

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Én skreddersydd immunocapture-LC-MS/MS-metode for diagnose av småcellet lungekreft

Multipleksing og differensiering av ProGRP- og NSE-varianter

Maren Christin Stillesby Levernæs



Avdelingen for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2013

Én skreddersydd immunocapture-LC-MS/MS-metode for diagnose av småcellet lungekreft

Multipleksing og differensiering av ProGRP- og NSE-varianter

Maren Christin Stillesby Levernæs

Masteroppgaven ble utført ved faggruppen for Legemiddelanalyse

Avdelingen for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

i perioden februar 2012 til mai 2013

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Silje Bøen Torsetnes, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

© Maren Christin Stillesby Levernæs

2013

Én skreddersydd immunocapture-LC-MS/MS-metode for diagnose av småcellet lungekreft

Multipleksing og differensiering av ProGRP- og NSE-varianter

Maren Christin Stillesby Levernæs

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Tiden som masterstudent har vært veldig interessant og utrolig lærerik. Disse siste 16 månedene er nok de jeg vil huske aller best fra studietiden og jeg håper at denne oppgaven vil sette et verdig punktum for fem fantastiske år på Farmasøytisk Institutt.

Alle klager over hvor hardt og vanskelig det er å skrive master og hvor utrolig lei de er, men jeg kan overhodet ikke si meg enig. Dette takket være mine fantastiske, engasjerte og inspirerende veiledere Silje, Léon og Trine. Tusen takk for all hjelp med store og små problemer både med labarbeid, presentasjoner, poster og skrivningen av denne oppgaven. En spesiell takk til Silje for god tålmodighet, mange lange dager på lab, faglige og ufaglige pauser, treningstimer og nye utfordringer. Dette har jeg satt utrolig stor pris på.

Til mine kjære medstudenter, Moheba og Thanh, tusen takk for et hyggelig år! Det har vært veldig koselig å dele kontor og bli bedre kjent med dere.

Til alle på avdelingen for legemiddelanalyse, dere er en fantastisk gjeng! Tusen takk for et inkluderende og godt arbeidsmiljø, hyggelige lunsjpauser, flotte fredags- og publikasjonskaker, og mye moro både på hyttetur i Nordmarka og på konferansen i Hafjell. Jeg kommer til å savne dere!

Til min beste venninne de siste fem årene, Jenny, tusen takk for faglige og ufaglige stunder fylt med mye latter og ofte også mye hardt arbeid. Takk for gode råd og korrekturlesing av masteroppgaven.

Til slutt vil jeg bare beklage ovenfor familie og venner som har sett ytterst lite til meg de siste 16 månedene. Tusen takk for god støtte og oppmuntrende ord.

Oslo, mai 2013

Maren Levernæs

Sammendrag

Småcellet lungekreft er den mest aggressive formen for lungekreft med en overlevelsesrate på mindre enn 5 % etter 5 år. Sykdommen responderer imidlertid godt på behandling hvis initiert på et tidlig stadium. Det er derfor viktig å utvikle gode diagnostiske verktøy som tillater tidlig diagnose og behandlingsmonitorering. Sammen med røntgen og CT-scanning kan bruk av spesifikke og sensitive biomarkører for småcellet lungekreft bidra til dette.

Neuronspesifikk enolase (NSE) er den mest etablerte biomarkøren for småcellet lungekreft. Samtidig bestemmelse av progastrinfrigjørende peptid (ProGRP), som er en lovende biomarkør for differensiert diagnose av småcellet lungekreft, vil være mer nøyaktig da ProGRP viser høyere sensitivitet og spesifisitet enn NSE. Begge proteinene bestemmes i dag separat ved bruk av immunometriske metoder. Disse metodene er imidlertid utsatt for kryssreaktivitet som kan resultere i falske positive og -negative resultater, i tillegg til at de ikke skiller mellom de ulike isoformene av proteinene.

Hensikten med denne oppgaven var å fusjonere to tidligere utviklede validerte metoder for deteksjon av ProGRP og NSE til én enkelt metode uten å påvirke resultatene som metodene gir separat. Begge metodene involverer immunoaffinitetsekstraksjon og "bottom-up" LC-MS/MS-analyse. En metode som tillater samtidig bestemmelse av ProGRP-isoformer og NSE-isoenzymer, vil være en arbeidsbesparende metode som tillater differensiert bestemmelse av to komplementære biomarkører for småcellet lungekreft.

For å evaluere den nye metoden ble det i denne oppgaven utført en grundig sammenligning av den fusjonerte metoden og de separate metodene. Forsøkene som vil bli presentert viser at de endrede forholdene ved fusjoneringen fortsatt gir god reproduserbarhet og utbytte. Forsøkene viser følgende effekter av endrede forhold; 1) det relative utbyttet av de respektive markørene ble ikke påvirket ved addisjon av ulike magnetiske kuler til varierende spikede løsninger, 2) reduksjon, varme og alkylering før tryptisk proteolyse ga økt signalintensitet for samtlige signaturpeptider sammenlignet med ingen pre-tryptisk behandling, 3) ProGRP- og NSE-konsentrasjoner ble sammenlignet ved varierende konsentrasjon av den andre markøren der en uparet *t*-test viste ingen signifikant forskjell i målt signalintensitet som tilsier at ProGRP- og NSE-konsentrasjoner kan bestemmes uavhengig av hverandres konsentrasjon, 4) kalibreringskurver for samtlige signaturpeptider ble harmonisert i serum hvilket tillater samtidig bestemmelse av ukjente ProGRP- og NSE-konsentrasjoner i pasientprøver.

Sammendrag

Vellykket fusjon av de to metodene for ProGRP og NSE, inkludert deres isoformer og isoenzymer, viser at metoden gir pålitelig bestemmelse og differensiering av klinisk relevante nivåer av to etablerte, komplementære biomarkører for småcellet lungekreft. Ved analyse av pasientprøver med den fusjonerte metoden ble resultatene funnet sammenfallende med eksisterende immunometriske assays og dette bekrefter at metoden kan være et egnet diagnoseverktøy for småcellet lungekreft.

Forkortelser

ABC	Ammoniumbikarbonat
ACN	Acetonitril
BSA	Bovint serumalbumin
CEA	Carcinoembryonic antigen
CID	Kollisjonsindusert dissosiasjon (Collision induced dissociation)
CNS	Sentralnervesystemet (Central nervous system)
CT	Computertomografi (Computed tomography)
CYFRA 21-1	Cytokeratin fragment 21-1
DNA	Deoksyribonukleinsyre (Deoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-ditiotretiol
ELISA	Enzymkoblet immunoassay (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ESI	Elektronsprayionisering (Electrospray ionization)
GRP	Gastrinfrigjørende peptid (Gastrin-releasing peptide)
GRPR	Gastrinfrigjørende peptidreseptor (Gastrin-releasing peptide receptor)
HPLC	Væskekromatografi (High-performance liquid chromatography)
IAA	2-jodeddiksyre (Iodoacetic acid)
IS	Intern standard (Internal standard)
L	Liter
LC	Væskekromatografi, (Liquid chromatography)
LC-MS/MS	Væskekromatografi tandem massespektrometri (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry)
LLOQ	Nedre kvantifiseringsgrense (Lower limit of quantification)
LOD	Deteksjonsgrense (Limit of detection)
mAb	Monoklonalt antistoff (Monoclonal antibody)
mL	Milliliter

Forkortelser

mM	Millimolar
MSE	Muskelspesifikk enolase (Muscular specific enolase)
mRNA	Messenger ribonukleinsyre (messenger Ribo Nucleic Acid)
MS	Massespektrometri (Mass Spectrometry)
MS/MS	Tandem massespektrometri (Tandem Mass Spectrometry)
m/z	masse/ladning (mass/charge)
n	Antall paralleller
NF	Ikke detektert (Not found)
ng	Nanogram
NMBR	Neuromedin B reseptor
NNE	Ikke-neuronspesifikk enolase (Non-neuron specific enolase)
NSCLC	Ikke-småcellet lungekreft (Non Small Cell Lung Cancer)
NSE	Neuronspesifikk enolase (Neuron specific enolase)
P	P-verdi (angir sannsynlighet)
PBS	Fosfatbufret salin
pM	Pikomolar
ProGRP	Progastrinfrigjørende peptid (Progastrin-releasing peptide)
PTM	Posttranslasjonelle modifikasjoner (Post translational modifications)
QqQ	Trippel quadrupol
Q1	Den første masseanalysatoren i en trippel quadrupol
q2	Kollisjonscellen i en trippel quadrupol
Q3	Den tredje masseanalysatoren i en trippel quadrupol
Q-TOF	Quadrupol Time-of-flight
r^2	Regresjonskoeffisient
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsyre (Ribo Nucleic Acid)
rpm	Omdreining per minutt (Revolutions per minute)

RSD	Relativt standardavvik (Relative standard deviation)
SCLC	Småcellet lungekreft (Small Cell Lung Cancer)
SIM	Selektiv ionemonitorering (Selected ion monitoring)
SRM	Selektiv reaksjonsmonitorering (Selected reaction monitoring)
TR-IFMA	Time-resolved immunofluorometric assay
Tris-HCl	Tris-buffer
μL	Mikroliter

Innholdsfortegnelse

Forord	5
Sammendrag	7
Forkortelser	9
Innholdsfortegnelse	13
1 Introduksjon	15
1.2 Hensikt med oppgaven	15
2 Bakgrunn	17
2.1 Proteomikk	17
2.1.1 Biomarkører for kreft	17
2.2 Småcellet lungekreft	18
2.3 Proteinmarkører for småcellet lungekreft	18
2.3.1 Neuronspesifikk enolase	18
2.3.2 Progastrinfrigjørende peptid.....	20
2.4 Deteksjon av ProGRP og NSE i dag	22
2.5 Prøveopparbeidelse fra biologiske matrikser	23
2.5.1 Immunoaffinitetsekstraksjon	23
2.5.2 Enzymatisk proteolyse	24
2.6 Deteksjon av peptider ved bruk av LC-MS/MS	26
2.6.1 Væskekromatografi	26
2.6.2 Elektronspray ionisering.....	26
2.6.3 Massespektrometri	27
2.6.4 Fragmentering	29
3 Materialer	31
3.1 Kjemikalier, proteiner og utstyr	31
3.2 Tillaging av løsninger	34
3.2.1 Løsninger til immunoekstraksjon	35
3.2.2 Løsninger til trypsinering	35
3.2.3 Løsninger for tillaging av intern standard	36
3.2.3 Mobilfaser	37
4 Metoder	39
4.1 Prøveopparbeidelse av NSE og ProGRP fra serum	39
4.1.1 Vask av magnetiske kuler.....	39
4.1.2 Immunoekstraksjon	39

Innholdsfortegnelse

4.1.3 Trypsinering	40
4.1.4 Klargjøring av prøver for analyse.....	40
4.2 LC-MS/MS-analyse av ProGRP og NSE	41
4.2.1 HPLC-parametere	41
4.2.2 MS-parametere	43
5 Resultater og diskusjon	47
5.1 Fusjon av to validerte metoder	47
5.1.1 Innledende forsøk	47
5.1.2 Blir ekstraksjonsutbyttet av ProGRP påvirket ved addisjon av magnetiske kuler "coated" med anti-NSE (mAbE21) og vice versa?.....	49
5.1.3 Hva er effekten av denaturering gjennom varme, reduksjon og alkylering på bestemmelsen av ProGRP og NSE?.....	54
5.1.4 Kan ProGRP- og NSE-konsentrasjoner bestemmes nøyaktig uavhengig av hverandres konsentrasjon?.....	59
5.1.5 Hvordan harmonisere kalibreringskurve for begge metodene?.....	62
5.2 Analyse av pasientprøver	64
6 Konklusjon	69
Referanser	71

1 Introduksjon

Lungekreft er en av de vanligste kreftsykdommene og deles inn i to hovedformer basert på størrelse og malignitet av cellene involvert i sykdomsutviklingen: småcellet (SCLC) og ikke-småcellet lungekreft (NSCLC) [1]. Av disse er småcellet lungekreft den mest aggressive formen med en overlevelsrate på mindre enn 5 % etter 5 år [2, 3]. Tidlig diagnose er essensielt da sykdommen er meget sensitiv for kjemoterapi eller radioterapi hvis dette initieres på et tidlig stadium [1, 3, 4]. Det er derfor viktig å utvikle gode diagnostiske verktøy som kan gi tidlig diagnose og god behandlingsmonitorering. Sammen med røntgen og CT-scanning kan identifikasjon av spesifikke og sensitive biomarkører for småcellet lungekreft bidra til dette [2].

Flere biomarkører har blitt detektert i økte konsentrasjoner i blodet ved småcellet lungekreft [2-5]. Av disse er neuronspesifikk enolase (NSE) den mest etablerte i klinikken hvor den brukes innen terapimonitorering og prognosevurdering [4, 6, 7]. Samtidig bestemmelse med en annen lovende markør for differensiert diagnose av småcellet lungekreft, progastrinfrigjørende peptid (ProGRP), vil være mer nøyaktig da ProGRP har vist høyere sensitivitet og spesifisitet enn NSE [2, 4, 8, 9]. Markørene bestemmes i dag separat ved bruk av immunometriske metoder [10, 11]. Disse metodene er sensitive, effektive og enkle, men de er også utsatt for kryssreaktivitet og kan gi falske positive og -negative resultater [12-14].

Absolutt kvantifisering av proteiner fra biologiske matrikser ved bruk av væskekomatografi (LC) koblet til tandem massespektrometri (MS/MS) blir stadig mer utbredt [15-17]. Bruk av immunocapture-LC-MS/MS kan eliminere flere av utfordringene forbundet med de immunometriske metodene. I tillegg gir en slik metode muligheten til å måle flere analytter i samme analyse samt å differensiere mellom ulike isoformer og isoenzymer av proteinene.

1.2 Hensikt med oppgaven

Målet med denne oppgaven er å fusjonere to tidligere validerte metoder til én enkelt metode uten at det går utover det de enkelte metodene kan prestere alene. Metodene utviklet av Silje Bøen Torsetnes *et al.* baserer seg på immunoaffinitetsekstraksjon og "bottom-up" LC-MS/MS, og disse har vist at såkalt immunocapture-LC-MS/MS-bestemmelse av proteinmarkørene ProGRP og NSE er mulig. I tillegg muliggjør metodene individuell bestemmelse av definerte varianter av markørene, såkalte ProGRP-isoformer og NSE-isoenzymer, hvilket kan være av betydning for differensiert diagnose av småcellet lungekreft. Én metode som tillater samtidig bestemmelse av ProGRP-isoformer og NSE-

1 Introduksjon

isoenzymer, vil være en arbeids- og prøvemateriellbesparende metode som tillater differensiert bestemmelse av to komplementære biomarkører for småcellet lungekreft.

For å kunne gjøre dette ble følgende delmål ble satt opp:

- Fusjonere og optimalisere de to metodene til en multipleks metode.
 - Påvirkes ekstraksjonsutbytte ved addisjon av magnetiske kuler med andre antistoff?
 - Hva er effekten av denaturering gjennom varme, reduksjon og alkylering etter ekstraksjon og før tryptisk proteolyse?
 - Kan ProGRP og NSE bestemmes uavhengig av hverandres konsentrasjon?
 - Hvordan harmonisere kalibreringskurve for markørvariantene for ProGRP og NSE?
- Analysere pasientprøver for å teste metoden mot to etablerte immunbaserte assays.

2 Bakgrunn

2.1 Proteomikk

Proteomikk er et voksende forskningsområde som involverer identifikasjon, karakterisering, og kvantifisering av proteiner i en celle, et vev, eller en kroppsvæske [18]. Videre innebærer proteomikk kartlegging av proteinuttrykk, identifikasjon av proteiner og deres modifikasjoner, og karakterisering av proteininteraksjoner. Sistnevnte baseres på kunnskap om proteinenes struktur og funksjonelle relasjoner med individuelle proteiner eller alle proteiner i cellen, organet eller organismen [19].

Et av målene innenfor proteomikk er å identifisere proteinforandringer assosiert med utvikling av sykdom, som for eksempel kreft [18, 20]. Det er imidlertid vanskelig å identifisere spesifikke biomarkører fra proteomet fordi det er ekstremt komplekst og dynamisk. Proteomet er det tids- og celledoesifikke proteinkomplementet til genomet. Det omfatter alle proteiner uttrykt i en celle på et gitt tidspunkt, inkludert isoformer, ko- og posttranslasjonelle modifikasjoner (PTM) [18-20]. For å fullstendig forstå proteomet er det nødvendig med fullstendig proteinkarakterisering [18].

2.1.1 Biomarkører for kreft

Den enkleste definisjonen av en biomarkør er et molekyl som indikerer en fysiologisk forandring fra normalen. En mer praktisk definisjon av en biomarkør avhenger av den kliniske betydningen av molekylet [21]. Biomarkører kan derfor defineres som en gruppe biologiske analytter som kan brukes til sykdomsprediksjon og -deteksjon, skille ulike celletyper, monitorering av behandlingsrespons, og terapeutisk monitorering [18, 20-22].

De fleste kjente kliniske biomarkører er proteiner, og proteomikk er derfor mye brukt i oppdagelsen av nye biomarkører. Det er mest vanlig å lete etter potensielle biomarkører i biologiske væsker som blod, spytt, og cerebrospinalvæsken, da disse inneholder informasjon om proteiner fra en rekke organer og disse kan reflektere ulike sykdomstilstander [18, 22].

Den dynamiske naturen til sirkulasjonssystemet og dets komponenter reflekterer ulike fysiologiske eller patofysiologiske tilstander. Blodkomponenter som indikerer kreft inkluderer en rekke cellulære elementer som sirkulerende kreftceller, fritt DNA og RNA, proteiner, peptider og metabolitter [23]. Målet med å identifisere biomarkører for kreft er å utvikle enkle tester som kan indikere risiko for kreft. Dette vil tillate tidlig oppdagelse og diagnostisering av kreft, noe som er viktig for tilrettelagt behandling for den enkelte pasient. Videre vil det tillate monitorering av sykdommens progresjon, regresjon og oppdagelse av eventuelle tilbakefall [2, 7, 23].

2.2 Småcellet lungekreft

Lungekreft omfatter enhver unormal cellevekst i lungevev. Lungekreft deles inn i to grupper basert på størrelse og malignitet av cellene involvert i kreftutviklingen; småcellet lungekreft (SCLS) og ikke-småcellet lungekreft (NSCLC) [1]. Småcellet lungekreft kjennetegnes av små celler, begrenset nivå av cytoplasma, en kjerne uten kjernelegeme, høy grad av mitose og hyppig nekrotisering [3]. Småcellet lungekreft er den mest aggressive varianten, og har en overlevelseshastighet på mindre enn 5 % etter 5 år [2, 3]. Den lave overlevelseshastigheten skyldes for sen diagnose. Diagnosen stilles på grunnlag av røntgen og CT-scanning og på dette tidspunktet har de fleste pasientene utviklet fjerne metastaser i regionale lymfeknuter eller organer (kalt "elevated disease"). Tidlig diagnose er derfor essensielt da småcellet lungekreft responderer godt på kjemoterapi eller radioterapi hvis det initieres på et tidlig tidspunkt (kalt "limited disease") [1, 3, 4].

Sammen med røntgen og CT-scanning kan identifikasjon av sensitive og spesifikke biomarkører for småcellet lungekreft føre til tidligere screening og eventuell initiering av behandling [2]. Identifiserte biomarkører for lungekreft inkluderer CEA, CYFRA 21-1, NSE and ProGRP [2-5].

2.3 Proteinmarkører for småcellet lungekreft

Neuronspesifikk enolase, NSE, er den mest etablerte biomarkøren for småcellet lungekreft og brukes innen terapimonitorering og prognosevurdering [4, 6, 7]. NSE har imidlertid lav sensitivitet for småcellet lungekreft, spesielt hos pasienter med "limited disease" [4]. Samtidig deteksjon med progastrinfrigjørende peptid, ProGRP, som er en lovende biomarkør for differensiert diagnose av småcellet lungekreft, vil være mer nøyaktig da ProGRP viser høyere sensitivitet og spesifisitet enn NSE [2, 4, 8, 9]. Videre har ProGRP vist signifikant høyere verdier ved ren småcellet lungekreft, sammenlignet med småcellet eller storcellet lungekreft, mens NSE ikke viser signifikant forskjell mellom de ulike SCLC-subtypene [8].

2.3.1 Neuronspesifikk enolase

Enolase, eller 2-fosfo-D-glycerat hydrolase, ble først oppdaget i 1934 av Lohman og Mayerhof [24]. Det uttrykkes av tre ulike gener som hver gir opphav til et 434 aminosyrer langt isoenzym. α -enolase, eller ikke-neuronspesifikk enolase (NNE), finnes i de fleste vev og i gliaceller i nervevev. β -enolase, eller muskelspesifikk enolase (MSE), forekommer i skjelettmuskel, mens γ -enolase, eller neuronspesifikk enolase (NSE), finnes i neuroner og neuroendokrine vev [24-30].

Tabell 2.1 – Oversikt over hva de ulike enolasene inneholder.

Navn	Isoenzymer	Tilstedeværelse
NNE	$\alpha, \alpha\alpha$	De fleste vev og gliaceller i nervevev
NSE	$\alpha\gamma, \gamma\gamma, \gamma$	Neuroner og neuroendokrine vev
MSE	$\beta, \beta\beta$	Skjelettmuskel

Uttrykket av genene som koder for enolase varierer med patofysiologiske, metabolske, og utviklingstilstander i cellene [24]. α -enolase er det isoenzymet som er mest uttrykt i fosterutviklingen [24, 25]. Omdannelse av isoenzymet skjer samtidig med terminal differensiering i neuroner og skjelettmuskel, fra α -enolase til henholdsvis γ - og β -enolase [25, 26].

Enolase er et glykolytisk nøkkelenzym som katalyserer dehydrering av 2-fosfoglyserat til fosfoenolpyruvat, i det siste trinnet i glykolysen [6, 26, 28-31]. Det er et metallenzym som krever metallionet magnesium for å være katalytisk aktivt [24]. Det aktive enzymet er en dimer bestående av ikke-kovalent bundne subenheter, men de kan også danne heterodimere [24, 28, 29, 32]. NSE omfatter isoenzymene $\alpha\gamma$, $\gamma\gamma$ og γ [32, 33]. Aminosyresekvensen til γ - og α -subenheten er vist i henholdsvis figur 2.1 og 2.2.

α -enolase spiller også en viktig rolle i mange andre biologiske og patofysiologiske prosesser. Det har blitt detektert på overflaten av blodkreftceller slik som monocytter, T- og B-celler, nerveceller og endotelceller, som en sterk plasminogen reseptor som modulerer pericellulær fibrinolytisk aktivitet [24, 31].

Forhøyede konsentrasjoner av α - og γ -enolase i plasma er blitt observert hos pasienter med ulike typer kreft med neuroendokrine egenskaper, som neuroblastoma og lungekreft. Enolase har derfor blitt vurdert som en potensiell diagnostisk markør for mange krefttilstander [6, 24, 28]. Gjennom rollen som en plasminogen reseptor på kreftcellene, virker enolase som et nøkkelprotein ved å fremme cellulær metabolisme ved anaerobe forhold. Denne aktiveringen av plasminogen og degradering av ekstracellulær matriks bidrar til tumorutvikling [24].

MSIEKI W ARE	ILDSRGNPTV	EVDLYT A KGL	FRAAVPSGAS	TGIYEAL E LR	DGDK Q RYLGK
GVLK A VDHIN	STIAPAL I SS	GLSVVEQ E KL	DNLM L ELDGT	ENKSKFGANA	ILGVSLAV C K
AGAA E RELPL	YRHIA Q LAGN	SDLILP V PAF	NVINGGSHAG	NKLAMQEFMI	LPVGA E SFRD
AMRLGAEV Y H	TLKG V IKDKY	GKDATNVGDE	GGFAPNILEN	S EAL E LVKEA	I DKAGY T EKI
VIGMDVA A SE	FYRDGKYDLD	FKSPTDPSRY	I TGD Q L G ALY	Q DFV R DYPVV	SIEDPFDQDD
WAAWSK F TAN	VGIQIVGDDL	TVTNP K RIER	AVEEK A CNCL	LLKVNQIGSV	TE A I Q ACKLA
QEN G WGVMVS	HRSGETEDTF	IADLVVGLCT	GQIKTGAPCR	SERLAKYNQL	M RI E EEL G DE
A RFAG H NFRN	P SVL				

Figur 2.1 – Aminesyresekvensen til γ -enolase [34]. Uthevede bokstaver angir aminosyrer som skiller seg fra aminosyresekvensen til α -enolase.

MSIL K I H ARE	IFDSRGNPTV	EVDL F T S KGL	FRAAVPSGAS	TGIYEAL E LR	D N DKTRY M GK
G V SKAVEHIN	KT I APAL V SK	K LN V TEQEKI	DKLMI E MDGT	ENKSKFGANA	ILGVSLAV C K
AGAVE K G V PL	YRHIA D LAGN	SEVILP V PAF	NVINGGSHAG	NKLAMQEFMI	LPVGA A N F RE
AMRIGAEV Y H	N L K N V IK E KY	GKDATNVGDE	GGFAPNILEN	K E G L E LL K T A	I G K AGY T DK V
VIGMDVA A SE	FFRS G KYDLD	FKSP D DPSRY	I SP D Q L ADLY	K S F IKDYPVV	SIEDPFDQDD
WGA W QKFTAS	AGIQVVGDDL	TVTNP K RIAK	AVNEK S CNCL	LLKVNQIGSV	TES L QACKLA
Q A NGWGVMVS	HRSGETEDTF	IADLVVGLCT	GQIKTGAPCR	SERLAKYNQL	L RI E EEL G SK
A K F AG R NFRN	P LA K				

Figur 2.2 – Aminesyresekvensen til α -enolase [35]. Uthevede bokstaver angir aminosyrer som skiller seg fra aminosyresekvensen til γ -enolase.

2.3.2 Progastrinfrigjørende peptid

Gastrinfrigjørende peptid (GRP), som normalt isoleres fra magesekk fra svin, er et bombesinlignende peptid bestående av 27 aminosyrer [8, 9, 36-38]. Karboksyl-terminal dekaeptidet er identisk med bombesin, med unntak av én aminosyre, og denne strukturlikheten gir opphav til de lignende biologiske aktivitetene [9, 36, 37, 39].

Studier av GRP-immunoreaktivitet, samt deres mRNA, viser at disse peptidene er vidt distribuert til sentralnervesystemet og perifere vev, spesielt i gastrointestinaltrakten [8, 36, 40]. I gastrointestinaltrakten finnes GRP hovedsakelig i det enteriske nervesystemet, med de høyeste konsentrasjonene i tykk- og tynntarmen. I sentralnervesystemet er GRP høyest distribuert i neuroner, med høye nivåer i forhjernen og hypotalamus, samt i sensoriske kjerner [36]. I lungene er GRP uttrykt i bronkialt epitel [9].

GRP bidrar til en rekke farmakologiske og biologiske responser, inkludert stimulering av gastrointestinal og urogenital peristaltikk ved kontraksjon av glatte muskelceller [9, 36, 37, 41, 42], sekresjon av magesyre, pankreassyre, gastrin- og pankreashormoner [9, 36, 37, 41], regulering av CNS-effekter som døgnrytme, temperaturregulering og ulike faktorer relatert til oppførsel [9, 36, 41, 42], og profilering av pankreas [37] og lungene [9].

GRP kan bidra til metastasering av småcellet lungekreft ved å virke som en autokrin vekstfaktor gjennom binding til bombesinlignende peptidreseptorerer som gastrinfrigjørende peptidreseptor (GRPR), neuromedin B reseptor (NMBR), eller bombesin reseptor subtype 3 [8, 9, 36, 37, 40, 42, 43]. I tillegg antyder enkelte studier at GRP produseres i cellene ved småcellet lungkreft [5, 8, 39] og at dette hormonet derfor kan være av betydning for monitoreringen av disse pasientene [8]. Det er imidlertid vanskelig å bestemme konsentrasjonen av GRP i serum da hormonet har en halveringstid på ca. 2 minutter. Progastrinfrigjørende peptid (ProGRP), som er forløper for GRP, er mer stabil og brukes derfor som en spesifikk biomarkør for småcellet lungekreft [8].

GRP-genet koder for et 148 aminosyrer langt forløperpeptid, preproGRP (-23 til 125), som består av en N-terminal signalsekvens (-23 til -1), GRP-sekvensen (1-27), og et C-terminal forlengende peptid (31-125) [38, 43]. Genet består av tre eksoner, og er lokalisert på kromosom 18q21 [9, 39, 43]. Alternativ splicing av disse resulterer i tre forskjellige mRNA, som skilles ved at de koder for ulike aminosyrer, 98-125 [39, 43]. Dette gir opphav til tre varianter av forløperproteinet ProGRP (figur 2.3) [38-40, 43, 44]. Den lengste ProGRP-isoformen dannes fra preproGRP ved kløyving av N-terminal signalsekvensen og kalles isoform 1 (1-125), kjeden uten base 21 kalles isoform 2 (1-118), og kjeden uten base 19 kalles isoform 3 (1-115) [9, 40, 43, 44]. Disse peptidene er relativt stabile i serum sammenlignet med neuropeptidet GRP, og de brukes derfor som biomarkører [40, 44].

Isoform 1:					
MRGRELPLVL	LALVLCLAPR	GRAVPLPAGG	GTVLTKMYPR	GNHWAVGHLM	GKKSTGESSS
VSERGSLKQQ	LREYIRWEEA	ARNLLGLIEA	KENRNHQPPQ	PKALGNQQPS	WSEDSSNFK
DVGSKGKVGR	LSAPGSQREG	RNPQLNQQ			
Isoform 2:					
MRGRELPLVL	LALVLCLAPR	GRAVPLPAGG	GTVLTKMYPR	GNHWAVGHLM	GKKSTGESSS
VSERGSLKQQ	LREYIRWEEA	ARNLLGLIEA	KENRNHQPPQ	PKALGNQQPS	WSEDSSNFK
DVGSKGKGSQ	REGRNPQLNQ	Q			
Isoform 3:					
MRGRELPLVL	LALVLCLAPR	GRAVPLPAGG	GTVLTKMYPR	GNHWAVGHLM	GKKSTGESSS
VSERGSLKQQ	LREYIRWEEA	ARNLLGLIEA	KENRNHQPPQ	PKALGNQQPS	WSEDSSNFK
DLVDSLLQVL	NVKEGTPS				

Figur 2.3 – Aminosyresekvensene til ProGRP isoform 1, 2 og 3 [45-47]. Uthevede bokstaver angir hvilke aminosyrer som skiller de ulike isoformene fra hverandre.

2.4 Deteksjon av ProGRP og NSE i dag

Rutinemessig bestemmelse av ProGRP og NSE utføres i dag ved bruk av immunometriske metoder med enzymatisk eller fluorescence deteksjon [10, 11]. Disse metodene (ELISA, RIA, TR-IFMA) er sensitive, effektive og enkle, men det er imidlertid flere utfordringer knyttet til bruken av dem [12-14].

Tester fra ulike produsenter, deklart for samme bruk, gir ofte svært ulike resultater. Dette skyldes gjerne bruk av ulike antistoffer. Det vil derfor være viktig at pasienter monitoreres med de samme betingelsene slik at konsentrasjonsmålingene blir sammenlignbare. Metodene er også utsatt for kryssreaktivitet som kan resultere i falske positive og -negative resultater [48]:

- Endogene immunoglobuliner kan blokkere epitoper av den aktuelle analytten slik at den ikke bindes til assays'ene sine antistoff. Dette vil føre til "falske" lave resultater i "sandwich"-immunometriske assays (ELISA), og "falske" forhøyede resultater i kompetitive radioimmunoassays.
- Endogene uspesifikke eller multispesifikke immunoglobuliner kan dessuten bindes til antistoffene og dette resulterer i "falske" forhøyede og "falske" reduserte resultater i immunometriske assay.
- Antistoffene kan også mettes med analytt (hook effekt), som vil gi "falske" lave resultater i prøver med ekstremt høye analyttkonsentrasjoner.

Bruk av immunocapture-LC-MS/MS kan eliminere mange av de overnevnte utfordringene. Deteksjonsprinsippet for de immunometriske metodene sammenlignet med immunocapture-LC-MS/MS-metoden er ganske forskjellig. De immunometriske metodene baserer seg på "sandwich"-prinsippet med en "catcher" og en "tracer" rettet mot epitoper i proteinet. Immunocapture-LC-MS/MS-metoden baserer seg på "bottom-up"-prinsippet og bruker trypsin kombinert med selektiv prøveopparbeidelse ved bruk av immunoekstraksjon, omvend-fase LC-separasjon og deteksjon ved SRM-MS av proteinspesifikke signaturpeptider. Interfererende immunoglobuliner vil fjernes ved tryptisk proteolyse. Hook effekt vil ikke lenger være noe problem fordi detektorene som brukes i massespektrometri ikke mettes av mengden peptid som kan renses opp av antistoffene, men begrensede mengder antistoff vil kunne føre til at signalet når et platå ved høye konsentrasjoner. Metoden detekterer dessuten spesifikt peptider derivert fra proteinet, ikke epitoper. Forutsatt at man velger analyttderiverte signaturpeptider fri for posttranslasjonelle modifikasjoner og polymorfer, vil signaturpeptidene være representative for mengden protein i prøven og dette vil tillate kalibrering av assays på tvers av laboratorier [48].

2.5 Prøveopparbeidelse fra biologiske matrikser

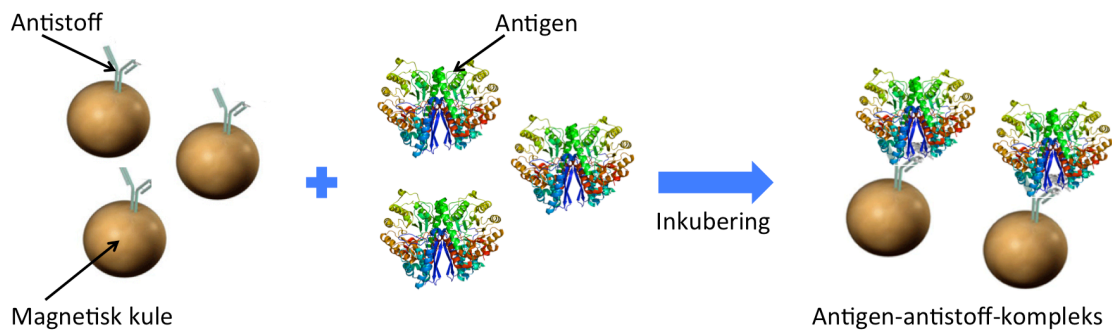
Biologiske matrikser som blod, plasma og urin er komplekse da de inneholder en rekke proteiner, salter og ulike organiske forbindelser. De aktuelle analyttene forekommer ofte i lave konsentrasjoner og det er derfor viktig med gode prøveopparbeidelsesmetoder for å fjerne interfererende substanser (inkludert proteiner, salter og lipider) og samtidig oppkonsentrere analytten [49].

2.5.1 Immunoaffinitetsekstraksjon

Immunoaffinitetsbaserte prøveopparbeidelsesteknikker baserer seg på molekylær gjenkjenning. Disse teknikkene er svært sensitive grunnet den høye affinitets- og selektivitetsinteraksjonen mellom antigen og antistoff [50, 51].

Den største fordelen med immunoaffinitetsbaserte prøveopparbeidelsesteknikker er renheten av de prosesserte prøvene. Grunnet den store betydningen interfererende forbindelser i den biologiske matriksen har på ioniseringen ved ESI, er rene ekstrakter et nøkkeltrinn for suksessfull analyse. Andre kritiske faktorer er analyttkonsentrasjon og begrenset prøvemateriell [52].

Immunoaffinitetsekstraksjon ved hjelp av magnetiske kuler er en svært selektiv prøveopparbeidelsesmetode. Her benyttes det monoklonale antistoffer immobilisert på magnetiske kuler (figur 2.4). Ved Radiumhospitalet er det utviklet monoklonale antistoffer mot både ProGRP og NSE som benyttes i denne oppgaven, henholdsvis mAbE146 [11] og mAbE21 [53]. Det ProGRP-spesifikke antistoffet E146 bindes selektivt til en bestemt region av aminosyresekvensen, felles for alle isoformene, mens det NSE-spesifikke antistoffet E21 binder til en bestemt region av aminosyresekvensen til γ -enolase, slik at det vil isolere isoenzymene γ , $\gamma\gamma$ og $\alpha\gamma$ men ikke fritt α . De magnetiske kulene tilsettes serumprøvene (1 mL) som deretter roteres og ristes i 1 time slik at det dannes antistoff-antigen-komplekser (figur 2.4). Deretter brukes en magnet til å isolere de magnetiske kulene med antistoff-antigen-kompleksene bundet til overflaten, mens matriksen pipetteres vekk. For å fjerne ytterligere forurensninger utføres fire vasketrinn før trypsinering [13, 54].



Figur 2.4 – Magnetiske kuler ”coated” med antistoff tilsettes serumprøven og etter en gitt inkubasjonstid vil det dannes antistoff-antigen-komplekser. Kompleksene isoleres ved bruk av en magnet som holder de magnetiske kulene tilbake mens matrisen fjernes.

2.5.2 Enzymatisk proteolyse

Enzymatisk proteolyse er en mye benyttet metode innen kvantitativ proteomikk. Metoden involverer spalting av intakte peptider eller proteiner til mindre peptider, i størrelsesorden 6-20 aminosyrer, som regel ved bruk av et spesifikt proteolytisk enzym under bestemte betingelser. I de fleste tilfeller oppstår det peptidprodukter som er spesifikke for og støkiometrisk relatert til proteinet de kommer fra. Disse peptidene kalles for signaturpeptider. I neste trinn velges det ut ett eller noen få signaturpeptider som brukes til bestemmelse av proteiner. Mengden av disse signaturpeptidene kan bestemmes ved LC-MS og brukes som et mål på den totale mengden intakt peptid eller protein. Dette bidrar til økt sensitivitet siden bestemmelse av intakte proteiner ikke på langt nær er så sensitivt som peptidbestemmelser og tandem MS-analyser av peptider; blant annet øker feilmarginen med økende molekylvekt, i tillegg til at intakte proteiner kan inneholde post-translasjonelle modifikasjoner som ytterligere kan komplisere nøyaktig bestemmelse [15, 55, 56].

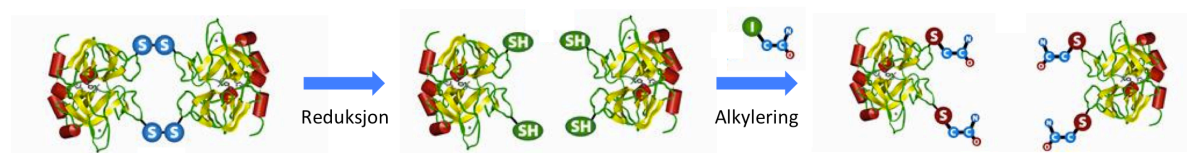
Deteksjon av ProGRP og NSE ved bruk av LC-MS/MS baserer seg på monitorering av signaturpeptider dannet ved tryptisk proteolyse. Utvelgelsen av et signaturpeptid gjøres ved hjelp av algoritmer og databaser. I denne oppgaven benyttes henholdsvis tre og to signaturpeptider for å detektere de ulike ProGRP-isoformene [13] og NSE-isoenzymene [54] (tabell 2.2). ProGRP isoform 2 genererer imidlertid ikke noe eget signaturpeptid og det er derfor ikke mulig å gjøre en direkte bestemmelse av denne isoformen [13].

Tabell 2.2 – Oversikt over de ulike signaturpeptidene for ProGRP og NSE

Protein	Isoform/isoenzym	Aminosyresekvens
ProGRP	Total	NLLGLIEAK
	Isoform 1	LSAPGSQR
	Isoform 3	DLVDSLLQVLNVK
NSE	α -subenhet	TIAPALVSK
	γ -subenhet	ELPLYR

Ved enzymatisk proteolyse er det en forutsetning at det brukes stabile, velkarakteriserte proteolytiske enzymer med veldefinert spesifisitet. Disse enzymene må være tilgjengelig i høy kvantitet og renhet, og de må være robust nok for bruk i en rekke sammenhenger. Eksempler på slike enzymer er trypsin, chymotrypsin, Glu C, Lys C og Asp N [55]. Av disse er den velkarakteriserte serinproteasen trypsin den mest brukte og den isoleres hovedsakelig fra pankreas fra svin eller storfe [15, 55]. Trypsin klipper proteiner etter aminosyrene lysin og arginin, så lenge disse ikke er etterfulgt av prolin i C-terminal retning [15, 55, 57, 58]. Tryptisk proteolyse danner på denne måten unike signaturpeptider med høyst basiske residuer ved C-terminalen i det foretrukne masseområdet for effektiv fragmentering ved tandem MS [58].

Enzymatisk proteolyse gjøres normalt etter denaturering, reduksjon og alkylering av proteinet (figur 2.5) [15, 56]. Denaturering ved bruk av varme gjør at proteinene folder seg ut og mister sin konformasjon. Reduksjon ved bruk av et reduseringsreagens som DTT hindrer dannelse av intra- og intermolekylære disulfidbindinger mellom cysteinresiduer på proteinene. Alkylering med et alkyleringsreagens som IAA modifierer sulfhydrylgruppen (SH-grupper eller tioler) og hindrer dermed redannelse av disulfidbindinger [15]. Disse trinnene bidrar til at trypsin får tilgang på aminosyresekvensen til proteinet og kan utføre sin proteolytiske aktivitet.



Figur 2.5 – Reduksjon av disulfidbindinger mellom cysteinresiduer og alkylering av sulfhydrylgruppen. Modifisert fra [59].

2.6 Deteksjon av peptider ved bruk av LC-MS/MS

LC-MS/MS (Væskekromatografi tandem massespektrometri) er en mye anvendt analyseteknikk innenfor proteomikk der kromatografisk separasjon og massespektrometrisk deteksjon (figur 2.6) kombineres til svært sensitive og spesifikke metoder [57]. Teknikken kan skille mellom koeluerende peptider med ulike masser og ved bruk av tandem massespektrometri kan selv forbindelsesspesifikke masser av fragmenter detekteres og brukes til kvantifisering [56].



Figur 2.6 – Skjematisk oversikt over hvordan peptider detekteres ved hjelp av LC-MS/MS. Peptidene separeres ved væskekromatografi (LC), deretter ioniseres peptidene ved elektronspray (ESI) slik at de kan separeres basert på masse-ladningsforhold (m/z -verdi) i masseanalysatoren (MS/MS) og detekteres.

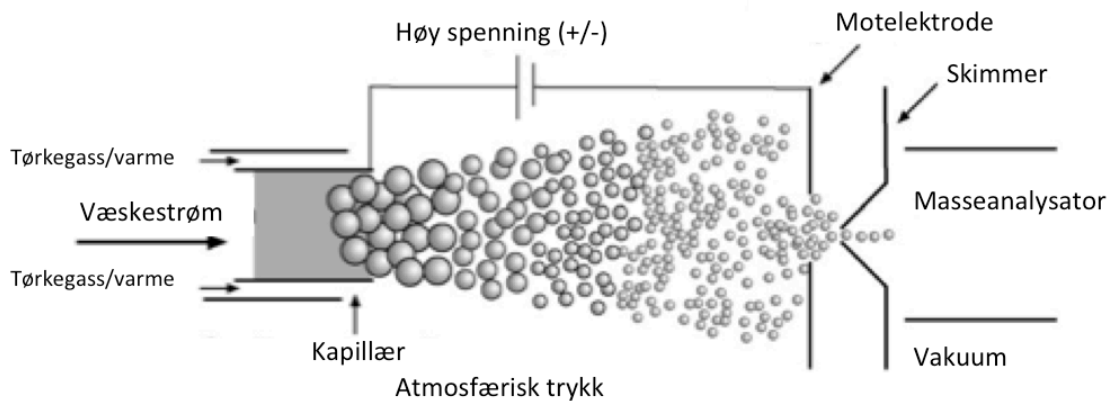
2.6.1 Væskekromatografi

Væskekromatografi (LC) er den separasjonsmetoden som er mest brukt til å separerer stoffer fra biologiske matrikser som blod, serum og urin. Metoden baserer seg på at prøven injiseres i strømmen av mobilfase som presses gjennom separasjonskolonnen som er pakket med en stasjonærfase som retarderer stoffene. Hvilken stasjonærfase som benyttes avhenger av analyttene som skal separeres og deres kjemiske egenskaper. For separasjon av peptider fra biologiske matrikser benyttes omvendt-fase prinsippet. Stasjonærfasen består da av et hydrofobt materiale, mens mobilfasen vil være en vandig løsning som er kompatibel med prøveløsningen. Analyttene retarderes av hydrofobe interaksjoner mellom hydrokarbonkjedene på stasjonærfasen og de hydrofobe gruppene på analytten; retensjonen avtar med avtagende hydrofobisitet. Ved separasjon av analytter med ulik hydrofobisitet kan mobilfasesammensetningen endres over tid slik at retensjonstiden for de mest hydrofobe analyttene blir kortere. Økt innhold av organisk modifikator gir økt løsemiddelstyrke og retensjonen avtar [60].

2.6.2 Elektronspray ionisering

Elektronspray ionisering (ESI) er en myk ioniseringsteknikk som danner ioner ved en spenningsforskjell mellom kapillæret og inngangen til massespektrometret (skimmer) [56, 61, 62]. Det elektriske feltet genererer ladede dråper av væskestrømmen i form av en fin sky. Enten ved bruk av en tørkegass (nitrogen) eller varme, fordampes løsemidlet og dråpene blir dermed mindre helt til overflatespenningen blir så stor at det skjer en såkalt Coulomb eksplosjon, der dråpene rives fra

hverandre og danner enda mindre dråper. Denne prosessen gjentas til det tilslutt dannes desolvatiserte ioner som kan passere videre inn til massespektrometeret, som holdes under høyt vakuum (figur 2.7) [55, 61, 62].



Figur 2.7 – Elektronsprayionisering. Modifisert fra [61].

En unik egenskap ved ESI er dannelsen av multiple ladete ioner fra proteiner og peptider uten at de fragmenteres [55, 61]. Mange peptider har multiple protonakseptor seter og kan eksistere som enkelt ladete eller multiple ladete ioner i løsnig. Dette gjelder spesielt peptider dannet ved tryptisk proteolyse, da de har lysin og arginin ved C-terminalen samt N-terminale aminogrupper, som begge kan være protonert i sure løsninger. Dette er årsaken til at ESI av peptider hovedsakelig gjøres i positiv modus for å analysere sure prøver [55-57].

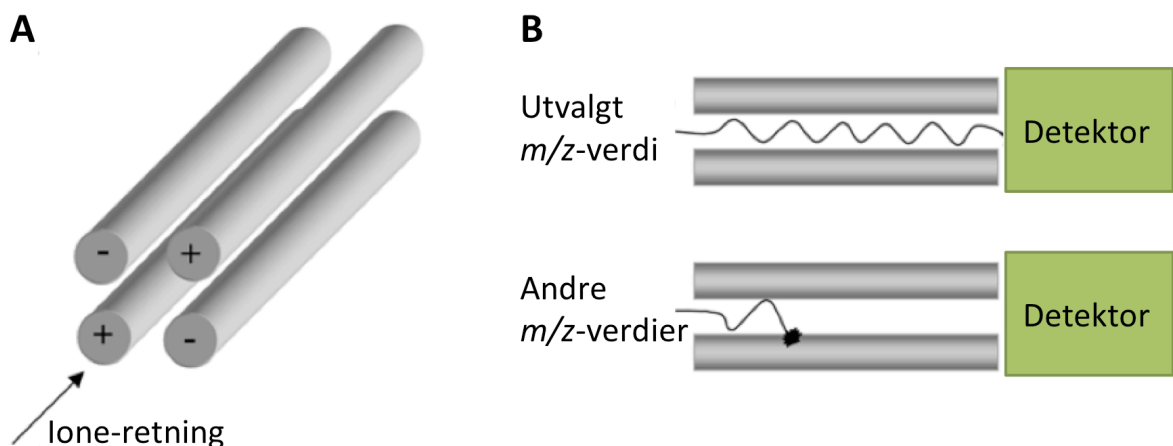
2.6.3 Massespektrometri

Det er flere typer av tandem masseanalysatorer som kobles til ESI i proteomikk, blant annet trippel quadrupol (QqQ), ionefelle, quadrupol-time of flight (Q-TOF) og orbitrap. Disse analysatorene er meget godt egnet til nøyaktig massebestemmelse (Q-TOF og orbitrap) og/eller til sensitive konsentrasjonsbestemmelser (QqQ) og/eller til bestemmelse av aminosyresekvenser (Q-TOF, orbitrap og ionefelle) [63]. I det siste tilfellet brukes fragmentering: fra en blanding av peptidioner generert av ESI-kilden, velger MS-analysatoren ut et enkelt m/z -ion. Dette ionet blir så utsatt for kollisjonsindusert dissosiasjon (CID), som induserer fragmentering av peptidet til fragmentioner og nøytrale fragmenter. Fragmentionene blir deretter analysert med basis i deres m/z -verdi for å gi et produksjonspekter. Dette spekteret kan brukes til å bestemme peptidsekvensen [55].

2.6.3.1 Trippel quadrupol masseanalysator

Den mest brukte tandem masseanalysatoren til konsentrasjonsbestemmelse i svært lave nivåer er trippel quadrupolen. Quadrupoler er veldig godt egnet for kvantitative bestemmelser grunnet sin relativt høye ionetransmisjonseffektivitet, store dynamiske rekkevidde og høye sensitivitet når brukt i statisk modus [56].

En quadrupol masseanalysator består av fire parallelle runde metallstenger (figur 2.3 A) slik at det elektriske feltet mellom dem er hyperbolisk (quadrupolart). Det elektriske feltet dannes ved å tilføre likestrøm og radiofrekvensspenning til metallstengene. Motstående stenger har motsatt polaritet slik at ionene beveger seg i en korketrekkerbane mens de flytter seg ned akse mellom stengene. Avhengig av spenningen som settes på stengene, vil ioner med spesifikk m/z -verdi passere gjennom quadrupolen, mens ioner av større eller mindre m/z -verdier vil kollideres med stengene og nøytraliseres slik at de ikke passerer gjennom quadrupolen (figur 2.3 B). Ved å endre spenningen på stengene, kan ioner med økende m/z -verdier analyseres [55, 56, 61, 62].



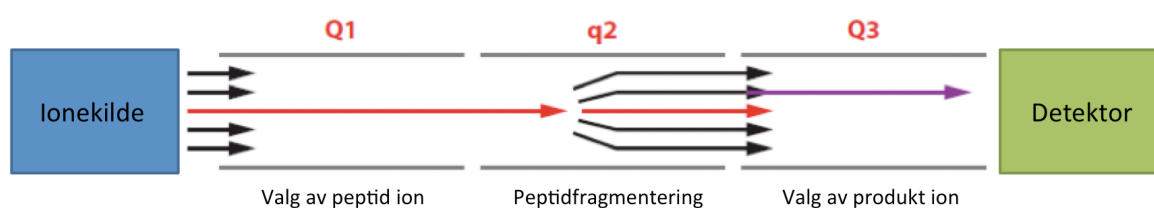
Figur 2.8 – Prinsippet for quadrupolen som masseanalysator. Modifisert fra [55]. **A:** Fire parallelle metallstenger utgjør quadrupolen. **B:** Det elektriske feltet tillater ioner med bestemte m/z -verdier å passere gjennom quadrupolen mens andre m/z -verdier nøytraliseres.

En trippel quadrupol (QqQ) består av to av disse quadrupolene (Q1 og Q3). Disse er separert av en noe forskjellig quadrupol (q2) som kun styres av radiofrekvensspenning. Den midterste quadrupolen, q2, fungerer som en kollisjonscelle, hvor kollisjon mellom ioner og nøytrale gassatomer fører til peptidionfragmentering (figur 2.9). Detektoren er plassert etter Q3 [55, 61, 64].

Måling av ioner i MS og MS/MS kan skje i ulike scan modus. I MS full scan modus genereres et fullstendig massespektrometer som viser molekylioner i ulike ladningstilstander og de ulike

adduksjonene. Ved kvantitative analyser er det imidlertid vanlig å velge ut en eller noen få m/z -verdier og måle kun disse. Dette kalles selektiv ionemonitorering (SIM) [55, 56, 64].

For veldig selektiv og sensitiv MS/MS kvantifisering velges det gjerne ut en eller noen få m/z -verdier i Q1. Ionene med disse m/z -verdiene passerer videre til q2 hvor de fragmenteres. I Q3 detekteres de fragmentationene med høyest og mest stabil signalintensitet. Monitoreringen av en slik overgang, fra et molekylion til et etterfølgende fragmention, kalles selektiv reaksjonsmonitorering (SRM) og er illustrert i figur 2.9. SRM-modus eliminerer interferens fra koeluerende forurensninger, spesielt for peptider med høy molekylvekt [56, 64].



Figur 2.9 – Selektiv reaksjonsmonitorering (SRM). Modifisert fra [65].

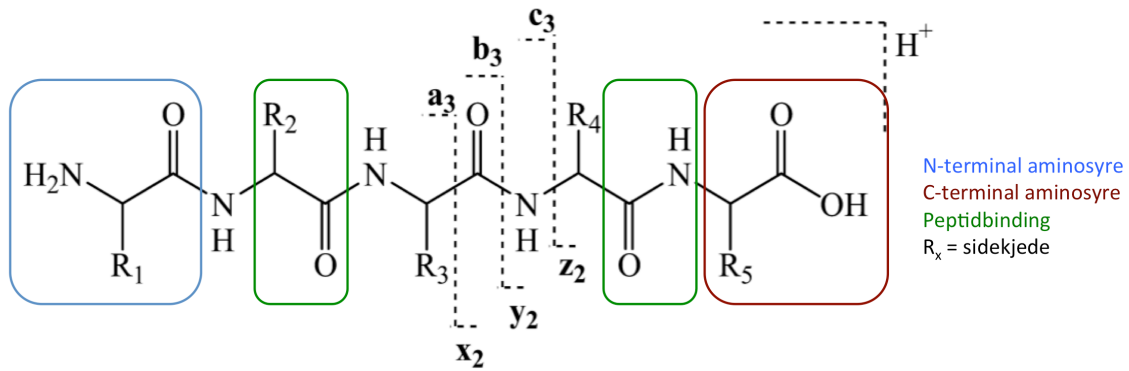
2.6.4 Fragmentering

Den mest populære metoden innen proteinidentifikasjon baserer seg på peptidsekvensering og refereres til som "bottom-up"-strategien. Metoden er avhengig av nøyaktig analyse av MS/MS-spektra av proteolytiske fragmenter for å kunne identifisere proteiner og avhenger vanligvis av algoritmer for bestemmelse av aminosyresekvens [57].

Identifisering av peptidsekvenser ved bruk av massespektrometri involverer fragmentering av peptider til dannelse av mindre m/z -fragmenter; ideelt kan de målte m/z -verdiene av disse fragmentene settes sammen til den originale sekvensen [57]. Fragmentering initieres når peptidioner kolliderer med nøytrale gassatomer og absorberer kinetisk energi for eksempel i kollisjonscellen i trippel quadrupolen [55]. En rekke bindinger i peptidionet kan potensielt undergå fragmentering, men den mest vanlige er når en ladning overføres til peptidets hovedkjede og initierer spalting av bindingen mellom karbonyloksygen og amidnitrogen. Denne spaltingen gir opphav til et y-ion og et b-ion. Et y-ion er et fragment hvor den positive ladningen sitter på C-terminalen til det originale peptidionet og et b-ion er et fragment hvor ladningen sitter på N-terminalen av det originale peptidionet (figur 2.10). Når enkeltladede peptidioner fragmenterer dannes enten et b-ion eller et y-ion. Den andre halvdel av peptidet, som er nøytralt, vil ikke detekteres i massespektrometret. Når dobbeltladede peptidioner fragmenterer dannes imidlertid komplementære fragmenter; et b-ion og et y-ion [55, 57]. Identifikasjon av b- og y-ionseriene i MS/MS-spektret kan indikere

2 Bakgrunn

aminosyresekvensen til peptidet da masseforskjellen mellom to γ -ioner korresponderer med massen til en aminosyre. Siden b-ionserien komplementerer γ -ionserien vil γ - og b-ionserien beskrive den samme aminosyresekvensen i to forskjellige retninger [55].



Figur 2.10 – Generell peptidstruktur og nomenklatur for fragmentering av peptidioner [57].

3 Materialer

3.1 Kjemikalier, proteiner og utstyr

Tabell 3.1 - Kjemikalier

Kjemikalier	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril, CH ₃ CN	LC-MS-kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat, NH ₄ HCO ₃	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Dinatriumfosfatdihydrat, Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	≥ 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
DTT (1,4-ditiotretiol), C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
IAA (Jodeddiksyre), C ₂ H ₃ IO ₃	≈ 99 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenfosfat, KH ₂ PO ₄	Analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid, KCl	> 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Maursyre, HCOOH	≈ 98 %, MS-kvalitet	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Metanol, CH ₃ OH	≥ 99,0 %, LC-MS-kvalitet	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Natriumklorid, NaCl	> 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Saltsyre, HCl	37 %, analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Tris, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	> 99,9 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Tween 20	-	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA

Tabell 3.2 – Proteiner og peptider

Protein	Kvalitet	Leverandør
Bovint serum albumin	≥ 96 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Intern standard, heavy_ELPLYR, ELPLY[R- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₄]	> 95 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Intern standard, heavy_NLLGLIEAK, NLLGLIEA[K- ¹³ C ₆ ¹⁵ N ₂]	> 95 %	Sigma-Aldrich inc., St. Lois, MO, USA
Endogent γ-enolase (Scripps)	≥ 95 %	Scripps Laboratories, San Diego, CA, USA
ProGRP isoform 1 (AA 1-125 +8)	-	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
ProGRP isoform 2 (AA 1-141 +8)	-	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
ProGRP isoform 3 (AA 1-138 +8)	-	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
Rekombinant α-enolase	> 90 %	Fitzgerald Industries International, MA, USA
Rekombinant αγ	1450 µg/L	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
Trypsin fra bovin pankreas	13631 enheter/mg protein 96,1 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA

Tabell 3.3 – Utstyr til immunoaffinitetsekstraksjon

Utstyr	Modell	Leverandør
Monoklonalt antistoff for NSE	E21	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
Monoklonalt antistoff for ProGRP	E146	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
Magnetiske kuler	Dynabeads kuler® M280, tosylaktivert	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Magnetstativ	DynaMag™-2	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Prøveblender for bruk til konveksjon av løsning med magnetiske kuler	HulaMixer™	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabell 3.4 – Utstyr til LC-MS/MS

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/-injektor	WPS-3000TRS	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
Forkolonne	AQUASIL C18 10 x 1 mm i.d., 5 µm partikkelstørrelse	Thermo scientific, Holger teknologi, Oslo, Norge
Separasjonskolonne	AQUASIL C18 50 x 1 mm i.d., 3 µm partikkelstørrelse	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Pumpe	LPG-3400M	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
Detektor	TSQ Quantum Access	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Programvare	Chromeleon v. 6.80 SR6 Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA

Tabell 3.5 – Øvrig utstyr; forbruksmateriell

Utstyr	Modell	Produsent
Eppendorfrør, LoBind (for proteiner)	Protein LoBind tube 1,5 mL og 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Glasspasteurpipetter	230 mm	VWR International, Leuven, Belgia
Hvite korker til vialer	-	Holger teknologi, Oslo, Norge
Inserts	31 x 6 mm, 0,1 mL	VWR International, Leuven, Belgia
Pipettespisser	Finntip® Biohit®	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA Biohit Oyj, Helsinki, Finland
Sentrifugerør	15 mL med skrukork, sterile	VWR International, Leuven, Belgia
Vialer	32 x 11,6 mm	Matrisk kjemisk teknologi, Oslo, Norge

Tabell 3.6 – Øvrig utstyr; ikke-forbruksmateriell

Utstyr	Modell	Produsent
Automatpipette	Finnpipette®	Thermo electron corp. Cheshire, UK
	Biohit®	Biohit Oyj, Helsinki, Finland
Inkubatorovn	ED 53	BINDER Inc, Bohemia, NY, USA
pH-meter	827 pH lab	Metrohm AG, Herisau, Sveits
Thermomixer	Comfort eppendorf 1,5 mL	Fisher Scientific, Oslo, Norge
Sentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
	Galaxy Mini centrifuge	VWR International, Leuven, Belgia
Ultralydbad	Ultrasonic Cleaner	VWR International, Leuven, Belgia
Vannrenseanlegg	Milli-Q Centry Systems	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Vekt	XS205 DualRange	Mettler-Toledo, Oslo, Norge
Vortex-mikser	IKA® MS3 digital	IKA Works inc., Wilmington, NC, USA

3.2 Tillaging av løsninger

Ammoniumbikarbonat-buffer (ABC-buffer)

50 mM ABC-buffer: 40 mg ammoniumbikarbonat veies ut og løses i 10 mL ionebyttet vann.

Løsningen lages samme dag den brukes og oppbevares kjølig.

5 % BSA-løsning

For hver mL 5 % BSA-løsning veies det ut 50 mg BSA-tørrstoff som løses i 1*PBS-løsning. Løsningen lages samme dag som det skal brukes.

3.2.1 Løsninger til immunoekstraksjon

10*PBS-buffer (100 mL)

8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 240 mg KH_2PO_4 veies ut og løses i 100 mL ionebyttet vann. Løsningen oppbevares i romtemperatur i inntil 3 måneder.

1*PBS-buffer (100 mL)

10 mL 10*PBS-buffer overføres til en målekolbe og tilsettes ionebyttet vann til 100 mL. Løsningen oppbevares i kjøleskap i inntil 3 måneder.

1*PBS-buffer med 0,05 % (v/v) Tween 20 (100 mL)

10 mL 10*PBS-buffer overføres til en målekolbe og tilsettes ionebyttet vann til 100 mL. Deretter tilsettes 50 μL Tween 20 løsning og løsningen blandes godt. Løsningen oppbevares i kjøleskap i inntil 3 måneder.

10 mM Tris-HCl (100 mL)

232,8 mg Tris veies ut og løses i 50 mL ionebyttet vann. pH justeres til 7,4 med en løsning som består av konsentrert saltsyre og ionebyttet vann i forholdet 1:7. Deretter tilsettes ionebyttet vann til 100 mL. Løsningen oppbevares i kjøleskap i inntil 3 måneder.

3.2.2 Løsninger til trypsinering

Reduseringsreagens

100 mM DTT: 7,7 mg DTT veies ut og løses i 50 mM 500 μL ABC-buffer umiddelbart før bruk.

Alkyleringsreagens

400 mM IAA: 37,19 mg IAA veies ut og løses i 50 mM 500 μL ABC-buffer umiddelbart før bruk.

3 Materialer

Trypsin

1 mg/mL trypsinløsning: 1 mg trypsin veies ut og løses i 1 mL 50 mM ABC-buffer umiddelbart før bruk.

50 µg/mL trypsinløsning: 50 µL 1 mg/mL trypsin-løsning tilsettes 950 µL 50 mM ABC-buffer umiddelbart før bruk.

3.2.3 Løsninger for tillaging av intern standard

10 %(v/v) maursyre

10 µL konsentrert maursyre løses i 90 µL ionebyttet vann.

0,1 %(v/v) maursyre

100 µL konsentrert maursyre tilsettes ionebyttet vann til 10 mL.

Intern standard heavy-ELPLYR

Vialen med 1 nmol intern standard tilsettes 20 µL 10 %(v/v) maursyre og ristes til peptidet er fullstendig løst. 180 µL 0,1 %(v/v) maursyre tilsettes vialen for å gi en stamløsning (5 nM).

Løsning A (100 nM): 20 µL stamløsning tilsettes 980 µL 0,1 %(v/v) maursyre.

Løsning B (50 nM): 10 µL stamløsning tilsettes 990 µL 0,1 %(v/v) maursyre. Løsningen oppbevares i fryser inntil bruk.

Intern standard heavy-NLLGLIEAK

Vialen med 1 nmol intern standard tilsettes 20 µL 10 %(v/v) maursyre og ristes til peptidet er fullstendig løst. 180 µL 0,1 % maursyre tilsettes vialen for å gi en stamløsning (5 nM).

Løsning A (100 nM): 20 µL stamløsning tilsettes 980 µL 0,1 %(v/v) maursyre.

Løsning B (50 nM): 10 µL stamløsning tilsettes 990 µL 0,1 %(v/v) maursyre. Løsningen oppbevares i fryser inntil bruk.

3.2.3 Mobilfaser

Mobilfase A består av 99 % 20 mM maursyre og 1 % ACN. Mobilfase B består av 1 % 20 mM maursyre og 99 % ACN. Mobilfase C består av 50 % ACN og 50 % ionebyttet vann og mobilfase D består av 5 % metanol og 95 % ionebyttet vann. Mobilfase C og D benyttes til vask av kolonne mellom analyse av prøver.

20 mM maursyre: 755 µL 100 % maursyre tilsettes 1 L ionebyttet vann.

Mobilfase A: 990 mL 20 mM maursyre blandes med 10 mL ACN.

Mobilfase B: 10 mL 20 mM maursyre blandes med 990 mL ACN.

Mobilfase C: 500 mL ACN blandes med 500 mL ionebyttet vann.

Mobilfase D: 50 mL MeOH blandes med 950 mL ionebyttet vann.

Mobilfasene ristes godt og settes på ultralydbad i 10-15 minutter for å fjerne eventuelle luftbobler.

4 Metoder

Prøvene i denne oppgaven ble opparbeidet og analysert med immunocapture-LC-MS/MS-metoden utviklet av Silje Bøen Torsetnes *et al.* [13, 54]. Metoden baserer seg på deteksjon og kvantifisering av signaturpeptider for tre ProGRP-isoformer (total, 1 og 3) og to NSE-isoenzymer (α og γ). Det benyttes en intern standard for NSE: ELPLY[R-¹³C₆¹⁵N₄] (IS γ -NSE), og en intern standard for total ProGRP: NLLGIEA[K-¹³C₆¹⁵N₂] (IS total ProGRP). Signalintensiteten til hver signaturpeptid er beregnet ved forholdet mellom topparealet til signaturpeptidet i forhold til intern standard. Den interne standarden korrigerer på denne måten for eventuelle variasjoner i massespektrometret.

4.1 Prøveopparbeidelse av NSE og ProGRP fra serum

4.1.1 Vask av magnetiske kuler

1. Ønsket volum av magnetisk kuler overføres til et eppendorfrør og settes på magnetstativet. Kulene vil trekkes mot magneten slik at det blir mulig å fjerne løsningen.
2. Løsningen fjernes forsiktig.
3. Eppendorfrøret fjernes fra magnetstativet og kulene vaskes med 1 mL 1*PBS-buffer med 0,05 %(v/v) Tween 20
4. Eppendorfrøret settes tilbake på magnetstativet og vaskeløsningen fjernes forsiktig.
5. De magnetiske kulene resuspenderes i 50 mM ABC-buffer i samme volum som ble tatt ut i punkt 1.

4.1.2 Immunoekstraksjon

- 1) 1 mL prøveløsning overføres til LoBind eppendorfrør.
- 2) 20 μ L magnetiske kuler fra punkt 5 (4.1.1) tilsettes hver prøve. Kuleløsningen gjøres homogen mellom hver andre tilsetning.
- 3) Prøvene ekstraheres i 60 minutter på en roterende Hulashaker (prøveblender) ved romtemperatur.
- 4) Prøvene settes på magnetstativ og løsningen fjernes forsiktig.
- 5) De magnetiske kulene vaskes med:
 - a. 500 μ L 1*PBS-buffer med 0,05 %(v/v) Tween 20
 - b. 400 μ L 1*PBS-buffer
 - c. 300 μ L Tris-HCl
 - d. 200 μ L 50 mM ABC-buffer

4 Metoder

Mellom hvert vasketrinn ristes eppendorfrørene godt og sentrifugeres raskt, før de settes tilbake på magnetstativet hvor vaskeløsningen fjernes forsiktig.

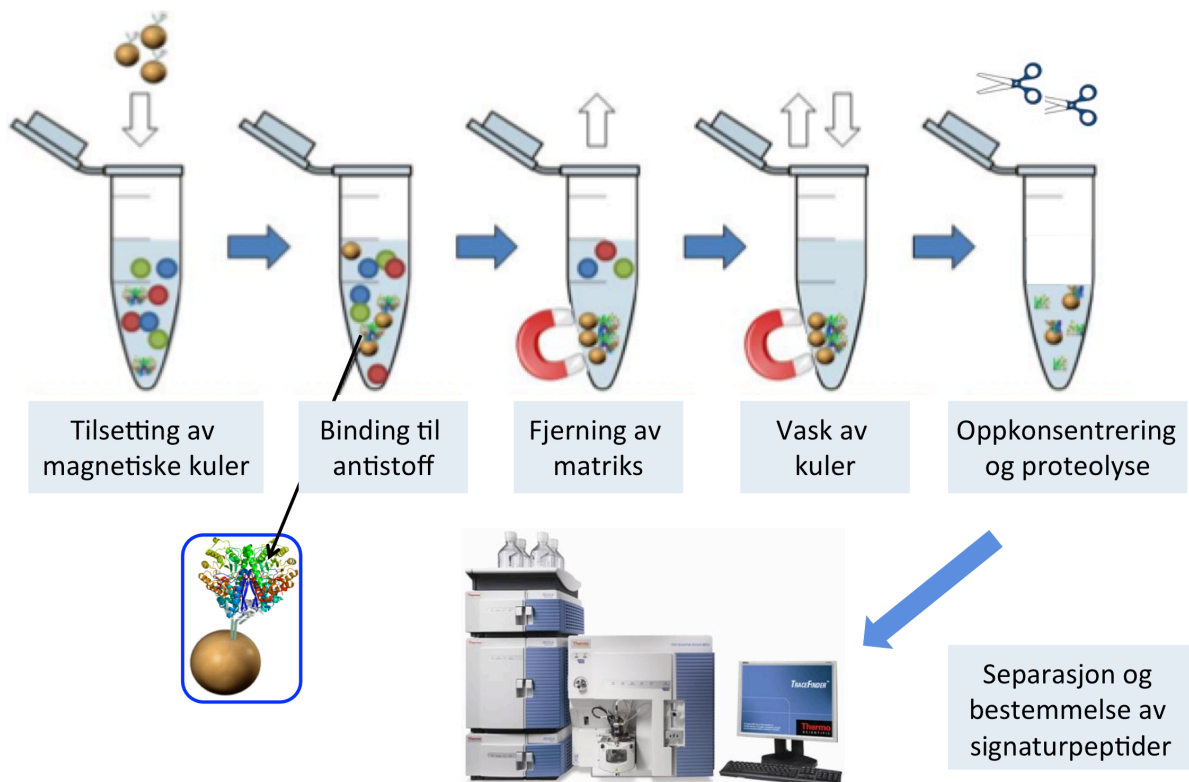
- 6) 76 μL 50 mM ABC-buffert og 2 μL av hver IS tilsettes.

4.1.3 Trypsinering

1. *Redusering*: 5 μL 100 mM DTT-løsning tilsettes hvert eppendorfrør og prøvene ristes på Thermomixer (1100 rpm) ved 60 °C i 15 minutter.
2. Prøvene avkjøles til romtemperatur.
3. *Alkylering*: 5 μL 400 mM IAA-løsning tilsettes hvert eppendorfrør. Rørene ristes og settes mørkt i 15 minutter.
4. *Trypsinering*: 10 μL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsinløsning tilsettes hvert eppendorfrør og prøvene ristes på Thermomixer (1100 rpm) ved 37 °C over natten.

4.1.4 Klargjøring av prøver for analyse

1. Prøvene avkjøles til romtemperatur.
2. Eppendorfrørene ristes kraftig og sentrifugeres før de settes på magnetstativet.
3. Prøveløsningen overføres til nye LoBind eppendorfrør og sentrifugeres (2 min, 6000 rpm).
4. 50 μL prøveløsning overføres til vialer.



Figur 4.1 – Skjematisk oversikt over den totale analytiske metoden.

4.2 LC-MS/MS-analyse av ProGRP og NSE

4.2.1 HPLC-parametere

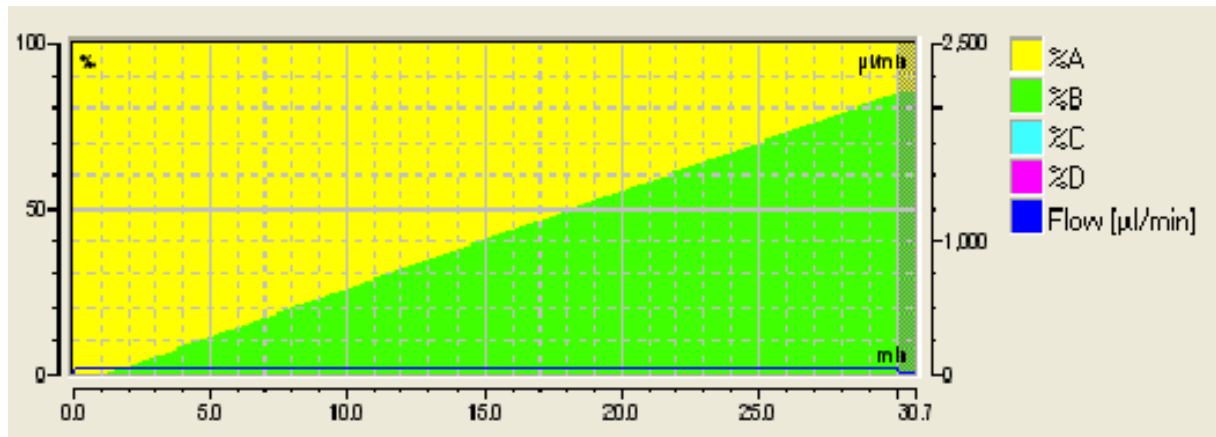
Kromatografiske parametere:

Mobilfase A:	99 % 20 mM maursyre, 1 % ACN
Mobilfase B:	1 % 20 mM maursyre, 99 % ACN
Kolonne:	AQUASIL C18, 50 x 1 mm i.d., 3 µm partikkelstørrelse
Forkolonne:	AQUASIL C18, 10 x 1 mm i.d., 5 µm partikkelstørrelse
Kolonneovn:	30 °C
Injeksjonsvolum:	40 µL
Flow:	40 µL/min

Analyttene som analyseres har stor forskjell i hydrofobisitet og det ble derfor benyttet gradienteluering. Gradienten gikk fra 100 % mobilfase A ved tiden 0 min til 85 % mobilfase B ved tiden 30,1 min. En slik gradvis økning i løsemiddelstyrke fører til at sterkere hydrofobe bindinger mellom analytt og pakkemateriale i kolonnen brytes lettere enn hvis løsemiddelstyrken hadde vært konstant gjennom hele analysen. Mobilfaseflowen holdes imidlertid konstant på 40 µL/min, men unntak av de første og siste 0,1 minuttene. Tabell 4.1 og figur 4.2 viser en oversikt over analyseprogrammet som ble benyttet.

Tabell 4.1 – Gradienteluering for analyse av ProGRP isoformer og NSE isoenzymer

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Flow (µL/min)
0,0	100	0	10
0,1	100	0	40
1,0	100	0	40
30,0	15	85	40
30,1	15	85	10

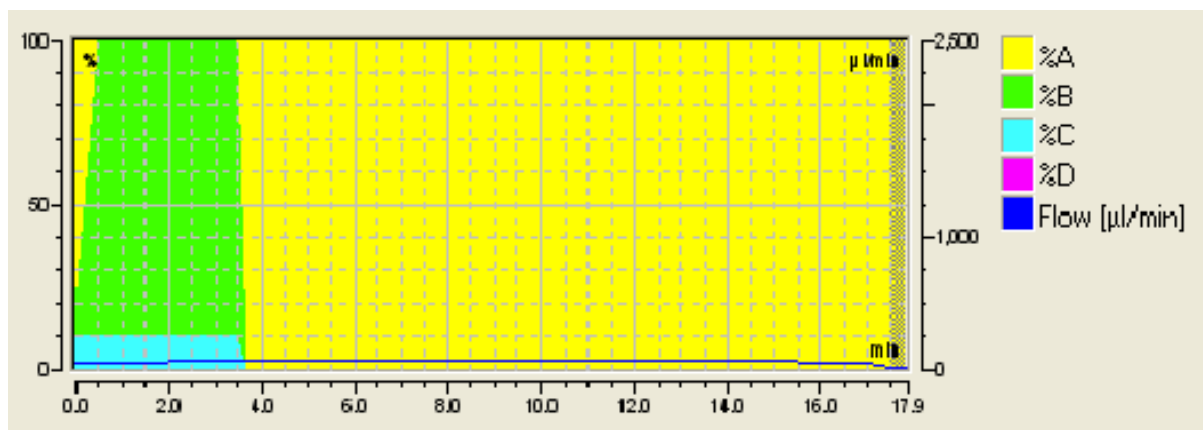


Figur 4.2 – Grafisk fremstilling av gradienten. x-akse: Tid (minutter). Venstre y-akse: Andel mobilfase (%). Høyre y-akse: Flow ($\mu\text{L}/\text{min}$). Gul: Andel mobilfase A. Grønn: Andel mobilfase B.

Mellom hver prøve kjøres et vaskeprogram for å fjerne eventuelle rester av analytt og andre forurensninger fra kolonnen og rekondisjonere den før neste analyse. Som vist i tabell 4.2 og figur 4.3 har gradienten høyest andel av mobilfase A det første halve minuttet, før andelen av mobilfase B øker til 90 %. Den høye andelen av mobilfase B fører til at eventuelle hydrofobe stoffer som fortsatt sitter igjen på kolonnen vaskes ut. De neste 13,5 minuttene rekondisjoneres kolonnen med 100 % mobilfase A og kolonnen er klar for en ny analyse. Dette innebærer at hele analysemetoden vil ta 48 minutter.

Tabell 4.2 – Oversikt over vaskeprogrammet som benyttes mellom hver analyse

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfase C (%)	Flow ($\mu\text{L}/\text{min}$)
0,0	75	15	10	45
0,5	0	90	10	55
3,5	0	90	10	65
4,0	100	0	0	70
17,0	100	0	0	50
17,5	100	0	0	10



Figur 4.3 – Grafisk fremstilling av vaskeprogrammet. x-akse: Tid (minutter). Venstre y-akse: Andel mobilfase (%). Høyre y-akse: Flow ($\mu\text{L}/\text{min}$). Gul: Andel mobilfase A. Grønn: Andel mobilfase B. Turkis: Andel mobilfase C.

4.2.2 MS-parametere

MS-parametere:

Ionisering:	ESI, positive mode
Kapillærtemperatur:	270 °C
Forstøvergass:	Nitrogen (N_2)
Forstøvergassstrykk:	15 units
Tørkegass:	Nitrogen (N_2)
Hastighet av tørkegass:	5-10 units
CID-energi:	14-34 V
Kollisjonsgass:	Argon (Ar)
Kollisjonstrykk:	1,7 mTorr
Scanintercall:	0,3 sek/scan

For å unngå å få forurensninger inn i systemet brukes en vekslingsmekanisme før inngangen til MS-systemet. Dette innebærer at analytter som elueres fra kolonnen de første 12 minuttene og det siste minuttet kjøres rett til "waste", mens de aktuelle analyttene som elueres i tidsperioden 13-30 minutter kjøres inn til MS-systemet.

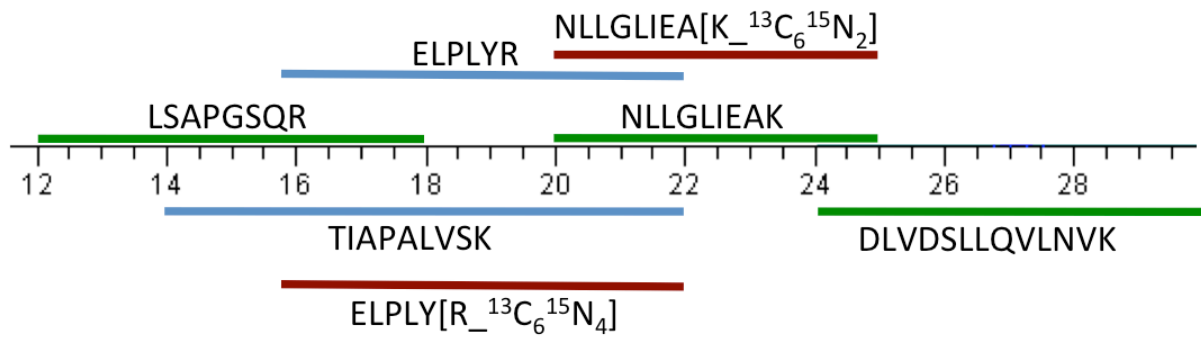
4 Metoder

Massespektrometret analyserer prøvene i SRM-mode. Fordelen med denne metoden er at ikke er nødvendig å definere segmenter for grupper av overganger, men at det isteden velges når skanningen av de ulike overgangene skal starte og stoppe. Disse tidsintervallene kan overlappe i større eller mindre grad, men for å få flest mulig punkter per topp er det ønskelig at intervallene er så smale som mulig i perioder hvor flere analytter eluerer samtidig. Tabell 4.2 viser en oversikt over SRM-metoden som ble benyttet og figur 4.3 viser en skjematisk oversikt over når metoden skanner for de ulike signaturpeptidene.

Tabell 4.2 – SRM-metoden benyttet ved analyse av ProGRP og NSE

Peptidion m/z -verdi (M^{2+})	Fragmention m/z -verdi	Signaturpeptid	Kollisjonsenergi (V)	Starttid (min)	Sluttid (min)
408,20	272,65 (y_5^{2+})	LSAPGSQR (ProGRP isoform 1)	17	12	18
	544,40 (y_5)		14		
450,23	614,39 (y_6)	TIAPALVSK (α -NSE)	16	14	22
	685,42 (y_7)		16		
395,70	274,66 (y_4^{2+})	ELPLYR (γ -NSE)	14	16	22
	548,32 (y_4)		14		
401,00	279,50	ELPLY[R- $^{13}C_6^{15}N_4$] (IS NSE)	14	16	22
	558,30		14		
485,80	630,30 (y_6)	NLLGLIEAK (total ProGRP)	15	20	25
	743,20 (y_7)		16		
489,90	638,40	NLLGLIEA[K- $^{13}C_6^{15}N_2$] (IS total ProGRP)	15	20	25
	751,40		16		
728,60	200,80 (a_2)	DLVDSLLQVLNVK (ProGRP isoform 3)	34	24	30
	228,80 (b_2)		29		
	359,90 (y_3)		18		

Uthevet m/z -verdi for fragmentionene markerer den overgangen som brukes til kvantifisering av de ulike signaturpeptidene, mens øvrige overganger brukes til kvalitativ analyse. a-, b- og y-ioner er angitt i parentes.



Figur 4.3 – Oversikt over MS-segmentene for de ulike signaturpeptidene.

5 Resultater og diskusjon

Målet med oppgaven er å fusjonere to tidligere utviklede validerte metoder til én enkelt metode. Begge metodene involverer immunoaffinitetsekstraksjon og "bottom-up" LC-MS/MS-analyse, men de er likevel ikke helt like. Som vist i tabell 5.1 er metodene validert i ulike matrikser, de bruker ulike monoklonale antistoffer, i tillegg til at reduksjon og alkylering inngår i NSE-metoden. For å evaluere den nye metoden gjøres det en grundig sammenligning av den fusjonerte metoden og de separate metodene.

Tabell 5.1 – Sammenligning av de separate validerte metodene for ProGRP og NSE

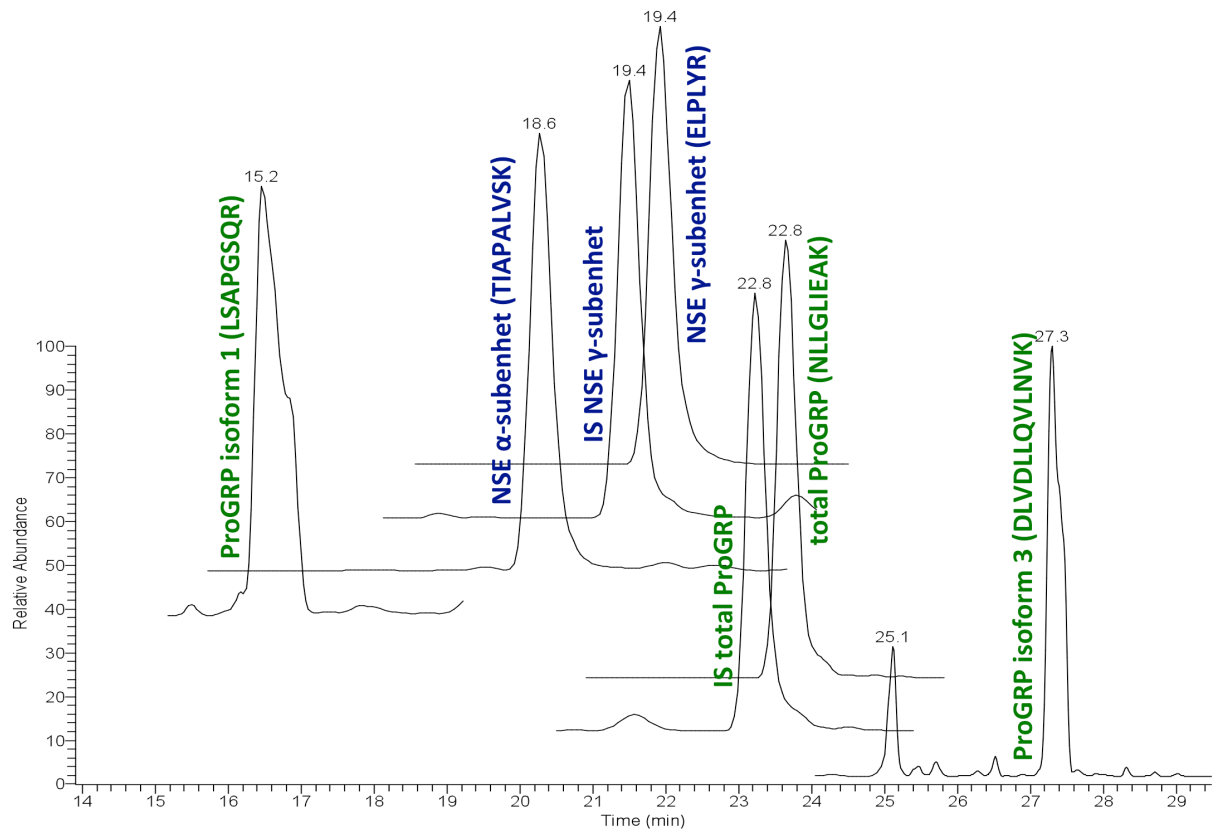
	ProGRP (1, 3 og total)	NSE (γ, $\gamma\gamma$ og $\alpha\gamma$)
Prøvevolum	1000 μ L	1000 μ L
Matriks	Humant serum (depleted for ProGRP)	5 % BSA
Immunoekstraksjon	Magnetiske kuler med mAbE146	Magnetiske kuler med mAbE21
Betingelser	Trypsin	DTT/IAA/60 °C og deretter trypsin
LC-MS/MS	ProGRP/NSE metode (SRM)	ProGRP/NSE metode (SRM)

5.1 Fusjon av to validerte metoder

5.1.1 Innledende forsøk

Frem til nå har det ikke blitt publisert noen immunoaffinitetsbasert metode som tillater bestemmelse og differensiering av flere proteiner brukt som biomarkører i samme analyse. De individuelle metodene beskrevet over er utviklet med tanke på at de skal kunne fusjoneres til en multipleks metode men det er likevel ikke gitt at det vil fungere første gang det forsøkes. Innledningsvis ble det derfor utført et enkelt forsøk for å undersøke om det var mulig å ekstrahere de to proteinene fra samme prøve. ProGRP isoform 1, 2 og 3 samt $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps) ble tilsatt samme serumprøve og ekstrahert med både mAbE146 og mAbE21 magnetiske kuler samtidig. Siden begge metodene er validert med samme LC-MS/MS-metode ble det forventet at alle signaturpeptidene ville la seg detektere i samme analyse.

5 Resultater og diskusjon



Figur 5.1 – Kromatogram for den kombinerte ekstraksjonen og analysen av ProGRP-isoformer (1000 pM isoform 1 og 3, 3000 pM total ProGRP) og NSE-isozymer (tilsatt 47,3 ng/mL $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps)) fra friskt donorserum. Deteksjon av α -subenheten kommer fra endogent $\alpha\gamma$ -NSE i friskt donorserum. Prøven er opparbeidet med betingelsene for NSE-metoden.

Som vist i figur 5.1 var det mulig å detektere samtlige signaturpeptider fra den samme serumprøven. Dette antyder at det ville være mulig å kombinere de to metodene til én multipleks immunocapture-LC-MS/MS-metode.

Selv om det innledende forsøket virket svært lovende for en kombinert metode for deteksjon av ProGRP og NSE, var det ønskelig å vise at det å kombinere metodene ikke påvirker resultatene som de enkelte metodene ga alene. For å undersøke dette var det spesielt noen punkter som måtte vurderes:

- **Blir ekstraksjonsutbyttet av ProGRP påvirket ved addisjon av magnetiske kuler "coated" med anti-NSE (mAbE21) og vice versa?**

Tilstedeværelsen av et annet antistoff kan potensielt påvirke antistoff-antigen-bindingen og dermed også ekstraksjonen av de enkelte proteinene.

- **Hva er effekten av denaturering gjennom varme, reduksjon og alkylering på bestemmelsen av ProGRP og NSE?**

Dersom effekten av denne behandlingen sammenlignet med ingen behandling før tryptisk proteolyse ikke er signifikant kan disse trinnene kanskje utelates fra den fusjonerte metoden.

- **Kan ProGRP og NSE bestemmes nøyaktig uavhengig av hverandres konsentrasjon?**

Det er ønskelig at metoden skal kunne brukes som et diagnostisk verktøy for småcellet lungekreft og det er derfor viktig at konsentrasjonen av en biomarkør kan bestemmes nøyaktig uavhengig av konsentrasjonen av den andre biomarkøren.

- **Hvordan harmonisere kalibreringskurve for begge metodene?**

Metodene er validert i ulike matrikser, men det ville være arbeidsbesparende om kalibreringskurvene kunne lages i samme matriks slik at konsentrasjonen av samtlige signaturpeptider kunne bestemmes fra samme kalibreringskurve.

5.1.2 Blir ekstraksjonsutbyttet av ProGRP påvirket ved addisjon av magnetiske kuler "coated" med anti-NSE (mAbE21) og vice versa?

Ved tilsetning av to sett magnetiske kuler med ulike antistoffer vil andel magnetiske kuler i prøveløsningen fordobles. Totalvolumet i eppendorfrøret vil bli noe større og dette kan potensielt påvirke antistoff-antigen-bindingen til de enkelte proteinene og dermed også ekstraksjonsutbyttet. De enkelte metodene er undersøkt for interferenser fra de respektive magnetiske kulene på deteksjon av de ulike signaturpeptidene, men det kan tenkes at de ville kunne påvirke deteksjonen av signaturpeptidene som ikke inngår i den enkelte validerte metoden.

For å undersøke om tilstedeværelsen av andre magnetiske kuler påvirket ekstraksjonen av enkeltproteinene ble ProGRP isoform 1 (1000 pM) og $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps, 50 ng/mL), alene og i kombinasjon, tilsatt til 5 % BSA. Hver av prøveløsningene ble ekstrahert med ProGRP-kuler, NSE-kuler eller både ProGRP- og NSE-kuler (n = 2).

For å unngå å måtte teste for matrikseffekter for den fusjonerte metoden var det ønskelig at det relative utbyttet for samtlige signaturpeptider var upåvirket og at de enkelte markørene ikke lot seg detektere når de respektive magnetiske kulene ikke var tilstede i løsningen. En eventuell interferens ville også kunne medføre endringer i LC-MS/MS-metoden og dette kan være tidkrevende.

Tabell 5.2 viser relativt utbytte av signaturpeptidene til markørene ved de ulike betingelsene. Signalintensiteten til de ulike signaturpeptidene ved optimale betingelser (opprinnelig metode) er satt til 100 %. Farget felt i tabellen viser betingelser det ønskes lik relativ signalintensitet for.

5 Resultater og diskusjon

Tabell 5.2 – Målte signalintensiteter for signaturpeptidene til ProGRP isoform 1 og $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps) tilsatt til 5 % BSA med ulike magnetiske kuler

Tilsatt protein	ProGRP isoform 1 (1000 pM)			ProGRP isoform 1 (1000 pm) og $\gamma\gamma$ -NSE (50 ng/mL)			$\gamma\gamma$ -NSE (50 ng/mL)		
Tilsatt kuler	<i>ProGRP-kuler</i>	<i>ProGRP- og NSE-kuler</i>	<i>NSE-kuler</i>	<i>ProGRP-kuler</i>	<i>ProGRP- og NSE-kuler</i>	<i>NSE-kuler</i>	<i>ProGRP-kuler</i>	<i>ProGRP- og NSE-kuler</i>	<i>NSE-kuler</i>
Protein	(kolonne 1)	(kolonne 2)	(kolonne 3)	(kolonne 4)	(kolonne 5)	(kolonne 6)	(kolonne 7)	(kolonne 8)	(kolonne 9)
ProGRP isoform 1 (LSAPGSQR)	<u>100 %</u>	95 %	3 %	103 %	103 %	1 %	NF	NF	NF
total ProGRP (NLLGLIEAK)	<u>100 %</u>	93 %	2 %	102 %	102 %	NF	NF	NF	NF
γ-NSE (ELPLYR)	2 %	2 %	2 %	8 %	96 %	83 %	10 %	97 %	<u>100 %</u>

Farget felt: målte relative signalintensiteter som ønskes å være like. 100 %-verdiene refererer til målt signalintensitet av de enkelte signaturpeptidene ved bruk av den opprinnelige metoden. NF = ikke detektert. n = 2.

Som vist i tabell 5.2 er det relative utbyttet for begge signaturpeptidene til ProGRP isoform 1 tilnærmet upåvirket ved tilstedeværelsen av begge de magnetiske kulene (kolonne 1 mot kolonne 2). Ved tilsetning av γ -NSE (Scripps) oppnås også det samme relative utbytte for ProGRP både når prøveløsningen ekstraheres med kun ProGRP-kuler (kolonne 4) og begge typer magnetiske kuler (kolonne 5). Dette tyder på at bestemmelse av ProGRP ikke påvirkes av verken tilstedeværelsen av NSE i prøveløsningen eller addisjon av magnetiske kuler "coated" med anti-NSE. Når prøveløsningen ikke inneholder ProGRP isoform 1 detekteres heller ikke de respektive signaturpeptidene (kolonne 7 og 8). Tabellen viser også at ProGRP ikke detekteres når prøven kun ekstraheres med NSE-kuler (kolonne 3 og 6). Dette viser at de monoklonale antistoffene er selektive og at tilstedeværelsen av andre monoklonale antistoffer ikke vil påvirke immunoekstraksjonen av ProGRP.

Tabellen viser den samme tendensen for signaturpeptidet til γ -NSE. Det relative utbyttet er tilnærmet upåvirket når ekstrahert med kun NSE-kuler (kolonne 9) sammenlignet med både ProGRP- og NSE-kuler (kolonne 8). Når ProGRP isoform 1 er tilstede i prøveløsningen blir det relative utbyttet noe lavere ved bruk av kun NSE-kuler (kolonne 6), avviket er imidlertid ikke så stort at det anses som signifikant forskjellig. Ved bruk av kun ProGRP-kuler ekstraheres det små mengder NSE (kolonne 4 og 7). Eventuelt detekterte mengder av NSE ved bruk av ProGRP-kuler kan skyldes uspesifikk binding til antistoffet eller at noe protein blir sittende i hulrom mellom kulene og selv etter gjentatte vaskesykluser ikke er blitt fjernet.

For å konkludere viser tabell 5.2 som nevnt ovenfor at det relative utbyttet for samtidlige signaturpeptider er tilnærmet upåvirket av magnetiske kuler med andre antistoff. Tabellen viser også at antistoffene er selektive ved at det ikke detekteres ProGRP når det bare er NSE-kuler tilstede i løsningen og omvendt. Dette tyder på at de ulike markørene kan detekteres uavhengig av hverandre.

De separate metodene er som nevnt tidligere validert i ulike matrikser (tabell 5.1). I den fusjonerte metoden er det ønskelig å bruke serum som matriks og for å bekrefte resultatene beskrevet over ble forsøket derfor gjentatt i ProGRP-depleted serum (serum hvor endogent ProGRP er fjernet). Det relative utbyttet for de ulike signaturpeptidene er vist i tabell 5.3.

5 Resultater og diskusjon

Tabell 5.3 – Målte signalintensiteter for signaturpeptidene til ProGRP isoform 1 og $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps) tilsatt til ProGRP-depleted serum med ulike magnetiske kuler

Tilsatt protein		ProGRP isoform 1 (1000 pM)			ProGRP isoform 1 (1000 pM) og $\gamma\gamma$ -NSE (50 ng/mL)			$\gamma\gamma$ -NSE (50 ng/mL)		
Tilsatt kuler		<i>ProGRP-kuler</i>	<i>ProGRP- og NSE-kuler</i>	<i>NSE-kuler</i>	<i>ProGRP-kuler</i>	<i>ProGRP- og NSE-kuler</i>	<i>NSE-kuler</i>	<i>ProGRP-kuler</i>	<i>ProGRP- og NSE-kuler</i>	<i>NSE-kuler</i>
Protein		(kolonne 1)	(kolonne 2)	(kolonne 3)	(kolonne 4)	(kolonne 5)	(kolonne 6)	(kolonne 7)	(kolonne 8)	(kolonne 9)
ProGRP isoform 1 (LSAPGSQR)		<u>100 %</u>	113 %	2 %	100 %	107 %	3 %	2 %	6 %	3 %
total ProGRP (NLLGLIEAK)		<u>100 %</u>	72 %	NF	80 %	79 %	1 %	1 %	3 %	1 %
γ-NSE (ELPLYR)		NF	33 %	32 %	2 %	86 %	88 %	2 %	97 %	<u>100 %</u>

Farget felt: målte relative signalintensiteter som ønskes å være like. 100 %-verdiene refererer til målt signalintensitet av de enkelte signaturpeptidene ved bruk av den opprinnelige metoden. NF = ikke detektert. n = 2.

Tabell 5.3 viser at det relative utbyttet for signaturpeptidet til ProGRP isoform 1 også her er tilnærmet upåvirket av tilstedeværelsen av både den andre markøren (kolonne 1 mot kolonne 4) og de andre magnetiske kulene i løsningen (kolonne 2 mot kolonne 5). Det relative utbyttet for signaturpeptidet til total ProGRP varierer imidlertid noe mer ved tilsetning av NSE-kuler til ProGRP-løsningen. Når både ProGRP isoform 1 og γ -NSE (Scripps) er tilstede i løsningen er de målte signalintensitetene for dette signaturpeptidet lavere, både når ekstrahert med kun ProGRP-kuler (kolonne 4) og begge typer magnetiske kuler (kolonne 5). Verdiene er imidlertid identiske og direkte sammenlignbare med verdien for ProGRP-løsningen ekstrahert med både ProGRP- og NSE-kuler (kolonne 5 og 6 mot kolonne 2). Det kan derfor se ut som ProGRP påvirkes noe av NSE-kuler i løsningen, men at variasjonen er reproducerbar uavhengig av om γ -NSE (Scripps) er tilstede i løsningen eller ikke (kolonne 5 mot kolonne 2). Denne variasjonene anses derfor ikke av stor betydning for bestemmelsen av total ProGRP. Tabellen viser også her at ProGRP ikke detekteres når løsningen kun ekstraheres med NSE-kuler (kolonne 3) eller når løsningen ikke inneholder ProGRP (kolonne 7 og 8). Dette bekrefter resultatene for ProGRP presentert i tabell 5.2.

Den målte signalintensiteten for signaturpeptidet til γ -NSE er, som vist i tabell 5.3, også med serum som matriks tilnærmet upåvirket av tilstedeværelsen av ProGRP-kuler (kolonne 9 mot kolonne 8). Ved tilstedeværelsen av ProGRP i prøveløsningen blir imidlertid signalintensiteten noe lavere, men også her er verdiene med kun NSE-kuler (kolonne 6) og begge typer magnetiske kuler (kolonne 5) tilnærmet like. Det detekteres også et relativt høyt signal for γ -NSE i prøven kun tilsatt ProGRP isoform 1 (kolonne 2). Dette skyldes deteksjon av endogent γ -NSE tilstede i friskt donorserum brukt til å lage prøvene. Disse verdiene er også like uavhengig av om ProGRP-kulene er tilstede i løsningen eller ikke (kolonne 2 mot kolonne 3).

Det relative utbyttet for samtlige signaturpeptider varierer mer i serum enn i 5 % BSA. Siden verdiene innad i samme løsning ekstrahert med én type magnetiske kuler og begge de magnetiske kulene er relativt like, anses dette imidlertid ikke som noe problem.

På bakgrunn av disse forsøkene konkluderes det at verken tilsetning av andre magnetiske kuler eller varierende tilstedeværelse av den andre biomarkøren påvirker det relative utbyttet av signaturpeptidene i betydelig grad. Det ble derfor heller ikke sett noe behov for ytterligere undersøkelse av matrikseffekter forbundet med addisjon av andre magnetiske kuler til prøveløsningen.

5.1.3 Hva er effekten av denaturering gjennom varme, reduksjon og alkylering på bestemmelsen av ProGRP og NSE?

Den validerte metoden for deteksjon av NSE inkluderer denaturering gjennom varme (60 °C), reduksjon (DTT) og alkylering (IAA) før proteolyse med trypsin. Som beskrevet tidligere (avsnitt 2.5.2), bidrar disse trinnene til økt utfoldelse av proteinet, i tillegg til at de hindrer dannelse av inter- og intramolekylære disulfidbindinger mellom cysteinresiduer, og gjendannelse av disulfidbindinger ved å modifisere sulfhydrylgruppen. ProGRP inneholder ikke cystein og disse trinnene inngår dermed ikke i den validerte ProGRP-metoden. Det var derfor ønskelig å undersøke effekten av denne behandlingen på den målte signalintensiteten til samtlige signaturpeptider for å vurdere om disse trinnene kunne utelates fra, eller måtte inkluderes i, den fusjonerte metoden.

For å undersøke dette ble ProGRP isoform 1, 2 og 3 og γ -NSE (Scripps) spiket til både ABC-buffer og serum. Proteinstandardene i ABC-buffer (*in solution*) ble enten behandlet med DTT/IAA/60 °C eller ikke behandlet før tryptisk proteolyse (n = 5). Det samme forsøket ble også utført for serum, etter en ekstraksjon (n = 5). Alle forsøkene ble utført på to konsentrasjonsnivåer, høyt og lavt, hvorav resultatene for høy konsentrasjon (konsentrasjonen av ProGRP-isoformene og total var henholdsvis 200 pM og 600 pM, mens konsentrasjonen var γ -NSE (Scripps) var 20 ng/mL) er vist her (tabell 5.4).

Tabell 5.4 – Relativ økning for hvert signaturpeptid ved behandling med DTT/IAA/60 °C sammenlignet med ingen behandling før tryptisk proteolyse

Protein \ Type proteolyse	<i>In solution</i>	Immunaffinitetsekstraksjon fra serum
NSE α-subenhet (TIAPALVSK)*	NF	1,2 \pm 25,2 %
NSE γ-subenhet (ELPLYR)	1,5 \pm 4,1 %	1,5 \pm 17,3 %
total ProGRP (NLLGLIEAK)	1,5 \pm 6,4 %	5,3 \pm 27,9 %
ProGRP isoform 1 (LSAPGSQR)	1,1 \pm 19,1 %	0,8 \pm 17,9 %
ProGRP isoform 3 (DLVDSLLQLNVK)	1,5 \pm 10,0 %	2,7 \pm 28,1 %

Relative standardavvik (% RSD) er angitt i prosent. NF = ikke detektert. * = α -subenheten detekteres i form av endogent α -NSE tilstede i friskt donorserum brukt til å lage prøvene (1.3.1) da mAb mot α -subenheten ikke er tilgjengelig. n = 5.

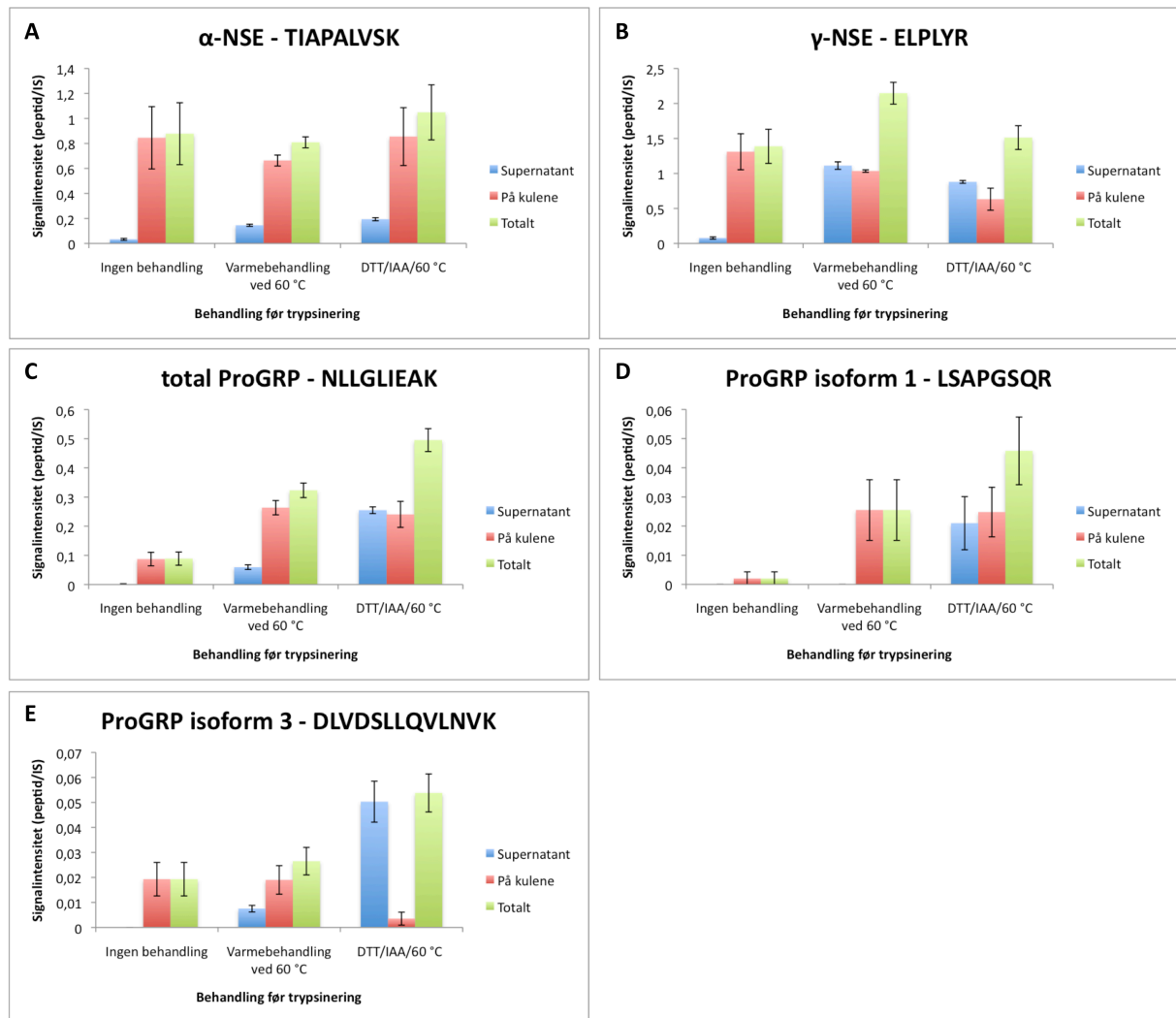
Tabell 5.4 viser at behandling med DTT/IAA/60 °C gir økt signalintensitet for alle signaturpeptidene sammenlignet med ingen behandling før tryptisk proteolyse *in solution*. Der var den relative økningen i samme størrelsesorden for alle signaturpeptidene. Etter ekstraksjon fra serum observeres

imidlertid en relativ nedgang for signaturpeptidet til ProGRP isoform 1. Tross de store standardavvikene viser en uparet *t*-test at det er en signifikant forskjell mellom resultatene fra *in solution* sammenlignet med serum ($P < 0,01$, $\alpha = 0,05$). Sett under et er imidlertid variasjonen innenfor avvikene for den validerte metoden for ProGRP [13]. Den relative økningen var klart høyest for signaturpeptidet til total ProGRP etter ekstraksjon fra serum. Siden ProGRP ikke inneholder aminosyren cystein var ikke dette forventet. En mulig forklaring på dette kan være at DTT/IAA/60 °C bidrar til at ProGRP frigjøres fra antistoffene og kulene og at noen områder i proteinet dermed blir lettere tilgjengelig for proteolyse.

Siden DTT/IAA/60 °C førte til økt relativt utbytte for de fleste signaturpeptidene var det ønskelig å undersøke denne effekten grundigere. Det er mulig at varme eller DTT/IAA kan frigjøre ProGRP fra kulene hver for seg. For å undersøke om reduksjon og alkylering bidro til å bryte bindingen til de magnetiske kulene eller om det skyldtes varmebehandlingen ble forsøket derfor utvidet som beskrevet under.

ProGRP isoform 1, 2 og 3 samt $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps) spiket til serum ble ekstrahert og utsatt for enten DTT/IAA/60 °C, varmebehandling ved 60 °C eller ingen behandling før tryptisk proteolyse. For alle betingelsene ble supernatanten pipetert over til nye LoBind eppendorfrør før trypsinering og de magnetiske kulene ble resuspendert i et tilsvarende volum ABC-buffer. Begge løsningene ble proteolysert og analysert ($n = 4$). De målte signalintensitetene for hvert signaturpeptid (peptid/IS) ved de ulike behandlingene er vist i figur 5.2.

5 Resultater og diskusjon



Figur 5.2 – Målte signalintensiteter for hvert signaturpeptid (peptid/IS) i supernatant, på kuler og totalt (sum av supernatant og på kuler) ved de ulike behandlingene, inkludert relative standardavvik. $n = 4$. **A:** Signaturpeptidet for α -NSE (detektert fra $\alpha\gamma$ -NSE tilstede i friskt donorserum). **B:** Signaturpeptidet for γ -NSE. **C:** Signaturpeptidet for total ProGRP. **D:** Signaturpeptidet for ProGRP isoform 1. **E:** Signaturpeptidet for ProGRP isoform 3.

For signaturpeptidet til α -NSE (fra $\alpha\gamma$ -NSE tilstede i friskt donorserum) er, som vist i figur 5.2 A, den målte totale signalintensiteten etter samtlige behandlingalternativer tilnærmet uforandret. Figuren viser at tilførsel av varme fører til økt frigjørelse fra de magnetiske kulene. Det totale signalet er imidlertid noe lavere sammenlignet med ingen behandling og behandling med DTT/IAA/60 °C, men grunnet de høye relative standardavvikene anses dette ikke som signifikant forskjellig ($P > 0,10$, $\alpha = 0,05$). Det var imidlertid forventet å se en større forskjell ved behandling med DTT/IAA/60 °C siden proteinet inneholder cystein og derfor burde ha effekt av reduksjon og alkylering. Siden den observerte signalintensiteten til supernatanten var relativt uforandret kan det imidlertid tyde på at reduksjon og alkylering ikke bidrar til økt frigjørelse fra antistoffene.

Som vist i figur 5.2 B sitter mesteparten av signaturpeptidet til γ -NSE fast på kulene når løsningen ikke behandles før tryptisk proteolyse. Ved tilførsel av varme løsner imidlertid omtrent halvparten av proteinet fra kulene og det totale utbyttet er 1,5 ganger høyere sammenlignet med ingen behandling. Behandling med DTT/IAA/60 °C, som teoretisk sett skulle gi de høyeste signalene, gir en økning på kun 1,2 sammenlignet med ingen behandling. En uparet *t*-test viser også at den observerte forskjellen i bruk av reduksjon og alkylering i tillegg til varmebehandling mot kun varmebehandling er så stor at resultatene regnes som signifikant forskjellig, selv når de relative standardavvikene tas med i betraktningen ($P < 0,01$, $\alpha = 0,05$). Det kan tyde på at varmebehandlingen bidrar til økt frigjørelse fra antistoffene fordi signalet for supernatanten øker, mens tilleggsbehandlingen med reduksjon og alkylering er av mindre betydning for frigjørelse fra antistoffene.

Som vist i figur 5.2 C er signalintensiteten for signaturpeptidet til total ProGRP lavest uten behandling i forkant av tryptisk proteolyse og blir 6 ganger så høyt ved tilførsel av varme. Varmebehandlingen fører til at en liten andel løsner fra kulene, mens bruk av DTT/IAA/60 °C fører til at en enda større andel av proteinet løsner fra kulene og denne andelen utgjør som vist i figuren tilnærmet halvparten av det totale signalet. Det totale signalet for dette signaturpeptidet er høyest etter behandling med DTT/IAA/60 °C. Dette var imidlertid overraskende da proteinet ikke inneholder cystein.

Signaturpeptidet for ProGRP isoform 1 er noe overraskende det signaturpeptidet som påvirkes mest av behandling med DTT/IAA/60 °C. Dette var ikke forventet da signaturpeptidet viste en relativ nedgang i det innledende forsøket, som vist i tabell 5.4. Forsøkene er imidlertid designet på ulike måter ved at supernatanten og det som fortsatt sitter bundet til kulene her trypsineres og analyseres hver for seg. Dette fører til at mindre protein vil være tilstede i hver løsning, som gjør at det kan spekuleres i om trypsineringen dermed blir mer effektiv.

Som vist i figur 5.2 D er den målte signalintensiteten for ProGRP isoform 1 uten behandling i forkant av tryptisk proteolyse svært lav. Ved tilførsel av varme øker intensiteten hele 12,8 ganger sammenlignet med ingen behandling, mens bruk av DTT/IAA/60 °C øker signalet ytterligere 1,8 ganger sammenlignet med kun varmebehandling. Dette skyldes trolig at reduksjon og alkylering bidrar til økt frigjørelse, og dermed økt utfoldelse, av proteinene fra de magnetiske kulene. Trypsin får dermed bedre tilgang på aminosyresekvensen og klippeutbyttet øker. Det var imidlertid overraskende at behandlingen skulle ha så stor innflytelse på dette signaturpeptidet da proteinet ikke inneholder cystein. Signaturpeptidet sitter dessuten i enden av aminosyrekjeden og antas dermed i utgangspunktet å være mer tilgjengelig for trypsin enn for eksempel signaturpeptidet til total ProGRP, som sitter mer i midten av aminosyresekvensen.

5 Resultater og diskusjon

For signaturpeptidet til ProGRP isoform 3 øker andelen som løsner fra kulene ved tilførsel av varme. Andelen bundet til kulene holder seg imidlertid uforandret, som vist i figur 5.2 E. Ved behandling med DTT/IAA/60 °C løsner nærmere 90 % fra kulene og det totale signalet øker 2,8 ganger sammenlignet med ingen behandling.

Alle signaturpeptidene til ProGRP har betydelig effekt av behandling med DTT/IAA/60 °C i forkant av tryptisk proteolyse. Dette er imidlertid overraskende da proteinet som nevnt tidligere ikke inneholder cystein. Den observerte effekten skyldes sannsynligvis at denatureringen påvirker antistoffet slik at bindingen til proteinet brytes og aminosyresekvensen blir mer tilgjengelig for trypsin. Signaturpeptidene til ProGRP isoform 1 og 3 sitter begge i enden av aminosyresekvensen og det ble derfor forventet at disse ville være mest tilgjengelig for trypsin, forutsatt at proteinet var utfoldet når bundet til antistoffet, og at disse dermed ville ha mindre effekt av denaturering og alkylering sammenlignet med signaturpeptidet for total ProGRP som sitter i midten av aminosyresekvensen. Som vist i figur 5.2 er dette imidlertid ikke tilfelle. Dette kan skyldes at ProGRP, som er et svært lite protein sammenlignet med NSE, kan være mer foldet når bundet til antistoffet og at det først vil utfoldes og bli tilgjengelig for trypsin når proteinet denatureres gjennom varme, reduseres og alkyleres.

Begge signaturpeptidene til NSE er tilnærmet upåvirket av behandling før tryptisk proteolyse. Siden NSE inneholder cystein burde signaturpeptidene i utgangspunktet få effekt av reduisering og alkylering da dette som nevnt tidligere henholdsvis vil hindre dannelse av inter- og intramolekylære disulfidbindinger mellom cysteinresiduer på proteinet og redannelse av disulfidbindinger. Den målte signalintensiteten er imidlertid tilnærmet uforandret ved denne behandlingen sammenlignet med ingen behandling. Det kan derfor tyde på at proteinet både i naturlig og denaturert konformasjon ikke danner slike bindinger eller at signaturpeptidene (som ikke inneholder cystein) er like tilgjengelig for trypsin selv om det skulle dannes disulfidbindinger innad i proteinet. Siden NSE også, som nevnt tidligere, er et ganske stort protein vil det trolig ikke ha like kompakt konfigurasjon som et mindre protein kunne tenkes å ha og at også denatureringen derfor har mindre effekt på dette proteinet sammenlignet med ProGRP. Det kan også tenkes at forskjellen i antigen-antistoff-binding og forskjeller mellom selve antistoffene for de to markørene kan være årsak til effektforskjell av behandlingen før tryptisk proteolyse. Dersom NSE i større grad er bundet til antistoffene, selv etter at varmebehandlingen har bidratt til frigjørelse av antigen-antistoff-kompleksene fra de magnetiske kulene, vil dette kunne forklare hvorfor andelen av signaturpeptidene i supernatanten øker mens det totale utbyttet holdes tilnærmet konstant.

Som vist i figur 5.2 bidrar varmebehandling ved 60 °C til at de fleste proteinene løsner fra de magnetiske kulene. Dette illustreres ved at den målte signalintensiteten til supernatanten øker for

samtligesignaturpeptider med unntak av ProGRP isoform 1. Det økte totale signalet skyldes at varmebehandlingen bidrar til økt utfoldelse av proteinene og trypsin får dermed bedre tilgang på aminosyresekvensen hvilket bidrar til økt klippeutbytte. Høyest signalintensitet oppnås for alle signaturpeptidene, med unntak av ELPLYR (γ -NSE), ved behandling med DTT og IAA i tillegg til varme. Andelen i supernatanten for signaturpeptidene til NSE påvirkes imidlertid ikke av denne tilleggsbehandlingen og det kan tyde på en sterk interaksjon mellom antigen og antistoff.

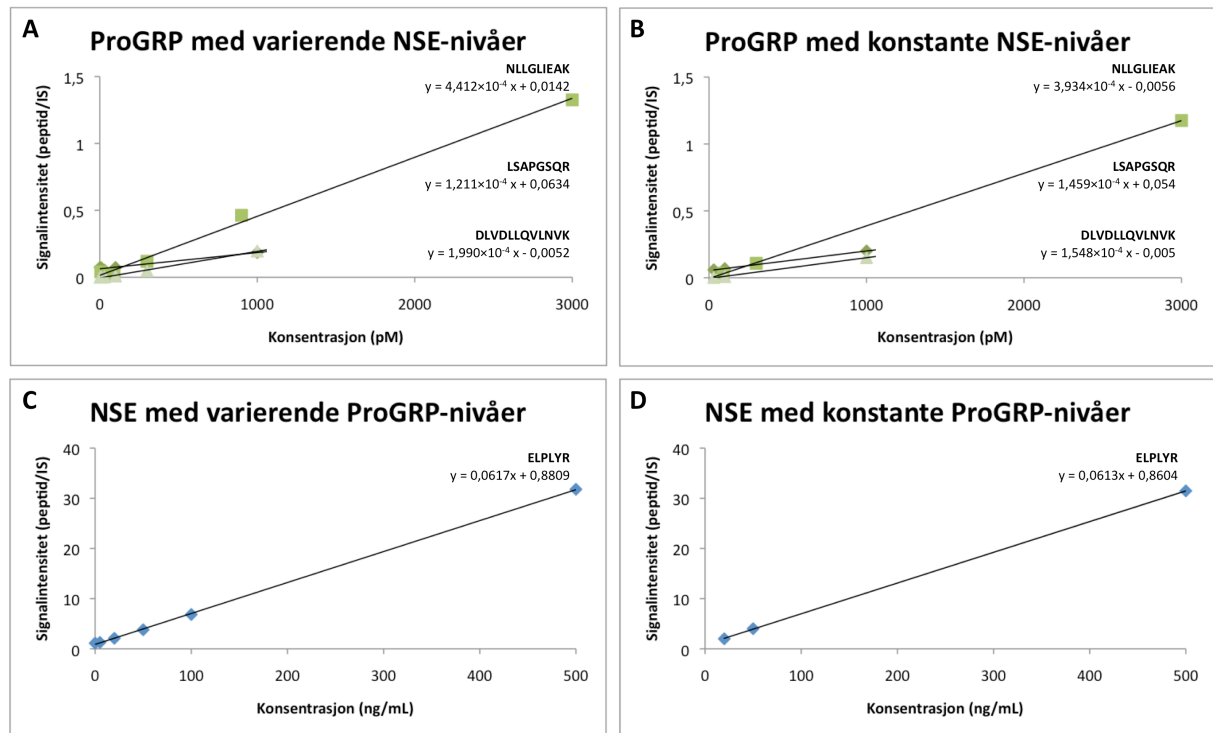
På bakgrunn av disse forsøkene konkluderes det med at behandling med denaturering og alkylering før tryptisk proteolyse øker signalintensiteten til samtlige signaturpeptider, selv for ProGRP som ikke inneholder cystein. Dette kan som nevnt skyldes utfolding av proteinet og frigjørelse fra kulene ved at bindingen mellom antigen og antistoff brytes. Grunnet de høye relative standardavvikene (% RSD) er det imidlertid ikke reproducerbart hvor mye som løsner fra kulene, men siden det er totalen som skal brukes ved analyse anses ikke dette som noe problem. Varmebehandling, reduksjon og alkylering vil derfor inngå i den fusjonerte metoden.

5.1.4 Kan ProGRP- og NSE-konsentrasjoner bestemmes nøyaktig uavhengig av hverandres konsentrasjon?

Målet med dette arbeidet er som vent tidligere at metoden skal kunne brukes som et mulig diagnostisk verktøy for samtidig bestemmelse av ProGRP- og NSE-konsentrasjoner i serum. Serumnivåene vil imidlertid kunne variere mye fra pasient til pasient, og for med sikkerhet å kunne bestemme den nøyaktige konsentrasjonen av alle signaturpeptidene i samme prøve er det viktig at ProGRP- og NSE-konsentrasjoner kan bestemmes uavhengig av hverandres konsentrasjon.

For å undersøke dette ble tre situasjoner simulert: kovarierende ProGRP- og NSE-konsentrasjoner, konstant ProGRP-konsentrasjon og varierende NSE-konsentrasjon, og varierende ProGRP-konsentrasjon og konstant NSE-konsentrasjon ($n \geq 3$). Alle forsøkene ble utført i ProGRP-depleted serum. Resultatene ble vurdert ved å lage kalibreringskurver for de ulike situasjonene som vist i figur 5.3. En kalibreringskurve beskriver forholdet mellom konsentrasjonen av et signaturpeptid og den målte signalintensiteten, og er basert på forholdet mellom signaturpeptid og intern standard.

5 Resultater og diskusjon



Figur 5.3 – Kalibreringskurver for ProGRP og NSE i ProGRP-depleted serum med varierende og konstante nivåer av den andre biomarkøren tilstede i løsningen. **A:** ProGRP ($r^2 > 0,970$) med kovarierende NSE-konsentrasjoner i henholdsvis konsentrasjonsområde 6-3000 pM og 5-500 ng/mL. **B:** ProGRP ($r^2 > 0,999$) med konstante NSE-konsentrasjoner (20 ng/mL). **C:** NSE ($r^2 > 0,999$) med kovarierende ProGRP-konsentrasjoner i henholdsvis konsentrasjonsområde 5-500 ng/mL og 6-3000 pM. **D:** NSE ($r^2 > 0,999$) med konstante ProGRP-konsentrasjoner (30 pM).

Kalibreringskurvene var i alle situasjoner lineære ($r^2 > 0,970$) for kliniske relevante nivåer av begge proteinene. Som vist i figur 5.3 er stigningstallene i regresjonslinjene med konstant og varierende nivåer av den andre markøren relativt like. Dette tydet på at ProGRP- og NSE-konsentrasjonene kunne bestemmes uavhengig av hverandre. For å bekrefte dette ble det utført en uparet *t*-test hvor signalintensiteten til en bestemt konsentrasjon av det ene proteinet ble sammenlignet ved varierende konsentrasjon av det andre proteinet. Som vist i tabell 5.6 er testen utført på to konsentrasjonsnivåer for hvert protein og hvert av disse er sammenlignet ved to ulike konsentrasjonsnivåer av den andre markøren. Samtlige P-verdier er over 0,064 og med et signifikansnivå $\alpha = 0,05$ tilsier dette at det er ingen signifikant forskjell i signalintensitet når konstante konsentrasjoner av den ene markøren sammenlignes ved varierende konsentrasjoner av den andre markøren. På bakgrunn av dette konkluderes det med at ProGRP- og NSE-konsentrasjoner kan bestemmes uavhengig av hverandre da høye eller lave konsentrasjoner av ProGRP har vist å ikke ha noen innflytelse på bestemmelsen av NSE og motsatt.

Tabell 5.5 – Oversikt over P-verdier for signifikanstesting av den ene markørens innvirkning på konsentrasjonsbestemmelse av den andre markøren

	Konsentrasjon	Konsentrasjon av den andre markøren	P-verdi
ProGRP			
NLLGLIEAK	90 pM	50 og 500 ng/mL	0,432
LSAPGSQR	30 pM	50 og 500 ng/mL	0,979
DLVDSLLQVLNVK	30 pM	50 og 500 ng/mL	0,064
ProGRP			
NLLGLIEAK	300 pM	20 og 50 ng/mL	0,095
LSAPGSQR	100 pM	20 og 50 ng/mL	0,376
DLVDSLLQVLNVK	100 pM	20 og 50 ng/mL	0,660
NSE			
ELPLYR	50 ng/mL	90 og 300 pM	0,099
NSE			
ELPLYR	500 ng/mL	90 og 3000 pM	0,710

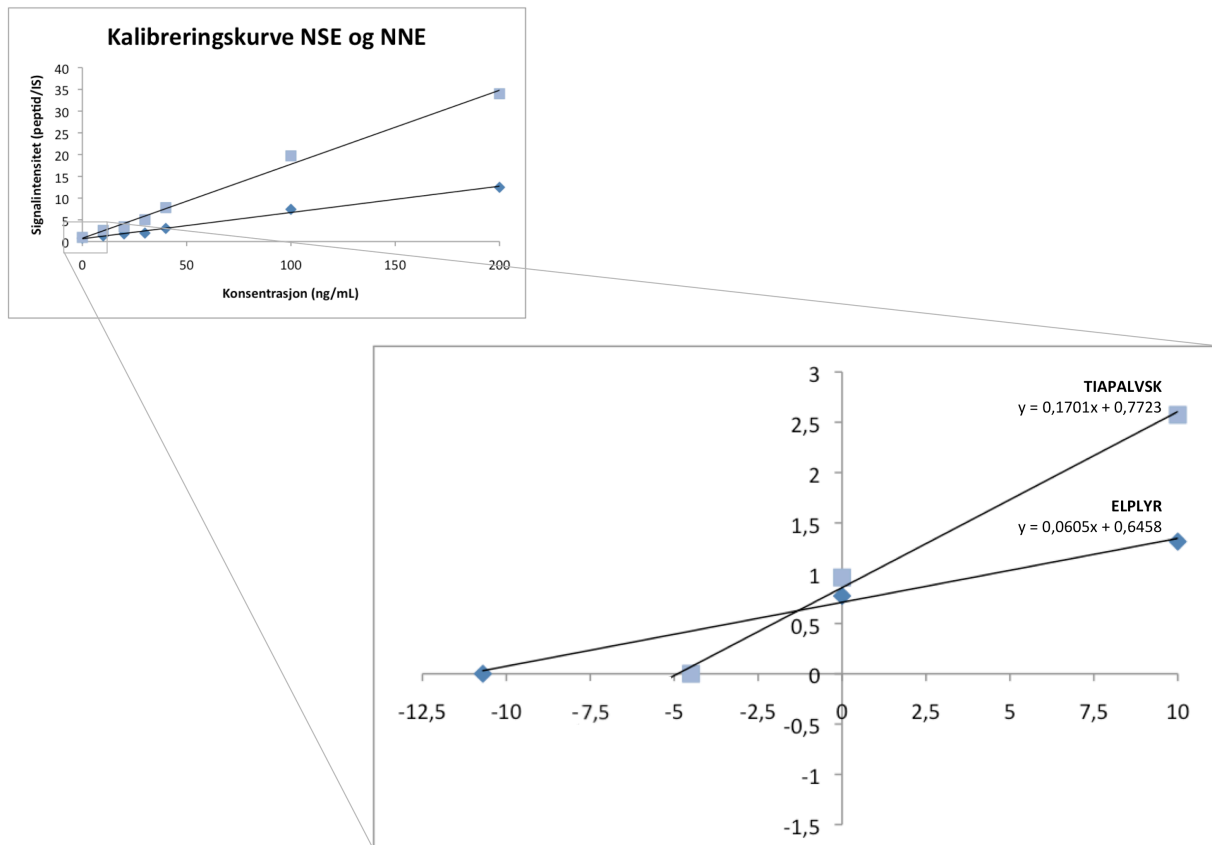
Uavhengig bestemmelse av de to proteinene tyder på at den fusjonerte metoden vil være egnet som et mulig diagnostisk verktøy for samtidig bestemmelse av biomarkørene. For at den fusjonerte metoden med sikkerhet skal kunne bestemme selv de lave endogene nivåene hos friske frivillige ble metodens deteksjonsgrense (LOD) og nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) estimert ut fra målinger gjort på 5 ng/mL γ -NSE og 10 pM total ProGRP. Med metodens deteksjonsgrense menes den laveste konsentrasjonen som med sikkerhet kan detekteres fra prøven og ble satt til når signalet til analytten er mer enn tre ganger så høyt som signalet til støyen. Den nedre kvantifiseringsgrensen ble satt til når signalet til analytten er mer enn ti ganger så høyt som signalet til støyen. Det er ønskelig at disse er så lave som mulig for også å kunne detektere de lave endogene nivåene tilstede hos friske frivillige. LOD ble beregnet til 7,2 pM og 209 pg/mL for henholdsvis total ProGRP og γ -NSE, mens LLOQ ble beregnet til henholdsvis 24 pM og 696 pg/mL. Til sammenligning ble LOD og LLOQ for de separate metodene beregnet til henholdsvis 1 pM og 13 pM for total ProGRP [13] og 11 pg/mL og 38 pg/mL for γ -NSE [54]. Disse verdiene er betraktelig lavere enn for den fusjonerte metoden, som blant annet kan skyldes tilstedeværelse av flere andre magnetiske kuler og antistoff som kan introdusere mer MS-støy. De rapporterte referanseverdiene for total ProGRP og γ -NSE hos friske frivillige er henholdsvis 7,6 pM [66] og 10 ng/mL [67]. Det antas derfor at den fusjonerte metoden vil være i

stand til å bestemme endogene nivåer av NSE og med sikkerhet å kunne avsløre forhøyede konsentrasjoner av ProGRP da disse øker betraktelig ved utvikling av sykdom.

5.1.5 Hvordan harmonisere kalibreringskurve for begge metodene?

De to metodene er som nevnt tidligere validert i ulike matriser, NSE i 5 % BSA og ProGRP i depleted serum. Valget av 5 % BSA framfor serum for validering av NSE-metoden ble brukt siden det ikke var gjennomførbart å lage NSE-fritt serum (NSE-depleted serum). For at den kombinerte metoden skal bli mest mulig arbeidsbesparende var det ønskelig å harmonisere kalibreringskurvene for de to proteinene i samme matris. ProGRP-depleted serum ble valgt da ProGRP har vist seg å være noe ustabil i BSA, spesielt i lave konsentrasjoner (resultater ikke vist), og da forsøket beskrevet over viste god r^2 for alle signaturpeptidene når ekstrahert fra samme serumprøve. Utfordringen med dette er at det da finnes NSE i denne matrisen, med andre ord vil varierende konsentrasjon av ProGRP generere en vanlig standardkurve mens varierende konsentrasjon av NSE vil generere en standardaddisjonskurve. Dette vil da være forskjellig fra den tidligere NSE-metoden. Fra denne standardaddisjonskurven er det mulig å beregne nivåene av endogent γ -NSE. Denne verdien må legges til den avleste konsentrasjonen på kurven for å gi den eksakte konsentrasjonen av γ -NSE i prøven.

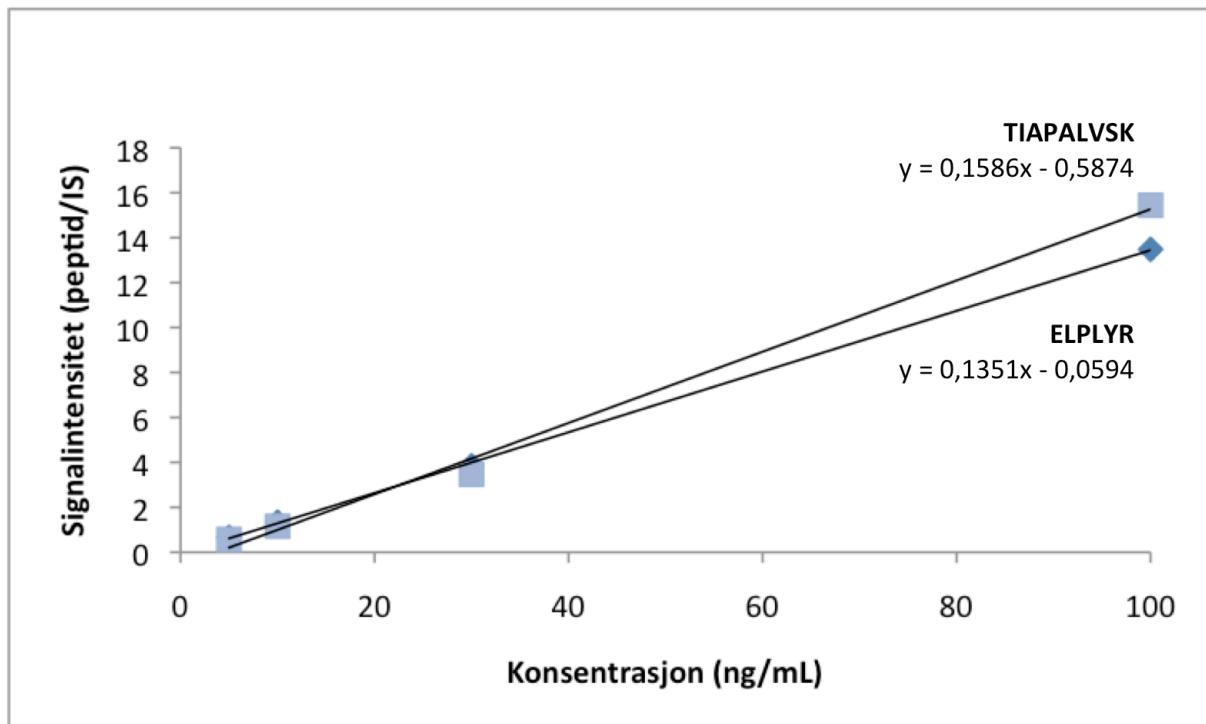
Mengden α som detekteres med metoden kommer fra $\alpha\gamma$ -isoenzymet, som også ekstraheres av metoden. For å kunne si noe om konsentrasjonen av α -subenheten, i tillegg til å bestemme den endogene konsentrasjonen av γ -subenheten, ble $\alpha\alpha$ -NNE tilsatt prøvene etter ekstraksjon fra serum.



Figur 5.4 – Kalibreringskurve for $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps) tilsatt før ekstraksjon og $\alpha\alpha$ -NNE tilsatt etter ekstraksjon fra friskt donorserum i konsentrasjonsområde 10-200 ng/mL ($n = 3$, $r^2 > 0,992$).

Som vist i figur 5.4 er det en lineær sammenheng mellom signalintensitet og konsentrasjon for begge proteinene ($r^2 > 0,992$). Dette gjorde det mulig å beregne den endogene konsentrasjonen av γ -NSE i serum ved å ekstrapolere regresjonslinjen. Konsentrasjonen av γ -enolase ble estimert til 10,7 ng/mL. På samme måte var det mulig å estimere en nedre grense for den endogene konsentrasjonen av α -enolase, estimert til 4,5 ng/mL. Den faktiske konsentrasjonen vil imidlertid være noe høyere da ekstraksjon ville generert et lavere stigningstall for α (signaturpeptidet TIAPALVSK). Dette fordi ekstraksjonen ikke gir 100 % utbytte slik som addisjon av standard etter simulerer. Konsentrasjonen av α vil imidlertid ikke kunne overstige konsentrasjonen av γ da andelen α som ekstraheres kommer fra $\alpha\gamma$ -isoenzymet. Dette forsøket antyder derfor at konsentrasjonen av α -NNE ligger mellom 4,5 og 10,7 ng/mL.

For også å kunne bestemme konsentrasjonen av α -subenheten, som detekteres ved $\alpha\gamma$, var det ønskelig å undersøke forholdet (ratioen) mellom de målte signalintensitetene (peptid/IS) for de to proteinene. Det ble derfor laget en kalibreringskurve for $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps) og $\alpha\alpha$ -NNE i ABC-buffer (*in solution*, $n = 3$), som vist i figur 5.5.



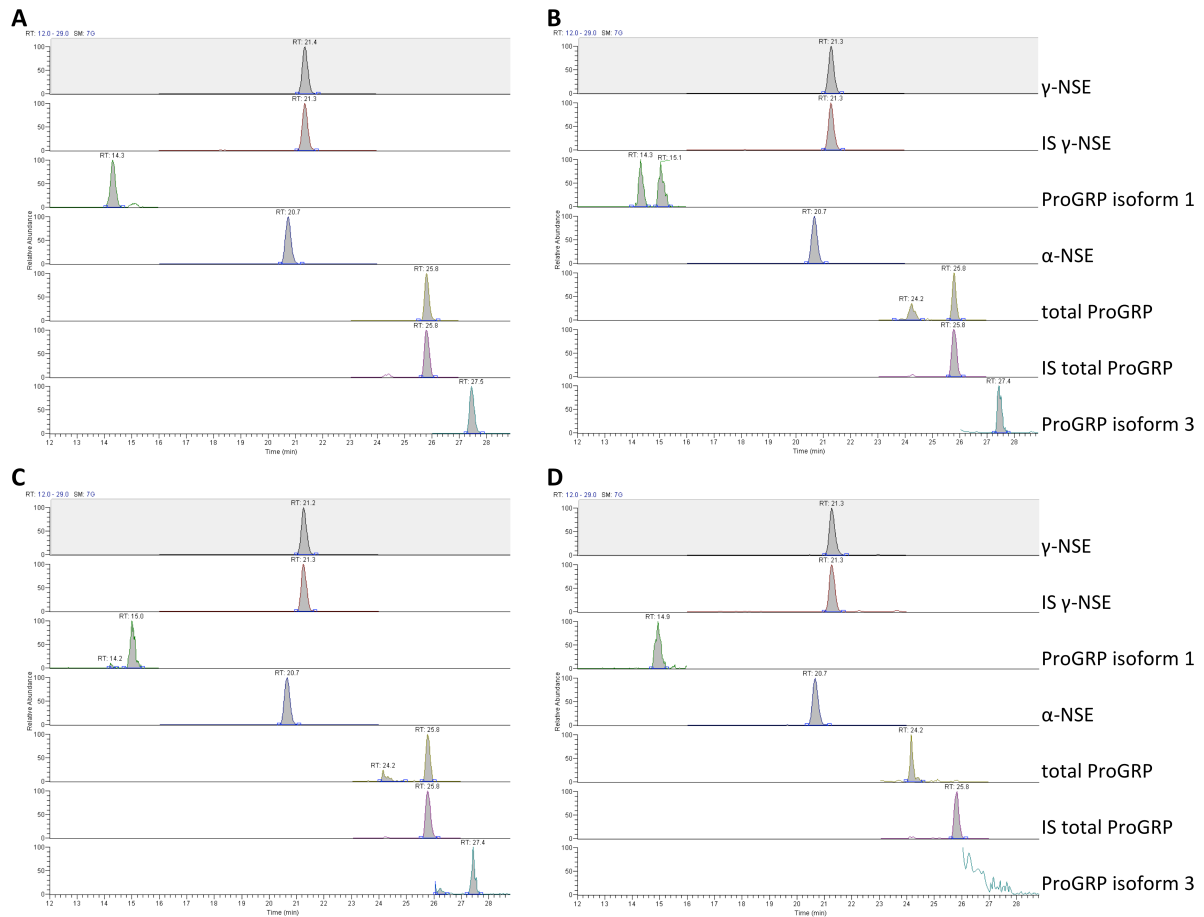
Figur 5.5 – Kalibreringskurve for $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps) og $\alpha\alpha$ -NNE *in solution* ($n = 3$, $r^2 > 0,995$).

Forutsatt at $\alpha\alpha$ og $\gamma\gamma$ klippes like reproduserbart er forholdet mellom de to peptidene *in solution* tilnærmet 1,2:1. Ved å bruke dette forholdet og den målte signalintensiteten (signaturpeptid/IS) er det dermed mulig å estimere konsentrasjonen av α -subenheten som detekteres fra $\alpha\gamma$ -NSE i serum fra standardkurven til γ -NSE. Dette forutsatt at α og γ etter ekstraksjon klippes like reproduserbart som $\alpha\alpha$ og $\gamma\gamma$ separat.

5.2 Analyse av pasientprøver

For at metoden skal kunne brukes som et diagnostisk verktøy for småcellet lungekreft var det viktig å bevise at den er egnet til å detektere og bestemme konsentrasjonen av de ulike ProGRP-isoformene og NSE-isoenzymene i reelle serumprøver. Det var også ønskelig å sammenligne metoden med eksisterende metoder som brukes til bestemmelse av disse biomarkørene i klinikken.

For å vise dette ble det analysert 14 serumprøver fra pasienter diagnostisert med småcellet lungekreft (prøver mottatt fra Radiumhospitalet) og 8 serumprøver fra friske frivillige. Utvalgte kromatogrammer av analysene er vist i figur 5.6.



Figur 5.6 – Utvalgte kromatogrammer for pasientprøvene. **A:** Pasient 14. **B:** Pasient 13. Der toppene ved tidene 15,1 min og 24,2 min er forurensninger. **C:** Pasient 2. Der toppene ved tidene 15,0 min og 24,2 min er forurensninger. **D:** Frivillig A. Der toppene ved tidene 14,9 min og 24,2 min er forurensninger.

Som vist i figur 5.6 var metoden i stand til å detektere de ulike signaturpeptidene i pasientprøver med varierende konsentrasjon av de to proteinene. Konsentrasjonen av ProGRP-isoformene hos de friske frivillige var imidlertid for lave til at de kunne detekteres og vises derfor ikke i figur 5.6 D. Toppene som vises i linjene for ProGRP isoform 1 og total ProGRP er forurensninger.

For å bestemme konsentrasjonen av de ulike proteinene i prøven ble det laget en standardkurve i ProGRP-depleted serum som beskrevet over (avsnitt 5.1.5). Standardkurven strakte seg over et antatt klinisk relevant område; 4-3000 pM for total ProGRP og 5-1000 ng/mL for $\gamma\gamma$ -NSE (Scripps) (n = 3). De beregnede konsentrasjonene for et utvalg av pasientprøvene er vist i tabell 5.6. Tabellen gir også en sammenligning av de beregnede konsentrasjonene for total ProGRP og γ -NSE analysert med immunocapture-LC-MS/MS-metoden og metodene som brukes i rutineanalyse ved Radiumhospitalet (TR-IFMA for total ProGRP og RIA for γ -NSE).

Tabell 5.6 – Sammenligning av eksisterende metoder med immunocapture-LC-MS/MS-metoden

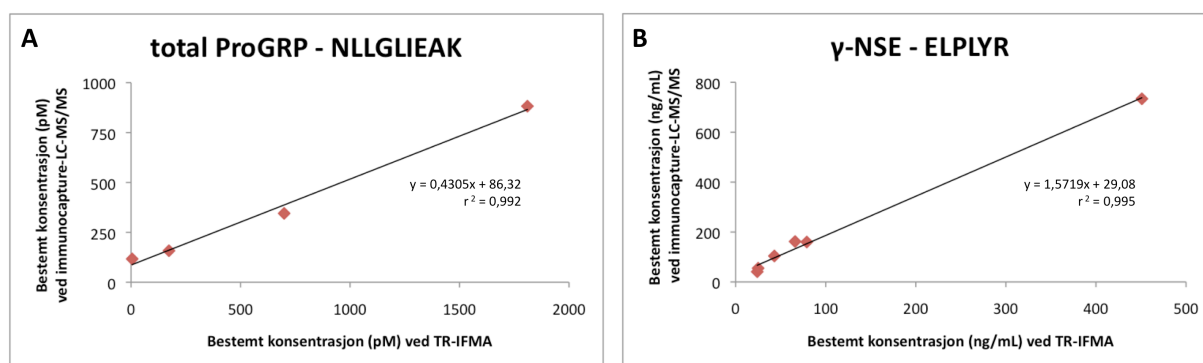
	TR-IFMA	Immunocapture-LC-MS/MS					RIA
Signaturpeptid Serumprøve	total ProGRP (pM)	total ProGRP (pM)	ProGRP isoform 1 (pM)	ProGRP isoform 3 (pM)	NSE α- subenhet (ng/mL)	NSE γ- subenhet (ng/mL)	NSE γ- subenhet (ng/mL)
Pasient 2	173	158	46	95	149	160	79
Pasient 6	7	NF	NF	NF	39	55	25
Pasient 7	5	117	52	69	143	162	66
Pasient 9	1810	882	465	680	86	104	43
Pasient 13	699	345	189	148	32	41	24
Pasient 14	1767	16517	1501	5763	557	734	451
Frivillig A	NA	NF	NF	NF	16	22	NA
Frivillig B	NA	NF	NF	NF	5	13	NA
Frivillig C	NA	NF	NF	NF	12	18	NA
Frivillig D	NA	NF	NF	NF	6	16	NA

NF = ikke detektert. NA = ikke analysert.

Som vist i tabell 5.6 er det en viss variasjon i de beregnede konsentrasjonene av total ProGRP ved bruk av de to metodene. Avvikene er størst for pasient 7 og 14 hvor immunocapture-LC-MS/MS-metoden gir en konsentrasjon henholdsvis 23,4 og 9,3 ganger høyere enn TR-IFMA-metoden. For pasient 2, 9 og 13 er avvikene imidlertid konstante, der TR-IFMA-metoden gir en konsentrasjon 3,7 ganger høyere enn immunocapture-LC-MS/MS-metoden. Begge metodene baserer seg på bruk av det samme monoklonale antistoffet (E146) men prøveoppbeidelsen er forskjellig og MS-metoden har en noe lengre inkubasjonstid. Pasientprøvene er ikke analysert på samme tidspunkt, hvilket innebærer en ekstra fryse-tine-syklus for MS-metoden. Dette kan forklare tendensen til at TR-IFMA-metoden gir en høyere konsentrasjon enn MS-metoden for noen av prøvene. Den observerte

variasjonen kan også skyldes bruk av ulike standarder hvilket resulterer i ulik kalibrering av de to metodene. Dette vil igjen gi ulike referanseområder [68]. Forskjellen i konsentrasjonsberegningen for pasient 14 er imidlertid så stor at det trolig er en annen årsak som ligger bak. Som nevnt tidligere kan immunometriske metoder være utsatt for hook effekt. Dette innebærer at konsentrasjonen i prøven er så stor at antistoffet enten blir mettet med analytt eller at analytten aggregerer og dermed ikke bindes til antistoffet. Begge disse tilfellene vil kunne gi falskt lave signaler for prøver med ekstremt høye konsentrasjoner. Den beregnede konsentrasjonen ved immunocapture-LC-MS/MS-metoden ligger dessuten langt utenfor verdiene i kalibreringskurven og det vil derfor være en viss usikkerhet i bestemmelsen av denne konsentrasjonen. Siden dette kun observeres for en av prøvene, i tillegg til at det totalt sett kun er analysert et lite antall prøver, bør dette undersøkes nærmere ved analyse av et større antall pasientprøver.

I en annen, ikke publisert studie ble konsentrasjonen av total ProGRP i 60 pasientprøver bestemt ved immunocapture-LC-MS/MS-metoden og sammenlignet med det veletablerte "time-resolved immunofluorometric assay" (TR-IFMA) på Radiumhospitalet [68]. Studien viste god korrelasjon for den lineære sammenhengen mellom de to metodene ($r^2 = 0,887$). En mer nøyaktig sammenligning av de målte verdiene viste en svak tendens til at TR-IFMA-metoden ga noe høyere verdier sammenlignet med immunocapture-LC-MS/MS-metoden. Metodene ble imidlertid funnet å være sammenfallende. En tilsvarende sammenligning av pasientprøvene analysert med den fusjonerte metoden viste også god korrelasjon for den lineære sammenhengen mellom de to metodene ($r^2 = 0,992$) (figur 5.7 A). Antall prøver som ligger til grunn for denne korrelasjonen er imidlertid ikke stort nok til å gi en tilstrekkelig sammenligning.



Figur 5.7 – Korrelasjon mellom de to metodene. **A:** Korrelasjon for konsentrasjonen av total ProGRP bestemt ved immunocapture-LC-MS/MS-metoden og TR-IFMA-metoden. **B:** Korrelasjon for konsentrasjonen av γ -NSE bestemt ved immunocapture-LC-MS/MS-metoden og RIA-metoden.

5 Resultater og diskusjon

Immunocapture-LC-MS/MS-metoden tillater også differensiering av ProGRP-isoformer. Forutsatt at de to signaturpeptidene for isoform 1 (LSAPGSQR og NLLGLIEAK) og isoform 3 (NLLGLIEAK og DLVDSLLQVLNVK) klippes likt, er det mulig å indirekte beregne andelen av isoform 2 [13]. Med dette som utgangspunkt kan det tyde på at pasient 14 har et høyt nivå av isoform 2, mens pasient 2, 7, 9 og 13 har svært lave eller totalt fraværende nivåer av denne isoformen. Andelen av de ulike isoformene kan bidra til differensiert diagnose men den kliniske verdien av denne informasjonen vil imidlertid ikke bli diskutert her.

Den validerte NSE-metoden har ikke blitt sammenlignet med eksisterende metoder for deteksjon av dette proteinet tidligere. Som vist i tabell 5.6 gir immunocapture-LC-MS/MS-metoden mellom 1,7-2,4 ganger høyere konsentrasjon enn RIA-metoden. Denne variasjonen kan skyldes bruk av ulike standarder og derav ulik kalibrering for de to metodene. Som vist i figur 5.7 B observeres en god korrelasjon for den lineære sammenhengen mellom de to metodene ($r^2 = 0,995$). Det er imidlertid kun analysert et fåtall prøver og det ville derfor være ønskelig å undersøke dette nærmere ved analyse av et større antall pasientprøver.

Som vist i tabell 5.6 var det mulig å bestemme de endogene nivåene av NSE hos friske frivillige og de beregnede verdiene ligger innenfor normalområdet. De endogene nivåene av ProGRP-isoformene var imidlertid ikke høye nok til å kunne detekteres. Serumprøvene fra de friske frivillige er ikke analysert med metodene på Radiumhospitalet og det er derfor ikke mulig å gjøre en sammenligning av disse prøvene.

Analyse av pasientprøvene viste som beskrevet over at den fusjonerte metoden er egnet til å bestemme de ulike nivåene av signaturpeptidene i reelle prøver. Ved sammenligning av immunocapture-LC-MS/MS-metoden og de immunometriske metodene brukt i rutineanalyse ved Radiumhospitalet ble det vist god korrelasjon mellom de to metodene for både total ProGRP og γ -NSE. Det er imidlertid kun analysert et lite antall pasientprøver og det vil derfor være ønskelig å undersøke dette nærmere.

6 Konklusjon

I denne oppgaven har to metoder for kvantifisering av proteiner i serum blitt fusjonert og den resulterende metoden er blitt optimalisert. Metodene involverer immunoaffinitetsekstraksjon og "bottom-up" LC-MS/MS-analyse hvilket gir en selektiv og svært sensitiv bestemmelse av to komplementære biomarkører for småcellet lungekreft, ProGRP og NSE. Den fusjonerte metoden tillater også differensiert bestemmelse av ProGRP-isoformer og NSE-isoenzymer.

Det er blitt gjort en grundig sammenligning av den fusjonerte metoden og de enkelte metodene for å sikre at den fusjonerte metoden gir like gode resultater som metodene gjør hver for seg. Det relative utbyttet for de respektive markørene påvirkes ikke av addisjon av ulike magnetiske kuler eller tilstedeværelsen av den andre markøren. Behandling i form av varmeassistert denaturering, reduksjon og alkylering før tryptisk proteolyse økte signalintensiteten for samtlige signaturpeptider, selv for ProGRP som ikke inneholder cystein. Kalibreringskurvene var lineære ($r^2 > 0,970$) for klinisk relevante nivåer av begge proteinene med både konstante og varierende nivåer av den andre markøren. Dette tilsier at ProGRP- og NSE-konsentrasjoner kan bestemmes uavhengig av hverandres konsentrasjon.

Vellykket fusjonering av de to metodene for ProGRP og NSE, inkludert deres isoformer og isoenzymer, viser at den presenterte metoden tillater pålitelig bestemmelse og differensiering av kliniske nivåer av de etablerte biomarkørene for småcellet lungekreft. Det er blitt analysert et begrenset antall pasientprøver og utprøvingen på reelle prøver tydet på at immunocapture-LC-MS/MS-metoden er godt egnet til deteksjon av varierende konsentrasjoner av ProGRP og NSE i serum. Det er imidlertid ønskelig å analysere et større antall pasientprøver for å sammenligne den fusjonerte metoden med de immunometriske metodene som benyttes i rutineanalyse for å undersøke om metoden er et bedre alternativ enn dagens metoder for kvantifisering av disse proteinene.

Referanser

1. Cho, J.Y. and H.J. Sung, *Proteomic approaches in lung cancer biomarker development*. Expert Rev Proteomics, 2009. **6**(1): p. 27-42.
2. Greenberg, A.K. and M.S. Lee, *Biomarkers for lung cancer: clinical uses*. Curr Opin Pulm Med, 2007. **13**(4): p. 249-55.
3. Planchard, D. and C. Le Pechoux, *Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment*. Eur J Cancer, 2011. **47 Suppl 3**: p. 272-83.
4. Molina, R., et al., *Pro-gastrin-releasing peptide (proGRP) in patients with benign and malignant diseases: comparison with CEA, SCC, CYFRA 21-1 and NSE in patients with lung cancer*. Anticancer Res, 2005. **25**(3A): p. 1773-8.
5. Lamy, P.J., et al., *Pro-gastrin-releasing peptide, neuron specific enolase and chromogranin A as serum markers of small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2000. **29**(3): p. 197-203.
6. Kaiser, E., et al., *Clinical biochemistry of neuron specific enolase*. Clin Chim Acta, 1989. **183**(1): p. 13-31.
7. Sung, H.J. and J.Y. Cho, *Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics*. BMB Rep, 2008. **41**(9): p. 615-25.
8. Molina, R., X. Filella, and J.M. Auge, *ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer*. Clin Biochem, 2004. **37**(7): p. 505-11.
9. Uchida, K., et al., *Expression of progastrin-releasing peptide and gastrin-releasing peptide receptor mRNA transcripts in tumor cells of patients with small cell lung cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2002. **128**(12): p. 633-40.
10. Aoyagi, K., et al., *Enzyme immunoassay of immunoreactive progastrin-releasing peptide(31-98) as tumor marker for small-cell lung carcinoma: development and evaluation*. Clin Chem, 1995. **41**(4): p. 537-43.
11. Nordlund, M.S., et al., *Production and Characterization of Monoclonal Antibodies for Immunoassay of the Lung Cancer Marker proGRP*. Tumour Biol, 2007. **28**(2): p. 100-10.
12. Nordlund, M.S., et al., *Characteristics and clinical validity of two immunoassays for ProGRP*. Tumour Biol, 2012. **33**(4): p. 1105-13.
13. Torsetnes, S.B., et al., *Digging Deeper into the Field of the Small Cell Lung Cancer Tumor Marker ProGRP: A Method for Differentiation of Its Isoforms*. J Proteome Res, 2013. **12**(1): p. 412-20.
14. Winther, B., et al., *Absolute ProGRP quantification in a clinical relevant concentration range using LC-MS/MS and a comprehensive internal standard*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(13): p. 1359-65.
15. Halquist, M.S. and H. Thomas Karnes, *Quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of macromolecules using signature peptides in biological fluids*. Biomed Chromatogr, 2011. **25**(1-2): p. 47-58.
16. Ackermann, B.L. and M.J. Berna, *Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers*. Expert Rev Proteomics, 2007. **4**(2): p. 175-86.
17. Lange, V., et al., *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. Mol Syst Biol, 2008. **4**: p. 222.

Referanser

18. Matt, P., et al., *Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples*. *Physiol Genomics*, 2008. **33**(1): p. 12-7.
19. Neverova, I. and J.E. Van Eyk, *Role of chromatographic techniques in proteomic analysis*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005. **815**(1-2): p. 51-63.
20. Wong, S.C., et al., *Advanced proteomic technologies for cancer biomarker discovery*. *Expert Rev Proteomics*, 2009. **6**(2): p. 123-34.
21. Fung, E.T., G.L. Wright, Jr., and E.A. Dalmasso, *Proteomic strategies for biomarker identification: progress and challenges*. *Curr Opin Mol Ther*, 2000. **2**(6): p. 643-50.
22. Hu, Z., L. Hood, and Q. Tian, *Quantitative proteomic approaches for biomarker discovery*. *Proteomics Clin Appl*, 2007. **1**(9): p. 1036-41.
23. Hanash, S.M., S.J. Pitteri, and V.M. Faca, *Mining the plasma proteome for cancer biomarkers*. *Nature*, 2008. **452**(7187): p. 571-9.
24. Diaz-Ramos, A., et al., *alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 156795.
25. Giallongo, A., et al., *Structure of the human gene for alpha-enolase*. *Eur J Biochem*, 1990. **190**(3): p. 567-73.
26. Oliva, D., et al., *Complete structure of the human gene encoding neuron-specific enolase*. *Genomics*, 1991. **10**(1): p. 157-65.
27. Marangos, P.J., et al., *The existence and neurobiological significance of neuronal and glial forms of the glycolytic enzyme enolase*. *Biol Psychiatry*, 1979. **14**(4): p. 563-79.
28. McAleese, S.M., et al., *Complete amino acid sequence of the neurone-specific gamma isozyme of enolase (NSE) from human brain and comparison with the non-neuronal alpha form (NNE)*. *Eur J Biochem*, 1988. **178**(2): p. 413-7.
29. Sakimura, K., et al., *The structure and expression of neuron-specific enolase gene*. *Gene*, 1987. **60**(1): p. 103-13.
30. Tracy, M.R. and S.B. Hedges, *Evolutionary history of the enolase gene family*. *Gene*, 2000. **259**(1-2): p. 129-38.
31. Pancholi, V., *Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(7): p. 902-20.
32. Paus, E. and A.T. Myklebust, *Expression and interconversion of neuron-specific enolase in patient sera and extracts from small-cell lung cancer cells*. *Tumour Biol*, 1996. **17**(5): p. 271-80.
33. Paus, E., et al., *TD-12 workshop report: characterization of monoclonal antibodies to neuron-specific enolase*. *Tumour Biol*, 2011. **32**(4): p. 819-29.
34. UniProt. *Gamma-enolase*. 2013; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P09104>. (besøkt 15.05.13)
35. UniProt. *Alpha-enolase*. 2013; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P06733>. (besøkt 15.05.13)
36. Gonzalez, N., et al., *Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2008. **15**(1): p. 58-64.
37. Hohla, F. and A.V. Schally, *Targeting gastrin releasing peptide receptors: New options for the therapy and diagnosis of cancer*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(9): p. 1738-41.

38. Spindel, E.R., et al., *Cloning and characterization of cDNAs encoding human gastrin-releasing peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(18): p. 5699-703.
39. Sausville, E.A., et al., *Expression of the gastrin-releasing peptide gene in human small cell lung cancer. Evidence for alternative processing resulting in three distinct mRNAs*. J Biol Chem, 1986. **261**(5): p. 2451-7.
40. Patel, O., et al., *C-terminal fragments of the gastrin-releasing peptide precursor stimulate cell proliferation via a novel receptor*. Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 1330-9.
41. Jensen, R.T., et al., *International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(1): p. 1-42.
42. Weber, H.C., *Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. **16**(1): p. 66-71.
43. Reeve, J.R., Jr., et al., *Multiple gastrin-releasing peptide gene-associated peptides are produced by a human small cell lung cancer line*. J Biol Chem, 1989. **264**(4): p. 1928-32.
44. Nordlund, M.S., et al., *Studies on multiple forms of proGRP in serum from small cell lung cancer patients*. Tumour Biol, 2009. **30**(5-6): p. 265-75.
45. Sequence, N.R. *Gastrin-releasing peptide isoform 1 preproprotein [Homo sapiens]*. 2013; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_002082. (besøkt 15.05.13)
46. Sequence, N.R. *Gastrin-releasing peptide isoform 2 preproprotein [Homo sapiens]*. 2013; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001012530.1. (besøkt 15.05.13)
47. Sequence, N.R. *Gastrin-releasing peptide isoform 3 preproprotein [Homo sapiens]*. 2013; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001012531.1. (besøkt 15.05.13)
48. Hoofnagle, A.N. and M.H. Wener, *The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry*. J Immunol Methods, 2009. **347**(1-2): p. 3-11.
49. Ashri, N.Y. and M. Abdel-Rehim, *Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices*. Bioanalysis, 2011. **3**(17): p. 2003-18.
50. Hennion, M.C. and V. Pichon, *Immuno-based sample preparation for trace analysis*. J Chromatogr A, 2003. **1000**(1-2): p. 29-52.
51. Nedelkov, D., *Mass spectrometry-based immunoassays for the next phase of clinical applications*. Expert Rev Proteomics, 2006. **3**(6): p. 631-40.
52. Thomas, A., et al., *Immunoaffinity purification of peptide hormones prior to liquid chromatography-mass spectrometry in doping controls*. Methods, 2012. **56**(2): p. 230-5.
53. Paus, E. and K. Nustad, *Immunoradiometric assay for alpha gamma- and gamma gamma-enolase (neuron-specific enolase), with use of monoclonal antibodies and magnetizable polymer particles*. Clin Chem, 1989. **35**(10): p. 2034-8.
54. Torsetnes, S.B., et al., *Immunocapture and LC- MS/MS for selective quantification and differentiation of the isozymes of the biomarker neuron-specific enolase in serum*. Journal of Chromatography B 2013.
55. Liebler, D.C., *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology* 2002, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
56. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **872**(1-2): p. 1-22.

Referanser

57. Wysocki, V.H., et al., *Mass spectrometry of peptides and proteins*. Methods, 2005. **35**(3): p. 211-22.
58. Olsen, J.V., S.E. Ong, and M. Mann, *Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(6): p. 608-14.
59. G-Biosciences. *Protein Reduction and Alkylation*. 2011; Available from: <http://www.gbiosciences.com/Protein-Electrophoresis.aspx> (besøkt 15.05.13)
60. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*, 2004, Bergen: Fagbokforlaget.
61. Kicman, A.T., M.C. Parkin, and R.K. Iles, *An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **260-262**: p. 212-27.
62. Yates, J.R., 3rd, *Mass spectrometry and the age of the proteome*. J Mass Spectrom, 1998. **33**(1): p. 1-19.
63. Ahmed, F.E., *Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches*. Expert Rev Proteomics, 2008. **5**(6): p. 841-64.
64. Elliott, M.H., et al., *Current trends in quantitative proteomics*. J Mass Spectrom, 2009. **44**(12): p. 1637-60.
65. Kline, K.G. and M.R. Sussman, *Protein quantitation using isotope-assisted mass spectrometry*. Annu Rev Biophys, 2010. **39**: p. 291-308.
66. Nordlund, M.S., et al., *Progastrin-releasing peptide: stability in plasma/serum and upper reference limit*. Tumour Biol, 2008. **29**(3): p. 204-10.
67. Bjerner, J., et al., *Reference intervals for carcinoembryonic antigen (CEA), CA125, MUC1, Alfa-foeto-protein (AFP), neuron-specific enolase (NSE) and CA19.9 from the NORIP study*. Scand J Clin Lab Invest, 2008. **68**(8): p. 703-13.
68. Torsetnes, S.B., et.al., *Characteristics and clinical application of two different and complementary methods for ProGRP*. Manuskript under utarbeidelse, 2013.