



**FURIINIPUUTTEISEN HIIREN
SUOLISTOTULEHDUKSEN
KARAKTERISOINTI**

**Geeniekspressioanalyysi hiiren
paksusuolen kudoksenäytteistä**

Wilhelmiina Niinen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2014
Laboratorioalan koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

NIININEN, WILHELMIINA

Furiinipuutteisen hiiren suolistotulehduksen karakterisointi:
Geeniekspressioanalyysi hiiren paksusuolen kudostenäytteistä

Opinnäytetyö 40 sivua
Joulukuu 2014

Tulehdukselliset suolistosairaudet ovat kroonisia ja uusiutuvia tulehdustiloja suolistossa, eikä niiden syytä vielä tarkasti tunneta. Kaksi yleisintä tulehduksellista suolistosairautta ovat Crohnin tauti ja haavainen paksusuolitulehdus. Sairauksien oletetaan syntyvän normaalin mikrobiflooran aiheuttamasta tavallista voimakkaammasta immuunivasteesta suoliston limakalvoilla, mistä seuraa kudosten vahingoittuminen. Lisätekijöitä ovat geneettinen alttius sekä ympäristön ja ravinnon vaikutukset.

Tiettyjen T-soluvasteiden tiedetään vaikuttavan suolistotulehduksen syntyyn. Lisäksi T-soluaktivaation ja proinflammatoristen sytokiinien erityksen on osoitettu kroonistuvan suolistosairauksissa. Hiirille on todettu syntyvän suolistotulehdus, kun niiden T-soluista on poistettu proproteiinikonvertaasientsyymi furiini. Furiinin on osoitettu säätelevän immuunijärjestelmää, mutta sen toimintaa suolistotulehduksessa ei vielä kuitenkaan täysin tunneta.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia ennalta valittujen sytokiinien ja transkriptiotekijöiden ekspressoitumista suolistotulehduksessa. Työn avulla oli mahdollista saada osaltaan selville tulehduksen mekanismeja sekä nähdä millaisia eroja sytokiiniekspressiossa muodostuu, kun furiini on poistettu T-soluista ja myeloisista soluista. Tarkoituksena oli karakterisoida suolistotulehdus hiirilinjasta, jossa furiini on poistettu T-soluista ja tarkastella mahdollisia tulehduksen merkkejä linjassa, jossa furiini on poistettu hiiren myeloisista soluista. Karakterisointi tehtiin kvantitatiivisen sytokiini- ja transkriptiotekijäekspressioanalyysin avulla.

Sytokiiniekspressio oli suurinta niillä hiirillä, joilla furiini oli poistettu T-soluista. Villityypin hiirillä ekspressiotasot olivat odotetusti pienemmät. Myeloisen furiinipuutteisen hiirilinjan sytokiiniekspressiot olivat niin ikään furiini-T-solupuutteisia hiiriä pienemmät, eikä niillä todettu erityisiä tulehduksen merkkejä. Saadut tulokset tukevat aiempia oletuksia siitä, että proinflammatoristen sytokiinien tuotanto tulehduksellisissa suolistosairauksissa on lisääntynyt. Myös furiinilla on tulehduksen kehittämisessä merkitystä, mutta sen toiminta on rajoittunut T-imusoluihin, sillä poistettaessa furiini T-soluista syntyy tulehdus. Sen sijaan furiinin puuttuminen myeloisista soluista ei merkitsevästi kiihdytä tulehdusta. Tulevissa tutkimuksissa voitaisiin selvittää suoliston mikrobikantaa kudosspesifisesti poistogeenisistä furiinilinjoista, jolloin furiinin mahdollisesta yhteydestä mikrobistoon saataisiin lisää tietoa.

Asiasanat: geeniekspressio, furiini, suolistotulehdus, sytokiini, reaaliaikainen PCR

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Science

NIININEN, WILHELMIINA

Characterisation of Inflammatory Bowel Disease in Furin Deficient Mice:
Gene Expression Analysis of Murine Large Intestine Tissue Samples

Bachelor's thesis 40 pages
December 2014

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are chronic and recurrent disorders whose origin is yet unclear. Two most common versions of IBD are Crohn's disease and ulcerative colitis. The main cause behind the diseases is thought to be a person's own luminal flora triggering overactive mucosal immune response which leads to intestinal tissue damage. Genetic susceptibility, environment and nutriment also play a role in this.

Certain T cell responses are known to have an effect on IBDs. The activation of T cells and the secretion of proinflammatory cytokines have been shown to become chronic in these diseases. Furin T cell deficient mice have got an inflammatory bowel disease. Furin is a notable factor in the specimens' evolution and it has several target proteins. Its function in IBD is not fully understood although it has been shown that it regulates the immune system.

The aim of the thesis was to research the expression of cytokines and transcription factors in IBD. The cytokines and transcription factors were chosen beforehand. By the results of the work it was possible to get some information about the mechanisms of the IBD and see if there were any differences in cytokine expression between two different mouse models. The purpose of the thesis was to characterise the inflammatory bowel disease from mouse models which had the furin knocked out from T cells. A further goal was to observe potential inflammation marks from mice which had furin removed from myeloid cells. The characterisation was made with the help of quantitative cytokine and transcription factor expression analysis.

Cytokine expressions were highest with those mice that had furin removed from T cells. The wild type mice had lower expression levels as expected. The expression levels for the myeloid furin deficient mice were lower and there were no particular inflammation marks. The results support the theory that the production of proinflammatory cytokines in inflammatory bowel disease has increased. Moreover furin has some significance with the progress of inflammation because when it was removed from T cells the mice had inflammation, whereas the deletion of furin from myeloid cells did not cause notable inflammation. In future the microbiota of the intestines could be researched with furin knock out mice in which case we could get more information about the possible connection with furin and microbiota.

Key words: gene expression, furin, inflammatory bowel disease, cytokine, real-time PCR

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1	Tulehdukselliset suolistosairaudet	7
2.2	Furiini.....	7
2.3	Sytokiinit.....	11
2.3.1	Interferoni-gamma.....	11
2.3.2	Tuumorinekroositekijä-alfa.....	12
2.3.3	Interleukiinit	12
2.4	Transkriptiotekijät.....	13
2.5	Polymeraasiketjureaktio.....	15
3	TYÖN TAVOITE JA TARKOITUS	21
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	22
4.1	Hiirilinjat, kudoksenäytteiden ottaminen ja esivalmistelu.....	22
4.2	Geeniexpressioon tutkiminen kvantitatiivisella PCR:lla.....	23
4.2.1	RNA:n eristäminen.....	23
4.2.2	RNA:n käntö cDNA:ksi	24
4.2.3	Kvantitatiivinen PCR	26
5	TULOKSET	28
5.1	Suolistotulehduksen karakterisointi CD4cre-fur-flox-linjassa	28
5.2	Suolistotulehduksen merkit LysMcre-fur-flox-linjassa	31
6	POHDINTA.....	33
	LÄHTEET.....	36

LYHENTEET JA TERMIT

Antigeeni	Molekyyli, joka aiheuttaa elimistössä immuunivasteen
Anti-inflammatorinen	Tulehdusta vähentävä
Apoptoosi	Solujen ohjelmoitu kuolema
Autoproteolyysi	Proteiinin itsenäinen pilkkoutuminen
B-solu	B-lymfosyytti, voi aktivoitua erittämään vasta-aineita
Chaperoni	Proteiini, joka avustaa molekyylin laskostumisessa
Ekspressoituminen	Geenin ilmentyminen solussa
Endotoksiini	Bakteerin ulkokalvon molekyyli, joka aiheuttaa infektion aikana isäntäelimistössä esimerkiksi kuumetta
Flox	Lox-paikat sijaitsevat molemmilla puolilla (flanked by <i>loxP</i>)
IFN- γ	Interferoni-gamma, proinflammatorinen sytokiini
IL	Interleukiini, sytokiini
Makrofagi	Kudoksissa esiintyvä suuri syöjäsolu
Monosyytti	Veressä esiintyvä syöjäsolu
Naiivi solu	Esimerkiksi T-solu, joka ei ole vielä kohdannut antigeeniään
Proinflammatorinen	Tulehdusta lisäävä
Propeptidi	Inaktiivinen, lyhyt aminohappoketju
Proteaasi	Entsyymi, joka hajottaa proteiineja
Proto-onkogeeni	Esisyöpägeeni, joka voi aktivoitua syöpää aiheuttavaksi geeniksi
Reseptoriantagonisti	Molekyyli, joka estää toisen molekyylin kiinnittymisen tiettyyn reseptoriin
Retrovirus	<i>Retroviridae</i> -heimoon kuuluva RNA-virus
Th1-, Th2-, Th17-solu	Erilaisia auttaja-T-solutyyppejä (T-helper)
TNF- α	Tuumorinekroositekijä-alfa, proinflammatorinen sytokiini
T-solu	T-lymfosyytti, reagoi antigeeniin pinnassaan olevien molekyyliyhymien avulla

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston BioMediTechin Immuunivasteen säätelyn tutkimusryhmässä. Tutkimusryhmää johtaa dosentti Marko Pesu, joka yhdessä laboratorioanalytikko Sanna Hämäläisen kanssa toimi opinnäytetyön ohjaajana. Tutkimusryhmässä tutkitaan prooteiinikonvertaasiin, erityisesti furiiniin, merkitystä immuunijärjestelmän toiminnassa ja kehityksessä.

Tulehduksellisiin suolistosairauksiin kuuluu muun muassa haavainen paksusuolitulehdus sekä useita muita suoliston tulehdustiloja. Nämä tulehdustilat johtuvat yksilön oman immuunijärjestelmän erilaisista häiriöistä, joiden tarkkaa syytä ei tiedetä. Immuunijärjestelmää säätelee useat eri tekijät. Furiini on prooteiinikonvertaasi-perheen proteolyyttinen entsyymi, joka säätelee kasvutekijöiden sekä entsyymien toimintaa vaikuttaen näin ollen myös immuunijärjestelmään. Sytokiinit taas ovat välittäjäaineita, joita erittyy esimerkiksi taudinaiheuttajien läsnä ollessa. Niiden tarkoitus on välittää viestejä eri solujen välillä, jotta patogeeneja saadaan tuhottua. Sekä furiiniin että sytokiiniin erityyppisiin vaikuttavat transkriptiotekijät, sillä niiden tehtävä on säädellä proteiinien tuotantoa. Näiden molekyylien esiintymistä soluissa voidaan analysoida reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR-menetelmällä. Näyte saadaan tutkimuksessa hyödynnettävästä eliöstä, esimerkiksi hiirestä tai kasvatetuista soluista.

Opinnäytetyössä tutkitaan hiiren suolistotulehduksen mekanisme. Tavoitteena on selvittää, miten suolistotulehdus vaikuttaa analysoitavien sytokiiniin ja transkriptiotekijöiden ekspresioon. Työn avulla saadaan osaltaan selville tulehduksen mekanismeja. Tarkoituksena on sytokiini- ja transkriptiotekijäekspressioanalyysien avulla karakterisoida suolistotulehdus T-soluspesifisesti furiinipuutteisesta hiirilinjasta. Samalla toisesta hiirilinjasta selvitetään, aiheuttaako furiinin poistaminen myeloisista soluista myös merkkejä tulehduksesta.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Tulehdukselliset suolistosairaudet

Crohnin tauti ja haavainen paksusuolitulehdus (ulseratiivinen koliitti) ovat kaksi yleisintä muotoa tulehduksellisista suolistosairauksista. Ne ovat kroonisia ja uusiutuvia suoliston tulehdustiloja, joiden syytä ei vielä tarkasti tunneta. (Sarlos ym. 2014, 304.) Crohnin taudissa tulehdus ulottuu suolen seinämän läpi ja voi koskea koko ruuansulatuskanavaa, kun taas haavaisessa paksusuolitulehduksessa tulehdus useimmiten rajoittuu limakalvolle ja pelkästään paksusuoleen (Wallace, Zheng, Kanazawa & Shih 2014, 7).

Tulehduksellisten suolistosairauksien oletetaan johtuvan geneettisesti alttiilla yksilöillä normaalin mikrobiflooran aiheuttamasta tavallista voimakkaammasta immuunivasteesta suoliston limakalvoilla, mikä johtaa kudosten vahingoittumiseen (Sarlos ym. 2014, 305). Erityisesti adaptiivisen immunitietin on ajateltu olevan näiden sairauksien edistäjä. Tässä tapauksessa syy saattaisi olla joko Th-solujen tuottamien proinflammatoristen sytokiinien tuotannon lisääntyminen tai anti-inflammatoristen säätelijä-T-solujen tehotomuus. Arvellaan, että Crohnin taudin syntyyn vaikuttavat erityisesti Th1-soluvasteet, ja haavaisen paksusuolitulehduksen syntyyn Th2-soluvasteet. (Wallace ym. 2014, 11.) Kun suolen limakalvo läpäisee bakteeriantigeneja helpommin ja tuhoaa bakteereja heikommin, T-soluaktivaatio ja proinflammatoristen sytokiinien erityis kroonistuu. Myös ympäristö- ja ravintotekijöiden on todettu vaikuttavan tulehduksellisiin suolistosairauksiin sekä ehkäisevästi että edistävästi. (Färkkilä, Isoniemi, Kaukinen & Puolakkainen 2013, 474.)

2.2 Furiini

Proproteiinikonvertaasit ovat solujen erittämiä seriiniproteaaseja. Niiden aktiivisessa kohdassa on aminohappo seriini, joka on osallisena proteiinien hajotuksessa. Seriiniproteaasit jaetaan kahteen pääryhmään, trypsiini-kymotrypsiini-sukuisiin ja subtilisinkexin-sukuisiin, joista proproteiinikonvertaasit kuuluvat jälkimmäisiin. (Seidah & Prat 2012, 367.) Proproteiinikonvertaasit syntetisoidaan tsymogeeneinä, inaktiivisina esias-teina, ja prodomeeniensa ohjaamana sekä chaperonien avulla ne kulkeutuvat solussa

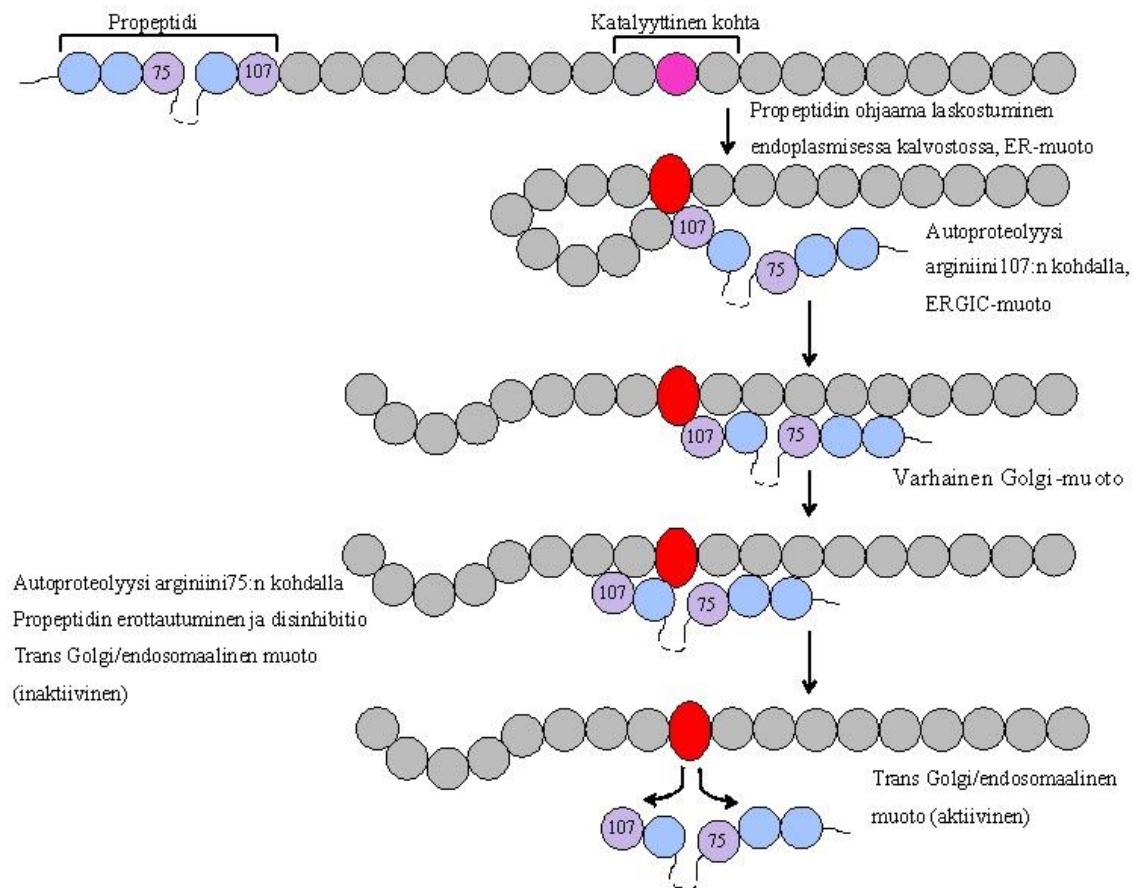
oikeaan paikkaan. Prodomeenit osallistuvat proproteiinikonvertaasien esiasteiden aktivoimiseen eri tavoin. Aktivointi on tarpeen, jotta proproteiinikonvertaasit voivat poistua solulimakalvostosta toimimaan muualla solussa. (Artenstein & Opal 2011, 2508.)

Proproteiinikonvertaaseja on tähän mennessä löydetty yhdeksän kappaletta, joista seitsemän on rakenteellisesti ja biokemiallisesti toistensa kaltaisia. Nämä seitsemän ovat proproteini convertase subtilisin/kexin 1 (PCSK1), PCSK2, furiini, PCSK4, PCSK5, PCSK6 ja PCSK7. Kaksi muuta proproteiinikonvertaasia, subtilisin/kexin isoenzyme 1 (SKI-1) ja proproteini convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9), on löydetty myöhemmin ja eroavat selvästi seitsemästä muusta. (Artenstein & Opal 2011, 2507–2508.) Seitsemän ensimmäistä proteiinia toimivat muun muassa Golgin laitteessa, solun pinnalla ja endosomeissa aktivoitujen tai inaktivoitujen muita proteiineja, kuten kasvutekijöitä ja entsyymejä. Ne vaikuttavat myös erilaisiin patogeeneihin. SKI-1 aktivoi muun muassa lukuisia transkriptiotekijöitä ja on tärkeä tekijä kolesteroli- ja rasvahapposynteesissä, joissa myös PCSK9 on mukana. (Seidah & Prat 2012, 367–368.)

Furiini on ensimmäisenä löydetty proproteiinikonvertaasi. Vuonna 1986 Roebroek, Schalken, Bussemakers, Heerikhuizen, Onnekink, Debruyne, Bloemers ja Van de Ven löysivät uuden nukleiinihappojakson *fes/fps*-proto-onkogeenin ylävirta-alueelta tutkiesaan kyseisen geenin emäsjärjestystä. Löydetty uusi geeni sai nimen *fur*, ja se karakterisoiitiin 3'-päästä koodaamattoman alueen perusteella. (Roebroek ym. 1986, 117.) Samana vuonna kyseisen geenin todettiin koodaavan furiiniksi nimettyä proteiinia. Tällöin myös huomattiin, että furiinilla on reseptorinkaltaisia ominaisuuksia. (Roebroek ym. 1986, 2197.)

Furiini on 794 aminohaposta koostuva 1-tyypin transmembraaniproteiini. Se kuuluu subtilisin-sukuisiin seriiniendoproteaaseihin, ja suurin yhteneväisyys sen ja muiden proproteiinikonvertaasien välillä on katalyyttinen alue. Tähän alueeseen kuuluvat aminohapot aspartaatti, histidiini ja seriini. (Seidah, Day, Marcinkiewicz & Chrétien 1998, 11–12.) Furiinin rakenteessa on myös prodomeeneja, joilla on merkittävä rooli sen laskotumisessa, kuljetuksessa sekä aktivoinnissa ja toiminnan säätelyssä. Prodomeenien molemmilla puolilla sijaitsevat leikkauskohtat, aminoterminaalissa päässä signaalipeptidaasin leikkauskohta ja karboksiterminaalissa päässä konservoituneiden aminohappojen muodostama autoproteolyttinen leikkauskohta. (Thomas 2002, 754.)

Furiinin laskostumiseen ja aktivoimiseen vaikuttava propeptidi koostuu 83 aminohaposta. Se leikkautuu pois endoplasmisessa kalvostossa (endoplasmic reticulum, ER), mutta jää sitoutuneeksi furiiniin voimakkaana autoinhibiittorina. Mikäli furiinista puuttuu kyseinen propeptidi, se jää endoplasmiseen kalvostoon inaktiiviseksi proteiiniksi. (Anderson ym. 2002, 12879.) Furiinin laskostuminen aktiiviseen muotoon koostuu propeptidin kaksivaiheisesta pilkkoutumisesta. Propeptidi toimii molekyylinvälisenä chaperonina ohjaten inaktiivisen katalyyttisen kohdan muuntumisen aktiiviseen muotoon. Endoplasmisessa kalvostossa alkavan laskostumisen jälkeen furiini käy läpi molekyylinvälisen poistoleikkauksen propeptidin arginiini107:n kohdalla. Myöhemmin propeptidi leikkautuu irti vielä arginiini75:n kohdalta, minkä jälkeen furiini on aktiivinen molekyyli. (Thomas 2002, 779.) Furiinin aktivointi on esitetty kuviossa 1.



KUVIO 1. Furiinin laskostuminen aktiiviseen muotoon (Thomas 2002, 779, muokattu).

Furiinin on osoitettu ekspressoituvan eri puolilla elimistöä. Sillä on suuri määrä kohdeproteiineja, jotka säätelevät lukuisia erilaisia biologisia toimintoja. (Turpeinen, Ortutay & Pesu 2013, 457.) On todettu, että furiini ekspressoituu muun muassa Th1-soluissa.

Sitä säädellään Stat-perheeseen kuuluvien transkriptiotekijöiden kautta, joita aktivoi muun muassa interleukiini-12 (IL-12). (Pesu, Muul, Kanno & O'Shea 2006, 984.)

Fur-geenin poistamisen on todettu olevan alkiole tappava (Roebroek ym. 1998, 4863). Tällaisten poistogeenisten eli knock-out-hiirien tutkiminen on ollut kyseisestä syystä mahdotonta. Kudosspesifisesti poistogeeninen furiinihiirilinja (*fur^{flox/flox}*) kehitettiin ensimmäisen kerran vuonna 2004, jolloin furiini poistettiin maksasta. Linjan kehityksessä hyödynnettiin konditionaalista knock-out-tekniikkaa, tarkemmin Cre-LoxP-rekombinaatiota. (Roebroek ym. 2004, 53442–53443.)

Cre-entsyymi on rekombinaasi, joka säätelee DNA-rekombinaatiota 34 emäsparista koostuvien *loxP*-kohtien välillä. Samansuuntaiset *loxP*-kohdat johtavat niiden välisen DNA-sekvenssin poistamiseen, kun taas vastakkaisuuntaisilla *loxP*-kohdilla DNA-sekvenssin aminohappojärjestys kääntyy. (Orban, Chui & Marth 1992, 6861.) Jotta geeni saadaan poistettua spesifisesti tietystä kudoksesta, Cre-rekombinaasigeenin promootorin ilmentymisen tulee olla kudosspesifinen. Paritettaessa tällainen Cre-hiiri flox-hiiren kanssa, jolla *loxP*-kohdat ympäröivät haluttua geeniä, saadaan kudosspesifinen knock-out-hiiri. (Gendt & Verhoeven 2012, 14–15.)

Kudosspesifisesti poistogeenisten furiinilinjojen avulla on voitu todeta muun muassa, että furiini säätelee PCSK9:n mRNA-tasoa maksasoluissa ja että se on tärkeässä roolissa endoteelisoluissa, sillä poistettaessa furiini endoteelisoluista vastasyntyneet hiiret kuolevat (Essalmani ym. 2010, 4257; Kim ym. 2012, 3382). Vuonna 2008 puolestaan luotiin CD4cre-*fur^{f/f}*-hiirilinja, jossa furiini on poistettu T-soluista. Sen avulla kyettiin osoittamaan, että furiinin poistaminen T-soluista johtaa Th1- ja Th2-solujen tuottamien sytokiinien ylituotantoon, autovasta-aineiden leviämiseen sekä tulehduksellisen suolis-tosairauden kehittymiseen. (Pesu ym. 2008, 246.)

Lisäksi furiini säätelee interferoni-gamman (IFN- γ) tuottamista sekä vaikuttaa esimerkiksi transformoiva kasvutekijä β :n (TGF- β) ja tuumorinekroositekijä-alfan (TNF- α) muokkaamiseen ja säätelyyn (Pesu ym. 2006, 984). On myös viitteitä siitä, että tiettyjen sairauksien, kuten ateroskleroosin, kohdalla furiinitasot ovat koholla. Furiini on siis tärkeä elion kehittämisessä, mutta sillä on merkitystä myös sairauksissa. (Turpeinen, Ortutay & Pesu 2013, 457.)

2.3 Sytokiinit

Solujen välittäjäaineita kutsutaan sytokiineiksi, ja ne syntyvät muun muassa erilaisten infektioiden aikana. Sytokiineja on lähes 200 erilaista, ja niiden tehtäviin kuuluu esimerkiksi solujen kasvun ja erilaistumisen säätely, tulehdusvasteen säätely sekä mikrobispesifisen immunitetin kehittymisen ohjaus. (Hedman ym. 2011, 46.) Sytokiineja vapautuu yleensä jonkin stimulantin vaikutuksesta, ja sitoutumalla niille spesifisiin reseptoreihin ne käynnistävät soluissa biologisen vasteen. Sytokiinin toiminta voi olla autokriinistä, jolloin ne vaikuttavat vain solun omaan toimintaan, parakriinistä, jolloin vaikutus ulottuu viereisiin soluihin tai joskus myös endokriinistä, missä tapauksessa ne vaikuttavat kaukaisempiinkin soluihin. (Murphy 2012, 99–100.)

Sytokiinien nimeäminen on ollut sattumanvaraista. Osa on nimetty suoraan biologisten toimintojensa mukaan (esimerkiksi tuumorinekroositekijä) ja osaa kutsutaan interleukiineiksi numerojälkiliitteen kera. Interleukiini-nimitys tulee siitä, että alun perin ajateltiin sytokiinien muodostuvan ja toimivan leukosyyteissä. (Abbas & Lichtman 2012, 8.) Sytokiinit voidaan toimintojensa mukaan jakaa kemokiineihin, proinflammatorisiin sytokiineihin, anti-inflammatorisiin sytokiineihin, Th1- ja Th2-sytokiineihin, interferoneihin ja kasvutekijöihin (Hedman ym. 2011, 47–48).

2.3.1 Interferoni-gamma

Interferonit ovat sytokiinejä, jotka reagoivat useisiin eri immuunivasteen aiheuttajiin, esimerkiksi bakteeri- ja virusinfektioihin. Ne säätelevät sekä luontaisten että hankitun immunitetin soluja. (Baccala, Kono & Theofilopoulos 2005, 9–10.)

Interferoni-gammaa (IFN- γ) erittävät pääasiassa Th1- ja CD8⁺-tyypin T-solut sekä luonnolliset tappajasolut, mutta jossain määrin myös muut solut, kuten esimerkiksi B-solut (Schroder, Hertzog, Ravasi & Hume 2004, 163–164). IFN- γ vaikuttaa T-solujen erilaistumiseen sekä aktivoivasti että inhiboivasti. Se myös aktivoi makrofageja ja inhiboi B-solujen lisääntymistä. (Billiau & Matthys 2009, 102.)

2.3.2 Tuumorinekroositekijä-alfa

Tuumorinekroositekijä-alfan (TNF- α) kuvailtiin alun perin estävän kasvaimien syntyä. Sen todettiin erittyvän isäntäsoluista endotoksiinien avulla ja olevan myrkyllistä kasvainsoluille, jolloin ne tuhoutuvat. Tästä kyseinen sytokiini on myös saanut nimensä. (Carswell ym. 1975, 3666.)

TNF- α :a erittävät pääasiassa aktivoituneet makrofagit, mutta joissakin määrin myös B-solut sekä endoteelisolut (Imaizumi ym. 2000, 413). TNF- α on osallisena T-, B- ja dendriittisolujen kehittämisessä. Tämän lisäksi se proinflammatorisena sytokiininä on merkittävä tulehduksen säätelijä ja vaikuttaa apoptoosiin. (Postal & Appenzeller 2011, 537.)

2.3.3 Interleukiinit

Interleukiinit (IL) kuuluvat sytokiineihin eli ne ovat erilaisia kemiallisia viestimolekyylejä. Eri interleukiineilla on ollut erilaisia nimityksiä niiden toimintatehtävien määrittämisestä riippuen. (Rohleder 2013, 1092.) Interleukiinit jaetaan rakenteensa ja toimintamekanisminsa perusteella seitsemään interleukiiniryhmään: IL-1-, IL-2-, IL-10-, IL-12-, IL-17- ja IL-6-tyyppiset sytokiinit ja kemokiinit. Yhteensä interleukiineja on näissä ryhmissä noin 40. (Magyari ym. 2014, 518–524.)

Interleukiini-1 (IL-1) on yksi ensimmäisistä löydetyistä sytokiineistä. Se käsittää kolme eri molekyyliä, IL-1 α , IL-1 β sekä IL-1ra (reseptoriantagonisti). IL-1 α ja IL-1 β eroavat siinä, että ne sitoutuvat eri reseptoreihin. IL-1ra taas estää IL-1 α :n ja IL-1 β :n vaikutukset. (Rohleder 2013, 1092.) Proinflammatorista IL-1 β :aa erittävät muun muassa monosyytit, makrofagit ja dendriittisolut (Zhao, Zhou & Bo Su 2013, 658–659). IL-1 β :n on todettu osallistuvan Th2-solujen polarisaatioon sekä vasta-ainetuotantoon B-soluissa. Se vaikuttaa myös B-solujen lisääntymiseen. (Dinarello 2009, 524.) IL-1 β syntetisoidaan esiasteena ja sen aktivoimiseksi kysteiniiniproteaasi kaspasi-1 leikkaa siitä osan pois (Thornberry ym. 1992, 768–774).

Interleukiini-4 (IL-4) ekspressoituu erityisesti aktivoituneissa T-soluissa (Th2), mutta niiden lisäksi myös syöttösoluissa, basofiileissä sekä eosinofiileissä (Nelms ym. 1999,

702). Sen on todettu ohjaavan auttaja-T-solujen erilaistumista Th2-soluiksi sekä vaimentavan esimerkiksi IFN- γ :n erittymistä kehittyvissä T-soluissa. IL-4 myös säätelee solukasvua, apoptoosia ja useiden geenien ekspressiota. Näin ollen se vaikuttaa moniin eri soluihin, kuten lymfosyytteihin ja makrofageihin. (Hsieh ym. 1992, 6065; Chomarat & Banchereau 1998, 2–4.)

Interleukiini-6 (IL-6) on aktiivinen useissa eri kohteissa, esimerkiksi T- ja B-soluissa sekä maksasoluissa. Sitä erittävät muun muassa T-solut, ja on todettu, että juuri T-solujen erittämä IL-6 on merkittävä tekijä naiivien B-solujen vasta-ainetuotannossa. (Hilbert ym. 1989, 4019.) Proinflammatorisen IL-6:n on myös huomattu vaikuttavan tulehduksen alussa erittyvien proteiinien tuottoon ja yleisesti makrofagien, maksasolujen ja lymfosyyttien toimintaan tulehduksen kehittymisen jälkeen (Kopf ym. 1994, 339–342; Jemaa ym. 2013, 643).

Interleukiini-10 (IL-10) on useiden solujen, esimerkiksi T- ja B-solujen tuottama sytokiini. Sen on todettu toimivan epäsuorasti sytokiinisynteesien inhibiittorina, sillä se vähentää makrofagien sytokiinien tuotantoa. (Ding & Shevach 1992, 3133.) Se estää myös muuta makrofagitoimintaa sekä T-solutoimintaa ja IL-10 uskotaankin olevan merkittävä immuunivasteen säätelijä (Kühn ym. 1993, 263–274).

Interleukiini-17A (IL-17A tai IL-17) on proinflammatorinen sytokiini, jolla on useita eri tehtäviä. Sen uskotaan houkuttelevan neutrofiilejä tulehduspaikalle sekä aktivoivan kemokiinituotantoa. (Park ym. 2005, 1134.) IL-17A:ta tuottavat pääasiassa Th17-solut, mutta mahdollisesti myös muut T-solut (Lockhart, Green & Flynn 2006, 4668). IL-17A vaikuttaa useisiin eri soluihin, erityisesti T-soluihin, lisäten muun muassa näiden sytokiiniekspressiota (Korn, Bettelli, Oukka & Kuchroo 2009, 499–502).

2.4 Transkriptiotekijät

Transkriptiotekijät ovat proteiineja, jotka kiinnittyvät tiettyyn DNA-sekvenssiin. Kiinnittymiskohta sijaitsee lähellä kohdegeenejä, sillä transkriptiotekijät säätelevät transkriptiota alusta lähtien. Riippuen kiinnittymiskohdasta ja kohdegeenin transkription aloitussijainnista transkriptiotekijät voivat joko aktivoida tai vähentää transkriptiota.

Kukin transkriptiotekijä säätelee geenijoukkoa tiettyjen ulkoisten tai solunsisäisten ärsykkeiden perusteella. (Seshasayee, Sivaraman & Luscombe 2011, 10–11.)

T-bet on T-box-joukkoon kuuluva transkriptiotekijä, joka ekspressoituu selektiivisesti kateenkorvan imusoluissa sekä Th1-soluissa. T-bet:lla on keskeinen rooli Th1-solujen kehityksessä, sillä se on kyseisille soluille ominainen ”master regulator”-transkriptiotekijä. On osoitettu, että T-bet vaikuttaa IFN- γ :n tuottamiseen primäärisissä T-soluissa ja ohjaa polarisoituja Th2-soluja Th1-solureitille. (Szabo ym. 2000, 656.) IFN- γ :n taas on todettu lisäävän T-bet:n ilmentymistä monosyyteissä, makrofageissa sekä dendriittisoluissa (Lighvani ym. 2001, 15137).

GATA-3 kuuluu GATA-transkriptiotekijöihin, jotka sitoutuvat DNA:n (A/T)GATA(A/G) -sekvenssiin yhdellä tai kahdella sinkkisormella (Kouros-Mehr, Slo-rach, Sternlicht, & Werb 2006, 1041). Tutkimukset ovat osoittaneet, että GATA-3:lla on merkittävä rooli Th2-solujen erilaistumisessa ja onkin ehdotettu, että erilaistuneen Th2-solutyyppin ylläpitoon tarvitaan jatkuvaa GATA-3:n tuottoa. (Pai, Truitt & Ho 2004, 1993.) GATA-3:n on todettu myös lisäävän IL-4:n sekä vähentävän IFN- γ :n ekspressiota (Ferber ym. 1999, 134).

ROR γ t (Retinoid-related Orphan Receptor gamma t) on tärkein transkriptiotekijä Th17-solujen erilaistumisessa. Se edistää IL-17A:n ja IL-17F:n koodausta naiiveissa CD4⁺-auttaja-T-soluissa ja on tarpeellinen myös niiden ekspressiossa. Tutkimus on osoittanut, että ROR γ t:n puuttuessa Th17-soluja ei muodostu ja että ROR γ t:tä omaavien T-solujen puuttuessa tutkimuskohteelle on muodostunut autoimmuunitauti. ROR γ t:n uskotaankin olevan merkittävä säätelijä immuunijärjestelmän tasapainossa, ja tulehdussairauksien hoidossa voitaisiin mahdollisesti hyödyntää tätä tietoa. (Ivanov ym. 2006, 1121.)

Transkriptiotekijä Foxp3 vaikuttaa T-solujen aktivaatioon, ja pääasiassa säätelijä-T-soluihin. Foxp3:n on ajateltu olevan kyseisten solujen tärkein transkriptiotekijä. Erityisesti CD4⁺CD25⁺-säätelijä-T-solujen on todettu ilmentävän Foxp3:a vaikuttaen niiden kehittymiseen, ja se onkin näille soluille ominainen markkeri. (Schubert ym. 2001, 37672; Fontenot, Gavin & Rudensky 2003, 334–335.) On kyetty myös osoittamaan, että Foxp3-geenissä olevat mutaatiot aiheuttavat IPEX-oireyhtymän, jossa T-solut lisääntyvät kontrolloimattomasti (Wildin ym. 2001, 20).

2.5 Polymeraasiketjureaktio

DNA:n monistaminen on helppoa ja tehokasta polymeraasiketjureaktion (polymerase chain reaction, PCR) avulla. Polymeraasiketjureaktiossa monistetaan kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä olevaa DNA-sekvenssiä. Useimmiten halutut sekvenssit ovat alle 10 kiloemäsparin pituisia, mutta on mahdollista kopioida huomattavasti pidempiäkin jaksoja. PCR-menetelmässä tarvitaan DNA:ta syntetisoiva polymeraasientsyymi, DNA-sekvenssille spesifiset alukkeet, nukleotideja (dNTP) sekä PCR-laite. (Suominen, Pärssinen, Haajanen, & Pelkonen 2010, 153–154.)

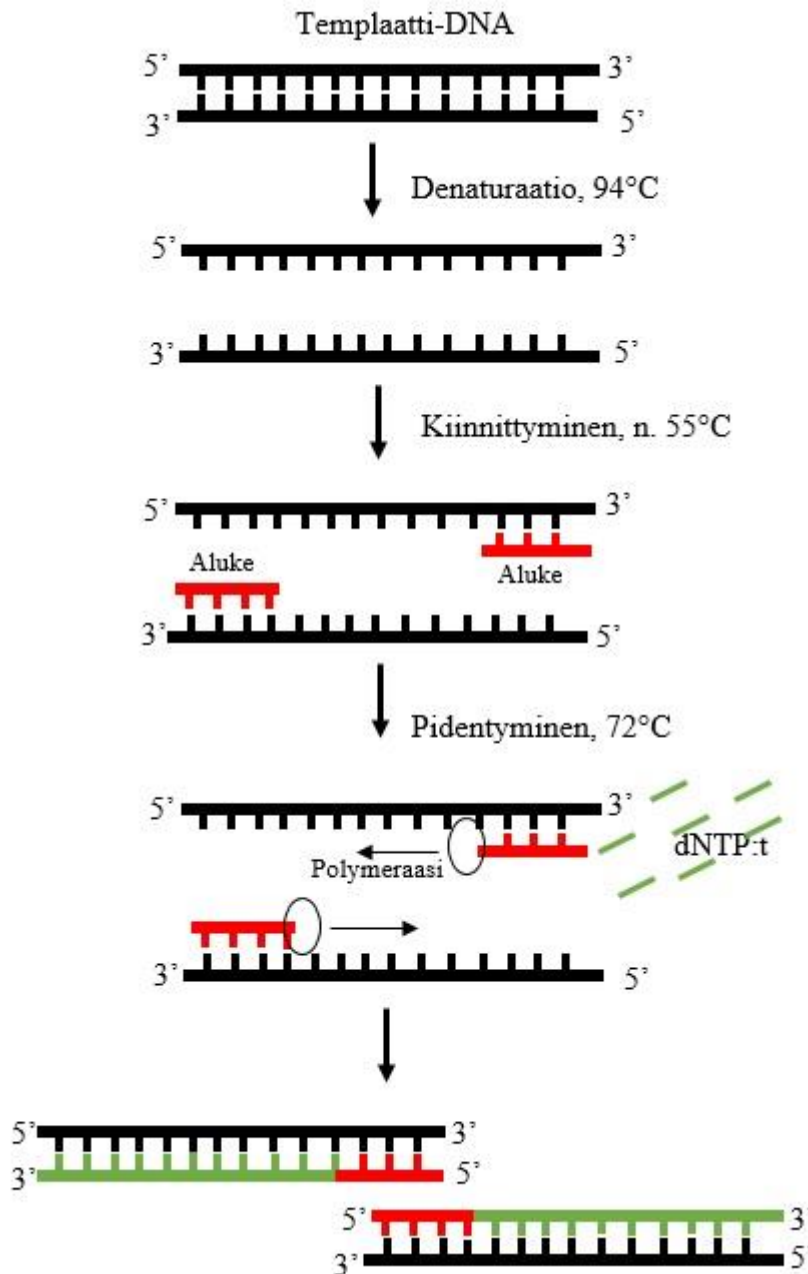
DNA:n syntetisoinnissa juosteita muodostava polymeraasientsyymi ei yleensä ole stabiili niissä lämpötiloissa, joissa DNA:n kaksoisjuoste saataisiin avautumaan. On kuitenkin kyetty eristämään termostabiileja polymeraaseja bakteereista, jotka elävät ääriolosuhteissa, kuten yli 100 °C:n lämpötiloissa. Käytetyin polymeraasi on *Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty *Taq*, jolle standardimenetelmät on optimoitu. *Taq*-polymeraasi on virhealtis, joten myös muita polymeraaseja käytetään. (Terpe 2013, 10243–10246.)

Tunnetun emäsjärjestyksen perusteella saadaan valmistettua DNA-sekvenssin aloituskohdille komplementaariset alukkeet. Käytettävistä alukkeista toinen on spesifinen DNA:n koodaavan juosteen 5'-päälle ja toinen templaattijuosteen 5'-päälle. (Abbas & Lichtman 2005, 530.) PCR-menetelmän tärkein osa on alukkeiden suunnittelu, sillä niiden tulee olla riittävän pitkiä spesifioidun DNA-sekvenssin saamiseksi. Pituuden lisäksi on tärkeää huomioida alukkeiden sitoutumiskyky sekä sulamislämpötila, jotta alukkeet kiinnittyvät kopioitaviin juosteisiin ennen DNA:n palautumista kaksijuosteiseksi. (Campbell & Farrell 2012, 377.)

PCR-reaktio toistuu sykleissä, ja yksi sykli sisältää kolme eri vaihetta. Sykli alkaa DNA-juosteiden erottautumisella eli DNA:n denaturaatiolla lämpötilan nousun vaikutuksesta. (Abbas & Lichtman 2005, 530.) Lämpötilaa hetkellisesti laskettaessa lyhyet alukkeet kiinnittyvät yksittäisiin DNA-juosteisiin (*annealing*). Lyhyessä ajassa templaatti-DNA ei ehdi täysin renaturoitumaan eli palautumaan kaksijuosteiseksi. (Suominen ym. 2010, 154.)

Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen lämpötilaa nostetaan jälleen, jotta *Taq*-polymeraasi aktivoituu. Uuden kaksijuosteisen DNA:n syntetisointi alkaa alukkeen 3'-päästä, ja uusi

juoste muodostuu 5'-3'-suunnassa. Polymeeraasi syntetisoi halutun pituisen DNA-juosteen ja ensimmäinen sykli päättyy. DNA:n määrä on nyt kaksinkertaistunut ja näitä vaiheita toistetaan 25–40 kertaa, jolloin saadaan miljoonia kopioita halutusta DNA-sekvenssistä. (Campbell & Farrell 2012, 377.) Kuviossa 2 on esitetty yhden syklin kaikki kolme vaihetta yleisesti käytetyillä lämpötiloilla.

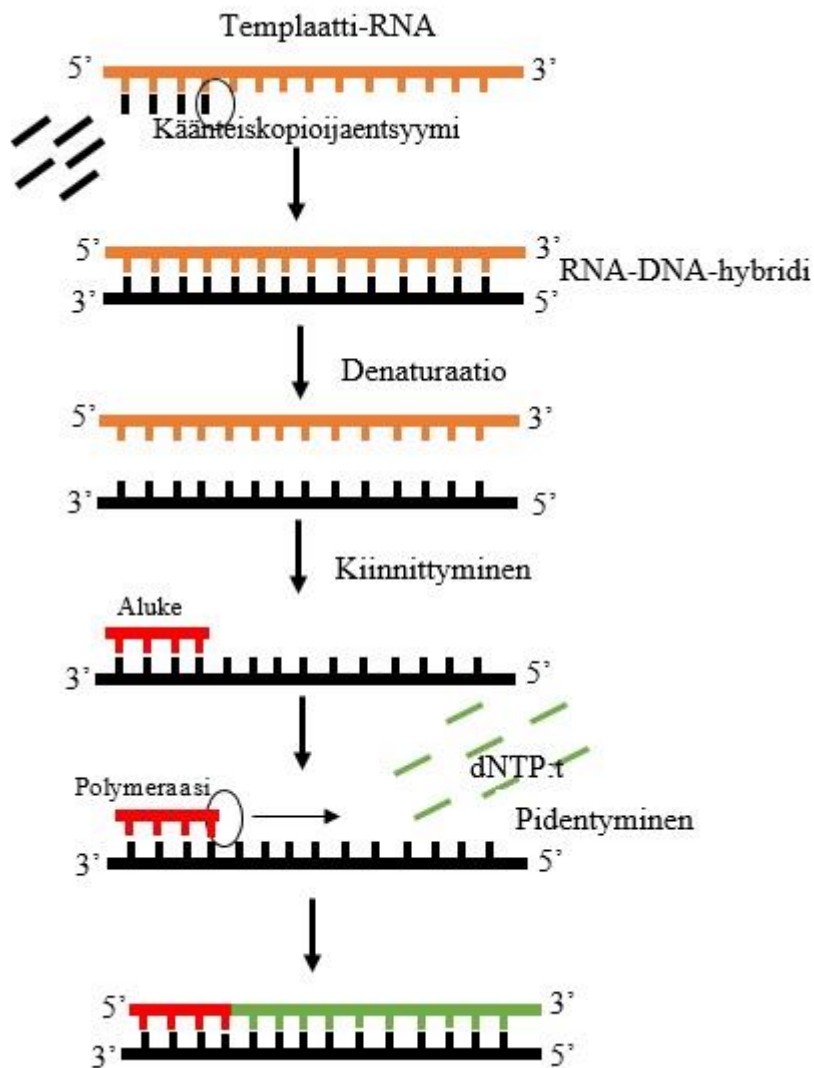


KUVIO 2. PCR-reaktio (Campbell & Farrell 2012, 378, muokattu).

Myös RNA:ta voidaan monistaa, mutta se tulee ensin kääntää komplementaariseksi DNA:ksi. Tämä onnistuu RT-PCR:illa (reverse transcription PCR), jossa käänteiskopioijaentsyymin avulla syntetisoidaan yksijuosteisesta RNA:sta kaksijuosteista cDNA:ta.

RNA:n monistamista hyödynnetään silloin, kun halutaan saada selville solun ilmentämiä genejä. (Bustin 2000, 169–170.) RT-PCR:ssä käytettävä käänteiskopioijaentsyymi on peräisin retroviruksista. Alukkeet voivat olla joko sekvenssille spesifisiä, tai satunnaisalukkeita. Jotta reaktio onnistuu, RNA:n tulee olla mahdollisimman puhdasta ja laadukasta. (Freeman, Walker & Vrana 1999, 113–121.)

RT-PCR-reaktiossa käänteiskopioijaentsyymi syntetisoi RNA:n juosteen, jolloin saadaan kaksijuosteinen cDNA-RNA-hybridi. Hybridistä hajotetaan RNA-juoste ja templaattina toimii tämän jälkeen cDNA-juoste. Ensimmäisessä sykliässä cDNA kahdentuu, ja muissa sykleissä molemmat juosteet toimivat templaatteina. (Suominen ym. 2010, 170.) Kuviossa 3 on esitetty cDNA:n valmistus.



KUVIO 3. cDNA:n muodostuminen (Suominen ym. 2010, 171, muokattu).

Käänteiskopioinnin lisäksi PCR:stä on muitakin sovelluksia. Toinen yleisesti käytetty on kvantitatiivinen PCR (quantitative PCR, qPCR), usein yhdistettynä reaaliaikaiseen seurantaan (real-time PCR). Reaaliaikaisessa PCR:ssä nimensä mukaisesti tuotteen monistumista voidaan määrittää reaktion edetessä. (Kim, Lim & Lee 2013, 1358–1359.) Tuotteen määrä havaitaan fluoresoivan merkkiaineen avulla. Sitä mukaa kun tuote monistuu, käytettävän merkkiaineen fluoresenssisignaali kasvaa. Merkkiaineena voidaan käyttää fluoresoivaa väriä tai koetinta. (Bustin & Mueller 2005, 366–367.)

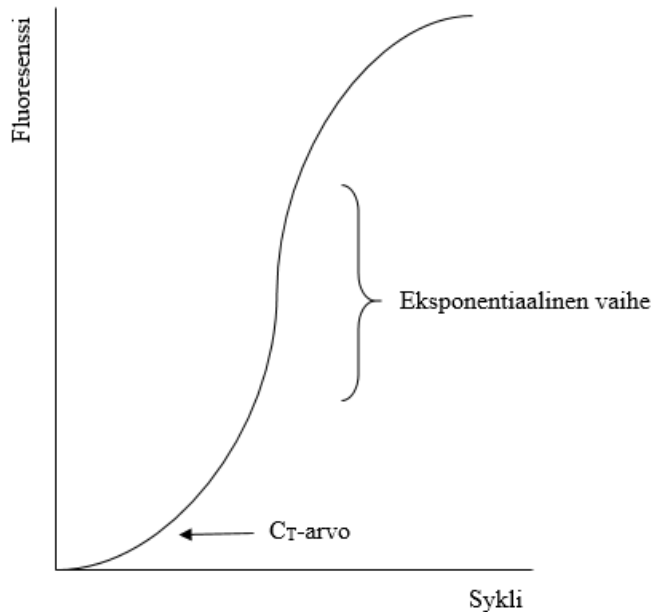
Esimerkki laajasti käytetystä fluoresoivasta väristä on SYBR Green. Se on helppo optimoida ja edullinen, mutta epäspesifinen, koska se sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han. SYBR Green:iä saa valmiina kaupallisina master mixeinä eli reagenssiseoksina, mutta myös itsetehdyt master mixit ovat toimivia. Fluoresenssin määrä riippuu DNA:n emäsparien ja SYBR Green -molekyylin muodostamien kompleksien määrästä. Näin ollen SYBR Green itsessään ei merkittävästi fluoresoi. (Giglio, Monis & Saint 2003, 1.)

Fluoresoiva koetin on lyhyt fluoresenssileimattu DNA-pätkä, joka on komplementaarinen kopioitavalle DNA-sekvenssille. Paljon käytetyn hydrolyysikoetin TaqMan'in lisäksi on kehitetty muun muassa molecular beacon -hybridisaatiokoettimia. Fluoresenssikoettimien etuna on niiden herkkyys ja spesifisyys. (Holland, Abramson, Watson & Gelfand 1991, 7276; Tyagi & Kramer 1996, 303.)

Usein fluoresenssiväri SYBR Greenin yhteydessä tarkastellaan reaktion sulamiskäyrää, sillä siitä nähdään onko reaktiossa syntynyt alukedimeereitä vai pelkästään haluttua tuotetta. PCR-tuote on helppo spesifoida, sillä DNA:n sulamislämpötila riippuu sekvenssistä, sen pituudesta sekä GC-emäsparien määrästä. SYBR Green fluoresoi ollessaan sitoutuneena kaksijuosteiseen DNA:han, ja DNA:n denaturoituessa fluoresenssi vähenee nopeasti. Sulamiskäyrä muodostetaan PCR-ajon jälkeen nostamalla reaktion lämpötilaa asteittain ja mittaamalla samalla fluoresenssin määrää. Muokkaamalla saatua käyrää nähdään yksi selkeä piikki PCR-tuotteelle ja mahdollisten alukedimeerien muodostuksessa myös toinen piikki. (Cubie ym. 2001, 24–25.)

Reaaliaikaisen PCR:n ideana on siis fluoresenssin mittaaminen. Reaktion alussa PCR-tuotteen määrä on vielä alhainen, joten fluoresenssisignaali on heikko eikä sitä voida havaita. Kun monistettavaa tuotetta on tarpeeksi paljon ja signaali havaitaan, saadaan

toteutuneiden syklien määrästä kynnyssykliarvo eli C_T -arvo (Threshold Cycle), kuten esitetty kuviossa 4. Reaktion C_T -arvo määräytyy pääasiassa templaatin alkuperäisen määrän perusteella. Mikäli templaattia on alussa vähän, tarvitaan useita syklejä, jotta fluoresenssisignaali havaitaan. Tällöin C_T -arvo on suuri. Jos taas templaattia on paljon jo reaktion alkaessa, C_T -arvo jää pienemmäksi, koska syklejä havaittavaan fluoresenssisignaaliin tarvitaan vähemmän. (Wong & Medrano 2005, 75–76.)



KUVIO 4. Kasvavan fluoresenssin ja syklien suhde (Bio-Rad Laboratories 2006, 4, muokattu).

Kvantitatiivisella PCR:lla tulos voidaan määrittää suhteellisesti tai absoluuttisesti, joista suhteellista normalisointia käytetään useammin. Suhteellista normalisointia käytettäessä tutkittavan geenin määrä suhteutetaan ylläpitogeneeniin (engl. housekeeping gene), jota ilmenee solussa pysyvästi tietty määrä. Koska sekä ylläpitogeneeni että tutkittava geeni on näytteessä koko analyysin ajan, mahdolliset häiriöt saadaan minimoitua. Näin myös näytteiden väliset erot ovat pienempiä. Ylläpitogeneenejä on lukuisia erilaisia, käytössä on esimerkiksi ribosomi-RNA:n osia (18S ja 28S) ja erilaisia proteiineja, kuten glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi (GAPD) ja mikroglobuliinit. (Pfaffl, Tichopad, Prgo-met & Neuvians 2004, 509.)

Absoluuttisessa normalisoinnissa valmistetaan laimennossarja, joiden perusteella muodostetaan standardisuora. Suora tehdään suhteuttamalla DNA-konsentraatio C_T -arvoon, jolloin tuotteen tuntematon DNA-määrä saadaan C_T -arvon perusteella tietoon. Abso-

luuttista normalisointia käytettäessä laimennosten DNA-konsentraation tulisi kattaa näytteiden vastaava, sekä olla tarkasti määritettävissä ja PCR-laitteen havaittavissa. (Wong & Medrano 2005, 76–77.)

3 TYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tavoitteena on tutkia tiettyjen sytokiinien ja transkriptiotekijöiden ekspressoitumista suolistotulehduksessa. Tutkimuksen avulla saadaan osaltaan selville tulehduksen mekanismeja ja samalla nähdään mitä eroja sytokiiniekspressiossa ilmenee, kun furiini on poistettu T-soluista ja myeloisista soluista. Opinnäytetyö liittyy laajempaan tutkimusryhmässä tehtävään tutkimukseen furiinin osuudesta immuunijärjestelmässä.

Opinnäytetyön tarkoituksena on karakterisoida suolistotulehdus CD4cre-fur-flox-linjan hiirissä analysoimalla sytokiini- ja transkriptiotekijäekspressiota reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR-menetelmällä. Karakterisointianalyysiä varten RNA eristetään paksusuolen proksimaaliosan kudoksenäytteistä, viidestä hiirestä genotyyppiä kohden. Geeniekspresioanalyysi tehdään seitsemästä geenistä: IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-17A, IL-6, IL-10 ja TNF- α . Lisäksi tutkitaan neljän transkriptiotekijän ekspressoitumista. Tutkittavat transkriptiotekijät ovat T-bet, GATA-3, ROR γ T ja Foxp3. Karakterisoinnin lisäksi on tarkoitus selvittää sytokiiniekspression perusteella, esiintyykö LysMcre-fur-flox-linjan hiirissä merkkejä suolistotulehduksesta. LysMcre-fur-flox-linjasta analyysiä varten on kolme hiirtä genotyyppiä kohden. Sytokiiniekspressiota verrataan kahden eri genotyypin välillä molemmissa hiirilinjoissa ja samalla vertaillaan myös hiirilinjoja keskenään.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Hiirilinjat, kudokset ja esivalmistelu

Työssä käytettiin kudosspesifisesti poistogeenisiä furiinilinjoja CD4cre-fur-flox ja LysMcre-fur-flox, joista ensimmäisessä furiini on poistettu T-soluista ja jälkimmäisessä myeloisista soluista. Koe-eläintöihin oli Eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen lupa ja koe-eläimiä hoidettiin asianmukaisesti. Hiirien tappamisen suoritti siihen pätevä henkilö.

Kudokset otettiin hiiren paksusuolesta proksimaali-, mediaali- ja distaaliosista, joista itse työssä käytettiin proksimaaliosan näytteitä. Hiiri avattiin ja sen suolistosta otettiin osa alkaen umpisuolesta ja päättyen suoliston loppuun. Suoliston osa siirrettiin PBS-puskuriin petrimaljalle. Suoli avattiin, jotta se saatiin tyhjennettyä ja puhdistettua, ja siitä leikattiin noin 1 mm leveä kudokset paksusuolen proksimaali-, mediaali- ja distaaliosasta. Kudokset puhdistettiin vielä PBS-puskurissa erillisellä petrimaljalla ja siirrettiin 250 µl:aan RNAlater® (Ambion) -liuosta. RNAlater® on liuos, joka suojaa ja stabilisoi näytteen RNA:n ennen pakastamista. Kudokset säilytettiin -70 °C pakastimessa. Käytettyjen hiirien tunnistet, genotyyppi ja ikä on esitetty taulukoissa 1 ja 2.

TAULUKKO 1. CD4cre-fur-flox-linjan hiirien tunnistet, genotyyppi ja ikä.

Tunniste	Genotyyppi	Hiiren ikä (päivää)
MPe-38	Villityyppi	149
MPe-50	Villityyppi	141
MPe-100	Villityyppi	106
MPe-119	Villityyppi	144
MPe-120	Villityyppi	144
MPe-39	Knock-out	149
MPe-51	Knock-out	141
MPe-107	Knock-out	105
MPe-118	Knock-out	92
MPe-127	Knock-out	94

TAULUKKO 2. LysMcre-fur-flox-linjan hiiren tunniste, genotyyppi ja ikä.

Tunniste	Genotyyppi	Hiiren ikä (päivää)
MPe-143	Villityyppi	110
MPe-151	Villityyppi	110
MPe-152	Villityyppi	110
MPe-136	Knock-out	131
MPe-137	Knock-out	131
MPe-142	Knock-out	131

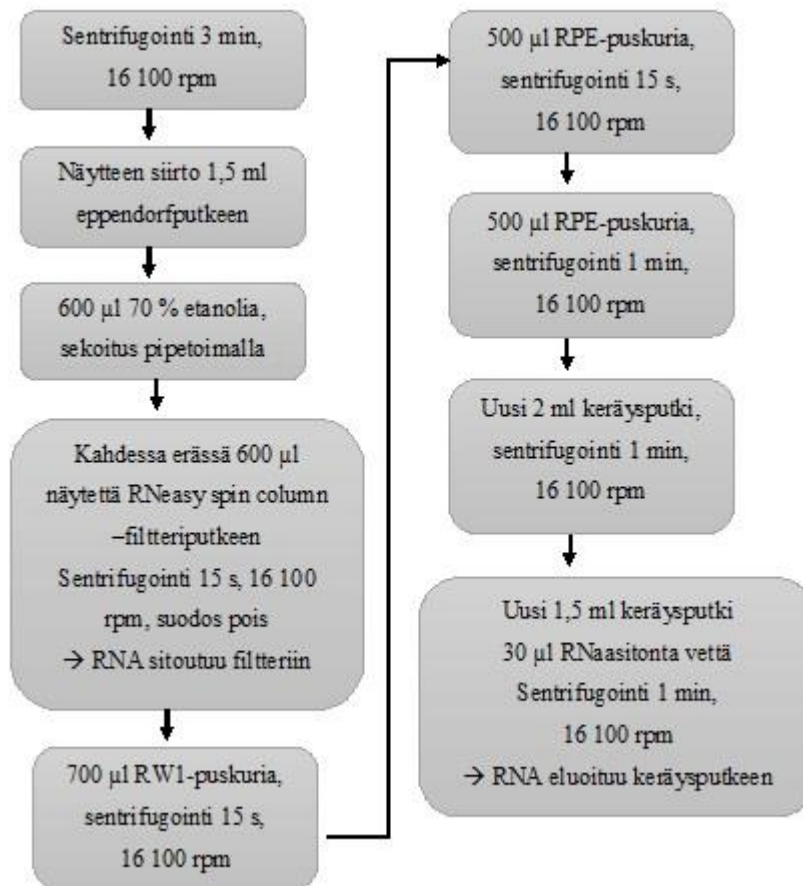
4.2 Geeniekspression tutkiminen kvantitatiivisella PCR:lla

4.2.1 RNA:n eristäminen

Ennen eristyksen aloittamista kaikki käytettävät pipetit sekä pöytäpinnat pyyhittiin RNaseKiller-liuoksella (5Prime). Sen tarkoitus on poistaa RNA:ta hajottavia entsyymejä, jolloin saadaan minimoitua kontaminaation sekä epäpuhtauksien lähteet.

RNA-eristys suoritettiin Qiagenin RNeasy[®] Mini Kit -kitin protokollan mukaisesti. Eristyksessä tarvittavaan RLT-puskuriin lisättiin β -merkaptotetanolia 10 μ l/1 ml ja RPE-puskuriin oli lisätty jo valmiiksi Aa-puhtausluokan 99,5 % etanolia. Tarvittavat reagenssit olivat eristyskitin mukana, lukuunottamatta 70 % etanolia ja β -merkaptotetanolia.

Kudospala siirrettiin RNAlater[®]-liuoksesta tyhjään 2 ml:n eppendorffputkeen. Putkea kastettiin nestetyypeen ja hajotettiin kudospala murskaimella mahdollisimman hienoksi jauheeksi. Hienonnetun kudospalan päälle lisättiin 600 μ l RLT-puskuria ja homogenisoitiin näyte 20 g neulan ja 1 ml ruiskun avulla. RLT-puskurin tarkoitus on inaktivoida RNA:ta hajottavia entsyymejä ja näin ollen taata RNA:n puhtaus. Etanolin lisäyksen myötä saavutetaan sopivat olosuhteet RNA:n sitoutumiselle RNA-suodattimeen. Kokonais-RNA sidottiin suodattimeen ja epäpuhtaudet poistettiin pesujen avulla. Lopulta sitoutunut RNA eluoiitiin veteen. Näytteitä käsiteltiin korkeintaan kolme kerrallaan, jotta eristyksen vaiheet saatiin suoritettua riipeästi. Homogenisoinnin jälkeiset eristysvaiheet on esitetty kuviossa 5.



KUVIO 5. RNA:n eristäminen näytteestä valmistajan (Qiagen) ohjeen mukaan (Qiagen, RNeasy® Mini Handbook 2012, 41–42, muokattu).

4.2.2 RNA:n käänntö cDNA:ksi

RNA:n eristämisen jälkeen näytteiden RNA-pitoisuudet ja puhtausasteet mitattiin cDNA-kääntöä varten NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 -laitteella. RNA-pitoisuus saatiin aallonpituudella 260 nm mitatusta absorbanssista, ja puhtausaste määritettiin 260 nm ja 280 nm absorbanssien suhteesta. Saadut pitoisuudet ja puhtausasteet CD4cre-fur-flox-linjan näytteille on esitetty taulukossa 3 ja LysMcre-fur-flox-linjan näytteille taulukossa 4. Kunkin näytteen puhtaus oli lähellä 2,0, mikä on optimaalinen puhtausaste RNA:lle. Näytteiden puhtaudet vaihtelivat välillä 2,03–2,17.

TAULUKKO 3. CD4cre-fur-flox-linjan näytteiden RNA-pitoisuudet ja puhtausasteet.

Näyte	RNA-pitoisuus (ng/μl)	Puhtausaste (A 260/280)
MPe-38	22,70	2,09
MPe-50	137,91	2,09
MPe-100	205,71	2,15
MPe-119	406,61	2,11
MPe-120	157,88	2,13
MPe-51	100,13	2,06
MPe-39	243,30	2,08
MPe-107	293,27	2,10
MPe-118	399,01	2,06
MPe-106	445,53	2,03

TAULUKKO 4. LysMcre-fur-flox-linjan näytteiden RNA-pitoisuudet ja puhtausasteet.

Näyte	RNA-pitoisuus (ng/μl)	Puhtausaste (A 260/280)
MPe-136	259,65	2,17
MPe-137	273,95	2,14
MPe-142	346,93	2,12
MPe-143	175,27	2,13
MPe-151	156,98	2,13
MPe-152	238,93	2,14

cDNA-kääntö suoritettiin iScript™ Select cDNA Synthesis -kitillä (Bio-Rad). Reagensseista tehty master mix -liuos valmistettiin taulukon 5 mukaan. Master mix -liuosta tuli 7 μl kutakin näytettä kohden. cDNA-kääntöä varten RNA:ta tarvittiin 1000 ng tai pienimmän RNA-pitoisuuden mukainen pitoisuus. Pienintä RNA-pitoisuutta käytettiin silloin, kun pipetointimäärät olisivat olleet yli näytteelle tarkoitetun 13 μl. Näytteet laimennettiin vedellä 13 μl:aan ja lisättiin 7 μl master mix -liuosta, jolloin lopputilavuus oli 20 μl. Näytteet sekoitettiin ja sentrifugoitiin putkien pohjalle. Haluttaessa näytettä 1000 ng pipetointimäärä laskettiin kaavan 1 mukaan ja pienintä RNA-pitoisuutta käytettäessä kaavan 2 mukaisesti.

$$\frac{1000 \text{ ng}}{\text{Näytteen RNA-pitoisuus ng/}\mu\text{l}} = \text{Tarvittava näytemäärä, } \mu\text{l} \quad (1)$$

$$\frac{13 \mu\text{l} \cdot \text{Pienin RNA-pitoisuus ng/}\mu\text{l}}{\text{Näytteen RNA-pitoisuus ng/}\mu\text{l}} = \text{Tarvittava näytemäärä, } \mu\text{l} \quad (2)$$

TAULUKKO 5. Master mix -liuoksen reagenssien pipetointimäärät yhteen näytteeseen.

Master mix -liuoksen reagenssit	
5x iScript Select Reaction mix	4 μl
Random primer	2 μl
iScript Reverse Transcriptase	1 μl

PCR-ajo suoritettiin MJ Research:n Peltier Thermal Cycler 200 -laitteella taulukon 6 mukaisella lämpötilaohjelmalla. Saaduista cDNA-näytteistä tehtiin 50 μl 1:5 -laimennosta kvantitatiivista PCR:a varten. Näytteet säilytettiin -20 °C:ssa.

TAULUKKO 6. PCR-ajon lämpötilaohjelma.

Lämpötila	Aika
25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	∞

4.2.3 Kvantitatiivinen PCR

Työskentely suoritettiin sille tarkoitettussa PCR-kaapissa, jotta ulkopuoliset häiriöt ja kontaminaation lähteet saatiin minimoitua. Ajo suoritettiin 96-kuoppalevyllä ja näytteistä käytettiin 1:5 -laimennosta.

Molemmista linjoista tutkittiin seitsemän eri sytokiiniä, minkä lisäksi CD4cre-fur-flox-linjasta tutkittiin myös neljä transkriptiotekijää. Sytokiinit tutkittiin kolmessa vaiheessa, ensimmäisessä ajossa IFN- γ , IL-17A ja IL-4, toisessa TNF- α ja IL-6 ja kolmannessa IL-10 ja IL-1 β . Transkriptiotekijät ajettiin kahdessa osassa, ensimmäisessä T-bet ja GATA-3 ja toisessa ROR γ T ja Foxp3. Kustakin näytteestä tehtiin rinnakkainen näyte ja

jokaisesta tutkittavasta geenistä ajettiin myös templaatiton näyte, jossa cDNA-näyte oli korvattu vedellä. Jokaisessa ajossa oli mukana myös ylläpitogeeni 18srRNA, ja se tutkittiin kaikista näytteistä, myös rinnakkaisista.

Kunkin sytokiinin ja transkriptiotekijän alukkeista tehtiin omat master mix -liuokset, jotka valmistettiin taulukon 7 mukaisesti. Master mix -liuosta pipetoitiin kuoppalevyille 18,7 µl ja sen päälle 1,25 µl cDNA-templaattia. Templaattittomaan näytteeseen pipetoitiin 1,25 µl vettä. Levyn päälle laitettiin optinen kalvo ja levyä sentrifugoitiin 3 min 700 g 4 °C:ssa ilmakuplien poistamiseksi. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR -ajo tehtiin Bio-Rad:n CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System -laitteella taulukossa 8 esitetyn lämpötilaohjelman mukaan.

Saadut tulokset analysoitiin vertaamalla näytteen sytokiini- tai transkriptiotekijäekspressiota ylläpitogeenin ekspression. Kuvaajien piirtämiseen käytettiin GraphPad Prism 5 -ohjelmaa.

TAULUKKO 7. Master mix -liuoksen reagenssien määrät yhtä näytettä kohden.

Master mix -liuoksen reagenssit	
SsoFast EvaGreen Mastermix 2x	10,00 µl
Steriili vesi	6,75 µl
Alukkeet (forward) 10 µM	1,00 µl
Alukkeet (reverse) 10 µM	1,00 µl

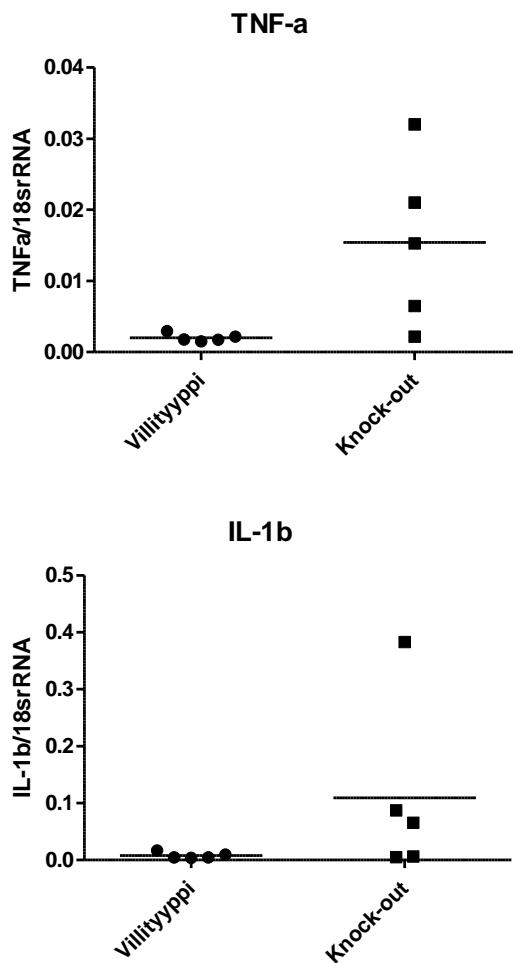
TAULUKKO 8. qPCR-ajossa käytetty lämpötilaohjelma.

Lämpötila	Aika	} 40x levyn lukeminen
96 °C	30 s	
96 °C	2 s	
60 °C	5 s	
Melt curve 65 °C to 95 °C (0,5 °C nousu) plate read		

5 TULOKSET

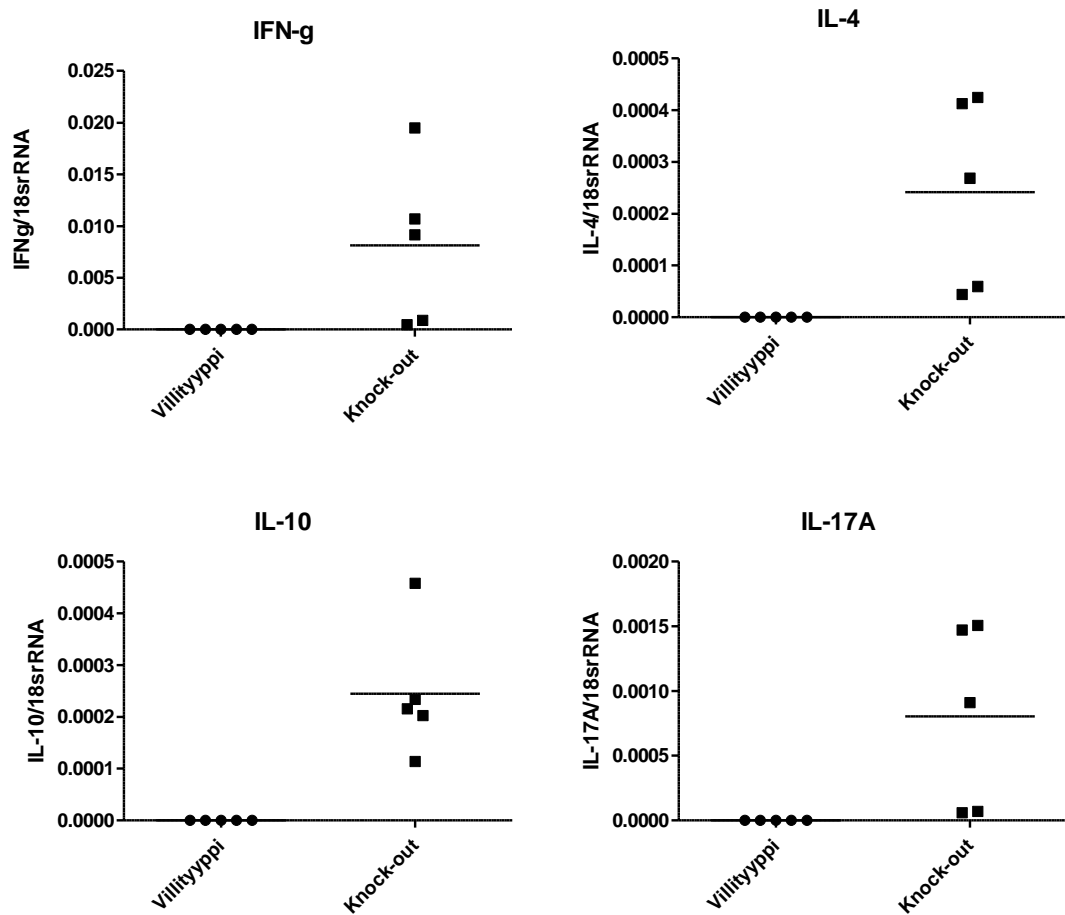
5.1 Suolistotulehduksen karakterisointi CD4cre-fur-flox-linjassa

Suolistotulehduksen karakterisoinnissa tutkituista sytokiineista TNF- α ja IL-1 β ekspresoituvat erityisesti makrofageissa. Kuviossa 6 on esitetty näiden sytokiinien ekspresiotasot CD4cre-fur-flox-hiirissä ja saman hiirilinjan villityypin kontrollihiirissä. Molemmat sytokiinit olivat ekspressoituneet merkitsevästi enemmän knock-out-hiirissä, mutta villityypin hiirissä ekspresio oli kuitenkin havaittavissa. Knock-out-hiirillä IL-1 β :n ekspresiotasot olivat korkeammat kuin TNF- α :n, kun taas villityypin hiirillä TNF- α oli ekspressoitunut enemmän. IL-6 ekspressoitui ainoastaan yhdellä knock-out-hiirellä.



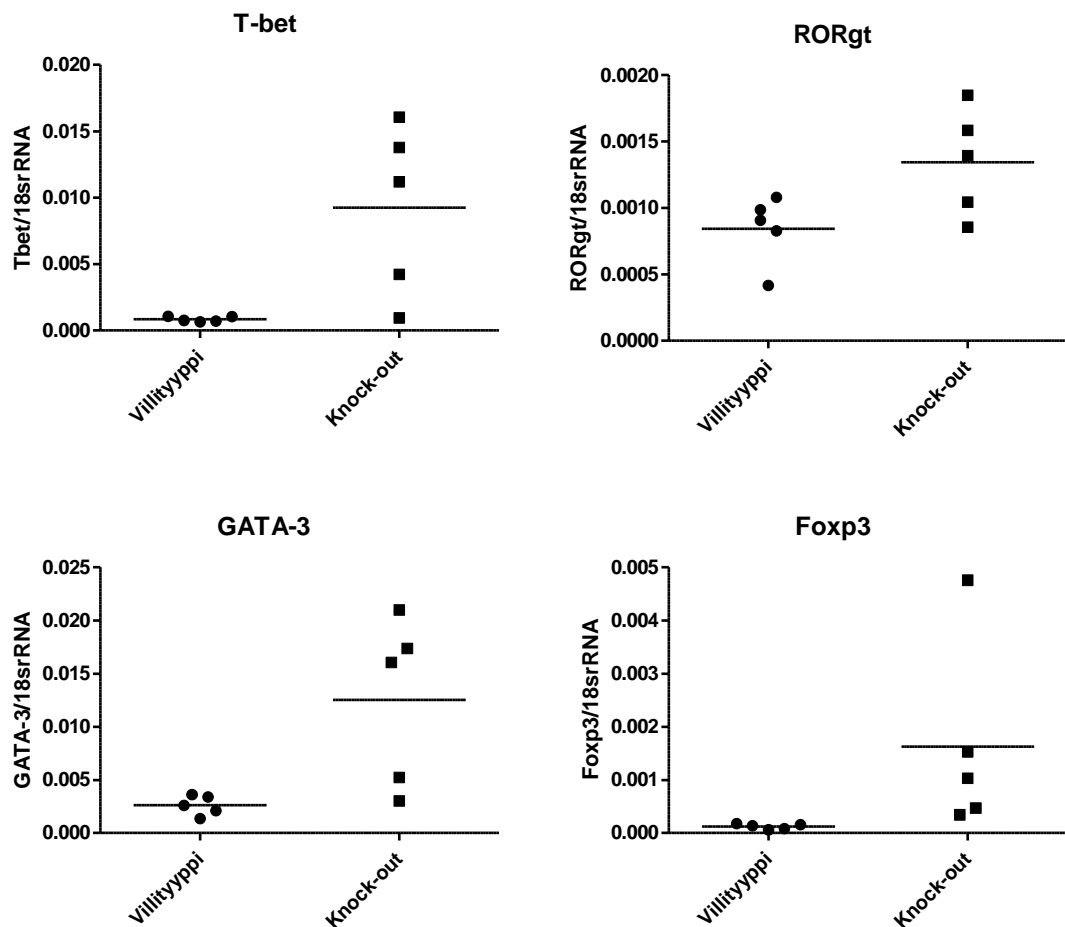
KUVIO 6. TNF- α :n ja IL-1 β :n ekspresiot CD4cre-fur-flox-linjan hiirissä.

Sytokiinit IFN- γ , IL-4, IL-10 ja IL-17A ekspressoituvat yleisesti T-soluissa. Kyseisten sytokiinien ekspressiot CD4cre-fur-flox-linjan hiirissä on esitetty kuviossa 7. Kaikki sytokiinit olivat ekspressoituneet merkitsevästi enemmän knock-out-hiirissä kuin villityypin kontrollihiirissä. Knock-out-hiirissä IFN- γ oli ekspressoitunut eniten ja IL-4 vähiten. Mikään sytokiineista ei ekspressoitunut villityypin hiirissä.



KUVIO 7. IFN- γ :n, IL4:n, IL-10:n ja IL-17A:n ekspressoituminen CD4cre-fur-flox-linjan hiirissä.

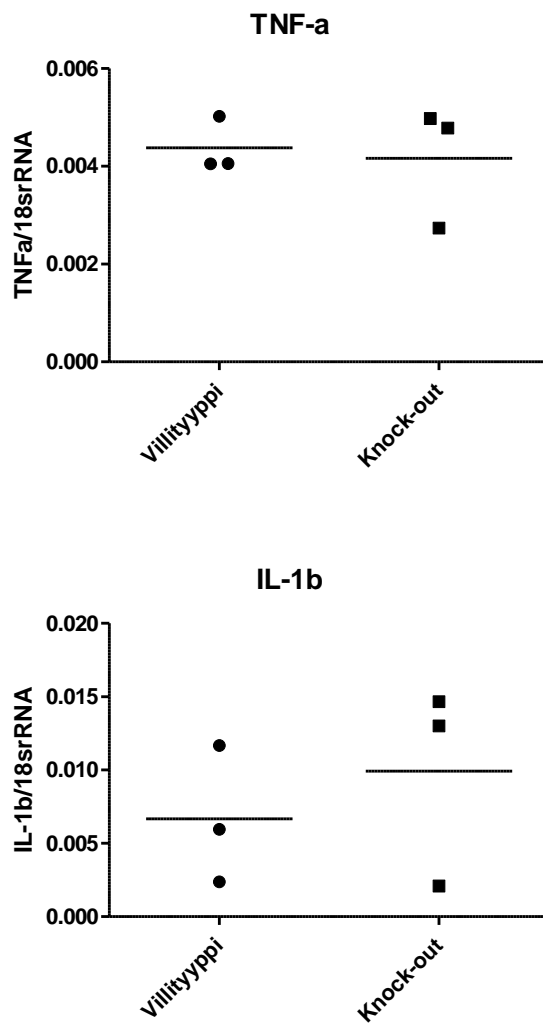
Kaikki neljä tutkittavaa transkriptiotekijää, T-bet, ROR γ t, GATA-3 ja Foxp3, esiintyvät erilaisissa Th-solujen alaryhmissä. Kuviossa 8 on esitetty niiden ekspressiot CD4cre-fur-flox-linjan hiirissä. T-bet, GATA-3 ja Foxp3 ekspressoituivat knock-out-hiirissä merkitsevästi enemmän kuin villityypin hiirissä, ROR γ t:n ekspressiot olivat lähes samalla tasolla knock-out-hiirien ja villityypin hiirien välillä. Knock-out-hiirissä erot transkriptiotekijäekspressioiden välillä olivat todella pieniä, mutta GATA-3 ekspressoitui eniten ja Foxp3 vähiten. Villityypin hiirissä Foxp3 ekspressoitui vähiten ja ROR γ t eniten.



KUVIO 8. T-bet:n, ROR γ t:n, GATA-3:n ja Foxp3:n ekspressiot CD4cre-fur-flox-linjan hiirissä.

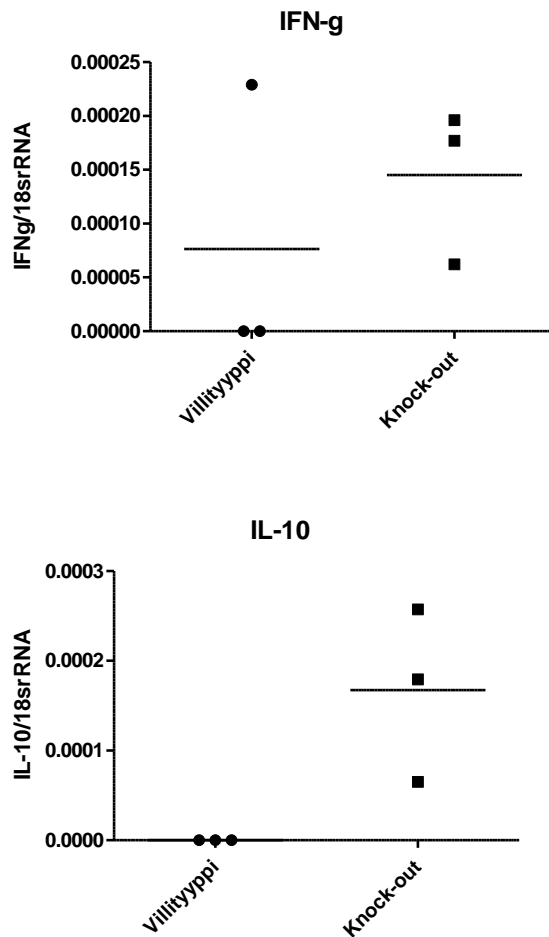
5.2 Suolistotulehduksen merkit LysMcre-fur-flox-linjassa

LysMcre-fur-flox-linjan hiirissä tutkittavista sytokiineista IL-4, IL-6 ja IL-17A eivät ekspressoituneet lainkaan. Makrofageissa ekspressoituvien TNF- α :n ja IL-1 β :n tulokset on esitetty kuviossa 9. Villityypin hiirten ja knock-out-hiirten välillä ei ollut merkitsevää eroa kummankaan sytokiinin ekspressiossa. IL-1 β ekspressoitui sekä villityypin hiirissä että knock-out-hiirissä enemmän kuin TNF- α .



KUVIO 9. TNF- α :n ja IL-1 β :n ekspressiot LysMcre-fur-flox-linjan hiirissä.

T-soluissa ekspressoituvien IFN- γ :n ja IL-10:n tulokset LysMcre-fur-flox-linjan hiirissä näkyvät kuviossa 10. Molemmat sytokiinit ekspressoituivat merkitsevästi enemmän knock-out-hiirissä kuin villityypin hiirissä. IL-10 ei ekspressoitunut villityypin hiirissä lainkaan ja IFN- γ vain yhdessä hiiressä. Knock-out-hiirissä IL-10 ekspressoitui hieman enemmän kuin IFN- γ .



KUVIO 10. IFN- γ :n ja IL-10:n ekspressiot LysMcre-fur-flox-linjan hiirissä.

6 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoite oli tutkia ennalta valittujen sytokiinien ja transkriptiotekijöiden ekspressoitumista suolistotulehduksessa. Työn tarkoituksena oli karakterisoida suolistotulehdus CD4cre-fur-flox-linjan hiirissä sytokiini- ja transkriptiotekijäekspressoanalyysin perusteella. Analyysi tehtiin reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR-menetelmällä. Karakterisoinnin lisäksi oli tarkoitus selvittää sytokiiniekspression avulla, esiintyykö LysMcre-fur-flox-linjan hiirissä merkkejä suolistotulehduksesta.

Karakterisoitavan CD4cre-fur-flox-linjan näytteissä sytokiinit ekspressoituivat merkittävästi enemmän knock-out-hiirissä. Ainoastaan TNF- α ja IL-1 β ekspressoituivat villityypin hiirissä. Muut sytokiinit eivät ekspressoituneet lainkaan tai niin vähän, ettei tulosta voinut pitää luotettavana. Saadut tulokset eivät kuitenkaan ole yllättäviä, sillä villityypin hiirillä ei ole todettu syntyvän suolistotulehdusta, kuten knock-out-hiirillä (Pesu ym. 2008, 248). Villityypin hiiren näytteissä ekspressiotasot eivät olleet yhdelläkään näytteellä muista poikkeavia, vaan kaikkien ekspressiot olivat suunnilleen samalla tasolla. Nämä tulokset kertovat todennäköisesti hiiren suoliston normaalista sytokiiniekspression määrästä.

CD4cre-fur-flox-linjan knock-out-hiirillä on huomattu syntyvän suolistotulehdusta noin kuuden kuukauden iässä (Pesu ym. 2008, 248). Tulehdus näkyy myös sytokiiniekspressiossa. IL-6 oli ainoa sytokiini, jossa tulos saatiin vain yhdestä näytteestä (MPE-51). Sen lisäksi IL-4 ja IL-17A eivät ekspressoituneet kahdella näytteellä (MPE-118 ja MPE-127) lainkaan. Nämä näytteet olivat nuorimmilta hiiriltä (MPE-118 ikä 92 päivää ja MPE-127 ikä 94 päivää), joten niillä ei todennäköisesti ole vielä suolistossaan tulehduksellista tilaa. Sytokiineista IL-1 β ekspressoitui knock-out-hiirillä eniten, IL-4 taas vähiten. Knock-out-hiiristä yhdellä näytteellä (MPE-51) ekspressiomäärät olivat suurimmat kuudessa sytokiinissä seitsemästä, poikkeuksena IL-10. Erot muihin näytteisiin olivat selkeitä. Kyseisellä hiirellä on mahdollisesti ollut voimakas tulehdus paksusuoleltaan, koska sillä ekspressoitui erityisesti proinflammatoriset sytokiinit IFN- γ , IL-1 β ja TNF- α . Proinflammatoristen sytokiinien erityksen kroonistuminen on suolistotulehduksessa todennäköistä (Färkkilä ym. 2013, 474). Hiiri oli iältään 141 päivää, toiseksi vanhin valituista eläimistä. Mahdollisesti suolistotulehdus voi siis alkaa kehittyä CD4cre-fur-flox-hiirille jo alle viiden kuukauden ikäisenä.

Transkriptiotekijöiden osalta kaikista näytteistä saatiin tulos. T-bet, GATA-3 ja Foxp3 ekspressoituivat knock-out-hiirissä merkitsevästi enemmän. Villityypin hiirillä ekspresiotasot ovat odotetusti pienemmät kuin knock-out-hiirillä, eivätkä kaikki tulokset ole täysin luotettavia, sillä ekspressiomäärät olivat vähäisiä. Näytteistä MPe-38:n ekspresiot olivat selkeästi pienimmät, mikä saattaa johtua pienestä RNA-pitoisuudesta ja sitä myöten cDNA:n määrästä. Yleisesti villityypin hiirillä Foxp3 ekspressoitui vähiten ja ROR γ t eniten. Knock-out-hiirillä näyte MPe-51 erottui myös näissä tuloksissa, koska sillä oli suurimmat ekspresiotasot kaikkien neljän transkriptiotekijän kohdalla. Tässä erot muihin näytteisiin ovat kuitenkin huomattavasti pienemmät kuin sytokiiniekspressiossa. Yleisesti knock-out-hiirillä GATA-3 ekspressoitui eniten ja Foxp3 vähiten. Transkriptiotekijöiden ekspressiomäärät kaikkien näytteiden kohdalla oli pienemmät kuin sytokiiniekspressiot.

Karakterisoinnin tulokset vahvistavat sitä oletusta, että proinflammatoristen sytokiinien tuotanto tulehduksellisissa suolistosairauksissa on lisääntynyt (Färkkilä ym. 2013, 474). Proinflammatorisista sytokiineista erityisesti IL-1 β , TNF- α ja IFN- γ ovat ekspressoituneet, kun taas IL-17A ei läheskään yhtä paljon, ja IL-6 ei lainkaan. Edellä mainituista erityisesti TNF- α on tärkeä tekijä tulehduksen säätelyssä (Postal & Appenzeller 2011, 537).

LysMcre-fur-flox-linjan näytteissä ei ekspressoitunut merkittävästi kuin neljä sytokiiniä, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ ja IL-10, muista ei saatu tulosta. IL-10 ja IFN- γ ekspressoituivat merkitsevästi enemmän knock-out-hiirissä kuin villityypin hiirissä, muutoin ekspressiomäärät olivat samalla tasolla. Suurimmat ekspressiomäärät saatiin IL-1 β :sta kaikkien näytteiden kohdalla. LysMcre-fur-flox-linjan hiiriä käsiteltäessä sekä tämän että tutkimusryhmän muiden tutkimusten yhteydessä niillä ei silmämääräisesti ole huomattu tulehduksen merkkejä suolistossa. Tämän takia sytokiiniekspressiotasot ovat matalia ja suolistossa ei ole tulehduksellista tilaa.

CD4cre-fur-flox-linjan karakterisointi onnistui suunnitelmien mukaisesti, samoin tulehdukseen viittaavien merkkien tutkiminen LysMcre-fur-flox-linjasta. Tulokset olivat odotetunlaisia, koska CD4cre-fur-flox-linjan knock-out-hiirillä tulehdusta sytokiiniekspression perusteella on, kun taas LysMcre-fur-flox-linjan knock-out-hiirillä ei. Rinnakkaisten näytteiden välillä ei ollut merkittäviä eroja, joten pipetointitarkkuus oli hyvä. RNA-pitoisuudet ja -puhtaudet olivat riittävät, vaikka RNA:n hajoaminen on

RT-PCR:ssa usein ongelma (Freeman, Walker & Vrana 1999, 121). Kaikki tulokset eivät olleet täysin luotettavia, sillä ekspressiot olivat joissakin tapauksissa pieniä, joten ekspressoitumista ei ole todennäköisesti tapahtunut lainkaan. Tästä syystä osa tuloksista oletettiin suoraan nollassa.

Koe-eläintöihin liittyy vahvasti etiikka, ja eläinten käyttö erilaisissa kokeissa herättää paljon keskustelua puolesta ja vastaan. Eläimien käyttö onkin luvanvaraista ja niitä tulee kohdella asianmukaisesti. Hiirilinjoja (esimerkiksi *fur^{flox/flox}* ja CD4cre-*fur-flox*) kehitetään paljon erilaisia tutkimuksia varten, muun muassa prooteiinikonvertaasi furiinin toimintojen tutkimiseen (Roebroek ym. 2004, 53442–53443; Pesu ym. 2008, 246). Koe-eläintöiden avulla saadaan lisää tietoa erilaisista sairauksista ja fysiologisista toiminoista, joita ei vielä tunneta kunnolla. Niistä on paljon hyötyä myös uusien hoitokeinojen löytämiseen.

Tämän työn perusteella furiinin spesifisellä poistamisella on suolistotulehduksen kehittymisessä merkitystä. T-soluista poistettaessa suolistotulehdus kehittyy ja proinflammatoristen sytokiinien tuotanto lisääntyy. Myeloisista soluista furiinin poistaminen ei näiden tulosten perusteella vaikuta suolistotulehduksen syntyyn. Tulevissa tutkimuksissa voitaisiin selvittää suoliston mikrobikantaa ja sen yhteyttä nyt määritettyyn sytokiiniekspressioon kudosspesifisesti poistogeenisillä furiinihiirilinjoilla. Näin suolistotulehduksen mekanismeja voitaisiin tarkentaa lisää, ja tutkimusryhmä saisi lisää tietoa furiinin merkityksestä suoliston mikrobikannan osalta. Mekanismin selvittämisen myötä mahdollisten hoitokeinojen tutkiminen olisi helpompaa, mistä voisi tulevaisuudessa olla apua myös ihmisille tulehduksellisten suolistosairauksien hoitamisessa.

LÄHTEET

Abbas, A. & Lichtman, A. 2005. Cellular and Molecular Immunology. 5. painos. Philadelphia: Elsevier Saunders.

Abbas, A. & Lichtman, A. 2012. Cellular and Molecular Immunology. 7. painos. Philadelphia: Elsevier Saunders.

Anderson, E., Molloy, S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S. & Thomas, G. 2002. The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (15), 12879–12890.

Artenstein, A. & Opal, S. 2011. Proprotein convertases in health and disease. *The New England Journal of Medicine* 365 (26), 2507–2518.

Baccala, R., Kono, D. & Theofilopoulos, A. 2005. Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. *Immunological Reviews* 205 (1), 9–26.

Billiau, A. & Matthys, P. 2009. Interferon- γ : A historical perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, 97–113.

Bio-Rad Laboratories. 2006. Real-Time PCR Applications Guide.

Bustin, S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169–193.

Bustin, S. & Mueller, R. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science* 109, 365–379.

Campbell, M. & Farrell, S. 2012. Biochemistry. 7. painos. Brooks/Cole.

Carswell, E., Old, L., Kassel, R., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *PNAS* 72 (9), 3666–3670.

Chomarat, P. & Banchereau, J. 1998. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *International Reviews of Immunology* 17 (1–4), 1–52.

Cubie, H., Seagar, A., McGoogan, E., Whitehead, J., Brass, A., Arends, M. & Whitley, M. 2001. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18. *Molecular Pathology* 54 (1), 24–29.

Dinarelli, C. 2009. Immunological and inflammatory functions of the Interleukin-1 family. *The Annual Review of Immunology* 27, 519–550.

Ding, L. & Shevach, E. 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by inhibiting macrophage costimulatory function. *The Journal of Immunology* 148 (10), 3133–3139.

Essalmani, R., Susan-Resiga, D., Chamberland, A., Abifadel, M., Creemers, J., Boileau, C., Seidah, N. & Prat, A. 2010. *In vivo* evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. *The Journal of biological chemistry* 286 (6), 4257–4263.

Ferber, I., Lee, H-J., Zonin, F., Heath, V., Mui, A., Arai, N. & O'Garra, A. 1999. GATA-3 Significantly Downregulates IFN- γ Production from Developing Th1 Cells in Addition to Inducing IL-4 and IL-5 Levels. *Clinical Immunology* 91 (2), 134–144.

Fontenot, J., Gavin, M. & Rudensky, Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology* 4 (4), 330–336.

Freeman, W., Walker, S. & Vrana, K. 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *BioTechniques* 26, 112–125.

Färkkilä, M., Isoniemi, H., Kaukinen, K. & Puolakkainen, P. (toim.) 2013. Gastroenterologia ja hepatologia. 2. painos. Helsinki: Duodecim.

Gendt, K. & Verhoeven, G. 2012. Tissue- and cell-specific functions of the androgen receptor revealed through conditional knockout models in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 352, 13–25.

Giglio, S., Monis, P. & Saint, C. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research* 31 (22), e136 1–5.

Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. 2011. *Immunologia*. 1. painos. Helsinki: Duodecim.

Hilbert, D., Cancro, M., Scherle, P., Nordan, R., Snick, J., Gerhard, W. & Rudikoff, S. 1989. T cell derived IL-6 is differentially required for antigen-specific antibody secretion by primary and secondary B cells. *The Journal of Immunology* 143 (12), 4019–4024.

Holland, P., Abramson, R., Watson, R. & Gelfand, D. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 88, 7276–7280.

Hsieh, C-S., Heimberger, A., Gold, J., O'Garra, A. & Murphy, K. 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an $\alpha\beta$ T-cell-receptor transgenic system. *PNAS* 89, 6065–6069.

Imaizumi, T., Itaya, H., Fujita, K., Kudoh, D., Kudoh, S., Mori, K., Fujimoto, K., Matsumiya, T., Yoshida, H. & Satoh, K. 2000. Expression of Tumor Necrosis Factor- α in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1 α . *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 20, 410–415.

Ivanov, I., McKenzie, B., Zhou, L., Tadokoro, C., Lepelley, A., Lafaille, J., Cua, D. & Littman, D. 2006. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells. *Cell* 126 (6), 1121–1133.

- Jemaa, A., Sallami, S., Ramarli, D., Colombatti, M. & Oueslati, R. 2013. The proinflammatory cytokine, IL-6, and its interference with bFGF signaling and PSMA in prostate cancer cells. *Inflammation* 36 (3), 643–650.
- Kim, J., Lim, J. & Lee, C. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances* 31, 1358–1373.
- Kim, W., Essalmani, R., Szumska, D., Creemers, J., Roebroek, A., D'Orleans-Juste, P., Bhattacharya, S., Seidah, N. & Prat, A. 2012. Loss of endothelial furin leads to cardiac malformation and early postnatal death. *Molecular and Cellular Biology* 32 (17), 3382–3391.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H. & Köhler, G. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339–342.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. 2009. IL-17 and Th17 cells. *The Annual Review of Immunology* 27, 485–517.
- Kouros-Mehr, H., Slorach, E., Sternlicht, M. & Werb, Z. 2006. GATA-3 Maintains the Differentiation of the Luminal Cell Fate in the Mammary Gland. *Cell* 127 (5), 1041–1055.
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Müller, W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75 (2), 263–274.
- Lighvani, A., Frucht, D., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B., Nguyen, B., Gadina, M., Sher, A., Paul W. & O'Shea J. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *PNAS* 98 (26), 15137–15142.
- Lockhart, E., Green, A. & Flynn, J. 2006. IL-17 production is dominated by $\gamma\delta$ T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Immunology* 177, 4662–4669.
- Magyari, L., Varszegi, D., Kovesdi, E., Sarlos, P., Farago, B., Javorhazy, A., Sumegi, K., Banfai, Z. & Melegh, B. 2014. Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications. *World Journal of Orthopedics* 5 (4), 516–536.
- Murphy, K. 2012. *Janeway's Immunobiology*. 8. painos. New York: Garland Science.
- Nelms, K., Keegan, A., Zamorano, J., Ryan, J. & Paul, W. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual Review of Immunology* 17, 701–738.
- Orban, P., Chui, D. & Marth, J. 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *PNAS* 89, 6861–6865.
- Pai, S-Y., Truitt, M. & Ho I-C. 2004. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *PNAS* 101 (7), 1993–1998.

- Park, H., Li, Z., Yang, X., Chang, S., Nurieva, R., Wang, Y-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. & Dong, C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology* 6 (11), 1133–1141.
- Pesu, M., Muul, L., Kanno, Y. & O’Shea, J. 2006. Proprotein convertase furin is preferentially expressed in T helper 1 cells and regulates interferon gamma. *Blood* 108 (3), 983–985.
- Pesu, M., Watford, W., Wei, L., Xu, L., Fuss, I., Strober, W., Andersson, J., Shevach, E., Quezado, M., Roebroek, A., Belkaid, Y., Creemers, J. & O’Shea, J. 2008. T cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral tolerance. *Nature* 455 (7210), 246–250.
- Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best-Keeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26, 509–515.
- Postal, M. & Appenzeller, S. 2011. The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 56 (3), 537–543.
- Roebroek, A., Schalken, J., Bussemakers, M., van Heerikhuizen, H., Onnekink, C., Debruyne, F., Bloemers, H. & Van de Ven, W. 1986. Characterization of human *c-fes/fps* reveals a new transcription unit (*fur*) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Molecular Biology Reports* 11 (2), 117–125.
- Roebroek, A., Schalken, J., Leunissen, J., Onnekink, C., Bloemers, H. & Van de Ven, W. 1986. Evolutionary conserved close linkage of the *c-fes/fps* proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *The EMBO Journal* 5 (9), 2197–2202.
- Roebroek, A., Umans, L., Pauli, I., Robertson, E., van Leuven, F., Van de Ven, W. & Constam, D. 1998. Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase furin. *Development* 125, 4863–4876.
- Roebroek, A., Taylor, N., Louagie, E., Pauli, I., Smeijers, L., Snellinx, A., Lauwers, A., Van de Ven, W., Hartmann, D. & Creemers, J. 2004. Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (51), 53442–53450.
- Rohleder, N. 2013. Interleukins, -1 (IL-1), -6 (IL-6), -18 (IL-18). Teoksessa Gellman, M. & Turner, J. (ed.) *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. New York: Springer.
- Sarlos, P., Kovesdi, E., Magyari, L., Banfai, Z., Szabo, A., Javorhazy, A. & Meleg, B. 2014. Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 5 (3), 304–321.
- Schroder, K., Hertzog, P., Ravasi, T. & Hume, D. 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 163–189.
- Schubert, L., Jeffrey, E., Zhang, Y., Ramsdell, F. & Ziegler, S. 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (40), 37672–37679.

- Seidah, N. & Prat, A. 2012. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 367–383.
- Seidah, N., Day, R., Marcinkiewicz, M. & Chrétien, M. 1998. Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 839, 9–24.
- Seshasayee, A., Sivaraman, K. & Luscombe, N. 2011. An overview of prokaryotic transcription factors. Teoksessa Hughes, T. (ed.) *A handbook of transcription factors. Sub-cellular Biochemistry* 52, 7–23.
- Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka. 2. painos*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- Szabo, S., Kim, S., Costa, G., Zhang, X., Fathman C.G. & Glimcher L. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100 (6), 655–669.
- Terpe, K. 2013. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 10243–10254.
- Thomas, G. 2002. Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (10), 753–766.
- Thornberry, N., Bull, H., Calaycay, J., Chapman, K., Howard, A., Kostura, M., Miller, D., Molineaux, S., Weidner, J., Aunins, J., Elliston, K., Ayala, J., Casano, F., Chin, J., Ding, G., Egger, L., Gaffney, E., Limjuco, G., Palyha, O., Raju, S., Rolando, A., Salley, P., Yamin, T-T., Lee, T., Shively, J., MacCross, M., Mumford, R., Schmidt, J. & Tocci, M. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 356, 768–774.
- Turpeinen, H., Ortutay, Zsuzsanna & Pesu, M. 2013. Genetics of the first seven proprotein convertase enzymes in health and disease. *Current Genomics* 14 (7), 453–467.
- Tyagi, S. & Kramer, F. 1996. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* 14, 303–308.
- Wallace, K., Zheng, L-B., Kanazawa, Y. & Shih, D. 2014. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 20 (1), 6–21.
- Wildin, R., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J-L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli E. D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M. & Brunkow, M. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*. *Nature Genetics* 27, 20–21.
- Wong, M. & Medrano, J. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39 (1), 75–85.
- Zhao, R., Zhou, H. & Bo Su, S. 2013. A critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* 17 (3), 658–669.