

Hanna Launonen

# Solunsalpaajien vaikutus suolen limakalvon tiivisliitosproteiineihin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

20.4.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Hanna Launonen Solunsalpaajien vaikutus suolen limakalvon tiivisliitosproteiineihin 44 sivua + 1 liite 20.4.2018
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	FT Richard Forsgård ja FT Aino Siltari Professori Riitta Korpela Tutkintovastaava Carola Fortelius
<p>Syöpä on yksi yleisimmistä kuolinsyistä maailmassa. Syöpää hoidetaan muun muassa solunsalpaajilla eli sytostaateilla, jotka tuhoavat tehokkaasti syöpäsoluja estämällä niiden jakautumisen. Solunsalpaajat vaikuttavat kuitenkin syöpäsolujen lisäksi myös normaaleihin soluihin ja siksi niillä on runsaasti erilaisia haittavaikutuksia. Yleisimpiä solunsalpaajien aiheuttamia haittavaikutuksia ovat suoliston limakalvovauriot ja niistä aiheutuvat vatsaoireet.</p> <p>Solunsalpaajien aiheuttaman suolen limakalvovaurion kaikkia taustalla olevia syitä ei vielä tunneta. Limakalvovauriosta johtuvien oireiden vuoksi potilaan lääkeannosta joudutaan usein pienentämään, mikä saattaa vaikuttaa myös toipumisennusteeseen. Viime aikoina tutkimuksessa on kiinnostuttu tiivisliitosproteiinien osallisuudesta limakalvovaurion syntyprosessiin. Tiivisliitokset ovat proteiinikomplekseja, jotka liittävät vierekkäiset epiteelisolut tiukasti yhteen. Tiivisliitosten toimintahäiriöt on yhdistetty lisääntyneeseen suoliston läpäisevyyteen sekä erilaisiin tautitiloihin.</p> <p>Tämän työn tarkoituksena oli tutkia, miten syövän hoidossa yleisesti käytetyt solunsalpaajat vaikuttavat viiden eri tiivisliitosproteiinin, okludiinin, klaudiini-1:n, klaudiini-4:n, ZO-1:n ja JAM-A:n tasoihin rotan ohut- ja paksusuolella. Tutkimus suoritettiin Western blot -menetelmällä, joka myös optimoitiin kyseisiä proteiineja varten. Insinööriydessä käytetyt suolinäytteet oli kerätty kahdesta eläinkokeesta, joissa rotille oli annosteltu kolmea eri solunsalpaajaa: 5-fluorourasiilia, oksaliplatiinia, irinotekaania sekä 5-fluorourasiiliin ja irinotekaaniin yhdistelmää.</p> <p>Western blot -menetelmä optimoitiin, ja okludiinin, klaudiini-1:n, klaudiini-4:n ja JAM-A:n tasot saatiin määritetyiksi. ZO-1:n tasoa ei saatu luotettavasti selvitettyksi. Klaudiini-1:n ja JAM-A:n tasoissa ei tapahtunut tilastollisesti merkitseviä muutoksia. Solunsalpaajien yhdistelmä laski tilastollisesti merkitsevästi klaudiini-4:n tasoa ohutsuolessa. Sytostaatit vaikuttivat eniten okludiinin tasoihin, jotka nousivat ryhmissä, joissa oli havaittu eniten limakalvovaurioita. Näin ollen voidaan todeta, että okludiini ja klaudiini-4 ovat yhteydessä limakalvovaurioihin. Seuraavassa tutkimuksessa olisi tarpeen selvittää ajan vaikutusta okludiinin tason muutokseen solunsalpaajien antamisen jälkeen. Tutkimuksia tulisi jatkaa myös suuremmalla aineistolla.</p>	
Avainsanat	Western blot, tiivisliitosproteiinit, okludiini, klaudiini-1, klaudiini-4 ZO-1, JAM-A, solunsalpaajat, irinotekaani, 5-fluorourasiili, oksaliplatiini

Author Title Number of Pages Date	Hanna Launonen Effects of cytotoxic chemotherapy on tight junction proteins in the intestine 44 pages + 1 appendice 20 <sup>th</sup> of April 2018
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Richard Forsgård, PhD Aino Siltari, PhD Riitta Korpela, Professor Carola Fortelius, Head of Degree Programme
<p>Cancer is one of the most common causes of death in the world. The disease is often treated by chemotherapy. Cytotoxic drugs kill effectively dividing cancer cells, but they have an effect also on the normal cells resulting in damage to the mucosa and abdominal symptoms.</p> <p>The exact mechanisms leading to chemotherapy induced gut toxicity (CIGT) remain unknown. This condition is an important dose-limiting factor, and it may affect the recovery of patients. Lately, researchers have begun to become interested in the role of tight junction proteins in the development of CIGT. Tight junctions are protein complexes that connect epithelial cells tightly together. Disturbances in tight junctions have been associated with increased mucosal permeability in the gut and with many diseases.</p> <p>The aim of this thesis was to investigate how commonly used chemotherapeutics in cancer treatment affect the levels of five tight junction proteins occludin, claudin-1, claudin-4, ZO-1 and JAM-A in jejunum and colon of rats. The levels were determined by the Western blot analysis, and the method was optimized for these tight junction proteins. The gut samples were collected from two animal experiments, where three cytotoxic drugs, 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin and a combination of 5-fluorouracil and irinotecan were administered to groups of rats.</p> <p>The Western blot method was optimized, and the levels of occludin, claudin-1, claudin-4 and JAM-A were analysed reliably. The only protein that could not be detected was ZO-1. Differences in claudin-1 and JAM-A levels were not statistically significant. The combination treatment decreased significantly claudin-4 level in the jejunum. Cytotoxic drugs had the strongest effect on the occludin levels, which were increased in groups that had the most mucosal damage. Therefore, it can be stated that claudin-4 and occludin are connected to mucosal damages. For future research, the time between the drug administration and gut sample collection could be further explored as it might affect the occludin levels. The number of samples should also be increased in order to reduce the uncertainty.</p>	
Keywords	Western blot, tight junction proteins, occludin, claudin-1, claudin-4, ZO-1, JAM-A, chemotherapy, irinotecan, 5-fluorouracil, oxaliplatin

## Sisällysluettelo

### Tärkeimmät lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Syöpä, solunsalpaajat sekä niiden haitat	2
2.1	5-Fluorourasiili	4
2.2	Oksaliplatiini	5
2.3	Irinotekaani	6
3	Suolen rakenne	7
4	Tiivisliitosproteiinit	10
4.1	Okludiini	12
4.2	Klaudiini-1 ja -4	13
4.3	Zonula occludens -1	14
4.4	JAM-A	15
5	Western blot	16
5.1	SDS-PAGE	16
5.2	Blottaus	17
5.3	Blokkaus	18
5.4	Vasta-aineet	19
6	Työn tausta ja tavoitteet	19
7	Materiaalit ja menetelmät	20
7.1	Koe-eläimet ja lääkeaineannokset	20
7.2	Näytteiden käsittely	21
7.3	Proteiinipitoisuuden määrittäminen	22
7.4	Western blot	22
7.4.1	SDS-PAGE	23
7.4.2	Blottaus	23
7.4.3	Blokkaus	24
7.4.4	Vasta-aineet	24
7.4.5	Detektointi ja tilastollinen käsittely	26
7.4.6	Proteiinien poistaminen kalvolta	26

8	Tulokset	27
8.1	Menetelmän optimointi	27
8.1.1	SDS-PAGE	27
8.1.2	Blottaus	28
8.1.3	Vasta-aineet	28
8.2	Ohutsuolinäytteiden proteiinitasot	29
8.3	Paksusuolinäytteiden proteiinitasot	32
9	Tulosten tarkastelu	33
9.1	Menetelmän optimointi	33
9.1.1	SDS-PAGE	33
9.1.2	Blottaus	34
9.1.3	Vasta-aineet	34
9.2	Ohutsuolinäytteiden proteiinitasot	35
9.3	Paksusuolinäytteiden proteiinitasot	37
10	Yhteenveto	38
	Lähteet:	41

## Liitteet

Liite 1. Western blot -ohje

## Tärkeimmät lyhenteet

CIGT	solunsalpaajahoidon aiheuttama suolen limakalvovaurio
HRP	piparjuuriperoksidaasi
JAM	liitosadheesiomolekyyl
MAGUK	kalvoon liitetty guanylaattikinaasi-proteiiniperhe
MMP	matriksin metalloproteinaasi
PKC	proteiinikinaasi C
PVDF	polyvinyylidifluoridikalvo
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
TBS	tris-suolaliuos
TBS-T	tris-suolaliuos ja 0,05 % Tween
ZO	zonula occludens

## 1 Johdanto

Syöpä on yksi yleisimmistä kuolinsyistä maailmassa. Vuonna 2012 sitä sairasti 36,2 miljoonaa ihmistä, joista yli kahdeksan miljoonaa menehtyi. (Cancer Fact Sheets.) Syöpää hoidetaan muun muassa solunsalpaajilla eli sytostaateilla, jotka tuhoavat tehokkaasti syöpäsoluja. Lääkkeiden vaikutukset ulottuvat kuitenkin myös terveisiin soluihin, minkä vuoksi niillä on runsaasti haittavaikutuksia. Yksi tavallisimpia sytostaattihoidon haittavaikutuksia on suolen limakalvovaurio. (McSherry ym. 2013: 2.)

Limakalvovaurion aiheuttamien oireiden, kuten ripulin, vuoksi lääkennosta joudutaan usein pienentämään, mikä saattaa vaikuttaa myös potilaan paranemisennusteeseen. Tutkimuksista huolimatta solunsalpaajien aiheuttaman suolen limakalvovaurion kaikkia taustalla olevia syitä ei vielä tunneta. Viime aikoina tutkimuksessa on kiinnostuttu tiivisliitosproteiinien osuudesta suolen limakalvovaurion synnyssä. (Wardill & Bowen 2013:155.) Tiivisliitosproteiinit liittävät limakalvon solut tiukasti yhteen, ja muutokset tiivisliitoksissa on yhdistetty useisiin tauteihin ja lisääntyneeseen suoliston läpäisevyyteen (McSherry ym. 2013: 2).

Tämän insinööriyön tavoitteena oli selvittää kolmen yleisesti paksusuolen syövän hoidossa käytetyn solunsalpaajan 5-fluorourasiilin, irinotekaanin ja oksaliplatiinin vaikutuksia rotan ohut- ja paksusuolen tiivisliitosproteiineihin. Tiivisliitosproteiinien määritys suoritettiin Western blot -menetelmällä, joka myös optimoitiin tutkittaville proteiineille. Tiivisliitosproteiineista tutkittiin okludiini, klaudiini-1, klaudiini-4, zonula occludens -1 (ZO-1) ja JAM-A. Näiden proteiinien tasoja solunsalpaajaryhmissä verrattiin 0,9 %:sta NaCl-liuosta saaneeseen verrokkiryhmään ja siten saatiin tietoa solunsalpaajien vaikutuksesta suolen vaurioihin.

Tutkimus tehtiin Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian yksikössä heinäkuun ja joulukuun välisenä aikana 2017. Insinööriyön ohjaajina toimivat FT Richard Forsgård ja FT Aino Siltari, professori Riitta Korpela sekä tutkintovastaava Carola Fortelius.

## 2 Syöpä, solunsalpaajat sekä niiden haitat

Syöpä on yksi yleisimmistä kuolinsyistä maailmassa. Uusia syöpätapauksia kirjattiin maailmassa vuonna 2012 neljätoista miljoonaa. (Cancer Fact Sheets.) Suomessa vastaava luku ylitti kyseisenä vuonna ensimmäistä kertaa kolmenkymmentuhannen tapauksen rajan. Uusien syöpätapauksien on ennustettu lisääntyvän vuoteen 2030 mennessä noin kolmellakymmenellä prosentilla, kun ikääntyneiden osuus väestöstä kasvaa. (Seppä 2017.)

Syöpä johtuu solujen hallitsemattomasta jakautumisesta, joka on tarkoituksetonta ja haitallista elimistölle. Pahanlaatuiset syöpäkasvaimet pystyvät tunkeutumaan ympäröiviin kudoksiin ja aiheuttamaan tuhoa niissä. Kasvaimet voivat myös lähettää etäpesäkkeitä muualle elimistöön. Syövän syntyyn vaikuttavat ulkoiset tekijät kuten onkogeneiset virukset, säteily ja kemialliset karsinogeenit sekä geneettiset tekijät. Usein kuitenkin monet tekijät yhdessä aiheuttavat mutaatioiden synnyn ja kasvaimen kehittymisen. (Isola & Kallioniemi 2013: 10–16.)

Syövän synnyn ensimmäistä vaihetta kutsutaan initiaatioksi. Siinä syövän synnyn kannalta tärkeisiin DNA:n kasvunrajoitegeeneihin syntyy mutaatioita. Toisessa vaiheessa, promotiossa kohdesolukon solut alkavat jakautua tavallista aktiivisemmin ja solukko vaurioituu. Kolmannessa vaiheessa progressiossa, syöpäsolukon jakautumisaste kasvaa eikä se ole enää riippuvainen kasvunsäätelytekijöistä. (Isola & Kallioniemi 2013: 10–16.)

Syöpää hoidetaan kirurgisesti, sädehoidolla sekä solunsalpaajilla eli sytostaateilla. Syövän hoitoon voidaan käyttää myös hormoneja, vasta-aineita ja erilaisia immunologisia hoitoja. (Joensuu 2015: 2165–2167.) Solunsalpaajat tuhoavat tehokkaasti syöpäsoluja, ja ne kulkeutuvat verenkierron mukana kaikkialle kehoon. Elimistössä lääkeaineet reagoivat kohdesolun yhdisteiden kanssa. Solunsalpaajat vaikuttavat yleensä vain jakautumisvaiheessa oleviin soluihin. Yleisiä vaikutuskohtia ovat esimerkiksi DNA:n ja RNA:n synteesi ja toiminta sekä kalvorakenteet. Monet solunsalpaajat vaikuttavat myös tiettyihin entsyymeihin esimerkiksi tymidylaattisyntaasiin ja dihydrofoolihapporeduktaasiin. (Elonen & Bono 2013: 175–177.) Tymidylaattisyntaasi on DNA:n synteessissä tarvittava entsyymi, joka katalysoi deoksiuridiinimonofosfaatin (dUMP) muuttumista deoksitymidii-nimonofosfaatiksi (dTMP) (Rose ym. 2002: 220). Dihydrofoolihapporeduktaasi taas on läsnä puriin ja tymidylaatin synteeseissä ja se katalysoi dihydrofolaatin muuttumista



tetrahydrofolaatiksi (Lin & Stanton 2014: 379–382). Taulukossa 1 on esitettyinä tässä tutkimuksessa käytettyjen solunsalpaajien 5-fluorourasiilin, oksaliplatiinin ja irinotekaaniin vaikutustavat.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytettyjen solunsalpaajien vaikutustavat (Mukaiillen: Elonen ym. 2011: 707).

<b>Solunsalpaajien vaikutustapa</b>		
5-Fluorourasiili	Oksaliplatiini	Irinotekaani
Antimetaboliitit	Platinajohdokset	Irinotekaani, Topotekaani
DNA:n ja RNA:n synteesiä estävä vaikutus	DNA:ta tai RNA:ta vaurioitava tai niiden toimintaa estävä vaikutus	Topoisomeraasi I -entsyymin esto

Solunsalpaajien tehoon vaikuttaa kasvainsolujen jakautumisnopeus. Myös lääkkeen pitoisuudella, hoitoajalla ja jakautumissyklissä olevien solujen osuudella on merkittävästi vaikutusta asiaan. Osa solunsalpaajista vaikuttaa useissa jakautumiskierron vaiheissa, ja näitä lääkeaineita kutsutaan ei-faasispesifisiksi. Tällaisia solunsalpaajia ovat esimerkiksi platinajohdokset ja alkyloivat aineet. Suurin osa solunsalpaajista, esimerkiksi mitosinestäjät kuuluvat faasispesifisten lääkeaineiden ryhmään, jotka vaikuttavat vain tietyssä jakautumiskierron vaiheessa. Usein syövän hoidoissa käytetään tehon lisäämiseksi erilaisia usean solunsalpaajan yhdistelmähoitoja. (Elonen & Bono 2013: 175–181.)

Solunsalpaajat eivät pysty erottelemaan terveitä ja syöpäsoluja, ja siksi niillä on runsaasti haittavaikutuksia. Solunsalpaajien tavallisia haittavaikutuksia ovat muun muassa pahoinvointi ja hiusten lähtö. Pahoinvointiin käytetään usein ehkäisevää lääkitystä, joka lievittää oireita huomattavasti. Estolääkityksenä käytetään muun muassa 5-HT<sub>3</sub> -reseptorin salpaajia, neurokiini-1:n salpaajia, kortikosteroideja ja bentsodiatsepiineja. Solunsalpaajat voivat aiheuttaa vaurioita myös keuhkoihin, munuaisiin, sydänlihakseen, luuytimeen, hermostoon ja limakalvoihin. (Elonen & Bono 2013: 182–189.)

Ruoansulatuskanavan limakalvoissa solujen vaihtuvuus on nopeaa, joten ne ovat erittäin alttiita vaurioille. Solunsalpaajahoidon aiheuttama suolen limakalvovaurio onkin hyvin yleinen solunsalpaajien aiheuttama haittavaikutus. Siinä suolen limakalvoon ilmaantuu haavaumia, jotka aiheuttavat ripulia, painon alenemista, tulehduksia ja pahoinvointia. (Wardill & Bowen 2013: 155–157.) Limakalvovauriossa myös suolen estotoiminto eli kyky estää erilaisten mikrobien ja antigeenien pääsy elimistöön heikkenee. Tällöin bakteerit

pääsevät siirtymään helpommin limakalvon läpi elimistöön, jossa ne aiheuttavat tulehduksia. (Suzuki 2012: 631–633.) Limakalvovauriosta johtuvat oireet, kuten ripuli, vaikuttavat merkittävästi potilaan elämänlaatuun ja voivat johtaa sairaalahoidon tarpeeseen. Oireiden vuoksi lääkemannosta saatetaan joutua rajoittamaan, mikä voi vaikuttaa hoidon lopputulokseen. (Wardill & Bowen 2013: 155–157.)

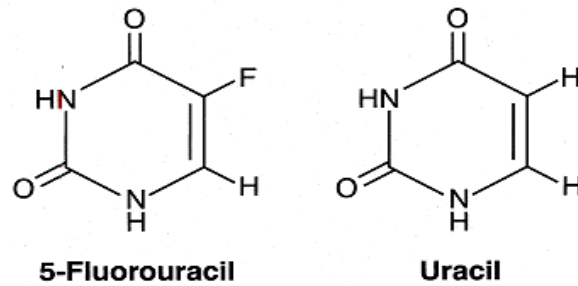
Ohjelmoitua solukuolemaa ja matriksin metalloproteinaaseja (MMP) on esitetty viime aikoina suolen limakalvovaurion syntymistä edistäviksi tekijöiksi. Tiivisliitosproteiinit yhdistävät suolen limakalvon vierekkäiset solut toisiinsa ja siten estävät molekyylien vapaan liikkumisen puolelta toiselle. Solunsalpaajahoidossa tähän rajapintaan tulee vakavia vaurioita. Viime vuosina tutkijat ovat kiinnostuneet erityisesti tiivisliitosproteiinien osuudesta solusalpaajien aiheuttaman limakalvovaurion synnyssä. Solunsalpaajahoidon vaikutusta tiivisliitosproteiineihin tulee vielä tutkia lähemmin. Huomiota tulee kiinnittää erityisesti tiivisliitosproteiinien tasoissa tapahtuviin muutoksiin sekä aikaan, jolloin ne on määritetty lääkkeen annon jälkeen. (Wardill & Bowen 2013: 155–161.)

## 2.1 5-Fluorourasiili

Syövän hoidossa käytettävä 5-fluorourasiili (kuva 1) kuuluu antimetaboliittien ryhmään, jotka häiritsevät solun omaa aineenvaihduntaa. Antimetaboliitit ovat faasispesifisiä ja niillä voi olla yksi tai useampi mekanismi, joilla ne aiheuttavat solujen kuoleman. Yksi 5-fluorourasiilin vaikutustapa on toimia pyrimidiinianalogina RNA-synteesissä. (Elonen 2013: 1021–1024.)

Lääkeaine saapuu soluun kantajamolekyylin avulla, jonka jälkeen se muuttuu useiksi aktiivisiksi aineenvaihduntatuotteiksi. Yksi tärkeimmistä tuotteista on fluorouridiinimosfaatti (FUMP), joksi 5-fluorourasiili voi muuttua suoraan orotaattifosforibosyyli transferaasin (OPRT) välityksellä. Tässä reaktiossa kofaktorina toimii fosforibosyylipyrofosfaatti (PRPP). Lääkeaine voi muuttua FUMP:ksi myös toista reittiä, jolloin uridiinifosforylaasi (UP) katalysoi sen ensin fluorouridiiniksi (FUR). Tämän jälkeen FUR muuttuu FUMP:ksi uridiinikinaasin (UK) välityksellä. Syntynyt aineenvaihduntatuote FUMP fosforyloituu fluorouridiinidifosfaatiksi (FUDP), joka voi edelleen fosforyloitua fluorouridiinitrifosfaatiksi (FUTP). FUTP voi ottaa RNA:ssa urasiilitrifosfaatin paikan ja näin vahingoittaa syntyvää nukleiinihappoa. (Longley ym. 2003: 330–338.)

Toinen lääkeaineen vaikutustapa on estää DNA:n synteesissä tarvittavan tymidylaattisyntaasientsyymin toiminta. Tällöin 5-fluorourasiili muuttuu ensin fluorodeoksiuridiiniksi (FUDR), joka fosforyloituu tymidiinikinaasin (TK) välityksellä fluorodeoksiuridiinimonofosfaatiksi (F-dUMP). Syntynyt aineenvaihduntatuote voi ottaa tymidylaattientsyymissä luonnollisen deoksiuridiinimonofosfaatin (dUMP) paikan ja näin estää entsyymin toiminnan. (Longley ym 2003: 330–338.)



Kuva 1. Fluorourasiili on samankaltainen aine kuin RNA-synteesissä tarvittava urasiili. 5-Fluorourasiililla on viidennessä hiilessä sitoutuneena fluori-atomi vety-atomin sijasta. (Vale-riote & Santelli 1984.)

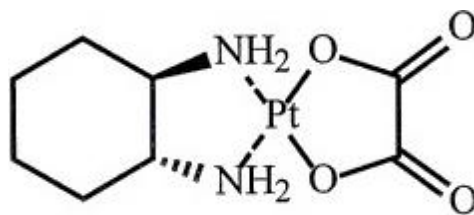
Muun muassa ruonsulatuskanavan ja rintarauhasen syöpiä hoidetaan fluorourasiililla. Lääkeaine annetaan useimmiten verenkiertoon laskimoinjektiona tai -infuusiona. Verenkierrosta lääke pääsee vaikuttamaan tehokkaasti kudoksiin, kun taas ruoansulatuskanavan kautta annettuna sen imeytyminen on huomattavasti vähäisempää. 5-fluorourasiili aiheuttaa runsaasti sivuvaikutuksia, joihin kuuluvat muun muassa ripuli, pahoinvointi, suolen limakalvon haavaumat, hiustenlähtö, ihottuma ja valkosolujen määrän lasku. (Elonen & Bono 2013: 195.)

## 2.2 Oksaliplatiini

Oksaliplatiini (kuva 2) on platinajohdannaisien sytostaattien ryhmän jäsen. Oksaliplatiini vaurioittaa DNA:ta ja siten aiheuttaa solun kuoleman. Oksaliplatiini muodostaa ristsidoksia DNA-säikeiden välille ja sisälle muuttaen näin niiden rakennetta. Lääkeaine muodostaa siltoja myös DNA:n ja proteiinien välille, mikä estää solun kahdentumiselle tärkeiden entsyymien syntymistä. Ristsidos voi syntyä yhteen juosteeseen tai vastakkaisten DNA-juosteiden välille. Samaan juosteeseen muodostuvat sidokset asettuvat useimmiten

guaniinien välille, mutta joskus myös guaniinin ja adeniinin välille. Suurin osa oksaliplatiinin toksisesta vaikutuksesta perustuu samaan juosteeseen muodostuvaan ristsidokseen. (Alcindor & Beauger 2011: 18–19.)

Oksaliplatiini muuttuu plasmassa nopeasti moniksi yhdisteiksi ilman entsyymien katalysointia. Muutoksen aiheuttaa oksaliplatiinissa olevan oksalaatin poistuminen. Syntynyt aktiivinen diklooriplatina-yhdiste (DACH) siirtyy tumaan, jossa se sitoutuu DNA:n puriiniemäksen guaniinin typpi-atomiin. Tällöin syntyy DNA:n ja kemikaalin komplekseja DNA-addukteja, jotka vahingoittavat DNA:ta ja estävät sen kahdentumista. (Alcindor & Beauger 2011: 18–20.)



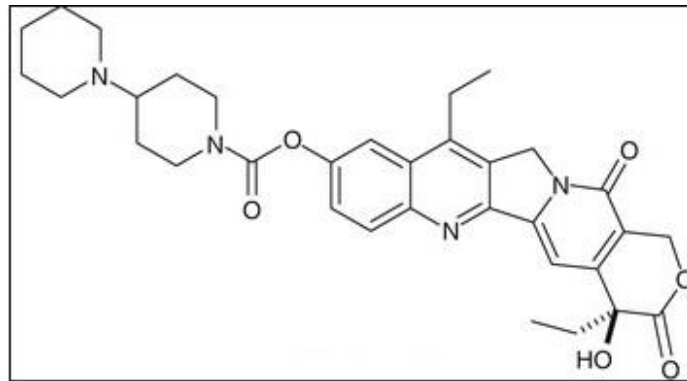
Kuva 2. Oksaliplatiinin kemiallinen rakenne (Dospivova 2012: 3073).

Oksaliplatiini annetaan potilaalle verenkiertoon ja sitä käytetään pääasiassa suolistosyövän hoitoon. Se tehoaa erityisen hyvin, kun sitä käytetään yhdessä 5-fluorourasiilin kanssa. Oksaliplatiini aiheuttaa monia haittavaikutuksia esimerkiksi pistelyä sekä tunnottomuutta sormissa ja jaloissa. Se ei kuitenkaan yleensä aiheuta hiustenlähtöä. (Lääkeaine: Oksaliplatiini.) Oksaliplatiinin muita haittavaikutuksia ovat pahoinvointi ja ripuli (Alcindor & Beauger 2011: 20).

### 2.3 Irinotekaani

Irinotekaani (kuva 3) kuuluu topoisomeraasi I:n estäjien ryhmään. DNA:n kaksoisjuostetta avataan sen lukemisen ja kahdentumisen aikana, mikä aiheuttaa painetta ja kiertymistä DNA:n muille alueille. Topoisomeraasientsyymi vähentää lukemisesta aiheutuvaa jännitystä leikkaamalla toisen juosteen poikki ja siirtämällä katkenneet päät ensimmäisen juosteen toiselle puolelle. Tämän jälkeen entsyymi liittää päät takaisin yhteen. Irinotekaani estää topoisomeraasia sitomasta päitä takaisin yhteen aiheuttaen DNA-juosteeseen katkeamia, jonka seurauksena solu joutuu apoptoosiin. (Elonen 2013: 1032.)

Lääkeaine hydrolysoituu elimistössä aktiiviseksi aineenvaihduntatuotteeksi SN-38:ksi karboksyyliesteriäsiin (CES) katalysoimana. Reaktio voi tapahtua sekä solun sisä- että ulkopuolella. SN-38 sitoutuu topoisomeraasi I:n ja häiritsee sen toimintaa. Lopulta se aiheuttaa solun kuoleman. SN-38 poistuu solusta ABC-kuljetusproteiinien avulla. SN-38 inaktivoidaan maksassa glukuronidaatiolla. (Ulrich ym 2014.)



Kuva 3. Irinotekaanin kemiallinen rakenne (Kacprzak 2013.)

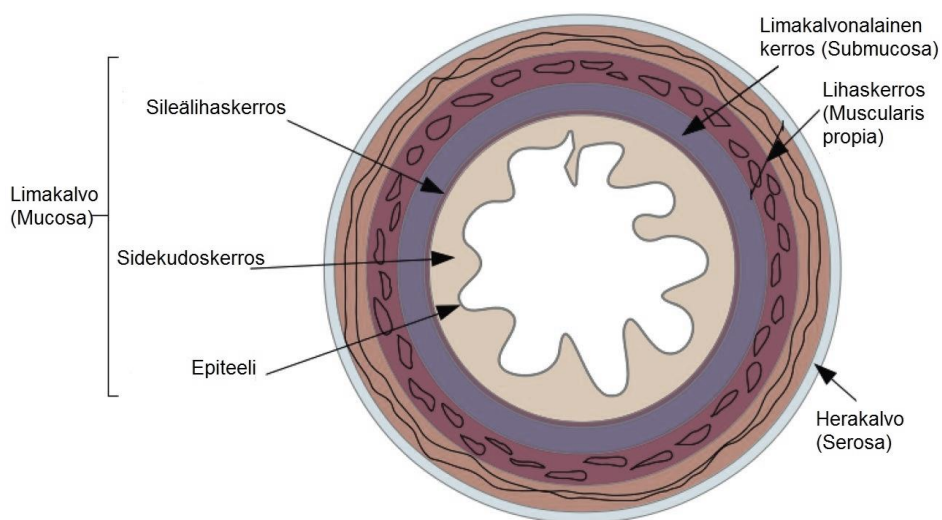
Irinotekaania käytetään erityisesti paksusuolen ja peräsuolen syöpien hoidossa, ja sitä voidaan käyttää myös yhdessä 5-fluorourasiilin kanssa. Lääkeaine annetaan potilaalle laskimoinfuusiona 2-3 viikon välein. Irinotekaanin haittavaikutuksiin kuuluu muun muassa vaikea pahoinvointi ja hiustenlähtö. Pahoinvointia voidaan hoitaa ennaltaehkäisevästi 5HT<sub>3</sub>-salpaajilla. Noin viisi päivää lääkkeen antamisen jälkeen voi esiintyä myös vaikeaa ripulia, ja sen vuoksi voidaan joutua alentamaan lääkkeen annostusta. Ripulia voi hoitaa loperamidilla, kun oireet alkavat. Oireiden alkaminen on kuitenkin hyvin potilaskohtaista eikä annoksesta voi päätellä oireiden vakavuutta. Irinotekaanin on todettu aiheuttavan myös ruoansulatuskanavan limakalvovauriota eli mukosiittia ja ihottumaa. (Elonen ym. 2011: 720–721.)

### 3 Suolen rakenne

Ruonsulatuskanava koostuu suusta, ruokatorvesta, mahalaukusta, ohut- ja paksusuolesta sekä peräsuolesta. Kanavan pääasiallisena tehtävänä on muuttaa ruoasta saadut ravintoaineet elimistölle käyttökelpoiseen muotoon sekä siirtää ne verenkierron

kautta solujen käyttöön. Sylkirauhaset, maksa, sappirakko ja haima edistävät ruoansulatusta erittämällä kanavaan entsyymejä ja erilaisia nesteitä. Ruoan pilkkominen alkaa suusta, jossa se pureskellaan ja syljessä oleva amylaasientsyymi aloittaa monimutkaisten hiilihydraattien polysakkaridien pilkkomisen. Tämän jälkeen ruokamassa siirtyy ruokatorven kautta mahalaukuun, jossa ruoka varastoidaan ja sitä pilkotaan edelleen mahaneesten ja entsyymien avulla. Mahalaukusta ruokasula kulkeutuu ohutsuoleen, jossa ravintoaineiden imeytyminen tapahtuu. Paksusuolella ruokasulasta imeytyy elimistöön vettä ja suolet ennen kuin ruokamassa poistuu elimistöstä peräsuolen kautta. (Ward & Linden 2013: 84–93.)

Ruoansulatuskanavan seinämä koostuu neljästä kerroksesta: limakalvosta (mucosa), limakalvon alaisesta kerroksesta (submucosa), lihaskerroksesta (muscularis propria) ja herakalvosta (serosa) (kuva 4).



Kuva 4. Ruoansulatuskanavan seinämän rakenne (Balbi & Ciarletta 2013).

Limakalvo eli mucosa rakentuu edelleen kolmesta erillisestä kerroksesta: epiteelikerroksesta, sidekudoskerroksesta (lamina propria) ja limakalvon lihaskerroksesta (muscularis mucosa). Ravintoaineiden imeytyminen elimistöön tapahtuu limakalvon epiteelisolujen läpi, jonka jälkeen yhdisteet kulkeutuvat elimistöön sidekudoskerroksen verisuonten välityksellä. (Ward & Linden 2013: 85.) Epiteelikerros toimii mekaanisena esteenä, joka estää taudinaiheuttajien ja muiden haitallisten aineiden pääsyn elimistöön. Epiteelikerroksen alla oleva sidekudoskerros sisältää runsaasti imusoluja, jotka vahvistavat elimistön puolustusta edelleen. (Lopez 2010.)

Limakalvonalainen kerros eli submucosa sisältää veri- ja imusuonia sekä yhden enterisen hermoston hermosoluverkoista eli limakalvonalaispunoksen. Submucosan alla oleva lihaskerros supistelee ja liikuttaa ruokamassaa eteenpäin suolistossa. Lihaskerros koostuu rengasmaisesta ja poikittaisesta lihaskerroksesta, joiden välissä on toinen enterisen hermoston hermosoluverkoista, myenteerinen punos. Suolen ulomman kerros on nimeltään herakalvo eli serosa, joka yhdistää suolen sen ympärillä oleviin rakenteisiin. Herakalvo muodostuu sidekudoksesta, jonka päällä on kerros levyepiteeliä. (Ward & Linden 2013: 84–85.)

Ohutsuoli on läpimitaltaan noin 2,5 cm leveä ja noin neljä metriä pitkä putkimainen elin, jossa vesi, elektrolyytit, hiilihydraatit, mineraalit, rasvat ja vitamiinit imeytyvät elimistöön. Se koostuu kolmesta osasta: pohjukais-suolesta (duodenum), tyhjäsuolesta (jejunum) ja sykkyräsuolesta (ileum), joista kahdessa ensimmäisessä imeytyminen lähinnä tapahtuu. Ohutsuolen suuren imeytymispinnan mahdollistavat sidekudoskerroksesta kohoavat sormimaiset nukkalisäkkeet eli villukset sekä niiden välissä olevat suolirauhaset eli kryptat. Nukkalisäkkeet koostuvat epiteelisoluista, ja ne sisältävät yhden imusuonen sekä hiussuoniverkoston, joiden kautta suurin osa ravintoaineista imeytyy verenkiertoon. Nukkalisäkkeiden pinnalla on lisäksi mikrovilluksia, jotka lisäävät suolen imeytymispintaa entisestään. Mikrovillusten muodostamaa kerrosta kutsutaan harjareunukseksi. (Ward & Linden 2013: 88–89.)

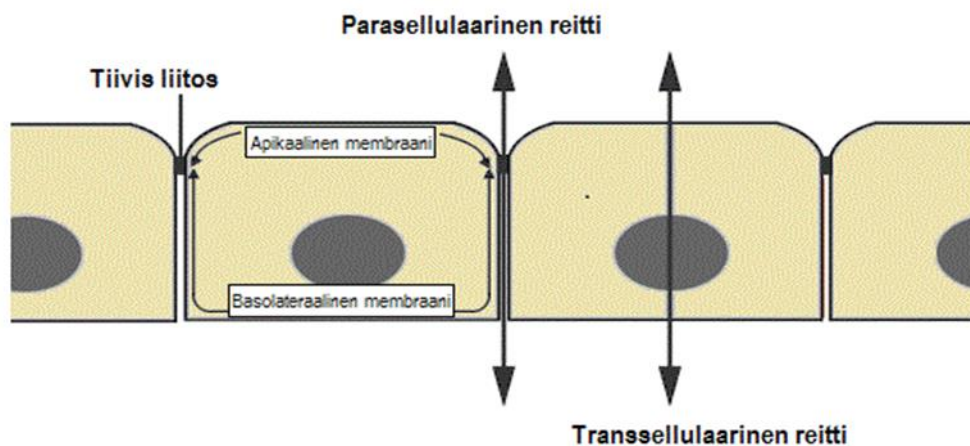
Paksusuoli on läpimitaltaan noin 6–9 cm leveä ja 1,2 pitkä putkimainen elin, jossa suurin osa vedestä ja elektrolyyteistä imeytyvät elimistöön. Paksusuoli koostuu umpisuolesta (caecum), nousevasta koolonista (colon ascendes), poikittaisesta koolonista (colon transversum), laskevasta koolonista (colon descendes), vemmelsuolesta (colon sigmoideum), peräsuolesta (rectum) ja peräaukosta. Paksusuoleen tulee päivittäin noin 1,5 litraa ruokasulaa, joka viipyy suolessa noin 20 tuntia. Veden ja suolojen imeytymisen jälkeen tästä määrästä on jäljellä 100 grammaa vettä ja 50 grammaa kiintoainetta, joka poistuu elimistöstä ulosteena. Suurin osa ruoansulatuskanavan bakteereista on paksusuolesta, koska muut kanavan osat ovat liian happamia ympäristöjä mikroflooralle. Lähes kaikki paksusuolen bakteerit ovat anaerobeja, ja ne osallistuvat K- ja B<sub>12</sub>-vitamiinien synteesiin. Bakteerit myös hajottavat primaarisia ja sekundaarisia sappihappoja, kolesterolia sekä lääkeaineita. (Ward & Linden 2013: 92–93.)

#### 4 Tiivisliitosproteiinit

Ruoansulatuksen epiteelillä on kaksi samanaikaista tehtävää. Se muodostaa imeytymispinnan ravintoaineille, elektrolyyteille ja vedelle sekä toimii mekaanisena esteenä, jonka tarkoituksena on torjua patogeenien, toksiinien ja antigeenien pääsy elimistöön. Rajapinnan epiteelisolut ovat liittyneet tiukasti toisiinsa tiivisliitoksilla, jotka sulkevat solujen välit. (Suzuki 2012: 631–633.)

Tiivisliitokset ovat proteiinikomplekseja, jotka ylläpitävät solujen polaarisuutta ja estävät apikaalisella ja basolateraalilla pinnalla olevia molekyylejä sekoittumasta. Solun apikaalisella puolella tarkoitetaan sitä pintaa, joka on kohti suolen sisäosaa. Basolateraalinen pinta taas suuntautuu kohti kudosta tai muita soluja. Soluja yhdistävät myös desmosomi ja vyöliitos, jotka lisäksi tukevat solun rakennetta. (Heino & Vuento 2004: 217–219.)

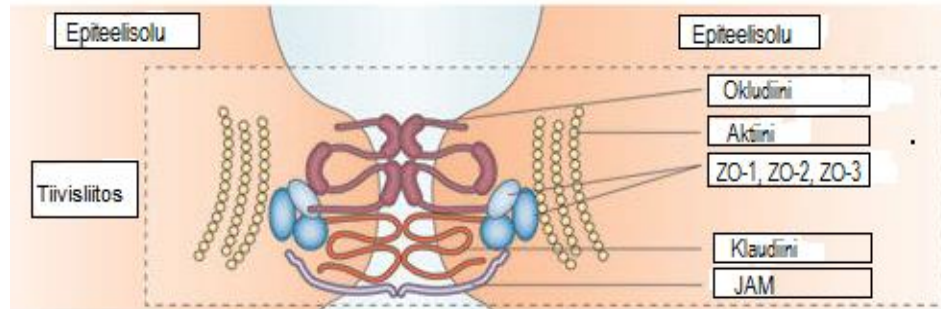
Tiivisliitokset muodostavat solujen välisen valikoivan kanavan, joka säätelee suolen läpäisevyyttä sekä liuenneiden aineiden ja ionien virtausta. Tätä kanavaa kutsutaan parasellulaariseksi reitiksi (kuva 5). Ravintoaineet kuten sokerit, rasvahapot, aminohapot, mineraalit ja vitamiinit kulkevat transsellulaarisesta reitistä solun läpi. Tämän reitin mahdollistavat apikaalisella ja basolateraalilla solukalvoilla olevat kantaja- ja kanavaproteiinit. (Suzuki 2012: 631–633.)



Kuva 5. Kaavakuva tiivisliitosten muodostamasta parasellulaarisesta reitistä sekä solun läpi kulkevasta transsellulaarisesta reitistä. (Tsukita 2003, muokattu).

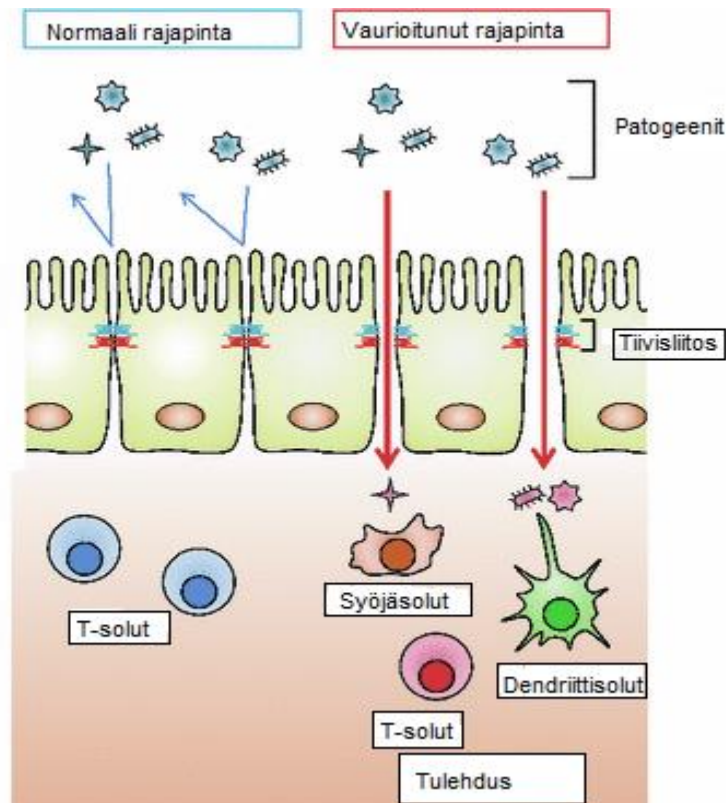


Tiivisliitokset muodostuvat tiivisliitosproteiineista, joista osa ulottuu solukalvon läpi, ja osa sijaitsee solulimassa (kuva 6). Solukalvon läpäisevät kaudiinit, okludiini ja liitosadheesiomolekyylit (JAM-A -proteiinit). Solulimassa sijaitsevat ZO-proteiinit kiinnittävät proteiinikompleksin solun tukirangan aktiinifilamentteihin. (Fromm & Schulzke 2009: 1.)



Kuva 6. Tiivisliitosproteiinit ja niiden sijainti solujen välissä (Mukaillen: Neunlist ym. 2013).

Häiriöt tiivisliitoksissa lisäävät suolen läpäisevyyttä, jolloin haitalliset molekyylit pääsevät helpommin elimistöön (kuva 7). Molekyylit aktivoivat limakalvon puolustusjärjestelmän, jolloin kudokseen syntyy tulehdus sekä vaurioita. Syntyneet vauriot voivat laukaista suolistosairauden kehittymisen. Häiriöt tiivisliitoksissa onkin yhdistetty useisiin sairauksiin, kuten tulehduksellisiin suolistosairauksiin (IBD), keliakiaan ja tyypin 1 diabetekseen. (Suzuki 2012: 648–650.) Tulehduksellista suolistosairautta, kuten Crohnin tautia tai haavaista paksusuolentulehdusta sairastavilla, on lisäksi suurempi todennäköisyys sairastua paksusuolensyöpään. Myös muissa syövässä esimerkiksi keuhkosyövässä ja maha-syövässä on havaittu muutoksia tiivisliitoksissa. (McSherry ym. 2013: 2.)



Kuva 7. Kaavakuva normaalisti toimivasta sekä vaurioituneesta rajapinnasta (Suzuki 2012: 632).

Epiteelin läpäisevyyteen ja tiivisliitoksiin vaikuttavat monet tekijät kuten suolistossa olevat välittäjäaineet eli sytokiinit ja kasvutekijät. Jotkut sytokiinit kuten tuumorinekroositekijä alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ) ja interleukiini-1 beeta ( $\text{IL-1 } \beta$ ) kasvattavat suoliston läpäisevyyttä, kun taas transformoivat kasvutekijät (TGF) ja epidermaaliset kasvutekijät (EGF) alentavat sitä. Myös joidenkin ravintoaineiden on todettu aiheuttavan muutoksia läpäisevyyteen. Esimerkiksi glutamiinin ja probioottien on todettu tukevan ja suojelevan tiivisliitoksia, kun taas alkoholi ja jotkut rasvahapot lisäävät suoliston läpäisevyyttä. (Suzuki 2012: 637–651.)

#### 4.1 Okludiini

Okludiini tunnistettiin solukalvon läpäisevistä tiivisliitosproteiineista ensimmäisenä vuonna 1993. Se muodostuu kahdesta silmukasta, jotka läpäisevät solukalvon neljä kertaa. Solun ulkopuolisten silmukoiden avulla viereisten solujen okludiinit sitoutuvat toisiinsa ja liittävät solut yhteen. (Fromm & Schulzke.2009: 1–2). Silmukat myös muodos-

tavat esteen makromolekyyleille, mutta mahdollistavat pienien ionien kulkemisen parsellulaarisen kanavan läpi. Silmukoiden toisessa päässä okludiinilla on solun sisäpuolella C-terminaali, jolla se on yhteydessä zonula occludens -proteiineihin. Toisessa päässä okludiinilla on lyhyt N-terminaali. (Suzuki 2012: 633–634).

Okludiini on molekyylipainoltaan 65 kDa, ja sen tason kasvu lisää tiivisliitosten määrää solujen välissä. Kaniinien munuaissoluja (MDCK) viljelemällä on pystytty selvittämään, että okludiinin tuotannon lisääminen kasvattaa epiteelin sähköneristyskykyä. Tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, ettei okludiinin päätehtävä ole tiivisliitosten muodostumisessa. Tämä tuli ilmi kokeilla, joissa hiiriltä poistettiin okludiinin tuotanto kokonaan. Siitä huolimatta ne yllättäen pystyivät muodostamaan toimivat tiivisliitokset. Tutkijat kuitenkin havaitsivat kudoksissa kroonista tulehdusta, joka viittasi läpäisevyyden kasvuun. (Cummins 2011: 5.) Hiirillä todettiin myös ruoansulatuskanavan epiteelin solumäärän kasvua eli hyperplasiaa ja lysosomien eli granuloiden vähentymistä sylkirauhasten juovaisten tiehyiden soluissa. Okludiinin osuus proteiinikompleksissa liittyykin enemmän tehokkaaseen estotoiminnallisuuteen ja tiivisliitosten ylläpitoon. (Suzuki 2012: 633–634.)

Okludiinin fosforylaatio säätelee tiivisliitosten läpäisevyyttä ja okludiinin lokalisointia. Fosforylaatiota taas säätelevät kinaasit kuten proteiinikinaasi C (PKC) kaseiinikinaasi I ja II sekä fosfataasientsyymit. Proteiinikinaasi C:n inhibiitio aiheuttaa okludiinin defosforylaatiota, joka johtaa häiriöihin tiivisliitoksissa. (Suzuki 2012: 633–634.)

#### 4.2 Klaudiini-1 ja -4

Shoichiro Tsukita tunnisti klaudiinin ensimmäisenä vuonna 1998 yhdessä vaimonsa Sachikon Tsukitan kanssa. Tämän jälkeen tietämys klaudiinien merkityksestä tiivisliitoksissa on kasvanut huomattavasti, ja klaudiinien perheeseen on tunnistettu kuuluvaksi ihmisillä ja hiirillä yhteensä 24 proteiinia. Näistä proteiineista jokaisella on erityisiä ominaisuuksia, ja klaudiineista on erilaisia yhdistelmiä eri solutyypeissä. Klaudiinien alatyypien määrät ja kokonaisuudet vaikuttavat huomattavasti tiivisliitosten kykyyn toimia valikoivana kanavana ja rajapintana. (Furuse 2010: 1–5.) Klaudiinien tärkeys tiivisliitosten läpäisevyyteen osoitettiin kokeilla, joissa hiiriltä poistettiin klaudiini-1:n tuotanto. Kaikki hiiret kuolivat vuorokauden sisällä elektrolyyttien ja nesteiden menetykseen, koska epiteelikudoksen läpäisevyys kasvoi. (Fromm & Schulzke 2009: 1–2.)

Klaudiinin aminohapposekvenssin pituus on 207 ja 305 aminohapon väliltä (Gunzel & Yu 2013: 6). Klaudiini koostuu kahdesta silmukasta, jotka läpäisevät solukalvon neljä kertaa. Solulimassa silmukoiden päässä on lyhyt N-terminaali ja pidempi C-terminaali, kuten okludiinillakin. C-terminaali vaikuttaa klaudiinien ja tiivisliitosten pysyvyyteen. Isompi silmukka (ECL1) koostuu 50 aminohaposta ja pienempi (ECL2) kahdestakymmenestä. Isommassa silmukassa on myös varauksellisia aminohappoja, jotka vaikuttavat parasellulaarisen kanavan varausselektiivisyyteen. Näiden aminohappojen määrä vaihtelee klaudiinien eri alatyypeissä. Pienemmän silmukan arvellaan muodostavan dimeereitä. (Furuse 2010: 1–5.) Sen tehtävä liittyy klaudiinien välisiin vuorovaikutuksiin, eikä niinkään parasellulaariseen läpäisevyyteen (Gunzel & Yu 2013: 46).

Klaudiinien molekyyli­massat vaihtelevat 20–27 kDa:n välillä (Furuse 2010: 1–5). Klaudiinin ensimmäistä muotoa on elimistössä lähes kaikista kudoksissa, ja sen tärkein tehtävä on osallistua rajapinnan muodostamiseen (Gunzel & Yu 2013: 27–28). Myös klaudiinin neljäs muoto liittyy suolistossa estotoiminnallisuuteen. Klaudiinin ensimmäisen muodon fosforylaatiota säätelevät proteiini fosfataasi PP2A ja PKC. (Suzuki 2012: 634–635.) Klaudiini-4:n fosforylaatiota säätelee PKC (Aono & Hiray 2008).

#### 4.3 Zonula occludens -1

Bruce Stevenson kollegoineen tunnisti ZO-1-proteiinin 1986. Myöhemmin Zonula occludens -perheen jäseniä tunnistettiin kaksi muuta lisää. Nämä nimettiin ZO-2- ja ZO-3 -proteiineiksi. Ne kuuluvat vielä laajempaan MAGUK-perheeseen, jotka koostuvat kolmesta PDZ-domeenista, yhdestä CH3- ja yhdestä guanylaattikinaasi domeenista (GUK). (Fromm & Schulzke 2009: 1–28.) ZO-1-proteiinin molekyyli­paino on 220 kDa (Suzuki 2012: 636–637).

Monet tiivisliitosproteiinit kiinnittyvät ZO-proteiinin N-terminaaliin. Esimerkiksi klaudiinit kiinnittyvät ZO-1:n ensimmäiseen PDZ-domeeniin, kun taas JAM-A sitoutuu kolmanteen PDZ-domeeniin. Toisen PDZ-domeenin avulla proteiini on vuorovaikutuksessa muiden ZO-proteiinien kanssa. Okludiinin sitoutumispaikka ZO-1 -proteiinissa on GUK-domeeni. C-terminaali kiinnittää proteiinikompleksin aktiinitukirankaan. (Suzuki 2012: 636–637.) ZO-proteiinien tehtävänä on solun tukiranka­na toimimisen lisäksi signaalien kuljettaminen. Lisäksi Eph4-soluissa on tutkittu, että nämä proteiinit myös mahdollistavat klaudiinien polymerisaation ja näin tiivisliitoksen rakentumisen. (Liu ym. 2012.) ZO-1 -proteiini

säätää myös transkriptiotekijöitä, jotka mahdollistavat DNA-koodin lukemisen aloittamisen (McSherry 2013: 33).

ZO-1 –proteiinin tärkeys tiivisliitoksille on osoitettu hiirillä suoritetussa tutkimuksessa. ZO-1:n ja ZO-2:n suhteen poistogeeniset hiiret kuolivat jo alkionkehitysvaiheessa. ZO-3:n suhteen poistogeeniset hiiret kuitenkin pystyivät muodostamaan normaalit tiivisliitokset. (Fromm & Schulzke 2009: 28–29.)

#### 4.4 JAM-A

Liitosadheesiomolekyyli JAM-A tunnistettiin ihmisestä vuonna 1999. Sen jälkeen liitosadheesiomolekyyliä on löydetty lisää, ja niille on annettu nimet JAM-B, JAM-C, JAM-4 ja ESAM. (Schmitt 2014: 14.) JAM-proteiinit ovat molekyylipainoltaan noin 40 kDa, ja ne kuuluvat suureen immunoglobuliinien perheeseen (Liu ym. 2012). Nämä kaikki proteiinit läpäisevät solukalvon kerran. JAM-proteiinit koostuvat kahdesta solun ulkopuolella sijaitsevasta silmukasta ja niiden päässä olevasta N-terminaalista. Solulimassa niillä on C-terminaali, joka sisältää paikan proteiinikinaasi C:n fosforylaatiolle. (Schmitt 2014: 16–19.)

JAM-A:n väheneminen tiivisliitoksissa aiheuttaa tulehdusta. JAM-A:n tehtäviin kuuluvat epiteelin estotoiminnallisuuden säätely sekä solun polaarisuuden säilyttäminen. JAM-A vaikuttaa myös solujen liikkumiseen eli migraatioon ja solumäärän lisääntymiseen eli proliferaatioon. (Fromm & Schulzke 2009:10.) Se osallistuu myös verisuonten uudismuodostumiseen (Schmitt.2014: 16–19).

Suolen epiteelin tiivisliitoksia ovat muodostamassa JAM-A, JAM-4 ja adenovirusreseptori CAR. JAM-A:n merkitystä tiivisliitoksille on tutkittu poistamalla sen tuotanto hiiriltä kokonaan. Tutkimuksessa havaittiin, että JAM-A:n poisto johtaa lisääntyneeseen suoliston läpäisevyyteen ja tekee hiiristä alttiimpia kemiallisesti indusoidulle paksusuolen tulehdukselle. (Suzuki 2012: 635–636.)

## 5 Western blot

Western blot on semikvantitatiivinen yleisesti käytössä oleva menetelmä, jolla voidaan tunnistaa haluttu proteiini kokonaisproteiininäytteestä sekä määrittää sen taso. Menetelmän avulla voidaan saada tietoa myös proteiinien molekyylipainoista ja niiden mahdollisista post-translationalaalisista muunnoksista. Haluttu proteiini tunnistetaan spesifisen vasta-aineen avulla. Menetelmää voidaan pitää herkkänä, koska sen avulla on mahdollista tunnistaa näytteestä hyvin pieniäkin määriä proteiinia. (Najafov & Hoxhaj 2017: 1–2.)

Tässä tutkimuksessa Western blot -menetelmää käytettiin tiivisliitosproteiinien (okludiini, klaudiini-1, klaudiini-4, ZO-1 ja JAM-A) tasojen määrittämiseksi.

### 5.1 SDS-PAGE

SDS-polyakryyliamidigeelelektroforeesissa (SDS-PAGE) proteiinit erotetaan molekyylipainon mukaan sähkökentässä. SDS muuttaa proteiinit negatiivisesti varautuneiksi, ja ne liikkuvat polyakryyliamidigeelillä kohti positiivista anodia. Isommat proteiinit liikkuvat hitaammin kuin pienemmät proteiinit. Akryyliamidin määrä geelissä määrittää sen huokoskoon. Mitä enemmän geelissä on akryyliamidia, sitä tiheämpi se on, ja näin ollen se soveltuu hyvin molekyylipainoltaan pienelle proteiinille. Isommat proteiinit sen sijaan vaativat harvemman geelin. (Najafov & Hoxhaj 2017: 6–9.)

Konsentroitigeelissä polyakryyliamidiprosentti on pienempi ja pH alempi kuin erottelugeelissä. Tästä syystä proteiinien varaus vähenee, ja ne pääsevät pakkautumaan toistensa päälle. Näin tuloksista saadaan terävämpiä ja tarkempia. Konsentroitigeelin polyakryyliamidiprosentti on usein 4–5 %. Erottelugeelin vastaava luku on taas 6–15 %. Lisäksi kaupan on valmiiksi valettuja 4–20-prosenttisia gradienttigeelejä. Pienissä geelissä kaivoja on usein 10 tai 15. (Najafov & Hoxhaj 2017: 6–9.)

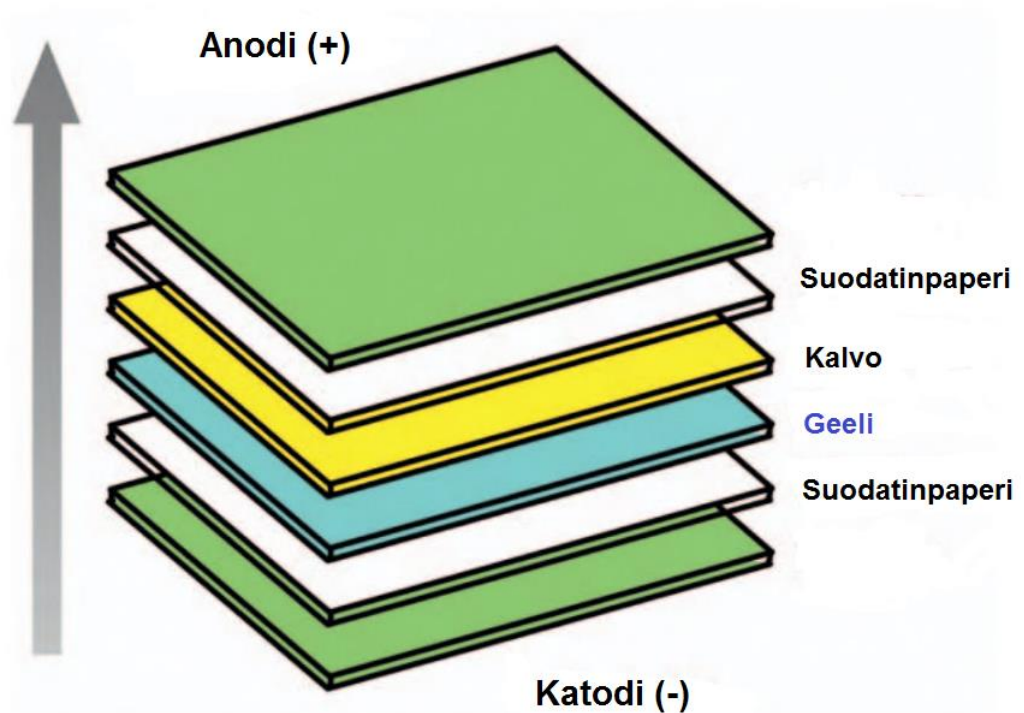
Puhdistetuista proteiineista valmistettuja molekyylimerkkiaineita käytetään muun muassa proteiinien kulun seuraamiseen elektroforeesin aikana. Merkkiaineessa olevien proteiinien molekyylipainot tunnetaan, ja ne vaihtelevat yleensä 10–250 kDa:n välillä. Leimatut proteiinimarkkerit vähentävät myös geelien Ponceau-värjäämisen tarvetta. (A Guide to successful Western Blotting: 7; Najafov & Hoxhaj 2017: 9.)

## 5.2 Blottaus

SDS-PAGE:n jälkeen proteiinit pitää siirtää kalvolle, koska geeli on liian haurasta jatkokäsittelyyn. Kalvoja on erilaisia, mutta kaksi yleisimmin käytettyä kalvoa on tehty nitroselluloosasta ja polyvinyylideenifluoridista (PVDF). Kalvon valinnassa tulee ottaa huomioon sen ominaisuudet ja proteiinien kuvantamistapa. Molemmista materiaaleista valmistetut kalvot sitovat hyvin proteiineja, ja niitä on saatavilla huokoskoossa 0,1 µm, 0,2 µm ja 0,45 µm. Tavallisimmin käytetty huokoskoko on 0,45 µm. Pienemmän koon kalvot on tarkoitettu alle 20 kDa:n proteiineille. Nitroselluloosakalvo on vähän hauraampi käsittelyssä kuin polyvinyylideenifluoridikalvo. PVDF-kalvolla voidaan havaita jopa 10 pikomoolin määriä. (Protein Transfer Technical Handbook: 4.)

PVDF-kalvon kyky sitoa proteiineja on 170–200 µg/cm<sup>2</sup>, kun taas nitroselluloosan on heikompi 80–100 µg/cm<sup>2</sup>. Nitroselluloosakalvo aiheuttaa kuitenkin vähemmän yleistä taustaa kuin PVDF-kalvo. (Najafov & Hoxhaj 2017: 11–12.)

Negatiivisesti varautuneet proteiinit saadaan siirtymään positiivisesti varatulle kalvolle sähkövirran avulla (Faoro ym. 2011: 271). Proteiinit voidaan siirtää kalvolle usealla eri tavalla. Puolikuivassa blottauksessa (semi-dry) kalvo, geelit ja suodatinpaperit kostutetaan puskurilla, ja siirto tapahtuu anodi- ja katodilevyjen välissä (kuva 8). Märkä blottaus taas suoritetaan kokonaan puskuria täynnä olevassa astiassa. (A Guide to successful Western Blotting: 8–9.)



Kuva 8. Puolikuiva blottaus katodi- ja anodilevyjen välissä (Najafov & Hoxhaj 2017: 10, muokattu).

### 5.3 Blokkkaus

Seuraavan työvaiheen, blokkauksen, tarkoituksena on saada primaarinen vasta-aine sitoutumaan vain haluttuun proteiiniin. Blokkauksessa tyhjät huokokset täytetään vasta-aineelle epäspesifisellä proteiinilla. Näin mahdollistetaan tarkat tulokset kohdeproteiinista ja vähennetään taustaa. (Najafov & Hoxhaj 2017: 11–12.)

Blokkausliuksena käytetään usein 5–10-prosenttista rasvatonta maitoa tai 3–5-prosenttista naudan seerumin albumiinia (BSA). Saatavilla on myös kaupallisia puskureita. Liuoista valittaessa tulee ottaa huomioon tutkittavan proteiinin ominaisuudet, jotta saadaan paras mahdollinen tulos. Esimerkiksi maito sisältää luonnostaan fosfokaseiinia, joka aiheuttaa kalvoon taustaa ja saattaa myös vähentää tulosten näkyvyyttä fosfospesifisillä vasta-aineilla. Blokkauksessa kalvoja inkuboidaan liuksessa 30–180 min. (Najafov & Hoxhaj 2017: 11–12.) Tätä aikaa ei tule ylittää, koska liian pitkä inkubointi saattaa estää vasta-ainetta sitoutumasta (A Guide to successful Western Blotting: 10).



## 5.4 Vasta-aineet

Kun tyhjät huokokset on tukittu, kalvot käsitellään halutulle proteiinille spesifisellä primaarivasta-aineella. Primaarivasta-aine voi olla joko polyklonaalinen tai monoklonaalinen. Polyklonaalinen vasta-aine on halvempi, koska se on helpompi ja nopeampi tuottaa. Monoklonaalinen vasta-aine taas on hyvin spesifinen ja sitoutuu herkästi eikä sen erien laadun välillä ole usein lainkaan eroja. Polyklonaalisen vasta-aineen erien välillä taas saattaa olla eroavaisuuksia johtuen sen erilaisesta tuotantotavasta. (Najafov & Hoxhaj 2017: 14–16.) Hyvä primaarivasta-aine on tärkeä osa Western blot -ajoa, koska sen avulla voidaan saada laadukkaat ja tarkat tulokset. Huono vasta-aine saattaa antaa harhaanjohtavia tuloksia. (A Guide to succesful Western Blotting: 4.)

Primaarivasta-aineella inkuboinnin jälkeen kalvot käsitellään sekundaarisella vasta-aineella. Inkubointien välissä kalvot pestään TBS-T:llä, jotta saadaan poistetuksi ylimääräinen sitoutumaton primaarivasta-aine. Yleisiä vaihtoehtoja laimennosliuoksiksi ovat muun muassa TBT-T ja blokkauspuskuri, joista jälkimmäinen vähentää taustan muodostumista detektointivaiheessa. Inkubointiajaksi suositellaan yhtä tuntia huoneenlämmössä. Sekundaarivasta-aineet sitoutuvat primaarivasta-aineeseen, ja ne voidaan leimata detektoimista varten joko entsyymikonjugaatilla tai fluoro-fluorilla. Usein käytettyjä entsyymikonjugaatteja ovat piparjuuriperoksidaasi (HRP) tai alkalinen fosfaatti (AP), ja näiden käyttö vahvistaa signaalia detektoimisessa. Fluoresenssimenetelmää pidetään kuitenkin yleisesti luotettavampana tulosten määrittämisessä. (Najavof & Hoxhaj. 2017:17–18.)

## 6 Työn tausta ja tavoitteet

Insinööriyön tarkoituksena oli kehittää Western blot -menetelmä soveltuvaksi solunsalpaajien vaikutusten tutkimiseksi suolen limakalvon tiivisliitosproteiineille. Työhön kuului osana myös menetelmän optimointi halutuille proteiineille. Tutkimukset suoritettiin heinäkuun ja joulukuun välisenä aikana vuonna 2017 Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian osastolla.

Työ oli osa Richard Forsgårdin väitöskirjaan liittyvää tutkimusta, joka koostui kahdesta osasta (Forsgård ym. 2016). Ensimmäisessä kokeessa hän selvitti, korreloiko sytostaattien aiheuttaman limakalvovaurion vakavuus suolen lisääntyneen läpäisevyyden kanssa. Insinööriyön aineistona oli edellä mainitusta tutkimuksesta saatujen rottien ohutsuolten

kudosnäytteet. Tutkimuksessa vertailtiin irinotekaania, 5-fluorourasiilia ja oksaliplatiinia saaneiden rottien kudosnäytteitä fysiologista suolaliuosta saaneiden eläinten verrokkiryhmään.

Toisessa tutkimuksessa tavoitteena oli määrittää, lisäävätkö sytostaattien yhdistelmillä toteutetut hoidot ruoansulatuskanavan toksisuutta. Insinööriyön toisen osan kudosnäytteet saatiin kyseisestä tutkimuksesta. Tässä osassa käytetyt sytostaatit olivat irinotekaani, 5-fluorosiliili ja niiden yhdistelmä.

Näytteistä oli tarkoitus määrittää okludiinin, klaudiini-1:n, klaudiini-4:n, ZO-1:n ja JAM-A:n tasot. Suolikudosten histologiset tutkimukset olivat aikaisemmin osoittaneet eroja solusalpaajilla hoidettujen ryhmien ja verrokkiryhmien välillä, joten tämän insinööriyön tavoitteena oli tuoda lisätietoa limakalvovaurion mekanismeista.

## **7 Materiaalit ja menetelmät**

Työ aloitettiin tutustumalla ryhmän käytössä olevaan Western blot -menetelmään. Insinööriyön aikana optimointia suoritettiin SDS-PAGE-vaiheessa geelin valinnassa, näytemäärässä ja ajoparametreissa sekä blottausvaiheessa laitteen valinnassa. Myös spesifisen vasta-aineen ja sopivimman pitoisuuden löytämiseksi tarvittiin optimointia.

### **7.1 Koe-eläimet ja lääkeaineannokset**

Työn kudosnäytteet saatiin Forsgårdin tutkimuksen rotista. Molempien kokeiden eläimet olivat kuusi viikkoa vanhoja Hsd:Sprague-Dawley<sup>®</sup>™ SD<sup>®</sup>™ -urosrottia (Envigo, Udine, Italia). Rotat totutettiin uusiin olosuhteisiin ennen lääkeaineiden annostelua. Lääkeaineet annosteltiin vatsaonteloon nukutuksessa. Ensimmäisen tutkimuksen eläimet oli jaettu sattumanvaraisesti neljään ryhmään lääkeaineiden antoa varten. Jokaisessa ryhmässä oli neljä rottaa. Verrokkiryhmä sai yhden injektion 0,9-prosenttista NaCl-liuosta. 5-fluorourasiiliryhmän annos oli 150 mg/kg ja irinotekaaniryhmän 200 mg/kg. Oksaliplatiiniryhmälle lääkeainetta annosteltiin 15 mg/kg.

Toisen tutkimuksen verrokkiryhmä sai 0,9 %:sta NaCl-liuosta yhteensä kolme kertaa annoksella 1 ml/kg. 5-fluorourasiiliryhmän annostus oli sama kuin ensimmäisessä kokeessa (150mg/kg). Irinotekaaniryhmän annos oli puolet edellisen kokeen vastaavasta (100mg/kg). Yksi ryhmä oli irinotekaanin (100mg/kg) ja 5-fluorourasiilin (150mg/kg) yhdistelmä. Taulukossa 2 on esitettyä tutkimuksen rottaryhmät ja niiden lääkeaineannokset.

Taulukko 2. Ensimmäisen ja toisen tutkimuksen rottaryhmät ja niiden lääkeaineannokset.

Ensimmäisen tutkimus	Toinen tutkimus
Verrokkiryhmä (0,9 % NaCl-liuos)	Verrokkiryhmä (0,9 % NaCl-liuos)
5-Fluorourasiiliryhmä (150mg/kg)	5-Fluorourasiiliryhmä (150mg/kg)
Irinotekaaniryhmä (200mg/kg)	Irinotekaaniryhmä (100 mg/kg)
Oksaliplatiiniryhmä (15mg/kg)	Yhdistelmäryhmä (irinotekaani 100mg/kg ja 5-fluorourasiili 150mg/kg)

Eläimet lopetettiin nukutuksessa 72 tunnin päästä lääkeaineiden antamisesta ja kudokset jäädytettiin nestetyypeissä nopeasti. Tämän jälkeen niitä säilytettiin -80 °C:ssa. Eläinkokeet toteutettiin Etelä-Suomen aluehallintaviraston hankelupalautakunnan hyväksymänä (lupnumero ESAVI/114/0.4.10.07/2015).

## 7.2 Näytteiden käsittely

Näytteiden valmistus aloitettiin homogenisoinnilla, jossa proteiinit eroteltiin kudoksesta. Suolinäytteistä leikattiin noin 5 mm:n pituinen pala, joka laitettiin 1 ml:aan ELISA-puskuria (136 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 4.46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 % Tween, pH 7,4). Puskuriin oli liuotettu proteaasi-inhibiittoria (Pierce™ protease Inhibitor Mini Tablets, Thermo Scientific), joka suojeli näytteitä proteolyttiseltä hajoamiselta. Näytteet homogenisoitiin Precellys 24-laitteella (Bertin Technologies), ja ohjelmana käytettiin 5500 rpm, 20 sekuntia. Homogenisointi toistettiin jos näytteeseen jäi vielä kudospaloja.

Tämän jälkeen näytteet sonikotiin VC 505 -laitteella (Sonics) ja ohjelmana käytettiin 21 %, 10 sekuntia. Sonikoinnilla varmistettiin, että kaikki tiivisliitosproteiinit olivat irronneet

solujen välistä. Sonikoinnin jälkeen näytteitä sentrifugoitiin (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) 13 362 g 15 min. Supernatantti pakastettiin -80 °C:ssa seuraavaa vaihetta varten. Näytteitä pidettiin jäähauteessa koko käsittelyn ajan.

### 7.3 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Valmistetuista näytteistä analysoitiin proteiinipitoisuus, jotta proteiinimäärien erot saatiin tasattua Western blot -menetelmää varten. Kaikkiin geelin kaivoihin tuli pipetoida sama määrä proteiinia, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia keskenään. Proteiinimäärän selvittämiseksi käytettiin kaupallista kittiä (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific). Jokaista näytettä pipetoitiin 96-kuoppalevyille 25 µl ja sen päälle lisättiin 200 µl kitin sisältämää valmista reagenssia. Kuoppalevyä sekoitettiin sille tarkoitettussa ravistelijassa ja levyä inkuboitiin 30 min 37°C:ssa. Tämän jälkeen absorbanssit mitattiin Multiskan RC-spekrofotometrillä (Labsystems) 540 nm:n aallonpituudella. Jokaista näytettä oli kuoppalevyllä kolme rinnakkaista, ja niistä laskettiin keskiarvo. Kitissä olevasta standardiliuoksesta valmistettiin laimennussarja, jonka avulla piirrettiin standardisuora. Näytteiden proteiinipitoisuudet laskettiin standardisuoran yhtälön avulla.

Tämän jälkeen näytteet laimennettiin ELISA-puskurilla samaan proteiinipitoisuuteen. Pitoisuus määrytyi vähiten proteiinia sisältävän näytteen mukaan. Ensimmäisen tutkimuksen jejunumin proteiinimääräksi tuli 6,6 µg/µl. Toisen tutkimuksen jejunumin proteiinimääräksi saatiin 3,1 µg/µl ja colonin 3,3 µg/µl. Laemmlin näytepuskuriin lisättiin 5 % 2-merkaptoetanolia, jotta aminohappojen väliset rikkisillat saatiin hajotetuiksi. Kahteen sataan mikrolitraan näytettä pipetoitiin saman verran puskuria, ja sen jälkeen proteiineja denaturoitiin lämpöblokkissa 95 °C:ssa 5 min. Lopuksi näytteet pakastettiin pienissä erissä -80 °C:ssa. Näytteiden lopulliset proteiinipitoisuudet olivat 3,3 µg/µl, 1,55 µg/µl ja 1,65 µg/µl.

### 7.4 Western blot

Ryhmässä oli aiemmin käytetty Western blot -menetelmää kahdessa tutkimuksessa, joten näiden kokeiden tietoja ja ohjeita pystyttiin käyttämään hyväksi. Tutkimusryhmällä oli valmiina SDS-PAGE-laitteisto ja detektointilaitte (Odyssey CLx Imaging System, LICOR). Lisäksi blottauksessa oli mahdollista käyttää ECL TE77 semi-dry transfer unit -

laitetta (GE Healthcare Amersham) tai Trans-Blot Turbo -laitetta (Bio-Rad). Välineet ja aikaisemmat ohjeet muodostivat hyvän lähtökohdan määryyksille.

#### 7.4.1 SDS-PAGE

Riippuen tutkittavan proteiinin koosta, tutkimuksessa käytettiin itse valettuja 4-, 7,5- ja 10-prosenttisia polyakryyliamidigeelejä, jotka valmistettiin ajoa edeltävänä päivänä ja säilytettiin 4 °C:ssa ionivaihdetulla vedellä kostutetussa käsipaperissa. Lisäksi käytössä oli kaupallisen valmistajan 4-20- % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast (BioRad) -gradienttigeelejä. Ajoparametreina kokeiltiin kolmea eri yhdistelmää konsentroitigeelille ja erottelugeelille (taulukko 3).

Taulukko 3. Polyakryyliamidigeelien ja ajoparametrien kokeilut eri tiivisliitosproteiineille

	Polyakryyliamidigeelin pitoisuus	Ajoparametrit
Okludiini	10 %	150 V 10 min, 200 V 35 min
	4-20 %	
ZO-1	4 %	150 V 10 min, 200 V 35 min
	7,5 %	150V 10 min, 190V 35 min
	4-20 %	150V 10 min, 190V 45 min
Klaudiini-1	10 %	150 V 10 min, 200 V 35 min
	4-20 %	150V 10 min, 190 V 35 min
Klaudiini- 4	4-20 %	150 V 10min, 190 V 35 min

Merkkiaineina olivat käytössä BlueStep™ Protein MW Marker (Broad Range) ja Precision Plus Protein™ Dual Color standard (Bio-Rad). Elektroforeesilaitteistona käytettiin Power Pac Basic (BioRad) -laitetta ja ajopuskuri valmistettiin ohjeen mukaisesti (Tris 25 mM, Glysiini 190 mM ja SDS 0,1 %).

#### 7.4.2 Blottaus

Kun proteiinit oli eroteltu molekyylipainon mukaan SDS-PAGE:lla, geeleistä leikattiin pois konsentroitigeeli ja ”dye front” -rintama geelin alaosaan. Tämän jälkeen geelejä, kalvoa

ja suodatinpapereita inkuboitii blottauspuskurissa (25 mM Tris, 192 mM glysiini, 20 % metanoli) 15 min, jonka jälkeen ne pakattiin blottauslaitteeseen.

Tutkimuksessa käytettiin ECL TE77 semi-dry trasfer unit -laitetta (GE Healthcare Amersham). Blottausaika oli kaksi tuntia, ja sen jännite oli maksimissaan 30 V, 95 mA. Myös Trans-Blot Turbo -laitetta (Bio-Rad) kokeiltiin. Tämän laitteen ohjelma kesti seitsemän minuuttia ja ajossa käytettiin valmistajan suosittelemaa valmista kittiä (Midi Format, 0,2µm PVDF). ECL TE77 -laitteen kanssa käytettiin 0,45 µm:n nitroselluloosa kalvoa (Bio-Rad), joka oli ryhmän aikaisemmissa tutkimuksissa todettu toimivaksi.

### 7.4.3 Blokkkaus

Blottauksen jälkeen kalvot leikattiin merkkiaineen avulla niin, että tutkittavat proteiinit jäivät eri kalvoihin. Koska tutkittavat proteiinit olivat molekyylipainoiltaan hyvin erilaisia, yhdestä geelistä saatiin tutkituksi jopa neljä eri proteiinia. Leikkaamisen jälkeen kalvot asetettiin 50 millilitran falcon-putkiin, ja pestiin kolme kertaa TBS:llä (20 mM Tris, 137 mM NaCl). Blokkauksessa käytettiin valmista kaupallista puskuria (Odyssey blocking buffer, (TBS), LI-COR) ja se laimennettiin suhteessa 1:1 TBS-T:n (20 mM Tris, 137 mM NaCl ja 0,05 % Tween) kanssa. Kalvoja inkuboitii puskurissa kaksi tuntia huoneenlämmössä.

### 7.4.4 Vasta-aineet

Tutkimuksen aikana käytettiin useaa primaarivasta-ainetta ja jokaiselle tutkittavalle proteiinille määritettiin sopiva laimennos. Valmistaja on usein määritellyt sopivan alueen laimennoksille, ja sopivan pitoisuuden etsiminen aloitettiin kyseisistä arvoista. Blokkauksen jälkeen kalvot pestiin kerran TBS-T:llä. Laimennusliuos sisälsi blokkaukspuskuria (Odyssey Blocking Buffer) ja TBS-T:tä samassa suhteessa. Kalvoja inkuboitii tässä primaarivasta-aineliuoksessa yön yli +4 °C:ssa. Taulukossa 4 on ilmoitettu kaikki käytetyt vasta-aineet ja testatut laimennokset. Sekundaarivasta-aineiden laimennoksena käytettiin aina 1:20 000, johon päädyttiin ryhmän aikaisempien määrityksien perusteella.

Taulukko 4. Käytetyt vasta-aineet, niiden valmistajat sekä testatut laimennokset

Primaarivasta-aine	Tuotenumero	Laimennos	Valmistaja	Sekundaari vasta-aine
Occludin rabbit polyclonal IgG	40- 4700 Lot 981727A ja RI237069	1:100 1:125 1:250	Invitrogen	IRDye800CW goat anti-rabbit
Claudin- 1 (A-9) mouse monoclonal IgG	sc:166338	1:100 1:200 1:400 1:800	Santa Cruz Biotechnology	IRDye680LT goat anti-mouse
Claudin- 4 (A-12) mouse monoclonal IgG	sc-376643	1:150 1:250 1:550	Santa Cruz Biotechnology	IRDye680LT goat anti-mouse
JAM-A (J10.4) mouse monoclonal IgG	sc-53623	1:200	Santa Cruz Biotechnology	IRDye680LT goat anti-mouse
ZO-1 rabbit polyclonal IgG	40- 2200	1:250 1:500	Invitrogen	IRDye800CW goat anti-rabbit
ZO-1 rabbit polyclonal IgG	61-7300	2 µg/ml 2,5 µg/ml	Thermo Fisher Scientific	IRDye800CW goat anti-rabbit
β-actin mouse monoclonal IgG	3700S	1:3000	Cell Signaling Technology	IRDye680LT goat anti-mouse

Sekundaarivasta-aineen laimennuspuskuriksi valittiin TBS-T:n ja blokkauuspuskurin yhdistelmä. Ennen sekundaarivasta-aineen lisäämistä kalvot pestiin kerran TBS-T:llä. Sekundaarivasta-aineet olivat fluoresenssi leimattuja (LI-COR), joten kalvot suojattiin valolta foliolla käsittelyn ajan. Kalvoja inkuboitiin yhden tunnin ajan ja tämä vaihe suoritettiin huoneenlämmössä.

#### 7.4.5 Detektointi ja tilastollinen käsittely

Sekundaarikäsittelyn jälkeen kalvot pestiin ja kuvattiin vasta-aineiden kanssa yhteen so-  
pivalla Odyssey CLx Infrared Imaging System -laitteella (LI-COR). Tulosten käsittelyssä  
käytettiin Image studio -ohjelmaa (LI-COR), jolla mitattiin fluoresenssin intensiteetti näyt-  
teissä. Mitä suurempi intensiteetti oli, sitä enemmän kyseistä proteiinia oli näytteessä.  
Ohjelma vähensi saadusta tuloksesta automaattisesti taustafluoresenssin. Tämän jäl-  
keen saadut luvut jaettiin vielä latauskontrolli  $\beta$ -aktiinin intensiteeteillä, jotta lopullisia tu-  
loksia pystytään vertaamaan toisiinsa ja näin saamaan tietoa siitä, paljonko tutkittavaa  
proteiinia oli eri näytteissä.

Intensiteettitasoista piirrettiin kuvaajat GraphPad Prism 5 -ohjelmalla (GraphPad Soft-  
ware Incorporated, La Jolla, CA, Yhdysvallat). Tämän jälkeen tuloksista tehtiin yksisuun-  
tainen varianssianalyysi (ANOVA) sekä Tukeyn testi, joilla tarkasteltiin ryhmien välisiä  
tilastollisia eroja. Eroja pidettiin tilastollisesti merkitsevinä, kun P-arvo oli pienempi kuin  
0,05. Yksittäiset poikkeavat arvot (outlier) testattiin yleisesti käytössä olevalla Grubbin  
testillä.

#### 7.4.6 Proteiinien poistaminen kalvolta

Proteiinien tasojen tutkimiseen kului Western blot -menetelmällä noin kaksi päivää. Ku-  
vattuja kalvoja oli mahdollista käyttää kerran uudelleen. Tällöin kalvoilta poistettiin pri-  
maari- ja sekundaarivasta-aineet strippauspuskurin (25 mM glysiini, 1 % SDS, pH 2,0)  
avulla. Kalvoja inkuboitiin puskurissa kaksi kertaa 10 min, jonka jälkeen ne pestiin. Tä-  
män jälkeen Western blot suoritettiin uudelleen ohjeen mukaan blokkauvaiheesta al-  
kaen. Kalvoja oli tarpeen blokata kuitenkin vain 60 min, 120 min sijasta. Samoille kalvoille  
ei suositella useita proteiininpoistokäsittelyitä, koska puskurin saattaa irrottaa myös koh-  
deproteiinia.



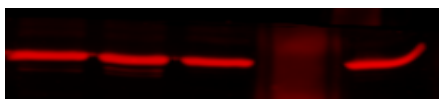
## 8 Tulokset

### 8.1 Menetelmän optimointi

Insinööriyön aikana optimointia suoritettiin SDS-PAGE:ssa ja blottauksessa. Myös spesifisen vasta-aineen ja sopivimman pitoisuuden löytämiseksi tarvittiin optimointia.

#### 8.1.1 SDS-PAGE

Sopivimmiksi ajoparametreiksi todettiin 150 V, 10 min konsentroitigeelille ja 190 V, 35 min erottelugeelille. Näillä arvoilla näytteet saatiin ajetuksi suorana viivana. Kahdensadan voltin jännitteellä alageelin reunimmaisat näytteet ajautuivat vinoon, ja niitä oli silloin vaikeampi tulkita (kuva 9).



Kuva 9. Latauskontrolli  $\beta$ -aktiini on ajautunut reunasta kaarelle parametreilla 150 V, 10 min konsentroitigeeli ja 200 V, 35 min erottelugeeli.

Okludiinin tasot pystyttiin havaitsemaan luotettavasti sekä kaupallisen valmistajan 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast gradienttigelillä, että 10-%:lla geelillä. Klaudiini-1:n, klaudiini-4:n ja JAM-A:n tasojen tutkimuksissa käytettiin kaupallista gradienttigeliiä. ZO-1:n tasoa ei saatu luotettavasti määritettyä.

Insinööriyön ensimmäisessä osassa proteiinia pipetoitiin kaivoihin 33  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Toisessa osassa oli mukana myös näytteitä tämän insinööriyön ulkopuolelta ja siksi kaivoja tarvittiin enemmän samalle geelille. Pienempiin kaivoihin mahtui vähemmän proteiinia, joten proteiinimäärä puolitettiin. Toisessa tutkimuksessa vastaavat luvut olivatkin ohutsuoli- ja paksusuolinäytteillä noin 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Molemmat käytössä olleet merkkiaineet toimivat hyvin ja niiden mukaan oli helppo leikata kalvot ennen blokkausta.

### 8.1.2 Blottaus

Blottaus onnistui hyvin ECL TE77 -laitteistolla, ja geeleihin jäi vain hyvin vähän proteiinia. Tähän vaiheeseen menevää aikaa yritettiin lyhentää kokeilemalla Trans-Blot Turbo -laitetta. Laitteen vaihto olisi lyhentänyt blottaukseen kuluvaan aikaan kahdesta tunnista seitsemään minuuttiin. Blottausta ei kuitenkaan saatu toimimaan uudella laitteella.

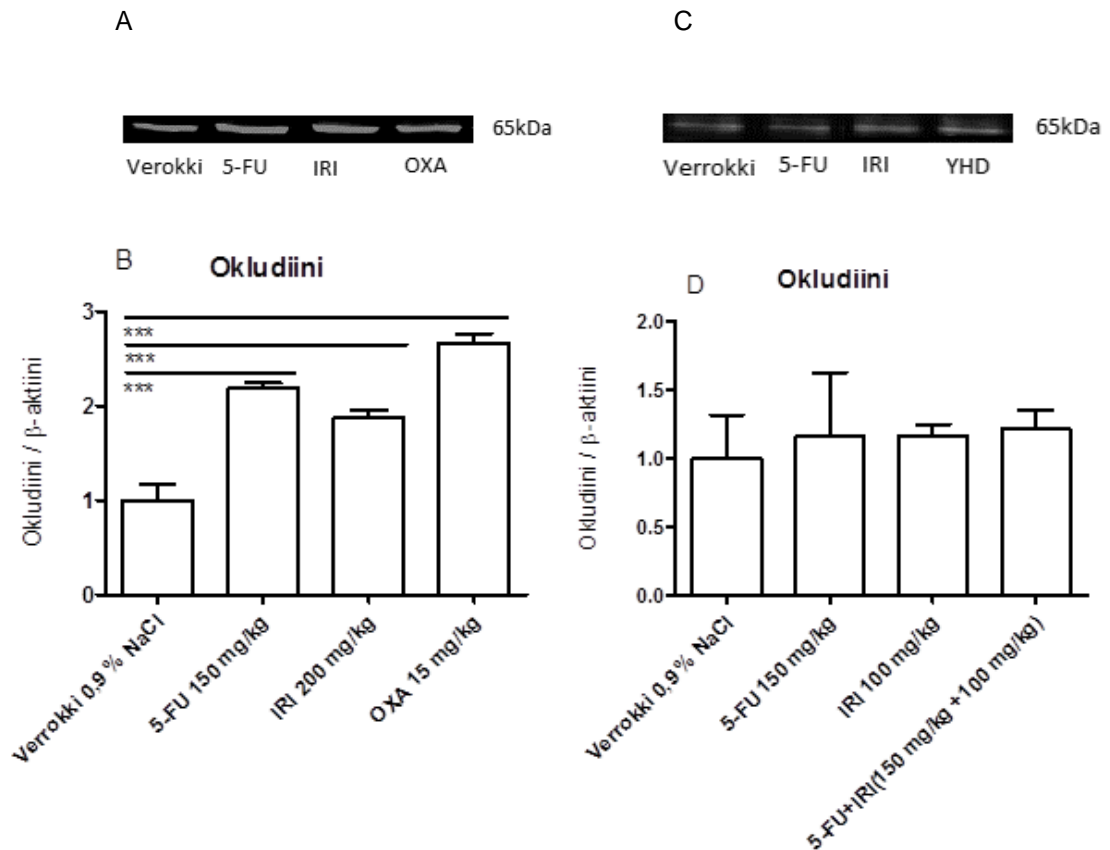
### 8.1.3 Vasta-aineet

Tutkimuksessa pyrittiin löytämään jokaiselle proteiinille spesifinen vasta-aine. Sitoutuminen oikeaan kohtaan on tärkeää, koska se mahdollistaa tarkat tulokset. Pitoisuus pyrittiin myös optimoimaan mahdollisimman laimeaksi, jotta hintavia vasta-aineita kuluisi mahdollisimman vähän. Vasta-aineiden laimennokset säästettiin, ja niitä voitiin käyttää uudestaan. Taulukossa 5 on esitetty optimoitujen primaarivasta-aineiden parhaiten toimiva pitoisuus. Inkuboinnin aika ja lämpötila pidettiin koko ajan samana, kuten myös sekundaarivasta-aineen laimennus.

Taulukko 5. Vasta-aineiden optimoidut laimennukset.

<b>Tutkittava proteiini</b>	<b>Pitoisuus</b>
Okludiini	1:125
Klaudiini- 1	1:100
Klaudiini- 4	1:150
JAM-A	1:200
$\beta$ -Aktiini	1:3000
ZO-1	-

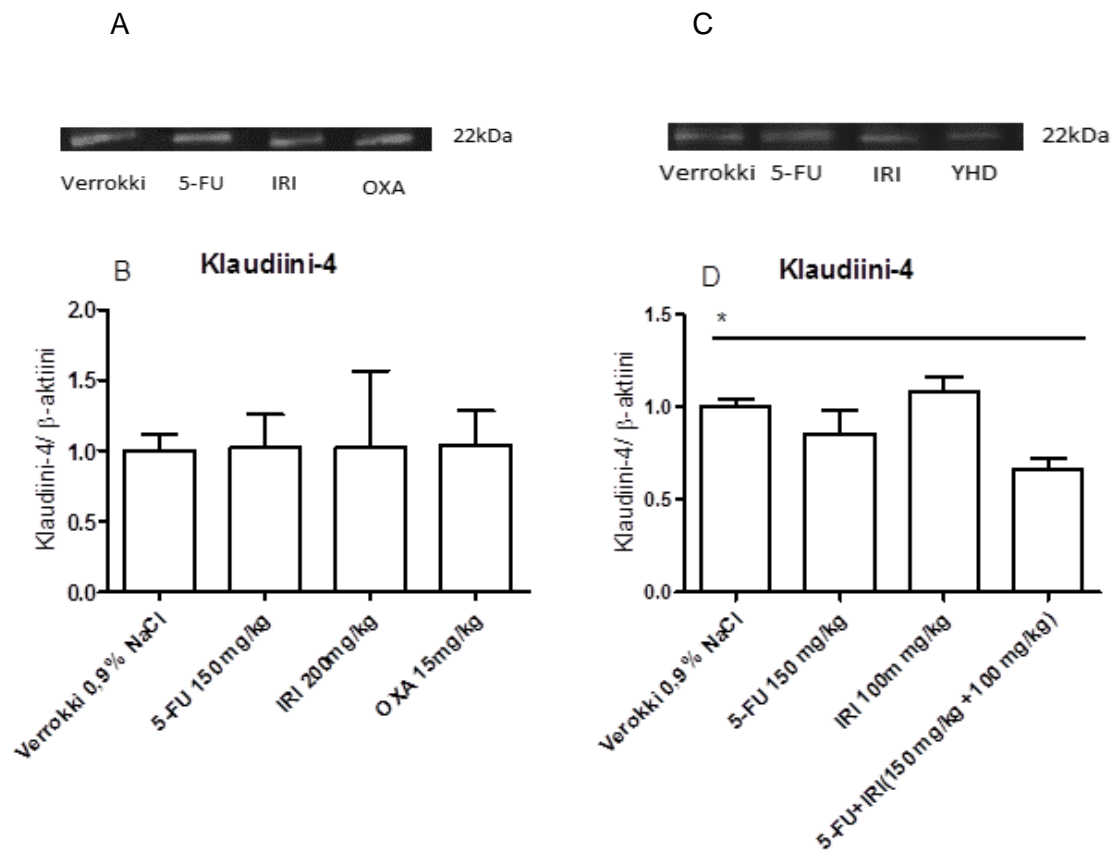
## 8.2 Ohutsuolinäytteiden proteiinitasot



Kuva 10. Okludiinin Western blot -kuvat ja intensiteettitasot ensimmäisen (A ja B) ja toisen tutkimuksen (C ja D) jejunum-näytteistä. Ensimmäisessä tutkimuksessa tilastollisia eroja havaittiin kaikkien solunsalpaajien saaneiden ryhmien ja verrokkien kesken (\*\* $P < 0,0001$ ),  $n=4$ /ryhmä. Toisessa tutkimuksessa tilastollisia eroja ei havaittu.

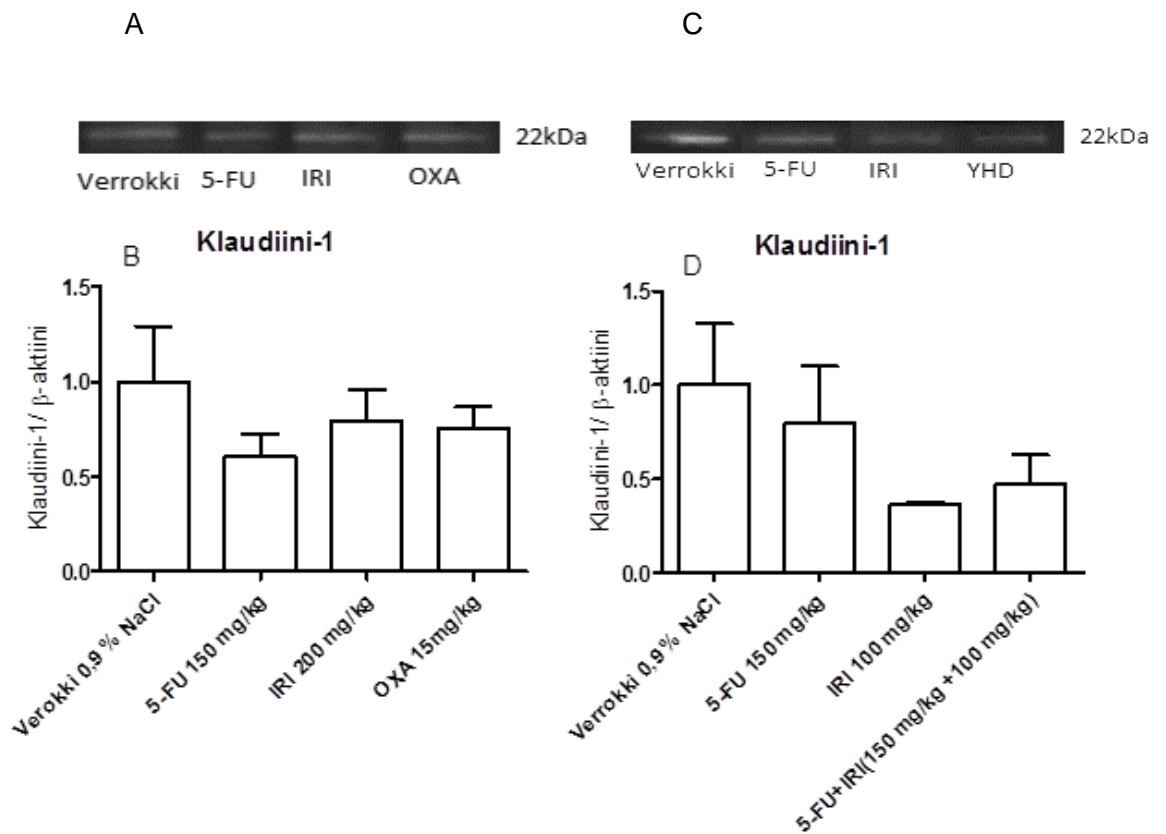
Ensimmäisessä tutkimuksessa okludiinin tasot nousivat kaikilla ryhmillä, jotka olivat saaneet sytostaatteja verrattuna verrokkiryhmään ( $P < 0,001$ ) (kuva 10A ja 10B). Erot olivat tilastollisesti merkitseviä ( $P < 0,0001$ ). Intensiteettitaso nousi 5-fluorourasiililla 118 %, irinotekaanilla 87 % ja oksaliplatiinilla 167 %.

Tutkimuksen toisessa osassa (kuva 10C ja 10D) havaittiin, että lääkeaineet nostivat tasoja vain hieman eikä tilastollisesti merkitseviä eroja havaittu ( $P < 0,05$ ). 5-fluorourasiili nosti okludiinin ilmentymistasoa 16 %, yhdistelmä 22 % ja irinotekaani 17 %.



Kuva 11. Klaudiini-4:n Western blot -kuva ja intensiteettitasot ensimmäisen (A ja B) ja toisen tutkimuksen (C ja D) jejunum-näytteistä. Ensimmäisessä tutkimuksessa tilastollisia eroja ei ollut lääkeaineiden välillä,  $n=4$ . Toisessa tutkimuksessa irinotekaanin ja 5-fluorourasiilin yhdistelmän sekä kontrollin välinen ero on tilastollisesti merkitsevä ( $P<0,05$ ).

Klaudiini-4:n tasot eivät muuttuneet tilastollisesti merkitsevästi sytostaatteja saaneilla rotililla verrattuna verrokkeihin (kuva 11A ja 11B). Tilastollinen ero syntyi 5-fluorourasiilin ja irinotekaanin yhdistelmän sekä verrokkiryhmän välille ( $P<0,05$ ) (kuva 11C ja 11D). 5-fluorourasiili laski ilmentymistasoa 15 % ja lääkeaineiden yhdistelmä 34 %. Irinotekaani nosti ilmentymistasoa 8 %.

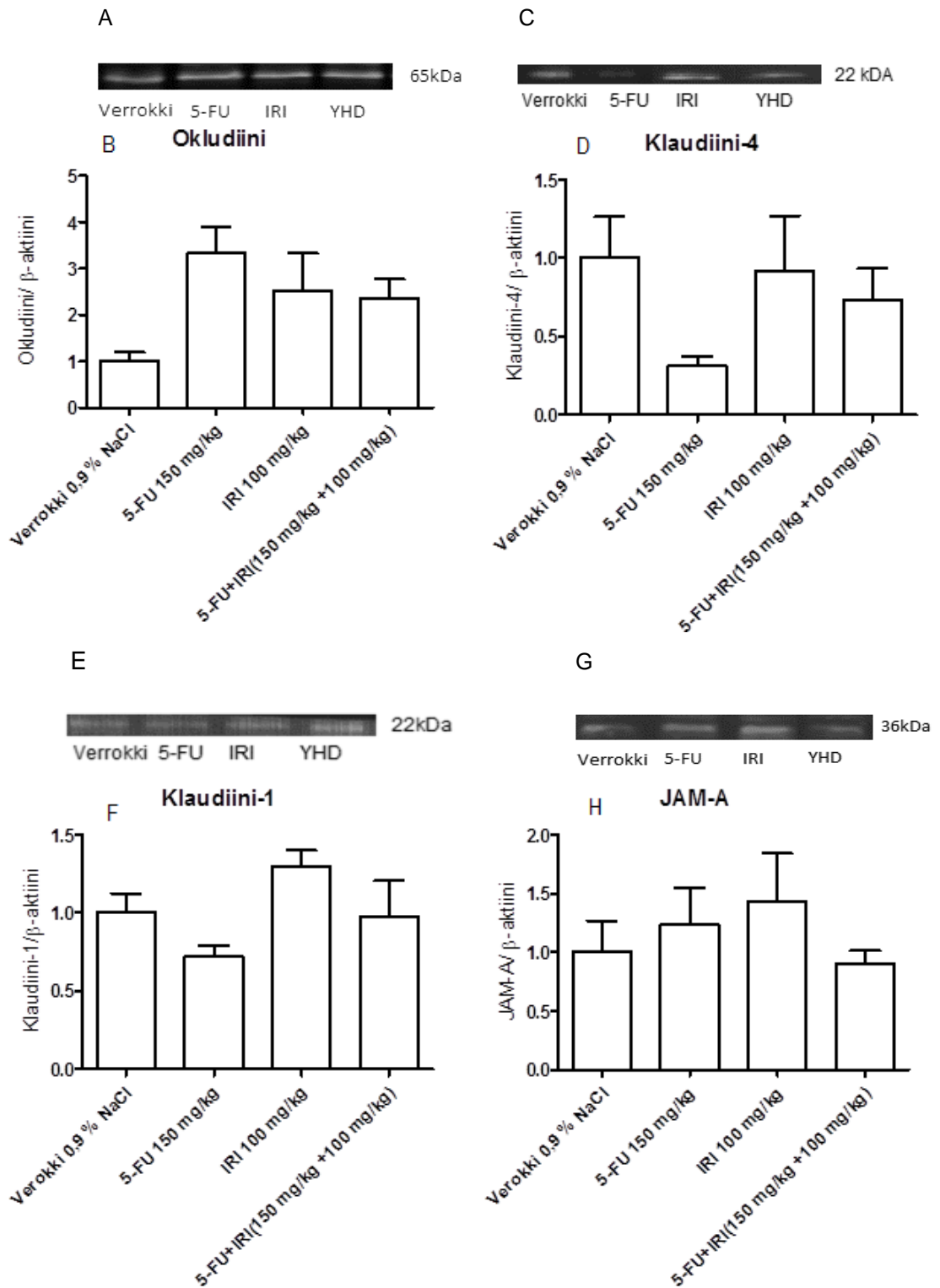


Kuva 12. Klaudiini-1:n intensiteettitasot ja Western blot -kuva ensimmäisen kokeen (A ja B) sekä toisen kokeen (C ja D) jejunum-näytteistä. Tilastollisia eroja ei havaittu, n=4/ryhmä.

Tilastollisia eroja ei syntynyt sytostaatteilla hoidettujen ja verrokkiryhmän välille, vaikka lääkeaineet pyrkivät laskemaan hieman klaudiini-1:n tasoja ( $P > 0.05$ ) (kuva 12A ja 12B). 5-fluorosiili laski klaudiini-1:n tasoa 43 %, irinotekaani 21 % ja oksaliplatiini 25 %.

Sytostaatteja saaneiden rottaryhmien ja verrokkiryhmän välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja myöskään toisen tutkimuksen näytteissä (kuva 12C ja 12D). 5-fluorourasiili laski tutkittavan proteiinin tasoa 21 %, yhdistelmä 53 % ja irinotekaani 64 %. Nähtävillä oli laskeva trendi erityisesti irinotekaaniin kohdalla, mutta ero ei kuitenkaan muodostunut tilastollisesti merkitseväksi.

## 8.3 Paksusuolinäytteiden proteiinitasot



Kuva 13. Proteiinien tasot ja Western blot-kuvaajat toisen tutkimuksen paksusuolesta otetuista näytteistä. Sytostaatit nostivat voimakkaasti okludiinin tasoja (A ja B), mutta tilastollisia eroja näytteiden välille ei syntynyt, n=4/ryhmä. Klaudiini-4:n (B ja C), Klaudiini-1:n (E ja F) ja JAM-A:n (G ja H) tasoissa ei myöskään havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja.

Sytostaatteja saaneiden rottien okludiinin tasot nousivat huomattavasti, mutta tilastollisia eroja ei syntynyt kuitenkaan syntynyt Tukeyn testillä ( $P > 0.05$ ) (kuva 13A ja 13B). 5-fluorourasiili nosti okludiinin ilmentymistasoa 233 %, yhdistelmä 137 % ja 153 %. Tuloksissa on kuitenkin selvästi havaittavissa nouseva trendi. T- testillä ja non-parametrisellä -testillä tilastollisia eroja ryhmien välille kuitenkin syntyi ( $P < 0.05$ ).

Klaudiini-4:n ja klaudiini-1:n tasot eivät muuttuneet tilastollisesti merkitsevästi ( $P > 0,05$ ) (13C, 13D, 13 E ja 13 F). Tilastollisia eroja ei havaittu myöskään JAMA:n (kuva 13 G ja H) näytteiden keskiarvojen välillä ( $P > 0,05$ ). 5-fluorourasiili nosti JAM-A:n ilmentymistasoa 24 % ja irinotekaani 43 %. Yhdistelmä taas laski tutkittavan proteiinin tasoa 10 %. JAM-A valittiin tutkimukseen ZO-1:n tilalle, koska sen tasoja ei onnistuttu määrittämään. JAM-A:n proteiinitasojen välillä ei kuitenkaan esiintynyt tilastollisia eroja, joten sen tason tutkimista ei jatkettu insinööriyön muissa osioissa.

## 9 Tulosten tarkastelu

### 9.1 Menetelmän optimointi

#### 9.1.1 SDS-PAGE

Okludiini näkyi hyvin itse valetulla 10-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä, joten myös klaudiini-1 ajettiin aluksi saman pitoisuuden geelillä. Tuloksissa havaittiin kuitenkin useita bändejä, ja syyksi epäiltiin aluksi epäspesifistä vasta-ainetta. Useat bändit voivat johtua tällöin klaudiini-perheen sisäisestä tai ulkopuolisesta ristireagoinnista. Syy voisi olla myös klaudiini-1:n fosforylaatio tai proteiiniin pilkkoutuminen näytteen valmistuksessa. Proteiinin pilkkoutuminen näkyy kuitenkin yleensä varsinaisen bändin alapuolella, joten sitä pidettiin epätodennäköisenä. Vaihtoehtona pidettiin blokkauspeptidin tilaamista, joka sitoutuu tarkasti vain haluttuun proteiiniin ja näin paljastaa epäspesifisen sitoutumisen.

Ennen blokkauspeptidin tilaamista päätettiin tutkimus kuitenkin vielä suorittaa samoilla parametreilla kaupallisella gradienttigeelillä. Tiheä geeli pakkasi pienikokoisen proteiinin tiiviiksi selkeäksi bändiksi, ja häntä poistui (kuva 14). Näin tulokset olivat selkeästi luettavissa. Myös klaudiini-4 ajettiin pienen kokonsa vuoksi gradienttigeelillä.



Kuva 14. Vasemmalla puolella klaudiini-1 ajettuna 10- %:lla geelillä ja oikealla puolella gradienttigelillä.

ZO-1:n tasoa ei saatu luotettavasti määritettyä, luultavasti epäspesifisen vasta-aineen takia. ZO-1:lle ajoparametreiksi kokeiltiin myös pidempiä aikoja, jotta iso proteiini olisi varmasti siirtynyt kaivosta geelille. Kyseinen proteiini myös ajettiin monella eri vahvuisella polyakryliamidigelillä, mutta optimoinnilla ei ollut vaikutusta tuloksiin.

### 9.1.2 Blottaus

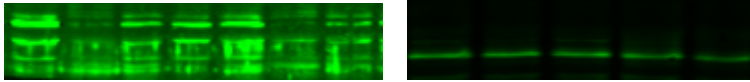
Blottaus suoritettiin ECL TE77 -laitteistolla. Tähän vaiheeseen menevää aikaa yritettiin lyhentää kokeilemalla nopeampaa Trans-Blot Turbo -laitetta. Proteiinit eivät kuitenkaan siirtyneet onnistuneesti geelistä kalvoon Trans-Blot Turbo -laitteella, mikä johtui luultavasti käytetystä kitistä.

### 9.1.3 Vasta-aineet

Polyklonaalisten vasta-aineiden erien välillä saattaa esiintyä suuriakin eroja, ja se huomattiin okludiinin tasoa tutkittaessa. Okludiinin ensimmäisille näytteille käytettiin Invitrogenin polyklonaalista vasta-ainetta, ja se toimi erittäin hyvin. Vasta-ainetta tilattiin lisää toisten näytteiden Western blot -ajoja varten. Koejärjestely toistettiin samanlaisena toisille näytteille, mutta yllättäen tulokseksi saatiin useita epätasaisia ja sumeita bandeja. Aluksi syyksi epäiltiin proteiinin pilkkoutumista näytteiden tekemisen aikana, koska vasta-aine oli aiemmin toiminut erinomaisesti.

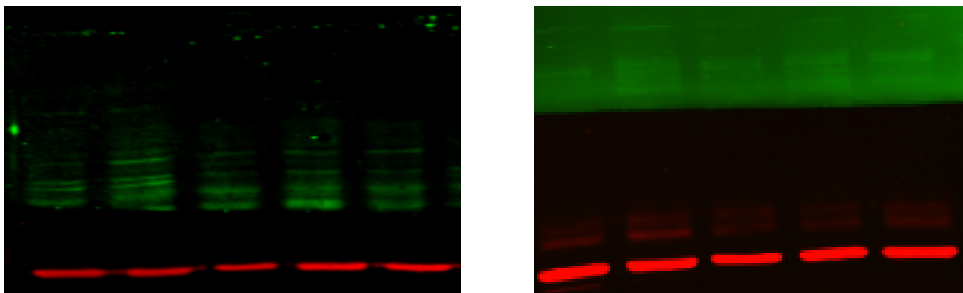
Asia selvitettiin ajamalla ensimmäiset näytteet uuden erän vasta-aineella. Tulokset olivat myös nyt epätarkkoja ja vaikeaselkoisia, joten vika oli luultavasti vasta-aineen epäspesifisyydessä. Tästä haluttiin kuitenkin vielä varmistua, joten toiset näytteet ajettiin ensimmäisen erän vanhalla vasta-aineella. Nyt tulokset olivat taas siistit ja tarkat. Kuva 15 havainnollistaa erien välisen spesifisyyden eron.





Kuva 15. Toisen osan näytteiden Western blot -kuvaajat. Vasemmalla okludiinin uuden erän vasta-aine, jonka tulokset ovat epäspesifisiä. Oikealla vanhan erän vasta-aineella saadut siistit ja tarkat tulokset.

ZO-1:lle ei löydetty toimivaa vasta-ainetta. Tutkimuksessa kokeiltiin kahta eri vasta-ainetta, joista ensimmäinen oli rabbit polyclonal IgG (Invitrogen). Tämä vasta-aine sitoutui epäspesifisesti. Sen tulokset ovat alla olevassa kuvassa 16 vasemmalla. Myös rabbit polyclonal IgG (Thermo Fisher Scientific) osoittautui epätarkaksi. Tämän vasta-aineen tulokset näkyvät kuvassa 16 oikealla puolella. Molempien vasta-aineiden pitoisuuksia optimoitiin, mutta sillä ei ollut vaikutusta tulokseen. Bandeja muodostui silti useita ja odottamattomiin kohtiin. ZO-1 voi olla myös proteolyttisesti pilkkoutunut näytteiden valmistuksen aikana. ZO-1:n näytteet homogenisoitiin kolmessa erässä. Pilkkoutumisen olisi pitänyt tapahtua jokaisen erän kohdalla ja siksi se on epätodennäköistä.



Kuva 16. ZO-1:n kokeillut vasta-aineet. Vasemmalla rabbit polyclonal IgG (Invitrogen) ensimmäisen tutkimuksen ohutsuolinäytteistä ja oikealla rabbit polyclonal IgG (Thermo Fisher Scientific) toisen tutkimuksen ohutsuolinäytteistä otetuista näytteistä. Kuvissa on myös tuloksien vastaavat  $\beta$ -aktiinit, jotka vahvistavat ajon onnistumisen.

## 9.2 Ohutsuolinäytteiden proteiinitasot

### Okludiini

Okludiinin tulokset ovat sopusoinnussa ryhmän aikaisempia tutkimustuloksien kanssa. Histologisessa näytteiden analyysissä käytettiin nelinumeroista asteikkoa suolen vaurioiden ilmoittamisessa: minimalinen (1), vähäinen (2), kohtalainen (3) ja huomattava (4).

Analyysissä todettiin, että eniten vaurioita ohutsuoleen aiheutti oksaliplatiini. Sen akuuttien vaurioiden tuloslukema oli  $(3,7 \pm 0,5)$  ja ero muiden sytostaattien vastaaviin lukuihin oli tilastollisesti merkitsevä ( $P < 0.001$ ). Seuraavaksi eniten vaurioita aiheutti 5-fluorourasiili ( $2,6 \pm 1,0$ ) ja vähiten näistä kolmesta irinotekaani ( $2,0 \pm 0,2$ ). 5-fluorourasiilin ero irinotekaaniin aiheuttamiin vaurioihin oli tilastollisesti merkitsevä ( $P < 0,05$ ). (Forsgård 2016).

Solunsalpaajahoidon aiheuttaman limakalvovaurion tiivisliitosproteiinien tutkimuksessa tulee kiinnittää huomiota aikajanan määrittämiseen lääkeaineiden antamisen jälkeen. Nakao on aikaisemmin tutkinut irinotekaaniin vaikusta okludiinin tasoon. Hänen tutkimuksensa annos ja rottien lopetusaika eroavat tämän tutkimuksen vastaavista arvoista. Nakaon tutkimuksessa irinotekaaniin annos rotilla oli 250mg/kg, kun Forsgårdin vastaava luku oli 200mg/kg. Nakaon rotat lopetettiin 43 tuntia annoksen saamisen jälkeen, kun taas tässä tutkimuksessa vastaava aika oli 72 tuntia. Nakaon tutkimuksessa okludiinin taso oli merkitsevästi pienempi kontrolliin verrattuna ( $P < 0.05$ ). (Wardill & Bowen 2013.) Okludiinin tason kasvu solussa aiheuttaa tiivisliitosproteiinien määrän kasvua (Cummins 2011: 5). Tämä herättää kysymyksen, voiko tässä tutkimuksessa havaittu tason nousu sen laskun jälkeen olla solun korjausreaktio.

Myös tutkimuksen toisen osan tulokset ovat samansuuntaisia histologisen analyysin kanssa. Histologisessa analyysissä todettiin, että kyseiset lääkeaineet aiheuttivat tässä tutkimuksessa vähemmän vaurioita ohutsuolessa kuin ensimmäisessä. Muutokset toisessa tutkimuksessa olivat vähäisiä, kun taas ensimmäisessä tutkimuksessa ne olivat suurimmalta osalta kohtalaisia. Tämä selittää pienemmät muutokset okludiinin tasossa ensimmäiseen osan näytteisiin verrattuna. Lisäksi irinotekaaniin annos oli tässä tutkimuksessa puolet pienempi kuin ensimmäisessä tutkimuksessa.

#### Klaudiini-4

Ensimmäisen ja toisen kokeen tulokset ovat sopusoinnussa keskenään. Lääkeaineet yksinään eivät aiheuttaneet tilastollisesti merkitseviä muutoksia klaudiini-4:n tasoihin verrokkiryhmään nähden. Yhdistelmänä lääkeaineet taas aiheuttavat tilastollisesti merkitsevän muutoksen kyseisen proteiinin tasossa.

Myös histologisen analyysin tulokset ovat samansuuntaiset tulosten kanssa. Analyysissa todettiin, että rottien paino laski merkitsevästi enemmän yhdistelmäryhmässä kuin pelkästään irinotekaanilla tai 5-fluorosiililla hoidettuna. Analyysissa ei kuitenkaan havaittu eroja yhdistelmän ja yksittäisten lääkeaineiden aiheuttamien muutosten välillä.

#### Klaudiini-1

Klaudiini-1:n tasoissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä muutoksia. Nakao on aikaisemmin tutkinut irinotekaanin vaikutusta klaudiini-1:n tasoon. Hänen tutkimuksessaan kyseisestä lääkeainetta saaneiden rottien proteiinitaso erosi tilastollisesti verokkiyhmästä ( $P < 0.05$ ). Nakaon tutkimuksessa irinotekaanin annos oli 50mg/kg suurempi kuin Forsgårdin tutkimuksessa, ja rotat myös lopetettiin 29 tuntia myöhemmin. Nämä seikat saattavat osittain selittää sitä, miksi tässä tutkimuksessa tilastollista eroa ei muodostunut, vaikka proteiinitaso pyrkikin laskemaan.

#### 9.3 Paksusuolinäytteiden proteiinitasot

Paksusuolen okludiinin tasossa ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa, vaikka tuloksissa oli näkyvissä nouseva trendi. Tuloksissa oli kontrolliryhmässä yksi poikkeava arvo (outlier), joka testattiin Grubbin testillä. Tämä arvo saattoi osaltaan myös vaikuttaa siihen, miksi tilastollisia eroja ei syntynyt. Jokaisessa Western blot -tutkimuksessa oli näytteitä kahdella geelillä, jotka käsiteltiin samaan aikaan. Myös SDS-PAGE:n jälkeen koejärjestely suoritettiin yhdenmukaisesti molemmille kalvoille. Tästä huolimatta tuloksissa oli havaittavissa intensiteettieroja kalvojen välillä, mikä nosti hajontaa. Näin ollen erot vaikuttivat suoraan myös tilastolliseen merkitsevyyteen. T- testillä ja non-parametrisellä testillä tilastollisia eroja ryhmien välille kuitenkin syntyi ( $P < 0.05$ ).

Klaudiini-4:n tasoissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa, vaikka 5-fluorourasiili laski kyseisen proteiinin tasoa huomattavasti. Intensiteettien arvoissa oli hajontaa samaan aikaan ajettujen eri geelien välillä myös klaudiini-4:n tuloksissa ja se saattoi vaikuttaa siihen, miksi tilastollisesti merkitseviä eroja ei syntynyt.

Myöskään klaudiini-1:n tasoissa ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja. Paksusuolesta otettujen näytteiden tasoja ei testattu tutkimuksen ensimmäisessä osassa, joten

näytteillä ei ole samanlaista vertailukohtaa kuin ohutsuolen näytteillä. Klaudiini-1:n tasoissa ei ole kuitenkaan esiintynyt tilastollisesti merkitseviä eroja tämän insinööriyön aikaisemmissa osissa eikä paksusuolen näytteet tee tässä poikkeusta.

## 10 Yhteenveto

Insinööriyön tavoitteena oli selvittää, miten syövän hoidossa yleisesti käytössä olevat solunsalpaajat oksaliplatiini, 5-fluorourasiili ja irinotekaani sekä kahden viimeksi mainitun yhdistelmä vaikuttavat suolen epiteelin tiivisliitosproteiineihin. Tavoitteena oli myös optimoida Western blot –menetelmä kyseisille proteiineille. Menetelmää käytettiin proteiinitasojen määrittämiseen. Vertailemalla sytostaatteja saaneen ryhmään proteiinitasoja verrokkiryhmän tasoihin pystyttäisiin saamaan lisää tietoa kyseisten lääkeaineiden vaikutuksista tiivisliitosproteiineihin ja niiden yhteydestä suolen limakalvovaurioon.

Western blot -menetelmä optimoitiin ja sillä mitattiin onnistuneesti okludiinin, klaudiini-1:n, klaudiini-4:n ja JAM-A:n proteiinitasot. ZO-1:n tasoja ei saatu luotettavasti selvityksi. Syynä oli luultavasti epäspesifinen vasta-aine. Useat bandit tuloksissa saattoivat olla myös näytteiden tekemisen aikana syntynyttä proteolyyttistä pilkkoutumista. Aikaisemmissa tutkimuksissa on selvitetty sytostaattien irinotekaanin ja metotreksaatin vaikutuksia ZO-1:n tasoon (Wardill & Bowen 2013). Kyseisissä kokeissa ei kuitenkaan ilmennyt muutoksia proteiinin ilmentymisessä. ZO-1:n taso olisi kuitenkin ollut kiinnostavaa selvittää insinööriyössä, koska proteiini tärkeä osa tiivisliitoskompleksia ja sen puuttuminen lisää läpäisevyyttä (Liu ym. 2012). On myös mahdollista, että sen taso oli niin pieni, ettei sitä pystytty tällä menetelmällä havaitsemaan.

Muutoksia solunsalpaajat aiheuttivat okludiinin tasoihin, joissa esiintyi tilastollisia eroja ja nousevaa trendiä. Tutkimuksen ensimmäisessä osassa kaikki sytostaatit nostivat okludiinin tasoja merkitsevästi ( $P < 0,0001$ ). Tulos myötäili histologisen analyysin tuloksia ja oli linjassa myös sytostaattien aiheuttamien akuuttien vaurioiden kanssa. Histologisessa analyysissä havaittiin, että ohutsuoleen syntyi ensimmäisessä tutkimuksessa tilastollisesti enemmän vaurioita kuin toisessa tutkimuksessa. Tämä saattoi olla syynä siihen, ettei tilastollisia eroja havaittu insinööriyön toisen osan ohutsuolinäytteistä. Solunsalpaajat nostivat paksusuolen tiivisliitosproteiinien tasoja voimakkaasti. 5-fluorourasiili nosti okludiinin tason yli kolminkertaiseksi verrokkiryhmään nähden. Kuitenkaan Tukeyn

testillä tilastollisesti merkitseviä eroja ei ollut. T-testillä ja non-parametrisellä testillä tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä havaittiin ( $P < 0.05$ ).

Klaudiini-1:n tasoissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä muutoksia. Klaudiini-4:n taso pysyi tutkimuksen ensimmäisessä osassa hyvin samanlaisena solunsalpaajien antamisen jälkeen. Myöskään toisen osan ohutsuolinäytteissä ei havaittu tasojen muutoksia yksittäisten sytostaattien kohdalla. Yhdistelmä kuitenkin laski tilastollisesti merkitsevästi klaudiini-4:n tasoa ( $P < 0,05$ ). Tulos oli sopusoinnussa ryhmän aikaisemman tutkimuksen kanssa, jossa havaittiin, että rottien painot olivat laskeneet enemmän 5-fluorourasiilin ja irinotekaanin yhdistelmällä kuin yksittäisillä sytostaateilla. Toisen tutkimuksen paksusuolesta otetuissa näytteissä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja klaudiinien tasoissa. Myöskään JAM-A:n tasoissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä muutoksia.

Western blot on semikvantitatiivinen tutkimusmenetelmä eli sen tulokset ovat suuntaa antavia. Tutkimuksen luotettavuutta voisi kasvattaa käyttämällä muita menetelmiä esimerkiksi immuofluoresenssia Western blot -menetelmän rinnalla. Myös näytemäärän kasvattaminen voi tuoda lisää varmuutta tuloksiin. Tutkimuksessa näytteiden väliset hajonnat olivat pieniä tai kohtuullisia, mikä lisäsi insinööriyössä saavutettujen tulosten luotettavuutta. Hajontaa esiintyi kuitenkin samaan aikaan ajettujen geelien välillä, vaikka menetelmä suoritettiin täysin samanlaisena molemmille geeleille. Näytteiden erot olivat usein hyvin pienet molempien kalvojen sisällä, mutta suuret verrattuna toisiinsa. Tämä saattoi vaikuttaa siihen, että tilastollisia eroja ei muodostunut, vaikka proteiinitason muutos olikin prosentuaalisesti suurta.

Tälle insinööriyölle määritetyt tavoitteet saavutettiin. Western blot -menetelmä saatiin optimoiduksi ja intensiteettitasot pystyttiin selvittämään. Johtopäätöksenä voidaan todeta, että okludiini ja klaudiini-4 ovat yhteydessä suolen limakalvovaurioon. Seuraavassa tutkimuksessa olisi tarpeen selvittää ajan vaikutusta okludiinin tason muutoksiin sytostaattien antamisen jälkeen. Tutkimuksia tulisi jatkaa myös suuremmalla aineistolla.

Haluaisin kiittää insinööriyöni ohjaajia FT Richard Forsgårdia, FT Aino Siltaria, professori Riitta Korpelaa sekä emeritusprofessori Heikki Vapaataloa korvaamattomasta tuesta ja ohjauksesta. Finska läkaresällskapet sekä Einar och Karin stroems stiftelse olivat mahdollistamassa insinööriyöni toteuttamista ja siitä heille lämpimät kiitokset. Kiitokset myös laboratoriomestareille Lahja Eurajoelle ja Nada Bechara-Hirvoselle opastuksesta

ja neuvoista. Lisäksi haluaisin kiittää Metropolian opintolinjani tutkintovastaavaa Carola Forteliusta insinöörityöni ohjaamisesta ja arvokkaista kommentteista.

**Lähteet:**

Alcindor, T. & Beauger, N. 2011. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*. Vol. 18(1), s. 18–25.

Aono, S. & Hiray, Y. 2008. Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Experimental Cell Research*. Vol. 314(18), s. 3326–3339.

Balbi, V. & Ciarletta, P. 2013. Morpho-elasticity of intestinal villi. *Journal of the Royal Society Interface*. Vol. 10(82), s. 1–12.

Cancer Fact Sheets. Verkkodokumentti. World Health Organization. <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Luettu 23.11.2017.

Cummins, P. 2011. Occludin: One Protein, many Forms. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology. Vol. 32(2), s. 242–250.

Dospipova, D., Smerkova, K., Ryvolova, M., Hynek, D., Adam, V., Kopel, P., Stiborova, M., Eckschlager, T., Hubalek, J. & Kizek, R. 2012. Catalytic Electrochemical Analysis of Platinum in Pt-DNA Adducts. *International Journal of Electrochemical Science*. Vol. 7, s. 3072–3088.

Elonen, E. & Bono, P. 2013. Solunsalpaajahoito ja muut syöpälääkkeet. Teoksessa Jönensuu, H., Roberts, P., Kellokumpu-Lehtinen, P-L., Jyrkkiö, S., Kouri, M ja Teppo, L. (toim.). *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Elonen, E., Huupponen, R., Johansson, R. ja Pyrhönen, S. 2011. *Syöpätaudit*. Teoksessa Neuvonen, P., Himberg, J., Huupponen, R., Kivistö, K. ja Ylitalo, P. (toim.). *Kliininen farmakologia ja lääkehoito*. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

Elonen, E. 2013. *Kasvainten lääkehoito*. Teoksessa Koulu, M. ja Mervaala, E. (toim.). *Farmakologia ja toksikologia*. Kuopio: Medicina.

Faoro, V., Stanta, G. & Becker, K.-F. 2011. *Western Blotting*. Teoksessa Stanta, G. (toim.). *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Berlin: Springer.

Forsgård, R., Korpela, R., Holma, R., Linden, J., Frias, R., Spillmann, T. and Österlund, P. Intestinal permeability to iohexol as an *in vivo* marker of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity in Sprague–Dawley rats. 2016. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Vol. 78(4), s. 863-784.

Fromm, M & Schulzke, J. 2009. *Molecular Structure and Function of the Tight Junction: From Basic Mechanisms to Clinical Manifestations*. Boston, Massachusetts: Plackwell Publishing.

Furuse, M. 2010. *Introduction to Claudins, Tight junctions and the paracellular barrier*. Teoksessa Yu, A. *Claudins*. San Diego: Elsevier Inc.

A Guide to successful Western blotting. Verkkodokumentti. Cell Signaling Technology. <<https://media.cellsignal.com/www/pdfs/resources/white-papers/guide-to-successful-wb.pdf>>. Luettu 3.10.2017.

Günzel, D., & Yu, A. S. L. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews*. Vol. 93(2), s. 525–569.

Heino, J. & Vuento, M. 2004. *Solubiologia*. Helsinki: WSOY.

Isola, J. & Kallioniemi, A. 2013. *Syövän synty, kasvu ja leviäminen*. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P., Kellokumpu-Lehtinen, P-L., Jyrkkiö, S., Kouri, M ja Teppo, L. (toim.). *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Joensuu, H. 2015. *Syövän hoidon voittokulku jatkuu*. *Duodecim*. Vol. 131, s. 2163–2170.

Kacprzak, K. 2013. *Chemistry and Biology of Camptothecin and its Derivatives*. Teoksessa Merillon, J. & Ramawat, K. (toim.). *Natural Products Phytochemistry, Potany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. New York: Springer.

King, D. 1998. *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*. London: Taylor & Francis Ltd.



Lin, Y. & Stanton, L. 2014. Clinical Trials Using LV-P140K-MGMT for Gliomas. Teoksessa Lattime, E. & Gerson, S. (toim.). Gene Therapy of Cancer. San Diego: Elsevier Inc.

Liu, W-Y., Wang, Z-B., Zhang, L-C., Wei, X. & Li, L. 2012. Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator Substances. CNS Neuroscience & Therapeutics. Vol. 18(8), s. 609–615.

Longley, D., Harkin, P. & Johnston, P. 2003. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer. Vol. 3(5), s. 330–338.

Lopez, M. 2010. Mucosal Immunity. Teoksessa McQueen, C. (toim.). Comprehensive Toxicology. Kidlington: Elsevier Ltd.

Lääkeaine: Oksaliplatiini. 2017. Verkkodokumentti. Suolistosyöpä.fi. <<https://suolistosyopa.fi/suolistosyovan-hoito/solunsalpaajahoito/laakeaine-oksaliplatiini/>>. Luettu 21.12.2017

McSherry, E., Owens, M. & Hopkins, A. 2013. The Molecular Aspects of Tight Junctions. Teoksessa Martin, A. & Jiang, G. (toim.). Tight Junctions in Cancer Metastasis. New York: Springer.

Najafov, A. & Hoxhaj, G. 2017. Western Blotting Guru. London: Elsevier Inc.

Neunlist, M., L. Van Landeghem, M. M. Mahé, P. Derkinderen, S. B. des Varannes, and M. Rolli-Derkinderen. 2013. The digestive neuronal-gliial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease.

Protein Transfer Technical Handbook. Verkkodokumentti. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/protein-transfer-technical-handbook.pdf>>. Luettu 17.10.2017.

Rose, M., Farrell, M. & Schmitz, J. 2002. Thymidylate synthase: a critical target for cancer chemotherapy. Clinical Colorectal Cancer. Vol. 1(4), s. 220–229.

Schmitt, M. 2014. JAM-A; Junctional Adhesion Molecule-A or Janus Acting Mediator in Atherosclerosis. Väitöskirja. RWTH Aachen University.

Seppä, K. 2017. Syövät vuonna 2030. Verkkodokumentti. Syöpäjärjestöt. <<https://www.syopajarjestot.fi/julkaisut/raportit/syopa-suomessa-2016/syovat-vuonna-2030/>>. Luettu 23.11.2017.

Suzuki, T. 2012. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cellular and Molecular Life Sciences. Vol. 70(4), s. 631–659.

Tsukita, H. 2003. NatBox1. Verkkodokumentti. <<http://www3.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~htsukita/new-pub/NatBox1.html>>. Luettu 1.12.2017.

Ulrich, C., Robien, K. & McLeod, H. 2014. Cancer pharmacogenetics: Polymorphisms, pathways and beyond. Nature Reviews Cancer. Vol. 3(12), s. 912–920.

Valeriote, F. & Santelli, G. 1984. 5-Fluorouracil (FUra). Pharmacology & Therapeutics. Vol. 24, s. 107–132.

Ward, P. & Linden, R. 2013. Physiology at a Glance. Oxford: John Wiley & Sons Ltd.

Wardill, H. & Bowen, J. 2013. Chemotherapy-induced mucosal barrier dysfunction: an updated review on the role of intestinal tight junctions. Current Opinion in Supportive and Palliative Care. Vol. 7(2), s. 155–161.

## Western blot –ohje

### Geelien valmistus

Akryyliamidikonsentraatio	5 %	7,50 %	10 %	12 %	15 %
MW range (kDa)	57- 212	36- 94	20- 80	12- 60	10- 43

### Alageelit (2 kpl):

Reagenssit	7,5 %	10 %	12 %
Tislattua vettä	8,25 ml	9,5 ml	8,3 ml
Akryyliamidi/Bis (30 % stock)	3,375 ml	6 ml	7,2 ml
3 M Tris-HCl pH 8,8	1,688 ml	2,25 ml	2,25 ml
10 % (w/v) SDS	180 µl	180 µl	180 µl
10 % (w/v) ammonium persulfate	90 µl	90 µl	90 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl

Tee vetokaapissa, nitrilihanskat.

### Ylägeeli (2 kpl, 4 ml):

Reagenssit	3,75 %
Tislattua vettä	2,95 ml
Akryyliamidi/Bis (30 % stock)	500 µl
1 M Tris-HCl pH 6,8	500 µl
10 % (w/v) SDS	40 µl
10 % (w/v) ammonium persulfate	24 µl
TEMED	3 µl

Tee vetokaapissa.

Pipetoi seokset vetokaapissa (APS, TEMED, akryyliamidi). Pipetoi APS ja TEMED viimeisenä, sillä ne alkavat jähmettyä heti.

Merkitse lasiin alageelin yläraja, joka on noin senttimetrin päässä lasin yläreunasta. Valmista ja pipetoi ensin alageeli. Pipetoi vettä geelin päälle, jotta geelin pinta ei kuivu jähmettymisen aikana. Anna jähmettyä noin tunti. Kaada ja ime paperilla vesi pois geelin päältä. Pipetoi ylägeeli piripintaan. Tämän jälkeen aseta kampa paikoilleen. Anna jähmettyä ainakin puoli tuntia. Kääri geelit milli-q-veteen kostutettuun käsipaperiin ja laita pussissa jääkaappiin. Geelit voi siis tehdä ajoa edeltävänä päivänä.

### **SDS-PAGE**

1. Sulata näytteet jäällä
2. Kokoa ajolaite ja kaada kylmää 1x ajopuskuria ajolaitteen kammioon tasaisesti. Poista näytekampa geelin lasien välistä varovasti

Huolehdi, että ajolanka on kokonaan nesteeseen peitossa ja että geelien välillä oleva kammiot on täynnä ajopuskuria. Voit myös kaataa ajopuskuria koko laitteen sisälle.

3. Pipetoi näytteet (15- 40 µl) ja molekyylimarkkeri (5-7 µl) suunnitelman mukaisesti kammioihin. Pipetoi rauhassa ja vältä ilmakuplia.
4. Varmista, että ajolaitteen kytkennät ovat oikein.
5. Aja 150 V noin 10 min.
6. Kun näytteet ovat saavuttaneet alageelin rajan, nosta jännite 190 V:n ja aja noin 35 min.
7. Keskeytä ajo, kun näytteiden etulinja on 2 mm geelin alareunan yläpuolella. Jatka heti blottaukseen, sillä proteiinit ovat herkkiä liikkumaan geeliltä pois.

### **Blottaus perinteisesti**

- 1 Poista geeli varovasti levyjen välistä. Merkitse geelit leikkaamalla pieni pala pois (geeli 1 → 1 kulma, geeli 2 → kaksi kulmaa jne.)

- 2 Siirrä geelit varovasti astiaan, jossa on kylmää blottaus-puskuria (n. 15 ml). Anna geelien tasoittua n. 15 minuuttia.
- 3 Pakkaa geelit seuraavassa järjestyksessä, alkaen alimmasta:
  - a. 2 kpl märkiä suodatinpapereita
  - b. nitroselluloosakalvo
  - c. geelit
  - d. 2 kpl märkiä suodatinpapereita
- 4 Rullaa ilmakuplat pois.
- 5 Tarkista kytkennät ja aja 15 V, 2h.

### ***Blokkaus ja vasta-aineet perinteisesti***

1. Ota kalvot blottauslaitteesta varovasti reunoista kiinni pitäen.
2. Leikkaa kalvot halutuista kohdista.
3. Pese kolmesti 1 x TBS:llä 5 min ravistelijassa.
4. Blokkaa kalvot blokkaustrupkurissa (1:1 TBS-T ja odysseus blocking buffer) 2 h  
RT
5. Pese blokkauksen jälkeen kerran 1 x TBS-T 5min ravistelussa.
6. Lisää 5 ml primaarista vasta-aineliuosta.
7. Inkuboi yön yli +4 °C ravistelussa.
8. Ota vasta-ainelaimennos talteen (voi käyttää uudelleen).
9. Pese kalvot kolmesti 1 x TBS-T 5 min ravistelijassa.

10. Lisää sekundaarista vasta-aineliuosta (10 ml/kalvo).

11. Inkuboi 1h RT ravistelijassa.

12. Pese kalvot kahdesti 1 x TBS-T:llä 5 min ravistelijassa.

13. Pese kalvot kahdesti 1 x TBS 5 min ravistelijassa.

### ***Detektointi***

1. Detektoi kalvot Odyssey CLx Infrared Imaging System -laitteella (LI-COR). Käytä tulosten käsittelyssä Image studio -ohjelmaa (LI-COR).

### **Kalvojen strippaus**

1. Inkuboi kalvoja strippauspuskurissa kahdesti 10 min ajan.

2. Pese kalvot kahdesti 1 x TBS-T:llä 5 min ravistelijassa.

3. Pese kalvot kahdesti 1 x TBS 5 min ravistelijassa.

4. Toista ohje uudestaan blokkauksesta lähtien. Blokkauслиuoksen inkubointiajaksi riittää yksi tunti.