

SOLUKALVOON SITOUTUVIEN HIILIHAPPOANHYDRAASIEN ILMENTYMINEN PUNASOLUISSA

Sini Sutinen

Syventävien opintojen opinnäytetyö

Tampereen yliopisto

Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta

Tammikuu 2018

Tampereen yliopisto
Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta

SUTINEN SINI: SOLUKALVOON SITOUTUVIEN HIILIHAPPOANHYDRAASIEN ILMENTYMINEN
PUNASOLUISSA

Kirjallinen työ, 18 s
Ohjaaja: professori Seppo Parkkila

Tammikuu 2018

Avainsanat: verisively, immunosytokemia, CA IV, hiilidioksidi, bikarbonaatti

Punasolujen hiilihappoanhydraasien tärkein fysiologinen tehtävä on taata hiilidioksidin tehokas kuljetus perifeerisistä kudoksista keuhkoihin. Solulimassa sijaitsevat hiilihappoanhydraasi-isomuodot katalysoivat tehokkaalle kuljetukselle välttämätöntä hiilidioksidin hydraatioreaktiota bikarbonaatiksi. Myös useita solukalvoon sitoutuvia isomuotoja esiintyy elimistössä, mutta punasoluissa niiden ilmentymistä ei ole juurikaan tutkittu.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ilmentävätkö punasolut solukalvoon sitoutuvia hiilihappoanhydraaseja (CA IV, CA IX, CA XII ja CA XIV). Aihe on merkityksellinen hengitykseen liittyvän fysiologian kannalta, sillä nykytiedon mukaan hiilidioksidin hydraatiota tapahtuu entsyymien katalysoimana ainoastaan solun sisällä. Pääasiallisena tutkimusmenetelmänä käytettiin perifeerisen veren sivelynäytteiden epäsuoraa immunofluoresenssivärjäystä.

Sivelynäytteissä nähtiin positiivista värjäytymistä puna- ja valkosoluissa kaikille tutkittaville isoentsyymeille paitsi CA IX:lle. Western blot, RNA-sekvensointi tai massaspektrometria ei kuitenkaan tue löydöksiä punasoluissa, ja tulokset jäivät siten epävarmoiksi. Vahvimmin positiivisia löydökset olivat CA IV:n kohdalla, ja pieni mahdollisuus jää, että punasolujen solukalvolla voisi olla vähäinen määrä CA IV-aktiivisuutta. Tulosten varmentaminen CA IV:n osalta ja solukalvoon sitoutuvien CA-isomuotojen ilmentyminen valkosoluissa edellyttävät jatkotutkimuksia.

Tämän opinnäytteen alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-ohjelmalla Tampereen yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti.

Lyhenteet

BSA = bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini

BSA-PBS = PBS, joka sisältää 1 % naudan seerumin albumiinia

CA = hiilihappoanhydraasi

CAGE = cap analysis of gene expression

CARP = carbonic anhydrase related protein, hiilihappoanhydraasin kaltainen proteiini

GPI = glykofosfoinositoli

mRNA = lähetti-RNA

PBS = phosphate-buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos

PAGE = polyakryyliamidi-geelielektroforeesi

SDS = natriumlauryylisulfaatti

Sisällys

1 JOHDANTO	1
1.1 PUNASOLUJEN CA:T	2
1.2 SOLUKALVOON SITOUTUVIEN CA-ENTSYMIEN OMINAISUUDET JA ILMENTYMINEN KUDOKSISSA	3
1.2.1 CA IV:N ILMENTYMINEN KUDOKSISSA	4
1.2.2 CA IX:N ILMENTYMINEN KUDOKSISSA	5
1.2.4 CA XIV:N ILMENTYMINEN KUDOKSISSA	6
2 MENETELMÄT	7
2.1 IMMUNOSYTOKEMIAALLISET VÄRJÄYKSET	7
2.1.1 VASTA-AINEET	7
2.1.2 SIVELYNÄYTTEIDEN VALMISTUS	7
2.2 WESTERN BLOT	8
2.3 BIOINFORMATIIKKA	8
3 TULOKSET	9
3.1 IMMUNOSYTOKEMIA	9
3.1.1 CA IV	10
3.1.2 CA XII	10
3.1.3 CA XIV	11
3.2. WESTERN BLOT	12
3.3 RNA-SEKVENSOINTI JA TIETOKANTAHAUT	12
4 POHDINTA	13
LÄHDELUETTELO	17

1 JOHDANTO

Hiilihappoanhydraasit (CA:t) ovat sinkkiä sisältäviä entsyymejä, jotka katalysoivat molempiin suuntiin tapahtuvaa tasapainoreaktiota, jossa hiilidioksidista ja vedestä muodostuu protoneja ja bikarbonaattia: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. Reaktio tapahtuu myös spontaanisti, mutta hyvin hitaasti. Se on keskeinen monien fysiologisten ja metabolisten prosessien, kuten elimistön pH-tasapainon säätelyn, hengityksen, ureageneesin ja glukoneogeneesin kannalta. Siksi käytännössä kaikki kudokset ja solut ilmentävät yhtä tai useampaa rakenteeltaan ja katalyyttiseltä aktiivisuudeltaan toisistaan eroavaa CA-isoentsyymiä. Ihmiseltä on löydetty 15 eri CA-isomuotoa, jotka kuuluvat kaikki α -CA-geeniperheeseen. Katalyyttisesti aktiivisia solulimaan paikantuvia isomuotoja on viisi (CA I, II, III, VII ja XIII) ja solukalvoon sitoutuneita muotoja neljä (CA IV, IX, XII ja XIV). Lisäksi ihmisellä on mitokondrioissa sijaitsevat CA VA ja VB sekä maitoon ja sylkeen eritettävä CA VI. Jäljelle jäävät kolme isomuotoa ovat katalyyttisesti inaktiivisia CARP:ja (carbonic anhydrase related protein). (1-3)

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, ilmentävätkö punasolut solukalvoon sitoutuvia CA-isoentsyymejä. Punasolujen CA-entsyymejä on aiemmin tutkittu paljon, ja entsyymi on alun perin ensimmäisenä löydetty juuri punasoluista (1). Harvoin mielenkiinnon kohteena on kuitenkaan ollut solukalvoon sitoutuvien isoentsyymien ilmentyminen, eikä 2000-luvulla ole julkaistu lainkaan tutkimuksia aiheesta. Ainoastaan CA IV:n ilmentymistä on tutkittu aiemmin ja Wistrand ym. (1999) ovat raportoineet löytäneensä vähäistä CA IV-aktiivisuutta punasoluista. Löydöstä ei kuitenkaan ole vahvistettu myöhemmin, ja edeltävissä tutkimuksissa vähemmän herkillä menetelmillä CA-aktiivisuutta ei ole havaittu solukalvolla (1,4). Lähtökohtana tälle tutkimukselle toimi Medisapiens Oy:n (<https://www.medisapiens.com/>) mikrosirutekniikalla tuottama data solukalvoon sitoutuvien CA-isoentsyymien lähetti-RNA:n (mRNA:n) ilmentymistasoista retikulosyyteissä. Tasot olivat merkittäviä verrattuna soluihin ja kudoksiin, joiden tiedetään ilmentävän tutkittavia isoentsyymejä. Kypsissä punasoluissa ilmentymistä tutkittiin alustavasti Western blotilla, jonka tulokset jäivät osittain ristiriitaisiksi. Tässä raportissa käsitellään pääasiassa immunosytokemiallisella menetelmällä saatuja tuloksia, joiden tueksi ja varmistamiseksi

suoritettiin lisäanalyyskejä bioinformatiikan ja -analytiikan menetelmiä hyödyntäen.

Tutkimusraportti toimii lääketieteen lisensiaatin tutkinnon syventävien opintojen opinnäytetyönä.

1.1 Punasolujen CA:t

Punasolut ovat hengityskaasujen kuljetukseen erikoistuneita verisoluja. Ne menettävät tumansa erilaistumisensa loppuvaiheessa, minkä vuoksi niillä ei ole omaa proteiinisynteesiä. Retikulosyytit ovat punasolujen tumattomia esiasteita, jotka vielä kykenevät proteiinisynteesiin, sillä ne sisältävät ribosomeja ja aerobiseen energiantuottoon vaadittavia mitokondrioita. Myöhemmin kypsymisen edetessä soluelimet surkastuvat, ja suurimman osan solulimasta kypsissä punasoluissa täyttää hapen kuljetukseen tarvittava hemoglobiini ja erilaiset entsyymit, joista yleisimpiä ovat hiilihappoanhydraasit. Punasoluissa on kahta solulimaan paikantuvaa hiilihappoanhydraasia, CA I:ä ja CA II:a, joista CA I:n pitoisuus solussa on suurempi. Toisaalta CA II on katalyyttisesti aktiivisempi, joten suurin osa punasolujen CA-aktiivisuudesta on nimenomaan CA II-aktiivisuutta. (1,5)

Punasolujen CA-entsyymien tärkein tehtävä liittyy solujen aineenvaihdunnassa syntyneen hiilidioksidin kuljetukseen perifeerisistä kudoksista keuhkoihin uloshengitettäväksi. Hiilidioksidi siirtyy punasoluihin diffuusion avulla ensisijaisesti akvaporiinien ja rhesuskompleksin (Rh-kompleksi) kautta (3). Punasolun solulimassa CA katalysoi hiilidioksidin hydraation paremmin liukenevaan muotoon bikarbonaatiksi, mikä mahdollistaa kuljetuksen osittain veri-plasmassa. Varauksensa vuoksi bikarbonaatti ei pysty siirtymään suoraan solukalvon läpi takaisin plasmaan, vaan se tarvitsee kuljetukseen kloridi-bikarbonaattivaihtajan ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -vaihtaja, AE1). CA II sitoutuu AE1-kuljettimiin ja lisää siten niiden aktiivisuutta (6). Noin 20 % soluihin siirtyneestä hiilidioksidista sitoutuu hemoglobiiniin, ja pieni osa myös liukenee tai konvertoituu spontaanisti bikarbonaatiksi ja protoneiksi plasmassa. (1,3) Aiemmassa tutkimuksessa punasolujen ulkopinnalta on löydetty vähäisiä määriä solukalvoon sitoutunutta CA IV-entsyymiä (4). Jos punasolujen pinnalla olisi solunulkoista CA-aktiivisuutta, se tehostaisi systeemissä hiussuonissa tapahtuvaa hiilidioksidin hydraatiota, joka nykytiedon mukaan tapahtuu entsyymin katalysoimana ainoastaan solun sisällä.

Keuhkojen alveolaarissa hiussuonissa bikarbonaatti dehydroidaan takaisin hiilidioksidiksi mahdollistaen siirtymisen keuhkorakkuloihin uloshengitettäväksi. Punasolujen CA:n lisäksi alveolaaristen hiussuonien endoteelisolujen CA IV katalysoi reaktiota. (1,3) Punasolujen soluliman

CA-aktiivisuus liittyy epäsuorasti myös hapen kuljetukseen Bohrin ilmiön vuoksi. Hemoglobiini puskuroi punasolun solunsisäistä pH:ta sitomalla hiilidioksidin hydraatiossa vapautuneita protoneja. Kun hemoglobiini sitoo protoneja, sen affiniteetti hapelle laskee, ja happea vapautuu solujen käyttöön systeemissä hiussuonissa. Keuhkoissa puolestaan punasolujen kyky kuljettaa happea lisääntyy, kun protoneja vapautuu hemoglobiinista bikarbonaatin dehydraation yhteydessä ja affiniteetti hapelle kasvaa. (1)

Punasolujen CA-aktiivisuus vaikuttaa myös merkittävästi elimistön happo-emästasapainon säätelyyn. Normaali aineenvaihdunta tuottaa elimistöön jatkuvasti happoja, jotka ensilinjassa elimistön puskurijärjestelmien ansiosta eivät aikaansaa pH-muutoksia solunulkoisissa nestetiloissa. Elimistön proteiinit voivat toimia puskureina, mistä tärkeimpänä esimerkkinä edellä kuvattu hemoglobiinin puskurivaikutus punasoluissa. Lisäksi epäorgaaniset yhdisteet muodostavat puskurijärjestelmiä, ja esimerkiksi fosfaatilla on pieni osuus elimistön kokonaispuskurikapasiteetista. Kuitenkin merkittävin osuus elimistön puskurikapasiteetista on bikarbonaattipuskurilla, jonka muodostavat hiilihappo ja sen konjugaattiemäs bikarbonaatti (3). Samalla merkittävin hapan aineenvaihduntatuote on hiilidioksidi sen hydraatiossa syntyvien protonien vuoksi. Punasolujen CA-aktiivisuus vaikuttaa siis suoraan puskurijärjestelmän komponenttien pitoisuuksiin, ja sen ansiosta ylimääräisten happojen tai emästen vaikutus pH-arvoon on mahdollista tasapainottaa nopeasti. Hengitystä säätelemällä voidaan vaikuttaa poistuvan hiilidioksidin määrään, ja ventilaatiota lisäämällä elimistöstä saadaan tarvittaessa tehokkaammin poistettua hiilidioksidin mukana happokuormaa. (3,7) Edellä kuvatut mekanismit reagoivat happo-emästasapainon muutoksiin nopeasti; puskurijärjestelmät välittömästi ja hengityksen säätely pienellä viiveellä. Pidemmällä aikavälillä munuaisten rooli happo-emästasapainon säätelyssä korostuu. Tähän aiheeseen palataan lyhyesti myöhemmin.

1.2 Solukalvoon sitoutuvien CA-entsyymien ominaisuudet ja ilmentyminen kudoksissa

Eri CA-isoentsyymien aktiivisuus eroaa suuresti toisistaan ja osa isomuodoista on katalyyttisesti täysin inaktiivisia. Kaikki solukalvoon sitoutuvat CA:t ovat kuitenkin korkean aktiivisuuden omaavia isomuotoja. Useissa pahanlaatuisissa kasvaimissa yli-ilmentyvä CA IX on katalyyttisesti hyvin aktiivinen (suurin mitattu $k_{cat} = 2,5 \times 10^7$) ja myös CA IV:n katalyyttinen aktiivisuus on korkea ($k_{cat} =$

$1,1 \times 10^6$). Kineettisiltä ominaisuuksiltaan samankaltaisten CA XII:n ja CA XIV:n aktiivisuus on puolestaan matalampi. (8)

Kaikkien solukalvolla ilmentyvien CA-entsyymien katalyyttinen keskus sijaitsee solun ulkopuolella. Katalyydistä vastaava aktiivinen kohta on rakenteeltaan hyvin samanlainen kaikissa isoentsyymeissä. Se sijaitsee kartion muotoisessa syvennyksessä, jonka pohjalla sinkki (Zn^{2+}) toimii entsyymin ko-faktorina sitomalla itseensä reaktiossa vesimolekyylistä syntyvän hydroksidi-ionin (OH^-). Zn^{2+} sitoutuu kolmeen histidiinitähteeseen (His94, His96, His119), jotka ovat säilyneet osana proteiinin rakennetta kaikissa isoentsyymeissä. Syvennyksen toisella reunalla sijaitsevat hydrofobiset aminohappotähteet, jotka muodostavat hydrofobisen taskun CO_2 :lle. Vastakkaisella reunalla on puolestaan hydrofiilisiä tähteitä, joiden läheisyyteen vesi ja OH^- hakeutuvat. Entsyymin aktiivisuuden kannalta tärkeä rakenne on protonisukkula (proton shuttle), joka nopeuttaa katalyyttistä reaktiota. His64-tähde muodostaa perustan sukkulan toiminnalle lähes kaikissa katalyyttisesti aktiivisissa isoentsyymeissä ja sen vaihtuminen toiseen aminohappotähteeseen johtaa katalyyttisen aktiivisuuden huomattavaan laskuun. (1,2)

Kuten edellä on kuvattu, CA-entsyymien aktiiviset keskukset ovat rakenteeltaan samankaltaisia. Muilla alueilla rakenteellisia eroja on kuitenkin enemmän, minkä vuoksi eri isomuodot eroavat ominaisuuksiltaan toisistaan. CA IX ja CA XII muodostavat dimeerejä, mutta CA IV ja CA XIV esiintyvät monomeereinä (9-11). Kaikissa solukalvoon sitoutuviissa isoentsyymeissä on molekyylin rakennetta stabiloiva kysteiinitähteiden (Cys-23 ja Cys-203) välinen disulfidisilta. CA IV sisältää lisäksi ylimääräisen disulfidisillan Cys-6 ja Cys-11 tähteiden välillä, minkä vuoksi se ei denaturoidu edes 5% natriumlauryylisulfaattiliuoksessa (SDS). (9-12) Entsyymin rakenteen on oltava solunulkoisessa tilassa erityisen stabiili vaativien olosuhteiden vuoksi (1). CA IX, CA XII ja CA XIV ovat solukalvon läpäiseviä integraalisia kalvoproteiineja, mutta CA IV liittyy solukalvoon translaation jälkeen lisättävällä glykofosfoinositoliankkurilla (GPI-ankkurilla) (2). GPI-ankkuroitujen proteiinien on havaittu esiintyvän solukalvolla lipidilautoissa ja niiden on mahdollista siirtyä solusta toiseen (13,14).

1.2.1 CA IV:n ilmentyminen kudoksissa

CA IV on ihmisellä ensimmäisenä löydetty munuaistiehyistä, lisäksi isoentsyymiä ilmentävät keuhkojen, sydän- ja luurankolihaksen, silmän sekä aivojen hiussuonien endoteelisolut. Se ilmentyy

myös ruoansulatuskanavassa. (15-19) Munuaisten CA IV:llä on tärkeä rooli elimistön pH-tasapainon säätelyssä. Kuten edellä on kuvattu, elimistö pystyy nopeasti kompensoimaan pH-muutoksia solunulkoisessa tilassa puskurijärjestelmien avulla ja hengitystä säätelemällä. Munuaiset kuitenkin säätelevät elimistön pH-tasapainoa pitkällä aikavälillä ja ylläpitävät bikarbonaattipuskuria reabsorboimalla lähes kaiken alkuvirtsan eritettävän bikarbonaatin. Ne myös tuottavat uutta bikarbonaattia ja erittävät ylimääräisiä protoneja virtsaan, mikä on edellytyksenä aineenvaihdunnassa syntyvien hiilidioksidista riippumattomien happojen, kuten rikki- ja fosforihapon vaikutuksen neutraloimiseksi. Sekä protonien erityy että bikarbonaatin reabsorptio tapahtuu munuaistiehyiden epiteelisolujen apikaalisen solukalvon CA IV:n ja solunsisäisen CA II:n mahdollistamana. (7)

Keuhkojen CA IV ei ole tutkimuksissa osoittautunut välttämättömäksi hiilidioksidin poistamiseksi elimistöstä, minkä vuoksi sen on ehdotettu mahdollisesti osallistuvan pH-tasapainon ja hiilidioksidiosapaineen säätelyyn hiussuonissa. Samanlainen pH-tasapainoon liittyvä rooli CA IV:llä on luurankoli hasten hiussuonissa. Lisäksi lihastyön aikana CA IV-aktiivisuus on edellytyksenä hiilidioksidin tehokkaalle poistumiselle lihaksista vereen, sillä jatkuva hiilidioksidin hydraatio bikarbonaatiksi hiussuonissa saa aikaan konsentraatiogradientin hiilidioksidille lihassolujen ja veren välille. (1)

1.2.2 CA IX:n ilmentyminen kudoksissa

Syöpäkasvaimissa CA IX:n rooli liittyy soluadheesioon ja -proliferaatioon sekä invaasioon. CA IX:n ilmentymistä syöpäsoluissa säätelee transkriptiotekijä HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha), jonka määrä soluissa lisääntyy hypoksian vaikutuksesta (20). Syöpäsolujen aineenvaihdunta on hyvin vilkasta ja diffuusiomatkat pitkiä, mikä johtaa hypoksiaan ja kasvuympäristön happamoitumiseen. Olosuhteet ovat optimaaliset syöpäsolujen kasvulle, kun solunulkoinen tila on hapan, mutta solunsisäinen pH pysyy neutraalina. CA IX:n on tärkeässä roolissa kasvuympäristön pH-tasapainon säätelyssä ja siten olosuhteiden optimoinnissa, sillä hiilidioksidin hydraatio solujen ulkopinnalla mahdollistaa bikarbonaatin kuljetuksen takaisin soluun puskuroimaan solunsisäistä pH-laskua samalla, kun reaktiossa syntyneet protonit jäävät happamoittamaan solunulkoista tilaa. (8,20) Syöpäsolujen lisäksi CA IX ilmentyy yhdessä CA IV:n kanssa myös paranevassa kudoksessa, kun kudokseksi on hapen puutteessa (21). CA IX ilmentyy myös terveessä ruoansulatuskanavassa, etenkin mahan ja sappirakon epiteelisoluissa (22). Mahan karsinomat käyttäytyvät tämän vuoksi

CA IX:n ilmentymisen osalta poikkeuksellisesti verrattuna useisiin muihin karsinomiin, sillä niissä ilmentyminen vähentyy verrattuna terveeseen solutyyppeihin, josta kasvain on lähtöisin (23).

1.2.3 CA XII:n ilmentyminen kudoksissa

CA XII:n on alun perin havaittu CA IX:n tavoin yli-ilmentyvän tietyissä syöpäkasvaimissa, kuten paksu- ja peräsuolen syövässä ja munuaissyövässä, mutta sitä ilmentävät myös monet terveet kudokset (24). Suolistossa ilmentyminen on vahvaa etenkin paksusuolen epiteelillä, missä CA XII osallistuu epäsuorasti natriumin, kloridin ja veden imeytymiseen vaikuttamalla solunsisäiseen pH-arvoon ja bikarbonaattipitoisuuteen. Suoliston adenoomissa CA XII:n ilmentymisen on myös havaittu lisääntyvän dysplasia-asteen kasvaessa. (25) Lisäksi CA XII paikantuu basolateraalille solukalvolle haimatiehyiden epiteelillä, lisäkivesten vievien tiehyiden ja endometriumien epiteelisoluissa sekä useassa eri solutyypissä munuaistiehyiden ja kokoojaputkien alueella (26). CA IV:n tavoin myös CA XII ilmentyy silmässä, jossa sen roolin arvioidaan liittyvän kammionesteen tuotantoon. (24)

Kasvaimissa CA XII osallistuu pH-tasapainon säätelyyn ja sen lisääntynyt ilmentyminen edesauttaa syöpäsolujen migraatiota, invaasiota ja proliferaatiota. Sekä CA XII:n että CA IX:n ilmentymistä säätelee von Hippel-Lindau-geeni, ja hypoksia lisää myös CA XII:n ilmentymistä. Rintasyövässä CA XII:sta ilmentymistä säätelee lisäksi estrogeenireseptori. (24)

1.2.4 CA XIV:n ilmentyminen kudoksissa

CA XIV ilmentyy ihmisellä aivoissa, etenkin aivosillan ja ydinjatkoksen neuronien soomaosissa ja aksoneissa. Fysiologisesti se säätelee hermoimpulssien etenemistä. (27) Jyrsijöillä tehdyissä tutkimuksissa CA XIV on paikannettu myös munuaisiin, maksaan sekä luuranko- ja sydänlihakseen (28-31). Lihassoluissa isoentsyymi ilmentyy solujen ulkopinnalla sarkolemmalla sekä solun sisällä sarkoplasmakalvostolla (28). Munuaisissa CA XIV:n rooli on pääasiassa samanlainen kuin CA IV:n ja isoentsyymit ilmentyvätkin yhdessä useassa munuaistiehyiden osassa. Kuitenkin erityisesti proksimaalisen kiemuratiehyiden S1-segmentissä CA XIV:n ilmentyminen on vahvempaa kuin CA IV:n, viitaten merkittävään rooliin bikarbonaatin reabsorptiossa. (30)

2 MENETELMÄT

2.1 Immunosytokemialliset värjäykset

Immunosytokemiallisissa värjäyksissä käytettiin perifeerisen veren sivelynäytteitä, jotka valmistettiin tämän tutkimuksen tekijöiltä saaduista ihopisto- eli kapillaariverinäytteistä. Solukalvoon sitoutuvat CA-isomuodot pyrittiin tunnistamaan punasolujen solukalvoilta epäsuoran immunofluoresenssitekniikan avulla.

2.1.1 Vasta-aineet

Primaariset CA II-, CA IV-, CA IX-, CA XII- ja CA XIV-vasta-aineet on kuvattu aiemmissa julkaisuissa (22,27,32-35). Primaariset anti-human α -CA II, anti-human lung CA IV, anti-human CA IV, anti-human CA XII, anti-mouse CA XIV ja normaali kanin IgG vasta-aineet laimennettiin suhteessa 1:100; ja primaarinen anti-human CAIX (M75) vasta-aine suhteessa 1:10.

Sekundaarisena vasta-aineena M75-vasta-aineelle toimi polyklonaalinen F(ab')₂-Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, kataloginnumero A11019), ja muille primaarisille vasta-aineille polyklonaalinen F(ab')₂-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, kataloginnumero A11070). Sekundaariset vasta-aineet laimennettiin suhteessa 1:100. Kaikkien vasta-aineiden laimentamiseen käytettiin 1% BSA-PBS-liuosta.

2.1.2 Sivelynäytteiden valmistus

Viiden henkilön sormenpään ihopistonäytteistä valmistettiin verisivelynäytteet. Sivelynäytteet kiinnitettiin 4 % paraformaldehydissä 15 minuutin ajan, jonka jälkeen ne pestiin PBS:lla. Näytteet blokattiin estopuskurissa (1 % BSA-PBS) 30 minuutin ajan, jonka jälkeen niitä inkuboitiin tunnin ajan primaaristen vasta-aineiden kanssa. Tämän jälkeen näytteet pestiin kolme kertaa viiden minuutin ajan 1 % BSA-PBS:ssa, mitä seurasi inkubointi tunnin ajan sekundaaristen vasta-aineiden kanssa. Lopuksi näytteet pestiin kaksi kertaa viiden minuutin ajan 1 % BSA-PBS:ssa ja kerran viiden

minuutin ajan PBS:ssa. Fluoresenssia säilyttävän petauksen jälkeen (VECTASHIELD® Mounting Medium, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornia, Yhdysvallat) preparaattit analysoitiin ja valokuvattiin konfokaalimikroskoopilla (Zeiss LSM780).

2.2 Western blot

Solukalvoon sitoutuvien CA-isomuotojen ilmentymistä punasoluissa tutkittiin Western blotilla ennen sivelynäytteiden valmistamista. Näytteiden proteiinit eroteltiin SDS-PAGE-menetelmällä, ja immunoblottauksessa käytettiin kappaleessa 2.1.1 lueteltuja vasta-aineita. Käytetty menetelmä on kuvattu aiemmassa Kallion ym. julkaisussa (36). Punasolujen solukalvot eroteltiin ja käsiteltiin analyysejä varten, työvaiheet suoritettiin jäähähteessä. Ensin laskimoverinäytettä sentrifugoitiin 10 minuutin ajan nopeudella 1000 rpm, minkä jälkeen siitä eroteltiin punasolut. Tämän jälkeen punasolut hajotettiin 10 millilitrassa vettä, johon oltiin liuotettu yksi tabletti proteaasin estäjää (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim, Saksa). Tätä seurasi sentrifugointi nopeudella 13 000 rpm noin 20 sekunnin ajan. Syntynyt pelletti pestiin tämän jälkeen kaksi kertaa PBS:ssa. Lopuksi pelletti liuotettiin 500 µl vettä ja 500 µl näytepuskuria (Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Yhdysvallat), ja näytettä lisättiin 9 µl ja 45 µl geelin kaivoihin.

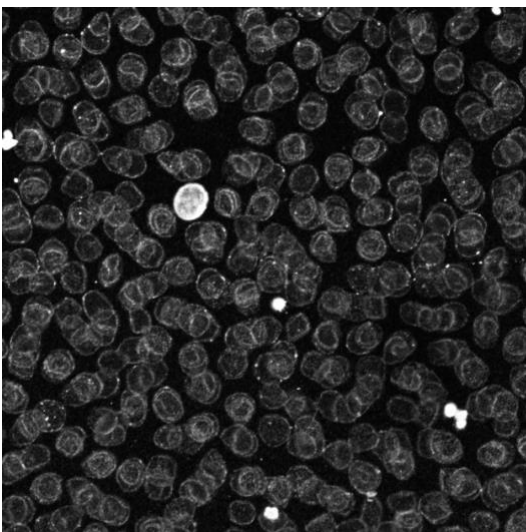
2.3 Bioinformatiikka

Analyyseissä hyödynnettiin RNA-sekvensointimenetelmällä tuotettua FANTOM-projektin dataa ja menetelmän perusta on kuvattu tietokannan tuottaneen ryhmän julkaisuissa aiemmin (37). Analyysit suoritti FM Harlan Barker (Tampereen yliopisto, Lääketieteen ja biotieteiden tiedekunta).

3 TULOKSET

3.1 Immunosytokemia

Immunosytokemiallisissa värjäyksissä käytettiin perifeerisen veren sivelynäytteitä, joista voitiin tutkia CA-entsyymien ilmentymistä sekä puna- että valkosoluissa. Näytteet olivat teknisesti onnistuneita. Niissä nähtiin punasolujen lisäksi valkosoluja, joista runsaimmin granulosyyttejä ja lymfosyyttejä. Eri granulosyyttityyppejä ei tutkimuksessa eroteltu toisistaan. Positiivisena kontrollina toimi CA II, joka ilmentyy voimakkaasti punasoluissa (Kuva 1). Myös valkosoluissa ja verihiutaleissa nähtiin voimakasta värjäytymistä CA II:lle.

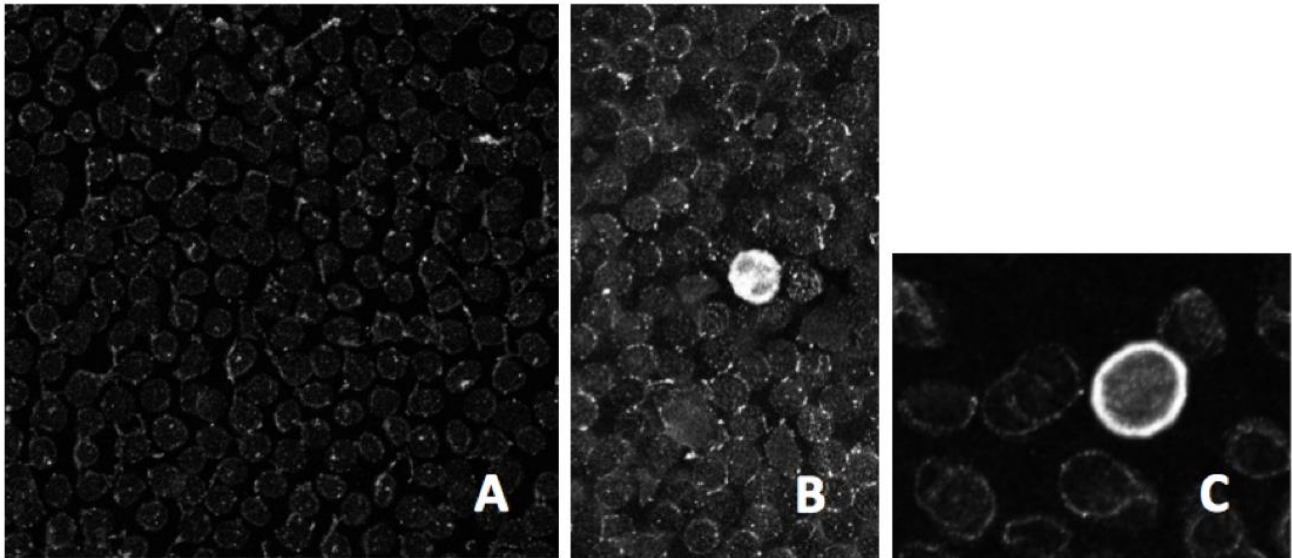


Kuva 1. Positiivinen kontrolli, CA II. Kuvassa positiivisesti värjäytyviä punasoluja ja yksi voimakkaasti värjäytynyt lymfosyytti. Myös verihiutaleissa nähdään voimakasta värjäytymistä.

Negatiivisena kontrollina toimi kaniinin IgG, jolla värjäytymistä ei nähty lainkaan. Myös värjäystulokset CA IX:lle jäivät täysin negatiivisiksi (kuvaa ei esillä).

3.1.1 CA IV

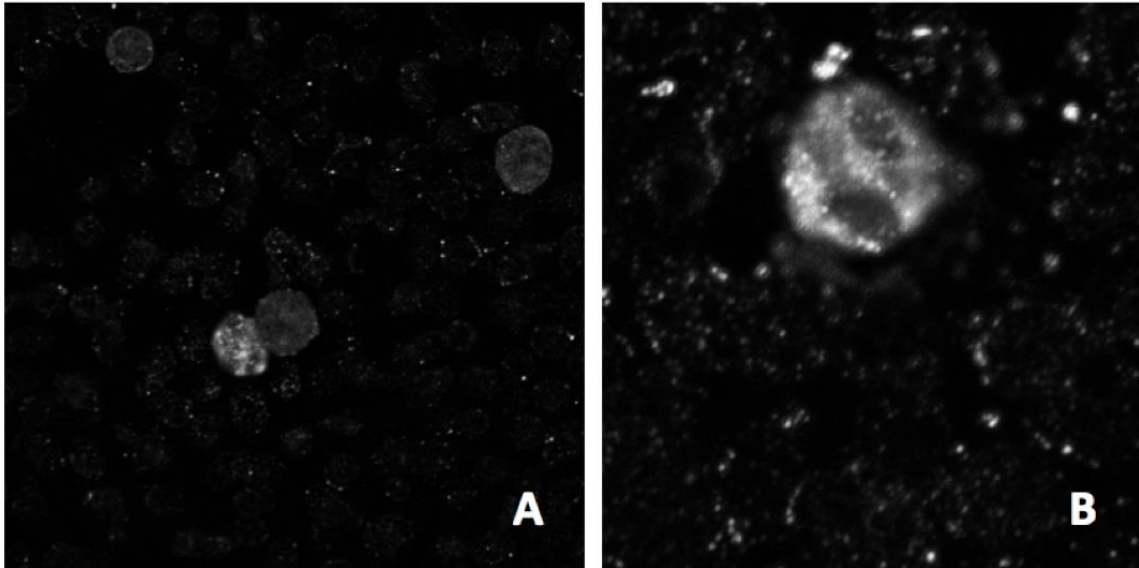
Punasolujen solukalvoilla värjäystulos CA IV:lle oli heikosti positiivinen. Lisäksi nähtiin voimakasta värjäytymistä lymfosyyteissä sekä granulosityeissä. Tulokset olivat samanlaisia molemmilla käytetyillä CA IV-vasta-aineilla. Positiivinen värjäytyminen painottui solukalvolle ja oli luonteeltaan epäyhtenäistä.



Kuva 2. Konfokaalimikroskoopin kuvat CA IV vasta-aineella värjäystä verisoluista perifeerisen veren sivelnäytteissä. Heikko positiivinen värjäystulos punasoluissa (A). Positiivinen värjäytyminen on vahvaa valkosoluissa. Granulosyytti (B) ja lymfosyytti (C) värjäytyvät voimakkaasti.

3.1.2 CA XII

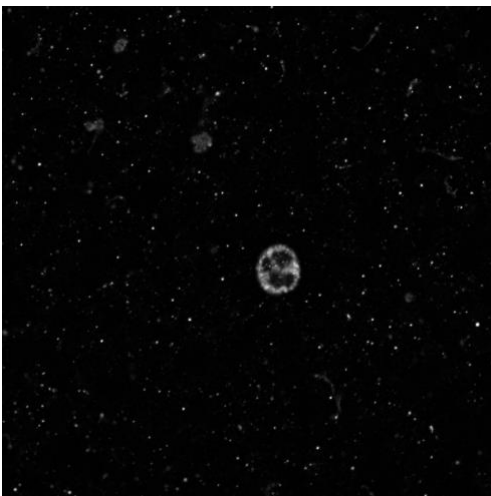
Punasolut eivät juurikaan värjäytyneet CA XII entsyymille. Nähtävissä oli vain erittäin vähäistä pistemäistä värjäytymistä. Värjäyskuvioitus oli poikkeava verrattuna CA IV- ja CA II-vasta-aineilla saatuihin tuloksiin. Granulosyyteissä värjäytyminen oli voimakkaampaa. Värjäystulokset ovat nähtävissä kuvassa 3.



Kuva 3. Konfokaalimikroskoopin kuvat CA XII vasta-aineella värjätystä verisoluista perifeerisen veren sivelynäytteissä. Punasoluissa nähdään erittäin heikko värjäytyminen. Valkosolujen värjäystulos on voimakkaammin positiivinen. Suurennoksessa on granulositytti (B).

3.1.3 CA XIV

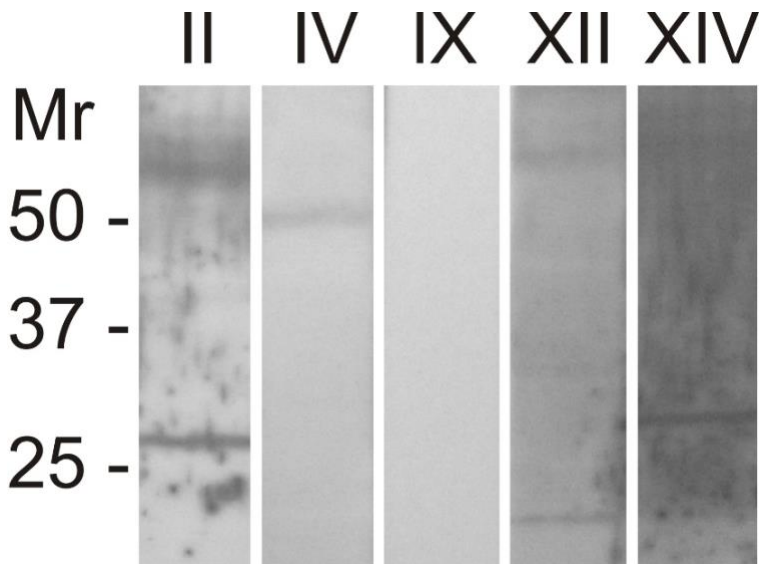
CA XIV:n värjäytyminen oli hyvin samankaltainen kuin CA XII:n. Punasolut värjäytyivät hyvin heikosti verrattuna granulosityttien positiiviseen värjäytymiseen, kuten kuvasta 4 nähdään. Punasolujen solukalvolla ei nähty yhtenäistä värjäytymistä. Tämän vuoksi vähäinen pistemäinen värjäytyminen tulkittiin ensisijaisesti epäspesifiseksi.



Kuva 4. Konfokaalimikroskoopin kuva CA XIV vasta-aineella värjätystä verisoluista perifeerisen veren sivelynäytteissä. Punasoluissa värjäystulos on käytännössä negatiivinen. Kuvassa on myös positiivisesti värjäytyvä granulositytti.

3.2. Western blot

Western blot-tunnistus oli negatiivinen kaikkien solukalvoon sitoutuvien isoentsyymien kohdalla. Vasta-aineet eivät tunnistanee molekyyli­massaltaan tutkittavia entsyymejä vastaavia polypeptidejä. Tulokset ovat nähtävissä kuvassa 5.



Kuva 5. Punasolujen proteiinien Western blot-tunnistus anti-CAII, anti-CA IV, anti-CA IX, anti-CA XII ja anti-CA XIV vasta-aineilla. 30 kDa CA II polypeptidi on selvästi nähtävissä. Muilla vasta-aineilla nähtävät polypeptidit eivät vastaa molekyyli­massaltaan kyseisiä entsyymejä.

3.3 RNA-sekvensointi ja tietokantahaut

Sivelynäytteiden värjäystulosten perusteella CA IV:n ilmentymistä päätettiin tutkia myös muiden menetelmien avulla. RNA-sekvensointimenetelmällä tuotettua FANTOM-projektin dataa hyödynnettiin CA IV:n mRNA-ilmentymisen tarkastelemiseksi retikulosyyteissä ja valkosoluissa. Projektissa on kartoitettu geenien transkription aloituspaikat (gene transcription start sites = TSSs) ja ilmentyminen lähes kaikissa ihmisen primaarisolutyypeissä sekä useassa eri syöpäsolulinjassa CAGE-tekniikan (cap analysis of gene expression) avulla. (37) CA IV:n pääasiallisen proteiinia koodaavan transkriptin promoottorialeelta löytyi FANTOM-projektin tietokannasta kaksi CAGE-huippua (p1@CA4 ja p2@CA4), joiden ilmentymistä tarkasteltiin eri solu- ja kudoksenäytteissä. Kumpikaan CA IV:n CAGE-huipuista ei ilmennyt lainkaan tietokannan retikulosyytinäytteissä, mutta neutrofiili- ja eosinofiilinäytteissä ilmentyminen oli merkittävää. Tarkemmat TPM-luvut (transcripts per million) molemmille CAGE-huipuille on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. CA IV:n CAGE –huippujen ilmentyminen retikulosyyteissä, neutrofiileissä ja eosinofiileissä. Taulukossa esitetyt tulokset ovat FANTOM-projektin dataa (31).

Näyte	p1@CA4 (TPM)	p2@CA4 (TPM)
Reticulocytes, biol_rep1	0,00	0,00
Reticulocytes, biol_rep2	0,00	0,00
Eosinophils, donor2	158,14	67,57
Eosinophils, donor3	174,50	27,14
Neutrophils, donor1	116,85	48,69
Neutrophils, donor2	128,64	44,87
Neutrophils, donor3	67,55	18,65

Korkein ilmentymistaso CA IV:n ensisijaiselle CAGE-huipulle, p1@CA4:lle, on saatu medulloblastoomasolulinjassa (TPM = 232,43), eosinofiilien ilmentymistasot ovat seuraavaksi merkittävimpiä. Toisen CAGE-huipun, p2@CA4:n, kohdalla eosinofiilien ilmentymistasot ovat kaikkien näytteiden kesken suurimpia. CA IV:n CAGE-huippujen ilmentymisen kanssa korreloivia tehostinalueita (enhancer) löytyi tietokannasta kaksi, ja myös ne ilmentyivät voimakkaasti neutrofiileissä ja eosinofiileissä.

4 POHDINTA

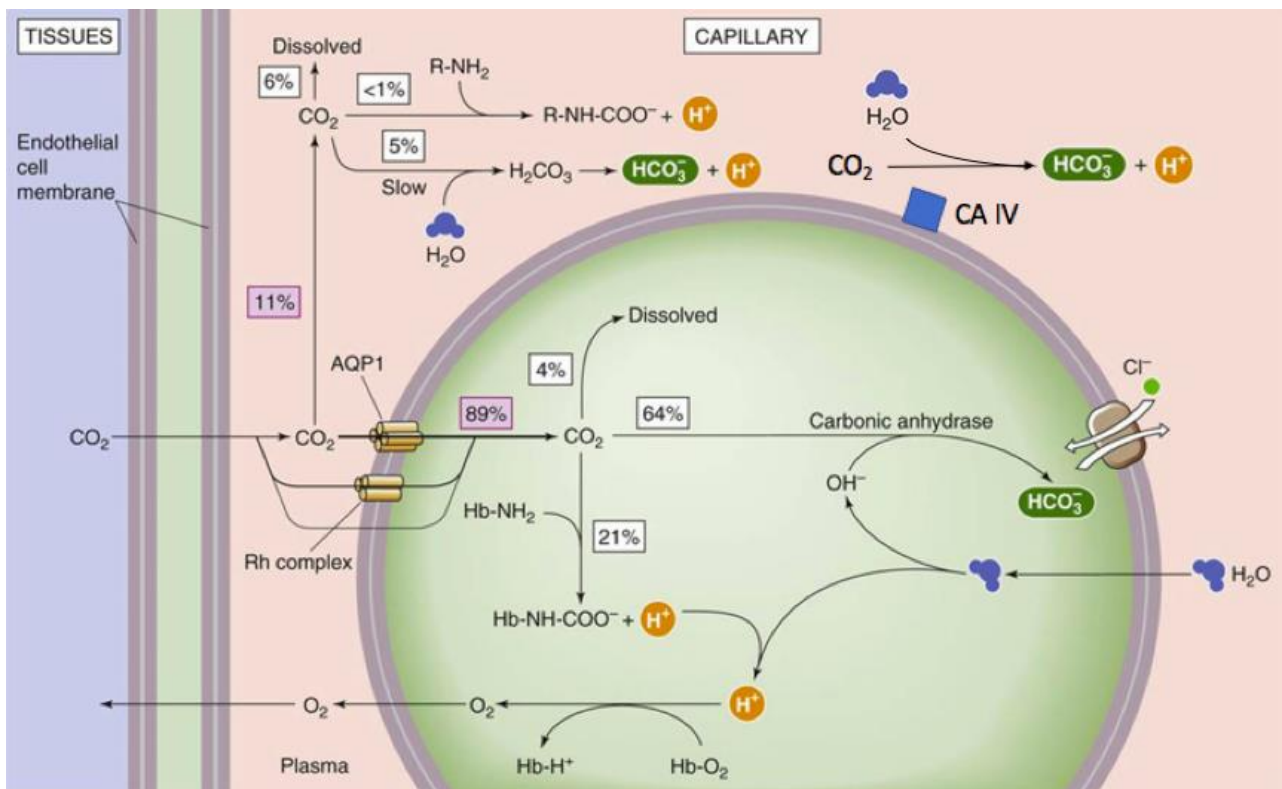
Sivelynäytteissä nähtiin vähintään heikkoa värjäytymistä lähes kaikilla tutkittavilla isoentsyymeillä, ainoastaan CA IX:n värjäytyminen jäi täysin negatiiviseksi. Positiivisena kontrollina toimivan CA II:n vahva värjäystulos punasolujen solukalvoilla selittyy isoentsyymien interaktiolla kalvoproteiinien, etenkin AE1:n kanssa (6). Värjäytyminen punasoluissa oli CA XII:lle ja CA XIV:lle hyvin heikkoa ja poikkeavaa verrattuna CA II:n värjäytymiseen. Solukalvoilla ei nähty yhtenäistä värjäyskuviota, joten tulos on todennäköisesti epäspesifinen. Western blotin tulokset eivät myöskään tue näiden isoentsyymien ilmentymistä punasoluissa, sillä vasta-aineet eivät tunnista neet molekyyli­massaltaan vastaavia polypeptidejä.

Immunosytokemiallisella menetelmällä saadut tulokset olivat CA IV:n osalta vahvimmin positiivisia, joten sen ilmentymistä päätettiin tarkastella myös muiden menetelmien avulla. Lähtökohtaisesti tulos oli kuitenkin myös CA IV:n osalta epävarma, sillä ennen sivelynäytteiden valmistamista Western blotilla saatu positiivinen tulos ei täsmännyt CA IV:n kirjallisuudessa esitettyyn molekyylimassaan (35 kDa), vaan vasta-aine tunnisti massaltaan suuremman proteiinin (n. 45-50 kDa). Myöskään FANTOM-projektin RNA-ilmentymisdata ei tue CA IV:n ilmentymistä punasoluissa, sillä kumpikaan kahdesta CAGE-huipuista ei imene retikulosyyttinäytteissä. Tulokset poikkeavat Medisapiens Oy:n mikrosirutekniikalla saamista tuloksista, joiden mukaan CA IV mRNA:ta olisi retikulosyyteissä. Ristiriitaisten tulosten selventämiseksi suoritettiin vielä massaspektrometrianalyysi, johon pyrittiin puhdistamaan punasoluista niiden mahdollisesti sisältämä CA IV. Tulokset jäivät täysin negatiivisiksi (julkaisematon tulos), mikä sopii myös aikaisempiin tutkimuksiin punasolun solukalvon proteomiin liittyen (38). Selityksenä positiiviselle tulokselle immunosytokemiallisella menetelmällä voisi olla vasta-aineen tunnistama epäspesifi proteiini, mikä selittäisi myös Western blotin tuloksen. On myös mahdollista, että CA IV:n pitoisuus solukalvolla on hyvin vähäinen eikä isoentsyymiä saada esille edes massaspektrometria-analyseissä, koska näytteiden muut suuremmalla pitoisuudella esiintyvät peptidit peittävät sen alleen. Toisaalta jää myös pieni mahdollisuus, ettei CA IV-puhdistus onnistunut, eikä CA IV siksi tullut esiin. Tätä on kuitenkin pidettävä epätodennäköisenä, koska kyse on tutkimusryhmän käyttämästä rutiinimenetelmästä.

Ainoina aihetta aiemmin tutkineet Wistrand ym. (1999) käyttivät myös tutkimuksessaan sekä Western blotia että immunosytokemiallista menetelmää. Tulokset olivat samansuuntaisia kuin tässä tutkimuksessa: Western blotissa vasta-aine tunnisti massaltaan liian suuria proteiineja (45 ja 55 kDa) verrattuna CA IV:ään, ja puhdistetuista punasoluista valmistetuissa sivelynäytteissä punasolut värjäytyivät samoilla vasta-aineilla tasaisesti. Solukalvovalmisteiden CA-aktiivisuutta tutkimalla he päätyivät kuitenkin tulokseen, jonka mukaan punasolun solukalvolla olisi 0,03 μM CA IV:ää, joka vastaisi 0,2 % punasolujen CA-aktiivisuudesta. (4) Pitoisuus on niin suuri, että se olisi mahdollista saada esille myös massaspektrometrillä tarkemman menetelmän avulla, joka olisi suunnattu pelkästään CA IV:n tunnistamiseen. Wistrand ym. (1999) pohtivat havaitsemansa CA IV:n olevan mahdollisesti peräisin endoteelisoluista, sillä GPI-ankkuroitujen proteiinien on havaittu pystyvän siirtymään endoteelisoluista punasoluihin *in vivo* (13). Jos punasoluissa vahvistettaisiin olevan CA IV:ää, niin endoteliaalinen alkuperä voisi olla mahdollinen ja sitä tukisi myös CA IV:n

mRNA:n puuttuminen retikulosyyteistä FANTOM-projektin tietokannassa.

Tässä tutkimuksessa saadut tulokset eivät täysin poissulje sitä mahdollisuutta, että punasoluissa voisi olla pieni määrä CA IV:ää. Vähäisen pitoisuuden osuus punasolujen CA-aktiivisuudesta jäisi hyvin pieneksi, mutta kuten kuvassa 5 on esitetty, CA IV katalysoisi hiilidioksidin konversiota välittömästi veriplasmassa toisin kuin solulimaan paikantuvat isoentsyymit, joiden toiminta vaatii hiilidioksidin ja bikarbonaatin kuljetuksen solukalvon läpi. Hiilidioksidin ja bikarbonaatin liikkeet solukalvon läpi, soluliman CA-aktiivisuus sekä plasmassa tapahtuva spontaani konversio on esitetty kuvassa 6, kuten nykytiedon mukaan ajatellaan tapahtuvan. Lisäksi esitettynä on hemoglobiinin (Hb) puskurivaikutus ja protonien sitoutumisen aiheuttama hemoglobiinin affiniteetin lasku hapelle (Bohrin ilmiö).



Kuva 6. Hiilidioksidin kuljetus ja punasolujen toiminta perifeerisissä hiussuonissa. Muokattu lähteestä (3).

Muissa CA IV:ää ilmentävissä kudoksissa isoentsyymin vuorovaikutus AE-kuljettimien kanssa tehostaa bikarbonaatin siirtymistä solukalvon läpi, ja tämä ominaisuus olisi hyödyllinen myös

punasoluissa (24). Solukalvoon sitoutuvilla isoentsyymeillä on havaittu olevan monenlaisia rooleja kudoksissa. Etenkin syöpiin liitettävät CA IX ja CA XII osallistuvat karsinogeneesiin pH-tasapainon säätelyn lisäksi muillakin tavoilla. CA IX on osa solunsisäistä signalointijärjestelmää ja mahdollisesti osallistuu myös solujen väliseen kommunikaatioon, ainakin soluadheesioon liittyen (9). Myös CA IV:llä voisi rakenteensa puolesta olla rooli soluadheesioon ja -signalointiin liittyen, kuten useilla muilla GPI-ankkuroiduilla proteiineilla. Myös lipidilautat, joissa GPI-ankkuroitujen proteiinien ajatellaan sijaitsevan, liittyvät toiminnallisesti solujen väliseen signalointiin. (14)

Sivulöydöksenä sivelyvalmisteissa nähtiin positiivista värjäytymistä valkosoluissa kaikille tutkittaville isoentsyymeille paitsi CA IX:lle. Positiivisesti värjäytyneet liuskatumaiset solut kuvissa 2, 3 ja 4 ovat todennäköisesti neutrofiilisiä granulosityttejä, sillä niitä on veressä liuskatumaisista soluista eniten, normaalisti yli 50 % kaikista valkosoluista. Lisäksi veressä on hyvin vähäinen määrä basofiilisiä ja eosinofiilisiä granulosityttejä. (5) Neutrofiilit ilmentävät solulimaan paikantuvia CA I:ä ja CA II:a suunnilleen samassa suhteessa kuin punasolut. Kuitenkaan aiemmissa tutkimuksissa neutrofiileissä ei ole havaittu CA-aktiivisuutta solukalvolla. (39) FANTOM-projektin tietokannassa CA IV:n mRNA-ilmentymistasot olivat korkeita eosinofiileissä ja neutrofiileissä. Lisäksi CAGE-huippujen ilmentymisen kanssa korreloivat tehostinjaksot ilmentyivät myös vahvimmin eosinofiileissä ja neutrofiileissä. Eosinofiilien tutkiminen perifeerisen veren sivelynäytteiden avulla on vaikeaa, koska eosinofiilejä on normaalisti veressä keskimäärin vain noin 3 % kaikista valkosoluista (5). Ristiriitaista CA IV:n mRNA-ilmentymisessä on se, että tietokannan munuaistiehyiden solunäytteistä suurimmassa osassa samoilla CAGE-huipuilla ilmentymistä ei ole havaittu lainkaan tai se on hyvin vähäistä, vaikka CA IV:n tiedetään ilmentyvän munuaistiehyissä. Valkosolujen CA:t eivät olleet erityisen mielenkiinnon kohteena tässä tutkimuksessa, ja aikaisempia tutkimuksia aiheesta on tehty hyvin vähän. Hiljattain julkaistiin kuitenkin tutkimus, jossa paranevissa ihohaavoissa ilmentyvän CA IV:n arvioitiin olevan peräisin pääosin neutrofiileistä (21). Solukalvoon sitoutuvien isoentsyymien ilmentymisen luotettava arviointi valkosoluissa vaatisi oman, siihen erityisesti suunnitellun ja kohdennetun, tutkimusmenetelmänsä solutyyppiin liittyvien haasteiden vuoksi. Aihe voisi siis olla mielenkiintoinen tutkimuskohde tulevaisuudessa.

Lähdeluettelo

- Esbaugh A, Tufts B. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 2006;154:185-98.
- Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A, ym. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg Med Chem* 2013;21:1570-82.
- Boron W. The Respiratory System. Kirjassa: Boron W, Boulpaep E, toim. *Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier 2017, s. 589-700.
- Wistrand PJ, Carter N, Conroy CW, ym. Carbonic anhydrase IV activity is localized on the exterior surface of human erythrocytes. *Acta Physiol Scand* 1999;165:211-8.
- Boulpaep E. The Blood. Kirjassa: Boron W, Boulpaep E, toim. *Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier 2017, s. 429-46.
- Vince JW, Reithmeier RA. Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte C1-/HCO₃- exchanger. *J Biol Chem* 1998;273:28430-7.
- Giebisch G, Windhager E, Aronson P. The Urinary System. Kirjassa: Boron W, Boulpaep E, toim. *Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier 2017, s. 821-35.
- Hilvo M, Baranauskienė L, Salzano AM, ym. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem* 2008;283:27799-809.
- Alterio V, Hilvo M, Di Fiore A, ym. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16233-8.
- Alterio V, Pan P, Parkkila S, ym. The structural comparison between membrane-associated human carbonic anhydrases provides insights into drug design of selective inhibitors. *Biopolymers* 2014;101:769-78.
- Whittington DA, Waheed A, Ulmasov B, ym. Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9545-50.
- Stams T, Nair SK, Okuyama T, ym. Crystal structure of the secretory form of membrane-associated human carbonic anhydrase IV at 2.8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:13589-94.
- Kooyman DL, Byrne GW, McClellan S, ym. In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* 1995;269:89.
- Paulick MG, Bertozzi CR. The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry* 2008;47:6991-7000.
- Sender S, Decker B, Fenske CD, ym. Localization of carbonic anhydrase IV in rat and human heart muscle. *J Histochem Cytochem* 1998;46:855-61.
- Sender S, Gros G, Waheed A, ym. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase IV in capillaries of rat and human skeletal muscle. *J Histochem Cytochem* 1994;42:1229-36.
- Hageman GS, Zhu XL, Waheed A, ym. Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2716-20.
- Ghandour MS, Langley OK, Zhu XL, ym. Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6823-7.
- Fleming RE, Crouch EC, Ruzicka CA, ym. Pulmonary carbonic anhydrase IV: developmental regulation and cell-specific expression in the capillary endothelium. *Am J Physiol* 1993;265:627-35.
- Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:299-310.
- Barker H, Aaltonen M, Pan P, ym. Role of carbonic anhydrases in skin wound healing. *Exp Mol Med*, julkaistu verkossa 19.5.2017.
- Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK, ym. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: Analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* 1997;112:398-408.

Leppilampi M, Saarnio J, Karttunen TJ, ym. Carbonic anhydrase isozymes IX and XII in gastric tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:1398-403.

Waheed A, Sly WS. Carbonic anhydrase XII functions in health and disease. *Gene* 2017;623:33-40.

Kivelä A, Parkkila S, Saarnio J, ym. Expression of a Novel Transmembrane Carbonic Anhydrase Isozyme XII in Normal Human Gut and Colorectal Tumors. *Am J Pathol* 2000;156:577-84.

Hynninen P. Expression of Carbonic Anhydrases II, IX and XII in the Normal Female Reproductive Tract, Gynecological Tumors and Lynch Syndrome, väitöskirja, Tampereen yliopisto, Tampere 2014.

Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H, ym. Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1918-23.

Wetzel P, Scheibe RJ, Hellmann B, ym. Carbonic anhydrase XIV in skeletal muscle: subcellular localization and function from wild-type and knockout mice. *Am J Physiol* 2007;293:358-66.

Vargas LA, Alvarez BV. Carbonic anhydrase XIV in the normal and hypertrophic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:741-52.

Kaunisto K, Parkkila S, Rajaniemi H, ym. Carbonic anhydrase XIV: luminal expression suggests key role in renal acidification. *Kidney Int* 2002;61:2111-8.

Parkkila S, Kivelä AJ, Kaunisto K, ym. The plasma membrane carbonic anhydrase in murine hepatocytes identified as isozyme XIV. *BMC Gastroenterol* 2002;2:13.

Parkkila AK, Parkkila S, Juvonen T, ym. Carbonic anhydrase isoenzymes II and I are present in the zona glomerulosa cells of the human adrenal gland. *Histochemistry* 1993;99:37-41.

Fleming RE, Parkkila S, Parkkila AK, ym. Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization. *J Clin Invest* 1995;96:2907-13.

Parkkila S, Parkkila A, Juvonen T, ym. Membrane-bound carbonic anhydrase IV is expressed in the luminal plasma membrane of the human gallbladder epithelium. *Hepatology* 1996;24:1104-1108.

Karhumaa P, Parkkila S, Türeci Ö, ym. Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium. *Mol Hum Reprod* 2000;6:68-74.

Kallio H, Tolvanen M, Janis J, ym. Characterization of non-specific cytotoxic cell receptor protein 1: a new member of the lectin-type subfamily of F-box proteins. *PLoS ONE*, julkaistu verkossa 7.11.2011.

Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, ym. Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol* 2015;16:22.

Hegedus T, Chaubey PM, Varady G, ym. Inconsistencies in the red blood cell membrane proteome analysis: generation of a database for research and diagnostic applications. *Database (Oxford)* 2015. DOI:10.1093/database/bav056.

Campbell AR, Andress DL, Swenson ER. Identification and characterization of human neutrophil carbonic anhydrase. *J Leukoc Biol* 1994;55:343-8.