

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Noora Heiskanen

ELISA-menetelmän suunnittelu ja toteutus

angiopiettiinityyppisen proteiini 4:n (Angptl-4)

määrittämiseksi ihmisen verestä

Insinööriyö 6.11.2008

Ohjaaja: dosentti Matti Jauhiainen,
FM Mikko Muilu
Ohjaava opettaja: yliopettaja Marja Vaheri

Tekijä	Noora Heiskanen
Otsikko	ELISA-menettelyn suunnittelu ja toteutus angiopoietiinityyppisen proteiini 4:n (Angptl-4) määrittämiseksi ihmisen verestä
Sivumäärä	52
Aika	6.11.2008
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja	dosentti Matti Jauhiainen, FM Mikko Muilu
Ohjaava opettaja	yliopettaja Marja Vaheri
<p>Tämä insinööriyö tehtiin Kansanterveyslaitoksen (KTL) molekyyli lääketieteen osastolla, sydän- ja verisuonitauteja sekä niiden aineenvaihduntaa tutkivassa ryhmässä. Rasva-aineenvaihduntaan osallistuu lukuisia välittäjäaineita sekä signaalimolekyylejä, jotka vaikuttavat paikallisesti sekä kulkeutumalla veren mukana elimistön muihin osiin. Tässä työssä keskityttiin tutkimaan yhtä rasvakudoksen signaalimolekyylejä, Angiopoietiinityyppistä proteiini 4:ää (Angptl-4), jonka on todettu olevan suoraan yhteydessä rasvakudoksen laatuun ja määrään sekä plasman rasva-aineiden tasoon.</p> <p>Työssä suunniteltiin ELISA-testi ihmisen Angptl-4-tason mittaamiseen seerumista. Työn lähtökohdaksi oli kahden Angptl-4-proteiinin peptidin injektointi neljään kaniin vasta-aineen tuottamiseksi kanin seerumissa. Tuotettu IgG-vasta-aine puhdistettiin kaniseerumista korkean resoluution nestekromatografiolla (HPLC). Saatujen vasta-aineiden puhtaus testattiin SDS-PAGE-menettelmällä ja IgG-vasta-aineiden sitoutumista tutkittiin Western Blot -menettelmällä. Lisäksi osalle IgG-vasta-aineista tehtiin entsyymileimaus piparjuuriperoksidaasilla, jotta niitä voitiin käyttää ELISA-testissä sekundaarisena vasta-aineena.</p> <p>Lopullinen Angptl-4-pitoisuus seerumissa määritettiin vertaamalla paastottua ihmisen seerumia paastotuista hiiriadiposyyteistä mitattuun totaaliproteiinipitoisuuteen. ELISA-testissä todettiin IgG-vasta-aineiden sitoutuvan ihmisen paastotun seerumin Angptl-4:ään, jonka lisäksi Angptl-4:n todettiin ilmenevän solujen kasvuliuksessa. Saaduista tuloksista päätettiin ELISA-testin toimivan hyvin, mutta riittävien toistomittausten suorittaminen jäi tekemättä. Angptl-4:n mittaamiseksi rutiininomaisesti seerumista täytyisi menetelmä kehittää kokonaisuudessaan Angptl-4-proteiinille käytettyjen peptidipätkien sijasta.</p>	
Hakusanat	ELISA, Angptl-4, angiopoietin-like protein 4

Author Title	Noora Heiskanen Planning and constructing ELISA-method for measuring Angiopoietin-like protein 4 (Angptl-4) in human blood
Number of Pages Date	52 6 November 2008
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor Supervisor	Matti Jauhiainen, Ph.D. docent, Mikko Muilu, M.Sc. Marja Vaheri, Principal Lecturer
<p>This final year project was carried out in National Public Health Institute in the Department of Molecular Medicine, in a group that studies Atherosclerosis and the metabolism involved in it. Several factors and signaling molecules participate in adipose metabolism affecting locally and secreting in blood to other organs. In this project, the focus was on one signaling molecule secreted by adipose tissue called Angiopoietin-like protein 4 (Angtl-4), which is known to interrelate directly with the quality and amount of adipose tissue and with blood serum triglyceride levels.</p> <p>In the project, a construction of ELISA-method was carried out to measure Angptl-4 levels in human serum. The starting point for the study was injecting two Angptl-4 protein peptides into four rabbits to produce antibodies in the rabbit serum. The IgG-antibodies used in the immunological method were purified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The purity of the antibodies was controlled by SDS-PAGE and antigen-binding ability was tested with Western Blot-technique. In addition some of the purified antibodies were labeled with Horseradish Peroxidase to enable their use as a secondary antibody in the ELISA-method.</p> <p>The final concentration of Angptl-4 in human serum was measured by comparing fasted human serum to total protein concentration measured from fasted mouse adipose cells. It was found out in ELISA-test that the produced IgG-antibodies bound to fasted human serum Angptl-4 and also Angptl-4 was present in the adipocyte medium. The results indicated that the ELISA-test was functional but the repeatability of the measurement was not done. In order to measure Angptl-4 routinely from human serum, the method should be constructed using a whole Angptl-4 protein instead of peptides.</p>	
Keywords	ELISA, Angptl-4, angiopoietin-like protein 4

Sisällys

1. Johdanto	6
Kirjallisuusosa	7
2. Rasvakudos ja sen aineenvaihdunta	7
2.1 Rasvakudos	7
2.2 Rasvasolujen aineenvaihdunta	9
2.3 Adipokiinit ja adiposytokiinit	11
2.4 Angiopiettiinyyppinen proteiini 4 ja sen toiminta	14
2.5 Rasvasolujen aineenvaihdunnan häiriöt	16
Kokeellinen osa	18
3. Työn tarkoitus ja tavoitteet	18
4. Materiaalit ja menetelmät	18
4.1 Vasta-aineiden valmistaminen	18
4.2 Korkeapainenekromatografia	19
4.3 Proteiinimääritys	20
4.4 Geelielektroforeesi	21
4.5 Western Blotting eli immunoblottaus	23
4.6 IgG-vasta-aineen entsyymileimaus	25
4.7 ELISA-menetelmä	26
4.7.1 Kuoppalevyjen valmistaminen	26
4.7.2 Angptl-4:n ELISA-analyysi	27

5. Tulokset ja tulosten tarkastelu	28
5.1 Angptl-4-vasta-aineiden tuotto ja testaus	28
5.2 IgG-vasta-aineiden analysointi Dot-plot-analyysin avulla	29
5.3 Angptl-4-proteiininäytteet	30
5.4 ELISA-menetelmän kehittäminen	33
5.4.1 Primaarisen vasta-aineen valinta	34
5.4.2 ELISA-testin näytteet ja näytekäsittelyt	36
5.4.3 Sekundaarisen vasta-aineen ja ELISA-testin toistettavuus	40
5.4.4 Yksilölliset erot Angptl-4-vasteessa ihmisen seerumissa	43
5.5 Lopullinen ihmisen seerumin Angptl-4-proteiinin pitoisuuden määrittäminen	45
6. Tulosten yhteenveto ja päätelmät	48
Lähteet	49

1. Johdanto

Rasva-aineenvaihdunta on tarkkaan säädelty elimistön prosessi, johon osallistuu lukuisia välittäjäaineita sekä signaalimolekyylejä ja jonka toiminnasta saadaan jatkuvasti tarkempaa tietoa. Rasvakudoksella on rooli niin energian otossa, insuliinin säätelyssä kuin lisääntymis- ja immunobiologiassa. Adiposytokiinien merkitys varsinkin glukoosin aineenvaihdunnassa on laajalti tutkittu, mutta vähemmän tiedetään siitä, miten adiposytokiinit tarkalleen vaikuttavat plasman rasvojen aineenvaihduntaan.

Tutkimalla ravitsemuksellisten erojen, kuten paaston tai korkearasvaisen ruokavalion, vaikutusta rasvakudokseen ja sen erittämiin aineisiin, saadaan tietoa rasvakudoksen signaalireiteistä ja sen vaikutuksesta koko elimistölle. Rasvakudoksen erittämien hormonaalisten tekijöiden, nk. adipokiinien tai adiposytokiinien, on todettu vaikuttavan laajalti elimistön biologisissa prosesseissa ja niiden kirjo on kasvanut jatkuvasti tiedon lisääntyessä

Angiopietiniityppinen proteiini 4 eli Angptl-4 on tumareseptorin säätelemä adiposytokiini, jonka rooli aineenvaihdunnallisena säätelijänä on tarkentunut vasta lähivuosina. Tutkimukset osoittavat sen olevan suoraan yhteydessä rasvakudoksen laatuun ja määrään sekä plasman rasva-aineiden tasoon. Lisäksi Angptl-4:n on todettu aktivoivan muita aineenvaihdunnan kannalta tärkeitä adiposytokiineja, jolloin kiinnostus Angptl-4-proteiinia kohtaan voi tulevaisuudessa kasvaa terapeuttisia lääkkeitä kehitettäessä.

Kirjallisuusosa

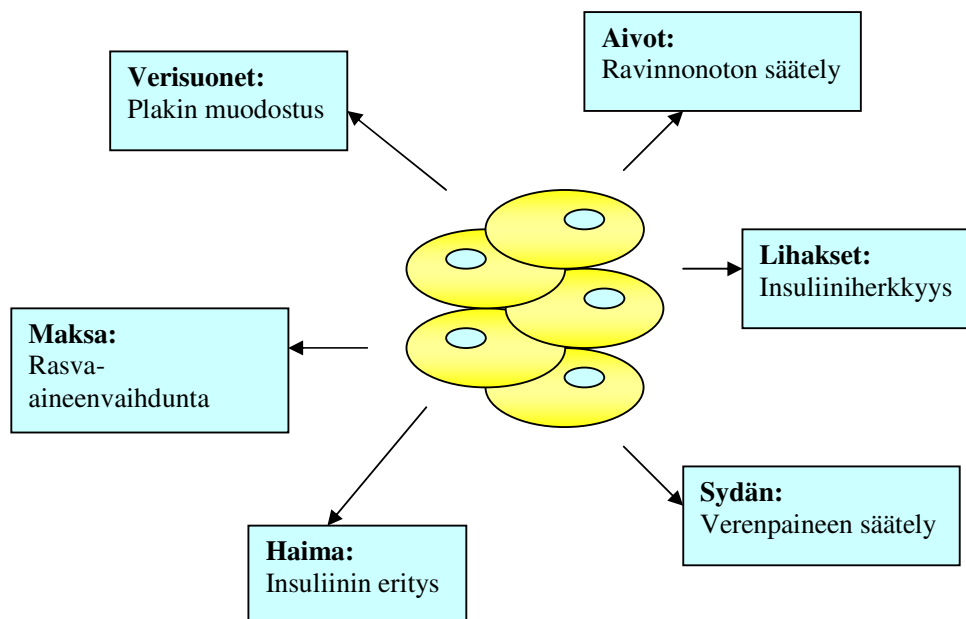
2. Rasvakudos ja sen aineenvaihdunta

2.1 Rasvakudos

Rasvakudos on rakenteellisesti löyhää kudosta, joka muodostuu rasvasoluista eli adiposyyteistä. Sen tehtävänä on pitkään tiedetty olevan energian varastoiminen ja elimistön eristäminen kylmältä, mutta rasvakudoksella on tämän lisäksi huomattava merkitys monien hormonien sisäeritteisenä elimenä. Rasvakudos voidaan jakaa vaaleaan rasvakudokseen ja ruskeaan rasvakudokseen sen toiminnallisten eroavaisuuksien vuoksi. Vaalean rasvakudoksen tärkein tehtävä on energian varastointi hormonituotannon avulla, joka osallistuu aivojen välityksellä yksilön ravinnonoton säätelyyn. Ruskean rasvakudoksen fysiologinen rooli on valinnainen lihasvärinätön lämmöntuotanto, jonka tarkoituksena on energiaa polttamalla auttaa sopivan ruumiinlämmön ylläpitämistä. Ruskea rasvakudos siis polttaa energiaa siinä missä vaalea rasvakudos varastoi sitä. (1.)

Rasvasolujen lisäksi rasvakudos koostuu sidekudoksesta, hermokudoksesta, verisuonista ja imukudoksesta, jotka yhdessä muodostavat toiminnallisen kokonaisuuden. Rasvakudoksen erityistoiminnoista alettiin saada tarkkaa tietoa 1980-luvulla, kun vuonna 1987 rasvakudos havaittiin pääasialliseksi sukupuolisteroidien sijaintipaikaksi(2) ja adipsiinin tuottajaksi. Leptiinin myöhempi havaitseminen ja tunnistaminen vuonna 1994 varmistivat rasvakudoksen sisäeritteisen merkityksen (3) ja nykyään rasvakudoksen tiedetään säätelevän useiden bioaktiivisten peptidien, adipokiinien ja adiposytokiinien, erittämistä. Adipokiinit vaikuttavat kaikkialla elimistön kudoksissa, mm. aivoissa, luustossa, lisääntymiselimistössä, maksassa, immuunisoluiissa ja verisuonissa. (4.)

Sisäeritteisyytensä lisäksi rasvakudos ilmentää monenlaisia reseptoreita, joiden avulla se pystyy reagoimaan lukuisiin signaaleihin niin hormonivälitteisiltä systeemeiltä kuin keskushermostolta. Rasvakudos vapauttaa suuren määrän sytokiineja (adiposytokiineja) ja bioaktiivisia välittäjä-aineita, kuten leptiiniä, adiponektiiniä ja interleukiini-6:sta (IL-6). Nämä välittäjäaineet vaikuttavat varsinkin kehon painon homeostasiaan, mutta myös insuliiniresistenssin syntymiseen ja tätä kautta II tyypin diabeteksen kehittymiseen. (5.)



Kuva 1. Adiposytokiinien vaikutuskohteita elimistössä. (6)

Metabolisen koneistonsa vuoksi rasvakudoksella on kyky toimia elimistön toisistaan kaukana olevien elinten viestinnässä (kuva 1), kuten keskushermoston toiminnan apuna. Rasvakudoksen viestiketju on moniulotteinen ja vaatii hyvin erilaisten biologisten prosessien hallintaa. (7.)

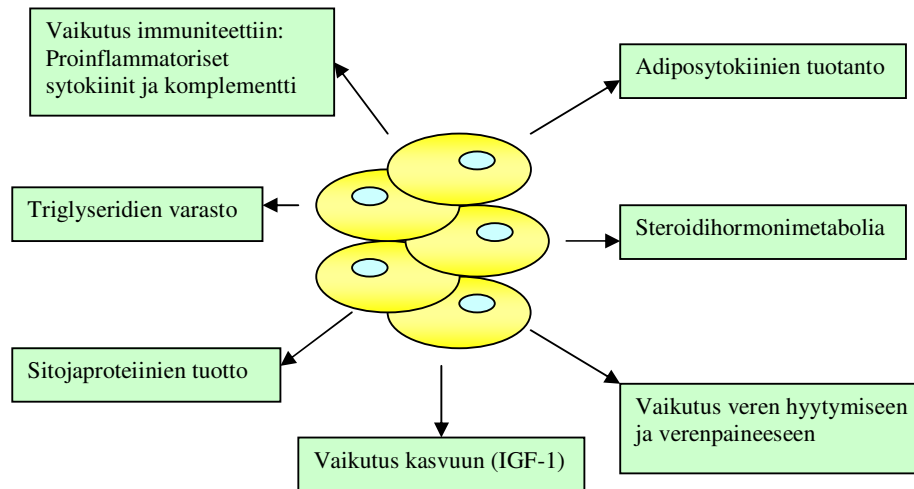
Sytokiinit ovat veressä kiertäviä pieniä proteiineja, kooltaan 8–10 kDa (kilodaltonia). Niitä tuottavat antigeenien aktivoimat lymfosyytit, makrofagit (joita aktivoivat muut sytokiinit), endoteelisolut, epiteelisolut ja trombosyytit eli verihiutalet. Homokysteini aiheuttaa ja kiihdyttää valtimonkoveitustautia vuorovaikuttamalla tulehdussytokiinin (IL1 ja IL6) kanssa. (8.)

Sytokiinit toimivat sitoutumalla kohdesolunsa pinnalla oleviin vastaanottajamolekyyleihin eli reseptoreihin. Ne aktivoituvat ja käynnistävät sarjan reaktioita solun sisällä. Reaktiot toimivat signaaleina, jotka lopulta välittyvät solun tumaan ja siellä sijaitseviin kohdegeeneihin. Sytokiinit toimivat siis vaikuttamalla geenien luentaan. Sytokiinit säättävät solun jakautumista normaaleihin ja syöpäsoluihin. Siksi esimerkiksi interleukiini 8:aa (IL8) kutsutaan myös syöpägeeniksi. (9.)

Tällä hetkellä sytokiineja tunnetaan yli 100, ja niihin kuuluvat mm. kemotaktiset sytokiinit, interleukiinit, interferonit, tuumorinekroositekijät, granylosyyttejä ja makrofageja stimuloivat tekijät, transformoivat kasvutekijät ja erytropoietiini. Sytokiinit säätelevät solujen kasvua ja erilaistumista, stimuloivat tai vaimentavat tulehdusreaktioita ja säätelevät antimikrobisen immunitetin kehittymistä yhdessä antigeenia esittelevien solujen kanssa. (10.)

2.2 Rasvasolujen aineenvaihdunta

Rasvakudos on endokriininen elin, joka erittää useita proteiineja, adiposytokiineja. Rasvakudos osallistuu muun muassa veren hyytymisen, immuuniteetin ja verenpaineen säätelyyn ja tuottaa tärkeitä sitoja-proteiineja. Rasvakudos tuottaa myös useita metabolisen oireyhtymän synnyn kannalta keskeisinä pidettyjä proteiineja.



Kuva 2. Rasvakudoksen keskeisimmät toiminnot. (11)

Rasvakudoksen erittämällä proinflammatorisilla sytokiineilla on vaikutusta erityisesti elimistön tulehdusreaktion alkuvaiheessa. Nämä sytokiinit aktivoivat kohdesoluja spesifisten reseptoriensa välityksellä, minkä seurauksena stimuloituneet solut tuottavat lisää kemokiineja, proinflammatorisia sytokiineja ja muita biologisesti aktiivisia aineita.

Steroidihormonimetaboliolla (kuva 2) säädelään sukupuolisuuteen liittyvien hormonien toimintaa ja aktiivisuutta. Testosteronin, kuten muidenkin biologisesti aktiivisten steroidien, synteesi alkaa kolesterolista.

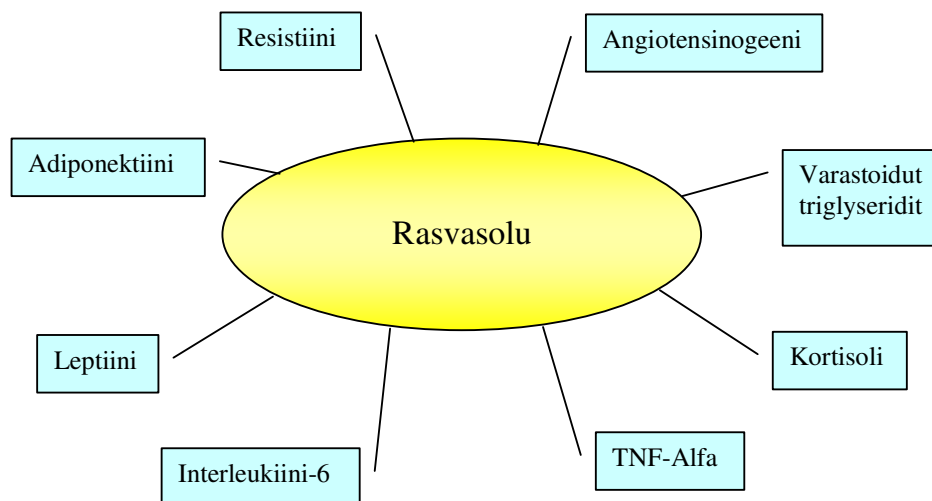
Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1, somatomeidiini C) tuotetaan pääosin maksassa, mutta myös muissa kasvuhormonin kohdekudoksissa. IGF-1-pitoisuudet heijastelevat kasvuhormonin aktiiviteettia (kuva 2). Lapsilla ja vanhuksilla IGF-1-tasot ovat matalimmillan, kun taas korkeimmat IGF-1-pitoisuudet nähdään murrosiässä. (12.)

Kasvutekijöiden sitojaproteiinit ovat osallisena somaattisen kasvun ja solun proliferaation säätelyssä. Sitojaproteiinit sitovat kasvutekijöitä, kuten insuliinin kaltaista kasvutekijää (Insulin-like growth factor, IGF) itseensä. Sitojaproteiinit pidentävät IGF-I:n ja IGF-II:n puoliintumisaikaa verenkierrossa, kuljettavat IGF:ia kohdesoluille ja osallistuvat niiden vaikutuksen välittymiseen soluun. (13.)

2.3 Adipokiinit ja adiposytokiinit

Rasvakudoksen erittämät hormonaalisten tekijöiden, adipokiinien tai adiposytokiinien (kuva 2), on todettu vaikuttavan laajalti elimistön biologisissa prosesseissa.

Rasvakudoksella on rooli niin energian varastoinnissa, insuliinin säätelyssä kuin lisääntymis- ja immunologisessa kemiassa.



Kuva 3. Eräitä rasvasolujen erittämiä adipokiinejä. (14)

Tärkeitä proinflammatorisia välittäjäaineita – muun muassa allergioissa, diabeteksessa ja sydän- ja verisuonitaudeissa – ovat interferoni-gamma ja tuumorinekroositekijä-alfa (TNF- α , Tumor necrose factor- α), jotka tuottavat tulehdusytokiineja. TNF- α heikentää insuliinin vaikutuksia kohdekudoksissa monella eri tavalla, ja sitä on pidetty eräänä molekulaarisena linkkinä lihavuuden ja tyypin 2 diabeteksen välillä.

Leptiini on rasvasolujen tuottama hormoni, jonka plasmapitoisuudet heijastelevat suurelta osin kehon rasvakudoksen määrää. Korkea leptiinipitoisuus on liitetty metabolisen oireyhtymän syntyyn, ja korkeiden leptiinitasojen on myös todettu ennustavan metabolisen oireyhtymän kehittymistä. Kohonnut leptiinitaso,

hyperleptinemia, on yhdistetty insuliiniresistenssiin. Lisäksi leptiinin on todettu lisäävän interleukiini-6:n eritystä.

Ravinnon korkea glykemiakuorma tuottaa interleukiini 6:ta (IL6), joka puolestaan lisää C-reaktiivisen proteinin (C-reactive protein, CRP) tuotantoa maksassa. Kohonnut CRP liittyy epäspesifisesti kaikkiin tulehdustauteihin ja sen katsotaan olevan merkittävä sydän- ja verisuonitautien ennustaja. CRP:n on todettu heikentävän leptiinin vaikutusta keskushermostossa eli aiheuttavan leptiiniresistenssiä, joka puolestaan on keskeinen lihavuuteen liittyvä piirre. Lisäksi rasvakudos erittää IL-1 β -, IL-8- ja IL-10 sytokiinejä. (11) Rasvakudoksen erittämistä tekijöistä adiponektiinitasojen tiedetään olevan käänteisessä yhteydessä kehon rasvakudoksen määrään. (15) Laihduttaminen lisää adiponektiinin määrää verenkierrassa. Adiponektiini vaikuttaa sokeriaineenvaihduntaan lisäämällä insuliiniherkkyttä. Sen vaikutuksesta verenkierrassa kiertävien vapaiden rasvahappojen määrä ja lihaskudoksen triglyseridimäärä laskevat.

Jälkimmäisen katsotaan johtuvan adiponektiinin aikaansaamasta rasvahappojen hapettumisen kiihtymisestä. (16) Etenkin vatsaontelon sisäisen rasvakudoksen määrän kasvu alentaa voimakkaasti adiponektiinitasoja. Matalia adiponektiinitasoja on todettu tyyppin 2 diabeteksen ja insuliiniresistenssin yhteydessä. (17.)

Adiponektiinin on osoitettu vähentävän tulehduksenvälittäjäaineiden tuotantoa ja vaahtosolujen muodostusta ja siten hidastavan ateroskleroottisten plakkien muodostumista verisuonten endoteelissa. Se myös vähentää tuumorinekroositekijä- α :n tuotantoa, mikä johtaa endoteelin adheesiomolekyylien vähenemiseen, ja näin monosyyttien siirtyminen alueelle hidastuu. Pieni adiponektiinipitoisuus on lisäksi merkittävä sydän- ja verisuonitautien riskitekijä. Uusista sydän- ja verisuonisairauksien indikaattoreista adiponektiini on CRP:n ohella ehkä lähimpänä käytännön sovelluksia sekä diagnostiikassa että metabolisten poikkeavuuksien hoidossa. (18.)

Resistiini nimettiin alun perin sen insuliiniresistenssiä lisäävän vaikutuksen mukaan. Hiirillä resistiini lisää insuliiniresistenssiä, ja sitä tuottavat pääosin rasvasolut. (19.)

Ihmisillä sitä ilmentyy runsaasti monosyyttien kypsyyssä makrofageiksi. Resistiinin ja lihavuuteen liittyvien sairauksien yhteyksiä ihmisillä selvittäneiden tutkimusten tulokset ovat olleet ristiriitaisia. Joissakin tutkimuksissa yhteys painoon on ollut positiivinen, mutta toisissa tutkimuksissa ei ole löydetty minkäänlaista yhteyttä. (20) Kummassakaan edellä mainituista tutkimuksista ei havaittu yhteyttä insuliiniresistenssiin, vaikkakin resistiinipitoisuudet olivat korkeammat tyypin 2 diabeetikoilla. Resistiini näyttäisi sen sijaan olevan yhteydessä tulehdukseen. (21.)

Angiotensiini on veressä esiintyvä säätelijäaine, jonka esiaste angiotensinogeeni (AGT, angiotensinogen) muuttuu aktiiviseen muotoon munuaisten erittämän reniinin vaikutuksesta. Angiotensiini supistaa verisuonia ja nostaa verenpainetta, lisää aldosteronin erittymistä lisämunuaiskuoresta ja säätelee siten suolatasapainoa sekä vaikuttaa aivoissa mm. janon tunteen syntymiseen. Valkoinen rasvakudos ja maksa ovat merkittävimpiä angiotensinogeenin tuottajaelimiä. Aikaisemmin plasman angiotensinogeenipitoisuuden on oletettu riippuvan suoraan maksan tuottamasta määrästä. Hiirikokeiden perusteella on kuitenkin todettu rasvakudoksen erittämän AGT:n vaikuttavan sekä paikallisesti rasvakudoksen kehitykseen että sisäeritteisesti verenkierron välityksellä muualla elimistössä. (22.)

Kortisoli on ihmisen tärkein glukokortikoidi. Verenkierrossa kortisoli on sitoutunut transkortiiniin ja vain pieni osa on vapaana. Vapaa kortisoli on biologisesti aktiivinen ja saa aikaan kortisolin metaboliset vaikutukset. Aivolisäkkeen ACTH säätelee kortisolin eritystä lisämunuaisissa. Seerumin kortisolipitoisuus puolestaan säätelee ACTH:n eritystä negatiivisen palautteen välityksellä. Kortisoli lisää glukoosin muodostusta ja estää immuunijärjestelmän toimintaa. Biologisesti aktiivisen kortisolin tuotolla rasvasoluissa uskotaan olevan merkitystä sekä hyperkortisolismiin että metaboliseen oireyhtymään liittyvän keskivartalolihavuuden synnyssä. (23.)

Uusi tulokas adiposytokiinien joukossa on visfatiini, jota erittyy erityisen paljon vatsaontelon sisäisestä rasvakudoksesta. Solukokeissa sillä on todettu olevan insuliinin kaltaisia vaikutuksia, ja se sitoutuu insuliinireseptoriin. Se lisää rasvan kertymistä etenkin metabolisesti haitalliseen paikkaan, vatsaontelon sisälle. Visfatiinista tarvitaan

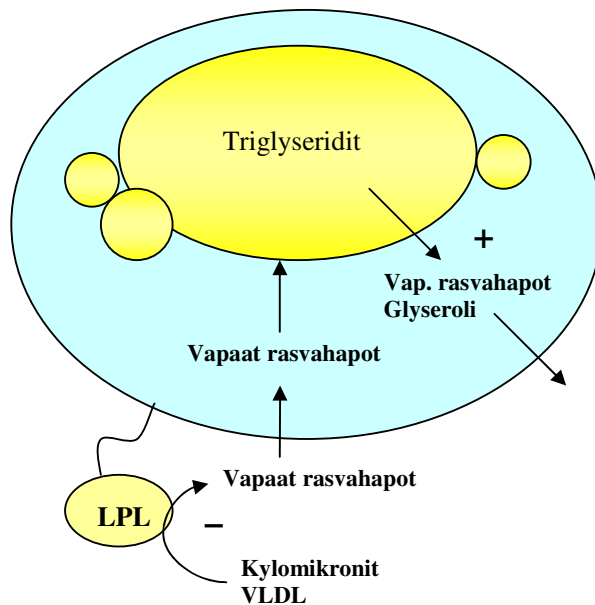
paljon lisätutkimuksia, ennen kuin voidaan arvioida sen merkitystä esimerkiksi metabolisen oireyhtymän synnyssä. (24.)

2.4 Angiopietiinityyppinen proteiini 4 ja sen toiminta

Adiposytokiinien merkitys varsinkin glukoosin aineenvaihdunnassa on laajalti tutkittu, mutta vähemmän tiedetään siitä, miten adiposytokiinit tarkalleen vaikuttavat plasman rasvojen aineenvaihduntaan.

Angiopietiinityyppinen proteiini 4 (Angiopietin-like protein 4, Angptl-4), jota kutsutaan myös nimellä peroksisomien lisääntymisestä aktivoitua reseptorivaikuttaja (tumareseptori PPAR:n myötävaikuttaja) ja maksan fibrinogeeniin/angiopietiniin liittyvä proteiini (Hepatic fibrinogen/Angiopietin-related protein, HFARP), on tunnistettu yhdeksi rasvakudoksen aineenvaihdunnan merkittäväksi, mutta vähemmän tunnetuksi säätelijäksi. (25.)

Hiiritutkimuksissa saatujen tulosten perusteella Angptl-4:n määrän kasvu ääreiskudoksissa sai aikaan 50 %:n vähenemisen rasvakudoksen kokonaispainossa, mistä suurin vaikutus aiheutui rasvojen hajoamisen nopeutumisella. Angptl-4:n on todettu inhiboivan lipoproteiinilipaasin (LPL) vaikutusta pilkkoa lipoproteiinien kuljettamia triglyseridejä vapaiksi ja auttaa niiden soluun siirtymistä. (26.)



Kuva 4. *Angptl-4 inhiboi lipoproteiinilipaasiaktiivisuutta (LPL) ja vapauttaa rasvahappoja rasvasoluista. (26)*

Tämän seurauksena triglyseridien, vapaiden rasvahappojen, glyserolin, tiheydeltään korkea plasman lipoproteiinin (HDL, High Density Lipoprotein) ja kokonaiskolesterolin määrä kasvoi plasmassa (kuva 4). Angptl-4:n vaikutus voimistui lisäksi korkearasvaisessa ruokavaliassa (hiirillä), jolloin plasman koostumuksen lisäksi se heikensi elimistön glukoosinsietoa merkittävästi. (27.)

Angptl-4:stä on tunnistettu kaksi rakenteellista muotoa, jotka molemmat esiintyvät sekä hiirellä että ihmisellä, mutta eroavat toisistaan tarkalta sijainniltaan lipoproteiinissa. Lipoproteiiniin kiinnittyneenä Angptl-4-proteiinin on todettu välittävän voimakkaan signaalin mm. rasvakudoksesta. Tämä signaali estää rasvojen varastoitumista kudoksiin ja stimuloi niiden siirtymistä verenkiertoon. Varsinkin paaston aikana tämän vaikutuksen on todettu olevan erityisen voimakas. Angptl-4-proteiinin signaalin estymisen on tutkittu aiheuttavan rasva-aineenvaihdunnan häiriintymisen. Angptl-4:n toiminnallinen muoto muiden adiposytokiinien, kuten adiponektiinin, tavoin on laskostunut muoto, mutta sillä on myös suora muoto. (27.)

Nimensä mukaisesti Anptl-4 lisääntyy elimistössä tumareseptorien PPAR α ja PPAR γ vaikutuksesta, jolloin sitä voidaan kutsua PPAR-tumareseptorien välittömäksi

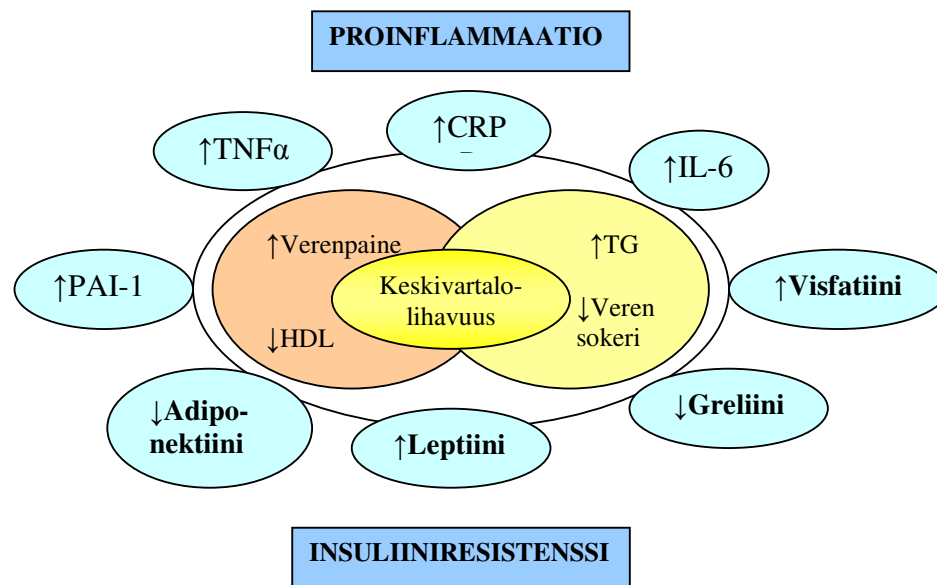
kohteeksi. Angptl-4 on tunnistettu myös rasva-arvoja vähentävän fibraattilääkityksen ensisijaiseksi kohteeksi elimistössä. Fenofibraatin, jota on epäilty niin ikään PPAR-tumareseptorin myötävaikuttajaksi ja jota käytetään rasva-arvoja alentavana lääkkeenä, todettiin tutkimuksissa lisäävän plasman Angptl-4:n laskostuneen muodon määrää. (27.)

Plasman lipoproteiinitason säätelyn häiriö nostaa riskiä sairastua sydän- ja verisuonitauteihin. Lipoproteiinilipaasin aktiivisuus tietyssä kudoksessa toimii tasoa rajoittavana tekijänä triglyserideistä saatujen rasva-happojen sisään otossa kudokseen. Epätasapaino rasvahappojen jakautumisessa kudokseen puolestaan aiheuttaa laajoja aineenvaihdunnallisia vaikutuksia. Kun näin ollen tunnetaan lipoproteiinilipaasin tärkeä merkitys aineenvaihdunnalle, on entistä tärkeämpää tutkia lipoproteiinilipaasia estävän tekijän, Angptl-4:n, toimintaa ja potentiaalia uusissa terapeuttisissa hoidoissa. (28.)

Angptl-4 ja angiopoietiinityyppinen proteiini-3 (Angptl-3, Angiopietin-like protein 3) ovat kaksi angiopoietiinityyppisen proteiiniperheen jäsentä. Angptl-3:n on todettu vaikuttavan positiivisesti elimistön endoteelilipaasitasoon. Siinä missä endoteelilipaasin määrän nouseminen elimistössä laskee aineenvaihdunnan toiminnan kannalta tärkeän HDL:n määrää, inhiboi Angptl-3 endoteelilipaasin aktiivisuutta. Useat geenimuunnelluilla hiirillä suoritettut tutkimukset ovat auttaneet näiden kahden proteiinin fysiologisen merkityksen selvittämisessä *in vivo*. Lisäksi proteiinien muuntelua terapeuttiseen käyttöön soveltuvaksi tutkitaan aktiivisesti. (28.)

2.5 Rasvasolujen aineenvaihdunnan häiriöt

Useat metaboliset poikkeavuudet, kuten lihavuus, insuliinin vaikutuksen heikkeneminen kohdekudoksessa, rasva-aineenvaihdunnan häiriöt, koholla oleva verenpaine ja huonontunut sokerinsieto, esiintyvät useammin yhdessä samoilla henkilöillä kuin sattuman perusteella voisi olettaa. Tätä sydän- ja verisuonisairauksien riskitekijöiden kasaamaa (kuva 5) on nimitetty metaboliseksi oireyhtymäksi (Metabolic syndrome, MBO). Henkilöllä, jolla on metabolinen oireyhtymä, on suuri riski sairastua valtimosairauksiin.



Kuva 5. Metabolisen oireyhtymän kannalta tärkeitä osatekijöitä sekä oireyhtymään vaikuttavat keskeisimmät peptidihormonit. (11)

Tärkein osatekijöistä on rasvan liiallinen kertyminen vatsaontelon sisäiseen tilaan. Tämä johtaa insuliiniresistenssiin, edistää hyytymien syntymistä ja lisää tulehduksen vaaraa. Kaikki nämä muutokset edistävät valtimonkovettumistaudin kehittymistä. Peptidihormonien käyttö metabolisen oireyhtymän indikaattoreina on jatkuvan tutkimuksen kohteena.

Liikalihavuus on länsimaista lähtöisin oleva nopeasti kasvava elintasosairaus, joka varsinkin korkean elintason maissa koskettaa jo kaikkia ikäryhmiä ja jonka on todettu olevan yhteydessä ennenaikaiseen kuolemanriskiin. Yksilötasolla juuri keskivartaloon kertynyt ylimääräinen rasva, keskivartalon lihavuus, on syynä mm. sydän- ja verisuonitautien kehittymiselle verisuonten kalkkeutumisen johdosta. Vakavimmillaan verisuonten kalkkeutuminen voi johtaa kuolemaan aivohalvauksen, sydämen ahtauman, sydänveritulpan tai muiden sydän- ja verisuonitautien välityksellä. Vaikka sydän- ja verisuonitautien kehittymiseen vaikuttavia tekijöitä on useita, liikalihavuuteen yhdistettyjen tekijöiden voidaan sanoa olevan oma itsenäinen kokonaisuutensa. (29.)

Liikalihavuuden merkitys sairauksien kehittymisessä on tähdellinen juuri sen yleisiä riskitekijöitä nostavan vaikutuksen vuoksi, jolloin itse sairauden kehittyminen tulee todennäköisemmäksi. Rasvakudoksen määrällä on vaikutusta verenpaineeseen, veren hyytymiseen, fibrinolyysiin sekä tulehdusreaktion syntymiseen, joka voi johtaa endoteelin toimintahäiriöön ja verisuonitauteihin. (30.)

Kokeellinen osa

3. Työn tarkoitus ja tavoitteet

Työn tarkoituksena oli ihmisen seerumin Angptl-4- proteiinin massamäärityksen kehittäminen. Angptl-4:n määrittämiseksi tuotettiin vasta-aineita, joiden toimivuutta testattiin ennen varsinaista näytteiden Angptl-4-pitoisuuden määrittämistä. Varsinainen Angptl-4 pitoisuuden määrittäminen tehtiin rakentamalla sopiva ELISA-testi käyttäen tuotettuja vasta-aineita, sopivaa määrää humaniseeruminäytettä sekä sovittamalla testin muut muuttujat parhaan lopputuloksen saamiseksi. Tavoitteena oli standardoida ELISA-testi niin, että jatkossa sitä voitaisiin käyttää rutiininomaiseen ihmisen seerumin Angptl-4 tason mittaukseen.

4. Materiaalit ja menetelmät

4.1 Vasta-aineiden valmistaminen

Angptl-4-vasta-aineiden valmistukseen valittiin neljä kania, joihin jokaiseen injektoidiin hiiren synteettisesti valmistettua Angptl-4-peptidiä. Peptidipätkät oli valmistettu Haartman-instituutin peptidisynteesi-laboratoriossa. Verta otettiin immunisaation yhteydessä noin kuukauden välein (7ml/kanin painokilo). Näytteenotokertoja tuli kuuden kuukauden aikana 5-6 kpl jokaisesta neljästä kanista.

Näytteenoton jälkeen kaniveriä säilytettiin +4 °C:ssa, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (10 min, 3000 rpm, G-arvo: 1609,92 G). Erottunut seerumi pipetoitiin ja sentrifugoitiin vielä uudestaan punasolujen erottamiseksi. Seerumit säilöttiin 2ml:n erissä -20 °C:ssa.

4.2 Korkeapainenestekromatografia

Käytetyt laitteet ja reagenssit:

- Korkeapainenestekromatografialaitteisto (Merch-Hitachi, L-4200 UV-VIS detector, L-6200A Intelligent pump) jossa virtaus 1,0ml/min
- Kolonni: Proteiini G pylväs (1ml HiTrap™ Protein G HP, Amersham Pharmacia Biotech AB)
- Pesupuskuri: fosfaatti-NaCl-puskuri (Phosphate buffer saline, PBS), 137 mM NaCl, 10 mM Na-fosfaatti, 2,7 mM KCl, pH 7,4
- Eluointipuskuri: 0,1M Glysiini, pH 2,5
- 1 M Tris-HCl, pH 9,0

Vasta-aineen puhdistus seerumista immunoglobuliini G:ksi tehtiin korkeapainenestekromatografialaitteiston (HPLC, High-Performance liquid Chromatography) avulla, joka perustui affiniteetikromatografiaan. Käyttämällä sekä monoklonaalisen että polyklonaalisen vasta-aineen puhdistukseen sopivaa IgG-proteiinia sitovaa Proteiini G -pylvästä saatiin kerättyä synteettisellä Angptl-4-peptidillä immunisoitujen kaniverinäytteiden seerumista IgG-vasta-ainefraktio.

Laitteisto pestiin valmiiksi ajoa varten ja pesupuskuria ajettiin pH:n nostamiseksi. Oikea pH (pH 7-8) havaittiin pH-paperin avulla. Laitteistoon ladattiin ensimmäinen kaniseeruminäyte (1 ml) ja aloitettiin ajo, jolloin seerumin sisältämä IgG-vasta-aine sitoutui valmiiksi pakatun 1 ml:n pylvään proteiini G:hen. Eluointi suoritettiin glysiinillä happamissa olosuhteissa. Aineisto kerättiin piirtyneiden käyrien huipuista, jotka kuvasivat pylväessä erottuneita seerumin osia. Ensiksi kolonnista saatiin piikki, joka oli seerumin proteiini G-pylväeseen tarttumaton osa. Seuraava oli haluttu proteiini

G -pylvääseen tarttunut IgG-fraktio. Saadut fraktiot jaettiin koeputkiin, jotka säilöttiin +4 °C:ssa.

4.3 Proteiinimääritys

Proteiinimääritys tehtiin Lowry et al. menetelmän mukaan.

Käytetyt laitteet ja reagenssit:

- Spektrofotometri (Wallac Victor II Multilabel, 595nm)
- 6 × 8 kuoppalevy (NUNC, 48 kaivon proteiinimittauskuoppalevy, 50µl/kaivo)
- Kuoppalevyravistelijä
- Reagenssi A (yhdistetään suhteessa 100:1:1):
 - o 2 % Na₂CO₃-1% SDS (Merck, Darmstad, Germany)
 - o 4 % K-Na-tartraatti (Merck, Darmstad, Germany)
 - o 1% CuSO₄ (Merck, Darmstad, Germany)
- Reagenssi B: Folin reagenssi (säilytettävä +4 °C, valonarkaa)
- Milli-Q H₂O, Sähkönjohtavuus < 0,006 mS/m (Millipore-laitteisto)
- Härän seerumialbumiini (Bovine Serum Albumin, BSA) A-4503 (SIGMA)
- High- ja Low-kontrollit (valmistettu 0,9 % NaCl:iin)

Valmistettiin standardisuora BSA:sta (0,1 – 1 mg/ml) Milli-Q veteen tehdyn 1 mg/ml BSA-kantaliuoksen avulla. Kuoppalevyyn pipetoitiin ensin standardisuora toistaiseen, sitten lisättiin kaivoihin 500 µl reagenssia A ja annettiin reaktion tapahtua 10 minuuttia ravistelijalla. Lopuksi lisättiin 50 µl reagenssia B ja annettiin inkuboitua ravistelijalla 30 min – 1 h.

Absorbanssimittauksessa kaivoissa ei saa olla kuplia estämässä tuloksen lukua, ja itse mittausta suoritettiin valon aallonpituudella 595 nm. Saadulle suoralle (konsentraatio absorbanssin funktiona) sijoitettiin oman näytteen arvo, josta saatiin laskettua sen proteiinikonsentraatio. Standardisuoran kaavasta laskemalla saatua näytteen proteiinipitoisuutta käytettiin hyväksi laskettaessa ELISA-testissä yhteen kaivoon mahtuvaa peptidimäärää.

4.4 Geelielektroforeesi

Käytetyt laitteet ja reagenssit:

- SDS-geelijokammio (Pharmacia LKB, ECPS 3000/150, Hoefer, SE 260)
- virtalähde
- 12,5 % polyakryyliamidigeeli (valmistettiin ylä- ja alageelistä valamalla, säilytys +4 °C)
- Geelin valmistuskasetti

Taulukko 1. Geelielektroforeesissa tarvittavat reagenssit

Ylägeeli	Reagenssi	määrä
	30 % akryyliamidi/bis-akryyliamidi	9,38ml
	3 M TRIS-puskuri	2,81ml
	H ₂ O	10,18ml
	10 % APS (ammoniumpersulfaatti), 10 %	112µl
	TEMED (N'-tetrametyyli-etaani-1,2-diamiini), pH 8,9	15µl
Alageeli		
	30 % akryyliamidi/bis-akryyliamidi	1,25ml
	1M TRIS-puskuri	1,25ml
	H ₂ O	7,44ml
	APS (ammoniumpersulfaatti) 10 %	60µl
	TEMED (N'-tetrametyyli-etaani-1,2-diamiini) pH 8,9	8µl
Näytepuskuri		
	glyseriini	1ml
	2-merkaptetaanoli	0,5ml
	20 % sodiumdodekyylisulfaatti	1ml
	TRIS- puskuri, 0,5M, pH 6,8	1,25ml
	brumfenolisininen, 0,5 M	0,1ml
	Milli-Q H ₂ O	1,15ml
SDS-PAGE standardiliuos (Prestained SDS-PAGE Standards)	Low Range, Control 310 000 986 (Bio-Rad)	3,5µl
Ajopuskuri		
	196mM glysiini	288,2g
	0,1 % SDS	20g
	50 mM Tris-HCl, pH 8.3	60,6g

Tutkittavista näytteistä tehtiin laimennokset ja ennen kaivoihin pipetointia näytteisiin lisättiin 10 µl näytepuskuria jonka sisältämä 2-merkaptetaanoli toimi pelkistävänä rakenteen avaajana. Näytteitä kuumennettiin noin viiden minuutin ajan kiehuvaan vesihautteeseen, sentrifugoitiin 10 sekuntia maksimilla ja pipetoitiin näytteet geelille.

Geelin ensimmäiseen kaivoon pipetoitiin 3,5 µl valmiiksi värjättyä SDS-PAGE-standardiliuosta (taulukko 1), jolla saatiin geelille värjätyt molekyylipainomerkit tulosten määrittämiseksi. Laitteistoon lisättiin ajopuskuria, se suljettiin ja ajo

suoritettiin 150 W ylägeelille ja 180 W alageelille noin tunnin ajan tai kunnes näytteiden sininen väri oli selkeästi kulkenut geelin alareunaan asti.

4.5 Western Blotting eli immunoblottaus

Käytetyt laitteet ja reagenssit

- Siirtoajalaitteisto (siirtoajo 400 mA:n virralla 45 minuutin ajan)
- Nitroselluloosakalvo (Hybond-C Extra)
- Imupaperi (Whatman)

Taulukko 2. Immunoblottauksessa tarvittavia aineet ja niiden valmistusreagenssit

Ajopuskuri, pH 8.3	
	50mM Tris-puskuri - HCl
	0,196M glysiini
Päällystyspuskuri	
	5 % Valion rasvaton maitojauhe
	TBS -liuos, pH 7,6 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl,
	0,05 % Tween-20 (Polysorbaatti 20))
Huuhtelupuskuri	
	0,5 % Valion rasvaton maitojauhe
	TBS-liuos, pH 7,6 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl,
	0,05 % Tween-20 (polysorbaatti 20))
Primaarivasta-aine:	
	Kanissa tuotettu Angptl-4-vasta-aine 1:1000
Sekundaarivasta-aine:	
	Vuohessa tuotettu kanivasta-aine (Goat anti rabbit, GAR, Bio Rad). Entsyymileimattu 1:2000
	0,5 % Valion rasvaton maitojauhe
	TBS-liuos, pH 7,6 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl,
	0,05 % Tween-20 (polysorbaatti 20))
Irotuspuskuri, pH 2,25	
	1 M glysiini 10-kertainen kantaliuos

Blottauksen jälkeen nitroselluloosakalvolle olivat siirtynyneet geelielektroforeesin geelin proteiinit. Kalvot käsiteltiin epäspesifisen tarttumisen estämiseksi päällystyspuskurissa (taulukko 2) 0,5-1 tunnin ajan huoneenlämmössä ravistelijalla. Tämän jälkeen valmistettiin jokaista kalvoa varten huuhteluliuosta siten, että vasta-aineita lisättiin liuoksiin suhteessa 1:1000. Huuhtelu suoritettiin kolme kertaa 15 minuutin välein. Vasta-aineen lisäämisen jälkeen käsiteltiin kalvot sekundaarisella vasta-aineella (taulukko 2), joka tunnisti primaarisen kanissa tuotetun vasta-aineen. Sekundaariseen vasta-aineeseen oli sidottu entsyymi kemiluminesenssiin perustuvan tuloksen mittauksen mahdollistamiseksi.

Kalvoja jouduttiin myös pesemään vasta-aineista muutamia kertoja koko tutkimuksen aikana tuloksen selkeyttämiseksi. Kalvoja pidettiin irrotuspuskurissa 30 minuuttia 50 °C:ssa ennen uutta käsittelyä.

Tuloksen havainnoinnissa käytetyt laitteet ja reagenssit:

- Filmin kehityslaitteisto (Kodak)
- Filmi (Fuji Super RX medical x-ray film)
- Lasilevy
- Ajastin
- Nitroselluloosakalvo, jossa siirretyt vasta-aineet
- Kehitysluokset 1 ja 2 (Amersham ECL-western blotting detection, GE Healthcare)
- Ajopuskuri: 50 mM Tris-emäspuskuri (Tris-hydroksymetyyli-aminometaani), pH 8,3

Tutkittava nitroselluloosakalvo, jolle oli siirretty halutut, sekundaarisen vasta-aineen avulla leimatut kanin seerumista eristetyt IgG-vasta-aineet, laitettiin lasilevyn päälle ja pipetoitiin kehitysluokset kalvolle. Kalvo peitettiin muovikelmulla ja kehitys tapahtui filmille välillä 10 s – 10 min. Kehityksen jälkeen filmillä näkyivät erottuneet proteiinit tummentumina.

4.6 IgG-vasta-aineen entsyymileimaus

Käytetyt laitteet ja reagenssit:

- Dialyysiletku (12-14kDa cut-off)
- Rullasekoitin
- Piparjuuriperoksidaasientsyymi (Horse Radish Peroxidase, HRPO), Sigma
- HPLC-puhtausluokan vettä (Rathburn)
- 0,1 M Na-metaperjodaatti
- 1 nM Na-asetaatipuskuri pH 4,4
- 0,1 M karbonaatti-bikarbonaatipuskuri (0,1M NaHCO₃, 0,1M Na₂CO₃), pH 9,5
- Pelkistävä reagenssi: natriumborohydridi
- PBS-puskuri (137 mM NaCl, 10 mM fosfaatti, 2,7 mM KCl), pH 7,4

Liutettiin 5 mg peroksidaasi-entsyymiä 1 ml:aan HPLC-puhtausluokan vettä, jonka jälkeen lisättiin 0,2 ml 0,1M Na-metaperjodaattia ja sekoitettiin hyvin. Tämän jälkeen seosta inkuboitiin huoneenlämmössä 30 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen liuos dialysoitiin yön yli Na-asetaatipuskuria (5 litraa) vastaan. Liuos lisättiin dialyysiletkuun, ja se suljettiin tiiviisti sulkijoilla.

Leimattava IgG, joka oli saatu eristettyä korkeapainekromatografialla kaniseerumista, dialysoitiin vastaavalla menetelmällä ja samanaikaisesti 0,1 M karbonaatti-bikarbonaatipuskuria (5 litraa) vastaan yön yli viileässä paikassa. Molemmat liuokset olivat kevyellä sekoituksella dialysoinnin ajan.

Dialysoinnin jälkeen IgG-preparaatti ja dialysoitu peroksidaasi yhdistettiin ja sekoitettiin rullasekoittimella huoneenlämmössä kahden tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen putki peitettiin alumiinifoliolla ja lisättiin 5 mg pelkistävää reagenssia, ja lisäyksen jälkeen korkki avattiin muutaman kerran vapautuvan vedyn poistamiseksi.

Pelkistysreaktion annettiin edetä tunnin ajan vetokaapissa ilman sekoitusta, jonka jälkeen konjugaatti dialysoitiin PBS-puskuria (5 litraa) vastaan käyttäen dialyysiletkeä. Dialyysiliuos vaihdettiin kerran uuteen liuokseen.

4.7 ELISA-menetelmä

4.7.1 Kuoppalevyjen valmistaminen

Käytetyt laitteet ja reagenssit

- 96-kuoppalevy (NUNC)
- Kuoppalevyn pesuri (LabSystem Multiwash)
- 0,05M natriumkarbonaattipuskuri (0,05M Na₂CO₃ ja 0,05M NaHCO₃), pH 9,6, 100 µl/kaivo
- Pesupuskuri: fosfaatti-NaCl-puskuri (PBS) + 0,5 % Tween 20 (Fluka), 300 µl/kaivo
- Päälylystyspuskuri: 1 x PBS + 0,5 % rasvaton häränseerumialbumiini (Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma, A3803) 200 µl/kaivo

Pohjan päälylystys tehtiin karbonaattipuskuriin laimennetulla IgG-vasta-aineella. IgG-vasta-aine oli saatu yhdestä neljästä kanista. Ensimmäinen pesu tehtiin seuraavana päivänä pesurilla käyttäen ohjelmaa, joka huuhteli kaivot kuusi kertaa. Epäspesifisen tarttumisen estäminen tehtiin laittamalla levyille päälylystyspuskuriä. Levy laitettiin ravistelijalle nopeudella ~300 rpm ja inkuboitiin 1 tunti huoneenlämmössä. Tämän jälkeen levyt pestiin toisen kerran samalla tavalla kuin ensimmäisessä pesussa.

4.7.2 Angptl-4:n ELISA-analyysi

Käytetyt laitteet ja reagenssit

- Spektrofotometri (Wallac Victor 2 Multilabel, Protokolla luotu: 1.9.1996 Wallac, laitteen sarjanumero 420 180 0))
- Sekundäärivasta-aine, kaniveren seerumista eristetty ja entsyymileimattu anti-Angptl-4 – IgG-liuos.
- Laimennuspuskuri: 1 x PBS + 0,5 % Tween 20 + 0,5 % rasvaton häränseerumialbumiini
- Fenyleenisubstraatti: 100 µl/kaivo
 - 6,25ml 0,1 M sitruunahappo
 - 6,25ml 0,1 M Na₂HPO₄
 - 12,5ml Milli-Q H₂O
 - o-fenyleenidiamiini-dihydrokloriditabletti (OPD, o-phenylene-diamine)
 - 10µl H₂O₂
- Rikkihappo: 3M H₂SO₄ , 50µl/kaivo

Laimennuspuskuriin laimennetut näytteet pipetoitiin levyille (yhteensä 100 µl/kaivo) ja inkuboitiin ravistelijalla huoneenlämmössä 300 rpm tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen levy pestiin pesupuskurilla.

Laimennetty sekundäärivasta-aine lisättiin kaivoihin ja inkuboitiin ravistelijalla huoneenlämmössä 300 rpm tunnin ajan, jonka jälkeen pestiin levy edellisten pesujen tavoin.

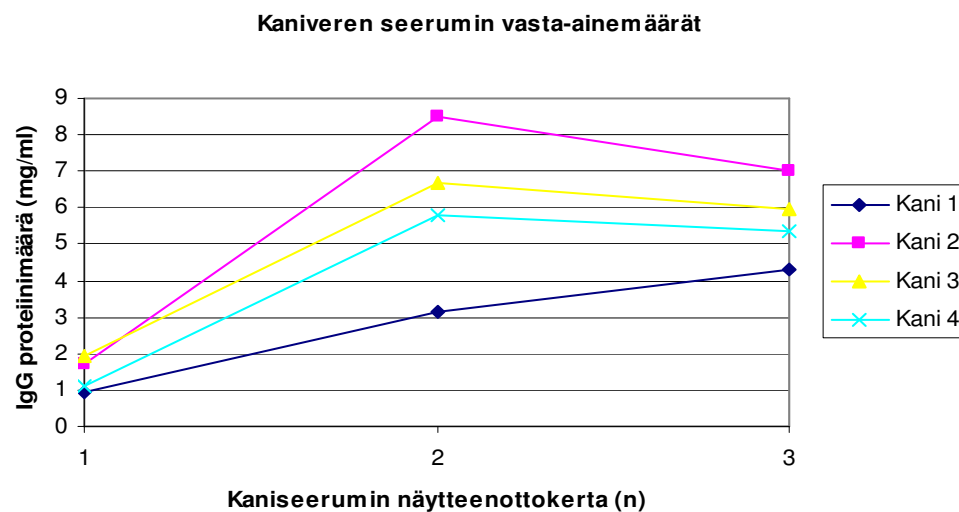
Entsyymireaktio aloitettiin lisäämällä 100 µl substraattia per kaivo ja peitettiin levy foliolla. Kun väri näytti hyvältä (yleensä 4-15 minuutin aikana), se pysäytettiin lisäämällä rikkihappoa jokaiseen kaivoon. Absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä 490 nm aallonpituudella ja muutettiin Angptl-4-pitoisuudeksi spektrofotometrin ohjelman kaavan mukaisesti. Saadut absorbanssit sijoitettiin Excel-ohjelmassa y-akselille, ja x-akselille laskettiin näytteiden laimennoskerrointen sekä kaivon proteiinimäärän perusteella konsentraatio (µg/ml).

5. Tulokset ja tulosten tarkastelu

5.1 Angptl-4-vasta-aineiden tuotto ja testaus

Anti-Angptl-4-vasta-aineiden tuotto aloitettiin injektoimalla aiemmin valmistettua hiiren synteettistä Angptl-4-peptidiä neljään kaniin. Koe-eläimeksi valittiin kani, sillä näytelmäärän tarve arvioitiin noin 20 ml verta/näytteenottokerta. Neljä yksilöä (kanta NZW-Rabbit) valittiin, jotta voitaisiin valita parhaiten vasta-aineenmuodostukseen sopivat yksilöt.

Antigeenin injektoinnilla pyrittiin saamaan kanit tuottamaan haluttua Angptl-4-vasta-ainetta, jota voitaisiin myöhemmin testata hiiren ja ihmisen seerumeita vastaan. Angptl-4-proteiinin havaitsemiseksi ja määrittämiseksi. Immunisaation jälkeen kaneista otettiin säännöllisesti verinäytteitä, joista eristettiin haluttu anti-Angptl-4-vasta-aine.



Kuva 6. Vasta-aineiden määrä kaniveressä

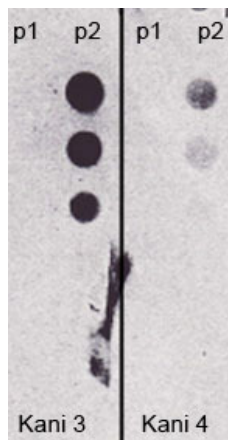
Taulukko 3. Vasta-aineiden määrä kaniverissä.

Näytekertta	Puhdistettu totaali-IgG määrä (mg/ml)			
	Kani 1	Kani 2	Kani 3	Kani 4
I	0,92	1,73	1,91	1,11
II	3,17	8,5	6,7	5,8
III	4,3	6,99	5,95	5,36
Muutos (+/-)	+ +	+ -	+ -	+ -

Tutkimuksen aikana vasta-aineen määrän oletettiin nousevan kaniveressä, mutta alun proteiinimääritysten jälkeen huomattiin seerumin proteiinipitoisuuden vähenevän, kun kaneihin oli injektoitu kolme kertaa tuotettua synteettistä Angptl-4-proteiinia noin kolmen kuukauden aikana (kuva 6 ja taulukko 3) Vain kani 1:n kohdalla vasta-aineen määrä nousi edellisestä vielä kolmannen injektion jälkeen. Tulos on normaali ja kertoo kanien yksilöllisen sietokyvyn eroista.

5.2 IgG-vasta-aineiden analysointi Dot-plot-analyysin avulla

HPLC:llä kanin seerumista puhdistetuista IgG-fraktioista tehtiin Dot-plot-analyysi käyttäen samoja Angptl-4-peptideitä, joita oli käytetty immunisaatiossa. Tulos osoitti kahdessa kanissa tuotetun puhdistetun IgG-fraktion tarttuvan Angptl-4-peptideihin ja ilmenevän dot plotissa erivahvaisina täplinä. Kahden muun kanin seerumista puhdistettu IgG toimi huonommin dot-plot-analyysissä, jonka oletettiin johtuvan kanien yksilöllisistä eroista vasta-aineen tartumisessa peptidiin.



Kuva 7. Dot-plot-analyysi kanien seerumista puhdistetuista IgG-fraktioista.

Kuvassa 7 näkyvät tummentumat tulivat esiin immunoseerumilaimennoksilla, joissa oli proteiinia 20 µg-2 µg. P1 ja p2 tarkoittavat synteettisiä peptidejä, jotka rakennettiin tutkimusta ennen vastaamaan Angptl-4-peptidin aktiivisia rakenneosia ja joita käytettiin kanien immunisoinnissa. Näistä p2 antoi vasteen kani 3:n ja kani 4:n seerumeista puhdistetuille IgG-fraktioille.

Vertailussa käytettiin mukana kaupallista Angptl-4-proteiinivalmistetta omien näytteiden rinnalla sekä vuohessa tuotettua kanivasta-ainetta (Goat Anti Rabbit, GAR). GAR otettiin testiin mukaan sen tarttumisen tarkistamiseksi, sillä GAR:ia haluttiin käyttää myöhemmin sekundaarisen vasta-aineen leimaamisessa ELISA-testissä. Näin ollen oli tärkeää tietää, tarttuuko GAR-vasta-aine suoraan Angptl-4-proteiiniin mikä estäisi sen käytön myöhemmin hyväksi. Tuloksissa ei havaittu epäspesifistä GAR:in tarttumista kaupalliseen Angptl-4-proteiiniin. Lisäksi todettiin, että kanista puhdistetut IgG-vasta-aineet tarttuivat spesifisesti Angptl-4-proteiiniin. Myöhemmät Dot-plot-testit tukivat kokeiden jatkamista kaikilla neljästä eläimestä saadulla immunoseerumilla.

5.3 Angptl-4-proteiininäytteet

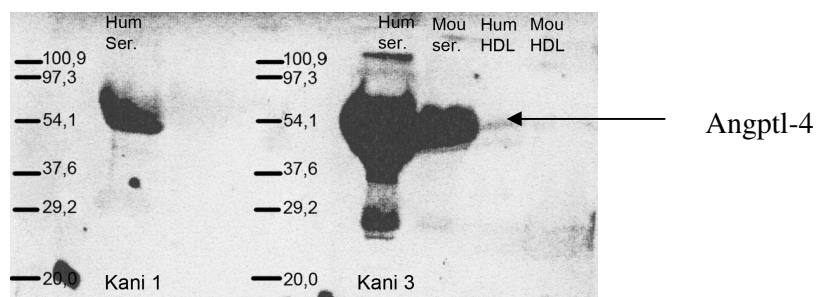
Angptl-4-proteiinin havaitsemiseksi humaani- ja hiirinäytteistä suoritettiin tutkittaville näytteille Western blot -analyysi. Angptl-4-proteiinia oletettiin löytyvän ihmisen

seerumista, lipoproteiinista ja rasvasoluista sekä hiirellä seerumista, lipoproteiinista sekä rasvasoluista.

Angptl-4-proteiini saatiin näkyviin primaarisella toisessa kaniyksilössä tuotetulla vasta-aineella ja tämä puolestaan sekundaarisella vuohessa tuotetulla kanivasta-aineella (Goat anti rabbit, GAR), joka oli leimattu piparjuuriperoksidaasilla kemiluminesenssin mahdollistamiseksi.

Taulukko 4(A). SDS-PAGE-analyysissä käytetyt näytteet.

Humaaniperäiset näytteet	Hiiriperäiset näytteet
Seerumi (yli 8 h paastonneelta ja paastoamattomalta ihmiseltä)	Seerumipooli eri hiirikannoista sekä C57Black-kannasta
HDL (High Density Lipoprotein, ”hyvä” kolesteroli), lipoproteiininäyte, joka on yhdistetty HDL ₂ - ja HDL ₃ -näytteistä (23,3 mg/ml)	HDL, laboratoriossa käytetty yleinen hiiriperäinen (C57B1) lipoproteiininäyte
Seerumialbumiini, HSA (Human serum albumin) (2mg/ml)	Seerumialbumiini, MSA (Mouse serum albumin) (2mg/ml)
Adiposyyttikasvuliuos, kasvatetusta soluviljelmästä 0 päivän ja 8 päivän kuluttua	—
Adiposyyttisolut, kasvatetusta soluviljelmästä 0 päivän ja 8 päivän kuluttua	Adiposyyttisolut, kasvatetusta western-populaatiosta 0 ja 8 päivän kuluttua

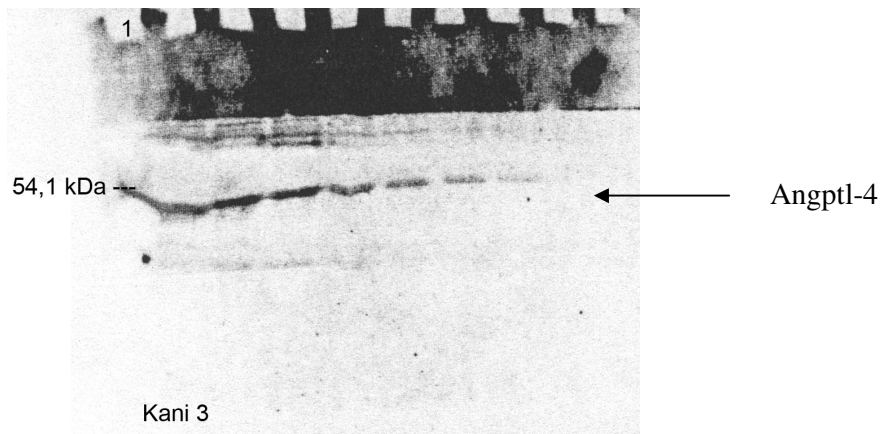


Kuva 8(B). Kahden kaninäytteen ANGPTLA-proteiiniin tarttunut vasta-aine.

Western Blot -analyysissä käytettiin humaani- ja hiiriperäisiä näytteitä (taulukko 4(A)) niin, että yhdessä kaivossa oli näytettä aina 5 mg/kaivo. Seerumista haluttiin myös paastonäyte, sillä Angptl-4-proteiinin oletettiin lisääntyvän seerumissa paastoamisen vaikutuksesta.

Huomattiin, että humaaniseerumi ja hiiriseerumi toimivat parhaiten signaalin antajina kaikista tutkituista näytteistä. Humaani- ja hiiri-HDL antoivat myös signaalin tarttumisesta (kuva 8(B)), mutta ei niin vahvaa kuin seerumeilla. Kani 1 antoi voimakkaan vasteen vain humaaniseerumin kohdalle, kun taas kanin 3 vasta-aineella saatiin näkyviin tarttuminen hiiriseerumin Angptl-4-proteiiniin ja HDL:iin.

Humaani- ja hiiriseerumialbumiini otettiin testiin mukaan, sillä varsinkin humaaniseerumituloksissa (kuva 8(B) kani 3:ssa) näkyi varsinaisen kulkeutuneen proteiinin päällä merkkiä alaspäin painava vaalea albumiinisakka, mitä Angptl-4-vasta-aine ei kuitenkaan tunnistanut seuraavassa Western-blot-analyysissä (kuva 9).



Kuva 9. Ihmisen seerumilaimennos ja ihmisen sekä hiiren seerumialbumiini Western-blot -analyysissä.

Kuvassa (Kuva 9) kaivoihin 9 ja 10 oli ajettu ihmisen ja hiiren seerumialbumiini, mutta verrattuna ihmisen seerumista tehtyyn laimennossarjaan (kuopat 1-8) ei albumiiniin tartu vasta-ainetta eikä se näy tummana. Albumiinin läsnäolo kuitenkin vaikutti korkeilla proteiinipitoisuuksilla painaen fysikaalisesti Angptl-4-proteiinia normaalia

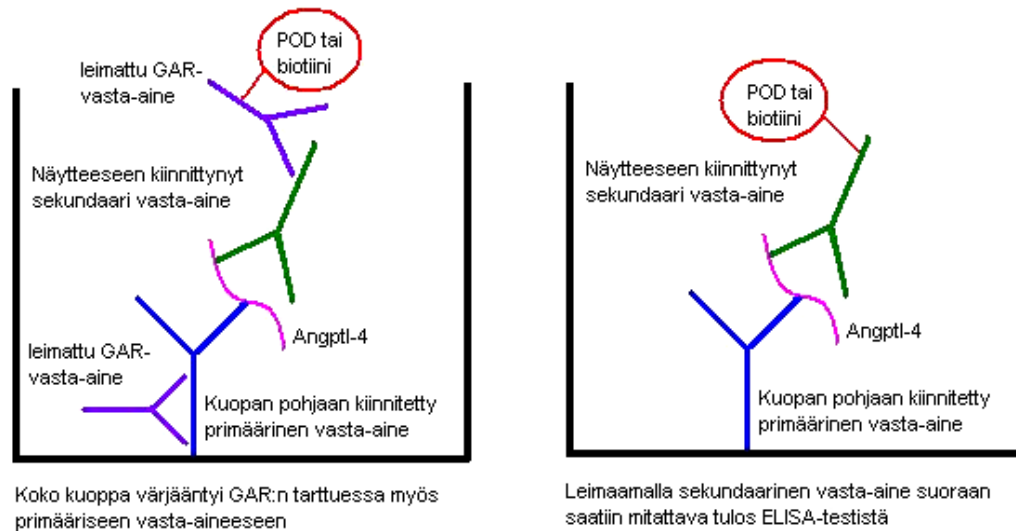
alemmas. Kokeen perusteella voitiin myös tehdä päätelmä, että tuotettu vasta-aine tarttuu spesifisesti Angptl-4-proteiinia sisältäviin näytteisiin.

Tutkimukseen ei otettu mukaan varsinaista negatiivista kudoksetta, jonka olisi tiedetty reagoivan negatiivisesti kanista puhdistettuun IgG-vasta-aineeseen. Tarttumisen eroista kertoi kuitenkin Wester-Blot-analyysi. Adiposyyttikasvuliosta ja kasvatettuja adiposyyttisoluja näytteenä käyttäen saatiin tulos, jossa adiposyyttien kasvuliuosnäytteeseen tarttui Angptl-4-vasta-ainetta, muttei adiposyyttisoluihin. Tulos tuki oletusta siitä, että Angptl-4 on erittyvä proteiini ja läsnä juuri solun ulkopuolella sekä seerumissa. Adiposyyttikasvulioksesta saadun signaalin perusteella sitä voidaan jatkossa käyttää esim. soluviljelyissä Angptl-4:n havainnointiin.

Työn aikana keskityttiin seerumista tehtyihin Angptl-4-proteiinin mittauksiin. Muita kudoksia käytettiin suuntaa antavina tuloslähteinä, jotka tukivat seeruminäytteistä saatuja tuloksia ja antoivat yleiskuvaa Angptl-4-proteiinin toiminnasta.

5.4 ELISA-menetelmän kehittäminen

ELISA-testin kehittäminen aloitettiin immunoblottauksessa saatujen tulosten perusteella, jotka osoittivat Angptl-4-proteiinin tarttuvan kaneissa tuotettuihin IgG-vasta-aineisiin spesifisesti. Immunoblottauksen perusteella oli saatu viitteitä Angptl-4-proteiinin tartumisesta parhaiten veren seerumiin, joten ELISA-testissä käytettiin lähtökohtaisesti juuri seerumia näytteenä.



Kuva 10. ELISA-menetelmän toimimaton ja toimiva suunnitelma. Primaarisena vasta-aineena käytettiin kanissa tuotettua vasta-ainetta.

Ensimmäisessä vaiheessa käytettiin kerros-ELISA-menetelmää, jossa levyn värjäys havainnointia varten tehtiin vuoheissa tuotetulla kanivasta-aineella (Goat anti Rabbit, GAR) sitomalla se sekundaariseen vasta-aineeseen. Kerros-ELISA-menetelmästä kuitenkin luovuttiin, sillä GAR-vasta-aine tarttui myös primaariseen vasta-aineeseen ja värjäsi koko levyn (kuva 10 vasen kaavio). Sekundaarinen vasta-aine leimattiin peroksidaasientsyymillä (Peroxidase, POD) suoraan (kuva 10. oikea kaavio), kun kerros-ELISA-testistä ja vuoheissa tuotetusta kanivasta-aineen käytöstä oli luovuttu.

Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin aluksi vuorotellen joko kani 2:lta tai kani 3:lta puhdistettua immunoseerumia siten, että primaarisen vasta-aineen ollessa kani 2 oli sekundaarinen vasta-aine kani 3:sta saatu immunoseerumi.

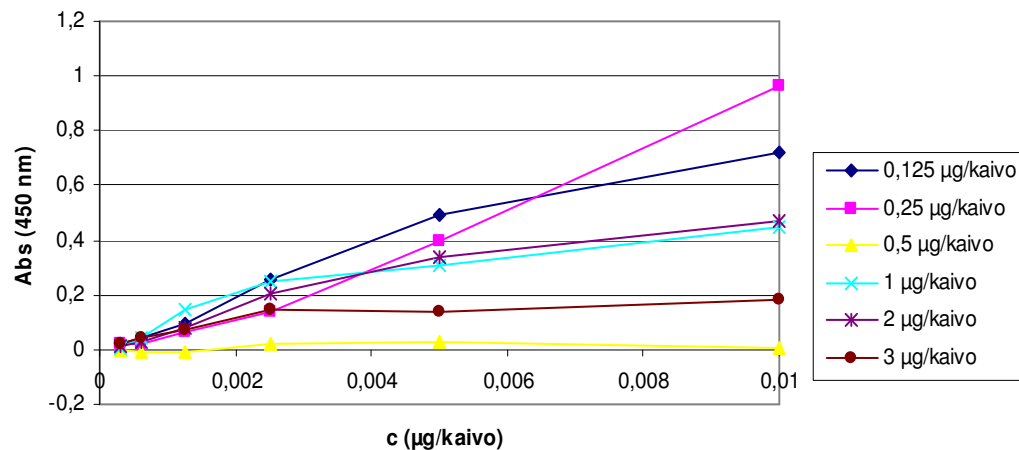
5.4.1 Primaarisen vasta-aineen valinta

ELISA-testi aloitettiin kuopan pohjan vasta-aineiden toimivuuden kartoittamisella käyttäen pohjassa kanissa tuotettuja vasta-aineita ja kiinnittämällä siihen erilaisia näytteseerumeita (taulukko 5).

Taulukko 5. ELISA-testin toimivuuden tarkistamiseen käytetyt näytteet.

Näytteet
Seerumipooli sekahiiripopulaatiosta
C57 Black -kannan hiiriseerumi
Humaaniseerumi

Kun vasta-aineen toimivuus pohjassa oli todettu hiiriseerumikokeiluilla, valittiin yksi kanissa tuotettu vasta-aine ja tehtiin sarja kokeita muuttamalla ainoastaan pohjaan sidottavan vasta-aineen määrää. Vasta-ainevahvuus tutkittiin seuraavilla konsentraatioilla: 0,125; 0,25; 0,5; 1, 2 ja 3 $\mu\text{g}/\text{kaivo}$. Tutkituista primaarivasta-ainevahvuuksista päädyttiin käyttämään vahvuutta 0,5 $\mu\text{g}/\text{kaivo}$, sillä sen avulla saatiin useimmin selkeä ja helppolukuinen tulos.



Kuva 11. Pohjaan kiinnitetyn primaari vasta-aineen määrän vertailu ELISA-testissä, kun sekundaarivasta-aineen määrä oli 1:800.

Kuvassa (kuva 11) oli käytetty 6:ta erilaista pohjaan kiinnitettyä primaarivasta-ainevahvuutta, kun sekundaarivasta-ainelaimennos oli 1:800 ja näytelaimennokset (1:100-1:3200) C57Black -hiiren seerumista.

Kani 2:n ja kani 3:n seerumista puhdistetut IgG-fraktiot vaikuttivat sopivimmilta ELISA-levyn pohjan päällystykseen. Kani 3:n seerumista puhdistettu IgG-vasta-aine näytti toimivan parhaiten kuopan pohjaan sidottuna (taulukko 6) ja sen

proteiinipitoisuus oli 5,951 mg/ml. Kani 2 vasta-ainetta testattiin pitoisuuksilla 6,994 mg/ml – 8,5 mg/ml.

Taulukko 6. ELISA-testin erilaisten muunteluiden tulokset.

Prim. vasta-aine, puhdistettu IgG, Kani 2 (µg/kaivo)	Näytelaimennokset humaaniseerumista	Näytekasittely	Sek. vasta-aine-laimennokset	Tulos
0,5	1:100 - 1:1600	-	1:100-1:3200	+/-
1	1:100 - 1:1600	-	1:100-1:3200	+/-
0,5	1:10 - 1:1600	SDS 0,5%	1:100-1:3200	+/-
1	1:10 - 1:1600	SDS 0,5%	1:100-1:3200	+/-
0,5	1:3 - 1:100	SDS 0,5%	1:100	+/-
0,5	1:3 - 1:100	SDS 0,5%	1:200	+/-
0,5	1:3 - 1:100	-	1:50	+
0,5	1:3 - 1:100	SDS 2%	1:100	+/-
0,5	1:2 - 1:512	SDS 0,5%	1:1000	++
0,5	1:2 - 1:512	SDS 0,5%	1:500	+
Prim. vasta-aine, puhdistettu IgG, kani 3 (µg/kaivo)	Näytelaimennokset humaaniseerumista	Näytekasittely	Sek. vasta-aine-laimennokset	Tulos
0,5	1:3 - 1:100	SDS 0,5%	1:100	-
1	1:3 - 1:100	SDS 0,5%	1:200	+/-
0,5	1:3 - 1:100	SDS 0,5%	1:50	-
0,5	1:3 - 1:100	SDS 2%	1:100	+
0,5	1:2 - 1:512	SDS 0,5%	1:1000	+++
0,5	1:2 - 1:512	SDS 0,5%	1:500	++

5.4.2 ELISA-testin näytteet ja näytekasittelut

Näytteen määrää alettiin optimoida sen jälkeen, kun pohjan IgG:n kiinnitysmäärä oli löydetty suunnilleen sopivaksi. Käytetyt näytteet olivat enimmäkseen hiiren ja ihmisen seerumeita, minkä lisäksi mittauksia suoritettiin muilla kudoksilla, joista oli saatu signaali Dot-plot- sekä Western-blot-analyseissä.

Taulukko 7. ELISA-testissä käytetyt näytekäsittelyt.

Näyte	Käytetyt laimennokset	Mahd. käsittely	Tulokset
C57 Black -hiiriseerumi	1:40 - 1:3200	Käsittelemätön SDS-käsittely	+ ++
Hiiren adiposyyttisolut (3T3L1-hiirikanta)	1:2 – 1:64	SDS-käsittely	++
Paastoamaton humaaniseerumi	1:10 - 1:320	Käsittelemätön SDS-käsittely 1mM β -SH 2mM β -SH 0,5% Tween 20 0,5% CHAPS 0,5% OG	+/- ++ - - - - -
Paastottu humaaniseerumi	1:2 - 1:2560	Käsittelemätön SDS-käsittely	+ ++

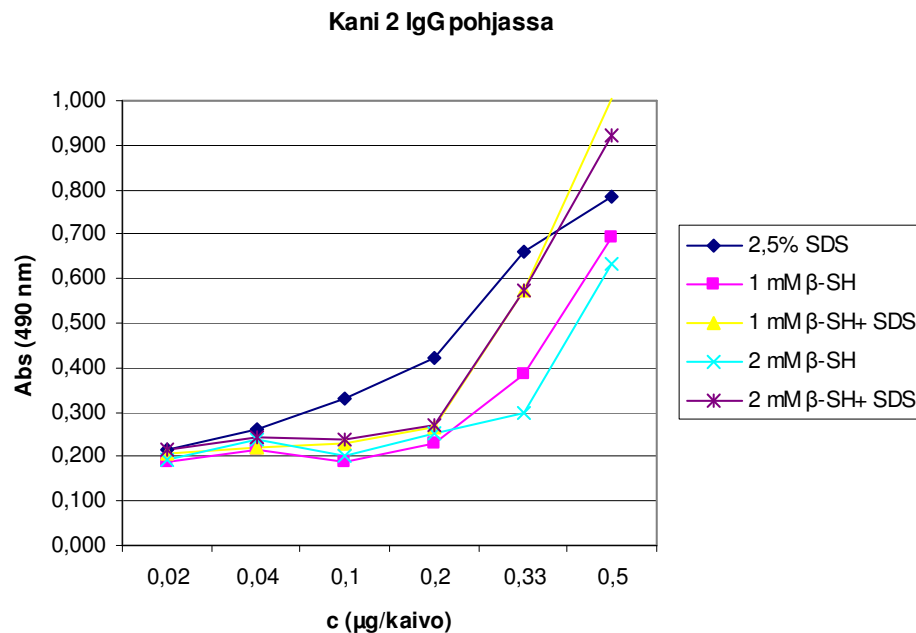
ELISA-testissä kokeiltiin useita eri pinta-aktiivisia aineita tarkoituksena parantaa vasta-aineen tarttumiskykyä proteiiniin. Tietyillä aineilla pyrittiin avaamaan proteiinin rakennetta tarttumisen lisäämiseksi. Näytteenä käytettiin aluksi jo aiemmin immunoblottauksessa hyvän vasteen antanutta C57 Black -hiiriseerumia, joka käsiteltiin myöhemmin natriumdodekyylisulfaatilla (Sodium dodecyl sulfate, SDS). SDS on pinta-aktiivinen aine, jolla pystyttiin avaamaan tutkitun seerumin Angptl-4-proteiinin rakennetta ja parantamaan vasta-aineen tarttumista (taulukko 7).

Hiiren adiposyyttisoluja käytettiin hyväksi määrittäessä lopullista humaaniseerumin Angptl-4-proteiinipitoisuutta. Hiiren adiposyyttisolusta erotettiin ensin geelifiltraatiolla fraktio, joka tarttui pakattuun anti-Angptl-4-pylvääseen. Tämän jälkeen fraktiosta määritettiin sen proteiinipitoisuus (Lowry et al.) jonka avulla proteiinipitoisuudeksi saatiin 1,64mg/ml. Hiiren adiposyyttisolufraktiota käytettiin humaaniseerumin lopullisen Angptl-4-pitoisuuden määrittämisessä vertaamalla näitä kahta ELISA-testissä, sillä hiiren adiposyyttisolujen tiedettiin tuottavan Angptl-4-proteiinia.

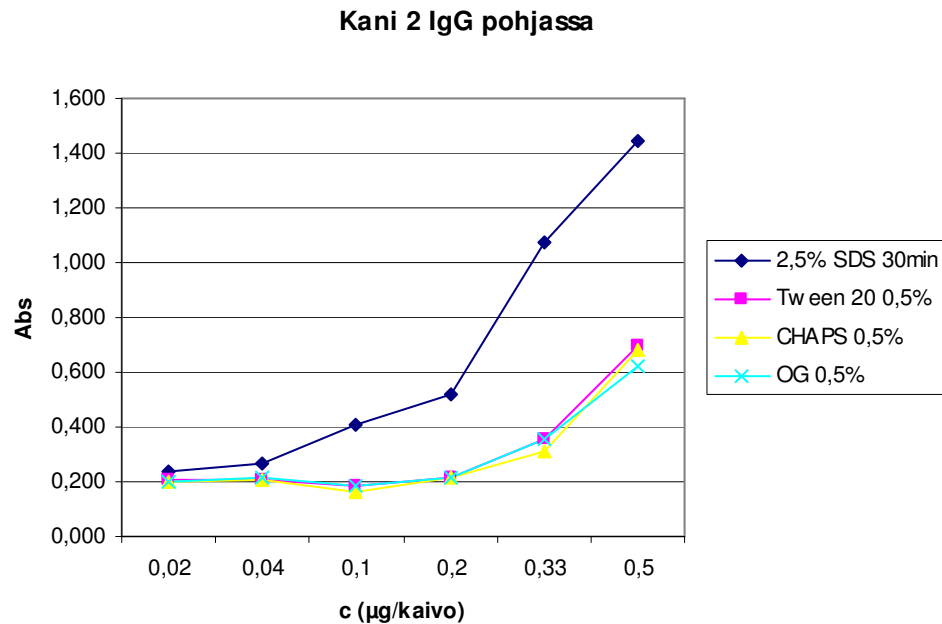
Humaaniseerumin käyttö ELISA-testissä aloitettiin paastoamattomalla seerumilla, johon vasta-aine ei tarttunut kunnolla, ennen kuin näyte käsiteltiin natriumdodekyylisulfaatilla

proteiinirakenteen avaamiseksi. Myöhemmin alettiin käyttää 12 tuntia paastottua humaaniseerumia, jossa vaste oli parempi kuin paastoamattomassa. Oikea näytteen laimennossarja humaaniseerumilla määritettiin välille 1:2 -1:512, jolla havaittiin lineaarinen riippuvuus värin voimakkuuden ja Angptl-4-pitoisuuden välille.

Humaaniseerumin Angptl-4-proteiinin rakenteen avaamiseksi kokeiltiin erilaisia pinta-aktiivisia aineita ja vertailtiin niiden vaikutusta. Natriumdodekyylisulfaattikäsittelyn lisäksi tarkasteltiin β -merkaptoetanolin (β -SH), polysorbaatin (Tween 20), 3-[(3-kolamido- propyyli)dimetyyliammonio]-1-propaanisulfonaatin (CHAPS) ja oktyyloglukosidin (OG) vaikutusta proteiinin muodon avaamiseen ja vasta-aineen parempaan tarttumiseen. Näytekäsittelykokeiluista saatujen tulosten perusteella todettiin natriumdodekyylisulfaatin olevan parhaiten vasta-aineen tarttumiseen vaikuttava proteiinin rakennetta avaava pinta-aktiivinen aine. SDS-käsittelyn todettiin toimivan parhaiten, kun näytekäsittely tehtiin 30 minuutin ajan.



Kuva 12A. Merkaptoetanolikäsittelyn vaikutus ELISA-testin tuloksiin.



Kuva 12B. Muiden näytekäsittelyiden vaikutus ELISA-testin tuloksiin.

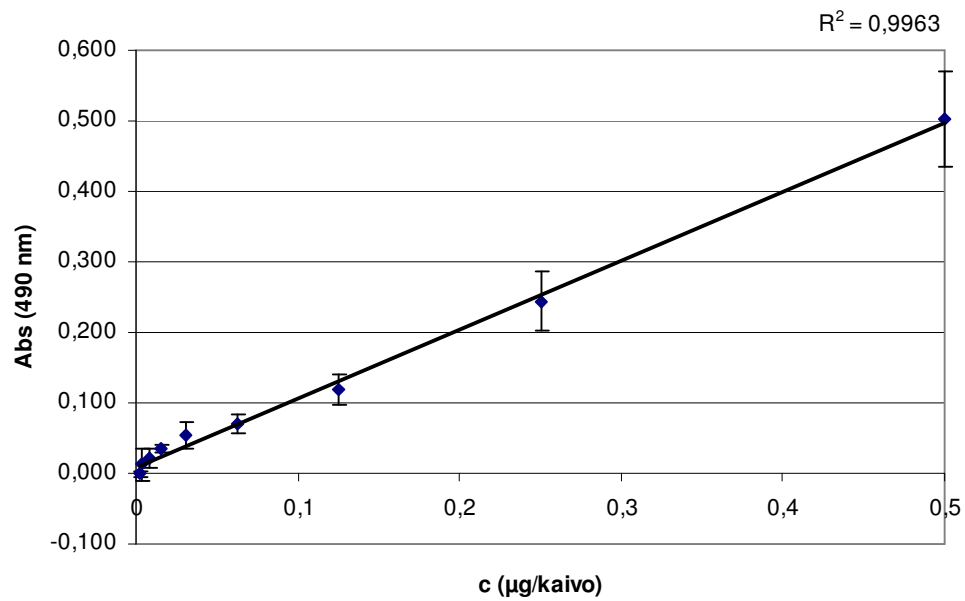
Verratessa natriumdodekyylisulfaatin ja β -merkapttoetanolin vaikutusta näytteen käsittelyssä (kuva 12A) huomattiin, ettei merkapttoetanolin lisäys näytteeseen saikaan selkeää vasta-aineen tarttumisen huippukohtaa, eikä sillä saatu tulosta selkeyttävää vaikutusta Angptl-4-proteiinin määrittämisessä humaaniseerumista.

Merkapttoetanolikäsittelyä kokeiltiin kahdella vahvuudella (1 mM ja 2 mM) sekä yhdessä natriumdodekyylisulfaatin kanssa.

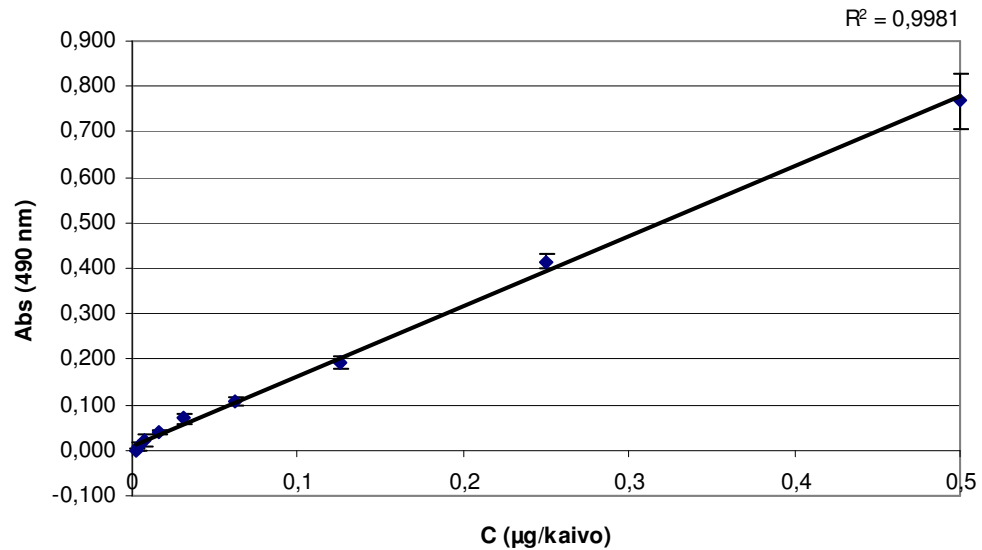
Verratessa vasta-aineen tarttumista näytteen Angptl-4-proteiiniin muilla pinta-aktiivisilla aineilla (kuva 12B) todettiin sen olevan selvästi korkeampi natriumdodekyylisulfaattikäsittelyllä kuin muilla vertailukäsittelyillä. Tuloksien perusteella jatkettiin näytekäsittelyä ainoastaan natriumdodekyylisulfaatilla parhaan tarttumisen saavuttamiseksi.

5.4.3 Sekundaarisen vasta-aineen ja ELISA-testin toistettavuus

Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin lähinnä POD-leimattua kani 3:n immunoseerumia, mutta useiden toistokokeiden jälkeen huomattiin kani 2:n immunoseerumin toimivan paremmin sekundaarisena vasta-aineena ja kani 3:n immunoseerumin primaarisena vasta-aineena.



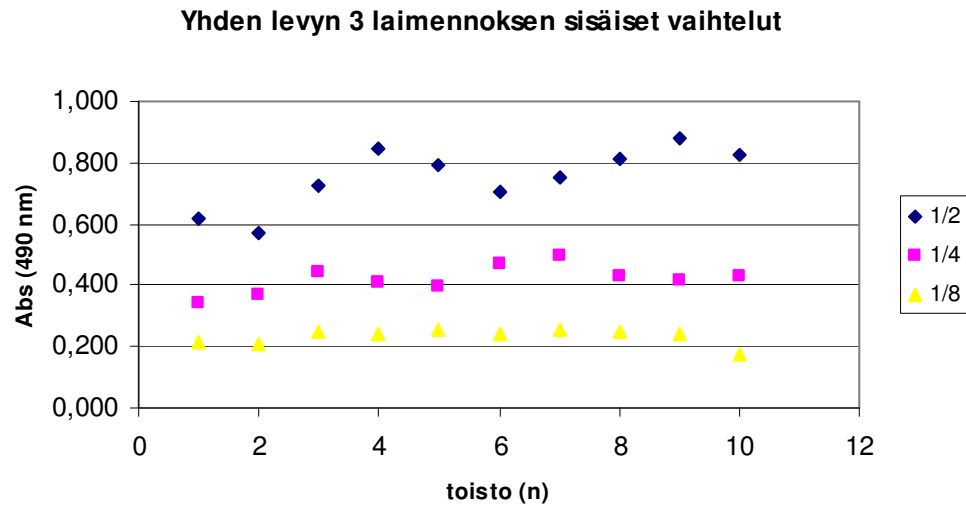
Kuva 13A. ELISA-testin laimennossarjatoistojen hajonta, kun sekundaarisena vasta-aineena oli kani 3:sta puhdistettu IgG-fraktio.



Kuva 13B. ELISA-testin laimennossarjatoistojen hajonta, kun sekundaarisena vasta-aineena oli kani 2:sta puhdistettu IgG-fraktio.

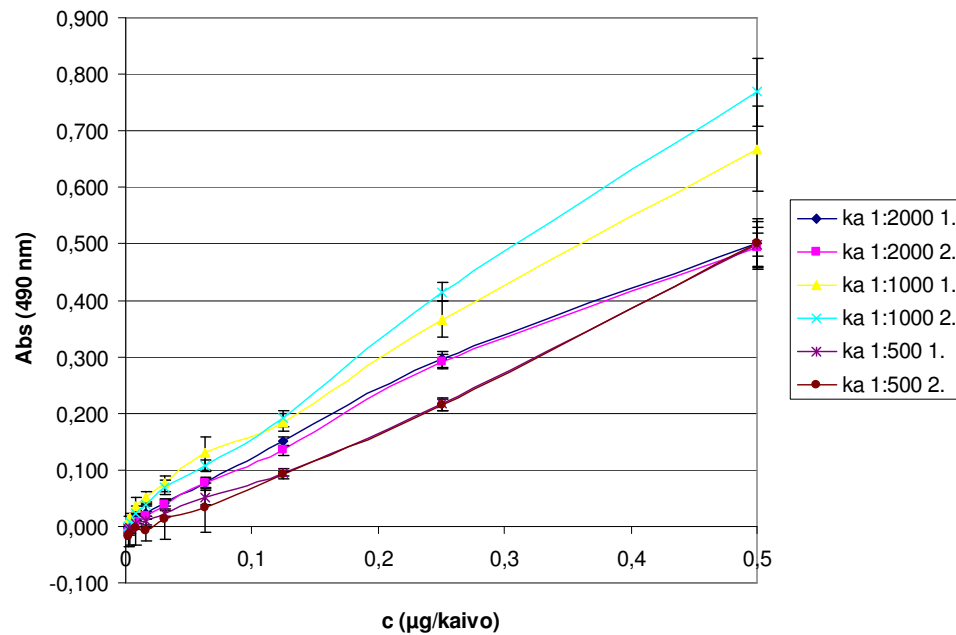
Verrattiin viittä toistettua ELISA-testiä (kuva 13A), joissa sekundaarisena vasta-aineena oli POD-leimattu kani 3 immunoseerumi viiteen ELISA-testiin (kuva 13B), joissa sekundaarisena vasta-aineena oli POD-leimattu kani 2:n immunoseerumi.

Angptl-4-proteiinin havaitsemiseen tarkoitettuna peroksidaasileimattuna vasta-aineena kani 2:n seerumista puhdistettu IgG-fraktio (kuva 13A) antoi pienemmän hajonnan toistomittauksissa kuin kani 3:n seerumin puhdistettu IgG-fraktio (kuva 13B) sekundaarisena vasta-aineena. Näin ollen valittiin kani 2:ssa tuotettu peroksidaasileimattu IgG-vasta-aine jatkokäyttöön ELISA-testissä, sillä sen tulokset olivat luotettavampia pienen hajonnan vuoksi.



Kuva 14. Kolmen samalla levyllä mitatun näytelaimennoksen 10 toiston absorbanssin vaihtelu, kun käytettiin primaarisena vasta-aineena kani 3:n seerumin pudistettua IgG:tä.

Kolmen paastotun humaaniseerumi näytelaimennoksen (1:2, 1:4 ja 1:8) sisäisessä toistokokeessa (kuva 14) yhdellä levyllä saatiin keskihajonnoiksi 0,10 (laimennos 1:2), 0,045 (laimennos 1:4) ja 0,026 (laimennos 1:8).

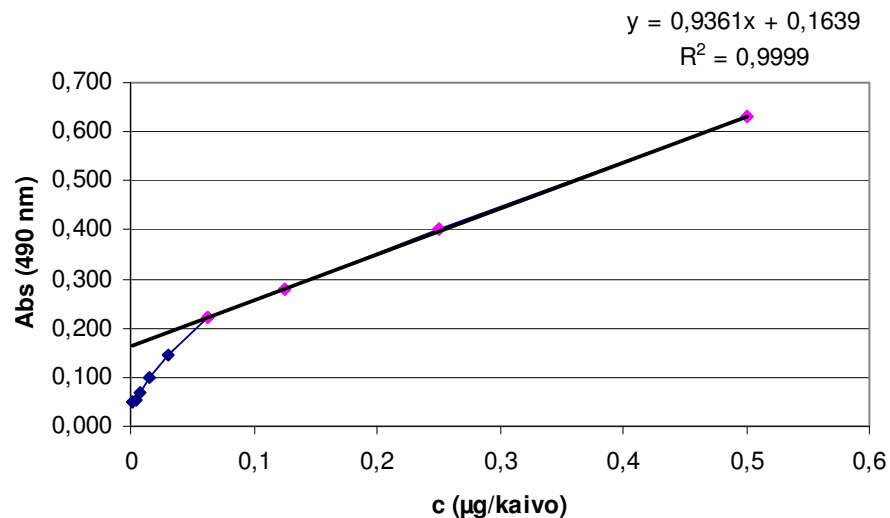


Kuva 15. Sekundaarisen vasta-aineen laimennostoistot.

POD-leimatun sekundaarisen vasta-aineen toimivuutta kokeiltiin laimennoksilla 1:500 – 1:2000 ja päädyttiin laimennokseen 1:1000, jolla saatiin voimakkain tulos (kuva 15) verrattessa erilaisia sekundaarisen vasta-aineen laimennoksia 10 sarjan toistokokeissa, joissa tarkkailtiin myös toistokokeiden hajontaa. Matalampi ja korkeampi POD-leimatun sekundaarisen vasta-aineen laimennos antoivat heikommät tulokset kuin laimennos 1:1000.

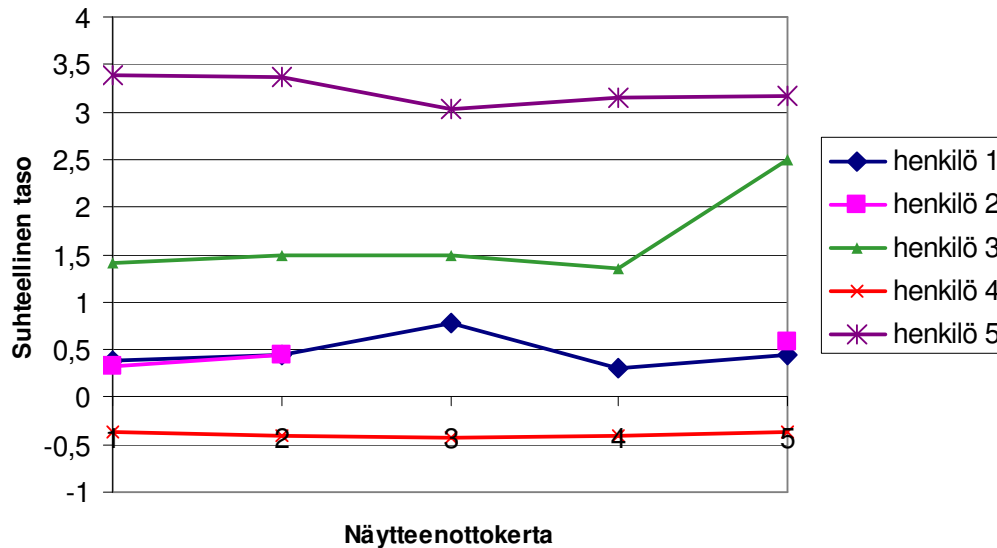
5.4.4 Yksilölliset erot Angptl-4-vasteessa ihmisen seerumissa

Yksilöiden seerumien eroja Angptl-4-proteiinin määrässä tutkittiin preliminäärikokeessa, jossa käytettiin näytteenä viideltä eri ihmiseltä saatua seerumia. Näytteitä otettiin viisi kertaa yhden päivän aikana niin, että ensimmäinen näyte oli 12 tunnin paastonäyte ja toinen näyte noin kahden tunnin kuluttua, ruokailun jälkeen. Tämän jälkeen otettiin vielä kolme näytettä kahden tunnin välein. Teoriassa tulosten olisi tullut seurata muotoa, jossa Angptl-4-taso on ensin matalalla, mutta nousee hetkellisesti ruokailun jälkeen alkaen taas laskea hitaasti.



Kuva 16. ELISA-testin pohjalta tehty paastotun humaniseerumin standardisuora.

Saaduista seeruminäytteistä tehtiin ELISA-testi käyttäen standardisuoran tekoon aiemmin toistokokeissa hyväksi todettua 12 tuntia paastottua humaniseerumia. Saatuun standardisuoraan sovitettiin trendiviiva ja sijoitettiin saatuun yhtälöön mitatut seerumien absorbanssi-arvot (kuva 16) Tulokset sijoitettiin samaan taulukkoon vertailtavaksi.



Kuva 17. Angptl-4-proteiinin tason muutokset seerumissa ajan suhteen eri koehenkilöillä.

Koehenkilöitä ei ollut riittävästi tarkkojen johtopäätösten tekemiseksi, mutta tuloksista voidaan tehdä suuntaa antava päätelmiä siitä, että yksilöiden väliset erot ovat huomattavat Angptl-4-proteiinitasoissa.

Toisen näytteenoton jälkeen (kuva 17) kaikissa käyrissä on havaittavissa muutos, joka viestii mittauksen onnistumisesta, vaikka muutoksen suunta on yllättävä näytteissä 3 ja 5. Näyte 1 ilmentää parhaiten odotettua Angptl-4-proteiinin määrän kasvua seerumissa ruokailun jälkeen. Näyte 2 ei ole täysin vertailukelpoinen, sillä siitä ei ole saatu kaikkia näytepisteitä. Näytteen 4 Angptl-4-taso on liian alhainen verrattavaksi, kun taas näytteen 5 taso on huomattavasti muita korkeampi.

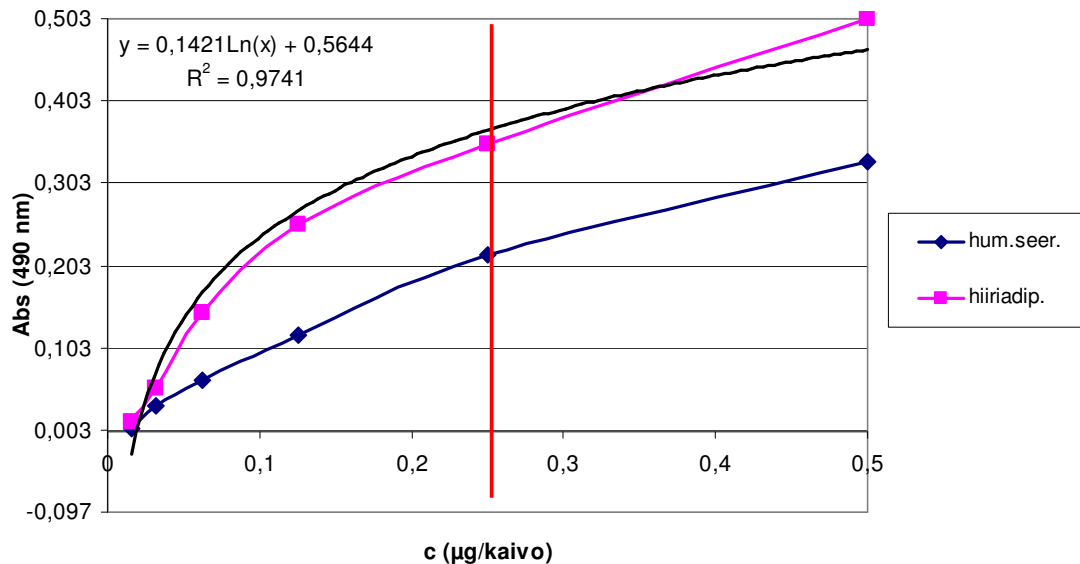
5.5 Lopullinen ihmisen seerumin Angptl-4-proteiinin pitoisuuden määrittäminen

Lopullisen Angptl-4-proteiinipitoisuuden määrittämiseksi ihmisen seerumista käytettiin apuna hiiren adiposyyttisoluja. Seerumia ja adiposyyttikasvuliuosta voidaan verrata, sillä molemmissa Angptl-4-proteiini reagoi samalla tavalla tarttumalla puhdistettuun IgG-fraktioon.

Ihmisen paastotusta seerumista ja hiiren adiposyyttikasvuliuoksesta tehtiin laimennossarjat ELISA-testin näytteiksi (taulukko 8(A)) ja käytettiin primaarisena vasta-aineena kani 3:n seerumista puhdistettua IgG-vasta-ainetta, Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin kani 2:n seerumista puhdistettua ja peroksidaasileimattua IgG:tä.

Taulukko 8(A). *Humaaniseerumin ja hiiri-adiposyyttinäytteiden mittaus samassa ELISA-testissä.*

Konsentraatio	Absorbanssi 450 nm	
	humaaniseerumi	Hiiriadiposyytti kasvuliuos
0,015625	0,004	0,013
0,03125	0,032	0,054
0,0625	0,062	0,145
0,125	0,118	0,253
0,25	0,216	0,350
0,5	0,330	0,503



Kuva 18(B). Humaaniseerumin Angptl-4-proteiinipitoisuuden määrittäminen hiiriadiposyyttikasvuliuoslaimennossarjan avulla.

Humaaniseerumi ja hiiriadiposyyttilaimennossarjan absorbanssit sijoitettiin kuvaajaan konsentraatio ($\mu\text{g}/\text{kaivo}$) absorbanssin funktiona. Proteiinimäärältään tunnettua hiiriadiposyyttisuoraa tutkimalla todettiin tarpeelliseksi määrittää mittaukselle sopivan kasvun alue, jonka perusteella humaaniseerumin proteiinipitoisuus mitattaisiin.

Kuvaajan (kuva 18(B)) perusteella todettiin reaktion eksponentiaalisen kasvualueen rajaksi noin $0,025 \mu\text{g}/\text{kaivo}$ (punainen viiva kuvassa 18(B).), jonka jälkeen reaktio tasoittui lineaarisesti kasvavaksi eli oli menty parhaan herkkyyalueen yli. Hiiriadiposyyttikuvaajaan sijoitettiin trendiviiva niin, että se sopi parhaiten mitta-alueelle $0-0,25 \mu\text{g}/\text{kaivo}$.

Proteiinimäärältään tunnetun hiiriadiposyyttisuoran saatu trendiviivan yhtälö sijoitettiin mitattavaan humaaniseerumisuoran arvoihin ja tulokset muutettiin muotoon $\mu\text{g}/\text{ml}$ jakamalla ne laimennuskertoimellaan (taulukko 9).

Taulukko 9. *Humaaniseerumin lopullisen Angptl-4-tason määrittäminen käyttäen hiiriadiposyyttikasvuliuosuorasta saatua yhtälöä*

Laim. Kerroin	Saatu Abs (humaani)	Kaavaan sijoitus	Lopullinen c (µg/ml)
0,015625	0,004	-0,216	-13,836
0,03125	0,032	0,075	2,394
0,0625	0,062	0,170	2,726
0,125	0,118	0,261	2,085
0,25	0,216	0,346	1,386
0,5	0,330	0,407	0,813

Saatujen tulosten (taulukko 9 ja kuva 18(B)) perusteella huomattiin, että humaniseerumin absorbanssi-arvot ovat lähes lineaarisesti (mittausalueella 0,032 – 0,118 Abs), joten näiden lopullinen Angptl-4-proteiinitaso saatiin näiden kolmen tuloksen keskiarvona. Lopulliseksi humaniseerumin Angptl-4-proteiinin tasoksi saatiin 2,4 µg/ml.

6. Tulosten yhteenveto ja päätelmät

Työn tärkeimpänä tavoitteena oli ihmisen seerumin Angptl-4- proteiinin massamäärityksen kehittäminen. Angptl-4-proteiinin pitoisuus ihmisen paastoseerumissa oli 2,4 µg/ml, joka saatiin käyttämällä ELISA-testissä primaarisena vasta-aineena puhdistettua kanin IgG-vasta-ainetta (kaniyksilö 3) 0,5 µg/kaivo. Näytteenä parhaan tuloksen antoi 12 tunnin paastoseerumi laimennoksina 1:8 – 1:2, ja joka oli käsitelty 30 minuuttia 0,5 % SDS-liuoksella. Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin POD-leimattua kani IgG-vasta-ainetta (kaniyksilö 2) laimennoksena 1:1000.

Tulosta verrattiin kirjallisuuslähteessä kuvailtuun toiseen ELISA-testiin, jossa näytteitä kerättiin useammalta yksilöltä ja käytetty rekombinanttiproteiini oli tuotettu itse. (31) Tulokseksi oli saatu humaaniseerumin Angptl-4-proteiinin tasoksi terveillä yksilöillä $0,35 \pm 0,01$ µg/ml. Tulos poikkeaa melko paljon määritetystä tuloksesta, mutta on huomioitava, että menetelmien standardisaatiossa on suuria eroja. Lisäksi arvioitiin tuloksiin vaikuttavan toistokokeiden puuttuminen ja standardina käytetyn kokonaisen rekombinanttiproteiinin puuttuminen. Määritetty tulos saatiin käyttämällä hiiriadiposyyttisoluviljelyliuoksesta mitattua totaaliproteiinipitoisuutta vertailuarvona, joka nostaa osaltaan laskettua Angptl-4-proteiinin määrää humaaniseerumissa.

ELISA-testin eri työvaiheiden mittaustarkkuuden ja tulosten pienen hajonnan perusteella todettiin testin toimivan hyvin Angptl-4:n tunnistamisessa. Mittaustulosten tasoon vaikutti kuitenkin peptidin käyttö vasta-aineen tunnistuksessa kokonaisen proteiinin sijaan.

Angptl-4:n määrittämisen jatkon kannalta olisi olennaista tutkia mahdollisuutta rekombinanttiproteiinin tuottamiseksi esimerkiksi *E. Colissa*. Puhdistettuna Angptl-4-proteiinia voidaan käyttää polyklonaalisen vasta-aineen valmistamiseen. Se tarjoaa mahdollisuuden myös monoklonaalisen vasta-aineen tuottoon, jolloin ELISA-metodi voidaan kehittää mono- ja polyklonaalisen vasta-aineen yhdistelmälle.

Lähteet

- 1 Raasmaja, A. Ruskea rasva polttaa energiaa. Kuopion yliopisto, Kansanterveyslehti 1/1997
- 2 Siiteri, P. K. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* 45:277–282, 1987
- 3 Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372:425–432, 1994
- 4 Rajala, M.W., Scherer, P.E. Minireview: The adipocyte – at the crossroads of energy homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Endocrinology* 144: 3765 – 3773, 2003
- 5 Lau, D.C.W., Dhillon, B. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 288: H2031-H2041, 2005
- 6 Heinonen, M., Purhonen, A. K. ja Herzig, K. H. Adipokiinit – rasvakudoksen viestinviejistä valoa lihavuuden haittojen ymmärtämiseen. *Duodecim* 122:2177–178, 2006
- 7 Grundy, S.M., Brewer, Jr H.B., Cleeman, J.I., Smith, Jr S.C., Lenfant, C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109:433–438, 2004
- 8 Gori A. M., et al. A proinflammatory state is associated with hyperhomocysteinemia in the elderly. *Am. J. of Clinical Nutrition*, Vol. 82, No. 2, 335-341, August 2005
- 9 Tolonen, M. Tuumorinekroositekijä (TNF)-alfa, ja muut tulehdus- ja syöpäsytokiinit.

- (WWW-dokumentti.) <http://www.biovita.fi/suomi/terveysivut/tnf.html>
4.7.2006. Luettu: 2.11.2008.
- 10 Julkunen, I., Silvennoinen, O. ja Hurme, M. Sytokiinit immuunijärjestelmän stimulaatiossa.,
(WWW-dokumentti.)
http://www.terveysportti.fi/terveysportti/ekirjat_tmp.Naytaartikkeli?p_artikkeli=mbi00310
8.7.2004. Luettu: 2.11.2008.
- 11 Ukkola, O. Rasvakudoksen peptidihormonit – MBO:n syy vai seuraus?,
Diabetes ja lääkäri-lehti nro. 35, 4/12, 2006
- 12 Oulun Yliopistollinen sairaala, Laboratorioiden tutkimusvalikoima. Insuliinin kaltainen kasvutekijä-1.
(WWW-dokumentti.) <http://oyslab.fi/ohjekirja/3253.html>
21.05.2007. Luettu: 2.11.2008.
- 13 Yhtyneet Laboratoriot Oy, Laboratoriokäsikirja. Insuliininkaltaista kasvutekijää sitova proteiini-3.
(WWW-dokumentti.)
<http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/kasikirja/tutkimukset.asp?id=10504&char=I>
18.09.2007. Luettu: 2.11.2008.
- 14 Underwood, A., Alder, J., Hand, K., Ulick, J. What do you know about fat.
Newsweek, 144:40-47, 2004
- 15 Wu, X., et al. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes.
Diabetes, 52: 1355-1363, 2003
- 16 Fruebis J. et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci USA, 98:2005-2010, 2001

- 17 Hotta K, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20:1595-1599, 2000
- 18 Santaniemi M, Kesäniemi YA, Ukkola O. Low plasma adiponectin concentration is an indicator of the metabolic syndrome. *Eur J. Endocrinol*, 2006
- 19 Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409:307-312, 2001
- 20 Youn, B.S., et al. Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:150-156, 2004
- 21 Stejskal, D. et al. Resistin - concentrations in persons with type 2 diabetes mellitus and in individuals with acute inflammatory disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 147(1):63-69, 2003
- 22 Massiéra, F. et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *Faseb. J. Dec*;15(14):2727-2729, 2001
- 23 Eloranta, E. sis.el. Kortisolin metaboliasta ja vaikutusmekanismeista. Oulun yliopisto/OYS.
(WWW-dokumentti.) <http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/031113.htm>
13.11.2003. Luettu: 2.11.2008.
- 24 Fukuhara, A et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307(5708): 426-430, 2005
- 25 Mandard, S., Zandbergen, F., Tan, N.S., et. al. The Direct Peroxisome Proliferator-activated Receptor Target Fasting-induced Adipose Factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) Is Present in Blood Plasma as a Truncated Protein

- That Is Increased by Fenofibrate Treatment. *J. Biol. Chem.* 279, 34411-34420, 2004
- 26 Kersten, S. Regulation of lipid metabolism via angiopoietin-like proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1059–1062, 2005
- 27 Mandard S., Zandbergen F. et. al. The Fasting-induced Adipose Factor/Angiopoietin-like Protein 4 Is Physically Associated with Lipoproteins and Governs Plasma Lipid Levels and Adiposity. *J. Biol. Chem.*, Jan, 281: 934 – 944, 2006
- 28 Li, C. A tale of two angiopoietin-like proteins. *Current Opinion in Lipidology*, 18(5):597-599, 2007
- 29 Kenchaiah, S. et al. Obesity and the risk of heart failure. *N. Engl. J. Med.* 347:205-313, 2002
- 30 Peeters, A. et al. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann. Intern. Med.* 138:24-32, 2003
- 31 Aimin, X., Michael, C.L., Kok, W.C. et al. Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *PNAS*, April 26 vol. 102 no.17 6086-6091, 2005