

**TNF- α :n, IL-1 β :n JA *CANDIDA*-ALTISTUKSEN VAIKUTUS IHMISEN β -
DEFENSIINITUOTANTOON SUUN LIMAKALVON KERATINOSYYTTI- JA
KIELISYÖPÄSOLULINJOISSA**

TNF- α :n, IL-1 β :n ja *Candida*-altistuksen vaikutus ihmisen β -defensiinituotantoon suun
limakalvon keratinosyytti- ja kielisyöpäsolumulinjoissa
Raudasoja Päivi
Hammaslääketieteen laitos
Oulun yliopisto
Maaliskuu 2014
professori Tuula Salo / EHL Aleksi Rytönen

TIIVISTELMÄ

Raudasoja, Päivi: TNF- α :n, IL-1 β :n ja Candida-altistuksen vaikutus
ihmisen β -defensiinituotantoon suun limakalvon
keratinosyytti- ja kielisyöpäsolulinjoissa
Syventävien opintojen tutkielma: 21 sivua

Ihmisen β -defensiinit (hBD) ovat epiteelisoluissa tuotettavia lyhyitä peptidejä, joilla on todettu olevan antimikrobiaalista aktiivisuutta bakteereja, sieniä ja viruksia vastaan. β -defensiini-1:stä (hBD-1) tuotetaan epiteelisoluissa jatkuvasti, kun taas hBD-2 ja hBD-3 β -defensiinien ekspresio lisääntyy tulehdustiloissa.

Useiden eri sytokiiniinien vaikutuksia β -defensiinituotantoon on tutkittu terveiden henkilöiden ien- tai suulakikudosnäytteistä eristetyissä keratinosyyttisoluviljelmissä. Nyt tehdyn tutkielman tarkoituksena oli testata tuumorinekroositekijä α :n (TNF- α), interleukiini-1 β :n (IL-1 β) ja Candida-altistuksen aikaansaamia vaikutuksia β -defensiini-1:n, -2:n ja -3:n pitoisuuksiin ikenen keratinosyyttisoluviljelmässä (HMK) sekä kielen levyepiteelikarsinomasoluviljelmässä (HSC-3).

Käytettävät tutkimusmenetelmät olivat soluviljely, RNA:n eristys, kaksi erilaista polymeraasiketjureaktiota ja elektroforeettinen erottelu. Lisäksi β -defensiini-2:sta tutkittiin entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA).

Analysointien jälkeen saatiin tulokseksi, että β -defensiini-1:n mRNA-tuotanto ei juurikaan muuttunut induktoreiden vaikutuksesta huolimatta. Sen sijaan β -defensiini-2:lla mRNA-määrä nousi selvästi sekä TNF- α :n että IL-1 β :n läsnäollessa molemmissa solulinjoissa, muutos oli jopa lähes seitsenkertainen. Candida-altistuskokeessa ei saatu riittävästi hBD-2:ta analysoinnin onnistumiseksi. β -defensiini-3:n mRNA-tasossa tapahtui keratinosyyttisoluisissa vain hieman muutosta IL-1 β :n läsnäollessa, kun taas HSC-3-soluilla TNF- α :n vaikutuksesta ekspresio kasvoi noin kolminkertaiseksi ja IL-1 β :kin lisäsi ekspressiota.

Yhteenvetona voidaan todeta sekä TNF- α :n että IL-1 β :n lisäävän selvästi hBD-2-mRNA:n tuotantoa ikenen keratinosyytti- ja kielen levyepiteelikarsinomasoluviljelmissä ja TNF- α :n lisäävän hBD-3-mRNA:n tuotantoa kielen levyepiteelikarsinomasolulinjassa.

KIRJALLISUUSKATSAUKSESSA KÄYTETYT LYHENTEET

bp	base pairs, emäskoko
BPE	bovine pituitary extract, naudan aivolisäkeuute
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C.dubliensis</i>	<i>Candida dubliensis</i>
<i>C.glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C.krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C.parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C.tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CCR6	chemokine receptor 6, kemokiinireseptori 6
cDNA	komplementaarinen DNA
CH ₃ COOH	etikkahappo
CO ₂	hiilidioksidi
CXCR	CXC chemokine receptor, CXC kemokiinireseptori
dATP	deoxyadenosine triphosphate, deoksiadenosiinitrifosfaatti
dCTP	deoxycytidine triphosphate, deoksisytidiinitrifosfaatti
dGTP	deoxyguanosine triphosphate, deoksiguanosiinitrifosfaatti
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoksiribonukleiinihappo
dNTP	deoxyribonucleotidine triphosphate, deoksiribonukleotiinitrifosfaatti
DTT	ditiotreitoli
dTTP	deoxythymidine triphosphate, deoksitymidiinitrifosfaatti
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
EGF	epidermal growth factor, epidermaalinen kasvutekijä
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
FBS	fetal bovine serum, vasikan alkion seerumi
hBD	human β -defensin, ihmisen β -defensiini

hBD-1	human β -defensin 1, ihmisen β -defensiini-1
hBD-2	human β -defensin 2, ihmisen β -defensiini-2
hBD-3	human β -defensin 3, ihmisen β -defensiini-3
HIV	human immunodeficiency virus, ihmisen immuunikatovirus
HMK	human mucosal keratinocyte, ihmisen ikenen keratinosyyttisolu
HSC-3	human squamous cell carcinoma, ihmisen kielen levyepiteelikarsinoomasolu
HSV	herpes simplex virus
IFN- γ	interferoni- γ
IL-1 β	interleukiini-1 β
IL-2	interleukiini-2
IL-6	interleukiini-6
IL-8	interleukiini-8
IL-12	interleukiini-12
LPS	lipopolysakkaridi
mRNA	messenger-RNA, lähetti-RNA
O ₂	happi
OSCC	oral squamous cell carcinoma, suun levyepiteelikarsinoomasolu
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PCR	polymerase chain reaction, polymeraasiketjureaktio
RLT	RNA:n eristyksessä käytettävä kaupallinen lyysipuskuri
RNA	ribonukleiinihappo
RNAasi	ribonukleaasi
RT-PCR	reverse transcriptase-PCR, käänteiskopioija-PCR
SA-HRP	Streptavidin-Horseradish peroxidase
TAE	Tris-etikkahappo-EDTA –puskuri
TNF- α	tuumorinekroositekijä- α
Tris	tris(hydroksimetyyli)aminometaani
UV	ultravioletti

SISÄLLYS

1. JOHDANTO	1
1.1. Immunitetti	1
1.2. β-defensiinit	1
<i>1.2.1. β-defensiini-1</i>	4
<i>1.2.2. β-defensiini-2</i>	4
<i>1.2.3. β-defensiini-3</i>	5
1.3. Sytokiinit TNF-α ja IL-1β	6
1.4. <i>Candida</i>-lajit	6
2. TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA	6
3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT	7
4. KÄYTETYT SOLULINJAT JA TUTKIMUSMENETELMÄT	7
4.1. Solulinjat	7
4.2. Käytetyt tutkimusmenetelmät	8
<i>4.2.1. Soluviljely</i>	8
<i>4.2.2. Molekyylibiologiset menetelmät</i>	10
<i>4.2.2.1. RNA:n eristys</i>	10
<i>4.2.2.2. PCR:t</i>	10
<i>4.2.2.3. Agarosigeelielektroforeesi</i>	11
<i>4.2.3. ELISA</i>	12
5. TULOKSET	13
6. POHDINTA	16
7. LÄHTEET	19

1. JOHDANTO

1.1. Immunitetti

Ihmisellä puolustautuminen taudinaiheuttajia vastaan voidaan jakaa synnynnäiseen ja hankittuun immunitettiin. Synnynnäisessä immunitetissä puolustusreaktiot toistuvat samanlaisina kerta toisensa jälkeen, kun taas hankitussa immunitetissä taudinaiheuttajasta jää muisti ensimmäisen kohtaamisen seurauksena. Synnynnäiseen immunitettiin kuuluvat mm. matala pH-arvo, limakalvojen epiteelit, komplementtijärjestelmä sekä useat entsyymit. Se reagoi nopeasti, mutta pystyy tunnistamaan vain rajallisesti taudinaiheuttajien rakenteita. (Meri 2003)

Synnynnäisen immunitetin tärkeys korostuu suuontelossa, joka on risteyskohta ihmistä ympäröivän ympäristön ja kehon sisäosien välillä. Suussa limakalvon tehtävänä on muodostaa fysikokemiallinen este, jolloin immuunipuolustus voi estää taudinaiheuttajien invaasiota elimistöön. Suu on myös ainoa alue elimistössä, jossa kovakudos eli hampaat puhkaisevat muuten yhtenäisen epiteelipinnan. (de Sousa Gomes ja Fernandes 2010)

Synnynnäiseen immunitettiin kuuluu antimikrobiaalisia peptidejä, polypeptidejä, joiden pituus on alle 100 aminohappoa. Näitä ovat mm. katelisiidiinit ja defensiinit. Ihmiseltä löydetään α - ja β -defensiiniperheeseen kuuluvia defensiinejä. Näiden lisäksi on θ -defensiinejä, joita tavataan vain muutamilla apinalajeilla. (Ganz 2003, Lehrer 2004, Prado-Montes de Oca 2010)

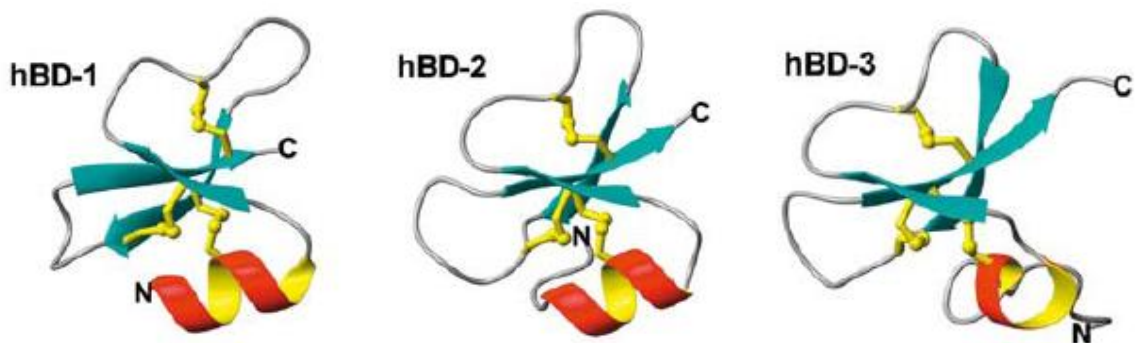
1.2. β -defensiinit

Ihmisen β -defensiinit (hBD) ovat lyhyitä kationisia peptidejä, joita tuotetaan useiden kudosten kuten ihon, keuhkojen, silmien ja suun epiteelisoluissa. Defensiineillä on antimikrobiaalista aktiivisuutta gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteereja sekä sieniä ja viruksia vastaan (Abiko ym. 2003, Lehrer 2004, Abiko ym. 2007, Diamond ym. 2008). Nimi ”defensiini” tulee latinan sanasta *defendo*, joka tarkoittaa torjumista (Prado-Montes de Oca 2010). Virusten osalta tiedetään, että defensiineillä on antimikrobiaalista aktiivisuutta vaipallisia ja vaipattomia viruksia vastaan. Virusten tuhoamismekanismeihin kuuluvat niin suorat (sitoutuminen virukseen) kuin epäsuoratkin (esim. virusreplikaation inaktivointi) menetelmät. (Diamond ym. 2008)

Useat geenit koodaavat β -defensiinejä. Tiedetään, että β -defensiini-1:stä (hBD-1) tuotetaan soluissa jatkuvasti, kun taas β -defensiini-2:n (hBD-2) ja β -defensiini-3:n (hBD-3) tuotanto lisääntyy tulehdustiloissa. (Abiko ym. 2003, Lehrer 2004, Abiko ym. 2007, Meyer ja Harder 2007)

Pääosa β -defensiinien geneistä sijaitsee kromosomissa 8 alueella p23. Geenikopioiden lukumäärä vaihtelee yksilöiden välillä. Liian suuri geenikopioiden määrä on yhteydessä krooniseen ihon tulehdussairauteen, psoriasikseen ja liian vähäinen määrä (erityisesti hBD-2:n geenikopioita) liittyy krooniseen suolistosairauteen, Crohnin tautiin. (Gisbert ja Gomollón 2008, Semple ym. 2010)

Defensiinien mikrobeja tuhoava vaikutus ei ole täysin selvillä. Arvellaan, että defensiinit sitoutuvat mikrobien kalvoihin muodostaen niihin reikiä, jolloin solu hajoaa lyttisesti (Bissell ym. 2004). Oletusta tukee defensiinien rakenne, jossa on sekä hydrofiilinen että hydrofobinen osa, jolloin liittyminen mikrobien fosfolipidikalvoon olisi mahdollista (Krisanaprakornkit ym. 1998). Defensiinien rakenteiden tyypillisiä piirteitä ovat kolme β -taso-rikasta aluetta ja kuusi kysteiniä, joiden välille muodostuu kolme disulfidisiltaa. (Ganz 2003, Pazgier ym. 2006, Meyer ja Harder 2007, kuva 1)

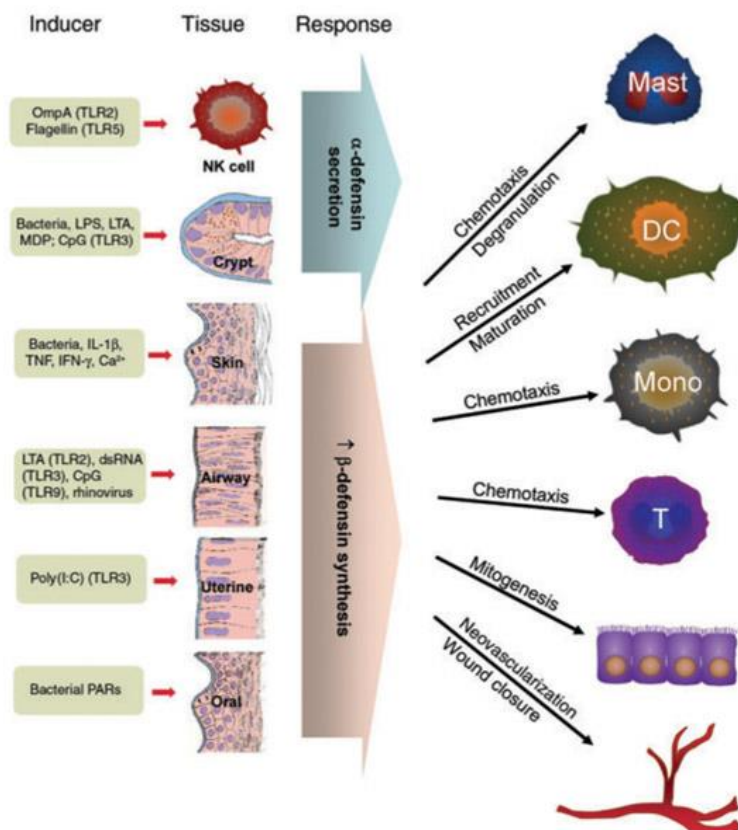


Kuva 1: β -defensiinien rakenteet. Spiraalit kuvaavat α -helix-rakenteita. Nuolet osoittavat β -tasoja ja rakenteita yhdistävät paksummat osat ovat kysteiniinien välille muodostuneita disulfidisiltoja. (kuva muokattuna lähteestä Pazgier ym. 2006) N tarkoittaa N-terminaalista päätä ja C tarkoittaa C-terminaalista päätä proteiinin rakenteessa.

Taulukko 1: hBD-1:n, hBD-2:n ja hBD-3:n aminohappojärjestykset. Taulukon tiedot muokattu Diamond ym. 2008. Alkuperäislähteessä aminohappojärjestykset on saatu ClustalW-hakuohjelmalla, joka löytyy Internet-osoitteesta <http://www.clustal.org/>. Kysteiniinit esitetään lihavoituna harmaalla taustalla.

hBD-1	-----DHYN C VSSGGQCLYSAC P IFTKIQGT C YRGK---AK C CK---
hBD-2	-----DPVTCLKSGA ICHPVFC P RRYKQIGTCGLPG---TK C CK---
hBD-3	GIINTLQKY C RV R GG R CAVLS C LPKEEQIG K CSTRG---RK C CR R KK

Defensiinien on todettu toimivan linkkinä synnynnäisen ja hankitun immunitetin välillä: defensiinit houkuttelevat kemotaktisesti dendriittisoluja ja muisti-T-soluja mikrobien luokse kemokiinireseptori 6:n (CCR6) välityksellä (Bissell ym. 2004, Diamond ym. 2008). Niiden on myös osoitettu osallistuvan mast-solujen aktivaatioon ja degranulaatioon, jolloin histamiinia ja prostaglandiineja vapautuu (Meyer ja Harder 2007). Lisäksi defensiinit osallistuvat tulehduksen vähenemiseen, fibroblasti- ja epiteelisolujen jakautumiseen sekä edistävät verisuonten uudismuodostusta ja haavan sulkeutumista (Selsted ja Ouellette 2005, kuva 2). Kaikkia β -defensiinien vaikutusreittejä ei vielä tunneta. (Diamond ym. 2008)



Kuva 2: Defensiinituotannon indusoijia ja vastevaikutuksia. Vasemmalla on lueteltu tekijöitä, jotka lisäävät α - ja β -defensiinien tuotantoa eri kudoksissa. Oikealla on kuvattu lisääntyneen tuotannon aikaansaamia vasteita elimistössä (kuva kopioitu Selsted ja Ouellette 2005).

1.2.1. β -defensiini-1

Ihmisen β -defensiini-1 löydettiin vuonna 1995 munuaissairaahan potilaan plasmasta (Bensch ym. 1995). 36 aminohapon pituista hBD-1:stä tuotetaan jatkuvasti ihon keratinosyyteissä (Krisanaprakornkit ym. 1998, Pazgier ym. 2006) sekä virtsa- ja hengitysteiden epiteelisoluissa (Prado-Montes de Oca 2010), eikä tulehdustilan ole todettu lisäävän sen ekspressiota (Bissell ym. 2004). hBD-1:n aktiivisuus kohdistuu lähinnä gram-negatiivisiin bakteereihin, kuten *Escherichia coliin* (*E.coli*) ja *Pseudomonas aeruginosaan* (*P.aeruginosa*) (taulukko 2). Gram-positiivisia bakteereita kohtaan aktiivisuus on vähäistä (Joly ym. 2004). hBD-1:n muuttuneen geeniekspression on arveltu olevan yhteydessä ainakin kahteenkymmeneen eri sairauteen, kuten tulehduksellisiin ihosairauksiin, ihon allergisiin reaktioihin (Prado-Montes de Oca 2010) ja kystiseen fibroosiin (Singh 1998). Suun alueella hBD-1:stä tuotetaan eniten lähellä marginaalista ientä. (Diamond ym. 2008)

1.2.2. β -defensiini-2

Pari vuotta hBD-1:n löytymisen jälkeen 39 aminohappoa sisältävä β -defensiini-2 eristettiin psoriasispotilaan ihosta (Harder ym. 1997, Pazgier 2006). hBD-2:sta ekspressoidaan vain mikrobien tai tulehduksesta viestivien molekyylien läsnäollessa. Se on aktiivinen lähinnä gram-negatiivisiin bakteereihin (taulukko 2) kuten hBD-1:kin, mutta hBD-2 näyttäisi olevan noin kymmenen kertaa tehokkaampi bakterisidi testattuihin *E.coliin* ja *P.aeruginosaan* verrattuna hBD-1:een. Kyseisessä tutkimuksessa ko. bakteerit kuolivat kun hBD-2:ta oli kymmenesosa pitoisuus hBD-1:n pitoisuudesta (Singh ym. 1998, Joly ym. 2004). Suun patogeeneista hBD-2:n aktiivisuus on 100 % aerobibakteereihin, mutta vain noin 21 % anaerobibakteereihin. (Pazgier ym. 2006)

Suussa hBD-2:sta tuotetaan marginaalisen ikenen lähellä, johon biofilmiä helposti kertyy. Lisäksi tulehdustiloissa sulkusalueen epiteelisoluissa on hBD-2:ta (Diamond ym. 2008). Kohonneita β -defensiini-2 määriä on havaittu suun tulehduksellisissa epiteelileesioissa, Sjögrenin syndroomassa ja suusyövässä. Yhtenä hypoteesina β -defensiinien aktiivisuudesta syöpäsoluja kohtaan on β -defensiinien korkea positiivinen varaus: syöpäsolujen solukalvoilla on enemmän anionisia fosfolipidejä kuin normaalisolulla ja siksi syöpäsolut saattavat olla herkkiä kationisille peptideille. (Abiko ym. 2007)

1.2.3. β -defensiini-3

β -defensiini-3:n eristivät psoriaatikon ihon hilseestä samanaikaisesti kaksi tutkimusryhmää vuonna 2001 (Garcia ym. 2001, Harder ym. 2001). Mikrobiaktiivisuudeltaan 45 aminohapon pituinen hBD-3 poikkeaa selvästi hBD-1:stä ja hBD-2:sta. Sillä on osoitettu olevan laaja aktiivisuus sekä gram-positiivisia että gram-negatiivisia bakteereja vastaan huomattavasti pienemmillä pitoisuuksilla kuin muilla β -defensiiniperheen jäsenillä (Joly ym. 2004, Pazgier 2006). Bissell'n ym. (2004) tutkimuksen mukaan terveen kudoksen korkea hBD-3 lähetti-RNA (mRNA)-pitoisuus saattaa viitata suojaavaan vaikutukseen parodontaalipatogeenejä vastaan, vaikkakin hBD-3:n aktiivisuus anaerobibakteereita vastaan on noin 50 % (Pazgier ym. 2006). hBD-3 inhiboi myös *Herpes simplex*-viruksen (HSV) infektoimiskykyä estämällä viruksen sitoutumista ja sisäänpääsyä. Vastaavaa ei havaittu hBD-1:llä tai -2:lla. (Hazrati ym. 2006)

hBD-2:n ja -3:n aktiivisuuden uskotaan olevan syynä siihen, että HIV-positiivisilla henkilöillä on syljen HIV-pitoisuus matala, noin 1 %. Lisäksi epidemiologisesti on todettu eksogeenisen, suun kautta tarttuvan HIV-infektion olevan harvinainen. Tutkimusten mukaan HIV-1 kannat X4 ja R5 indusoivat hBD-2- ja hBD-3-mRNA:n tuotannon 78-kertaiseksi normaalitasoon nähden, jolloin HIV-infektio estyy (Weinberg ym. 2006). β -defensiinit joko tarttuvat suoraan viruksen vaipparakenteisiin tai muokkaavat viruksen CXCR4 kemokiinireseptori 4:n (CXCR4) rakennetta siten, ettei virus pysty sitoutumaan (Diamond ym. 2008). Yhteenvetona hBD-1:n, -2:n ja -3:n antimikrobiaalisista vaikutuksista eri mikrobeihin on koottu taulukko 2.

Taulukko 2: β -defensiinien antimikrobiaaliset vaikutukset eri mikrobeihin. (muokattu Pazgier ym. 2006)

Defensiini	Patogeeni
hBD-1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
hBD-2	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>HIV-1</i>
hBD-3	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>HIV-1</i>

1.3. Sytokiinit TNF- α ja IL-1 β

Sytokiineja tunnetaan yli sata erilaista. Ne ovat pääasiallisia välittäjämolekyylejä puolustus- ja tulehdusvasteessa solujenvälisessä kommunikaatiossa. Sitoutumalla reseptoriinsa nämä lyhytikäiset liukoiset valkuaisaineet ovat mukana monissa solun tärkeimmässä tapahtumissa, kuten solun lisääntymisessä, aktivoitumisessa ja solukuolemassa. Tulehduksen aikana monet solut, mm. leukosyytit ja fibroblastit erittävät sytokiineja ja niiden vaikutukset ovat pääosin paikallisia. (Taylor 2000, Julkunen ym. 2003)

Sytokiinit jaetaan tulehdusta edistäviin eli proinflammatorisiin ja tulehdusta alentaviin eli anti-inflammatorisiin. Tuumorinekroositekijä alfa (TNF- α) ja interleukiini 1-beta (IL-1 β) ovat proinflammatorisia sytokiineja, joten niillä on merkitystä erityisesti tulehdusreaktion alussa. TNF- α on tehokas sytokiini, jonka tehtävänä on yleisesti tehostaa solujen aktivaatiota. IL-1 β kuuluu laajaan interleukiinien proteiiniperheeseen. Sen tehtäviä ovat mm. leukosyyttien, epiteeli- ja endoteelisolujen stimulaatio. Stimuloituneet solut tuottavat lisää biologisesti aktiivisia aineita, kuten kemokiineja tehostaen solujenvälisiä interaktioita. (Julkunen ym. 2003)

1.4. *Candida*-lajit

Candida-hiivat kuuluvat suun normaaliflooraan eivätkä terveelle ihmiselle aiheuta tautia, vaikka ovatkin heikkoja patogeenejä. Immunitetin laskiessa ne saattavat aiheuttaa infektioita, joita kutsutaan kandidoosiksi. Yleisin taudinaiheuttaja on *Candida albicans* (*C.albicans*, Regezi ym. 2008, Gallè ym. 2013). Muita *Candida*-infektion aiheuttajia ovat mm. *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ja *C.krusei*. Yleensä kandidoosi on suun limakalvolla tai iholla oleva pinnallinen, väriltään vaalea tai punainen muutos. (Regezi ym. 2008)

2. TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

Taustana syventävien opintojen aiheelle on vuonna 2005 julkaistu tutkimus, jossa otettiin kudoksenäytteitä ikeneltä ja suulaesta terveiltä tupakoimattomilta henkilöiltä. Kudoksenäytteet muokattiin keratinosyyttisoluviljelmiksi ja keratinosyyttisoluja indusoiitiin useilla eri interleukiineilla, TNF- α :lla, IFN- γ :lla (interferoni gamma) tai *E.colin* lipopolysakkarideilla (LPS) 24 tunnin ajan. Tuloksiksi he saivat, että hBD-1-mRNA-tasot olivat korkeampia ja hetero-

geenisempiä kuin hBD-2:n tai -3:n mRNA-tasot, mutta indusoimaton pitoisuus oli havaittavissa kaikilla kolmella defensiinillä. hBD-1:stä indusoidessa sen mRNA:n tuotto kasvoi ainoastaan IFN- γ :n vaikutuksesta, hBD-2:lla pääosin IL-1 β :n ja TNF- α :n vaikutuksesta ja -3:lla IFN- γ :n ja TNF- α :n vaikutuksesta yli puolessa testatuista soluviljelmistä. (Joly ym. 2005)

Saman tutkimusryhmän toisessa tutkimuksessa vuodelta 2009 viljeltiin suun ja nielun alueen levyepiteelikarsinoomasolulinjoja (OSCC). Kontrollina oli keratinosyyttisolulinja. Näiden solulinjojen hBD-1, -2 ja -3 mRNA-määriä tutkittiin indusoiduilla soluilla 24 tunnin ajan IL-1 β :lla, TNF- α :lla, IFN- γ :lla, niiden yhdistelmällä tai *E.colin* LPS:lla. Tuloksina he havaitsivat peruspitoisuuden hBD-1:llä, -2:lla ja -3:lla OSCC-soluissa ja kuten keratinosyyttitutkimuksessa, hBD-1:n mRNA-pitoisuudet olivat korkeampia ja vaihtelevampia eri OSCC-solulinjojen välillä kuin hBD-2:lla tai -3:lla. Induktiokokeen tuloksina he saivat, ettei hBD-1:n tai -3:n mRNA-pitoisuuksissa ollut eroa OSCC- ja keratinosyyttisolujen välillä indusoinnista huolimatta. hBD-2:n mRNA-taso kasvoi selvästi OSCC-soluissa IL-1 β :n vaikutuksesta ja jonkin verran myös TNF- α :n vaikutuksesta. (Joly ym. 2009)

3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSONGELMAT

Syventävien opintojen tavoitteena oli tutkia ihmisen β -defensiinien 1, 2 ja 3 mRNA-tasoa kielisyöpäsoluissa verrattuna normaaleihin suun limakalvosoluihin, kun ekspressiota indusoidiin TNF- α :lla tai IL-1 β :lla. mRNA-pitoisuuden muutokset määritettiin polymeraasiketjureaktioista saatuja tuloksia analysoimalla. Defensiiniekspression muutosta verrattiin indusoidun kontrollisoluviljelmään. β -defensiini-2:n tuotantoa tutkittiin lisäksi *Candida*-altistuskokeella indusoiduilla kielisyöpäsoluilla kuudella eri *Candida*-lajilla. Tulokset analysoitiin entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA).

4. KÄYTETYT SOLULINJAT JA TUTKIMUSMENETELMÄT

4.1. Solulinjat

Tutkimuksessa käytettiin kahta eri ihmissolulinjaa: suun limakalvon keratinosyyttisolulinjaa (HMK), jotka on eristetty ienbiopsiasta (Mäkelä ym. 1999) ja kaupallista kielen levyepiteelikarsinomasolulinjaa (HSC-3). (Matsumoto ym. 1989, JCRB Cell Bank 0623, Osaka, Japan)

Haavanparanemistutkimusta varten ienbiopsiasta eristettyjen HMK-solujen todettiin spontaanisti mutatoituneen siten, että ne jakaantuvat loputtomasti (Salo ym. 1994, Mäkelä ym. 1999). Ne eivät kuitenkaan ole pahanlaatuisia tai invasoivia syöpäsoluja ja tutkimuksen kannalta HMK-soluja käsitelläänkin normaalisolaina.

HSC-3-solut ovat peräisin kielen levyepiteelikarsinooman kasvaimesta 64-vuotiaalta mieheltä. Solut eristettiin Japanissa 1980-luvun puolivälissä, jolloin myös niiden viljely aloitettiin. HSC-3-solut ovat pahanlaatuisia, aggressiivisia ja leviävät helposti. (Matsumoto ym. 1989, JCRB Cell Bank 0623, Osaka, Japan)

4.2. Käytetyt tutkimusmenetelmät

Yhtä soluviljelykoetta kohti suoritettiin tutkimusmenetelmiä kolmessa vaiheessa. Aluksi viljeltiin soluja ja indusoiitiin niitä TNF- α :lla tai IL-1 β :lla. Seuraavassa vaiheessa solunäytteet analysoitiin eristämällä niistä RNA, monistamalla sitä PCR:lla ja erottelemalla saadut näytteet elektroforeettisesti. Lopuksi geelivyöhykkeiden kirkkaudet mitattiin numeeristen lukuarvojen saamiseksi. β -defensiini-2:n pitoisuuksia tutkittiin lisäksi *Candida*-kokeella, jota varten kasvatettiin HSC-3-soluja, altistettiin ne eri hiivakannoille ja analysoitiin mediumit ELISA:lla.

4.2.1. Soluviljely

Soluviljelyssä kasvatetaan yhtä solutyyppeä kiinteällä alustalla sopivassa elatusliuoksessa eli mediumissa ja inkubaatiokaapissa, jossa on 5 % CO₂, 21 % O₂ ja +37°C. Menetelmänä soluviljely on erikoistiloja sekä steriiliä ja huolellista työskentelyä vaativaa.

Mediumit koostuvat liuoksesta, joka sisältää solujen kasvun kannalta tarpeellisia aminohappoja, vitamiineja ja suoloja sekä siihen lisättävistä aineista, joilla medium saadaan optimaaliseksi juuri kyseiselle solukannalle. HMK-solujen kasvatusliuos koostui Keratinocyte-SFM-mediumista (Life Technologies), johon lisättiin siihen kuuluvat lisäravinteet (epidermaalinen kasvutekijä EGF 0.005 μ g/ml ja naudan aivolisäkeuute BPE 0.05mg/ml, Life

Technologies), kalsiumia 0.1 %, penisilliini-streptomysiiniseosta (100 U/ml penisilliiniä-0.1 mg/ml streptomysiiniä, Sigma Aldrich) estämään bakteereiden kasvua ja Fungizone-sienilääkettä 0.1 % (Sigma Aldrich) inhiboimaan sienten kasvua. HSC-3-solujen kasvatusliuoksen pohjana oli Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12, Life Technologies), johon lisättiin penisilliini-streptomysiiniseosta (100 U/ml-0.1mg/ml), Fungizonea 0.1 %, antioksidanttina toimivaa askorbiinihappoa 0.05mg/ml (AppliChem), hydrokortisonia 0.2mg (Sigma Aldrich) pitämään soluja erillään toisistaan sekä 10 % inaktivoitua vasikan seerumia (FBS, Biowhittaker Lonza), jossa on mm. useita solujen tarvitsemia kasvutekijöitä. Vaikutukset solujen kasvussa, muodossa, kiinnittymisessä alustaan jne. näkyvät nopeasti lisättäessä aineita mediumiin tai jätettäessä jotain pois. Solujen laskennat ja tarkastelut kasvatusten aikana tehtiin mikroskoopin (Leitz Diavert) avulla.

HMK-soluja kasvatettiin aluksi kasvatuspullossa (Corning Incorporated) 60-80 % konfluentiksi eli pullon pohjan peittäväksi solukerrokseksi. Tähän alkukasvatukseen kului reilu viikko. Solut irrotettiin 1x trypsiini-EDTA:lla (valmistettu porsaan haimasta, 10x kantaliuoksen trypsiinipitoisuus 0.5%, Sigma Aldrich). Vaikutusajan (10-15 min) jälkeen trypsiini-EDTA:n vaikutus neutraloitiin trypsiini-inhibiittorilla (Sigma Aldrich) ja loput solut irrotettiin soluraaputtimella. Hemosytometrillä suoritettua solulaskennan jälkeen 500 000 solua siirrettiin kuuskuoppalevyn (Corning Incorporated) jokaiseen kuoppaan kiinnittymään. HMK-solujen kiinnittyttyä noin 2 vrk:n kuluttua soluille vaihdettiin medium, jossa oli joko 200 ng/ml TNF- α :aa (Sigma Aldrich) tai IL-1 β :aa (Calbiochem). Kontrolli-HMK:t kasvatettiin induktorivapaassa mediumissa. Kasvatuskoe kesti 24 tuntia, jonka jälkeen mediumit kerättiin talteen. Solut pestiin kolmesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS-puskuri, Sigma Aldrich) ja irrotettiin alustastaan soluraaputtimella käyttäen nesteinä RNeasy Mini kit:n (Qiagen) RLT-puskuria, joka lyysipuskurina aloitti solujen hajotusta. Lopullisesti keratinosyytit hajotettiin Qiagenin Qiasredder kit-menetelmällä. Solulysaatti säilytettiin -70 °C:ssa RNA:n eristystä varten.

HSC-3-soluja kasvattiin neljän päivän ajan, jolloin kasvatuspullo oli 60-80 % konfluentti. Solut irrotettiin 1x trypsiini-EDTA:lla, jonka vaikutus neutraloitiin noin 10 min kuluttua 10 % FBS:ia sisältävällä mediumilla. Laskennan jälkeen 500 000 solua siirrettiin kuuskuoppalevyn kuoppiin kiinnittymään vastaavasti kuin HMK-soluilla. HSC-3-solut kiinnittyivät noin vuorokaudessa. Ennen induktiokokeen aloittamista HSC-3-solut pestiin kolmesti PBS:lla, sillä koeksessa käytettiin seerumivapaata laktalbumiini-mediumia. Tämä valmistettiin kuten kasvatusmediumkin, mutta FBS:n sijaan lisättiin laktalbumiinia (Sigma Aldrich) pitoisuuteen 0,5 %.

Pesujen jälkeen solut laitettiin kasvamaan laktalbumiinimediumiin, jossa oli 200 ng/ml TNF- α :a tai IL-1 β :a. Kontrollisolut kasvatettiin ilman induktoria laktalbumiinimediumissa. Indusointi kesti 24 tuntia, jonka jälkeen mediumit ja solut kerättiin talteen vastaavasti kuin HMK-soluilla.

β -defensiini-2:n *Candida*-kokeeseen valittiin solukannaksi HSC-3. Positiiviseksi kontrolliksi hBD-2-pitoisuutta lisäämään otettiin IL-1 β ja hiivakannoiksi seuraavat *Candida*-lajit: *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.dubliensis* ja *C.parapsilosis*. Hiivanäytteissä, jotka saatiin toiselta tutkimusryhmältä, oli ollut 10 miljoonaa solua ml:ssa ennen solujen hajoitusta. Koetta varten HSC-3-solujen alkukasvatus tehtiin kuten induktiotestissä. Siirryttäessä laktalbumiinimediumiin lisättiin 50 μ l hiivanäytettä muihin paitsi kontrollisoluihin. *Candida*-kokeen kesto oli 24 tuntia, jonka jälkeen mediumit kerättiin ja tulokset analysoitiin ELISA:lla β -defensin-2 (Human) ELISA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. 2010)-ohjeen mukaisesti.

4.2.2. Molekyylibiologiset menetelmät

4.2.2.1. RNA:n eristys

RLT-puskurilla ja Qiasredder kit:llä aloitettu RNA:n eristys tehtiin loppuun Qiagenin RNeasy Mini kitillä valmistajan ohjeen mukaisesti eluoimalla RNA lopputilavuuteen 30 μ l. Eristetyn RNA:n pitoisuus ja puhtaus määritettiin spektrofotometrisesti mittaamalla absorbanssiarvot aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm Bio-Radin SmartSpecTM 3000 –spektrofotometrillä käyttäen Bio-Rad trUViewTM -kertakäyttökyvettejä.

4.2.2.2. PCR:t

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (*polymerase chain reaction*) on menetelmä, jolla saadaan monistettua haluttu alue RNA:sta, DNA:sta tai komplementaarisesta DNA:sta (cDNA) käyttämällä spesifisiä alukkeita. PCR-menetelmiä on useita, joista tässä työssä on käytetty kahta. Ensin RT-PCR:lla (*reverse transcriptase*- eli käänteiskopioija-PCR) käännettiin eristetty RNA cDNA:ksi. Tämän jälkeen ei-kvantitatiivisella PCR:lla monistettiin cDNA:sta haluttua DNA-sekvenssiä.

Käänteiskopioija-PCR:ssa tarvitaan eristetyn RNA:n (1-2 µg) lisäksi koostumukseltaan erilaisia lyhyitä, 10 nukleotidin pituisia juosteita (*random decamers*, 50 ng/µl, Life Technologies), nukleasivapaata vettä (Ambion), dNTP-seosta (10 mM sisältäen 25 µmol dATP:tä, dGTP:tä, dCTP:tä ja dTTP:tä, Fermentas), 5x ensijuostepuskuria (*first strand*, Life Technologies), ditiotreitolia (DTT, 0.1 M, Life Technologies), RNAasi-inhibiittoria (40 Units/µl, Promega) ja SuperScript III RT-entsyymiä (200 Units/µl, Life Technologies). RNA:n kääntäminen cDNA:ksi tehtiin PCR-laitteen (Eppendorf Mastercycler gradient) ohjelmalla, jonka lämpötilat ja ajat olivat seuraavat: vaihe 1: 42°C 1 h, vaihe 2: 95°C 10 min ja vaihe 3: 4°C.

Ei-kuantitatiivisessa PCR:ssa käytettiin spesifisiä oligonukleotidialukkeita (Sigma Aldrich) hBD-1:lle, -2:lle, -3:lle ja β-aktiinille. β-aktiini on *housekeeping*-geeni eli sitä tuotetaan solussa jatkuvasti ja siksi siitä saadaan vertailukohde tutkittaessa ei-säännöllisesti tuotettavan proteiinin ekspressiota. Alukesekvenssit ja PCR-tuotteiden kokotiedot on esitetty taulukossa 3. Alukkeiden ja cDNA:n lisäksi reaktioseos sisälsi nukleasivapaata vettä, 10x PCR-puskuria (Roche/Applied Biosystems), dNTP-seosta ja Amplitaq-entsyymiä (Roche/Applied Biosystems).

Taulukko 3: Oligonukleotidialukkeiden sekvenssit ja valmiiden PCR-tuotteiden koot.

Geenin nimi	Alukkeen emäsjärjestys, forward (5'-3')	Alukkeen emäsjärjestys, reverse (5'-3')	PCR-tuote (emäsparia)
β-aktiini	CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC	AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC	587
hBD-1	ATGAGA AACTTCTACCTTCTGCT	TCACTTGCAGCACTT	207
hBD-2	CCAGCCATCAGCCATGAGGGT	GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA	255
hBD-3	AGCCTAGCAGCTATGAGGATC	CTTCGGCAGCATTTTCGGCCA	206

DNA:n tuottamiseen cDNA:sta käytettiin seuraavaa ohjelmaa: vaihe 1: 95°C 5 min, vaihe 2: 95°C 1 min, vaihe 3: 54°C 1 min, vaihe 4: 72°C 1 min, vaihe 5: kohtia 2-4 toistetaan 40x, vaihe 6: 72°C 10 min ja vaihe 7: 4°C. PCR:lla saatiin DNA:ta monistettua riittävästi agarosi-geelelektroforeettista analysointia varten.

4.2.2.3. Agaroosigeelelektroforeesi

Agaroosigeelielektroforeesilla saadaan eripituiset DNA–juosteet eroteltua kokonsa perusteella sähkökentässä. DNA-juosteet kulkevat kohti positiivista sähkövarausta, koska ne ovat negatiivisesti varautuneita molekyyliä. Geelin valmistukseen käytettiin SeaKem LE-agarosia (Cambrex) ja visualisointiin käytettiin etidiumbromidia (Sigma Aldrich). Kooltaan tiedettyjen standardien avulla voitiin tarkistaa PCR:lla monistetun DNA:n olleen oikeankokoista. Erotteluun käytettiin 1 % agarosigeeliä, standardina oli Biolabsin Quick-load 100 bp DNA ladder, joka sisälsi koot 1517 bp, 1200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 517/500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp ja 100 bp. Analysointiliuoksena oli 50x kantaliuoksesta 1x laimennettu TAE-puskuri (kantaliuos: 2M Tris, 1M CH₃COOH, 0.1M EDTA pH 8,5) ja erotteluolosuhteina oli 110 V noin 35 min ajan, jonka jälkeen geelejä tarkasteltiin UV-valossa.

Analysoinnin helpottamiseksi standardikoot 1000 bp ja 517/500 bp näkyivät muita kirkkaampina UV-valolaitteessa (BRL UV transilluminator TFX-35M, Life Technologies). Geelit kuvattiin AlphaDigiDocTM RT–kameralla ja –kuvausohjelmalla tai Polaroid 664, Polapan Pro 100 Black & White–filmille International Biotechnologies Inc-kameralla (model QSP # 22).

Numeerinen arvo geelillä näkyvän vyöhykkeen kirkkaudelle määritettiin Bio-Radin Quantity One–ohjelmalla (versio 4.6), jonka jälkeen kuvaajat tehtiin OriginPro 8.0–ohjelmalla (OriginLab Corporation) vertaamalla defensiini-mRNA:n määrää β -aktiini-mRNA:n määrään.

4.2.3. ELISA

hBD-2:sta tutkittiin hiivasolualtistuksen läsnä ollessa ELISA-menetelmällä, eli entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Kyseisessä menetelmässä antigeeni ja sen vasta-aine sitoutuvat kovalenttisesti toisiinsa. Näytteeseen lisätään myös jotain väriä tuottavaa indikaattoria, esimerkiksi peroksidaasia, jonka avulla tulos voidaan analysoida spektrofotometrisesti. ELISA on herkkä menetelmä ja sitä käytetäänkin tutkimustyön lisäksi kliinisissä testeissä, kuten HIV-testissä, koska näytteeksi sopivat kasvatuliuoksen ohella seerumi tai plasma. (Mathews ym. 2000, Phoenix Pharmaceuticals, Inc. 2010)

HSC-3-solujen kasvatuksen, *Candida*-altistuksen ja mediumien keräämisen jälkeen tulokset analysoitiin β -defensin-2 (Human) ELISA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. 2010)-ohjeen mukaisesti. Nollakontrollina oli hiivalle altistamaton ja positiivisena kontrollina IL-1 β -indu-

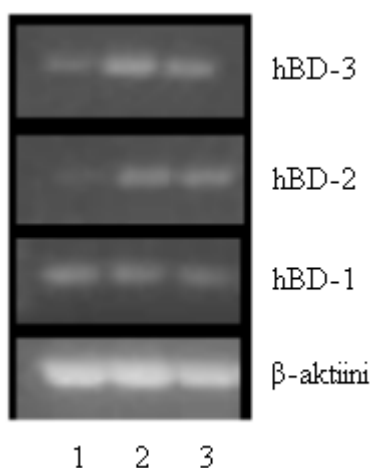
soitu mediumnäyte. Pitoisuuden määrittämiseen oli menetelmän oma hBD-2-standardiliuos. Vasta-aineena oli biotinyloitu ihmisen β -defensiini-2:n vasta-aine ja indikaattorina Streptavidin-Horseradish peroksidaasi (SA-HRP). Näytteissä olleen hBD-2:n pitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti mittaamalla absorbanssi-arvot aallonpituudella 450 nm.

ELISA:n herkkyys on korkea, hBD-2:n määrä voidaan mitata konsentraatiolla 7,8-500 pg/ml. Mittaustulokset olivat kuitenkin liian matalia, suurin osa näytteiden absorbanssi-arvoista oli alimman standardin absorbanssi-arvon alapuolella eikä pitoisuutta voi silloin määrittää. Todettiin ettei *Candida*-tutkimusta kannata jatkaa eikä matalia mittaustuloksia esitetä tässä työssä.

5. TULOKSET

HSC-3-soluilla tehtiin aluksi kolmen aikapisteen koe, jolla selvitettiin tulevien induktiotestien induktioaika. Koeajoiksi valittiin 4, 24 ja 48 tuntia, valinta tehtiin agarosigeelien (kuvia ei esitetä) ja solujen ulkonäön perusteella. Sopivaksi induktioajaksi todettiin 24 tuntia, sillä 4 tuntia oli selvästi liian lyhyt aika induktion vaikutusten ilmenemiseen ja 48 tunnin jälkeen vyöhykkeet geelillä olivat jo himmenneet ja lisäksi solut kärsivät selvästi ravinnottomasta kasvatusliuoksesta. Vastaava 24 tuntia valittiin suoraan HMK-solujen kasvatusajaksi.

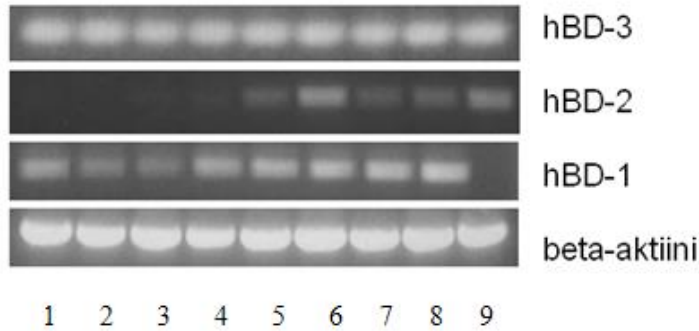
HSC-3-solujen kontrollin ja induktorien kolmesta rinnakkaisnäytteestä valittiin vain yhdet RNA:n eristykseen, koska tuntemattomasta syystä johtuen kolmesta TNF- α -solukasvustoista kahdessa oli laajalti solukuolemaa eikä niiden analysointi olisi ollut järkevää. Vertailun vuoksi myös kontrolli- ja IL-1 β -näytteistä valittiin analysointiin vain yhdet. Soluista eristettiin



RNA, tehtiin PCR:t niin β -aktiinista kuin defensiineistäkin, eroteltiin PCR-tuotteet agarosigeelillä ja kuvattiin ne. Vertailukelpoisiksi järjestellyt geelivyöhykkeet ovat kuvassa 3.

Kuva 3. Defensiinien ekspression vertailu β -aktiinin ekspression HSC-3-soluissa. Näytejärjestys: 1 kontrolli, 2 TNF- α ja 3 IL-1 β . Eristetyt RNA:t käännettiin cDNA:ksi, jota monistettiin PCR:lla ja tulokset visualisoitiin 1 % agarosigeelillä.

Vastaavasti käsiteltyjen HMK-solujen agarosigeelien vyöhykkeet vertailua varten on esitetty kuvassa 4. Erona HSC-3-solujen tuloksiin on se, että HMK-soluista analysoitiin kaikki näytteet eli rinnakkaisnäytteitä oli kolmet.



Kuva 4. Defensiinien ekspresion vertailu β-aktiinin ekspressioon HMK-soluissa. Näytejärjestys: 1-3 kontrolli, 4-6 TNF-α ja 7-9 IL-1β. Eristetyt RNA:t käännettiin cDNA:ksi, monistettiin PCR:lla ja visualisoitiin 1 % agarosigeelillä.

Quantity One-ohjelmalla tehdyn analysoinnin jälkeen saatiin numeerista dataa. Ohjelma määrittä geelillä näkyvän vyöhykkeen kirkkauden eli mRNA-pitoisuuden antaen tulokseksi lukuarvon. Sen perusteella laskettiin kontrolli-, TNF-α- ja IL-1β-näytteiden defensiinipitoisuuksien suhde β-aktiinin pitoisuuteen. Saadut luvut hBD-1:n osalta on esitetty taulukossa 4, hBD-2:n osalta taulukossa 5 ja hBD-3:n osalta taulukossa 6.

Taulukko 4: Vyöhykkeiden kirkkausmittausten tulokset hBD-1:n osalta

Solulinja	Näyte	Näytevyöhykkeen kirkkaus / β-aktiini vyöhykkeen kirkkaus	Keskiarvo	Muutos kontrolliin (%)
HMK	kontrolli	(216) 417, 779	598	100
	TNF-α	614, 669, 779	687	114
	IL-1β	767, 854	810	135
HSC-3	kontrolli	805	805	100
	TNF-α	874	874	109
	IL-1β	630	630	78

β-defensiini-1:n tuloksissa (taulukko 4) nähdään HMK-solujen kontrollinäytteiden osalta muista mittaustuloksista poikkeavan suuri hajonta (minimi 216, maksimi 779) mittauspisteiden välillä. Mikäli matalin mittaustulos (216) jätetään huomioimatta muista selvästi poikkeavana, nousee HMK-kontrollinäytteiden keskiarvo 470:stä 598:aan, joka on huomattavasti lähempänä indusoidujen näytteiden keskiarvolukemia (TNF-α 687 ja IL-1β 810). Poikkeava lukema voi johtua esimerkiksi siitä, etteivät solut ole kasvaneet yhtä hyvin kuin muissa näytteissä tai analyysivaiheessa on tullut jonkin reagenssin mittaustulovirhe. Jotain vastaavaa on tullut myös HMK-solujen IL-1β:n kolmanteen rinnakkaisnäytteeseen, eikä agarosigeelissäkään

(kuva 4) erotu vyöhykettä näytteen 9 kohdalla. HSC-3–solujen osalta näytteiden välillä ei ole suuria eroavaisuuksia verrattaessa kontrollin keskiarvoa (805) indusoitujen näytteiden keskiarvoihin (TNF- α 874, IL-1 β 630). Valitettavasti HSC-3-solunäytteistä vain yhdet näytteet kolmesta saatiin analysoitavaksi.

Taulukko 5: Vyöhykkeiden kirkkausmittausten tulokset hBD-2:n osalta

Solulinja	Näyte	Näytevyöhykkeen kirkkaus / β -aktiini-vyöhykkeen kirkkaus	Keskiarvo	Muutos kontrolliin (%)
HMK	kontrolli	58	58	100
	TNF- α	119, 264, 486	289	498
	IL-1 β	273, 294, 539	368	634
HSC-3	kontrolli	123	123	100
	TNF- α	816	816	663
	IL-1 β	611	611	497

hBD-2:n tuloksissa havaitaan selvä ero verrattaessa HMK- ja HSC-3-solujen kontrollinäytteitä sytokiineilla indusoituihin näytteisiin. Erityisen selvä on ero HSC-3–solujen kontrolli- ja TNF- α –näytteiden välillä; ero on lähes seitsemänkertainen kontrollin lukeman ollessa 123 ja indusoidun näytteen 816. Ero vastaavaan IL-1 β –näytteeseen on noin viisinkertainen (123 vs. 611). Myös HMK-soluissa hBD-2:n pitoisuus lisääntyy indusoinnin myötä selvästi kontrolliin verrattuna, mutta toisin kuin syöpäsoluissa IL-1 β lisäsi ekspressiota hieman enemmän, noin kuusinkertaisesti (58 vs. 368) kuin TNF- α (noin viisinkertaisesti, 58 vs. 289). HMK-solujen kontrollinäytteistä vain yhdestä saatiin määritettyä pitoisuus Quantity One–ohjelmalla kahden muun vyöhykkeen (kuva 4) ollessa liian heikkoja määrittelykseen.

Taulukko 6: Vyöhykkeiden kirkkausmittausten tulokset hBD-3:n osalta

Solulinja	Näyte	Näytevyöhykkeen kirkkaus / β -aktiini-vyöhykkeen kirkkaus	Keskiarvo	Muutos kontrolliin (%)
HMK	kontrolli	25, 35, 24	28	100
	TNF- α	30, 25, 24	26	93
	IL-1 β	35, 59, 33	42	150
HSC-3	kontrolli	429	429	100
	TNF- α	1254	1254	292
	IL-1 β	619	619	144

hBD-3:n osalta näyttää sekä geelin (kuva 4) että vyöhykemittaustulosten (taulukko 6) perusteella siltä, ettei HMK-solujen hBD-3–ekspressiossa tapahdu juuri mitään muutosta sytokii-

nien lisäämisestä huolimatta (kontrollin keskiarvo 28, TNF- α 26 ja IL-1 β 42). Sen sijaan HSC-3-soluilla TNF- α :n vaikutuksesta ekspressio kasvaa lähes kolminkertaiseksi (1254) verrattuna kontrolliin (429) ja IL-1 β :kin lisää ekspressiota hieman (619 vs. 429).

6. POHDINTA

Tutkimuksessamme mitattiin ihmisen β -defensiini-1:n, -2:n ja -3:n mRNA-tasoja kielisyöpä-soluissa ja normaaleissa suun limakalvosoluissa, kun β -defensiinien tuottoa indusoitiin TNF- α :lla tai IL-1 β :lla. mRNA-pitoisuuksien muutokset määritettiin PCR:illa ja niitä verrattiin indusoimattomien kontrollisolujen mRNA-tasoon. hBD-2:n tuotantoa tutkittiin myös *Candida*-altistuskokeella ja analysoinnit tehtiin mediuumeista ELISA:lla.

Joly tutkimusryhmineen on tutkinut β -defensiinejä -1, -2 ja -3 ja niiden mRNA-pitoisuuksien muutoksia sytokiinien vaikutuksesta (Joly ym. 2005). He olivat keränneet kudoksenäytteitä terveestä ikenestä tai suulaesta 14 tupakoimattomalta henkilöltä. Kudoksenäytteen epiteeli irrotettiin mekaanisesti sidekudoksesta ja epiteelisoluista valmistettiin keratinosyyttisoluviljelmä. Defensiinien mRNA-tuottoa indusoitiin viidellä eri interleukiinilla (IL-1 β , -2, -6, -8 ja -12), TNF- α :lla, IFN- γ :lla (pitoisuudet 100 tai 200 ng/ml) ja *E.colin* LPS:lla (10 μ g/ml).

He totesivat, että kaikkien kolmen defensiinin mRNA:ta ilmentyi indusoimattomissa näytteissä, mutta hBD-1:llä mRNA-tasot olivat selvästi korkeampia ja heterogeenisempiä 14 näytteen kesken kuin -2:lla tai -3:lla. Samansuuntainen tulos nähdään myös meidän tutkimuksessamme: HMK-solujen indusoimattomat näytteet tuottivat enemmän hBD-1:stä kuin -2:sta tai -3:sta.

Indusointien jälkeen Jolyn tutkimusryhmä havaitsi, että hBD-1-mRNA:n tuotto kasvoi ainoastaan IFN- γ :n vaikutuksesta. Meidän tuloksemme poikkeaa Jolyn tuloksesta: TNF- α ja IL-1 β lisäsivät molemmat hieman hBD-1-mRNA:n pitoisuutta; IL-1 β enemmän kuin TNF- α . Jolyn ryhmällä hBD-2-mRNA:n pitoisuus kasvoi eniten IL-1 β :n ja jonkin verran myös TNF- α :n ja lisäksi yhdessä soluviljelmässä joko IL-2:n, IL-6:n tai LPS:n vaikutuksesta. Samansuuntaisen tuloksen sain omassa tutkimuksessani: hBD-2:n mRNA-määrä nousi selvästi TNF- α :n ja IL-1 β :n vaikutuksesta. hBD-3 indusoitui tehokkaimmin Jolyn tutkimuksessa: hBD-3-mRNA-taso kasvoi IFN- γ :n ja TNF- α :n vaikutuksesta yli puolessa soluviljelmistä, 2-3 soluviljelmässä IL-

1 β :n tai IL-6:n ja yhdessä IL-2:n vaikutuksesta. Jolyn työhön verrattuna tuloksemme oli erilainen TNF- α :n osalta: sillä ei juuri ollut vaikutusta hBD-3-mRNA:n määrään. Sen sijaan IL-1 β :n vaikutuksesta mRNA-taso nousi jonkin verran, mikä oli myös Jolyn saama tulos. Lisäksi Jolyn induktiotestin perusteella IL-8 ja IL-12 eivät vaikuttaneet yhdessäkään soluviljelmässä hBD-1:n, -2:n tai -3:n ekspressioon, eikä myöskään induktorien pitoisuudella (100 tai 200 ng/ml) ollut vaikutusta defensiini-mRNA:n ekspressiotasoon.

Toisessa artikkelissa (Joly ym. 2009) viljeltiin 19 ihmiseltä saatuja suun ja nielun alueen levyepiteelikarsinomasolulinjoja (OSCC). Kontrollisolulinjana oli 44 ihmisen terveestä suun limakalvonäytteestä (poskesta, ikeneltä) koostuva keratinosyyttisolulinja. Solujen kasvatuksen jälkeen hBD-1:n, -2:n ja -3:n mRNA-määriä tutkittiin indusoimalla soluja IL-1 β :lla, TNF- α :lla, IFN- γ :lla, niiden yhdistelmällä (pitoisuus 100ng/ml) tai *E.colin* LPS:lla joko matalalla (200ng/ml) tai korkealla (10 μ g/ml) pitoisuudella. Induktioaika oli 24h.

hBD-1, -2 ja -3 tuotettiin OSCC-soluissa ja hBD-1:n mRNA-määrä oli korkeampi ja vaihtelevampi eri OSCC-solulinjojen välillä kuin hBD-2:lla tai -3:lla. Keratinosyyttisoluihin verrattuna hBD-1-mRNA-taso oli selvästi matalampi OSCC-soluissa, kun puolestaan hBD-2:n ja -3:n mRNA-tasot OSCC-soluissa olivat melko samansuuruiset kuin keratinosyyttisoluiissa. Työsämme HSC-3-solujen kontrollinäytteen mRNA-pitoisuus oli hBD-1:n osalta selvästi korkeampi kuin hBD-2:lla tai -3:lla, kuten oli Jolyn tutkimuksessakin. Toisin kuin Jolyn ym. työssä HSC-3-soluilla mRNA-määrät olivat kaikilla kolmella β -defensiinillä korkeammat kuin HMK-keratinosyyteillä.

Jolyn työssä induktoreilla ei ollut vaikutusta OSCC- ja keratinosyyttisolujen hBD-1:n tai hBD-3:n mRNA-pitoisuuksiin. hBD-2:n mRNA-taso kasvoi selvästi OSCC-soluissa IL-1 β -indusoinnin vaikutuksesta ja jonkin verran myös TNF- α :n vaikutuksesta kontrollisoluihin nähden. Työssäni induktiokokeesta saatu tulos poikkeaa Jolyn tuloksesta: HSC-3-soluilla mRNA-pitoisuudet kasvoivat kaikissa muissa näytteissä paitsi hBD-1:n IL-1 β -näytteessä HMK-soluihin verrattuna. Erityisen selkeä mRNA-tason nousu indusoinnin myötä on HSC-3-solulinjan hBD-3:n TNF- α -näytteessä, kun sitä verrataan HMK-solulinjan TNF- α -näytteeseen.

Verrattaessa Jolyn ym. (2009) ja oman työmme tuloksia tulee huomioida, etteivät OSCC- ja HSC-3-solut ole samanlaisia, vaikka molemmat ovat suun karsinomasolulinjoja. OSCC-solut

oli kerätty useilta henkilöiltä suun ja nielun alueelta. HSC-3 oli kaupallinen, yhden henkilön kielisyöpäkasvaimesta peräisin oleva solulinja. Tämä saattaa osaltaan selittää näiden tutkimusten erilaisia tuloksia. Lisäksi HSC-3-solujen kahdessa TNF- α -näytteessä oli laajalti solu-kuolemaa eikä niitä otettu analysoitavaksi. Vertailun vuoksi myös HSC-3:n kontrolli- ja IL-1 β -näytteistä analysoitiin vain yhdet, eikä siksi voida arvioida esimerkiksi indusoimattomien HSC-3-solujen hBD-1-mRNA-pitoisuuksien vaihtelua.

Defensiinit ovat useita tutkimusryhmiä kiinnostava kohde. Mielenkiinto defensiinejä kohtaan on ymmärrettävää niiden laaja-alaisen immuunipuolustuksen vuoksi ja toisaalta muutokset geeniekspressiossa vaikuttavat altistavan tai jopa aiheuttavan lukuisia sairauksia. Tiedon lisääntyessä ja tutkimuksen laajentuessa *in vitro*-menetelmistä *in vivo*-menetelmiin tullaan oppimaan enemmän immuunijärjestelmän toiminnasta, josta voi tulevaisuudessa olla hyötyä esimerkiksi HI-virusinfektion estämisessä. Työssämme tutkittiin ihmisen β -defensiini-1, -2 ja -3 mRNA-määriä ilman indusointia ja indusointien jälkeen kahdessa eri solulinjassa. Kovin varmoja johtopäätöksiä näin pienellä aineistolla tehdyn tutkimuksen tuloksiin on vaikea sanoa. Induktiotesti tulisi ehdottomasti toistaa huolellisesti laajemmalla näytemäärällä ja useammilla solulinjoilla.

7. LÄHTEET

Abiko Y, Nishimura M ja Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc* 2003; 36: 247-52.

Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D ja Kaku T. Role of β -defensins in oral epithelial health and disease. *Med mol morphol* 2007; 40: 179-84.

Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P ja ForssmannWG. hBD-1: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS letter* 1995; 368: 331-5.

Bissell J, Joly S, Johnson GK ym. Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 278-85.

de Sousa Gomes P ja Fernandes MH. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. *J Oral Pathol Med* 2010; 39: 1-9.

Diamond G, Beckloff N ja Ryan LK. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *J Dent Res* 2008; 87: 915-27.

Gallè F, Colella G, Di Onofrio V, Rossiello R, Angelillo IF ja Liguori G. *Candida* spp. in oral cancer and oral precancerous lesions. *New Microbiol.* 2013; 36: 283-8.

Ganz T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 710-20.

Garcia JR, Jaumann F, Schulz S ym. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 257-64.

Gisbert JP ja Gomollón F. Crohn's disease –Defect in innate defence. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5499-503.

Harder J, Bartels J, Christophers E ja Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861.

Harder J, Bartels J, Christophers E ja Schröder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-13.

Hazrati E, Galen B, Lu W ym. Human α - and β -defensins block multiple steps in Herpes simplex virus infection. *J Immunol* 2006; 177: 8658-66.

Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank 0623 [HSC-3], Osaka, Japan (Luettu 16.7.2010). Saatavissa: http://cellbank.nibio.go.jp/cellbank_e.html.

Joly S, Maze C, McCray PB Jr. ja Guthmiller JM. Human β -defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1024-29.

Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr. ja Guthmiller JM. Correlation between β -defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005; 42: 1073-84.

Joly S, Compton LM, Pujol C, Kurago ZB ja Guthmiller JM. Loss of human β -defensin 1, 2, and 3 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 353-60.

Julkunen I, Silvennoinen O ja Hurme M. Sytokiinit, niiden toiminta ja kliininen merkitys. Kirjassa: Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheri A, Valtonen V, toim. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2003, s. 734-747.

Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN ja Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human β -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998; 66: 4222-8.

Lehrer RI. Primate defensins. *Nat rev microbiol* 2004; 2: 727-38.

Mathews CK, van Holde KE ja Ahern KG, toim. *Biochemistry*. Addison Wesley Longman, Inc, 2000, s. 253.

Matsumoto K, Horikoshi M, Rikimaru K ja Enomoto S. A study of an in vitro model for invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 498-501.

Meri S. Johdanto immunologiaan. Kirjassa: Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheri A, Valtonen V, toim. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2003, s. 621-622.

Meyer JE ja Harder J. Antimicrobial peptides in oral cancer. *Curr Phar Design* 2007; 13: 3119-30.

Mäkelä M, Larjava H, Pirilä E ym. Matrix metalloproteinase 2 (Gelatinase A) is regulated to migration of keratinocytes. *Exp cell res* 1999; 251: 67-78.

Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W ja Lubkowski J. Human β -defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1294-1313.

Phoenix Pharmaceuticals, Inc. β -Defensin 2 (Human) ELISA kit protocol. 2010, Burlingame, CA, USA.

Prado-Montes de Oca E. Human β -defensin 1: A restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 800-4.

Regezi JA, Sciubba JJ ja Jordan RCK. Nonepithelial white-yellow lesions. Kirjassa: Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK, toim. Oral pathology, clinical pathologic correlations. Missouri: Saunders Elsevier, 2008, s.98.

Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H ja Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994; 70: 176-82.

Selsted ME ja Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005; 6: 551-7.

Semple F, Webb S, Li H-N ym. Human β -defensin 3 has immunosuppressive activity *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1073-8.

Singh PK, Jia HP, Wiles K ym. Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 14961-6.

Taylor PC. Antibodies for inflammatory disease: cytokines. *Methods Mol Med* 2000; 40: 115-39.

Weinberg A, Quiñones-Mateu ME ja Lederman MM. Role of human β -defensins in HIV infection. *Adv Dent Res* 2006; 19: 42-8.