

Ella Saarsola

Angiopoietinin kaltaisen proteiini 8:n määrittämenetelmän kehittäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka AMK

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

10.11.2015

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Ella Saarsola Angiopoietinin kaltainen proteiini 8:n määritysmenetelmän kehittäminen 39 sivua + 1 liite 10.11.2015
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Matti Jauhiainen, dosentti, tutkimuspäällikkö Jari Metso, FM, tutkija Hannele Pihlaja, lehtori, Metropolia AMK
<p>Angiopoietinin kaltainen proteiini 8 (ANGPTL8) on hiljattain tunnistettu proteiini. ANGPTL8:n tarkka fysiologinen rooli on toistaiseksi huonosti tunnettu, mutta sillä tiedetään olevan vaikutuksia muun muassa rasva-aineenvaihdunnassa. Se pystyy inhiboimaan lipo-proteiinilipaasin toimintaa, joka on tärkeä verenkierron entsyymi triglyseridien hajottamisessa elimistön käyttöön. Häiriöt rasva-aineenvaihdunnassa eli dyslipidemiat, kasvattavat riskiä sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin. Nämä sairaudet ovat merkittävimpiä kuolinsyitä koko maailmassa, joten uusia keinoja niiden hoitoon tarvitaan.</p> <p>ANGPTL8-pitoisuuden määrittämiseen on tällä hetkellä olemassa kaksi kaupallista ELISA-testiä, jotka antavat keskenään erittäin poikkeavia tuloksia herättäen kysymyksen niiden luotettavuudesta. ANGPTL8:n ristiriitaiset tutkimustulokset voivat johtua näiden eri menetelmien käytöstä. Menetelmän kehittämisen haasteena on ANGPTL8:n mahdollinen hajoaminen ja kompleksoituminen verenkierrossa. Luotettavan määritysmenetelmän kehittäminen on välttämätöntä, jotta ANGPTL8:n vaikutuksia elimistössä ja mahdollista käyttöä dyslipidemian biomarkkerina voidaan tutkia.</p> <p>Opinnäytetyössä suunniteltiin ja kehitettiin entsyymi-immunologinen ELISA-menetelmä ANGPTL8:n määrittämiseksi THL:n tutkimusryhmän eri hankkeisiin. Menetelmää lähdettiin kehittämään tutkimalla erilaisia vasta-aineyhdistelmiä. Kehitystyössä käytettiin ANGPTL8:n peptideillä immunisoitujen kaniinien puhdistettuja vasta-aineita. Optimaaliset olosuhteet menetelmälle pyrittiin löytämään vaihtelemalla ELISA-menetelmän eri komponentteja.</p> <p>Hyvän vasteen antavat vasta-aineet, jotka tunnistavat spesifisesti ANGPTL8:n, onnistuttiin löytämään ja menetelmän olosuhteet optimoimaan. Tutkimuksissa todettiin myös, että ANGPTL8:n esiintyi suureen kompleksiin sitoutuneena niin plasma- kuin seeruminäytteissä. Menetelmän kehittäminen jäi kesken, koska primaarista standardia ei ollut saatavilla. Seuraava askel kehittämistyössä on luotettavan standardin löytäminen ja menetelmän validointi.</p>	
Avainsanat	Angiopoietinin kaltainen proteiini (ANGPTL), ANGPTL8, ELISA

Author Title	Ella Saarsola Development of ELISA for measuring angiopoietin-like protein 8
Number of Pages Date	39 pages + 1 appendix 10 November 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Matti Jauhiainen, Adjunct professor, Research manager Jari Metso, Msc, Researcher Hannele Pihlaja, Senior Lecturer
<p>Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) is a novel member of angiopoietin-like protein family. Its physical functions are so far poorly known, but research has found it having influence on lipid metabolism. Protein inhibits lipoprotein lipase activity and prevents triglyceride hydrolysis in the body. Lipid metabolism disorders (dyslipidemia) increases risk of cardiovascular diseases which are among the main causes of death globally. New methods for curing these diseases are therefore needed.</p> <p>At the moment, there are two commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for measuring ANGPTL8. Problem is the discrepancies between these two methods which may explain the ANGPTL8's controversial research results. It is possible, that ANGPTL8 is cleaved and forms large complexes in the blood stream. These things make it challenging to develop a reliable method which is needed to investigate proteins function and use as a biomarker for dyslipidemia.</p> <p>The goal of this study was to plan and develop enzyme-immunological ELISA-method for measuring ANGPTL8 for THL's research groups use in different projects. We started to develop the method by testing different antibody combinations. Antibodies that we used in the method were from rabbits that were immunized for ANGPTL8 peptides. We tried to find optimal conditions for the method by changing different components of ELISA.</p> <p>We were able to find well responding and specifically ANGPTL8 recognizing antibodies and optimal conditions for the method. We also discovered that ANGPTL8 was in large complexes in serum and plasma samples. It was impossible to complete the ELISA development, because we did not have primary standard. Next step is to find reliable standard and validate the method.</p>	
Keywords	Angiopoietin-like proteins (ANGPTL), ANGPTL8, ELISA

Sisällys

1	Johdanto	2
2	Rasvakudos ja maksa	3
2.1	Rasva-aineenvaihdunta	4
2.2	Maksan tehtävät rasva-aineenvaihdunnassa	6
2.3	Rasva-aineenvaihduntaan liittyvät sairaudet	7
3	Angiopoietiinin kaltaiset proteiinit	8
3.1	Angiopoietiinin kaltainen proteiini 8	10
3.2	ANGPTL8:n määrityksen haasteet	12
4	ELISA eli entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys	13
5	Materiaalit ja menetelmät	17
5.1	Immunisoitujen kaniin vasta-aineet	17
5.2	ANGPTL8 vasta-aineiden puhdistus antiseerumista	18
5.3	Proteiinipitoisuudenmääritys ANGPTL8 kanivasta-aineista	19
5.4	ANGPTL8 vasta-aineen HRP-leimaus	19
5.5	Geelifiltraatio ja proteiinien fraktiointi	20
5.6	SDS-PAGE ja Coomassie blue-värjäys	21
5.7	Western blot – analyysi	22
5.8	ELISA-menetelmä	24
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	26
6.1	Vasta-aineen puhdistus ja proteiinipitoisuus	26
6.2	HRP-leimatut vasta-aineet	27
6.3	Proteiinifraktiot ANGPTL8:n kompleksoitumisen selvittämisessä	28
6.4	Kokopitkän ANGPTL8:n koon ja puhtauden tutkiminen	29
6.5	Vasta-aineet Western blot -analyysillä	29
6.6	ELISA-menetelmän kehittäminen	30
7	Johtopäätökset	33
	Lähteet	36
	Liitteet	
	Liite 1. ANGPTL8:n ELISA- työhohje	

1 Johdanto

Angiopoietiinin kaltainen proteiini 8 (ANGPTL8) on hiljattain tunnistettu proteiini, joka on angiopoietiinin kaltainen proteiini- perheen epätyypillinen jäsen. ANGPTL8:n tarkka fysiologinen rooli on toistaiseksi huonosti tunnettu, mutta sillä on todettu olevan vaikutuksia muun muassa rasva-aineenvaihduntaan. Erityisesti se pystyy inhiboimaan lipoproteiinilipaasin (LPL) toimintaa, joka on tärkeä verenkierron entsyymi triglyseridien hajottamisessa elimistön käyttöön. Dyslipidemiassa veren lipidien suhteet poikkeavat normaalista, ja sydän- ja verisuonisairauksien, kuten ateroskleroosin, riski kasvaa. Sydän- ja verisuonisairauksien ollessa merkittävimpiä kuolinsyitä koko maailmassa, on erilaisten hoitokeinojen ja biomarkkereiden löytäminen ja kehittäminen niiden ehkäisemiseksi tärkeää.

ANGPTL8:n määrittämiseen on tällä hetkellä olemassa kaksi kaupallisesti saatavaa, kallista menetelmää, jotka antavat keskenään erittäin poikkeavia tuloksia herättäen kysymyksen niiden luotettavuudesta. Määrittämenetelmän haasteeksi on muodostunut se, että proteiini hajoaa elimistössä proteolyyttisen säätelyn seurauksena ja muodostaa mahdollisesti suuria komplekseja verenkierrossa. Luotettavan määrittämenetelmän kehittäminen on välttämätöntä, jotta ANGPTL8:n vaikutuksia elimistössä ja mahdollista käyttöä dyslipidemian biomarkkerina voidaan tutkia.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli suunnitella ja kehittää entsyymivälitteinen immunosorbenttimäärittäminen eli ELISA-menetelmä ANGPTL8:n määrittämiseksi, jota tutkimusryhmä pystyy tulevaisuudessa käyttämään eri hankkeissa. Luotettavaa ja taloudellista menetelmää ei vielä toistaiseksi ole saatavilla. Opinnäytetyö tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL), genomiikka ja biomarkkerit- yksikön dosentti Matti Jauhaisen johtamassa tutkimusryhmässä. THL on vuonna 2009 perustettu tutkimus- ja kehittämislaitos, joka toimii sosiaali- ja terveysministeriön hallinnonalaisena. THL tekee paljon tilasto-, tutkimus ja kehittämistyötä väestön terveyden ja hyvinvoinnin edistämiseksi. (THL. 2015.) Opinnäytetyötä ohjasivat tutkimusryhmän päällikkö dosentti Matti Jauhainen ja tutkija Jari Metso. Metropolian Ammattikorkeakoulun puolelta työtä ohjasi lehtori Hannele Pihlaja.

2 Rasvakudos ja maksa

Rasvakudos ja maksa osallistuvat keskeisesti rasva-aineenvaihduntaan. Rasvakudos muodostuu rasvasoluista eli adiposyyteistä, löyhästä sidekudoksesta, hermokudoksesta ja verisuonista. Rasvakudos toimii tärkeänä energiavarastona varastoiden suuren määrän rasvaa triglyseridien täyttämiin lipidipisaroihin. Se toimii myös lämmöneristeenä ja suojana sisäelimille. Rasvakudos on tärkeä endokriininen elin, joka tuottaa erilaisia elimistölle tärkeitä aineita. Ihmisellä on pääasiassa valkoista ja vain vähän metabolisesti aktiivista ruskeaa rasvakudosta. Ravinnosta saatavat rasvat ovat pääasiassa triglyseridejä, jotka muodostuvat glyserolista ja kolmesta rasvahaposta. Elimistö joko varastoi rasvan kudoksiin tai käyttää sen lihaksissa energian lähteenä. (Sand – Sjaastad – Haug – Bjälje – Toverud 2012: 95.)

Rasvasolut erittävät erilaisia hormonin kaltaisia yhdisteitä, adipokiinejä. Näistä tunnetuimpia ovat leptiini ja adiponektiini. Leptiini on merkittävä hormoni, joka säätelee lukemattomia fysiologisia toimintojamme. Sen tärkeimpänä tehtävänä on säädellä energiansaantia ja kulutusta viestimällä hypotalamuksen kanssa. Leptiinin määrä veressä on usein lihavilla kohonnut. (Mantzoros ym. 2011: E567-E584.) Adiponektiini on rasvasolujen erittämä hormoni, joka lisää kudosten insuliiniherkkyyttä ja hillitsee inflamaatiota eli tulehdusta. Se vaikuttaa myös maksaan lisäämällä HDL:n muodostusta ja hillitsemällä maksan tulehdusreaktiota. Lihavilla adiponektiinipitoisuudet ovat usein alentuneet. (Hui – Lam – Vanhouette – Xu 2012: 574–590.) Rasvakudos osallistuu siis keskeisesti elimistön aineenvaihdunnan säätelyyn.

Maksa on suuri rauhanen, jolla on useita tehtäviä elimistössä. Maksa muodostuu kahdesta päälohkosta ja maksanportista, jota kautta verisuonet ja sappitiehyet kulkevat maksaan. Hapekas valtimoveri virtaa maksavaltimon ja ruuansulatuskanavan veri virtaa porttilaskimon kautta maksaan sekoittuen hepatosyyttien eli maksasolujen hiusuonissa. Veri virtaa keskuslaskimon kautta maksalaskimoon ja edelleen takaisin sydämeen. Maksalla on keskeinen rooli rasva-aineenvaihdunnan lisäksi muiden ravintoaineiden käsittelijänä, veren glukoosipitoisuuden säätelijänä, erilaisten elimistön omien ja vieraiden aineiden muokkaamisessa ja erittämisessä sappeen sekä useiden plasman proteiinien tuottajana. (Sand ym. 2012: 406–407.)

2.1 Rasva-aineenvaihdunta

Rasvat eli lipidit ovat rasvaliukoisia, eivätkä siksi kykene liukenemaan plasmaan vaan ne tarvitsevat kuljetusproteiinin liikkuaakseen verenkierrossa. Lipoproteiinit vastaavat rasvojen kuljetuksessa elimistössä ja niitä muodostuu maksassa ja suolistossa. Lipoproteiinit jaotellaan tiheyden perusteella seuraavasti: kylomikroni (CM), VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) ja HDL (high density lipoprotein). Eniten triglyseridejä sisältävät kylomikronit ja VLDL. Partikkelien tiheys muuttuu jatkuvasti niiden kiertäessä elimistössä luovuttaen tai vastaanottaen triglyseridejä, kolesterolia ja proteiineja. Partikkelien sisäosa koostuu hydrofobisista triglyserideistä ja kolesteroliestereistä ja ulkokalvo muodostuu enemmän hydrofiilisistä fosfolipideistä, vapaasta kolesterolista ja apolipoproteiineista. Apolipoproteiinit säätelevät lipoproteiinien toimintaa, vaikuttavat niiden rakenteeseen ja toimivat solu- ja tunnistavina reseptoreina. Lipoproteiinit voidaan jakaa joko apoA- tai apoB-ryhmään. ApoB-ryhmä voidaan jakaa edelleen apoB-48 ja apoB100 proteiineja sisältäviin hiukkasiin, joiden pääasiallinen tehtävä on kuljettaa triglyseridejä (kylomikronit ja VLDL) ja kolesterolia (LDL). HDL:n tärkein rakenneproteiini on apoA-I ja HDL:n merkittävä tehtävä on kuljettaa kolesterolia kudoksista takaisin maksaan eritettäväksi pois elimistöstä. Lisäksi lipoproteiinit pystyvät keskenään vaihtelevaan apolipoproteiineja, kuten apoE- ja C-I-III-proteiineja elimistön rasvametabolian eri vaiheissa. (Kovanen – Pentikäinen – Viikari 2009: 799–817.)

Ravintoperäisten rasvojen kuljetusmekanismia kutsutaan eksogeeniseksi lipidien kuljetukseksi. Kylomikronit muodostuvat suolen soluissa eli enterosyyteissä. Ne keräävät suolesta ravinnon mukana tulleita triglyseridimuodossa tulleita rasvahappoja ja pääsevät imusuoniston kautta verenkiertoon, jossa ne kypsyvät keräämällä pinnalleen apolipoproteiineja. Verisuonien sisäkalvolla apoC-II aktivoi lipoproteiinilipaasin (LPL), joka hydrolysoi kylomikronin sisältämää triglyseridia vapaiksi rasvahapoiksi ja glyseroliksi. Rasvahapot siirtyvät pääasiassa valkoiseen rasvakudokseen varastoitavaksi tai energiakäyttöön kudoksiin, erityisesti lihaskudokseen. Glyseroli kuljetaan maksaan poistettavaksi. LPL:n hydrolysoinnin seurauksena syntyy kylomikronijäännehiukkanen, joka pääsee maksaan LPR-1 reseptorin välityksellä, joka tunnistaa kylomikronin pinnalla olevan apoE-proteiinin. (Mutanen – Voutilainen 2012: 49–59; Kovanen ym. 2009: 799–817.)

Endogeenisestä lipidien kuljetuksesta puhutaan maksan tuottamien lipoproteiinien metabolian yhteydessä. Maksan parenkyymisoluisissa muodostettuihin VLDL-partikkeleihin pakataan runsaasti triglyseridejä ja vain vähän kolesteroliestereitä. Verenkierrossa LPL hydrolysoi triglyseridejä ja kolesteroliesterinsiirtoproteiinin (CETP) avulla VLDL saa HDL:ltä kolesteroliestereitä ja HDL puolestaan vastaanottaa VLDL:n fosfolipidejä ja triglyseridejä. VLDL-hiukkasesta muokkautuu jäännöshiukkasenkaltaisen IDL-hiukkanen. Osa jäännöshiukkasista poistuu maksaan ja suuri osa muuttuu edelleen LDL-hiukkasiksi maksalipaasin vaikutuksesta. LDL:ssä triglyseridit ovat korvautuneet kolesteroliestereillä. LDL:n tehtävänä on kuljettaa kolesterolia kudoksiin sitoutumalla solujen LDL-reseptoreihin, josta ne siirtyvät lysosomeihin hajotettavaksi ja päätyvät lopulta solukalvolle ja moniin muihin kohteisiin, kuten lisämunuaiseen steroidihormonien synteesiin. Suurin osa hiukkasista palautuu maksaan, jossa ne joko varastoidaan, eritetään sappeen tai VLDL-hiukkasten mukana kolesteroli pääsee takaisin verenkiertoon. (Mutanen – Voutilainen 2012: 49–59; Kovanen ym. 2009: 799–817.) Maksa muodostaa myös jonkin verran LDL-hiukkasia, joissa apo(a) on kiinnittyneenä apoB-100:aan. Lipoproteiini (a)-partikkelin on todettu olevan merkittävä kardiovaskulaaristen sairauksien riskitekijä, mutta sen kaikkia vaikutusmekanismeja ei toistaiseksi tunneta. (Nordestgaard ym. 2010: 2844–2852.)

Valtimonkovettumatautia eli ateroskleroosia aiheuttavan LDL:n vastavaikuttajana toimivat HDL-hiukkaset, joiden yksi tärkein ateroskleroosilta suojaava tehtävä on kuljettaa periferiaan kertynyttä kolesterolia takaisin maksaan poistettavaksi. HDL-hiukkaset syntetisoidaan pääasiassa maksassa ja jonkin verran suolistossa sekä verenkierrossa, lähinnä kylomikroneiden LPL-välitteisen lipolyysin yhteydessä, irronneista kuoriosista. HDL-partikkelit ovat aluksi ohuita levyjä, jotka kypsyvät edelleen tiheiksi HDL₃- ja vähemmän tiheiksi HDL₂-partikkeleiksi. HDL:n tärkein apolipoproteiini on apoA-I, joka aktivoi lesitiini-kolesteroli-asyylitransferaasi (LCAT) entsyymiä esteröimään kolesteroliestereitä lisäämällä vapaaseen kolesteroliin rasvahappoja, jolloin hydrofobiset esterit siirtyvät HDL-partikkelin ytimeen kypsyttäen hiukkasen pallomaiseksi. Osa HDL:n kolesteroliestereistä siirtyy CETP:n avulla lähinnä VLDL-hiukkasiin ja vastaavasti VLDL:stä siirtyy saman entsyymin välityksellä triglyseridejä HDL:ään. (Kovanen ym. 2009: 799–817.) Maksalipaasi säätelee HDL-hiukkasten koostumusta ja määrää hydrolysoimalla fosfolipidejä ja triglyseridejä. (Chatterjee – Sparks 2011: 1429–1433). Tutkimuksissa on todettu HDL:llä ja apoA-I:llä olevan tulehdusta vähentäviä eli anti-inflammatorisia vaikutuksia, niiden toimivan antioksidanteina ja ehkäisevän ateroskleroosin kehittymistä. (Umemoto yms. 2013: 1345–1354)

Lipoproteiinilipaasin tärkein tehtävä on hydrolysoida triglyseridejä vapaiksi rasvaha-poiksi joko energiaksi lähinnä lihaksille tai rasvakudokseen varastoon. LPL:a synteti-soidaan pääasiassa rasva-, lihas- ja sydänlihaskudoksessa, josta se siirtyy verisuonien endoteelin pinnalle kiinnittymällä HSPG- ja GPIHBP1-molekyyleihin. LPL tarvitsee akti-voituakseen apoC-II apolipoproteiinin, jotta entsyymi voi hydrolysoida triglyseridejä kylomikroneista ja VLDL-hiukkasista. LPL:n keskeisen roolin triglyseridien metabolia-sa osoittaa se, että geenimutaatio, jossa LPL:n tuotanto on heikentynyt, johtaa vakavan korkeaan veren triglyseridipitoisuuteen eli hypertriglyseridemiaan. Lipoproteiinilipaasin toimintaa säädellään monilla eri mekanismeilla ja angiopoietiinin kaltaiset proteiinit 3, 4 ja 8 ovat herättäneet kiinnostusta niiden LPL:n aktiivisuutta inhiboivan toiminnan vuok-si. Insuliini ja ravinto lisäävät lipoproteiinilipaasin aktiivisuutta kudoksissa. (Kersten 2014: 919–933.)

2.2 Maksan tehtävät rasva-aineenvaihdunnassa

Maksa osallistuu elimistön rasva-aineenvaihduntaan usein eri tavoin. Maksasolut muo-dostavat kolesterolista joko sappihappoja tai erittävät sen suoraan sappeen, josta se päätyy suoliston kautta ulosteeseen. Melkein kaikki sappihapot imeytyvät enterohe-paattisen kierron seurauksena suolistosta takaisin ja palaavat maksaan. Sappen kes-keinen tehtävä on avustaa rasvojen pilkkomisessa ja niiden imeytymisessä ohut-suoleessa. Kolesteroli puolestaan kulkeutuu suolistosta kylomikronien mukana takaisin ensin systeemiseen verenkiertoon ja lopulta maksaan. Lisäksi maksa osallistuu rasvo-jen aineenvaihduntaan tuottamalla itse kolesterolia ja triglyseridejä. Kolesterolia tarvi-taan sappihappojen muodostuksen lisäksi solujen kalvorakenteisiin ja steroidihormoni-en valmistukseen. (Kovanen ym. 2009: 815–817.)

Maksasolujen pinnalla on apoE- ja apoB100-molekyylejä tunnistavia LDL-reseptoreja, joiden avulla LDL-hiukkaset otetaan maksaan ja ne pääsevät hajotettavaksi rasvaha-poiksi, aminohapoiksi ja kolesteroliksi solujen lysosomeihin. Osa kolesterolista hyödyn-netään sappiaineenvaihdunnassa ja osa pakataan takaisin VLDL-hiukkasiin, joiden mukana ne päätyvät takaisin verenkiertoon. (Kovanen ym. 2009: 815–817.)

2.3 Rasva-aineenvaihduntaan liittyvät sairaudet

Dyslipidemiassa veren lipidien suhteet poikkeavat normaalista, joka voi tarkoittaa suurentunutta seerumin kokonais- tai LDL-kolesterolipitoisuutta, suurentunutta triglyseridipitoisuutta, pientä HDL-kolesterolipitoisuutta tai näiden yhdistelmää. Käypä hoito suositus määrittelee dyslipidemian seuraavasti: seerumin LDL-kolesterolipitoisuus on yli 3,0 mmol/l, triglyseridipitoisuus on yli 1,7 mmol/l ja HDL-kolesterolipitoisuus on miehillä alle 1,0 mmol/l ja naisilla alle 1,2 mmol/l. (Käypä hoito –suositus 2013.)

Korkea kolesteroli eli hyperkolesterolemia lisää merkittävästi riskiä sairastua kardiovaskulaarisiin sairauksiin, kuten ateroskleroosiin ja sydäninfarktiin. ApoB100:aa sisältävät lipoproteiinit, kuten LDL ja VLDL-jäänteet, pääsevät verisuonien sisäkalvon alle eli intimaan aiheuttaen tulehdusreaktion muuntumalla ja hapettumalla. Monosyytit, jotka erilaistuvat kudoksessa makrofageiksi, tulevat paikalle ja ottavat sisäänsä intimaan kertynyttä muuntunutta lipoproteiinia, jolloin ne muuttuvat kolesterolia sisältäviksi vaahtosoluiksi synnyttäen aterooma-nimisen plakin. Tulehdusreaktion edetessä suonet ahtautuvat ja verenvirtaus heikkenee. Ateroomaplakin repeytyminen voi aiheuttaa vaarallisen trombin eli veritulpan. (Tabas – Williams – Borén 2007: 1832–1844.)

HDL- partikkelit puolestaan kuljettavat kolesterolia pois kudoksista ja epidemiologisten tutkimusten perusteella HDL:n pitoisuus on erinomainen biomarkkeri sydän- ja verisuonitautien riskin ennustamisessa. (Rader – Hovingh 2014: 618–625.) Triglyseridit ovat joko ravinnosta saatavia tai elimistön itse valmistamia rasvahappoja sisältäviä molekyyliä, joiden suuri pitoisuus altistaa sydän- ja verisuonitautien lisäksi haimatulehdukselle eli pankreatiitille (Nordestgaard – Varbo: 626–635). Sydän- ja verisuonitaudit ovat merkittävin kuolinsyy koko maailmassa (WHO. 2015).

Dyslipidemat voidaan jakaa sairauden syyn mukaisesti joko primaarisiin eli geneettisiin sekä sekundaarisiin eli ulkopuolisten tekijöiden aiheuttamiin muotoihin. Ympäristötekijöillä ja erityisesti ravinnolla on suuri merkitys veren kolesterolipitoisuuteen. Geneettiset tekijät ovat myös suuressa roolissa ja perinnöllisiä dyslipidemiaa aiheuttavia sairauksia tunnetaan useita. Esimerkiksi familiarisessa hyperkolesterolemiassa (FH) LDL:n poistuminen verenkierrosta on häiriintynyt ja partikkeleja kertyy runsaasti vereen. (Kovanen ym. 2009: 819–859.) Dyslipidemiaa esiintyy usein myös yhdessä muiden sairauksien, kuten insuliiniresistenssin ja diabeteksen yhteydessä. Tällaista sokeri- ja rasva-

aineenvaihdunnan häiriötilaa kutsutaan metaboliseksi oireyhtymäksi, joka on lisääntynyt maailmanlaajuisesti epidemian tavoin. (Grundy 2008: 629–636.)

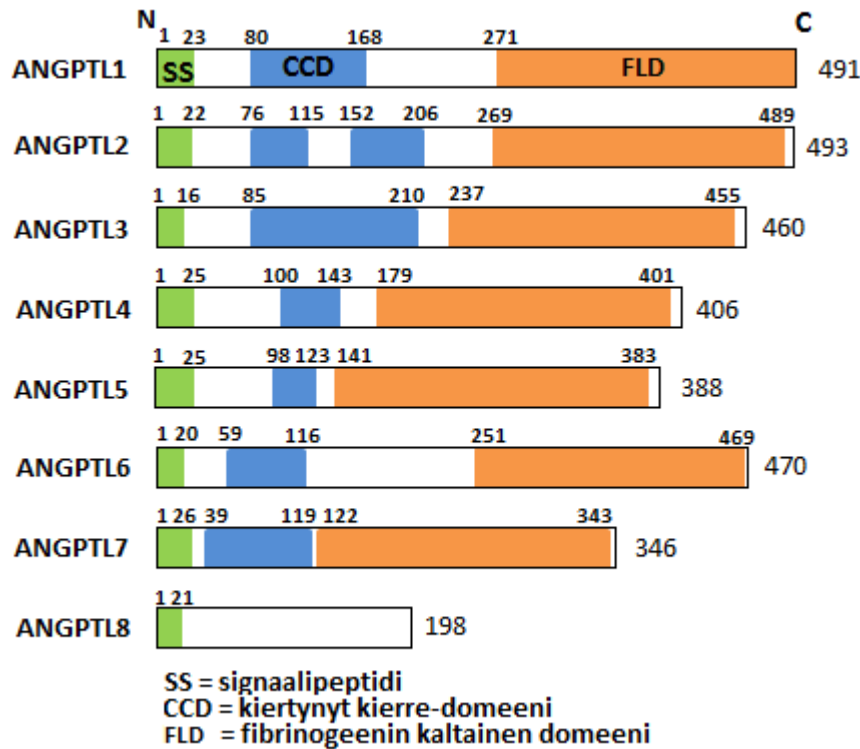
Ensisijaisena dyslipidemioiden hoitokeinona ovat elämäntapamuutokset, erityisesti ravinnon rasvahappokoostumuksen muuttaminen, ravinnosta saatavan kolesterolin vähentäminen ja kokonaisenergian saannin optimoiminen on keskeistä. Laihduttaminen ja alkoholin käytön rajoittaminen voivat auttaa. Ruokavalioon voidaan lisätä myös ravintokuituja ja funktionaalisia kasvistanolia- tai sterolia sisältäviä elintarvikkeita, jotka vaikuttavat edullisesti veren lipidiarvoihin. Ravintomuutokset eivät kuitenkaan aina riitä, jolloin tarvitaan lääkehoitoa. (Kovanen ym. 2009: 861–864.)

Dyslipidemian hoitoon on useita lääkkeitä, joiden toiminta perustuu joko kolesterolin imeytymisen estämiseen, lipoproteiinisynteesiin estämiseen tai niiden määrän vähentämiseen. Statiinit ovat yleisimmin käytetty kolesterolilääke. Niiden toiminta perustuu maksan kolesterolisynteesiin estämiseen HMG-CoA reduktaasientsyymiä inhiboimalla, jolloin LDL-kolesterolipitoisuus pienenee. Maksan kolesterolisynteesin esto aktivoi LDL-reseptorien tuotantoa, joka puolestaan lisää LDL:n poistumista takaisin maksaan. Statiinit vähentävät myös VLDL-partikkelien muodostumista, jolloin triglyseridien määrä veressä vähenee sekä kasvaneen apoA-I-synteesiin seurauksena HDL-kolesterolipitoisuus suurenee. (Ruskoaho 2014: 427–445.)

3 Angiopoietiinin kaltaiset proteiinit

Angiopoietiinin kaltaiset proteiinit (ANGPTL) muodostavat ryhmän, johon kuuluu kahdeksan proteiinia. ANGPTL1-7 omaavat yhtenäisen rakenteen, joka käsittää N-terminaalisen kiertyneen kierre-domeenin (CCD) sekä C-terminaalisen fibrinogeenin kaltaisen domeenin (FLD) (kuvio 1). Lisäksi ANGPTL-perheen jäsenillä on solusta ulos eritettävälle eli sekretorisille proteiineille tyypillinen signaalipeptidi. ANGPTL8 poikkeaa rakenteellisesti muista ryhmän jäsenistä, koska siltä puuttuu FLD-domeeni. Angiopoietiinit ovat proteiineja, joilla on rakenteellisia yhteneväisyyksiä ANGPTL-ryhmän kanssa. Niiltä löytyvät samat N- ja C-terminaaliset domeenit, joilla ne sitoutuvat pääasiallisesti TIE-2-tyrosiinikinaasireseptoreihin vaikuttaen verisuonien muodostukseen eli angiogeneesiin. (Thomas – Augustin 2009: 125–137.) Rakenteellisesta samankaltaisuudesta huolimatta, ANGPTL-proteiinit eivät kuitenkaan sitoudu TIE-2-reseptoreihin. Angiopoietiinin ja ANGPTL:n C-terminaalisten kysteiinien toisistaan poikkeavat lukumää-

rät voivat vaikuttaa niiden erilaiseen sitoutumiseen TIE-2-reseptoriin. (Oike – Yasunaga – Sudaa 2004: 21–28.)



Kuvio 1. ANGPTL-ryhmän proteiinien rakenne. (Mukaiillen Uniprot. 2015.)

ANGPTL1 on ensimmäinen tunnistettu tämän proteiini ryhmän jäsen. Sen tiedetään estävän angiogeneesiä sekä vaikuttavan syöpäsoluihin. ANGPTL2:n on tutkittu olevan yhteydessä rasvakudoksen tulehdusreaktioon, rasvakudoksen määrään ja insuliini-resistenssiin. (Farhat ym. 2013: 10–12.) ANGPTL2 edistää verisuonten inflammaatiota aiheuttaen endoteelin toimintahäiriön ja ateroskleroosin kehittymistä (Horio 2014: 790–800).

ANGPTL3 muodostuu pääasiassa maksassa ja se on keskeinen lipoproteiinien metabolian säätelijä, koska se inhiboi lipoproteiinilipaasin sekä endoteelilipaasin aktiivisuutta, mahdollisesti yhteisvaikuttamalla ANGPTL8:n kanssa. Kyseisen proteiinin puutteen on tutkittu lisäävän insuliiniherkkyyttä ja vaikuttavan glukoosiainevaihduntaan, alentavan kaikkien lipoproteiinien (VLDL, LDL, HDL) määrää, indusoivan lipoproteiinilipaasin aktiivisuutta ja laskevan seerumin vapaiden rasvahappojen määrää. (Robriuc 2013: 1706.)

ANGPTL4 inhiboi myös lipoproteiinilipaasia ja sen sokeri- ja lipidiaineenvaihdunnan vaikutustensa vuoksi, sillä voi olla merkitystä 2 tyypin diabeteksessa ja metabolisessa oireyhtymässä. Lisäksi ANGPTL4 on voimakkaasti paaston indusoima proteiini. ANGPTL5 esiintyy pääasiassa ihmisen sydänlihaskudoksessa, sillä on vaikutuksia rasvametaboliassa ja sen on todettu indusoivan viljelyissä kantasolujen jakaantumista (Zhang – Kaba – Iizuka – Huynh – Lodish 2008: 3415–3426). ANGPTL6 on todettu kohoavan merkittävästi metabolisen oireyhtymän yhteydessä. ANGPTL7 vaikutuksia elimistön biologisissa prosesseissa tunnetaan huonosti, mutta yhteyksiä muun muassa glaukoomaan on löydetty. (Santulli 2014: 1–4.)

Kaiken kaikkiaan ANGPTL-ryhmän proteiineista tiedetään melko vähän. Lisää tutkimusta vaaditaan niiden fysiologisten vaikutusten selvittämiseksi sekä niiden luotettavan määritysmenetelmän pystyttämiseksi.

3.1 Angiopoietiinin kaltainen proteiini 8

Angiopoietiinin kaltainen proteiini 8 (ANGPTL8, lipasin, betatrophin, RIFL) on kromosomi 19 koodaama, 198 aminohapon pituinen proteiini, jonka molekyylipaino on noin 22 kDa. Proteiinin useat eri nimet viittaavat sen mahdollisiin vaikutuksiin elimistössä: betatropiini viittaa vaikutuksiin haiman β -soluissa, RIFL (Refeeding-Induced Fat And Liver) tarkoittaa ravinnon indusoimaa proteiinia rasvakudoksessa ja maksassa ja lipasiini viittaa sen kykyyn inhiboida lipoproteiinilipaasin toimintaa.

ANGPTL8:aa ilmennetään pääasiassa maksassa, mutta myös valkoisessa ja ruskeassa rasvakudoksessa (Haridas ym. 2015: 1299–1307.). Proteiinin N-terminaaliosassa on 21 aminohapon mittainen signaalipeptidi, joka katkeaa kun proteiini eritetään ulos solusta. ANGPTL8 poikkeaa muista ryhmään kuuluvista proteiineista, koska siltä puuttuu osittain N-terminaalinen CCD- ja kokonaan C-terminaalinen FLD- domeeni, glykosylaatiokohdat sekä oleelliset kysteiini-aminohapot rikkisidosten muodostukseen. (Zhang 2012: 786–792.)

ANGPTL8:n tarkka fysiologinen rooli on toistaiseksi huonosti tunnettu, mutta sillä tiedetään olevan vaikutuksia rasva-aineenvaihdunnan ja erityisesti LPL:n inhiboinnin avulla plasman triglyseridipitoisuuden säätelyssä. Se on ravinnon säätelemä proteiini, jonka pitoisuutta paastoaminen voimakkaasti alentaa ja ravinto puolestaan nostaa. (Zhang 2012: 786–792.) Kilpirauhashormoni mahdollisesti stimuloi ANGPTL8:n ilmentymistä

vaikuttamalla geenin transkriptioon. Kylmäältistuksen on todettu lisäävän proteiinin ekspressiota ruskeassa rasvakudoksessa ja valkoista rasvakudosta ruskeaksi muuttava, lihaksesta peräisin oleva irisiini-hormoni lisää ANGPTL8:n ilmentymistä. (Tseng – Yeh – Chen – Lin 2014: 23640–23657.)

ANGPTL8:n puutoksen on todettu laskevan merkittävästi plasman triglyseriditasoja VLDL-hiukkasten erittymisen vähentyessä ja LPL:n aktiivisuuden lisääntyessä. Vastavasti proteiinin yliekspressio aiheuttaa hypertriglyseridemiaa ja lisää insuliinin eritystä. Tutkimuksessa poistogeeniset hiiret lihoivat normaaleja hiiriä hitaammin, mikä osoittaa ANGPTL8:n vaikutuksen triglyseridien varastoitumisessa rasvakudokseen. (Wang 2013: 16109–16114.) ANGPTL8:lla on siis tärkeä rooli rasvahappojen metaboliassa. Vielä on epäselvää, vaikuttaako ANGPTL8 itsenäisesti suoraan LPL:n inhibitioon vai epäsuorasti aktivoimalla ANGPTL3:a.

Glukoosiaineenvaihdunnan ja ANGPTL8:n yhteyksistä on ristiriitaista tietoa. Insuliinin on kuitenkin todettu lisäävän proteiinin ekspressiota ja ANGPTL8:n on esitetty olevan yhteydessä insuliiniresistenssiin. Plasman ANGPTL8:n tasot eivät kuitenkaan nouse insuliinin vaikutuksesta vaikka proteiinin ekspressio rasva- ja maksakudoksessa lisääntyvät. (Haridas ym. 2015: 1299–1307.) ANGPTL8:n yhteyksistä tyyppin 2 diabetekseen ja ylipainoon on ristiriitaista tutkimustietoa. Gómez-Ambrosi ym. (2014: E2004–E2009) tutkivat ANGPTL8:n pitoisuuden laskevan verenkierrassa ylipainon ja 2 tyyppin diabeteksen yhteydessä kun taas Fu ym. (2014a: 1–5) saivat täysin päinvastaiset tulokset.

Cell-lehdessä vuonna 2013 julkaistussa tutkimuksessa ANGPTL8:n todettiin edistävän haiman β -solujen proliferaatiota eli lisääntymistä ja uudiskasvua, joka voisi tuoda uudenlaisia mahdollisuuksia diabeteksen hoitoon (Yi – Park – Melton 2013: 747–758). Myöhemmin muun muassa Gusarova ym. (2014: 691–696) ja Cox ym. (2015: 1523–1531) saivat päinvastaisia tuloksia eivätkä havainneet ANGPTL8:n vaikuttavan β -soluihin.

ANGPTL8:lla, 4:llä ja 3:lla on sekä rakenteellisia että toiminnallista samankaltaisuutta: niiden N-terminaaliset domeenit ovat 20 % yhtenevät ja ne kaikki vaikuttavat rasvaaineenvaihduntaan (Yunchao – Chunbo 2014: 679–687). ANGPTL8:aa ja 3:a koodaavat geenit sijaitsevat keskenään samankaltaisten DOCK (dedicator of cytokinesis) 6- ja 7-geenien introneissa. Todennäköisesti proteiinien samankaltaisuus johtuu aikoinaan tapahtuneesta geenin duplikaatiosta. Tutkimuksissa on löydetty yhteisvaikutuksia

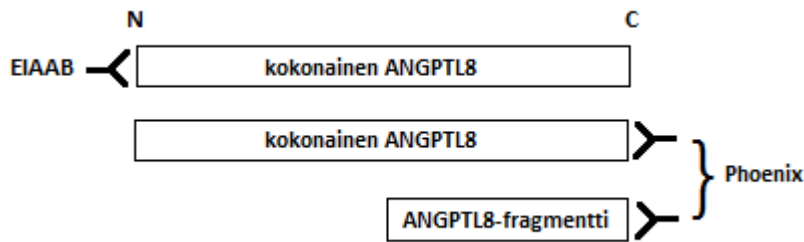
ANGPTL8:n ja ANGPTL3:n välillä, mutta tarkka mekanismi on vielä epäselvä. On mahdollista, että ANGPTL8:n kiinnittyy ANGPTL3:n N-terminaaliseen domeeniin katkaisten proteiinin ja aktivoiden sen toimintaa. Yhdessä ANGPTL8 ja 3 alentavat plasman triglyseriditasoja ja ANGPTL8:n erityis ulos solusta lisääntyy merkittävästi enemmän kuin jos proteiinit esiintyisivät yksinään. (Quagliarini ym. 2012: 19751–19756; Haridas ym. 2015: 1299–1307.)

ANGPTL8:n inhibitio voisi tulevaisuudessa olla keino korkeiden plasman lipoproteiinitasojen alentamiseen. Lisätutkimusta vaaditaan niin ANGPTL8:n yhteyksistä glukosiaineenvaihduntaan, diabetekseen ja β -solujen proliferaatioon, sen yhteisvaikutuksista muiden ANGPTL-ryhmän jäsenten kanssa sekä sen mekanismeista rasva-aineenvaihdunnan säätelijänä. Tulevaisuudessa ANGPTL8 voi tarjota uusia keinoja rasva-aineenvaihdunnan sairauksien, erityisesti hypertriglyseridemian hoidossa ja voisi mahdollisesti toimia dyslipidemian biomarkkerina.

3.2 ANGPTL8:n määrittämisen haasteet

ANGPTL8:sta tiedetään vielä hyvin vähän. Määrittämismenetelmän haasteeksi on osoittautunut se, että proteiini saattaa hajota elimistössä proteolyttisen säätelyn seurauksena, todennäköisesti niin että elimistössä kiertävänä siitä puuttuu proteiinin N-terminaalinen pää. Tämän mekanismin selvitys on vielä täysin avoin, samoin kuin ne tekijät, jotka mahdollisesti lisäävät proteiinin hydrolyysiä. Ei myöskään tiedetä kiinnittyykö kyseinen proteiini muihin proteiineihin elimistössä ja vaikuttaako mahdollinen kompleksoituminen määrittämisessä käytettyjen vasta-aineiden kykyyn sitoutua proteiiniin.

ANGPTL8:n määrittämiseen on olemassa kaksi kaupallista, kallista menetelmää, jotka antavat keskenään erittäin poikkeavia tuloksia herättäen kysymyksen niiden luotettavuudesta. USA:n (Phoenix) menetelmä tunnistaa proteiinin C-terminaalista päästä 139–198 aminohappojakson ja kiinalainen (EIAAB) tunnistaa N-terminaalista päästä aminohappoja (kuvio 2). Phoenix-menetelmä antaa EIAAB-menetelmää korkeampia tuloksia, joka voisi viitata siihen, että se tunnistaa kokonaisen ANGPTL8:n lisäksi myös mahdollisesti C-terminaaliset fragmentoituneet peptidiketjut. EIAAB mittaa siis kokopitkää proteiinia ja Phoenix mittaa kokonais-ANGPTL8-pitoisuuden, mittaamalla kokopitkän proteiinin lisäksi myös C-terminaaliset fragmentit. (Fu – Abou-Samra – Zhang 2014b: 2232–2234.)



Kuvio 2. Kaupalliset ANGPTL8:n ELISA-testit. EIAAB-menetelmä mittaa vain kokonaista ANGPTL8:aa ja Phoenix-menetelmä mittaa kokonais-ANGPTL8-pitoisuuden mittaamalla ehjän proteiinin lisäksi myös C-terminaaliset fragmentit.

Menetelmien antamat arvot poikkeavat suuresti toisistaan ja se vaikeuttaa eri tutkimustulosten keskinäistä vertailua. ANGPTL8:n tutkimuksissa on käytetty eri kaupallisia ELISA-testejä ja se voi mahdollisesti olla selittävä tekijä ristiriitaisille tuloksille. Lisäksi ANGPTL8:n ollessa ravinnon indusoima proteiini, pitäisi tutkimusmenetelmät vakioida niin, että käytetään esimerkiksi aina paastonäytettä ja samalla tavalla käsiteltyjä näytteitä.

Rajoituksia määritysmenetelmän kehittämiseen tuo se, että primaaristandardia ei toistaiseksi ole olemassa ja siksi luotettavan standardisuoran, jonka avulla pitoisuudet lasketaan, tekeminen on mahdotonta. ANGPTL8:sta tiedetään hyvin vähän, eikä sen pitoisuutta normaaleissa näytteissä tiedetä. Nämä tekijät asettavat rajoitteita ja haasteita määritysmenetelmän kehittämiseksi.

4 ELISA eli entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys

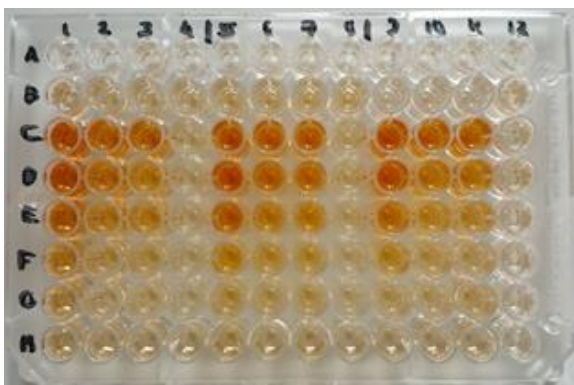
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) eli entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys on spesifinen ja sensitiivinen immunokemian tekniikka, jonka avulla voidaan määrittää erilaisia analyyttejä, kuten vasta-aineita tai antigeenejä. Menetelmä perustuu vasta-aineiden ja antigeenin spesifiseen sitoutumiseen toisiinsa. ELISA on yksi eniten käytettyjä laboratoriomenetelmiä määritettäessä erilaisia elimistön tärkeitä proteiineja.

Vasta-aine on rakenteeltaan Y:n muotoinen proteiiniketju, jossa on kaksi keskenään identtistä H- eli raskasketjua, L- eli kevytketjua ja vakio- eli C-alueet. Kummankin ketjun päässä on hypervariaabeli (Fab)-alue, joka pystyy sitoutumaan antigeeniin, eli yksi vasta-aineen perusyksikkö pystyy sitomaan kaksi samanlaista antigeenia rajoittavana

tekijänä kuitenkin antigeenin koko. Vasta-aineet jaotellaan raskasketjun vakio-osan mukaan viiteen eri päätyyppiin: IgG, IgA, IgM, IgE ja IgD. ELISA-menetelmissä käytetään eniten IgG-luokan vasta-aineita. Antigeeniksi kutsutaan vasta-aineiden kohderakenteita ja epitooppi on antigeenin osa, johon vasta-aine spesifisesti sitoutuu. ELISA:n toiminta perustuu siihen, että yleisesti vasta-aineet sitoutuvat vain yhteen epitooppiin, eli tunnistavat vain tietyn antigeenin. Ristireaktiossa eri antigeenien samankaltaisten rakenteiden vuoksi vasta-aine pystyy sitoutumaan useampaan epitooppiin. Tämä voi aiheuttaa haasteita ELISA-menetelmässä. (Jokiranta – Seppälä 2011: 101–111.)

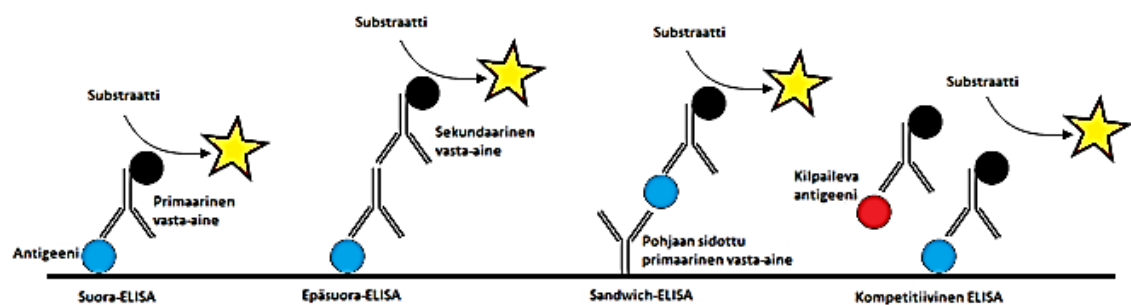
ELISA:ssa käytettävät vasta-aineet voivat olla joko mono- tai polyklonaalisia. Monoklonaaliksi vasta-aineiksi kutsutaan samasta solukloonista peräisin olevia, keskenään identtisiä, vasta-aineita, jotka kaikki tunnistavat saman epitoopin. Näitä keskenään samanlaisia vasta-aineita voidaan valmistaa soluviljelmissä. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat puolestaan peräisin immuunijärjestelmän useista B-soluista ja ne tunnistavat saman antigeenin eri epitooppeja. Eläimiä immunisoimalla saadaan tuotettua polyklonaalisia vasta-aineita. (Lipman – Jackson – Trudel – Weis-Garcia 2005: 258–568.)

ELISA-menetelmä käyttää hyväkseen entsyymi-immunologiaa, jossa värireaktiota katalysoi entsyymi, erimerkiksi peroksidaasi, alkalinen fosfataasi tai glukoosihydrogenaasi. Peruseriaatteena on, että spesifiset vasta-aineet ja näytteen antigeeni reagoivat keskenään, ja vasta-aine-antigeeni-tasapainotilan synnyttyä lisätään substraatti, jota entsyymi katalysoi synnyttäen värimuutoksen, joka mitataan spektrofotometrisesti tai fluorometrisesti tietyllä aallonpituudella. (Niemelä – Pulkki: 2010. 84.)



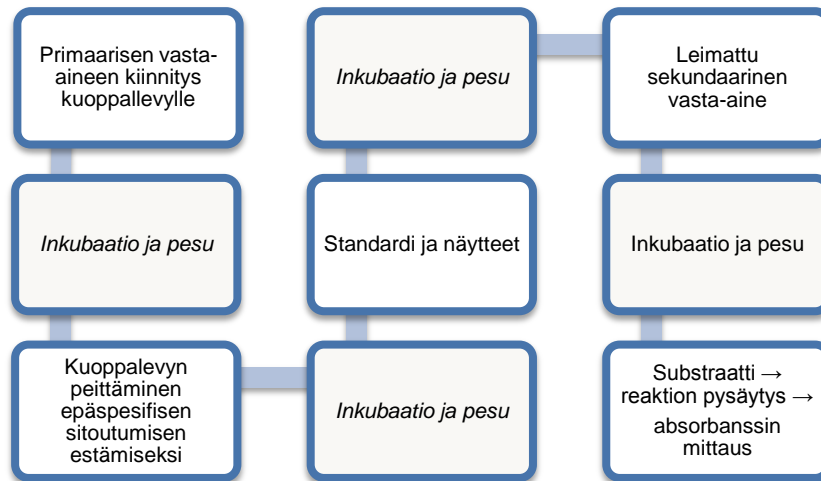
Kuvio 3. ELISA:n tyypillinen 96-kuoppainen levy. Kuoppalevyt ovat yleensä polystyreeniä, joihin useimmat proteiinit alkaalisissa olosuhteissa pystyvät kiinnittymään.

Menetelmän voi rakentaa monella eri tavalla, riippuen siitä mitä tutkitaan. Kiinteään faasiin, yleensä kuoppalevyn pohjalle kiinnitetään vasta-aine tai antigeeni. Suorassa ELISA:ssa primaarinen vasta-aine tunnistaa pohjaan sidotun antigeenin ja epäsuorassa pohjaan kiinnitetyn antigeenin tunnistaa ensin primaarinen vasta-aine, jonka leimattu sekundaarinen vasta-aine lopulta tunnistaa. Entsyymien substraatin lisäyksen jälkeen muodostuva värireaktio kertoo antigeenin määrän kuopassa. Suora menetelmä on nopea, mutta epäsuora on menetelmänä spesifisempi. ELISA voi olla myös kompetitiivinen, jossa kuoppalevyn pohjalle kiinnitetty puhdistettu antigeeni ja näytteen antigeeni kilpailevat keskenään vakiomäärästä lisättyä entsyymileimattua vasta-ainetta. Mitä enemmän näytteessä on antigeeniä, sitä enemmän se sitoo entsyymileimattua vasta-ainetta, jolloin saadaan pienempi värimuutos entsyymituotetta mitattaessa. (Elisa technical guidebook and protocols. 2010.) Erilaiset ELISA-menetelmän vasta-aine ja antigeeni vaihtoehdot on esitetty kuviossa 4.



Kuvio 4. Erilaiset ELISA-menetelmän vasta-aine ja antigeeni vaihtoehdot.

Opinnäytetyön ANGPTL8:n määritysmenetelmä perustuu sandwich-ELISA:aan. Menetelmän eri vaiheet on kuvattu kuviossa 5. Sandwich-menetelmässä kuoppalevyn pohjalle kiinnitetään primäärinen vasta-aine, joka sitoutuu näytteen antigeenin epitooppiin. Entsyymileimattu sekundaarinen vasta-aine sitoutuu myös antigeeniin. Näytteen antigeeni jää siis kahden vasta-aineen väliin. Entsyymi ja substraatti reagoivat keskenään saaden aikaan värireaktion, joka mitataan. Syntyneen värireaktion tuotteen määrä on suoraan verrannollinen mitatun antigeenin määrään näytteessä. Kyseinen menetelmä on hyvin herkkä ja spesifinen, koska käytetään kahta antigeenin eri epitooppiin sitoutuvaa vasta-ainetta. Sandwich-ELISA:ssa tulee ottaa huomioon se, että antigeenissä pitää olla ainakin kaksi sitoutumispaikkaa vasta-aineille ja näiden epitooppien tulee olla riittävän kaukana toisistaan, erityisesti tilanteissa, joissa käytetään kahta monoklonaalista vasta-ainetta. (Elisa technical guidebook and protocols. 2010.)



Kuvio 5. Sandwich-ELISA:n työvaiheet.

Standardisuoran avulla määritetään mitatusta absorbanssista näytteen pitoisuus. Standardista, esimerkiksi puhdistetusta proteiinista, jonka pitoisuus tunnetaan, tehdään laimennossarja. Standardin mittausalueen tulee määrittää niin, että näytteiden pitoisuudet osuvat tälle alueelle. Suoralta luetaan absorbanssin avulla näytteen pitoisuus. Jokaiselle kuoppalevylle tulee tehdä oma standardisuora, koska arvot saattavat vaihdella eri määrityskerroilla. (Elisa technical guidebook and protocols. 2010.)

Menetelmän suunnittelussa on otettava huomioon monta asiaa. Käytetyt vasta-aineet on valittava huolella, jotta ne sitoutuvat spesifisesti mitattavaan antigeeniin ilman risti-reaktioita. Epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi primaarisen vasta-aineen kiinnityksen jälkeen on tärkeää peittää kuoppalevyn pohjalle mahdollisesti jääneet aukot peittämisspuskurilla, joka sisältää esimerkiksi albumiinia. Vasta-aineiden sitoutumiseen antigeeniin vaikuttaa keskeisesti käytetty pitoisuus, inkubaatioajat ja lämpötilat sekä mitattavan antigeenin määrä näytteessä. Myös leimatun vasta-aineen pitoisuuden optimointi on tärkeää hyvän signaalin syntymisen kannalta. Entsyymien ja substraatin valinnalla pystytään vaikuttamaan menetelmän sensitiivisyyteen. Yleisimmin käytetty entsyymi on piparjuuresta eristetty peroksidaasi (HRP), joka voidaan konjugoida vasta-aineeseen. Myös käytettävien puskurien koostumus ja pH on optimoitava menetelmälle sopivaksi. (Elisa technical guidebook and protocols. 2010.)

5 Materiaalit ja menetelmät

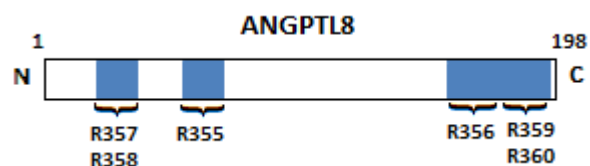
5.1 Immunisoitujen kanien vasta-aineet

ELISA-menetelmän kehittämisessä käytetyt vasta-aineet tuotettiin Helsingin koe-eläinkeskuksessa New Zealand white-kaneissa. Kaneihin injektoidiin kolmen viikon välein yhteensä seitsemän kertaa laboratorioissa suunniteltuja ja kaupallisesti peptidisyntetisaattorilla valmistettuja ANGPTL8:n peptidijaksoja, jotka immunsioivat kanin tuottamaan vasta-aineita kyseistä peptidijaksoa kohtaan.

Kokopitkää ANGPTL8:aa ei ollut saatavilla, joten immunisoinnissa käytettiin osia kokonaisesta proteiinista. Peptidijaksot valittiin ANGPTL8:n C- ja N-terminaalisisesta päästä ja ne olivat pituudeltaan 14–16 aminohappoa (kuvio 6). Osa kaneista immunsioitiin samaa peptidiä kohtaan, koska immuunivaste ja vasta-aineiden tuotanto voi vaihdella eläinyksilöstä toiseen.

Kanien vereen tuottamat, pääasiallisesti IgG-luokkaan kuuluvat, polyklonaaliset vasta-aineet puhdistettiin ja proteiinipitoisuus mitattiin ennen kuin niitä käytettiin ELISA:n kehittämisessä. Lisäksi menetelmän kehittämisessä käytettiin kaupallista affiniteettipuhdistettua Genscriptin vasta-ainetta, joka tunnistaa laboratorioissa suunnitellun 77–90 aminohappo-domeenin.

Kani	Peptidijakso
R355	54-68
R356	169-185
R357	23-37
R358	23-37
R359	182-196
R360	182-196



Kuvio 6. Kanien immunisointiin käytetyt ANGPTL8-peptidit. R-kirjain viittaa immunisoidun kanin tunnistamiseen.

5.2 ANGPTL8 vasta-aineiden puhdistus antiseerumista

Laitteet	Nestekromatografialaite (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography, Merck Hitachi)
Materiaalit	Affiniteetikromatografiapylväs (1m HiTrap Protein G HP, GE Healthcare) Dialyysiletku, molekyyliläpäisevyys 12-14 kDa (Spectrum Laboratories)
Reagenssit	Tasapainoituspuskuri: Fosfaattipuskuroitu NaCl (PBS, Phosphate buffered saline), pH 7,4 Eluointipuskuri: Glysiini (Sigma), pH 2,5 0,1 M Tris-HCl, pH 9,0

Kanissa tuotettu IgG-vasta-aine puhdistettiin seerumista korkean erottelukyvyn neste-kromatografiaan perustuvalla menetelmällä (HPLC). Puhdistuksessa käytettiin valmista kaupallista pylvästä, johon on sidottuna proteiini-G:tä. Neutraalissa pH:ssa IgG-vasta-aine sitoutuu proteiini G:hen ja happamalla pH:lla sitoutunut IgG saadaan eluoitua irti pylvästä.

Vasta-aineen puhdistus alkoi pylvään neutraloimisella PBS:llä. Kuuden eri kanin antiseerumit lisättiin pylvääseen kaksi kertaa yhden millilitran annoksina eluointinopeudella 1 ml/minuutti. Kromatografian aikana absorbanssilukemat kertoivat proteiinien sitoutumisesta pylvääseen. Vasta-aineet irrotettiin pylvästä happamalla glysiiniliuoksella. Eluoitunut IgG-vasta-aine kerättiin putkiin, joissa oli Tris-HCl-liuosta neutraloimassa kerätyn fraktion pH:n.

Puhdistettu vasta-aine pipetoitiin dialyysiletkuihin, joiden läpäisevyys oli 12–14 kDa. Selektiivisen diffuusion avulla letkun puoliläpäisevän kalvon läpi saatiin Tris-HCl-liuos ja glysiini vaihdettua neutraalin pH:n PBS:ään. Letkuja säilytettiin yön yli jääkaapissa PBS-puskurissa, jonka jälkeen vasta-aineet jaettiin 0,5ml:n eriin.

5.3 Proteiinipitoisuudenmääritys ANGPTL8 kanivasta-aineista

Laitteet	Kuoppalevyspektrofotometri (Enspire Multimode Plate Reader, PerkinElmer)
Materiaalit	96-kuoppalevy (Nunc)
Reagenssit	Fosfaattipuskuroitu NaCl (PBS, Phosphate buffered saline), pH 7,4 Naudan seerumin albumiini (BSA, Bovine serum albumin) Proteiinimäärityskitti (DC™ Protein Assay, Bio-Rad): Reagenssi A Reagenssi B Reagenssi S

Näytteiden proteiinipitoisuuden määrittäminen aloitettiin standardisuorannäytteiden laimentamisesta. Standardisuoran tekemisessä käytettiin naudan seerumin albumiinia 4 mg/ml, joka laimennettiin PBS:ään pitoisuuksiin 0,1 – 0,2 – 0,4 - 0,6 - 0,8 ja 1 mg/ml. Näytteet laimennettiin PBS:ään 1:5 ja 1:10. Kaikkiin kuoppiin pipetoitiin näytteet rinnakkaisina 5 µl/kuoppa. Reagenssit A ja S yhdistettiin ja pipetoitiin 25 µl/kuoppa. Reagenssi B:tä pipetoitiin 200 µl/kuoppa. Kuoppalevyä sekoitettiin ravistelijassa 5 sekunnin ajan. Absorbanssi mitattiin 15 minuutin kuluttua aallonpituudella 750 nm. Standardisuoran avulla laskettiin näytteiden proteiinipitoisuudet.

5.4 ANGPTL8 vasta-aineen HRP-leimaus

Laitteet	Putken sekoittaja
Materiaalit	Dialyysiletku, läpäisevyys 12-14 kDa, 0,32ml/cm (Spectrum Laboratories)
Reagenssit	Fosfaattipuskuroitu NaCl (PBS, Phosphate buffered saline), pH 7,4 0,1M Na ₂ CO ₃ 0,1M NaHCO ₃ 0,1M Natriummetaperjodaatti

1mM Natriumasetaatti, pH 4,4
Natriumborohydridi
Peroksidaasi, Type XII, piparjuuresta (HRP, SIGMA)
Naudan seerumin albumiini (BSA. Bovine serum albumin)
1% tiomersaali

Vasta-aineet Kani-antiseerumista puhdistettu IgG

Puhdistettua vasta-ainetta pipetoitiin 1 mg/ml dialyysiletkuihin, joiden läpäisevyys oli 12–14 kDa ja dialysoitiin yön yli 0,1M karbonaattipuskuria vastaan +4 °C:ssa.

Peroksidaasia punnittiin 1 mg, joka liuotettiin tislattuun veteen. Tämän jälkeen lisättiin natriummetaperjodaattia ja putkea inkuboitiin sekoittajassa folioon käärittynä puolen tunnin ajan. Peroksidaasi pipetoitiin dialyysiletkuun ja dialysoitiin yön yli +4 °C:ssa 1mM natriumasetaattipuskuria (pH 4,4) vastaan.

Dialysoidut tuotteet yhdistettiin samaan putkeen ja inkuboitiin sekoittajassa folioon käärittynä tunnin ajan, jonka jälkeen lisättiin natriumborohydridiä 1 mg. Putki avattiin muutamia kertoja tunnin inkubaation aikana, jotta muodostunut hiilidioksidi pääsi ulos. Lopullista tuotetta dialysoitiin PBS:ää vastaan +4 °C:ssa kahden päivän ajan.

Dialyysin jälkeen, leimattuun vasta-aineeseen lisättiin säilyvyyden parantamiseksi 20 % BSA:ta ja 1 % tiomersaalia.

5.5 Geelifiltraatio ja proteiinien fraktiointi

Geelifiltraation (size exclusion chromatography) avulla saadaan eroteltua erilaisia molekyyliä niiden molekyylikoon perusteella lisäämällä ne geeliä sisältävän pylvään läpi. Menetelmä on käyttökelpoinen biomolekyylien kuten proteiinien erotteluun ja koon määrittämiseen, suolojen poistoon sekä puskurin vaihtoon. Pylvään geeli muodostuu pyöreistä, inerteistä partikkeleista joita ympäröi puskuri. Nämä partikkelit muodostavat moniulotteisen verkoston, jossa molekyylikooltaan tietyn kokoiset molekyylit pääsevät suodattumaan. Kun näyte lisätään pylvääseen, suuret molekyylit menevät melko suoraan pylvään geelin läpi suodattumatta verkostoon kun pienemmät molekyylit joutuvat kulkemaan pidemmän matkan ja niillä kestää kauemmin tulla ulos pylväästä. Absor-

banssia mittaamalla saadaan kuvaaja, jossa ensimmäisenä ovat kooltaan suurimmat molekyylit ja lopussa pienimmät. (Janson 2011: 51–87.)

Laitteet	Nestekromatografialaite (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography, Merck Hitachi)
Materiaalit	96-kuoppalevy (Nunc) Geelifiltraatiopylväs (Superose 6 10/300 GL, GE Healthcare)
Reagenssit	Fosfaattipuskuroitu NaCl (PBS, Phosphate buffered saline), pH 7,4 1 mM EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo)
Näyte	7 kertaa immunisoitujen kaniinien HRP-leimatut vasta-aineet Plasma ja seerumi

Aluksi Superose-geelipylväs tasapainotettiin PBS-EDTA-puskurilla. Tämän jälkeen näytteet lisättiin yksitellen injisoimalla 0,5 ml näytettä pylvääseen. Näytteet eluoiitiin nopeudella 0,5 ml/minuutissa ja absorbanssia mitattiin aallonpituudella 280 nm. Fraktiot kerättiin minuutin välein yhteensä 45 minuutin ajan.

5.6 SDS-PAGE ja Coomassie blue-värjäys

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) eli natrium-dodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi on yleinen biokemian menetelmä, jonka avulla proteiineja erotellaan molekyylipainon mukaan. SDS denaturoi proteiinien rakenteen ja antaa niille negatiivisen varauksen. Sähköisesti varautuneet proteiinit erottuvat polyakryyliamidigeelillä niin, että pienemmät liikkuvat suurempia nopeammin. Erottelun jälkeen geeli voidaan värjätä proteiinivyyhykkeiden havaitsemiseksi. (Janson: 349–373.)

Laitteet	Geelinerottelulaite (Hoefer Mighty Small II, SE 250/260 Mini-Vertical Gel Electrophoresis Units)
Materiaalit	12,5 % polyakryyliamidigeeli

Reagenssit	Näytepuskuri SDS-puskuri Värjäyspuskuri (Coomassie Blue R250) Väripoistoaine SDS-PAGE standardi, markkerit alueella 10-250 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific)
Näyte	Kokopitkä ANGPTL8 (Human C19orf80 full length protein, abcam®)

Näyte laimennettiin näytepuskuriin 2 µg näytettä riviä kohden. Tämän jälkeen putkia keitettiin kiehuvaan veteen noin viiden minuutin ajan, jotta proteiini denaturoituu sekä puskuri ja näyte sekoittuvat hyvin keskenään. Näytepuskurin 2-merkaptotanolin edesauttaa proteiinien denaturointia rikkoen rikkisiltoja.

Geeliksi valittiin näytteen molekyylipainon (noin 22 kDa) mukaan 12,5 % polyakryyliamidigeeli. Näytteet pipetoitiin geelille ja sähkövirran avulla proteiinit liikkuvat geelissä. Kokoomageeli (3 %) eroteltiin 90 V ja 12,5 % erotusgeeli 150 V. Kun näytteet olivat kulkeutuneet geelin alareunaan, elektroforeesi purettiin ja geeli laitettiin noin puoleksi tunniksi värjäyspuskuriin ja väripoistoon niin pitkäksi aikaa, että tausta kirkastui ja proteiinivyöhykkeet erottuvat. Geeliä tarkasteltiin valopöydällä standardia apuna käyttäen.

5.7 Western blot – analyysi

Western blot on tärkeä solu- ja molekyylibiologian tekniikka, jonka avulla erotellaan ja tunnistetaan proteiineja sekä voidaan testata käytettyjen vasta-aineiden spesifisyys. Ensin proteiinit erotellaan kokonsa perusteella sähkökentässä geelielektroforeesilla. Proteiinit siirretään esimerkiksi nitroselluloosakalvolle ja sitoutetaan spesifisten vasta-aineiden kanssa. Sitoutumattomat vasta-aineet pestään pois ennen sekundaarisen vasta-aineen lisäämistä. Sekundaarinen vasta-aine, joka on leimattu esimerkiksi piparjuuriperoksidaasientsyymillä (HRP), sitoutuu primaariin vasta-aineeseen ja substraatin lisäyksen jälkeen saadaan näkyviin kohdeantigeenit. (Mahmood – Yang 2012: 129–434.)

Laitteet	Siirtäjäelektroforeesi (Hoefer Transphor, Transfer Electrophoresis Units) Filmin kehityslaitte (Kodak)
Materiaalit	Nitroselluloosakalvo (Amersham™ Hybond™-ECL 0,45µm, GE Healthcare) Röntgenfilmi (Super RX, Fujifilm)
Reagenssit	Rasvaton maitojauhe (Valio) TBST (Tris puskuroitu NaCl ja 0,1% Tween 20), pH 7,6 SDS-PAGE standardi, markerit alueella 10-250 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) Blot-puskuri: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glysiini, 20 % MeOH Kuvantamissubstraatti (Clarity™ Western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad)
Näyte	Kokopitkä ANGPTL8 (Human C19orf80 full length protein, abcam®)
Vasta-aineet	Seitsemän kertaa immunisoitujen kaniin puhdistettu IgG GAR (Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate, Bio-Rad)

Näytteiden erottelu tehtiin samalla tavoin kuin edellisessä SDS-PAGE:ssa on kuvattu. Erottelun jälkeen geeli laitettiin kasettiin imupapereiden väliin nitroselluloosakalvon kanssa. Kasetti upotettiin puskuuriin ja näytteet siirrettiin sähkövirtaa hyväksikäyttäen polyakryyliamidigeeliltä nitroselluloosakalvolle. Siirtäminen suoritettiin 200 V ja 400 mA noin tunnin ajan. Kalvolle siirrettyjä näytteitä inkuboitettiin tunnin ajan 5 % maito – TBST-peittämisspuskurissa.

Vasta-aineet laimennettiin 1:500 0,5 % maito – TBST -liuokseen. Nitroselluloosakalvoja inkuboitettiin vasta-aineita sisältävän maitoliuoksen kanssa yön yli +4 °C, jonka jälkeen ne pestiin kaksi kertaa 15 minuutin ajan tasosekoittajassa TBST-pesupuskurilla. Affiniteettipuhdistettu ja HRP-leimattu sekundaarinen vasta-aine GAR, laimennettiin 1:2000

0,5 % maito – TBST –liuokseen, jossa näytteitä inkuboitiin noin tunnin ajan. Nitroselluloosakalvo pestiin samoin kuin aikaisemmin.

Kuvantamisessa käytettiin vahvistettuun kemiluminesenssiin (ECL, enhanced chemiluminescence) perustuvia kaupallisia substraatteja. GAR-vasta-aineeseen sidottu peroksidaasientsyymi hapettaa substraatin luminolin synnyttäen valoreaktion. Substraatti pipetoitiin nitroselluloosakalvolle ja inkuboitiin muutama minuutti. Tämän jälkeen nitroselluloosakalvoa vasten painettiin röntgenfilmi, johon näyte emittoi valoa ja filmi kehitettiin Kodak-laitteella. Työskentely tapahtui pimiössä.

5.8 ELISA-menetelmä

Laitteet	Kuoppalevyspektrofotometri (Enspire Multimode Plate Reader, PerkinElmer) Kuoppalevyn pesulaite (WellWash AC, Thermo Fisher Scientific)
Materiaalit	96-kuoppalevy (Nunc)
Reagenssit	Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃ Fosfaattipuskuroitu NaCl (PBS, Phosphate buffered saline), pH 7,4 Tween 20 (Sigma) Naudan seerumin albumiini (BSA. Bovine serum albumin) Sitruunahappo Na ₂ HPO ₄ H ₂ O ₂ H ₂ SO ₂ 10mg o-polyetyleenidiamiini tabletti (Sigma)
Vasta-aineet	Kaneissa tuotettu polyklonaalinen ANGPTL8 vasta-aine Kaupallinen vasta-aine (Affinity Purified Antibody, Genscript) HRP-leimattu vasta-aine
Puskurit	Pinnoitus: 0,05M Na ₂ CO ₃ – NaHCO ₃ , pH 9,6

Peittäminen: PBS – 0,5% BSA - 0,1% Tween 20

Laimennos: PBS- 0,5% BSA – 0,5% Tween 20

Pesu: PBS – 0,5% Tween 20

Substraatti: 6,25 ml 0,1 M sitruunahappo

6,25 ml 0,2 M Na₂HPO₄

12,5 ml H₂O

10mg o-polyetyleenidiamiini tabletti

10 µl H₂O₂

Menetelmän toteutus aloitettiin laimentamalla pinnoituspuskuriin puhdistetut IgG-vasta-aineet pitoisuuteen 2 µg/kuoppa ja laimennosta pipetoitiin 200 µl/kuoppa. Kuoppalevyn kahteen ensimmäiseen kuoppaan pipetoitiin pelkkää puskuria taustan mittaamiseksi. Kuoppalevyä inkuboitiin yön yli jääkaapissa (+4 °C) muovikalvolla peitettynä.

Seuraavana päivänä kuoppalevy pestiin neljä kertaa 350 µl:lla pesupuskuria kuoppaa kohden. Tämän jälkeen lisättiin peittämisspuskuria 200 µl/kuoppa, jotta pohjan pinnoitukseen ei jää aukkoja ja estetään vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen. Kuoppalevyä inkuboitiin huoneenlämmössä peitettynä tunnin ajan, jonka jälkeen kuopat pestiin uudelleen.

Seerumi- ja plasmanäytteet laimennettiin laimennospuskuriin suhteessa 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32. Näytteitä pipetoitiin 200 µl/kuoppa. Kuoppalevyn kuuteen ensimmäiseen kuoppaan pipetoitiin vain laimennospuskuria, jotta saatiin taustan lisäksi havaittua mahdollinen vasta-aineiden ristireaktio. Kuoppalevyä inkuboitiin tunnin ajan jääkaapissa, jonka jälkeen suoritettiin pesu.

HRP-konjugoidut eli leimatut sekundaariset vasta-aineet laimennettiin laimennospuskuriin suhteessa 1:500 ja pipetoitiin kuoppiin 200 µl. Kuoppalevyä inkuboitiin tunnin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen kuoppalevy pestiin.

Substraatti valmistettiin sekoittamalla putkessa 6,25 ml 0,1 M sitruunahappoa ja 6,25 ml 0,2 M Na₂HPO₄ ja 12,5 ml steriiliä vettä. Lopuksi putkeen liuotettiin 10mg o-polyetyleenidiamiinitabletti ja lisättiin 10 µl vetyperoksidia. Substraatti-entsyymi värireaktio on valolle herkkä, joten substraatti valmistettiin juuri ennen pipetointia. Substraat-

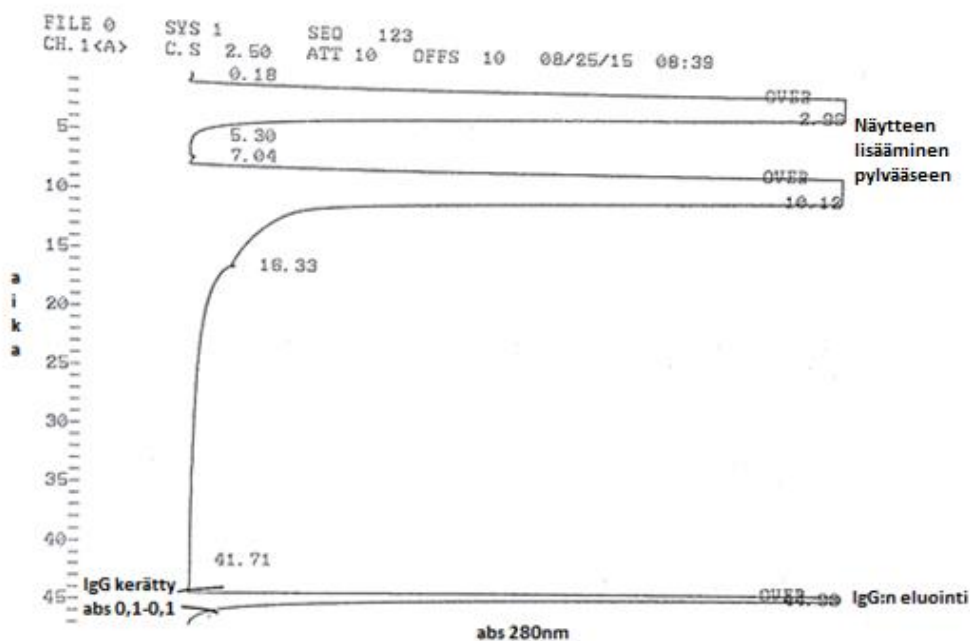
tia lisättiin välittömästi 200 µl/kuoppa, jonka jälkeen kuoppalevy peitettiin foliolla ja annettiin värireaktion edetä 20–25 minuuttia.

Reaktio pysäytettiin 3 M rikkihapolla, jota pipetoitiin 50 µl kuoppaa kohden. Peroksi- daasin hajottaessa substraattia, syntyi kellertävä värireaktio, jonka absorbanssi mitat- tiin aallonpituudella 490 nm.

6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

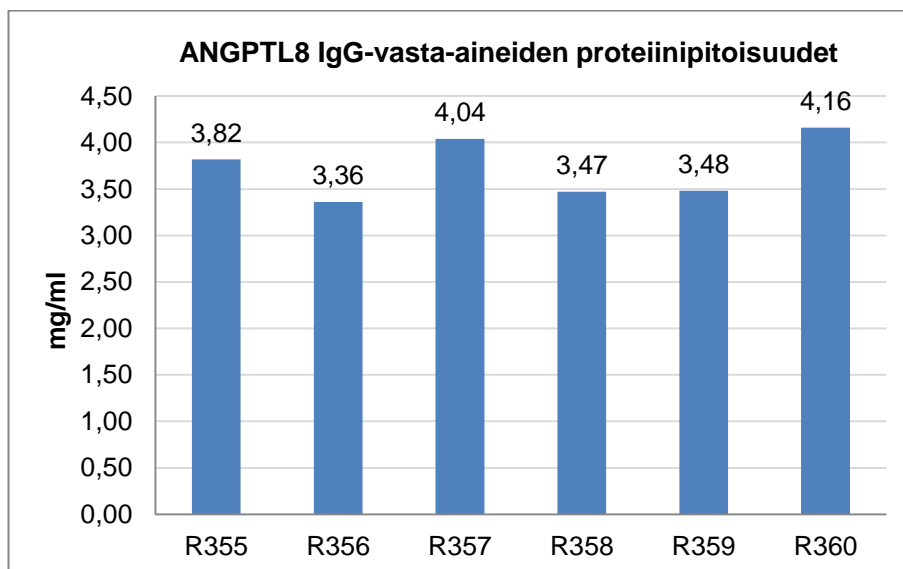
6.1 Vasta-aineen puhdistus ja proteiinipitoisuus

Immunisoitujen kanien verestä eroteltiin haluttu vasta-aine, joka kuuluu IgG-luokkaan. Puhdistukseen käytettiin proteiini-G-affiniteettipylvästä, jotta saatiin vain IgG-fraktio kaikista muista proteiineista erilleen. Kuviossa 7 on esitetty tyypillinen HPLC- kromatografian kuvaaja. Ensimmäiset kaksi piikkiä kuvaavat näytteen liikkumisen al- kamista pylväässä ja viimeinen piikki kuvaa IgG:n eluointia pylvästä. Kaikki kuusi eri kanin antiseerumia eroteltiin vuorotellen pylväässä, eluointiin ja kerättiin talteen.



Kuvio 7. ANGPTL8 IgG-vasta-aineen puhdistuksen kromatogrammi. Kanin antiseerumi lisättiin pylväaseen kahdesti yhden millilitran annoksina nopeudella 1 ml/min, josta syntyy kaksi ylintä piikkiä. Happaman pH:n avulla IgG eluointiin pylvästä irti, jota kuvaa viimeinen piikki.

Proteiinipitoisuudet määritettiin kaikista proteiini-G-pylväällä puhdistetuista ANGPTL8-peptidivasta-aineista. Kuviossa 8 on esitetty eri kaniin puhdistettujen IgG-vasta-aineiden proteiinipitoisuudet.



Kuvio 8. Immunisoitujen kaniin puhdistettujen IgG-vasta-aineiden proteiinipitoisuudet. Eri kaniin vasta-ainepitoisuudet vaihtelivat välillä 3,36-4,16mg/ml.

6.2 HRP-leimatut vasta-aineet

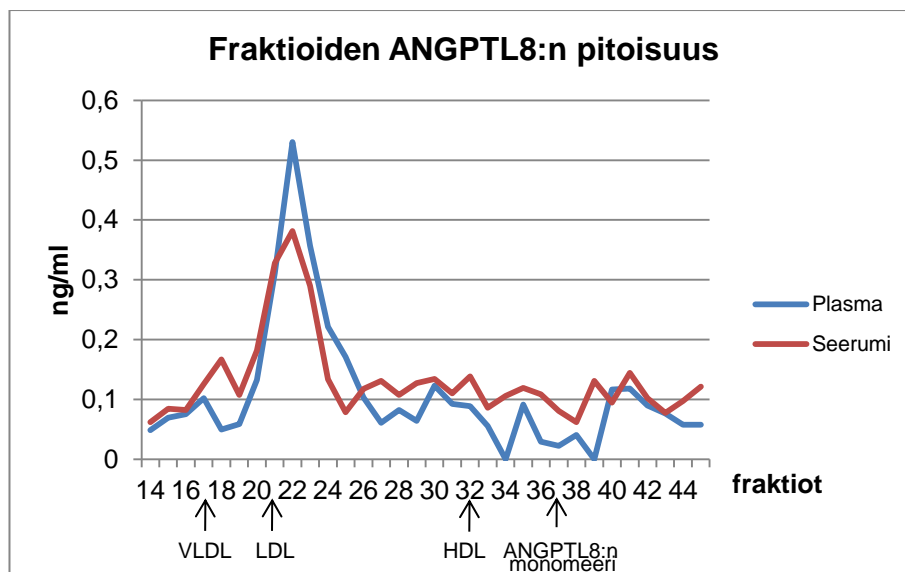
Seitsemän kertaa immunisoitujen kaniin puhdistetut vasta-aineet leimattiin piparjuuri-peroksidaasilla. Aikaisemmasta kolmannesta immunisaatiosta kerätyt vasta-aineet olivat toimineet hyvin sekundaarisena vasta-aineena, mutta haluttiin testata toimisivatko uudemmat vielä paremmin. Uudet leimatut vasta-aineet eivät kuitenkaan toimineet ja syytä lähdettiin selvittämään. Oli todennäköisempää, että ongelma oli leimausvaiheessa eikä seitsemännen immunisaation kanivasta-aineissa.

Geelifiltraation avulla selvitettiin onko HRP-leima, jonka molekyylipaino on noin 44 kDa, kiinnittynyt IgG-vasta-aineeseen, jonka koko on noin 150 kDa. Vasta-aineiden lisäksi vertailukohdaksi eroteltiin puhdasta kanin IgG:tä, jotta tiedettiin mihin IgG-piikki tavallisesti sijoittuu. Seitsemän kertaa immunisoitujen kaniin vasta-aineiden kromatogrammin useammasta piikistä nähtiin, että vain osaan vasta-aineista peroksidaasi oli kiinnittynyt sitomisreaktion aikana. Leimaamisessa käytetty natriumborohydridi, jonka tarkoituksena on kiinnittää vasta-aine ja peroksidaasi toisiinsa, ei todennäköisesti ollut toiminut optimaalisesti.

6.3 Proteiinifraktiot ANGPTL8:n kompleksoitumisen selvittämisessä

ANGPTL8:n kompleksoitumista tutkittiin geelifiltraation avulla kerätyistä proteiinifraktioista käyttäen kehitettyä ELISA-menetelmää. ANGPTL8 on molekyylipainoltaan 22 kDa, joten geelifiltraatioissa proteiinin pitäisi pienen kokonsa vuoksi tulla kromatografian loppupuolella. ELISA-tuloksen perusteella osoittautui, että ANGPTL8-proteiini eluoitui jo huomattavasti aikaisemmin (kuvio 9). Tästä voitiin päätellä, että ANGPTL8 on ainakin ajetuissa näytteissä kompleksoitunut molekyylikooltaan hyvin suureksi kokonaisuudeksi.

Seerumi- ja plasmanäytteet lisättiin pylvääseen, jotta saatiin selville niiden välinen ero ANGPTL8:n eluotumisessa. ANGPTL8-pitoisuus nousi samassa fraktioissa molemmissa näytetyypeissä, joten on todennäköistä, että kompleksi ei ole muodostunut pelkästään hyytymistekijöiden kanssa, koska seerumista ne puuttuvat. Plasman ANGPTL8-pitoisuus oli hieman seerumia korkeampi. Kompleksoitumisesta huolimatta kehitetyssä ELISA-menetelmässä vasta-aineet pääsevät sitoutumaan ANGPTL8:aan.

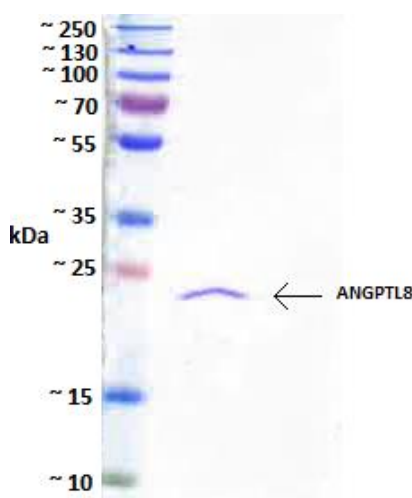


Kuvio 9. Proteiinien fraktiointi korkean erottelukyvyn geelisuodatuksella. ANGPTL8:n kompleksoitumisen selvittämisessä. ANGPTL8:n oli niin plasmassa kuin seerumissa samassa fraktiossa ja eluoituu suurimolekyylisten yhdisteiden alueella. Kuvioon on merkitty nuolilla lipoproteiinien ja ANGPTL8:n monomeerin tyypilliset eluointikohdat kuvion tulokinnan helpottamiseksi.

6.4 Kokopitkän ANGPTL8:n koon ja puhtauden tutkiminen

E. coli-bakteereissa tuotetun rekombinantti-ANGPTL8:n kokoa ja puhtautta selvitettiin elektroforeesin avulla. Molekyylivälikoon 10-250 kDa mukaan merkitty standardinäyte ja kokopitkä ANGPTL8 eroteltiin polyakryyliamidigeelissä pitoisuudella 2 µg/kaivo.

Kokopitkä ANGPTL8:n muodosti yhden selkeän proteiinvyöhykkeen noin 22 kDa kohdalla (kuvio 8). Kaupallinen proteiini on siis puhdasta eli se ei sisällä mitään muita proteiineja kuin kokopitkää, ANGPTL8:n molekyylivälikoon alueella liikkuvaa proteiinia. ANGPTL8:n identiteetistä saatiin varmuus vasta Western blot-analyysin avulla.



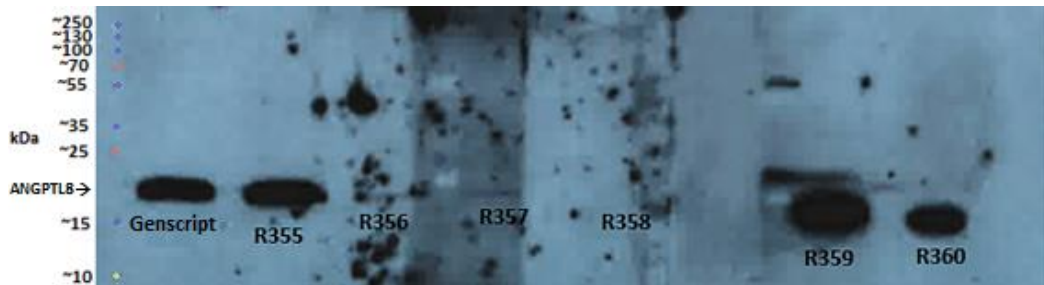
Kuvio 10. Kokopitkän ANGPTL8:n SDS-PAGE ja Coomassie blue-värijäys. Värijätystä geelistä voidaan todeta näytteen sisältävän vain puhdasta ANGPTL8:aa, joka on molekyylipainoltaan noin 22 kDa.

6.5 Vasta-aineet Western blot -analyysillä

Western blot -analyysin tarkoituksena oli selvittää tunnistavatko tuotetut vasta-aineet puhtaan, kokopitkän ANGPTL8:n. Kaikkien immunisoitujen kaniin puhdistetut vasta-aineet sekä Genscript:n kaupallinen vasta-aine tutkittiin Western blot-menetelmällä.

Kaikki vasta-aineet, lukuun ottamatta R358:aa, sitoutuivat koko pitkään ANGPTL8:aan. R356:n ja R357:n vasta-aineet reagoivat melko huonosti ja R358 ei antanut lainkaan signaalia (kuvio11). R357- ja R358-kanit on immunisoitu samaa ANGPTL8-peptidiä vastaan, joten erot signaalienvoimakkuuksissa johtuvat kaniin erilaisista immuunivasteista proteiinia kohtaan. R359:n vasta-aine reagoi voimakkaasti Western blot:ssa,

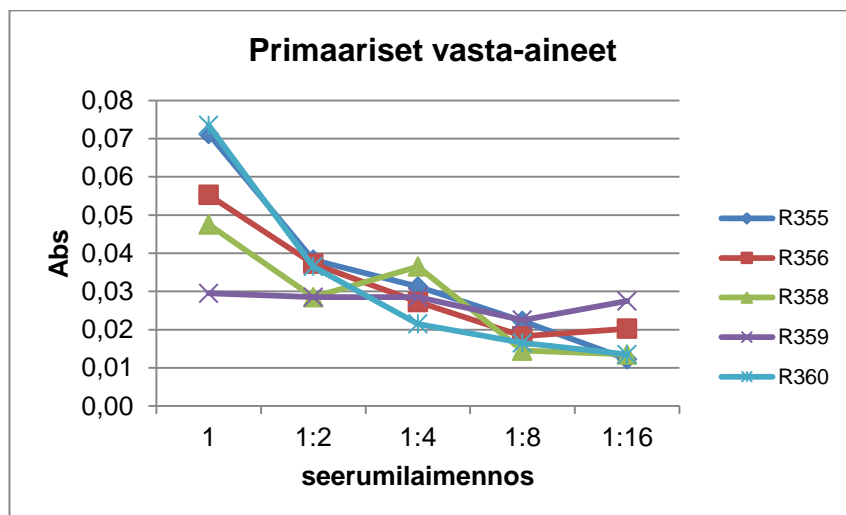
mutta ELISA:ssa vaste oli R360:n vasta-ainetta huonompi. Western blot vahvistaa ELISA-menetelmän kehittämisessä R355:n ja R360:n vasta-aineiden käyttöä, koska ne antavat parhaimman vasteen.



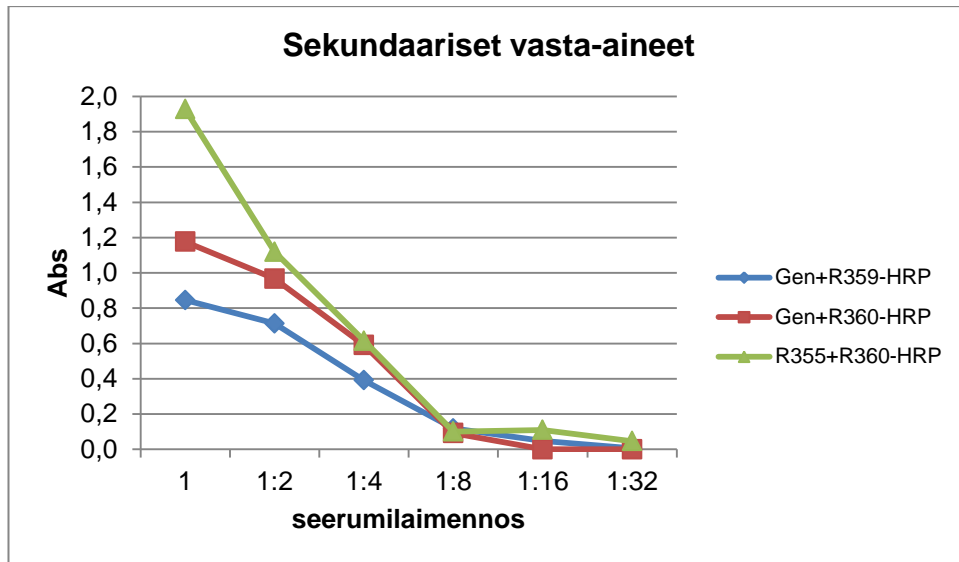
Kuvio 11. Immunisoitujen kanien vasta-aineiden tutkiminen Western-blot -analyysillä. Kaikki vasta-aineet lukuun ottamatta R358, tunnistavat kaupallisen kokopitkän ANGPTL8:n.

6.6 ELISA-menetelmän kehittäminen

ELISA:n kehittäminen alkoi yhdistelemällä eri primaari- ja sekundaarivasta-aineita. Primaarinen vasta-aine etsittiin kiinnittämällä kuoppalevyn pohjaan viiden eri kanin puhdistettu IgG-vasta-aine (kuvio12). Kolme kertaa immunisoitujen kanien R359- ja R360-vasta-aineita oli valmiiksi HRP-leimattuina, joten kokeilut aloitettiin niillä (kuvio 13). Vasta-aineet pyrittiin valitsemaan niin, että toinen vasta-aineista tunnisti ANGPTL8:n N-terminaalista ja toinen C-terminaalista osaa, jotta saatiin luotettavimmin mitattua kokopitkä proteiini.



Kuvio 12. Primaaristen vasta-aineiden tutkiminen. Vasta-aineet 2 µg/kuoppa, sekundaarisena vasta-aineena kaupallinen HRP-leimattu Genscript suhteessa 1:1000. Inkubointaessa + 37°C:ssa absorbanssit ovat hyvin matalat verrattuna + 4°C:ssa. Näytteenä huumaniseerumi.



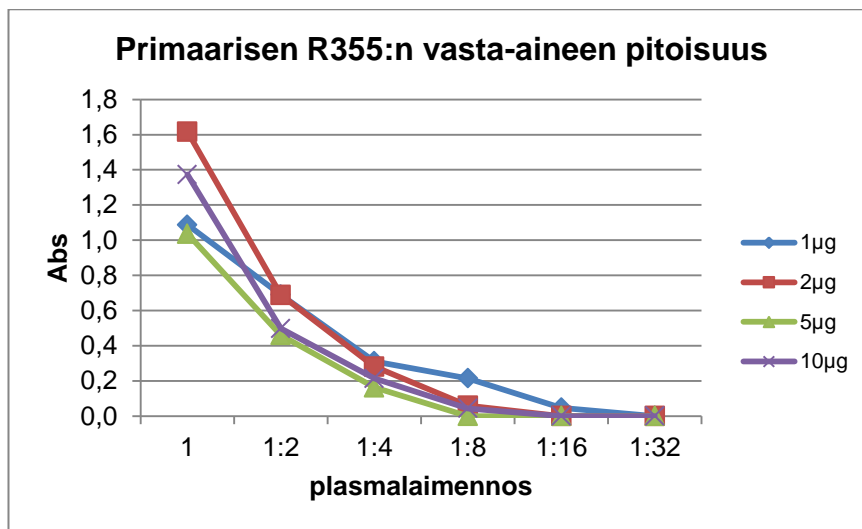
Kuvio 13. Sekundaaristen vasta-aineiden tutkiminen. Affiniteetti puhdistettu Genscript 1 µg/kuoppa ja R355 10 µg/kuoppa. Sekundaariset vasta-aineet 1:500. R360 antaa paremman vasteen kuin R359. Näytteenä humaaniseerumi. Inkubaatio näytteen kanssa + 4°C:ssa.

Tutkimusten perusteella parhaaksi kuoppalevyn pohjaan kiinnitettäväksi vasta-aineeksi valikoitui R355. Sekundaarisista vasta-aineista R360 antoi paremman vasteen niin primaarisen vasta-aineen ollessa Genscript kuin R355. Kuvion 13 tulosten vertailussa on otettava huomioon, että Genscript-vasta-aine on affiniteettipuhdistettua ja siksi pienempi pitoisuus vasta-ainetta riittää verrattuna tuotettuun R355-vasta-aineeseen. Menetelmää lähdettiin kehittämään niin, että R355-vasta-aine kiinnitettiin kuoppalevyn pohjaan ja HRP-leimattu R360-vasta-aine toimi detektiovasta-aineena. Myöhemmin leimattiin seitsemännen immunisaatiokerran kaniin parhaiksi havaitut sekundaariset vasta-aineet, mutta ne eivät toimineet menetelmässä.

Vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista ja taustan aiheuttamaa signaalia tutkittiin lisäämällä osaan levyn kuopista vain puskuriliuokset ja vasta-aineet ilman näytettä. Kuoppien arvot olivat alhaiset eli vasta-aineet eivät ristireagoineet menetelmässä. Standardin ja näytteiden absorbansseista vähennettiin puskuriliuosten ja vasta-aineiden absorbanssiarvot.

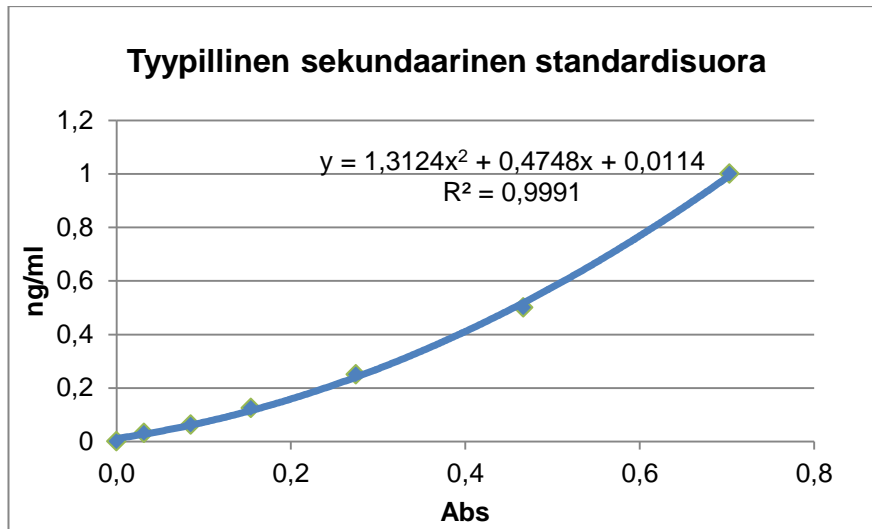
Kun hyvin laimeneva ja riittävän korkean absorbanssin antava vasta-aine yhdistelmä löytyi, lähdettiin yksitellen muuttamaan menetelmän eri komponentteja. Ensimmäisten ELISA-kokeilujen inkubaatiot tehtiin lämpökaapissa, mutta jääkaappi- ja huoneenlämpötilan todettiin antavan huomattavasti paremmat ja korkeammat absorbanssi-tulokset, todennäköisesti johtuen vasta-aineiden ja antigeenien lisääntyvästä reagoimisesta

kylmässä. Lisäksi tutkittiin kuinka eripituiset inkubaatioajat vaikuttavat tuloksiin. Näytteidien yön yli inkubaation havaittiin parantavat vastetta, mutta hyödyn todettiin olevan vähäinen pitkään tutkimusaikaan verrattuna. Näytetilavuuden puolittumisen todettiin puolittavan absorbanssiarvon, joten tarpeeksi korkean absorbanssin aikaansaamiseksi näytetilavuutena käytettiin 200 µl kuoppaa kohden. Primaari- ja sekundaarivasta-aineen pitoisuutta vaihtelemalla pyrittiin löytämään parhaan tuloksen antava pitoisuus. Optimaaliseksi primaarisen R355-vasta-aineen pitoisuudeksi todettiin 2 µg/kuoppa (kuvio 14) ja sekundaarisena vasta-aineena käytetyn R360:n parhaan vasteen antavaksi laimennokseksi osoittautuivat 1:500.



Kuvio 14. Primaarisen vasta-aineen R355:n optimipitoisuuden määrittäminen. Paras vaste saatiin pitoisuudella 2 µg/kuoppa. Näytteenä humaaniplasma.

Seuraava askel oli määrittää standardisuora, jotta absorbanssiarvoista saatiin määritettyä näytteen pitoisuus. Tarkoituksena oli käyttää kokopitkää rekombinantti-ANGPTL8:aa primaaristandardina, mutta proteiini ei reagoinut kehitetyssä ELISA-menetelmässä erilaisista käsittelyistä huolimatta. Sekundaarisena standardinäytteenä käytettiin plasmafereesistä kerättyä plasmaa, jotta saatiin suuntaa antava tulostaso ANGPTL8:n pitoisuudesta. Laimentamattoman standardin pitoisuudeksi arvioitiin 1 ng/ml ja se laimennettiin pitoisuuksiin 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32. Kuviossa 15 on tyyppinen sekundaarinen standardin suora. Kaikki standardisuoran näytteet pipetoitiin luotettavuuden lisäämiseksi rinnakkaisina.



Kuvio 15. Tyypillinen kehitetyn ANGPTL8:n ELISA-menetelmän sekundaarinen standardisuora.

Menetelmän toimivuutta tutkittiin ihmisen ja hiiren plasma- ja seeruminäytteillä. Menetelmä antoi hyvän vasteen niin plasmasta kuin seerumista. Vasta-aineet reagoivat myös hiirinäytteillä osittaisen proteiinisekvenssin homologian vuoksi eli menetelmä on käyttökelpoinen myös hiirten ANGPTL8:n pitoisuuden määrittämisessä. Kokonaisella rekombinantti-ANGPTL8:lla ei saatu kehitetyssä ELISA-menetelmässä minkäänlaista vastetta, vaikka Western blotissa vasta-aineet tunnistivat kokopitkän proteiinin.

7 Johtopäätökset

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ELISA-menetelmä ANGPTL8:n määrittämiseksi. ANGPTL8 on erittäin mielenkiintoinen uusi proteiini, josta tiedetään vielä melko vähän. Sen moninaiset vaikutukset elimistössä tekevät siitä mielenkiintoisen tutkimuskohteen. Monet kysymykset proteiinin toiminnassa vaativat vielä vastauksia ja siksi olisi tärkeää saada luotettava menetelmä proteiinin määrittämiseksi.

ELISA-menetelmän kehitystyö alkoi toimivien vasta-aineiden löytämisestä ja menetelmän olosuhteiden optimimisesta. Erinomaisen vasteen eli hyvin laimenevat ja korkean absorbanssin antavat vasta-aineet onnistuttiin löytämään, joista toinen tunnistaa spesifisesti N- ja toinen C-terminaalisenpään proteiinista. Menetelmä mittaa siis kokopitkää ANGPTL8:aa. Primaaristandardin puutteen vuoksi menetelmää ei pystytty validoimaan eli sen luotettavuutta testaamaan. Sekundaarisena standardina käytetystä plasmasta tehdyn standardisuoran avulla saatiin määritettyä näytteistä vain suuntaa antavia pitoi-

suuksia. Vaikka tarkkoja pitoisuuksia ei pystytty määrittämään, tuloksista voitiin todeta menetelmän tunnistavan hyvin ANGPTL8:n plasmasta ja seerumista.

Seitsemännen immunisaatiokerran kanien vasta-aineet haluttiin leimata peroksidaasilla, jotta nähtäisiin toimisivatko ne kolme kertaa immunisoitujen kanien vasta-aineita paremmin sekundaarisena vasta-aineena. Hypoteesina oli, että useamman immunisaation jälkeen kanit olivat tuottaneet enemmän vasta-aineita ANGPTL8:n peptidipätkiä kohtaan. Valitettavasti uudet leimatut vasta-aineet eivät toimineet ELISA-menetelmässä. Geelifiltraation avulla pystyttiin toteamaan, että peroksidaasi oli kiinnittynyt vain pieneen osaan vasta-aineista. Epäonnistuneen leimauksen syynä oli mitä todennäköisimmin toimintakykynsä menettänyt natriumborohydridi, jonka tarkoituksena on kiinnittää vasta-aine ja entsyymi toisiinsa. Seitsemän kertaa immunisoitujen kanien vasta-aineet pitäisi seuraavalla kerralla leimata tuoretta natriumborohydridiä käyttämällä.

Geelifiltraatiosta saatujen proteiinifraktioiden avulla saatiin selville, että ANGPTL8 esiintyy elimistössä monomeerin sijaan suureen kompleksiin sitoutuneena. Seerumi- ja plasmanäytteitä tutkimalla kävi ilmi, että proteiini esiintyy kummassakin näytetyypissä samankokoisena. Plasmanäytteen ANGPTL8-pitoisuus oli hieman seeruminäytettä korkeampi. Kompleksi ei siis todennäköisesti ole muodostunut pelkästään hyytymistekijöistä, koska ne puuttuvat seerumista. Toistaiseksi on epäselvää minkä kanssa ANGPTL8:n muodostaa kompleksin ja kuinka se jakautuu verenkiertoon ja kudoksiin. Tulevaisuudessa olisi mielenkiintoista tutkia ilmiötä lisää. Kompleksoitumisesta huolimatta kehitetyn menetelmän vasta-aineet pääsevät sitoutumaan kokopitkään proteiiniin.

Western blot vahvisti tuotettujen vasta-aineiden tunnistavan spesifisesti kokonaisen ANGPTL8:n ja että menetelmän kehittämisessä on käytetty parhaan signaalin antavia vasta-aineita. Lisätutkimusta vaaditaan siitä miksi puhdistettu, kokopitkä ANGPTL8:n reagoi Western blot-analyysissä, muttei ELISA-menetelmässä. Todennäköinen syy on se, että ANGPTL8:n täytyy olla sen biologisissa näytteissä kompleksimuodossa. ELISA-menetelmässä antigeeni reagoi liuostilassa kun taas Western blot-analyysissä ANGPTL8 on SDS-käsitelty ja kiinnitettynä nitroselluloosakalvossa. Reagointiolosuhteet ovat siis hyvin erilaiset. Proteiini on valmistettu *E. coli* – bakteereissa, joten myös sen laskostuminen poikkeaa elimistössä esiintyvistä proteiineista. Proteiinin erilainen laskostuminen voi aiheuttaa antigeenien epitooppeihin muutoksia, jolloin vasta-aine ei

enää kykene sitoutumaan siihen. Matriksin vaikutuksen selvittämiseksi näytteitä inkuboitiin yhdessä plasman kanssa. Kokonainen vasta-aine ei kuitenkaan vielä näkynyt ELISA:ssa. Jatkossa kokopitkää rekombinantti-ANGPTL8:aa voisi käsitellä erilaisilla proteiinin rakenteeseen vaikuttavilla aineilla, esimerkiksi SDS-liuoksella, jolloin vasta-aineet mahdollisesti pystyisivät sitoutumaan siihen paremmin. Kokopitkän rekombinanttiproteiinin toimimaan saaminen menetelmässä olisi tärkeää, koska sitä voitaisiin käyttää primaarisena standardina näytteitä mitattaessa.

Määritysmenetelmä kehitettiin tutkimuksen hyvää tieteellistä käytäntöä (2012: 6-9) noudattaen. Menetelmän kehittämisenä on yhteiskunnallinen tarve ja merkittävyys, koska ANGPTL8:n vaikuttaa keskeisesti rasva-aineenvaihduntaan, jonka häiriöt ovat yhteydessä maailmanlaajuisesti yleisimpään kuolinsyyhyn, sydän- ja verisuonitauteihin. ANGPTL8:n tutkiminen voi mahdollistaa uusien hoitokeinojen kehittämisen ja olla mahdollisesti biomarkkeri näille sairauksille. Tutkimuksen merkittävyyttä lisää myös aikaisemman tutkimustiedon vähyys. Menetelmässä käytetyt vasta-aineet oli tuotettu Helsingin koe-eläinkeskuksessa koe-eläin lakeja ja eettisiä periaatteita noudattaen. Kehittämistyön eri vaiheet tehtiin tarkasti ja laadukkaasti, jotta pystyttiin varmistamaan tulosten luotettavuus. Suuri pipetointi määrä aiheuttaa jonkin verran satunnaisvirhettä ELISA-menetelmässä, joten virheen mahdollisuutta pienennettiin näytteiden rinnakkaispipetoinnilla. Kaikki tulokset käsiteltiin avoimesti ja rehellisesti tutkimusryhmässä. Työvaiheet ja tulokset raportoitiin ja arkistoitiin juuri sellaisena kuin ne saatiin. Tulosten esittämisessä on pyritty selittämään asiat johdonmukaisesti ja helposti ymmärrettävällä tavalla. Kehitetyn menetelmän jatkokehittämistä ja toistettavuuden varmistamista varten laadittiin tarkka työohje (liite 1).

Menetelmän kehittäminen jäi vielä kesken, koska primaaristandardia ei ollut saatavilla. Hyvän vasta-aineyhdistelmän ja menetelmän optimaalisten olosuhteiden löytäminen on kuitenkin jo hyvä alku. Seuraava askel kehittämistyössä on luotettavan standardin löytäminen ja menetelmän validointi. ANGPTL8 voidaan määrittää myös massaspektrometrin avulla plasmasta tai seerumista, jolloin sitä voitaisiin käyttää suoraan menetelmän standardina.

Lähteet

Chatterjee, Cynthia – Sparks, Daniel L. 2011. Hepatic Lipase, High Density Lipoproteins, and Hypertriglyceridemia. *The American Journal of Pathology* 178 (4). 1429–1433.

Cox, Aaron R. – Lam, Carol J. – Bonnyman, Claire W. – Chavez, Julia – Rios, Jacqueline S. – Kushner, Jake A. 2015. Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8)/betatrophin overexpression does not increase beta cell proliferation in mice. *Diabetologia* 58 (7). 1523–1531.

ELISA technical guide and protocols. Thermo Fisher Scientific. Verkkodokumentti. <<http://www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf>>. Luettu 26.10.2015.

Farhat, Nada – Thorin-Trescases, Nathalie – Mamarbachi, Maya – Villeneuve, Loius – Yu, Carol – Martel, Cecile – Duquette, Natacha – Gayda, Mathieu – Nigam, Anil – Juneu, Martin – Allen, Bruce G. – Thorin, Eric 2013. Angiopoietin-like 2 Promotes Atherosclerosis in Mice. *Journal of the American Heart Association* 2 (3).

Fu, Zhiyao – Berhane, Feven – Fite, Alemu – Seyoum, Berhane – Abou-Samra, Abdul B. – Zhang, Ren 2014a. Elevated circulating lipasin/betatrophin in human type 2 diabetes and obesity. *Scientific Reports* 4. 1–5.

Fu, Zhiyao – Abou-Samra, Abdul B. – Zhang, Ren 2014b. An explanation for recent discrepancies in levels of human circulating betatrophin. *Diabetologia* 57. 2232–2234.

Gómez-Ambrosi, Javier – Pascual, Eider -- Catalán, Victoria – Rodríguez, Amaia – Ramírez, Beatriz – Silva, Camilo – Gil, María J. – Salvador, Javier – Frühbeck, Gema 2014. Circulating Betatrophin Concentrations Are Decreased in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99 (10). E2004–E2009.

Grundey, Scott M. 2008. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 28. 629-636

Gusarova, Viktoria – Alexa, Corey A. – Na, Erqian – Stevis, Panayiotis E. – Xin, Yurong – Bonner-Weir, Susan – Cohen, Jonathan C. – Hobbs, Helen H. -- Murphy, Andrew J. -- Yancopoulos, George D. – Gromada, Jesper 2013. ANGPTL8/Betatrophin Does Not Control Pancreatic Beta Cell Expansion. *Cell* 159 (3). 691–696.

Haridas, P. A. Nidhina – Soronen, Jarkko – Sädevirta, Sanja – Mysore, Raghavendra – Quagliarini, Fabiana – Pasternack, Arja – Metso, Jari – Perttilä, Julia – Leivonen, Marja – Smas, Cynthia M. – Fischer-Posovszky, Pamela -- Wabitsch, Martin – Ehnholm, Christian – Ritvos, Olli – Jauhainen, Matti – Olkkonen, Vesa M. – Yki-Järvinen, Hannele 2015. Regulation of Angiopoietin-Like Proteins (ANGPTLs) 3 and 8 by Insulin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (10). E1299–E1307.

Horio, Eiji – Kadomatsu, Tsuyoshi – Miyata, Keishi – Arai, Yasumichi – Hosokawa, Kentaro – Doi, Yasufumi – Ninomiya, Toshiharu – Horiguchi, Haruki – Endo, Motoyoshi – Tabata, Mitsuhiisa – Tazume, Hirokazu – Tian, Zhe – Takahashi, Otowa – Tereda, Kazutoyo – Takeya, Motohiro – Hao, Hiroyuki – Hirose, Nobuyoshi – Minami, Takahashi – Suda, Toshio – Kiyohara, Yutaka – Ogawa, Hisao – Kaikita, Koichi – Oike, Yuichi 2014. Role of Endothelial Cell-Derived Angptl2 in Vascular Inflammation Lead-

ing to Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis Progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34. 790–800.

Hossain, Parvez – Kawar, Bisher – El Nahas, Meguid 2007. Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *The New England Journal of Medicine* 356. 213–215.

Hui, Xiaoyan – Lam, Karen – Vanhouette, Paul M. – Xu, Aimin 2012. Adiponectin and cardiovascular health: an update. *British Journal of Pharmacology* 165 (3). 574–590.

Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa 2012. Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Verkkodokumentti. <http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf>. Luettu 6.11.2015.

Janson, Jan-Christer 2011. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, 3rd edition. John Wiley & Sons, Inc.

Jokiranta, Sakari – Seppälä, Ilkka J. T. 2011. Vasta-ainevälitteinen immunitetti. Teoksessa Hedman, Klaus y. (toim.): *Immunologia*. Helsinki: Duodecim. 101–111.

Kersten, Sander 2014. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (7). 919–933.

Kovanen, Petri – Pentikäinen, Markku – Viikari, Jorma 2009. Dyslipidemiat. Teoksessa Välimäki, Matti ym. (toim.): *Endokrinologia*. Helsinki: Duodecim. 799–817, 861–864.

Käypä hoito –suositus 2013. Dyslipidemiat. Verkkodokumentti. <<http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/hoi/hoi50025.pdf>>. Luettu: 25.9.2015.

Li, Yunchao – Teng, Chunbo 2014. Angiopoietin-like proteins 3, 4 and 8: regulating lipid metabolism and providing new hope for metabolic syndrome. *Journal of Drug Targeting* 22 (8). 679–687.

Lipman, Neil S. – Jackson, Lynn R. – Trudel, Laura J. -- Weis-Garcia, Frances 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal* 46 (3). 258–268.

Mahmood, Tahrin – Yang, Ping-Chang 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 4 (9). 429–434.

Mantzoros, Christos S. – Magkos, Faidon – Brinkoetter, Mary – Sienkiewicz, Elizabeth – Dardeno, Tina A. – Kim, Sang-Yong – Hamnvik, Ole-Petter R. – Koniaris, Anastasia. 2011. Leptin in human physiology and pathophysiology. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 301 (4). E567–E584.

Mutanen, Marja – Voutilainen, Eeva. 2012. Energiaravintoaineet, ravintokuitu ja alkoholi. Teoksessa Aro, Antti ym. (toim.): *Ravitsemustiede*. Helsinki: Duodecim. 49–59.

Niemelä, Onni – Pulkki, Kari 2010. *Laboratoriolääketiede, Kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Nordestgaard, Børge G. – Chapman, John M. – Ray, Kausik – Borén, Jan – Andreotti, Felicita – Watts, Gerald F. – Ginsberg, Henry – Amarenco, Pierre – Catapano Alberico

– Descamps, Olivier S. – Fisher, Edward – Kovanen, Petri T. – Jan Albert Kuivenhoven, Jan Albert – Lesnik, Philippe – Masana, Luis – Reiner, Zeljko – Taskinen, Marja-Riitta – Tokgo˘ zoglu, Lale – Tybjærg-Hansen, Anne 2010. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *European Heart Journal* 31. 2844–2853.

Nordestgaard, Børge G. – Varbo, Anette 2014. Triglycerides and cardiovascular disease. *The Lancet* 384 (9943). 626-635.

Oike, Yuichi – Yasunaga, Kunio – Sudaa, Toshio 2004. Angiopoietin-Related/Angiopoietin-Like Proteins Regulate Angiogenesis. *International Journal of Hematology*. 80. 21–28.

Rader, Daniel J – Hovingh, G Kees 2014. HDL and cardiovascular disease. *The Lancet* 384 (9943). 618–625.

Ruskoaho, Heikki 2014. Dyslipidemia ja niiden hoitotavoitteet. Teoksessa Pelkonen, Olavi ym. (toim.): *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. Helsinki: Duodecim. 427–445

Robriuc, Marius R. – Maranghi, Marianna – Lahikainen, Anna – Rader, Daniel – Bensadoun, Andre – Öörni, Katariina – Metso, Jari – Minicocci, Ilenia – Ciociola, Ester – Ceci, Fbrizio – Mantali, Anna – Arca, Marcello – Ehnholm, Christian – Jauhiainen, Matti 2013. Angptl3 Deficiency Is Associated With Increased Insulin Sensitivity, Lipoprotein Lipase Activity and Decreased Serum Free Fatty Acids. *Journal of the American Heart Association. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 33. 1706–1713.

Sans, Olav – Sjaastad, Oystein V. – Haug, Elig – Bjålie, Jan G. – Toverud, Kari C. 2012. *Ihminen, Fysiologia ja anatomia*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Santulli, Gaetano. 2014. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Frontiers in Endocrinology* 5. 1–4.

Tabas, Ira -- Williams, Kevin J. – Jan Borén, Jan. 2007. Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis. *Circulation American Heart Association* 116. 1832-1844.

THL 2015. Kotisivut. <www.thl.fi>. Luettu 3.2.2015.

Thomas, Markus – Augustin, Hellmut G. 2009. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12. 125–137.

Tseng, Yi-Hsin – Yeh, Yung-Hsin – Chen, Wei-Jan – Lin, Kwang-Huei 2014. Emerging Regulation and Function of Betatrophin. *International Journal of Molecular Science* 15 (12). 23640–23657.

Umamoto, Tomio – Han, Chang Yeop – Mitra, Poulami – Averill, Michelle M. – Tang, Chongren – Goodspeed, Leela – Omer, Mohamed – Subramanian, Savithan – Wang, Shari – Den Hartigh, Laura J. – Wei, Hao – Kim, Eung Ju – Kim, Jinkyu – O’Brien, Kevin D – Chait, Alan 2013. Apolipoprotein A-I and HDL Have Anti-Inflammatory Effects on Adipocytes via Cholesterol Transporters: ATP-Binding Cassette (ABC) A-1, ABCG-1 and Scavenger Receptor B-1(SRB-1). *Circulation Research* 112 (10). 1345–1354.

Uniprot 2015. Maailmanlaajuinen proteiinitietokanta. <www.uniprot.org>. Luettu 27.10.2015

Quagliarini, Fabiana – Wang, Yan – Kozlitina, Julia – Grishin, Nick V. – Hyde, Rhonda – Boerwinkle, Eric – Valenzuela, David M. – Murphy, Andrew J. – Cohen, Jonathan C. – Hobbs, Helen H. 2012. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (48). 19751– 19756.

Wang, Yang – Quagliarini, Fabiana – Gusarova, Viktoria – Gromada, Jesper -- Valenzuela David M. – Cohen, Jonathan C. – Hobbs, Helen H. 2013. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (40). 16109–16114.

WHO 2015. Cardiovascular diseases (CVDs). Verkkodokumentti.
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Luettu 1.11.2015.

Yi, Peng – Park, Ji-Sun – Melton, Douglas A. 2013. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic β cell proliferation. *Cell* 153 (4). 747–758.

Zang, Cheng Cheng – Kaba, Megan – Iizuka, Satoru – Huynh, HoangDinh – Lodish, Harvey F. 2008. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* 111 (7). 3415–3423.

Zang, Ren 2012. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424. 786–792.

ANGPTL8:n ELISA-työohje

4.11.2015

Ella Saarsola

ANGPTL8-ELISA

Laitteet:	Kuoppalevyn pesulaite (WellWash AC, Thermo Fisher Scientific) Kuoppalevyspektrofotometri (Enspire Multimode Plate Reader, PerkinElmer)
Reagenssit:	Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃ Fosfaattipuskuroitu NaCl (PBS, Phosphate buffered saline), pH 7,4 Tween 20 (Sigma) Naudan seerumin albumiini (BSA. Bovine serum albumin) Sitruunahappo Na ₂ HPO ₄ H ₂ O ₂ H ₂ SO ₂ 10 mg o-polyetyleenidiamiini tabletti (Sigma)
Vasta-aineet:	R355, immunisaatio 7, IgG (3,82mg/ml) R360, immunisaatio 3, IgG, HRP-leimattu
Puskurit:	Pinnoitus: 0,05M Na ₂ CO ₃ – NaHCO ₃ , pH 9,6 Peittäminen: PBS – 0,5% BSA - 0,1% Tween 20 Laimennus: PBS- 0,5% BSA – 0,5% Tween 20 Pesu: PBS – 0,5% Tween 20 Substraatti: 6,25 ml 0,1 M sitruunahappo 6,25 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ 12,5 ml H ₂ O 10 mg o-polyetyleenidiamiini tabletti 10 µl H ₂ O ₂

Menetelmä

1. Pinnoitus

Kahteen ensimmäiseen kaivoon lisätään 200 µl pinnoituspuskuriä (-coat).
Primaarinen vasta-aine R355 laimennetaan pinnoituspuskuriin 2µg/kuoppa ja laimennosta pipetoidaan 200 µl/kuoppa.
Kuoppalevy peitetään kalvolla ja inkuboidaan yön yli jääkaapissa +4 °C.
Pesu 4 x 350 µl pesupuskurilla.

2. Peittäminen

Lisätään pinnoituspuskuriä 200 µl/kuoppa.
Inkuboidaan huoneenlämmössä kalvolla peitettynä 1 tunti.
Pesu 4 x 350 µl pesupuskurilla.

3. Standardit ja näytteet

Lisätään laimennosliuosta 6 ensimmäiseen kuoppaan (2 x –coat ja 4 x +coat).
Standardisuora laimennetaan laimennospuskuriin seuraavasti:
1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32.
Standardisuoran näytteet pipetoidaan rinnakkaisina.
Laimennettuja standardeja ja näytteitä pipetoidaan 200 µl/kuoppa.
Inkuboidaan jääkaapissa +4 °C:ssa 1 tunti kalvolla peitettynä.
Pesu 4 x 350µl pesupuskurilla.

4. HRP-leimattu R360-vasta-aine

HRP-leimattu R360-vasta-aine laimennetaan laimennospuskurilla 1:500.
Lisätään kaikkiin kuoppiin 200 µl.
Seisotetaan 1 tunti huoneenlämmössä kalvolla peitettynä.
Pesu 4 x 350 µl pesupuskurilla.

5. Värireaktio

Substraatti tehdään juuri ennen pipetointia.
Lisätään substraattipuskuriä 200 µl/kuoppa.
Kuoppalevy peitetään foliolla ja annetaan värireaktion edetä 20–25 minuuttia.
Reaktio pysäytetään lisäämällä 3M rikkihappoa 50 µl/kuoppa.
Mitataan absorbanssi 490 nm.