

ELK Heidi Tiihonen
Lisensiaatin tutkielma
Syksy 2011
Helsingin yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto
Fysiologian oppiaine

MCT1-, MCT4- ja CD147 –proteiinit kehittyvässä kilin pötsissä





Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Laitos - Institution – Department Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto	
Tekijä - Författare – Author □ ELK Heidi Tiihonen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title MCT1-, MCT4- ja CD147 –proteiinit kehittyvässä kilin pötsissä			
Oppiaine - Läroämne – Subject Fysiologia			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum – Month and year syksy 2010	
		Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 44	
<p>Tiivistelmä - Referat – Abstract</p> <p>Nuoren märehitjän alkaessa syödä kiinteää ravintoa, etumahojen suhteellinen osuus mahoista kasvaa ja niiden seinämän epiteeli alkaa kehittyä mahdollistaakseen ravintoaineiden tehokkaan imeytymisen. Märehitjällä rehun hiilihydraatit hajoavat pötsissä haihtuviksi rasvahapoiksi, ja monokarbonsyalaattikuljettajien uskotaan avustavan haihtuvien rasvahappojen imeytymisessä pötsin seinämän läpi. Pötsin seinämässä on todettu olevan ainakin MCT1- ja MCT4 – isoformeja. Nämä tarvitsevat toimiakseen CD147 -proteiinin (myös OX-47, EMMPRIN, HT7 ja basigin), joka on on glykosyloitu integraalinen membraaniproteiini.</p> <p>Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää MCT1-, MCT4- ja CD147 –proteiinien muutoksia pötsin toiminnan kehittymisen aikana. Toisena tavoitteena oli selvittää, voidaanko näytteenä käyttää solukalvojen sijasta pötsin seinämästä tehtyä homogenaattia.</p> <p>Tutkimuksessa käytettiin eri ikäisinä lopetetuista kileistä kerättyjä näytteitä. Kilejä oli yhteensä 31, joista 7 oli 3-21 tunnin ikäisiä, 7 viikon ikäisiä, 7 kahden viikon ikäisiä, 1 kolmen viikon ikäinen, 2 neljän viikon ikäistä, sekä 7 kahdeksan viikon ikäistä. Pötsin seinämästä otettiin näyte, josta valmistettiin homogenaatti ja eristettiin solukalvot eli membraanit.</p> <p>Pötsinäytteistä löydettiin MCT1- ja CD147 –proteiineja, mutta MCT4- isoformia ei ollut havaittavissa. Membraaninäytteissä havaittiin MCT1 -isoformin pitoisuuksien kasvavan iän mukana, paitsi kahdeksan viikon ikäisillä kileillä, joilla MCT1 –isoformin määrät vähenivät merkittävästi. CD147 –proteiinia oli havaittavissa jo vastasyntyneiden kilien pötsinäytteissä. Membraaninäytteissä CD147 -proteiinin määrä kasvoi lineaarisesti iän mukana ja CD147-proteiinin ja MCT1 –isoformin välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä korrelaatio.</p> <p>Homogenaattinäytteissä MCT1 -isoformin määrissä ei havaittu korrelaatiota iän kanssa. MCT1 - ja MCT4 -isoformien solukalvolle siirtymisessä avustavan CD147 –proteiinin ei myöskään havaittu korreloivan koe-eläinten iän tai MCT1 -isoformin kanssa. Membraani- ja homogenaattinäytteistä mitattujen MCT1- ja CD147 -määrien välillä ei ollut korrelaatiota.</p> <p>Haihtuvien rasvahappojen muodostus alkaa, kun eläin aloittaa kiinteän ravinnon syömisen. Tästä seuraa, että haihtuvia rasvahappoja kuljettavia proteiineja tarvitaan epiteelisolujen pinnalle. Tutkimuksessa havaittiin haihtuvia rasvahappoja kuljettavan MCT1 –proteiinin ja sen apuproteiinien määrän lisääntyminen iän myötä. N. 8-11 viikon iässä, jolloin pötsin toiminta on kehittynyt aikuisen eläimen tasolle, MCT1 –proteiinin määrä oli merkittävästi vähäisempi kuin 4 viikon iässä.</p> <p>Tulosten perusteella homogenaatti ei ole hyvä tapa mitata membraaniproteiinien määrää.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Pötsi, märehitjä, monokarbonsyalaattikuljettaja, kuljettajaproteiini, MCT1, MCT4, CD147			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin tiedekirjasto			
Työn valvoja (professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s) Työn johtaja: dosentti Reeta Pösö Työn ohjaaja: yliopistonlehtori Ninna Koho			

SISÄLLYSLUETTELO

1 Tiivistelmä	2
2 Kirjallisuuskatsaus	4
2.1 Pötsin kehittyminen	4
2.2 Pötsin seinämän histologiaa	5
2.3 Pötsin mikroflora ja sen kehittyminen	6
2.4 Pötsin metabolinen kehittyminen ja haihtuvat rasvahapot	9
2.5 Monokarboksylaattikuljettajat	14
2.6 CD147	17
3 Tutkimuksen tarkoitus	18
4 Aineisto ja menetelmät	19
4.1 Aineisto	19
3.1.1 Näytteet	19
4.2 Menetelmät	19
4.2.1 Homogenaattien valmistus	19
4.2.2 Membraanien valmistus	19
4.2.3 Proteiinien määrittäminen	20
4.2.4 Western blot	21
4.2.5 Proteiinien siirto membraanille (blottaus)	23
4.2.6 Ponceau –värjäys	24
4.2.7 Membraanien käsittely	24
4.2.8 Kuvantaminen	25
5 Tulokset	26
5.1 Homogenaattitulokset	26
5.1.1 Monokarboksylaattikuljettaja 1	26
5.1.2 CD147	27
5.1.3 Monokarboksylaattikuljettaja 4	29
5.2 Membraanitulokset	29
5.2.1 Monokarboksylaattikuljettaja 1	29
5.2.2 CD147	30
5.2.3 Homogenaatti- ja membraanitulosten vertailu	32
6 Pohdinta	33
6.1 MCT –proteiinit	33
6.2 CD147	35
6.3 Virhelähteet	36
7 Kiitokset	37
8 Kirjallisuus	37

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Pötsin kehittyminen

Vastasyntyneellä märehitijällä etumahat ovat vielä suhteellisen kehittymättömät ja nestemäinen ravinto kulkee etumahojen ohi märekourun kautta suoraan juoksutusmahaan (*abomasum*). Juoksutusmaha ei märehitijän ensimmäisen elinpäivän aikana eritä ruuansulatusnesteitä, jotta ternimaidon (*colostrum*) vasta-aineet eivät denaturoituisi ja hajoaisi. Immunoglobuliinit pääsevät näin imeytymään suolesta kokonaisina. Imemisen sekä suun ja nielun kemoreseptorien stimulaation aiheuttaman refleksin johdosta märekourun seinämän lihakset supistuvat ja muodostavat epätäydellisen putken, jota pitkin neste ohittaa etumahat. Tämä on tärkeää, sillä jos maitoa valuu liikaa pötsiin, pötsin mikrobit tuottavat siitä pH:ta laskevaa maitohappoa ja muita orgaanisia happoja. Matala pH hidastaa pötsin mikrobien proteiinisynteesiä (Russel ym. 1980), joten liian suuri pH:n lasku voi tuhota pötsin kehittyvän mikrofloran sekä saada aikaan väärin mikrobien kolonisaation.

Nuoren märehitijän alkaessa syödä kiinteää ravintoa, etumahojen suhteellinen osuus mahoista kasvaa ja niiden seinämän epiteeli alkaa kehittyä mahdollistaakseen ravintoaineiden tehokkaan imeytymisen. Kiinteän ruoan aiheuttama ärsytys stimuloi pötsin seinämän pinta-alaa lisääviä nystyjä, jotka suurenevat ja pitenevät (Lane ym., 2000). Myös mikrobien valmistamat käymistuotteet, lähinnä propionaatti ja butyraatti, vaikuttavat pötsinystyjen normaaliin kehittymiseen (Sander ym., 1959).

Mikäli pötsissä ei muodostu käymistuotteita riittävästi, pötsinystyt jäävät pieniksi ja mataliksi.

Pötsinystyt ovat erityisen kehittyneitä pötsin ventraalisäkissä sekä kraniodorsaalisisessa umpipussissa. Nystyt voivat olla jopa 15 mm pitkiä, mutta ne eivät kuitenkaan liiku koska niistä puuttuvat sileälihassolut. Kiinteän ravinnon määrä vaikuttaa myös pötsin ja verkkomahan seinämien lihasten kehittymiseen, mikä on myöhemmin tärkeää tehokkaan märehittämisen sekä pötsin ja verkkomahan liikkeen kannalta. Mitä aikaisemmin märehittäjälle annetaan kiinteää ravintoa, sitä aikaisemmin myös mikroflora kehittyy, jonka seurauksena pötsin metabolinen aktiivisuus on korkeampi kuin pidempään maitoa ainoana ravintona käyttäneillä eläimillä (Anderson ym. 1987).

2.2 Pötsin seinämän histologiaa

Etumahojen epiteeli on keratinisoitunutta, kerrostunutta levyepiteeliä, eikä siitä erityy ruuansulatusnesteitä. Se koostuu neljästä eri kerroksesta: keratinisoituneesta *stratum corneum*:ista, tiiviitä liitoksia sisältävästä *stratum granulosum*:ista, *stratum spinosum*:ista, jonne alimman solukerroksen tuottamat solut vaeltavat, sekä *stratum basale*:sta, jossa pötsistä imeytyneet aineet pääsevät ekstrasellulaariseen täyttämien soluvälitilojen kautta diffusoitumaan kapillaareihin. Epiteelin läpi tapahtuu runsaasti aineiden kuljetusta (Ross ym. 2003).

Pötsin seinämän epiteelin yleinen histologinen kehittyminen on riippuvainen lähinnä iästä, mutta ravinnon laadulla on myös jonkin verran merkitystä siihen, mitkä piirteet epiteelissä korostuvat. Esimerkiksi keratinisoituneen solukerroksen paksuus on riippuvainen karkean ravinnon määrästä (Wardrop, 1961). Wardropin (1961) tekemässä tutkimuksessa verrattiin kiinteällä ravinnolla sekä ainoastaan maidolla ruokittuja karitsoja. Pelkkää maitoa saaneiden karitsojen pötsin epiteeli näytti silmämääräisesti normaalilta, mutta kun epiteeliä verrattiin kiinteää ravintoa saaneiden karitsojen pötsiepiteeliin, pötsin papillat sekä *stratum granulosum* ja *stratum corneum* olivat heikommin kehittyneet.

2.3 Pötsin mikroflora ja sen kehittyminen

Pötsin mikrobit voidaan jakaa kolmeen osaan: sienet, bakteerit sekä alkueläimet (*protozoa*). Mikrobit voivat kellua vapaana pötsinesteessä tai olla kiinnittyneinä pötsin epiteeliin sekä pötsinesteessä oleviin partikkeleihin. Ne fermentoivat märehtijän syömää ravintoa saadakseen energiaa liikkumiseen, jakautumiseen ja kasvamiseen. Samalla ne tuottavat yhdisteitä, jotka ovat tärkeitä märehtijän energiansaannin kannalta. Jotta nämä yhdisteet eivät hapen avulla hajoaisi hiilidioksidiksi ja vedeksi, on pötsissä oltava anaerobiset olosuhteet. Tämän mahdollistavat pötsin seinämässä elävät fakultatiiviset eli happea sietävät anaerobiset bakteerit, jotka käyttävät märehtijän nielemän sekä verestä pötsiin seinämän läpi diffusoituvan hapen ja luovat näin oikeat olosuhteet obligatorisille anaeroobeille eli mikrobeille, jotka eivät selviä muissa kuin anaerobisissa

olosuhteissa. Märehtijän syömän ravinnon laatu ja koostumus vaikuttavat pötsin mikrobien lajikirjoon (Beharka ym. 1998). Ruokavalion muutokset voivatkin vaikuttaa mikrobitasapainoon pötsissä.

Lukumäärältään eniten pötsissä on bakteereja. Ne jaetaan amylolyyttisiin, sellulolyyttisiin, metanogeenisiin ja proteolyyttisiin bakteereihin sen mukaan, mitä ne pötsissä metaboloivat. Sellulolyttisiä ja metanogeenisiä bakteereja ilmaantuu pötsiin n. 3 päivän iässä (Anderson ym. 1987). Sellulolyttiset bakteerit hajottavat kasvikuituja, kuten pektiiniä ja selluloosaa, kiinnittymällä kuitujen pinnalle. Hajotuksen yhteydessä vapautuu monosakkarideja, jotka kuljetetaan bakteerisoluihin käytettäväksi niiden energiantuottoon anaerobisessa glykolyysissä. Toisin kuin eläinsoluissa, bakteereissa anaerobisen aineenvaihdunnan lopputuotteita ovat haihtuvat rasvahapot. Metanogeeniset bakteerit pelkistävät muiden mikrobien tuottamaa hiilidioksidia metaaniksi ja saavat siitä energiansa. Amylolyttiset bakteerit pystyvät metaboloimaan alfyglykosididisidoksia sisältäviä hiilihydraatteja mutta eivät kasvikuituja. Amylolyttisten bakteerien toiminnan seurauksena syntyy lähinnä laktaattia, joka laskee pötsin pH:ta ruokinnan jälkeen. Proteolyttiset bakteerit, kuten pötsin seinämän fakultatiivisesti anaerobiset bakteerit (Dinsdale ym. 1980), hajottavat proteiineja, joiden aminohapoista muodostetaan edelleen ammoniakkia ja orgaanisia happoja tai jotka käytetään sellaisenaan mikrobien proteiinisynteesiin.

Suurin osa pötsin alkueläimistä (*protozoa*) kuuluu luokkaan *Ciliata* (ripsieläimet). Usein pötsinesteen partikkeleihin tarttuneina olevat protozoat ovat obligaatteja anaerobeja. Ne ovat huomattavasti muita

mikrobeja suurempia ja voivat käyttää myös bakteereja ravintonaan. Hajottamastaan materiaalista ne tuottavat haihtuvia rasvahappoja, laktaattia, hiilidioksidia ja vetyä. Pötsissä kasvaa myös pieniä määriä sieniä, joiden itiöt lisäävät sellulolyyttisten bakteerien tarttumispinta-alaa kiinnittymällä ligniiniä sisältäviin kuituihin.

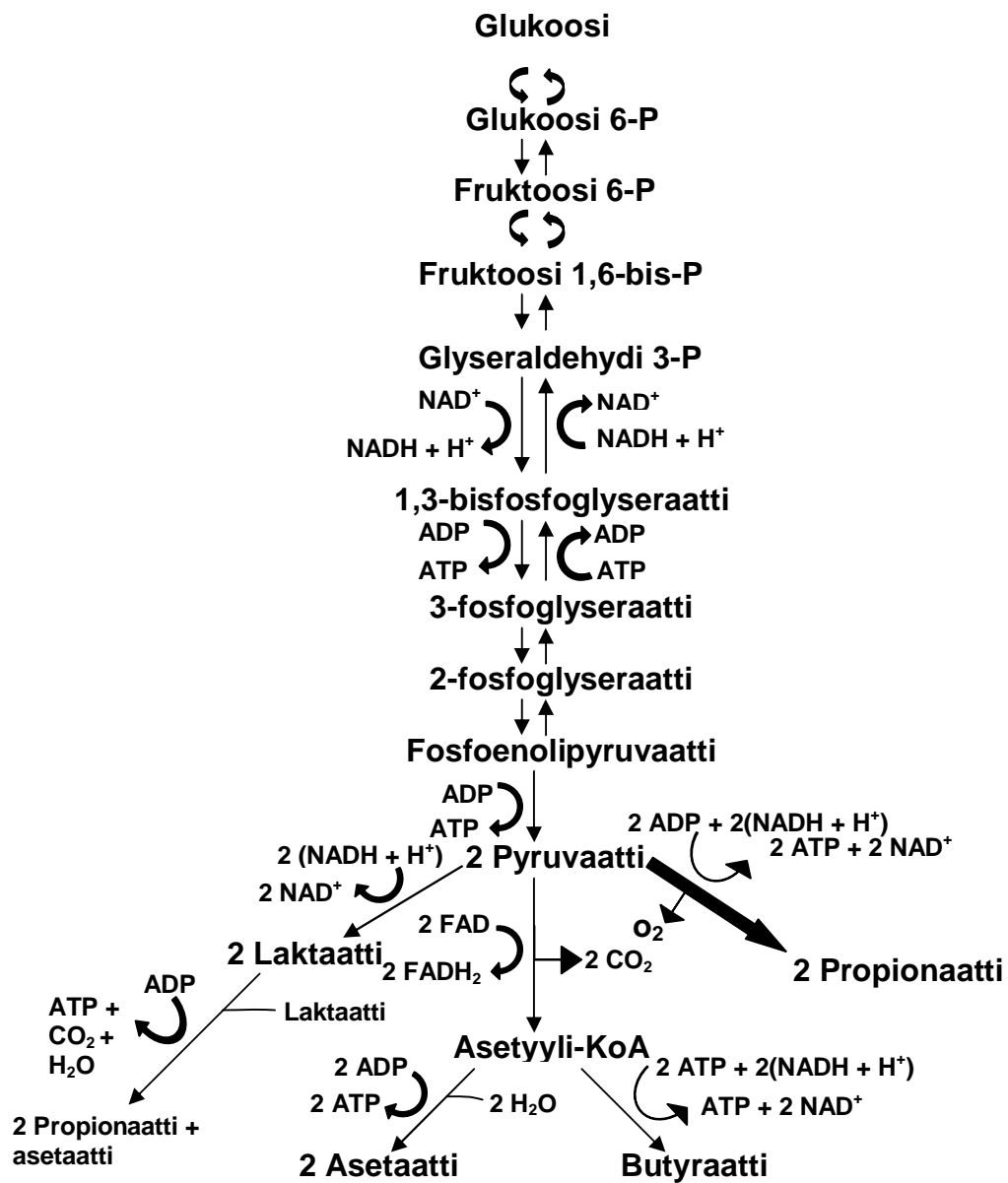
Pötsin mikrobikannan kehittyminen alkaa heti syntymästä, kun vastasyntynyt märehijä joutuu steriilistä kohdusta pois ja kosketuksiin ympäristön mikrobien kanssa. Ensimmäiset mikrobit tulevat yleensä emän maitorauhasesta ternimaidon mukana ja ovat pääasiassa *Lactobacillus*-sukuun kuuluvia, maitohappoa tuottavia bakteereja. Yhteys aikuisiin märehijöihin on tärkeää mikrobiston kehittymisen kannalta. Mikäli eläin eristetään syntymän jälkeen muista märehijöistä, sen pötsin bakteerikanta kehittyy normaalisti mutta mikrobeista protozoat puuttuvat kokonaan. Muiden märehijöiden ulosteiden sekä märepalojen välityksellä vastasyntynyt eläin saa mm. *Escherichia colin*, *Streptococcus*-bakteereja, sekä *Clostridium welchiin*. Pötsin asuttavat ensin fakultatiiviset anaerobit. Niiden muutettua olosuhteet otollisiksi fermentaatiolle, obligatoriset anaerobit saapuvat. Märehijän ensimmäisen kolmen elinviikon aikana pötsin anaerobisten bakteerien lukumäärä kasvaa, minkä jälkeen lukumäärät pysyvät suhteellisen vakioina (Anderson ym. 1987). Fakultatiivisten anaerobien lukumäärät puolestaan laskevat ensimmäisen viiden viikon aikana.

2.4 Pötsin metabolinen kehittyminen ja haihtuvat rasvahapot

Fermentatiivisessa ruuansulatuksessa ravinnon hiilihydraateista pilkotaan disakkarideja ja glukoosia, joita mikrobit ottavat sisään. Glykolyysin kautta glukoosi hajoo kahdeksi pyruvaatiksi, jota NADH:n hapettamiseksi pelkistetään laktaatiksi tai haihtuviksi rasvahapoiksi. Reaktioketjussa glukoosimolekyylistä muodostuu haihtuvien rasvahappojen lisäksi ATP:ta. NAD⁺:n ja FADH₂:n hapettamiseen voidaan käyttää myös hiilidioksidia, joka pelkistetään metaaniksi.

Fermentaation lopputuotteena ovat haihtuvat rasvahapot (VFA), joista määrällisesti tärkeimpiä ovat etikkahappo, propionihappo ja voihapo. Nämä haihtuvat rasvahapot ovat pötsin pH:ssa dissosioituneena asetaatiksi, propionaatiksi ja butyraatiksi. Lisäksi fermentaatiossa syntyy mm. valeriaanahappoa (valeraattia), isovaleriaanahappoa (isovaleraattia), isovoihappoa (isobutyraattia) sekä 2-metyylibutyraattia. Haihtuvien rasvahappojen suhteelliset määrät, ja myös niiden kokonaismäärä, vaihtelevat ravinnon laadun mukaan. Runsaasti karkeaa rehua saavilla eläimillä asetaatin, propionaatin ja butyraatin suhteet ovat 70:20:10, kun taas runsaasti viljaa saavilla suhteet ovat 60:30:10. Tärkkelyksen määrä ravinnossa vaikuttaa haihtuvien rasvahappojen kokonaismäärään, ja runsaasti tärkkelystä sisältävää ravintoa saavilla eläimillä VFA-kokonaismäärä on suurempi kuin runsaskuituista ravintoa saavilla. Pötsin pH:ta laskevia haihtuvia rasvahappoja puskuroidaan mm. runsaan syljenerityksen avulla. Märehtijän sylki on sen sisältämän vetykarbonaatin takia emäksistä ja sitä erittyy aikuisella naudalla n. 100-200 litraa

vuorokaudessa. Haihtuvia rasvahappoja imeytyy pötsistä verenkiertoon jatkuvasti ja ne ovat märehitjän tärkein energianlähde. Lisäksi haihtuvat rasvahapot, joilla on pariton hiililuku, toimivat glukoosisynteesin lähtöaineina (Bergman, 1990).



Kuva 1. Anaerobinen glykolyysi ja haihtuvien rasvahappojen tuotto pötsissä. (Cunningham 2002, Champe ym. 1994).

Myös mikrobien hajottamien proteiinien aminohapoista voidaan muodostaa haihtuvia rasvahappoja. Ensin aminohapoista poistetaan aminoryhmä ammoniakkinä deaminaation avulla. Haaraketjuisten aminohappojen hiilirunkoja lukuunottamatta muita hiilirunkoja muokataan eri reittien kautta yleisimmiksi haihtuviksi rasvahapoiksi (asetaatti, propionaatti, butyraatti). Haaraketjuisista hiilirungoista muodostetaan haaraketjuisia haihtuvia rasvahappoja, kuten isobutyraattia, isovaleraattia ja 2-metyylibutyraattia. Nämä toimivat tärkeinä kasvutekijöinä joillekin bakteereille (Bergman, 1990).

Haihtuvien rasvahappojen molekyyli-tason imeytymismekanismia ei vielä täysin tunneta. Pötsin pH:ssa suurin osa haihtuvista rasvahapoista on dissosioituneessa muodossa, mutta vain dissosioitumaton muoto pystyy diffusoitumaan suoraan epiteelin läpi. Dissosioituneen muodon muuttumista dissosioitumattomaksi muodoksi edesauttaa epiteelin läheisyydessä oleva matala pH. pH:n laskuun tarvittavat protonit saadaan epiteelisolun aineenvaihdunnan tuottamasta hiilidioksidista, joka veteen liuetessaan muuttuu hiilihapoksi. Hiilihappo dissosioituu bikarbonaatiksi ja protoniksi, jonka jälkeen protoni kuljetetaan solun ulkopuolelle pötsin luumeniin Na^+/H^+ -vaihtajan avulla. Samalla natriumioni siirtyy solun sisälle. Tämän seurauksena pötsin sisällön pH epiteelin läheisyydessä laskee alle haihtuvien rasvahappojen pKa:n, jolloin ne muuttuvat ionimuodosta happomuotoon. Happomuotoinen rasvahappo pystyy diffundoitumaan epiteelisolun sisään, mutta muuttuu uudelleen ionimuotoon solun sisällä vallitsevan korkeamman pH:n vaikutuksesta. Solujen basolateraalipinnalta haihtuvat rasvahapot

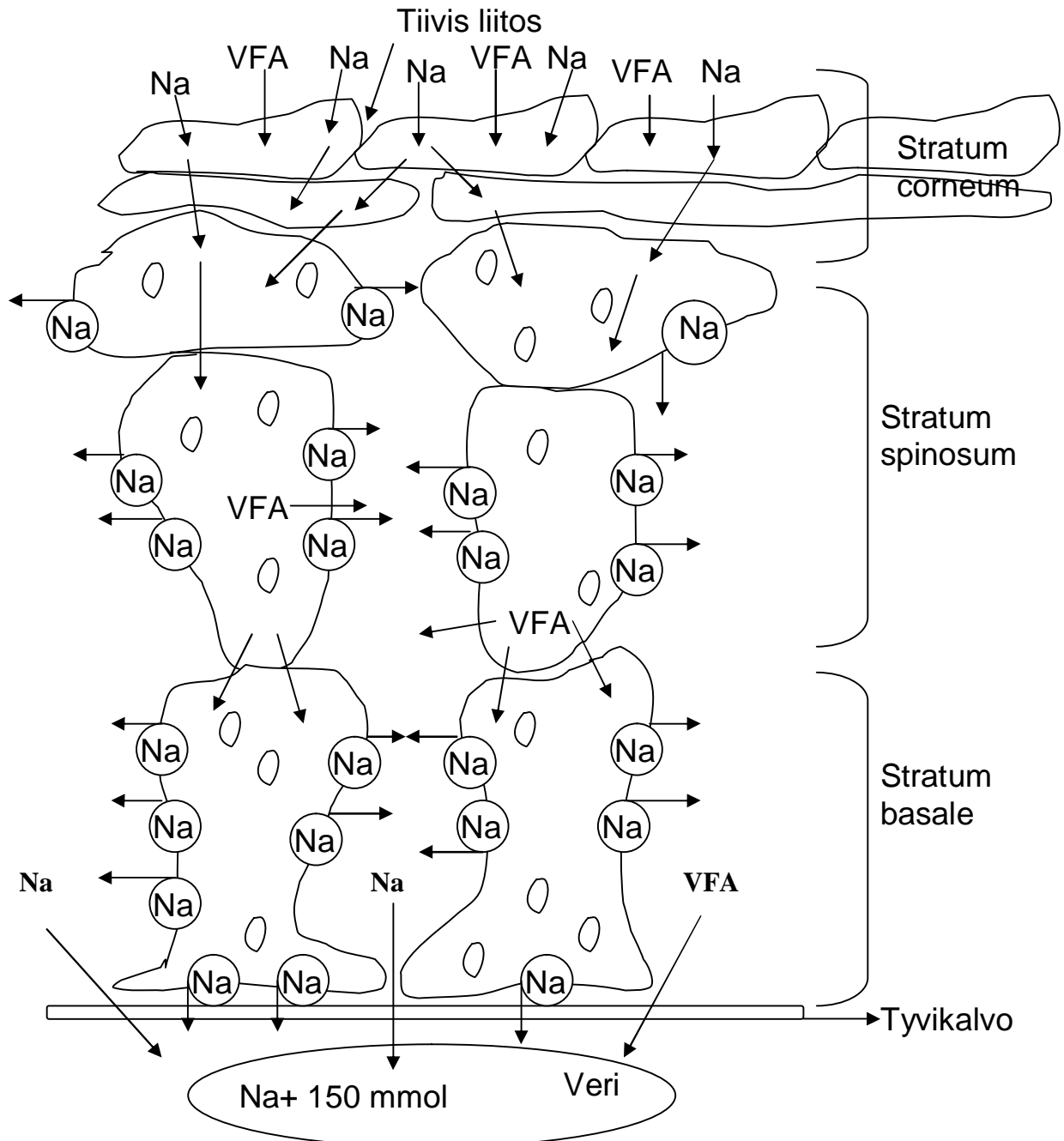
imeytyvät anioninvaihtajan sekä monokarboksylaattikuljettajan (MCT) avulla (Bergman, 1990).

Epiteelin luumeninpuoleiselta pinnalta haihtuvat rasvahapot siirtyvät syvempiin solukerroksiin aukkoliitosten kautta. Haihtuvia rasvahappoja muokataan etenkin tyvikalvon lähellä olevissa epiteelisoluissa. Osa asetaatista käytetään solujen energiantuottoon, mutta suurin osa siirtyy verenkiertoon. Propionaatista osa muutetaan laktaatiksi ja suurin osa propionaatistakin siirretään verenkiertoon. Butyraatti kuitenkin metaboloidaan lähes kokonaan β -hydroksibutyraatiksi (β -HBA), joka on ketoaine. Tämä ketogeneesiksi kutsuttu reaktio on ominainen täysikasvuiselle märehitijälle.

Haihtuvat rasvahapot vaikuttavat pötsin ja verkkomahan kehittymiseen. Godfrey (1961) vasikoilla tekemän tutkimuksen mukaan haihtuvien rasvahappojen pitoisuus pötsissä kasvaa ensimmäisen elinviikon jälkeen aina viidenteen elinviikkoon asti, jonka jälkeen VFA-pitoisuudet pysyvät jokseenkin samalla tasolla. Pientä vuorokausivaihtelua kuitenkin tapahtuu, ja VFA-pitoisuudet ovat korkeimmillaan heti ruokinnan jälkeen. Vastasyntyneen eläimen pötsin epiteeli hapettaa glukoosia 1.8-kertaisesti aikuisen eläimen pötsiin verrattuna (Baldwin ym. 1992). Epiteelin histologisen kehittymisen myötä myös solujen metaboliassa tapahtuu muutoksia. Glukoosin hapettuminen pötsin epiteelisoluissa vähenee (Lane ym. 1997), butyraatin käyttö lisääntyy (Walker ym. 1962) ja ketogeneesi käynnistyy (Lane ym. 2000).

Kaasunmuodostus pötsissä mahdollistaa märehitämisen alkamisen. Pötsin kaasun sisältää pääosin hiilidioksidia ja metaania. Lisäksi kaasussa on

vähän rikkivetyä, vetyä ja typpeä. Noin kolmen viikon ikäisellä vasikalla voidaan nähdä märepaloja nousevan suuhun toistuvasti. Kahdeksan viikon iästä lähtien vasikan voidaan katsoa olevan täysin märehtijä.



Kuva 2. Haihtuvien rasvahappojen (VFA) ja natriumionien imeytyminen pötsin epiteelin läpi verenkiertoon. (Cunningham, 2002).

2.5 Monokarboksylaattikuljettajat

Monokarboksylaattikuljettajien (monocarboxylate transporter, MCT) tehtävänä on kuljettaa lyhytketjuisia monokarboksyylihappoja solun sisälle tai solusta ulos. Yksimahaisilla tärkein MCT-proteiinien kuljettama molekyyli on anaerobisen glykolyysin tuote laktaatti, joka on saatava soluista ulos, jottei solunsisäinen pH laskisi liikaa. Toisaalta laktaattia kuljetetaan maksasoluihin glukoneogeneesiä varten (Poole ym. 1993). Märehtijöillä monokarboksylaattikuljettajat osallistuvat haihtuvien rasvahappojen imeytymiseen pötsistä (Kirat ym. 2006).

Monokarboksylaattikuljettajat ovat pH-riippuvaisia, eli ne kuljettavat haihtuvan rasvahapon mukana yhden protonin (Halestrap ym. 1999). Haihtuvan rasvahappoanionin ja protonin sitoutuessa kuljettajaproteiiniin, sen konformaatio muuttuu, jolloin se pystyy siirtämään sitomansa ionit kalvon läpi. Protoni ja haihtuva rasvahappoanioni vapautuvat, ja kuljettaja palautuu takaisin alkuperäiseen muotoonsa. Tyhjä kuljettaja siirtyy takaisin kalvon toisen puolen pinnalle (Poole ym. 1993). Tyhjän kuljettajan siirtymisnopeus on rajoittava tekijä monokarboksyylihappojen siirtämisessä kalvon toiselle puolelle.

Monokarboksylaattikuljettajia on löydetty nisäkkäistä 14 eri muotoa eli isoformia, mutta vain neljän ensimmäisen on todistettu katalysoivan pH -riippuvaista kuljetusta. (Halestrap ym. 2004). Solunulkoisen pH:n laskiessa monokarboksylaattien kuljetus solun sisään lisääntyy (Grollman ym. 2000). Kuljettajaproteiinit ovat kudosspesifisiä lukuunottamatta MCT1-proteiinia, jota löytyy lähes kaikista kudoksista.

MCT1-proteiinia sekä laktaatin kuljetusta on tutkittu etenkin punasoluissa (mm. Poole ym. 1996), joissa mitokondrioiden sekä tuman puuttumisen takia tapahtuu ainoastaan anaerobista glykolyysiä. MCT1-proteiinin molekyylipaino on 40-50 kDa (Poole ym. 1992). MCT-proteiineille on mitattu K_m -arvoja, jotka kertovat kuljettajan affiniteetin tiettyyn substraattiin. Mitä pienempi luku on, sen suurempi affiniteetti monokarboksylaattikuljettajalla on tiettyyn substraattiin. MCT1-isoformin K_m L-laktaatille on 3.5 mM (Manning Fox ym. 2000) ja β -hydroksibutyraatille 12,5 (Halestrap ym. 1999).

MCT2-isoformia löytyy eniten maksasta, munuaisista ja siittiöiden hännästä, sialla luurankolihasista (Sepponen ym. 2003) sekä hamsterilla luurankolihasesta sekä sydänlihaksesta (Garcia ym. 1995). MCT2-isoformin K_m L-laktaatille on 0.74 (Bröer ym. 1998). MCT3-isoformia on ainoastaan silmässä retinan pigmenttiepiteelisolujen basaalimembraanilla (Yoon ym. 1997).

MCT4-isoformin on todettu löytyvän soluista, joissa tapahtuu paljon glykolyysiä (Dimmer ym. 2000). Tällaisia soluja ovat mm. valkoiset lihassolut, astrozyytit, veren valkosolut ja kondrosyytit. MCT4-isoformia löytyy myös istukasta (Price ym. 1998). Glykolyysin aikana muodostuu NADH:ta, joka on muutettava takaisin NAD^+ :ksi. Tämä tapahtuu reaktiossa, jossa pyruvaatti muutetaan laktaatiksi. Pyruvaatin poistaminen monokarboksylaattikuljettajan avulla solusta pysäyttäisi NADH:n muuttumisen takaisin NAD^+ :ksi, ja lopulta glykolyysi pysähtyisi. MCT4-isoformilla on hyvin matala affiniteetti pyruvaattiin eli se kuljettaa pyruvaattia hyvin heikosti (K_m pyruvaatille 153). Näin syntynyt laktaatti

saadaan siirrettyä ulos solusta, mutta pyruvaatti jää solun käytettäväksi (Manning Fox ym. 2000). MCT4-isoformin K_m L-laktaatille on 28 ja se toimii ainoastaan, kun laktaatin konsentraatio solussa on suuri (Manning Fox ym. 2000). K_m -arvojen lisäksi voidaan määrittää myös MCT-proteiinin maksimaalinen kuljetusnopeus V_{max} . MCT1- ja MCT4-isoformeilla kuljetusnopeus on saman suuruinen, mutta MCT2-isoformilla se on n. 18-20 kertaa pienempi (Dimmer ym. 2000, Bröer ym. 1999).

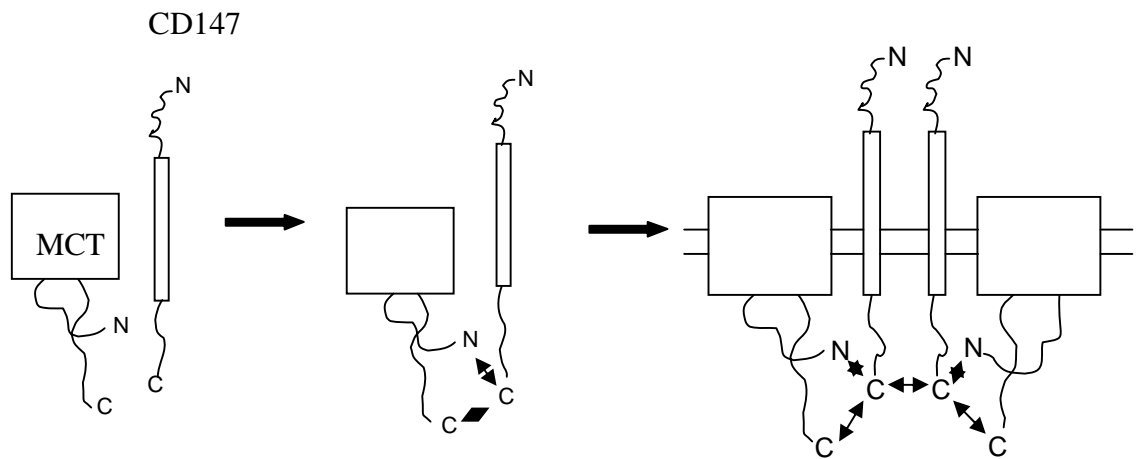
Muita MCT-perheen proteiineja ovat mm. suolesta, istukasta ja maksasta löytyvä TAT1, joka kuljettaa Na^+ - ja Cl^- -ionien mukana aromaattisia aminohappoja (Kim ym. 2001), koiran punasolujen MCT7 (Koho ym. 2002), sekä erityisesti maksasta löytyvä MCT8, joka on aktiivinen kilpirauhashormonikuljettaja (Friesema ym. 2003). MCT5-7 sekä MCT11-14 -isoformeista ei vielä tiedetä kovin paljoa.

Märehtijöillä monokarboksylaattikuljettajien uskotaan avustavan haihtuvien rasvahappojen imeytymisessä pötsin seinämän läpi. Useassa tutkimuksessa, joskin verrattuna vain MCT2-isoformiin, on todettu MCT1-isoformin olevan tärkein ruuansulatuskanavan monokarboksylaattikuljettaja (mm. Garcia ym. 1995, Ritzhaupt ym. 1998, Orsenigo ym. 1999 ja Tanai ym. 1995). Pötsin epiteelistä löytyy myös MCT4-isoformia (Koho ym. 2005), mutta monokarboksylaattikuljettajista vain MCT1 ja MCT2 pystyvät kuljettamaan myös ketoaineita (Halestrap ym. 1999). MCT1 sijaitsee pötsin epiteelin alimmassa kerroksessa (*stratum basale*), josta se pystyy siirtämään ketoaineet ja haihtuvat rasvahapot helposti verenkiertoon (Müller ym. 2002). Haihtuvien rasvahappojen kuljetuksen lisäksi MCT1:llä on tärkeä rooli pH:n ja solunsisäisen osmolaliteetin säätelyssä (Müller ym. 2002).

Apikaalipinnalta soluun siirtyvä dissosioitumaton happo dissosioituu solun sisällä ja pyrkii happamoittamaan sitä. Tästä syystä on erittäin tärkeää, että basolateraalipinnalla on kuljettajaproteiini, joka kuljettaa sekä happoanionin että protonin ulos solusta.

2.6 CD147

CD147 (myös OX-47, EMMPRIN, HT7 ja basigin) on glykosyloitu integraalinen membraaniproteiini, joka tarvitaan jotta monokarboxylaattikuljettajat MCT1 ja MCT4 sijoittuisivat oikein solun membraanille. Mikäli CD147 ei ole läsnä, kuljettajaproteiinit eivät pääse siirtymään solukalvolle vaan kerääntyvät endoplasmakalvostoon sekä Golgin laitteeseen (Kirk ym. 2000). Myöskään hevosen punasolujen membraanilla oleva MCT1 ei ole aktiivinen ilman CD147-kaitsijaproteiinia (Koho ym. 2002). CD147 avustaa MCT-proteiineja siten, että MCT -proteiinin C- tai N -terminaalinen pää kiinnittyy CD147-proteiinin C -terminaaliseen päähän. CD147-proteiinin ja MCT-proteiinin vuorovaikutustapa on hydrofobinen (Finch ym. 2009). Tämä pari muodostaa toisen MCT/CD147 -parin kanssa dimeerin (Wilson ym. 2002). CD147-proteiinin molekyylipaino on 54 kDa (Staffler ym. 2000).



Kuva 3. MCT-proteiini ja CD147-kaitsijaproteiini sitoutuvat toisiinsa ja kaksi tällaista MCT/CD147 -kompleksia muodostavat dimeerin solukalvolle. (Wilson ym. 2002).

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää MCT1-, MCT4- ja CD147-proteiinien muutoksia pötsin toiminnan kehittymisen aikana. Toisena tavoitteena oli selvittää, voidaanko näytteenä käyttää pötsin seinämästä eristettyjen membraaniproteiinien sijasta seinämästä tehtyä homogenaattia. Tämä tehtiin vertaamalla homogenaatti- ja membraaninäytteistä mitattuja MCT- ja CD147-proteiinien määriä.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Aineisto

4.1.1 Näytteet

Tutkimuksessa käytettiin eri ikäisinä lopetetuista kileistä kerättyjä näytteitä. Kilejä oli yhteensä 31, joista 7 oli 3-21 tunnin ikäisiä, 7 viikon ikäisiä, 7 kahden viikon ikäisiä, 1 kolmen viikon ikäinen, 2 neljän viikon ikäistä, sekä 7 kahdeksan viikon ikäistä.

Tutkimusta varten otettiin 2 x 2 cm:n näytteet kilien pötsin ventraalisäkistä. Eläimet avattiin 0,5-1 tuntia lopettamisen jälkeen. Kaksi kiliä kuoli luonnollisesti kokeen aikana, joista 20 vuorokauden ikäinen avattiin 8-16 tuntia kuoleman jälkeen ja 50 vuorokauden ikäinen 24 tuntia kuoleman jälkeen. 50 vuorokauden ikäistä kiliä säilytettiin ennen avaamista kylmässä, mutta näytteitä kerättyäessä huomattiin, että autolyysiä oli tapahtunut. Näytteet huuhdeltiin 0,9% NaCl:lla ennen pakastamista.

4.2 Menetelmät

4.2.1 Homogenaattien valmistus

Homogenaattien valmistusta varten jokaista näytettä punnittiin n. 250 mg jäädytettyihin Fast prep –putkiin (Lysing Matrix E, Bio 101 Inc. USA), joihin oli mitattu 750 µl puskuri-inhibiittoriseosta. Puskuri-inhibiittoriseos

sisälsi jokaista näytettä kohti 750 µl homogointipuskuria (0,3 M sakkarosi, 2 mM EGTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,2). Lisäksi puskuri-inhibiittoriseokseen lisättiin jokaista näytegrammaa kohti 50 µl proteaasi-inhibiittoriseoketta (SIGMA® Protease inhibitor cocktail, P 8340, Sigma-Aldrich Co., USA). Näytteitä homogointiin 3 kertaa 30 sekuntia nopeudella 6,0 (Fast Prep FP120, Bio 101 Inc. USA). Homogointikertojen välillä laitteen sekä näytteiden annettiin jäähtyä. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin +4 asteeseen jäähdytetyssä sentrifugissa 15 minuuttia 10000 g nopeudella. Supernatantti kerättiin talteen.

4.2.2 Membraanien valmistus

Näytteistä valmistettiin vertailun vuoksi myös membraanit, eli pötsinäytteistä eristettiin vain solukalvot näytteeksi. Membraanien eristämistä varten jokaista näytettä punnittiin n. 250 mg jäähdytettyihin Fast prep –putkiin, joihin oli mitattu 750 µl samaa homogointipuskuria, jota käytettiin homogonaattien valmistuksessa. Näytteitä homogointiin 2 kertaa 30 sekunnin ajan, ja laitteen ja näytteiden annettiin jäähtyä homogointikertojen välillä. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin minuutin ajan +4 asteeseen jäähdytetyssä sentrifugissa (8000 g). Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti siirrettiin Sorvall –putkiin (Sorvall® centrifuges, USA). Jäljelle jääneen pelletin päälle lisättiin uutta homogointipuskuria ja näyte homogointiin uudelleen 2 kertaa 30 sekunnin ajan. Näyte sentrifugoitiin (1 minuutti, 8000 g) ja supernatantti kerättiin talteen Sorvall –putkiin. Putkiin kerättyä supernatanttia

sentrifugoitiin 20 minuutin ajan 35600g nopeudella. Pelletti resuspensoitiin lisäämällä 5 ml homogointipuskuria ja 1,2 ml Percollia (Percoll™, Amersham Pharmacia Biotech AB, Ruotsi). Näytteitä sentrifugoitiin 10 minuutin ajan 17000g nopeudella, jonka jälkeen yläfaasi siirrettiin puhtaaseen Sorvall –putkeen, johon lisättiin homogointipuskuria. Tämän jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 40 minuutin ajan 35600g nopeudella. Pelletit pestiin ja sentrifugoitiin vielä 2 kertaa 40 minuutin ajan 35600g nopeudella, jonka jälkeen pelletti otettiin talteen. Pelletti liuotettiin 0,5-1,0 ml:aan homogointipuskuria.

4.2.3 Proteiinien määrittäminen

Proteiniääritystä varten valmistetuista homogenaateista sekä membraaneista tehtiin 1:20 laimennos. Laimennettua näytettä lisättiin 50 µl koeputkiin ja jokaiseen putkeen lisättiin 1 ml reagenssiliuosta (UPTIMA BC Assay Reagent, Interchim, Ranska, valmistettiin pakkauksen ohjeen mukaan). Myös standardiliuoksista (50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg) tehtiin samanlaiset näytteet. Koeputkia inkuboitiin +37 °C asteisessa vesihauteessa 30 minuuttia, jonka jälkeen putket jäähdytettiin nopeasti jäissä. Jäähdytyksen jälkeen näytteistä mitattiin absorbanssi spektrofotometrillä 562 nm:n aallonpituudella (HITACHI U-2000 spectrophotometer, Naka Works, Hitachi Ltd. Japan).

4.2.4 Western blot

SDS-PAGE –ajoa varten valmistettiin ensin 10%:n ajogeeli Bio Rad –geelilaitteistoon (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) sekoittamalla 4,0 ml H₂O:ta, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl:a (pH 8,8), 3,35 ml 30%:sta bisakryyliamidia sekä 0,1 ml 10%:sta SDS:a (SIGMA® Sodium docedyl sulfate, Sigma-Aldrich Co., USA). Liuokseen lisättiin jähmettimiksi 50 µl 10%:sta APS:a (ammoniumpersulfaatti, Sigma-Aldrich Co., USA) ja 5 µl TEMED:iä (N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiini, Sigma-Aldrich Co., USA). Geeli pipetoitiin laitteiston lasilevyjen väliin ja päälle pipetoitiin vettä. Geelin annettiin jähmettyä 30-45 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen vesi kaadettiin pois ja valmistettiin tiivistysgeeli sekoittamalla 3,05 ml H₂O:ta, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl:a (pH 6,8), 650 µl 30%:sta bisakryyliamidia sekä 50 µl 10%:sta SDS:a.

Jähmettiminä käytettiin 25 µl 10%:sta ammoniumpersulfaattia ja 5 µl N,N,N',N' -tetrametyylietyleenidiamiinia. Tiivistysgeeli pipetoitiin ajogeelin päälle ja geeliin asetettiin kammot kaivoja varten. Geelin annettiin jähmettyä 15-30 minuuttia huoneenlämmössä. Valmiista geelistä poistettiin kammot ja kaivot huuhdeltiin vedellä. SDS-PAGE –ajolaitteisto koottiin ja geelien väliin jäävä yläkammio täytettiin puskurilla (Tris-base 25 mM, glysiini 192 mM, SDS 5 g/l). Alakammioon kaadettiin puskuriliuosta niin, että elektrodilanka peittyi.

Kuhunkin näytteeseen lisättiin saman verran näytepuskuria (1 osa 10 % merkptoetanolia, 9 osaa puskuria: SDS 0,2 g/l, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 25 ml, H₂O 2,24 ml, 20% glyseroli 1 ml, bromofenolisininen, 5% 10 µl).

Näytteet kiehautettiin ja sentrifugoitiin nopeasti, jonka jälkeen proteiinia pipetoitiin 10 µg kaivoihin. Lisäksi yhteen kaivoon laitettiin 1.5 µl standardiliuosta (BIO-RAD Prestained SDS-PAGE standards, Low Range, Bio-Rad Laboratories Inc., USA) sekä kontrolliksi 5 µl punasolumembraaneista valmistettua näytettä. Geeli ajettiin (Bio Rad Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories Inc., USA) 50 minuutin ajan käyttäen 200 V jännitettä.

4.2.5 Proteiinien siirto membraanille (blottaus)

SDS-PAGE -ajon jälkeen geeliä pestiin blottauspuskurilla (Tris-base 25 mM, glysiini 192 mM, metanoli 20 % v/v, täytettiin vedellä 2 litraksi) 15 minuutin ajan (Luckham 4RT Rocking Table, Denley Instruments, Englanti) heilutuksessa. Proteiinien siirtämiseksi membraanille pinottiin katodin puolelta alkaen alimmaiseksi blottauspuskurissa kasteltu kuitutyyny sekä sen päälle suodatinpaperi, geeli, blottauspuskurissa 15 minuutin ajan tasapainotettu membraani, kostea suodatinpaperi sekä kuitutyyny. Lisäksi tarkistettiin, ettei geelin ja membraanin väliin jäänyt ilmaa. Koottu pino asetettiin telineeseen ja nostettiin altaaseen, jossa oli kylmää blottauspuskuria. Jäähdytysblokki asetettiin paikoilleen ja allas täytettiin kylmällä puskurilla. Proteiinit siirrettiin membraanille 100 V jännitteellä 90 minuuttin ajan (Bio-Rad Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Ajon jälkeen pino purettiin katodin puolelta.

4.2.6 Ponceau –värjäys

Ilmakuplien havaitsemiseksi membraanit värjättiin Ponceau –värillä (0,5 paino-% Ponceau-S, tilavuus-1% EtCOOH). Membraani upotettiin n. 30 sekunniksi väriliuokseen ja huuhdeltiin tislattulla vedellä, kunnes vesi ei enää värjäytynyt punaiseksi.

4.2.7 Membraanien käsittely

Värjäyksen jälkeen membraaneja huuhdeltiin tunnin verran 10%:ssa maitojauheliuoksessa. Maitojauheliuos oli valmistettu TBST:hen, joka sisälsi trispuskuroitua NaCl -liuosta (TBS, pH 7,5) 50 mM Tris-base, 0,9% NaCl, ja 1 ml TWEEN:iä (SIGMA Tween® 20, polyoxyethyenesorbitanmonolaurate, Sigma-Aldrich Co., USA). Tämän jälkeen membraanit käsiteltiin kanissa tuotetuilla primäärivasta-aineilla, joiden annettiin vaikuttaa membraanin päällä +4 °C yön yli. MCT1 –vasta-aine oli tuotettu ihmisen MCT1-proteiinin C-terminaalipeptidiä vastaan (Sigma Genosys, Englanti), MCT4-vasta-aine oli tuotettu ihmisen MCT4- proteiinin C-terminaalipeptidiä vastaan (Sigma Genosys, Englanti) sekä CD147 –vasta-aine oli lahjoituksena saatu antiseerumi (prof. Mawby, Univ. Bristol, Englanti). Vasta-ainekäsittelyn jälkeen membraaneja huuhdeltiin nopeasti pari kertaa TBST:llä. Tämän jälkeen membraaneja pestiin 15 ensin minuutin ajan, sekä sen jälkeen kaksi kertaa 5 minuutin ajan TBST:llä. Toisessa vasta-ainekäsittelyssä membraanit käsiteltiin vuohessa tuotetulla HRP -(horse

radish peroxidase) leimatulla antikanivasta-aineella (DakoCytomation Rabbit Immunoglobulins, Tanska). Sekundäärivasta-aineen annettiin vaikuttaa tunnin ajan, jonka jälkeen membraanit huuhdottiin pari kertaa nopeasti ja pestiin 15 minuutin ajan TBST:llä. Tämän jälkeen membraanit pestiin vielä kolme kertaa 5 minuutin ajan.

4.2.8 Kuvantaminen

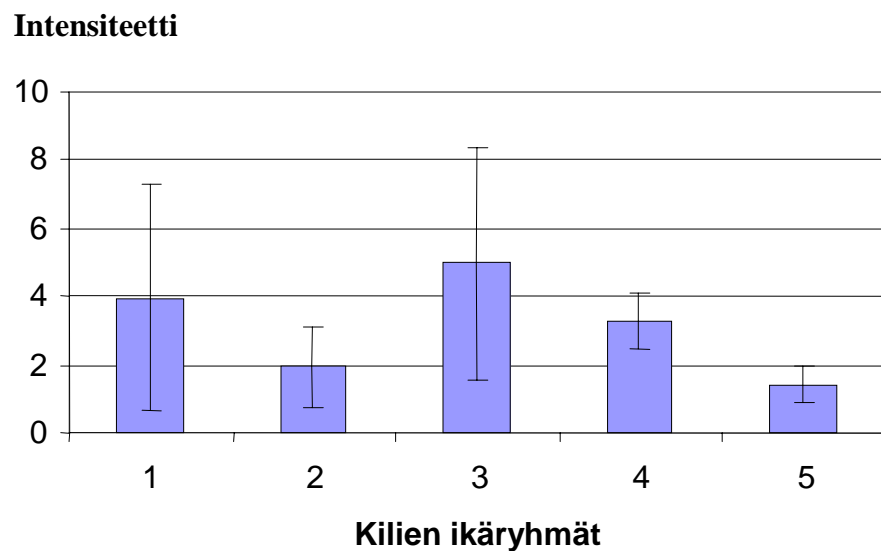
Proteiineja värjättiin 10 minuutin ajan tuikeluoksella (PIERCE SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Pierce Biotechnology Inc., USA). Tämän jälkeen membraaneista valutettiin ylimääräinen neste suodatinpaperiin, jonka jälkeen membraanit asetettiin muovitaskuun. Membraanien kemiluminesenssi kuvattiin (Bio-Rad GS-525 Molecular Imager, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) 20 minuutin valotusajalla ja tulokset käsiteltiin MultiAnalyst –ohjelmalla (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA).

5 TULOKSET

5.1 Homogenaattitulokset

5.1.1 Monokarboksylaattikuljettaja 1

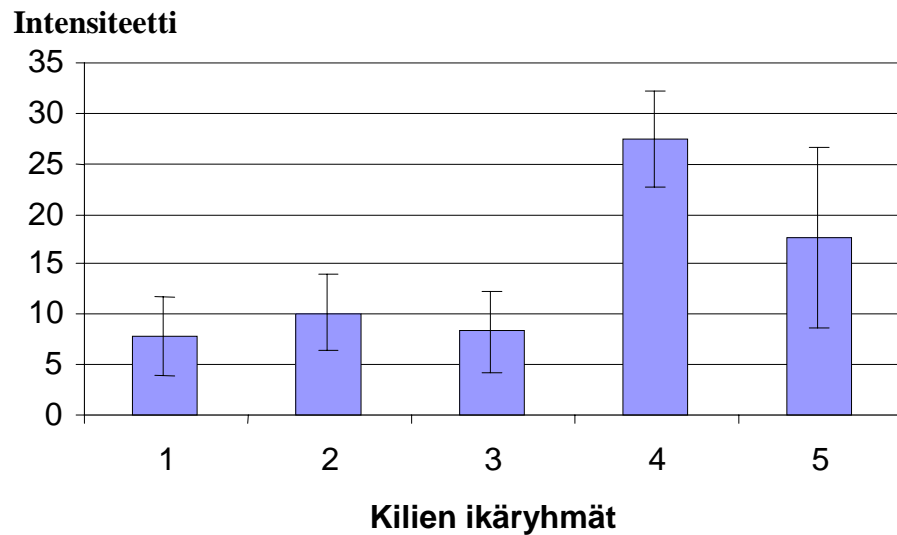
MCT1-isoformin määrissä ei havaittu korrelaatiota iän kanssa. Vajaan vuorokauden sekä 2 viikon ikäisissä MCT1-arvojen vaihteluväli oli suuri, kun taas 1 ja 8 viikon ikäisten lukuarvoissa hajonta oli pienempi.



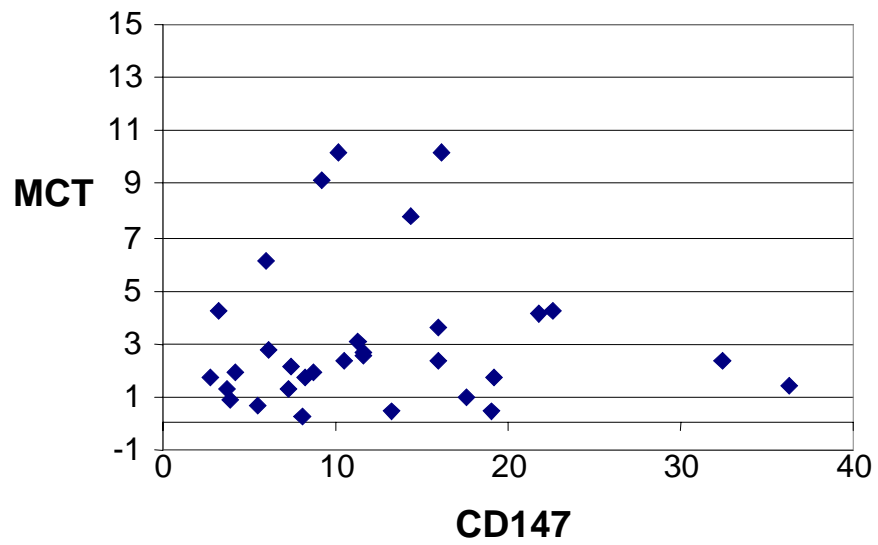
Kuva 4. MCT1-proteiinin keskiarvot ja hajonta (janat) eri ikäryhmissä. 1= 0 vrk, 2= 7 vrk, 3= 14-15 vrk, 4= 20-27 vrk ja 5= 50-57 vrk. Y-akselin yksikkö kuvaa signaalin voimakkuutta kuvantamislaitteessa.

5.1.2 CD147

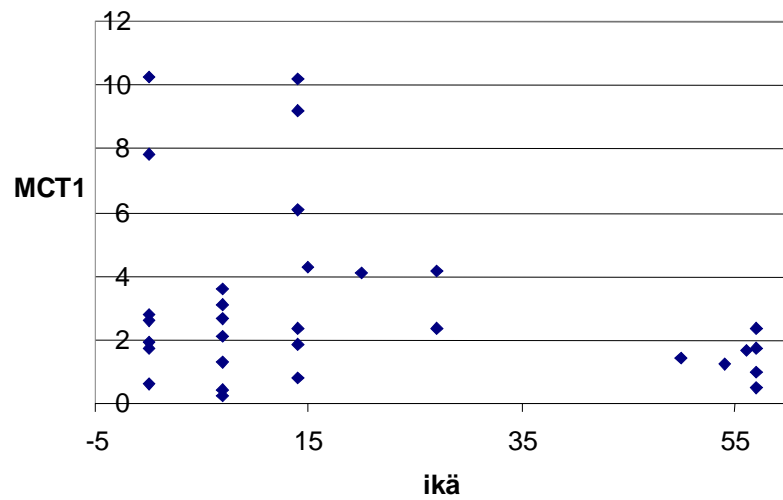
CD147:n määrät pysyivät tasaisina 2 viikon ikään asti. 3-4 viikon ikäisillä CD147- määrät nousivat merkitsevästi verrattuna 2 viikon ikäisiin kileihin ($p < 0,05$), jonka jälkeen ne hieman laskivat 8 viikon iässä, mutta määrät olivat kuitenkin merkitsevästi suurempia kuin 2 viikon ikäisillä ($p < 0,05$). CD147-proteiinilla havaittiin korrelaatio iän kanssa ($p < 0.01$). MCT1:n ja CD147:n välillä ei havaittu korrelaatiota.



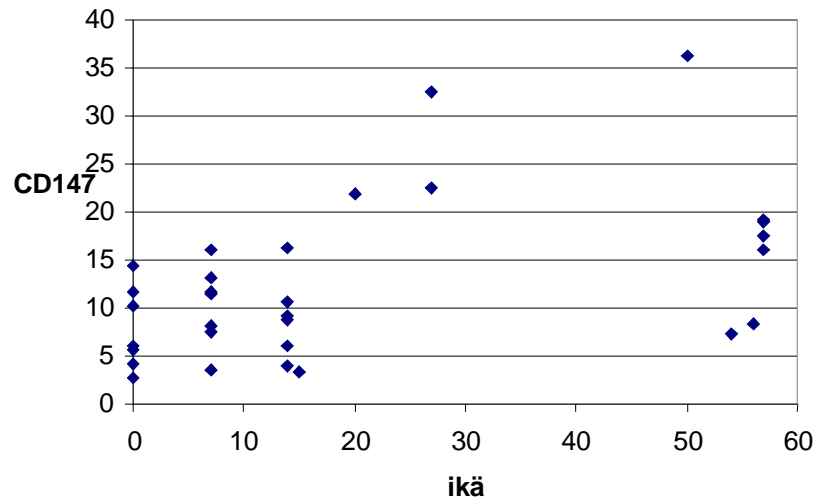
Kuva 5. CD147-proteiinin keskiarvot ja hajonta (janat) eri ikäryhmissä. 1= 0 vrk, 2= 7 vrk, 3= 14-15 vrk, 4= 20-27 vrk ja 5= 50-57 vrk. Y-akselin yksikkö kuvaa signaalin voimakkuutta kuvantamislaitteessa.



Kuva 6. CD147:n ja MCT1:n välinen korrelaatio. Korrelaatio ei ollut tilastollisesti merkittävä.



Kuva 7. MCT1-proteiinin arvot ikäryhmittäin. Ikä esitetty kuvassa vuorokausina.



Kuva 8. CD147-proteiinin arvot ikäryhmittäin. Ikä esitetty kuvassa vuorokausina.

5.1.3 Monokarboksylaattikuljettaja 4

Pötsinäytteistä ei löydetty MCT4-isoformia.

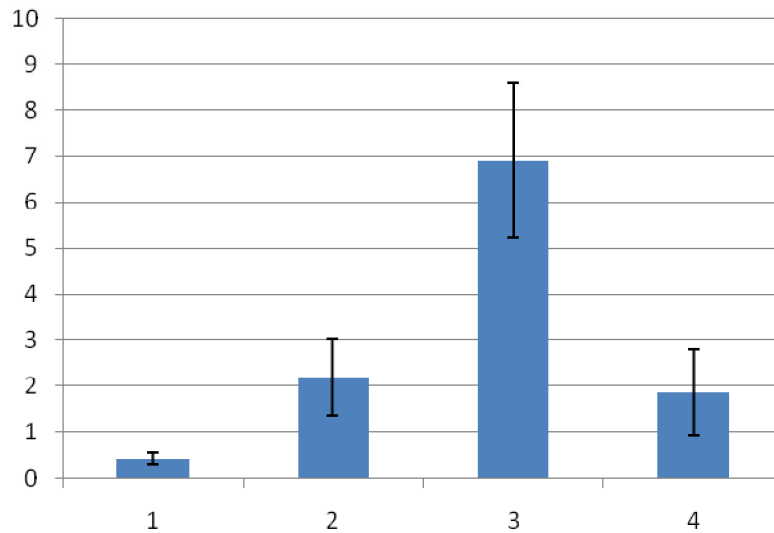
5.2 Membraanitulokset

Membraanitulokset on otettu tutkimusryhmän tuloksista.

5.2.1 Monokarboksylaattikuljettaja 1

Vastasyntyneillä kileillä MCT1-proteiinin määrä oli huomattavasti pienempi kuin vanhemmilla kileillä, ja proteiinin määrä kasvoi iän myötä kahden

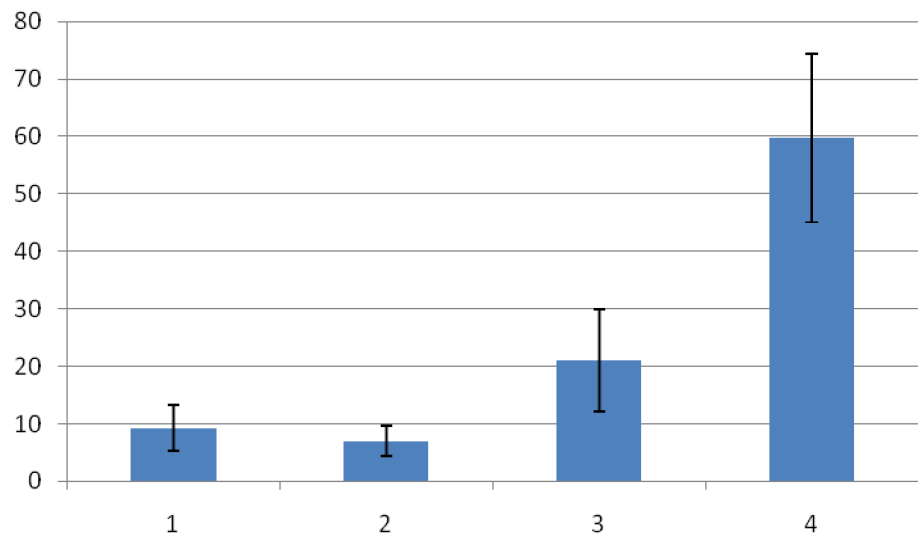
viikon ikään asti. Kahdeksan viikon ikäisillä kileillä proteiinin määrä oli kuitenkin merkitsevästi pienempi kuin kahden viikon ikäisillä kileillä ($p < 0.05$). Korrelaatio iän suhteen ei ollut tilastollisesti merkitsevä.



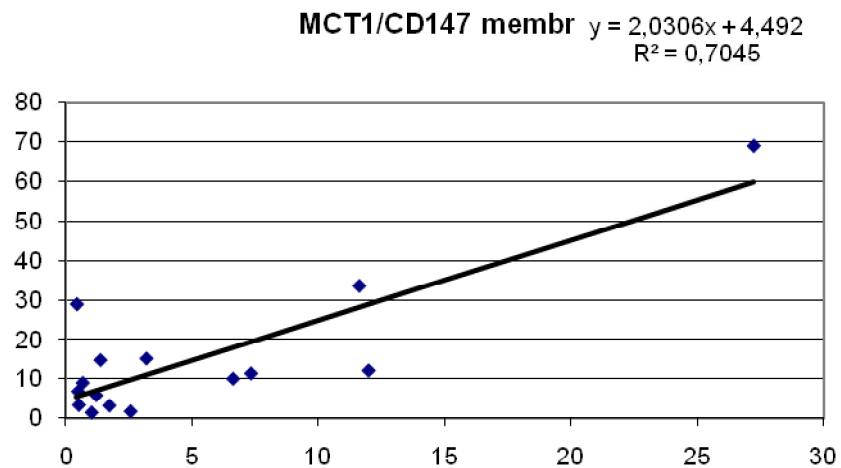
Kuva 10. MCT1-proteiinin keskiarvot ja hajonta (janat) eri ikäryhmissä. 0 vuorokauden (1), 1 viikon (2), 2 viikon (3) sekä 8 viikon (4) iässä. Y-akselin yksikkö kuvaa signaalin voimakkuutta kuvantamislaitteessa.

5.2.2 CD147

CD147-proteiinia oli havaittavissa jo vastasyntyneiden kilien pötsinäytteissä. Määrä pötsinäytteissä kasvoi lineaarisesti iän mukana ($p < 0.001$). Kahdeksan viikon ikäisten kilien pötsinäytteissä oli merkitsevästi enemmän CD147-proteiinia kuin viikon ikäisten kilien pötsinäytteissä ($p < 0.01$). MCT1-isoformin sekä CD147-proteiinin välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä korrelaatio ($p < 0.001$).



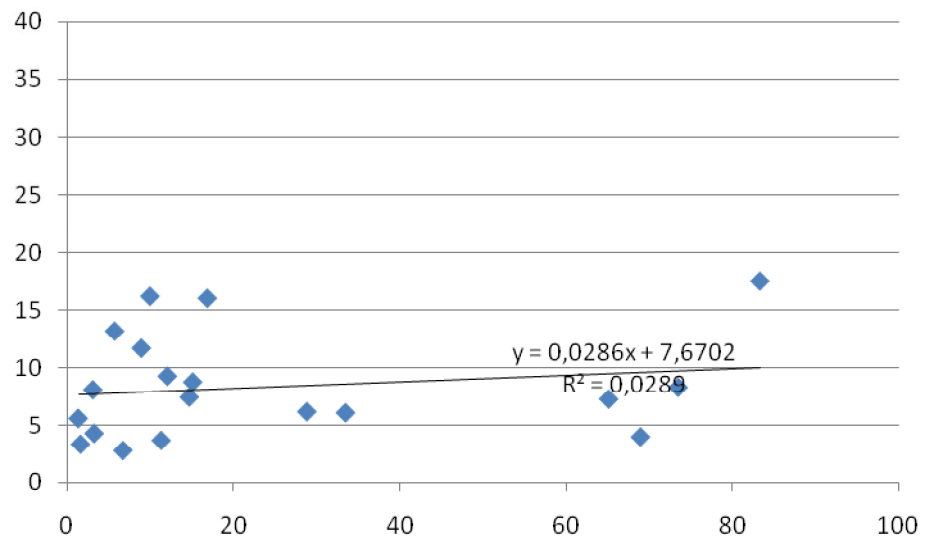
Kuva 11. CD147-proteiinin keskiarvot ja hajonta (janat) eri ikäryhmissä. 0 vuorokauden (1), 1 viikon (2), 2 viikon (3) sekä 8 viikon (4) iässä. Y-akselin yksikkö kuvaa signaalin voimakkuutta kuvantamislaitteessa.



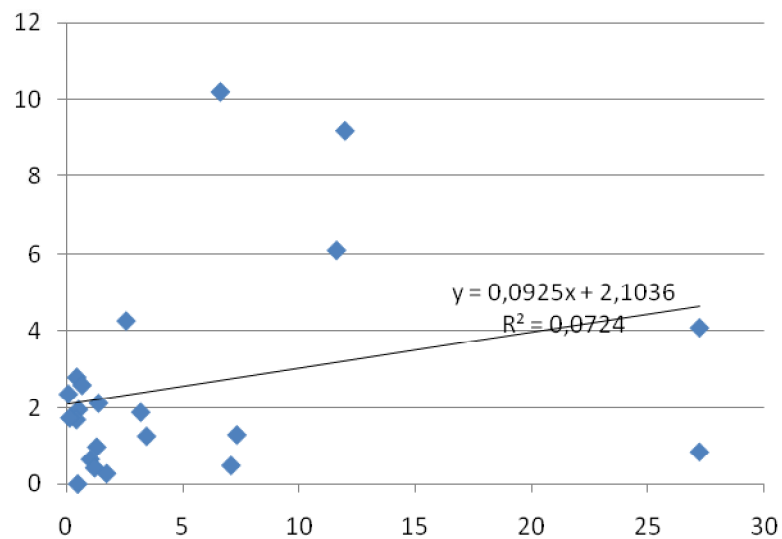
Kuva 12. MCT1- ja CD147-proteiinien välinen suhde pötsissä ($P < 0.001$).

5.2.3 Homogenaatti- ja membraanitulosten vertailu

Verrattaessa homogenaattituloksia ja membraanituloksia, kummankaan proteiinin tulosten välillä ei ollut havaittavissa korrelaatiota.



Kuva 13. CD147-proteiinin homogenaattitulosten ja membraanitulosten välinen suhde.



Kuva 14. MCT1-isoformin homogenaattitulosten ja membraanitulosten välinen suhde.

6 POHDINTA

6.1 MCT -proteiinit

Pötsin seinämän monokarboksylaattikuljettajien tehtävänä on kuljettaa mikrobikäymisestä syntyneet haihtuvat rasvahapot pötsin epiteelin basolateraalimembraanin läpi verenkiertoon, jonka mukana ne edelleen kulkeutuvat käytettäväksi märehitjän aineenvaihdunnassa. Märehitjän elämän alkupäivinä pötsissä ei kuitenkaan synny haihtuvia rasvahappoja, koska mikrobiflora on vasta kehittymässä ja eläimen ravintona käyttämä maito kulkeutuu märekourua pitkin etumahojen ohi. Näin ollen monokarboksylaattikuljettajilla ei vastasyntyneen märehitjän pötsissä vielä ole mitään tehtäviä. Tämän tutkimuksen perusteella vastasyntyneiden kilien pötsistä kuitenkin löytyy ainakin MCT1-isoformia, joka viittaa siihen, että märehitjällä on syntymästään lähtien resursseja kuljettaa haihtuvia rasvahappoja pötsin epiteelin läpi.

Samankaltaisia tuloksia pötsin epiteelin toimintakyvystä vastasyntyneillä karitsoilla ovat saaneet mm. Baldwin & Jesse (1992). Tutkimuksessa todettiin, että vastasyntyneiden karitsojen pötsin epiteeli kykenee hapettamaan sekä haihtuvia rasvahappoja että glukoosia, mutta hapettavat alkuvaiheessa glukoosia, koska sitä on eniten saatavilla. Myöhemmin epiteelisolut siirtyvät glukoosin hapetuksesta haihtuvien rasvahappojen hapetukseen, kun pötsiin alkaa mikrobifermentaation seurauksena kertyä haihtuvia rasvahappoja. Poron vasoilla tehdyssä

tutkimuksessa löydettiin pötsin seinämästä sekä MCT1- että MCT4-isoformia. Lisäksi MCT1-isoformin ja CD147-proteiinin määrien välillä oli positiivinen korrelaatio (Koho ym. 2005). Myös vasikoilta on tutkittu pötsin seinämän monokarboksylaattikuljettajia, ja ainakin MCT1-isoformia on löydetty (Kirat ym. 2005).

Homogenaattinäytteissä ei havaittu eroja eri ikäryhmien välillä, mutta solukalvonäytteissä MCT1-isoformin määrä kasvoi iän mukana. Kahdeksan viikon ikäisillä kileillä MCT1-isoformin määrät vähenivät kuitenkin merkittävästi. Tämä voi johtua siitä, että vanhemmilla kileillä pötsin seinämä on paksumpi, jolloin näytteeseen on voinut joutua enemmän muuta materiaalia pötsin seinämän kerroksista. Toisaalta myös vanhimmat koe-eläimet olivat saaneet ravintonaan vielä jonkin verran maitoa, joten lisätutkimuksia, joissa mukana olisi myös jo täysin kiinteää ravintoa syöviä kilejä, täytyisi vielä tehdä jotta tuloksista saataisiin yksiselitteisempiä.

MCT4-isoformia ei löytynyt ollenkaan näytteistä. Tämä voi johtua mm. siitä, että ihmisen MCT:tä vastaan tehty vasta-aine ei ole tunnistanut kilin MCT4-proteiinia, tai että MCT4-isoformia on ollut kudoksissa niin vähän, että se ei näy. Ensimmäistä teoriaa tukee se, että MCT4-isoformi ei ole yhtä konservoitu kuin esimerkiksi MCT1, joten sen tutkimiseksi tarvittaisiin lajispesifinen vasta-aine. Jälkimmäistä teoriaa tukisi lampaan pötsin epiteelin MCT1-isoformista tehty tutkimus (Müller ym. 2002), jossa todetaan että haihtuvien rasvahappojen kuljetuksen epiteelin läpi mahdollistaa lähinnä MCT1, ja muilla isoformeilla ei juuri ole merkitystä. Tässä tutkimuksessa, sekä muutamassa muussa (Tamai ym. 1995, Garcia ym.1995, Orsenigo ym. 1999 ja Ritzhaupt ym.1998), ei

kuitenkaan ole kuin todistettu MCT1-isoformin löytyminen ruuansulatuskanavasta. Muiden MCT-isoformien osalta olisi tehtävä lisää tutkimuksia käyttäen lajispesifisiä vasta-aineita, jotta voitaisiin todella varmistaa niiden puuttuminen ruuansulatuskanavan alueelta.

6.2 CD147

Homogenaattinäytteissä MCT1- ja MCT4-isoformien solukalvolle siirtymisessä avustavan CD147-proteiinin ei havaittu korreloivan kilien iän tai MCT-isoformien kanssa. CD147:n määrät pysyivät tasaisina 3 viikon ikään asti, jonka jälkeen ne nousivat merkitsevästi. 8 viikon ikäisillä kileillä CD147-määrät olivat kuitenkin matalampia kuin 3-4 viikon ikäisillä. Solukalvonäytteissä CD147-määrän havaittiin kasvavan lineaarisesti iän mukana. Nämä muutokset saattavat olla yhteydessä ikään, jolloin eläin alkaa syödä kiinteää ravintoa maidon lisäksi.

Kilien pötsien sisältö tarkastettiin näytteidenoton yhteydessä. Viikon ikäisillä kileillä pötsissä oli jonkin verran rehua, enimmäkseen purua. 3-4 viikon ikäisillä kileillä pötsissä oli runsaasti vihreää velliä, ja 8 viikon ikäisillä kileillä kaikilta löytyi pötsistä rehua. Tämä tulos on samankaltainen kuin karitsoilla tehty tutkimus, jossa niiden havaittiin alkavan syödä kiinteää ravintoa 2-3 viikon iässä (Walker ym. 1962). Samassa tutkimuksessa havaittiin myös, että aluksi pötsin epiteelisolujen butyraatin käyttö oli pienempää kuin aikuisella lampaalla, ylitti 3 viikon

iässä aikuisen tason ja pysyi aikuista lammasta korkeammalla n. 11 viikon ikään asti. Näistä tuloksista voitaisiin päätellä, että eläimen alkaessa syödä kiinteää ravintoa, haihtuvien rasvahappojen muodostus alkaa, josta seuraa, että kuljettajaproteiineja on saatava epiteelisolujen pinnalle. Tämän seurauksena kuljettajaproteiinien siirtymistä solukalvolle avustavan CD147-proteiinin määrä kasvaa. Kun haihtuvat rasvahapot kulkeutuvat solujen sisään, solut voivat käyttää niitä energianlähteenä ja niiden hapetus kiihtyy. N. 8-11 viikon iässä tilanne tasoittuu ja haihtuvien rasvahappojen hapetusnopeus laskee aikuisen märehitijän tasolle.

6.3 Virhelähteet

Tutkimuksessa käytettyjen vasta-aineiden ei ole todistettu toimivan vuohen MCT-proteiineja vastaan, sillä vuohen MCT-proteiinien C-terminaalisen päään sekvenssiä, johon vasta-aine kiinnittyy, ei tunneta. Käytetyt vasta-aineet olivat myös vanhoja. Ensimmäisen tyhjän MCT4-geelin jälkeen vasta-aineiden toimivuus testattiin villisian lihaksesta tehdyllä näytteellä, josta on aikaisemmin todettu löytyvän MCT4-isoformia (Sepponen 2008). Vasta-aine toimi hyvin villisiassa.

Virhelähteitä laboratoriotöissä voi tämän lisäksi olla useita, sillä Western blot ei menetelmänä ole toistettavuudeltaan hyvä välivaiheiden runsauden takia.

Tulosten perusteella homogenaatti ei ole hyvä tapa mitata membraaniproteiinien määrää.

7 KIITOKSET

Kiitokset työn johtajalle dosentti Reeta Pösölle sekä työn ohjaajalle yliopistonlehtori Ninna Koholle kärsivällisestä ja perusteellisesta ohjauksesta. Kiitokset myös ELL Annamari Nuutiselle kirjoitusseurasta.

8 KIRJALLISUUS

Anderson, K.L., Nagaraja, T.G., Morill, J.L., Avery, T.B., Galizer, S.J. & Boyer, J.E. Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64, 1987. 1215-1226

Baldwin VI, R.L. & Jesse, B.W. Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells. *J. Nutr.* 122, 1992. 1149-1153

Beharka, A.A., Nagaraja, T.G., Morrill, J.L., Kennedy, G.A. & Klemm, R.D. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 81, 1998. 1946-1955

Bergman, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70, 1990. 567-590

Bröer, S., Bröer, A., Schneider, H.-P., Stegen, C., Halestrap, A.P. & Deitmer, J.W. Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 341, 1998. 529-535

Champe, P.C. & Harvey, R.A. *Biochemistry*. Lippincott, 2.p., 1994. 76

Cunningham, J.G. (ed.) *Textbook of veterinary physiology*. W.B. Saunders Company, 3.p., 2002. 280-303

Dimmer, K.-S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J.W. & Bröer, S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem. J.* 350, 2000. 219-227

Dinsdale, D., Cheng, K.-J., Wallace, R.J. & Goodlad, R.A. Digestion of epithelial tissue of the rumen wall by adherent bacteria in infused and conventionally fed sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1980. 1059-1066

Finch, N.A., Linser, P.J. & Ochrietor, J.D. Hydrophobic Interactions Stabilize the Basigin-MCT1 Complex. *Protein J.* 28, 2009. 362–368

Friesema, E.C.H., Ganguly, S., Abdalla, A., Manning Fox, J.E., Halestrap, A.P. & Visser, T.J. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.* 278, 2003. 40128-40135

Garcia, C.K., Brown, M.S., Pathak, R.K. & Goldstein, J.L. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J. Biol. Chem.* 270, 1995. 1843-1849

Godfrey, N.W. The functional development of the calf II. Development of rumen function in the calf. *J. Agric. Sci.* 57, 1961. 177-183

Grollman, E.F., Philp, N.J., McPhie, P., Ward, R.D. & Sauer, B. Determination of transport kinetics of chick MCT3 monocarboxylate transporter from retinal pigment epithelium by expression in genetically modified yeast. *Biochemistry* 39, 2000. 9351-9357

Gäbel, G. & Sehested, J. SCFA transport in the forestomach of ruminants. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A, 1997. 367-374

Halestrap, A.P. & Price, N.T. The proton-linked monocarboxylate transporter family: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 343, 1999. 281-299

Halestrap, A.P. & Meredith, D. The SLC16 gene family – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Eur. J. Physiol.* 447, 2004. 619-628

Kim, D.K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S.H. & Endou, H. Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid

transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. J. Biol. Chem. 276, 2001. 17221-17228

Kirat, D., Inoue, H., Iwano, H., Hirayama, K., Yokota, H., Taniyama, H. & Kato, S. Expression and distribution of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in the gastrointestinal tract of calves. Res. Vet. Sci. 79, 2005. 45-50.

Kirat, D., Masuaka, J., Hayashi, H., Iwano, H., Yokota, H., Taniyama, H. & Kato, S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. J. Physiol. 576, 2006. 635-647.

Kirk, P., Wilson, M.C., Heddle, C., Brown, M.H., Barclay, A.N. & Halestrap, A.P. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. EMBO J. 19, 2000. 3896-3904

Koho, N.M., Väihkönen, L.K. & Pösö, A.R. Lactate transport in red blood cells by monocarboxylate transporters. Equine Vet. J., Suppl. 34, 2002. 555-559

Koho, N.M., Maijala, V., Norberg, H., Nieminen, M. & Pösö, A.R. Expression of MCT1 and MCT4 in the rumen, small intestine and liver of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus L.*). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 141, 2005. 29-34.

Lane, M.A. & Jesse, B.W. Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in neonatal sheep. *J. Dairy Sci.* 80, 1997. 740-746

Lane, M.A., Baldwin, R.L. & Jesse, B.W. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments. *J. Anim. Sci.* 78, 2000. 1990-1996

Manning Fox, J.E., Meredith, D. & Halestrap, A.P. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J. Physiol.* 529, 2000. 285-293

Müller, F., Huber, K., Pfannkuche, H., Aschenbach, J.R., Breves, G. & Gäbel, G. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, 2002. G1139-G1146

Orsenigo, M.N., Tosco, M., Bazzini, C., Laforenza, U. & Faelli, A. A monocarboxylate transporter MCT1 is located at the basolateral pole of rat jejunum. *Exp. Physiol.* 84, 1999. 1033-1042

Poole, R.C. & Halestrap, A.P. Identification and partial purification of the erythrocyte L-lactate transporter. *Biochem J.* 283, 1992. 855-62.

Poole, R.C. & Halestrap, A.P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am. J. Physiol.* 264, 1993. C761-C782

Poole, R.C., Sansom, C.E. & Halestrap, A.P. Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H⁺/lactate cotransporter (MCT1). *Biochem. J.* 320, 1996. 817-824

Price, N.T., Jackson, V.N. & Halestrap, A.P. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem. J.* 329, 1998. 321-328

Ritzhaupt, A., Wood, I.S., Ellis, A., Hosie, K.B. & Shirazi-Beechey, S.P. Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J. Physiol.* 513, 1998. 719-732

Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W. *Histology - A Text and Atlas.* Lippincott Williams & Wilkins, 4.p., 2003. 502-503

Russel, J.B. & Dombrowski, D.B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1980. 604-610

Sander, E.G., Warner, R.G., Harrison, H.N. & Loosli, J.K. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *J. Dairy Sci.* 42, 1959. 1600-1605

Sepponen, K. Monocarboxylate transporters and heat shock proteins in domestic pigs in relation to stress and meat quality. Väitöskirja. Helsingin yliopisto, 2008

Sepponen, K., Koho, N., Puolanne, E., Ruusunen, M. & Pösö, A.R. Distribution of monocarboxylate transporter isoforms MCT1, MCT2 and MCT4 in porcine muscles. *Acta Physiol. Scand.* 177, 2003. 79-86

Staffler, G. & Stockinger, H. CD147. *Biol. Regul. Homeost. Agents* 14, 2000. 327-330

Tamai, I., Takanaga, H., Maeda, H., Sai, Y., Ogihara, T., Higashida, H. & Tsuji, A. Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 1995. 482-489

Walker, D.M. & Simmonds, R.A. The development of the digestive system of the young animal VI. The metabolism of short-chain fatty acids by the rumen and caecal wall of the young lamb. *J. Agric. Sci.* 59, 1962. 375-379

Wardrop, I.D. Some preliminary observations on the histological development of the fore-stomachs of the lamb. *J. Agric. Sci.* 57, 1961. 343-346

Wilson, M.C., Meredith, D. & Halestrap, A.P. Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT1 and CD147 provide information on the transporter and stoichiometry of the complex *in situ*. *J. Biol. Chem.* 277, 2002. 3666-3672

Yoon, H., Fanelli, A., Grollman, E.F. & Philp, N.J. Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 1997. 90-94