



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Annika Häme

Reniini-angiotensiinijärjestelmän merkitys suoliston
läpäisevyydessä:
Angiotensiini II:n, angiotensiini (1–7):n ja tiivisliitos-
proteiinien yhteys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööriyö

30.4.2020

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Annika Häme Reniini-angiotensiinijärjestelmän merkitys suoliston läpäisevyydessä: Angiotensiini II:n, angiotensiini (1-7):n ja tiivisliitosproteiinien yhteys 31 sivua + 1 liite 30.4.2020
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	insinööri (AMK), tutkija Hanna Launonen professori Riitta Korpela lehtori Carola Fortelius-Sarén
<p>Suoliston limakalvo valvoo aineiden kulkeutumista epiteelin läpi ja lisääntyneeseen suoliston läpäisevyyteen on liitetty useita sairauksia, kuten tulehdukselliset suolistosairaudet. Suolen limakalvon solujen välissä olevat tiivisliitokset, jotka koostuvat tiivisliitosproteiineista, liittävät epiteelisolut yhteen ja ovat tärkeitä suolen epiteelin ylläpitämisessä. Niiden vaurioituminen sekä toimintahäiriöt on yhdistetty suoliston lisääntyneeseen läpäisevyyteen.</p> <p>Verenpainetta ja nestetasapainoa säätelevä reniini-angiotensiinijärjestelmä (RAS) toimii myös paikallisesti suolistossa, jossa se osallistuu mm. tulehduksen syntymiseen. RAS:n vaikutukset ilmenevät, kun angiotensiiniä konvertoiva entsyymi (ACE) muodostaa angiotensiini II:a (ang II), joka sitoutuu angiotensiini tyyppiin 1 reseptoriin (ATR1). Ang II/ATR1 -akseli edistää tulehduksen kehittymistä ja muita haitallisia vaikutuksia. Toisessa RAS:n vaikutusreitissä angiotensiiniä konvertoiva entsyymi 2 (ACE 2) muodostaa angiotensiini 1-7:ää (ang (1-7)), joka sitoutuu mas- reseptoriin (MasR). Ang (1-7) /MasR -akselin vaikutukset ovat päinvastaisia verrattuna edelliseen.</p> <p>Työn tarkoituksena oli selvittää ang II:n ja ang (1-7):n vaikutusta tiivisliitosproteiineihin määrittämällä kolme eri tiivisliitosproteiinia, okludiini, klaudiini-1 ja klaudiini-4, Western blot -menetelmällä hiiren ohut- ja paksusuolen inkubaationäytteistä. Lisäksi Western blot -menetelmää optimoitiin kyseisille proteiineille.</p> <p>Okludiinin, klaudiini-1:n ja klaudiini-4:n proteiinitasot saatiin määritetyksi ja Western blot -menetelmää optimoitiin. Ang II vähentää klaudiini-4:ää paksusuolella verrattuna ang II +ang (1-7) -näyteryhmään tilastollisesti merkitsevästi. Myös muut tiivisliitosproteiinit näyttäisivät vähenevän ohut- ja paksusuolella ang II:n vaikutuksesta, joskaan tilastollisia eroja ei havaittu. Menetelmää voitaisiin parantaa lisäämällä geeleille tunnettu kontrollinäyte saman ajon eri geelien välisen eron pienentämiseksi.</p>	
Avainsanat	reniini-angiotensiinijärjestelmä, suoliston läpäisevyys, tiivisliitosproteiinit, okludiini, klaudiini-1, klaudiini-4

Author Title Number of Pages Date	Annika Häme Renin-angiotensin system in intestinal permeability: the relationship between angiotensin II, angiotensin (1-7) and tight junction proteins 31 pages + 1 appendix 30 April 2020
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Hanna Launonen, Bachelor of Engineering, Researcher Riitta Korpela, Professor Carola Fortelius-Sarén, Senior Lecturer
<p>The intestinal mucosa controls the passage of substances through the epithelium, and increased intestinal permeability is associated with several diseases, such as inflammatory bowel diseases. Tight junction proteins are part of the tight junction between the intestinal epithelial cells. Tight junctions are important in maintaining the mucosal barrier and their damage and dysfunction is linked to increased intestinal permeability.</p> <p>The blood pressure and fluid balance, regulating the renin-angiotensin system (RAS) acts also locally in the gut, where it contributes to the creation of inflammation. The effects of RAS occur when angiotensin converting enzyme (ACE) forms angiotensin II (ang II), which binds to the angiotensin type 1 receptor (ATR1). The Ang II / ATR1 axis promotes the development of inflammation and other harmful effects. In another RAS pathway, angiotensin converting enzyme 2 (ACE 2) forms angiotensin (1-7) (ang (1-7)), which binds to the mas-receptor (MasR). The effects of the Ang (1-7) / MasR axis are opposite to those of the Ang II / ATR1 axis.</p> <p>The aim of this thesis was to investigate the effect of ang II and ang (1-7) on tight junction proteins by determining three different tight junction proteins, occludin, claudin-1 and claudin-4. Samples were taken from a mouse's small and large intestine, and determinations were carried out by Western blotting. In addition, the western blot method was optimized for those proteins.</p> <p>Protein levels of occludin, claudin-1 and claudin-4 were determined, and the Western blot method was optimized. Ang II reduces claudin-4 in the colon statistically significantly compared to the ang II + ang (1-7) sample group. Other tight junction proteins would also appear to decrease in the small and large intestine due to the effect of ang II, although no significant differences were observed. The method could be improved by adding a known control sample to the gels to reduce the difference between different gels in the same run.</p>	
Keywords	renin-angiotensin system, intestinal permeability, tight junction proteins, occludin, claudin-1, claudin-4

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Reniini-angiotensiinijärjestelmä	2
3	Suolen rakenne	4
4	Tiivisliitosproteiinit	6
4.1	Okudiini	9
4.2	Klauniini-1 ja -4	9
5	Western blot	10
5.1	SDS-PAGE	10
5.2	Blottaus	11
5.3	Blokkaus	12
5.4	Vasta-aineet	13
6	Työn tausta ja tavoitteet	13
7	Materiaalit ja menetelmät	14
7.1	Koe-eläimet ja näytteiden inkubointi	14
7.2	Näytteiden homogenisointi	15
7.3	Proteiinipitoisuuden määrittäminen	15
7.4	Western blot	16
7.4.1	SDS-PAGE	16
7.4.2	Blottaus	16
7.4.3	Blokkaus	17
7.4.4	Vasta-aineet	17
7.4.5	Detektointi ja tilastollinen käsittely	18
7.4.6	Proteiinien poistaminen kalvolta	18
7.4.7	Näytteiden yhdistäminen	18
8	Tulokset ja tulosten tarkastelu	19

8.1	Vasta-aineiden optimointi	19
8.2	Blokkauksen optimointi	20
8.3	Ohutsuolinäytteiden proteiinitasot	21
8.4	Paksusuolinäytteiden proteiinitasot	22
8.5	Yhdistetyt näytteet	23
8.5.1	Ohutsuolinäytteen proteiinitasot	23
8.5.2	Paksusuolinäytteen proteiinitasot	25
9	Pohdinta	26
	Lähteet	29

Liite 1. Western blot -ohje

Lyhenteet

ACE	Angiotensiiniä konvertoiva entsyymi
ACE 2	Angiotensiiniä konvertoiva entsyymi 2
ang I	Angiotensiini I
ang II	Angiotensiini II
ang (1–7)	Angiotensiini (1–7)
AT1R	Angiotensiini 1 - reseptori
AT2R	Angiotensiini 2 - reseptori
IBD	Inflammatory bowel disease. Krooninen tulehduksellinen suolistosairaus.
MasR	Mas-reseptori
RAS	Renin-angiotensin system. Reniini-angiotensiinijärjestelmä
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyligeelielektroforeesi
TBS	Tris-puskuroitu suolaliuos
TBS-T	Tris-puskuroitu suolaliuos, jossa on Tween-20 -reagenssia

1 Johdanto

Suoliston lisääntyneeseen läpäisevyyteen ja sen limakalvoesteen vaurioitumiseen on liitetty useita sairauksia, kuten tulehdukselliset suolistosairaudet (IBD) sekä muutamat autoimmuunisairaudet. On oletettu, että kyseisissä sairauksissa tulehdusmekanismit laukeavat suolistossa tai muissa elimissä, jos immuunijärjestelmä ja mikrobiston tasapaino ovat muuttuneet. Syitä ovat suolen limakalvoesteen säätelyhäiriöt, immuunivastetta aiheuttavien molekyylien hallitsematon virta suolen epiteelin läpi ja muutokset tiivisliitosproteiineissa. Tarkkoja IBD:n kehittymiseen vaikuttavia solutason mekanismeja ei vielä tunneta. [1: 821–822.] Suolistossa paikallinen reniini-angiotensiinijärjestelmä (RAS), jonka komponentteja ovat angiotensiini II ja angiotensiini (1–7), osallistuu tulehduksen syntymiseen [2: 1–2].

Suolen limakalvolla on kaksi samanaikaista tehtävää. Se mahdollistaa ravintoaineiden imeytymisen ja toisaalta estää haitallisten aineiden kulkeutumisen verenkiertoon. Molekyylit kulkeutuvat transsellulaarista- ja parasellulaarista reittiä. Transsellulaarisen reitin kautta solun läpi kulkeutuvat ravintoaineet ja suuret molekyylit. Tiivisliitosproteiinit säätelevät parasellulaarista reittiä, jonka kautta kulkeutuvat ionit ja hydrofiiliset pienet molekyylit. [1: 823.]

Tämän insinööriyön tavoitteena oli arvioida RAS:n komponenttien, angiotensiini II:n ja angiotensiini (1–7):n vaikutusta tiivisliitosproteiineihin määrittämällä tiivisliitosproteiinit Western blot -menetelmällä hiiren ohut- ja paksusuolen inkubaationäytteistä. Määritettävät tiivisliitosproteiinit olivat okludiini, klaudiini-1 ja klaudiini-4. Tutkimukset tehtiin Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian yksikössä ravitsemusfysiologian tutkimusryhmässä.

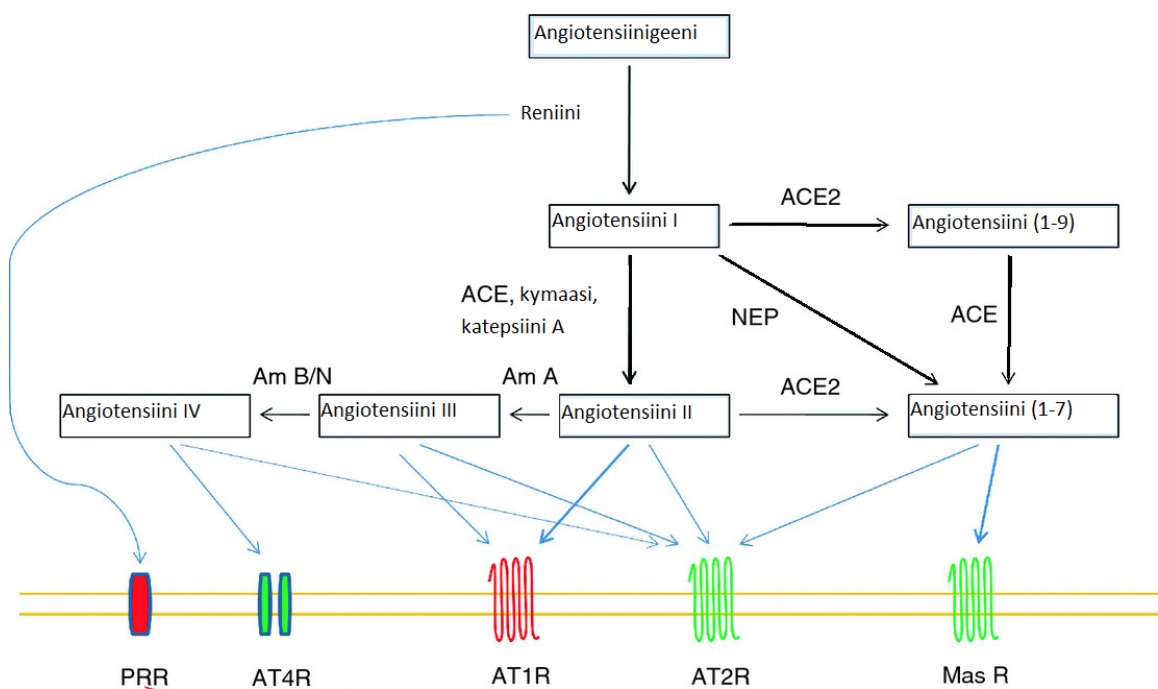
2 Reniini-angiotensiinijärjestelmä

Reniini-angiotensiinijärjestelmä (RAS) säätelee verenpainetta ja nestetasapainoa. Sen epänormaali aktivaatio voi johtaa korkean verenpaineen ja sydäsairauksien kehittymiseen. RAS-järjestelmän biologisesti aktiivisin komponentti on angiotensiini II (ang II) peptidi, jonka muodostuminen alkaa, kun munuaisissa muodostuva reniinientsyymi pilkkoo 10 aminohappoa maksaperäisen angiotensinogeenin N-terminaali päästä. Tällöin muodostuneesta angiotensiini I:stä (ang I) syntyy angiotensiiniä konvertoivan entsyymin (ACE) vaikutuksesta ang II. Aktiivinen reniini syntyy munuaisen jukstaglomerulaaristen solujen proreniinistä. Reniinin tuotannon laukaisee kolme keskeistä tekijää. Reniini vapautuu, kun verenpaine on matala, natriumkloridi vähenee munuaisen macula densa soluissa tai sympaattinen hermosto aktivoituu. [3: 1201–1214.]

ACE on dikarboksipeptidaasi, joka pilkkoo heikosti aktiivisen esiasteen, ang I:n c-terminaali päästä kaksi aminohappoa, jolloin muodostuu aktiivinen ang II peptidi. ACE:lla on myös muita aktiivisia peptidisubstraatteja, esimerkiksi bradykiniini. Se hajottaa bradykiniinin, jolla on verisuonia laajentavia ominaisuuksia, inaktiiviseksi peptidiksi. ACE:n estäjät eli ACE:n toiminnan estäminen on yksi mekanismi verenpaineen vähentämiseksi. ACE:lla on rakenteeltaan yli 40 % identtinen muoto, joka on ACE 2. ACE 2:n ilmentyminen on rajoittuneempaa, ja sen substraattiominaisuudet ovat myös erilaisia. ACE 2 pilkkoo matalammalla aktiivisuudella ang I:ä, mutta hydrolysoi korkealla tehokkuudella ang II:a. Ang II:n hajotessa ACE 2:n vaikutuksesta muodostuu angiotensiini (1–7) (ang 1–7), joka on biologisesti aktiivinen seitsemän aminohapon peptidi. [3: 1215–1217.]

Solun pinnalla olevat angiotensiinin reseptorit, jotka jaetaan kahteen luokkaan: AT1R ja AT2R, säätelevät ang II:n biologista vaikutuksia. AT1R aikaansaa useimpia klassisen RAS:n toimintoja. AT2R estää solun nopeaa lisääntymistä ja kasvua edistämällä solujen erilaistumista, laajentamalla verisuonia ja laskemalla verenpainetta. AT1R toimii päinvastoin eli aiheuttaa verisuonten supistumista. Tavallisesti siis AT1R:n kautta välittyvät ang II:n epäedulliset vaikutukset ja AT2R:n kautta välittyvät suojaavat vaikutukset. Kroonisesti kohonnut ang II edistää immuunijärjestelmän aktivaatiota sekä korkean verenpaineen ja tulehduksen kehittymistä. Immuunijärjestelmän aktivaatio tarkoittaa immuunisolujen nopeaa lisääntymistä ja tunkeutumista kudoksiin sekä tulehdussytokiinien tuotantoa. M2-makrofagin, jolla on tulehdusta lievittäviä vaikutuksia, polarisaatioon vaikuttaa

kuitenkin AT1R:iin sidottu ang II. [4: 3–7, 5: 6–7.] Ang II voi ACE-entsyymin lisäksi muodostua angiotensinogeenistä katepsiinin, toniinin tai kallikreiinin välityksellä. Myös ang I voi pilkkoutua katepsiinin ja kymaasin vaikutuksesta muodostaen ang II:ta. Kuvassa 1. on ang II:n muodostuminen ja RAS-järjestelmä yksinkertaistettuna. Verenpaineen ja elektrolyyttitasapainon säätelyn lisäksi ang II stimuloi aldosteronin synteesiä lisämunuaisen kuorikerroksessa. Aldosteroni vaikuttaa verenpaineeseen ja suolojen vaihtoon sen mineralokortikoidi-reseptorin kautta toimien eri kudoksissa eri tavalla. Lisäksi riippumatta systeemisestä RAS-järjestelmästä ang II:ta on löydetty useista kudoksista, joissa sitä tuotetaan paikallisesti. [5: 3–6.]



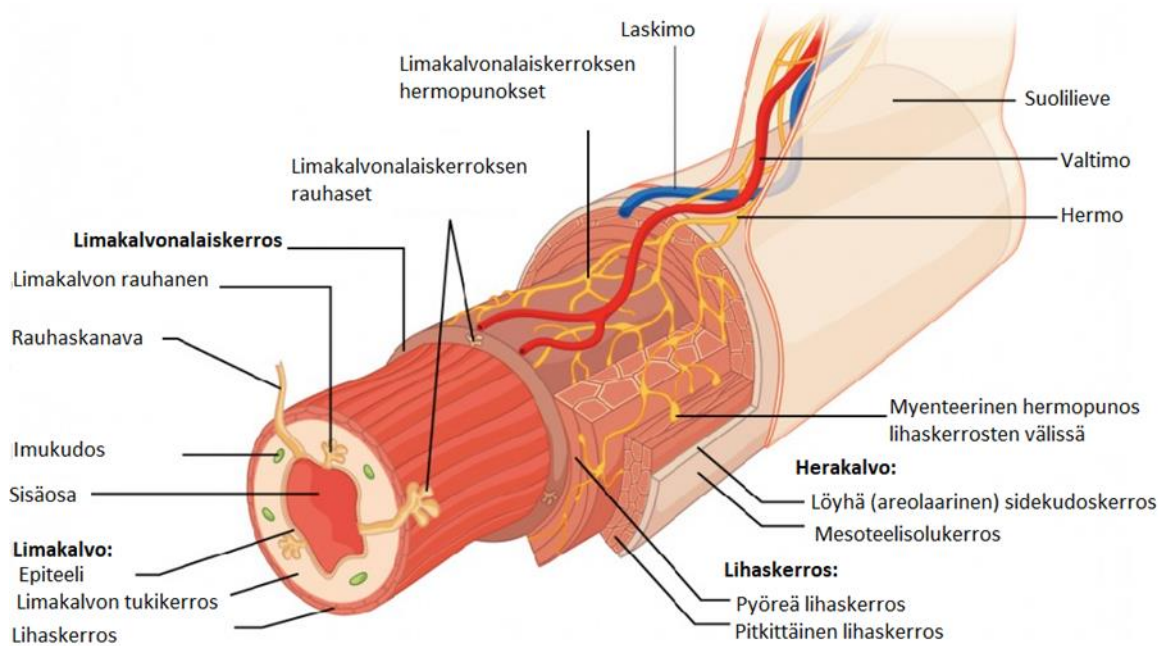
Kuva 1. Yksinkertaistettu kaavio reniini-angiotensiinijärjestelmästä. ACE2, angiotensiiniäkonvertoiva entsyymi 2; ACE, angiotensiiniä konvertoiva entsyymi; NEP, neutraali endopeptidaasi; Am A, aminopeptidaasi A; Am B/N, aminopeptidaasi B tai N; PRR, (pro)reniinireseptori; AT4R, angiotensiinin reseptori 4; AT1R, angiotensiinin reseptori 1; AT2R, angiotensiinin reseptori 2; Mas R, Mas-reseptori. [6, muokattu].

Ang (1–7) peptidi löydettiin 1980-luvulla. Sen toiminta on päinvastainen verrattuna AT1R:n säätelmän ang II:n toimintaan. Ang (1–7) peptidi muodostuu useimmiten ang II:sta ACE2-entsyymin vaikutuksesta. Se voi myös muodostua ang I:sta, jolloin välituotteena muodostuu ang (1–9), josta ACE pilkkoo ang (1–7):n. Jälkimmäinen muodostumisreitti on kuitenkin vähemmän merkityksellinen. Ang (1–7) peptidin vaikutukset

välittyvät pääasiassa Mas-reseptorin (MasR) kautta. Ang (1–7) /MasR - akselilla on monia vastakkaisia vaikutuksia verrattuna ang II/AT1R - akseliin. Näitä vaikutuksia ovat verisuonten laajeneminen, solun kasvun esto sekä tulehduksen, verisuonitukosten ja rytmihäiriöiden väheneminen ja lieventyminen. Vaikutukset ovat myös hyvin samanlaisia, kun ang (1–7) peptidi toimii vaihtoehtoisesti AT2R:n kautta. [5: 7–8.] Sillä on myös hyödyllisiä vaikutuksia aineenvaihduntasairauksiin, kuten diabetekseen. On tutkittu ihmisen ACE2- entsyymien kliinistä käyttöä, mutta haasteena on tuottaa korkealaatuista ACE2:ta, jolla on riittävä hyötyosuus kohdekudoksessa. Yhdessä tutkimuksessa hyödyllisiä vaikutuksia välittäväksi mekanismiksi on löydetty muokatun probioottilajin (*Lactobacillus paracasei*, LP) käyttäminen elävänä vektorina ihmisen ACE2:n kuljetukseen. Kahdessa diabeettisen retinopatian eli silmän verkkokalvosairauden hiirimallissa on ACE2–LP:n antaminen muun muassa vähentänyt verkkokalvon tulehdussytokiinien tuotantoa. [7: 161–165.]

3 Suolen rakenne

Ruuansulatuskanavassa suoliston seinämän rakenteeseen kuuluvat sisin kerros eli limakalvo (*mucosa*), jonka jälkeen järjestyksessä limakalvoalaiskerros (*submucosa*), lihaskerros (*muscularis externa*) ja herakalvo (*tunica serosa*) (kuva 2.). Limakalvo koostuu epiteelistä, limakalvon tukikerroksesta ja lihaskerroksesta. Epiteeli muodostuu useanlaisista erikoistuneista soluista. Limakalvon tukikerros on kollageeni - ja elastiini - kuituja sisältävä löyhä sidekudos, jossa on usean tyyppisiä rauhasia sekä imusuonia ja kapillaareja. Limakalvon lihaskerros on ohut sileälihaskerros, jonka supistukset muotoilevat limakalvoa. Seuraava kerros eli limakalvonalaiskerros on myös kollageeni - ja elastiinikuituja sisältävä löyhä sidekudos ja siellä sijaitsevat suolen seinämän suuret hermoringot ja verisuonet. Kerroksessa on myös rauhasia ja hermosolujen tiheä verkosto, enterinen hermosto. Lihaskerros koostuu kahdesta sileälihassolukerroksesta. Sisempänä on pyöreä lihaskerros, jonka supistus pienentää suolen läpimittaa. Uloimpana olevan pitkäntäinen lihaskerros työntää supistuksilla ruokasulaa eteenpäin. Uloimpana kerroksena on herakalvo, joka on sidekudosta päällystettynä leveillä mesoteelisolulla. [8: 539–563.]



Kuva 2. Suolen seinämän rakenteeseen kuuluu neljä peruskerrosta [9, muokattu].

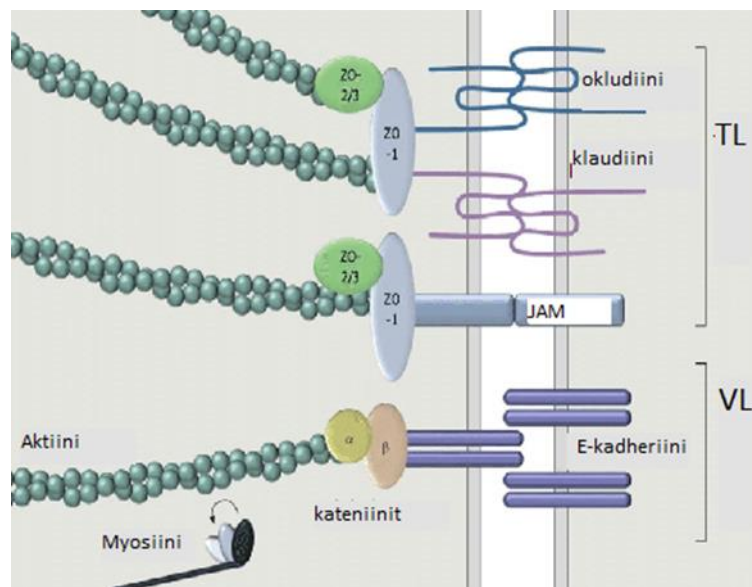
Ihmisen ohutsuolen pituus on noin 5 metriä. Ohutsuolessa on kolme osaa, jotka ovat *duodenum*, *jejunum* ja *ileum*. *Duodenum* on ohutsuolen alkuosa, *jejunumin* osuus koko ohutsuolen pituudesta on noin 40 %:a ja *ileum* on ohutsuolen viimeinen, distaalinen osa. Ohutsuolessa ruokasula sekoittuu, sen ravintoaineet imeytyvät suolinukan kautta ja se kulkeutuu paksusuoleen. Tämän aikaansaa ohutsuolen lihaskerroksen supistukset, jotka ovat segmentoivia ja peristalttisia. Segmentaatiossa supistukset jakavat suolen pieniin soikeisiin osiin, jolloin ruokasula sekoittuu tehokkaasti ja imeytyminen onnistuu. Peristalttisessa aaltoliikkeessä suolen sisältö työntyy eteenpäin pitkittäisillä supistuksilla. [8: 539–563.]

Paksusuolen osia ovat umpisuoli (*cecum*), nouseva, poikittainen ja laskeva paksusuoli (*colon*), peräsuoli (*rectum*) sekä peräaukon kanava (*anus*). Paksusuolen supistukset liikkuvat ja sekoittavat ruokasulaa hitaasti, noin 5–10 cm tunnissa, jolloin suolet ja veden imeytyminen helpottuu. Paksusuolella tapahtuu muutaman kerran päivässä massaliike, joka eroaa peristalttisista aalloista siten, että supistunut alue jää supistuksiin jokikin aikaa. Paksusuolen seinämän rakenne eroaa ohutsuolesta pitkittäisen lihaskerroksen rakenteesta. [8: 539–563.]

4 Tiivisliitosproteiinit

Solukalvon vierekkäiset solut kiinnittyvät toisiinsa liitoskomplekseilla. Liitoskompleksien jatkuvia rakenteita muodostavat tiivisliitokset sitoutuvat monimutkaisiksi proteiini-proteiini-vuorovaikutusjärjestelmiksi, jotka ovat supramolekyyllisiä kokonaisuuksia koostuen kiinteistä kalvoproteiineista, kalvoon liittyvistä proteiineista ja liukoisista sytoplasmista proteiineista. Liitoskomplekseihin kuuluvat tiivisliitosten lisäksi vyöliitokset ja desmosomit. Desmosomit muodostavat epäjatkuvia rakenteita. Vyöliitokset ovat rakenteeltaan tiivisliitosten ja desmosomien välimuoto, ja niitä on tiivisliitosten alapuolella. [10: 1–2.]

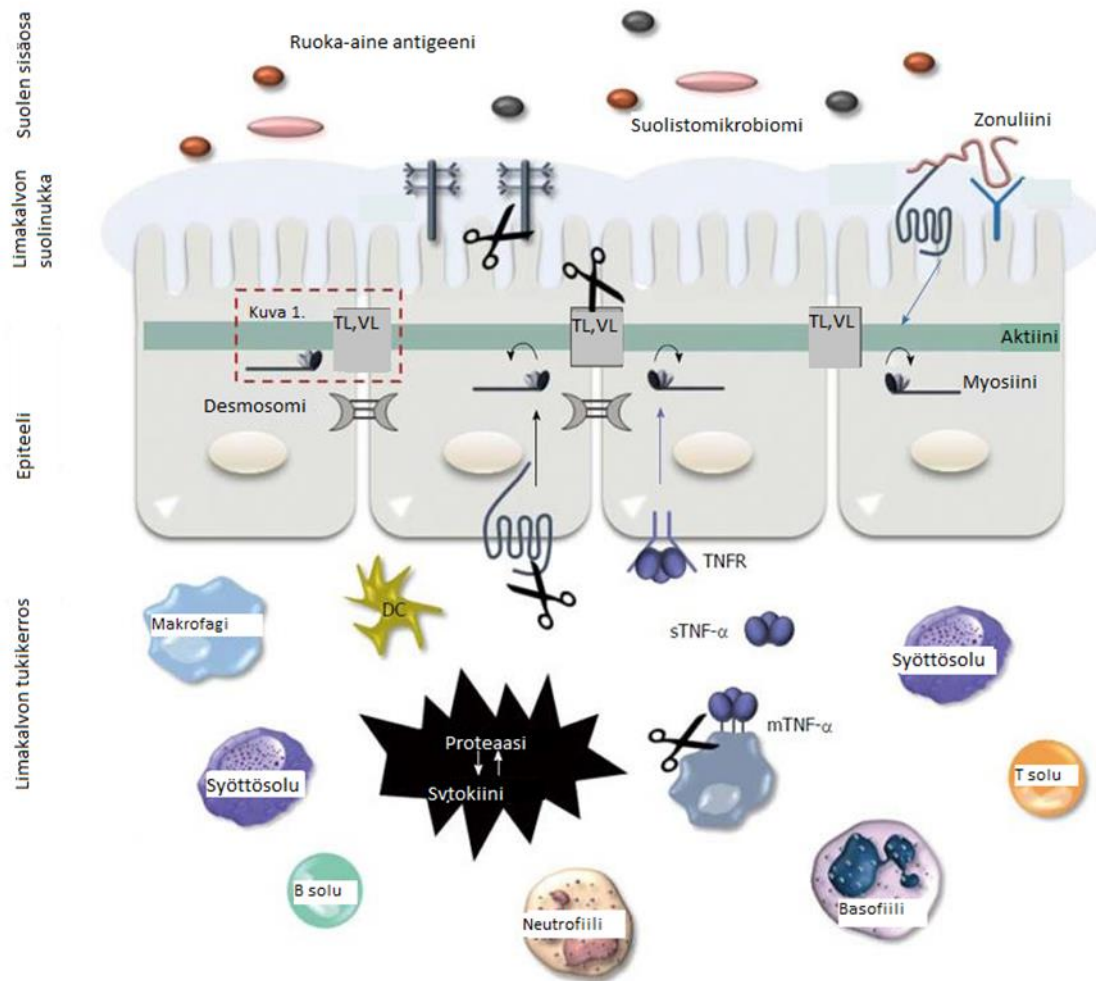
Tiivisliitosproteiinien muodostamat rakenteet säätelevät valikoivasti veden, elektrolyyttien ja liuenneiden aineiden siirtymistä parasellulaarisen reitin kautta [11: 783]. Tiivisliitoksilla on epiteelisoluissa osuus polarisaation säilyttämisessä, koska polarisaatio näkyy niissä erityisen selkeästi ja ne myös ovat polaaraisia rakenteita solukalvolla tarkkaan määrättyneen paikan vuoksi (kuva 3). Tiivisliitokset rajaavat solukalvon apikaaliseen ja basolateraaliseen osaan, joten molekyylit eivät pääse liitoksen ohi puolelta toiselle eli solun pitää kuljettaa ne oikeille paikoilleen. Apikaalinen pinta on suolen sisäpuolen pinta ja basolateraalinen pinta on tyvikalvolla eli ulospäin. [12: 139–140.]



Kuva 3. Tiivisliitosproteiinien sijoittuminen solujen väliin [13, muokattu].

Solukalvon tiivisliitosproteiineihin kuuluvat klaudiinit, samanlaisen domeenin sisältävät proteiinit, okludiini, triselluliini ja marvelD3 sekä immunoglobuliinin kaltaiset solun adheesiomolekyylit, kuten adheesiomolekyyli A (JAM-A). Soluliman tiivisliitosproteiineja ovat muun muassa ZO-proteiinit sekä angiomotin ja cingulin perheiden proteiinit, jotka ovat vaikutuksessa solun tukirangan polymeerien eli aktiinifilamenttien, myosiinin ja mikroputkien kanssa. [11: 784–785.]

Tiivisliitosproteiinit ovat tärkeitä suolen epiteelin ylläpitämisessä ja suolen läpäisevyyden lisääntymiseen on liitetty useita sairauksia, kuten tulehdukselliset suolistosairaudet (IBD), lihavuus ja diabetes [14: 165]. Jotkin ruoka-aineet, bakteerien erittämät yhdisteet ja haiman proteaasit voivat hajottaa solukalvon tiivisliitoksia suolen sisäpuolella (kuva 4.). Myös kemikaaleille, myrkyille ja stressille altistuminen voi vaikuttaa tiivisliitosproteiinien hajoamiseen. Tulehdussolut ja epiteelisolut tuottavat proteaaseja limakalvon tukikerroksessa, mikä saa immuunisolut vapauttamaan tulehdussytokiineja, kuten tuumorinekroositekijä-alfaa (TNF- α) ja interferoni-gammaa (IFN- γ). Tiivisliitosproteiineista erityisesti klaudiinien ilmentyminen (ekspressio) muuttuu tulehduksellisten tekijöiden vaikutuksesta niin, että klaudiini-2:n pitoisuudet lisääntyvät ja muiden solukalvoa vahvistavien klaudiinien pitoisuudet laskevat. [13: 2109–2110, 15: 10–12.]



Kuva 4. Suolen limakalvon toimintaan vaikuttavia tekijöitä [13, muokattu].

Tiivisliitosproteiinien hajoaminen voi tapahtua joko suoraan proteolyttisesti tai solun pinnalla olevien proteinaasilla aktivoitujen reseptorien aktivaation kautta, jolloin aktiinin ja myosiinin muodostama kompleksi supistuu ja liitos avautuu [13: 2110]. Lisäksi tiivisliitosproteiineja lisääviä tai korjaavia tekijöitä on selvitetty; esimerkiksi erityisten signaalireitien aktivoinnin kautta VSL#3 -probioottien on osoitettu suojelevan suolen solukalvon eheyttä ja lisäävän tiivisliitosproteiinien ilmentymistä [16: 117]. VSL#3 on ravintolisävalmiste, joka sisältää kahdeksan eri bakteerikantaa kolmesta eri suvusta. Niitä ovat laktobasillit (*L.paracei*, *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*), bifidobakteerit (*B.longum*, *B.infantis*, *B.breve*) ja streptokokki (*S.thermophilus*). [17.]

4.1 Okudiini

Tiivisliitosproteiineista okludiini on kuvattu ensimmäisenä kalvoproteiinina, ja se kuuluu MARVEL-domeenin sisältäviin tiivisliitosproteiineihin. MARVEL tarkoittaa myeliini- ja lymfosyyttiproteiineja sekä proteiineja, jotka liittyvät vesikkelien kuljetukseen ja kalvon linkkinä toimimiseen. MARVEL-domeeni, jonka toimintaa ei vielä tunneta hyvin, on muodostunut neljästä kalvon sisällä olevasta ketjusta, joilla on proteiini-rasva-vuorovaikutus. Myeliini- ja lymfosyyttiproteiinien, jotka eivät ole tiivisliitosproteiineja, tosin tiedetään stabiloivan kalvon toimintaa. Domeenin lisäksi okludiinin rakenne on samanlainen kuin klaudiineilla eli se sisältää nelijänteiset solukalvon proteiinit sekä solulimassa olevat N- ja C-terminaalit. Rakenteeseen kuuluu myös muita soluliman domeeneja ja solunulkoisia silmukoita. [10: 6–7, 18: 12–14.]

Hiirimallissa, jossa okludiinin geeni on poistettu, ei ole merkitsevää poikkeavuutta suo- liston epiteelin tiivisliitosten toiminnassa tai rakenteessa. Tiivisliitoksen muodostami- ssa okludiini ei siis ole välttämätön. Mutta okludiinin suhteen poistogeenisillä hiirillä on kuitenkin esiintynyt kroonista mahalaukun tulehdusta ja epiteelin liikakasvua sekä muita haitallisia vaikutuksia. [19: 2–3.] Lisäksi useat tutkimukset ovat osoittaneet, että okludii- nilla on suuri osuus suolen limakalvon suoja toiminnassa sekä myös solujen lisääntymi- sen säätelyssä. Fosforylaatio, joka säätelee okludiinin toimintaa, edistää limakalvon suo- jaomi-naisuusien säätelyä. Okludiinin C-terminaalien alueen domeeni, jota on tutkittu laajasti, säätelee tiivisliitoksen eheyttä ja okludiinin vuorovaikutusta ZO-proteiinien kanssa. [18: 14.] Crohnin taudissa, haavaisessa koliitissa ja keliakiassa okludiinin ilmen- tyminen on usein vähentynyt [19: 2–3].

4.2 Klauniini-1 ja -4

Klaudiiniproteiineja on tiivisliitoksessa eniten, ja nisäkkäillä tunnetaan 27 klaudiinin ala- tyyppiä, joiden yhdistelmillä eri kudoksissa on erilaisia vaikutuksia parasellulaariseen lä- päisevyyteen. Kaikkien klaudiinien yleiseen rakenteeseen kuuluvat nelijänteinen osa so- lukalvolla, solunsisäiset N- ja C-terminaalit sekä kaksi solunulkoista silmukkaa (ECL 1 ja ECL 2). [20: 25–27.] Molekyyli massat klaudiineilla vaihtelevat välillä 20–27 kDa [21: 61].

Klaudiinit luokitellaan tiivistäviin klaudiineihin ja heikentäviin eli huokoskanavia muodostaviin klaudiineihin. Klaudiini- 1 ja -4 ovat tiivistäviä klaudiineja. Klaudiini-1:llä arvellaan olevan tärkeä merkitys tiivisliitoksessa sen tunnettujen suojaavien muodostavien ominaisuuksien vuoksi. Klaudiini-4:n toiminta limakalvon suojauksessa riippuu liitoksen muista klaudiineista. [22: 68.] Klaudiini-1:n tärkeys on osoitettu klaudiini-1:n suhteen poistogeenisillä hiirillä ja todettu, että klaudiini-1 on tärkeä säätelijä tiivisliitosten toiminnassa ihon uloimmassa kerroksessa. Nämä poistogeeniset hiiret kuolivat vuorokauden vanhoina oletettavasti pahasti vaurioituneen ihokerroksen takia nestehukkaan. [19: 4.]

Suolen limakalvoa vahingoittavien sairauksien säätelijänä tai osoittajana voidaan pitää klaudiinien hajoamista ja ilmenemistä. Klaudiini-1:n vähenemisen on osoitettu lisäävän suolen läpäisevyyttä IBD-potilailla. Tulehdussytokiinin vaikuttaessa MLCK-aktivaatioon, voidaan havaita tulehdusta liitoskohdan epiteelissä ja klaudiini-4:n vähenemistä. [23: 4–6.]

5 Western blot

Western blot on yleisesti käytössä oleva menetelmä, jolla määritetään proteiinien ilmenemistasoja näytteistä spesifisen vasta-aineen avulla. Ennen Western blot- analyysia näytteiden proteiinit erotellaan koon mukaan geelielektroforeesilla. [24.]

5.1 SDS-PAGE

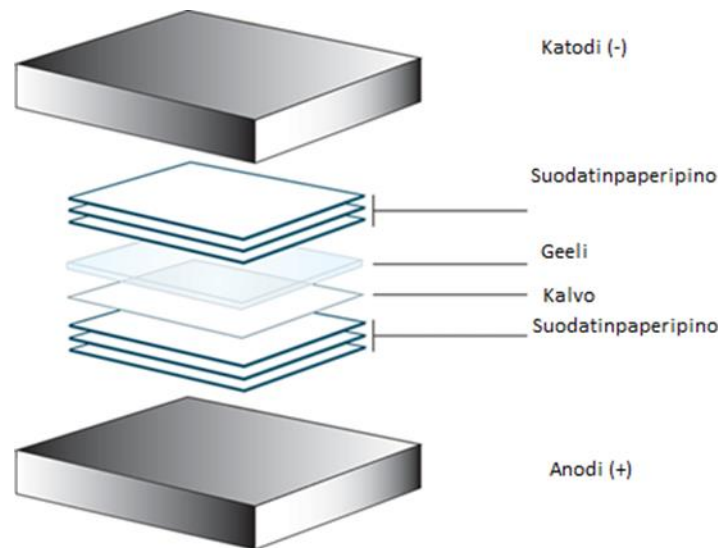
Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesissa (SDS-PAGE) proteiinit erotellaan koon mukaan geelillä sähkökentässä katodilta anodille. Menetelmää käytetään myös nukleinihappojen erottelemiseen. Erottumiseen vaikuttavat siis molekyyli-massa ja -varaus sekä sähkökentän voimakkuus. Ennen SDS-PAGE-ajoa proteiinit denaturoidaan ja saadaan negatiivisesti varautuneiksi lisäämällä näytteisiin puskuria, jossa on anionista detergenttiä, natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ja 2-merkaptetaanolia. SDS tekee proteiinin negatiivisesti varautuneeksi, ja 2-merkaptetaanoli poistaa proteiinin rikkisillat denaturoiden proteiinin lineaarisiksi polypeptidiksi. Proteiinit varataan negatiivisesti, koska jokaisella proteiinilla on isoelektrinen piste, jossa proteiinin varaus on nolla. Kun pH on matalampi kuin isoelektrisessä pisteessä, proteiini saa positiivisen varauksen

ja liikkuu kohti katodia. Korkeassa pH:ssa proteiini saa negatiivisen varauksen ja liikkuu anodille. [25: 21–22.]

Geeli eli väliaine, jossa proteiinit liikkuvat, on useimmiten polyakryyliamidia. Huokoskoko geelissä riippuu geelin konsentraatiosta, joka voidaan valita sen mukaan minkä kokoluokan proteiineja määritetään. [25: 21–22.] Esimerkiksi 4–20 %:n gradienttigelissä aluksi 4 %:n pitoisuudessa huokoskoko on suuri, jolloin erottuvat suuret proteiinit, ja lopuksi 20 %:n pitoisuudessa huokoskoko on pieni mahdollistaen pienten proteiinien erottumisen.

5.2 Blottaus

Kun proteiinit on eroteltu elektroforeettisesti SDS-PAGE- geelillä, seuraavassa vaiheessa eli blottauksessa ne siirretään geeliltä synteettiselle kalvolle. Elektroforeettinen siirto on yleisin menetelmä proteiinien siirtämiseen kalvolle. Proteiinit siirtyvät sähköjännitteen tuottaman virran avulla katodilta anodille. Lisäksi siirtymiseen pienemmässä määrin vaikuttavia tekijöitä ovat proteiinin varaus, muoto ja koko, blottauspuskurin ionivahvuus, pH ja viskositeetti sekä geelin koostumus. Elektroforeettinen siirto voidaan tehdä kahdella tekniikalla; märkäblottauksena tai puolikuivana blottauksena. Märkäblottauksessa geeli, kalvo suodatinpaperit ja pehmustetyynyt kootaan kasettiin, joka asetetaan blottauspuskuria täynnä olevaan astiaan elektrodien keskelle. Puolikuivassa blottauksessa geeli ja kalvo laitetaan blottauspuskurilla kostutettujen suodatinpaperien väliin blottaus-laitteeseen (kuva 5.). Blottauslaitteen levyt toimivat elektrodeina, joihin geelikalvopino on suoraan kosketuksissa. [24.]



Kuva 5. Geelin ja kalvon asettelu puolikuivassa blottauksessa [26, muokattu].

Blottauksessa käytettäviä kalvoja on saatavilla useita erilaisia, ja kalvoa valitessa pitää huomioida proteiinin koko ja varaus, käytettävä blottausmenetelmä sekä kalvon sitovat ominaisuudet. Kalvojen huokoskoko on joko 0,45 μm tai 0,2 μm . Jälkimmäinen huokoskoko sopii molekyylipainoltaan pienemmille proteiineille, jotka voivat läpäistä suuremman huokoskoon kalvon. Blottauksissa käytetään useimmiten kalvoa, jonka huokoskoko on 0,45 μm . Eniten käytetyt kalvot ovat nitroselluloosa- ja polyvinyylideenifluoridi (PVDF)-kalvo. Nitroselluloosakalvon proteiinin sitomiskapasiteetti on 80–100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Kalvon voi kostuttaa blottauspuskurilla tai vedellä. Sen huonona puolena on hauras rakenne. PVDF-kalvo sitoo tehokkaasti proteiinin, mutta korkean herkkyuden kemiluminesenssi-detektio voi hämärtyä, koska kalvo vastustaa ei-spesifisten proteiinien sitoutumista. Ennen käyttöä kalvo pitää kostuttaa 100 prosenttisella metanolilla. PVDF-kalvo voi sitoa proteiinia 150–300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. [24.]

5.3 Blokkkaus

Blokkkaus tehdään kalvon epäspesifisyyden poistamiseksi ja vähentämiseksi, jotta kohdeproteiinin ilmentyminen olisi selkeä. Blokkauksessa ei-spesifiset sitoutumiskohdat eli kalvon tyhjät huokokset täytetään blokkauspuskurilla. Blokkauspuskurina voidaan käyttää 5 prosenttista maitojauheliuosta tai kaupallista valmista blokkauspuskuria. [27: 271.]

5.4 Vasta-aineet

Tutkittavat kohdeproteiinit detektoidaan eli määritetään kalvolta vasta-aineiden avulla. Ensin kalvoa inkuboidaan kohdeproteiinille spesifistä primaarista vasta-ainetta sisältävässä liuoksessa, jolloin primaarinen vasta-aine sitoutuu proteiiniin. Seuraavaksi kalvo käsitellään sekundaarisessa vasta-aineliuoksessa, jotta primaarisen vasta-aineen ja proteiinin muodostama kompleksi voidaan havaita. Primaariseen vasta-aineeseen sitoutuva sekundaarinen vasta-aine voi olla eri tavoin konjugoitu. Se voi olla konjugoitu entsyymillä, kuten piparjuuriperoksidaasilla (HRP), jonka detektointi perustuu kemiluminesenssiin. Kemiluminesenssin detektio tapahtuu, kun HRP-entsyymin ja sen substraatin reaktio emittoivat valoa, jolloin kohdeproteiini näkyy mustana viivana eli ”bändinä” kalvolla. Toisenlaiseen sekundaariseen vasta-aineeseen on sidottu fluoresoiva aine, jolloin fluoresenssireaktiossa muodostuu valoa ja kohdeproteiinin ”bändi” voidaan mitata. [28: 81–82.]

6 Työn tausta ja tavoitteet

Insinööriyön tavoitteena oli tiivisliitosproteiinien määrittämisen lisäksi optimoida Western blot -menetelmää soveltuvammaksi kyseisten proteiinien määrittämiseen. Työn kokeellisen osan tutkimukset tehtiin marraskuun vuonna 2019 ja helmikuun vuonna 2020 välisenä aikana.

Työ on osa tutkimusta, jonka tavoitteena on selvittää miten ang II lisää suolen läpäisevyyttä, ja tapahtuuko se ATR1- reseptorin kautta. Lisäksi selvitettiin ang (1–7):n mahdollisia hyödyllisiä vaikutuksia suolen läpäisevyyden vähentämiseen, ja lievittääkö se ang II:n haitallisia vaikutuksia. Tutkimuksen näytteet olivat terveistä 10 viikkoa vanhoista Balb/c uros (Envigo) - hiiristä. Ussingin kammio -menetelmällä saadut tulokset osoittivat, että ang II lisää läpäisevyyttä ja ang (1–7) lievittää tätä ang II:n haitallista vaikutusta ohutsuolessa. Paksusuolessa vastaavia vaikutuksia ei havaittu. Ussingin kammio on *in vitro* menetelmä kaksiosaisessa kammiossa, missä fluoresoiva merkkiaine laitetaan pingoitettun suolen seinämän apikaaliselle puolelle ja merkkiaineen vastakkaiselle puolelle kammion toiseen osaan siirtynyt pitoisuus kuvastaa läpäisevyyttä [29: 1151–1154].

Losartaania käytettiin selvittämään, onko ryhmän aikaisemmissa tutkimuksissa havaitun läpäisevyyden lisääntymisen mekanismina, ATR1-reseptorin välittämä tapahtuma [30]. Losartaani on verenpainelääke, joka estää ATR1-reseptorin toimintaa ja ang II:n haitallisia vaikutuksia laajentaen verisuonia ja alentaen verenpainetta [31].

7 Materiaalit ja menetelmät

Ennen Western blot -menetelmää näytteet esikäsiteltiin homogenoimalla, mittaamalla kokonaisproteiinipitoisuudet ja erottelemalla näytteiden proteiinit koon mukaan geellelektroforeesilla.

7.1 Koe-eläimet ja näytteiden inkubointi

Ohut- ja paksusuolikudosnäytteet saatiin terveistä 10 viikkoa vanhoista BALB/c uros (Envigo) -hiiristä. Ohutsuolesta otettiin keskiosa eli *jejunum*. Paksusuolesta pyrittiin ottamaan distaalinen osa, mutta jouduttiin ottamaan näytettä myös laajemmalta alueelta. Kudospalat jaettiin neljään ryhmään vaikuttavien aineiden mukaan ja niitä inkuboitii 75 min vaikuttavia aineita sisältävissä liuoksissa (taulukko 1).

Taulukko 1. Näyteryhmät ja niiden käsittelyt

Ryhmä	Vaikuttava aine ja pitoisuus
1	angiotensiini II, 1 μ M
2	angiotensiini II, 1 μ M + angiotensiini (1–7) 10 μ M
3	angiotensiini II, 1 μ M + losartaani 10 μ M
4	kontrolli

Vaikuttavien aineiden pitoisuudet on optimoitu tutkimuksessa, jonka osa tämä työ on.

7.2 Näytteiden homogenisointi

Näytteet homogenisoitiin proteiinien vapauttamiseksi näytekudoksesta. Jokaiseen näyteputkeen lisättiin ensin ELISA-puskuria (136 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,46 mM KH₂PO₄, 0,001 % Tween - 20, pH 7,4). Puskuriin oli lisätty proteaasi-inhibiittoria, joka suojelee näytettä proteolyttiseltä pilkkoutumiselta. (Pierce™ protease Inhibitor Mini Tablets, Thermo Scientific), joka estää proteiinien hajoamista. Paksusuoli-näytteisiin puskuriliuosta lisättiin 500 µl ja ohutsuolinäytteisiin 300 µl. Homogenisointi tehtiin Precellys 24-laitteella (Bertin Technologies), jossa ohjelmana oli kolme 20 sekunnin sykliä nopeudella 5500 rpm, ja aika syklien välillä oli 15 sekuntia. Ohjelma toistettiin kaksi kertaa. Seuraavaksi näytteet sonikoitiin VC 505-laitteella (Sonics) ohjelmalla 26 %, 10 sekuntia. Sonikoinnissa solut hajotetaan mekaanisesti ja varmistetaan proteiinien erottuminen. Lopuksi näytteet sentrifugoitiin (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) 15 minuutin ajan nopeudella 12000 rpm. Supernatantti eli kirkas liuos pakastettiin – 80 °C:seen seuraavaa vaihetta varten.

7.3 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Näytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin, koska geelille pipetoitavien näytteiden kokonaisproteiinimäärät pitää olla samat vertailtavuuden vuoksi. Geelille ei voi myöskään pipetoida liian paljon proteiinia sisältävää näytettä, muuten tuloksista tulee epäspesifisiä. Määrittämisessä käytettiin kaupallista proteiinipitoisuuden määrittämissettiä (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific). Standardiliuoksesta (2mg/ml BSA) valmistettiin laimennetut liuokset, joista mittauksen jälkeen piirrettiin standardikuvaaja. Jokaista laimennettua standardiliuosta ja näytettä pipetoitiin 96-kuoppalevyille 25 µl ja sen päälle lisättiin kitin valmista reagenssia 200 µl. Kuoppalevyä inkuboitiin 37 °C:ssa 30 min, minkä jälkeen absorbanssit mitattiin 540 nm:n aallonpituudella Multiskan RC-spektrofotometrillä (Labsystems). Kuoppalevyllä olleista rinnakkaista näytteistä laskettiin keskiarvo ja näytteiden proteiinipitoisuudet laskettiin standardikuvaajan yhtälön avulla.

Näytteet laimennettiin samaan pitoisuuteen pienimmän proteiinipitoisuuden mukaan ELISA-puskurilla, johon oli lisätty proteaasi-inhibiittoria. Paksusuolinäytteiden proteiinipitoisuus oli 2,07 µg/µl. Puolet ohutsuolinäytteistä olivat pitoisuudeltaan 6,16 µg/µl ja

toisten pitoisuus oli 5,73 µg/µl. Näytteitä laimennettiin vielä Laemmlin näytepuskurilla, johon lisättiin 2-merkapttoetanolia. Paksusuolinäytteitä valmistettaessa 300 µl:n näytettä lisättiin 100 µl 4x Laemmlin näytepuskuria, jossa oli 10 % 2-merkapttoetanolia. Näytteiden pitoisuudeksi tuli 1,55 µg/µl. Ohutsuolinäytteisiin lisättiin 200 µl:a kohti saman verran 2x Laemmlin näytepuskuria, jossa oli 5 % 2-merkapttoetanolia. Näytteiden pitoisuudet olivat 3,08 µg/µl ja 2,87 µg/µl. Kokonaisproteiinimäärät geelillä olivat samat, kun näytteitä pipetoitiin geelille eri tilavuudet. Tämän jälkeen näytteitä denaturoitiin 95 °C:ssa 5 min ja pakastettiin pienissä erissä -20 °C:ssa.

7.4 Western blot

Western blot -menetelmä suoritettiin suurelta osin tutkimusryhmässä aikaisemmin optimoidun Western blot -ohjeen mukaan (liite 1). Optimointia menetelmässä tehtiin vasta-aineiden valinnassa ja laimennoksissa sekä blokkauksuskurin käytössä.

7.4.1 SDS-PAGE

Proteiinien erottelemiseen käytettiin 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast -geelejä (Bio-Rad). Geelielektroforeesi tehtiin ajopuskurissa (25 mM Tris, 190 mM glysiini, 0,1 % SDS) Power Pac Basic -laitteistolla (Bio-Rad). Ajoparametrit olivat 150 V, 10 min ja 195 V, 35 min. Molekyylipainostandardina käytettiin Precision Plus Protein™ Dual Color -standardia (BioRad), jota pipetoitiin geelin kaivoon 2 µl.

7.4.2 Blottaus

Kun geelit olivat valmiit SDS-PAGE -ajosta, niitä, blottauskalvoa ja suodatinpapereita inkuboitiin blottauspuskurissa (25 mM Tris, 192 mM glysiini, 20 % metanoli) noin 15 min. Tämän jälkeen ne pinottiin järjestyksessä ECL TE 77 Semi-Dry Transfer Unit -laitteeseen (GE Healthcare Amersham). Blottausaika laitteella oli kaksi tuntia ja jännite oli enintään 30 V. Blottauskalvona oli 0,45 µm:n nitroselluloosakalvo (BioRad).

7.4.3 Blokkauus

Blottauksen jälkeen kalvot leikattiin proteiinin molekyylipainon mukaan liuskoiksi niin, että yksi proteiini on yhdessä kalvon liuskassa. Liuskat laitettiin 50 ml:n falconputkiin ja niitä pestiin kolme kertaa 5 min TBS-liuoksella (20 mM Tris, 137 mM NaCl). Blokkauuspuskurina käytettiin kaupallista Odyssey® (TBS) Blocking Buffer -liuosta (LI-COR) laimennettuna TBS-liuokseen suhteella 1:1. Osassa määriä käytettiin kaupallisia Intercept® (TBS) Protein-Free Blocking Buffer - ja Intercept® (TBS) Blocking Buffer -liuoksia (LI-COR) laimentamattomina. Inkubointiaika blokkauuspuskurissa oli kaksi tuntia.

7.4.4 Vasta-aineet

Ennen inkubointia primaarivasta-aineen kanssa, kalvot pestiin 5 min ajan TBS-T-liuoksella (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,05 % Tween 20). Primaarivasta-aineiden laimennuksena oli 5 ml:n liuos, jossa Odyssey® (TBS) Blocking Buffer - ja TBS-T-liuosten laimennussuhde oli 1:1. Okludiinin määrittämisessä kokeiltiin useampia primaarivasta-aineita. Kaikki käytetyt vasta-aineet ja niiden laimennukset on lueteltu taulukossa 2. Primaarivasta-aineita inkuboitettiin yön yli + 6 °C:ssa ravistelijassa.

Taulukko 2. Käytetyt vasta-aineet ja niiden laimennokset

Primaarivasta-aine	Tuotenumero	Laimennus	Valmistaja	Sekundaarivasta-aine
Occludin rabbit polyclonal IgG	40-4700 Lot SK259086	1:125 1:100	Invitrogen, USA	IRDye 800CW Goat anti-rabbit
Occludin rabbit polyclonal IgG	40-4700 Lot 981727A	1:135	Invitrogen, USA	IRDye 800CW Goat anti-rabbit
Occludin mouse monoclonal IgG	33-1500 Lot UA280516	1:500	Invitrogen, USA	IRDye 68OLT Goat anti-mouse
Claudin-1 (A-9) mouse monoclonal IgG	sc- 166338 Lot D2817	1:100 1:80	Santa Cruz Biotechnology, USA	IRDye 68OLT Goat anti-mouse
Claudin-4 (A-12) mouse monoclonal IgG	sc- 376643 Lot 1516	1:80	Santa Cruz Biotechnology, USA	IRDye 68OLT Goat anti-mouse
β-actin mouse monoclonal IgG	C8H10D10	1:10000	Cell Signaling Technology, Alankomaat	IRDye 68OLT Goat anti-mouse

Primaarivasta-aine inkuboinnin jälkeen kalvot pestiin neljä kertaa 5 min TBS-T-liuoksella. Sekundaarivasta-aineet laimennettiin 10 ml:an samoilla liuoksilla ja laimennossuhteella kuin primaarivasta-aineet. β -aktiinin sekundaarisen vasta-aineen laimennoksena oli 1:20000. Klaudiini-1:n, klaudiini-4:n ja okludiinin sekundaarivasta-aineiden laimennoksena oli 1:10000. Tunnin kestävän sekundaarivasta-aine inkuboinnin aikana putket suojattiin valolta foliolla. Seuraavaksi kalvot pestiin kaksi kertaa 5 min TBS-T-liuoksella ja kaksi kertaa 5 min TBS-liuoksella.

7.4.5 Detektointi ja tilastollinen käsittely

Kalvot kuvattiin Odyssey® CLx Infrared Imaging System -detektointilaitteella (LI-COR). Proteiinien "bändit" havaitaan fluoresenssisignaaleilla, kun sekundaarivasta-aineet on merkitty lähi-infrapuna -fluoresenssiaineella. Proteiinien intensiteetit laskettiin Image Studio -ohjelmalla (LI-COR). Intensiteetit suhteutettiin latauskontrollina olevan β -aktiinin intensiteettiin, minkä jälkeen ne vielä suhteutettiin kontrollinäytteiden keskiarvoon.

Tulosten tilastollinen analysointi tehtiin GraphPad Prism 8 -ohjelmalla. Tilastollisen merkitsevyyden määrittämiseen käytettiin yksisuuntaista varianssianalyysiä (ANOVA) ja T-testiä. Ero on tilastollisesti merkitsevä, kun P-arvo on pienempi kuin 0,05.

7.4.6 Proteiinien poistaminen kalvolta

Jo kerran käsitellyltä ja kuvatulta kalvolta on mahdollista määrittää myös toinen proteiini. Kalvo käsitellään ensin kaksi kertaa 10 min strippauspuskurilla (25 mM glysiini, 1 % SDS), minkä jälkeen se pestään kaksi kertaa 5 min TBS-T-liuoksella. Strippauspuskuri rikkoo antigeenin ja vasta-aineen vuorovaikutuksen, mikä poistaa vasta-aineet kalvolta. Sitten kalvoa inkuboidaan blokkauspuskurissa yksi tunti, pestään kerran 5 min TBS-T-liuoksella ja käsitellään primaari- ja sekundaarivasta-aineilla kuten edellä.

7.4.7 Näytteiden yhdistäminen

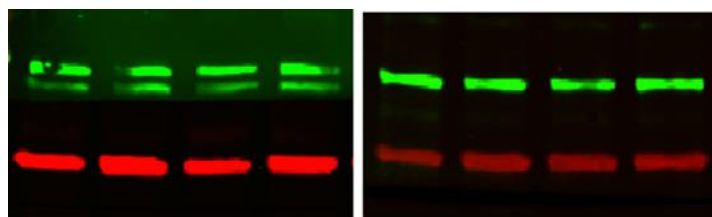
Yksittäisten näytteiden lisäksi tiivisliitosproteiinit määritettiin yhdistetyistä näytteistä eli saman näyteryhmän kaikki näytteet yhdistettiin. Näytteiden yhdistämisellä pienennetään ohutsuolen (*jejunum*) ja paksusuolen eri osien erilaisuutta. Ohutsuolinäytteiden saman

näyteryhmän näytteistä (n=5–7) pipetoitiin saman verran jokaisesta uusiin näyteputkiin. Paksusuolinäytteet (n=4) käsiteltiin samalla tavalla. Ennen näyteryhmän näytteiden yhdistämistä, ne vorteksoitiin ja sonikoitiin. Näytteet myös pidettiin koko käsittelyn ajan jäässä. Tiivisliitosproteiinit määritettiin yhdistetyistä näytteistä Western blot -menetelmällä kuten edellä ja näytteiden replikaateista laskettiin keskiarvot.

8 Tulokset ja tulosten tarkastelu

8.1 Vasta-aineiden optimointi

Okludiini määritettiin aluksi polyklonaalisen okludiinin vasta-aineen (40-4700, Lot SK259086, Invitrogen, USA) kahdella eri laimennuksella, mutta tuloksena oli kummallakin kerralla epäspesifiset ”bändit”. Monoklonaalista okludiinin vasta-ainetta (Occludin mouse monoclonal IgG, 33-1500, Lot UA280516, Invitrogen, USA) testattaessa ei saatu minkäänlaisia tuloksia, kun käytettiin suurinta sille suositeltua laimennosta. Okludiini saatiin määritetyksi samalla vasta-aineella (Occludin rabbit polyclonal IgG, 40-4700, Lot 981727A, Invitrogen, USA) kuin ensimmäisessä määrittelyssä, mutta sen eri erällä, joka on ostettu aikaisemmin. Tämä vasta-aine antoi tarkat ja siistit tulokset. Sen samaa kerran valmistettua laimennusta käytettiin paksu- ja ohutsuolinäytteiden sekä niiden molempien yhdistettyjen rinnakkaisnäytteiden okludiinin määrittelyssä. Kuvassa 6 on esitettyinä epäspesifisen ja hyvän tuloksen antaneet vasta-aineet.

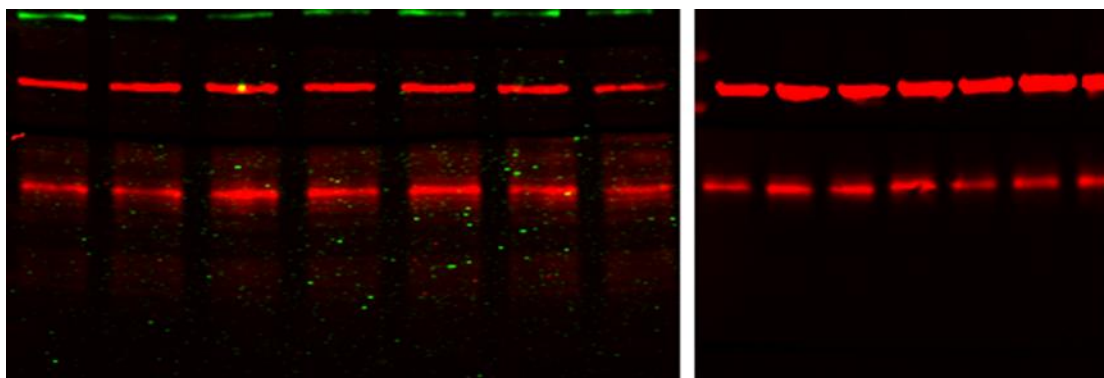


Kuva 6. Okludiinin vasta-aineiden Western blot -kuvat ohutsuolinäytteistä. Vasemmalla ylhäällä okludiinin vasta-aine (Occludin rabbit polyclonal IgG, 40-4700, Lot SK259086, Invitrogen) ja oikealla sama okludiinin vasta-aine, mutta sen erä on eri (Occludin rabbit polyclonal IgG, 40-4700, Lot 981727A, Invitrogen). Alhaalla on β -aktiini, joka vahvistaa näytteiden lataamisen onnistumisen

Okludiinin vasta-aineen käytetty laimennus oli 1:135 ja klaudiini-4:n vasta-aineen laimennus oli 1:80 paksu- ja ohutsuolinäytteissä. Klaudiini-1:n vasta-aineen laimennus paksusuolinäytteissä oli 1:100 ja ohutsuolinäytteissä se oli 1:80. Nämä vasta-aineet valittiin, koska niitä on käytetty myös ryhmän aikaisemmissa tutkimuksissa. Laimennokset valittiin siten, että lähdettiin liikkeelle valmistajan suositteleman laimennusalueen suunnilleen puolivälistä. Klaudiini-4:n määritykset ja klaudiini-1:n määrittäminen ohutsuolinäytteistä tehtiin aluksi käyttäen laimennosta 1:100, minkä jälkeen päädyttiin yllä oleviin laimennuksiin.

8.2 Blokkauksen optimointi

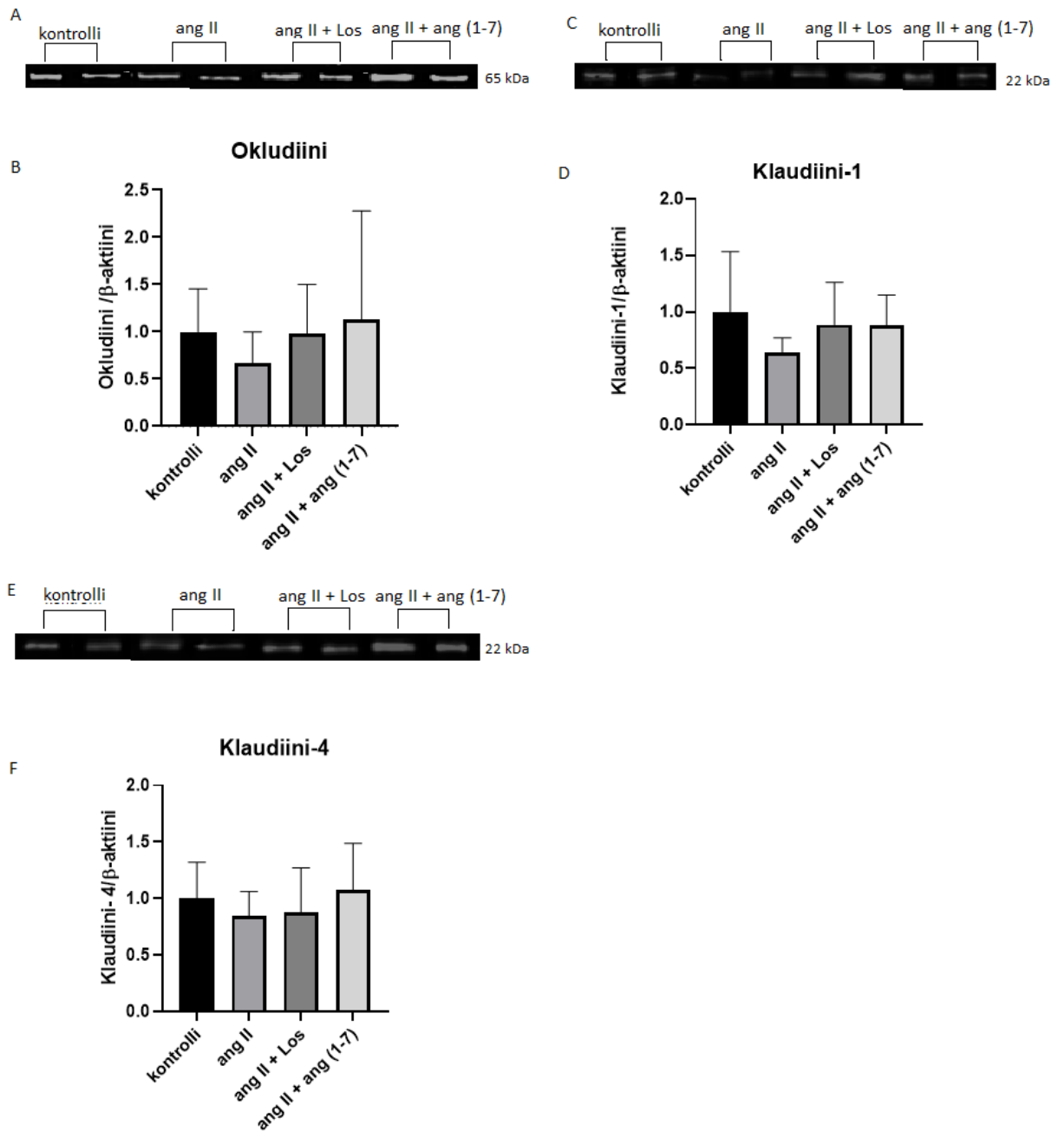
Viimeisimmissä Western blot -määrityksissä käytettiin uutta blokkaukspuskuria (Intercept® (TBS) Protein-Free Blocking Buffer ja Intercept® (TBS) Blocking Buffer (LI-COR)), jolla aikaisemmissa määrityksissä käytetty blokkaukspuskuri (Odyssey® (TBS) Blocking Buffer (LI-COR)) on korvattu valmistajayrityksessä. Blokkauksessa uutta blokkaukspuskuria pitää käyttää laimentamattomana. Lisäksi sitä käytetään laimentamattomana vasta-aineiden laimennuksissa. Vasta-aineiden laimennuksiin lisätään myös 0,1 % Tween 20 -liuosta, joka on pintajännitystä alentava aine. Uuden ja vanhan blokkaukspuskurin toimivuuden vertailu esitetty kuvassa 7.



Kuva 7. Klaudiini-4:n Western blot -kuvat ohutsuolinäytteistä. Määrityksissä on käytetty eri blokkaukspuskuria. Vasemmanpuoleisessa on käytetty uutta blokkaukspuskuria ja oikeanpuoleisessa on käytetty vanhaa blokkaukspuskuria. Klaudiini-4 on β -aktiinin alapuolella.

Uutta blokkaukspuskuria käytettäessä tuloksiin muodostui taustaa ja vähän epäspesifisyyttä verrattuna vanhaan blokkaukspuskuriin, joka antoi tarkemmat tulokset.

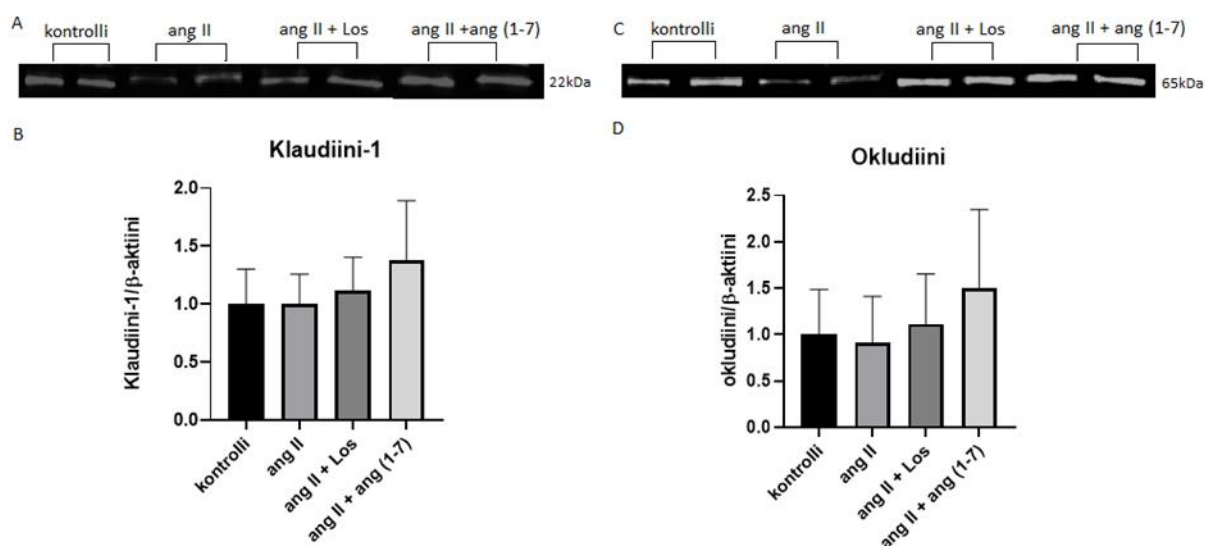
8.3 Ohutsuolinäytteiden proteiinitasot



Kuva 8. Western blot-kuvat ja proteiinitasot ohutsuolinäytteistä. Angiotensiini II (angII) pienensi okludiinin (A ja B) ja klaudiini-4:n (E ja F) tasoja, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä ($P > 0,05$), $n = 5-7$. Klaudiini-1 (C ja D) väheni enemmän ($P = 0,05$), $n = 5-7$. Los, losartaani.

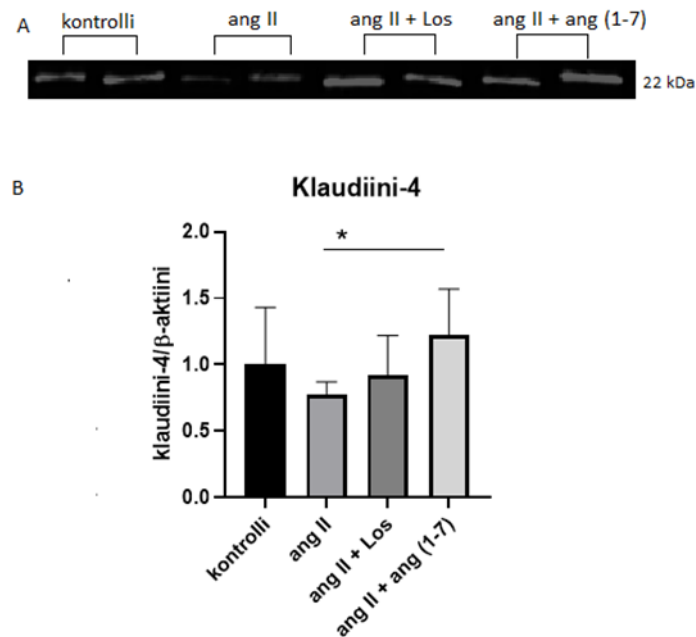
Okludiinin ja klaudiini-4:n tasot laskivat ang II:n vaikutuksesta, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä ($P>0,05$) (kuva 8A, 8B, 8E ja 8F). Klaudiini-1 väheni selvästi, ($P=0,05$) (kuva 8C ja 8D).

8.4 Paksusuolinäytteiden proteiinitasot



Kuva 9. Proteiinien tasot ja Western blot-kuvat paksusuolinäytteistä. Angiotensiini II (angII) laski vähän okludiinin tasoja (C ja D), mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä ($P>0,05$), $n=4$. Klaudiini-1:n (A ja B) tasoissa ei ole myöskään merkitseviä eroja ($P>0,05$), $n=4$. Los, losartaani.

Ang II pelkästään vähensi okludiinia lähes puoleen verrattuna näyteryhmään, jossa oli ang II:n lisäksi ang (1–7): a. Ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($P>0,05$) (kuva 9C ja 9D). Myöskään klaudiini-1:n taso ei muuttunut tilastollisesti merkitsevästi ($P>0,05$) (kuva 9A ja 9B).



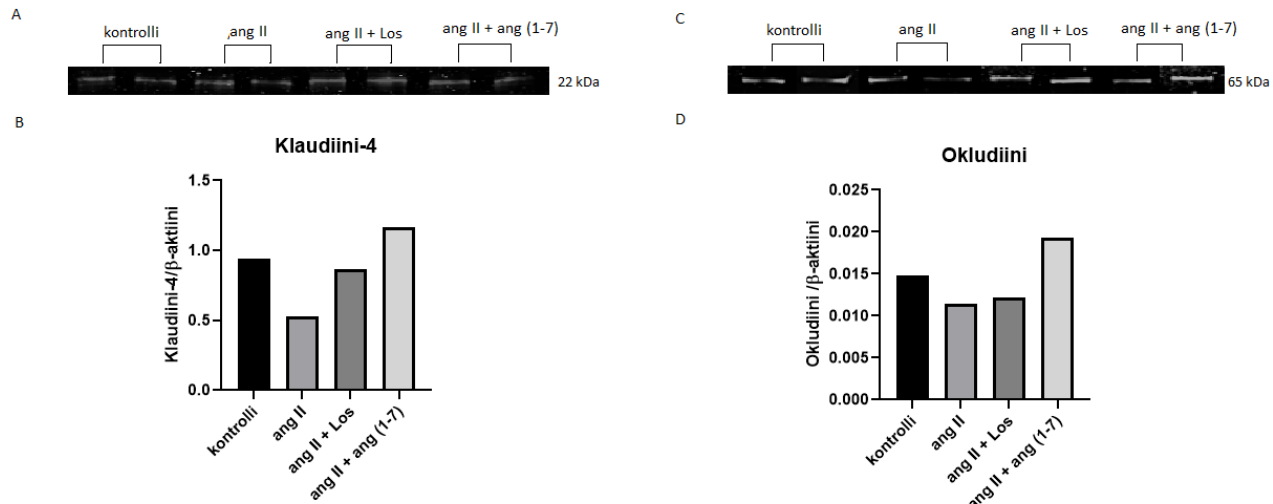
Kuva 10. Klaudiini-4:n Western blot-kuva ja intensiteettitasot (A ja B) paksusuolinäytteistä. Angiotensiini II:n (ang II) ja angiotensiini II + angiotensiini 1–7:n (angII + ang1–7) välinen ero on tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$), $n=4$. Los, losartaani.

Klaudiini-4:n taso väheni ang II:n vaikutuksesta, ang II:n ja ang II + ang1–7:n välinen T-testi ero on tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$) (kuva 10A ja 10B).

8.5 Yhdistetyt näytteet

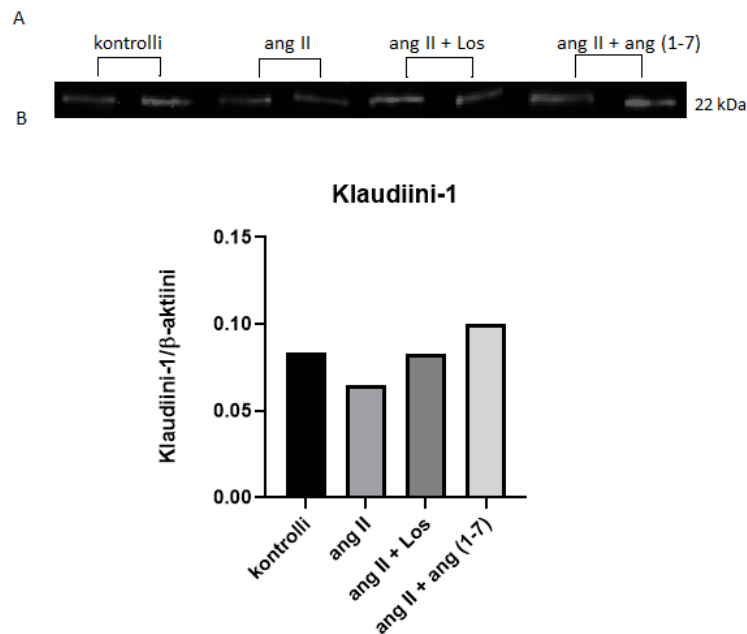
8.5.1 Ohutsuolinäytteen proteiinitasot

Yhdistetyn ohutsuolinäytteen tiivisliitosproteiinitasot vastasivat yksittäisten näytteiden tuloksia.



Kuva 11. Klaudiini-4:n (A ja B) ja okludiinin (C ja D) Western blot-kuvat ja intensiteettitasot ohutsuolinäytteistä. Los, losartaani.

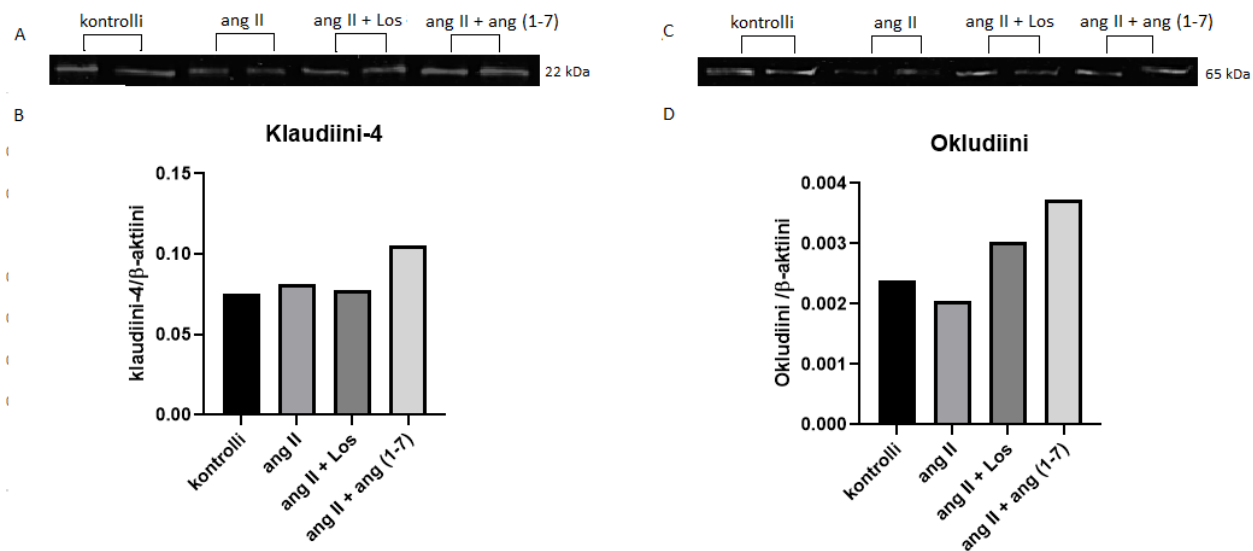
Ang II vähensi klaudiini-4:ä lähes puoleen verrokkiryhmästä (kuva 11A ja 11B). Sekä ang (1–7) että losartaani näyttivät poistavan ang II:n vaikutusta. Ang II pyrki pienentämään okludiinin tasoa ja ang (1–7) korjaamaan vähenemistä (kuva 11C ja 11D).



Kuva 12. Klaudiini-1:n (A ja B) Western blot-kuva ja intensiteettitasot ohutsuolinäytteistä. Los, losartaani.

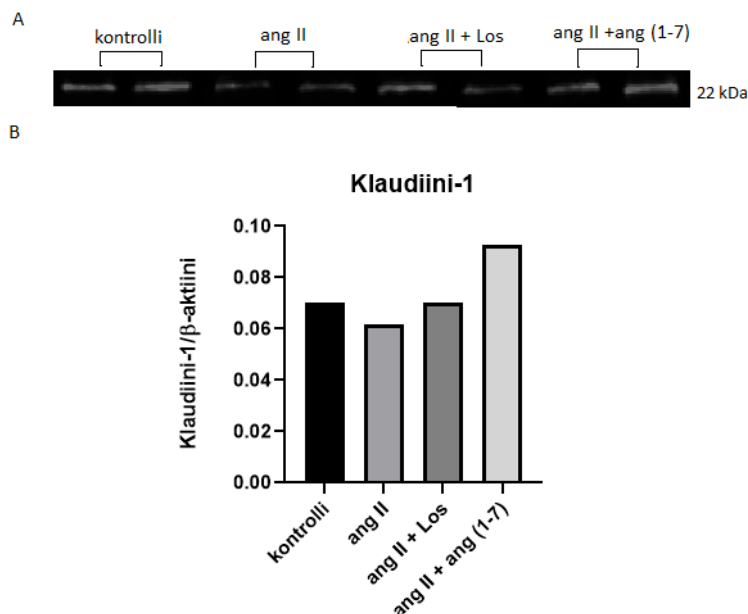
Klaudiini-1:n proteiinitaso vähenee noin kolmanneksella ang II:n vaikutuksesta. Ang (1–7) korjasi ang II:n vaikutusta ja losartaani vastusti ang II:n vaikutusta hyvin vähän (kuva 12A ja 12B).

8.5.2 Paksusuolinäytteen proteiinitasot



Kuva 13. Klaudiini-4:n (A ja B) ja okludiinin (C ja D) Western blot-kuvat ja intensiteettitasot paksusuolinäytteistä. Los, losartaani.

Myös yhdistetyn paksusuolinäytteen proteiinitasot vastasivat yksittäisten näytteiden tuloksia. Ang (1–7) nosti klaudiini-4:n ja okludiinin tasoja korjaten ang II:n vaikutusta (kuva 13A, 13B, 13C ja 13D).



Kuva 14. Klaudiini-1:n (A ja B) Western blot-kuva ja intensiteettitasot paksusuolinäytteistä. Los, losartaani.

Ang (1–7) vastusti ang II:n haitallisia vaikutuksia vaikuttaen myös klaudiini-1:n määrään nostavasti (kuva 14A ja 14B).

9 Pohdinta

Insinöörityön tavoitteena oli selvittää ang II:n ja ang (1–7):n vaikutusta tiivisliitosproteiineihin (okludiini, klaudiini-1 ja -4), jotka säätelevät suolen läpäisevyyttä. Niiden vaikutusta arvioitiin määrittämällä tiivisliitosproteiinien määrät hiiren suolinäytteistä Western blot -menetelmällä. Angiotensiini tyyppi 1:n reseptorin (ATR1) salpaajaa losartaania käytettiin selvittämään, onko ryhmän aikaisemmissa tutkimuksissa havaitun läpäisevyyden lisääntymisen mekanismina, mainitun reseptorin välittämä tapahtuma [30]. Ang (1-7) on RAS:n yleensä edullisia vaikutuksia välittävä peptidi, jonka vaikutukset välittyvät hiljattain löydetyn mas-reseptorin kautta. Hypoteesina oli, että kummallakin näillä yhdisteillä voitaisiin kumota tai ainakin pienentää ang II:n läpäisevyyttä lisääviä vaikutuksia tiivisliitosproteiinien tasolla. Toisena päätavoitteena oli myös optimoida Western blot -menetelmä sopivammaksi näiden proteiinien määrittämiseen.

Western blot -menetelmän optimoinnin tuloksena okludiinille löydettiin täsmällinen vasta-aine ja sen laimennos. Optimoinnin aikana selvisi käytännössä, että polyklonaalisten vasta-aineiden erien välillä voi olla isojakin eroja. Lisäksi optimointia tehtiin myös blokkausvaiheessa. Kahdessa ohutsuolinäytteiden Western blot -ajossa käytettiin uutta, edellisen blokkauspuskurin korvannutta tuotetta samalla lailla laimennettuna kuin edellistä blokkauspuskuria, jolloin tuloksissa oli vähän enemmän epäspesifisyyttä. Seuraavissa Western blot -ajoissa uuden blokkauspuskurin käyttöolosuhteita optimoitiin, mikä paransi tulosten spesifisyyttä. Optimoidulla koejärjestelyllä voidaan hyvin jatkaa tulevissa läpäisevyytystutkimuksissa tiivisliitosproteiinien osuuden selvittämistä.

Tulosten mukaan ang II näyttäisi vähentävän okludiini-, klaudiini-1- ja -4-proteiinien määriä Western blot -menetelmällä mitattuina. Aikaisemmassa tutkimuksessa tiivisliitosproteiinit vähenivät sekä ohutsuolessa että proksimaalisessa paksusuolessa korkeaverenpaineisilla rotilla mallissa, jossa hypertonia oli aiheutettu ang II:lla. Määritettyjä tiivisliitosproteiineja olivat okludiini, klaudiini-4, tiivisliitosproteiini 1 ja cinguliini. Lisäksi kyseisen rotilla tehdyn tutkimuksen muut havainnot näyttivät lisäävän suoliston läpäisevyyttä. Muuna havaintona oli plasmassa lisääntynyt fluoreseiini isotiosyanaatti (FITC) -dekstraanin konsentraatio, jolla arvioitiin suoliston limakalvon läpäisevyyttä. [32: 314–317.]

Tulokset osoittavat myös että, ATR1-reseptorin estäjä, losartaani, näyttäisi korjaavan ang II:n epäedullisia vaikutuksia tiivisliitosproteiinien määriin. Losartaanin vaikutuksia on selvitetty Crohnin taudin hiirimallilla, jonka tuloksena losartaani lievittää suolen epiteelisolujen apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa. Ang II on mukana apoptoosissa ja Crohnin taudin potilailla on havaittu olevan korkeat ang I ja -II-tasot. Apoptoosin estomekanismeissa losartaani vähentää apoptoosia säätelevää kaspasi-3-proteiinia ja lisää B-solulymfooma-2-proteiini (Bcl-2) / bax-proteiini suhdetta. Bcl-2:lla on anti-apoptoottisia vaikutuksia ja bax:lla on pro-apoptoottisia vaikutuksia. [33: 1160–1161.]

Western blot -menetelmä on monivaiheinen ja siinä on useampia kohtia, jotka voivat vaikuttaa lopputulokseen. Näitä kohtia voivat olla näytteiden pipetointi SDS-PAGE -geeleille, blottaus- ja blokkausvaiheet sekä vasta-aineiden inkubaatiot. Tuloksissa on melko suurta hajontaa, joka voi mahdollisesti johtua kahden geelin välisestä erosta. Tilastollisesti merkitsevien erojen vähäisyys voi johtua isohkosta hajonnasta tai liian pienestä näytemäärästä.

Työlle asetetut tavoitteet saavutettiin, sillä okludiinin, klaudiini-1:n ja -4:n proteiinitasot saatiin määritetyksi ja Western blot -menetelmää optimoitiin. Tulokset tukevat ryhmän aikaisempia havaintoja angiotensiini II:n *in vitro* läpäisevyyttä lisäävästä vaikutuksesta, joka selittyisi tiivisliitosproteiinin ilmenemisen muutoksilla, joita osittain voitaisiin estää kokeellisesti angiotensiini tyyppi 1:n reseptorien salpauksella ja/tai mas-reseptorien stimulaatiolla ang (1-7):llä. Tulevissa tutkimuksissa on kiinnitettävä erityistä huomiota vasta-aineiden soveltuvuuteen ja etukäteistestaukseen. Lisäksi tulisi käyttää molemmilla geeleillä koko ajan samaa tunnettua kontrollinäytettä, joka auttaisi geelien välisen eron selvittämisessä.

Lähteet

- 1 Vancamelbeke, Maaïke & Vermeire, Séverine. 2017. Review: The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. Europe PMC Funders Group. Vol. 11 (9). S. 821–834.
- 2 Salmenkari, H; Pasanen, L; Linden, J; Korpela, R & Vapaatalo, H. 2018. Beneficial Anti-Inflammatory Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor and Angiotensin Receptor Blocker in the Treatment of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 69 (4). S. 1–12.
- 3 Sparks, MA; Crowley, SD; Gurley, SB; Mirotsoy, M & Coffman, TM. 2014. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *National Institutes of Health*. Vol. 4(3). S. 1201–1228.
- 4 Satou, Ryouzuke; Penrose, Harrison & Navar, L. Gabriel. 2018. Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep*. Vol. 20(12). S. 100.
- 5 Nehme, Ali; Zouein, Fouad A.; Zayeri, Zeinab Deris & Zibara, Kazem. 2019. Review: An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. Vol. 6(2). S. 1–14.
- 6 Garg, M; Angus, PW; Burrell, LM; Herath, C; Gibson, PR & Lubel, JS. 2012. Review article: the pathophysiological roles of the renin-angiotensin system in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 35(4). S. 414–428.
- 7 Verma, Amrisha & al. 2019. Expression of Human ACE2 in Lactobacillus and Beneficial Effects in Diabetic Retinopathy in Mice. *Molecular Therapy, Methods & Clinical Development*. Vol. 14. S. 161–170.
- 8 Berne, Robert M & al. 2003. *Physiology*. 5. painos. USA: Mosby. S. 539–563.
- 9 Overview of the Digestive System. Verkkodokumentti. OER Services. <<https://courses.lumenlearning.com/suny-ulster-ap2/chapter/overview-of-the-digestive-system/>> Luettu 7.2.2020.
- 10 Heinemann, U, Schuetz, A. 2019. Structural Features of Tight-Junction Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 20(23). S. 1–24.
- 11 Citi, Sandra. 2019. The mechanobiology of tight junctions. *Biophysical Reviews*. Vol. 11(5). S. 783–793.

- 12 Hautakangas, Milla-Riikka; Huhtaniska, Sanna; Ruuska, Timo. 2009. Solujen polaarisuus. Solu- ja kehitysbiologian esseet. Anatomian ja solubiologian laitos, Oulun yliopisto. S.139–140.
- 13 Van Spaendonk, Hanne & al. 2017. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 23(12). S. 2106–2123.
- 14 Cheru, Lediya; Saylor, CF; Lo, Janet. 2019. Gastrointestinal Barrier Breakdown and Adipose Tissue Inflammation. *Current Obesity Reports*. Vol. 8(2). S. 165–174.
- 15 Bhat, AA; Uppada, S; Achkar, IW; Hashem, S; Yadav, SK; Shanmugakonar, M; Al-Naemi, HA; Haris, M; Uddin S. 2019. Tight Junction Proteins and Signaling Pathways in Cancer and Inflammation: A Functional Crosstalk. *Frontiers in Physiology*. Vol 9. S. 1–19.
- 16 Maldonado Galdeano, C; Cazorla, SI; Lemme Dumit, JM; Vélez, E; Perdigón, G. 2019. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Annals of Nutrition & Metabolism*. Vol. 74(2). S. 115–124.
- 17 VSL#3. Verkkodokumentti. Ferring Pharmaceuticals. <<https://www.vsl3.fi/mika-vsl3-on/>> Luettu 6.2.2020.
- 18 Díaz-Coránguez, Mónica; Liu, Xuwen; Antonetti, David A. 2019. Review. Tight Junctions in Cell Proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 20(23). S.1–30.
- 19 Xing, Tiaosi; Camacho Salazar, Rolando & Chena, Yan-Hua. 2017. Animal models for studying epithelial barriers in neonatal necrotizing enterocolitis, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Tissue Barriers*. Vol. 5(4). S. 1–21.
- 20 Suzuki, Hiroshi; Kazutoshi, Tani & Fujiyoshi, Yoshinori. 2017. Crystal structures of claudins: insights into their intermolecular interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1397(1). S. 25–34.
- 21 Kotler, Belinda M; Kerstetter, Jane E & Insogna, Karl L. 2013. Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation. *Oxford Academic. Nutrition reviews*. Vol. 71(1). S. 60–65.
- 22 Garcia-Hernandez, Vicky; Quiros, Miguel & Nusrat, Asma. 2017. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. Vol. 1397(1). S. 66–79.

- 23 Zhu, Liguo; Han, Jing; Li, Li; Wang, Ying; Li, Ying & Zhang, Shenghong. 2019. Claudin Family Participates in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*. Review. Vol. 10. S. 1–11.
- 24 Protein Blotting Guide. Verkkodokumentti. Bio-Rad Laboratories, Inc. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf?source_wt=s180516000008> Luettu 22.1.2020.
- 25 Wenk, Markus R.; Zefrin Fernandis, Aaron. 2007. *A Manual for Biochemistry Protocols*. World Scientific Publishing Co Pte Ltd. S. 21–22.
- 26 Western Blotting Principles and Methods. Verkkodokumentti. GE Healthcare. <<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=15994>Luettu > Luettu 22.1.2020.
- 27 Stanta, Giorgio. 2011. *Guidelines for molecular analysis in archive tissues*. Springer. S. 271.
- 28 Komoda, Tsugikazu & Matsunaga, Toshiyuki. 2015. *Biochemistry for Medical Professionals*. Academic Press. S. 81–82.
- 29 Clarke, Lane L. 2009. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*. Vol. 296(6). S.1151–1154.
- 30 Julkaisematon tulos
- 31 Losartan Orion. Verkkodokumentti. Duodecim, Terveyskirjasto. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=far01067&p_teos=far&p_kirjain=L > Luettu 14.2.2020.
- 32 Santisteban, Monica M. & al. 2016. Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. *Circ Res*. Vol. 120(2). S. 312–323.
- 33 Liu, Tiang-Jing & al. 2015. AT1R blocker losartan attenuates intestinal epithelial cell apoptosis in a mouse model of Crohn's disease. *Spandidos Publications*. S. 1156–1162.

Western blot -ohje

Näytteiden käsittely Western blotia varten

1. Määritetään näytteiden kokonaisproteiinipitoisuudet Piercen BCA Protein Assay Kitillä (microplate procedure)
2. Tehdään halutut laimennokset proteiinieristyspuskuriin ja lisätään Laemmlin näytepuskuria.
3. Näytteiden keitto +95°C 5 minuuttia lämpöblokissa
4. Näytteet pakastetaan odottamaan ajoa -80°C (pidempi aikainen säilytys) tai -18°C (lyhyt säilytysaika)

SDS-PAGE

1. Sulata näytteet jäällä
2. Kokoa ajolaite ja kaada kylmää 1x ajopuskuria ajolaitteen kammioon tasaisesti. Poista näytekampa geelin lasien välistä varovasti
Ilmakuplia ei saa muodostua! Kaada ajopuskuri päälle, niin kuplat nousevat kuopista. Huolehdi, että ajolanka on kokonaan nesteeseen peitossa ja että geelien välillä oleva kammio on täynnä ajopuskuria. Voit myös kaataa ajopuskuria koko laitteen sisälle. 500 ml puskuria riittää.
3. Pipetoi näytteet (15-40µl) ja molekyyli-markkeri (2µl) suunnitelman mukaisesti kammioiden sisälle.
4. Varmista, että ajolaitteen kytkennät ovat oikein.
5. Aja ensin 150 V noin 10 min.
6. Aja lopuksi 195 V noin 35 min., jolloin näytteet kulkeutuvat kokonsa mukaisesti geelillä siten, että pienimmät proteiinit kulkeutuvat alimmaisiksi ja isoimmat jäävät ylemmäs.

Jos geelejä ajaa liian kovalla voimalla, niin näytteet ajautuvat vinoon ja lopputulosta on vaikea arvioida.

7. Valmistaudu odotellessa muihin vaiheisiin:

Blottaus:

- Valmista 500 ml blottauspuskuria ja pidä jäällä/pakkasessa ennen käyttöä.
 - Leikkaa kahta pientä geeliä kohden
 - Nitroselluloosa – kalvosta geeliä vähän isompi pala, noin 10 x 15 cm (Huom! Älä koske kalvon keskelle, käsittele reunoilta, älä rypistä!)
 - Leikkaa suodatinpaperista (3M) 6 palaa
 - Esikastele suodatinpaperit laittamalla ne astiaan, jossa on jääkylmää blottauspuskuria.
8. Keskeytä ajo, kun näytteiden etulinja (sininen ”viiva”) on 2 mm geelin alareunan yläpuolella. Jatka heti blottaukseen, sillä proteiinit ovat herkkiä liikkumaan geeliltä pois.

Blottaus perinteisesti

1. Poista geeli varovasti levyjen välistä. Merkitse geelit leikkaamalla pieni pala pois (geeli 1 → 1 kulma, geeli 2 → kaksi kulmaa jne.)
2. Siirrä geelit varovasti astiaan, jossa on jääkylmää blottauspuskuria (n. 15 ml). Anna geelien tasoittua noin 15 minuuttia.
3. Kastele blottauslaitteen levyt pienellä määrällä blottauspuskuria ja pakkaa geelit seuraavassa järjestyksessä,
 - a. 3 kpl märkiä suodatinpapereita
 - b. Nitroselluloosa -kalvo
 - c. Geelit
 - d. 3 kpl märkiä suodatinpapereita
4. Varmista, että muualla kuin pinon kohdalla on muovikalvo.

5. Rullaa ilmakuplat pois geelin ja kalvon väliltä suodatinpapereiden päältä. Proteiinit eivät siirry ilmakuplan kohdalta!
6. Tarkista kytkennät ja aja 15 V, 2 h.

Blokkaus ja vasta-aineet perinteisesti

1. Leikkaa kalvot halutuista kohdista.
2. Pese kolmesti 1 x TBS:llä 5 min ravistelijassa.
3. Blokkaa kalvot blokkaustrupurissa 2 h RT.
4. Pese blokkauksen jälkeen kerran 1 x TBS-T:llä 5 min ravistelijassa.
5. Lisää primaarista vasta-ainetta sisältävä liuos ja inkuboi 1-2 h RT tai yön yli + 4°C ravistelijassa.
6. Ota vasta-aine laimennos talteen (voi käyttää uudelleen).
7. Pese kalvot neljästi 1 x TBS-T:llä 5 min ravistelijassa.
8. Lisää sekundaarista vasta-ainetta sisältävä liuos kalvoille ja inkuboi 1 h RT ravistelijassa.
9. Pese kalvot kahdesti 1 x TBS-T:llä 5 min ravistelijassa.
10. Pese kalvot kahdesti 1 x TBS:llä 5 min ravistelijassa. Säilö kalvot TBS:ään detektointiin asti.

Detektointi

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

Kalvojen strippaus

1. Inkuboi kalvoja kahdesti 10 min ajan strippaustrupurissa.
2. Pese kalvot kahdesti 1 x TBS-T:llä 5 min ravistelijassa.
3. Ohje toistetaan uudestaan blokkauksesta lähtien, paitsi blokkaustrupurin inkubointiaika on 1 h.