

**EFFLUX-GEENIEN ILMENTYMINEN hiPS-SOLUISTA ERILAISTETUISSA  
SARVEISKALVON EPITEELISOLUISSA**

Mia Haukipää  
Syventävien opintojen opinnäyte  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
BioMediTech/Silmäryhmä  
Elokuu 2014

---

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

BioMediTech/Silmäryhmä

## MIA HAUKIPÄÄ: EFFLUX-GEENIEN ILMENTYMINEN hiPS-SOLUISTA ERILAISTETUISSA SARVEISKALVON EPITEELISOLUISSA

Kirjallinen työ, 27 s.

Ohjaajat: FT, dosentti Heli Skottman, FM Alexandra Mikhailova

Elokuu 2014

---

Avainsanat: sarveiskalvon epiteeli, hiPSC, HCE, efflux-kuljettajaproteiini, multidrug resistance protein, P-glykoproteiini, breast cancer related proteiini

Sarveiskalvon epiteelin on opittu ilmentävän efflux-proteiineja MRP1-6 (multiresistance protein 1-6), P-gp (P-glykoproteiini) ja BCRP (breast cancer resistance protein), jotka pumppaavat substraattejaan ulos solusta. Tämän tiedon perusteella on voitu tutkia erilaisia solulinjoja, joilla voitaisiin korvata ihmisen sarveiskalvon epiteeliä tai luoda ihmisen sarveiskalvon epiteeliä vastaavia kudospalleja. hiPS-soluja (human induced pluripotent stem cell) voidaan ohjelmoida ihmisen omista soluista ja erilaistaa sarveiskalvon kaltaisiksi soluiksi.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin MRP1-6-, P-gp- ja BCRP-efflux-proteiinien ilmentymistä mRNA-tasolla natiivissa ihmisen sarveiskalvon epiteelissä (CE), immortalisoidussa HCE-solulinjassa, erilaistumattomassa hiPS-solulinjassa ja alkion kantasolulinjassa (hESC), sekä hiPS- ja hES-soluista erilaistetuissa sarveiskalvon epiteeleissä (hiPSC-CE ja hESC-CE). Tutkimuksessa käytettiin reaaliaikaista qPCR-menetelmää ja ilmentymistasot analysoitiin Ct-arvoista  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -menetelmällä. Solulinjojen efflux-geenien ilmentymistasoja verrattiin natiiviin ihmisen sarveiskalvon epiteeliin.

Kaikki tutkittavat efflux-geenit ilmenivät sekä CE:ssä, HCE:ssä, hiPSC-, hiPSC-CE- ja hESC-CE-solulinjoissa. hiPSC-CE:n ilmentymistasot vaihtelivat joidenkin geenien kohdalla suurestikin CE:stä. hiPSC-CE muistutti kuitenkin paremmin CE:tä kuin kaupallinen HCE-solulinja. Tämän tutkimuksen perusteella hiPSC-CE-solulinja ei sovi vielä kliiniseen käyttöön, vaan se tarvitsee jatkotutkimusta.

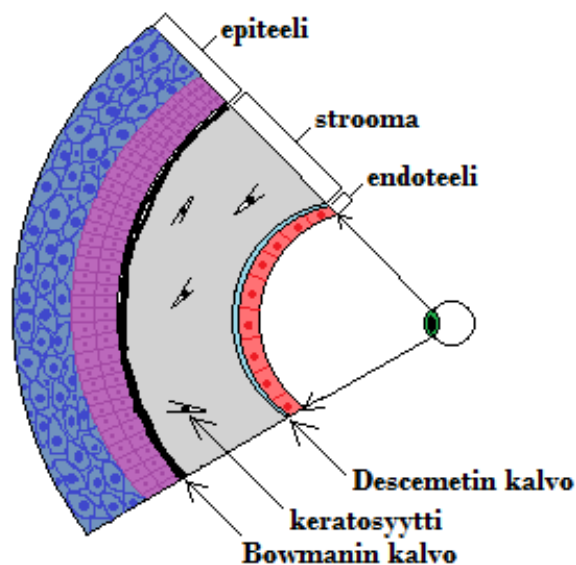
# SISÄLLYS

<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Sarveiskalvo .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epiteeli.....	2
1.1.2 Bowmanin kalvo.....	3
1.1.3 Strooma.....	4
1.1.4 Descemetin kalvo.....	4
1.1.5 Endoteeli .....	4
<b>1.2 Limbaaliset kantasolut .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Limbaalisten kantasolujen mikroympäristö .....	5
1.2.2 Limbaaliset häiriöt.....	6
1.2.3 LSCD:n hoito .....	7
<b>1.3 Efflux-proteiinit.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Työn tavoitteet .....</b>	<b>12</b>
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Solulinjat.....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Erileistumattomat kantasolut.....	12
2.1.2 hiPSC-CE ja hESC-CE.....	13
2.1.3 HCE-solulinja .....	13
2.1.4 Ihmisen natiivi sarveiskalvon epiteelikudos.....	13
<b>2.2 RNA:n kääntäminen cDNA:ksi .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Reaaliaikainen qPCR .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4 Tulosten analysointi.....</b>	<b>15</b>
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>16</b>
<b>4 POHDINTA .....</b>	<b>18</b>
<b>LÄHTEET .....</b>	<b>22</b>
<b>LIITE .....</b>	<b>27</b>

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Sarveiskalvo

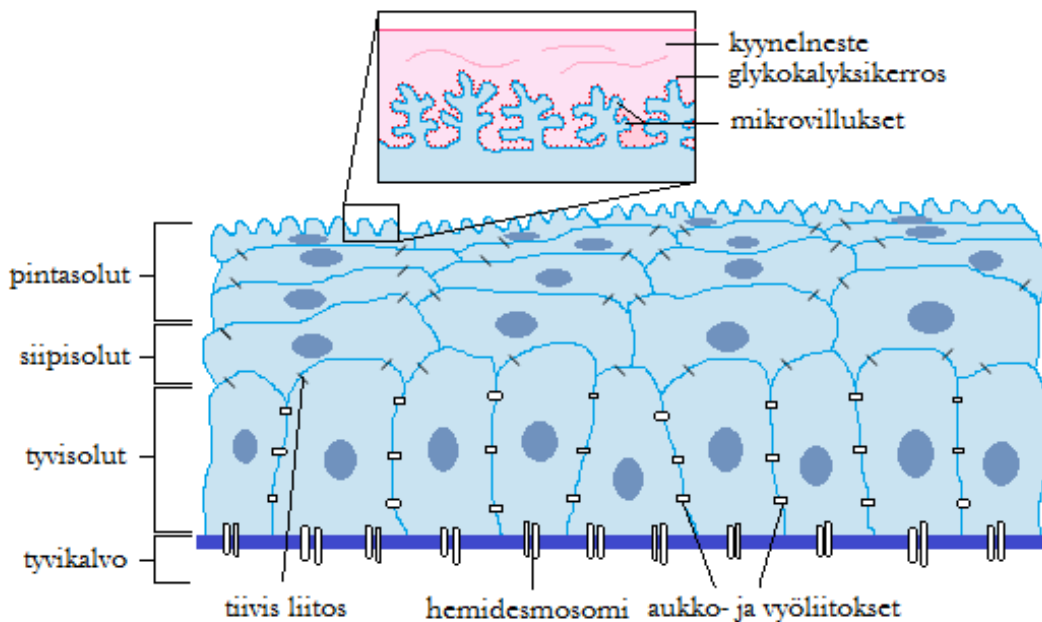
Näkeminen on mahdollista läpinäkyvän ja verisuonettoman sarveiskalvon ansiosta. Sarveiskalvon tehtävä on suojella silmää sekä läpäistä ja taittaa valoa. Se sijaitsee silmän etuosassa keskivaiheilla ja toimii silmän rajapintana ulkomaailmaan yhdessä kyynelnesteen kanssa. Siinä ei ole verisuonia lainkaan, vaan se on läpinäkyvä ja tiheään hermotettu. Se rajoittuu sekä kiinnittyy reunoiltaan sidekalvoon.(1) Aikuisen ihmisen sarveiskalvo on noin 11,5–12,0 mm leveä halkaisijaltaan vaakasuunnassa ja pystysuunnassa noin 10,5–11,0 mm korkea. Sarveiskalvon paksuus on noin 0,5 mm keskellä ja kasvaa kohti laitoja. Sarveiskalvon ulkoneva kaareva muoto mahdollistaa asfäärisen optiikan, joka taittaa valonsäteet yhteen polttopisteeseen.(2) Sarveiskalvo koostuu kuvan 1 mukaisesti viidestä kerroksesta, jotka ovat epiteeli, Bowmanin kalvo, strooma, Descemetin kalvo sekä endoteeli. Kerrokset ovat hyvin erilaisia ja jokaisella on oma funktionsa, jonka avulla sarveiskalvon normaali toiminta mahdollisestaan ja ylläpidetään.(2,3)



**Kuva 1.** Kaavakuva sarveiskalvon poikkileikkauksesta. Se koostuu kolmesta solukerroksesta, jotka ovat epiteeli, strooma ja endoteeli, sekä niitä erottavista kalvoista, Bowmanin kalvo ja Descemetin kalvo. Mukailtu lähteestä: Bioessays 35: 211-219 (4).

### 1.1.1 Epiteeli

Epiteeli on uloin kerroksista ja se on kerrostunutta, ei-keratinisoitunutta epiteeliä(5). Kuvan 2 mukaisesti epiteelin muodostaa 5-7 kerrosta erilaisia epiteelisoluja: pintasolut, siipisolut ja tyvisolut(3). Epiteelin tehtävä on suojella sarveiskalvon sisempiä kerroksia ja koko silmän etuosaa. Se osallistuu myös sarveiskalvon läpinäkyvyyden ylläpitämiseen estämällä hydrofiilistä stroomaa sitomaan vettä niin paljon kuin se pystyisi. Epiteelisolut estävät kyynelnesteen pääsyn epiteelin läpi, ja niillä on jonkin verran ionipumppuaktiivisuutta, jonka avulla nestettä saadaan pumpattua stroomasta pois päin.(6) Epiteelin läpäisevyys onkin erittäin alhainen, ja se läpäisee vain pieniä, lipofiilisiä yhdisteitä(7).



**Kuva 2.** Piirroskuva sarveiskalvon epiteelin poikkileikkauksesta. Epiteeli koostuu 5-7 kerroksesta pintasoluja, siipisoluja ja tyvisoluja. Mukailtu lähteestä: Ophthalmology 3<sup>rd</sup> ed (8)

Epiteelin päällimmäisin kerros muodostuu keskimäärin kahdesta tai kolmesta litteästä pintasolukerroksesta, joiden pinnalla on runsaasti mikrovilluksia ja mikropoimuja. Nämä ulostyöntyvät rakenteet kasvattavat pinta-alaa, jonka avulla vaihdetaan happea, ravintoaineita ja metaboliatuotteita.(9) Pintasolujen solukalvoa verhoaa kyynelnestettä solupintaan hydrofiilisesti kiinnittävä glykokalyksikerros(2). Kyynelneeste suojaa sarveiskalvon pintaa mikrobeilta, kemiallisilta ja myrkyllisiltä aineilta sekä vieraskappaleilta(1). Epiteelin pintasolut ovat liittyneet kiinni toisiinsa tiiviillä liitoksilla, mikä estää kyynelnesteen ja siihen liuenneiden mikrobien ja haitallisten kemiallisten aineiden pääsyn soluvälitilaan. Pintakerroksen alla on kaksi tai kolme solukerrosta suprabasaaleja

soluja eli siipisoluja. Solut eivät ole yhtä litteitä kuin pintakerroksen solut, mutta niillä on yhtä lailla tiiviit liitokset vierekkäisten solujen välillä.(2)

Syvimpänä epiteelissä on tyvikerros, joka on yksinkertaista lieriöepiteeliä. Tyvisolut kykenevät mitoosiin, ja erilaistuessaan ne etenevät epiteelin pintaa kohti ja muuttuvat siipi- ja pintasoluiksi. Vierekkäisten tyvisolujen välillä on aukko- ja vyöliitoksia. Solut ovat kiinnittyneet hemidesmosomeilla alla olevaan tyvikalvoon, joka koostuu pääosin tyvisolujen erittämästä tyypin IV kollageenista ja laminiinista. Häiriöt tässä lujassa kiinnittymisessä tyvikalvoon johtavat toistuviin sarveiskalvon eroosiosyndroomiin ja parantumattomiin epiteelivaurioihin.(2,3)

Sarveiskalvon epiteelin kantasolut sijaitsevat limbuksessa eli sarveiskalvon ja sidekalvon epiteelin yhtymäkohdassa sijaitsevassa kudoksessa(10). Limbaaliset kantasolut toimivat reservinä uusille epiteelisoluille. Ne erilaistuvat välivaiheen kautta tyvisoluiksi, kun ne etenevät kohti sarveiskalvon keskustaa. Tyvisolut jakautuvat mitoottisesti ja kypsyvät edelleen siipi- ja pintasoluiksi. Limbaalisten kantasolujen olemassa olo limbuksissa on ehdotonta terveelle sarveiskalvolle, koska tyvisolut voivat jakautua mitoottisesti vain rajallisesti. Limbuksen tehtävänä on myös rajata sarveiskalvoa sidekalvosta ja estää sen verisuonittumista.(11) Epiteelisolujen keskimääräinen elinikä on seitsemästä kymmeneen päivään, jonka jälkeen ne surkastuvat, menevät apoptoosiin ja hilseilevät pois epiteelin pinnalta(12). Tälle solujen kiertokululle kehitettiin X, Y, Z-hypoteesi, jonka mukaan (X) tyvisolut jakautuvat, kypsyvät ja kulkevat kohti sarveiskalvon pintaa, (Y) limbuksessa jakautuu soluja, jotka siirtyvät korvaamaan tyvisoluja, ja (Z) epiteelisoluja hilseilee pois pinnasta(13). Limbaalisten kantasolujen toiminnan häiriintyminen saattaa johtaa sarveiskalvon epiteelikerroksen vaurioitumiseen ja näkökyvyn heikentymiseen. Epiteelikudoksen vaurioita ja mahdollisia hoitomuotoja käsitellään tarkemmin alaluvussa 1.2.

### **1.1.2 Bowmanin kalvo**

Bowmanin kalvo sijaitsee strooman edessä ja onkin itse asiassa strooman solutonta etuosaa. Kalvo on 12–15 µm paksu ja koostuu lyhyistä tyypin I kollageenisäikeistä sekä proteoglykaaneista, joiden avulla se auttaa sarveiskalvoa ylläpitämään muotoaan. Kalvo ei uusiudu eli vaurion sattuessa siihen jää arpi.(2,3)

### **1.1.3 Strooma**

Strooma kattaa noin 80–85 % sarveiskalvon paksuudesta(2). Strooma koostuu pääosin soluväliaineesta, jonka seassa on soluja ja hermosäikeitä sekä niihin liittyneitä Schwannin soluja(3,14). Strooman pääkomponentteja olevat tyypin I ja V kollageenisäikeet muodostavat 200–250 läpinäkyvää lamellia. Ne ovat järjestäytyneet samansuuntaisesti sarveiskalvon pinnan kanssa ja suuntautuneet toisiinsa nähden siten, että ne läpäisevät valoa.(15) Kollageenikimput ovat tiiviimmin pakkautuneet sarveiskalvon sentraalisessa osassa kuin periferiassa, mikä vähentää valon sirontaa ja lisää sarveiskalvon mekaanista kestävyyttä kaarevassa kohdassa(16). Soluväliaine lamellien välissä koostuu pääasiassa vedestä, proteoglykaaneista, glykoproteiineista ja inorgaanisista suoloista. Seassa on kautta strooman keratosyyttejä ja fibroblasteja, joita on vain 2-5 % strooman tilavuudesta. Keratosyyttien tehtävänä on ylläpitää strooman rakennetta tuottamalla soluväliaineen komponentteja ja tarvittaessa hajottamalla ne. Fibroblastit tuottavat kollageenisäikeitä. Sarveiskalvoon kohdistuneen stressin tai trauman johdosta keratosyytit voivat muuttua fibroblasteiksi, jotka tuottavat lisää kollageenia.(3,17)

### **1.1.4 Descemetin kalvo**

Descemetin kalvo, joka sijaitsee strooman takana, on endoteelin tyvikalvo. Se koostuu endoteelin erittämästä tyypin IV kollageenista, laminiinista ja fibronektiinistä. Descemetin kalvo on vastasyntyneellä erittäin ohut, vain 2-3  $\mu\text{m}$ , ja sen paksuus kasvaa iän myötä. Aikuisella kalvon paksuus on noin 10  $\mu\text{m}$ . Ohuet kollageenisäikeet ovat järjestäytyneet kuusikulmion muotoon kalvon etuosassa. Endoteeli tuottaa kalvon amorfista takaosaa koko ihmisen eliniän. Descemetin kalvo mukailee strooman muotoa ja ylittää reunoiltaan trabekkeleihin rajalla, jota kutsutaan Schwalben linjaksi.(2,3) Kalvo voi sieltä työntyä etukammioon, mikä voidaan nähdä ikääntyneessä silmässä tai sarveiskalvovaurion seurauksena.

### **1.1.5 Endoteeli**

Yksikerroksinen endoteeli on vastasyntyneellä noin 10  $\mu\text{m}$  paksu koko sarveiskalvon takapinnan alueelta kunnes se päättyy trabekkeleihin yhdessä Descemetin kalvon kanssa. Endoteelin solut ovat kuusikulmaisia Descemetin kalvon kollageeniverkon mukaisesti, ja ne ovat kiinnittyneet Descemetin kalvoon eli tyvikalvoonsa basaalisesti lukuisilla hemidesmosomeilla. Lateraalisesti solut ovat

kiinnittyneet toisiinsa aukkoliitoksilla ja tiiviillä liitoksilla. Lateraalisilla membraaneilla on myös runsaasti natrium-kaliumpumppuja.(2)

Endoteelin tärkein tehtävä on ylläpitää sarveiskalvon läpinäkyvyyttä pitämällä strooman vesipitoisuus alhaisena (78 %)(18). Endoteeli saa aikaan veden passiivisen osmoosin stroomasta pois päin kahdella olennaisella mekanismilla. Ensimmäinen on solukalvojen natrium-kaliumpumput, jotka siirtävät ioneja ulos sarveiskalvosta. Toinen mekanismi on solunsisäinen hiilihappoanhydraasireitti, jossa vedestä ja hiilidioksidista tuotetaan hiilihapon kautta vety- ja bikarbonaatti-ioneja. Endoteelin aktiivisten ionipumppujen avulla vesi siirtyy sähkökemiallisen gradientin suuntaisesti pois stroomasta.(19) Endoteelin tiiviit liitokset eivät ole yhtä pitäviä kuin epiteelin, joten soluvälit vuotavat jonkin verran. Näin neste voi siirtyä soluvälitilasta etukammioon ja toisaalta endoteelisolut saavat ravinteita.(20)

Endoteelin soluilla ei ole mittoittista aktiivisuutta, vaan ihmisellä on riittävä reservi soluja eliniäksi. Ikääntymisen ja traumojen seurauksena reservi kuluu, ja endoteelin solut madaltuvat ja levittäytyvät peittämään sarveiskalvon takapintaa. Aikuisella endoteelin paksuus on noin 4-6  $\mu\text{m}$ .(2,3) On havaittu, että endoteelin solumäärän ollessa alle 500 solua/ $\text{mm}^2$ , endoteelin toiminta heikkenee ja riski sarveiskalvon turpoamiselle lisääntyy(21).

## **1.2 Limbaaliset kantasolut**

### **1.2.1 Limbaalisten kantasolujen mikroympäristö**

Limbaalisten kantasolujen mikroympäristön ansiosta solut säilyttävät olemuksensa kantasoluina ja kykynsä erilaistua(22). Mikroympäristö on hyvin hallittu limbuksen tyvikerroksessa, jossa kantasolut sijaitsevat. Tyvikerroksen läheisyyteen tulee runsaasti verisuonitusta, veren mukana kasvutekijöitä kantasoluille, ja hermotusta. Tyvikerroksessa kantasolut ovat myös lähellä limbaalisen strooman fibroblasteja, jotka säätelevät epiteelisolujen toimintaa. (11) Epiteelin tyvikalvo limbuksessa on poimuttunut, mikä lisää mikroympäristön pinta-alaa ja tuo suojaa kantasoluille. Poimuttuminen on erityisen voimakasta ylä- ja alaluomen kohdalla.(23) Poimujen lomasta on löydetty syvälle tunkeutuvia limbaalisia epiteliaalisia kryptia, joissa todelliset limbaaliset kantasolut sijaitsevat. Kantasolujen määrä on pieni, alle 1 % koko limbaalisen epiteelin solupopulaatiosta, mutta se riittää sarveiskalvon epiteelin uusiutumiseen ja pienten vaurioiden korjaamiseen.(11)



## 1.2.2 Limbaaliset häiriöt

Limbuksen tehtävänä on ylläpitää limbaalisia unipotentteja kantasoluja, joista erilaistuu ajan myötä sarveiskalvon epiteelin soluja, ja toimia fyysisenä rajapintana kirkkaan verisuonettoman sarveiskalvon ja verisuonitetun sidekalvon välillä. Kun limbuksen toiminta on häiriintynyt, sarveiskalvon epiteeli ei uusiudu normaalisti ja sidekalvo levittäytyy sarveiskalvon pinnalle. Yleisnimitys ilmiölle on limbaalisten kantasolujen puute (LSCD, limbal stem cell deficiency)(4). Häiriötilan taustalla on monia patofysiologisia syitä, kuten limbaalisten kantasolujen vähentynyt määrä tai toiminnan häiriö solunsisäisistä tai mikroympäristön muutoksista johtuen. Seurauksena sidekalvon epiteelin kyky jakautua on suurempi kuin limbuksen, ja sidekalvo pääsee valtaamaan alaa.(11)

LSCD:n kliiniseen taudinkuvaan kuuluu erilaisia merkkejä sarveiskalvon epiteelin vajaatoiminnasta. Epiteeli vaurioituu herkästi ja paranee huonosti, mikä voi johtaa krooniseen keratiittiin eli sarveiskalvon tulehdukseen. Potilas kokee jatkuvaa epämukavuuden tunnetta ja kipua silmän pinnalla. Sidekalvon epiteelin levittäytyminen sarveiskalvolle vähentää sen läpinäkyvyyttä, koska sidekalvon mukana levittäytyvät myös veri- ja imusuonet. Potilas kokee voimakasta valonarkuutta ja näkökyvyn alentumista. Tauti on kivulias ja johtaa sokeutumiseen.(24)

Useimmat LSCD:n aiheuttajat tunnetaan, mutta niiden lisäksi esiintyy idiopaattisia tapauksia, joiden syyt ovat tuntemattomia (25). Perinnöllisiä tai geneettisiä (primaarisia) limbaalisia kantasoluhäiriöitä ovat aniridia, ektodermaalinen dysplasia ja perinnöllinen erytrokeratodermia(11,26). Aniridia on yleisin perinnöllinen LSCD:tä aiheuttava sairaus. Sen aiheuttaja on mutaatio geenissä *PAX6*, minkä seurauksena ovat silmän kehityshäiriö ja keratopatia. *PAX6* on avainasemassa myös limbaalisten kantasolujen proliferaation säätelyssä. Tauti ei ilmene vastasyntyneellä, vaan kehittyy vasta myöhäislapsuudessa.(27) Systemiset inflammatoriset taudit, kuten limakalvopemfigoidi, Steven-Johnson-syndrooma, krooninen limbiitti ja pterygium, ovat sekundäärisiä LSCD:n aiheuttajia(11,26). Pterygium on yksi yleisimmistä silmätauteista, jonka nykyään uskotaan olevan proliferatiivinen sairaus ja yksi sen tärkeimmistä riskitekijöistä on UV-säteily(28). Muita limbusten vaurioiden aiheuttajia ovat termalliset ja kemialliset palovammat, pitkäaikainen piilolinssien käyttö, altistuminen sytotoksisille tai antiproliferatiivisille aineille sekä infektiot, kuten Herpes simplex -infektio. Nämä aiheuttavat vauriota suoraan kantasolujen mikroympäristöön. LSCD voi kehittyä myös joidenkin hoitojen, kuten mittavan kryohoidon, säteilytyksen ja limbuksen leikkauksen, seurauksena.(4,11,26)

### 1.2.3 LSCD:n hoito

Osittaisessa LSCD:ssä hoitona suoritetaan sidekalvon epiteelin mekaaninen poisto ja paljastuneen alueen päällystäminen sarveiskalvon epiteelillä tai pelkällä sikiökalvolla(29,30). Tämä on yksinkertainen ja tehokas tapa, mutta ei ole riittävä toimenpide, jos sidekudos peittää koko sarveiskalvon alueen. Täydellisessä limbaalisessa häiriössä ainoa parantava hoitokeino on terveiden limbaalisten kantasolujen siirto(11). Unilateraalisissa tapauksissa potilaan terveestä silmästä otetaan pieni limbaalinen siirre ja laitetaan sairaaseen silmään (autologinen siirre). Bilateraalisisissa tapauksissa potilaan molemmat silmät kärsivät limbaalisesta häiriöstä ja kudossiirre on saatava joko elävältä luovuttajalta tai vainajalta (allogeeninen siirre). Elävä luovuttaja on yleensä potilaan sukulainen, koska tavoitteena on kudosten yhtäläisyys ja HLA-tyypin yhteensopivuus. Sarveiskalvon siirto voidaan toteuttaa samassa toimenpiteessä tai jälkikäteen, jos silmässä on stroomaan yltäviä arpeutumia.(31)

Vaikka suurin osa kudossiirroista onnistuu, liittyy niihin kuitenkin haasteita ja riskejä. Autologista siirrettä tai elävältä luovuttajalta siirrettä otettaessa on riski, että luovuttavaan silmään kehittyy iatrogeninen limbaalinen häiriö, jossa luovuttajalle jää liian vähän kantasoluja(4). Allogeeniseen siirtoon luovutettavat kudossiirteet ovat harvassa ja hylkimisreaktioita tapahtuu, koska sarveiskalvon epiteelin perifeerisellä alueella on runsaasti Langerhansin soluja ja HLA-DR-antigeneja(32,33). Allogeenisen siirteen kanssa joudutaan aina käyttämään immunosuppressiivista hoitoa ainakin 12 kuukautta, jos allogeeninen siirre ei ole HLA-tyypitetty(31). Immunosuppressiivinen hoito altistaa potilaan kuitenkin infektioille, mikä lisää siirteen hylkimisreaktion riskiä(34).

Lupaava hoitomuoto on viljeltyjen limbaalisten kantasolujen siirto (CLET, cultured limbal epithelial transplantation), jota kokeiltiin ensimmäisen kerran 1990-luvun lopulla autologisesti(35). Kudospalaa tai siitä eristettyjä limbaalisia epiteelisoluja on viljelty monin eri menetelmin ja lopputuloksena on saatu viljelmä, jossa on limbaalisia epiteelisoluja sekä kantasoluja. Nämä limbaaliset siirteet tarvitsevat yleensä siirtomateriaalin, jota joissain tapauksissa käytetään kasvatusalustana ja jonka avulla limbaaliset solut asetetaan vastaanottajan silmään.(36) Vuonna 1998 Tseng et al. käyttivät sikiökalvoa menestyksekkäästi siirtomateriaalina *in vitro* kantasolusiirroissa(30). Nykyisessä kliinisessä käytössä olevan sikiökalvon haasteita ovat kuitenkin muun muassa saatavuuden haasteellisuus, infektoriski ja rajallinen läpinäkyvyys. Muita kliinisesti tai prekliinisesti testattuja siirtomateriaaleja ovat synteettiset polymeerit ja biopolymeerit, kuten fibriinigeeli, kollageenigeeli, keratiini ja silkkifibroini.(37)

Kudosviljelylle ei ole vielä muodostunut yhdenmukaista menetelmää, vaan tehdyissä tutkimuksissa esimerkiksi viljelytekniikat, potilasaineiston valitseminen ja tulosten arviointitavat vaihtelevat suuresti, minkä vuoksi se ei ole vielä yleistynyt kliinisenä hoitomuotona.(38)

CLET-menetelmässä piilee yhä samat ongelmat kuin kudossiirteissä, nimittäin kudossiirteiden ja limbaalisten kantasolusiirteiden vähyys, allogeenisten siirteiden hylkimisreaktiot, immunosuppressiivisten hoitojen tarve ja infektoriski. Tämän päivän tutkimukset pyrkivätkin löytämään vaihtoehtoisia solulähteitä autologiseen sarveiskalvon epiteelin korvaamiseen. Vahva kandidaattiryhmä ovat aikuisen ihmisen epiteelisolut, jotka muistuttavat sarveiskalvon epiteeliä: ei-keratinisoitunutta, kerrostunutta kuutioepiteeliä. Tällaisia ovat suun limakalvon epiteeli, sidekalvoepiteeli, nenän limakalvoepiteeli sekä vaginaalinen ja rektaalinen epiteeli.(38)

Toinen suurta potentiaalia omaava ehdokas on kantasoluhoito. Ihmisen alkion kantasolut (hESC, human embryonic stem cell) ovat pluripotentteja kantasoluja, jotka pystyvät erilaistumaan miksi tahansa kehon soluiksi. Näitä soluja istuttamalla osittain vaurioituneeseen sarveiskalvon epiteeliin, on saatu kantasolut levittäytymään ja erilaistumaan epiteelin kaltaisiksi soluiksi *in vitro*(39). Kantasolujen erilaistuminen epiteelin kaltaisiksi soluiksi perustuu siihen, että soluille luodaan limbaalisten kantasolujen mikroympäristö. Vuonna 2007 ilman sarveiskalvon epiteelin läsnäoloa onnistuttiin luomaan mikroympäristö, jossa hES-solut erilaistuivat sarveiskalvon epiteelin kaltaisiksi soluiksi. hES-soluja viljeltiin kollageeni IV:llä kasvatusliuoksessa, jossa oli limbaalisten fibroblastisolujen erittämiä liukoisia tekijöitä.(40) Alkion kantasolujen käyttöä vaikeuttaa niiden hankkimisen hankaluus ja eettiset kysymykset. Lisäksi, alkion kantasoluista erilaistetut solut ovat aina allogeenisia, eli niiden käyttöön liittyy hylkimisreaktioiden riski.

Alkion kantasolujen käytön ja hylkimisreaktioiden ongelmiin voi olla ratkaisu ihmisen uudelleenohjelmoiduissa kantasoluissa (hiPSC, human induced pluripotent stem cell). Uudelleen ohjelmoidut kantasolut ovat alun perin aikuisen yksilön erilaistuneita soluja, jotka ohjelmoidaan pluripotentteiksi ja ympäristön säätelyllä saadaan pysymään erilaistumattomassa tilassa. Vuonna 2006 Takahashi ja Yamanaka saivat hiiren fibroblastisolut palautumaan kantasolutasolle, ja he tekivät saman ihmisen fibroblasteilla vuotta myöhemmin(41,42). Hayashi et al. kuvasivat ensimmäistä kertaa ihmisen iPS-solujen erilaistamista sarveiskalvon epiteelin kaltaisiksi soluiksi kahdesta erilaistuneesta solulähteestä(43). Tämän jälkeen hiPS-solujen erilaistamista sarveiskalvon epiteelin kaltaisiksi soluiksi on tehty erilaisin menetelmin(44). Kun LSCD johtuu geenivirheestä (kuten ektodermaalisessa

dysplasiassa, jossa on mutaatio geenissä *p63*), seuraa virhe myös potilaan omista soluista tuotetuissa hiPS-soluissa ja niiden erilaistuminen epiteeliksi on häiriintynyt. Shalom-Feuerstein et al. onnistuivat tutkimuksessaan palauttamaan p63-signaalireitin yhdisteen APR-246 (PRIMA-1(MET)) avulla, mikä kuvastaa hiPS-solujen merkittävää potentiaalia tulevaisuuden hoitona limbaalisiin häiriöihin jopa geneettisissä sairauksissa(45).

Kypsällä sarveiskalvon epiteelillä ei voida korvata puuttuvaa limbaalista epiteeliä tai limbaalisia kantasoluja, vaan siirrettävään solupopulaatioon on sisällytettävä esiastesoluja. Tilanteessa, jossa limbaalinen kantasoluhäiriö ei ole seurausta kantasolujen puutteesta, vaan mikroympäristön häiriöstä, voi terve sarveiskalvon epiteeli korjata mikroympäristön taas suotuisaksi. Tutkimuksissa on havaittu, että vaikka allogeenistä limbaalista kudosta siirretään luovuttajalta vastaanottajalle, jonkin ajan kuluttua parantuneissa sarveiskalvoissa esiintyy pääosin vain vastaanottajalta itseltään peräisin olevia soluja. (46-49) Henderson et. al sekä Daya et al. käyttivät tutkimuksessaan menetelmää, jolla he tutkivat satunnaisia soluja sarveiskalvon pinnalta (impression cytology)(46,48,49). Voi siis olla, että solupopulaatioon ei ole osunut mukaan luovuttajalta peräisin olevia soluja. Toisaalta on epäilty, että luovuttajan terveet kantasolut vakauttavat mikroympäristön, minkä johdosta vastaanottajan epiteelin kantasolut pystyvät jälleen jakautumaan. Sarveiskalvon epiteeliksi erilaistettuja potilaan omia hiPS-soluja voitaisiin mahdollisesti käyttää mikroympäristön vakauttajina ja vaurioituneen epiteelin korvaajina. Sarveiskalvon esiastesoluiksi erilaistettuina hiPS-solut soveltuisivat myös LSCD:n hoitoon.

### **1.3 Efflux-proteiinit**

Sarveiskalvo on tärkeä imeytymisreitti topikaalisesti annosteltaville silmälääkkeille, joiden halutaan vaikuttavan silmän etu- ja sisäosissa. Yleensä alle 10 % annetusta lääkkeestä pääsee silmän sisäosiin. Markkinoilla olevien silmälääkkeiden annoskoko on noin 50 µl, kun silmän pinta ja silmäluomien taskut pystyvät sovittamaan keskimäärin vain 30 µl nestettä.(50) Osa lääkkeestä kulkeutuu kyynelnesteen mukana kyynelkanaviin ja imeytyy systeemiseen verenkiertoon(51). Myös sarveiskalvon rakenne asettaa haasteen lääkkeiden läpäisylle. Sarveiskalvon epiteelin tiiviit liitokset tekevät epiteelistä tehokkaan esteen kaikille muille aineille paitsi pienille ( $r < 10 \text{ \AA}$ ) lipofiilille yhdisteille, jotka pystyvät kulkemaan epiteelin läpi diffuusion välityksellä. Epiteelin läpäistyään lipofiiliset yhdisteet kohtaavat hydrofiilisen strooman, joka rajoittaa läpäisyn tahtia entisestään. Myös

endoteelin on havaittu estävän jonkin verran aineiden läpäisyä. Strooman ja endoteelin kyky estää absorboitumista on kuitenkin pieni verrattuna epiteeliin.(7)

Viime aikoina huomio lääkkeiden kulkeutumisessa elimistössä on keskittynyt efflux-kuljettajaproteiineihin. Efflux-proteiinit ovat solukalvoilla sijaitsevia proteiineja, jotka pumppaavat ksenobiootteja ja endogeenisiä metaboliitteja ulos soluista. Riippuen sijainnista solukalvolla ne voivat heikentää apikaalisella solukalvolla tai edistää basolateraalilla solukalvolla aineiden kulkeutumista elimistöön rajapinnoilla.(52) Sarveiskalvolla ne alentavat aineiden läpäisevyyttä ja suojelevat intraokulaarisia rakenteita. Ne siis alentavat lääkeaineiden hyötyosuutta; vähentävät imeytymistä ja kumuloitumista soluihin, vaikuttavat metaboliaan sekä lisäävät erittymistä(53). Monet lääkeaineet ovat näiden proteiinien substraatteja, ja tehokkaalla lääkkeiden poistamisella soluista voi olla seurauksena moniresistiivisyys lääkille (multidrug resistance). Tästä voi olla erityisesti haittaa esimerkiksi syöpäpotilaille, joilla hoito ei tehoa aktiivisen efflux-proteiinitoiminnan johdosta.(54) MRP1-proteiinin yli-ilmentymistä on löydetty monista syöpäkasvaimista, ja eräs syy on mutaatio *p53*-geenissä, joka suppressoi MRP1:n ilmentymistä.(55)

Suurin efflux-proteiiniperhe kudoksissa on ATP-binding cassette (ABC) kuljettajaproteiinit, joihin kuuluvat muun muassa multidrug resistance proteiinit 1-6 (MRP1-6), P-glykoproteiini (P-gp) ja breast cancer related proteiini (BCRP). Nämä kuljettajaproteiinit käyttävät ATP:n hydrolyysiä energianlähteenään.(56) MRP1-, MRP2- ja MRP3-proteiinien substraatteja ovat monet orgaaniset anionikonjugaatit, joissa yhdisteet ovat konjugoituneet glutationiin, glukuronaattiin tai sulfaattiin(54,55). MRP1:n on havaittu yleisesti sijaitsevan basolateraalilla solukalvolla suojellen herkkiä soluja myrkyllisiltä aineilta ja pumpaten substraatteja verenkiertoon(55,57). Sarveiskalvon epiteelillä sen on havaittu ilmentyvän basaalikerroksessa(58,59). Monet topikaalisesti annosteltavat silmälääkkeet, kuten ofloxaasiini, erytromysiini ja clotrimazole, ovat substraatteja MRP1-efflux-proteiinille(52,60,61). MRP6:n substraattispesifisyys muistuttaa MRP1:n, MRP2:n ja MRP3:n substraattikirjoa. Se on kuitenkin laajempi kuin MRP3:lla ja niukempi kuin MRP1:llä ja MRP2:lla.(62) Sarveiskalvolla sen on havaittu sijaitsevan basaalisolukerroksessa(59).

MRP4 ja MRP5 ovat muista MRP-perheen efflux-proteiineista poikkeavia siinä suhteessa, että ne pystyvät erittämään jossain määrin syklisiä nukleotideja ja nukleotidianalogeja(63,64). Niitä on havaittu sekä basolateraalilla että apikaalipuolella solutyypistä riippuen.(65) Chen et al. kuvasivat vähäistä MRP4-ilmentymistä sarveiskalvon epiteelin basaalikerroksessa ja Vellonen et al. osoittivat

MRP5:n runsasta ilmentymistä sentraalisen sarveiskalvon basaalikerroksessa ja limbaalisessa epiteelissä basaali- ja siipisolukerroksessa(58,59).

*MDR1*-geenin koodaama P-glykoproteiini on spesifinen monille amfipaattisille ja lipofiilisille yhdisteille, ja sillä on yhteisiä substraatteja muiden efflux-proteiinien kanssa, kuten sylkosporiini A (Csa), rhodamiini 123 ja vinkristiini(52). Yang et al. osoittivat P-gp:n osallistuvan propranololin kuljettamiseen ulos solusta jäniksen sidekalvon epiteelin apikaalipuolella(66). Chen et al. havaitsivat sen ilmentyvän koko sarveiskalvon epiteelin alueella(59).

BCRP:n on todistettu olevan eräs kantasolumarkkeri. Budak et al. värjäisivät ihmisen ja kanin sarveiskalvon ja limbuksen epiteeliä sekä sidekalvon epiteeliä Hoechst 33342-värillä, joka on BCRP:n substraatti. Alle 1 % soluista värjäytyi ja kantasoluttomassa sarveiskalvon epiteelissä värjäytymistä ei havaittu ollenkaan.(67) BCRP:n ilmentymistaso sarveiskalvon epiteelissä on laskenut tiloissa, joissa limbaalisten kantasolujen toiminta on laskenut tai määrä vähentynyt, kuten diabeteksessa(68). BCRP:n substraatteja ovat monet kemoterapeuttiset yhdisteet sekä anioniset orgaaniset konjugaatit.(52,53)

Koska sarveiskalvon epiteeli on silmän ensimmäinen rajapinta ulkomaailmaan ja topikaalisesti annosteltaville lääkkeille, on tärkeää, että fyysisen läpäisevyyden lisäksi tunnetaan myös sen dynaaminen läpäisevyys, jota säätelevät kuljettajaproteiinit. Ihmisen sarveiskalvon epiteelin efflux-proteiinien ilmentymisestä on tehty monta tutkimusta. Ensimmäisistä tutkimuksista saatiin hajanaista tietoa efflux-proteiinien ilmentymisestä, mikä luultavasti johtuu mittausten huonosta herkkyydestä(58,69,70). Myöhemmin on havaittu, että sarveiskalvon epiteeli ilmentää mRNA-tasolla (eli lähetti-RNA-tasolla) ainakin proteiineja MRP1-5, P-gp ja BCRP(59,71). Tulokset ovat ristiriitaisia, mikä voi johtua eri solulinjojen keskinäisistä eroista sekä niiden poikkeavuudesta natiiviin kudokseen nähden.

Oftalmisten lääkkeiden imeytymistä tutkitaan usein eläinkokeilla. Yleensä vähintään viisi kania täytyy uhrata, että voidaan muodostaa käsitys lääkkeen konsentraatioprofiilista tietyllä ajan hetkellä.(72,73) Joitain kudostallinnuksia sarveiskalvon epiteelistä on kehitetty, mutta ne eivät ole täysin vastanneet aidon sarveiskalvon toimintaa(74,75). Ihmisen sarveiskalvon epiteeliä vastaavalla kudostallinnalla voitaisiin luotettavammin tutkia oftalmisten lääkkeiden farmakologiaa ja farmakokinetiikkaa, ja samalla voitaisiin vähentää eläinkokeita. hiPS-soluista erilaistettua sarveiskalvon epiteeliä voitaisiin

hyödyntää kudos- ja tautimallinnuksessa, sekä lääkekehityksessä ja toisaalta sen avulla voitaisiin tutkia efflux-proteiinien toimintaa tarkemmin.

## 1.4 Työn tavoitteet

Tutkimuksen tarkoitus on vertailla efflux-kuljettajaproteiinien (MRP1-6, P-gp ja BCRP) geenien ilmentymistä mRNA-tasolla natiivissa ihmisen sarveiskalvon epiteelikudoksessa (CE), immortalisoidussa sarveiskalvon epiteelin kaltaisessa HCE-solulinjassa (HCE), erilaistumattomissa hiPS- ja hES-solulinjoissa (hiPSC ja hESC) sekä sarveiskalvon epiteeliksi erilaistetuissa hiPSC-CE- ja hESC-CE-solulinjoissa. Tavoitteena on, että hiPSC-CE ilmentäisi samoja efflux-proteiineja koodittavia geenejä ja samoilla geeni-ilmentymisen tasoilla kuin CE. Tavoitteena on myös selvittää, vastaako CE:n efflux-proteiinien geenien ilmentyminen kirjallisuuden tuloksia.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Solulinjat

#### 2.1.1 Erilaistumattomat kantasolut

Tutkimuksessa käytettiin erilaistumatonta hiPS-solulinjaa HEL24.3, joka on peräisin professori Timo Otonkosken laboratoriosta Helsingin yliopistosta. Ihmisen esinahan fibroblastit uudelleenohjelmoitiin neljällä geenillä (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *c-Myc*) Sendai-viruksen avulla (CytoTune; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).(76) hESC-linja on pystytetty Regean laboratoriossa (Regea 08/017). Molemmat kantasolulinjat on ylläpidetty inaktivoitujen tukisolujen päällä hESC-kasvatusliuoksessa (KnockOut<sup>TM</sup> DMEM; Life Technologies, jossa 1 % ei-välttämättömiä aminohappoja (NEAA), 50 U/ml penisilliini/streptomysiini (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) ja 8 ng/ml ihmisen bFGF (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)). Kasvatusliuos vaihdettiin viisi kertaa viikossa ja erilaistumattomat kantasolukoloniat siirrettiin tuoreille tukisoluille viikottain.(77) Molemmat solulinjan erilaistumattomista kantasoluista eristettiin RNA. Tämä oli tehty laboratoriossa tutkimusryhmän toimesta. Tutkimusryhmällä on eettinen lupa ihmisen alkion kantasolujen derivointiin ja tutkimuskäyttöön (R05116) sekä eettinen lupa käyttää muiden laboratorioden tuottamia hiPS-solulinjoja (R14023).

### **2.1.2 hiPSC-CE ja hESC-CE**

Tutkimuksen kohteena oli hiPSC-CE-solulinja, joka oli erilaistettu sarveiskalvon epiteeliksi aikaisemmin BioMeditechin laboratoriossa tutkimusryhmän toimesta HEL24.3 hiPS-solulinjasta. Ihmisen ESC-CE-solut on erilaistettu sarveiskalvon epiteelin soluiksi laboratorion hESC-linjasta (Regea 08/017) tutkimusryhmän toimesta. Kantasolujen erilaistumista aloitettiin lisäämällä kasvatusliuokseen 10  $\mu$ M TGF- $\beta$ -inhibiittoria SB-505124 (S4696; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10  $\mu$ M Wnt-inhibiittoria IWP-2 (681671; Merck, Darmstadt, Germany) ja 50 ng/ml ihmisen bFGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Kasvatusliuokset vaihdettiin päivittäin. Neljän päivän kasvatuksen jälkeen solujen erilaistusta jatkettiin kuoppalevyillä, jotka oli pinnoitettu ihmisen istukan kollageeni-IV:llä (5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>; C5533; Sigma-Aldrich), CnT-30-sarveiskalvoepiteeliliuoksessa, joka vaihdettiin kolmesti viikossa.(44) Erilaistus kesti yhteensä noin kuusi viikkoa ja kypsistä soluista erilaistettiin RNA (hiPSC-CE-soluista päivänä 44 ja hESC-CE-soluista päivänä 43). Työssä käytettiin kolmea hiPSC-CE erää ja yhtä hESC-CE erää, joita käsiteltiin erillisinä näytteinä.

### **2.1.3 HCE-solulinja**

Immortalisoitua HCE-solulinjaa (CRL-11135, ATCC, Manassas, VA, USA) oli viljelty T25 soluviljelypulloissa DMEM/F12-kasvatusliuoksessa laboratoriossa tutkimusryhmän toimesta. Liuoksessa oli 15% FBS (Sigma-Aldrich), 2 mM GlutaMax-I, 50 U/ml penisilliini/streptomysiini, 10  $\mu$ g/ml insuliinia (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ja 5  $\mu$ g/ml ihmisen epidermaalista kasvutekijää (EGF, Cat# AF-100-15, PeproTech). Kasvatusliuos vaihdettiin kolmesti viikossa ja solut siirrettiin uusiin soluviljelypulloihin kerran tai kahdesti viikossa.(44) Kypsät HCE-solut kerättiin kahdesta erillisestä jaosta ja käsiteltiin erillisinä näytteinä.

### **2.1.4 Ihmisen natiivi sarveiskalvon epiteelikudos**

Ihmisen natiivit sarveiskalvot saatiin Regean kudospankin ja solukeskuksen luovutetuista ja hylätyistä sarveiskalvon siirteistä. Sarveiskalvo leikattiin kahtia ja epiteelikudos kerättiin kummaltakin puoliskolta mekaanisella raaputuksella. Epiteeli pestiin PBS:llä ja sentrifugointiin 1000 rpm 5 minuutin ajan.(44) Sarveiskalvon puoliskot käsiteltiin erillisinä näytteinä. Tämä oli tehty tutkimusryhmässä ennen työn aloittamista. Alueellinen eettinen toimikunta on hyväksynyt ihmisen luovutettujen kudosten käytön tutkimuksessa (Valvira, Dnro 7797/05.01.00.06/2011).



## 2.2 RNA:n kääntäminen cDNA:ksi

Kaikista näytteistä RNA eristettiin käyttämällä NucleoSpin RNAII kittiä (Macherey-Nagel, GmbH & Co). RNA:n pitoisuus määritettiin NanoDrop-1000 spektrofotometerillä (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Työ, joka on tämän raportin aihe, alkaa RNA:n kääntämisestä komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). Kääntäminen tehtiin korkean kapasiteetin cDNA RT Kit:illä (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Jokaiselle RNA-näytteelle valmistettiin seos, joka sisälsi 2 µl puskuria (10x), 2 µl RT Random Primers (10x), 0,8 µl dNTP Mix (25x; 100 mM) sekä entsyymejä 1 µl RNase Inhibitor (10 U/µl) ja 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase. RNA:ta lisättiin seokseen laimennettuna siten, että RNA:n lopullinen pitoisuus on 10 ng/l, kun seoksen tilavuus oli 20 µl. cDNA syntetisoitiin PCR MasterCycler -laitteella (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) ohjelmalla: 10 min 25 °C, 120 min 37 °C, 5 min 85 °C ja lopulta jäähtyminen 4 °C.

## 2.3 Reaaliaikainen qPCR

Polymeraasiketjureaktiota (PCR) varten valmistettiin seos, joka koostui 7,5 µl TaqMan® Gene Expression Master Mix, 0,75 µl TaqMan® Gene Expression Assay eli alukkeista (Applied Biosystems Inc.), 3,75 µl steriilistä vedestä ja 3 µl cDNA:sta (laimennettu 1:5 veteen). Jokainen MasterMix-seos sisälsi tutkittavalle geenille sekvenssispesifisiä TaqMan Gene Expression alukkeita (Applied Biosystems Inc.). Alukkeiden tuotenumerot ovat lueteltuna taulukossa 1 geenin nimen ja toiminnan kanssa. Reaktio tapahtui 96-kaivoisella levyllä, jossa yhdellä näytteellä on aina kolme teknistä replikaattia. *GAPDH*-geeni tutkittiin aina kussakin ajossa jokaiselta näytteeltä, koska se ilmenee keskimäärin samalla tasolla kaikissa soluissa ja näin ollen toimii endogeenisenä kontrollina. qPCR:llä on mahdollista samalla sekä mitata että monistaa DNA-sekvenssejä reaaliaikaisesti.

Polymeraasiketjureaktio ajettiin 7300 Real-Time PCR System -laitteistolla (Applied Biosystems Inc.) ohjelmalla: alkuajo 2 min 50 °C ja 10 min 95 °C, seuraavat 40 kierrosta 15 s 95 °C ja 1 min 60 °C. Laite mittasi cDNA:n määrän eksponentiaalista kasvua valon absorptioon avulla aina kierroksen viimeisessä osiossa.

**Taulukko 1.** TaqMan Gene Expression Assay. Tutkimuksessa käytetyt geenien alukkeet.

Geenin nimi	Toiminta	Tuotenumero
GAPDH	Housekeeping	Hs99999905_m1
MRP1	Efflux	Hs00219905_m1
MRP2	Efflux	Hs00166123_m1
MRP3	Efflux	Hs00358656_m1
MRP4	Efflux	Hs00195260_m1
MRP5	Efflux	Hs00981071_m1
MRP6	Efflux	Hs00184566_m1
P-gp	Efflux	Hs00184500_m1
BCRP	Efflux	Hs01053790_m1

## 2.4 Tulosten analysointi

Mittaustulokset analysoitiin 7300 System SDS Software:n (Applied Biosystems Inc.) avulla. Ohjelma määrittä jokaiselle replikaatille Ct-arvon eli luvun, joka kuvaa sitä kierrosta (threshold cycle), jolloin geenin määrä kasvaa kaikista kiivaimmin. Tämän kynnsarvon kalibraattoriksi valittiin CE-replikaattien Ct-arvojen keskiarvo, koska muiden näytteiden arvoja halutaan verrata natiiviin sarveiskalvon epiteeliin. Jokaisen replikaatin kohdalla kalibroitiin sekä endogeeni että kohdegeeni. Ilmentymistasojen muutokset (fold change) laskettiin Microsoft Office Excel 2013:n (Microsoft Corporation, Redmond, WA) avulla. Relatiiviset muutokset geenien ilmentymisessä saatiin käyttämällä  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -menetelmää seuraavan kaavan mukaisesti:

$$\text{Relatiivinen muutos} = 2^{-[(C_t(\text{KOHDE}) - C_t(\text{GAPDH})) - (C_t(\text{KALIBRAATTORI(ka)}) - C_t(\text{GAPDH(ka)}))] \quad (78),$$

jossa relatiivinen (logaritminen) muutos lasketaan kohdegeenin ilmentymistasosta (Ct) suhteessa endogeenin ilmentymistasoon ja kalibraattorin sekä endogeenin ilmentymistasojen keskiarvoon (ka).

Analyysissä karsittiin tulokset, joiden Ct-arvot poikkesivat suuresti saman näytteen muista replikaateista, ja näytteet, joita qPCR-laite ei havainnut. Tulokset esitetään suhteellisina muutoksina geenien ilmentymistasoissa, joka on normalisoitu endogeeniseen vertailugeeniin (*GAPDH*) ja relatiivinen käsittelemättömään kontrolliin eli tässä tapauksessa ihmisen sarveiskalvon epiteelikudokseen. Kaavioissa virheenä kuvataan ilmentymistasojen keskihajontaa. Tuloksia ei ole rajattu hajonnan perusteella.

### 3 TULOKSET

Kahdeksan efflux-kuljettajaproteiinin ilmentymistä tutkittiin mRNA-tasolla ihmisen sarveiskalvon epiteelikudoksessa, erilaistumattomissa hiPS-soluissa, sarveiskalvon epiteeliksi erilaistetuissa hiPS-soluissa, erilaistumattomissa hES-soluissa, sarveiskalvon epiteeliksi erilaistetuissa hES-soluissa sekä immortalisoidussa HCE-solulinjassa. Relatiiviset mRNA-tasot kullekin solulinjalle geenikohtaisesti on esitetty kuvassa 3.

CE ilmensi kaikkia tässä kyseisessä tutkimuksessa tutkittuja efflux-geenejä. Lähes kaikki geenit ilmentyivät muissakin solulinjoissa. Ainoastaan MRP1:tä ja MRP2:ta ei havaittu erilaistumattomissa hES-soluissa, minkä vuoksi niitä ei ole esitetty pylväänä kaavioissa. Sen lisäksi, että CE ilmensi kaikkia tutkittavia geenejä, se ilmensi niitä samoissa suhteissa aiempaan kirjallisuuteen nähden: *MRP1* ja *MRP5* ilmentyivät runsaasti, muut (*MRP2-4*, *MRP6*, *P-gp* ja *BCRP*) ilmentyivät maltillisemmin(58,59,71). Liitteessä on taulukko, jossa kuvataan karkeasti absoluuttisia ilmentymistasoja.

Tutkimuksen kohteena ollut hiPSC-CE ilmensi kaikkia samoja efflux-geenejä kuin CE. Sen ilmentymistasot kuitenkin vaihtelivat suuresti. Efflux-geenejä *MRP4*, *MRP6* ja *BCRP* hiPSC-CE-solut yli-ilmentyivät merkittävästi, kun taas *MRP3* ali-ilmentyi. Verrattaessa erilaistumatonta hiPS-solulinjaa ja erilaistettua hiPSC-CE-solulinjaa hiPSC-CE vastaa paremmin CE:tä. hESC-CE osoittaa lähes yhtä suurta vaihtelua CE:n efflux-geenien ilmentymistasoista kuin hiPSC-CE.

Geenikohtaisesti tutkittaessa solulinjat hiPSC-CE ja hESC-CE vastaavat solulinjoista parhaiten CE:tä. hiPSC-CE ilmentää geenejä *MRP2*, *MRP5* sekä *P-gp* ja hESC-CE ilmentää geenejä *MRP1*, *MRP2* ja *MRP3* vastaavilla tasoilla kuin CE. *MRP3* ja *MRP5* ali-ilmentyivät useimmissa tutkituissa solulinjoissa kun taas *MRP6* ja etenkin *BCRP* yleisesti yli-ilmentyivät. *BCRP*:n yli-ilmentyminen on erittäin voimakasta. Kaupallinen solulinja HCE ei vastannut minkään geenin osalta hyvin CE:tä ja sen geenien ilmentymistasot poikkesivat yhtä paljon tai jopa enemmän CE:stä kuin hiPSC-CE:n.



**Kuva 3.** Efflux-kuljettajaproteiinien geenien (*MRP1-6*, *P-gp* ja *BCRP*) mRNA-tasot solulinjoissa CE, hiPSC, hiPSC-CE, hESC, hESC-CE ja HCE. Luvut ovat keskiarvoja näytteiden ilmentymistasoista ja virhepalkit kuvaavat solulinjan sisäistä keskihajontaa. ( $n=6$  CE ja HCE,  $n=9$  hiPSC ja hiPSC-CE,  $n=3$  hESC ja hESC-CE)

## 4 POHDINTA

Silmälääkkeiden tutkimuksen, etenkin farmakokinetiikan, kannalta on tärkeää kehittää entistä parempia malleja lääkeaineiden imeytymisen, jakautumisen, metabolian ja erityksen tutkimiseen, sillä toistaiseksi tutkimusta tehdään eläinmalleilla, jotka poikkeavat aidosta ihmisen sarveiskalvosta. Sarveiskalvon soluista 90 % sijaitsee sarveiskalvon epiteelissä ja epiteelin rakenteellisen läpäisemättömyyden lisäksi efflux-proteiiniaktiivisuus vähentää lääkeaineiden kulkeutumista sarveiskalvon läpi. On arvoitu, että efflux-proteiinit vaikuttavat ainakin 21 silmälääkkeen farmakokinetiikkaan.(52) Tehokkaampien lääkkeiden kehityksessä keskitytään entistä enemmän efflux-proteiinien huomiointiin esimerkiksi kehittämällä lääkkeitä, jotka ovat substraatteja basolateraalilla solukalvoilla sijaitseville kuljettajaproteiineille eivätkä ole substraatteja apikaalisilla membraaneilla oleville efflux-proteiineille(79,80). Taloudelliselle, helposti tuotettavalle, aitoa ihmisen sarveiskalvon epiteeliä vastaavalle kudospallille on suurta kiinnostusta ja tarvetta.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin efflux-proteiinien (MRP1-6, P-gp ja BCRP) geenitason ilmentymistä ihmisen sarveiskalvon epiteelikudoksen soluissa, erilaistumattomissa hiPS- ja hES-soluissa, hiPSC-CE- ja hESC-CE-soluissa sekä immortalisoidussa HCE-solulinjassa. Suuri määrä erilaisia solulinjoja antaa laajemman käsityksen efflux-proteiinien ilmentymisestä kuin yhden solulinjan tarkastelu. Tämä on ensimmäinen tutkimus, jossa määritetään hiPSC-CE-solujen efflux-geenien ilmentymistä.

Dey et al. pystyivät ensimmäisen kerran todistamaan P-gp:n olemassaolon ihmisen sarveiskalvolla(81). Tämän jälkeen on tehty monia tutkimuksia sarveiskalvon efflux-kuljettajaproteiineista eläinkokeilla, ihmisen natiivilla sarveiskalvon kudoksella sekä sarveiskalvon epiteelin kaltaisilla solulinjoilla(82-85). Eläintutkimuksilla saatuja tuloksia ei voida suoraan soveltaa ihmiseen. Niissä eri efflux-proteiinit voivat ilmentyä, ilmentymistasot voivat vaihdella ja efflux-proteiinit itsessään voivat olla erilaisia. Dey et al. havaitsivat, että kanin P-gp-molekyylä vastaa 89 % ihmisen P-gp:tä(81).

Tässä tutkimuksessa natiivi sarveiskalvon epiteelikudos ilmensi kaikkia tutkittavia geenejä, joten se oli mahdollista pitää vertailun kohteena muille solulinjoille suunnitelman mukaisesti. Se myös ilmensi niitä vastaavilla tasoilla kuin aiemmassa kirjallisuudessa, joten sarveiskalvon epiteelikudoksen ilmentymistasot ovat luotettavat ja niihin voidaan verrata muiden solulinjojen tuloksia.

Kantasolulähtöiset solulinjat hiPSC-CE ja hESC-CE ilmensivät myös kaikkia efflux-geenejä, mutta ilmentymistasoissa oli suuria vaihteluita ja ne poikkesivat merkittävästi sarveiskalvon

epiteelikudoksesta. Ne kuitenkin muistuttivat ilmentymistasoiltaan enemmän CE:tä kuin erilaistumattomat hiPS- ja hES-solut.

Tutkittava hiPS-CE yli-ilmensi geenejä *MRP1*, *MRP4*, *MRP6* ja *BCRP* verrattuna CE:hen. *MRP3* ali-ilmentyi, ja *MRP2*, *MRP5* sekä *P-gp* olivat vastaavilla tasoilla kuin CE:n ilmentymistasot. hiPS-CE on siis todennäköisesti resistiivisempi lääkaineille kuin CE. Mahdollinen selitys hiPS-CE:n (sekä myös hESC-CE:n) yli-ilmentyneille efflux-geeneille on se, että solulinjojen erilaistuminen sarveiskalvon epiteeliksi ei ole ollut kaikilta osilta täydellistä ja seassa on limbaalisia kantasoluja ja muita esiastesoluja. CE-näyte on otettu sentraalisesta sarveiskalvosta, joten siirteissä ei ole limbusta mukana, vaan se on pelkkää kypsää epiteeliä. Lisäksi tässä on käytetty vain yhtä sarveiskalvokudosta, jonka molempien puolen (CE1 ja CE2) näytteisiin muita tuloksia on verrattu. Useampi sarveiskalvo olisi antanut kattavamman ja luotettavamman kuvan, sillä silmien välillä on eroa. *BCRP*:n yli-ilmentyminen hiPSC-CE:ssä oli erittäin merkittävä eli hiPSC-CE ilmentää voimakkaasti kantasolumarkkeria. Tämä vahvistaa ajatusta, että hiPS-CE:llä on vielä kantasoluja tai kantasolujen kaltaisia ominaisuuksia.

HCE-solulinjan efflux-geenien ilmentyminen ei vastannut aitoa epiteelikudosta, vaan geenit *MRP1*, *MRP4*, *MRP6*, *P-gp* ja *BCRP* yli-ilmentyivät. HCE-solulinjojen poikkeavuuden aidosta sarveiskalvon epiteelistä ovat todistaneet aikaisemmin jo Becker et al., Vellonen et al. ja Chen et al. Heidän tutkimuksissaan ilmentyneet geenit eivät ole olleet identtiset CE:n kanssa ja ne ovat olleet voimakkaasti yli-ilmentyneitä.(58,59,84) Toropainen et al. havaitsivat HCE:n ja sarveiskalvon epiteelin välillä eroa myös soluvälien koossa ja määrässä; HCE:n raot isompia ja niitä on vähemmän(75). Sekä aikaisempien tutkimusten että tämän tutkimuksen HCE:n poikkeavuus sarveiskalvon epiteelin efflux-geenien ilmentymisessä voi selittyä immortalisaatiomenetelmällä. Ihmisen sarveiskalvon epiteelisolulinja on immortalisoitu simian viruksen 40 (SV40) T-antigeeni –geenillä. Tämä todennäköisesti aiheuttaa muutoksia kohdesolun genomissa ja geenien ilmentymisessä.(86)

Erot ihmisen sarveiskalvon epiteelin tutkimusten välillä johtuvat mahdollisesti tutkimusmenetelmien herkkydestä havaita pieniä mRNA-pitoisuuksia. Becker et al. käyttivät vuonna 2007 tavallista RT-PCR-menetelmää monistuneen DNA:n tutkimiseen(84). Vellonen et al. käyttivät analyysissään qRT-PCR:ää, plasmideja ja elektroforeesia(58). Chen et al. saivat Ct-arvot qPCR:stä vertaamalla kohde-cDNA:ta plasmidistandardeihin(59). Reaaliaikaisen qPCR:n käyttö mRNA-ilmentymistason mittaamisessa verrannollisesti eri kudoksissa on todettu olevan luotettava metodi(87). Alkuperäisen pitoisuuden määrittäminen qPCR:llä ei kuitenkaan ole täsmällistä, vaan matemaattiset algoritmit, joita

tulosten saamiseen käytetään, ovat suuressa roolissa(88). Ilmentymistasojen vaihtelut voivat johtua myös solulinjojen eri kypsyyden asteista(89-91). Tässä tutkimuksessa solulinjojen sisällä oli joissain tapauksissa suurtakin hajontaa, mikä voi johtua siitä, että erilaistumattomat kantasolut ovat läpikäyneet eri määrän jakoja (passage) ennen kuin ne on erilaistettu. RNA:n eristäminen on kuitenkin suoritettu näytteille saman ajan kuluttua erilaistamisesta.

Työssä käytetty iPS-solulinja oli tuotettu uudelleenohjelmoimalla fibroblastisolut Yamanaka-tekijöillä hiPS-soluiksi, samalla periaatteella kuin Takahashi et al. loivat ensimmäisen ihmisen iPS-solun. Merkittävä ero uudelleenohjelmoinnissa on kuitenkin virusvektori. Takahashi et al. käyttivät lentivirusvektoria, joka infektoi solut ja integroi oman genominsa (geenit *OCT*, *KLF4*, *SOX2* ja *cMyc*) somaattisten solujen DNA:han, kun taas tässä hiPS-solulinja uudelleenohjelmoitiin Sendai-viruksella.(42) Lentivirusvektorilla erilaistuneissa hiPS-soluissa jo hiljenneet Yamanaka-tekijät voivat reaktivoitua, ilmentyä jatkuvasti matalalla tasolla, aiheuttaa mutaation isäntäsolun genomiin tai muuttaa viereisten geenien ilmentymistä.(92) Sendai-viruksella ei näitä haasteita pitäisi ilmetä ja käytön pitäisi olla turvallista. Vaihtoehtoisia indusointimenetelmiä ovat mRNA-metodi ja proteiinitransduktio, jotka eivät myöskään ilmennä samanlaisia haasteita kuin virustransduktio lentiviruksella(93,94).

On todistettu, että uudelleenohjelmoituilla kantasoluilla on epigeneettistä muistia(95-97). Hayashi et al. käyttivät ihmisen limbaalisista epiteelisoluista ja ihmisen fibroblasteista uudelleenohjelmoituja hiPS-soluja, jotka sitten erilaistettiin sarveiskalvon epiteelin kaltaisiksi soluiksi. Limbaalisista epiteelisoluista tuotetuilla hiPS-soluilla oli suurempi taipumus erilaistua sarveiskalvon epiteelisoluiksi kuin fibroblasteista derivoiduilla hiPS-soluilla.(43) Toisaalta fibroblastit ovat helposti saatavilla, kasvatusta on yksinkertaista, ja ne ovat halpoja.

Tämän tutkimuksen tulosten luotettavuutta heikentävät mahdolliset virheet tutkimuksen eri vaiheissa. RNA:n eristyksessä ja mRNA:n kääntämisessä cDNA:ksi pitää olla tarkka, ettei RNA altistu RNAasi-kontaminaatiolle tai korkealle lämpötilalle. Koska RNA-pitoisuudet mitataan heti eristuksen jälkeen, voidaan olla melko varmoja, että RNA:n eristys oli onnistunut. Ennen qPCR-vaihetta on erittäin tärkeää välttää pipetointivirheitä ja DNA-kontaminaatiota. Reaaliaikaisessa qPCR:ssä cDNA monistetaan eksponentiaalisesti, joten pienikin virhe alkuperäisessä pitoisuudessa johtaa suureen eroon logaritmisessa analyysissä. Tämän takia tutkimuksessa käytettiin kolmea teknistä replikaattia, jotta suuren poikkeavuuden tulokset voitaisiin löytää ja poissulkea virheellisinä näytteinä. Tutkimuksessa olikin näitä yksittäisiä näytteitä, joiden ilmentyminen oli sata- tai tuhat-kertainen replikaatteihinsa

nähdessä. Näiden kohdalla on oletettavasti tapahtunut kontaminaatiota. Yksittäisiä näytteitä jäi myös havaitsematta qPCR-laitteelta, ja näissä on todennäköisesti sattunut pipetointivirhe ja näyte-DNA:ta ei ole päätyntä riittävästi tutkittavaan seokseen. Muutamalle näytteelle ei saatu efflux-geenien ilmentymistä millään kolmesta replikaatista. Voi olla, että ne eivät ilmennä tiettyjä efflux-geenejä tai tutkimuksen aiemmissa vaiheissa on tapahtunut virheitä. RNA:n pitoisuus on voinut vähentyä RNA:n puutteellisessa kääntämisessä c:DNA:ksi tai RNA:ta on hajonnut säilytyksen aikana.

Kantasolulähtöiset sarveiskalvon epiteelin mallit (hiPSC-CE ja hESC-CE) vaativat lisätutkimuksia sekä efflux-proteiinien ilmentymistasoista että muistakin ominaisuuksista ja niiden yhteneväisyydestä aitoon ihmisen sarveiskalvon epiteelikudokseen. Jatkotutkimusta tälle työlle on selvittää, ilmenevätkö efflux-proteiinit proteiinitasolla ja missä ne sarveiskalvon epiteelillä sijaitsevat. Tämän lisäksi olisi mielenkiintoista tutkia efflux-proteiinien ilmentymistä limbaalisissa kantasoluissa ja verrata tässä työssä saatuihin tuloksiin. Vaihtoehtoisesti pidentämällä hiPSC-CE- ja hESC-CE-solujen erilaistusaikaa ja kypsyttämällä niitä lisää saataisiin kerrostunutta kudosta, mikä luultavasti vastaisi paremmin natiivia sarveiskalvon epiteeliä. Tämän seurauksena myös efflux-proteiinien ilmentymistasoissa tapahtuisi muutosta. Tämän pohjalta ja nykytietämyksen mukaan hiPS-CE-solut eivät sovellu vielä kudomalliksi eivätkä kliiniseen hoitoon sarveiskalvon sairauksissa. Ottaen kuitenkin huomioon, että immortalisoitu solulinja HCE vastaa huomommin natiivia sarveiskalvon epiteeliä kuin hiPS-CE-solulinja ja sitä on jonkin verran käytetty kudomallina, voitaisiin hiPS-CE-soluja hyödyntää kudomallinnuksessa varauksella.



## LÄHTEET

- (1) Tong L, Lan W, Petznick A. Definition of the Ocular Surface. In: Raul Martin Herranz, Rosa M. Corrales Herran, editor. *Ocular Surface: Anatomy and Physiology, Disorders and Therapeutic Care* Florida: CRC Press; 2012. p. 3-18.
- (2) DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2011 Mar;37(3):588-598.
- (3) Beuerman RW, Pedroza L. Ultrastructure of the human cornea. *Microscopy Research & Technique* 1996 Mar 1;33(4):320-335.
- (4) Osei-Bempong C, Figueiredo FC, Lako M. The limbal epithelium of the eye--a review of limbal stem cell biology, disease and treatment. *Bioessays* 2013 Mar;35(3):211-219.
- (5) Ehlers N. Some comparative studies on the mammalian corneal epithelium. *Acta Ophthalmol* 1970;48(4):821-828.
- (6) Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 May;47(5):1754-1767.
- (7) Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J Pharm Sci* 1998 Dec;87(12):1479-1488.
- (8) Farjo A, McDermott M, Soong H. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. In: Yanoff M, Duker J, editors. *Ophthalmology*. 3rd ed.: St. Louis, MO, Mosby; 2008. p. 203-5.
- (9) Collin SP, Collin HB. The corneal epithelial surface in the eyes of vertebrates: environmental and evolutionary influences on structure and function. *J Morphol* 2006 Mar;267(3):273-291.
- (10) Ebrahimi M, Taghi-Abadi E, Baharvand H. Limbal stem cells in review. *Journal of Ophthalmic & Vision Research* 2009 Jan;4(1):40-58.
- (11) Ahmad S. Concise review: limbal stem cell deficiency, dysfunction, and distress. *Stem Cells Translational Medicine* 2012 Feb;1(2):110-115.
- (12) Hanna C, Bicknell DS, O'brien JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol* 1961 May;65:695-698.
- (13) Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983 Oct;24(10):1442-1443.
- (14) Otori T. Electrolyte content of the rabbit corneal stroma. *Exp Eye Res* 1967 Oct;6(4):356-367.
- (15) Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res* 1970 Jan;10(1):107-108.
- (16) Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 Jul;44(7):2941-2948.
- (17) Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull* 2010 Feb 15;81(2-3):198-210.
- (18) Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology* 1985 Jun;92(6):759-763.
- (19) Watsky MA, McDermott ML, Edelhauser HF. In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes. *Exp Eye Res* 1989 Nov;49(5):751-767.
- (20) Maurice DM. The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol (Lond)* 1972 Feb;221(1):43-54.
- (21) Polse KA, Brand RJ, Cohen SR, Guillon M. Hypoxic effects on corneal morphology and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990 Aug;31(8):1542-1554.
- (22) Schofield R. The stem cell system. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 1983;37(8):375-380.
- (23) Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971 Feb 19;229(5286):560-561.
- (24) Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995 Oct;102(10):1476-1485.

- (25) Espana EM, Grueterich M, Romano AC, Touhami A, Tseng SC. Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002 Nov;109(11):2004-2010.
- (26) Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: Concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 2000;48(2):83-92.
- (27) Ramaesh K, Ramaesh T, Dutton GN, Dhillon B. Evolving concepts on the pathogenic mechanisms of aniridia related keratopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 Mar;37(3):547-557.
- (28) Saw SM, Tan D. Pterygium: prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiol* 1999 Sep;6(3):219-228.
- (29) Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 1994 May;78(5):401-408.
- (30) Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998 Apr;116(4):431-441.
- (31) Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2000 Mar;84(3):273-278.
- (32) Mayer WJ, Irschick UM, Moser P, Wurm M, Huemer HP, Romani N, et al. Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 Oct;48(10):4459-4467.
- (33) Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal Stem Cells of the Corneal Epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000 0;44(5):415-425.
- (34) Avery RK. Update on infections in composite tissue allotransplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2013 Dec;18(6):659-664.
- (35) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997 Apr 5;349(9057):990-993.
- (36) Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *J Cell Biochem* 2011 Apr;112(4):993-1002.
- (37) Menzel-Severing J, Kruse FE, Schlotzer-Schrehardt U. Stem cell-based therapy for corneal epithelial reconstruction: present and future. *Canadian Journal of Ophthalmology* 2013 Feb;48(1):13-21.
- (38) Ahmad S, Kolli S, Lako M, Figueiredo F, Daniels JT. Stem cell therapies for ocular surface disease. *Drug Discov Today* 2010 Apr;15(7-8):306-313.
- (39) Hanson C, Hardarson T, Ellerstrom C, Nordberg M, Caisander G, Rao M, et al. Transplantation of human embryonic stem cells onto a partially wounded human cornea in vitro. *Acta Ophthalmologica* 2013 Mar;91(2):127-130.
- (40) Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Corneal Epithelial-Like Cells by In Vitro Replication of the Corneal Epithelial Stem Cell Niche. *Stem Cells* 2007;25(5):1145-1155.
- (41) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 Aug 25;126(4):663-676.
- (42) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 Nov 30;131(5):861-872.
- (43) Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T, et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 2012;7(9):e45435.
- (44) Mikhailova A, Ilmarinen T, Uusitalo H, Skottman H. Small-molecule induction promotes corneal epithelial cell differentiation from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2014 Feb 11;2(2):219-231.

- (45) Shalom-Feuerstein R, Serror L, Aberdam E, Muller FJ, van Bokhoven H, Wiman KG, et al. Impaired epithelial differentiation of induced pluripotent stem cells from ectodermal dysplasia-related patients is rescued by the small compound APR-246/PRIMA-1MET. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Feb 5;110(6):2152-2156.
- (46) Henderson TR, Findlay I, Matthews PL, Noble BA. Identifying the origin of single corneal cells by DNA fingerprinting: part I--implications for corneal limbal allografting. *Cornea* 2001 May;20(4):400-403.
- (47) Shimazaki J, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Munkhbat B, Hagihara M, et al. Evidence of long-term survival of donor-derived cells after limbal allograft transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 Jul;40(8):1664-1668.
- (48) Daya SM, Watson A, Sharpe JR, Giledi O, Rowe A, Martin R, et al. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 2005 Mar;112(3):470-477.
- (49) Henderson TR, Findlay I, Matthews PL, Noble BA. Identifying the origin of single corneal cells by DNA fingerprinting: part II-- application to limbal allografting. *Cornea* 2001 May;20(4):404-407.
- (50) Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 2000 Jul;27(7):558-562.
- (51) Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006 Nov 15;58(11):1131-1135.
- (52) Mannermaa E, Vellonen K, Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev* 2006 11/15;58(11):1136-1163.
- (53) Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. *AAPS Journal* 2010 Sep;12(3):348-360.
- (54) Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000 Aug 16;92(16):1295-1302.
- (55) Bakos E, Homolya L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 2007 Feb;453(5):621-641.
- (56) Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2010;9(3):215-236.
- (57) Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005 5/1;204(3):216-237.
- (58) Vellonen KS, Mannermaa E, Turner H, Hakli M, Wolosin JM, Tervo T, et al. Effluxing ABC transporters in human corneal epithelium. *J Pharm Sci* 2010 Feb;99(2):1087-1098.
- (59) Chen P, Chen H, Zang X, Chen M, Jiang H, Han S, et al. Expression of efflux transporters in human ocular tissues. *Drug Metabolism & Disposition* 2013 Nov;41(11):1934-1948.
- (60) Terashi K, Oka M, Soda H, Fukuda M, Kawabata S, Nakatomi K, et al. Interactions of ofloxacin and erythromycin with the multidrug resistance protein (MRP) in MRP-overexpressing human leukemia cells. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 2000 Jun;44(6):1697-1700.
- (61) Klokouzas A, Barrand MA, Hladky SB. Effects of clotrimazole on transport mediated by multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) in human erythrocytes and tumour cells. *European Journal of Biochemistry* 2011;268(24):6569-8.
- (62) Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, Kruh GD. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Research* 2002;62(21):612-5.

- (63) Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(39):30069-5.
- (64) Wielinga PR, van der Heijden I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J, Borst P. Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated Transport of Cyclic Nucleotides from Intact Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2003;278(20):17664-6.
- (65) Borst P, de Wolf C, van de Wetering K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4 and 5. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2006;453(5):661-12.
- (66) Yang JJ, Kim K, Lee VH. Role of P-Glycoprotein in Restricting Propranolol Transport in Cultured Rabbit Conjunctival Epithelial Cell Layers. *Pharmaceutical Research* 2000;17(5):533-5.
- (67) Budak MT, Alpdogan OS, Zhou M, Lavker RM, Akinci MA, Wolosin JM. Ocular surface epithelia contain ABCG2-dependent side population cells exhibiting features associated with stem cells. *Journal of Cell Science* 2005;118(8):1715-9.
- (68) Saghizadeh M, Soleymani S, Harounian A, Bhakta B, Troyanovsky SM, Brunken WJ, et al. Alterations of epithelial stem cell marker patterns in human diabetic corneas and effects of *c-met* gene therapy. *Molecular Vision* 2011;17:2177-13.
- (69) Becker U, Ehrhardt C, Daum N, Baldes C, Schaefer UF, Ruprecht KW, et al. Expression of ABC-transporters in human corneal tissue and the transformed cell line, HCE-T. *Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics* 2007 Apr;23(2):172-181.
- (70) Zhang T, Xiang CD, Gale D, Carreiro S, Wu EY, Zhang EY. Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: implications for ocular drug disposition. *Drug Metabolism & Disposition* 2008 Jul;36(7):1300-1307.
- (71) Dahlin A, Geier E, Stocker SL, Cropp CD, Grigorenko E, Bloomer M, et al. Gene expression profiling of transporters in the solute carrier and ATP-binding cassette superfamilies in human eye substructures. *Molecular Pharmaceutics* 2013 Feb 4;10(2):650-663.
- (72) Suhonen P, Jarvinen T, Rytönen P, Peura P, Urtti A. Improved corneal pilocarpine permeability with O,O'-(1,4-xylylene) bispilocarpic acid ester double prodrugs. *Pharm Res* 1991 Dec;8(12):1539-1542.
- (73) Suhonen P, Jarvinen T, Koivisto S, Urtti A. Different effects of pH on the permeation of pilocarpine and pilocarpine prodrugs across the isolated rabbit cornea. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998 Jul;6(3):169-176.
- (74) Chang JE, Basu SK, Lee VH. Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res* 2000 Jun;17(6):670-676.
- (75) Toropainen E, Ranta VP, Vellonen KS, Palmgren J, Talvitie A, Laavola M, et al. Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003 Sep;20(1):99-106.
- (76) Toivonen S, Ojala M, Hyysalo A, Ilmarinen T, Rajala K, Pekkanen-Mattila M, et al. Comparative analysis of targeted differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and human embryonic stem cells reveals variability associated with incomplete transgene silencing in retrovirally derived hiPSC lines. *Stem Cells Translational Medicine* 2013 Feb;2(2):83-93.
- (77) Skottman H. Derivation and characterization of three new human embryonic stem cell lines in Finland. *In Vitro Cellular & Developmental Biology/Animal* 2010;46(3-4):206-209.
- (78) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001 12;25(4):402-408.
- (79) Colabufo NA, Contino M, Cantore M, Capparelli E, Perrone MG, Cassano G, et al. Naphthalenyl derivatives for hitting P-gp/MRP1/BCRP transporters. *Bioorg Med Chem* 2013 Mar 1;21(5):1324-1332.
- (80) Borst P, Zelcer N, van de Wetering K, Poolman B. On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. *FEBS Lett* 2006 Feb 13;580(4):1085-1093.

- (81) Dey S, Patel J, Anand BS, Jain-Vakkalagadda B, Kaliki P, Pal D, et al. Molecular evidence and functional expression of P-glycoprotein (MDR1) in human and rabbit cornea and corneal epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 Jul;44(7):2909-2918.
- (82) Karla PK, Quinn TL, Herndon BL, Thomas P, Pal D, Mitra A. Expression of multidrug resistance associated protein 5 (MRP5) on cornea and its role in drug efflux. *Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics* 2009 Apr;25(2):121-132.
- (83) Karla PK, Earla R, Boddu SH, Johnston TP, Pal D, Mitra A. Molecular expression and functional evidence of a drug efflux pump (BCRP) in human corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 2009 Jan;34(1):1-9.
- (84) Becker U, Ehrhardt C, Daum N, Baldes C, Schaefer UF, Ruprecht KW, et al. Expression of ABC-transporters in human corneal tissue and the transformed cell line, HCE-T. *Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics* 2007 Apr;23(2):172-181.
- (85) Li B, Lee MS, Lee RS, Donaldson PJ, Lim JC. Characterization of glutathione uptake, synthesis, and efflux pathways in the epithelium and endothelium of the rat cornea. *Cornea* 2012 Nov;31(11):1304-1312.
- (86) Yamasaki K, Kawasaki S, Young RD, Fukuoka H, Tanioka H, Nakatsukasa M, et al. Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009 Feb;50(2):604-613.
- (87) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002 Jun 18;3(7):RESEARH0034.
- (88) Ruijter JM, Pfaffl MW, Zhao S, Spiess AN, Boggy G, Blom J, et al. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods (Duluth)* 2013 Jan;59(1):32-46.
- (89) Verstraelen J, Reichl S. Expression analysis of MDR1, BCRP and MRP3 transporter proteins in different in vitro and ex vivo cornea models for drug absorption studies. *Int J Pharm* 2013 Jan 30;441(1-2):765-775.
- (90) Reichl S, Kolln C, Hahne M, Verstraelen J. In vitro cell culture models to study the corneal drug absorption. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology* 2011 May;7(5):559-578.
- (91) Juuti-Uusitalo K, Vaajasaari H, Ryhanen T, Narkilahti S, Suuronen R, Mannermaa E, et al. Efflux protein expression in human stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 2012;7(1):e30089.
- (92) Hanley J, Rastegarlarlari G, Nathwani AC. An introduction to induced pluripotent stem cells. *Br J Haematol* 2010 Oct;151(1):16-24.
- (93) Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010 Nov 5;7(5):618-630.
- (94) Rhee YH, Ko JY, Chang MY, Yi SH, Kim D, Kim CH, et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 2011 Jun;121(6):2326-2335.
- (95) Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010 Sep 16;467(7313):285-290.
- (96) Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* 2011 Jul 8;9(1):17-23.
- (97) Sullivan GJ, Bai Y, Fletcher J, Wilmut I. Induced pluripotent stem cells: epigenetic memories and practical implications. *Mol Hum Reprod* 2010 Dec;16(12):880-885.

## LIITE

Taulukossa on esitettyä ihmisen sarveiskalvon epiteelin ilmentymistasot geeneille *MRP1-6*, *P-gp* ja *BCRP* tässä tutkimuksessa, Vellonen et al., Dahlin et al. ja Chen et al. tutkimuksissa. (58,59,71)

Ilmentymistasot on määritelty karkeasti:

Tässä tutkimuksessa ilmentymistaso määritettiin Ct-arvojen eli kynnyskierrosten mukaan.

Vellonen et al. 2010	<3000 mRNA kopiota/40 ng cDNA	–
	3000-13000 mRNA kopiota/40 ng cDNA	+
	13000-23000 mRNA kopiota/40 ng cDNA	++
	>23000 mRNA kopiota/40 ng cDNA	+++

Dahlin et al. 2013 Sarveiskalvon epiteelissä ilmentyneet geenit on mainittu tekstissä tai taulukoissa, mutta ilmentymistasoja ei näistä voi päätellä. Tästä näkee kuitenkin, että tutkitut geenit ilmenivät.

Chen et al. 2013	0 /ngRNA	-
	0-400 /ngRNA	+
	400-800 /ngRNA	++
	>800 /ngRNA	+++

	MRP1	MRP2	MRP3	MRP4	MRP5	MRP6	P-gp	BCRP
CE(tässä tutkimuksessa)	++	+	++	+	++	+	+	+
CE(Vellonen et al. 2010)	+	-	-	-	++	-	-	-
CE(Dahlin et al. 2013)	+	+	+	+	+			+
CE(Chen et al. 2013)	+++	+	+	-	+++	-	+	+