

Tomi Issakainen

# Angiotensiinijärjestelmä kokeellisessa suolisto- tulehduksessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalyttikko (AMK)  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
25.11.2014

## Alkusanat

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan biolääketieteen laitoksessa, farmakologian oppialalla lääketieteellisen ravitsemusfysiologian tutkimusryhmässä. Haluan kiittää työni ohjaajia professori Riitta Korpelaa, professori (emeritus) Heikki Vapaataloa, lehtori Tiina Soinista sekä erityisesti lähiohjaajaa, väitöskirjatutkija Hanne Salmenkaria, jonka väitöskirjatutkimuksen ajatusten pohjalta opinnäytetyön aihe sovellettiin.

Lisäksi haluan kiittää biolääketieteen laitoksen johtajaa, professori Eero Merivaalaa, osastonhoitaja Anneli von Behriä ja muuta farmakologian osaston henkilökuntaa opastuksesta ja neuvoista. Lämpimät kiitokset farmakologian osastolle viihtyisän työpaikan luomisesta opinnäytetyön aikana.

Helsingissä 25.11.2014

Tomi Issakainen

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Tomi Issakainen Angiotensiinijärjestelmä kokeellisessa suolistotulehduksessa</p> <p>41 sivua + 6 liitettä 25.11.2014</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Laboratorioalan koulutusohjelma</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Väitöskirjatutkija Hanne Salmenkari Professori Riitta Korpela Professori (emeritus) Heikki Vapaatalo Lehtori Tiina Soininen</p>
<p>Tämä opinnäytetyö toteutettiin Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan biolääketieteen laitoksessa, farmakologian oppialalla lääketieteellisen ravitsemusfysiologian tutkimusryhmässä.</p> <p>Reniini-angiotensiini -järjestelmä (RAS) on keskeinen elimistön elektrolyytti- ja nestetasapainon, sekä verenpaineen säätelijä. RAS toimii myös paikallisesti, ja sen komponentteja on osoitettu useista elimistön kudoksista ja elimistä. RAS:n toiminnan laajuutta täydentävät havainnot ns. vaihtoehtoisesta, angiotensiinikonvertaasientsyymi 2:n (ACE2) katalysoimasta signalointireitistä, ja sen osallisuudesta tulehdus- ja kudosisvauriossa yhdessä muiden paikallisesti toimivien RAS -komponenttien kanssa saattavat olla merkityksellisiä tulehduksellisia suolistosairauksia ajatellen.</p> <p>Opinnäytetyössä tutkittiin hiirille (n=5-8) aiheutetulla kokeellisella suolitulehdusmallilla RAS-järjestelmän keskeisten entsyymien, angiotensiinikonvertaasientsyymi 1:n (ACE1) ja ACE2:n ekspressiota proteiini- ja mRNA -tasolla ohut- ja paksusuolinäytteistä. RAS-järjestelmän komponenttien lisäksi opinnäytetyössä tutkittiin kolmea muuta tekijää ekspressiotasolla: TNF<math>\alpha</math> (tuumorinekroositekijä-alfa), LRH-1 (liver receptor homolog 1) ja CYP11B1 (11<math>\beta</math>-hydroxylase).</p> <p>ACE1:n ja ACE2:n proteiinipitoisuuksia määritettiin soveltamalla ja optimoimalla western blot -menetelmä. ACE1:n proteiinipitoisuutta määritettiin myös ELISA-menetelmällä. Kaikkien tutkittavien komponenttien mRNA ekspressiota mitattiin RT-qPCR-menetelmällä, jossa suunniteltiin komponenttien mRNA-sekvenssiä monistavat alukkeet, minkä jälkeen alukkeiden toimivuus testattiin ja suoritettiin varsinaiset ekspressioanalyysit.</p> <p>Tulokset eivät osoittaneet tutkittujen komponenttien pitoisuuksien muuttuvan suolistossa tilastollisesti merkittävästi suoritettua kokeellista suolistotulehdusmallissa.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>Reniini-angiotensiini-järjestelmä (RAS), angiotensiini-konvertaasientsyymi 1 (ACE1), angiotensiini-konvertaasientsyymi 2 (ACE2), kokeellinen suolistotulehdus, RT-qPCR, western blot, ELISA, DSS-malli.</p>

Author Title	Tomi Issakainen Angiotensin system in experimental intestinal inflammation
Number of Pages Date	41 pages + 6 appendices 25 November 2014
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Hanne Salmenkari, PhD student Riitta Korpela, Professor Heikki Vapaatalo, Professor (emeritus) Tiina Soininen, Lecturer
<p>This thesis was carried out in the Medical Nutrition Physiology research group at the Pharmacology Department of the Institute of Biomedicine in the Helsinki University Faculty of Medicine.</p> <p>The renin-angiotensin system (RAS) is a key regulator in body fluid and electrolyte homeostasis as well as in blood pressure. RAS can also be expressed locally, and its components have been located in many different organs and tissue types. Understanding of the RAS system's possible significance in inflammation has been widened by the discovery of the alternative RAS pathway involving angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). This alternative pathway together with the locally expressed RAS components may be significant in inflammatory bowel diseases.</p> <p>In this thesis, protein and mRNA expression of the RAS system's essential components, angiotensin-converting enzyme 1 (ACE1) and ACE2 were determined from small and large intestine samples acquired from the experimental mouse model for intestinal inflammation. In addition to the components of RAS, three other components were analyzed: Tumor necrosis factor alpha (TNF<math>\alpha</math>), Liver receptor homolog 1 (LRH-1) and 11<math>\beta</math>-hydroxylase (CYP11B1).</p> <p>Protein quantities of ACE1 and ACE2 were analyzed by western blot, for which purpose the method was adapted and optimized. ACE1 was also analyzed by ELISA. The mRNA expression quantities of all the components studied were assessed by RT-qPCR, to design the primers. Then, the primers were tested, and the actual expression analysis of the components was performed.</p> <p>Results did not show any statistically significant change in components concentrations in the experimental intestinal inflammation model.</p>	
Keywords	renin-angiotensin system (RAS), angiotensin-converting enzyme 1, angiotensin-converting enzyme 2, intestinal inflammation model, RT-qPCR, western blot, ELISA, DSS-model.

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	1
2.1	Klassinen reniini-angiotensiini-järjestelmä	1
2.2	ACE1	5
2.3	ACE2	6
2.4	Reniini-angiotensiini-järjestelmä suolistossa	6
2.4.1	Paikallinen reniini-angiotensiini-järjestelmä	6
2.4.2	RAS tulehduksellisissa suolistosairauksissa	7
2.5	Suolistotulehduksen tutkimusmallit hiirillä	9
2.6	Muut tutkimuksen kohteet tulehduksellisiin suolistosairauksiin liittyen	11
3	Tavoitteet	12
4	Menetelmät	12
4.1	Hiirikoe	13
4.2	Näytteiden käsittely	14
4.3	Kokonaisproteiinin määrittäminen	16
4.4	Western blot	16
4.5	RT-qPCR	19
4.6	ELISA	24
5	Tulokset	25
5.1	Western blot -optimoinnin tulokset	25
5.2	ELISA -tulokset	29
5.3	RT-qPCR-tulokset	31
6	Päätelmät	36
	Lähteet	38

## Liitteet

Liite 1. Käytetyt puskuriliuokset

Liite 2. Kudosnäytteiden homogenisointi

Liite 3. Western blot -menetelmä

Liite 4. Akryyliamidigeelit

Liite 5. Käytetyt alukeparit

Liite 6. Sulamispisteanalyysit

## Lyhenteet

5-ASA	5-aminosalicylic acid, 5-aminosalisylaatti
ACE1	Angiotensin-converting enzyme 1, angiotensiinikonvertaasientsyymi 1
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensiinikonvertaasientsyymi 2
Ang I	Angiotensin I, angiotensiini I
Ang II	Angiotensin II, angiotensiini II
Ang (1-7)	Angiotensin (1-7), angiotensiini (1-7)
AT1R	Angiotensin II Type I Receptor, angiotensiini II tyypin 1 reseptori
AT2R	Angiotensin II Type II Receptor, angiotensiini II tyypin 2 reseptori
BCA	Bicinchoninic acid, bikinkoniinihappo
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
CYP11B1	11 $\beta$ -hydroxylase
dCt	Delta-Ct
DNBS	Dinitrobenzene sulfonic acid, dinitrobentseeni-sulfonihappo
DSS	Dextran sodium sulfate, dekstraani natriumsulfaatti
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
HRP	Horseradish peroxidase, piparjuuriperoksidaasi
IBD	Inflammatory bowel disease, tulehduksellinen suolistosairaus
IBS	Irritable Bowel Syndrome, ärtyvän suolen oireyhtymä

LRH-1	Liver receptor homolog 1
NF	Normalization factor, normalisaatiotekijä
NRQ	Normalized relative quantity, normalisoitu suhteellinen pitoisuus
PCR	Polymerase chain reaction, polymeraasiketjureaktio
RAG	Recombination-activating genes
RAS	Renin-angiotensin system, reniini-angiotensiini –järjestelmä
RQ	Relative quantity, suhteellinen pitoisuus
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR, kvantitatiivinen käänteistraskriptiopolymeraasiketjureaktio
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-polyakryyliamidigeelelektroforeesi
TMB	Tetramethylbenzidine, tetrametyylibentsidiini
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid, 2,4,6-trinitrobenzeni-sulfonihappo
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha, tuumorinekroositekijä-alfa



## 1 Johdanto

Reniini-angiotensiini-järjestelmä (RAS) on keskeinen elimistön elektrolyytti-, nestetasapainon, sekä siihen liittyen verenpaineen säätelijä. Maksan syntetisoima angiotensinogeeni pilkotaan munuaisten erittämän reniinin katalysoimana angiotensiini I:ksi (Ang I), josta ACE1 muodostaa angiotensiini II:ta (Ang II), RAS-järjestelmän keskeistä verisuonia supistavaa yhdistettä. Tämän pitkään tunnetun järjestelmän lisäksi RAS:n komponenttien on osoitettu toimivan myös paikallisesti, ja käsitys sen mekanismeista ja signaalintireiteistä on laajentunut.

Klassisen RAS:n rinnalla toimii myös ns. vaihtoehtoinen RAS, joka saattaa edustaa klassiselle RAS:lle vastakkaisvaikutteista signaalintireittiä verisuonissa ja erilaisissa tulehdus- ja soluvauriutilanteissa. Tämän tiedon valossa on viime aikoina tutkittu RAS:n komponenttien paikallisia vaikutuksia tulehduksellisissa suolistosairauksissa.

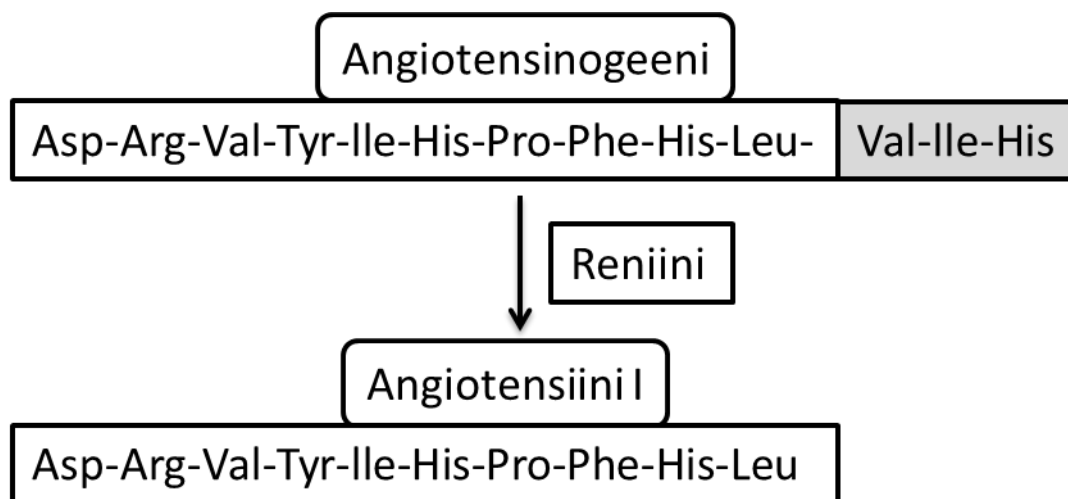
Tulehduksellisten suolistosairauksien (IBD) kaksi päämuotoa ovat Crohnin tauti ja haavainen paksusuolen tulehdus (colitis ulcerosa). Näistä kahdesta sairaudesta kärsii noin 0,5 % länsimaiden väestöstä ja kummatkin ovat syntymekanismeiltaan toistaiseksi tuntemattomia. Merkittävä osuus näistä sairauksista kärsivistä ei saavuta nykyisillä hoitomuodoilla pysyvää paranemista.

## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Klassinen reniini-angiotensiini-järjestelmä

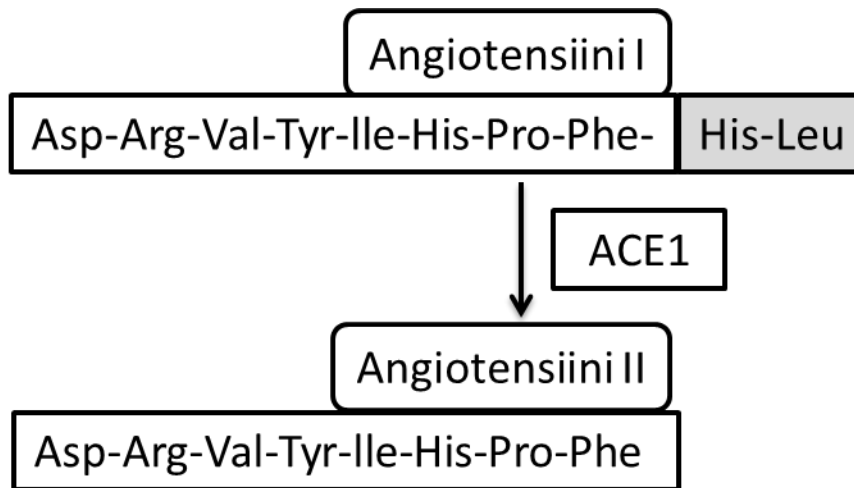
RAS on säätelyjärjestelmä, joka aktivoituu pääasiassa dehydraation, natriumin puutteen tai verenvuodon aiheuttaman veritilavuuden pienenemisen takia. Reniini on spesifinen proteolyttinen entsyymi, joka erittyy verenkiertoon munuaisten afferentin arteriolin jukstaglomerulaarisista soluista mm. silloin, kun suolatase on negatiivinen tai verenpaine laskee. Täsmällisemmin reniinin eritystä verenkiertoon säätelevät 1: sympaattisen hermoston aktivaatio  $\beta_1$  adrenoreseptorin kautta 2: munuaisvaltimon hypotensio eli alentunut verenpaine sekä 3: vähentynyt natriumpitoisuus distaalisissa munuaistiehyissä. [1; 2; 3.]

Reniini on RAS-järjestelmän kannalta merkittävä osatekijä siksi, että reniini-angiotensiini-järjestelmän tärkeimmän biologisesti vaikuttavan yhdisteen, angiotensiini II:n muodostumisnopeutta rajoittava tekijä on nimenomaan plasman reniiniaktiivisuus. Reniini pilkkoo veressä maksassa syntetisoitua angiotensinogeenia angiotensiini I:ksi. Tämä on RAS-järjestelmän aktivaation ensimmäinen vaihe (kuva 1). Angiotensinogeeni on maksassa syntetisoitava  $\alpha_2$ -globuliini ja ainoa tunnettu reniinin substraatti. Angiotensiini I:llä ei tiedetä olevan merkittävää biologista aktiivisuutta vaan sen merkitys lienee ainoastaan angiotensiini II:n esiasteena. [2; 4.]



Kuva 1 Angiotensinogeenin peptidisidos katkeaa N-terminaalisisesta päästä ja seurauksena muodostuu angiotensiini I.

Angiotensiini II on RAS-järjestelmän ehkä merkittävin biologisesti aktiivinen komponentti. Angiotensiini II muodostuu, kun Angiotensiini I:stä pilkotaan kaksi aminohappoa sen karboksiterminaalisisesta päästä. Tämä tapahtuu angiotensiinikonvertaasi 1:n eli ACE1:n katalysoimana (kuva 2). [2.]

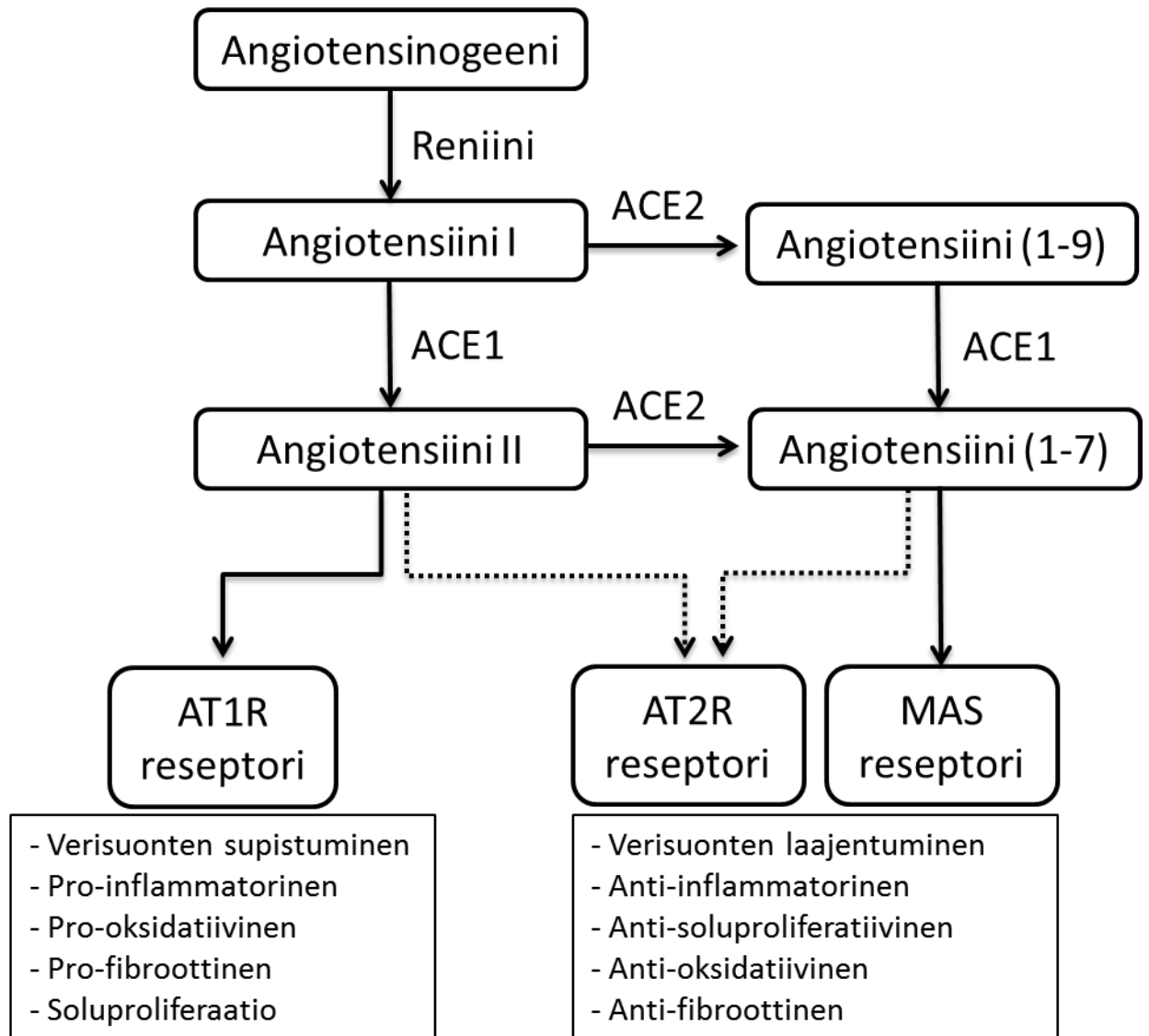


Kuva 2 ACE1 pilkkoo dipeptidin angiotensiini I:n karboksiterminaalista päästä ja seurauksena muodostuu kahdeksan aminohapon pituinen angiotensiini II.

Angiotensiini II:n tekee keskeiseksi sen voimakkaasti verisuonia supistava vaikutus elimistössä. Voimakkaimmin tämä vaikutus ilmenee ihossa, suoliston alueella ja munuaisissa, ja vähemmissä määrin aivoissa, sepelvaltimoissa, keuhkoissa ja luustolihasessa. [1.] Angiotensiini II aktivoi spesifisiä angiotensiinireseptoreja AT1R ja AT2R, jotka välittävät tunnetut angiotensiini II:n biologiset vaikutukset. Edellä mainittujen reseptorien suhteelliset määrät vaihtelevat kudoksittain AT1R:n ollessa useimpien kudosten pääasiallinen reseptori. Juuri AT1R-reseptori välittää angiotensiini II:n vasokonstriktiviset ominaisuudet verisuonissa. Muita AT1R:n välittämiä vasteita verisuonissa ovat mm. hypertrofia, migraatio, proliferatiivinen vaikutus, rakenneproteiinien synteesi ja oksidatiivinen stressi. AT1R-reseptorin omaavia kudoksia on mm. aivoissa, lisämunuaisten kuorikerroksessa, munuaisessa, kohdun sileälihaksessa, lisämunuaisten ytimessä ja maksassa. [2; 3.]

Angiotensiini II:n verisuonia supistavan vaikutuksen lisäksi sillä, ja sitä kautta myös koko reniini-angiotensiini -järjestelmällä, on oleellinen merkitys elimistön natriumtasapainon säätelyssä. Aldosteroni on lisämunuaisten kuorikerroksen erittämä hormoni, joka lisää natriumin takaisin imeytymistä distaalisisessa tubuluksessa ja kokoojaputkissa samalla lisäten kaliumin ja vedyn eritystä virtsaan. Angiotensiini II lisää aldosteronin eritystä lisämunuaisten kuorikerroksesta vaikuttaen sitä kautta elimistön natriumtasapainoon. Aldosteronilla on todennäköisesti myös suoria vaikutuksia verenpaineeseen. Aldosteroni on mineralokortikoidi-signaalintireitin keskeisin hormoni. Viime aikoina mineralokortikoidireseptoreita on löydetty muistakin kuin epiteelikudoksista, mm. sydämen ja verisuonten sileälihaskudoksista. Lisäksi suuremmat seerumin aldosteronipitoi-

suudet ja suuremmat aldosteroni-reniini-pitoisuussuhteet altistavat verenpainetaudin kehittymiselle. Nämä edellä mainitut seikat korostavat aldosteronin merkitystä hypertension patogeneesissä. Kuvassa 3 näkyy RAS-järjestelmä siltä osin kuin sitä tässä opinnäytetyössä käsitellään. Katkoviivoilla merkityt nuolet edustavat vähäisempää affiniteettia reseptoriin verrattuna normaalilla viivalla merkittyyn. [2; 33.]



Kuva 3 Reniini-angiotensiini -järjestelmä.

## 2.2 ACE1

Ihmisen ACE1 on molekyylipainoltaan 146,6 kDa, solukalvolle kiinnittyvä entsyymi. Hiiren ACE1 on molekyylipainoltaan 147,3 kDa, ja erittäin homologinen verrattuna ihmisen ACE1:een 1088 aminohapon 1312:sta ollessa identtisiä. ACE1 koostuu kahdesta homologisesta keskuksesta, N-terminaalista domeenista (Leu1–Pro601) ja C-terminaalista domeenista (Leu613–Pro1193). ACE1 on sinkistä ja kloridista riippuvainen sinkkimetallopeptidaasi, jonka optimaalinen pH-alue on 7,5-8,5. [21.]

ACE1 on kiinnittyneenä solukalvolle sen C-terminaalisen hydrofobisen transmembraanialueen (Val1228–Ser1248), ja sitä seuraavan solunsisäisen C-terminaalisen ”hännän” kautta (Gln1249–Ser1277). C-terminaalisen keskuksen yhdistää N-terminaaliseen keskukseen ”linker-region” (Pro602–Asp612). On myös viitteitä siitä, että ACE1:n vapautumiseen solukalvolta vaikuttaa ACE1 ”sheddase”-entsyymi. Kyseinen entsyymi kykenee vapauttamaan ACE1:n solukalvolta leikkaamalla sen solukalvoon sitovan C-terminaalisen hännän. Sheddase-entsyymien toiminnasta tiedetään toistaiseksi vähän, mutta sen aktiivisuuteen näyttäisivät vaikuttavan jotkin ACE1:n C-domeenin rakenteelliset jaksot. Entsyymien on ehdotettu kuuluvan proteiinien ADAM-sukuun, ja sen aktiivisuutta näyttäisi estävän ainakin EDTA. [21.]

ACE1:n ekspressiota tapahtuu määrällisesti eniten seuraavissa elimissä ja kudoksissa: keuhkoissa, verisuonien endoteelisoluissa, harjareunuksessa munuaistiehyissä, suoliston epiteelikerroksessa ja kehittyvissä sukusoluissa. Sukusoluissa syntetisoitava ACE1 on molekyylipainoltaan somaattista ACE1:tä pienempi sisältäen vain somaattisessakin ACE1:ssä esiintyvän C-terminaalisen domeenin. Kyseistä ACE1 -muotoa kutsutaan usein ”testis ACE” tai ”germinal ACE”. ACE1:tä syntetisoidaan myös aivoissa. Vuonna 2002 ilmestyneessä julkaisussa [22] ilmeni, että ACE1:n somaattista muotoa ekspresoitui kaikissa kokeessa käytetyissä 72 ihmisperäisessä kudoksenäytteessä merkittävällä tasolla.

ACE1 pilkkoo elimistössä angiotensiini I-peptidiä biologisesti aktiiviseksi, verisuonia voimakkaasti supistaviksi, angiotensiini II -peptidiksi. Tämä on ACE1:n keskeisin tehtävä elimistössä. ACE1-estäjät ovat yksi yleisimmistä verenpainelääkeryhmistä. ACE1:n, angiotensiini II:n ja niiden estäjien vaikutukset eivät kuitenkaan rajoitu ainoastaan verenpaineeseen ja muihin RAS-järjestelmän pitkään tunnettuihin vaikutuksiin kuten nes-

tetasapainon säätelyyn. ACE1:n on ehdotettu liittyvän myös mm. immuunivasteen prosesseihin ja ruuansulatusjärjestelmään. [21.]

### 2.3 ACE2

Angiotensiinikonvertaasientsyymi 2 (ACE2) on karboksipeptidaasi, jonka molekyyli-massa ihmisellä on noin 92 kDa. Se on sinkkiä sitova metallopeptidaasi sekä membraaniproteiini kuten ACE1. ACE2 on ACE1:n homologi, mutta eroaa siitä substraattispesifisyydeltään. ACE1-estäjillä ei ole havaittu olevan vaikutusta ACE2:n toimintaan käytetyillä pitoisuuksilla. ACE2:lla on ACE1:n tavoin transmembraanialue ja C-terminaalinen sytoplasminen häntä. ACE2:n N-terminaalinen domeeni on homologinen ACE1:n kanssa mutta sillä on vain yksi aktiivinen keskus. [23; 24; 25.]

ACE2 ilmenee ihmisellä useissa eri kudoksissa, mm. keuhkoissa, maksassa, aivoissa, munuaisissa ja suolistossa. ACE2 ekspressoituu erityisesti verisuonten endoteelisoluissa ja keuhkorakkuloiden epiteelisoluissa, mutta myös varsin merkittävässä määrin ruuansulatuskanavan kudoksissa kuten ohutsuolessa duodenumissa ja ileumissa. [23; 24; 25.]

ACE2 pilkkoo yhden aminohapon angiotensiini II:sta muodostaen tuotteena angiotensiini (1-7):n (Ang (1-7)). ACE2 on siis karboksipeptidaasi siinä missä ACE1 on karboksidiptidaasi pilkkoessaan aina kahden aminohapon mittaisen peptidin. Ang (1-7) välittää MAS-reseptorin kautta angiotensiini II:lle käänteisiä vaikutuksia kuten verenpaineen laskua verisuonten laajentumisen välityksellä, sekä tulehdusta vähentäviä vaikutuksia. ACE2:lla on siis osoitettu olevan kudosta suojaavia ominaisuuksia RAS:iin liittyvissä sairauksissa kuten verenpainetaudissa. [23; 24; 25; 26.]

## 2.4 Reniini-angiotensiini-järjestelmä suolistossa

### 2.4.1 Paikallinen reniini-angiotensiini-järjestelmä

Klassisen RAS:n lisäksi RAS-järjestelmä ja sen komponentit voisivat syntyä ja vaikuttaa elimistössä paikallisesti. Paikallisesti toimiva RAS ei ole riippuvainen elimistöön verenkierrossa eritettävästä reniinistä tai angiotensinogeenistä, vaan sen sijaan RAS-järjestelmän komponentit pystytään tuottamaan paikallisesti. Paikallisesti ilmentyvän

RAS:n uskotaan olevan merkittävässä roolissa kudoksen homeostaasiin liittyvissä prosesseissa kuten neste- ja elektrolyyttitasapainon ylläpitämisessä, paikallisessa verenkierron säätelyssä ja kudoksen vauriota seuraavissa toiminnoissa. RAS:n tai sen komponenttien paikallisesti tuottamia vasteita elimistöön on havaittu mm. munuaisissa, sydämessä, aivoissa, maksassa, haimassa sekä ruoansulatuskanavassa. [28.]

Ruoansulatuskanavasta on löydetty kaikki autonomisen RAS-järjestelmän edellyttämät komponentit. ACE1 on paikannettu ihmisen ohutsuolessa merkittävässä määrin epiteelisolujen villusrakenteeseen ja suoliliepeen valtimoiden endoteelikerrokseen. Paksusuolesta ACE1:tä on löydetty seuraavista paikoista: pintaepiteelikerros, suolilieve, lamina propria ja submucosan mesenkymaaliset solut. ACE2:n RNA:ta ja proteiinia löytyy merkittävässä määrin seuraavista ohutsuolen rakenneosista: epiteelin harja-reunus, verisuonten sileälihaskudos, verisuonten endoteeli, muscularis mucosa ja muscularis propria. Paksusuolesta ACE2:a on havaittu suoliliepeestä. RAS:n komponentteja on tutkittu vähemmän paksusuolella kuin ohutsuolessa. Sekä ACE1:n ja ACE2:n mRNA:ta esiintyy terminaalisisissa ileumissa, duodenumissa ja paksusuolella suhteessa enemmän kuin muissa ihmisen kudoksissa. [28.]

Ohutsuolessa angiotensiinireseptoreista AT1R ekspressoituu epiteelin villusrakenteissa, myenterisessä hermopunoksessa, lamina propriassa ja suorissa että pitkittäisissä lihaksissa. AT2R ekspressoituu myenterisessä plexuksessa sekä vähäisemmin lihaksessa ja epiteelisoluihin. Paksusuolella AT1R on löydetty ainakin pinnan epiteelisoluihin, kryptoihin, lamina propriasta ja limakalvolta. AT2R on paikallistettu suolen pinnan epiteelikerrokseen, kryptoihin ja joihinkin mesenkymaalisiin soluihin. Reniini ja angiotensiini II on myös paikallistettu ohutsuolessa. [28.]

Paikallisen RAS:n osallisuudesta ruoansulatuskanavan toimintaan on kertynyt viime aikoina paljon viitteitä. Paikallinen RAS on todennäköisesti osallisena ainakin seuraavissa suoliston toiminnoissa: glukoosin säätely, neste- ja elektrolyyttitasapainon säätely, verenkierto ja motiliteetti sekä tulehdustilat ja suoliston sairaudet. ACE1:n ja ACE2:n ajatellaan myös toimivan ruoansulatusentsyymeinä. [28.]

#### 2.4.2 RAS tulehduksellisissa suolistosairauksissa

RAS -järjestelmän komponenttien ja suoliston tulehdustilojen väliselle yhteydelle on saatu viime aikoina todisteita. Ang II-reseptoreilla on mahdollisesti merkitys suoliston

limakalvotulehdusten säätelyssä (29). Ang II:n tulehdustilojen ja kudosaivurioiden vasteesta on saatu viitteitä useissa muissakin elimissä. IBS:n (Irritable Bowel Syndrome), eli ärtyneen suolen oireyhtymän on ehdotettu liittyvän vähäisen aktiivisen inflammaation kautta AT2R -reseptoreihin. Vuonna 2014 julkaistussa tutkimuksessa [25] todettiin, että IBD:tä sairastavilla oli korkeammat ACE2 aktiivisuudet ja Ang (1-7) -konsentraatiot kuin kontrolliryhmällä. Muilla verenkierron välityksellä välittyvillä klassisen RAS:n komponenteilla ei todettu eroavaisuuksia ryhmien välillä. Ang (1-7):llä on osoitettu olevan tulehdusta ja fibroosia vähentäviä ominaisuuksia, jotka ovat angiotensiini II vastaisia.

Crohnin tauti ja ulseratiivinen koliitti ovat patogeneesiltaan vielä toistaiseksi tuntemattomia kroonisia tulehduksellisia suolistosairauksia, jotka vaikuttavat suolen limakalvolla ja seinämässä. Keskeiseksi tekijäksi on ehdotettu häiriintynyttä tai poikkeavaa immuunivastetta mm. suoliston omaa bakteeriflooraa vastaan, mutta sairauden syntymekanismit ovat vielä tuntemattomia. [30; 25.]

Crohnin tauti rajoittuu ohutsuoleen noin 30 %:lla, ja paksusuoleen 25 - 30 %:lla potilaita. 40 %:lla tautia esiintyy sekä ohut- että paksusuolen alueella. Oireita ovat tavallisimmin vatsakivut, ripuli, kuumeilu ja suolen tukokset. Diagnoosi tehdään oireiden ohella pääasiassa endoskopiaturkimuksilla. Crohnin sairaudessa joudutaan usein tekemään leikkaushoito, jossa pyritään poistamaan eniten oireita aiheuttavat tautimuutokset kuten ohutsuolitukokset, internit fistelit, absessit, suolen perforaatiot, toksiset koliitit ja anaalialueen leesiot. [30.]

Ulseratiivinen koliitti on suolen seinämän tulehdussairaus paksusuolen alueella. Tavallisimpia oireita ovat vatsakivut ja ripuli, sekä liman, märkäisen eritteen ja veren esiintyminen ulosteissa. Taudin diagnosointi perustuu oireiden lisäksi kolonoskopiaan ja histologisiin näytteisiin, joissa arvioidaan tyypillisten tulehdusmuutosten esiintyvyyttä paksusuoleessa. Aktiivin koliitin hoidossa käytetään ensisijaisesti kortikosteroideja, joiden on tarkoitus vaimentaa immunologisia reaktioita. Lievässä – keskivaikeassa koliitissa remissio on saavutettu 65 - 68 %:n todennäköisyydellä prednisonilla, joka on kortisonin sukuinen lääkeaine. Jos tauti ei reagoi kortikosteroidihoitoon, käytetään ensisijaisesti siklosporiinia, joka on immunosuppressoiva lääkeaine. Remission ylläpito-hoidossa käytetään ensisijaisesti 5-ASA (5-aminosalisylaatti) -valmisteita. Niitä käytetään myös taudin aktiivisen vaiheen hoitoon. Biologisia valmisteita kuten TNF $\alpha$  -salpaajia käytetään koliitin hoidossa, ja ne sopivat niille, jotka eivät ole reagoineet edellä mainittuihin perinteisiin lääkeaineisiin. TNF $\alpha$  on valkuaisaine, jota elimistö tuottaa normaalisti



torjuakseen tulehduksia, mutta sen liikatuotanto voi johtaa suoliston tulehdukseen. [30; 31.]

## 2.5 Suolistotulehduksen tutkimusmallit hiirillä

Monilla erilaisilla hiirimalleilla voidaan tutkia suolistotulehduksen mekanismeja. Taulukossa 1 on esitetty eniten käytettyjä suolitulehdusmalleja.

**Taulukko 1 Suolistotulehduksen tutkimusmalleja hiirillä.**

<b>Malli</b>	<b>Toimintaperiaate</b>
Kemiallisesti indusoidut mallit	Kemiallisesti indusoitu suoliston limakalvon/epiteelikerroksen häiriötila tai hapteenilla indusoitu koliitti.
Geneettiset mallit	Transgeeniset ja ”knock-out”-hiiret.
Immuunijärjestelmän solujen siirto	Immuunijärjestelmän solujen selektiivinen siirto puutteellisen immuunijärjestelmän omaavalle hiirelle.
Koliitin spontaani ilmentyminen	Spontaanisti suolistotulehduksia ilmentävien hiirikantojen käyttö.
Suoliston bakteerit	Suoliston mikrobiston manipulointi ja sen vaikutukset suolistotulehdusten kehittymiseen.

### *Kemiallisesti indusoidut mallit*

Kemiallisesti indusoidut mallit ovat suosittuja, koska niillä on suhteellisen helppo aikaansaada koliitin tai Crohnin-taudin kaltaisia oireita ja patogeenisiä reaktioita hiirillä. Toinen merkittävä syy kemiallisesti indusoidujen mallien suosioon on niiden hyvä toistettavuus. Kemiallisesti indusoidut suolitulehdusmallit voidaan jakaa karkeasti kahteen: 1. hapteenilla indusoiduun koliittiin ja 2. niihin, jotka vaikuttavat häiritsevästi tai tuhoavasti suoliston limakalvoon tai epiteelikerrokseen. [32.]

Esimerkkinä hapteenilla indusoidusta suolitulehdusmallista on malli, jossa intrarektaalisesti annettava TNBS (2,4,6-trinitrobenseeni-sulfonihappo) tai DNBS (dinitrobenseeni-sulfonihappo) etanolissa aiheuttaa immuunipuolustusjärjestelmän yliherkkyysoireita hapteeniin sitoutuneille proteiineille aiheuttaen Crohnin-taudin kaltaisen kroonisen

ja akuutin tulehduksen. Etanoli auttaa tuhoamaan suolistoa suojaavaa limakalvoa, ja TNBS tai DNBS haptenisoi suoliston mikrobiston proteiineja tehden niistä immuno-geenisii ja siten aiheuttaen antigeenispesifisten T-solujen tuotannon. [32.]

Toinen, tssäkin opinäytetyössä käytetty mallityyppi kemiallisesti indusoituun suolitu-lehdukseen on DSS -malli, jossa annetaan hiirille juomaveden välityksellä dekstraani natriumsulfaattia (DSS). DSS on sulfonoitu polysakkaridi, jolla aikaansaadaan annok-sesta riippuen joko akuutti tai krooninen tulehdus suolistossa, lähinnä paksusuolessa. DSS:n uskotaan aiheuttavan suoran toksisen reaktion suoliston epiteelissä, aiheuttaen suoliston mikrobiston ja sen tuotteiden tunkeutumisen epiteelin läpi. Tätä seuraavaan tulehdukseen reagoivat lähinnä synnynnäisen immuunipuolustuksen solut tehden tästä mallista mielekkään tutkittaessa luontaisia mekanismeja sekä epiteelivaurioiden aiheut-tamia vaikutuksia koliitissa. DSS juoton seurauksena paksusuolen patologia on sa-mankaltaista kuin ulseratiivisessa koliitissa: haavaumia, epiteelikerroksen eroosiota sekä suurentunutta leukosyyttien ja granulosyyttien esiintyvyyttä. [32.]

### *Geneettiset mallit*

Geneettisellä tulehdusmallilla tarkoitetaan transgeenisii (uusi geeni viety kohde-eliöön), tai poistogeenisii ("knock out", jokin geeni poistettu) eläinkantoja, joita käyte-tään tulehduksen patogeneesin ja mekanismien tutkimukseen. Käytetyimpiä ovat kan-nat, joiden suolissa on häiriöitä suojaavassa epiteelikerroksessa, bakteerien tunnistuk- sessa, synnynnäisen immuunipuolustuksen signaibinnissa, immuunijärjestelmän sääte- lyssä-, tai stressivasteen signaibinnissa. Esimerkiksi transgeeniset dominanttinegatiivi- set N-kadheriini hiiret, joilla on mutatoituneita suoliston epiteelisoluja, jotka kehittävät huokoisia kohtia epiteeliin. Lisäksi niiden solujen välinen adheesio on häiriintynyt. Nä- mä tekijät johtavat suolessa spontaanisti syntyvään tulehdustilaan, joka on samankal- tainen kuin Crohnin taudissa. Tulehdustila johtaa lopulta syöpämuutokseen. Muita tut- kittavia geneettisii malleja epiteelikerroksen toiminnan tutkimisen lisäksi ovat im- muunipuolustuksen häiriöt sekä antioksidantti- ja stressivaste. [32.]

### *Immuunijärjestelmän solujen siirto*

Tulehdusmallin periaatteena on tiettyjen immunopuolustusjärjestelmän solujen selektiivinen siirto hiiriin, joiden immunopuolustusjärjestelmä on poistogeenisin menetelmin saatettu epäkuuntoon. Näin pystytään indusoimaan tulehdus valituilla solutyypeillä. Ylei-

sin tapa on siirtää CD4+CD45RB auttaja-T-soluja hiirikantoihin, joilla on SCID (severe combined immunodeficiency), tai RAG-puutos (recombination-activating genes). Mainittujen solujen indusointi aiheuttaa koliitin. [32.]

#### *Koliitin spontaani ilmentyminen*

Joillain hiirikannoilla on todettu syntyvän spontaanisti suolistotulehduksia ilman min-käänlaista ulkoista indusointia kuten geenimuuntelua. Näillä kannoilla pystytään mallintamaan ihmisen patogeneesiltään mahdollisesti monisyinen ja kompleksi IBD. Esimerkiksi SAMP1/YitFc-kannat kehittävät spontaanin suolistotulehduksen Crohnin taudin kuvan tapaisesti distaaliseen ohutsuoleen. [32.]

#### *Suoliston bakteerit*

Hiiren suoliston bakteerikannan muutoksilla on yhteys tulehduksellisten suolistosairauksien patogeneesiin. Suoliston bakteerikantaa joko rajoitetaan esimerkiksi antibiooteilla tai se poistetaan kokonaan. Yleistä kaikille suoliston bakteerikantaa muuttavissa tulehdusmalleissa on suoliston altistaminen bakteerisille antigeeneille. Tämä aiheuttaa lymfosyyttien aktivaation. [32.]

### 2.6 Muut tutkimuksen kohteet tulehduksellisiin suolistosairauksiin liittyen

TNF $\alpha$  on pro-inflammatorinen sytokiini, jonka ekspresion on todettu kasvavan kroonisissa tulehduksissa. Tunnettujen pro-inflammatoristen vaikutusten lisäksi sillä voi olla myös tulehdusta vähentäviä vaikutuksia. TNF $\alpha$  näyttää indusoivan tulehdusta alentavien glukokortikoidien tuotantoa suoliston limakalvolla akuutissa tulehduksessa. Jos TNF $\alpha$  poistetaan suolistosta, glukokortikoidien tuotto pysähtyy ja tulehdukselliset oireet pahenevat DSS-mallissa. [34.]

CYP11B1 (11 $\beta$ -Hydroxylase) on geeni, josta koodattava entsyymi muuttaa hiirellä 11-deoksikortikosteronin kortikosteroniksi. CYP11B1 ja CYP11B2 säätelevät paikallista kortikosteronin tuottoa suolistossa hiirellä. Akuutin tulehduksen oireet voimistuvat CYP11B1:n eston seurauksena ihmisellä. Toisaalta joissain tulehduksellisissa tiloissa kuten diabeteksessä CYP11B1:n esto alentaa tulehdusta. [36; 38.]

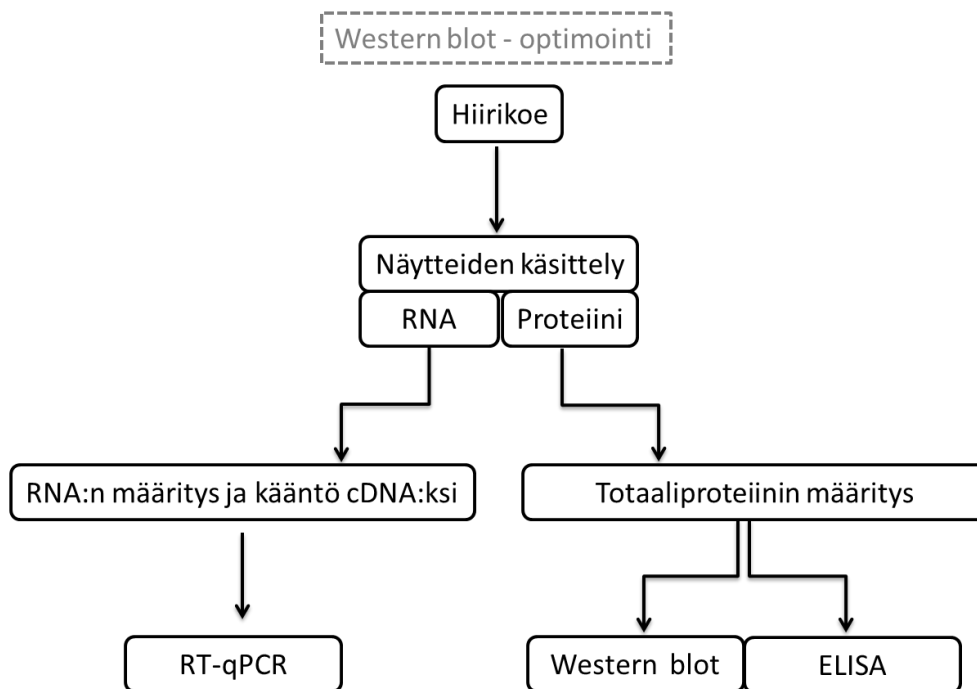
LRH-1 (Liver receptor homolog 1) on tumareseptori-proteiini, joka säätelee mm. elimistön kolesteroli- ja sappihappotasapainoa. LRH-1:n tuotannon geneettinen vaimentaminen (knock-down) altistaa hiiret tulehduksellisille suolistosairauksille. Intrarektaalaisesti annettu TNBS LRH-1 knock-down hiirillä aiheuttaa CYP11B1:n ja CYP11B2:n alentuneen ekspression suolistossa johtaen alentuneeseen kortikosteronituottoon. [35; 38.]

### 3 Tavoitteet

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää kokeellisessa tulehdusmallissa paikallisesti toimivan RAS -järjestelmän komponenttien ilmentymistä mRNA- ja proteiinitasolla hiiren suolistossa ja soveltaa menetelmät niiden mittaamiseen tutkimusryhmän käyttöön.

### 4 Menetelmät

Opinnäytetyön työosa aloitettiin optimoimalla western blot -menetelmää ACE1- ja ACE2-määrityksiä varten. Tämän jälkeiset keskeiset työvaiheet on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4 Opinnäytetyön kulku.

#### 4.1 Hiirikoe

Kudosnäytteet saatiin koe-eläiminä käytetyistä hiiristä. Hiiret (n=36) olivat balb/c-kantaa ja ne jaettiin kolmeen ryhmään: 1. Kontrolliryhmä, juomana oli vesi. 2. Tulehdusryhmä (3 % DSS), juomana 3 % DSS vedessä. 3. Tulehdusryhmä (5 % DSS), juomana 5 % DSS vedessä. Kussakin ryhmässä oli 12 hiirtä. Ennen tulehdusryhmien DSS-juoton aloittamista kaikkia hiiriä pidettiin 5 vuorokautta vedellä, jotta kuljetuksen aiheuttama mahdollinen stressi ei vaikuttaisi tutkimustuloksiin (niin sanottu tasapainotumisjakso).

Koe aloitettiin tasapainotumisjakson jälkeen porrastetusti 2 hiirtä ryhmää kohti/päivä. DSS tai vesi vaihdettiin päivittäin uuteen sekä tarkistettiin, että hiirillä on riittävästi ruokaa. Hiiret punnittiin päivittäin ja niiden yleiskunto tarkistettiin. Hiirten lopettamisperuste eli ns. humane-end point oli yleiskunnon romahdus tai painon putoaminen yli 10 % kokeen aikana. Häkit vaihdettiin viikoittain. Seitsemän DSS- tai vesijuottopäivän jälkeen hiiret lopetettiin ensin tainnuttamalla hiilidioksidilla ja sitten dekapitaatiolla. Hiiret punnittiin ennen tainnutusta. Dekapitaatioveri kerättiin suppilolla suoraan hepariiniputkiin, ja käännettiin putkea välittömästi muutaman kerran. Putket sentrifugoitiin (12 000 g , 15 min huoneenlämmössä).

Krebsin puskuria (liite 1) hapetettiin 10 min syöttämällä karbogenea (95 % O<sub>2</sub> 5 % CO<sub>2</sub>) putkella liuokseen. Krebsin puskuria pipetoitiin 3 ml jokaisen 6-kuoppalevyn kuoppaan *ex vivo*-inkubaatiota varten. Hiiret preparoitiin avaamalla ne ensin saksilla ja paikantamalla ohutsuolen ja paksusuolen liittymäkohta. Ileumista duodenumiin päin olevat kiinnikkeet ja rasvakudos ohutsuolen ympäriltä poistettiin. Suolet puhdistettiin Krebsin puskurissa.

Ohutsuoli leikattiin irti mahalaukusta ja umpisuolesta. Suoli avattiin pitkittäin ja poistettiin enimmäkseen ruokasulat. Ohutsuolen keskikohdasta leikattiin noin 1,5 cm:n kokoinen pala immunohistokemiallista määrittämistä varten, joka fiksattiin 10 % neutraaliksi puskuroidussa formaliinissa 24 h huoneenlämmössä. Kudospalat pestiin PBS:llä (liite 1) ja säilöttiin 70 % etanolissa + 4 °C:ssa paraffiinivaluun asti. Ohutsuolen ileumin ja duodenumin puoleisesta päästä leikattiin vastaavanlaisesti palat histologisia määrittämiä varten.

Hiiren paksusuoli irrotettiin ja avattiin sekä puhdistettiin se kuten ohutsuoli. Leikattiin suolen keskikohdasta noin 2 cm:n kokoinen pala *ex vivo* -inkubaatiota varten. Ohutsuolen jäljelle jäänyt duodenumin puoleinen osa pilkottiin noin 2 cm:n kokosiin paloihin *ex vivo* -inkubaatiota varten. Inkubaatiota varten leikatut palat ohutsuolesta sekä paksusuolesta asetettiin 6 kuoppalevylle omiin kuoppiinsa. Suolia inkuboitiin +37 °C:ssa 3 h. Otettiin 300 µl:n näytteet heti ns. nollahetkellä sekä 1,5 h:n päästä. Loput näytteestä otettiin talteen 3 h:n jälkeen (n. 900 µl). Näytteet pakastettiin -20 °C:ssa ja siirrettiin myöhemmin samana päivänä -80 °C:seen pakastimeen.

Ohutsuolen jäljellä oleva ileumin puoleinen osa leikattiin kahteen osaan: proksimaaliseen ja distaaliseen. Nämä olivat kudospäätteinä myöhemmissä proteiini- ja RNA -määrityksissä. Kudospäätteet jäädytettiin välittömästi kuivajäässä ja säilytettiin -80 °C:ssa. Myös proksimaalisesta osasta paksusuolta otettiin kuduskäyte. Proksimaalinen osa paksusuolta fiksattiin 10 % formaliinissa kuten vastaavat ohutsuolinäytteet duodenumista ja ileumista.

#### 4.2 Näytteiden käsittely

##### *Proteiinin ja RNA:n eristys western blot - ja RT-qPCR-menetelmien näytteitä varten*

Proteiini- ja RNA -näytteet eristettiin ohut- ja paksusuolinäytteistä. Proteiinin ja RNA:n eristykseen käytettiin kaupallista kittiä: Macherey-Nagel, NucleoSpin® RNA/Protein [8](liite 2). Näytteet otettiin pakkasesta ja säilöttiin välittömästi kuivajäälle. Eppendorf-putkessa oleva suolinäyte otettiin kuivajäältä ja siitä leikattiin preparointisaksilla noin 20 -30 mg:n painoinen pala suolta. Leikattu näyte punnittiin muutaman ensimmäisen keran ja sen jälkeen eristykseen menevän näytteen koko arvioitiin silmämääräisesti. Homogenisointiputkiin laitettiin 4 pientä halkaisijaltaan 2,8 mm keraamista helmeä putkea kohti. Putkiin pipetoitiin 350 µl kitin lyysauspuskuri ja 3,5 µl 2-merkptoetanolia. Lyy-sipuskuri sisältää suuria määriä kaotrooppisia ioneja, jotka denaturoivat proteiineja. Tämä on hyödyllistä siksi, että proteiineja pilkkovat proteaasit ja RNA:ta pilkkovat Rnaasit inaktivoituvat. 2-merkptoetanoli toimii pelkistävänä aineena ja rikkoo proteiinien disulfididisidoksia näin ollen rikkomalla niiden kvaternaari- ja tertiaarirakenteita. Disulfididisidosten rikkomisen yhdessä kaotrooppisten ionien kanssa pitäisi eliminoida entsyymiaktiivisuus näytematriisissa. [6.]

Kun tarvittava osuus suolta oli siirretty homogenisointiputkeen, laitettiin alkuperäinen näyte nopeasti takaisin kuivajälle. Näytteet homogenisoitiin nestetyppellä noin +4 °C:een jäähdytetyssä homogenisaattorissa (Precellys 24 Lysis & Homogenization, Bertin Technologies) (5400 rpm, 1 x 15 s). Homogenisointiohjelma toistettiin tarvittaessa. Liuokset sentrifugoitiin (12 000 g, 20 min), minkä jälkeen supernatantti otettiin talteen ja pakastettiin -80 °C:ssa.

RNA:n ja proteiinin eristys tehtiin kitin ohjeen mukaisesti. Näytteiden RNA-pitoisuudet mitattiin NanoDrop 8000 -laitteella. Nukleotidit, RNA, ssDNA, ja dsDNA absorboivat kaikki aallonpituudella 260 nm. Absorbanssien suhdeluvulla aallonpituuksista 260 nm ja 280 nm voidaan arvioida RNA:n puhtautta. 260/280-suhdeluku puhtaalle RNA:lle on likimain 2. Absorbanssien mittausten jälkeen näytteet säilöttiin välittömästi -80 °C:seen. [7.]

RNA:n eristyksen jälkeen proteiininäytteet saostettiin kitin "Protein precipitator"-puskurilla ohjeen mukaan. Etanolipesun jälkeen proteiinipelletti kuivattiin vetokaapissa huoneenlämmössä noin 10 min tai kunnes Eppendorf -putkea näpäyttämällä ei näkynyt vesipisaroita. Pelletti liuotettiin 100 µl:aan kitin puskuria, jossa pelkistävänä reagenssina oli TCEP. Proteiinipelletti resuspensoitiin. Näytteitä keitettiin 3 min +97 °C:ssa pelletin liuottamiseksi. Nämä denaturoituneessa muodossa olevat proteiininäytteet käytettiin western blot -analyysiin.

#### *Proteiinin eristäminen ELISA-määrittäjä varten*

Kokeesta saaduista kudospäätteistä määritettiin ELISA-tekniikalla ACE1-entsyymi spesifisellä kaupallisella kitillä (DuoSet ELISA Development system, mouse ACE, cat# DY1513). Koska denaturoituneessa muodossa Macherey-Nagel-kitin TCEP-puskurissa olevat näytteet eivät sovellu ELISA-määrittäjiin, täytyi ELISAA varten valmistaa omat näytteet. Näytteinä käytettiin ohut- ja paksusuolinäytteitä: kontrolli, 3 % DSS, 5 % DSS, n=8)

Näytteet siirrettiin nopeasti -80 °C:sta kuivajälle. Homogenisoitiin noin 100 mg:n pala ohutsuolta, joka laimennetaan 1:10 -suhteessa näytepuskuriin (liite 1, NP40). Aikaisempien määrittästen perusteella voitiin arvioida, että tässä suhteessa laimennetussa näytteessä on sopiva määrä proteiinia kokonaisproteiinin määrittäjä varten, kun näytettä laimennetaan edelleen vielä 1:10 -suhteessa. Paksusuolinäytteitä, joita oli lähtökoh-

taisesti massaltaan vähemmän per näyte pyrittiin leikkaamaan noin 20 - 30 mg:n pala, joka homogenisoitiin edelleen niin että se laimenee suurin piirtein 1:10 -suhteessa. Näytteet homogenisoitiin Precellys 24 Lysis & Homogenization -homogenisaattorilla kuten aikaisemmin.

Käytetty näytekupkuri (liite 1, NP40) sisältää suhteellisen heikkoja ei-ionisia detergenttejä ja soveltuu siis ELISA-määrityksiin, koska se ei denaturoi proteiineja. Puskuri soveltuu myös hyvin membraaniproteiineille, joihin ACE1 lasketaan. Proteaasi-inhibiittori tabletti (Thermo scientific, Pierce™ Protease inhibitor Mini Tablets) estää erilaisten proteaasien aktiivisuutta, mitkä pilkkovat proteiineja. [10.]

Kun näytteet oli homogenisoitu, ne sentrifugoitiin välittömästi (+4 °C, 12 000 g, 15 min). Supernatantti otettiin talteen ja laimennettiin 1:10 kokonaisproteiinin määritystä varten.

#### 4.3 Kokonaisproteiinin määrittäminen

Ennen näytteiden analysointia western blot - ja ELISA-tekniikoilla niiden kokonaisproteiinipitoisuus täytyi määrittää. Kokonaisproteiinin määrittäminen tehtiin kaupallisella kitillä: Thermo Scientific™ Pierce™ BCA™ Protein Assay -kitin ohjeen mukaisesti [9]. Tuntemattoman näytteen proteiinipitoisuus voidaan määrittää piirtämällä standardikuvaaja referenssiproteiinin antamista absorbansseista ja vertaamalla tuntemattoman proteiininäytteen absorbanssia standardisuoraan. Referenssiproteiininä käytettiin naudan seerumin albumiinia (BSA). BSA:sta tehtiin kahdeksan laimennoksen sarja pitoisuusalueelle 0 – 2000 µg/ml käytettyä puskuria.

#### 4.4 Western blot

Western blot -menetelmällä määritettiin RAS-järjestelmän komponentteja ACE1 ja ACE2. Menetelmää varten täytyi optimoida vasta-aineiden pitoisuudet, näytteen proteiinipitoisuus sekä yleisesti menetelmän toimivuus. Pohjana menetelmää suunniteltaessa käytettiin ohjetta Abcam, Definitive guide to western blot [10].



### *Western blot -optimointi ACE1 vasta-aineelle*

Ennen opinnäytetyön varsinaisen runko-osan muodostavan kokeen suoritusta pyrittiin pystyttämään menetelmä valmiiksi ACE1:n määrittystä varten western blot-tekniikalla. Varsinaisen kokeen proteiininäytteet eristettiin kaupallisella Macherey-Nagel, NucleoSpin® RNA/Protein -kitillä kuten aiemmin kuvattu. Seuraavassa on kuvattu alustavan western blot-optimointikokeen näytteen käsittely ja kokonaisproteiinin määrittys.

Näytteinä käytettiin hiiren ohut- ja paksusuoli, sekä munuais- ja keuhkonäytteitä. Kudospalat (ohutsuoli) sulatettiin jäällä. Otettiin noin 100 mg:n pala kudosta homogointiputken pohjalle. Lisättiin putkiin puskuria (liite 1, NP40) niin, että kudospala laimeni massan mukaisesti 1:10. Puskurissa oli käytetty NP-40:n sijasta Triton x-100:aa. Lisäksi näytepuskuriin oli lisätty proteaasi-inhibiittori-tabletti (Pierce™ Protease inhibitor Mini Tablets). Putkiin lisättiin myös 3 kpl suurta homogointihelmeä/putki. Putket laitettiin nestetyypellä n. 0 °C:seen jäädytettyn homogenisaattoriin (Precellys 24 Lysis & Homogenization, Bertin Technologies) ja homogenisoitiin laitteen ohjelmalla 6000 rpm, 3x5 sek. Osa homogointiputkista hajosi tällä ajo-ohjelmalla. Näytteitä sentrifugoitiin (+ 4°C 20 min 12 000 g) ja otettiin supernatantti talteen.

Näytteiden kokonaisproteiinipitoisuus määritettiin BCA-kitillä (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific), minkä jälkeen näytteet laimennettiin laemmlipuskuriiin siten, että 10 µl:ssa valmista näytettä oli 20 µg kokonaisproteiinia. Näytteitä keitettiin laemmlipuskurissa 95 C:ssa 5 min. Ne vorteksoitiin ennen ja jälkeen keittämisen ja ne olivat tässä vaiheessa valmiita näyteajoon. Näytteet voitiin vaihtoehtoisesti tässä vaiheessa pakastaa ja sulatuksen yhteydessä keitettiin vielä uudestaan +95 °C:ssa 5 min ajan. Näytteenkäsittelyn ja kokonaisproteiinin jälkeen western blot -menetelmä seuraa varsinaisen kokeen protokollaa (liite 3).

Käytetty vasta-aine ACE1:n määrittämiseen oli Abcam Anti-Angiotensin Converting Enzyme 1, Rabbit polyclonal antibody - N-terminal ab182770. Valmistaja ilmoittaa vasta-aineen tunnistavan hiiren, rotan ja ihmisen ACE1-proteiinin. Vasta-aineen immunogeeni, eli vasta-ainemuodostusta suoraan stimuloiva antigeeni, on synteettinen ihmisen ACE1 entsyymin N-terminaalisen pään peptidi. Valmistajan ilmoittama oletettu molekyylipaino ACE1-proteiinille on 150 kDa ja suosituslaimennosalue vasta-aineelle 1:1000 – 1:5000.

Vasta-ainepitoisuuksia kokeiltiin laimennosalueella 1:500 – 1:5000 pitäen kokonaisproteiini 20 µg:ssa totaalitylavuudessa 10 µl tai 20 µl riippuen käytetyn SDS-PAGE -geelin kaivontilavuudesta. Proteiinien siirtoa akryyliamidigeeliltä membraanille kokeiltiin Trans-Blot® Turbo™ -laitteen eri blottausohjelmilla (mm High MW, valmistajan suositus yli 150 kDa:n proteiineille, ja Mixed MW joka soveltuu proteiineille kokoluokassa 5-150 kDa). Myös näytteen denaturointia kokeiltiin alhaisemmassa 80 °C:n lämpötilassa sen varalta, että keitto lähellä 100 °C lämpötilaa aiheuttaisi tutkittavan proteiinin pilkkoutumisen. Sekundaari-vasta-aine (Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate #170-6515) laimennettiin 1:3000 TBST-puskurissa (liite 1). Sigma-aldrich, Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat A0545 -vasta-ainelaimennos oli 1:10 000.

Latauskontrollina (loading control) käytettiin beta-aktiinille spesifistä vasta-ainetta Santa Cruz, β-Actin Antibody (C4) mouse monoclonal IgG1 sc-47778, jota käytettiin laimennoksella 1:1000. Sekundaari vasta-aineena käytettiin R&D Systems, HAF007 Goat Anti-Mouse, HAF007 laimennoksella 1:1000. Latauskontrollia käytetään varmistamaan, että näytettä on pipetoitu geelille tasaisesti samat määrät kaivoihin. Tämä on erityisen tärkeää kun vertaillaan proteiiniekspressiota eri näytteiden välillä kuten tässä tapauksessa. Latauskontrollin tulisi olla näytteiden välillä tasaisesti ekspressoituva proteiini.

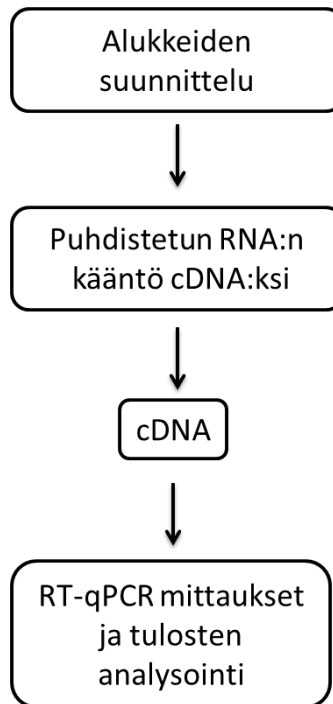
#### *Western blot -analyysi ACE1- ja ACE2 -vasta-aineilla*

Hiirikokeesta saatujen ohut- ja paksusuolinäytteiden ACE1 -ja ACE2 -proteiiniekspressiot pyrittiin mittaamaan pystytetyllä western blot -menetelmällä. Kontrollinäytteinä käytettiin kontrolliryhmän hiirien munuais- ja keuhkonäytteitä, joissa pitäisi olla runsaasti ACE1- ja ACE2 -proteiinia. ACE1:n (Abcam ab182770) primaarivasta-aine laimennettiin 1:1000 ja ACE2:n (Sigma-Aldrich, Anti-ACE2 rabbit, SAB3500346) primaarivasta-aine laimennettiin 1:500. Näytteen kokonaisproteiinipitoisuus geelin kuoppaa kohden oli 20 µg. Näytteiden käsittely ja kokonaisproteiinin määritys on kuvattu kappaleissa 3.2 ja 3.3. Geeleinä käytettiin valmiita kaupallisia geelejä (Bio Rad, Mini PROTEAN TGX 7,5%), sekä itse valmistettuja akryyliamidigeelejä (liite 4). Sekundaari-vasta-aineena käytettiin Sigma-Aldrich, Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat laimennoksella 1:10 000. Latauskontrollina käytettiin beta-aktiinille spesifistä vasta-ainetta Santa Cruz, β-Actin Antibody (C4) mouse monoclonal IgG1 sc-47778, joka laimennettiin 1:1000. β-aktiinin sekundaarivasta-aineena käytettiin

R&D Systems, HAF007 Goat Anti-Mouse, HAF007 laimennoksella 1:1000. Menetelmä suoritettiin liitteen 3 protokollan mukaisesti.

#### 4.5 RT-qPCR

Kvantitatiivisella käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktiolla, eli RT-qPCR-menetelmällä tutkittiin opinnäytetyön eläinkoesarjan geeniekspressiota kaikkien tutkittavien komponenttien osalta. Näytteinä käytettiin ohut- ja paksusuolinäytteistä eristettyä ja puhdistettua RNA:ta (kappale 3.2). Jokaisesta hiirikokeen kolmesta ryhmästä, 1. kontrolliryhmä, 2. tulehdusryhmä (3 % DSS) ja 3. tulehdusryhmä (5 % DSS) otettiin 5 näytettä geeniekspressioanalyysiä varten. Kuvassa 5 on esitetty RT-qPCR analyysin työvaiheet.



Kuva 5 RT-qPCR-analyysin työvaiheet

### Alukkeiden suunnittelu

Ensimmäinen työvaihe oli tutkittaville kohdegeeneille spesifisten alukkeiden suunnittelu. Primerit suunniteltiin NCBI:n Primer-BLAST-ohjelmalla. Monistettavat alueet eli amplikonit on esitetty taulukossa 2. Alukeparien sekvenssit ovat liitteessä 5.

**Taulukko 2 Monistettavat amplikonit**

Geeni	NCBI tietokantanumero
ACE1	NM_207624.5
ACE2	NM_001130513.1
TNF $\alpha$	NM_007393.3
LRH-1	NM_030676.3
CYP11B1	NM_001033229.3
$\beta$ -aktiini	NM_007393.3
Rplp0	NM_007475.5
S18	NR_003278.3

Primer-BLAST-ohjelmasta asetettiin monistuvan PCR-tuotteen eli amplikonin kooksi 80 - 120 bp. Alukkeiden sulamispisteeksi ( $T_m$ ) asetettiin +60 °C ja suurimmaksi lämpötila- poikkeamaksi ehdotettuihin alukepareihin 1 °C. Monistettavien alukkeiden koot asetettiin välille 18 – 25 bp optimaalisen pituuden ollessa 20 bp. Alukkeiden GC - pitoisuudeksi asetettiin viiteväli 40 - 60%. Alukkeiden optimaaliseksi dNTP-konsentraatioksi asetettiin 0,2 mM. Alukkeet suunniteltiin siten, että alukeparin väliin jää ainakin yksi introni monistumiskohtaa vastaavassa geenissä. Näin ollen pystytään erottamaan monistunut mRNA ja genomisen DNA toisistaan, koska jälkimmäisen muodostama monistumistuote on intronin takia pidempi. Intronin pituus pyrittiin saamaan aina ainakin 1000 bp:n pituiseksi. Mainittujen Primer-BLAST -asetuksien lisäksi muut parametrit pidettiin oletusasetuksissa.

Yllä mainittujen Primer-BLAST asetusten palauttamat alukepariehdotukset tarkistettiin vielä IDT:n OligoAnalyzer 3.1 -verkko-ohjelmistolla. OligoAnalyzerilla tarkistettiin alukkeiden mahdollisesti muodostamat "self-dimer" -rakenteet. Dimer-rakenteet, joita polymeeraasit pystyvät pidentämään 3' päästä ovat kriittisiä alukkeiden suunnittelussa. Esimerkiksi kuvassa 5 oleva dupleksi-rakenne pystyy pitenemään 3' päästä.

```

5' GAAGGCTTTGGCGACGCGT
      |||||
3'          TGCGCACGTATA

```

**Kuva 5** Dupleksirakenne pystyy pidentymään juosteen 3' päästä.

Kuvan 6 dupleksirakenne ei pysty pidentymään.

```

5'          TACGTAGTTGGTCTCCCTG
      |||||
3' TCCCTCTGGTTTCGATGCAT

```

**Kuva 6** Dupleksirakenne ei pysty pidentymään.

On havaittu, että kaksi toisilleen komplementaarista emästä alukkeen 3' päässä kuvan 5 kaltaisessa tilanteessa ei ole vielä tarpeeksi vakaa polymeeraaseille. Tämän pohjalta kaikki alukkeet, jotka sisälsivät 3 tai enemmän komplementaarisia nukleotideja itsensä kanssa alukkeen 3' -päässä hylättiin alukkeen suunnittelussa. Myös alukkeita, joissa oli useita peräkkäisiä G pareja, yritettiin välttää. G-parit lisäävät mahdollisten ei toivottujen rakenteiden vakautta. [17.]

Geeniekspressiota tutkiessa tulokset, eli tässä tapauksessa tutkittavan kohdegeenin koodaavan mRNA:n määrä, täytyy suhteuttaa johonkin. Suosituin tapa on käyttää sisäisiä kontrolligeenejä (ns. housekeeping-geenit tai endogeeniset kontrolligeenit), jotka ekspressoituvat optimaalisessa tilanteessa tasaisesti näytteiden välillä erilaisista näytteen käsittelyistä huolimatta. Käyttäessä kontrolligeenejä normalisointiin, huomioidaan myös mitattavan lähtömateriaalin määrä ja vaihtelu näytematrisiin kudostyyppissä ja solujakaumassa. Esimerkiksi normalisoitaessa totaali-RNA:n määrään ei oteta huomioon rRNA:n ja mRNA:n välistä jakaumaa totaali RNA:ssa. Lisäksi usein käytettävää absorbanssin mittausta aallonpituudella 260 nm ei voida pitää riittävän tarkkana ja luotettavana menetelmänä normalisointiin. [16.]

Vaikka kontrolligeenien oletetaan ekspressoituvan tasaisesti, on havaittu että niiden ekspressioissa saattaa olla todellisuudessa huomattavia eroja. Tästä syystä on suositeltavaa käyttää useampaa kuin yhtä kontrolligeeniä ekspressiotasojen normalisointiin, koska tulosten luotettavuus on täysin kiinni kontrolligeenin tasaisesta ekspressiosta. Käyttämällä useaa kontrolligeeniä, jotka todistetusti ekspressoituvat tasaisesti, saadaan tuloksiin RT-qPCR:n herkkyuden ja dynaamisen alueen edellyttämää luotetta-

vuutta. [16.] Suunnitelluista alukepareista  $\beta$ -aktiini, Rplp0 ja S18 toimivat sisäisinä kontrolligeeneinä näytesarjassa. Taulukossa 3 on esitelty ne lyhyesti.

**Taulukko 3 Käytetyt endogeeniset kontrollit**

<i><math>\beta</math>-aktiini</i>	$\beta$ -aktiini muiden aktiinien ohella on erittäin konservoitunut proteiini, joka ekspressoituu kaikissa eukariotissoluissa. $\beta$ -aktiini on solun tukirankaproteiini, joka osallistuu mm. solun motiliteetin ja fagosytoosin säätelyyn. [12; 13.]
<i>Rplp0</i>	Rplp0 on LP10 -suvun ribosomaalinen proteiini, joka sijaitsee sytoplasmassa sekä tumassa. Rplp0 on ribosomin 60S alayksikön komponentti. Rplp0 proteiinia koodaavassa 36B4 -geeniä vastaavassa cDNA -sekvenssissä on erittäin konservoituneita alueita 5' pään avoimessa lukukehyksessä kauttaaltaan kudostyypistä tai eläinlajista riippumatta. On myös huomattu, että sekvenssin vastaavuus eri eläinlajien välillä on huomattavan suuri. [14; 15.]
18S	18S ribosomaalinen RNA sekvenssi valittiin, koska ribosomaalista RNA:ta koodaavat sekvenssit sisältävät hyvin konservoituneita alueita.

### *RNA:n kääntö cDNA:ksi ja qPCR-mittaukset*

Koska RT-qPCR suoritettiin niin sanotulla kahden vaiheen reaktiolla (RNA käännetään ensin cDNA:ksi ja sitten ajetaan qPCR spesifisillä alukkeilla), täytyi puhdistettu RNA kääntää ensin cDNA:ksi. Kääntö suoritettiin kaupallisella kitillä: Bio rad, iScript™ cDNA Synthesis Kit, cat# 170-8891 kitin ohjeiden mukaisesti. Näytteet laimennettiin 20 µl:n totaalitylavuuteen siten, että reaktioon käytettiin 1 µg totaali-RNA:ta. Näytteet laimennettiin vielä edelleen suhteessa 1:5. Käännetty ja laimennettu cDNA oli nyt valmis templaatiksi qPCR -mittauksiin ja toimi ns. nollalaimennoksena.

Käytetty laite qPCR-mittauksiin oli Roche LightCycler® 480 Instrument II. Näytteet pipetoitiin Rochen valmistamille valkoisille 384-kuoppalevyille. Käytetty master-mix oli LightCycler® DNA Master SYBR Green I. Näytteen totaalitylavuus/kuoppa oli 10 µl, johon pipetoitiin aina 5 µl SYBR Green master mixia, 0,25 µl forward-aluketta, 0,25 µl reverse-aluketta ja 3,5 µl PCR-laatuista vettä. Alukkeet oli laimennettu pitoisuuteen 10 µM. Templaatin määrä/kuoppa oli 1 µl. Pipetoinnit suoritettiin huoneenlämmössä siten, että ensin pipetoitiin master-mix jokaiseen kuoppaan ja sen jälkeen templaatti. Templaatti pipetoitiin kuopan kylkeen, jotta saatiin visuaalinen varmistus siitä, että templaatti oli pipetoitu kuoppaan. Kun master-mix ja templaatti oli pipetoitu, laitettiin kuoppalevyn päälle ”plate-sealer” ja sentrifugoitiin master-mix ja templaatti kuoppalevyn kuoppien pohjalle 2250 g, 20 s. Kuoppalevy säilytettiin +4 °C:n lämpötilassa yön yli ja sentrifugoitii ja ajettiin qPCR-laitteella seuraavana aamuna. Laitteessa käytetyt ajoparametrit on esitetty taulukossa 4. Denaturaatio, annealing ja elongation -sykli toistettiin 45 kertaa ja sulamispiste -analyysi kerran.

**Taulukko 4 Ajoparametrit**

<b>Syklin vaihe</b>	<b>Lämpötila</b>	<b>Aika</b>
Denaturaatio	95 °C	10 s
Sitoutuminen (annealing)	60 °C	20 s
Pidennys (elongation)	72 °C	5 s
<b>Sulamislämpötila-analyysi</b>	95 °C	5 s
	60°C	60 s
	95 °C	15 s

Ensimmäinen suoritettu mittaussarja oli alukkeiden tehokkuuden testaaminen. Alukkeiden tehokkuus määritetään tekemällä templaatista laimennossarja. Ct arvojen, ja laimennoksen konsentraation logaritmisen arvon muodostavan suoran kulmakertoimen perusteella lasketaan tehokkuusarvo. Tässä työssä templaatin laimennossarjat tehtiin 1:2 laimennossarjalla sekä 1:5 laimennossarjalla aina tehden 5 eri laimennosta. Laimennokset pipetoitiin triplikaatteina.

Alukkeiden tehokkuus määritetään, jotta voidaan varmistua, että alukkeet monistavat spesifisesti haluttua tuotetta templaatista. Lisäksi alukkeiden tehokkuutta laskevat erilaiset primer-dimer-rakenteet, jotka kilpailevat halutun tuotteen muodostumisen kanssa. Alukkeiden hyvä tehokkuus on tärkeää erityisesti silloin, kun halutaan tarkkoja tuloksia vasta yli 35 syklin jälkeen monistuvista PCR-tuotteista. Varsinaiset ekspressiotasojen eroja vertailevat mittaukset tehtiin laimentamalla templaatti suhteessa 1:10. [18.]

#### 4.6 ELISA

Tässä työssä tutkittiin ACE1-entsyymiä kaupallisella ELISA-kitillä: DuoSet ELISA Development system, mouse ACE, cat# DY1513. Mittaukset suoritettiin kitin ohjeiden mukaisesti (DuoSet ELISA Development system, mouse ACE, cat# DY1513, 751870.1, 9/10). Näytteinä käytettiin hiirikokeen ohut- ja paksusuolinäytteitä, joita otettiin ELISAA varten 8 jokaisesta käsittelyryhmästä (kontrolli, 3 % DSS ja 5 % DSS). Näytteiden käsittely ja kokonaisproteiinin määrittäminen on kuvattu kappaleissa 3.2 ja 3.3. Näytteet laimennettiin 1:1000 -suhteessa kitin reagent diluenttiin (liite 1) ja pipetoitiin duplikaatteina kuoppalevyille. ACE1 -standardista tehtiin 7 pitoisuuden 1:2 -suhteinen laimennossarja alueelle 6000 pg/ml – 93,75 pg/ml. Standardit pipetoitiin duplikaattina. Lisäksi pipetoitiin nollanäyte ilman standardia. Nollanäyte ja standardinäytteet laimennettiin reagent diluent -liuokseen,

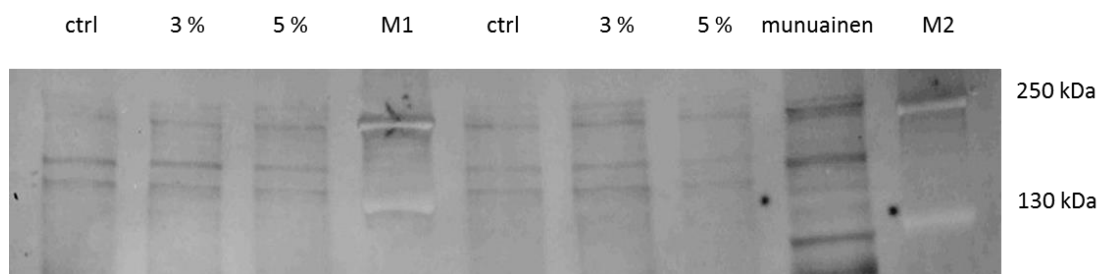


## 5 Tulokset

### 5.1 Western blot -optimoinnin tulokset

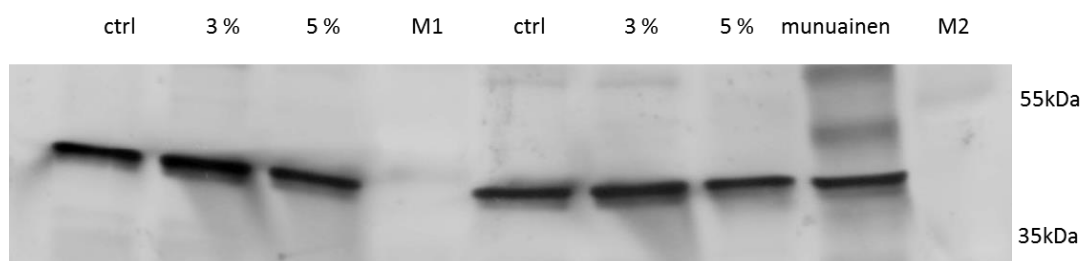
#### *ACE1 western blot*

ACE1-vasta-aineilla inkuboidut näytteet hiirikokeen ohutsuolihomogenaateista on esitetty kuvassa 6. Vasta-aineen valmistajan ilmoittama molekyylipaino ACE1-proteiinille on noin 150 kDa [20]. Ctrl on kontrolliryhmän näyte, 3 % on 3 % DSS -juoton saaneen ryhmän näyte ja 5 % on 5 % DSS -juoton saaneen ryhmän näyte. Näytteitä on 2 per käsittelyryhmä. Munuainen on kontrolliryhmän hiiren munuaisnäyte. M1 on PageRuler Plus -proteiinistandardi (cat# 26619), ja M2 on Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ -proteiinistandardi (cat#161-0375).



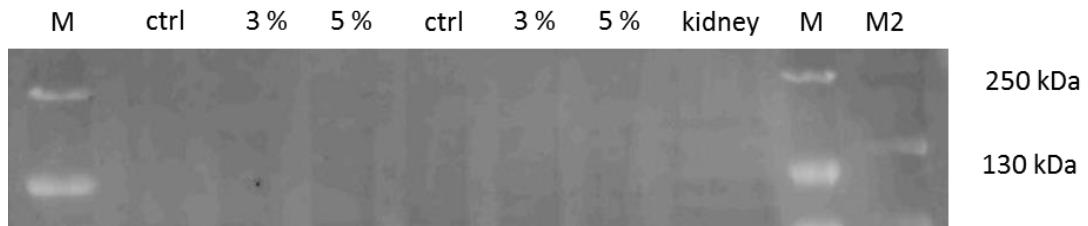
**Kuva 6 ACE1 -inkuboidut ohutsuolihomogenaatit. 20 µg kokonaisproteiinia/kaivo.**

Kuvassa 6 esitetyt ACE1-vasta-aineet poistettiin (ohutsuolihomogenaattinäytteet), ja membraani detektoitiin uudelleen  $\beta$ -aktiini-vasta-aineella. Vasta-aineen valmistajan ilmoittama  $\beta$ -aktiinin molekyylipaino on 43 kDa. (kuva 7)



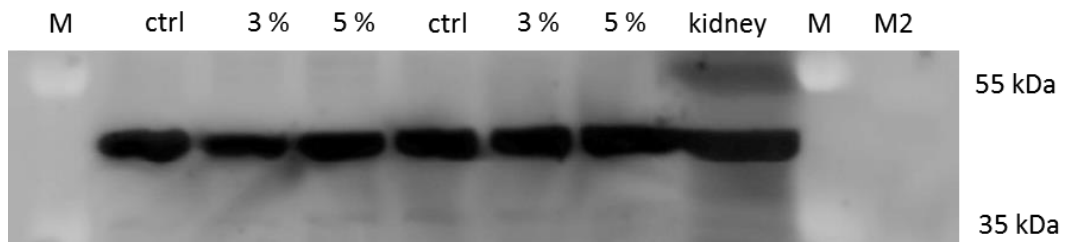
**Kuva 7 Ohutsuolihomogenaattinäytteet inkuboitu  $\beta$ -aktiini-vasta-aineella (latauskontrolli). 20 µg kokonaisproteiinia/kaivo.**

Kuvassa 8 ACE1-vasta-aineilla inkuboidut näytteet hiirikokeen paksusuolihomogenaateista. Näytteet samat ja toteutettu ohutsuolihomogenaatti-blottauksessa mutta käytettiin 8 % akryyliamidigeeliä (liite 4).



**Kuva 8 ACE1-vasta-aineilla inkuboidut näytteet hiirikokeen paksusuolihomogenaateista. 20 µg kokonaisproteiinia/kaivo.**

Kuvassa 8 esitetyt ACE1-vasta-aineet poistettiin (paksusuolihomogenaattinäytteet), ja membraani detektoitiin uudelleen β-aktiini-vasta-aineella (kuva 9.).



**Kuva 9 Paksusuolihomogenaattinäytteet inkuboitu β-aktiini-vasta-aineella (latauskontrolli). 20 µg kokonaisproteiinia/kaivo.**

Kuvat 6 ja 8 osoittavat, että ohutsuolinäytteissä tai paksusuolinäytteissä ei ole spesifistä bandia n. 150 kDa:n kohdalla, jossa ACE1:n pitäisi näkyä. Kuvat 7 ja 9 osoittavat, että β-aktiini sen sijaan näkyy hyvin sille spesifisellä vasta-aineella. Ohutsuolihomogenaatti-membraanissa (kuva 6) on havaittavissa joitain haaleita bandeja oikealla alueella, mutta niitä ei voi riittäväällä varmuudella tulkita ACE1-proteiiniksi.

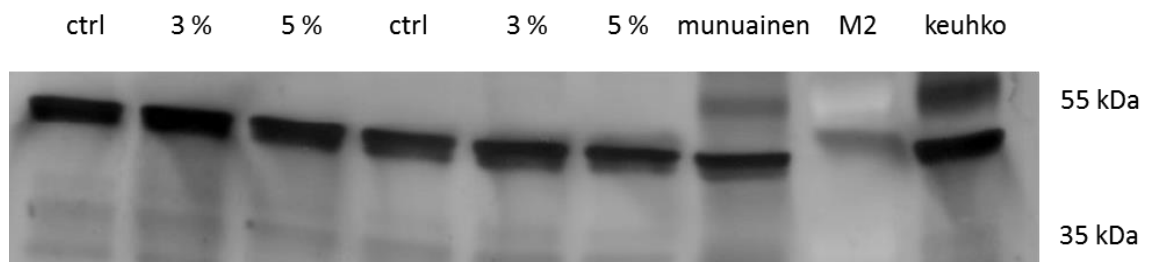
### ACE2 western blot

ACE2-vasta-aineilla inkuboidut näytteet hiirikokeen ohutsuolihomogenaateista on esitetty kuvassa 10. Vasta-aineen valmistajan ilmoittama molekyylipaino ACE2-proteiinille on noin 100 kDa. Näytteet ovat samat kuin ACE1-vasta-aineilla inkuboidussa blottauksessa erotuksena, että tässä on mukana myös keuhkonäyte kontrolliryhmän hiirestä. Käytetty geeli SDS-Pagessa oli Bio rad Mini-Protean TGX 7,5% cat#456-1023.



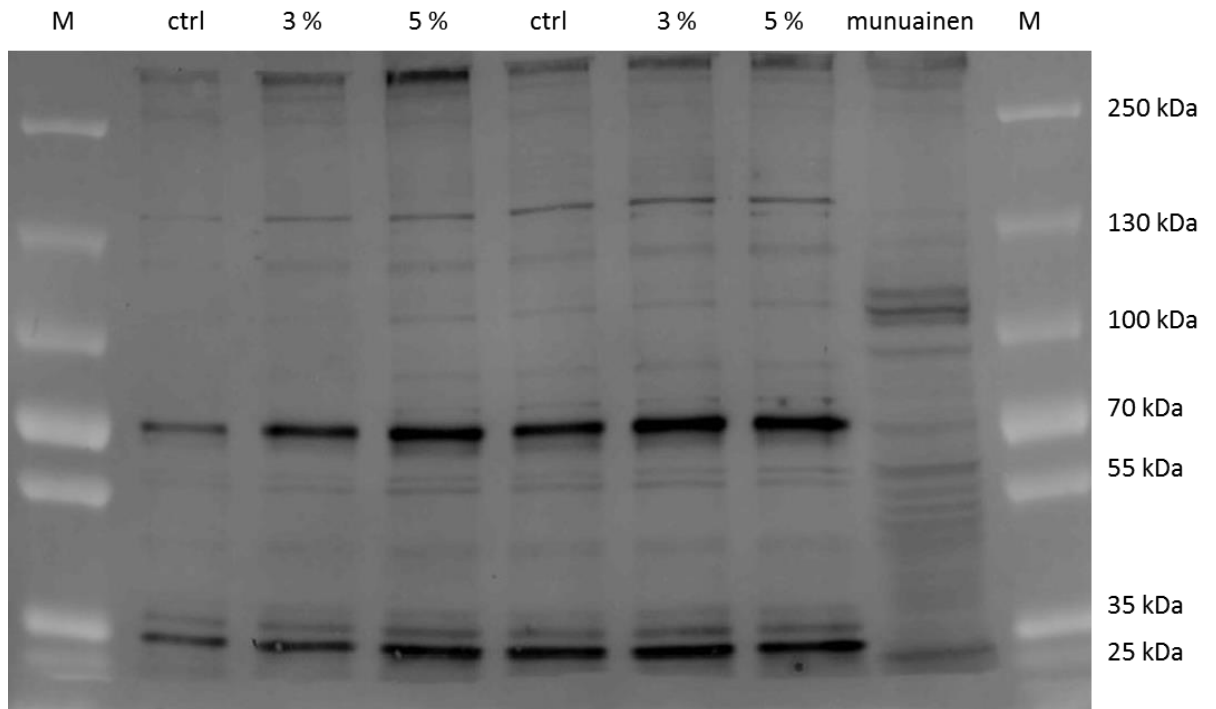
**Kuva 10 ACE2-vasta-aineilla inkuboidut näytteet hiirikokeen ohutsuolihomogenaateista. 20 µg kokonaisproteiinia/kaivo.**

Kuvassa 10 esitetyt ACE2-vasta-aineet poistettiin (ohutsuolihomogenaatinäytteet), ja membraani detektoitu uudelleen β-aktiini-vasta-aineella (kuva 11).



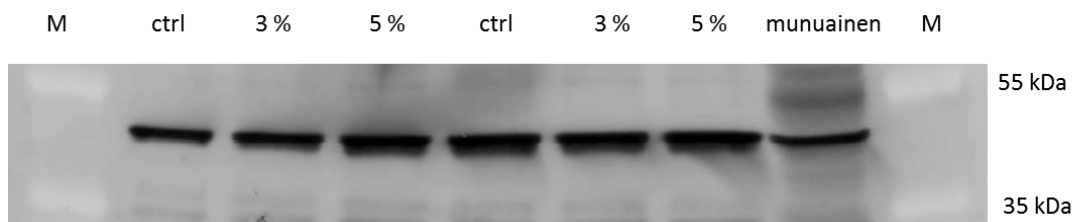
**Kuva 11 Ohutsuolihomogenaatinäytteet inkuboitu β-aktiini-vasta-aineella (latauskontrolli). 20 µg kokonaisproteiinia/kaivo.**

ACE2-vasta-aineilla inkuboidut näytteet hiirikokeen paksusuolihomogenaateista on esitetty kuvassa 12. Näytteet ovat samat ja samalla tavalla toteutettu kuin ACE2-ohutsuolihomogenaatti-blottauksessa. Esimerkkinä koko membraani.



**Kuva 12 ACE2-vasta-aineilla inkuboidut näytteet hiirikokeen paksusuolihomogenaateista. 20  $\mu$ g kokonaisproteiinia/kaivo.**

Kuvassa 12 esitetyt ACE2-vasta-aineet poistettiin (paksusuolihomogenaattinäytteet), ja membraani detektoitiin uudelleen  $\beta$ -aktiini-vasta-aineella (kuva 13).



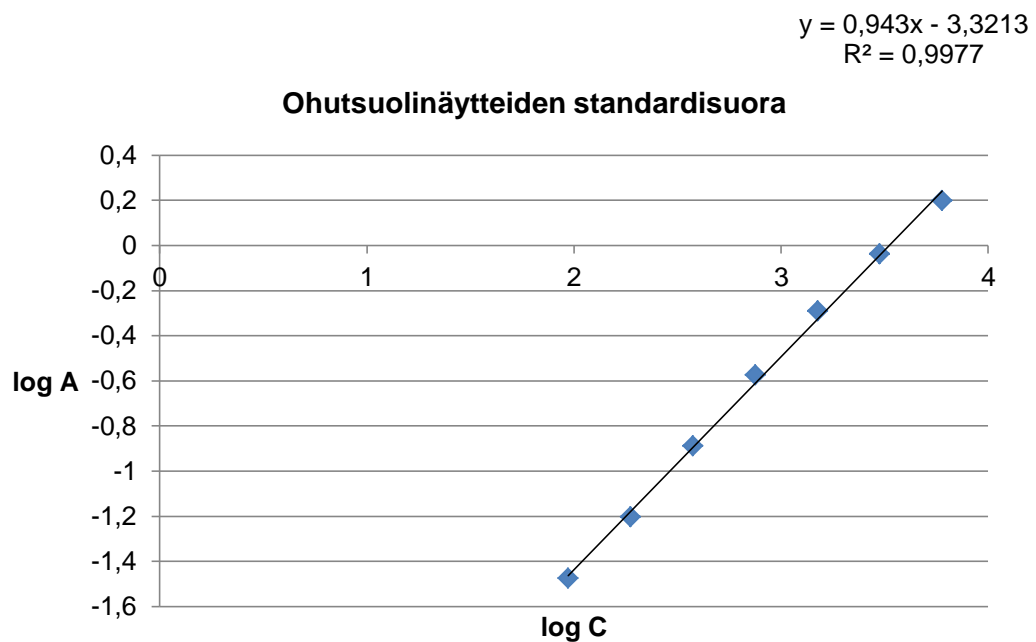
**Kuva 13 Paksusuolihomogenaattinäytteet inkuboitu  $\beta$ -aktiini-vasta-aineella. 20  $\mu$ g kokonaisproteiinia/kaivo.**

Myöskään ACE2 (noin 100 kDa) ei näy spesifisenä signaalilla ohutsuolinäytteissä tai paksusuolinäytteissä (kuvat 10 ja 12). Tilanne on sama kuin ACE1-bloiteissa, eli  $\beta$ -aktiini näkyy (kuvat 11 ja 13), mutta varsinainen tutkittava proteiini ACE2 ei. Vasta-ainepitoisuuksia kokeiltiin kummankin vasta-aineen kohdalla laajalla skaalalla kontrollinäytteiden kanssa, ja optimoinnissa otettiin huomioon myös blottauksen teho (varmistettiin

isojen proteiinien siirtyminen geeliltä membraanille) ja proteiinien denaturointilämpötila. Western blot -protokollan toimivuuden puolesta puhuu se, että  $\beta$ -aktiini saatiin onnistuneesti näkymään spesifisenä signaalina. Kun otetaan vielä huomioon se, että näytteen käsittely tehtiin NP40-puskurin ja sitä seuraavan lyysauksen ohella myös kaupallisella kitillä sen ohjeiden mukaisesti, on todennäköistä että vasta-aineiden toimivuudessa on ongelmia ACE1- ja ACE2 -proteiinien tunnistuksen suhteen käytettyjen näytteiden kohdalla.

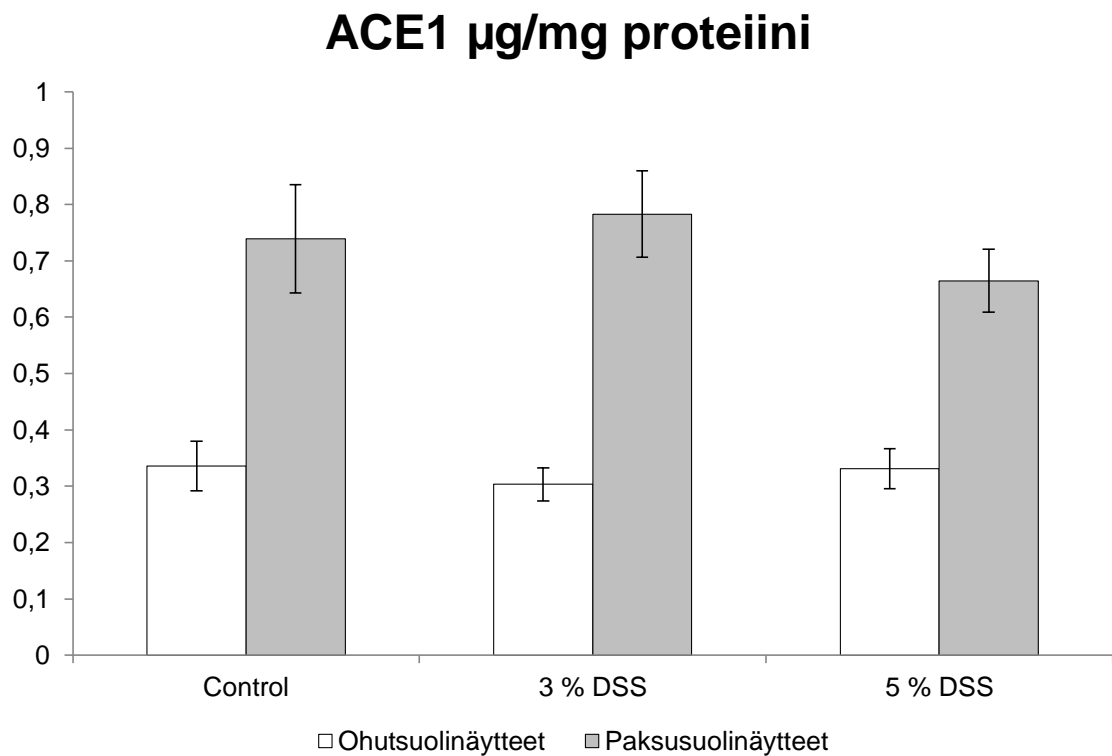
## 5.2 ELISA -tulokset

ACE1-määrittelyssä kuoppalevyiltä luettiin absorbanssit aallonpituuksilla 450 nm ja 540 nm. Absorbanssit aallonpituudella 540 nm vähennettiin 450 nm absorbansseista. Tämä aallonpituuslukemakorjaus ottaa huomioon kuoppalevyn optiset virheet. Tämän jälkeen nollanäytteen absorbanssi vähennettiin kaikista tuloksista. Standardikuvaaja piirrettiin laskemalla absorbansseista ja pitoisuuksista ensin kymmenkantaiset logaritmit. Näillä arvoilla piirrettiin standardikuvaaja absorbanssi-arvoista konsentraation funktiona (kuva 14).



Kuva 14 Ohutsuolinäytteiden mittauksessa käytetty standardisuora

Näytteiden absorbansseista otettiin samaan tapaan 10-kantaiset logaritmit ja sovitettiin suoralle. Ratkaistiin standardisuoran yhtälön perusteella näytteiden pitoisuudet. Näytteiden ACE1-konsentraatit jaettiin näytteistä määritetyillä kokonaisproteiinikonsentraatioilla, jolloin tulokset saatiin muodossa µg:aa ACE1-proteiinia mg:ssa kokonaisproteiinia (kuva 15). Samat laskut tehtiin paksusuolinäytteille (kuva 15), jonka määrittelyssä käytetyssä standardisuorassa  $R^2 = 0,9952$ . Tuloksissa kaikkien kolmen käsittelyryhmän ACE1 pitoisuudet (n=8). Pylväät ja pystyjanat kuvaavat keskiarvoa ja keskiarvon keskivirhettä (SEM).



**Kuva 15 ACE1 µg/mg kokonaisproteiinia ohut- ja paksusuolinäytteissä, n=8. Pystyjana = SEM.**

ACE1 ELISA-määrittysten perusteella käsittelyryhmien (kontrolli, 3 % DSS, 5 % DSS) välillä ei ole merkitsevää eroa. ACE1-pitoisuudet ovat ryhmien välillä otoksen keskivirheiden sisällä.

### 5.3 RT-qPCR-tulokset

#### *Alukkeiden tehokkuus ja sulamispiste-analyysi*

Amplikoneita TNF $\alpha$  ja CYP11B1 monistavien alukkeiden tehokkuus laskettiin tekemällä cDNA:sta laimennossarja 1:2, 1:4,1:8, 1:16 ja 1:32. Amplikoneiden  $\beta$ -aktiini, Rplp0, S18, ACE1, ACE2 ja LRH1 monistustehokkuus laskettiin tekemällä cDNA:sta laimennossarja 1:5, 1:25, 1:125, 1:625. Jokaiselle alukkeelle piirrettiin kuvaaja Ct arvoista konsentraation kymmenkertaisen logaritmin funktiona. Tehokkuus ( $E$ ) lasketaan kuvajan kulmakertoimen ( $S$ ) perusteella kaavalla 1:

$$E = 10^{\frac{-1}{S}} \quad [1]$$

Tulos muutetaan prosenttimuotoon kaavalla 2:

$$(E - 1) * 100 \quad [2]$$

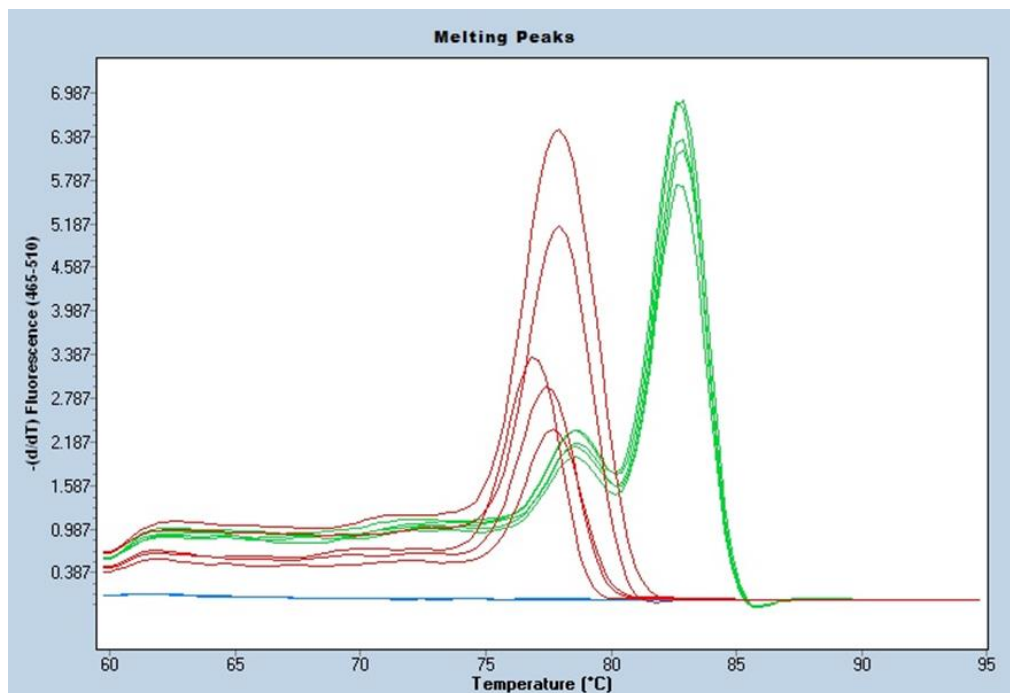
taulukossa 5 näkyy PCR -tehokkuus tietyille alukepareille.

**Taulukko 5 PCR -tehokkuus tietyille alukepareille**

Aluke	Tehokkuus (E)
ACE1	80 %
ACE2	105 %
TNF $\alpha$	94 %
LRH-1	65 %
CYP11B1	90 %
$\beta$ -aktiini	90 %
Rplp0	93 %
S18	76 %

Optimaalisesti tehokkuus on 90 - 100 %. Myös hieman yli 100 %:n tehokkuudet ovat hyväksyttäviä. Kuten tuloksista nähdään, alukkeet S18,  $\beta$ -aktiini, LRH-1 ja ACE1 eivät täytä näitä kriteereitä. [18; 37.]

Lisää informaatiota alukkeiden toiminnasta saadaan sulamispisteanalyysistä (liite 6). Alukkeet  $\beta$ -aktiini, S18, Rplp0, ACE1, ACE2 ja CYP11B1 näyttäisivat sulamispisteanalyysin perusteella monistavan yhtä spesifistä tuotetta. Alukkeet LRH-1 ja TNF $\alpha$  monistavat epäspesifisesti jotain muuta. Tämä ilmenee kuvaajassa useampana piikkinä. Esimerkkinä LRH-1:n sulamispisteanalyysi (kuva 16).



Kuva 16 LRH-1 sulamispisteanalyysi.

Kuten tuloksista havaitaan, hyvä tehokkuus ei välttämättä todista alukkeen monistavan spesifisesti haluttua tuotetta. TNF $\alpha$ :n sulamispisteanalyysi osoittaa sen monistavan useampaa kuin yhtä tuotetta vaikka sen tehokkuus oli hyvä, 94 %.

#### *Ekspressioiden mittaukset*

Korjaamattomia tuloksia eli Ct-arvoja käsiteltiin laskemalla ensiksi jokaisen käsittelyryhmän biologisten (käsittelyryhmän hiiren näyte) ja teknisten replikaattien (triplikaattipipetoinnit) keskiarvot jokaiselle amplikonille. Jokaiselle amplikonille saatiin siis kolme



Ct-keskiarvoa: kontrolli, 3 % DSS ja 5 % DSS. Seuraavaksi laskettiin jokaiselle amplikonille joka käsittelylle kontrollin ja käsittelyryhmän erotusta kuvaava arvo, delta-Ct (dCt). Tehokkuus arvot korotettiin potenssiin dCt-arvoilla joihin viitataan termillä relative quantity (RQ) (kaava 3).

$$RQ = \text{alukkeen tehokkuus}^{dCt} \quad [3]$$

Jokaiselle käsittelyryhmälle laskettiin kontrolligeenien muodostama yhtenen normalisaatiotekijä (NF). Käsittelyryhmän normalisaatiotekijä on kyseisen käsittelyryhmän jokaisen kontrolligeenin RQ-arvojen geometrinen keskiarvo (kaava 4).

$$NF = (j * n * k)^{\frac{1}{3}} \quad [4]$$

*j = 1. kontrolligeenin RQ*

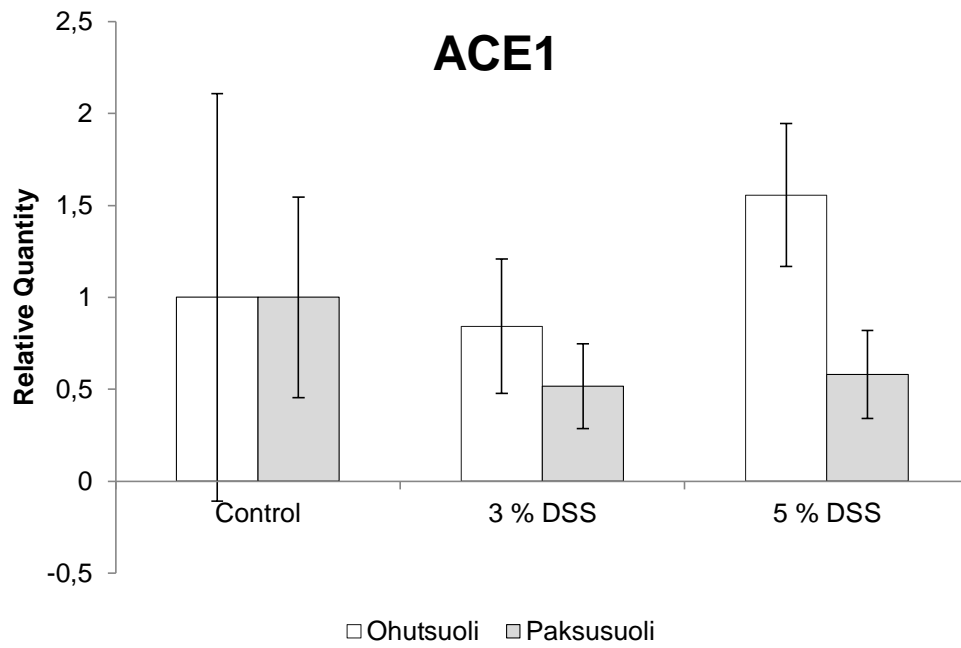
*n = 2. kontrolligeenin RQ*

*k = 3. kontrolligeenin RQ*

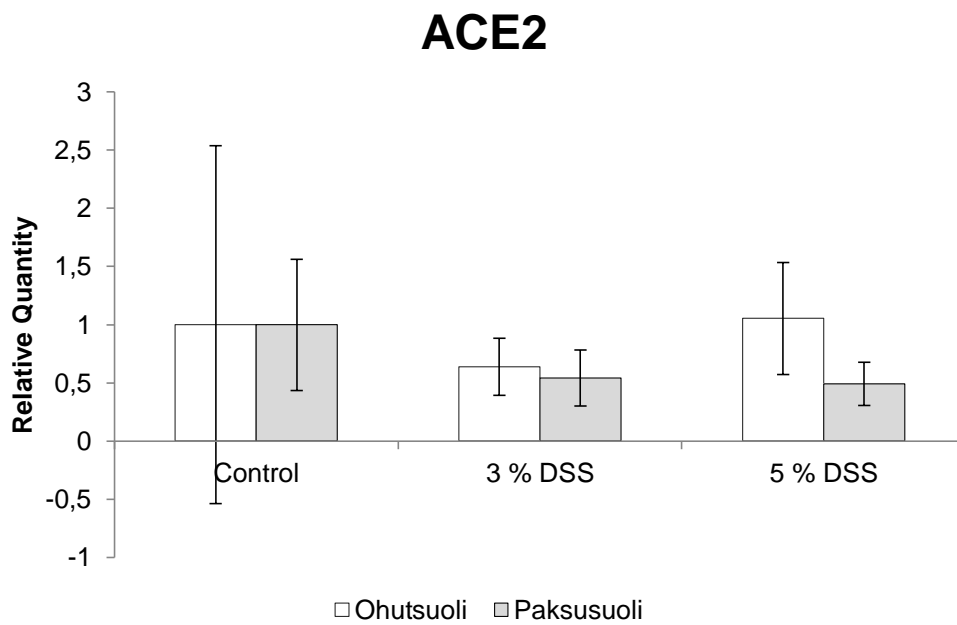
Viimeisenä RQ-arvo jaetaan kyseisen käsittelyryhmän NF-arvolla, jolloin saadaan NRQ arvo (normalisoitu suhteellinen pitoisuus). Näin kontrolliryhmän NRQ-arvo on aina 1, johon käsittelyryhmän arvoa verrataan (kaava 5).

$$NRQ = \frac{RQ}{NF} \quad [5]$$

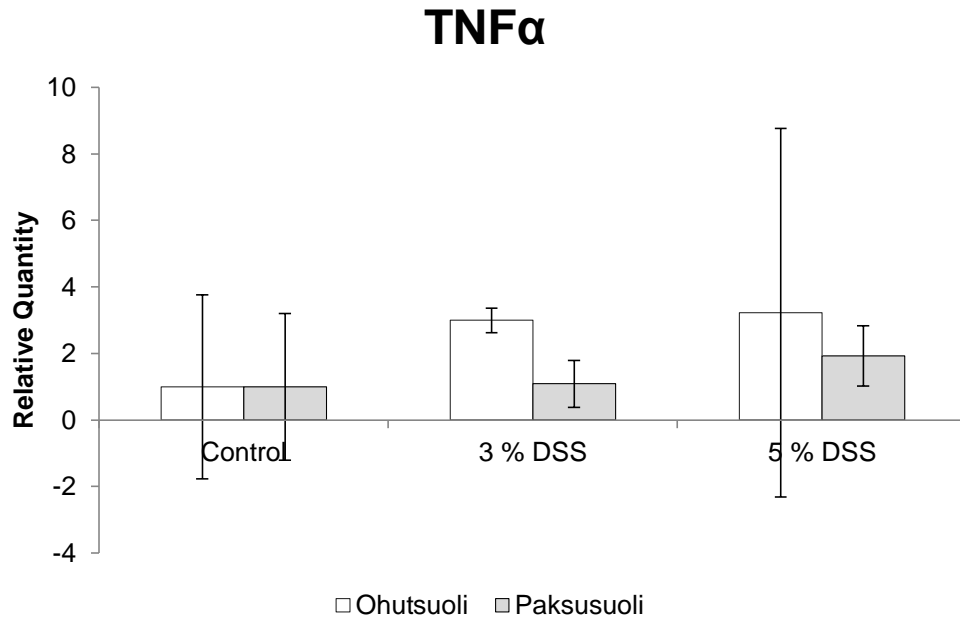
Seuraavassa kuvaajat tutkittavien komponenttien suhteellisista ekspressioista (kuvat 17 - 21). Virhepylväänä SEM, joka on biologisten replikaattien NRQ-arvojen keskiarvojen keskivirhe.



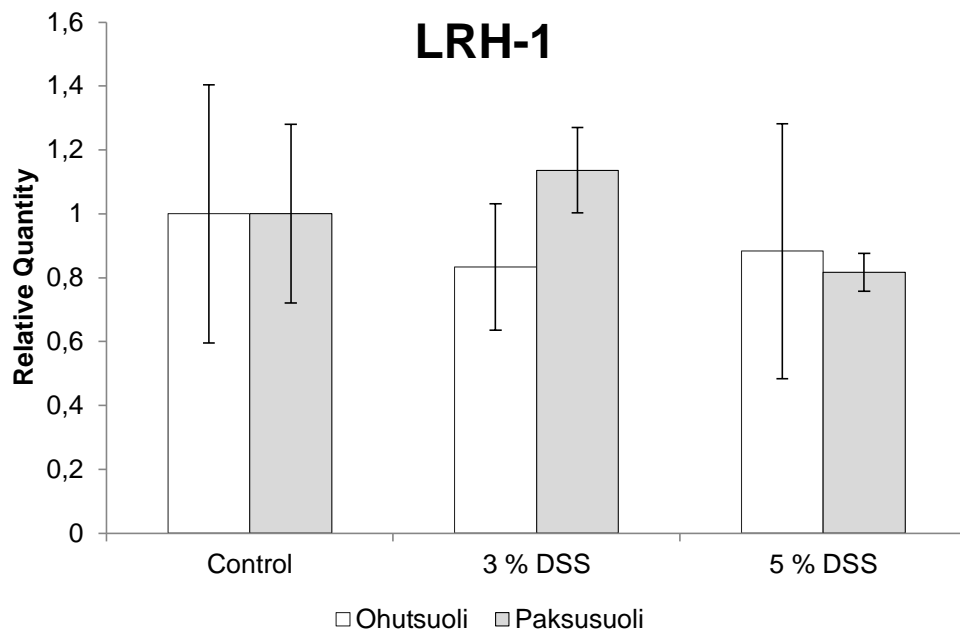
Kuva 17 ACE1:n suhteellinen ekspressio ohut- ja paksusuolinäytteissä, n=5, pystyjana = SEM.



Kuva 18 ACE2:n suhteellinen ekspressio ohut- ja paksusuolinäytteissä, n=5, pystyjana = SEM.

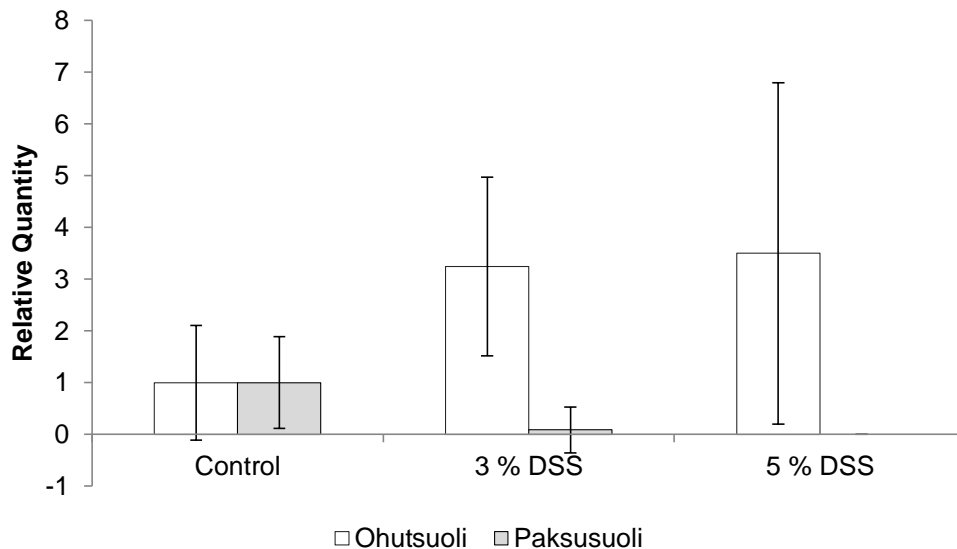


Kuva 16 TNF $\alpha$ :n suhteellinen ekspressio ohut- ja paksusuolinäytteissä, n=5, pystyjana = SEM.



Kuva 20 LRH-1:n suhteellinen ekspressio ohut- ja paksusuolinäytteissä, n=5, pystyjana = SEM.

## CYP11B1



Kuva 21 CYP11B1:n suhteellinen ekspressio ohut- ja paksusuolinäytteissä, n=5, pystyjana = SEM.

RT-qPCR –määrityksissä ongelmaksi osoittautui biologisten replikaattien välinen hajonta. NRQ-arvojen hajonta on liian suurta, minkä takia tilastollisesti merkittäviä eroja ekspressioeroista ei voida arvioida.

## 6 Päätelmät

Western blot on työläs menetelmä, jossa on paljon muuttujia, kun selvitetään syytä menetelmän toimimattomuuteen. Opinnäytetyön menetelmä saatiin käynnistettyä ja toimimaan luotettavasti  $\beta$ -aktiinille spesifisellä vasta-aineella, mutta mielenkiinnon kohteena olleita ACE1- ja ACE2 -proteiineja ei pystytty määrittämään. Menetelmän voisi kehittää toimivaksi ACE1:lle ja ACE2:lle löytämällä ja käyttämällä spesifisesti toimivia primaari-vasta-aineita. Menetelmän tehokkuus on paljon kiinni juuri siitä, onko käytettävissä toimivaksi todettuja spesifisiä vasta-aineita, mikä osoittautui opinnäytetyössä todennäköiseksi virhelähteeksi menetelmän toimivuuden kannalta. Toinen mahdollinen syy menetelmän toimimattomuuteen voisi olla tutkittavien proteiinien hajoamien näytteenkäsittelyssä. On kuitenkin epätodennäköistä, että kaikki tutkittava ACE1- ja ACE2 -proteiini olisi hajonnut näytteenkäsittelyn ja western blot -ajon aikana.

ELISA-menetelmä saatiin toimimaan ACE1-proteiinille käytetyssä näytematriisissa. ELISA –määritysten perusteella käsittelyryhmien (kontrolli, 3 % DSS, 5 % DSS) välillä ei ole merkitsevää eroa. Paksusuolella näyttäisi olevan noin kaksinkertainen määrä

ACE1-proteiinia ohutsuoleen verrattuna käytetyissä näytteissä. Ohut- ja paksusuolinäytteiden tulokset ovat kuitenkin eri mittauksista, joten niitä ei voi pitää täysin vertailukelpoisina. Lisäksi vasta-aineen mahdollinen epäspesifinen sitoutuminen korostuu, kun näytematriisina on paksusuoli, joka sisältää ohutsuolta enemmän mittausta häiritseviä tekijöitä kuten esimerkiksi bakteereita.

Tutkimusryhmän muissa kokeissa havaittiin, että *ex-vivo* –inkubaatiossa (kts. kpl. 4.1) ACE1:n pitoisuus kasvaa ajan funktiona näyteliuoksessa. Opinnäytetyön tulokset tukevat hypoteesia, jossa ACE1 pystytään vapauttamaan solukalvosta inkuboinnin seurauksena. Opinnäytetyön tuloksista ilmenee, että ACE1:n pitoisuudessa ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyryhmien välillä ennen inkubaatota.

Menetelmä on varsin nopea verrattuna western blot-menetelmään ja sisältää huomattavasti vähemmän mahdollisia virhelähteitä. Toisaalta ELISA-menetelmän tehokkuus ja luotettavuus on lopulta kiinni vasta-aineen toimivuudesta kuten western blot-menetelmässäkin. Vertailtaessa näitä kahta menetelmää ELISAn eduksi voidaan siis laskea erityisesti menetelmän nopeus.

RT-qPCR-menetelmä saatiin käytännössä toimimaan. Alukkeiden laskennalliset tehokkuusarvot jäivät kokonaisuudessaan hieman toivottua alhaisemmiksi (taulukko 5) optimaalisen tehokkuuden ollessa yli 90 %. Sulamispiste-analyysin perusteella ainoastaan LRH-1:ä ja TNF $\alpha$ :aa vastaavat alukeparit monistavat epäspesifisesti jotain muuta tuotetta. Muut alukeparit näyttävät sulamispiste-analyysin perusteella monistavan spesifisesti haluttua tuotetta. Biologisten replikaattien välisen hajonnan suuruuden takia ei pystytty määrittämään, onko eri käsittelyryhmien välillä tilastollisesti merkitsevää eroa tutkittavien komponenttien kohdalla. Teknisten replikaattien eli kuoppalevyille pipetoitujen rinnakkaisnäytteiden hajonta samoista biologisista näytteistä oli hyväksyttävällä tasolla. Menetelmää voisi kehittää suunnittelemalla yli 90 %:n tehokkuudella toimivat alukkeet ja saamalla biologisten replikaattien välisen hajonnan tasolle, millä voidaan vertailla käsittelyryhmien välisiä ekspressio-eroja tilastollisesti merkitsevällä tasolla.

## Lähteet

- 1 Paakkari, I. & Mervaala, E. 2013. Verisuonia laajentavat lääkkeet. Teoksessa: Koulu, M. & Mervaala, E. (toim.). Farmakologia ja toksikologia. Kuopio: Medicina.
- 2 Ruskoaho, H. & Pelkonen, O. 2003. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Kustannus Oy Medicina.
- 3 Klabunde, R. 2014. Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Verkkodokumentti. <http://cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP015.html>. Luettu 14.09.2014.
- 4 Sparks, M.A., Crowley, S.D., Gurley, S.B., Mirotsoy, M. & Coffman, T.M. 2014. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney. American Physiological Society, Comprehensive Physiology 4, s. 1201—1228.
- 5 Xanthakis, V. & Vasan, R.S. 2013. Aldosterone and the Risk of Hypertension. Current hypertension reports Vol. 15, nro. 2, s.102—107.
- 6 OPS diagnostics. 2012. Guide to the Disruption of Biological Samples. Verkkodokumentti <http://opsdiagnostics.com/applications/samplehomogenization/homogenizationguidepart4.html>. Luettu 10.09.2014 .
- 7 NanoDrop Technologies, 2007. TECHNICAL SUPPORT BULLETIN T009. 260/280 and 260/230 Ratios. Verkkodokumentti. [http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop\\_tip.pdf](http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf). Luettu 28.09.14.
- 8 Macherey Nagel. 2012. Total RNA and protein isolation, user manual NucleoSpin® RNA/Protein, February /Rev.08.
- 9 Thermo Scientific. Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Verkkodokumentti. <https://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf>. Luettu: 08.09.2014.
- 10 Abcam, Definitive guide to western blot. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Verkkodokumentti. <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>. Luettu 08.09.2014.
- 11 Hayworth, D. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Chemistry of Protein Assays. Verkkodokumentti. <http://www.piercenet.com/method/chemistry-protein-assays#copperassays>. Luettu 9.9.2014
- 12 Abcam. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Anti-beta Actin antibody (ab8227). Verkkodokumentti. <http://www.abcam.com/beta-actin-antibody-ab8227.html>. Luettu 03.10.2014.

- 13 Sigma-Aldrich. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin antibody produced in mouse. Verkkodokumentti. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2228?lang=fi&region=FI>. Luettu 03.10.2014.
- 14 PhosphoSitePlus. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. RPLP0 (mouse). Verkkodokumentti. <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=4241&showAllSites=true>. Luettu 03.10.2014.
- 15 Ferrell, C. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. The New Favorite Reference Gene: 36B4, a.k.a. RPLP0. Verkkodokumentti. <http://blog.biosearchtech.com/TheBiosearchTechBlog/bid/27718/The-New-Favorite-Reference-Gene-36B4-a-k-a-RPLP0>. Luettu 04.10.2014.
- 16 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, Vol. 3, nro. 7. research 0034.1-0034.11.
- 17 IDT. 2010. Self-Dimer and Hetero-Dimer Results Guide. Verkkodokumentti. [http://eu.idtdna.com/pages/docs/default-source/default-document-library/idt\\_self-dimer\\_and\\_hetero-dimer\\_results\\_guide.pdf](http://eu.idtdna.com/pages/docs/default-source/default-document-library/idt_self-dimer_and_hetero-dimer_results_guide.pdf). Luettu 06.10.2014.
- 18 Kennedy, S. 2010. Important Considerations for Determining qPCR Efficiency. Verkkodokumentti. <http://bitesizebio.com/3177/important-considerations-for-determining-qpcr-efficiency/>. Luettu 06.10.2014.
- 19 Thermo scientific. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Basic Principles of qPCR. Verkkodokumentti. <http://www.thermoscientificbio.com/applications/pcr-and-qpcr/introduction-to-qpcr/>. Luettu 07.10.2014.
- 20 Abcam. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Anti-Angiotensin Converting Enzyme 1 antibody - N-terminal (ab182770). Verkkodokumentti. <http://www.abcam.com/angiotensin-converting-enzyme-1-antibody-n-terminal-ab182770.html>. Luettu 07.10.2014.
- 21 Bernstein, K.E., Ong, F.S., Blackwell, W.L., Shah, K.H., Giani, J.F., Gonzalez-Villalobos, R.A., Shen, X.Z., Fuchs, S., & Touyz, R.M. 2013. A Modern Understanding of the Traditional and Nontraditional Biological Functions of Angiotensin-Converting Enzyme. *Pharmacological reviews*. Vol. 65, nro. 1. s.1—46.
- 22 Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R., & Clark, KL. 2002. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *Febs letters*, Vol. 4;532, nro. 1—2, s. 107.

- 23 PhosphoSitePlus. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. ACE2 (human). Verkkodokumentti. <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=14935&showAllSites=true>. Luettu 9.10.2014.
- 24 Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M.L., Lely, A.T., Navis, G., & van Goor, H. 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.
- 25 Garg, M., Burrell, L.M., Velkoska, E., Griggs, K., Angus, P.W., & Gibson, P.R. Lubel, JS. 2014. Upregulation of circulating components of the alternative renin-angiotensin system in inflammatory bowel disease: A pilot study. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system*, I-II.
- 26 Clarke, N.E. & Turner, A.J. 2011. Angiotensin-Converting Enzyme 2: The First Decade. *International Journal of Hypertension*, Vol. 2012, Article ID 307315.
- 27 Paul, M., Poyan Mehr, A., & Kreutz, R. 2006. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev* 86: s. 747—803.
- 28 Garg, M., Angus, P.W., Burrell, L.M., Herath, C., Gibson, P.R. & Lubel, JS. 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.
- 29 Fändriks, L. 2009. The angiotensin II type 2 receptor and gastrointestinal tract. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system*, Vol. 11, nro. 1, 43—8.
- 30 Färkkilä, M. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Tulehdukselliset suolistosairaudet. Verkkodokumentti. [http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Tulehdukselliset\\_suolistosairaudet](http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Tulehdukselliset_suolistosairaudet). Luettu 10.10.2014.
- 31 Crohn ja colitis RY. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Mitä lääkkeitä on saatavilla?. Verkkodokumentti. [http://www.haavainenkoliitti.fi/diagnoses/treating\\_uc/treatments\\_available/index.asp](http://www.haavainenkoliitti.fi/diagnoses/treating_uc/treatments_available/index.asp). Luettu 10.10.2014.
- 32 Westbrook, A.M., Szakmary, A., & Schiestl, RH. 2010. Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: Lessons learned from mouse models. *Mutation research*, Vol. 705, nro. 1, s.40—59.
- 33 Xanthakis, V. & Ramachandran, V. 2013. Aldosterone and the Risk of Hypertension. *Current hypertension reports*, Vol. 15, nro. 2: 102—7.
- 34 Noti, M., Corazza, N., Mueller, C., Berger, B., & Brunner, T. 2010. TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis. *The journal of experimental medicine*, Vol 10;207(5):1057—66.



- 35 Schoonjans, K., Dubuquoy, L., Mebis, J., Fayard, E., Wendling, O., Haby, C., Geboes, K., & Auwerx, J. 2005. Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation. *PNAS*, Vol. 102, nro. 6. s. 2058 - 2062.
- 36 Chapman, K.E., Coutinho, A.E., Zhang, Z., Kipari, T., Savill, JS., & Seckl, JR. 2013. Changing glucocorticoid action: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, Sep;137. s. 82 - 92.
- 37 Life technologies. Julkaisuvuotta ei ilmoitettu. Poor Efficiency of PCR. Verkodokumentti. <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>. Luettu 12.10.2014.
- 38 Coste, A., Dubuquoy, L., Barnouin, R., Annicotte, J.S., Magnier, B., Notti, M., Corazza, N., Antal, M.C., Metzger, D., Desreumaux, P., Brunner, T., Auwerx, J., & Schoonjans, K. 2007. LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *PNAS*, Aug.7, Vol 104, nro 32, 13098–13103.

**Käytetyt puskuriliuokset**NP40 Buffer 100 ml

150 mM NaCl

1% Triton X-100

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

10X TBS, pH 7,6, 1000 ml

24.23 g Trizma base

80.06 g NaCl

1000 ml MilliQ H<sub>2</sub>O1X TBST 1000 ml

100 ml 10X TBS

1 g Tween20

900 ml MilliQ H<sub>2</sub>OBlokkauspuskuri

2.5 g maitojauhetta

50 ml TBST

10 x PBS 1000 ml

80 g NaCl

2 g KCl

14 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Reagent diluent (ELISA-menetelmä)

1 % BSA PBS:ssa

Pesupuskuri (ELISA-menetelmä)

0,05 % Tween 20 PBS:ssa

Krebs-puskuri pH 7,4 1000 ml

6,95 g NaCl

2,1 g NaHCO<sub>3</sub>

2 g glukoosia

1,6 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>

1,3 ml 3,5 M KCl

0,16 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>

0,1 ml 5M HCl

### **Kudosnäytteiden homogenisointi**

1. Jäädetyt kudosnäytteet (hiiren ohut- ja paksusuoli) pidettiin jäässä kuivajäillä sillä välin, kun homogenisaattori (Precellys 24 Lysis & Homogenization, Bertin Technologies) jäähdytettiin noin 0 °C:seen jäähdytysyksikössä (Cryolys, Bertin Technologies) olevalla nestetyellä.
2. Homogenointiputkiin laitettiin 4 pientä helmeä sekä 350 µl lyysaus-puskuria. Laitettiin putkiin 20 – 30 mg:n painoinen kudospala. Ravisteltiin putkea, jotta kudospala saataisiin heti lyysauspuskuriin homogenointiputken pohjalle.
3. Laitettiin homogenointiputket homogenisaattoriin. Ajettiin laitteen ohjelmalla 5400 rpm, 1 x 35 s. Ajo keskeytettiin kuitenkin aina noin 20 s ajon jälkeen. Pidemmät ja voimakkaammat homogenisointiohjelmat sekä etenkin isommat helmet rikkoivat satunnaisesti homogenointiputkia. Pienillä helmillä putket säilyivät joka kerta ehjinä.
4. Homogenaatit pipetoitiin Eppendorf-putkiin ja säilöttiin välittömästi kuivajäille.

## Western blot -menetelmä

### *Näytteenkäsittely ja kokonaisproteiini*

1. Näytteiden kokonaisproteiini määritettiin BCA-kitillä (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific), minkä jälkeen näytteet laimennettiin näytepuskuriin siten, että 10 µl:ssa valmista näytettä on 20 µl kokonaisproteiinia. Näytteet keitettiin näytepuskurissa +95 °C:ssa 5 min. Näytteet vorteksoitiin ennen ja jälkeen keittämisen ja olivat tässä vaiheessa valmiita näyteajoon. Näytteet voitiin vaihtoehtoisesti tässä vaiheessa pakastaa ja sulatuksen yhteydessä keitettiin vielä uudestaan +95 °C:ssa 5 min.

### *SDS-PAGE ja blottaus*

2. SDS-PAGE-ajoa varten tehtiin geelit itse (8 - 10% Akryyliamidigeeli, liite 4), tai käytettiin valmiita kaupallisia geelejä (Bio Rad, Mini PROTEAN TGX 7,5 %). Bioradin ajolaitteisto valmisteltiin asettamalla geelit laitteeseen ja kaatamalla 1x laimennettua ajopuskuria (Biorad Tris/glycine/SDS) sisäkammioon. Näytteet pipetoitiin geelille (10 µl/kaivo). Molekyylipainostandardia (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10-250K, Thermo Scientific) pipetoitiin 7 µl/kaivo. Täytettiin myös ulkokammio ajopuskurilla ja ajettiin 100 V:n jännitteellä ensin 15 min, jonka jälkeen ajettiin vielä noin 45 min 125 V:n jännitteellä.
3. SDS-PAGE-ajon jälkeen siirryttiin suoraan blottaukseen, joka tehtiin laitteella Bio rad, Trans-Blot® Turbo™ Transfer System. Käytettiin laitteelle yhteensopivia PVDF-kalvoja (Bio rad, Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs). Toinen geelin laseista irroitettiin ja geeli siirrettiin suodatinpaperipinon ja kalvon päälle. Asetettiin toinen suodatinpaperipino geelin päälle ja rullattiin ilmakuplat pois. Ajattiin blottausohjelma laitteen "High MW"-ohjelmalla
4. Blottauksen jälkeen membraani värjättiin "Ponceau Red"-väriaineella. Membraani upotettiin väriaineeseen ja inkuboitiin sitä ravistuksessa 10 min. Inkuboinnin jälkeen huuhdeltiin membraania hieman vedellä, jolloin membraanilla olevat proteiinibandit näkyivät hieman paremmin. Kun blottauksen onnistuminen oli varmistettu, pestiin membraani väriaineesta TBST:llä 4x5 min heilurissa. Blottattu geeli värjättiin yön yli Coomassie-väriaineessa ja pestiin sen jälkeen vedellä, kunnes proteiinibandit erottuivat selkeästi. Näin pystyttiin havainnoimaan, oliko geelille jäänyt membraanille siirtymättömiä proteiineja.

### *Blokkaus ja vasta-aineinkubaatiot*

Pesuvaiheen jälkeen membraani blokattiin blokkauspuskurissa ( 5 % maitojauhe-TBST) 1 h 4 °C:ssa lievässä ravistuksessa.

5. Membraania inkuboitin primaari-vasta-aineessa yön yli 4 °C:ssa lievässä ravistuksessa. Vasta-aine laimennettiin blokkaupuskuriin.
6. Membraania pestiin TBST:llä 4x5 min ravistuksessa. Otettiin detektioreagensit tässä vaiheessa tasaantumaan huoneenlämpöön.
7. Membraania inkuboitin sekundaari vasta-aineessa 1 tunti huoneenlämmössä ravistuksessa. Vasta-aine laimennettiin TBST:hen.

#### *Detektointi*

8. Membraania pestiin TBST:llä 4x5 min ravistuksessa.
9. Sekoitettiin detektioreagenssit A ja B (Amersham ECL Plus western Blotting Detection Reagents) kitin ohjeiden mukaisesti suhteessa 1:40 falcon-putkessa ja pipetoitiin liuosta välittömästi membraanille niin, että pinta membraanin pinta peittyi kokonaan. Inkuboitin 5 min.
10. Asetettiin membraani kuvantamislaitteeseen (Fujifilm FLA-9000) ja kuvattiin membraani fluorescence ja ECL Plus-ohjelmalla PMT-asetuksella 300. Jos tutkittavat bandit olivat saturoituneet tai kuva oli liian tumma, kokeiltiin PMT -asetusta 250. Jos taas kuva oli liian haalea, kokeiltiin korkeampia PMT -asetuksia kuten 400 tai enemmän.

#### *Membraanin strippaus*

11. Kun kuvat olivat tallennettu, huuhdeltiin membraania TBST:ssä muutaman kerran.
12. Esilämmitettiin strippauspuskuri 60 °C:seen falcon-putkessa vesihautteessa. Käytettiin strippauspuskuriä joka sisälsi seuraavasti reagensseja totaalitylavuudessa 100 ml: 20 ml 10 % SDS, 12,5 ml 0,5 M tris-HCl pH 6,8, 67,5 ml milli-Q vettä, 0,8 ml 2-merkaptotetanoli. Asetettiin membraani kannelliseen muoviastiiaan, jonne pipetoitiin noin 25 ml strippauspuskuriä. Inkuboitin 60 °C vesihautteessa noin 30 min. Välillä astiaa heilutellen.
13. Inkubaation jälkeen huuhdeltiin membraania juoksevalla vedellä niin kauan, kunnes membraani ei haissut enää 2-merkaptotetanolilta.
14. Membraania pestiin TBST:llä 4x5 min ravistuksessa.

Membraani oli nyt valmis blokkaukseen ja vasta-aineinkubaatioihin kuten edellä.

**Akryyliamidigeelit**

## Alageeli

H <sub>2</sub> O	4,63 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
30 % acrylamide/ bisacrylamide	2,7 ml
10 % APS	60 µl
TEMED	13 µl

## Ylägeeli

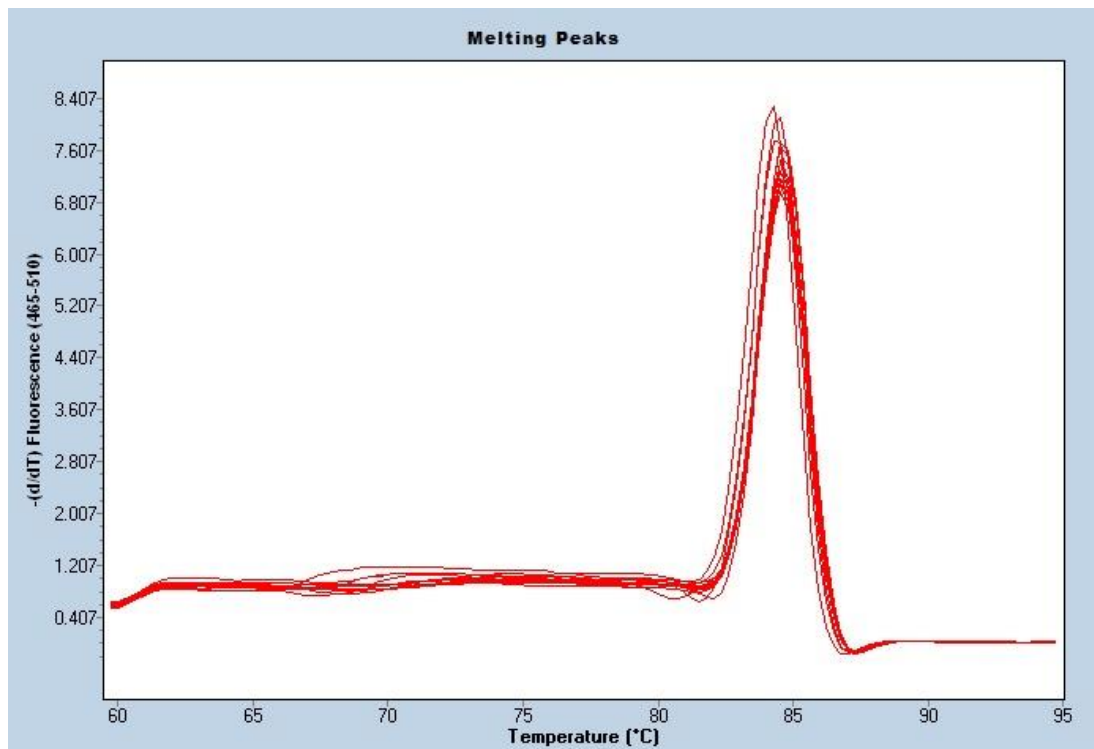
H <sub>2</sub> O	2,95 ml
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
30 % acrylamide/ bisacrylamide	700 µl
10 % APS	25 µl
TEMED	20 µl

Käytetyt alukeparit

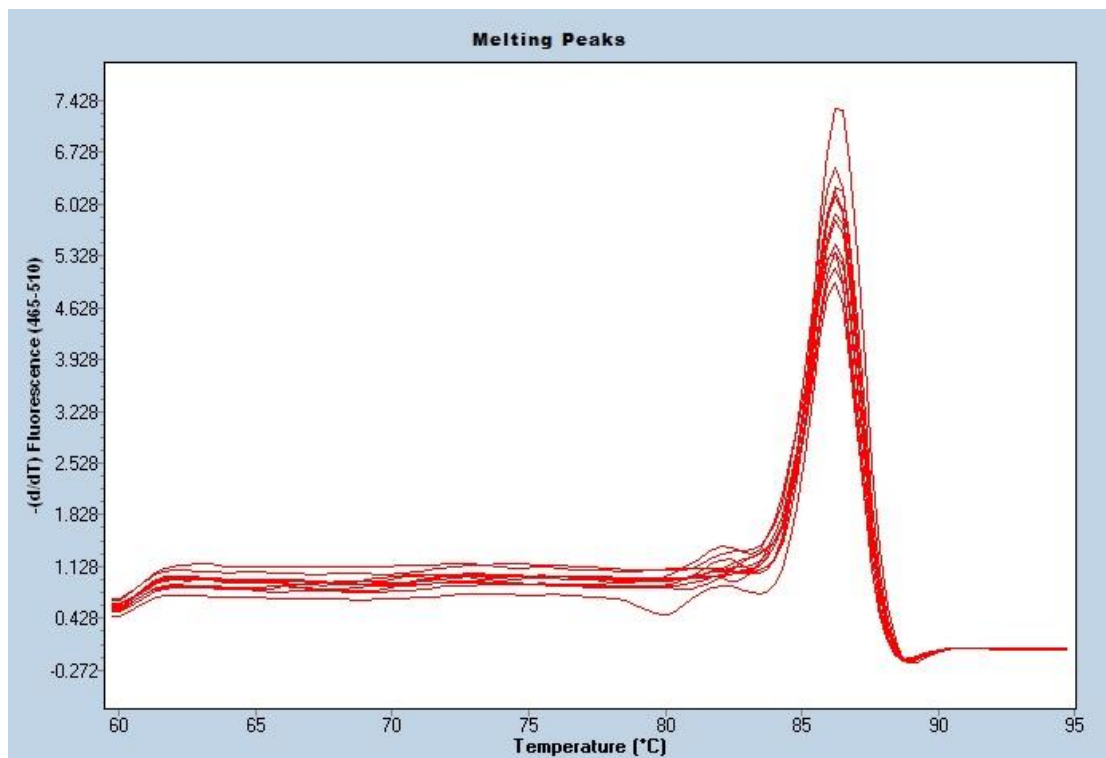
Batch #	Oligo Name	Oligo #	Leaf Pur	Scale	MW	Tm°	µg/OD	OD	µg	nmol	Epsilon <sub>1% (1mM,cm)</sub>	Dimer	2ndry	GC %	µl for 100µM	Sequence(5'-3')
HA06604578	ACE1_F1	8017390224-000010	20	DST	6247	66.4	32.0	14.3	458.5	73.4	194.8	No	None	55	734	GCTGAGGGTCTTTGATGGA
HA06604579	ACE1_R1	8017390224-000020	20	DST	6127	65.3	33.0	13.7	453.2	73.9	185.2	No	None	55	739	AGTCACCCTGGGATCTTGGC
HA06604580	ACE2_F1	8017390224-000030	20	DST	6207	62.8	32.8	9.2	301.9	48.6	189.1	No	None	55	486	CTGTGAACCTGGTGGGACTGT
HA06604581	ACE2_R1	8017390224-000040	20	DST	6133	63.8	30.2	13.2	399.1	65.0	202.8	No	None	55	850	CAGAAGCCACAGAGCATGAC
HA06604582	Actin_F1	8017390224-000050	20	DST	6161	67.1	32.3	13.8	446.5	72.4	190.4	No	Weak	60	724	CTGAATGGCCCGAGTCTGAG
HA06604583	Actin_R1	8017390224-000060	20	DST	6154	62.0	30.6	13.1	402.1	65.3	200.5	No	None	55	653	AAGTCAGTGTACAGGCCGCG
HA06604584	Rplp0_F1	8017390224-000070	20	DST	6089	63.5	31.5	10.2	321.6	52.8	193.1	No	None	50	528	TAACCCCTGAAGTGTCTGACA
HA06604585	Rplp0_R1	8017390224-000080	19	DST	5801	63.9	31.3	12.0	376.0	64.8	185.1	No	None	57.8	648	GGTACCCCGATCTGCAGACA
HA06604586	TNFa_F1	8017390224-000090	20	DST	5983	65.1	34.9	16.2	565.4	94.5	171.4	No	None	60	945	GGCCTCCCTCTCATCAGTTC
HA06604587	TNFa_R1	8017390224-000100	19	DST	5638	64.3	32.8	13.0	426.5	73.0	177.9	No	None	52.6	730	TTTTGCTACGACGTGGGCTA
HA06604588	18S_F1	8017390224-000110	20	DST	6139	63.8	30.7	12.2	375.3	61.1	199.5	No	None	50	611	AACGAACGAGACTCTGGCAT
HA06604589	18S_R1	8017390224-000120	20	DST	6016	63.2	33.2	14.8	492.7	81.9	180.7	No	Very Weak	55	819	ACGCCACTTGTCCTCTAAG
HA06604590	LRH-1_F1	8017390224-000130	24	DST	7377	63.4	32.3	11.9	385.5	52.2	227.7	No	Very Weak	41.6	522	TCGCTAAGAATGTCTGCTAGTTTG
HA06604591	LRH-1_R1	8017390224-000140	21	DST	6462	65.6	33.3	14.2	473.7	73.3	193.7	No	Weak	52.3	733	GAGTTGTTCCCTCACGTTTGGG
HA06604592	CYP11b1_F1	8017390224-000150	21	DST	6437	64.9	29.9	12.7	380.2	59.0	215	No	None	52.3	590	GGAAACCACCATCAGTAAGGA
HA06604593	CYP11b1_R1	8017390224-000160	20	DST	6000	66.9	32.8	11.8	386.1	64.6	182.4	No	Very Weak	50	646	TCITCCCTCACGCATGACAA



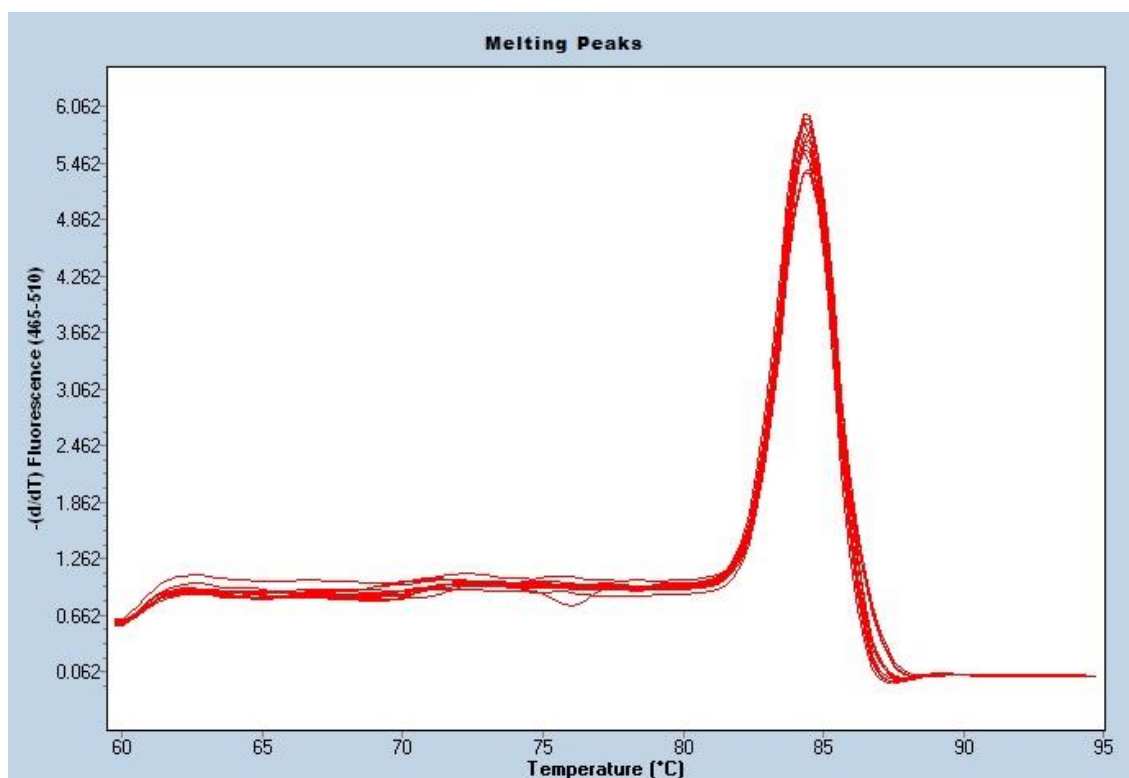
### Sulamispisteanalyysit



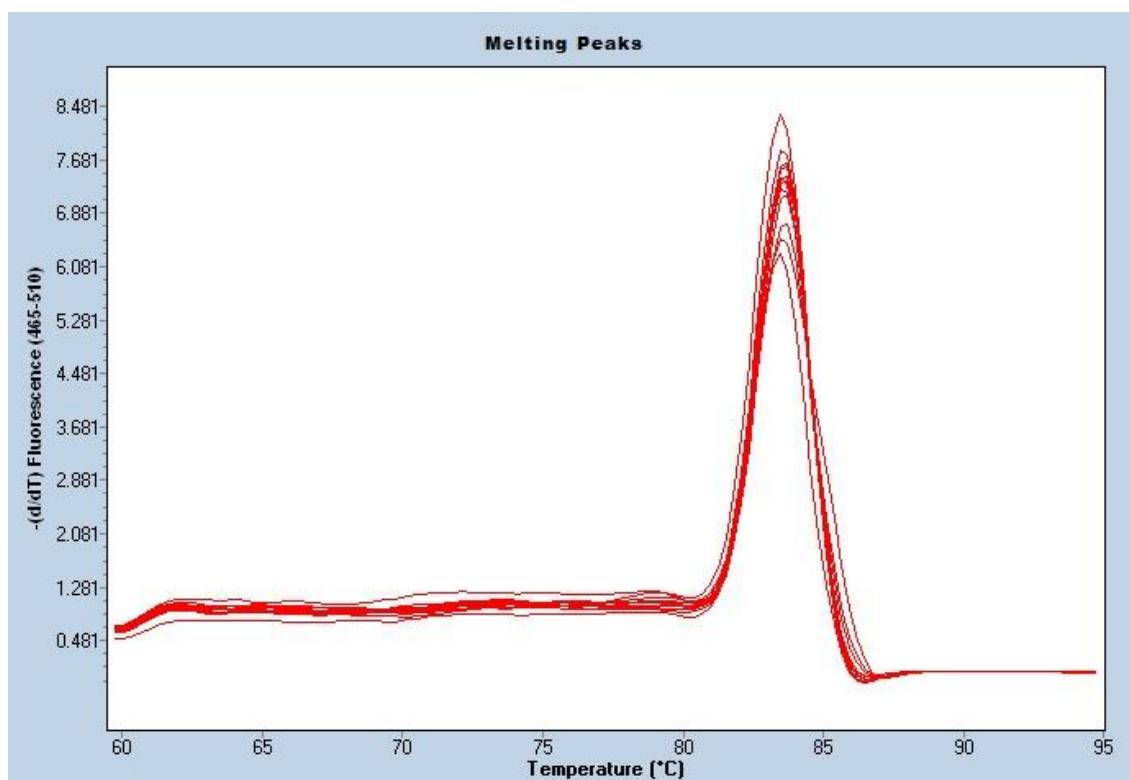
### $\beta$ -aktiini



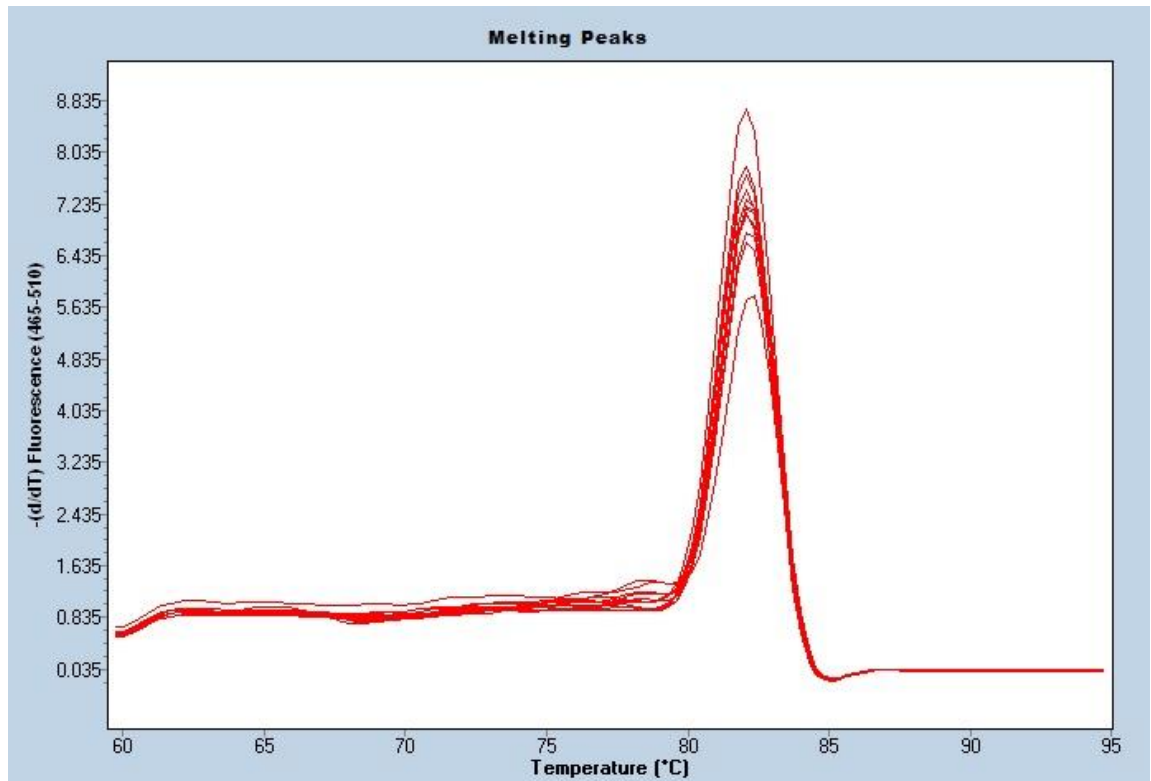
### Rplp0



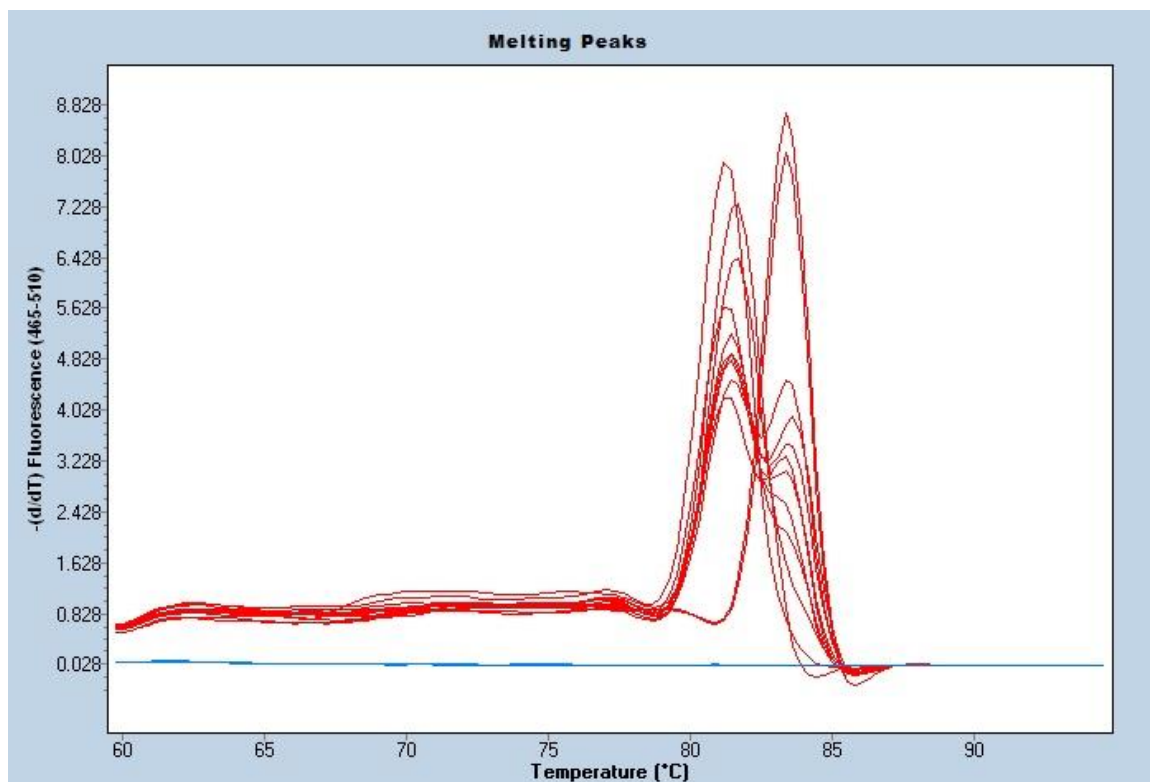
S18



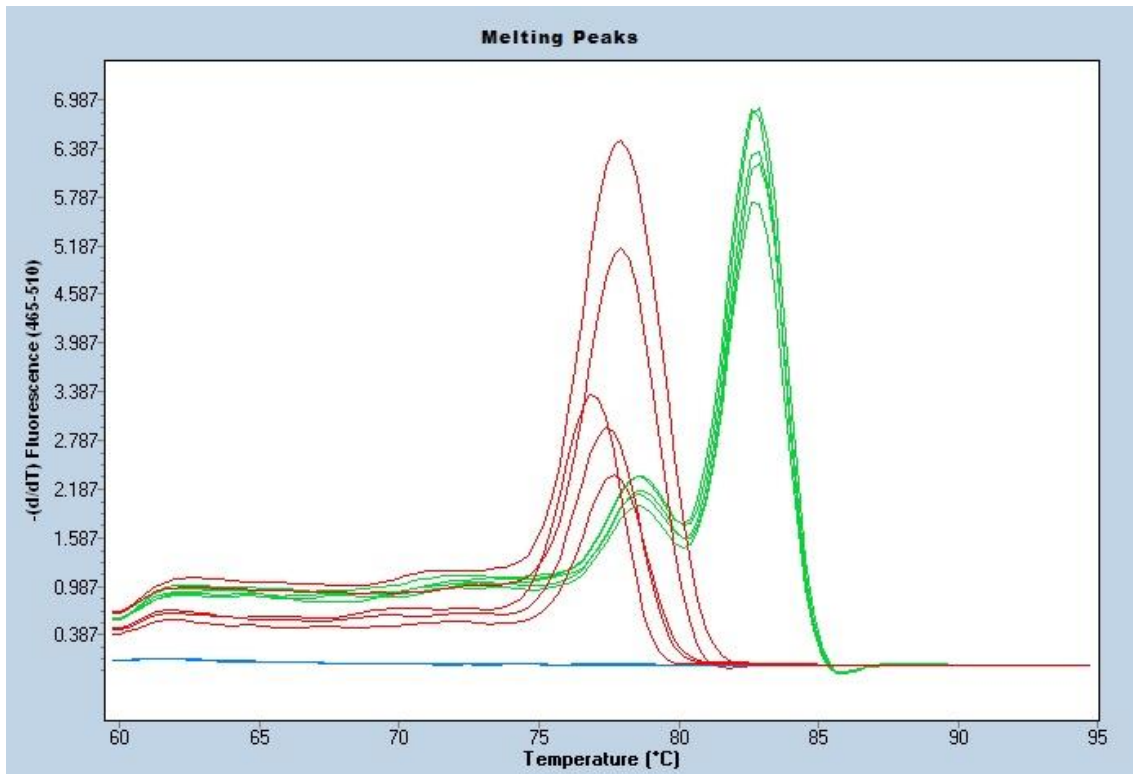
ACE1



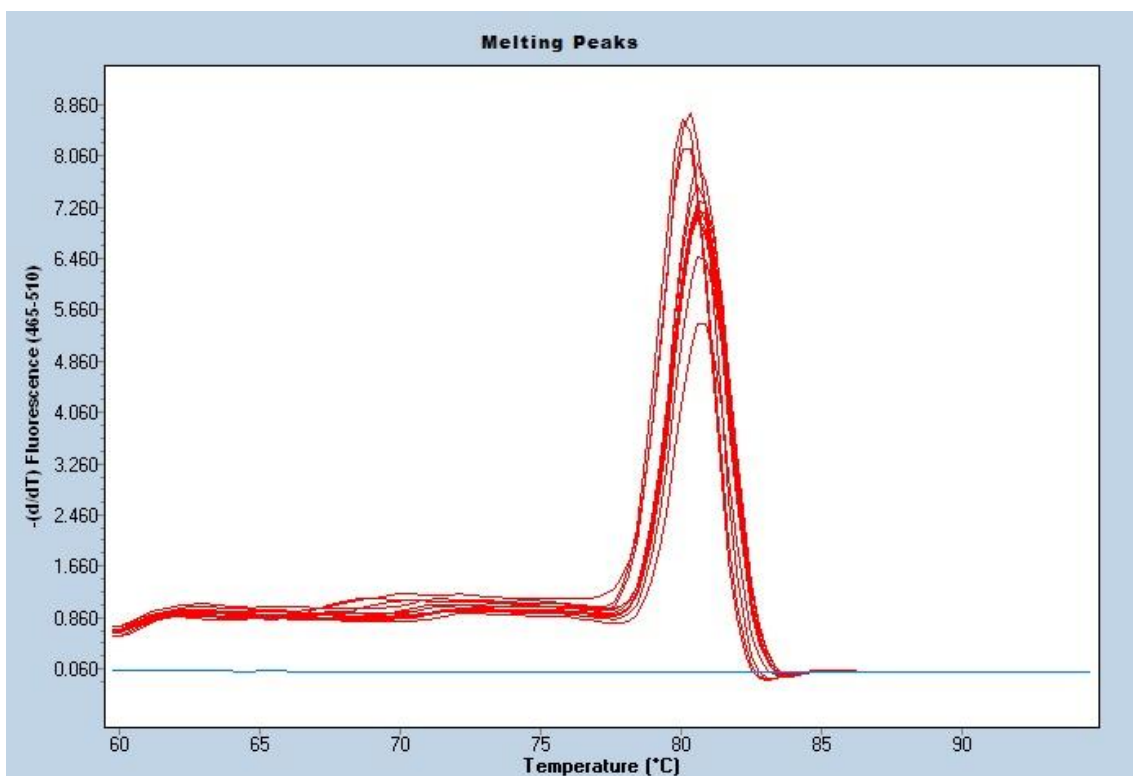
ACE2



TNF $\alpha$



LRH-1



CYP11B1