

Jonna Roivanen

# Ikääntymisen ja korkean verenpaineen vaikutus bradykiniinin vaikutusreitteihin liittyviin reseptoreihin ja entsyymeihin

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

24.5.2017

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Jonna Roivanen Ikääntymisen ja korkean verenpaineen vaikutus bradykiniinin vaikutusreitteihin liittyviin reseptoreihin ja entsyymeihin 32 sivua + 2 liitettä 24.5.2017
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Tohtorikoulutettava Aino Siltari Professori Riitta Korpela Emeritusprofessori Heikki Vapaatalo Lehtori Tiina Soininen
<p>Kohonnut verenpaine ja sen aiheuttamat sairaudet ovat yleisimpiä ennenaikaiseen kuolemaan johtavista tekijöistä. Ikääntyessä riski sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin kasvaa. Sairauksien syntymekanismejä ja -reittejä paremmin ymmärtämällä voitaisiin kehittää tehokkaampia ja ennaltaehkäisevämpiä hoitomuotoja niitä vastaan. Bradykiniini on vasoaktiivinen peptidi, joka on tunnettu sen verisuonia laajentavista ja sydän- ja verisuonisairauksilta suojaavista ominaisuuksistaan. Bradykiniinillä on kuitenkin havaittu olevan myös iästä ja terveydentilasta riippuvia verisuonia supistavia vaikutuksia, joiden tarkat vaikutusreitit ovat heikosti tunnetut.</p> <p>Tämän insinööriyön tavoitteena oli tutkia bradykiniinin vaikutusreitteihin liittyvien reseptorien ja entsyymien tasoja nuorilla ja vanhoilla korkeaverenpaineisilla sekä vastaavan ikäisillä terveillä rotilla. Työn tarkoituksena oli vertailla proteiinitasoa ryhmien välillä ja näin saada tietoa iän ja korkean verenpaineen vaikutuksesta bradykiniinin vaikutusreitteihin.</p> <p>Työssä pystytettiin ja optimoitiin Western blot -menetelmä bradykiniinireseptorien B1 ja B2, angiotensiiniä konvertoivan entsyymin (ACE1), syklo-oksigenaasientsyymien (COX-1 ja COX-2) ja angiotensiinireseptori tyypin 2 (AT2) tasojen määrittämistä varten rottien munuaisnäytteistä (n=3).</p> <p>Menetelmä saatiin pystytetyksi ja sillä voitiin havainnoida luotettavasti haluttujen proteiinien tasoja, lukuun ottamatta COX-2-entsyymiä. ACE1-entsyymin taso oli vanhoilla eläimillä korkeampi kuin nuorilla. COX-1-entsyymin tasojen perusteella tulokset tukivat hypoteesia, jonka mukaan bradykiniinin verisuonia supistavat vaikutukset välittyvät COX-entsyymien tuottamien prostanoidien kautta korkeaverenpaineisilla eläimillä. Odotusten vastaisesti bradykiniinireseptorien tasoissa ei havaittu ikääntymiseen liittyviä muutoksia. Merkittävimpien taserojen havainnoimiseksi määrityksiä tulisi jatkaa suuremmalla aineistolla. Seuraavassa tutkimuksessa tulisi myös selvittää, onko vastaavia eroja myös muissa kudoksissa, kuten sydämessä ja verisuonissa.</p>	
Avainsanat	Western blot, bradykiniini, bradykiniinireseptori, angiotensiiniä konvertoiva entsyymi, syklo-oksigenaasi

Author Title Number of Pages Date	Jonna Roivanen Effects of aging and elevated blood pressure on receptors and enzymes of the bradykinin pathway 32 pages + 2 appendices 24 May 2017
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Aino Siltari, PhD Student Riitta Korpela, Professor Heikki Vapaatalo, Emeritus Professor Tiina Soinila, Lecturer
<p>Elevated blood pressure and cardiovascular diseases are the most important causes of premature death. Aging is one of the factors that increases the risk of cardiovascular diseases. It is important to get more information about the diseases in order to develop more effective and more preventive treatments. Bradykinin is a vasoactive peptide which is known for its vasodilative and cardioprotective functions. It has been shown that bradykinin can induce age- and health-dependent vasoconstriction, but the pathways are not well-known.</p> <p>The aim of this thesis was to investigate the protein levels of the bradykinin pathway components in young and aged spontaneously hypertensive and normotensive rats. The goal was to compare the protein levels in these groups and thus to get information of the effects of aging and raised blood pressure on bradykinin pathways.</p> <p>In this thesis, Western blot method was built-up and optimized to analyse the levels of bradykinin receptors B1 and B2, angiotensin converting enzyme (ACE1), cyclooxygenase enzymes (COX-1, COX-2) and angiotensin receptor type 2 (AT2). Measurements were performed using rat kidneys (n=3).</p> <p>The method was built-up and optimized successfully, and the levels of the proteins could be analysed reliably. The only protein that could not be detected was COX-2. The levels of ACE1 protein were higher in kidney samples of old rats than in those of young rats. According to the levels of COX-1, results supported the hypothesis that bradykinin-induced vasoconstriction is mediated via products of COX enzymes. Contrary to expectations, there were no age-related changes in the levels of bradykinin receptors. To confirm the results, the study should be continued with higher number of samples. The study could be continued also by analysing levels of the investigated proteins in other tissues such as heart and blood vessels.</p>	
Keywords	Western blot, bradykinin, bradykinin receptor, angiotensin converting enzyme, cyclooxygenase

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
2.1	Verenpaineen säätely	2
2.2	Reniini-angiotensiinijärjestelmä	4
2.3	Kallikreiini-kiniinijärjestelmä	6
2.4	Prostanoidit	9
2.5	Western blot	10
3	Työn tausta ja tavoitteet	13
4	Menetelmät	13
4.1	Koe-eläimet	14
4.2	Näytteiden käsittely	14
4.3	Western blot -menetelmän pystytys ja optimointi	15
4.3.1	SDS-PAGE	16
4.3.2	Blottaus	16
4.3.3	Blokkaus	17
4.3.4	Vasta-aineet	17
4.3.5	Detektointi	19
4.3.6	Vasta-aineiden poistaminen kalvolta	19
4.3.7	Tilastollinen tulosten käsittely	19
5	Tulokset ja tulosten tarkastelu	20
5.1	Western blot -menetelmän optimointi	20
5.2	Proteiinitasot	23
6	Yhteenveto	27
	Lähteet	30

### Liitteet

Liite 1. Geelien valmistus

Liite 2. Western blot -ohje

## Lyhenteet

ACE1	Angiotensiiniä konvertoiva entsyymi 1
ACE2	Angiotensiiniä konvertoiva entsyymi 2
Ang I	Angiotensiini I
Ang II	Angiotensiini II
Ang 1–7	Angiotensiini 1–7
Ang 1–9	Angiotensiini 1–9
AT1/2	Angiotensiini II:n reseptori tyyppi 1 ja 2
B1/2	Bradykiniinireseptori tyyppi 1 ja 2
COX-1	Syklo-oksyygenaasi 1 -entsyymi
COX-2	Syklo-oksyygenaasi 2 -entsyymi
Mas	Mas-reseptori
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> . Fosfaattisuolaliuos.
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandiini D <sub>2</sub> . Prostanoideihin kuuluva rasvahappo.
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandiini E <sub>2</sub> . Prostanoideihin kuuluva rasvahappo.
PGI <sub>2</sub>	Prostasykliini. Prostanoideihin kuuluva rasvahappo.
PVDF	Polyvinyyliidifluoridi. Kalvomateriaali Western blot -menetelmässä.
RAS	<i>Renin-angiotensin system</i> . Reniini-angiotensiinijärjestelmä.
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> . SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi.

- SHR *Spontaneously hypertensive rat*. Geneettisesti verenpainetautia sairastava rottakanta.
- TXA<sub>2</sub> Tromboksaani A<sub>2</sub>. Prostanoideihin kuuluva rasvahappo.
- WKY *Wistar-Kyoto*. Normaaliverenpainainen rottakanta.

## 1 Johdanto

Kohonnut verenpaine ja sen aiheuttamat sairaudet ovat yksi yleisimmistä ennenaikaiseen kuolemaan johtavista tekijöistä. Kohonneesta verenpaineesta kärsii noin 970 miljoonaa ihmistä maailmassa. Kohonneen verenpaineen syntyyn vaikuttavat ikääntyminen ja perimä, sekä suurelta osin myös elintavat, kuten ravinto, liikunta, tupakointi ja stressi. Sydän- ja verisuonitautien syntymekanismieja paremmin ymmärtämällä, voitaisiin kehittää tehokkaampia ja kohdennetumpia hoitomuotoja niiden parantamiseen ja ennaltaehkäisyyn. (Hypertension 2017.)

Bradykiniini on vasoaktiivinen peptidi, joka toimii muun muassa tulehduksessa ja kivussa välittäjäaineena. Bradykiniini on tunnettu verisuonia laajentavana ja sydän- ja verisuonitaudeilta suojaavana yhdisteenä. Sen laajentavien ominaisuuksien on todettu kuitenkin olevan iästä ja terveydentilasta riippuvaisia. (Mantelli ym. 1995: 72–73; Siltari ym. 2017: 52–54.) Bradykiniinin vaikutukset välittyvät kahden reseptorin (B1 ja B2) kautta. Reseptorien määrien ja niiden suhteen on todettu muuttuvan ikääntyessä ja niiden kyky reagoida kiniineihin laskee. (Kintsurashvili ym. 2005: 202.) Bradykiniinin verisuonia laajentava ominaisuus katoaa ja muuttuu supistavaksi erityisesti vanhoilla, sydän- ja verisuonitaukeja sairastavilla. Supistava vaikutus välittyy prostanoidein eli keskeisten tulehdusta välittävien yhdisteiden kautta. Tarkemmat vaikutusreitit ja -mekanismit ovat kuitenkin heikosti tunnetut. (Erol ym. 2011: 420; More ym. 2014: 215–216.)

Tämän insinööriyön tavoitteena oli pystyttää Western blot -menetelmä, jolla voitiin tutkia bradykiniinin vaikutusreitteihin liittyvien reseptorien ja entsyymien tasoja nuorten ja vanhojen korkeaverenpaineisten ja vastaavan ikäisten terveiden rottien kudoksenäytteistä. Työ oli jatkoa eläintutkimukselle, jossa vanhojen ja nuorten verenpainetautisten sekä vastaavan ikäisten terveiden rottien verisuonien fysiologisten reaktiivisuuskokeiden avulla todettiin bradykiniinin vaikutusten välittyvän eri vaikutusreittien kautta terveessä ja sairaassa kudoksessa. Tämän työn avulla pyrittiin saamaan tarkempaa tietoa yksittäisten reseptorien ja entsyymien tasoista ja näin pyrittiin tukemaan edellisen tutkimuksen havaintoja. Työ suoritettiin Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian osastossa, ravitsemusfysiologian ryhmässä tohtorikoulutettava Aino Siltarin, professori Riitta Korpelan ja emeritusprofessori Heikki Vapaatalon ohjauksessa.

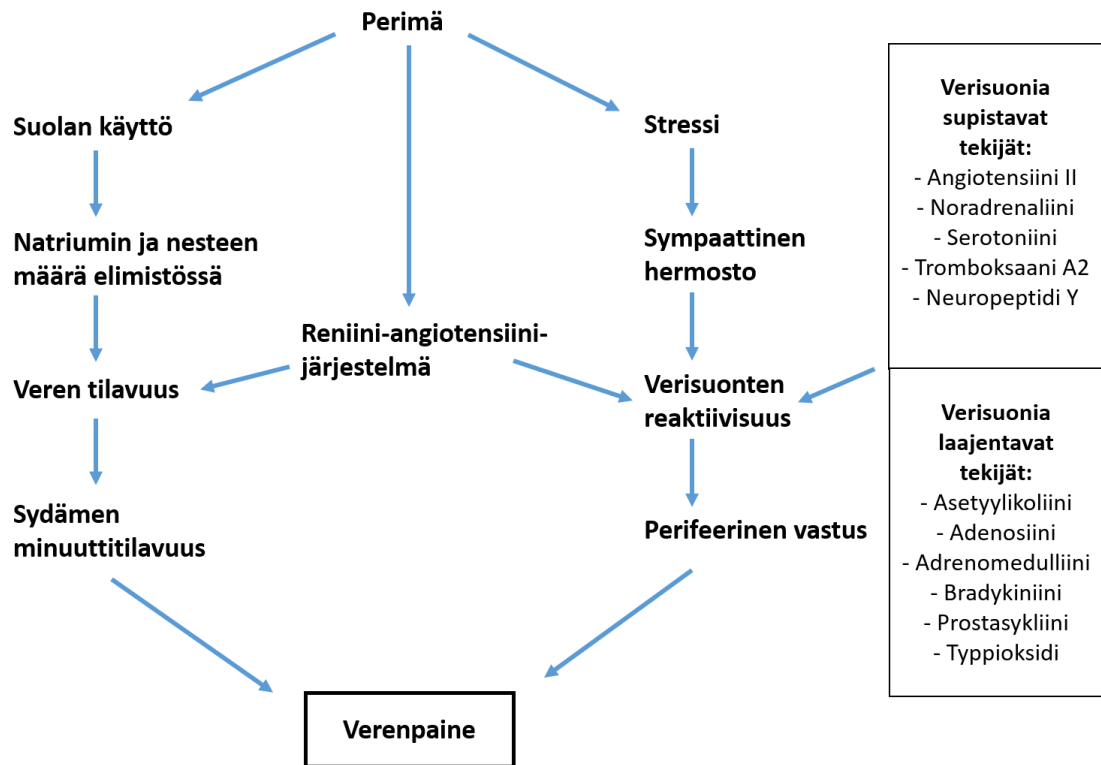
## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Verenpaineen säätely

Verenpainetauti on Suomessa yleinen sairaus, johon joka kymmenes suomalainen aikuinen saa lääkettä. Verenpaine määritetään sydämen minuuttitilavuuden ja verisuonten ääreisvastuksen tulona. Minuuttitilavuuteen vaikuttavat muun muassa sydämen syketaajuus ja iskutilavuus. Fysiologiset mekanismit sekä monet paikalliset tekijät ja autonominen hermosto välittäjäaineineen säätelevät verenpainetta eri tilanteissa tarvittavalle tasolle. Esimerkiksi fyysisessä rasituksessa sympaattinen hermosto aktivoituu ja parasympaattisen hermoston aktiivisuus laskee, jolloin vastussuonet supistuvat, syketaajuus nousee ja verisuonten supistusvoima suurenee. (Ruskoaho 2014: 307.)

Suurin osa kohonneesta verenpaineesta on essentiaalista eli primaarista hypertensiota ja vain noin 5 % on sekundaarista hypertensiota, eli jostain muusta tekijästä johtuvaa, kuten esimerkiksi munuaisperäisistä sairauksista. Sekundaarisen hypertension voi parantaa hoitamalla korkean verenpaineen aiheuttaman sairauden. Essentiaalisen hypertension kehittymiseen vaikuttavat monet tekijät, kuten perintötekijät ja elintavat, sympaattisen hermoston aktiivisuus sekä ääreisverenkierron vastuksen (perifeerinen vastus) kasvu (kuva 1). Pitkäkestoinen kohonnut verenpaine rasittaa sydäntä ja valtimoita ja voi johtaa valtimoiden kovettumistaudin, ateroskleroosin kehittymiseen, sydämen vajaatoimintaan ja aivoverenvuotoihin. (Ruskoaho 2014: 307–309; Mustajoki 2017.)





Kuva 1. Verenpaineen säätelyyn ja essentiaaliseen hypertension kehittymiseen vaikuttavia tekijöitä (Mukaiillen: Ruskoaho 2014: 309).

### Sydän ja verisuonisto ikääntyessä

Ikääntyminen on fysiologinen prosessi, johon vaikuttaa perimän lisäksi ympäristön ja ulkoisten tekijöiden vaikutus. Ikääntyessä elimissä tapahtuu fysiologisia muutoksia ja niiden toiminta heikentyy. Sydämessä ja verisuonistossa tapahtuvia muutoksia ovat muun muassa suurten suonien ja sydänlihaksen jäykistyminen sekä elastisuuden väheneminen. Tämä alentaa verenpaineen säätelyn tehokkuutta ja kuormittaa sydäntä ja verisuonistoa. Verenpaineen säätelyn tehokkuus pienenee myös erilaisten reseptorien, kuten baroreseptorien ja kemoreseptorien herkkyyden alenemisen johdosta. Lisäksi sydämen vasemman kammion hypertrofia eli liikakasvu ja sydämen lihassolujen määrän vähentyminen ovat yleistä ikääntyessä. Nämä tekijät voivat johtaa kohonneeseen verenpaineeseen, jolloin riski sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin kasvaa. (Cheitlin 2003: 9–10.)

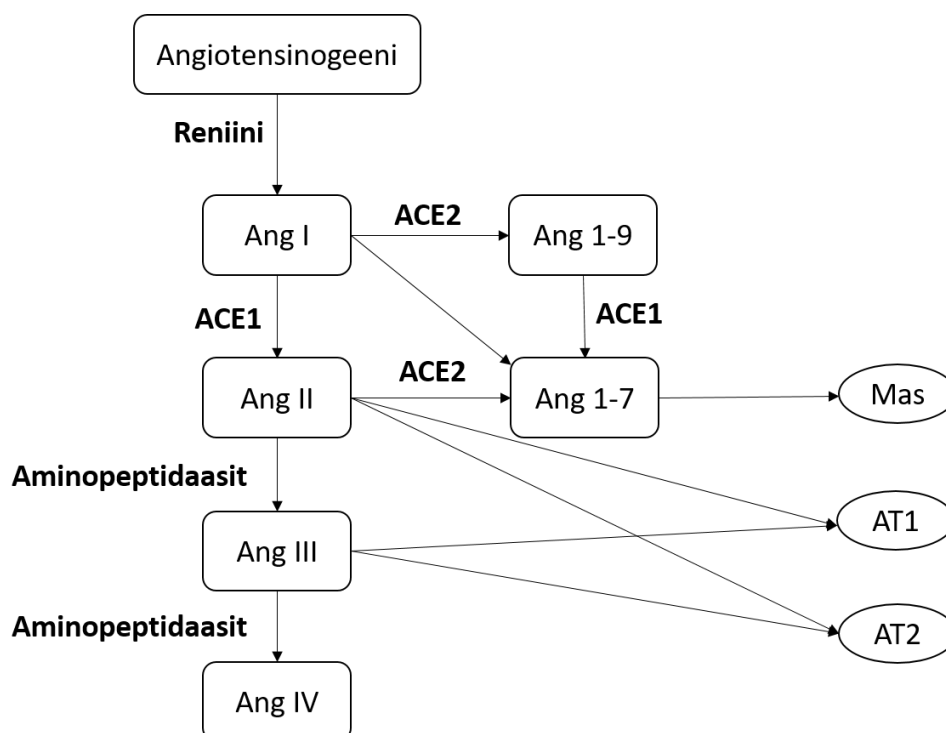
## 2.2 Reniini-angiotensiinijärjestelmä

Reniini-angiotensiinijärjestelmä (RAS) on keskeinen sekä verenpaineen pitkäaikaisessa että lyhytaikaisessa säätelyssä (Garrison & Jackson 1996: 734). Munuaisissa syntyvä reniini on 340 aminohaposta koostuva proteolyttinen entsyymi, joka pilkkoo angiotensiinogeenia angiotensiini I:ksi (Ang I). Reniiniä erittyy vereen, kun verenpaine laskee tai elimistön suolatasapaino on alhainen. Reniinin eritystä lisäävät adrenergisen hermoston beetareseptorien stimulaatio ja prostasykliini. Reniinin puoliintumisaika veressä on 10–15 minuuttia. Angiotensiinogeeni on maksasta erittyvä glykoproteiini, jota syntyy verenkiertoon tulehduksessa ja eri hormonien, kuten glukokortikoidien, estrogeenien, kilpirauhashormonien ja insuliinin vaikutuksesta. (Ruskoaho 2014: 330; Hilal-Dandan 2011.)

Ang I -peptidi muuttuu verenkierrossa angiotensiiniä konvertoivan entsyymin 1 (ACE1) avulla verisuonia voimakkaasti supistavaksi yhdisteeksi, angiotensiini II:ksi (Ang II). Verenkierrossa lisäksi myös useissa kudoksissa on todettu olevan paikallinen RAS-järjestelmä. (Fyhrquist & Saijonmaa 2008: 225.) ACE1 on karboksipeptidaasi, joka pilkkoo peptidien karboksiterminaaliosasta päästä kaksi aminohappoa. Se on epäspesifinen entsyymi, joka pilkkoo dipeptideitä monista eri aminohappojärjestyksistä. (Hilal-Dandan 2011.) Ang I -peptidi voi muuttua Ang II -peptidiksi myös muiden entsyymien, kuten kymaasin ja katepsiini G:n avulla. ACE1-entsyymin tiedetään kuitenkin olevan merkittävin Ang II -peptidiä muodostava entsyymi. (Fyhrquist & Saijonmaa 2008: 226–227; Vaajanen ym. 2008: 421–422.) Ang II -peptidi pilkkoutuu vielä angiotensiini III:ksi (Ang III) aminopeptidaasien vaikutuksesta, mutta Ang III -peptidin verisuonia supistava vaikutus on huomattavasti pienempi kuin Ang II -peptidin. (Hilal-Dandan 2011.)

Vasta viime vuosikymmenien aikana on kuvattu lukuisia muita RAS-järjestelmään kuuluvia komponentteja ja niiden merkityksiä. Näistä yksi on ACE1-entsyymin homologi angiotensiiniä konvertoiva entsyymi 2 (ACE2), joka pilkkoo Ang II -peptidin angiotensiini 1–7:ksi (Ang 1–7). Ang 1–7 -peptidi toimii Ang II -peptidin vastavaikuttajana. Se edistää prostasykliinin ja typpioksidin vapautumista endoteelistä, mikä laajentaa verisuonia. Ang 1–7 -peptidin vaikutukset välittyvät Mas-reseptorin kautta. ACE2-entsyymi muodostaa myös Ang I -peptidistä angiotensiini 1–9:ää (Ang 1–9), jonka vaikutuksina tiedetään olevan bradykiniinin aktivoiminen sekä typpioksidin ja arakidonihapon vapautuminen endoteelistä. Ang 1–9 -peptidi voi myös metaboloitua Ang 1–7 -peptidiksi ACE1-entsyymin välityksellä. (Vaajanen ym. 2008: 420–421.)

Ang II -peptidin vaikutukset välittyvät AT1- ja AT2-reseptorin kautta. AT1-reseptori on useimmissa kudoksissa yleisin angiotensiinireseptori. Sen aktivaatio aiheuttaa verisuonten supistumisen kautta perifeerisen vastuksen kasvun ja verenpaineen nousun. AT1-reseptorin kautta Ang II -peptidi aiheuttaa myös solujen hypertrofiaa, proliferaatiota ja migraatiota. AT2-reseptori on AT1-reseptorin vastavaikuttaja. Sen aktivaatio laajentaa verisuonia ja alentaa verenpainetta avaamalla kaliumkanavia ja estämällä kalsiumkanavia. Sen kautta myös bradykiniinin ja typpioksidin tuotanto lisääntyy. Tutkimusten mukaan AT2-reseptorien ekspresio kasvaa kardiovaskulaaristen sairauksien, kuten sydänlihaksen fibroosin eli sidekudoksen liikakasvun aikana ja sydämen vajaatoiminnan yhteydessä. (Hilal-Dandan 2011; Ruskoaho 2014: 332–335.) Ang II -peptidi kiihdyttää sympaattisen hermoston aktiivisuutta vapauttamalla noradrenaliinia hermopäätteistä ja adrenaliinia lisämunuaisen ytimestä. Ang II -peptidi lisää myös aldosteronin eritystä lisämunuaisen kuorikerroksesta AT1-reseptorin välityksellä, mikä on tärkeää elimistön natrium- ja nestetasapainon säätelyssä. Aldosteroni lisää natriumin takaisin imeytymistä munuaisen distalisessa tubuluksessa sekä kokoojaputkissa ja samalla lisää kaliumin ja vetyionien eritystä virtsaan. (Ruskoaho 2014: 334.) Kuvassa 2 on esitetty yksinkertaistettu kuva RAS-järjestelmän komponenteista.



Kuva 2. Yksinkertaistettu kuva RAS-järjestelmästä (Mukaillen: Fyhrquist & Saijonmaa 2008: 225).

## Angiotensiiniä konvertoiva entsyymi

ACE1 on RAS-järjestelmän keskeinen entsyymi. Se on molekyylimassaltaan noin 150–180 kDa (Moreau ym. 2005: 11). Se on membraaniin sitoutunut entsyymi, jolla on suuri aminoterminaalinen osa solunkalvon ulkopuolella ja sisäpuolella lyhyt karboksiternimaa-linen osa. (Hilal-Dandan 2011.) ACE1 ei ole spesifinen entsyymi, vaan pilkkoo monia vasoaktiivisia peptideitä. Sitä on eniten keuhkoissa, mutta myös muissa kudoksissa, kuten munuaisissa, haimassa ja suolistossa. (Moreau ym. 2005: 11; Savinen & Vapaatalo 2014: 2086–2088.) ACE1-entsyymiä ja monia muita RAS-järjestelmän komponentteja on löydetty myös silmästä, jossa ne vaikuttavat silmänpaineen säätelyyn (Vaajanen ym. 2008: 422–424).

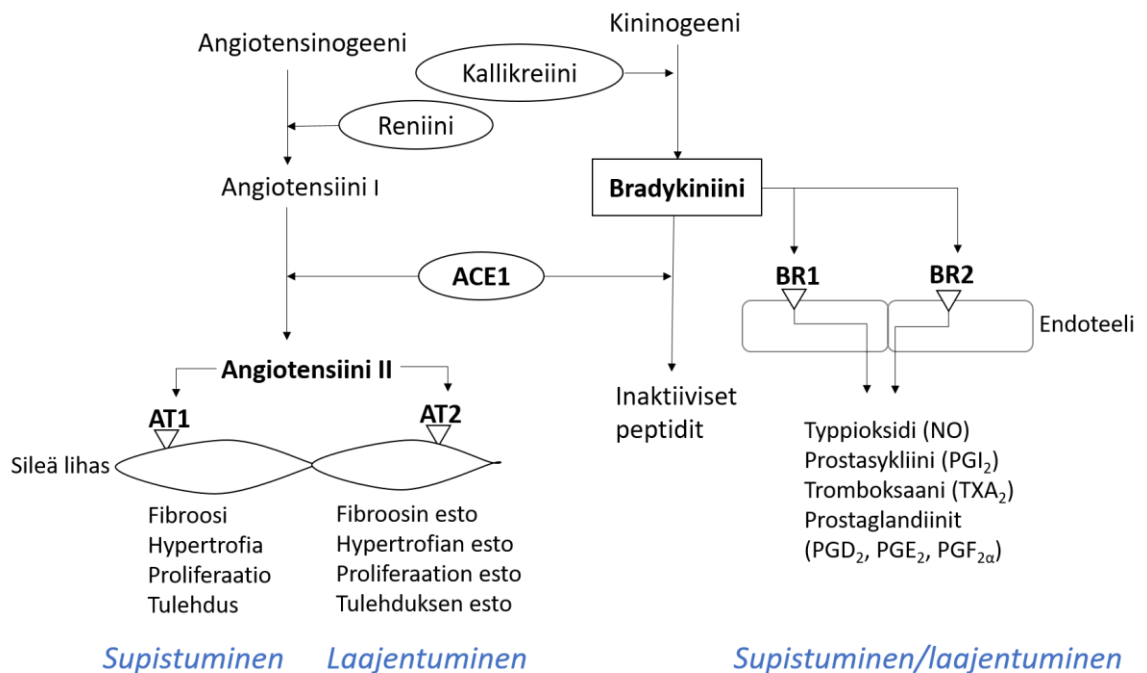
Monet verenpainetta alentavat lääkkeet perustuvat RAS-järjestelmän estämiseen. Näitä ovat ACE-entsyymien estäjät, jotka estävät ACE-entsyymiä muodostamasta Ang II -peptidiä ja pilkkomasta vasoaktiivisia peptideitä, kuten verisuonia laajentavaa bradykiniiniä. Käytössä on myös angiotensiinireseptorien salpaajia (ATR-salpaajat), jotka estävät Ang II -peptidin sitoutumisen sen reseptoreihin verisuonten ja muiden kudosten pinnalla. Lisäksi on käytössä reniininestäjiä, jotka estävät angiotensinogeenin muuttumista reniinin vaikutuksesta Ang I -peptidiksi. (Ruskoaho 2014: 328–330.)

### 2.3 Kallikreiini-kiniinijärjestelmä

Kallikreiini-kiniinijärjestelmä löydettiin viime vuosisadan alkupuolella, kun tutkijat Frey, Kraut ja Werle löysivät virtsasta kallikreiinientsyymien ja totesivat, että sen vaikutuksesta syntyy yhdistettä, joka supistaa suolen sileää lihasta hitaasti (bradys = hidas), mutta laajentaa verisuonia. Myöhemmin vaikutusten todettiin olevan peräisin kahdesta eri, lähes samankaltaisesta kiniinistä: kallidiinista ja bradykiniinista. Bradykiniini koostuu yhdeksästä ja kallidiini kymmenestä aminohaposta. Esimerkiksi kudostenvauriot, allergiset reaktiot, virusinfektiot ja muut tulehdukselliset tilat aiheuttavat kallikreiini-kiniinijärjestelmän aktivoitumisen. (Babe & Serafin 1996: 593; Moilanen & Vuolteenaho: 247–248.)

Bradykiniini ja kallidiini muodostuvat kallikreiinientsyymien katalysoimana esiasteestaan, kininogeenista. Kininogeeni on  $\alpha$ -globuliini, josta on sekä pienimolekulaarinen (11 kDa) että suurimolekulaarinen (70 kDa) muoto (Moilanen & Vuolteenaho 2014: 248). Kallikreiinientsyymiä on inaktiivisessa muodossa sekä plasmassa että kudoksissa. Plasman ja

kudosten kallikreiinientsyymit aktivoituvat eri mekanismien avulla, joten niitä pidetään keskenään erilaisina entsyymeinä. Plasman kallikreiini on kooltaan 88 kDa ja sen substraattina toimii suurimolekulaarinen kininogeeni, josta muodostuu pääasiassa bradykiniinia. (Skidgel ym. 2011; Regoli ym. 1998: 1.) Plasman kallikreiinin inaktiivisen muodon voi aktivoida muun muassa Hageman-tekijä, joka on myös yksi hyytymisjärjestelmän tekijöistä. Tulehdusreaktiossa kiniinijärjestelmä aktivoituu vasta tulehtuneessa kudoksessa, kun Hageman-tekijä, prekallikreiini ja kininogeenit siirtyvät plasmasta tulehtuneeseen kudokseen. (Moilanen & Vuolteenaho 2014: 248–249.) Kudoksessa oleva kallikreiini on kooltaan 29 kDa, ja sitä on löydetty ainakin haimasta, sylkirauhasista, eturauhasesta ja neutrofiileista. Kudosten kallikreiinit muodostavat pienimolekulaarisesta kininogeenistä kallidiinia. Kiniinien puoliintumisaika on lyhyt, muutama kymmenen sekuntia, sillä plasman entsyymit kininaasi I ja II hajottavat ne inaktiivisiksi peptideiksi. Kininaasi I irrottaa kiniinien karboksiterminaalisisesta päästä yhden aminohapon, kun taas kininaasi II irrottaa dipeptidin. ACE1-entsyymi on toiselta nimeltään kininaasi II. (Skidgel ym. 2011.) RAS-järjestelmän ja kallikreiini-kiniinijärjestelmän yhteys on havainnollistettu kuvassa 3.



Kuva 3. Yksinkertaistettu kaavakuva RAS-järjestelmästä ja ACE-entsyymin yhteys kallikreiini-kiniini-järjestelmään. ACE1-entsyymi pilkkoo Ang I -peptidistä verisuonia voimakkaasti supistavaa Ang II -peptidiä. Ang II -peptidin vaikutukset välittyvät AT1- ja AT2-reseptorien kautta. ACE1-entsyymi pilkkoo myös bradykiniinia inaktiivisiksi peptideiksi. Bradykiniinin vaikutukset välittyvät BR1- ja BR2-reseptorien kautta. (Mukaillen: Ruskoaho 2014: 331, 338.)

## Bradykiniini

Bradykiniini toimii välittäjäaineena tulehduksessa, astmassa ja allergiassa ja lisää tulehdukseen liittyvän kivun tuntemuksia. Se laskee verenpainetta, lisää verisuonten läpäisevyyttä ja lisää sileän lihaksen supistumista ruuansulatuskanavassa, kohdussa ja keuhkoputkissa. Verenpaineen aleneminen välittyy endoteelin tuottaman typpioksidin kautta, joka laajentaa verisuonten sileälihasta. Bradykiniini vapauttaa myös prostaglandiineja eli eräitä tulehduksen välittäjäaineista. (Skidgel ym. 2011.)

Bradykiniini supistaa verisuonia ainakin rotan valtimoissa. Bradykiniinin verisuonia supistavat vaikutusmekanismit ovat kuitenkin puutteellisesti tunnetut. Niiden uskotaan välittyvän syklo-oksigenaasireitin kautta. (Fasciolo ym. 1990: 347–348; Mantelli ym. 1995: 73, Siltari ym. 2017.) Tutkimuksissa on todettu, että bradykiniini aktivoi fosfolipaasi A2 -entsyymiä, joka vapauttaa solukalvoista arakidonihappoa, josta syklo-oksigenaasientsyymit (COX-entsyymit) tuottavat prostanoideja. Näistä osa on verisuonia supistavia, osa taas laajentaa verisuonia. (Briand ym. 1996: 292; Kennedy ym. 1996: 1064; Hecquet ym. 2006: 948–949; Erol ym. 2011: 427; More ym. 2014: 215.) Bradykiniinin aiheuttama verisuonten laajentuminen on myös iästä riippuvaista. Vanhoilla eläimillä bradykiniinin laajentava vaikutus häviää ja muuttuu supistavaksi. (Mantelli ym. 1995: 72–73; Siltari ym. 2016: 52–53.)

Bradykiniinin vaikutukset välittyvät B1- ja B2-reseptorien kautta (Skidgel ym. 2011). Reseptorit ovat G-proteiinikytkentäisiä (Regoli ym. 1998: 2). Reseptorin proteiinirakenteessa tapahtuu solunsisäisiä muutoksia, kun kohdeproteiini liittyy reseptoriinsa. Reseptorin aktivaatio saa aikaan solunsisäisen signaalimolekyylin, G-proteiinin aktivoitumisen. G-proteiinit koostuvat alfa-, beta- ja gamma-alayksiköistä. Alfa-alayksikkö sitoo itseensä guanosiinidifosfaattimolekyylin (GDP). Reseptorin aktivoituminen saa aikaan GDP-molekyylin irtoamisen, jolloin tilalle sitoutuu guanosiinirifosfaattimolekyylin (GTP). Tällöin G-proteiinista irtoaa alfa- ja beta-gamma-alayksikkö, jotka pystyvät aktivoimaan solussa niiden kohdeproteiineja, kuten fosfolipaaseja ja solukalvon ionikanavia. (Purves ym. 2001.) Fosfolipaasi A2 -entsyymi on yksi kohdeproteiineista, joka aktivoituu bradykiniinireseptorien kautta ja on mukana prostanoidien synnyssä (Curtis ym. 1997: 145). B1-reseptorien tasot ovat elimistön normaalitilassa matalat, mutta niiden ilmentyminen kasvaa tulehduksen ja kudosaaurioiden aikana, muun muassa tulehdussytokiini IL-1:n vaikutuksesta (Moilanen & Vuolteenaho 2014: 249). B1-reseptorien kautta bradykiniinin vai-

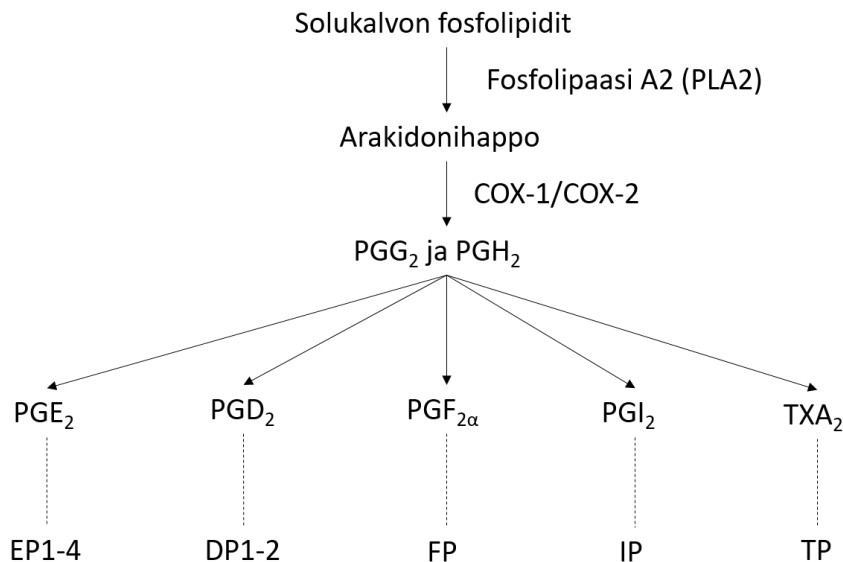
kutukset liittyvät kivun aistimuksiin. B2-reseptorit ilmentyvät elimistön normaalitilassa tassaaisesti eri kudoksissa ja erilaisissa solutyypeissä. (Skidgel ym. 2011.) Reseptorien määrissä ja niiden reaktiokyvyssä tapahtuu muutoksia ikääntyessä. Esimerkiksi B1-reseptorien määrän kasvaa ja B2-reseptorien määrä vähentyy rotan sydämessä ikääntyessä. Bradykiniinin sydäntä suojaavat ominaisuudet välittyvät B2-reseptorien kautta, joten muutokset reseptorien määrässä voivat altistaa sydänsairauksille. (Kintsurashvili ym. 2004: 202; Nurmi ym. 2011: 13–14.)

## 2.4 Prostanoidit

Bradykiniinireseptorien aktivaation kautta aktivoituu myös fosfolipaasi A2 -entsyymi, joka vapauttaa solukalvon fosfolipideistä arakidonihappoa. Arakidonihappo toimii lähtöaineena prostanoidien synnylle. Prostanoidisynteesisistä vastaavat syklo-oksigenaasientsyymit (COX-entsyymit), joista on kaksi alatyppiä. COX-1 on konstitutiivinen, jatkuvasti esiintyvä entsyymi, joka tuottaa pieniä määriä prostanoideja eri kudoksiin. COX-2-entsyymi indusoituu tulehduksen aikana muun muassa tulehdussytokiinin ja bakteerituotteiden vaikutuksesta. Se tuottaa tulehduspesäkkeeseen suuren määrän prostanoideja. Joissakin kudoksissa, kuten aivoissa, munuaisissa ja verisuonten endoteelissa COX-2-entsyymi esiintyy myös pieninä pitoisuuksina normaalitilassa. (Curtis ym. 1997: 145; Moilanen & Nieminen 2014: 235–238.)

Prostanoidit kuuluvat eikosanoideihin, jota käytetään yhteisnimityksenä paikallisesti vaikuttaville lipidivälittäjäaineille. Niille tyypillistä on, etteivät ne varastoidu soluun, vaan synteesi käynnistyy tarvittaessa. Eikosanoidit säätelevät elimistössä useita fysiologisia toimintoja, kuten verenkiertoa ja veren hyytymistä, munuaisten toimintaa, maha suojaava eritystoimintaa, sileän lihaksen supistumista ja tulehdusreaktioita. (Moilanen & Nieminen 2014: 235.) Prostanoideihin kuuluvat COX-entsyymien tuotteet prostasykliini ( $\text{PGI}_2$ ), tromboksaani ( $\text{TXA}_2$ ) ja prostaglandiinit ( $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  ja  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ). Näiden lisäksi eikosanoideihin kuuluvat lipoksigenaasien kautta syntyvät leukotrieenit ja eräät muut huonommin tunnetut yhdisteet. Eri prostanoidien tasot vaihtelevat solutyypistä riippuen ja niiden fysiologisista määristä ei ole luotettavaa tietoa. COX-entsyymien vaikutuksesta arakidonihaposta syntyy lyhytikäisiä prostaglandiiniendoperoksideja, jotka katalysoituvat spesifisten syntaasien tuottamina edelleen eri prostanoideiksi (kuva 4). Tromboksaani syntyy pääasiassa verihiiutaleissa, ja se aiheuttaa verisuonten supistumista ja verihiiuta-

leiden aggregaatiota ja mahdollisesti verisuonitukoksia. Prostasykliini syntetisoituu verisuonten endoteelisoluissa ja laajentaa verisuonia sekä estää verihiutaleiden aggregaatiota. Se myös säätelee munuaisten toimintaa, kuten reniinin vapautumista ja natriumin eritystä virtsaan. Prostaglandiini D<sub>2</sub> syntetisoituu syöttösolujen vaikutuksesta ja prostaglandiini E<sub>2</sub> monosyytti-makrofagilinjan soluissa tulehdustiloissa, mutta myös mahalaukun limakalvon suojaustehtävissä. (Moilanen & Nieminen 2014: 238–241.)



Kuva 4. Prostanoidisynteesi. Fosfolipaasi A2 -entsyymi vapauttaa solukalvon fosfolipideistä arakidonihappoa, josta syntyvät prostaglandiiniendoperoksidit (PGG<sub>2</sub> ja PGH<sub>2</sub>) COX-1- ja COX-2-entsyymien avulla. PGG<sub>2</sub> ja PGH<sub>2</sub> syntetisoituvat edelleen prostaglandiineiksi (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> ja PGF<sub>2α</sub>), prostasykliiniksi (PGI<sub>2</sub>) ja tromboksaaniksi (TXA<sub>2</sub>). Niiden vaikutukset välittyvät prostanoidireseptorien kautta (EP1-4, DP1-2, FP, IP ja TP). (Mukailen: Moilanen & Nieminen 2014: 236–241.)

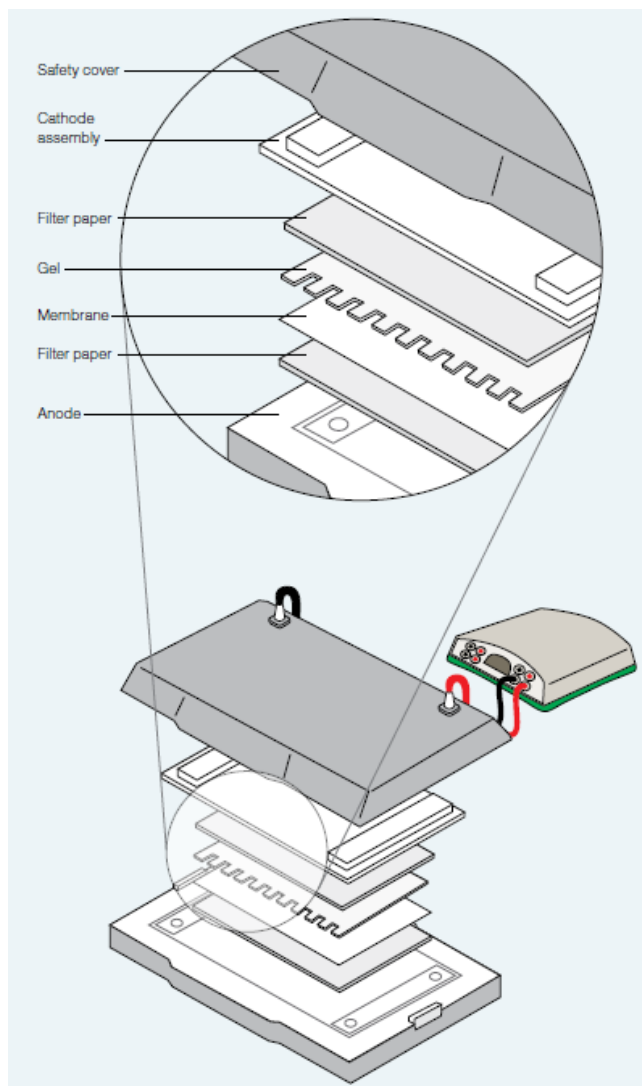
## 2.5 Western blot

Western blot on perinteisesti käytetty menetelmä proteiinitasojen määrittämiseen ja proteiinien tunnistamiseen spesifisten vasta-aineiden avulla kokonaisproteiininäytteestä. Western blot -menetelmällä voidaan määrittää esimerkiksi RAS-järjestelmän komponenttien tasoja sekä muiden entsyymien ja reseptorien, kuten esimerkiksi bradykiniinireseptorien ja COX-entsyymien tasoja. Proteiinit erotellaan toisistaan molekyylimassan mukaan SDS-polyakryyliamidi-geelelektroforeesilla (SDS-PAGE) ja siirretään elektroforeettisesti positiivisesti varautuneeseen huokoiseen kalvoon, johon negatiivisesti varautuneet proteiinit sitoutuvat. (Faoro ym. 2011: 271.)



## Blottaus

SDS-PAGE:n jälkeen toisistaan erotellut proteiinit siirretään geeliltä proteiineja sitovaan huokoiseen kalvoon sähkövirran avulla. Blottaus voidaan suorittaa tankissa (tank blotting), jolloin geelit ja kalvot ovat kokonaan upotettuina puskuriliuokseen ja sähkövirta kulkee kahden metallilangan välillä. Toinen yleinen blottausmenetelmä on puolikuiva blottaus (semi-dry blotting), jossa puskuriin kostutetut kalvot, geelit ja suodatinpaperit pakataan elektrodien väliin. Sähkövirta kulkeutuu puskurin avulla laitteen katodista anodiin suodatinpaperien välissä olevien geelien ja kalvon läpi ja siirtää proteiinit kalvolle (kuva 5). (Protein blotting guide: 10.)



Kuva 5. Blottaus puolikuivalla (semi-dry) menetelmällä. Laitteeseen pakataan anodin päälle puskurissa kostutetut suodatinpaperit, kalvo, geelit ja päällimmäiseksi toinen kerros suodatinpapereita. Kasan päälle tulee katodi, josta virta kulkee anodia kohti. (Protein blotting guide: 50.)

Yleisimmin käytetyt kalvot, joihin proteiinit siirretään, on valmistettu nitroselluloosasta tai polyvinyylidifluoridista (PVDF) (Faoro ym. 2011: 271). Kalvoja on 0,45 µm ja 0,2 µm huokoskoolla, joista 0,2 µm huokoskoon kalvot soveltuvat pienien, alle 15 kDa proteiinien tutkimiseen. PVDF-kalvo sitoo suuremman määrän proteiinia (150–160 µg/cm<sup>2</sup>) kuin nitroselluloosakalvo (80–100 µg/cm<sup>2</sup>), mutta suuren proteiinien sitomiskyvyn takia kalvoon saattaa sitoutua käsittelyn aikana herkästi kuitenkin myös taustaa aiheuttavia epäspesifisiä proteiineja. Nitroselluloosa oli ensimmäisiä Western blot -menetelmässä käytettyjä kalvomateriaaleja, ja se on edelleen hyvin yleisesti käytetty. Sen tekniset ominaisuudet ovat kuitenkin heikompia, kuin PVDF-kalvon, sillä se saattaa murtua käsittelyssä helpommin. (Protein blotting guide: 18.)

### Blokkaus

Kun proteiinit on siirretty eli blotattu kalvoon, täytyy kalvon tyhjät huokokset täyttää eli blokata vasta-aineelle epäspesifisellä proteiinilla. Kalvot käsitellään usein edullisuutensa vuoksi rasvattomalla maidolla, naudan seerumin albumiinilla (BSA) tai kaseiinilla ja lisäksi on olemassa myös kaupallisia blokkauspuskureita. Ilman blokkausta vasta-aineet sitoutuisivat tasaisesti sekä kalvon tyhjiin huokosiin että kohdeproteiiniin, joten halutun proteiinin tarkastelu olisi mahdotonta. Blokkausliuoksen valinta on tehtävä menetelmäkohtaisesti ja valittava vähiten taustaa aiheuttava liuos. (Galva ym. 2012: 22.)

### Vasta-ainekäsittelyt

Blokkauksen jälkeen kalvo käsitellään kohdeproteiinille spesifisellä primaarivasta-aineella. Tämän jälkeen kalvo pestään ja käsitellään sekundaarivasta-aineella, joka sitoutuu primaarivasta-aineeseen. Sekundaarivasta-aineet on leimattu detektoimiseen mahdollistavalla leimalla. Vasta-aineella voi olla radioaktiivinen tai fluoresoiva leima tai se voi olla konjugoitu entsyymillä. Yksi yleisimmistä detektointitavoista on kemiluminesenssiin perustuva, jolloin sekundaarivasta-aine on leimattu entsyymikonjugaatilla, kuten piparjuuriperoksidaasilla (horseradish peroxidase, HRP). Kun kalvon päälle lisätään substraattia, HRP-entsyymi hapettaa substraattina toimivan luminolin vetyperoksidin läsnä ollessa 3-aminoftalaatiksi, jonka emittoima valo voidaan kuvantaa. Fluoresenssimenetelmässä sekundaarivasta-aine on leimattu fluoroforilla, joka absorboi valoa tietyllä aallonpituudella ja vapauttaa osan energiasta näkyvänä fluoresenssina. (Protein blotting guide: 33–41). Erityisen herkkä fluoresenssimenetelmä on, kun vasta-aineet on leimattu

lähi-infrapuna-alueella (650–900 nm) absorboivalla fluoroforilla. Tällöin kalvon ja esimerkiksi blokkausliuoksen aiheuttama luonnollinen fluoresointi näkyvän valon alueella ei häiritse kohdeproteiinin havaitsemista ja pienimmätkin fluoresenssitaset saadaan mitatuksi. (IRDye infrared dyes 2010.)

### **3 Työn tausta ja tavoitteet**

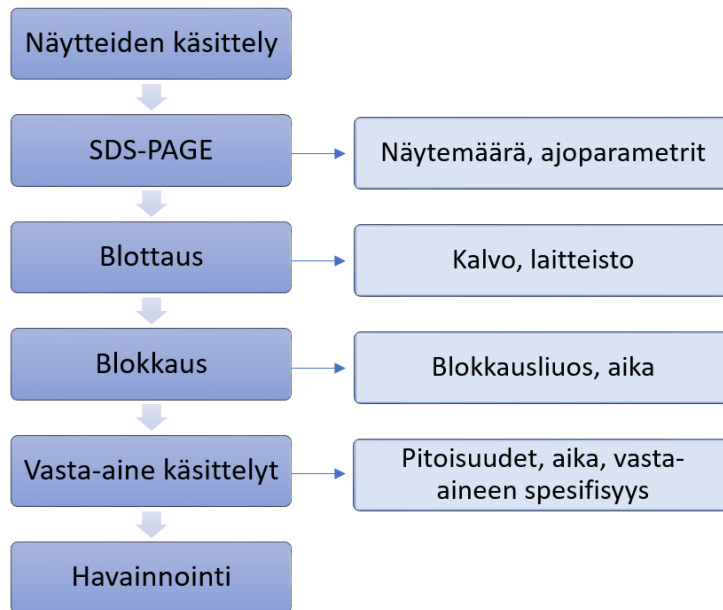
Insinööriyön tavoitteena oli pystyttää Western blot -menetelmä ravitsemusfysiologian tutkijoiden käyttöön ja optimoida menetelmä verenkiertojärjestelmän kudoksista tehtäviin proteiinimäärityksiin. Erityisesti tarkoitus oli tutkia bradykiniinin vaikutusreitteihin liittyviä proteiineja.

Työ liittyy ryhmän aiempiin tutkimuksiin, joissa todettiin rotilla verisuonien reaktiivisuuskokeiden avulla bradykiniinin vaikutusreittien ja -mekanismien muuttuvan ikääntyessä sekä sydän- ja verisuonitauteja sairastaessa ilmeisesti paikallisen vähäisen verisuonen sisäkalvon tulehdustilan seurauksena. Kokeissa käytettiin spontaanisti korkeaverenpainaisia nuoria ja vanhoja rottia (SHR), sekä verrokkieläiminä saman ikäisiä terveitä yksilöitä (WKY). Insinööriyön aineistona käytettiin kyseisen eläintutkimuksen –80 °C:ssa säilytettyjä munuaisnäytteitä.

Näytteistä oli tarkoitus määrittää bradykiniinireseptorien B1 ja B2, ACE1-entsyymin, COX-1- ja COX-2 entsyymin ja AT2-reseptorin tasot. Koska ryhmässä tehdyt fysiologiset mittaukset osoittivat verisuonivasteissa eroja nuorten ja vanhojen eläinten kesken, tavoitteena oli myös vertailla tällä menetelmällä kyseisten proteiinien tasoja nuorten ja vanhojen korkeaverenpaineisten sekä normaalipaineisten koe-eläinten välillä.

### **4 Menetelmät**

Insinööriyön kokeellinen osa aloitettiin pystyttämällä Western blot -menetelmä. Kuvassa 6 on esitetty menetelmän eri vaiheet ja niihin liittyneet tekijät, joita työssä optimoitiin.



Kuva 6. Kaaviokuva Western blot -menetelmän kulusta. Kapeat nuolet osoittavat tässä työssä optimoidut tekijät.

#### 4.1 Koe-eläimet

Työn kudoksenäytteet (n=3) saatiin ryhmässä aiemmin tehdyn eläintutkimuksen rotista. Tutkimuksessa käytettiin spontaanisti (geneettisesti) verenpainetautia sairastavia, spontaanisesti hypertensivisiä rotia, (SHR, Charles River Laboratories) ja normaalipaineisia Wistar-Kyoto rottia (WKY, Charles River Laboratories). Eläinkokeet suoritettiin Suomen eläinkoelautakunnan luvalla (lupnumero: ESAVI/6718/04.10.03/2012), noudattaen EU Direktiiviä 2010/63/EU ja Suomen koe-eläin lakia Act 62/2006s. Eläintutkimus suoritettiin kesän 2015 aikana. Kudoksenäytteet jäähdytettiin välittömästi nestetyypessä niiden keräämisen jälkeen ja ne säilytettiin  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa.

#### 4.2 Näytteiden käsittely

Western blot -menetelmää varten kudoksenäytteet homogenisoitiin, jotta proteiinit saatiin erotetuksi muusta kudoksesta. Munuaisnäytteistä leikattiin jäällä noin kahden millimetrin paksuiset segmentit, jotka homogenisoitiin 1 ml ELISA-puskuria (136 mM NaCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 mM KCl, 4,46 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.001% Tween, pH 7.4). ELISA-puskuri on

fysiologinen puskuri, johon proteiinit liukenevat. Puskuriin lisättiin myös 0,01 % proteaasi-inhibiittoria (Set X, Calbiochem, Merck Millipore), jotta proteolyyttistä hajoamista tapahtuisi mahdollisimman vähän. Näytteet homogenisoitiin Precellys 24 -homogenisaattorilla (Bertin Technologies) ohjelmalla 5500 rpm, 20 sekuntia. Näytteitä pidettiin noin minuutin ajan kuivajäällä ja ohjelma toistettiin. Homogenisoidut näytteet sentrifugoitiin 4 °C:ssa (12 000 g, 15 minuuttia), jolloin kudoksen muut osat kerääntyivät putken pohjalle ja supernatanttiin jäi proteiinit. Supernatantit pakastettiin lyhytaikaiseen säilytykseen -20 °C:ssa.

#### Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Näytteiden kokonaisproteiinipitoisuus mitattiin, jotta proteiineja erotellessa jokaiseen kairoon voitiin pipetoida sama määrä kokonaisproteiinia ja näin saada keskenään vertailtavissa olevia tuloksia. Kokonaisproteiinimääritys suoritettiin kaupallisen testikitin ohjeiden mukaisesti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific). Näytteitä ja standardeja sekä reagenssia pipetoitiin 96-kuoppalevyille 1:20-laimennoksena. Kuoppalevyä sekoitettiin voimakkaasti 30 sekunnin ajan levysekoittajalla ja inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Absorbanssit mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 540 nm. Arvoista vähennettiin puskurin aiheuttama tausta ja näytteiden proteiinipitoisuudet saatiin selville standardisuoran avulla.

#### Näytteiden valmistus geeliajota varten

Näytteet laimennettiin niin, että jokaisen näytteen proteiinipitoisuudeksi tuli 2 µg/µl. Näytteisiin lisättiin 1:2 Laemmlin näytepuskuria, johon oli lisätty 5 % 2-merkaptetaanolia. Näin lopulliseksi proteiinipitoisuudeksi saatiin 1 µg/µl, jolloin kaivoihin pipetoitavaa proteiininimäärää oli helppo vaihdella pipetointilavuutta muuttamalla. Näytteitä denaturoitiin lämpöblokkissa 95 °C:ssa 5 minuutin ajan. Näytteiden annettiin jäähtyä jäällä ja ne pipetoitiin pienempiin eriin, jotka säilöttiin -80 °C:seen.

### 4.3 Western blot -menetelmän pystytys ja optimointi

Menetelmän pystytystä varten tutkimusryhmässä oli käytössä SDS-PAGE-laitteisto, sekä muutamia eri blottaus- ja detektointilaitteistoja. Ryhmässä oli aiemmin käytetty Western blot -menetelmää tiivisliitosproteiineille ja samoja ohjeita pystytettiin käyttämään

osittain hyväksi erityisesti työn alussa, menetelmään tutustuessa. Menetelmässä haluttiin kuitenkin käyttää saatavilla olevaa nopeaa blottauslaitteistoa (Trans Blot Turbo, Bio-Rad) sekä fluoresenssimenetelmään perustuvaa detektointilaitteistoa (Odyssey CLx Imaging System, LI-COR), joka on kemiluminesenssimenetelmää herkempi. Menetelmän pystytyksessä hyödynnettiin myös laitteen valmistajan kehittälemää, fluoresenssimenetelmälle suunniteltua Western blot -ohjetta.

#### 4.3.1 SDS-PAGE

Näytteiden sisältämät proteiinit eroteltiin toisistaan 7,5 % ja 10 % polyakryyliamidigeelien avulla. Geelit valettiin ajoa edeltävänä päivänä liitteen 1 mukaan ja säilöttiin ionivaihdetussa vedessä kostutetuissa käsipapereissa 4 °C:ssa. Näytemäärinä kokeiltiin sekä 20 µg että 35 µg kokonaisproteiinia kaivoa kohden. Ajoparametreinä kokeiltiin taulukon 1 mukaisia jännitteitä ja aikoja.

Taulukko 1. SDS-PAGE:n ajoparametrit.

Kokeilukerta	Konsentroitigeeli	Erotusgeeli
Kokeilu 1	100 V, 10 min	150 V, 45 min
Kokeilu 2	150 V, 10 min	200 V, 30 min

Geelielektroforeesi suoritettiin ajopuskurissa (25 mM Tris, 190 mM glysiini ja 0,1 % SDS) Power Pac Basic -elektroforeesilaitteistolla (Bio-Rad).

#### 4.3.2 Blottaus

Proteiinit siirrettiin geeliltä nitroselluloosakalvolle (Bio-Rad) käyttäen sekä Trans-Blot Turbo -blottauslaitetta (Bio-Rad) että ECL TE77 semi-dry transfer unit -laitetta (GE Healthcare Amersham). Blottauksessa kokeiltiin myös PVDF-FL ja PVDF-P -kalvoja (Merck Millipore Ltd). Geeleistä leikattiin pois konsentroitigeeli sekä näytepuskurin väriaineen muodostama "dye front" geelin alaosa. Geelit, suodatinpaperit (Whatman 3 MM Chr, GE Healthcare) ja nitroselluloosakalvo tasapainotettiin Towbin blottauspuskurissa (25 mM Tris, 192 mM glysiini, 20 % metanoli) ja pakattiin blottauslaitteistoon. Lopuksi ilmakuplat rullattiin varovaisesti pois. Taulukossa 2 on esitetty käytetyt blottausohjelmat.

Taulukko 2. Käytetyt blottausohjelmat ja -laitteistot.

Laite	Ohjelma	Aika
Trans-Blot Turbo	Mixed MW, 25 V, 2,5 A	7 min
Trans-Blot Turbo	Standard SD, 25 V, 1 A	30 min
Trans-Blot Turbo	Standard SD, 25 V, 1 A	40 min
ECL TE77	Max 30 V, 95 mA	1,5 h
ECL TE77	Max 30 V, 95 mA	2 h
ECL TE77	Max 30 V, 95 mA	2,5 h

Blottauksen onnistuminen tarkistettiin värjäämällä geelit Coomassie blue -väriaineella, jolloin geeliin jääneet proteiinit värjäytyivät sinisiksi. Blottaus pyrittiin optimoimaan niin, ettei geeliin jäisi yhtään proteiinia.

#### 4.3.3 Blokkaukset

Blottauksen jälkeen kalvot leikattiin molekyyliomerkkejä (BlueStep™ Protein MW Marker, Broad Range, Prestained, Amresco) apuna käyttäen niin, että kohdeproteiini ja latauskontrolliproteiini jäivät eri kalvopaloihin. Kalvopalat laitettiin omiin 50 ml Falcon-putkiinsa proteiiniapuoli ylöspäin. Kalvot pestiin PBS-pesuliuoksella (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ja 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ja niitä inkuboitiin blokkaukspuskurissa (50 % PBS ja 50 % Odyssey Blocking Buffer (PBS), LI-COR) huoneenlämmössä kahden tunnin ajan. Käytetty blokkaukspuskuri säästettiin ja samaa puskuria voitiin käyttää muutaman kerran uudestaan.

#### 4.3.4 Vasta-aineet

##### Primaarivasta-ainekäsittely

Primaarivasta-ainekäsittelyssä jokaisen vasta-aineen optimaalinen laimennossuhde määritettiin erikseen. Toimivan laimennoksen etsimisessä lähdettiin liikkeelle valmistajan ilmoittamasta suosituksesta sekä tätä laimeammasta pitoisuudesta. Primaarivasta-aineet laimennettiin puskuriin, joka sisälsi 1:2 blokkaukspuskuria ja PBS-T-puskuria (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ja 0,1 % Tween). Latauskontrollina käytettiin β-aktiinia, joka ekspressoituu tasaisesti soluissa. Taulukossa 3 on esitetty kaikki käytetyt vasta-aineet ja kokeillut laimennokset.

Taulukko 3. Käytetyt primaari- ja sekundaarivasta-aineet ja kokeillut laimennokset.

Primaarivasta-aine	Tuotenumero	Valmistaja	Laimennokset	Sekundaarivasta-aine	Laimennokset
$\beta$ -actin mouse monoclonal IgG	3700S	Cell Signaling Technology	1:1000, 1:2000, 1:3000	IRDye680LT goat anti-mouse	1:10 000, 1:20 000
ACE1 mouse monoclonal IgG	MA1-25290	Thermo Fischer	1:33, 1:50, 1:100, 1:500	IRDye680LT goat anti-mouse	1:3000, 1:8000, 1:10 000
BR1 goat polyclonal IgG	SC-15045	Santa Cruz Biotechnology	1:1000, 1:2000, 1:3000	IRDye680LT donkey anti-goat	1:10 000
BR2 rabbit polyclonal IgG	720288	Thermo Fischer	1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000	IRDye800CW goat anti-rabbit	1:10 000, 1:20 000
AT2 rabbit polyclonal IgG	SC-9040	Santa Cruz Biotechnology	1:200, 1:500	IRDye800CW goat anti-rabbit	1:20 000
COX-1 mouse monoclonal IgG	35-8100	Thermo Fischer	1:200, 1:250, 1:500, 1:1000	IRDye680LT goat anti-mouse	1:3000, 1:10 000, 1:20 000
COX-2 rabbit polyclonal IgG	SC-7951	Santa Cruz Biotechnology	1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000	IRDye800CW goat anti-rabbit	1:10 000, 1:20 000
COX-2 goat polyclonal IgG	SC-1747	Santa Cruz Biotechnology	1:200, 1:500	IRDye680LT donkey anti-goat	1:10 000
COX-2 rabbit polyclonal IgG	PA5-16817	Thermo Fischer	1:500, 1:2000, 1:3000	IRDye800CW goat anti-rabbit	1:10 000, 1:20 000

Primaarivasta-aineiden inkubointiaikoina kokeiltiin kahta tuntia huoneenlämmössä, sekä yön yli 4 °C:ssa.

#### Sekundaarivasta-ainekäsittely

Ennen sekundaarivasta-ainekäsittelyä kalvot pestiin PBS-T-puskurilla. Sekundaarivasta-aineet laimennettiin puskuriiin, joka sisälsi 1:2 laimennettua blokkaukspuskuria ja PBS-T-puskuria sekä 0,01 % SDS. Kalvoja inkuboitiin sekundaarivasta-aineissa huoneenlämmössä 60 min. Kaikki sekundaarivasta-aineet olivat LI-COR:n fluoresoivalla leimalla konjugoituja vasta-aineita, jotka olivat valmistajan suosittelemia käytettäväksi LI-COR:n Odyssey-detektointilaitteiden kanssa. Kalvot pidettiin valolta suojattuna koko sekundaarivasta-ainekäsittelyn ajan.



#### 4.3.5 Detektointi

Proteiinit detektoitiin kalvoilta Odyssey CLx Infrared Imaging System -laitteella (LI-COR). Kalvot kuvattiin samanaikaisesti 700 nm:n ja 800 nm:n aallonpituuskanavilla, jolloin saamaan kuvaan saatiin näkyviin punaisena näkyvän IRDye680LT-vasta-aineen ja vihreänä näkyvän IRDye800CW-vasta-aineen leimat.

Kuvaamisen jälkeen näytteiden kohdeproteiinitasoja voitiin verrata mittaamalla jokaisen proteiinibändin intensiteetti Image Studio -ohjelman avulla (LI-COR). Proteiinibändin ympärille piirrettiin alue, jonka sisältä ohjelma vähensi automaattisesti taustan aiheuttaman intensiteetin ja tuloksena saatiin bändin intensiteetti. Eri näytteiden intensiteettejä toisiinsa vertaamalla pystyttiin saamaan semikvantitatiivinen tulos siitä, missä näytteistä kyseinen proteiini ekspressoituu eniten. Proteiinibändin paksuus ja intensiteetin suuruus kasvavat suhteessa proteiinimäärään näytteessä.

#### 4.3.6 Vasta-aineiden poistaminen kalvolta

Kalvojen detektoimisen jälkeen niistä voidaan poistaa primaari- ja sekundaarivasta-aineet (stripping), jotta samoista kalvoista pystytään tutkimaan myös muita proteiineja. Vasta-aineet poistettiin itsevalmistetun strippauspuskurin avulla (25 mM glysiini, 1 % SDS, pH 2,0). Kalvoja inkuboitiin puskurissa 30 minuutin ajan vaihtamalla puskurin 15 minuutin jälkeen tuoreeseen puskurin. Käsittelyn jälkeen kalvot pestiin PBS-T- ja PBS-puskurilla ja tarvittaessa kalvot detektoitiin vasta-aineiden irtoamisen tarkastamiseksi. Vasta-aineiden sidosten vahvuudesta riippuen käsittely toistettiin. Pitkäkestoisessa käsittelyssä riskinä on kuitenkin myös kohdeproteiinien irtoaminen kalvolta. Käsittelyn jälkeen kalvot blokattiin uudelleen, sillä käsittely irrottaa kalvolta myös blokkausproteiineja. Kalvoja blokattiin tunnin ajan, jonka jälkeen suoritettiin uuden kohdeproteiinin primaari- ja sekundaarivasta-aine käsittelyt tavallisen ohjeen mukaan. Työssä optimoidut Western blot -menetelmän ohjeet ovat esitetty liitteessä 2.

#### 4.3.7 Tilastollinen tulosten käsittely

Tulosten käsittelyä varten Western blot -kuvista mitatut proteiinibändien intensiteetit jaettiin niitä vastaavien latauskontrollien intensiteeteillä, jotta tuloksia voitiin vertailla luotettavasti toisiinsa. Intensiteeteistä piirrettiin GraphPad Prism 5 -ohjelmalla kuvaajat, joita

analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) ja Tukeyn jatkotestillä. Tilastollisilla analyyseillä tulkittiin ryhmien keskiarvojen tilastollisesti merkittäviä eroja ja verrattiin eroja toisiinsa. Eroja pidettiin tilastollisesti merkittävänä P-arvon ollessa alle 0,05.

## 5 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 5.1 Western blot -menetelmän optimointi

Western blot -menetelmä saatiin pystytetyksi ja optimoiduksi tavoitteiden mukaan. Sillä voitiin tarkastella luotettavasti näytteiden ACE1-entsyymien, COX-1-entsyymien, B1- ja B2-reseptorien sekä AT2-reseptorien ekspressiotasoja. Optimointia vaativat vaiheet olivat SDS-PAGE, blottaus sekä vasta-ainekäsittelyt.

#### SDS-PAGE

Sopivimmat ajoparametrit SDS-PAGE:ssa todettiin olevan konsentroitigeelille 150 V, 10 min ja erotusgeelille 200 V, 30 min. Jännite oli tarpeeksi suuri, jotta näytteet ajautuivat kohtuullisessa ajassa ja suorana viivana. Liian suuri jännite ajaa näytteet kaareviksi geelille, jolloin tulosten tulkinta hankaloituu.

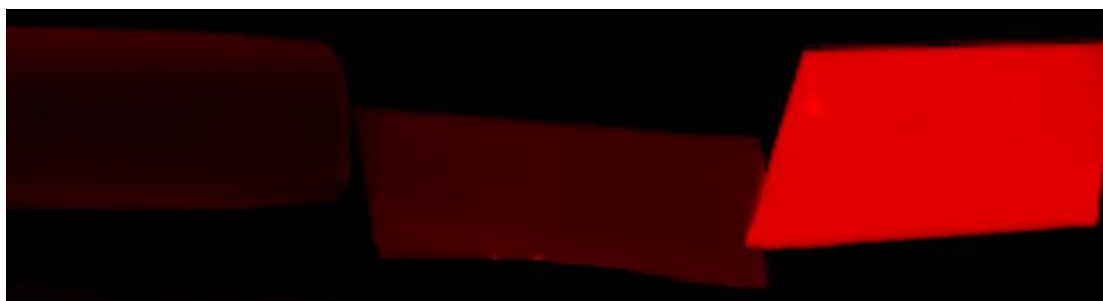
Sopiva näytemäärä oli 20 µg. Määrä oli riittävä jokaisen tutkittavan proteiinin havainnoimiseen kalvolla eikä latauskontrollin määrä ollut liian runsas. Käytössä olleen molekyylipainostandardin (BlueStep™ Protein MW Marker, Broad Range, Prestained, Amresco) määrää vähennettiin valmistajan ohjeen mukaisesta 10 µl:sta 0,5 µl:aan. Useimpien sinisellä värillä värjättyjen molekyylipainostandardien väriaineet fluoresoivat 680 nm:n aallonpituudella. Detektointimenetelmän herkkyyden takia jo pieni määrä standardia fluoresoi riittävästi. Jos standardia oli kalvolla liikaa, oli eri molekyylikoon bändeistä vaikea saada selvää. Näin tapahtui erityisesti, jos kohdeproteiinin taso oli pieni ja kirkkautta jouduttiin säätämään suureksi, jotta proteiini näkyi kalvolla.

## Blottaus

Blottaus saatiin onnistumaan ECL TE77 -laitteella. Parhain tulos saatiin 2,5 tunnin ohjelmalla 95 mA:n sähkövirrassa. Blottauksessa oli huomioitava, että laitteen elektrodit tuli kostuttaa ennen ajoa blottauspuskurilla ja lisäksi tuli varmistaa, että suodatinpaperit olivat tarpeeksi kosteita. Mikäli elektrodit ja suodatinpaperit olivat liian kuivia, jännite nousi laitteen sallimaa maksimaalista jännitettä (30 V) korkeammaksi, jolloin laite pysäytti blottausten. Lisäksi paras blottaustulos saatiin, kun suodatinpaperit ja nitroselluloosakalvo oli leikattu täsmälleen geelien kokoisiksi. Jos suodatinpaperit olivat liian isoja, osa sähkövirrasta kulkeutui geelin ohi eikä blottaus ollut tehokasta. Myös ECL TE77 -laitteen blottauksen jälkeen geeleihin jäi hieman proteiinia, mutta kohdeproteiinit saatiin kuitenkin havainnoiduksi kalvoilta hyvin, joten blottausta voitiin pitää riittävän tehokkaana.

Blottausta ei saatu onnistumaan Trans-Blot Turbo -laitteella. Laitteen etu olisi ollut nopea 30 minuutin blottaus Standard SD -ohjelmalla, mutta blottauksen aikana huomattiin, ettei virta noussut haluttuun 1 A:iin. Virta oli suurimmillaan 0,3 A ja tästä syystä kaikki proteiinit eivät siirtyneet geeliltä kalvolle. Valmistaja suosittelee laitetta käytettäväksi kaupallisten kittien kanssa, joihin kuuluu valmiiksi valettu geeli, kalvo, suodatinpaperit ja blottauspuskuri. Onnistunut blottaus omilla materiaaleilla vaatisi erilaisten puskuriliuosten ja suodatinpaperien kokeilua. Myös geelin ominaisuudet voivat vaikuttaa blottausten tehokkuuteen.

PVDF-P-, PVDF-FL- ja nitroselluloosakalvojen toimivuus fluoresenssimenetelmällä detektoitaessa testattiin. Testin tulokset on esitetty kuvassa 7. Tulosten perusteella päätettiin valita nitroselluloosakalvo lopullisiin kokeisiin, koska se aiheutti vähiten taustafluoresenssia.



Kuva 7. Kalvojen aiheuttamat taustafluoresenssit. Nitroselluloosakalvo (vas.), PVDF-FL (kesk.) ja PVDF-P (oik.).

## Blokkaus

Kaupallinen blokkauслиuos (Odyssey Blocking Buffer (PBS), LI-COR) toimi blokkaukseen hyvin ja myös inkubointiaika 1,5–2 h todettiin toimivaksi. Käytetty blokkauслиuos säästettiin ja samaa liuosta käytettiin uudelleen blokkaukseen varten valmistajan ohjeiden mukaan. Viidennen käyttökerran jälkeen huomattiin kalvoissa olevan taustaa, jolloin kalvossa oli useissa kohdissa pieniä fluoresoivia pisteitä, mikä kertoi blokkauksen epäonnistumisesta. Kaikki kalvon huokokset eivät olleet täyttyneet blokkauksproteiineilla, jolloin vastaainetta sitoutui niihin ja tämä näkyi fluoresoivina pisteinä. Tausta poistui tuoreeseen blokkauслиuokseen vaihtamalla.

## Vasta-aineet

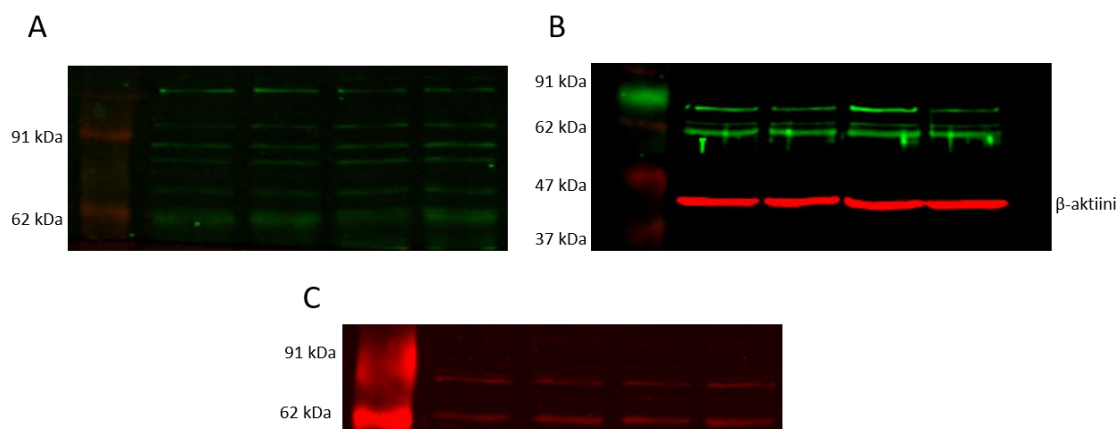
Vasta-ainekäsittelyiden optimoinnissa pyrittiin lopputulokseen, jossa vasta-aine oli sitoutunut spesifisesti vain kohdeproteiiniin. Tähän vaikuttavat käsittelyaika ja -lämpötila sekä vasta-aineen pitoisuus. Vasta-aineiden korkean hinnan takia pyrittiin löytämään myös mahdollisimman laimea toimiva pitoisuus. Lisäksi valmiita laimennoksia pystyttiin käyttämään uudelleen lukuisia kertoja vasta-aineesta riippuen. Käytettyjen vasta-aineiden optimoidut pitoisuudet on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Optimoidut vasta-ainelaimennokset.

Kohdeproteiini	Primaarivasta-aine laimennos	Sekundaarivasta-aine laimennos
$\beta$ -actin	1:3000	1:20 000
ACE1	1:50	1:10 000
BR1	1:1000	1:10 000
BR2	1:2000	1:20 000
AT2	1:200	1:20 000
COX-1	1:250	1:10 000
COX-2	-	-

Kaikille primaarivasta-aineille toimiva käsittelyaika oli yön yli 4 °C:ssa. Sekundaarivasta-aineille sopiva inkubointiaika oli 1 h huonelämpötilassa. Ainoa proteiini, jolle ei löydetty luotettavaa primaarivasta-ainetta, oli COX-2-entsyymi. Käytössä oli kolmea eri vastaainetta: rabbit polyclonal IgG #PA5-16817 (Thermo Fischer), rabbit polyclonal IgG #SC-7951 (Santa Cruz Biotechnology) ja goat polyclonal IgG #SC-1747 (Santa Cruz Biotechnology), joista jokainen sitoutui epäspesifisesti useaan molekyyliä painoltaan erikokoiseen proteiinibändiin. Käsittelyaikojen lyhentäminen tai vasta-ainepitoisuuksien muuttaminen

eivät vaikuttaneet tuloksiin. COX-2-entsyymien havainnoimisessa Western blot -menetelmällä on todettu myös muissa tutkimuksissa olevan mahdollisuus väärintulkintaan primaarivasta-aineiden spesifisyyden suuresta vaihtelusta johtuen (Liu ym. 2006: 330, 334). Näytteiden COX-2-entsyymi voi olla myös hajonnut tai proteolyttisesti muokkautunut, jolloin vasta-aine sitoutuu useaan erikokoiseen proteiinibändiin. COX-2-entsyymien oletettu molekyylipaino on 70–72 kDa. COX-2-entsyymien eri vasta-aineilla tehdyt Western blot -työt on esitetty kuvassa 8.

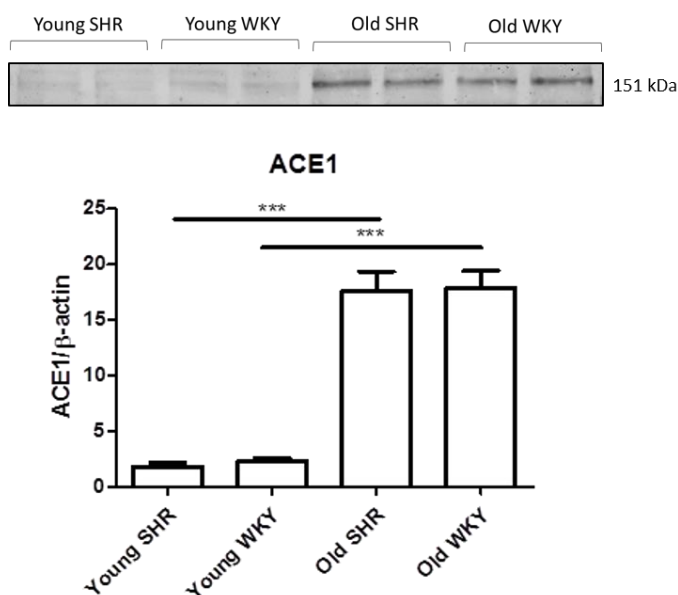


Kuva 8. Western blot -kuvat COX-2-entsyymien vasta-aineilla. Valmistajien ilmoittamat oletetut molekyylipainot ovat 70–72 kDa. A. COX-2 rabbit polyclonal IgG, Thermo Fischer. B. COX-2 rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology (vihr.), β-aktiini (pun.). C. COX-2 goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology.

ACE1-entsyymien ilmentyminen kalvoilla oli muihin proteiineihin verrattuna heikkoa, joten totaalinäyttemäärää kasvatettiin 35 µg/kaivo. Näyttemäärän korotus ei vaikuttanut ACE1-entyymien havainnointiin kalvolla, joten syyksi pääteltiin vasta-aineen heikko sitoutuminen ja proteiinin vähäinen määrä. Tulokset olivat kuitenkin luettavissa, joten toista vasta-ainetta ei ollut tarvetta kokeilla.

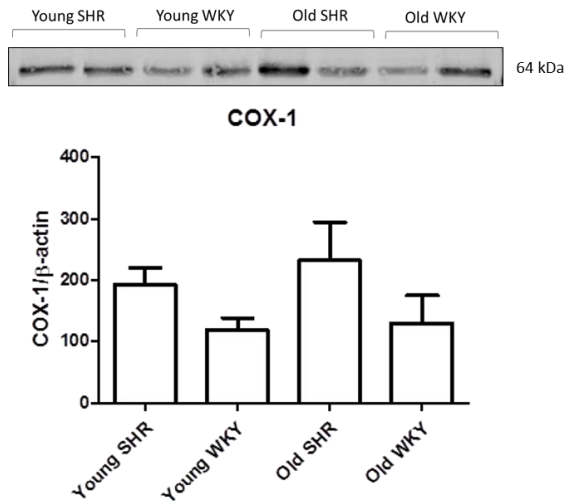
## 5.2 Proteiinitasot

Western blot -tuloksista verrattiin korkeaverenpaineisten nuorien ja vanhojen sekä normaalipaineisten nuorien ja vanhojen rottien välisiä proteiinitasoja toisiinsa. Kaikkien proteiinien intensiteetit jaettiin niitä vastaavien latauskontrollien intensiteeteillä. Western blot -kuvat ja niistä mitatut intensiteetit on esitetty kuvissa 9–13. Tuloksia vertailtiin ryhmien välillä keskenään yksisuuntaisen varianssianalyysin (ANOVA) ja Tukeyn testin avulla.



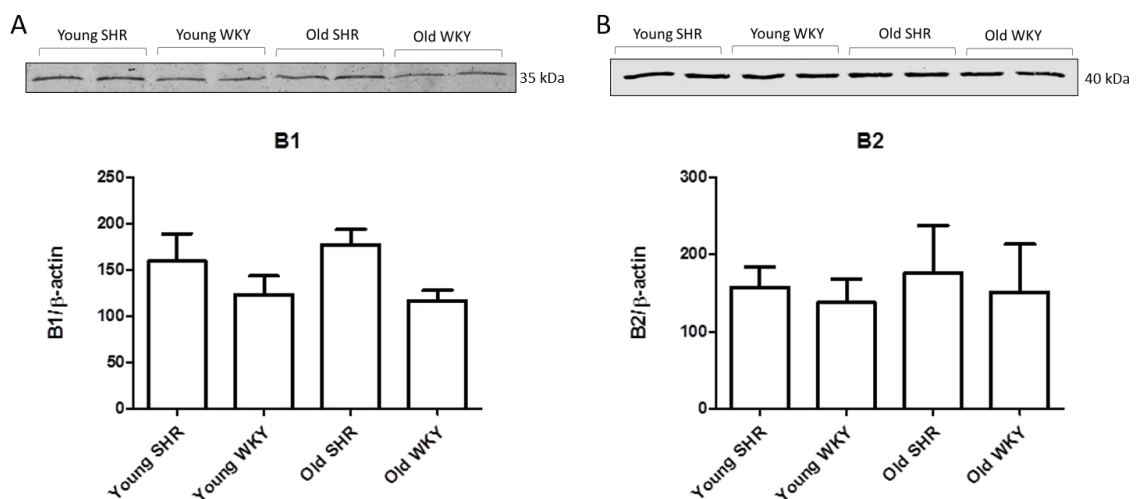
Kuva 9. Angiotensiiniä konvertoivan entsyymin 1 (ACE1) tasot. Spontaanisti korkeaverenpaineisilla (SHR) ja normaaliverenpaineisilla rotilla (WKY) oli nuorten ja vanhojen eläinten välillä ACE1-tasojen keskiarvoilla tilastollisesti merkitseviä eroja (\*\* $P < 0,001$ ),  $n=3$ .

Kuvassa on 9 esitetty ACE1-entsyymin Western blot -kuva ja intensiteettitasot. Sekä spontaanisti korkeaverenpaineisilla rotilla että normaaliverenpaineisilla vanhoilla rotilla ACE1-entsyymin tasot olivat nuoria rottia korkeammat ( $P < 0,001$ ). Tulosten mukaan ACE1-entsyymin taso kasvaa ikääntyessä, mutta korkea verenpaine ei ollut selitettävissä ACE1-entsyymin ilmentymistasolla, sillä vanhoilla korkea- ja normaaliverenpaineisilla eläimillä tasot olivat hyvin tasaiset. Nuorilla korkea verenpaine ei aiheuttanut ACE1-entsyymin tason nousua. Myös muissa tutkimuksissa on havaittu, että ACE1-entsyymin sekä sen konvertoiman Ang II -peptidin tasot kasvavat ikääntyessä (Najjar ym. 2005: 459; Yoon ym. 2016: 7). Ikääntymiseen on todettu liittyvän muun muassa verisuonien seinämien paksuuntumista ja jäykistymistä, solujen proliferaatiota sekä endoteelin toiminnan heikentymistä. Nämä tekijät voivat altistaa kohonneen verenpaineen syntyyn sekä sydän- ja verisuonisairauksille. Muun muassa ACE1-entsyymin konvertoima Ang II -peptidi aiheuttaa näitä vaikutuksia AT1-reseptorin välityksellä. (Najjar ym. 2005: 459; Fyhrquist & Saijonmaa 2008: 231.)



Kuva 10. Syklo-oksigenaasi 1 -entsyymin Western blot -kuva ja intensiteettitasot, n=3.

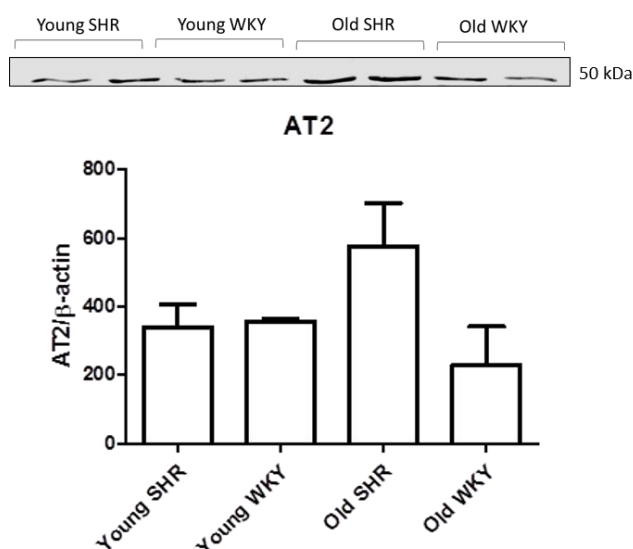
Kuvassa 10 on esitetty COX-1-entsyymin Western blot -kuva ja intensiteettitasot. Tulosten mukaan korkeaverenpaineisilla rotilla COX-1-entsyymin tasot näyttäisivät olevan hieman korkeammat kuin normaaliverenpaineisilla rotilla. Tulokset vastasivat ryhmän aiemmassa tutkimuksessa samojen eläinten aortasta tehtyjä mRNA-määrytyksiä qPCR-menetelmällä. mRNA:n suhteelliset tasot olivat korkeaverenpaineisilla eläimillä hieman korkeammat kuin normaalipaineisilla eläimillä (Siltari ym. 2017). COX-1-entsyymi on jatkuvasti esiintyvä entsyymi, joka tuottaa pieniä määriä prostanoidia eri kudoksiin. Tuloksista nähdään, että COX-1-entsyymin ilmentyminen kasvaa hieman korkeaverenpaineisilla, oletettavasti verenpaineen aiheuttaman lievän tulehdustilan seurauksena.



Kuva 11. Bradykiniinireseptorien B1 (A) ja B2 (B) Western blot -kuvat ja intensiteettitasot, n=3.

Kuvassa 11 on esitetty B1- ja B2-reseptorien Western blot -kuvat ja niiden intensiteettitasot. Korkeaverenpaineisilla rotilla B1-reseptorien tasot vaikuttivat olevan hieman korkeammat kuin normaaliverenpaineisilla rotilla. Korkeaverenpaineisten nuorten ja vanhojen eläinten välillä ei kuitenkaan ollut eroa B1-reseptorien tasoissa. B2-reseptorien määrä oli tasainen kaikissa tutkittavissa ryhmissä. B2-reseptorien tasojen vaihteluväli oli kuitenkin vanhoilla eläimillä ryhmien sisällä suurta.

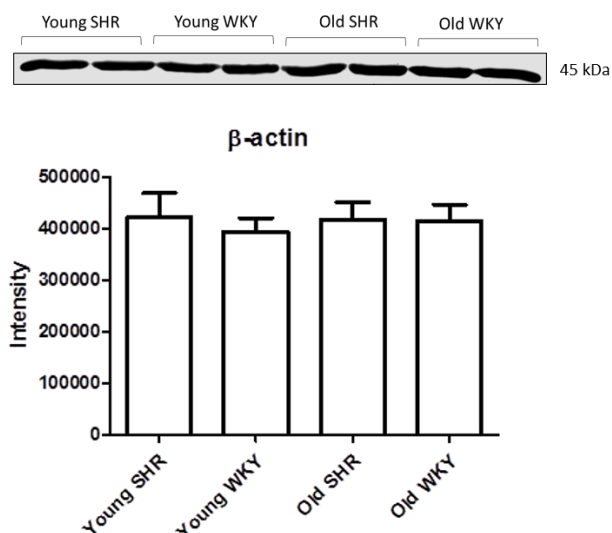
Bradykiniinin vaikutukset välittyvät tulehduksessa ja kudsvauriossa B1-reseptorin kautta. B1-reseptorien määrä myös indusoituu tulehduksessa. B2-reseptorien tiedetään ilmentyvän elimistön normaalitilassa tasaisesti. Tulokset tukivat näitä hypoteesejä. Aiemmissä tutkimuksissa iän on havaittu vaikuttavan bradykiniinireseptorien tasoihin. B1-reseptorien määrän on havaittu nousevan ikääntyessä, kun taas B2-reseptorien määrät ovat laskeneet. (Kintsurashvili ym. 2004: 202; Nurmi ym. 2011: 13.) Tämän työn perusteella reseptorien määrissä ei kuitenkaan havaittu ikääntymiseen liittyviä muutoksia.



Kuva 12. Angiotensinogeenireseptorin AT2 Western blot -kuva ja intensiteettitasot, (n=3).

Kuvassa 12 on esitetty AT2-reseptorin Western blot -kuva ja intensiteettitasot. Vanhoilla korkeaverenpaineisilla eläimillä AT2-reseptorin taso oli korkeampi kuin muilla ryhmillä. Vanhoilla ja nuorilla normaalipaineisilla sekä nuorilla korkeaverenpaineisilla tasot olivat tasaiset. Tulokset tukivat aiemmin todettuja tuloksia, sillä AT2-reseptorin tasot ovat suuret kardiovaskulaaristen sairauksien yhteydessä, jolloin AT2-reseptorin tiedetään toimivan AT1-reseptorin vastavaikuttajana ja tasapainottavan AT1-reseptorin kautta välittyviä verisuonia supistavia ja elimistöä rasittavia vaikutuksia. (Carey & Padia 2013: 528.)





Kuva 13. Latauskontrollina käytetyn  $\beta$ -aktiinin Western blot -kuva ja mitatut intensiteetit, (n=3).

Kuvassa 13 on esitetty  $\beta$ -aktiinin intensiteettitasot. Kuvasta nähdään, että latauskontrollin tasot ovat tasaiset, joten näytteitä on pipetoitu kaivoihin yhtäläiset määrät ja ne sisälsivät yhtä paljon kokonaisproteiinia.

## 6 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli pystyttää ja optimoida Western blot -menetelmä, jolla voitiin tutkia verenpaineen säätelyyn liittyviä reseptoreita ja entsyymeitä. Tässä työssä keskityttiin erityisesti bradykiniinin vaikutusreitteihin liittyviin reseptoreihin ja entsyymeihin. Lisäksi työssä oli tarkoitus verrata näiden proteiinien tasoja toisiinsa nuorilla ja vanhoilla korkea-verenpaineisilla eläimillä sekä terveillä saman ikäisillä yksilöillä ja näin saada lisää tietoa bradykiniinin vaikutusreiteistä.

Western blot -menetelmä saatiin pystytetyksi tavoitteiden mukaan. Menetelmällä havainnointiin luotettavasti ACE1-entsyymien, COX-1-entsyymien, B1- ja B2-reseptorin ja AT2-reseptorin ilmentymistasoja munuaisnäytteistä. COX-2-entsyymien Western blot -tulokset eivät olleet luotettavia oletettavasti vasta-aineiden epäspesifisyydestä tai proteiinin hajoamisesta johtuen. Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu bradykiniinin vaikuttavan erityisesti COX-2-entsyymien tuottamien prostanoidien kautta verisuonia supistavasti (More ym. 2014: 215), joten COX-2-entsyymien tasot olisi ollut mielekästä selvittää.

Ryhmän aiemmissa sekä muissa tutkimuksissa on osoitettu, että bradykiniinin verisuonia laajentavat ominaisuudet ovat ikään sidottuja (Mantelli ym. 1995: 72–73; Siltari ym. 2016: 52–53). Vanhoilla eläimillä bradykiniinireseptorien tasoissa on havaittu muutoksia; B1-reseptorien määrä nousee ikääntyessä, kun taas B2-reseptorien määrää laskee. (Kint-surashvili ym. 2004: 202). Tämän työn perusteella reseptorien määrissä ei kuitenkaan havaittu ikääntymiseen liittyviä muutoksia. B1-reseptorien tasot olivat korkeat sekä nuorilla että vanhoilla korkeaverenpaineisilla eläimillä. Tämän selittänee korkean verenpaineen aiheuttama lievä tulehdustila verisuonien sisäkalvolla. B2-reseptorien määrä oli samanlainen kaikissa tutkittavissa ryhmissä. COX-1-entsyymien korkeat tasot korkeaverenpaineisilla eläimillä tukevat tietoa, että bradykiniinin supistavat vaikutukset välittyvät COX-entsyymien tuottamien prostanoidien kautta. Ryhmän aiemmin tekemissä verisuonten reaktiivisuussmittauksissa havaittiin, että bradykiniini aiheutti verisuonten supistumisen korkeaverenpaineisilla eläimillä ja lievemmän supistumisen normaalipaineisilla eläimillä. Bradykiniinivälitteinen verisuonten supistuminen poistui estämällä COX-entsyymien toiminta. (Siltari ym. 2017.) ACE1-entsyymien tasot olivat kaikilla vanhoilla eläimillä suuret, kun taas nuorilla eläimillä tasot olivat todella matalat. Tulosten mukaan ACE1-entsyymien taso nousee ikääntyessä, mutta korkean verenpaineen synty ei ole selitettävissä yksiselitteisesti ACE1-entsyymien tasolla, koska myös vanhoilla normaalipaineisilla eläimillä proteiinitaso oli korkea.

Tulosten tilastollinen luotettavuus olisi parantunut, mikäli tutkittavien yksilöiden ja kudosten lukumäärä olisi ollut suurempi. Tutkimuksessa käytettyjen yksilöiden määrällä ( $n=3$ ) saatiin kyllä suuntaa antavia tuloksia, mutta tulokset olisivat olleet varmempia suuremmalla aineistolla. Luottavuuteen vaikutti myös kahden samalla tavalla käsitellyn ja samaan aikaan blotatun kalvon intensiteettitasojen erot. SDS-PAGE oli mahdollista suorittaa kahdelle geelille samanaikaisesti, joten myös kalvoja oli yhdellä suorituskerralla kaksi. Intensiteettitasot saattoivat olla moninkertaisia toisessa kalvossa, mutta kuitenkin ryhmien väliset erot olivat samassa suhteessa. Kun kahden eri kalvon tuloksia käsiteltiin yhdessä, hajonta kasvoi, mikä vaikutti osaltaan tulosten luotettavuuteen. Intensiteettitasojen erot voivat johtua vasta-aineiden sitoutumisesta. Runsaampi määrä vasta-aineliuoksia olisi voinut antaa tasaisemman tuloksen, sillä kalvot olisivat olleet paremmin liuoksen peitossa.

Tämän työn tulokset antavat aiheutta tulevaisuudessa selvittää, onko vastaavia eroja nähtävissä muissakin kudoksissa kuin munuaisissa, kuten esimerkiksi sydämessä ja verisuonissa. Jatkotutkimuksissa COX-2-entsyymien tasojen selvittämiseksi tulisi käyttää

kaupallista COX-2-entsyymiä kontrollinäytteenä varmistamaan vasta-aineen sitoutuminen oikeaan proteiiniin. Lisäksi uusia primaarivasta-aineita tulisi kokeilla. Tässä työssä käytetyt COX-entsyymien primaarivasta-aineet olivat polyklonaalisia, joten jatkotutkimuksessa tulisi kokeilla monoklonaalisia vasta-aineita ja mahdollisesti eri eläimissä tuotettuja vasta-aineita.

Western blot -menetelmään sisältyy useita vaiheita, jotka ovat tärkeitä onnistuneiden tulosten saamiseksi. Menetelmän suorittaminen vie kaksi päivää, ja menetelmää pystyttäessä toimimattoman vaiheen selvittely voi olla verrattain työlästä. Toimiessaan menetelmä on hyödyllinen erityisesti käytettäessä muiden menetelmien rinnalla. Proteiinitasoja vertaamalla ja korreloimalla jatkotutkimuksissa kvantitatiivisen PCR:n tuloksiin, on mahdollista saada arvokasta lisätietoa tutkittavana olevien reseptorien ja entsyymien muutoksista ja selittää fysiologisia verenpaineen ja verisuonitoiminnan eroja ryhmien välillä.

Tälle työlle annetut tavoitteet saavutettiin. Western blot -menetelmä saatiin pystytetyksi ja haluttujen proteiinien tasoja voitiin verrata toisiinsa. Tässä työssä optimoitua menetelmää voidaan hyödyntää suoraan ryhmän muissa tutkimuksissa, ja näin voidaan säästää aikaa tutkimuksesta. Eri laitteita ja uusia vasta-aineita käytettäessä tulee niiden käyttö kuitenkin aina optimoida menetelmään sopivaksi.

## Lähteet

Babe, K. & Serafin, W. 1996. Histamine, bradykinin and their antagonists. Teoksessa Gilman, A., Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P. & Ruddon, R. (eds.). Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 9th edition. New York: McGraw-Hill.

Briand, S., Bernier, S. & Guillemette, G. 1996. Calcium-Calmodulin Plays a Major Role in Bradykinin-Induced Arachidonic Acid Release by Bovine Aortic Endothelial Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol. 63, s. 292–301.

Carey, R. & Padia, S. 2013. Role of angiotensin AT2 receptors in natriuresis: Intrarenal mechanism and therapeutic potential. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Vol. 40, s. 527–534.

Cheitlin, Melvin. 2003. Cardiovascular Physiology –Changes With Aging. *The American Journal of Geriatric Cardiology*. Vol. 12, s. 9–13.

Curtis, M., Hoffman, B., Page, C., Sutter, M. & Walker M. 1997. *Integrated Pharmacology*. London: Mosby.

Erol, K., Sirmagul, B., Kilic, F., Yigitaslan, S. & Dogan, A. 2012. The role of inflammation and COX-derived prostanoids in the effects of bradykinin on isolated rat aorta and urinary bladder. *Inflammation*. Vol. 35, s. 420–428.

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

Fasciolo, J., Vargas, L., Lama, M. & Nolly, H. 1990. Bradykinin-induced vasoconstriction of rat mesenteric arteries precontracted with noradrenaline. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 101, s. 344–348.

Fyhrquist, F. & Saijonmaa, O. 2008. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine*. Vol. 264, s. 224–236.

Galva, C., Gatto, C. & Milanick, M. 2012. Soymilk: An effective and inexpensive blocking agent for immunoblotting. *Analytical Biochemistry*. Vol. 426, s. 22–23.

Garrison, J. & Jackson, E. 1996. Renin and angiotensin. Teoksessa Gilman, A., Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P. & Ruddon, R. (eds.). Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 9th edition. New York: McGraw-Hill.

Hecquet, C., Biyashev, D., Tan, F. & Erdős, E. 2006. Positive cooperativity between the thrombin and bradykinin B2 receptors enhances arachidonic acid release. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. Vol. 290, s. 948–958.

Hilal-Dandan, R. 2011. Renin and angiotensin. Teoksessa Brunton, L., Chabner, B. & Knollmann, B. (eds.). Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th edition. New York: McGraw-Hill.

Hypertension. 2017. Verkkodokumentti. World Heart Federation. <<http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/cardiovascular-disease-risk-factors/hypertension/>>. Luettu 8.4.2017.

IRDye Infrared Dyes. 2010. Verkkodokumentti. LI-COR. <<https://www.licor.com/documents/eukougpb4lxjupcds7pqdjyom13incs>>. Luettu 4.4.2017.

Kennedy, C., Proulx, P. & Hébert, R. 1996. Role of PLA2, PLC, and PLD in bradykinin-induced release of arachidonic acid in MDCK cells. *The American Journal of Physiology*. Vol. 271, s. 1064–1072.

Kintsurashvili, K., Duka, A., Ignjacev, I., Pattakos, G., Gavras, I. & Gavras, H. 2005. Age-related changes of bradykinin B1 and B2 receptors in rat heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. Vol. 289, s. 202–205.

Liu, Y., Kardosh, A., Cooc, J. & Schöntal, A. 2006. Potential Misidentification of Cyclooxygenase-2 by Western Blot Analysis and Prevention Through the Inclusion of Appropriate Controls. *Molecular Biotechnology*. Vol. 34, s. 329–335.

Mantelli, L., Amerini, S. & Ledda, F. 1995. Bradykinin-induced vasodilation is changed to a vasoconstrictor response in vessels of aged normotensive and hypertensive rats. *Inflammation Research*. Vol. 44, s. 70–73.

Moilanen, Eeva & Nieminen, Riina. 2014. Eikosanoidit. Teoksessa Pelkonen, Olavi & Ruskoaho, Heikki (toim.). *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Moilanen, Eeva & Vuolteenaho, Kristiina. 2014. Bradykiniini. Teoksessa Pelkonen, Olavi & Ruskoaho, Heikki (toim.). *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

More, A., Kim, H., Zhao, R., Khang, G., Hildebrandt, T., Bernlöhr, C., Doods, H., Lee, D., Lee, S., Vanhoutte, P. & Wu, D. 2014. COX-2 mediated induction of endothelium-independent contraction to bradykinin in endotoxin-treated porcine coronary artery. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. Vol. 64, s. 209–217.

Moreau, M., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N., Marceau, F. & Adam, A. 2005. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *Journal of Pharmacological Sciences*. Vol. 99, s. 6–38.

Mustajoki, Pertti. 2017. Kohonnut verenpaine (verenpainetauti). Verkkodokumentti. Duodecim Terveyskirjasto. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00034](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00034)>. Päivitetty 28.2.2017. Luettu 1.4.2017.

Najjar, S., Scuteri, A. & Lakatta, E. 2005. Arterial Aging, Is It an Immutable Cardiovascular Risk Factor? *Hypertension*. Vol. 46, s. 454–462.

Nurmi, L., Heikkilä, H., Vapaatalo, H., Kovanen, P. & Lindstedt, K. 2011. Downregulation of bradykinin type 2 reseptor expression in cardiac endothelial cells during senescence. *Journal of Vascular Research*. Vol. 49, s. 13–23.

Protein blotting guide. Verkkodokumentti. Bio-rad. <[www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_2895.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf)>. Luettu 4.4.2017.

Purves, D., Augustine, G. & Fitzpatrick, D. 2001. *G-Proteins and Their Molecular Targets*. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland: Sinauer Associates.

Regoli, D., Allogho, S., Rizzi, A. & Gobeil, F. 1998. Bradykinin receptors and their antagonists. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 348, s. 1–10.

Ruskoaho, Heikki. 2014. Verenpainelääkkeet. Teoksessa Pelkonen, Olavi & Ruskoaho, Heikki (toim.). *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. 4. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Savinen, Anni & Vapaatalo, Heikki. 2014. Reniini-angiotensiinijärjestelmä (RAS) suolissa - mitä se siellä? *Duodecim*. 2014:130 s. 2086–2091.

Siltari, A., Korpela, R & Vapaatalo, H. 2016. Bradykinin -induced vasodilatation: Role of age, ACE1-inhibitory peptide, mas- and bradykinin receptors. *Peptides*. Vol. 85, s. 46–55.

Siltari, A., Roivanen, J., Korpela, R. & Vapaatalo H. 2017. Long-term feeding with bioactive tripeptides in aged hypertensive and normotensive rats: Special focus on blood pressure and bradykinin-induced vascular reactivity. *Journal of Physiology and Pharmacology*. (Lähetetty julkaistavaksi).

Skidgel, R., Kaplan, A. & Erdös, E. 2011. Histamine, Bradykinin, and Their Antagonists. Teoksessa Brunton, L., Chabner, B. & Knollmann, B. (eds.). *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th edition. New York: McGraw-Hill.

Vaajanen, A., Luhtala, S., Oksala, O. & Vapaatalo, H. 2008. Does the renin-angiotensin system also regulate intra-ocular pressure. *Annals of Medicine*. Vol. 40, s. 418–427.

Yoon, H., Kim, E., Kim, M., Lim, J., Jang, I., Ban, T., Shin, S., Park, C., Chang, Y & Choi, B. 2016. Age-Associated Changes in the Vascular Renin-Angiotensin System in Mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*. Vol. 2016, s. 1–14.

## Geelien valmistus

Geelien valinta proteiinikoon mukaan:

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

Alageelit (2 kpl):

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

Ylägeelit (2 kpl):

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

Pipetoi seokset vetokaapissa. Pipetoi APS ja TEMED viimeisenä, sillä ne alkavat jähmettyä heti. Sekoita varovasti välttämällä ilmakuplien syntymistä.

Merkitse lasiin alageelin yläraja, noin senttimetrin päähän lasin yläreunasta. Valmista ja pipetoi ensin alageeli. Pipetoi vettä geelin päälle, jotta geelin pinta ei kuivu jähmettymisen aikana. Anna jähmettyä noin tunti. Kaada ja ime paperilla vesi pois geelin päältä. Pipetoi ylägeeli piripintaan. Aseta kampa paikoilleen. Anna jähmettyä ainakin puoli tuntia. Kääri geelit ionivaihdetulla vedellä kostutettuun käsipaperiin ja laita pussissa jääkaappiin. Voi tehdä ajoa edeltävänä päivänä.

## Western blot -ohje

### SDS-PAGE

1. Sulata näytteet jäällä.
2. Kokoa ajolaite ja poista näytekampa geelin lasien välistä varovasti. Kaada kylmää 1x ajopuskuria ajolaitteen kammioon tasaisesti. Huolehdi, että ajolanka on kokonaan nesteen peitossa, ja että geelien välillä oleva kammio on täynnä ajopuskuria.
3. Pipetoi näytteet (max 40 µl) ja molekyylimarkkeri (0,5 µl) suunnitelman mukaisesti kammioihin. Pipetoi rauhassa ja vältä ilmakuplia. Pipetoi näytteet melko nopeasti, sillä ne saattavat muuten karata kammioista.
4. Aja ensin 150 V noin 10 min, kunnes näytteet ovat saavuttaneet alageelin rajan. Aja lopuksi 200 V noin 30 min, jolloin näytteet kulkeutuvat kokonsa mukaisesti alageelillä (erotusgeeli) siten, että pienimmät proteiinit kulkeutuvat alimmaiseksi ja isoimmat jäävät ylemmäs.

### Blottaus

1. Irrota geelit laseista. Leikkaa ylägeeli ja väriaineen muodostama viiva geelin alaosasta varovaisesti pois. Tasapainota geelit jääkylmässä blottauspuskurissa noin 10 min ajan.
2. Leikkaa nitroselluloosakalvosta ja suodatinpapereista (6 kpl) geelien kokoiset palat ja tasapainota ne blottauspuskurissa noin 10 min ajan.
3. Kostuta ECL TE77 -blottauslaitteen (GE Healthcare) pinnat blottauspuskurilla. Pakkaa laitteeseen märät suodatinpaperit (3 kpl), nitroselluloosakalvo, geelit ja suodatinpaperit (3 kpl). Rullaa ilmakuplat varovasti pois.
4. Aja 95 mA:lla 2–2,5 h.
5. Värjää geelit blottauksen jälkeen Coomassie-väriaineella yön yli. Pese geelit vedellä, kunnes väriaine on liuennut ja geeliin jääneet proteiinit erottuvat.



### Blokkaus

1. Leikkaa kalvot niin, että halutut proteiinit jäävät omiin kalvopaloihinsa. Laita kalvopalat omiin 50 ml falcon-putkiinsa.
2. Pese kalvot PBS:llä 2 x 5 min sekoittajassa.
3. Blokkaa kalvot blokkaustrupkurissa (50 % PBS ja 50 % Odyssey Blocking Buffer (PBS), LI-COR) kahden tunnin ajan huoneenlämmössä sekoittajassa. (Ota blokkaustrupkuri talteen, voi käyttää uudelleen)
4. Pese PBS-T:llä 1 x 5 min.

### Vasta-ainekäsittelyt

1. Valmista primaarivasta-aine-laimennokset 1:2-laimennettuun PBS-T- ja blokkaustrupkuriin.
2. Inkuboi kalvoja primaarivasta-aineissa yön yli 4 °C:ssa tai 2 h RT.
3. Pese kalvot PBS-T:llä 4 x 5 min.
4. Valmista sekundaarivasta-aine-laimennokset 1:2-laimennettuun PBS-T- ja blokkaustrupkuriin ja lisää 0,01 % SDS.
5. Inkuboi kalvoja sekundaarivasta-aineissa 1 h RT.
6. Pese kalvot PBS-T:llä 2 x 5 min ja PBS:llä 2 x 5 min.

### Detektointi

1. Detektoi kalvot Odyssey CLx Infrared Imaging System -laitteella (LI-COR).

### Kalvojen strippaus

1. Käsittele kalvot strippaustrupkurissa 2 x 15 min.
2. Pese kalvot PBS-T:llä 2 x 5 min ja PBS 2 x 5 min.