

Olavi Järvinen

Angiotensiinikonvertaasientsyymi 1 (ACE1) ohutsuolessa
— fluorometrinen menetelmä aktiivisuuden määrittämiseksi

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko (AMK)
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
30.8.2013

Alkusanat

Haluan esittää kiitokset työni ohjaajille professori Riitta Korpelalle, tutkija Aino Siltarille, professori (emeritus) Heikki Vapaatalolle ja lehtori Jarmo Palmille arvokkaista neuvoista ja kommentteista. Lisäksi haluan kiittää laboratoriomestari Anne Reijulaa hänen tekemistään erinomaisista parafiinileikkeistä sekä biokemisti Richard Forsgårdia, lääketieteen opiskelija Anni Savista sekä laboratoriohenkilökuntaa ohjauksesta, neuvoista ja keskusteluista opinnäytetyön tekemisen varrelta.

Espoossa 30.8.2013

Olavi Järvinen

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Olavi Järvinen Angiotensiinikonvertaasientsyymi 1 (ACE1) ohutsuolessa — fluorometrinen menetelmä aktiivisuuden määrittämiseksi 40 sivua + 5 liitettä 30.8.2013
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Professori Riitta Korpela Tutkija Aino Siltari Professori (emeritus) Heikki Vapaatalo Lehtori Jarmo Palm
<p>Tämä opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan biolääketieteen laitoksessa, farmakologian osastossa.</p> <p>Reniini-angiotensiini -järjestelmä (RAS) säätelee verenpainetta ja elimistön fysiologista tasapainoa monissa eri kudoksissa. Järjestelmän aktivoituminen reniinin, angiotensinogeenin sekä angiotensiinikonvertaasientsyymien 1 (ACE1) kautta verenkierron välityksellä kohdekudokseen on joutunut viime vuosikymmenten aikana uuteen valoon.</p> <p>Järjestelmän komponentteja on löytynyt muun muassa ruoansulatuskanavasta, munuaisista, maksasta ja sydäimestä. Samalla sen aktivoituminen on osoittautunut oletettua monimutkaisemmaksi. Järjestelmän säätely kudoksessa riippumattomasti verenkierron kautta tapahtuvasta komponenttien muodostumisesta avaa kysymyksiä sen fysiologisesta merkityksestä ja osallisuudesta sairauksien synnyssä.</p> <p>Ruoansulatuskanavan RAS on vähän tutkittu paikallinen RAS. Niinpä sen osuus ohutsuolen häiriötiloissa, esimerkiksi ravintoaineiden imeytymistä ja motiliteettia koskevissa, ei ole selvä. Tässä opinnäytetyössä pyritään vahvistamaan aiempien tutkimusten havaintoja ja toisaalta valmistautumaan kliinisten näytteiden ACE1-aktiivisuuden mittaamiseen. Jos ACE1 on kliininen markkeri ohutsuolen häiriötiloissa, tarvitaan luotettava menetelmä sen aktiivisuuden mittaamiseksi.</p> <p>Opinnäytetyössä käynnistettiin fluoresenssispektrofotometrinen menetelmä ACE1:n aktiivisuuden mittaamiseksi ohutsuolihomogenaateissa. Lisäksi RAS:n keskeisiä komponentteja tutkitaan immunofluoresenssivärijäyksellä ja Western blot -tekniikalla.</p> <p>Tulokset osoittivat rotan ohutsuolessa olevan ACE1-aktiivisuutta. Aktiivisuus painottui ohutsuolen alkupäähän, duodenumiin ja jejunumiin, joissa aktiivisuus oli merkittävästi korkeampi kuin loppupäässä, ileumissa. Lisäksi havaittiin, että aktiivisuutta oli epiteelin ja lihaskerroksen kesken yksinomaan epiteelissä.</p>	
Avainsanat	Reniini-angiotensiini -järjestelmä (RAS), angiotensiinikonvertaasientsyymi 1 (ACE1), ruoansulatuskanava, ohutsuoli, fluoresenssispektrofotometria

Author Title	Olavi Järvinen Angiotensin-converting enzyme 1 (ACE1) in the small intestine — a fluorometric method to measure activity
Number of Pages Date	40 pages + 5 appendices 30 August 2013
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Riitta Korpela, Professor Aino Siltari, Researcher Heikki Vapaatalo, Professor (emeritus) Jarmo Palm, Senior Lecturer
<p>This thesis was carried out at the University of Helsinki in the Faculty of Medicine, Department of Biomedicine, in the section of Pharmacology.</p> <p>The renin-angiotensin system (RAS) is one of the key regulators of blood pressure. In the classical form of the system renin and angiotensinogen activate the system in the circulation and angiotensin II (Ang II), which is produced by angiotensin-converting enzyme 1 (ACE1), mediates the vasoconstriction effects in the target tissues.</p> <p>This classical view has turned out to be far more complex, as the components of the system have been identified throughout the human body including e. g. gastrointestinal tract, kidney, liver and heart. This has raised questions about the role of the system in local tissue homeostasis, diseases and the local regulation independent from circulative activation.</p> <p>The function of the RAS in the small intestine and its possible role it have in the dysfunctions and diseases of the gastrointestinal tract is not very well known. All this is used as a background information to confirm the previous findings, which have shown the system's components in the small intestine. In addition to this a measurement of clinical samples are prepared also. If RAS has a role in disorders concerning for example absorption and motility, the ACE1 activity can be an important clinical marker.</p> <p>In this thesis a fluorescence spectrophotometrical method to measure ACE1 activity in intestinal homogenates is constructed. At the same time immunofluorescence staining and Western blot is used to identify the components of the RAS.</p> <p>Results showed that the ACE1 activity in the rat small intestine is highest in the proximal part, in duodenum and jejunum. In the distal region, in ileum, the activity is much lower. When the activity was conducted in the epithelium and smooth muscle layer, the activity in the muscle layer was negligible.</p>	
Keywords	Renin-angiotensin system (RAS), angiotensin-converting enzyme 1 (ACE1), gastrointestinal tract, small intestine, fluorescence spectrophotometry

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Reniini-angiotensiini -järjestelmä (RAS)	2
2.1	RAS verenpaineen säätelyssä	2
2.1.1	Angiotensinogeeni	4
2.1.2	Reniini	4
2.1.3	Angiotensiini I ja angiotensiinikonvertaasientsyymi 1 (ACE1)	5
2.1.4	Angiotensiini II	6
2.1.5	Angiotensiini II tyypin 1 ja 2 reseptorit (AT1R ja AT2R)	7
2.1.6	RAS:n esto	8
2.1.7	Angiotensiini (1-7) ja angiotensiinikonvertaasientsyymi 2 (ACE2)	9
2.1.8	MAS-reseptori	10
2.1.9	Paikallinen RAS	11
2.2	Ruoansulatuskanavan RAS	11
2.2.1	Ohutsuolen rakenne ihmisellä	12
2.2.2	Angiotensiinikonvertaasit	14
2.2.3	Angiotensiinireseptorit	15
2.2.4	Angiotensiinit I, II ja 1-7	15
2.2.5	Angiotensinogeeni ja reniini	16
3	Tavoitteet	16
4	Käytetyt menetelmät	17
4.1	Kudosnäytteenotto ja näytteiden säilytys	17
4.2	BCA-proteiinimääritys	18
4.3	Fluorometrinen aktiivisuusmittaus	19
4.4	Immunofluoresenssivärjäys	20
4.5	Western blot	21
4.6	Tilastolliset menetelmät	21
5	Tulokset	22
5.1	ACE1-aktiivisuusmäärityksen kalibrointi ja ACE1-vertailumateriaali	23
5.2	ACE1-aktiivisuus ohutsuolen segmenteissä	24
5.3	ACE1-aktiivisuus ohutsuolen segmenttien eri osissa	25
5.4	Kaptopriilin vaikutus ACE1-aktiivisuuteen	27
5.5	ACE1-aktiivisuuden riippuvuus substraattikonsentraatiosta ja inkubaatioajasta	29
5.6	Kokonaisproteiini	31

5.7	Immunofluoresenssivärjäys (IF-värjäys)	31
5.8	Western blot (WB)	33
6	Pohdinta	33
6.1	Menetelmien arviointi	33
6.1.1	Suoli- ja munuaiskontrollinäytteiden kokonaisproteiinipitoisuuden määrittäminen ja homogeenointi	34
6.1.2	Fluorometrinen aktiivisuusmittaus	34
6.1.3	IF-värjäys	35
6.1.4	WB	35
6.2	Tulosten tarkastelu	36
6.2.1	ACE1-aktiivisuus	36
6.2.2	IF-värjäys	37
6.2.3	WB	37
6.3	Jatkotutkimukset	37
7	Päätelmät	38
	Lähteet	39

Liitteet

Liite 1. Työssä käytetyt eläimet

Liite 2. Suolinäytteiden homogeenointi ja kokonaisproteiinin määrittäminen

Liite 3. Angiotensiinikonvertaasientsyymin 1 (ACE1) aktiivisuuden määrittäminen fluoresenssispektrofotometrisesti

Liite 4. Parafiini- ja jääleikkeiden immunofluoresenssivärjäys

Liite 5. Western blot

Lyhenteet

ACE1	Angiotensin-converting enzyme 1, angiotensiinikonvertaasientsyymi 1
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensiinikonvertaasientsyymi 2
Ang I	Angiotensiini I
Ang II	Angiotensiini II
Ang (1-7)	Angiotensiini (1-7)
AT1R	Angiotensiini II tyypin 1 reseptori
AT2R	Angiotensiini II tyypin 2 reseptori
B2	Bradykiniini tyypin 2 reseptori
BCA	Bicinchoninic acid, bikinkoniinihappo
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
cAMP	Syklinen adenosini 3', 5'-monofosfaatti
cGMP	Syklinen guanosini 3', 5'-monofosfaatti
FITC	Fluorescein isothiocyanate, fluoresiini-isotiosyanaatti
HHL	Hippuryl-Histidine-Leucine, hippuryyli-histidiini-leusiini
MAS	MAS-reseptori
OPA	Ortho-phthalaldehyde, orto-ftaalialdehydi
PGE ₂	Prostasykliini E ₂

PGI ₂	Prostasykliini I ₂
PLA ₂	Fosfolipaasi A ₂
PLC-β	Fosfolipaasi C, beeta
PLD	Fosfolipaasi D
RAS	Renin-angiotensin system, reniini-angiotensiini -järjestelmä
SGLT1	Sodium-glucose linked transporter 1, natrium-glukoosi -transportteri 1
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate, tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti

1 Johdanto

Reniini-angiotensiini -järjestelmä (RAS) on yksi keskeisimmistä hypertension, kohonneen verenpaineen, syntyyn vaikuttavista tekijöistä. Kuva järjestelmästä on kuitenkin viimeisten vuosikymmenien aikana laajentunut, kun järjestelmän keskeisiä komponentteja on löydetty useista kudoksista, myös ruoansulatuskanavasta ja erityisesti ohutsuolesta.

Nimitystä paikallinen RAS käytetään erotuksena klassisesta järjestelmästä, missä munuaisissa ja maksassa ilmentyvät reniini ja angiotensinogeeni aktivoivat järjestelmän, joka säätelee verenpainetta ja ylläpitää suola-neste-tasapainoa. Paikallisessa järjestelmässä aktivaatio tapahtuu jollakin muulla tavalla, se ei edellytä verenkiertoon erittyviä reniiniä ja angiotensinogeenia muiden komponenttien tuotannon käynnistämiseksi vaan reniini ja angiotensinogeeni voidaan tuottaa paikallisesti.

Tässä opinnäytetyössä lähtökohtana ovat ruoansulatuskanavan ja erityisesti ohutsuolen toimintahäiriöt, joiden syntymekanismissa ja edelleen itse häiriötilassa RAS:lla voisi olla osuus. Tällaisia ohutsuolen toimintahäiriöitä ovat esimerkiksi ärtyvän suolen oireyhtymä, imeytymishäiriöt, kuten ileumin (sykkyräsuoli) toimintahäiriö, keliakia (viljan gluteenin aiheuttama suolen tulehdus) sekä bakteerien ja parasiittien aiheuttamat taudit. Ohutsuolen toiminta voi olla häiriintynyt myös suolen motiliteetin muodossa. Motiliteettihäiriöiden syitä voivat olla myenterisen hermopunoksen häiriöt sekä sileän lihaksen taudit ja ohutsuolen divertikkelitauti (umpipussisairaus). RAS:lla voi olla osuutensa myös ruoka-allergioissa ja ohutsuolen kasvainten synnyssä.

Opinnäytetyössä pystytetään fluoresenssispektrofotometrinen menetelmä RAS:n keskeisimmän entsyymin, angiotensiinikonvertaasientsyymin 1 (ACE1), aktiivisuuden mittaamiseksi ohutsuolihomogenaateista kuoppalevyllä. Tarkoituksena on osoittaa ACE1 rotan ohutsuolessa, nopeuttaa aktiivisuusmittauksia aiemmista kyveteillä tapahtuneista mittauksista ja osoittaa menetelmän soveltuvuus kudoshomogenaateille yleensä. Lisäksi pyritään osoittamaan järjestelmän muita komponentteja, erityisesti reseptoriproteiineja immunofluoresenssivärjäyksellä ja Western blot -tekniikalla.

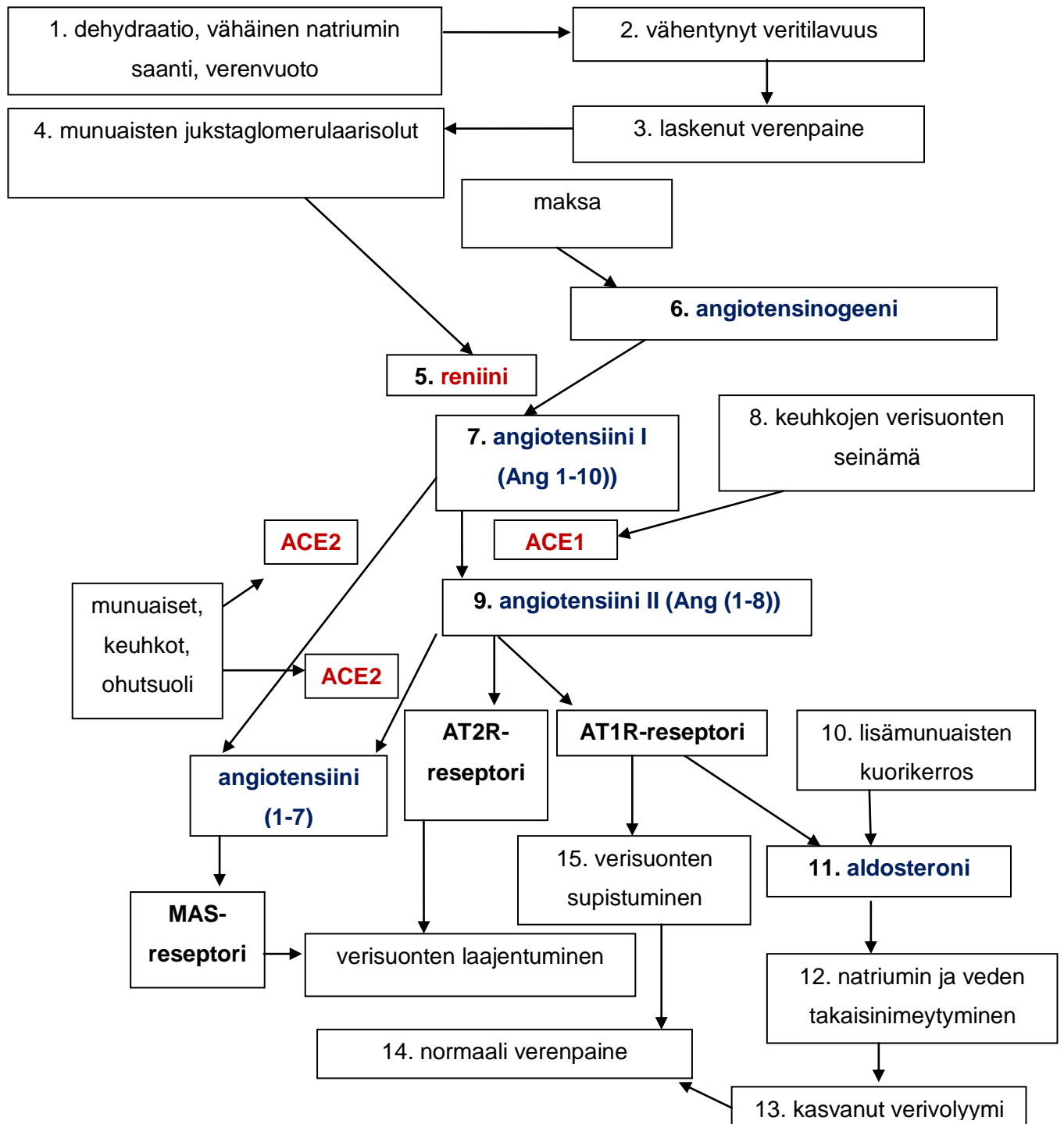
2 Reniini-angiotensiini -järjestelmä (RAS)

2.1 RAS verenpaineen säätelyssä

RAS osallistuu verenpaineen säätelyyn mm. tasapainottamalla veritilavuudessa ja sitä kautta myös verenpaineessa tapahtuneet muutokset. Veritilavuuden laskiessa järjestelmä aktivoituu. Aktivoitumisen seurauksena verenpaine normalisoituu. [1, s. 576.]

Lähtökohtaisesti veritilavuuden lasku on seurausta dehydraatiosta (nestehukka), vähäisestä natriumin saannista tai verenvuodosta. Tämä johtaa verenpaineen laskuun ja reniini-entsyymien erittymiseen verenkiertoon munuaisten jukstaglomerulaarisista soluista, jotka aistivat edellä mainittuja muutoksia. Maksassa syntetisoitu peptidi, angiotensiinogeeni, pilkotaan plasmassa reniinin katalysoimana angiotensiini I:ksi (Ang I). Ang I:n kasvanut pitoisuus johtaa angiotensiinikonvertaasientsyymien 1 (ACE1) tuotantoon keuhkoissa. ACE1 hydrolysoi Ang I:stä angiotensiini II:n (Ang II), joka on biologisesti aktiivinen supistaen verisuonia ja lisäksi lisämunuaisten kuoren soluista aldosteronin erittymistä angiotensiini II tyyppin 1 reseptorin (AT1R) aktivoituessa. Lisääntynyt aldosteronin erityy saa aikaan natriumin ja veden takaisinimeytymisen munuaisissa, jolloin veritilavuus kasvaa. Kasvanut veritilavuus ja Ang II:n aktiivisuus yhdessä vaikuttavat siihen, että verenpaine kohoaa takaisin normaaliksi. [1, s. 576.]

Kuvassa 1 on esitetty RAS:n kaaviokuva: fysiologinen aktivoitumismekanismi, seuraukset elimistössä, järjestelmän keskeiset entsyymit, peptidit ja reseptorit. Entsyymit, peptidit ja reseptorit on lihavoitu: entsyymit punaisena, peptidit tummansinisinä ja reseptorit mustina.



Kuva 1. Kaaviokuva reniini-angiotensiini-järjestelmästä (RAS). Lyhenteet: ACE1 = angiotensiinikonvertaasientsyymi 1, ACE2 = angiotensiinikonvertaasientsyymi 2, AT1R = angiotensiini II tyypin 1 reseptori, AT2R = angiotensiini II tyypin 2 reseptori, MAS-reseptori = Ang (1-7) -sitova reseptori. Kuva mukailten [1; 3.]. Numeroinnilla osoitetaan fysiologisten tapahtumien järjestys sekä RAS:n komponenttien muodostuminen fysiologisen aktivaation seurauksena.

Pitkään jatkunut reniinin ”up-regulation” ja siitä seuraava Ang II:n verisuonia supistava sekä aldosteronin aikaansaama natriumin ja veden takaisinimeytyminen johtaa verenpaineen nousun lisäksi kohdekudosten, verisuonten ja sydämen, rakenteellisiin muutoksiin, kuten niiden liikakasvuun ja tiiviin sidekudoksen muodostumiseen normaalin kudoksen tilalle. [1, s. 587.]

2.1.1 Angiotensinogeeni

Angiotensinogeeni on 452 aminohaposta koostuva glykoproteiini, jonka aminoryhmän pää on seuraava [2, s.1818]:

(NH₂-Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰-Val¹¹-Ile¹²-His¹³-Ser¹⁴-R) [3, s. 8.]

Angiotensinogeeni on reniinin substraatti ja näin järjestelmän aktivoiva peptidi. Sitä syntetisoidaan pääasiassa maksassa, josta se vapautuu verenkiertoon. Reniini pilkkoo angiotensinogeenista 10 aminohapon pituisen peptidin, Ang I. Angiotensinogeenin pitoisuus plasmassa on suuri suhteessa sen paikallisiin pitoisuuksiin kudoksissa. Pitoisuuden muutokset plasmassa määrittävät merkittävästi RAS:n aktivaatiota. [2, s.1818.]

2.1.2 Reniini

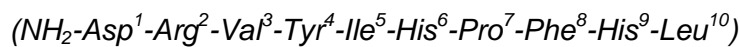
Reniini on glykoproteolyttinen entsyymi, joka muuttaa angiotensinogeenin Ang I:ksi. Rakenteeltaan se on yhdestä ketjusta koostuva aspartyyliproteaasi. Rakenteessa on kaksi aluetta, joissa amino- ja karboksyyli-terminaaliset osat koostuvat samanlaisista sekvensseistä, jotka ympäröivät entsyymin aktiivista kohtaa. Tämä reniinin katalyyttinen keskus sisältää kaksi asparagiinihapon osaa, jotka jakautuvat molemmille puolille entsyymiä. Tämä tekee reniinistä hyvin spesifin entsyymien angiotensinogeenille. [2, s. 1816.]

Reniini syntetisoituu munuaisten jukstaglomerulaarisissa soluissa. Synteesissä reniinin mRNA:sta muodostuu translaation ja glykosylaation kautta proreniini, reniinin esiaste. Proreniini voidaan edelleen erittää Golgin laitteen kautta tai pakata varastorakkuloihin ja erittää säännelysti. Varastorakkuloissa tapahtuvassa proreniinin muokkauksessa reniiniksi poistetaan 43 aminohapon pituinen ketju, jolloin verenkiertoon erittyy sekä

proreniiniä että reniiniä [2, s. 1816]. Aktiivinen reniini sisältää 340 aminohappoa ja on hyvin spesifi angiotensinogeenille katkaisten leusiinin ja valiinin välisen sidoksen (Leu¹⁰-Val¹¹) [3, s. 8].

2.1.3 Angiotensiini I ja angiotensiinikonvertaasientsyymi 1 (ACE1)

Angiotensiini I (Ang I) on 10 aminohapon mittainen peptidi, jolla ei ole merkittävää biologista aktiivisuutta. Ang I on angiotensiini II:n (Ang II) esiaste, josta angiotensiinikonvertaasientsyymi 1 (ACE1) poistaa dipeptidin histidiini⁹-leusiini¹⁰. Sen sekvenssi on seuraava [3, s. 9]:



ACE1 on solukalvolle kiinnittyvä entsyymi, joka koostuu 805 aminohaposta ja jonka molekyylipaino on välillä 140—170 kDa. Se on suurimmaksi osaksi solun ulkopuolella solukalvoon kiinnittyneenä. Solukalvoon se on kiinnittynyt C-terminaalisen osan transmembraanialueen kautta, jossa on 17 aminohappoa ja 30 aminohapon pituinen sytoplasman puolella oleva häntä. ACE1:llä on kaksi homologista aktiivista keskusta, C-terminaalinen ja N-terminaalinen. Näihin viitataan kirjainyhdistelmällä HEMGH (His-Glu-Met-Gly-His). Aktiivisessa keskuksessa on kaksi sinkkiä sitovaa histidiinipäätä ja katalyyttinen glutamiinihappo, jotka ovat sinkin kofaktoreita. Lisäksi ACE1 sisältää paljon hiilihydraatteja johtuen sen voimakkaasta muokkauksesta translaation jälkeen. [4, 10.4—10.5.]

ACE1 on kloridista riippuvainen sinkkimetallopeptidaasi. Siksi kelatoivat aineet ja sulfhydryyli-ryhmän sisältävät yhdisteet estävät ACE1:n muodostamalla kompleksin aktiivisen keskuksen sinkin kanssa. Entsyymien optimaalinen pH on välillä 7—8, mutta aktiivisuus laskee voimakkaasti happamissa olosuhteissa, minkä saa aikaan sinkin dissosioituminen aktiivisesta keskuksesta, kun sinkkiä sitovat histidiinipäät protonoituvat. [4, 10.4.]

ACE1:n kloridiaktivaatiomekanismi riippuu anionin ja aktiivista keskusta lähellä olevan lysiinin vuorovaikutuksesta, joka saa aikaan muutoksen entsyymien konformaatioissa mahdollistaen täten substraatin sitoutumisen. Tähän vaikuttaa kuitenkin myös substraatti ja se, tapahtuuko katalyyysi *in vivo* vai *in vitro*. Useimmissa kudoksissa kloridipitoisuus on riittävä ACE1:n täydelle aktiivisuudelle, mutta puhdistetun entsyymien *in vitro*

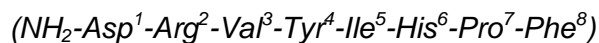
tapahtuva katalyyysi ei välttämättä edellytä anionia ollenkaan ja toisaalta jotkin substraatit eivät pilkkoudu ilman anionia ja toisten pilkkoutuminen jatkuu, vaikka kloridia ei olisi-kaan läsnä. [4, 10.5.]

ACE1:n synteesiä tapahtuu erityisesti seuraavissa paikoissa: endoteeli- ja epiteeli- sekä neuroepiteelisoluisissa keuhkoissa, harjareunuksessa munuaistiehyissä, ohutsuolessa ja istukassa sekä aivoissa mm. pikkuaivoissa. Näissä entsyymi on solukalvolle sitoutuneena pilkkoen sieltä käsin biologisia substraattejaan. Liukoisessa muodossa ACE1:n määrä on merkittävä plasmassa, veressä, virtsassa sekä aivoselkäydinnesteessä. [4, 10.2.]

ACE1-entsyymin merkittävin tehtävä elimistössä on pilkkoa verenkierrossa olevia angiotensiineja, erityisesti Ang II:ta sen verisuonia supistavan vaikutuksen vuoksi ja verisuonia laajentavaa bradykiniiniä. Tämän lisäksi ACE1 voi suolistossa vapauttaa dipeptidejä ravinnosta saatavista pidemmistä peptideistä tai inaktivoida istukassa äidin saamia sikiölle haitallisia peptidejä. Toisaalta kiniinejä pilkkovana entsyyminä ACE1 voi munuaistiehyissä inaktivoida tällaisia peptidejä, jolloin ne eivät nefroniin, munuaisten toiminnalliseen yksikköön, kulkeutuessaan pysty kiihdyttämään prostasykliinisynteesiä eivätkä suolan ja veden erittymistä [4, 10.3].

2.1.4 Angiotensiini II

Angiotensiini II (Ang II) on keskeinen biologisesti aktiivinen peptidi, jonka kautta RAS:n monet vaikutukset välittyvät. Rakenteeltaan se on kahdeksan aminohapon pituinen. Se on erittäin voimakas verisuonia supistava yhdiste [4, 9.1]:



Ang II ei ole ainoastaan verenkierrossa syntyvä yhdiste, joka osaltaan säätelee verenpainetta ja vaikuttaa veritilavuuden muutoksiin, vaan se on myös paikallisesti vaikuttava RAS:n komponentti monissa kudoksissa, kuten aivoissa, sydämessä, munuaisissa ja ruoansulatuskanavassa. [4, 9.1—9.6.]

Paikallisesti Ang II voidaan syntetisoida joko *de novo* eli yksinkertaisemmista molekyyleistä tai angiotensinogeenin ja reniinin kautta verenkierrosta. Näin Ang II ilmentyy kudoksessa joko solun sisäisenä tai ekstrasellulaarisesti eli ulkoisesti. Biologisen aktiivi-

suuden kannalta sen rakenteen fenyyli-ryhmä asemassa 8 on merkittävä, sillä tämän ryhmän korvaaminen toisella tai ryhmän poistaminen kokonaan vähentää sileää lihasta supistavaa vaikutusta. Reseptoriin sitoutumisessa aromaattiset sivuryhmät asemassa 4 ja 6, guanidi-ryhmä asemassa 2 sekä C-terminaalinen karboksyyli-ryhmä ovat merkittäviä. Aromaattisiin sivuryhmiin tehtävät modifikaatiot vaikuttavat peptidin konformaatioon, joka puolestaan vaikuttaa sen kykyyn sitoutua reseptoriin. [4, 9.7.]

Ang II saa aikaan monenlaisia vaikutuksia solutasolla ja kohdekudoksissa aktivoimalla AT1R-reseptorin. Kalsiumin soluunvirtaus kasvaa, ja entsyymien cAMP, PLA₂, PLC-β ja PLD pitoisuudet muuttuvat. Myös proto-onkogeenien, kasvutekijöiden ja rakenneproteiinien tuotanto käynnistyy. Kohdekudoksista lisämunuaisissa reseptorin aktivaatio aiheuttaa aldosteronin ja adrenaliinin erittymistä. Munuaisissa natriumin erityis vähenee ja kaliumin kasvaa samalla, kun vastussuonet ja laskimot supistuvat. Näiden lisäksi tapahtuu noradrenaliinin vapautumista sympaattisessa hermopäätteessä. Pitkään jatkuvana vaikutuksena verenpaine kohoaa ja sydämessä sekä verisuonissa kehittyä paineen nousun seurauksena rakenteellisia muutoksia. [1, s. 588.]

2.1.5 Angiotensiini II tyyppin 1 ja 2 reseptorit (AT1R ja AT2R)

Ang II sitoutuu reseptoreihin AT1R ja AT2R, jotka välittävät edelleen tämän peptidin fysiologiset vaikutukset kohdesoluihin. Reseptoreja on kahta tyyppiä, tyyppin 1 ja tyyppin 2, mikä jako perustuu antagonistien eli reseptoriproteiinien salpaajien erilaiseen reseptoriaffiniteettiin eli sitoutumisalttiuteen. [4, 12.9.]

AT1R on muodostunut ionikanavista sekä G-proteiineista, joihin on kytkeytyneenä entsyymi. Tämä reseptorityyppi välittää Ang II:n keskeiset vaikutukset, verisuonten supistuksen ja hypertrofian. Reseptorityyppi 1 on kalvoproteiini, jota löytyy erityisesti sydänlihaksesta ja verenkiertoelimistön sileästä lihaksesta, munuaisista ja maksasta. Näissä kudoksissa Ang II -peptidillä on korkea affiniteetti reseptoriin. [4, 12.1—12.8.]

Sitoutumisvoimakkuuteen vaikuttaa erityisesti pH, joka saa aikaan rakenteellisia muutoksia oktapeptidissä. N-terminaalisen pään emäksisen luonteen kasvaessa affiniteetti kasvaa, ja vastaavasti happaman luonteen ollessa suurempi affiniteetti heikkenee. Vastaavalla tavalla, kun N-terminaalista päästä poistetaan aminohappoja, affiniteetti heikkenee yhtä lailla. Solutason signalointimekanismit Ang II:n sitoutuessa reseptoriin-

sa aiheuttavat muutoksia mm. sytoplasman kalsiumionipitoisuudessa sekä G-proteiinivälitteisen adenyylaattisyklaasin eston. [4, 12.1—12.4.]

Aldosteronin vapautumiseen Ang II:n muodostumisen seurauksena vaikuttaa solun ulkopuolella olevan kalsiumin pitoisuus. Kalsiumin liikkuvuus solun sisä- ja ulkopuolisista lähteistä kiihtyy Ang II -stimulaatiossa, missä muodostuu kalsiumia kuljettava tosiolähetti, kun polyfosfoinositidi hydrolysoidaan [4, 12.1—12.4]. G-proteiinit ovat reseptoreissa signaalia muuntavia molekyylejä, kuten G_Q , johon kytkeytynyt entsyymi fosfolipaasi C stimuloi fosfolipidi-kalsium -vastetta Ang II:n läsnä ollessa ja tämän seurauksena aldosteronin erittymistä. Toinen esimerkki G-proteiinista on G_i , joka mm. estää adenyylaattisyklaasin aktiivisuutta, joka muussa tapauksessa vähentäisi Ang II välittämän aldosteronin muodostumista. [4, 12.4.]

Ang II tyyppin 2 reseptori AT2R eroaa tyyppin 1 reseptorista sekä signalointimekanismien että sen suhteen, missä kudoksissa tyyppin 2 reseptori ilmentyy. AT2R:n välittämät fysiologiset vasteet ovat vastakkaiset verrattuna tyyppin 1 reseptoriin, vaikkakaan vasteen mekanisme ei kunnolla tunneta. Kuitenkin Ang II sitoutuessaan tyyppin 2 reseptoriin lisää typpioksidin muodostusta, joka puolestaan saa aikaan cGMP:n tuotannon ja verisuonten laajenemisen. [3, s. 15.]

2.1.6 RAS:n esto

Tähänastinen tieto Ang II:n verenpainetta kohottavasta vaikutuksesta on johtanut sellaisten verenpainelääkkeiden kehitykseen, joilla estetään eri tavoin Ang II:n vaikutus. Tämä voi tapahtua seuraavilla tavoilla: 1) estetään reniinin muodostus, 2) estetään Ang II:n muodostus salpaamalla ACE1, 3) estetään Ang II:n sitoutuminen reseptoriin salpaamalla AT1R-reseptoriproteiinit, 4) estetään aldosteronin vaikutus salpaamalla aldosteronireseptorit. [1, s. 587.]

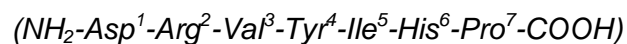
Reniini-angiotensiini -järjestelmää estävistä verenpainelääkkeistä valtaosa on joko ACE1-estäjiä tai AT1R-salpaajia. Näillä hoidetaan kohonnutta verenpainetta ja sydämen vajaatoimintaa. Lääkkeet vaikuttavat myös suojaavasti estäen munuaisvaurioiden syntyä erityisesti diabetespotilailla, muutoksia verisuonissa ja sydämen lihaskudoksen liikakasvua. [1, s. 588.]

ACE1-estäjät saavat aikaan verisuonten laajentumisen siten, että ACE1:n toiminta sal-
vataan ja samaan aikaan hidastetaan verisuonia laajentavan bradykiniinin inaktivaatio-
ta estämällä ACE1:n bradykiniinia pilkkovaa ominaisuutta. Fysiologisesti tämä saa ai-
kaan Ang II:n eston ja bradykiniinin aktivaation seurauksena bradykiniini tyyppin 2 re-
septorin (B₂) kautta typpioksidin ja prostasykliinin (PGI₂) muodostuksen, joilla on ve-
risuonia laajentava vaikutus [1, s. 589]. Näiden lisäksi ACE1-estäjät vaikuttavat pienen-
tämällä aldosteronin pitoisuutta seerumissa, jolloin elimistöstä poistuu natriumia ja vet-
tä ja kaliumin erityis vähenee. Sydänkudoksen liikakasvulta ne suojaavat, kun kasvute-
kijöiden tuotanto vähenee [1, s. 590].

ACE1-estäjiä oli Suomessa rekisteröity seitsemän vuonna 2013: enalapriili, kaptopriili,
kinapriili, lisinopriili, perindopriili, ramipriili ja tsofenopriili. Näistä tässä opinnäytetyössä
tarkastellaan kaptopriilia ja sen vaikutuksia ACE1:n aktiivisuuden estoon ohutsuolessa.
Kaptopriili ja lisinopriili ovat sellaisenaan aktiivisia, mutta muut ovat ns. ”pro-drug”-
yhdisteitä, jotka imeytyttyään de-esteröityvät aktiivisiksi karboksyylihapoiksi. [1, s. 591]

2.1.7 Angiotensiini (1-7) ja angiotensiinikonvertaasientsyymi 2 (ACE2)

Angiotensiini (1-7) (Ang 1-7) on seitsemän aminohapon heptapeptidi, jonka ACE2
muodostaa peptideistä Ang (1-10) tai Ang II. Sen aminohappoketju koostuu seuraavis-
ta aminohapoista [3, s. 19]:



Ang (1-7) on verisuonia laajentava, mikä tekee siitä tasapainottavan komponentin Ang
II:lle. Epätasapaino näiden kahden välillä voi olla sydän- ja verisuonisairauksien taus-
talla oleva tärkeä patologinen mekanismi. Sen biologisen aktiivisuuden mekanismi on
kompleksinen, mutta liittyy ilmeisesti bradykiniinin vapautumiseen, jota taas välittää
typpioksidi sekä ihmisillä että eläimillä. Tämä peptidi on osallisena myös verisuonia
laajentavien prostasykliinien E₂ (PGE₂) ja I₂ (PGI₂) synteessissä ja vapautumisessa. [3,
s. 20.]

ACE2 on ACE1:n entsymaattisesti aktiivinen homologi, joka on kooltaan 120 kDa ja
koostuu 805 aminohaposta. ACE1:n tavoin se on sinkkiä sitova metallopeptidaasi ja
glykoproteiini. Se ei kuitenkaan toimi katalyyttisesti aivan samalla tavoin kuin ACE1,
joka peptidyli-dipeptidaasina pilkkoo dipeptidin substraatistaan, vaan on karboksipep-

tidaasi [5, s. 33238]. Karboksipeptidaasina ACE2 pilkkoo substraatistaan yksittäisen aminohapon, mutta voi pilkkoa myös tripeptidin. Koska sen substraattia sitova aktiivinen keskus eroaa ACE1:n aktiivisesta keskuksesta, sitä ei voida estää samoilla yhdisteillä kuin ACE1:tä. Sillä on myös erilainen vaste kloridin kaltaisille monoanioneille johtuen entsyymien vähäisemmästä kloridia sitovien kohtien määrästä [3, s. 17].

ACE2 on ihmisellä laajasti jakautunut eri kudoksiin, ja sitä ilmentyy suussa, keuhkoissa, mahalaukussa, ohut- ja paksusuoleissa, maksassa, munuaisissa ja aivoissa. ACE2 on yhdistetty erityisesti keuhkorakkuloiden epiteelisoluissa ja ohutsuolen enterosyyteissä tapahtuvaan ilmentymiseen, koska SARS-koronavirus käyttää sitä funktionaalisen reseptorinaan. Entsyymiä ilmentyy yhtä lailla verisuoniston endoteelisoluissa kuin pehmeässä lihaskerroksessa edellä mainituissa kudoksissa. [6, s. 631].

Koska Ang (1-7) välittää vaikutuksensa MAS-reseptorin kautta, tämä angiotensiini (1-7)-MAS -akseli on laajentanut käsitystä niistä mahdollisista muista ACE2:n tehtävistä elimistössä kuin pelkkä verenpaineen säätelyyn osallistuminen. Munuaisissa ACE2 on liitetty diabeteksen yhteydessä syntyvään munuaisvaurioon, missä angiotensiinin (1-7) ilmentyminen vähenee Ang I:stä suhteessa Ang II:n muodostumiseen. Näin ollen ACE2 voi estää munuaisvaurioita ylläpitämällä angiotensiinin (1-7) korkeaa ekspressiotasoa [7, s. 596.]

2.1.8 MAS-reseptori

MAS-reseptori on G-proteiinin sisältävä proteiini-kompleksi, joka välittää Ang (1-7):n vaikutukset. Tämän reseptorin kautta välittyy sekä verisuonia laajentava vaste että Ang II:n esto, koska MAS on AT1R:n fysiologinen antagonisti. Vastakkainen vaikutus ei kuitenkaan ole täysin selvä, sillä Ang (1-7):n läsnäolo ei ole saanut aikaan MAS:n reseptorien tuotantoa hiirillä, joilta reseptoria koodaava geeni on puuttunut. Kuitenkin reseptorigeenin puuttuessa Ang II:n välittämät vaikutukset ovat kiihtyneet. [3, s. 20.]

2.1.9 Paikallinen RAS

Klassinen kuva RAS:sta sisältää verenkiertoon erittyvät angiotensinogeenin ja reniinin, joiden kautta muodostuva Ang I muutetaan ACE1:n aktiivisuuden tuloksena Ang II:ksi, jolla on sydän- ja verenkiertoelimistössä verisuonia supistava ja verenpainetta kohottava vaikutus. Ang II:n muodostuminen säätelee verenpainetta, mutta pitkään jatkuvana se voi kohottaa verenpaineen epänormaalksi, millä on sydämen ja verisuonten kudoserakenteeseen ja toimintaan suoraan ulottuva vaikutus. [1, s. 576.]

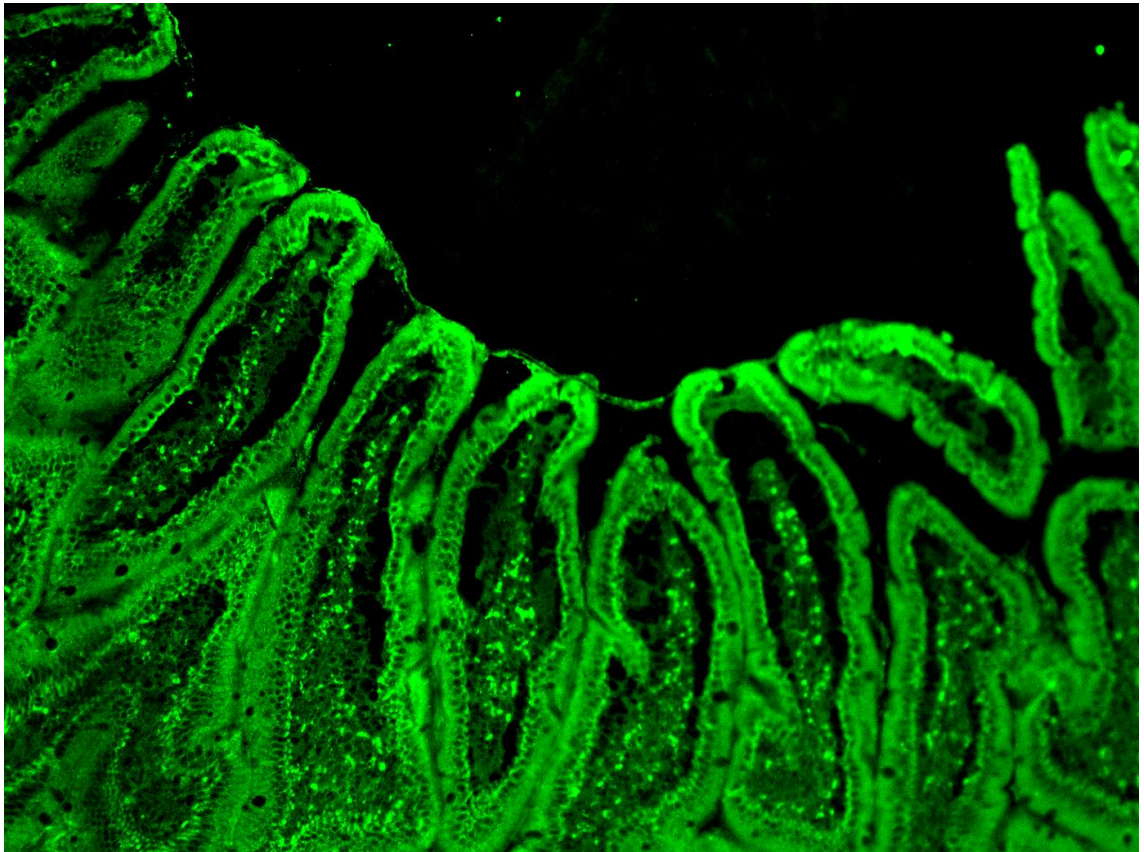
Käsitys RAS-järjestelmästä on jatkuvasti laajentunut, koska ainakin munuaisissa, sydämessä, aivoissa, maksassa ja ruoansulatuskanavassa muodostuu yhtä lailla reniiniä, angiotensinogeenia ja angiotensiineja sekä entsyymejä ACE1 ja ACE2 ilman komponenttien verenkierrosta näihin kudoksiin välittyvää vaikutusta. Tämä on johtanut teorian, jonka mukaan kudosten neste- ja elektrolyyttikuljetus, veren virtauksen paikallinen säätely sekä kudosten uusiutuminen, tulehdustilat ja fibroosi eli arpeutuminen voisivat saada osaltaan selityksensä paikallisen RAS:n kautta, jolla olisi näin tärkeä osuus kudosten fysiologisessa toiminnassa. [8, s. 417.]

2.2 Ruoansulatuskanavan RAS

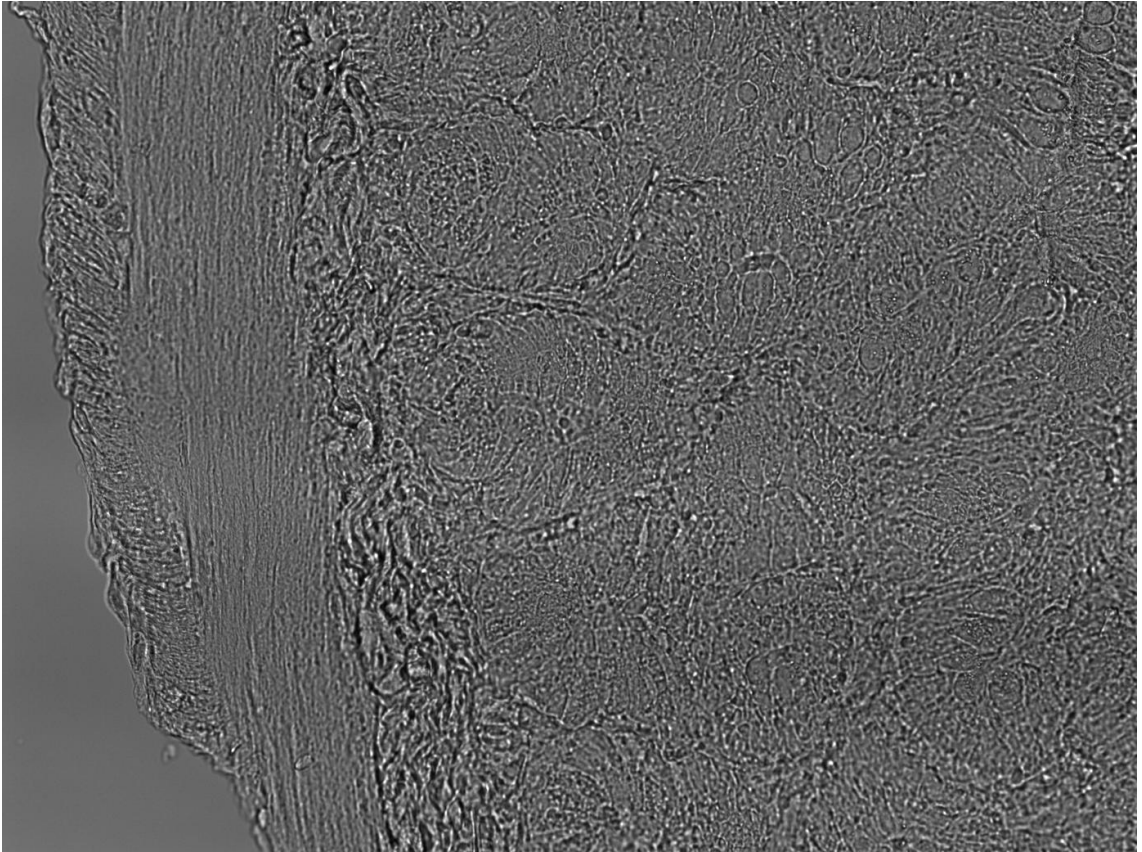
Kaikki RAS:n merkittävimmät komponentit on löydetty ruoansulatuskanavasta, ohut- ja paksusuolesta, mahalaukusta ja ruokatorvesta. Tästä päätellen sillä olisi itsenäinen asema, jolloin sen komponentit syntetisoitaisiin ruoansulatuskanavan eri osissa. Tämä herättää kysymyksiä myös siitä, miten järjestelmä aktivoituu ja mikä on järjestelmän fysiologinen ja patofysiologinen merkitys ruoansulatuskanavassa. Seuraavassa on kuvattu ohutsuolen rakenne ja tarkasteltu järjestelmän pääkomponentteja tässä osassa ruoansulatuskanavaa. RAS on osallisena ainakin seuraavissa toiminnoissa ohutsuolessa: bikarbonaatin erityminen, natriumin, veden, glukoosin ja peptidien imeytyminen sekä peptidien pilkkoutuminen [8, s. 414].

2.2.1 Ohutsuolen rakenne ihmisellä

Ihmisen ohutsuoli on 3—6 m pitkä. Se jaetaan anatomisesti duodenumiin, jejunumiin ja ileumiin. Duodenum on lähimpänä mahalaukkua oleva osa ja sijaitsee retroperitoneaalisesti eli vatsakalvon takana. Muu osa liikkuu vapaasti vatsaontelossa ja on kiinnittyneenä suoliliepeeseen. Vapaasti liikkuvan ohutsuolen proksimaalinen, lähempänä duodenumia, osa on jejunum ja distaalinen ileum. Terveen ohutsuolen aktiivinen pinta-ala on noin 200—400 m², mitä limakalvon suolinukka, villusrakenne, lisää moninkertaisesti. Rakenteellisesti ohutsuoli koostuu villuksista, joita verhoaa epiteeli, lamina propria, submukoosasta, poikittaisesta ja pitkittäisestä lihaskerroksesta sekä seroosasta [9, s. 254—255]. Kuvissa 2 ja 3 nähdään rotan ohutsuolen rakenteita.



Kuva 2. Ohutsuolen villusrakennetta duodenumissa (kuva: Olavi Järvinen). Immunofluorensenssivärjäys. Mikroskooppi Carl Zeiss Imager.M2, objektiivi EC PlnN 10x/0,3 DIC1, FITC-suodatin, 470 nm, 90 % intensiteetti, Axiocam HRm Rev 3 digital camera, 500 ms valotusaika.



Kuva 3. Äärimmäisenä vasemmalta alkaen seroosa, pitkittäinen lihaskerros, poikittainen lihaskerros ja submukoosa ileumissa. Kirkkaan kentän kuva immunofluoresenssivärjäyksestä (kuva: Olavi Järvinen). Mikroskoopi Carl Zeiss Imager.M2, objektiivi EC PlNn 20x/0.8 DI-CII, Axiocam HRm Rev 3 digital camera, 1,0 s valotusaika.

Ohutsuolessa ravintoaineet muokataan paremmin imeytyvään muotoon, jolloin ne imeytyvät elimistön tarpeisiin. Toiminnoissa tapahtuvat häiriöt johtavat aliravitsemukseen, laihtumiseen ja ripuliin, jotka ovat oireita ohutsuolen taudeissa. Ravintoaineiden imeytyminen tapahtuu pääosin duodenumissa, mutta mikäli suolen alkuosa puuttuu esimerkiksi tapaturman tai sairauden johdosta, voi loppuosa korvata tilanteen. B₁₂-vitamiini ja sappihapot imeytyvät ileumin loppuosassa. Ileumin dysfunktiossa ohutsuolen alkuosa ei pysty korvaamaan riittävästi vitamiinin ja sappihappojen imeytymistä. [9, s. 254.]

Duodenum on pituudeltaan 20—30 cm ja C:n muotoinen. Se jaetaan tavallisesti proksimaaliseen, laskevaan, poikittaiseen ja nousevaan osaan. Poikittainen osa liittyy maksaan säikeisen sidekudoksen avulla ja on liikkuva. Muilta osin duodenum sijaitsee retroperitoneaalisesti ja kulkee selkärangan oikealla puolella. [9, s. 172.]

Makroskooppiset ja mikroskooppiset rakenteet duodenumin seinämässä ja limakalvos- sa ovat paljolti samanlaiset muun ohutsuolen kanssa, mutta erojakin on. Ns. Kerckringin poimuja ei ole proksimaalisessa osassa, mutta enenevässä määrin 5 cm:n päästä pyloruksesta, mahan portista. Niiden koko sekä korkeus- että pituussuunnassa kasvaa distaalisia osia kohti mentäessä. Korkeus ja pituus ovat suurimmillaan nousevan duodenumin ja proksimaalisen jejunumin korkeudella. [9, s. 172.]

Brunnerin rauhaset ovat proksimaaliselle duodenumille tyypillisiä mikroskooppisia rakenteita. Ne koostuvat PAS-positiivisista asinaarisista rakenteista ja sijaitsevat submu- koosassa. Ne erittävät alkaalista musiinipitoista limaa. Niitä voi olla myös muissa osis- sa duodenumia, mutta distaalisissa osissa niiden määrä ja tiheys pienentyvät. [9, s. 172.]

Duodenumin seinämän, villusten ja epiteelin verhoamien villusten ja Lieberkühnin rau- hasten rakenne on samankaltainen kuin ohutsuolessa yleensä. Epiteeli muodostuu absorptiivisista eli imeytymiseen osallistuvista lieriösoluista, pikarisoluista, Panethin soluista ja endokriinisista soluista. Panethin solut sekä endokriiniset solut sijaitsevat Lieberkühnin rauhasissa. Sieltä ne erittävät serotoniinia ja histamiinia, mutta osa myös peptidihormoneja, gastriinia, sekretiiniä, glukakonia ja kolekystokiniiniä. [9, s. 172— 173.]

Absorptiiviset lieriösolut toimivat kuten jejunumissa ja ileumissa: limakalvolla olevat entsyymit pilkkovat hiilihydraatteja, proteiineja ja rasvoja. Entsyymiaktiivisuudet tosin vaihtelevat riippuen siitä, mistä osasta ohutsuolta on kysymys. Esimerkiksi laktaasin aktiivisuus on korkeampi proksimaalisessa jejunumissa kuin proksimaalisessa duo- denumissa. [9, s. 173.]

2.2.2 Angiotensiinikonvertaasit

Ihmisellä ACE1 sijaitsee ohutsuolessa epiteelisolujen villusrakenteessa ja verisuonten sisäkerroksessa, endoteelissa. Suurimmat ACE1:n ja ACE2:n mRNA-pitoisuudet ovat duodenumissa ja ileumin distaalisessa päässä eli lähempänä paksusuolta. Sekä ACE2:n mRNA:ta että proteiinia on suurina pitoisuuksina epiteelin harjareunuksessa ja limakalvolla sekä verisuonten endoteelissa ja lihassoluissa. [8, s. 418.]

Villusrakenteessa nämä molemmat entsyymit on oletettu funktionaaliselta toiminnaltaan ruoansulatusentsyymeiksi. Lisäksi ACE2-aktiivisuuden on havaittu kasvattavan neutraalin aminohapotransportterin B⁰AT1-aktiivisuutta, millä on yhteys Hartnupin sairauteen, koska transportterissa ilmenee mutaatio tässä sairaudessa [8, s. 418]. Hartnupin sairaus on synnynnäinen aineenvaihduntatauti, jolle ovat ominaisia eräiden neutraaleiden aminohappojen runsas erittyminen virtsaan, pikkuaivoperäinen ataksia ja pellagralle ominaiset ihomuutokset [10, s. 170].

2.2.3 Angiotensiinireseptorit

AT1R ilmentyy pääasiallisesti epiteelin villuksessa, mutta myös suorissa ja pitkittäisissä lihaksissa, mynteerisessä hermopunoksessa sekä pienissä verisuonissa lihaksen lamina propriassa. AT2R ilmentyy sen sijaan vain mynteerisessä pleksuksessa ja pieninä määrinä lihaksessa ja epiteelisoluissa. [8, s. 418.]

Molempien reseptorien tehtävänä duodenumissa on toimia muun muassa bikarbonaatin erityskanavana, joita Ang II stimuloi. Rotan jejunumissa Ang II stimuloi näitä reseptoreita natriumin ja veden imeytymisessä. Ang II:n pitoisuudesta riippuu, kumman reseptorin kautta natrium ja vesi imeytyvät. Pienellä Ang II-pitoisuudella imeytymiskanava on AT2R ja suurella AT1R. [8, s. 418.]

2.2.4 Angiotensiinit I, II ja 1-7

Angiotensiinejä I ja 1-7 ei ole vielä identifioitu ihmisen ohutsuoletta, mutta Ang I:n esiaste, pro-angiotensiini-12, on löydetty rotan ohutsuoletta [2, s. 418]. Ang II on paikannettu hiiren ohutsuoletta epiteelisolujen rauhasista ja rauhasen sekä villuksen välisestä liitoksesta kudostiljelytekniikalla, kun seriini-treoniini kinaasia koodaavan geenin poisto aiheutti ACE:n lisääntyneen ekspression ja samalla Ang II:n tuotannon käynnistymisen [11, s. 202].

Ang II:lla on sekä ihmisen että rotan ohutsuoletta lihasta supistava vaikutus duodenumissa, jejunumissa ja ileumissa. Hiirellä segmenttien välillä on havaittu merkittäviä eroja supistavan vaikutuksen ollessa suurin ileumissa ja pienin duodenumissa. Ihmisellä kaikki segmentit supistuvat merkittävästi Ang II:n vaikutuksesta. [12, s. 35–36.]

Sekä bikarbonaatin erityis että natriumin ja veden imeytyminen ovat Ang II -välitteisiä peptidin stimuloimissa AT1R- ja AT2R-reseptoreita. Jejunumissa ja ileumissa natriumin ja veden imeytymisprosessiin on kytkeytyneenä myös enteerinen sympaattinen hermojärjestelmä. Ang II voi kasvattaa natriumin ja veden imeytymistä stimuloimalla noradrenaliinin vapautumista sympaattisista neuroneista. Näiden lisäksi rotan jejunumissa Ang II estää natriumista riippuvaisen glukoositransportterin SGLT1:n toimintaa *in vitro*. [8, s. 418.]

2.2.5 Angiotensinogeeni ja reniini

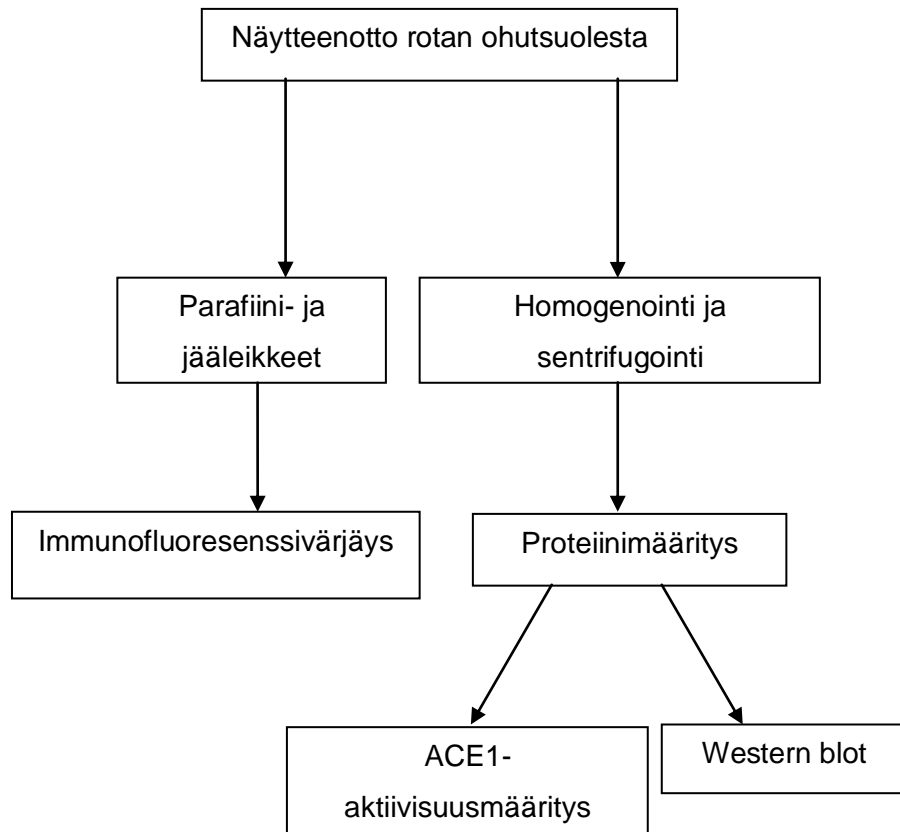
Angiotensinogeenia ei ole löydetty ihmisen ohutsuoletta, mutta rotalla tämä peptidi löytyy villuksesta, epiteeliltä, lamina propria ja mukoosasta. Sen sijaan reniinin mRNA:ta on eristetty ihmisen ohutsuoletta ja angiotensinogeenin mRNA:ta rotalta pitoisuutena, joka on noin kolmasosa munuaisten pitoisuudesta. Niiden tehtävät ohutsuolessa ovat epäselviä.

3 Tavoitteet

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on varmentaa kirjallisuuden havainnot ruoansulatuskanavan ja ohutsuolen Ang II:n paikallisesta muodostuksesta koe-eläimellä. Tätä varten käynnistettiin fluoresenssispektrofotometrinen menetelmä ACE1-aktiivisuuden mittaamiseksi ohutsuolihomogenaateissa. Koe-eläimestä saatujen ohutsuolinäytteiden perusteella pyrittiin osoittamaan menetelmän käyttökelpoisuus yleisesti kudoshomogenaateille, sekä suolistosairaiden potilaiden kliinisille näytteille. Lisäksi tavoitteena oli jo aiemmin kehitettyjen immunofluoresenssivärijäysmenetelmän ja Western blot -tekniikan avulla osoittaa erityisesti reseptoriproteiini AT1R ohutsuolessa.

4 Käytetyt menetelmät

Opinnäytetyön päämenetelmät olivat seuraavat: spektrofotometrinen BCA-proteiinimääritys, fluoresensspektrofotometrinen menetelmä ACE1-aktiivisuuden määrittämiseksi, immunofluoresenssivärjäys ja Western blot. Kuvan 4 vuokaaviosta selviää tiivistetysti, miten työ kokonaisuudessaan edistyi.



Kuva 4. Työn tiivistetty vuokaavio

4.1 Kudoksenäytteenotto ja näytteiden säilytys

Kokonaisproteiini- ja ACE1-aktiivisuusmääritystä varten rotan (liite 1) ohutsuolen jokaisesta segmentistä leikattiin kaksi n. 1 cm:n pituista palaa. Palat toimivat rinnakkaisnäytteinä. Palat asetettiin petrimaljalle kylmään (+4 °C) 0,01 M fosfaattipuskuriin (Sigma-Aldrich), missä 2,7 mM KCl ja 137 mM NaCl. Suolen sisältö huuhdeltiin puskurilla pipettiä apuna käyttäen. Suolen pinnalla oleva suolilieve poistettiin saksilla. Palat laitettiin Eppendorf-putkiin ja jäädytettiin välittömästi nestetyössä. Lopuksi palat siirrettiin -80

°C:seen siihen asti, kunnes niistä määritettäisiin kokonaisproteiinipitoisuus. Näytteet, joista kokonaisproteiinipitoisuus oli määritetty, säilytettiin -20 °C:ssa. Myöhemmin aktiivisuusmäärittystä varten ne laimennettiin pienimpään mittauksissa saatuun proteiinipitoisuuteen ja säilytettiin -20 °C:ssa. Kudoskontrollinäytteinä käytettiin rotan munuaista. Kontrollinäytteet saatiin vuonna 2012 toteutetusta tutkimuksesta, jossa tutkittiin marjojen terveysvaikutuksia. Tästä tutkimuksesta jääneitä näytteitä säilytettiin -20 °C:ssa ependorf-putkissa säilytysliuoksessa.

Immunofluoresenssivärjäykseen tehtiin parafiini- ja jääleikkeitä, joista jääleikkeet tehtiin itse. Niitä varten rotan ohutsuolen jokaisesta segmentistä leikattiin kaksi n. 1 cm:n pituista palaa. Palat asetettiin välittömästi petrimaljalle kylmään (+4 °C) 0,01 M fosfaattipuskuriin (Sigma-Aldrich), missä 2,7 mM KCl ja 137 mM NaCl. Mikroskoopin alla suolilieve poistettiin ja se avattiin saksilla. Suolen sisältö poistettiin kylmällä fosfaattipuskurilla. Suoli käännettiin ja kiinnitettiin parafiinipohjaiselle petrimaljalle metallikiinnikkeillä. Lihaskerros poistettiin tämän jälkeen pinseteillä. Jäljelle jäänyt epiteeli siirrettiin muovikuppiin, missä oli kaksi tippaa Tissue-Tek -matriisia (Thermo Scientific). Kudos peitettiin lopuksi matriisilla. Muovikuppia jäähdytettiin kuivajäissä 20 minuuttia, se peitettiin parafilmillä ja foliolla ja siirrettiin -80 °C:seen. Kryostaatissa (-20 °C) kudoksesta leikattiin 5 µm:n paksuisia leikkeitä preparaattilaseille. Lasit asetettiin muoviasiaan, jonne laitettiin silikageeliä kosteuden säilyttämiseksi. Astia teipattiin ja sitä säilytettiin muovipussissa -80 °C:ssa.

4.2 BCA-proteiinimääritys

Suolinäytteet homogenoitiin ja homogenaattien kokonaisproteiinipitoisuus määritettiin kaupallisen kitin avulla BCA:ta (bicinchoninic acid, bikinkoniinihappo) hyödyntävällä menetelmällä (liite 2). Menetelmä perustuu bikinkoniinihapon ja kupari-ionin välisessä reaktiossa muodostuneen värikompleksin absorbanssin määrittämiseen [13, s. 76]. Ensimmäisen vaiheen biurettireaktiossa proteiini pelkistää alkaalisessa liuoksessa kahdenarvoisen kuparin (Cu^{2+}) yhdenarvoiseksi (Cu^+). Tämän jälkeen pelkistynyt kupari-ioni reagoi kahden bikinkoniinihappomolekyylin kanssa, jotka muodostavat violetin värisen kompleksin, joka absorboi voimakkaimmin aallonpituudella 562 nm. Proteiinipitoisuuden määrittäminen on mahdollista, koska kompleksin absorbanssin ja näytteen proteiinipitoisuuden välillä on liki lineaarinen suhteisuus toisiinsa laajalla pitoisuusalueella (200—1200 µg/ml) [13, s. 78—80].

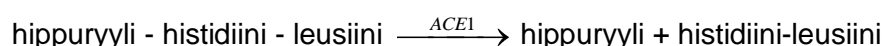
Kuparin pelkistyminen ja kompleksin muodostuminen Cu^+ :n ja bikinkoniinihapon kesken on riippuvainen proteiinin yksittäisistä aminohapoista ja eripituisten peptidien päätyrakenteesta sekä lämpötilasta. Yksittäisistä aminohapoista kysteiini, kystiini, tyrosiini ja tryptofaani hapettuvat lämpötilasta riippumattomassa reaktiossa pelkistäen kuparin. Peptidisidos hapettuu lämpötilasta riippuvassa reaktiossa erityisesti silloin, kun kysymyksessä on tripeptidi ja siten, että Cu^{2+} :n ja peptidin välille muodostuu tetradentaattikompleksi. [14, s. 231, 234.]

Menetelmässä näytteen proteiinipitoisuus määritetään standardikuvaajalta käyttämällä referenssiproteiinina naudan seerumin albumiinia (BSA). Haluttaessa spesifisempi tulos tulisi vertailuproteiinina käyttää näytematriisin tutkittavaa proteiinia [15, s. 2], kuten siis tässä työssä angiotensiinikonvertaasia, määritettäessä ohutsuolihomogenaattien kokonaisproteiinipitoisuutta.

4.3 Fluorometrinen aktiivisuusmittaus

ACE1:n aktiivisuus ohutsuolessa määritettiin fluorometrisellä menetelmällä 96-kuoppaveyllä (liite 3). Menetelmässä substraatista hippuryyli-histidiini-leusiini (HHL) hydrolysoituu lopputuotteina hippuryyli ja histidiini-leusiini (HL). Tämän opinnäytetyön menetelmässä histidiini-leusiini muodostaa reaktion pysäytyksen jälkeen *o*-ftaalialdehydin (OPA) kanssa fluoresoivan johdannaisen, jonka intensiteetti määritetään fluoresenssispektrofotometrisesti ($\lambda_{\text{EX}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 485 \text{ nm}$). [16, s. 1961.]

Menetelmän ensimmäisessä vaiheessa ACE1:n ja substraatin välisessä reaktiossa HHL-substraatti sitoutuu ACE1-entsyymiin sen COOH-terminaalisen pään kahden dipeptidin, HL, vaikutuksesta, joka on vastaava kuin angiotensiini I:n COOH-terminaalinen pää. Entsyymi hydrolysoi tämän jälkeen HL:n ja hippuryylin vapautumisen oheisessa reaktiossa, jota kiihdyttävät kloridin kaltaiset monoanionit pH-optimin ollessa 8,3–8,8. [17, s. 403, 406.]



Reaktio pysäytetään NaOH:lla, jolloin muodostuu samalla optimaaliset alkaaliset olosuhteet OPA:n ja HL:n väliselle reaktiolle. Reaktiossa OPA ja HL muodostavat fluore-

soivan kompleksin, jonka intensiteetti riippuu erityisesti yksittäisten aminohappojen rakenteesta ja pH:sta [18, s. 880—881].

Fluoresoivan johdannaisen intensiteetti kasvaa lineaarisesti puhtaan HL-vertailumateriaalin pitoisuuden funktiona. Vertailumateriaalin eri pitoisuuksia käytetään standardikuvaajan muodostamiseen, ja näytteen fluoresenssi-intensiteetin perusteella kuvaajalta lasketaan lineaarisella regressiolla reaktiossa syntyneen tuotteen määrä. Tuotteen määrä asetetaan vastaamaan inkubaatioajan aikayksikköä ja lopullinen ACE1-aktiivisuus ilmoitetaan muodossa *nmol tuotetta min⁻¹ mg⁻¹ kokonaisproteiini*.

4.4 Immunofluoresenssivärjäys

Parafiini- ja jääleikkeitä tutkittiin immunofluoresenssivärjäysmenetelmällä AT1-reseptorin ja ACE1:n tunnistamiseksi (liite 4). Immunofluoresenssivärjäysmenetelmissä vasta-aineet konjugoidaan kemiallisesti fluoresenssiväriaineiden kanssa, kuten fluoreysiini-isotiosyanaatti (FITC) tai tetrametyyli rodamiini-isotiosyanaatti (TRITC). Tällaiset leimatut vasta-aineet sitoutuvat suoraan tai epäsuorasti tutkittavan antigeenin kanssa. Antigeeni voidaan tällöin visualisoida esimerkiksi fluoresenssimikroskoopin avulla. [19, s. 61.]

Suora ja epäsuora värjäys ovat kaksi päämenetelmää immunofluoresenssivärjäyksessä. Suorassa menetelmässä tutkittavan antigeenin vasta-aineeseen on sidottu fluoresoiva väriaine. Epäsuorassa menetelmässä antigeenin vasta-aine on leimaamaton primaari vasta-aine. Tähän sidotaan leimattu sekundaarinen anti-immunoglobuliininen vasta-aine. Suoran menetelmän etuja ovat lyhyemmät värjäysajat ja yksinkertaisemmat toimenpiteet, jos halutaan käyttää useampia leimoja. Suora menetelmä antaa toisaalta heikon signaalin, on kustannuksiltaan korkeampi ja vähemmän joustava. Epäsuoran menetelmän etuja ovat signaalin suuri herkkyys, kun useat sekundaariset vasta-aineet voivat sitoutua yhteen primaariseen vasta-aineeseen. Toisaalta tästä muodostuu risti-reaktion vaara, jos primaariset vasta-aineet on tuotettu samassa eläinlajissa kuin sekundaariset. [19, s. 61.]

4.5 Western blot

Western blot -tekniikalla tutkittiin AT1-reseptorin ja ACE1:n vasta-aineilla niiden anti-geenia ohutsuolihomogenaateissa (liite 5). Western blot -menetelmässä näytteen proteiinit erotellaan polyakryyliamidigeelillä ja siirretään elektroforeettisesti nitroselluloosakalvolle. Kalvolla olevat proteiinit ”blokataan” sitoutumiskohtien kyllästämiseksi ja käsitellään vasta-aineella tai vasta-aineilla, joista toinen on sekundaarinen leimattu vasta-aine. Tämän jälkeen kalvolta tunnistetaan kuvantamalla antigeenit, joihin vasta-aine on sitoutunut. [20, s. 4350—4351.]

Ennen geelijaota proteiinien rakenne hajotetaan β -merkaptotoetanolilla. Tämä saa aikaan rikkisiltojen katkeamisen. Näytteisiin lisätty anioninen detergentti natriumdodekyylisulfaatti peittää proteiinien alkuperäisen varauksen alleen, mikä saa aikaan proteiinien kulkeutumisen geelillä niiden koon mukaan [21]. Tämän jälkeen ne siirretään elektroforeettisesti nitroselluloosakalvolle. Ollessaan vuorovaikutuksessa sähkökentässä kalvon kanssa, proteiinit siirtyvät kalvolle ja sitoutuvat siihen. Kalvolla olevat proteiinit käsitellään puskurilla, joka kyllästä kalvon pinnan. Tämä vähentää sitoutumispaikkojen määrää kalvolla ja vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista. Vasta-ainekäsittely voi tapahtua joko suoralla tai epäsuoralla menetelmällä. Kalvolle lisätään vasta-aine tai vasta-aineet. Epäsuorassa menetelmässä toinen, sekundaarinen vasta-aine, on leimattu. Leima ja kehityskemikaali muodostavat värin, joka voidaan havaita kuvantamalla. [20, s. 4350—4351.]

4.6 Tilastolliset menetelmät

Kalibrintisuorien muodostukseen käytetään lineaarista regressiota. Ryhmien välillä olevia tilastollisia eroja tarkastellaan yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Ryhmien välisen vertailun jatkotestinä käytetään yksisuuntaista t-testiä.

5 Tulokset

Näytteen kokonaisproteiinipitoisuus laskettiin kaavalla (1). Näytteen absorbanssi on kuoppalevyllä tapahtuneen spektrofotometrisen määrittelyn kahdesta kuopasta mitatun absorbanssin keskiarvo.

$$c_{näyte} (\mu\text{gml}^{-1}) = \frac{(\text{absorbanssi}_{näyte} - \text{blank}) + lp}{kk}, \quad (1)$$

lp = leikkauspiste

kk = kalibroitisuoran kulmakerroin

Kokonaisproteiinipitoisuus muutettiin muotoon $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ seuraavasti ottaen huomioon analyysin 10-kertainen laimennos.

$$c_{näyte} (\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}) = \frac{c_{näyte} (\mu\text{gml}^{-1}) \times 10}{10^3} \quad (2)$$

Näyte laimennettiin proteiinipitoisuuteen $3,3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ seuraavasti, kun selvitettiin lisättävän puskurin tilavuus $500 \mu\text{l}$:ssa näytettä.

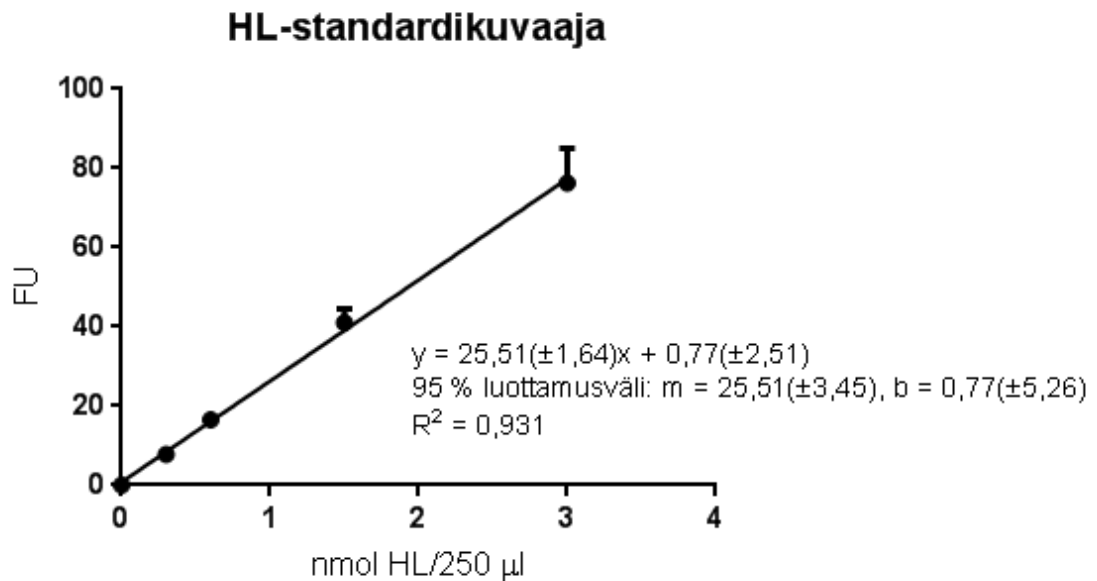
$$V_{puskuri} (\mu\text{l}) = \left(\frac{V_{näyte} (\mu\text{l}) \times c_{näyte} (\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1})}{3,3\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}} \right) - 500\mu\text{l} \quad (3)$$

ACE1-aktiivisuus kokonaisproteiinia kohti saatiin seuraavalla kaavalla. Näytteen fluoresenssi on kahden mittauksen keskiarvo.

$$\frac{(\text{fluoresenssi}_{näyte} - \text{blank}_{näyte}) - lp}{kk \times 60 \text{ min} \times (3,3 \times 10^{-3}) \text{ mg}} \quad (4)$$

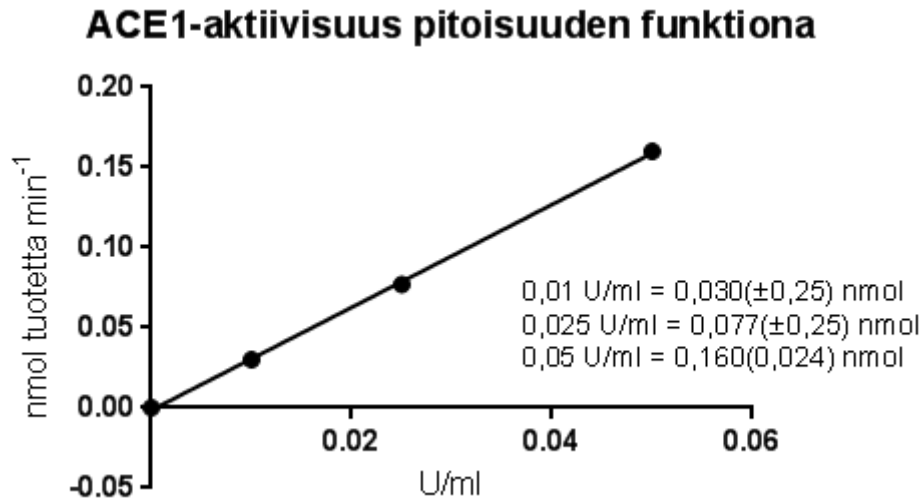
5.1 ACE1-aktiivisuusmäärityksen kalibrointi ja ACE1-vertailumateriaali

Kuviossa 1 on kalibrointisuora, joka sisältää neljän mittaussarjan tulokset neljältä erilliseltä päivältä. Jokaisessa mittaussarjassa jokaiselle standardipitoisuudelle tehtiin rinnakkaismittaus. Kuvion 1 standardit on valmistettu 5 mM HL-kantaliuoksesta laimentamalla 0,1 M boraattipuskurilla (pH 8,3), missä on ollut 0,8 M NaCl-pitoisuus.



Kuvio 1. ACE1-aktiivisuusmäärityksen kalibrointikuvaaja, missä fluoresenssi (FU) on y-akselilla ja HL-standardipitoisuus x-akselilla. Tulokset ovat neljästä mittaussarjasta. Jokaiselle standardipitoisuudelle on tehty rinnakkaismittaus. Fluoresenssin epävarmuus on ilmoitettu muodossa keskiarvo \pm SEM (keskiarvon keskivirhe). Lineaarilla regressiolla on muodostettu kalibrointikuvaaja, jonka kulmakertoimen ja leikkauspisteen virhe sekä niiden 95 %:n luottamusvälit on esitetty kuviossa.

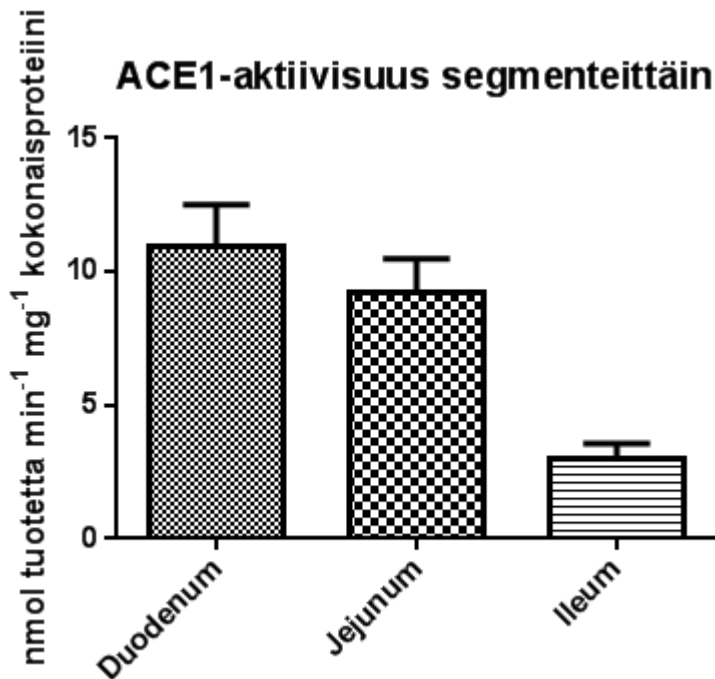
Kaniinin keuhkoista eristetyn puhtaan ACE1:n tyypillinen kuvaaja on esitetty kuviossa 2. Kuvaaja on yksittäisestä määrityksestä, johon eri pitoisuudet (U/ml) entsyymiä valmistettiin ACE1:n 0,1 U/ml kantaliuoksesta. Liuokset on tehty 50 mM HEPES-puskuriin (pH 8,3), missä on ollut 0,3 M NaCl-pitoisuus. Määrittelyn substraatti on ollut 10 mM HHL 0,1 M boraattipuskurissa (pH 8,3) 0,8 M NaCl-pitoisuudella. Näytteitä on inkuboitu 60 minuuttia 37 °C:ssa.



Kuvio 2. Kaniinin keuhkoista eristetyn puhtaan ACE1:n aktiivisuuden ($\text{nmol tuotetta min}^{-1}$) riippuvuus pitoisuudesta (U/ml). x-akselilla ACE1-pitoisuus on ilmaistu aktiivisuusyksikkönä U/ml ja y-akselilla reaktiossa muodostunut tuote aikayksikössä. Tulokset ovat yhdestä mittaussarjasta, jossa jokaiselle standardipitoisuudelle on tehty rinnakkaismittaus. Kunkin pitoisuuden epävarmuus kuvaa tuotteen määrän virhettä. Muodostuneen tuotteen määrä laskettiin saman sarjan kalibrointikuvaajan perusteella.

5.2 ACE1-aktiivisuus ohutsuolen segmenteissä

Kuviossa 3 on esitetty ACE1-aktiivisuuden jakautuminen ohutsuolessa segmenteittäin. Tulokset ovat 18 eläimestä. Mahdollisista rinnakkaishomogenaattien aktiivuuksista on tuloksiin otettu aktiivuuksien keskiarvo. Kukin homogenaatti on laimennettu määrittelyssä saatuun pienimpään proteiinipitoisuuteen, $3,3 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \text{ M}$ boraattipuskurilla (pH 8,3), missä on ollut $0,8 \text{ M}$ NaCl-pitoisuus. Määrittelyssä on käytetty 10 mM HHL-substraattia $0,1 \text{ M}$ boraattipuskurissa (pH 8,3) $0,8 \text{ M}$ NaCl-pitoisuudella. Näytteitä on inkuboitu 60 minuuttia $37 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa.



Kuvio 3. Angiotensiinikonvertaasientsyymiin (ACE1) aktiivisuuden jakautuminen ohutsuolen segmenteissä (epiteeli ja lihaskudos yhdessä). Tulokset ovat muodossa keskiarvo \pm SEM. Ryhmien välille tehtiin yksisuuntainen ANOVA-analyysi: $P < 0,0001$ ja lisäksi seuraavat yksisuuntaiset t-testit kahdenkeskisen vertailun jatkotestinä: duodenum vs. jejunum, $P \leq 0,2037$, duodenum vs. ileum, $P \leq 0,0001$ ja jejunum vs. ileum, $P \leq 0,0001$. $n = 18$.

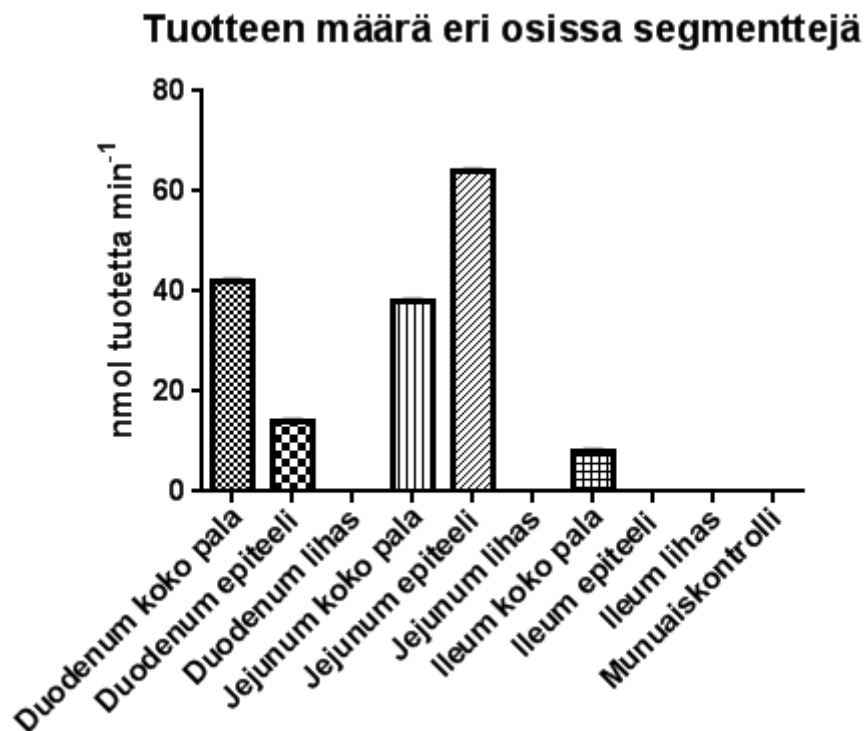
Kuvion 3 selitteen ANOVA-analyysi osoittaa, että ryhmien välinen vaihtelu on tilastollisesti merkitsevä 95 %:n luottamustasolla, eikä se siis selity ainoastaan mittausepävarmuudella. Näin on myös, kun verrattiin t-testillä annetulla luottamustasolla (95 %) aktiivisuuden vaihtelua duodenumin ja ileumin sekä jejunumin ja ileumin välillä. ACE1-aktiivisuutta on siis ohutsuolessa kaikissa segmenteissä. Korkeinta aktiivisuus on duodenumissa ja jejunumissa. Ileumissa aktiivisuus on merkittävästi pienempi kuin duodenumissa ja jejunumissa.

5.3 ACE1-aktiivisuus ohutsuolen segmenttien eri osissa

Kuviossa 4 on esitetty reaktiossa muodostuneen tuotteen määrä. Kysymyksessä on yhden mittaussarjan tulokset. Kuviossa duodenumin ja ileumin kokonaista suolipalaa edustaa yhden eläimen kahden suolipalan homogenaattien keskiarvo ja jejunumin kokonaista suolipalaa yhden suolipalan homogenaatti. Kaikkien segmenttien epiteeli- ja lihasnäytteet ovat kokoomanäytteitä neljästä eläimestä. Kokoomanäyte muodostettiin

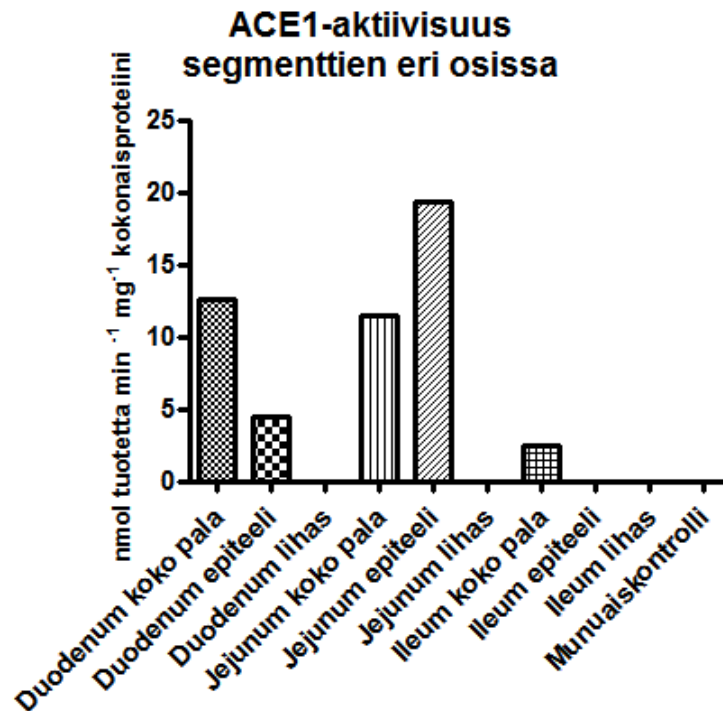
yhdistämällä eläimistä saadut näytteet, kun yhdestä eläimestä otettiin aina yksi näyte segmenttiä kohti. Munuaisverrokkia edustaa yhden eläimen munuainen.

Kaikkien muiden näytteiden homogenaatit, paitsi lihasnäytteiden ja toisen munuaisnäytteen, on kokeeseen laimennettu proteiinipitoisuuteen 3,3 µg/ml 0,01 M boraattipuskurilla (pH 8,3), missä on ollut 0,4 M NaCl-pitoisuus. Lihas- ja munuaisnäytteet olivat homogenointiin käytetyssä ELISA-puskurissa (pH 7,4), missä oli 136 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,46 mM KH₂PO₄ ja 0,001 % Tween 20. Määrityksessä on käytetty 10 mM HHL-substraattia 0,01 M boraattipuskurissa (pH 8,3) 0,4 M NaCl-pitoisuudella. Näytteitä on inkuboitu 30 minuuttia 37 °C:ssa.



Kuvio 4. ACE1:n katalysoimassa reaktiossa muodostuneen tuotteen määrä segmentteittäin kokonaisessa suolipalassa, epiteelissä ja lihaksessa sekä munuaiskontrollissa. Tulokset ovat yhdestä mittausarjasta.

Kuviossa 5 näkyy kuviota 4 vastaavien näytteiden ACE1-aktiivisuus laskettuna kaavalla 4.

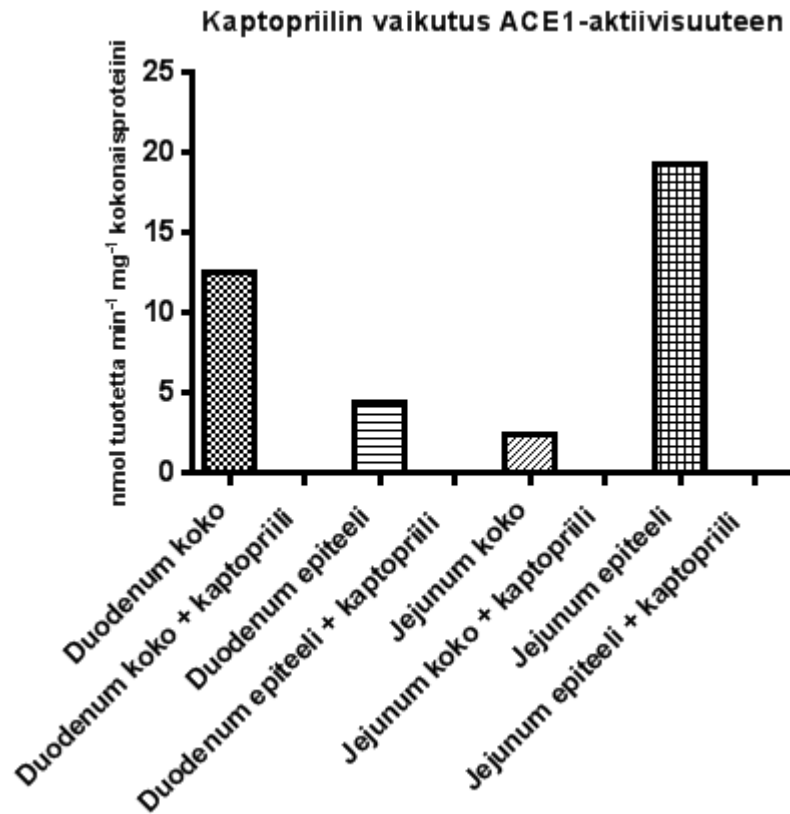


Kuvio 5. ACE1-aktiivisuus kokonaisessa suolipalassa, epiteelissä ja lihaksessa segmenteittäin sekä munuaiskontrollissa

Kuviot 4 ja 5 osoittavat aktiivisuudessa olevan eroja sen suhteen onko mittaus tehty käyttäen koko palaa, epiteeliä vai lihaskerrosta. Lihaskerroksessa aktiivisuutta ei ollut.

5.4 Kaptopriilin vaikutus ACE1-aktiivisuuteen

Kaptopriilin vaikutusta ACE1-aktiivisuuteen tutkittiin kuvion 4 mukaisilla näytteillä. Tuloksista (kuvio 6) on jätetty pois duodenumin rinnakkaishomogenaatti sekä molemmat ileumin homogenaatit johtuen epätavallisen suurista fluoresenssi-intensiteeteistä, kun kaptopriili oli läsnä. Reaktioseoksessa, jossa kaptopriili oli mukana, on siis tapahtunut reaktio OPA:n ja seoksen jonkin muun tai muiden yhdisteiden välillä. Kaptopriili liuotettiin 0,01 M boraattipuskuriin (pH 8,3), missä oli 0,4 M NaCl-pitoisuus ja lisättiin näytteen jälkeen ennen substraattia siten, että loppupitoisuus kuoppalevyllä oli 3,3 mM. Kaptopriilin lisäyksen jälkeen kuoppalevyn annettiin olla 5 minuuttia huoneenlämmössä. Näytteitä inkuboitettiin kaptopriilin läsnä ollessa 30 minuuttia 37 °C:ssa.



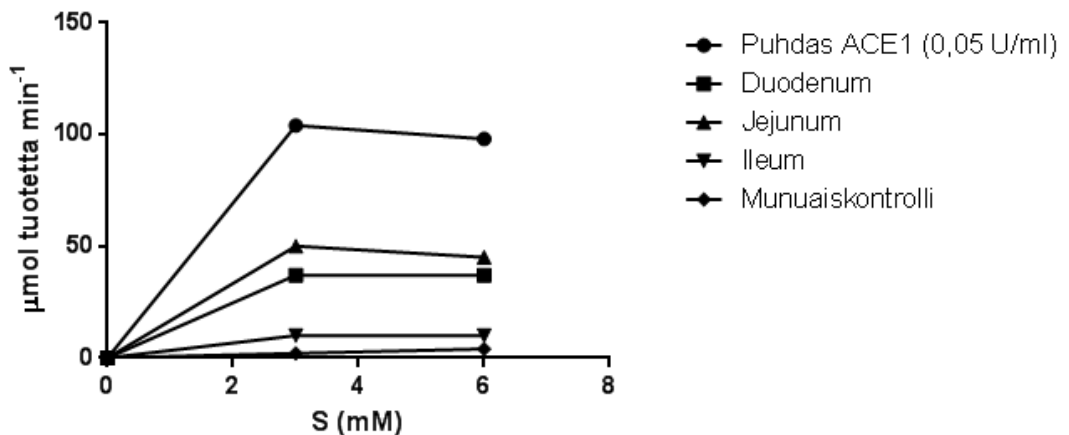
Kuvio 6. Kaptopriilin vaikutus kokonaisten suolinäytteiden ja epiteelinäytteiden ACE1-aktiivisuuteen segmenteittäin

Kaptopriili esti ACE1:n toiminnan mitatuissa näytteissä täydellisesti. Aktiivisuutta ei pystytty osoittamaan niistä näytteistä, joihin kaptopriilia oli lisätty.

5.5 ACE1-aktiivisuuden riippuvuus substraattikonsentraatiosta ja inkubaatioajasta

ACE1-aktiivisuuden riippuvuutta substraattikonsentraatiosta tutkittiin puhtaalla entsyymillä, munuaiskontrollissa ja suolihomogenaateissa (kuvio 7) sekä ilman substraattia että 3 mM ja 6 mM HHL-pitoisuudella. Substraatti valmistettiin 0,1 M boraattipuskuriin (pH 8,3), missä oli 0,8 M NaCl-pitoisuus. Sekä puhtaan entsyymin näytteitä että suolihomogenaatteja inkuboitettiin 60 minuuttia 37 °C:ssa.

ACE1-aktiivisuus substraattipitoisuuden funktiona

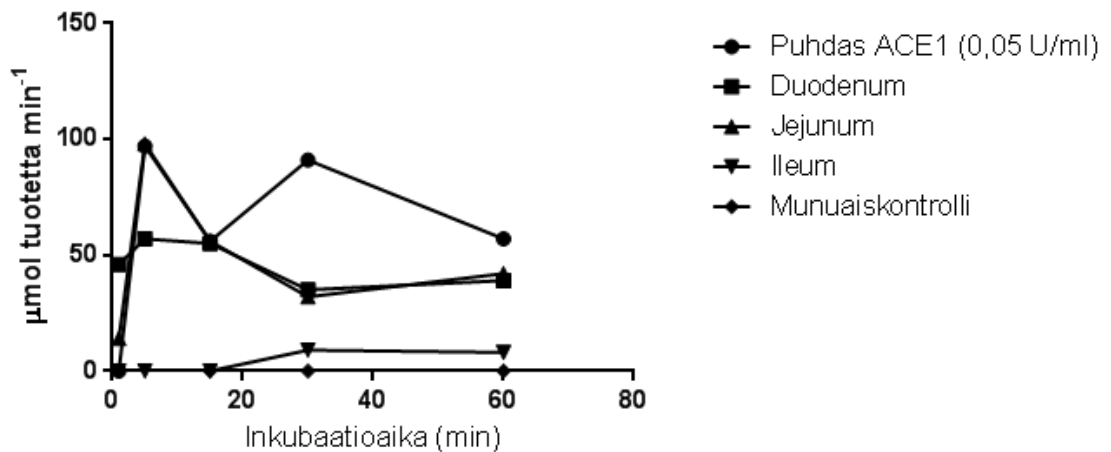


Kuvio 7. ACE1-aktiivisuuden riippuvuus substraattipitoisuudesta puhtaalla entsyymillä, kudoksetrollissa sekä suolihomogenaateissa kaikissa segmenteissä. Tulokset ovat yhdestä mittaussarjasta.

Kaikissa näytteissä lukuun ottamatta kudoksetrollia reaktion maksiminopeus saavutetaan, kun substraattipitoisuus on 3 mM.

Inkubaatioajan vaikutusta entsyymiaktiivisuuteen tutkittiin (kuvio 8) viidessä eri aikapisteessä 6 mM HHL-pitoisuudella (0,1 M boraattipuskuri, pH 8,3, 0,8 M NaCl) samoilla näytteillä, joilla tutkittiin substraattipitoisuuden vaikutusta. Inkubointilämpötila kaikissa aikapisteissä oli 37 °C.

ACE1-aktiivisuus inkubaatioajan funktiona

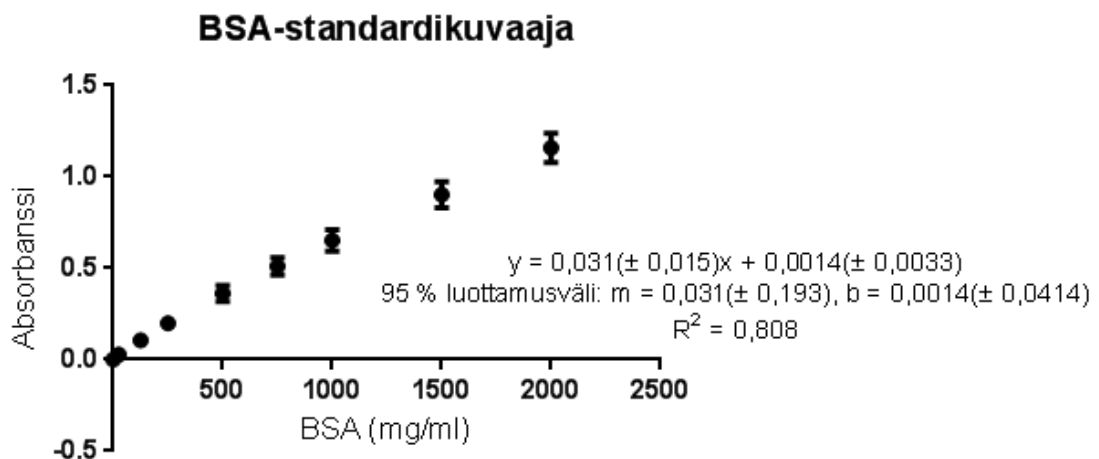


Kuvio 8. ACE1-aktiivisuuden riippuvuus inkubaatioajasta puhtaalla entsyymillä, kuduskontrollissa ja suolihomogenaateissa kaikissa segmenteissä. Tulokset ovat yhdestä mittausarjasta.

Puhtaalla entsyymillä aktiivisuus vaihtelee eri aikapisteissä, eikä selkeää aktiivisuuden maksimikohtaa havaita. Duodenumissa ja jejunumissa aktiivisuudessa saavutetaan maksimi 5 ja 10 minuutin aikapisteissä, eikä aktiivisuus tämän jälkeen enää kasva samalle tasolle, vaikkakin 60 minuutin inkubaatioajalla aktiivisuus molemmissa segmenteissä on hieman suurempi kuin 30 minuutin inkubaatioajalla. Ileumissa aktiivisuus kasvaa vasta 30 minuutissa huippuunsa, mutta ei enää nouse 60 minuutin inkubaatioajalla. Munuaiskontrollia tutkittiin näytteen vähäisyyden takia vain kolmessa suurimmassa aikapisteessä, mutta näissä aktiivisuutta ei havaittu.

5.6 Kokonaisproteiini

Ennen ACE1-aktiivisuusmäärittystä määritettiin suolinäytteiden kokonaisproteiinipitoisuus. Määrittelyn kalibrointi tapahtui naudan seerumin albumiinilla (BSA), jonka kanta-liuoksesta (2 mg/ml) tehtiin ELISA-puskuriin standardinäytteet. Kuviossa 9 on esitetty 12 mittausarjan tulokset. Jokaisessa mittausarjassa kullekin standardille tehtiin rinnakkaismittaus.

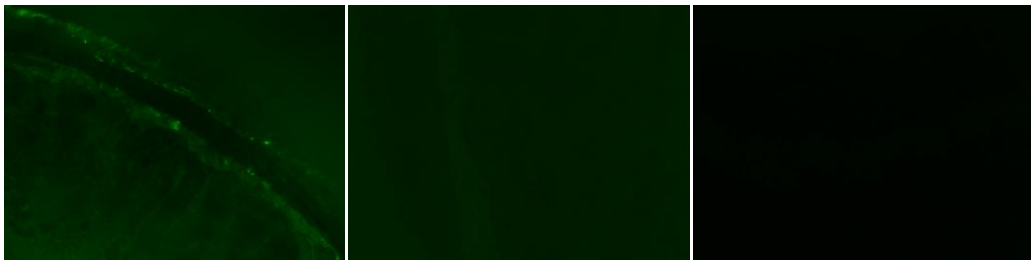


Kuvio 9. Kokonaisproteiinimäärittelyn BSA-standardikuvaaja. Tulokset ovat 12 mittausarjasta. Kullekin standardipitoisuudelle on tehty rinnakkaismittaus. Standardien virhettä kuvaa keskihajonta (SD).

5.7 Immunofluoresenssivärjäys (IF-värjäys)

IF-värjäyksellä pyrittiin tunnistamaan AT1R-reseptori ja ACE1-entsyymi epäsuoralla menetelmällä. Parafiinileikkeiden IF-värjäyksessä näytteen ja kontrollien välillä ei saatu useimmissa näytteissä selviä eroja näkyviin. Voimakkaan autofluoresenssin takia myös konjugaatti- ja puskurikontrollit näkyivät FITC-suodattimella voimakkaan vihreinä, vaikka ne eivät sisältäneet AT1R- tai ACE-vasta-ainetta. Joissakin tapauksissa sekä parafiini- että jääleikkeillä näytteissä, joista tutkittiin AT1-reseptoria, havaittiin taustafluoresenssin ohella kirkkaampia alueita, joita ei saman näytteen kontrolleissa havaittu tutkittua alueelta kudosta.

Kuvista 5, 6 ja 7 nähdään, että parafiinileikkeen näytteessä (Carl Zeiss Imager.M2, objektiivi EC PlnN 20x/0,3 DIC1, FITC-suodatin, 470 nm, 99 % intensiteetti, Axiocam HRm Rev 3 digital camera, 110 ms valotusaika) ileumista, joka sisältää AT1R-vasta-aineen (1:200 AT1 (N-10) rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz) ja FITC-konjugoidun sekundaarivasta-aineen (1:500 anti-rabbit FITC-conjugated IgG), taustasta erottuu kirkkaampia fluoresoivia kohtia, joita ei havaita kontroleissa (FITC-suodatin, 470 nm, 99 % intensiteetti, 110 ms valotusaika). Kirkkaammat alueet näytteessä voisivat siis viitata soluihin, jotka ovat AT1R-positiivisia. Ne sijaitsisivat siis seroosassa ja poikittaisessa lihaskerroksessa.

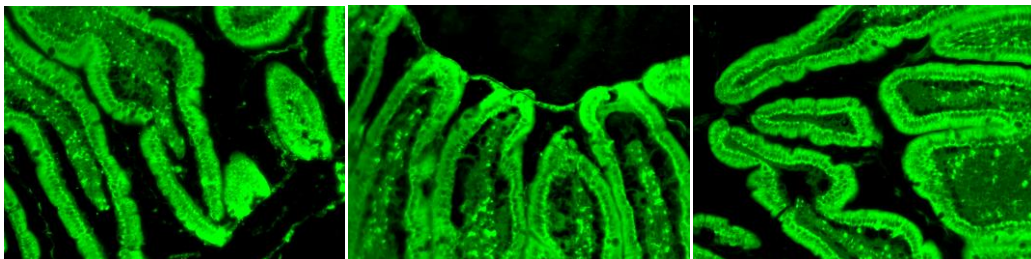


Kuva 5. Näyte

Kuva 6. Konjugaattikontrolli

Kuva 7. Puskurikontrolli

Toisaalta kuvissa 8, 9 ja 10, jotka ovat duodenumista, ei voida havaita eroja näytteen (FITC-suodatin, 470 nm, 90 % intensiteetti, 500 ms valotusaika, 1:50 AT1 (N-10) rabbit polyclonal IgG ja 1:125 anti-rabbit FITC-conjugated IgG) ja kontrollien (FITC-suodatin, 470 nm, 90 % intensiteetti, 500 ms valotusaika) välillä, kun tutkittiin AT1R-reseptoria.



Kuva 8. Näyte

Kuva 9. Konjugaattikontrolli

Kuva 10. Puskurikontrolli

5.8 Western blot (WB)

WB-analyysilla pyrittiin tunnistamaan AT1R ja ACE1 kudoshomogenaateista. Western blot -analyysistä ei saatu tulosta johtuen SDS-PAGE -ajossa ilmenneistä ongelmista sekä myöhemmin analyysissa tehdyistä virheistä. SDS-PAGE -ajossa jännite alkoi laskea, eikä sitä enää pystynyt nostamaan. Näytteet eivät enää kulkeutuneet geelillä tai kulkeutuvat hyvin hitaasti. Ajo lopetettiin kesken. Myöhemmin analyysissa ilmeni ongelmia, joiden takia skannattu kalvo oli hyvin tumma, eikä siitä erottunut näytevyöhykkeitä.

6 Pohdinta

Tässä opinnäytetyössä käynnistettiin fluoresenssispektrofotometrinen ACE1-aktiivisuusmäärittäminen suolistosairaiden potilaiden kliinisille näytteille. Tieto RAS-järjestelmästä on laajentunut, mutta sen fysiologiaa ja patofysiologiaa ei tunneta hyvin ohutsuolessa. Niinpä tällä menetelmällä voidaan myöhemmin osoittaa, onko ACE1-aktiivisuudella ja suolistosairauksilla yhteys.

Opinnäytetyön keskeinen tulos on, että ACE1-aktiivisuutta on rotilla ohutsuolessa. Korkeinta aktiivisuus on duodenumissa ja jejunumissa ja matalinta ileumissa. ACE1:n voidaan päätellä sijaitsevan epiteelissä, sillä epiteelinäytteet osoittivat aktiivisuutta toisin kuin lihaskerrosnäytteet, joihin epiteelinäytteitä verrattiin.

6.1 Menetelmien arviointi

Seuraavissa osakappaleissa on pohdittu käytettyjen menetelmien tarkoituksenmukaisuutta, niiden etuja ja mahdollisia haittoja sekä tulosten luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä. Tässä yhteydessä on pohdittu myös näytteiden laatua ja vertailukelpoisuutta.

6.1.1 Suoli- ja munuaiskontrollinäytteiden homogenointi ja kokonaisproteiinipitoisuuden määrittäminen

Suoli- ja munuaiskontrollinäytteet homogenoitiin helmillä. Osoittautui, että suoli ei homogenoitu täysin, koska homogoinnin jälkeen suolipala oli edelleen putkessa kiinteänä. Kuitenkin, kun tiedetään tutkittavan entsyymien sijaitsevan solukalvolla, on hyvin luultavaa että tällainen homogenointi riittää vapauttamaan entsyymien puskuriin etenkin, kun puskuuri sisältää vielä Tweeniä, joka on pinta-aktiivinen aine. Toisaalta mikäli haluttaisiin kudoksen hajoavan täysin, tähän tarvittaisiin tehosekoittimen kaltaista nopeasti pyörivää terää. Ei tiedetä, miten tällainen käsittely vaikuttaa tutkittavaan entsyymiin, rikkoutuisiko sen rakenne ja aktiivinen keskus, jolloin substraatti ei enää pystyisi sitoutumaan siihen.

BCA-proteiinimääritys on osoittautunut toimivaksi menetelmäksi kokonaisproteiinin määrittämiseksi biologisista näytteistä, myös kudoshomogenaateista [15]. Luotettavuuteen vaikuttaa, käytetäänkö standardina naudan seerumin albumiinia vai puhdistettua ACE1:a. Mittauksen ajankohtaa osana aktiivisuusmäärittäystä on myös pohdittava. Tehdäänkö se ennen aktiivisuusmäärittäystä, kuten tässä opinnäytetyössä, vai pakastetusta näytteestä aktiivisuusmäärittäyksen jälkeen. Jos kokonaisproteiinipitoisuus määritettäisiin aktiivisuusmittauksen jälkeen, säästettäisiin yksi sulatus-pakastus-sykli, jolla voisi olla vaikutuksensa aktiivisuuteen etenkin, jos entsyymi on herkkä monille pakastus-sulatus-sykleille. Kaikki suoli- ja munuaiskontrollinäytteet käsiteltiin työssä kuitenkin samalla tavalla, joten ne olivat vertailukelpoisia keskenään.

6.1.2 Fluorometrinen aktiivisuusmittaus

Menetelmää käytettiin kuoppalevyformaattissa, mikä mahdollistaa suuremmat näytemäärät kyvettimen menetelmään nähden. Lisäksi reagenssien kulutus pienenee. Fluorometrinen menetelmä ACE1-aktiivisuuden määrittämiseksi yleensä on varsin herkkä ja lineaarinen laajalla His-Leu -vertailumateriaalin pitoisuusalueella. Kuitenkaan OPA ei ole spesifinen sitoutumisessaan ACE1-substraatti -reaktion tuotteen kanssa vaan se reagoi monien peptidien kanssa. Näin suolihomogenaattien muutkin proteiinit ja peptidit vaikuttavat fluoresenssisignaalin syntyyn. Lineaarisuuden suhteen suolihomogenaattien fluoresenssisignaali sijoittui kalibroitisuoran alkupäähän, jolloin kalibroitipisteitä tulisi olla tiheämmässä alkupäässä. Lisäksi muut peptidit saattavat pilkkoa syntynyttä tuotetta, jolloin määritetty ACE1-aktiivisuus voi olla liian pieni todelliseen aktiivisuuteen

nähdän [22, s. 225–228]. Näin ollen inkubaatioajan optimointi on tärkeä luotettavuuteen vaikuttava seikka, jotta dipeptidaasit pilkkoisivat syntynyttä tuotetta mahdollisimman vähän.

6.1.3 IF-värjäys

Kudosvärjäyksellä pystytään tunnistamaan proteiineja ja niiden sijaintia kudoksessa. Tässä työssä tehtiin kudosvärjäyksiä sekä parafiinileikkeistä että jääleikkeistä. Fiksaus on värjäyksen ensimmäinen vaihe, ja sillä saadaan kudoksen biologinen aktiivisuus vaimennettua, ja toisaalta voidaan vaikuttaa proteiinien keskinäiseen vuorovaikutukseen ristisilloittamalla niitä, kuten tapahtuu paraformaldehydifiksauksessa. Tässä työssä parafiinileikkeet fiksattiin laskevalla alkoholisarjalla ja jääleikkeet paraformaldehydillä. Värjäysmenetelmää oli käytetty aiemmin farmakologian osastolla juuri kudosvärjäykseen sekä solujen värjäykseen. Menetelmässä käytetään epäsuoraa värjäystä, missä käytetään kahta vasta-ainetta, joista toinen on leimattu. Tämä on etu signaalin kannalta, mutta ristireagoinnin vaara kasvaa. Jääleikkeissä saatetaan menettää kudoksen morfologian kannalta tärkeää informaatiota, mutta toisaalta monien entsyymien ja anti-geenien aktiivisuus säilyy.

6.1.4 WB

Western blot mahdollistaa proteiinien karakterisoinnin proteiineja sisältävistä seoksista, kuten kudoshomogenaateista. Se on kuitenkin herkkä menetelmä, koska se sisältää monta vaihetta. Proteiinien elektroforeettisessa erottelemisessä toisistaan koon perusteella geelillä proteiinit voivat ajautua esimerkiksi vinoon, jos geeliä ajetaan liian kovalla jännitteellä tai sitten proteiinit eivät erotu, mikäli jännite on liian alhainen tai jos tulee teknisiä ongelmia, kuten tässä työssä tapahtui.

Vasta-aineiden pitoisuudet tulee optimoida aina, kun otetaan käyttöön vasta-aine, jonka antigeenia ei ole aiemmin tutkittu. Siksi useiden vasta-ainepitoisuuksien käyttäminen samassa ajossa on ainakin alussa suotavaa. ”Blokkausessa” nitroselluloosakalvo tulee kyllästää hyvin puskurilla, jotta vältetään vasta-aineiden epäspesifiseltä sitoutumiselta. Myös sekundaarisen vasta-aineen pitoisuus tulisi optimoida mentäessä kohti detektiovaihetta ja kuvantamista, jossa voidaan säätää kuvantamislaitteella eri muuttujia.

6.2 Tulosten tarkastelu

Seuraavassa on pohdittu käytettyjen menetelmien keskeisiä tuloksia.

6.2.1 ACE1-aktiivisuus

Työn tarkoitus saavutettiin, sillä aktiivisuudessa havaittiin eroja ohutsuolen segmenttien välillä. Aktiivisuus oli korkein duodenumissa ja jejunumissa, mikä vahvistaa aiempia havaintoja [23, s. G469]. Näiden välillä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Matalin aktiivisuus mitattiin ileumissa. Ileumin ja muiden segmenttien välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero, joka ei selity mittausepävarmuudella. Aktiivisuuden mittauksen luotettavuutta kudoksessa pienentävät munuaiskontrollissa mitatut vain hyvin pienet aktiivisuudet tai fluoresenssisignaalit, jotka eivät riittäneet aktiivisuuden osoittamiseen. Tämä voi johtua munuaisnäytteiden säilytysliuoksesta ja siitä, että ne oli käsitelty eri tavalla.

Aktiivisuutta tarkasteltiin pääasiassa kokonaisessa suolipalassa. Kun epiteeli ja lihaskerros eristettiin, osoittautui että epiteelissä aktiivisuutta oli, mutta lihaskerroksessa alle menetelmän määritysrajan. Kaptopriili esti korkeassa pitoisuudessa sekä puhtaan ACE1-entsyymin että näytteiden aktiivisuuden täysin. Havainnon merkitystä vähentää se, että kaptopriilin pitoisuus oli tarpeettoman suuri verrattuna aikaisempiin tutkimuksiin, joissa IC50-arvot (lääkeaineen pitoisuus, jossa puolet biologisista prosesseista estyy) ovat olleet mikromolaarisella alueella [24, s. 783]. Spesifisellä ACE1-estäjällä saatu täydellinen entsyymiaktiivisuuden esto kuitenkin vahvistaa sitä, että ohutsuolesta mitattu entsyymi oli ACE1.

Substraatin ja inkubaatioajan vaikutusta tutkittaessa osoittautui, että 3 mM substraattipitoisuus tuotti 60 minuutin inkubaatioajalla korkeimman aktiivisuuden, kun käytössä oli vain kaksi substraattipitoisuutta ja yksi inkubaatioaika. Substraattipitoisuuden ollessa vakio ja inkubaatioaikojen vaihdeltaessa korkeimmat aktiivisuudet havaittiin duodenumissa ja jejunumissa jo 1 minuutin inkubaatioajalla. Myös puhtaan ACE1:n aktiivisuus oli korkeimmillaan käytettäessä lyhyttä inkubaatioaikaa. Ileumissa aktiivisuus oli mitattavissa vasta 30 ja 60 minuutin inkubaatioajoilla.

6.2.2 IF-värjäys

On luultavaa, että parafiinileikkeiden IF-värjäyksissä havaitut kirkkaammin fluoresoivat alueet olivat AT1R-positiivisia soluja. Tämä havaittiin erityisen selvästi ileumin (kuvat 4., 5. ja 6.) seroosassa ja lihaskerroksesta. Aiemmissä tutkimuksissa AT1R on havaittu ohutsuolessa rotalla ja ihmisellä lihaskerroksesta, mutta ei kuitenkaan välttämättä IF-värjäyksellä vaan WB-analyysillä [12, s. 36]. Havainnon luotettavuutta heikentää kuitenkin se, että hyvin usein näytteiden ja kontrollien välillä ei havaittu eroja. Molemmissa leiketyppeissä, parafiini- ja jääleikkeissä taustafluoresenssi oli voimakasta. Kudoksen proteiinit siis autofluoresoivat luonnostaan, mikä haittaa tällaisen menetelmän käyttöä. On myös hyvin luultavaa, että vasta-aineet ovat sitoutuneet epäspesifisti. Tällaista voi yrittää ehkäistä suorittamalla esimerkiksi pesuvaiheet useilla erillä tuoretta puskuria.

Usein ongelmana oli kirkkaan kentän ja FITC-suodattimella otettujen kuvien yhdistäminen hyvälaatuiseksi kuvaksi, joka olisi paljastanut paremmin mahdollisen tunnistetun antigenin sijainnin kudoksessa. Nyt tulokset olivat vain yhdellä kanavalla saatuja. Tunnistamista heikensi myös se, ettei tumavärjäyksen ja fluoresoivan värjäyksen yhdistäminen onnistunut.

Jääleikkeissä ongelmana oli myös taustan korkea värjäytyvyys, mutta joissakin tapauksissa jälleen AT1R-näytteissä taustasta erottui voimakkaampia fluoresoivia alueita. Jääleikkeissä epiteeli oli osittain hajonnut johtuen luultavasti liian vähäisestä harjoittelusta kudoksenäytteenotossa.

6.2.3 WB

Käytännön työhön käytettävän ajan umpeuduttua WB-menetelmällä ei saatu varmistettua AT1R-reseptorin ja ACE1-entsyymin olemassaoloa rotan ohutsuolessa. Varmistus siirtyy syksyllä 2013 tehtäviin jatkotutkimuksiin.

6.3 Jatkotutkimukset

Fluorometrista aktiivisuusmenetelmää voidaan edelleen kehittää kliinisten näytteiden ACE1-aktiivisuuden mittaamiseksi. Menetelmässä voidaan optimoida käytettävää puskuria, sen pitoisuutta sekä puskurissa olevaa kloridipitoisuutta, jotta selviäisi ACE1-

entsyymille optimaaliset olosuhteet juuri ohutsuolessa. Optimaalisinta substraattipitoisuutta ja inkubaatioaikaa voidaan myös etsiä. Määrityksen sujuvuuden kannalta reaktioiden suorittaminen Eppendorf-putkissa lämpöhauteessa saattaisi olla myös tutkimisen arvoista.

Järjestelmän komponentteja on mahdollista tunnistaa useilla biokemiallisilla menetelmillä, kuten esimerkiksi Western blot -analyysillä ja 2D-elektroforeesilla. Fluorometrisen aktiivisuusmenetelmän rinnalla voidaan käyttää esimerkiksi matriisiavusteista laser desorptioionisaatiotekniikkaa lentoaikamassaspektrometrilla (MALDI-TOFMS) tai LC-MS-menetelmää, joilla pystytään identifioimaan RAS:n komponentteja massaspektrin perusteella ja verrata tätä tietoa tietokannassa oleviin tietoihin. MALDI-TOFMS:n ja LC-MS:n käyttäminen farmakologian osastolla ei ole kuitenkaan mahdollista.

Molekyylibiologisia menetelmiä käyttäen on mahdollista tutkia järjestelmän keskeisten peptidien, entsyymien ja reseptorien RNA-ekspressiota RT-PCR-tekniikalla tai DNA:n määrää qPCR-menetelmällä.

7 Päätelmät

ACE1-aktiivisuutta on ohutsuolessa rotalla kaikissa segmenteissä, ja suurinta se on duodenumissa ja jejunumissa. Tämä vahvistaa aiempia tuloksia. Edelleen aktiivisuutta on epiteelin ja lihaskerroksen suhteen lähes yksinomaan epiteelissä. Näin ACE1 sijaitisi ohutsuolessa epiteelissä tai lähellä sitä. Myös tämä tukee aiempia tutkimuksia angiotensiinikonvertaasientsyymistä ohutsuolessa. Lisäksi kaptopriili estää ACE1-aktiivisuuden ohutsuolessa. Vaikka käytetty pitoisuus oli tarpeettoman suuri aiemmissä tutkimuksissa käytettyihin pitoisuuksiin, voi tällä olla kliininen merkitys, sillä suolistosairauksien lääkehoidossa kaptopriili olisi täten yksi vaihtoehto. Näyttää siltä, että käytetty menetelmä ACE1-aktiivisuuden määrittämiseksi soveltuu myös kliinisiin potilasnäytteisiin.

Lähteet

- 1 Paakkari, I. & Mervaala, E. 2013. Verisuonia laajentavat lääkkeet. Teoksessa: Koulumäki, M. & Mervaala, E. (toim.). Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Medicina.
- 2 Griendling, K., Murphy, T. & Alexander, R. 1993. Molecular biology of the renin-angiotensin system. Review. *Circulation*, Vol. 87, nro 6, s. 1816—1828.
- 3 Luhtala, S. 2009. Activities of angiotensin-converting enzymes (ACE1, ACE2) and inhibition by bioactive tripeptides (IPP, VPP, LPP) in porcine ocular tissues. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto: Bio- ja ympäristötieteiden laitos.
- 4 Morton, J. 1993. Biochemical aspects of the angiotensins. Teoksessa: Robertson, Ian & Nicholls, Gary (toim.). *The Renin-Angiotensin System*, Vol. 1: biochemistry, physiology. London: Gower Medical Publishing.
- 5 Tipnis, R. ym. 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, nro 43, s. 33238—33243.
- 6 Hamming, I. ym. 2004. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology*, Vol. 203, nro 2, s. 631—637.
- 7 Chappel, C. 2007. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension*, Vol. 50, nro 4, s. 596—599.
- 8 Garg, M. ym. 2012. Review article: the pathophysiological roles of the renin-angiotensin system in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 35, nro 4, s. 414—428.
- 9 Collin, P. 1998. Ohutsuoli. Teoksessa: Höckerstedt, K., Färkkilä, M., Kivilaakso, E. & Pikkarainen, P. (toim.). *Gastroenterologia*. Helsinki: Duodecim.
- 10 Nienstedt, W., Rautiainen, E., Pernaa, M. & Salmi, U. (toim.). 2000. Lääketieteen termit. Helsinki: Duodecim.
- 11 Shorning, B. ym. 2012. Intestinal renin-angiotensin system is stimulated after deletion of Lkb1. *Gut*, Vol. 61, nro 2, s. 202—213.
- 12 Ewert, S. ym. 2006. Angiotensin II induced contraction of rat and human small intestinal wall musculature *in vitro*. *Acta Physiologica*, Vol. 188, nro 1, s. 33—40.
- 13 Smith, P. ym. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, Vol. 150, nro 1, s. 76—86.

- 14 Wiechelman, J., Braun, D. & Fitzpatrick, D. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, Vol. 175, nro 1, s. 231—237.
- 15 Thermo Scientific. Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Julkaisuvuotta ei ole ilmoitettu. Verkkodokumentti. www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf. Luettu 4.7.2013.
- 16 Schwager, L., Carmona, K. & Sturrock, D. 2006. A high-throughput fluorimetric assay for angiotensin I-converting enzyme. *Nature Protocols*, Vol. 1, nro 4, s. 1961—1964.
- 17 Cheung, HS. ym. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme: Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 255, nro 2, s. 401—407.
- 18 Roth, M. 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry*, Vol. 43, nro 7, s. 880-882.
- 19 Robinson, P., Sturgis, J. & Kumar, G. 2009. Education guide: Immunohistochemical staining methods. Verkkodokumentti. www.dako.com/08002_03aug09_ihc_guidebook_5th_edition_chapter_10.pdf. Luettu 28.7.2013.
- 20 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 76, nro 9, s. 4350—4354.
- 21 Itä-Suomen yliopisto. 2006. Solunetti. Verkkodokumentti. http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/. Luettu 28.7.2013.
- 22 Friedland J., Silverstein E. 1977. Sensitive fluorometric assay for serum angiotensin-converting enzyme with the natural substrate angiotensin I. *American Journal of Clinical Pathology*, Vol. 68, nro 2, s. 225—228.
- 23 Erickson, R. ym. 1992. Rat intestinal angiotensin-converting enzyme: purification, properties, expression, and function. *American Journal of Physiology: gastrointestinal and liver physiology*, Vol. 263, nro 4, s. G466—G473.
- 24 Yoshioka, M. ym. 1987. Role of rat intestinal brush-border membrane angiotensin-converting enzyme in dietary protein digestion. *American Journal of Physiology*, Vol. 253, nro 16, s. G781—G786.

Työssä käytetyt eläimet

Eläimet ACE1-aktiivisuuden mittaamiseksi duodenumista, jejunumista ja ileumista sekä parafiinileikkeiden näytteiksi:

Sprague-Dawley (uros), Harlan, 6–7 vk. Rotille tehty 40 minuutin munuaisten iskemia sekä vasemmalle että oikealle, kipulääkitys Temgesic 0,1 mg/kg (vaikuttava aine buprenorfiini), joka annettu intramuskulaarisesti. Kontrollirotat maanneet 40 minuuttia kipulääkityksellä, mutta ilman iskemiaa.

24 h kuluttua iskemiasta rotat lopetettiin, nukutus: 3 % isofluraani (Virbac Animal Health), kantokaasuna Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂).

Eläimet ACE1-aktiivisuuden määrittämiseksi epiteelistä ja lihaskerroksesta sekä jääleikkeiden näytteiksi:

Lewis (naaras), Harlan, 14 vk. Lopetus 24 h kuluttua, nukutus: 3 % isofluraani (Virbac Animal Health), kantokaasuna Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂).

Suoli- ja munuaiskontrollinäytteiden homogenointi ja kokonaisproteiinin määrittäminen (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific)

1. Eppendorf-putkissa olevat suolipalat ja munuaiskontrollit sulatettiin jäissä ja siirrettiin jäissä jäähdytetyllä pinseteillä homogenointiputkeen. Putkeen lisättiin n. 10 helmeä ja 1 ml kylmää ELISA-puskuria, missä 136 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 8 mM Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich), 2,7 mM KCl (Sigma-Aldrich), 1,46 mM KH₂HPO₄ (Sigma-Aldrich) ja 0,001 % Tween 20 (Sigma-Aldrich).
2. Näytteet homogenoitiin (6000 rpm, 3 * 15 s) homogenisaattorissa (Precellys 24 Lysis & Homogenization, Bertin Technologies), joka oli jäähdytetty n. - 2 °C:seen cryoluskammiossa (Precellys 24, Bertin Technologies) olevalla nestetypellä.
3. Näytteet siirrettiin jäihin ja niiden annettiin tasoittua 15 minuuttia.
4. Nestefaasi siirrettiin jäissä jäähdytettyyn Eppendorf-putkeen. Näyte sentrifugoitiin (15 minuuttia, 12 000 rfc) kylmiössä olevalla sentrifugilla.
5. Supernatantti siirrettiin jäissä jäähdytettyyn Eppendorf-putkeen. Näytteitä säilytettiin jäissä jääkaapissa ennen niiden laimentamista.

Standardit

Seuraavat tilavuudet ELISA-puskuria ja BSA:ta (Thermo Fischer Scientific) yhdistettiin standardiliuoksiksi.

BSA (µg/ml)	STD	ELISA-puskuri (µl)	BSA (µl)
2000	A	0	60
1500	B	25	75
1000	C	65	65
750	D	35	35 B:tä
500	E	65	65 C:tä
250	F	65	65 E:tä
125	G	65	65 F:ää
25	H	80	20 G:tä
0	I	80	

Näytteet

Laimennettiin 1:10 (10 µl näytettä ja 90 µl ELISA-puskuria).

Määrittäminen

1. 25 µl standardeja ja näytteitä pipetoitiin 96-kuoppalevyille (Thermo Scientific) rinnakkaisiin kuoppiin.
2. 200 µl BCA-reagenssia (1:50 4 % CuSO₄:a ja bikarbonaattiliuosta, joka sisältää BCA:n) lisättiin kuoppalevyn kuoppiin. Sekoitettiin puolen minuutin ajan tasosekoittajassa.
3. Näytteitä inkuboitiin 30 minuutin ajan 37 °C:ssa, jonka jälkeen 30 minuuttia huoneenlämmössä.
4. Näytteiden absorbanssi mitattiin (Labsystems Multiskan RC) aallonpituudella 595 nm.

Angiotensiinikonvertaasientsyymin 1 (ACE1) aktiivisuuden määrittäminen fluoresenssispektrofotometrisesti

Alkuperäinen työohje: Fluorimetric assay for angiotensin I-converting enzyme, Schwager, L., Carmona, K. & Sturrock, D. 2006.

Standardit

Pipetoitiin seuraavat tilavuudet 5 mM histidiini-leusiini -vertailumateriaalia (Sigma-Aldrich) ja 0,1 M boraattipuskuria (natriumtetraboraattidekahydraatti, Sigma-Aldrich), pH 8,3 ja jossa oli 0,8 M NaCl (Sigma-Aldrich).

nmol HL/250 µl	5 mM HL (ml)	0,1 M boraattipuskuri (ml)
0	0	5,00
0,3	0,1	4,90
0,6	0,2	4,75
1,5	0,5	4,50
3	1,0	4,00

Määrittäminen

1. Näytteet (PCR-putkissa) sulatettiin huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin 10 minuuttia.
2. 96-kuoppalevyille (valkoinen, Nunc) pipetoitiin 30 µl standardeja, 10 µl puhdasta entsyymiä (0,1 U ACE from rabbit lung, Sigma-Aldrich) ja 30 µl näytteitä rinnakkaisiin kuoppiin. ACE1- ja näyttereaktionollisiin ei lisätty näytteitä.
3. Kaikkiin standardeihin ja näytteisiin lisättiin 30 µl NaOH:iin (Eka Chemicals) liuotettua ja boraattipuskurilla laimennettua HHL-substraattia (Sigma-Aldrich). Kuoppalevy asetettiin tasosekoitukseen. Sitä inkuboitiin 37 °C:ssa 60 minuutin ajan koko ajan sekoittaen.
4. Reaktio pysäytettiin 175 µl:lla 0,3 M NaOH:a (Eka Chemicals). Näytteet sekoitettiin tasosekoittajassa. 10 µl entsyymiä ja 30 µl kudoshomogenaattia lisättiin entsyymi- ja reaktionollanäytteiksi. Näytteet sekoitettiin tasosekoittajassa.

5. 15 μ l 2-prosenttista (20 mg/ml) *o*-ftaaliialdehydiä (Sigma-Aldrich) metanolissa lisättiin kaikkiin standardeihin ja näytteisiin, jotka sekoitettiin tasosekoittajassa. Näytteitä inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna.

6. 25 μ l 3 M HCl:a lisättiin jokaiseen käytössä olevaan kuoppaan. Näytteet sekoitettiin.

7. Näytteiden fluoresenssi mitattiin (Cary Eclipse fluorimetric plate reader, Varian) aallonpituuksilla $E_x = 360$ nm ja $E_m = 485$ nm.

Parafiini- ja jääleikkeiden immunofluoresenssivärjäys

Rotan parafiinileikkeiden IF-värjäys (alkuperäinen työohje: IF-värjäys hiiren parafiinileikkeille, Tuomas Heini 26.7.2011)

1. Leikkeet laitettiin kaksi kertaa ksyleeniin (Fischer Chemical) 5 minuutin ajaksi. Toisto tehtiin puhtaaseen ksyleeniin.
2. Leikkeet laitettiin 5 minuutin ajaksi seuraaviin etanoliliuoksiin (etanoli, Altia Oyj) vahvimasta laimeampaan: 95 %, 70 %, 50 %.
3. Leikkeet asetettiin 3 minuutiksi 1*TBS:ään (Tris-HCl, Sigma-Aldrich, NaCl, Sigma-Aldrich), jossa 0,05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich).
4. Joillekin leikkeille tehtiin tässä vaiheessa kuumennus sitraattipuskurissa (trinatriumsitraatti, Sigma-Aldrich), jossa 0,05 % Tween 20. Tämä tapahtui kuumassa vesihautteessa (n. 90 °C) tai mikroaaltouunissa.
5. Leikkeet pestiin (5 min) 1*TBS:llä (0,05 % Tween) kaksi kertaa.
6. Leikkeitä ”blokattiin” 2 h huoneenlämmössä 1*TBS:llä, jossa 1 % BSA:ta (Thermo Scientific).
7. Lasit kuivattiin varovasti pehmeällä paperilla.
8. Leikkeille lisättiin 10 µl primaarista vasta-ainetta (AT1 (N-10) rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz), josta oli tehty laimennokset (1:50, 1:200 tai 1:500) 1*TBS:ään, missä 0,01 % BSA. Kontrollileikkeille, konjugaatti- ja puskurikontrolli, lisättiin 10 µl vain 1*TBS:ää, missä 0,01 % BSA.
9. Leikkeitä inkuboitiin yön yli kylmiössä (+6 °C) astiassa, jossa oli mukana vedellä kostutettua talouspaperia kuivumisen estämiseksi.
10. Leikelaseja pestiin 5 minuutin ajan 1*TBS:llä (0,05 % Tween).

11. Lasit kuivattiin pehmeällä paperilla.

12. Vasta-aineella tutkittavan antigeenin leikkeelle lisättiin 10 µl sekundaarivasta-ainetta (anti-rabbit FITC-conjugated IgG), joka oli laimennettu (1:125, 1:500 tai 1:1000) 1*TBS:llä, missä 0,01 % BSA. Konjugaattikontrollileikkeelle lisättiin samalla tavalla sekundaarivasta-aine, mutta puskurikontrollille 10 µl vain 1*TBS:ää, missä 0,01 % BSA. Leikkeitä inkuboitiin 60 minuuttia huoneenlämmössä pimeässä.

13. Leikkeet pestiin 3*5 minuutin ajan 1*TBS:llä (0,05 % Tween).

14. Leikkeet kuivattiin pehmeällä paperilla. Peitinlasi kiinnitettiin pisaralla peittausainetta (ProLong Gold Antifade Reagent, Invitrogen). Jos tumat värjättiin, lisättiin pisara kiinnittävää DAPI:a (Vectashield Hard Set mounting medium with DAPI H-1500, Vector Laboratories), mutta ei Pro Long Gold Antifade Reagent:a.

15. Leikkeet laitettiin foliolla vuorattuun astiaan, missä oli mukana kosteaa talouspaperia. Leikkeitä pidettiin kahden vuorokauden ajan kylmiössä (+6 °C).

16. Leikkeet mikroskojettiin fluoresenssimikroskoopilla (Carl Zeiss Imager.M2, AxioCam HRm Rev 3 digital camera) käyttäen kirkkaan kentän valaistusta sekä FITC- ja DAPI-suodattimia useilla valotusajoilla ja reflektorien intensiteeteillä.

Jääleikkeiden protokolla oli muuten sama, mutta ne fiksattiin 4 % paraformaldehydillä 1*PBS:ssä (paraformaldehydi, Sigma-Aldrich, phosphate buffer saline, Sigma-Aldrich) laskevan alkoholisarjan sijaan. Fiksauksen jälkeen jatkettiin kohdasta 3.

Western blot

Alkuperäinen työohje: Western blot, Martta Raatikainen 28.7.2011.

Näytteiden käsittely

1.) 20 µl suolinäytteitä ja vasta-aineita (AT1 (N-10) rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz ja ACE (H-170) rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz) lisättiin 20 µl:aan Laemmlin näytepuskuria (950 µl näytepuskuria, Bio Rad ja 50 µl β-merkaptotetanolia, Sigma-Aldrich). Näytteet vorteksoitiin, keitettiin lämpöhauteessa 93,5 °C:ssa 5 minuutin ajan ja vorteksoitiin uudelleen.

2.) Näytteet laitettiin -20 °C:seen odottamaan ajoa.

SDS-PAGE

1.) Näytteet sulatettiin jäällä.

2.) Valmis geeli (Mini Protean TGX, Bio Rad) asetettiin ajolaitteeseen (Bio Rad) ja valmistettiin ajoon pipetoimalla kuoppiin kylmää 1*ajopuskuria (Bio Rad). Ajopuskuri kaadettiin ajokammioon.

3.) 20 µl näytteitä ja 5 µl molekyylipainostandardia (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) pipetoitiin geelin kuoppiin.

4.) Ajettiin 100 V:lla noin 15 minuuttia, 150 V:lla noin 30 minuuttia ja koko ajan laskevalla jännitteellä noin 15 minuuttia (140—130 V), jonka jälkeen ajo lopetettiin.

Blottaus Trans Blot Turbolla (Bio Rad)

1.) Alaosa siirtokitistä (Trans Blot Turbo PVDF/nitrocellulose starter kit, Bio Rad) siirrettiin laitteen kasettiin.

2.) Geeli poistettiin varovasti lasien välistä ja asetettiin alaosan päälle. Ilmakuplat rullattiin pois.

3.) Siirtokitin yläosa asetettiin geelin päälle ja ilmakuplat rullattiin pois.

4.) Kasetti työnnettiin laitteeseen ja ohjelmaksi valittiin Turbo ja 1 mini gels.

Blokkaus ja vasta-aineet SNAP i.d. -laitteella (Millipore)

1.) Kalvot asetettiin MilliQ-vedellä kostutettuihin "blot holdereihin". Ilmakuplat rullattiin pois ja kalvon päälle asetettiin suodatinpaperi. Ilmakuplat rullattiin jälleen pois.

2.) Blot holderit asetettiin laitteeseen ja siihen kaadettiin 30 ml 0,5 % maitojauhe-1*TBS-Tween -seosta, joka imettiin vakuamalla läpi.

3.) Vasta-ainekeräimet asetettiin laitteeseen ja lisättiin 3 ml primaaria AT1R:n vasta-ainetta (1:600 1*TBS-Tween), jota inkuboitiin 10 minuutin ajan ennen läpi-imua vakuamalla. Tämän jälkeen lisättiin 3 ml ACE1:n vasta-ainetta (1:600 1*TBS-Tween), inkuboitiin 10 minuuttia ja imettiin vakuamalla läpi. Vasta-ainekeräimet poistettiin.

4.) Kalvo pestiin kolme kertaa 30 ml:lla 1*TBS-Tweenia.

5.) Vasta-ainekeräin asetettiin laitteeseen ja 3 ml 1:10 000 1*TBS-Tweeniin laimennettua sekundaarista vasta-ainetta (anti-rabbit HRP, Bio Rad) lisättiin kalvolle. Sekundaarista vasta-ainetta inkuboitiin 10 minuuttia, jonka jälkeen se ajettiin vakuamalla läpi. Vasta-ainekeräin poistettiin.

6.) Kalvot pestiin 3*30 ml:lla 1*TBS-Tweeniä. Kalvo poistettiin blot holderista ja asetettiin 1*TBS-Tweeniin odottamaan detektointia.

Detektointi

1.) Detektioreagenssien (ECL Plus Detection Reagent Kit, GE Healthcare) annettiin tasaantua huoneenlämpöön. Tummassa putkessa sekoitettiin detektiokitin reagensseja A ja B ohjeen mukaan.

2.) Kehityskemikaali kaadettiin kalvon päälle kehitysastiaan, jossa kalvoa inkuboitiin 5 minuuttia.

3.) Ylimääräinen kehityskemikaali poistettiin valuttamalla. Kuvantamislaitteen (Fujifilm FLA-9000) lasi puhdistettiin MilliQ-vedellä pehmeää paperia käyttäen. Laitteen lasi kostutettiin MilliQ-vedellä kuvausalueelta ja kalvo laitettiin lasille varoen ilmakuplien muodostumista.

5.) ImageReader FLA-9000 -ohjelmalla kalvo skannattiin (PMT 400, ch. 1, pixel size 100 μm).