerimuodon on huomattu muodostavan kanavan kun se upotetaan lipidikaksoiskalvoon. (Thomas ym., 1988). Koska Syp myös muistuttaa jonkin verran rakenteeltaan konneksiinia, joka muodostaa konneksioni kanavat gap- eli aukkoliitoksissa, jotka ovat aukkoliitoksia kahden solukalvon välillä, on ajateltu että se voisi osallistua mahdollisen synapsirakkulan ja solukalvon fuusion ja eksosytoosin aloittavan fuusiokanavan muodostukseen (Ginsel ja Shoshan-Barmatz, 2002). Synaptofysiinistä käytetään myös nimityksiä Syp, P38 ja SVP38. Kun hermosolu on sähköisesti aktiivinen, eli siinä liikkuu aktiopotentialiaaleja, kulkee

aksoneissa myös paljon synapsirakkuloita, sillä välittäjäainetta täytyy kuljettaa synapsin lähelle, aksonin päätehaaraan. Tällöin myös synapsirakkuloissa esiintyvää proteiinia synaptofysiiniä näkyy paljon aksoneissa esimerkiksi immunofluoresenssileimauksen avulla.

6.1.3 Hermoston kehitys

Yksilönkehityksen alkuvaiheessa alkion solut muodostavat kolme kerrosta: ektodermin, mesodermin ja endodermin. Keskushermosto kehittyy ektodermistä, josta muodostuu ensin pitkänomainen neuraalilevy, jonka reunat eli neuraalipoimut kohoavat ja viimein yhtyvät alkion keskiviivassa. Näin muodostuu neuraaliputki jonka päät sulkeutuvat ja keskushermoston kehitys on alkanut.

Hermostopienan (engl. neural crest) solut muodostuvat ektodermissä hermostolevyn ja epidermin väliin. Hermostopienan solut kykenevät muodostamaan monia solutyyppejä, mm. hermosoluja, sekä pigmenttiä ja rustoa muodostavia soluja. Ne lähtevät liikkeelle joko juuri ennen hermostoputken sulkeutumista tai heti sen jälkeen ja vaeltavat alkion eri osiin. Soluväliaineen molekyylit vaikuttavat siihen mihin solut vaeltavat. mutta hermostopienan solujen erilaistumiseen vaikuttavia tekijöitä ei tarkkaan tunneta. Ympäröivien solujen lähettämät viestit säätelevät hermostopienan eri solujen jakautumista tai eloonjäämistä. (ks. mm. Helsingin yliopiston Biolääketieteen laitoksen kehitysbiologian lukupaketti, 2006 ja Nienstedt ym., 2004)

6.1.4 Ihmisen neuroblastooma SH-SY5Y-solulinja: hermosolujen mallilinja

Neuroblastooma on tavallisin pikkulasten ja imeväisikäisten kiinteä pahanlaatuinen kasvain, joka löytyy keskushermoston ulkopuolelta. Se saa alkunsa alkeellisesta hermokudoksesta ja esiintyy yleensä autonomisessa hermostossa esimerkiksi lisämunuaisen ytimessä ja sympaattisissa hermosolmukkeissa. Neuroblastoomat ovat hyvin

monimuotoisia ja karkeasti yleistäen voidaan sanoa, että mitä erilaistuneempia kasvaimen solut ovat, sitä parempi on taudin ennuste. Jos taas solut ovat hyvin monikykyisiä, on kasvain yleensä aggressiivisempi ja ennuste huonompi. Hoitokeinoina neuroblastoomaan käytetään pääasiassa kasvaimen kirurgista poistoa, sädehoitoa ja sytostaattihoitoja, mutta tietyissä tilanteissa myös esimerkiksi retinoideja, eli A-vitamiinijohdannaisia. (Pihkala ym., 2001; Edsjö ym. 2006).

SH-SY5Y-solulinja on neuroblastoomasta eristetty solulinja. Se on SK-N-SH-solulinjan, joka perustettiin vuonna 1970 neljävuotiaan tytön luuydinbiopsiasta löytyneestä neuroblastooman etäpesäkkeestä, alalinja. Solut kasvavat osittain alustaansa kiinnittyneinä ja osin kelluvina ja ne muodostavat rykelmiä (The American Culture Collection, eli ATCC).

Koska neuroblastooma saa alkunsa kehittyvästä ääreishermostosta eli hermostopienasta, jonka solut vielä ovat monikykyisiä, kasvaimen solut ovat yleensä vaihtelevia ilmiänsuultaan. Siksi myös SK-N-SH-linjan solut jakaantuvat kolmeen erilaiseen solutyyppiin. N-tyyppin (engl. neuroblast like) solut muistuttavat varhaishermosoluja, niissä on lyhyitä neuriitteja, ne kasvavat ryppäinä ja tarttuvat heikosti alustaan. Ne ovat ns. sympatoblasteja, eli pluripotentteja soluja, jotka voivat kehittyä sympaattisen hermoston neuroneiksi tai lisämunuaisen ytimen kromaffiinisoluiksi. S-tyyppin (engl. substrate adherent) solut ovat schwannin-solujen, gliasolujen ja melanoplastien esiasteita, ovat litistyneitä ja suuria, ja ne kasvavat tiukasti kiinnittyneinä alustaansa. I-tyyppin (intermediate type) solut ovat niin sanottuja prekursorisoluja, joista edellä mainitut solut kehittyvät sekä kasvaimessa, että kehittyvässä alkiossa. Ulkomuodoltaan ne ovat N- ja S-tyyppin välimuotoja, eli pieniä, litteitä ja kiinnittyvät suhteellisen tiukasti alustaansa. N- ja S-tyyppin solujen on lisäksi todettu muuntuvan viljelmässä toisikseen. (ks. yleiskatsaus Ross ym. 2003; Walton ym. 2004). Muun muassa Encinas ym. ovat todenneet, että myös SH-SY5Y-linjan soluilla on jäljellä kyky jakaantua näihin kolmeen solutyyppiin (mm. Encinas ym. 2000). 12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asetaatilla (TPA) erilaistettujen SH-SY5Y-solujen on myös todettu olevan sähköisesti aktiivisia ja niissä esiintyy useita hermosoluille tyypillisiä ionikanavia (Jalonen ja Åkerman 1986, Jalonen 1988, Jalonen ja Åkerman 1988).



Kuva 3. SH-SY5Y-soluja 10. päivän kasvatus ja RA-käsittely 200-krt. suurennos (Siikanen 2004).

SH-SY5Y-solulinjaa on käytetty runsaasti mallisolulinjana hermosoluille ja sympaattisten hermosolujen erilaistumiselle ja tätä tarkoitusta varten sitä on käsitelty mm. *all-trans* retinolihapolla (kuva 3.), josta tarkemmin kappaleessa 6.2.2. Yhtenä ongelmana linjan kohdalla on ollut solujen taipumus pitkän kasvatusajan jälkeen muuntua S-tyypin soluiksi, jonka esimerkiksi Encinas ym. ovat ratkaisseet käyttämällä erilaistamisen yhteydessä aivoista johdettua hermokasvutekijää (engl. Brain-derived neurotrophic factor) (Encinas ym. 2000). Linjan käytettävyyttä on myös koko ajan pyritty parantamaan, mutta erilaisten yhdisteiden vaikutuksia ei ole juurikaan vertailtu keskenään.

6.2 Solujen jakaantuminen, erilaistuminen ja apoptoosi

Solujen elinkaaren aikana ne jakaantuvat, erilaistuvat, liikkuvat eri paikkoihin elimistössä ja viimein kuolevat. Monisoluisilla eläimillä juuri tasapaino näiden toimintojen kesken on elintärkeä tekijä koko eliön elämänkaaren toteutumisessa ja päivittäisen tasapainon ylläpitämisessä ulkoisesti muuttuvissa tilanteissa. Tällaisia tilanteita ovat esimerkiksi ravinnon puute, tai elimistön ulkoisen suojan (iho tai nahka) rikkoontuminen.

6.2.1 Solusykli

Solusykliksi kutsutaan niitä tapahtumia, joiden tuloksena solu jakaantuu ja syntyy kaksi tytärsolua aitotumallisilla soluilla. Sykli voidaan jakaa mitooseen, eli solun jakaantumiseen ja interfaasiin, eli välivaiheeseen. Mitoosi voidaan edelleen jakaa mikroskooppisten tapahtumien perusteella profaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin, sekä tämän jälkeiseen sytokineesiin, jossa solulima jakaantuu tytärsolujen kesken. Interfaasi voidaan puolestaan jakaa G1-, S- ja G2-vaiheisiin. Syklin aikana on useita ns. tarkastuskohtia joiden aikana solussa tarkistetaan, että asiat ovat edenneet niin kuin pitää ja että ulkoiset olosuhteet ovat solun jakaantumiselle otolliset. Solusyklin säätelyyn osallistuu monimutkainen joukko erilaisia proteiineja mm. sykliini-CDK-pareja ja kinaasi-inhibiittoreita. (ks. mm. Heino ja Vuento 2004, Lammi 1999 ja Solunetti, 2006).

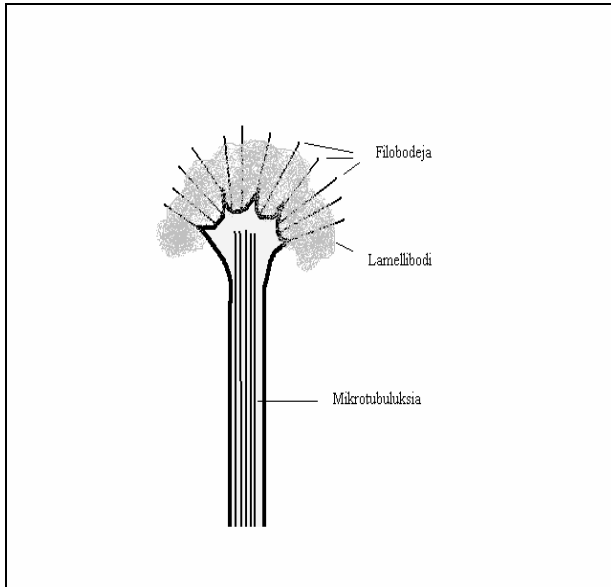
Sykli alkaa G1-vaiheella, joka voi kestää pitkäänkin. Tässä vaiheessa solu tekee päätöksen siitä, jakaantuuko se vai siirtyykö ns. G0-vaiheeseen jolloin se irtoaa solusyklistä ns. lepovaiheeseen. Solu varmistaa, että se on saavuttanut riittävän suuren massan, DNA:ssa ei ole vaurioita ja että solun ympäristö on suosiollinen jakaantumiselle esimerkiksi ravinteiden suhteen. Postmitoottiset solut ovat pysyvästi G0-vaiheessa. S-vaiheessa (engl. synthesis, joka viittaa DNA-synteesiin) solu kahdentaa DNA-materiaalinsa, eli solun kromosomiluku lisääntyy 2N:stä 4N:ään. G2-vaiheessa solu valmistautuu mitooseen. Mitoosi alkaa profaasilla jonka aikana keskusjyvän kahdentuu, sentrosomit liikkuvat solun eri päihin, tumakotelo hajoaa ja DNA kondensoituu kromatideiksi. Metafaasin aikana sisarkromatidit asettuvat solun keskitasoon ja tumasukkulan mikrotubulukset kiinnittyvät sentromeereihin. Anafaasin aikana sisarkromatidit erotellaan solun eri päihin mikrotubulusten vetämänä ja telofaasissa kromatidien superkiertisyys purkautuu ja tumakotelo rakentuu uudelleen. Välittömästi tämän jälkeen seuraa sytokineesi, jossa solulima ja -organellit jaetaan kahden tytärsolun kesken ja aktiini rengas kuristaa muodostuvat solut erilleen. (ks. mm. Heino ja Vuento 2004, Lammi 1999 ja solunetti 2006).

6.2.2 Erilaistuminen

Solujen erilaistuessa ne kehittyvät yksilön kantasoluista johonkin tiettyyn suuntaan keskittyäkseen tietyn tyyppiseen toimintaan. Monisoluisilla eläimillä solujen erilaistuminen ja kudosten sekä elimien muodostuminen auttaa niitä sopeutumaan ympäristön vaatimuksiin. Solujen erilaistuminen perustuu pohjimmiltaan geenien toiminnan säätelyyn. Nykykäsityksen mukaan solujen geenit jakaantuvat ns. house-keeping-geeneihin jotka toimivat jatkuvasti kaikissa soluissa ja liittyvät esimerkiksi solukalvon proteiinien valmistukseen, ja soluspesifisiin geeneihin, jotka ovat aktiivisia vain niissä soluissa jotka ovat erilaistuneet suorittamaan tiettyä tehtävää (esim. Lammi 1999).

Hermosolut erilaistuvat jo sikiökaudella synnyttämään aktiopotentiaaleja, jolloin ne menettävät ainakin pääosin kykynsä uusiutua. Ne lisääntyvät nopeasti kolmannelta – neljänneltä raskausviikolta alkaen niin, että sikiökauden lopussa hermokudokseen on muodostunut noin 10^{12} solua. Hermosolujen erilaistuessa ne kasvattavat dendriittejä ja aksonin, sekä luovat uusia synapseja ja karsivat turhia. (Nienstedt ym., 2004). Tämä dendriittien ja aksonin kasvaminen näkyy mikroskooppisesti neuriittien kasvamisena. Erilaiset ulkoiset vihjeet (esim. hormonit, kasvutekijät ja soluväliaineen tuottamat yhdisteet) ovat keskeisessä osassa tässä prosessissa.

Neuriittien kasvaminen tapahtuu aktiinitukirangan ja mikrotubulusverkoston avulla. Kasvualueella (kuva 4. seuraavalla sivulla), voidaan erottaa mikrotubuluksia sisältävä keskusalue ja ulommainen aktiinipohjaisia rakenteita sisältävä alue. Aktiinin muodostamia rakenteita ovat mm. laakea lamellibodi ja sormimaiset ulokkeet eli filobodit. (ks. yleiskatsaus Cladett-Dame ym. 2005).



Kuva 4. Neuriitin kasvualue eli growth cone neuriitin päässä (Siikanen 2006).

Kasvaessaan neuriitti ”etsii” kohdesolua johon se muodostaa yhteyden. Tässä tehtävässä tärkeällä sijalla ovat monet solukalvon reseptorit growth cone -alueella. (ks. yleiskatsaus Tanaka ja Sabry 2005).

A-vitamiinin aineenvaihduntatuote *all-trans* retinolihapo (RA), on merkittävässä roolissa hermoston solujen erilaistumisessa ja neuriittien kasvussa. RA:n on osoitettu lisäävän neuriittien kasvua useilla eri soluilla ja varsinkin ihmisen neuroblastoomasolulinjoilla. RA on rasvaliukoinen aine, joten se kulkeutuu solukalvon läpi kohdesoluun ja vaikuttaa tarttumalla tuman retinoidihapporeseptoriin. Reseptori-RA-kompleksi muodostaa heterodimeerin retinoidi-x-reseptorin kanssa, jonka jälkeen kompleksi tarttuu DNA:han ja vaikuttaa kohteena olevien geenien luentaan. (ks. yleiskatsaus Cladett-Dame ym., 2005). Synteettistä retinoidia, *13-cis* retinolihapo, käytetään myös neuroblastooman hoidossa erilaistamaan kasvaimen solukkoa vähemmän pahanlaatuiseen suuntaan. Synteettisellä retinoidilla on RA:ta parempi vaste hoidossa, joka luultavasti johtuu aineen paremmasta farmakokinetiikasta elimistössä. (Edsjö ym. 2006).

Dibutyryyli syklinen adenosiinimonofosfaatti (dBcAMP) on toinen yleisesti käytössä ollut hermosolujen erilaistamiseen käytetty yhdiste. Solun morfologiaan yhdisteen on todettu vaikuttaneen niin, että solun koko on kasvanut ja haarautuminen

neuriiteissa lisääntynyt. Katekoliamiinit, mm. dopamiini, syntyvät tyrosiinista. Tyrosiinihydroksylaasientsyymin pitoisuus on synteessin nopeutta rajoittava tekijä katekoliamiinien biosynteesissä. Tyrosiinihydroksylaasin fosforylaatio lisää sen aktiivisuutta ja PKA, eli syklistä AMP:stä riippuvainen proteiinkinaasi A lisää entsyymin fosforylaatiota. dBcAMP:n on todettu lisäävän tyrosiinihydroksylaasiaktiivisuutta katekoliamiineja tuottavissa hermosoluissa. Näiden tulosten pohjalta on ehdotettu, että dBcAMP erilaistaisi hermosoluja dopaminergisiksi neuroneiksi. (Roskoski ja Roskoski, 1987; Mena ym., 1995; Sanchez ym., 2001).

12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asetatti (TPA) on yleisesti erilaistamiseen käytetty yhdiste. On todettu että sen avulla erilaistuneisiin SH-SY5Y-soluihin kasvaa haaroittuneita neuriiiteja ja solut tuottavat monia sympaattisen hermoston merkkiaineita, kuten tyrosiinihydroksylaasia. On luultavaa, että TPA:n erilaistumisvaikutukset välittyvät PKC:n, eli proteiinkinaasi C:n, eri muotojen välityksellä. Forboliestereiden vaikutukset välittyvät pääosin PKC:n kautta ja altistettaessa neuroblastomasoluja suurille annoksille yhdistettä ne käyttävät vaimennussäätelyä (engl. downregulation), joka johtaa vähemmän erilaistuneisiin soluihin. (Parrow ym. 1992 ja yleiskatsaus Edsjö ym. 2006).

Kolesteroli (CHOL) on steroleihin kuuluva kiteinen, rasvaliukoinen yhdiste. Sitä valmistetaan pääasiassa maksassa ja saadaan myös jonkin verran ravinnon kautta. Kolesterolia tarvitaan elimistössä mm. solukalvojen rakennerasvaksi, jossa se vaikuttaa solukalvoa jäykistävästi. Lisäksi se on ohutsuolessa rasvoja emulgoivan sappinesteen osa ja steroidihormonien, esim. estradioli ja testosteroni, esiaste. Kolesterolisynteesi alkaa asetyylikoentsyymi A:sta, kun kolme siitä irronnutta asetyyliryhmää muodostaa mevalonaatin, josta muodostuu aktivoitu isopreeniyksikkö. Tämän jälkeen kuusi isopreeniyksikköä muodostaa lineaarisen skvaleeni rakenteen. Skvaleenista muotoutuu nelirenkainen steroidikeskus, josta muodostuu lanosterolin kautta kolesteroli. Kolesterolin jäykistävä vaikutus johtuu juuri sen nelirenkaisesta jäykästä rakenteesta, jossa neljä sitoutunutta hiilirengasta sijaitsevat avaruusrakenteessa miltei tasomaisesti.

Kolesterolilla on suuri osuus synapsirakkuloiden rasvakoostumuksessa, jossa synaptofysiini muodostaa kompleksin yhdessä sen kanssa (ks. yleiskatsaus Huttner ja

Schmidt 2000). On myös esitetty, että kolesteroli auttaisi synapsirakkulan proteiinien kierrätyksessä neuronin presynaptisella kalvolla ja Jia ym. ovatkin todenneet, että kalvolla sijaitsevat mikrodomeenit eli lautat (engl. rafts), jotka sisältävät paljon kolesterolia, voivat avustaa synapsirakkulan proteiinien spatiaalisessa kierrätyksessä (Jia ym. 2006). Myös muut tutkimukset todistavat, että synaptisen kalvon kolesterolipitoisuus on merkittävä tekijä synapsirakkulan proteiinien kierrätyksessä (ks. yleiskatsaus Huttner ja Schmidt 2000). Lisäksi kolesteroli mahdollisesti osallistuu pre- ja postsynaptisten neuronien aktiinisolutukirangan rakentamiseen (ks. yleiskatsaus Murthy ja De Camilli 2003). Näiden syiden takia voidaan epäillä, että kolesterolilla on merkittävä osa hermosolujen synaptisessa aktiivisuudessa. Sarkanen ym. ovat huomanneet kolesterolin suojaavan RA:lla erilaistettuja SH-SY5Y-soluja Golgin laitteen hajoamiselta, jota RA-käsittely aiheuttaa (Sarkanen ym. 2004).

6.2.3 Apoptoosi

Apoptoosi, eli ohjattu solukuolema on tapahtumaketju, jossa solu tarkoituksenmukaisesti tuhoaa itsensä. Apoptoosin avulla tuhotaan esimerkiksi turhat solut yksilönkehityksen aikana, sekä DNA-vaurioisia ja virusten infektoimia soluja. Mikroskooppisella tasolla voidaan apoptoosissa nähdä ajallisesti erilaisia vaiheita: aluksi DNA kondensoituu tumakotelon laidolle, tämän jälkeen tumakotelo osittuu, seuraavaksi solu pirstoutuu pieniksi kappaleiksi joita ympäröi solukalvo ja viimeiseksi toiset läheiset solut fagosytoivat apoptoottiset kappaleet.

Jos apoptoosia verrataan toiseen solun kuolinmekanismiin, nekroosiin, jossa solu kuolee suoran ulkoisen tekijän seurauksena, huomataan monia eroja. Apoptoosiin ei liity tulehdusreaktiota joka aina on mukana nekroosissa, vaan apoptoosissa solun sisäisten molekyylien kosketus immunologisen järjestelmän kanssa estyy, jolloin autovasta-aineita ei muodostu. Apoptoosi koskee yleensä yksittäisiä soluja, kun taas nekroosissa tuhoutuu joukko soluja. Apoptoosi on solun aktiivinen tapahtumasarja, joka vaatii energiaa ja siihen liittyy lisääntynyt makromolekyylien synteesi, kun taas nekroosissa

makromolekyylisynteesi vähenee ja ATP-varastot ovat tyhjentyneet. (ks. yleiskatsaus Sastry ja Rao 2000).

Apoptoosin indusoitumiseen tarvitaan aina jokin signaali, joka käynnistää reaktiosarjan. Signaali voi tulla solun ulko- tai sisäpuolelta. Solukalvoilla sijaitsee niin sanottuja kuolemanreseptoreja eli Fas-reseptoreja, jotka aktivoituessaan aloittavat apoptoosiin johtavat tapahtumat. Kun esimerkiksi tappajasolu kohtaa kohdesolunsa, sen solukalvolla sijaitseva Fas-ligandi sitoutuu kuoleman reseptoriin, jolloin muodostuu reseptoriklusteri ja reseptorin solun sisäiset kuolemandomeenit aktivoituvat. Kuolemandomeenit aktivoivat puolestaan edelleen kaspasiproteiineja, jotka aiheuttavat apoptoosiin johtavan tapahtumasarjan. Solun sisäisenä signaalina voi puolestaan toimia esimerkiksi DNA-vaurio, tai puuttuva kasvusignaali. Tilanne johtaa mitokondrioiden H^+ -tasapainon muuttumiseen, jolloin apoptoosin aloittajat pääsevät ulos mitokondrioista (esim. sytokromi c) ja aktivoivat kaspasit.

Tuli signaali sitten ulko- tai sisäpuolelta, ovat tapahtumat jatkossa solussa samanlaisia, eli kaspasiproteiinien signaalinsiirtokoneisto käynnistyy. Kaspasit ovat jatkuvasti solussa esiintyviä proteiineja, mutta ne syntetisoidaan inaktiivisina prekursoreina, jotka toimivat vasta käytyään läpi proteolyyttisen kypsymisen, jonka aikana proteiinien pro-domeenit poistetaan ja ne dimerisoituvat. Signaalinsiirtokoneistossa aktivoituvat ensin aloitteentekijäkaspasit, jotka aktivoivat suorittajakaspasit, jotka lopulta ovat vastuussa apoptoosin tapahtumista, eli hajottavat apoptoosia estäviä proteiineja ja solun rakenteita, sekä aktivoivat ja inhiboivat muita proteiineja. Kaspasien ja sytokromi c:n lisäksi tärkeitä proteiineja apoptoosin signaalinsiirtokoneistossa ovat bcl-2-geeniperheen jäsenet, joista toiset estävät ja toiset edistävät apoptoosia.

Apoptoosi kuuluu luonnollisena osana myös neuronin elinkaareen ja hermoston kehitykseen. Suurissa osissa hermostoa, jopa noin puolet hermoston neuroneista tuhoutuu apoptoottisesti hermoston kehityksen aikana. Toisaalta moniin neurologisiin sairauksiin, kuten Parkinsonin ja Alzheimerin tautiin, on yhdistetty asteittainen hermosolujen tuhoutuminen liiallisen ja väärään aikaan tapahtuvan apoptoosin seurauksena. Apoptoosia aiheuttavia tekijöitä on löydetty monia, kuten esimerkiksi erilaiset hermomyrkyt ja DNA:ta

vahingoittavat aineet. (ks. yleiskatsaus Sastry ym., 2000). SH-SY5Y-solulinjalle on käytetty apoptoottisina aineina mm. typpioksidia (Kamoshima ym., 1997; Uehara ym., 1999) ja staurosporiinia (Nath ym., 1996). Toisaalta myös esimerkiksi all-*trans*-retinolihamon on todettu aiheuttavan apoptoosia alkion kantasoluissa niiden erilaistuessa neuroneiksi (Okazawa ym., 1996). Nykyään on saatu myös todisteita siitä, että postmitoottisissa hermosoluissa, jotka ovat erilaistuneet niin pitkälle etteivät enää jakaannu, apoptoosi saattaisi liittyä epäonnistuneeseen yritykseen palata mitoottisen syklin S-vaiheeseen (Encinas ym. 2000; Nuydens ym. 1998).

R. Sarkasen mukaan (henkilökohtainen tiedonanto 15.11.2006) RA:lla, RA+CHOL:lla ja CHOL:lla käsitellyt kymmenen päivää kasvatetut SH-SY5Y-solut ovat vähemmän herkkiä staurosporiinilla aiheutetulle apoptoosille kuin erilaistamattomat tai dBcAMP:lla käsitellyt saman ajan kasvaneet SH-SY5Y-solut.

On olemassa suuri joukko yhdisteitä ja molekyyylejä jotka vaikuttavat antiapoptoottisesti, eli estävät apoptoottisia tapahtumia soluissa. Kemokiinit ovat joukko proteiineja joiden nimi perustuu niiden kemotaksista aikaansaavaan ominaisuuteen, jonka perusteella ne alun perin tunnistettiin. Kemokiinit luokitellaan ja nimetään C, CC, CXC, CXXXC perheisiin riippuen siitä, missä proteiinin N-terminaalinen kysteini sijaitsee. Kemokiinit aktivoivat G-proteinireseptoreihin kuuluvia kemokiinireseptoreja.

Kemokiinireseptorien aktivaatio johtaa useissa tapauksissa ensimmäiseksi nopeaan ja tilapäiseen solun sisäisen kalsiumtason nousuun, jonka jälkeen muut signaalinsiirtoreitit aloittavat toimintansa. Näitä signaalinsiirtoreittejä ovat ainakin fosfatidylyli-inositoli 3-kinaasi, joka aktivoi proteiinkinaasi B:n ja MAPK (engl. mitogen activated protein kinases) -reitti. Viimeaikoina on myös esitetty, että kemokiinit signaloisivat lisäksi JAK/STAT-signaalinsiirtoreitin kautta. Kemokiinien tiedetään osallistuvan mm. leukosyyttien migraatioon, T-lymfosyyttien aktivaatioon, fagosytoosiin, apoptoosiin, angiogeneesiin, sytokiinien eritykseen ja viruspatogeneesiin. Niiden epänormaali toiminta on liitetty useisiin sairauksiin, varsinkin kroonisen tulehduksen pohjalta syntyviin ja autoimmuunisairauksiin. Sekä kemokiineja että niiden reseptoreita esiintyy paljon keskushermostossa. Niiden epäillään liittyvän mm. erilaistumiseen, organogeneesiin,

erilaisiin patogeeneisiin tiloihin kuten Multippeliskleroosiin ja toimivan myös neuromodulaattoreina, eli synapsien toimintaa säätelevinä aineina. (ks. yleiskatsaukset Asensio ja Campbell, 1999; Bacon ja Harrison, 2000; Bonavia ym., 2003).

Fraktalkiini on kemokiineihin kuuluva molekyyli, jota esiintyy enemmän keskus- kuin ääreishermostossa. Vaikka suurin osa kemokiineistä on kooltaan pieniä, noin 8-14 kDa:ia, Fraktalkiini esiintyy 95 kDa:in kokoisena liukoisena proteiinina ja myös solukalvoon ankkuroituneena muotona. Siitä käytetään myös nimityksiä CX3CL1 ja neurotaktiini. (Pan ym. 1997 ja yleiskatsaukset Bacon ja Harrison, 2000; Bonavia ym., 2003). Fraktalkiinilla on todettu olevan suojaavia vaikutuksia keskushermostossa (Mizuno ym., 2003; Limatola ym., 2005), jossa sen on todettu esimerkiksi estävän apoptoosia (Boehme ym., 2000; Deiva ym., 2004).

Fraktalkiinin reseptori on nimeltään CX3CR1 ja se esiintyy runsaasti ainakin ihmisen keskushermoston neuroneissa ja mikroglia soluissa (Hatori ym. 2002). T. Jalosen (henkilökohtainen tiedonanto 31.08.2006) mukaan on myös osoitettu RT-PCR-kokeiden avulla, että fraktalkiinia ilmenee SH-SY5Y-soluissa. Vaikka fraktalkiinireseptorin ei ole todettu ilmentyvän SH-SY5Y-soluissa, ovat Pulkkinen ym. todenneet fraktalkiini käsittelyn aiheuttavan CCR5- ja CXCR5-kemokiinireseptorien ilmentymistä RA:lla erilaistetuissa SH-SY5Y-soluissa, joka voi tarkoittaa sitä, että fraktalkiini pystyy käyttämään myös muita reseptoreja (Julkaisematon tieto. Pulkkinen, K., I. Kärkkäinen, K. Kurppa, H. Tähti ja T.O. Jalonen. 2006. Fractalkine differentially affects the expression of HIV chemokine co-receptors in human neuroblastoma and astrocytoma cells. *J. Neuroimmunol.*). Fraktalkiinia on myös tutkittu mahdollisena neuroblastooman hoitokeinona (Zeng ym. 2005) hiirimallia käyttäen, muokkaamalla geneettisesti neuroblastoomasolut tuottamaan fraktalkiinia. Tutkimuksissaan huomattiin hoidon pienentävän kasvaimen kokoa ja vähentävän maksametastaasien määrää.

7 Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena oli kuvata eri yhdisteillä erilaistettujen SH-SY5Y-solujen morfologiaa ja käyttäytymistä kahden viikon viljelyn aikana. Tutkimus oli osa laajemmasta hermosolujen erilaistamiseen ja hermoverkkojen käyttäytymiseen liittyvästä tutkimuksesta. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on kehittää solumalleja käytettäväksi mm. toksisuus- ja lääkeainekokeissa.

Solujen erilaistumista selvitettiin hakemalla vastauksia seuraaviin kysymyksiin: Millainen morfologia soluilla on eri käsittelyjen jälkeen ja onko eri tavoin käsitellyillä soluilla tässä eroja? Erilaistuvatko solut neuronien kaltaisiksi erityisesti jotakin yhdistettä käytettäessä? Onko eri tavoin käsitellyillä soluilla eroa neuriittien kasvussa? Missä vaiheessa synapsirakkulat tulevat näkyviin ja missä osissa solua niitä havaitaan? Mitä tapahtuu, kun fraktalkiini ja kolesteroli ovat mukana vaikuttamassa solujen erilaistumiseen?

8 Materiaalit ja menetelmät

8.1 Solujen viljely ja käsittelyt

8.1.1 Soluviljely

Kokeessa käytettiin ihmisen neuroblastooma SH-SY5Y-solulinjaa joka oli tilattu ATCC:ltä. Siirrostuksen järjestysnumerot olivat sulatuksen jälkeen 33 – 35. Käytetyn elatusaineen ohje löytyy liitteenä (liite 1.). Sulatuksen jälkeen soluja kasvatettiin 75 cm²:n pulloissa (Nunclon EasYFlasks) kolmesta viiteen vuorokautta, ennen niiden jakamista kokeita varten. Epäsuoraa immunofluoresenssimikroskopiaa varten soluja siirrostettiin

Lab-Tek Chamber PERMANOX-kammioiduille peitinlaseille, joiden reunat ovat helposti poistettavissa. Tällöin solut voidaan kasvattaa, kiinnittää, leimata ja mikroskopoida samalla levyllä. Yhdellä levyllä oli neljä kuoppaa ja eri yhdisteillä käsiteltyjä soluja kasvatettiin sivulla 25. olevan kuvan (kuva 5.) mukaan, jokaisesta levystä ollen kaksi rinnakkaista levyä. Etanoli (Abs) ja RA+CHOL-kammioita oli kaksi kertaa enemmän kuin muita sen vuoksi, että kammiolaseilla oli kahdeksan kuoppaa ja näin elatusaineen vaihto kävi helpommin ja kaikki lasit olivat ulkonäöltään samanlaisia, jolloin inhimillisen virheen mahdollisuus vaihdettaessa elatusainetta, joka sisälsi vaikuttavan aineen, pieneni. Soluja siirrostettiin 3500 solua/cm^2 , eli $6300 \text{ solua/kuoppa}$ ja kasvatettiin $+37^\circ\text{C}$:een inkubaattorissa viiden prosentin hiilidioksidipitoisuudessa.

Lisäksi soluja kasvatettiin 6-kuoppamaljoilla, $33600 \text{ solua/kuoppa}$ valokuvausta varten, joka oli helpompi suorittaa isommalta astialta. Soluja kasvatettiin kokonaisuudessaan viisi toistoa, eli viisi kertaa edellä mainitulla tavalla. Viimeisessä toistossa soluja kasvatettiin myös 25 cm^2 :n solukasvatuspulloissa (Nunclon EasYFlasks) Western Blotting-analyysia varten, sillä toivottiin että näin saataisiin eristettyä tarpeeksi suuri määrä synaptofysiiniä. Soluja kasvatettiin 10 vuorokautta, sillä edeltävissä kokeiluissa huomattiin, että 14. kasvatuspäivänä solut alkoivat jo olla huonokuntoisia ja S-tyypin solujen osuus oli kasvanut, kuten aiemmissakin tutkimuksissa on todettu (mm. Encinas ym. 2000). Toisaalta tutkimuksen mielenkiinnon kohteena olevaa synaptofysiiniä alkoi esiintyä immunofluoresenssinäytteiden neuriiteissa vasta lähinnä kymmenentenä kasvatuspäivänä. Toistoista 1-4 tehtiin immunofluoresenssinäytteet, joista kolmannen toiston näytteet kuitenkin epäonnistuivat, ja toistoista 3.-5. solut kuvattiin ja tehtiin morfometria-analyysi neuriittien kasvun arvioimiseksi.

8.1.2 Solujen erilaistaminen

Siirrostuksen jälkeisenä päivänä (päivä 0.) soluille lisättiin elatusaineen mukana erilaistumiseen vaikuttavat yhdisteet: RA 5 μ M, dBcAMP 50 μ M, CHOL 10 μ g/ml, TPA 20 nM ja yhdistelmä, jossa RA pitoisuus oli 5 μ M ja CHOL pitoisuus oli 5 μ g/ml. TPA:n ja dBcAMP:n mukana annettiin etanolia, sillä muut vaikuttavat yhdisteet oli liuotettu etanoliin ja tämä vaikutus haluttiin samankaltaistaa. Samasta syystä negatiiviseksi kontrolliksi kasvatettiin soluja, jotka käsiteltiin vain etanolilla. Etanolin lopullinen konsentraatio liuoksissa ei ylittänyt 0,1 prosenttia, joka on yleisesti todettu myrkylliseksi pitoisuudeksi. Vaikuttavan aineen sisältävä elatusaine vaihdettiin kolmantena, seitsemäntenä ja kymmenentenä kasvatuspäivinä.

Peitinlasi 1. Peitinlasi 2.

RA	Abs
TPA	Abs
CHOL	RA+CHOL
dbcAMP	RA+CHOL

Kuva 5. Eri tavoin käsiteltyjen SH-SY5Y-solujen kasvatus peitinlaseilla.

8.1.3 Fraktalkiinikäsittely

Tutkimuksessa oletettiin, että fraktalkiini saattaisi lisätä solujen elinkykyisyyttä erilaistumisen edetessä. Solut käsiteltiin 100 nM:lla fraktalkiiniliuoksella, jota on myös aiemmin käytetty tutkimuksissa (julkaisematon tieto. Pulkkinen, K., I. Kärkkäinen, K. Kurppa, H. Tähti ja T.O. Jalonen. 2006. Fractalkine differentially affects the expression of HIV chemokine co-receptors in human neuroblastoma and astrocytoma cells. J. Neuroimmunol.).

Solujen käsittelyä varten fraktalkiini liuotettiin steriiliin fosfaattipuskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (PBS) ja sekoitettiin heti solujen kasvatusliuokseen. Fraktalkiinikäsittely tehtiin yhden kerran RA-, TPA- ja Abs-käsitellyille soluille viidennessä toistossa. Kontrollikäsittelynä käytettiin solukasvatusliuosta, johon oli lisätty PBS:ää samassa suhteessa kuin sitä oli fraktalkiini-PBS-kasvatusliuos-sekoituksessa. Kun solut olivat kasvaneet kymmenen päivää, ne valokuvattiin, kasvatusliuos imettiin pois ja tilalle lisättiin kasvatusliuosta jossa fraktalkiinin pitoisuus oli 100 nM. Fraktalkiinin (tai kontrolliliuoksen) annettiin vaikuttaa kaksi tuntia, jonka jälkeen solut valokuvattiin ja niistä tehtiin proteiinieristys, SDS-PAGE ja Western Blotting.

8.2 Mikrokooppiset menetelmät

8.2.1 Faasikontrastimikroskopia ja valokuvaus

Soluja tarkasteltiin käsittelyn eri vaiheissa faasikontrastimikroskopiolla (200-kertainen suurennos). Huomio kiinnitettiin neuriittien lukumäärään ja pituuteen, solujen runsauteen, sooman muotoon ja S-tyyppin solujen esiintymiseen. Lisäksi solut kuvattiin 3. – 5. toistoissa 0., 3., 7., ja 10. kasvatuspäivinä morfometria-analyysia varten. Solut kuvattiin myös fraktalkiinikäsittelyn yhteydessä ennen käsittelyä ja heti kahden tunnin käsittelyn jälkeen. Mikrokooppijärjestelmänä oli Olympus CK40-käänteisfaasikontrastimikroskooppi, jossa Olympus DP10-digitaalinen kamera (Olympus, Tokyo, Japan).

8.2.2 Immunofluoresenssimikroskopia

Soluista tehtiin immunofluoresenssinäytteet ensimmäisessä, toisessa, kolmannessa ja neljännessä toistossa. Ensimmäisessä toistossa 0., 3., 7. ja 10. kasvatuspäivinä ja toisessa toistossa 7. ja 10. kasvatuspäivinä, sillä oli selvää ettei synaptofysiiniä esiinny neuriiteissa vielä kolmantena päivänä. Kolmatta toistoa tehdessä tapahtui inhimillinen virhe ja

käytettävä sekundäärivasta-aine oli päässyt loppumaan. Tilalle ei saatu tarpeeksi nopeasti uutta vasta-ainetta joten päädyttiin kokeilemaan virtausytometriaan optimoitua vasta-ainetta, joka oli lisäksi hieman vanhaa. Kokeilu kuitenkin epäonnistui eikä näytteissä näkynyt mitään. Neljännessä toistossa keskityttiin tutkimaan 10. päivää.

Solujen käsittely mikroskopointia varten tapahtui normaalin immunofluoresenssi käsittelytavan mukaan. Primäärivasta-aineena käytettiin SIGMAN hiiren monoklonaalista anti-synaptofysiiniä, joka tarttuu myös ihmisen synaptofysiiniin. Sekundäärivasta-aineena käytettiin SIGMAN vuohen anti-hiiri immunoglobuliini-G (IgG) fluoreskeiini-isotiosyanaatti (FITC)-yhdistelmää. Vasta-aineista kokeiltiin ensin erilaisia laimennoksia yhdistelminä, joista päädyttiin käyttämään anti-synaptofysiinille 1:1000 ja FITC-yhdistelmälle 1:150. Kuitenkin myöhemmin kolmannessa ja neljännessä toistossa käytettiin 1:200 anti-synaptofysiinille ja 1:100 FITC-yhdistelmälle, sillä vaikutti siltä että käytetyt laimennokset olivat liian laimeita. Solut pestiin PBS:llä ja kiinnitettiin neljä prosenttisella paraformaldehydillä. Permeabilisointiin käytettiin 0,5 prosentista Triton X-100:aa ja laseille piirrettiin rajat rasvatussilla. Epäspesifiset sitoutumispaikat suljettiin kymmenen prosenttisella vuohen seerumilla. Primäärivasta-ainetta inkuboitin yön yli ja sekundäärivasta-ainetta 1,5 tuntia pimeässä. Tämän lisäksi käytettiin tumaväri Hoechst-33258:aa 1:10000 laimennoksena auttamaan mikroskopoinnissa ja tumien paikannuksen todentamisessa. Näytteistä tehtiin myös negatiiviset kontrollit käyttämällä pelkkää sekundäärivasta-ainetta eri laimennoksilla (1:50, 1:80, 1:100 ja 1:150). Näytteiden petausaineena käytettiin vesipitoista petausainetta (nimeltään ”mömmö”) joka valmistettiin laboratoriomestari Ulla Jukaraisen avustuksella viereisellä kehitysbiologian osastolla, ohje liitteenä. Näytteet esitarkastettiin samana päivänä ja säilytettiin -20°C:een lämpötilassa pakastimessa ja tarkasteltiin tarkemmin kahden viikon aikana. Mikroskooppijärjestelmänä oli käytössä IBM PC, Nikon Mikrophot-FXA mikroskooppi, jossa SensiCam digitaalinen kamera (PCO Computer Optics GmbH).

8.3 Morfometria-analyysi

8.3.1 Neuriittien mittaaminen

Morfometrialla tarkoitetaan kudoksen tai solujen rakenteiden mittaukseen perustuvaa menetelmää. Tässä tutkimuksessa laskettiin neuriittien suhteellista osuutta yhtä solua kohden ja käytettiin sitä erilaistumista kuvaavana suureena. Menetelmä kehitettiin yhteenvetona yleisesti käytettyjen morfometrinen analyysimenetelmien ja käytössä olleiden välineiden pohjalta.

Analyysi tehtiin kolmannesta, neljännestä ja viidennestä toistosta. Neuriittien ja solukeskusten laskenta suoritettiin manuaalisesti käyttäen hyväksi Image-J-ohjelmistoa. Laskuja varten eri tavoin käsitellyt solut kuvattiin 0. (kontrolli), 3., 7. ja 10. kasvatuspäivinä. Jokaisesta eri tavoin käsitellystä solujoukosta otettiin satunnaisesti eri kohdista maljaa neljä kuvaa ja kuvista laskettiin sekä solukeskukset, että ulokkeet. Samalla ulokkeet mitattiin pixeleinä ja neuriiteiksi hyväksyttiin ne, joiden pituus ylitti keskimääräisen feretin halkaisijan, joka oli laskettu kontrollipäivän soluista.

Feretin halkaisija on yksi tilastollisista halkaisijoista, joita käytetään mikroskooppisissa menetelmissä, kun mitataan sellaisten kappaleiden kokoa jotka eivät ole symmetrisen pyöreitä. Tilastollinen halkaisija saadaan, kun partikkeli mitataan useaan suuntaan ja lasketaan näiden halkaisijoiden keskiarvo. Halkaisija laskettiin mittaamalla Image-J-ohjelmiston avulla ympärysmitta kaikista kontrollipäivän neljän kuvan soluista, jolloin ohjelma laski automaattisesti keskimääräisen halkaisijan jokaiselle kuvan solulle. Näistä neljän kuvan halkaisijoista laskettiin vielä keskiarvo, jolloin saatiin mittaluku, jota pidemmät ulokkeet voitiin hyväksyä neuriiteiksi. Kaikkia ulokkeita ei hyväksytty neuriiteiksi, sillä varhaishermosoluissa esiintyy lyhyitä ulokkeita jo hyvin varhaisessa vaiheessa, ja tarkoitus oli tehdä ero pidemmälle erilaistuneisiin soluihin.

Kirjallisuudessa esiintyy erilaisia keinoja tehdä tämä ero neuriitin pituuden perusteella. On käytetty esimerkiksi määriteltyä solun standardiläpimittaa jota pidemmät

on laskettu neuriiteiksi (Adlerz ym., 2003). Lähtökohtana on myös voinut olla kontrollisolujen ulokkeiden pituus, joita pidemmät on laskettu mukaan (Miloso ym., 2004) tai solukeskusten keskimääräinen pituus (Héraud ym., 2004). On myös tutkimuksia joissa erottelua ei ole haluttu tehdä (Encinas ym., 1999 ja Vu ym., 2003). Päädyttiin käyttämään feretin halkaisijaa, sillä neuroblastien sooman muoto oli niin vaihteleva, että käyttämällä suurta määrää kontrollisoluja ja niistä laskettua feretin keskiarvoa ajateltiin sen olevan kattava suunnannäyttävä keskimääräisessä solun halkaisijan koossa. Kuten edellä mainittiin, oli tärkeää tehdä ero erilaistuneiden ja alkuvaiheessa olevien hermosolujen välillä ja siksi neuriittien rajaaminen tietyn pituisiin oli tässä tutkimuksessa tärkeää.

Neuriitit ja solukeskukset laskettiin seuraavien periaatteiden mukaan: jos neuriitti haarautui, se mitattiin pidemmän haaran mukaan, S-tyyppin soluja ei laskettu ja vain ne solut laskettiin jotka näkyivät kokonaan kuvan sisällä. Kuvien analysoinnin jälkeen jokaisesta neljän kuvan ryhmästä (esim. RA-käsitellyt solut seitsemäntenä käsittelypäivänä) laskettiin neuriittien ja solukeskusten välinen suhde, eli kuinka monta neuriittia keskimäärin oli solukeskusta kohden. Solujen määrä neljän kuvan ryhmässä vaihteli 89-269 välillä.

8.3.2 Tilastolliset menetelmät

Tutkimuksessa haluttiin tietää, onko eri tavoin käsiteltyjen neuroblastoomasolujen neuriittien kasvussa eroavaisuutta. Tämä suoritettiin vertaamalla kolmessa eri toistossa keskimääräisiä neuriittien lukumääriä solukeskusta kohden seitsemäntenä kasvutuspäivänä eri tavoin käsitellyillä soluilla. Tilastollinen merkitsevyys arvioitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) ja sitä seuranneella Dunnetin monivertailulla. Analyysi tehtiin Microsoft® Office Excel-tilastollisella laskentaohjelmalla, joka oli täydennetty tutkijoille suunnatulla Analyse-it-ohjelmalla.

Tutkimuksen hypoteesit olivat: H_0 = Käsittely ei vaikuta neuriittien lukumäärään solukeskusta kohden. H_1 = Käsittely vaikuttaa neuriittien lukumäärään solukeskusta kohden.

8.4 SDS-PAGE ja Western Blotting

Tutkittiin synaptofysiinin ilmentymistä kymmenentenä kasvatuspäivänä RA-, TPA- ja kontrollisolulla, joista osaa vielä käsiteltiin kaksi tuntia fraktalkiinilla.

Proteiinieristys tehtiin käyttämällä M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent-liuosta (nro 78501), joka on suunniteltu viljeltyjen nisäkässolujen soluliman ja tuman proteiinien eristykseen. Jokaiseen pulloon lisättiin solujen pesun jälkeen 500 µl liuosta ja sen annettiin vaikuttaa viisi minuuttia. Kevyen raapimisen jälkeen soluja sentrifugoitiin kymmenen minuuttia 12000 rpm ja supernatantti otettiin talteen immunoblottausta varten.

Proteiinimääritykseen käytettiin BCA Protein Assay Reagent-pakkausta (nro 23225), Microplate-menettelyn mukaan. Taustafluoresenssin mittaamiseen käytettiin edellä mainittua M-PER[®]-reagenssia, sillä proteiinit oli liuotettu siihen. Standardisuoran mittaamiseen käytettiin BSA(naudan seerumin albumiini)-standardia. BSA-pitoisuudet standardisuoralla olivat: 0 µg/ml, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml ja 1500 µg/ml. Proteiinimääritys tehtiin kahteen kertaan. Ensin laimennoksella 1:5 ja sitten suoraan laimentamattomalla supernatantilla, sillä proteiinin määrä supernatantissa oli niin pieni, ettei se riittänyt laimentamiseen. Kaikista näytteistä ja standardeista tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta joista laskettiin keskiarvo. Mittaus suoritettiin Labsystems Multiskan MS:llä. Koska matalin konsentraatio oli noin 0,23 mg/ml = 0,23 µg/µl, ja yhteen SDS -PAGE:n näytekaivoon mahtuu 50 µl, josta puolet on näytekupuria, niin kaivoihin, joihin kaikkiin tulee sama määrä proteiinia, voidaan laittaa sitä: 25 µl x 0,23 µg/µl = 5,75 µg.

SDS-PAGE suoritettiin käyttäen neljä prosentista ylägeeliä ja kaksitoista prosentista erottelu-geeliä. Geelien ja käytettyjen puskureiden ohjeet löytyvät liitteenä (liite 3.). Proteiininauhojen paikantamiseen käytettiin low molecular weight-standardia. Geeliä ajettiin 200V/ 70mA:n sähkövirrassa noin 30 minuuttia.

Työssä käytettiin Amersham Biociences Western Blotting-pakkausta. Immunoblottauksessa käytettyjen puskureiden ja blokkauksliuosten ohjeet löytyvät liitteenä (liite 4.). Primäärisenä vasta-aineena käytettiin hiiren monoklonaalista anti-synaptofysiiniä 1:100 laimennoksena yksi prosenttisessa maito-TBS-tweenissä ja sen annettiin vaikuttaa yön yli. Sekundäärisenä vasta-aineena oli käytössä peroksidaasi-konjugoitu vuohen IgG hiiren IgG:tä vastaan (koko molekyyli) cappel-55550. Laimennoksena käytettiin 1:10000 yksi prosenttisessa maito-TBS-tweenissä ja sen annettiin vaikuttaa yksi tunti huoneenlämmössä. Peroksidaasireaktiota varten kalvoa inkuboitiin osoitusliuoksessa yksi minuutti huoneenlämmössä ja tämän jälkeen autoradiografiafilmi valotettiin kalvon kemiluminesenssin avulla sulkemalla kalvo ja filmi röntgenfilmikasettiin.

9 Tulokset

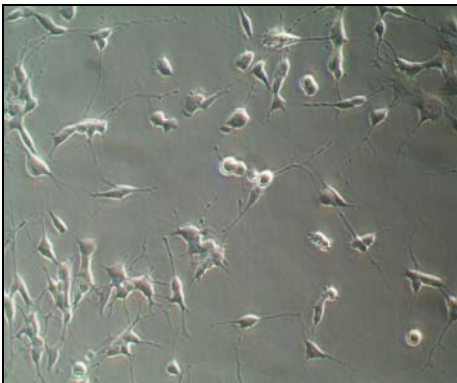
9.1 Morfologiset muutokset

Yleisesti voidaan sanoa, että morfologian perusteella RA- ja RA+CHOL-käsitellyt solut näyttivät erilaistuneen eniten kypsän neuronin kaltaiseksi. Lisäksi myös TPA-käsitellyt solut näyttivät erilaistuvan hieman kontrollisoluja enemmän, mutta niiden morfologia erosi huomattavasti RA- ja RA+CHOL-käsitellyistä. Sen sijaan dBcAMP- tai CHOL-käsitellyt solut eivät mikroskooppisessa tarkastelussa eronneet merkittävästi kontrollisoluista.



kuva 6. SH-SY5Y-soluja ilman käsittelyä ja kasvatusta 200-krt. suurennos.

Ensimmäisenä päivänä, kun soluja ei vielä ollut käsitelty millään yhdisteellä, niiden solukeskus oli suhteellisen pyöreä tai kolmiomainen ja neuriitit olivat lyhyitä (kuva 6.). Solut muistuttavat ulkomuodoltaan hermosolujen esiasteita, eli neuroblasteja.



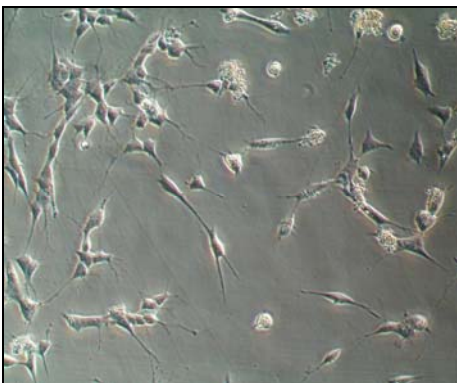
kuva 7. SH-SY5Y-soluja. 10 päivää kasvatettuna ja etanolikäsiteltyinä (kontrolli) 200-krt. suurennos.

Kun tarkasteltiin kontrollikäsiteltyjä soluja (Abs), niin solujen lukumäärä lisääntyi kasvatuksen edetessä ja solukeskuksen muoto säilyi samanlaisena. Neuriittien pituus kasvoi hieman silmämääräisesti arvioiden ja myös niiden lukumäärä solukeskusta kohden kasvoi morfometria-analyysissä. Toisin sanoen solut näyttivät erilaistuneen hieman spontaanisti neuronin kaltaiseksi. Kuitenkin neuriitit olivat lyhyitä verrattuna esim. RA-käsiteltyihin soluihin. Soluja esiintyi runsaasti (kuva 7.).



kuva 8. SH-SY5Y-soluja 10 päivää kasvatettuna ja TPA-käsiteltynä 200-krt. suurennos.

TPA-käsiteltyjen solujen ulkomuoto erosi RA- ja RA+CHOL-käsitellyistä selvästi. Niiden solukeskus oli huomattavan pyöreä ja pallomainen ja neuriitit olivat lyhyitä. Monilla näytti esiintyvän yksi selkeä neuriitti, joka saattaisi muistuttaa aksonia. Solujen määrä oli keskimääräinen (kuva 8.).



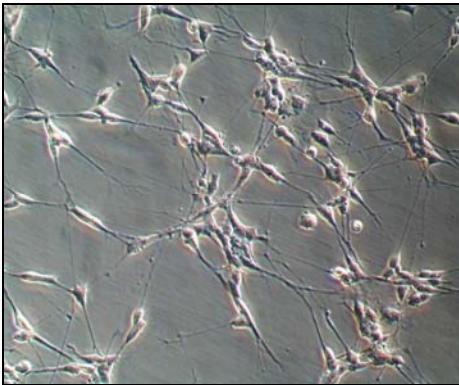
kuva 9. SH-SY5Y-soluja 10 päivää kasvatettuna ja CHOL-käsiteltynä 200-krt. suurennos.

Kolesterolikäsiteltyjen solujen ulkomuodossa ei näkynyt selkeää eroa verrattuna Abs-käsiteltyihin soluihin. Kuvassa näkyy myös kolesterolikiteitä (kuva 9.).



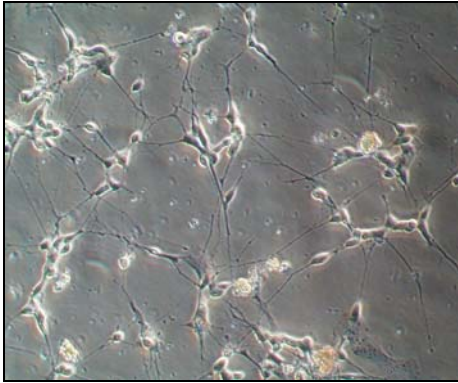
kuva 10. SH-SY5Y-soluja 10 päivää kasvatettuna ja dBcAMP-käsiteltynä 200-krt suurennos.

dBcAMP -käsitellyt solut eivät sen sijaan juurikaan eronneet kontrollisoluista, vaan niiden ulkoinen muoto muistutti kontrollisoluja kun verrattiin 10. kasvatuspäivän soluja (kuva 10.).



kuva 11. SH-SY5Y-soluja 7. päivää kasvatettuna ja RA-käsiteltynä 200-krt suurennos.

RA-käsitellyillä soluilla neuriitit olivat erityisen pitkiä ja soluja oli vähemmän verrattuna kontrolli- (Abs) ja muihin soluihin (kuva 11.). Solut muistuttivat selkeästi hermosoluja.



kuva 12. SH-SY5Y-soluja 7. päivää kasvatettuna ja RA+CHOL-käsiteltynä 200-kr. suurennos.

RA+CHOL-käsitellyt solut muistuttivat morfologialtaan RA-käsiteltyjä soluja. Niissä oli runsaasti pitkiä neuriitteja. Myös tässä kuvassa näkyy kolesterolikiteitä (kuva 12.).

Solut erilaistuivat morfologisesti eniten neuronin kaltaiseksi käytettäessä RA:ta. Lisäksi kolesteroli mahdollisesti lisäsi niiden elinkykyisyyttä ja erilaistumista. Kasvatuksen edetessä 14. kasvatuspäivään solut vaikuttivat jo huonokuntoisemmilta ja S-tyypin solujen määrä lisääntyi.

9.2 Neuriittien kasvu

9.2.1 Neuriittien määrät solukeskusta kohden

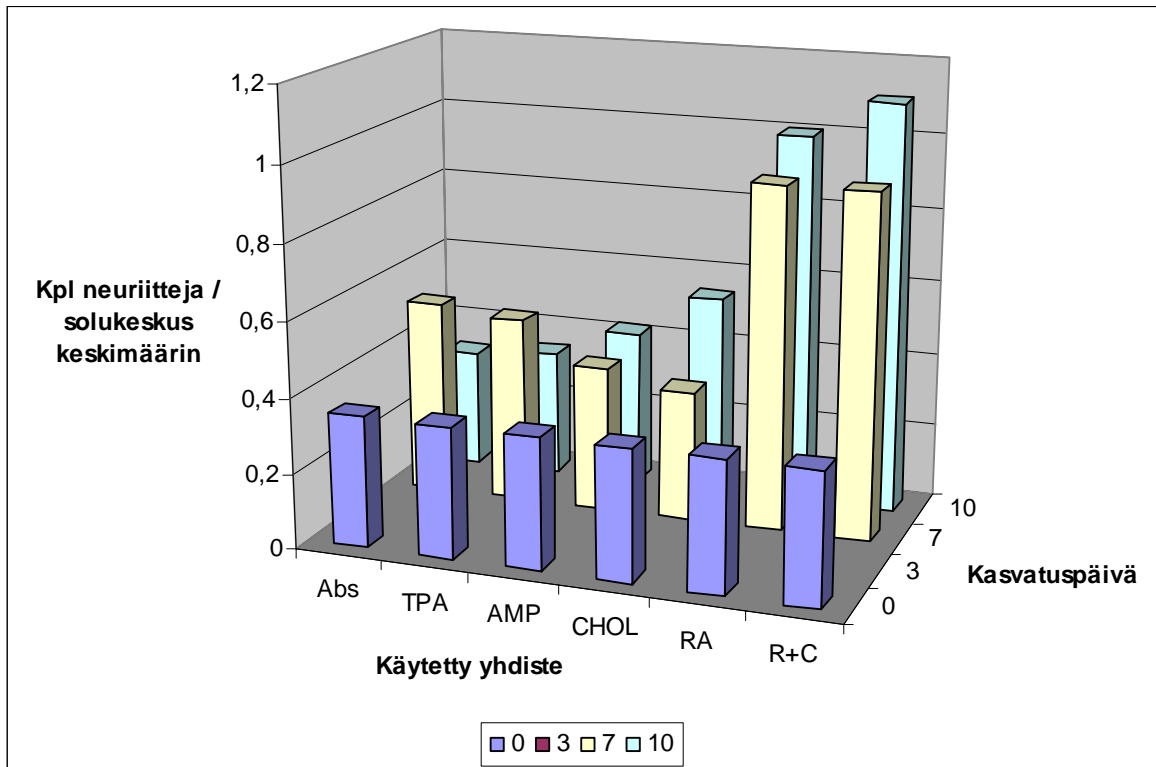
Kaikissa kolmessa toistossa neuriittien lukumäärä solukeskusta kohden kasvoi eniten RA- ja RA+CHOL-käsitellyillä soluilla (taulukko 1 ja kuvat 13.-15.). Kun vertailtiin RA-käsiteltyjä ja RA+CHOL-käsiteltyjä soluja huomattiin, että neuriittien lukumäärä oli pääsääntöisesti kaikissa kolmessa toistossa suurin soluilla, jotka oli käsitelty RA:n lisäksi myös kolesterolilla. Oheisessa taulukossa on esitetty neuriittien lukumäärät kaikissa toistoissa eri tavoin käsiteltyjen solujen ja eri kasvatuspäivien kohdalla. Kolmannen toiston

kohdalla puuttuvat kolmannen kasvatuspäivän ja viidennen toiston kohdalla kymmenennen päivän tulokset, kuten edellä mainittiin.

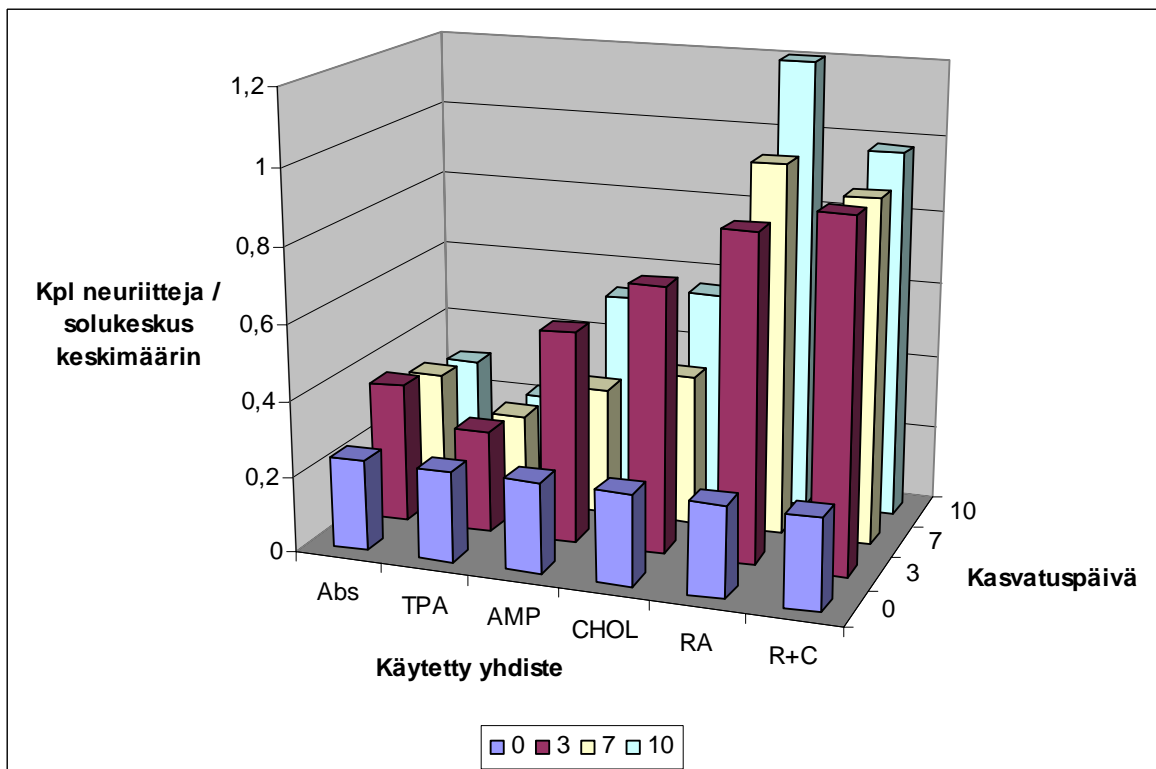
	Abs	TPA	dBcAMP	CHOL	RA	RA+CHOL	
0	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	3.toisto
0	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	4.toisto
0	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	5.toisto
3	x	x	x	x	x	x	3.toisto
3	0,37	0,27	0,56	0,70	0,86	0,92	4.toisto
3	0,44	0,37	0,58	0,67	0,81	1,02	5.toisto
7	0,52	0,50	0,39	0,35	0,92	0,92	3.toisto
7	0,33	0,24	0,34	0,40	0,98	0,91	4.toisto
7	0,57	0,39	0,52	0,64	0,99	1,08	5.toisto
10	0,32	0,34	0,42	0,54	1,00	1,10	3.toisto
10	0,30	0,22	0,53	0,56	1,20	0,98	4.toisto
10	x	x	x	x	x	x	5.toisto

Taulukko 1. Neuriittien määrä kpl/solukeskus eri kasvatuspäivinä eri toistoissa.

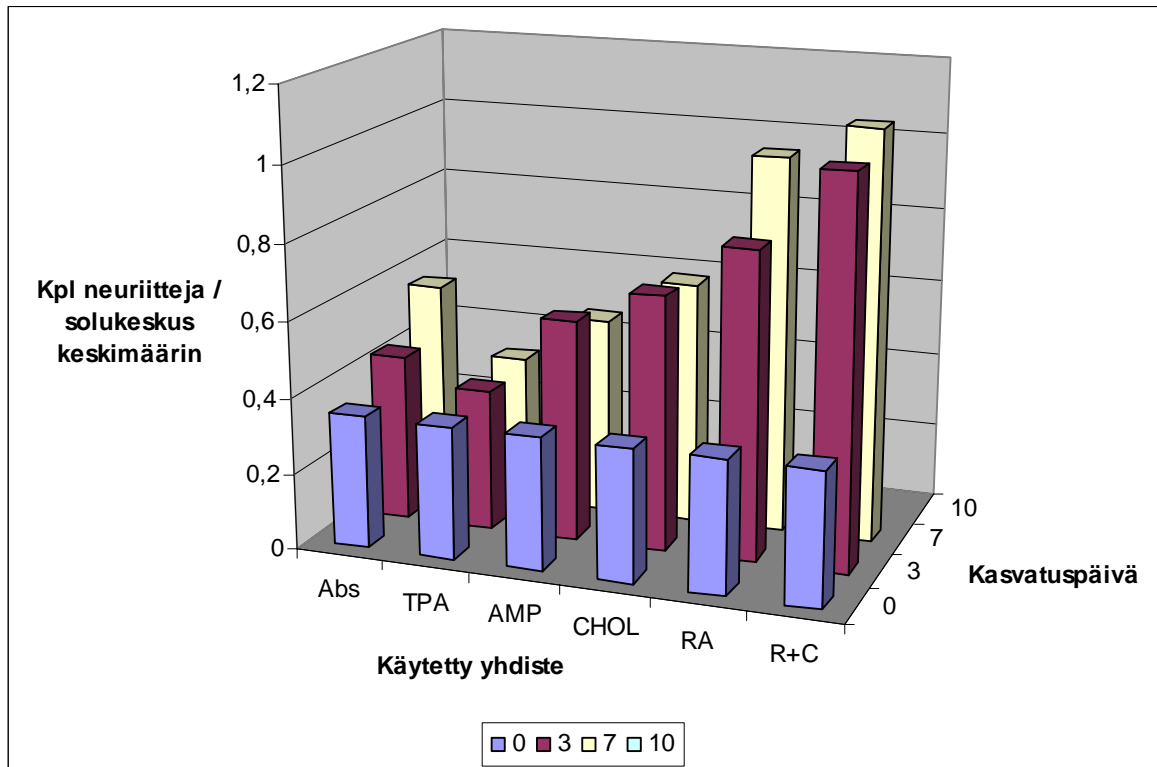
Seuraavissa kaavioissa on esitetty neuriittien lukumäärät eri toistoissa (kuvat 13.-15.). Kasvatuspäivät näkyvät erivärisinä pylväinä. Kaavioissa dBcAMP on lyhennetty AMP:ksi.



Kuva 13. Neuriittien määrä kpl/solukeskus eri kasvatuspäivinä 3. toistossa



Kuva 14. Neuriittien määrä kpl/solukeskus eri kasvatuspäivinä 4. toistossa



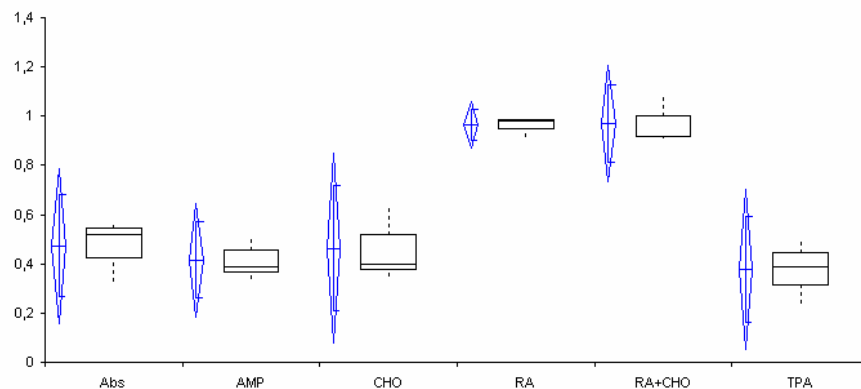
Kuva 15. Neuriittien määrä kpl/solukeskus eri kasvatuspäivinä 5. toistossa.

Seitsemännen kasvatuspäivän neuriittien lukumääriä vertailtaessa huomattiin, että vähiten vaihtelua eri toistojen välillä oli RA- ja RA+CHOL-käsitellyillä soluilla. CHOL-, dBcAMP-, TPA- ja kontrollikäsiteltyjen solujen neuriittien lukumäärässä vaihtelu oli suurempaa eri toistoissa.

9.2.2 Tilastolliset tulokset

Tutkittaessa neuriittien lukumääriä solukeskusta kohden seitsemäntenä kasvatuspäivänä kolmessa toistossa, voitiin jo kuvailevien tilastollisten menetelmien avulla nähdä, että RA- ja RA+CHOL-käsitellyillä soluilla neuriitteja esiintyi selvästi enemmän (kuva 16.).

Testi	Vertailevat kuvailut	
	Neuriittien määrä/solukeskus keskimäärin 7. kasvatuspäivänä	
Yhdistykset	Neuriitteja/Käsittely	
Tekijä	Siihanen	Päivämäärä 7 joulukuuta 2005



Neuriitteja/Käsittely	n	KA	SD	SE	95% Luottamusväli	Mediaani	IOR
Abs	3	0,473	0,1266	0,0731	0,159 to 0,788	0,520	0,120
dBcAMP	3	0,417	0,0929	0,0536	0,186 to 0,647	0,390	0,090
CHOL	3	0,463	0,1550	0,0895	0,078 to 0,848	0,400	0,145
RA	3	0,963	0,0379	0,0219	0,869 to 1,057	0,980	0,035
RA+CHOL	3	0,970	0,0954	0,0551	0,733 to 1,207	0,920	0,085
TPA	3	0,377	0,1305	0,0754	0,052 to 0,701	0,390	0,130

Kuva 16. Vertailevat kuvailut neuriittien keskimääräisestä lukumäärästä/solukeskusta seitsemäntenä kasvatuspäivänä. Kuva Excel tiedostosta.

Yksisuuntaisen varianssianalyysin ja sitä seuranneen Dunnetin monivertailun perusteella todettiin, että ero neuriittien lukumäärässä eri tavoin käsitellyillä soluilla oli tilastollisesti merkittävä ($p < 0.05$) RA-käsitellyillä ja RA+CHOL-käsitellyillä soluilla. dBcAMP-, TPA- ja CHOL-käsiteltyjen solujen neuriittien lukumäärä ei eronnut tilastollisesti merkittävässä määrin kontrollisoluista (taulukko 2.).

Testi	1-suuntainen varianssianalyysi ANOVA		
	Neuriittien määrä/solukeskus keskimäärin 7. kasvatuspäivänä		
Vertailu	Neuriitteja/Käsittely: Abs, dBcAMP, CHOL, RA, RA+CHO, TPA		
Tekijä	Siikanen	Päivämäärä	7 joulukuu 2005

n | 18

Neuriitteja/Käsittely	n	Keskiarvo	SD	SE
Abs	3	0,473	0,127	0,0731
dBcAMP	3	0,417	0,093	0,0536
CHOL	3	0,463	0,155	0,0895
RA	3	0,963	0,038	0,0219
RA+CHOL	3	0,970	0,095	0,0551
TPA	3	0,377	0,131	0,0754

Variaation lähde	SSq	DF	MSq	F	p
Käsittely	1,159	5	0,232	18,24	<0.0001
Toisto	0,153	12	0,013		
Yhteensä	1,312	17			

Kontrasti	Ero	Dunnett		
		95% Luottamusväli		
dBcAMP vs Abs	-0,057	-0,324	to 0,210	
CHOL vs Abs	-0,010	-0,277	to 0,257	
RA vs Abs	0,490	0,223	to 0,757	(merkittävä)
RA+CHOL vs Abs	0,497	0,230	to 0,764	(merkittävä)
TPA vs Abs	-0,097	-0,364	to 0,170	

Taulukko 2. 1-suuntaisen varianssianalyysin ja Dunnetin monivertailun tulokset.

Tämän perusteella hypoteesi $H_0 =$ Käsittely ei vaikuta neuriittien lukumäärään solukeskusta kohden hylätään ja hypoteesi $H_1 =$ Käsittely vaikuttaa neuriittien lukumäärään solukeskusta kohden, jää voimaan.

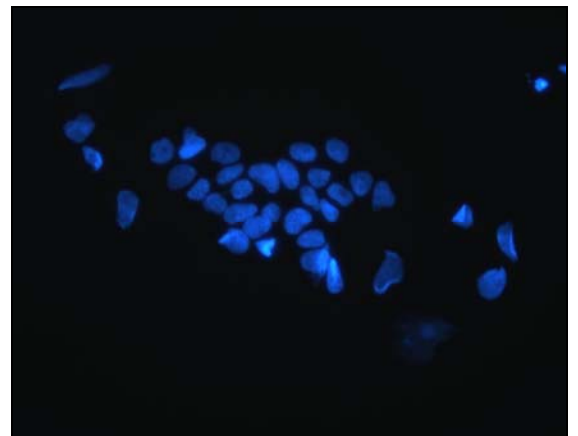
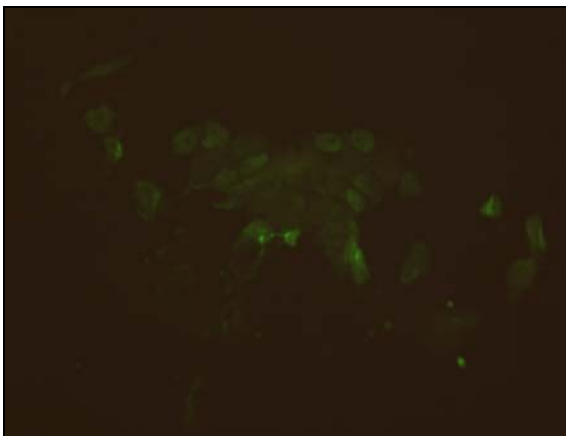
9.3 Synapsirakkuloiden esiintyminen

0., 3. ja 7. kasvatuspäivinä soluissa näkyi vain vähän synaptofysiiniä tumissa. Varsinaisesti synaptofysiiniä alkoi näkyä vasta 10. kasvatuspäivänä, jolloin sitä näkyi myös RA- ja RA+CHOL-käsiteltyjen solujen neuriiiteissa. 14. kasvatuspäivänä solut näyttivät jo huonokuntoisemmilta ja S-tyyppin solujen osuus oli lisääntynyt, kuten jo edellä mainittiin.

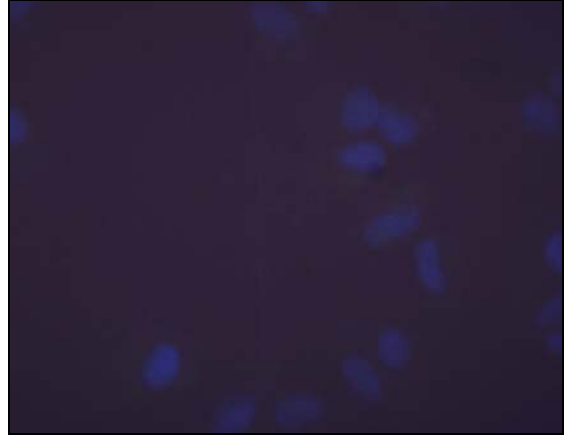
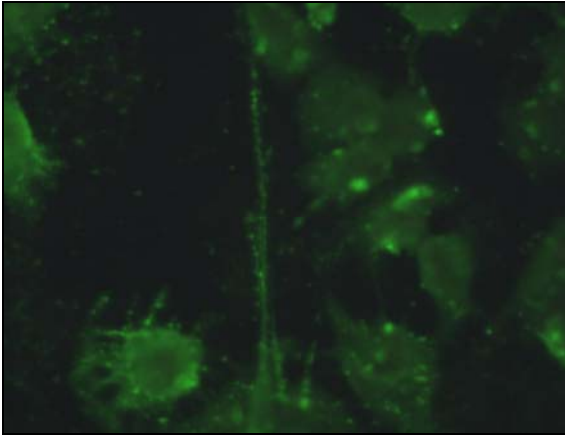
Negatiivisissa kontrollinäytteissä, eli näytteissä jotka oli käsitelty vain sekundäärivasta -aineella, ei nähty mitään (kuvat 17. ja 18.). RA- ja RA+CHOL-käsitellyissä soluissa näkyi selkeästi synaptofysiiniä (joka osoittaa synapsirakkuloita) tuman lisäksi myös neuriiiteissa kymmenentenä kasvatuspäivänä (kuvat 21. ja 22.).



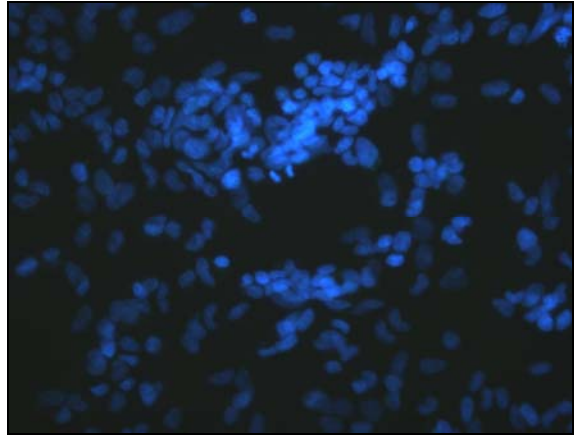
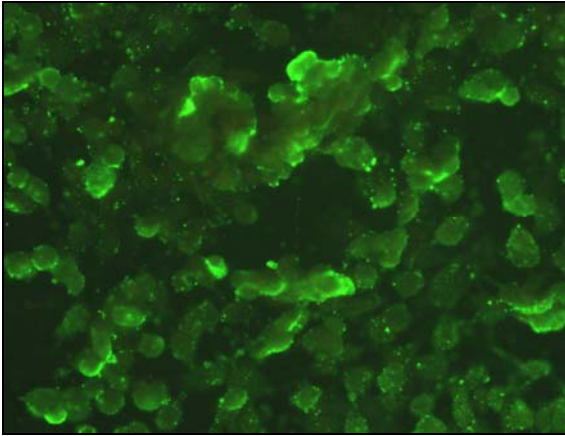
Kuvat 17. ja 18. Negatiivinen kontrollinäyte primäärivasta-aineen pitoisuus 1:100 (vasemmalla) ja tumat (oikealla) käsittelemättömissä soluissa 0. kasvatuspäivänä 100-krt. suurennos.



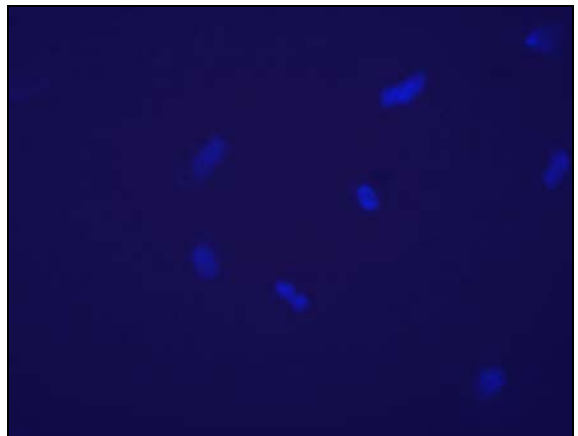
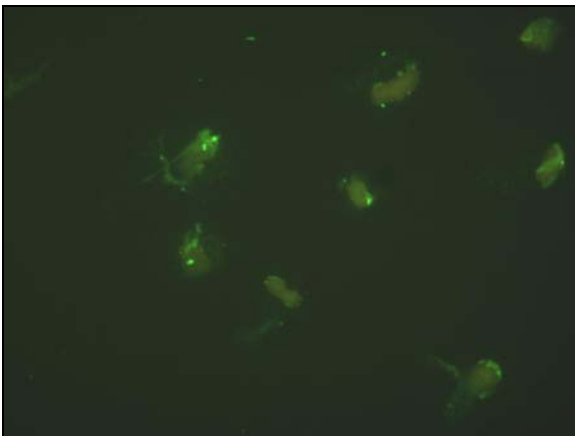
Kuvat 19. ja 20. Synaptofysiiniä (vasemmalla) ja tumat (oikealla) CHOL-käsitellyissä soluissa 10. kasvatuspäivänä ensimmäisessä toistossa 100-krt. suurennos.



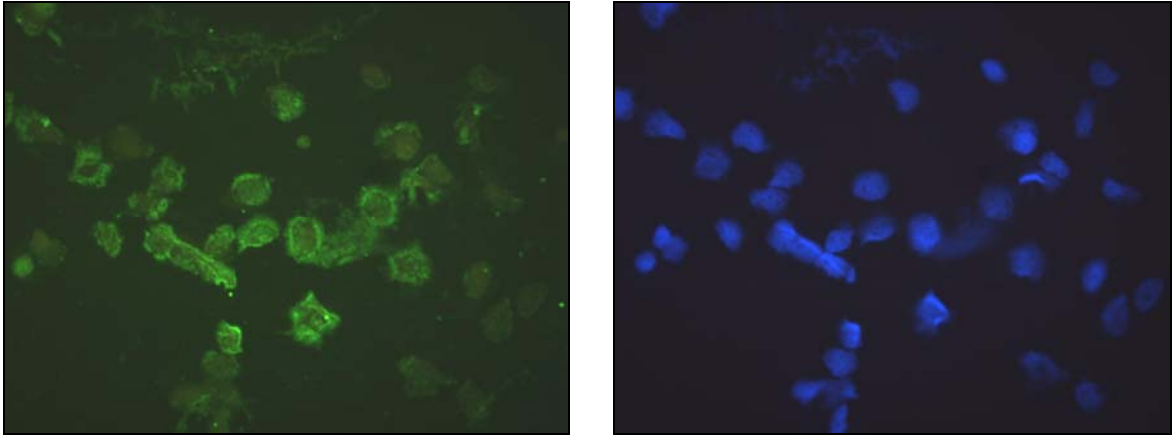
Kuvat 21. ja 22. Synaptofysiiniä ja tumat RA+CHOL-käsitellyissä soluissa 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa 400- ja 200-krt. suurennos.



Kuvat 23. ja 24. Synaptofysiiniä ja tumat kontrollisoluiissa 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa 200-krt. ja 100-krt. suurennos.



Kuva 25. ja 26. Synaptofysiiniä ja tumat TPA-käsitellyissä soluissa 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa 200-krt. suurennos.

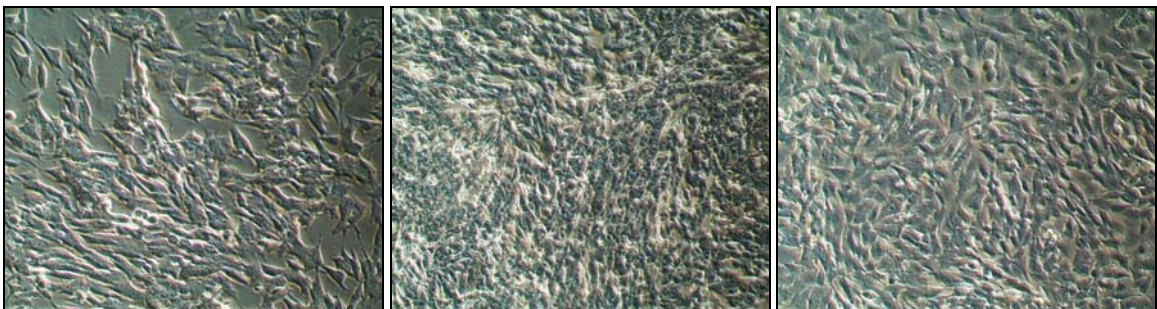


Kuva 27. ja 28. Synaptofysiiniä ja tumat dBcAMP-käsitellyissä soluissa 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa 200-krt. suurennos.

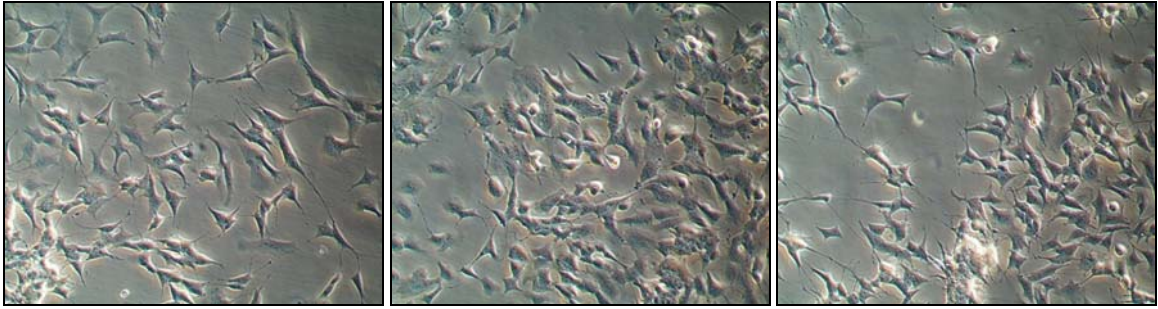
9.4 Fraktalkiinin vaikutus

9.4.1 Morfologiset muutokset

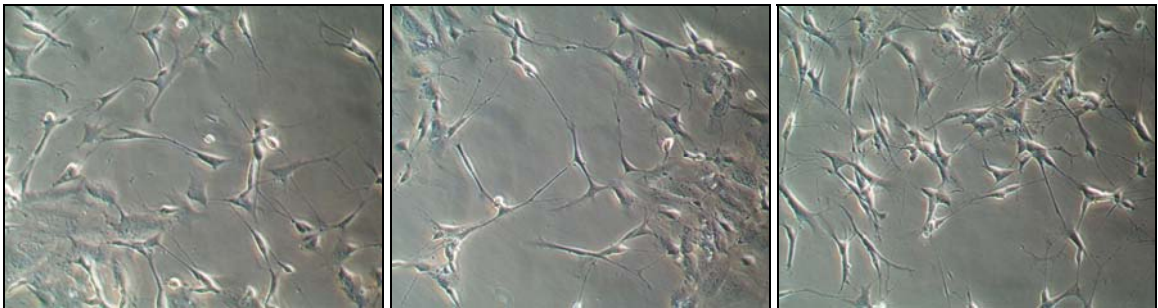
Silmämääräisesti arvioiden RA + fraktalkiini-käsitellyt solut näyttivät hieman elinkelpoisemmilta kuin ilman fraktalkiinia olleet ja RA-käsitellyt solut. Sen sijaan TPA-käsitellyissä soluissa eroa ei huomattu ja kontrollisoluissa vaikutus näytti silmämääräisesti olevan kuin edellä mainittujen väliltä.



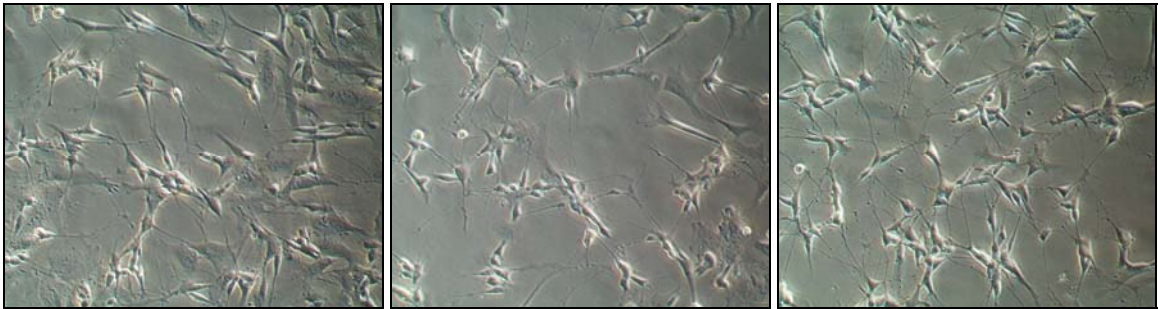
Kuvat 29. 30. ja 31. Kontrollikäsitellyjä soluja ennen fraktalkiini-käsittelyä (keskellä), -käsittelyn jälkeen (oikealla), sekä kontrollikäsitellyn jälkeen (vasemmalla), 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa (ensimmäinen rinnakkainen näyte). 100-krt. suurennos.



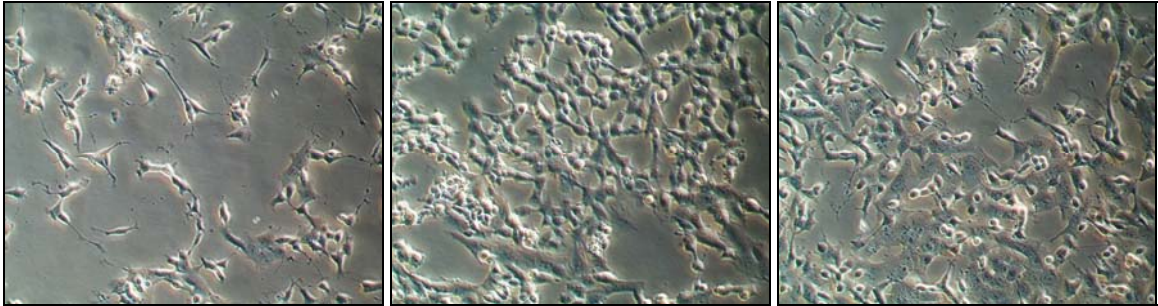
Kuvat 32. 33. ja 34. Kontrollikäsitellyjä soluja ennen fraktalkiini-käsittelyä (keskellä), -käsittelyn jälkeen (oikealla), sekä kontrollikäsitellyn jälkeen (vasemmalla), 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa (toinen rinnakkainen näyte). 100-krt. suurennos.



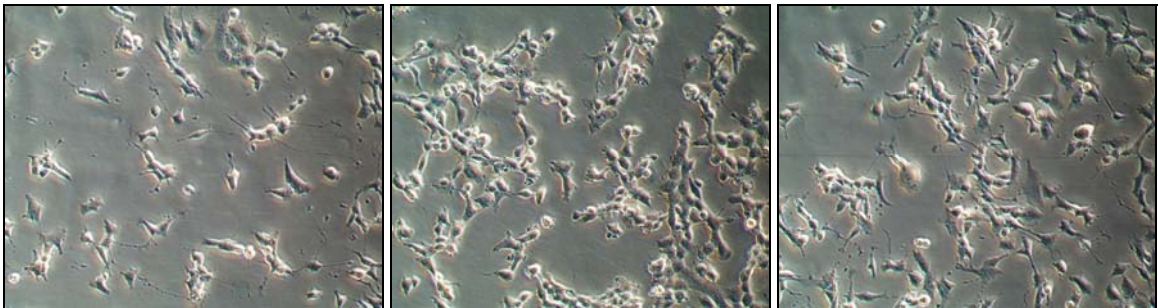
Kuvat 35. 36. ja 37. RA-käsitellyjä soluja ennen fraktalkiini-käsittelyä (keskellä), -käsittelyn jälkeen (oikealla), sekä kontrollikäsitellyn jälkeen (vasemmalla), 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa (ensimmäinen rinnakkainen näyte). 100-krt. suurennos.



Kuvat 38. 39. ja 40. RA-käsitellyjä soluja ennen fraktalkiini-käsittelyä (keskellä), -käsittelyn jälkeen (oikealla), sekä kontrollikäsitellyn jälkeen (vasemmalla), 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa (toinen rinnakkainen näyte). 100-krt. suurennos.



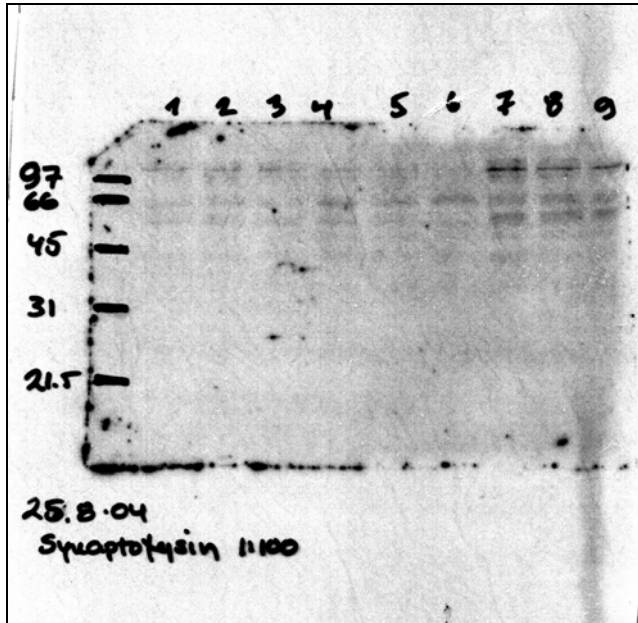
Kuvat 41. 42. ja 43. TPA-käsitellyjä soluja ennen fraktalkiini-käsittelyä (keskellä), -käsittelyn jälkeen (oikealla), sekä kontrollikäsitteilyn jälkeen (vasemmalla), 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa (ensimmäinen rinnakkainen näyte). 100-krt. suurennos.



Kuvat 44. 45. ja 46. TPA-käsitellyjä soluja ennen fraktalkiini-käsittelyä (keskellä), -käsittelyn jälkeen (oikealla), sekä kontrollikäsitteilyn jälkeen (vasemmalla), 10. kasvatuspäivänä neljännessä toistossa (toinen rinnakkainen näyte). 100-krt. suurennos.

9.4.2 SDS-PAGE ja Western Blotting

Tutkimuksessa ei saatu näkyviin proteiininauhaa synaptofysiinin (38 kDa:in) kohdalle (kuva 47.). Sen sijaan 66 kDa:in ja 97 kDa:in kohdalla näkyvät nauhat, jotka ovat voimakkaimmat seitsemännessä, kahdeksannessa ja yhdeksännessä näytteessä, jotka sisälsivät näytteet kontrollikäsitellyistä soluista (Abs) fraktalkiini-käsiteltyinä (7. ja 8.) ja kontrollikäsiteltyinä (PBS, näyte 9.). Lisäksi näkyy nauha noin 57-59 kDa:in kohdalla ja ehkä heikko nauha myös 45 kDa:in kohdalla.



Kuva 47. Western Blotting kalvo.

Seuraavassa taulukossa esitetään näytteiden proteiinipitoisuudet ja pipetointimäärät SDS-PAGE-geelille kun käytettiin laimentamatonta supernatanttia.

NÄYTENUMERO	KÄSITTELY	PROTEIINIKONSENTRAATIO mg/ml	PIPETOITU MÄÄRÄ
1	RA + FTK 1. näyte	0,269857	43 µl
2	RA + FTK 2. näyte	0,256286	44 µl
3	RA	0,235571	48 µl
4	TPA + FTK 1. näyte	0,290929	40 µl
5	TPA + FTK 2. näyte	0,229857	50 µl
6	TPA	0,295214	39 µl
7	Abs + FTK 1. näyte	0,456286	25 µl
8	Abs + FTK 2. näyte	0,444143	26 µl
9	Abs	0,472357	24 µl

Taulukko 3. Näytteiden proteiinipitoisuudet ja pipetointimäärät eri tavoin käsitellyistä soluista.

10 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksen tarkoituksena oli kuvata eri yhdisteillä erilaistettujen SH-SY5Y-solujen ilmentymiä, niiden morfologiaa, silmin nähtävää erilaistumista, neuriittien kasvua, synapsirakkuloiden lokalisaatiota ja fraktalkiinin sekä kolesterolin vaikutuksia.

Tutkimuksessa huomattiin, että solut erilaistuvat morfologisesti eniten neuronin kaltaiseksi käytettäessä RA:ta. Lisäksi kolesteroli mahdollisesti lisäsi niiden elinkykyisyyttä ja erilaistumista. Tutkimuksessa saatiin myös viitteitä siitä, että fraktalkiini voisi lisätä solujen elinkykyisyyttä, mutta asia vaatii vielä lisäselvityksiä.

Kun tarkasteltiin solujen morfologian muutosta tutkimuksen aikana, huomattiin että kasvatuksen aikana solut erilaistuivat hieman jo pelkän kontrollikäsitelyn johdosta. Kuitenkin ero käsittelyiden avulla erilaistuneisiin oli selvä. Tutkimuksessa tämä pieni spontaani erilaistuminen otettiin huomioon hyväksymällä neuriiteiksi vain keskimääräistä kontrollisolujen sooman feretin halkaisijaa pidemmät neuriitit. Varsinkin RA- ja RA+CHOL-käsitellyillä soluilla solujen lukumäärä väheni samalla kun ulkomuoto muuntui enemmän neuroniamuistuttavaksi. Tämä onkin johdonmukaista, sillä yleensä erilaistumisen edetessä solujen jakaantuminen vähenee. RA- ja RA+CHOL-käsiteltyjen solujen ulkomuoto muistutti selkeästi erilaistunutta hermosolua pitkin neuriitteineen. Kasvatuksen edetessä 14. kasvatuspäivään solut vaikuttivat jo huonokuntoisemmilta ja S-tyypin solujen määrä lisääntyi. Samanlaisia tuloksia onkin saatu myös muiden tutkijoiden toimesta, joten tätä osattiin myös odottaa (ks. esim. Encinas ym. 2000).

Myös neuriittien lukumäärää tarkasteltaessa RA- ja RA+CHOL-käsitellyt solut näyttivät erilaistuneen eniten neuronin kaltaiseksi, eli näillä soluilla esiintyi eniten neuriitteja solukeskusta kohden. Olisi ollut hyödyllistä ja mielenkiintoista tarkastella myös neuriittien haarautumista ja erityisen pitkien neuriittien esiintymistä, mutta tämän tutkimuksen puitteissa aika ei tähän riittänyt. Jatkossa asia siis kaipaasi lisäselvityksiä. Neuriittien lukumääriä laskettaessa valokuvista, kolmannen toiston (eli ensimmäinen josta laskettiin neuriitit) kolmannen kasvatuspäivän kuvat otettiin vahingossa liian pienellä suurennoksella. Koska neuriittien lukumäärä laskettiin pituuden perusteella pikseleihin,

olisi tämä antanut väärän tuloksen joten ne jätettiin laskematta. Käytössä ollut mikroskoopin kamera oli sellainen, ettei siihen ollut mahdollista asettaa mittatikkua, jolla pituus olisi voitu laskea esimerkiksi mikrometreinä. Viidennessä (kolmas josta laskettiin neuroiitit) toistossa puolestaan solut olivat jo miltei kuolleet kymmenentenä kasvatuspäivänä, joten tämä päivä jäi myös laskuista pois. Neuroiittien lukumäärän suhteen kuitenkin saatiin kolmen toiston ajalta lukumäärät seitsemäntenä kasvatuspäivänä. Lisäksi neljännessä toistossa pystyttiin laskemaan neuroiitit kaikkina kasvatuspäivinä, ja toisaalta vertaamaan kokonaiskuvaa neuroiittien lukumäärän lisääntymisestä kymmenen kasvatuspäivän aikana kolmessa toistossa. Seitsemännen kasvatuspäivän neuroiittien lukumääriä vertailtaessa huomattiin, että CHOL-, dBcAMP-, TPA- ja kontrollikäsiteltyjen solujen neuroiittien lukumäärässä vaihtelu oli suurempaa eri toistoissa, kuin RA- ja RA+CHOL-käsitellyillä soluilla. Vaihtelu saattaa johtua siitä, että tutkimuksen tekijä on vielä tutkimustyössä aloittelija, jolloin tarkkuus pikkutarkassa työskentelyssä, kuten neuroiitteja laskettaessa paranee vuosien kokemuksen myötä.

Synapsirakkuloita osoittavaa synaptofysiiniä tutkittaessa huomattiin, että sitä alkoi näkyä neuroiiteissa vasta kymmenentenä kasvatuspäivänä. Tämä saattaa viitata siihen, että tällä tavalla soluja käsiteltäessä, niistä tulee sähköisesti aktiivisia, eli aktiopotentiaaleja muodostavia, vasta tässä vaiheessa. Synaptofysiiniä havaittiin lähinnä vain RA- ja RA+CHOL-käsitellyissä soluissa, joten voi olla, että muut käsittelytavat eivät saa SH-SY5Y-soluja erilaistumaan niin hyvin toiminnallisiksi neuroneiksi, eli soluiksi jotka omaavat kyvyn sähköiseen toimintaan, sen lisäksi että näyttävät kypsiltä hermosoluilta. Negatiivisissa kontrollinäytteissä, eli näytteissä jotka oli käsitelty vain sekundääriavastaineella, ei nähty mitään.

Tutkimuksessa kokeiltiin myös fraktalkiinin vaikutusta loppuvaiheen solujen elinkykyisyyteen. Rahoituksen puitteissa oli mahdollisuus kokeilla tätä vain kerran, sillä fraktalkiini on melko kallista. Silmämääräisesti ja valokuvista arvioiden RA:lla erilaistetut solut näyttivät hieman elinkykyisemmiltä fraktalkiini käsittelyn jälkeen, mutta TPA:lla ei näkynyt tällaista eroa. Koska Pulkkinen ym. ovat todenneet fraktalkiinikäsittelyn aiheuttavan CCR5- ja CXCR5-kemokiinireseptorien ilmentymistä RA:lla erilaistetuissa, mutta ei TPA:lla erilaistetuissa soluissa (Julkaisematon tieto. Pulkkinen, K., I. Kärkkäinen,

K. Kurppa, H. Tähti ja T.O. Jalonen. 2006. Fractalkine differentially affects the expression of HIV chemokine co-receptors in human neuroblastoma and astrocytoma cells. *J. Neuroimmunol.*), herättää tämä kysymyksen siitä onko fraktalkiini toiminut näiden reseptorien kautta ja aiheuttanut jonkin elinkykyisyyttä lisäävän reaktiosarjan SH-SY5Y-soluissa ja mikä tämä reaktiosarja ja sen vaikutukset ovat? Olisi mielenkiintoista myös selvittää auttaisiko fraktalkiinikäsittely solujen jatkokasvatuksessa niin, että ne selviäisivät pidemmän kasvatuksen, esimerkiksi neljäntoista päivän ajan. Olisi varmasti hyödyllistä tutkia myös se, miten fraktalkiinikäsittely vaikuttaa S-tyypin solujen ilmenemiseen kyseisessä tapauksessa.

Western Blottingia tehtäessä proteiinipitoisuus oli jo alun perinkin näytteissä hyvin matala. Tutkimuksen aikataulun puitteissa ei kuitenkaan ollut mahdollisuutta kehittää protokollaa paremmaksi. Proteiinin määrää olisi voinut kasvattaa esimerkiksi lisäämällä tai vähentämällä reagenssien määriä, pidentämällä inkubointiaikaa lisäämällä ravistelua tai lisäämällä solujen määrää. Mahdollisesti eristysliuosta olisi myös voinut vaihtaa, sillä nyt käytössä ollut oli suunniteltu sytoplasmisille ja tuman proteiineille, kun taas synaptofysiini on rakkulaproteiini.

Tutkimuksen aikana huomattiin, että soluviljelyyn käytettävät kammioidut peitinlasit vuotivat välillä, joka johti siihen, että viereisissä kammioissa sijaitsevat eri tavoin käsitellyt solut mahdollisesti saivat myös viereisen kammion solujen vaikuttavaa ainetta. Tällaiset peitinlasit pyrittiin poistamaan, mutta on myös mahdollista, että jokin tarpeeksi pieni vuoto jäi huomaamatta. Mietittiin myös voiko synaptofysiiniä poistua liikaa soluista kun permeabilisointiin käytetään Triton X-100:aa. Toisin sanoen: Permeabilisoiko Triton X-100 liikaa solukalvoa, niin että osa synaptofysiinistä ”karkaa” soluista?

Jos tutkimuksen tekemiseen olisi ollut enemmän aikaa, olisi ollut hyvä mitata esimerkiksi neurofilamenttien proteiineja tai jotain solujen tuottamaa välittäjäainetta, joko proteiinien tai geenien ilmentymisen tasolla ja näin todentaa paremmin minkä tyyppisiksi solut eri käsittelyissä tarkemmin ottaen muodostuvat. Olisi ollut myös mielenkiintoista mitata eri solujen sähköistä toimintaa patch-clamp -tekniikan avulla ja mitata apoptoottisten solujen määrää loppukasvatuksen aikana eri tavoin erilaistetuilla soluilla.

Nämä kuitenkin jäävät tulevaisuudessa tutkittaviksi, sillä Pro gradu-tutkielman puitteissa ei näin laajaan asioiden selvittelyyn ole mahdollisuuksia.

Tutkimuksessa huomattiin, että kolesteroli auttoi soluja kasvattamaan enemmän neuriitteja solukeskusta kohden ja lisäksi silloin neuriiteissa näkyi enemmän synapsirakkuloita osoittavaa synaptofysiiniä, jolloin ne luultavasti olivat myös toiminnallisesti aktiivisia hermosoluja. Tätä voidaan pitää osoituksena pidemmälle edenneestä erilaistumisesta, tosin asia vaatii vielä lisäselvityksiä. Koska synteettisiä retinoideja käytetään myös joissain tapauksissa neuroblastoomakasvaimen hoitoon, olisi mielenkiintoista tietää, voisiko kolesteroli lisätä näiden lääkkeiden tehoa kasvainta erilaistettaessa. Varmasti myös fraktalkiinin vaikutuksia kasvaimeen kannattaisi tutkia tämän ja aikaisempien (kuten Zeng ym. 2005) tutkimuksien valossa.

Tätä tutkimusta oli mielenkiintoista ja innostavaa tehdä. Ajan, laitteiden ja rahan rajallisuus kuitenkin harmitti monesti. Ihmisen hermosolujen kehityksen, toiminnan ja rakenteen tutkiminen on kuin ihmisen hermosto itsessään: kun yhden oven aukaisee, uusia reittejä ja polkuja löytyy aina lisää.

11 Lähdeluettelo

- Adlerz, L., M. Beckman, S. Holback, R. Tehranian, V.C. Toro, ja K. Iverfeldt. 2003. Accumulation of the precursor-like protein APLP2 and reduction of APLP1 in retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells upon curcumin-induced neurite retraction. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 119:62-72.
- Asensio, V.C., I.L. Campbell. 1999. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci.* 22:504-512.
- ATCC. The American Culture Collection.
- Bacon, K.B., J.K. Harrison. 2000. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J.Neuroimmunol.* 104:92-97.
- Boehme S.A., F.M. Lio, D. Maciejewski-Lenoir, K.B. Bacon ja P.J. Conlon. 2000. The chemokine fractalkine inhibits fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol.* 165: 397-403.
- Bonavia, R., A. Bajetto, S. Barbero, P. Pirani, T. Florio ja G. Schettini. 2003. *Toxicol Lett.* 139:181-189.
- Clagett-Dame, M., E.M. McNeill, P.D. Muley. 2005. Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J.Neurobiol.* 66:739-756.
- Deiva, K., T. Geeraerts, H. Salim, P. Leclerc, C. Héry, B. Hugel, J.-M. Freyssinet ja M. Tardieu. 2004. Fractalkine reduces N-methyl-D-aspartate-induced calcium flux and apoptosis in human neurons through extracellular signal-regulated kinase activation. *Eur J Neurosci.* 20:3222-3232.
- Edsjö, A., L. Holmquist, S. Pählman. 2006. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Semin Cancer Biol.* doi:10.1016/j.semcancer.2006.04.005
- Encinas, M. M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, A. Muhaisen, V. Ceña, C. Callego ja J.X. Comella. 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent human neuron-like cells. *J. Neurochem.* 75:991-1003.
- Encinas, M., M. Iglesias, N. Llecha, ja J.X. Comella. 1999. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritegenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Neurochem.* 73:1409-1421.
- Gincel, D. ja V. Shoshan-Barmatz. 2002. The synaptic vesicle protein synaptophysin: purification and characterization of its channel activity. *J. Biophys.* 83:3223-3229.
- Hatori, K., A. Nagai, R. Heisel, J.K. Ryu, ja S.U. Kim. 2002. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *J. Neurosci. Res.* 69:418-426.
- Heino, J. ja Vuento M. 2004. Solubiologia. 2. painos. WSOY, Porvoo, Helsinki. 320 s.
- Helsingin yliopisto, Lääketieteellinen tiedekunta, Biolääketieteen laitos. 2006. Kehitysbiologian lukupaketti 4. Ektodermi endodermi ja mesodermi. <http://www.kumpula.helsinki.fi/bllelimi/lukup5.html>.
- Héraud, C., S. Hilairt, J-M. Muller, J-F. Leterrier, ja C. Chadéneau. 2004. Neuritegenesis induced by vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, and peptide histidine methionine in SH-SY5Y cells is associated with regulated expression of cytoskeleton mRNAs and proteins. *J. Neurosci. Res.* 75:320-329.

- Hirano, A. ja J. Llena. 2006. Fine structure of neuronal and glial processes in neuropathology. *Neuropathology* 26:1-7.
- Huttner, W.B. ja A. Schimdt. 2000. Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission – insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol.* 10:543-551.
- Jalonen, T. 1988. Rectifying potassium channel in human neuroblastoma cells teoksessa *Electromagnetic Fields and Biomembranes* toim. M. Blank ja M. Markov. Plenum press, N.Y., USA. s. 211-214.
- Jalonen, T. ja K.E. Åkerman. 1988. Single transient potassium channels in human neuroblastoma cells induced to differentiate in vitro. *Neurosci.Lett.* 86:99-104.
- Jalonen, T. ja K.E. Åkerman. 1986. Single channel ion currents in the TPA-treated human neuroblastoma cells. *Neljännän suomalaisten neurokemistien tapaamisen julkaisut, Turku.* 120:49-50.
- Jia, J., S. Lamer, M. Schumann, M. Schmidt, E. Krause ja V. Haucke. 2006. Quantitative proteomic analysis of detergent-resistant membranes from chemical synapses: evidence for cholesterol as spatial organizer of synaptic vesicle cycling. *Mol Cell Proteomics* (julkaistu verkossa ennen painamista 21.6.2006).
- Kamoshima, W., Y. Kitamura, Y. Nomura ja T. Taniguchi. 1997. Possible involvement of ADP-ribosylation of particular enzymes in cell death induced by nitric oxide-donors in human neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* 30:305-311.
- Lammi M. Solubiologian Web oppikirja. Perustuen Kuopion yliopiston anatomian laitoksen solubiologian kurssin luentomonisteeseen 8.2.1999. <http://www.uku.fi/anatomia/sob/solujohd.htm>.
- Limatola, C., C. Lauro, M. Catalano, M.T. Ciotti, C. Bertollini, S. Di Angelantonio, D. Ragozzini ja F. Eusebi. 2005. Chemokine CX3CL1 protects rat hippocampal neurons against glutamate-mediated excitotoxicity. *J.Neuroimmunol* 166:19-28.
- Mena M.A., M.J. Casarejos, A. Bonin, J.A. Ramos ja J.G. de Yébenes. 1995. Effects of dibutyryl cyclic AMP and retinoic acid on the differentiation of dopamine neurons: prevention of cell death by dibutyryl cyclic AMP. *J. Neurochem* 65:2612-2620.
- Miloso, M., D. Villa, M. Crimi, S. Galbiati, E. Donzelli, G. Nicolini, ja G. Tredici. 2004. retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *J. Neurosci. Res.* 75:241-252.
- Mizuno, T., J. Kawanokuchi, K. Numata ja A. Suzumura. 2003. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res.* 979:65-70.
- Murthy, V.N. ja P. De Camilli. 2003. Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 26:701-728.
- Nath, R., K.J. Raser, K. McGinnis, R. Nadimpalli, D. Stafford ja K.K. Wang. 1996. Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *Neuroreport* 8:249-255.
- Nienstedt, W., O. Hänninen, A. Arstila, S.-E. Björkqvist. 2004. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 15. painos. WSOY, Porvoo. 655 s.
- Okazawa, H., J. Shimizu, M. Kamei, I. Imafuku, H. Hamada ja I. Kanazawa. 1996. Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. *J. Cell Biol.* 132: 955-968
- Pan, Y., C. Lloyd, H. Zhou, S. Dolich, J.A. Gonzalo, J. Vath, M. Gosselin, J. Ma, B. Dussault, E. Woolf, G. Alperin, J. Culpepper, J. Gutierrez-Ramos ja D. Gearing. 1997. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387:611-617.

- Parrow, V., E. Nanberg, J. Heikkilä, U. Hammerling ja S Pählman. 1992. Protein kinase C remains functionally active during TPA induced neuronal differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol.* 152:536-544.
- Pihkala, U., S Wikström, R. Moren, K-M Lähteenoja, U. Uusitalo, T. Schröder, M. Nikiforow ja P. Palmumaa. 2001. Neuroblastooma: opas vanhemmille. Sylva, Helsinki. 71s.
- Roskoski, R. Jr ja LM. Roskoski. 1987. Activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells by the cyclic GMP and cyclic AMP second messenger system. *J Neurochem.* 48:236-242.
- Ross, R.A., J.L. Biedler, B.A. Spengler. 2003. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer lett.* 197:35-39.
- Sanchez, S., C.L. Sayas, F. Lim, J. Avila ja F. Wandosell. 2001. The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3. *J Neurochem.* 78:468-481.
- Sarkanen R., J. Siikanen, J. Nykky, M.I. Karjalainen, M. Vuento, T. Ylikomi ja T.O. Jalonen. 2004. Development of synaptic contacts in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Tiivistelmä verkkojulkaisussa: Neurobiology of Lipids. 3:5. Julkaistu 13.09.2004. <http://neurobiologyoflipids.org/content/3/5/>.
- Sastry, P.S., ja K.S. Rao. 2000. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem.* 74(1):1-20.
- Solunetti. Suomen virtuaaliyliopisto. Solubiologia. 2006. <http://www.solunetti.fi/fi/>.
- Tanaka, E., ja J. Sabry. 1995. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.
- Thomas, L., K. Harung, D. Langosch, H. Rehm, E. Bamberg, W.W. Franke, ja H. Betz. 1988. Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242:1050-1053.
- Uehara, T., U. Kikuchi ja Y. Nomura. 1999. Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 72:196-205.
- Valtorta, F., M. Pennuto, D. Bonanomi, ja F. Benfenati. 2004. Synaptophysin: leading actor or walk on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays* 26:445-453.
- Vu, D., P. Marin, C. Walzer, M.M. Cathieni, E.N. Bianchi, F. Saïdji, G. Leuba, C. Bouras, ja A. Savioz. 2003. Transcription regulator LMO4 interferes with neuritogenesis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 115:93-103.
- Walton, J.D., D.R. Kattan, S.K. Thomas, B.A. Spengler, H-F. Guo, J.L. Biedler, N-K.V. Cheung ja R.A. Ross. 2004. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* 6:838-845.
- Zeng, Y., J. Jiang, N. Huebener, J. Wenkel, G. Gaedicke, R. Xiang ja H.N. Lode. 2005. Fractalkine gene therapy for neuroblastoma is more effective in combination with targeted IL-2. *Cancer Lett.* 228 (1-2):187-193.

12 Liitteet

12.1 LIITE 1: Kasvatusliuos SH-SY5Y soluille

200 ml kasvatusliuosta:

87 ml Minimum Essential Medium w Earle's salts w/o L-Glutamine (Gibco 21127-022)

1 ml L-Glutamiinia (Gibco 25030-024)

1 ml Non-essential Amino acids (Gibco 11140-035)

sekoitetaan ja joukkoon lisätään:

89 ml Nutrient Mixture Kaighn's modification w L-Glutamine (Gibco 21127-022)

20 ml Foetal Bovine Serum (Gibco 10106-169)

2 ml Antibiotic-Antimycotic (Gibco 15240-062)

12.2 LIITE 2: Petausaine fluoresenssimikroskopiaa varten

50 mg p-fenyleenidiamiinia liuotetaan 5 ml:aan PBS:ää. Seos suodatetaan tummaan foliolla peitettyyn pulloon pimeässä ja lisätään 45 ml glyseriiniä. Säädetään pH 8:aan 0,5 M karbonaattipuskurilla pH 9,0

Sekoitus tapahtui niin, että laboratoriomestari Ulla Jukarainen oli tehnyt valmiiksi 100 µl:n annoksia PBS:ään liuotetusta ja suodatetusta p-fenyleenidiamiinista jotka säilytettiin pakastimessa -70°C:ssa ja yhteen annokseen lisättiin tarvittaessa 900 µl glyseriiniä, ja 12 µl 0,5 M Natrium karbonaattia pH 9,0. Foliolla peitetty 1,5 ml:n eppendorf-putkilo säilytettiin pakastimessa -20 °C:ssa ja heitettiin pois jos liuos oli tummunut, sillä silloin se oli vanhentunut.

12.3 LIITE 3: SDS-PAGE-liuokset

Ylägeeli:

6,1 ml tislattua vettä
2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
100 µl 10 % SDS
1,3 ml akryyliamidi/Bis
100 µl 10 % APS
10 µl TEMED

Alageeli:

3,35 ml tislattua vettä
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
100 µl 10 % SDS
4 ml akryyliamidi/Bis
50 µl 10 % APS
5 µl TEMED

Ajopuskuri:

Laimennettiin 5x ajopuskurista
80 ml 5x ajopuskuri
320 ml tislattu vesi

Siirtopuskuri:

3,03 g TRIS

14,4 g glysiini

200 ml metanoli

tislattua vettä ad 1000 ml

Näytepuskuri:

4,0 ml tislattu vesi

1.0 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,8 ml glyserolia

1,6 ml 10 % SDS

0,2 ml bromifenoli sininen

Ennen käyttöä lisättiin 5 % 2-b-merkaptotanolia 100 µl 1ml:aa kohden

12.4 LIITE 4: Western Blotting-liuokset

TBS-käyttöliuos:

Laimennettiin 10x tiivisteestä

TBS-0,05% tween:

1000 ml TBS-käyttöliuosta

500 µl tween

5% Maito-TBS-tween:

50 ml TBS-0,05% tween + 2,5 g maitojauhetta

1% Maito-TBS-tween:

100 ml TBS-0,05% tween + 1 g maitojauhetta