

Putila Kirsi

PINP:N ERI VARIANTTIMUOTOJEN TUTKIMINEN

PINP:N ERI VARIANTTIMUOTOJEN TUTKIMINEN

Kirsi Putila
Opinnäytetyö
Kevät 2014
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä: Kirsi Putila

Opinnäytetyön nimi: PINP:n eri varianttimuotojen tutkiminen

Työn ohjaajat: Marja-Kaisa Koivula, Juha Risteli ja Paula Reponen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2014

Sivumäärä: 48 + 1 liitesivu

Tyyppin I prokollageenin aminotermiinalinen propeptidi (PINP) muodostuu tyyppin I kollageenin synteesin aikana ja erittyy verenkiertoon. Seerumista mitattava intakti-PINP on heterotrimeerinen antigeeni, joka kuvaa luun aineenvaihduntanopeutta. PINP:n patologisen eli homotrimeerisen muodon on todettu liittyvän luukudoksen eri sairauksiin sekä luustoon etäpesäkkeitä lähettäviin syöpiin. Homotrimeeriselle antigeenille ei ole tarjolla spesifistä analysointimenetelmää, mikä hidastaa sen kliinisen merkityksen selvittämistä.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia PINP:n eri varianttimuotoja leimattujen monoklonaalisten vasta-aineiden avulla. Tavoitteena oli optimoida sekä vasta-aineparien että tutkittavien antigeeninäytteiden pitoisuudet siten, että vasta-aineet sitoutuisivat spesifisesti joko heterotrimeeriseen tai homotrimeeriseen PINP-varianttiin. Analysoinneissa käytettiin Oulun yliopiston Diagnostiikan laitoksen Kliinisen kemian laboratoriossa olevaa IDS-iSYS-analysaattoria, jonka analysointimenetelmä perustuu vasta-aineeseen liitetyn merkkiaineen hajoamisessa emittoituvan valon määrän mittaamiseen (kemiluminesenssi).

Tutkittavat PINP-näytteet puhdistettiin pleura- ja askitesnesteistä kromatografisilla menetelmillä. Toimeksiantajan laboratoriossa aikaisemmin tehdyn tutkimuksen perusteella valitut vasta-aineet leimattiin joko biotiinilla tai akridiumesterillä. Vasta-aineiden pitoisuusoptimoinnin jälkeen leimaparien toimivuutta testattiin analysoimalla niiden sitoutuminen puhdistettuihin soluviljelynäytteisiin sekä denaturoituihin antigeeninäytteisiin. PINP-näytteiden puhtautta ja antigeenien rakennetta arvioitiin lisäksi geelielektroforeesin avulla.

Työn tuloksena saatiin optimoitua kolme erilaista vasta-aineparia, joilla mitattaessa PINP-näytteet titraantuivat tavoitteiden mukaisesti. Vasta-aineparit sitoutuivat hyvin soluviljelynäytteiden antigeeneihin, eli leimapareja on mahdollista käyttää apuna eri solulinjojen tutkimisessa. Vasta-aineiden sitoutuminen kohdeantigeeniin inhiboitui lämpödenaturoinnin seurauksena, eli menetelmä on herkkä antigeenin rakenteen muutoksille. Lisäksi työn aikana leimattujen vasta-aineiden todettiin olevan herkkiä pakastus-sulatussyklin toistumiselle. Työn tuloksia on mahdollista käyttää eri PINP-variantit erottelevan automaattisen analysointimenetelmän jatkokehityksessä ja pystytyksessä.

Asiasanat: Aminotermiinalinen propeptidi, homotrimeeri, heterotrimeeri, vasta-aine, IDS-iSYS-analysaattori

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Technology

Author: Kirsi Putila

Title of thesis: Aminoterminal Propeptide of Type I Procollagen: Research on Different Variants

Supervisors: Marja-Kaisa Koivula, Juha Risteli and Paula Reponen

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2014

Number of pages: 48 + 1 appendix page

The aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) is a trimeric antigen which is secreted into the blood circulation during collagen synthesis. In human serum PINP is mostly in a heterotrimeric form (so called intact PINP) and it is a clinically valid indicator for bone synthesis. In some pathological tissues like breast cancer or osteoarthritis PINP is synthesized as a homotrimeric form which is weak and fragile compared to intact PINP. Present PINP immunoassays do not distinguish between the heterotrimeric and homotrimeric forms of the PINP antigen.

The purpose of this thesis was to study different variants of the PINP antigen and the structure of trimeric isoforms of the propeptide. The objective was to optimize the concentrations for monoclonal antibodies to bind specifically either heterotrimeric or homotrimeric form of the antigen from the sample matrix.

PINP antigen samples were purified from human pleural and ascites fluid by chromatographic methods, and the purity of PINP samples was verified by gel electrophoresis. Monoclonal antibodies against different variants were either biotinylated or labeled with acridinium ester. Different samples were analyzed using automated IDS-iSYS-analyzer which assay method is based on the amount of light emitted by acridinium label of an antibody (chemiluminescence). The structure of antigens was studied by heat denaturation and gel electrophoresis.

After optimization the antigen-binding specificity of different antibody pairs was good. The antigen-binding ability was inhibited by heat denaturation so the method is sensitive to changes in antigen conformation. According to the results of gel electrophoresis the antigen samples were pure and the molecular weight of the polypeptide chains of PINP did not depend on the origin of the antigen. The results of this thesis can be used for establishing a new automated assay method for different PINP variants.

Keywords: Aminoterminal propeptide, homotrimer, heterotrimer, antibody, IDS-iSYS-analyzer

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	TEOREETTINEN TAUSTA	8
2.1	Tyypin I kollageeni.....	8
2.1.1	Tyypin I prokollageenin aminotermiinalinen propeptidi	9
2.1.2	Nykyiset kaupalliset PINP-määritysmenetelmät.....	10
2.1.3	Kollageenien denaturaatio	11
2.2	Monoklonaaliset vasta-aineet	12
2.3	Sandwich-CLIA.....	13
2.3.1	Monoklonaalisten vasta-aineiden valinta	15
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	17
3.1	Käytetyt reagenssit ja triggerit	17
3.2	Preparaattien puhdistaminen ja antigeenipitoisuuden analysoiminen.....	18
3.3	Vasta-aineen biotinylointi.....	19
3.4	Vasta-aineen leimaaminen akridiumesterillä	20
3.5	Leimattujen vasta-aineiden pitoisuuksien optimointi	21
3.6	Antigeenipitoisuuden optimointi.....	21
3.7	Antigeenin denaturointi.....	22
3.8	Soluviljelynäytteiden mittaaminen intaktilla leimaparilla	22
4	TULOKSET	23
4.1	Esivalmistelut.....	23
4.2	Miten mAb-parien pitoisuudet optimoidaan?	25
4.3	Antigeeninäytteiden pitoisuusoptimointi	29
4.4	Miten eri lähtömateriaaleista puhdistetut preparaatit eroavat toisistaan?.....	35
4.5	Antigeenin denaturointi.....	38
4.6	Voidaanko eri mAb-pareja hyödyntää soluviljelynäytteiden tutkimisessa?.....	40
5	POHDINTA	43
	LÄHTEET	45
	LIITTEET	49

1 JOHDANTO

Oulun yliopiston professori Juha Risteli on tutkinut kollageeneja ja niiden hajoamistuotteita jo usean vuosikymmenen ajan. 2000-luvun alusta lähtien Ristelin tutkimusryhmässä on tutkittu luuston aineenvaihduntaa kuvaavan tyypin I prokollageenin aminoterminalisen propeptidin (PINP) eri varianttimuotoja. Kollageenisynteesin yhteydessä verenkiertoon vapautuvan intakti-PINP-variantin mittaaminen seerumista on tällä hetkellä ainoa luotettava keino seurata osteoporoosilääkityksen tai estrogeenihoidon vaikutusta luun aineenvaihduntanopeuteen. Lisäksi huomattavan korkeiden seerumin PINP-pitoisuuksien on todettu olevan yhteydessä esimerkiksi luuston osteoblastisiin metastaaseihin. (HUSLAB-liikelaitos 2011, hakupäivä 18.3.2014.)

Terveestä kollageenistä peräisin oleva intakti-PINP on rakenteeltaan heterotrimeeri, eli se muodostuu kahdesta erilaisesta polypeptidiketjusta: kahdesta $\alpha 1$ -ketjusta ja yhdestä $\alpha 2$ -ketjusta. Joidenkin patologisten tilojen yhteydessä kollageenisynteesi kuitenkin häiriintyy ja muodostuu homotrimeeristä kollageenia, jossa kaikki kolme polypeptidiketjua ovat $\alpha 1$ -ketjuja. (Han, McBride, Losert & Leikin 2008, 123.) Kolmesta samanlaisesta α -ketjusta muodostuva kollageeni on haurasta verrattuna terveeseen muotoon. Homotrimeerisen kollageenin kliinistä merkitystä ei vielä täysin tunneta, mutta sen on epäilty olevan yhteydessä esimerkiksi osteoartraosin kehittymiseen. (Bailey, Sims & Knott 2002, 176.) Hiirimallia, jolla $\alpha 2$ -ketjuja koodaavan COL1A2-geenin vaurioitumisen seurauksena muodostuu vain homotrimeeristä tyypin I kollageeniä, voidaan käyttää homotrimeerisen variantin merkityksen selvittämiseen esimerkiksi perinnöllisten luustosairauksien kehittämisessä (Kuznetsova, McBride & Leikin 2001, 807–808).

Tämän opinnäytetyön laboratorio-osuus tehtiin Oulun yliopiston Diagnostiikan laitoksen Kliinisen kemian laboratoriossa. Laboratoriossa on käytössä IDS-iSYS-analysaattori, jolla voidaan määrittää seerumin tai plasman intakti-PINP-pitoisuus kemiluminesenssiin perustuvalla analysointimenetelmällä (CLIA). Kyseinen menetelmä ei kuitenkaan tee eroa trimeeristen varianttien välille. Mikäli analysointimenetelmä pystyttäisiin kehittämään molemmat PINP-variantit erottelevaksi, homotrimeerisen kollageenin tutkiminen nopeutuisi huomattavasti.

Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia PINP:n eri varianttimuotoja kolmen erilaisen leimatun vasta-aineparin avulla. Tavoitteena on löytää leimatuille vasta-ainepareille sellaiset pitoisuudet, että ne sitoutuvat spesifisesti joko homotrimeeriseen tai heterotrimeeriseen PINP-varianttiin. Lähtö-

kohtana työlle on toimeksiantajan laboratoriossa aikaisemmin tehty tutkimus vasta-aineparien sitoutumisesta PINP-antigeenin eri varianttimuotoihin. Lisäksi tavoitteena on optimoida eri lähtö-
materiaaleista puhdistettujen PINP-näytteiden pitoisuudet IDS-iSYS-analyssaattorilla tehtäviä mitta-
uksia varten. Aikaisemman tutkimustyön perusteella haasteita työhön tuo kahden eri PINP-
antigeenin välisen ristireagoinnin lisäksi sandwich-CLIA:an perustuvan menetelmän herkkyys
vasta-aineiden ja merkkiaineiden suhteiden muuttumiselle.

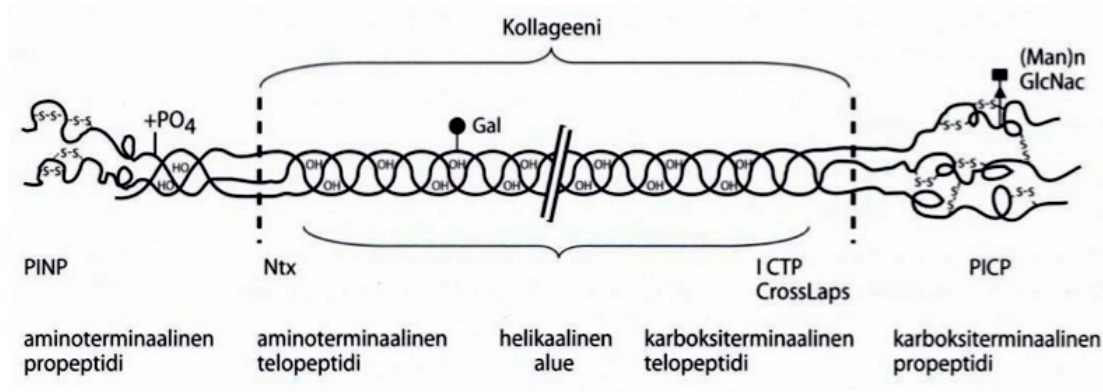
2 TEOREETTINEN TAUSTA

Kollageenit ovat kaikkien monisoluisten eliöiden tärkeimpiä rakenneproteiineja. Ne antavat tukikudoksille, kuten luustolle ja iholle, niiden toiminnan kannalta tärkeimmät ominaisuudet: lujuuden ja kestävyuden. Kollageenit on eroteltu roomalaisin numeroin niiden rakenteen ja toiminnallisten ominaisuuksien perusteella yli kahdeksikymmeneksi eri kollageenityypiksi, joiden suhteellinen osuus vaihtelee elimestä ja kudoksesta riippuen. Kollageenien aineenvaihduntatuotteilla on suuri merkitys ihmisen terveydentilan arvioimisessa ja niiden analysoimiseksi on kehitetty useita immunokemiallisia määrittämenetelmiä. (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltrimore & Damell 2000, hakupäivä 3.4.2014; Risteli 1993, 9–11.)

2.1 Tyypin I kollageeni

Fibroblastien ja osteoblastien syntetisoima tyypin I kollageeni kattaa 70 % kaikesta elimistön kollageenista. Suurin osa tyypin I kollageenista on luustossa ja hampaissa, joissa se muodostaa jopa 90 % niiden orgaanisesta matriksista. Pehmytkudoksessa, kuten ihossa, tyypin I kollageeni esiintyy usein yhdessä muiden kollageenityyppien kanssa. (Risteli 1993, 11–12.)

Säikeitä muodostava tyypin I kollageeni syntetisoidaan suurina prokollageenimolekyyleinä (kuviokuva 1). Useiden entsymaattisten reaktioiden seurauksena kahden eri geenin koodaamat polypeptidiketjut kiertyvät toistensa ympärille rakenteeksi, jota sanotaan kolmoiskierteiseksi kollageeniheliksiksi. Kolmoiskierteinen rakenne on mahdollista kollageenille ominaisen aminohappokoostumuksen ansiosta, missä joka kolmas aminohappo on glysiini. Joka kolmannen aminohapon sivuketjun on mahdollista kierteen keskelle, ja glysiinin sivuketju muodostuu pelkästään vedystä. Kollageenin rakenteen ajatellaan koostuvan aminohappotripleteistä Gly-X-Y, jossa X ja Y vastaavat mitä tahansa aminohappoa, useimmiten proliinia tai hydroksiproliinia. Erityisesti hydroksiproliini stabiloi kollageenin rakennetta hydroksyyliyhymien välisillä vetysidoksilla. Normaalisti kollageenisäikeen muodostavat kaksi α 1-ketjua ja yksi α 2-ketju. Kun muodostuneen prokollageenin päistä katkaistaan proteolyttisesti pitkät aminoterminaaliset ja karboksiterminaaliset propeptidiosat, jäljelle jää varsinainen kollageenimolekyyli. Molekyylin päissä olevat ei-helikaaliset telopeptidialueet sitovat poikkisiltarakenteiden avulla viereiset molekyylit vahvoiksi kollageenisäikeiksi. Koska luu on elävää ja jatkuvasti uusiutuvaa kudosta, myös tyypin I kollageenin tuotanto pysyy aktiivisena koko ihmisen eliniän ajan. (Risteli 1993, 13–15; Koivula, Risteli & Risteli 2012, 921.)



KUVIO 1. Tyypin I prokollageenin rakenne (Risteli & Risteli 2010, 181). Kuvaan merkityt rakenteeseen liittyvät hiilihydraattiketjut ovat: Gal = galaktoosi, GlcNac = N-asetyyli-glukosamiini, (Man)*n* = *n* lukumäärä mannoosi-tähteitä

2.1.1 Tyypin I prokollageenin aminoterminaalinen propeptidi

Tyypin I prokollageenin aminoterminaalinen propeptidi on yksi parhaiten luun uusiutumista kuvaava merkkiaine. Kun elimistö tuottaa yhden moolin tyypin I kollageenia, erittyy verenkiertoon samalla yksi mooli N-terminaalista propeptidia (PINP) ja yksi mooli C-terminaalista propeptidia (PICP). Verenkierrosta PINP poistuu maksan endoteelisolujen kautta. (Risteli 1993.) Koska suurin osa tyypin I kollageenista on luustossa ja pehmytkudoksesta peräisin oleva propeptidi erittyy yleensä ensin imunesteeseen, antaa seerumin PINP-pitoisuus hyvän kuvan luun kollageenin synteesinopeudesta. (Koivula, Richardson, Leino, Valleala, Griffiths, Barnes, Kontinen, Garrity & Risteli 2010, 1453.)

PINP esiintyy seerumissa kahdessa eri muodossa. Suurempi, trimeerinen antigeeni (intakti-PINP) rakentuu kolmesta toisiinsa sähköisin vuorovaikutuksin sitoutuneesta pro α -ketjusta, joista kaksi on pro α 1-ketjua ja yksi on lyhyempi pro α 2-ketju. Molemmista ketjuista voidaan erottaa helikaalinen keskusosa ja lyhyt karboksiterminaalinen alue. Pro α 1-ketjussa on lisäksi pallomainen N-terminaalinen alue, joka on antigeenin immunogeenisin osa. Toinen seerumista löydettävä muoto on monomeerinen PINP, jossa on vain yksi pro α 1-ketju. Monomeeri poistuu verestä todennäköisesti munuaisten kautta, minkä vuoksi esimerkiksi dialyysipotilaiden seerumissa on huomattavan

paljon monomeerista muotoa. (Koivula ym. 2012, 921.) Aikaisemmin monomeerin epäiltiin olevan peräisin intakti-PINP:n denaturoitumisesta, mutta todennäköisemmin se on pehmytkudoksen niin sanotun pN-kollageenin hajoamisessa muodostunut tuote (Koivula, Ruotsalainen, Björkman, Nurmenniemi, Ikäheimo, Savolainen, Sorva, & Risteli 2010, 70–71).

Joidenkin patologisten tilojen, kuten luustoon etäpesäkkeitä lähettävän rintasyövän ja nivelrikkojen yhteydessä on todettu muodostuvan homotrimeeristä tyypin I kollageenia, jossa normaalista poiketen kaikki kolme polypeptidiketjua ovat $\alpha 1$ -ketjuja. (Koivula ym. 2012; 921.) Myös tulehduksellisten iensairauksien yhteydessä ienfibroblastit muodostavat $\alpha 1$ -homotrimeeriä kollageenia heterotrimeerin tyypin I ja III kollageenien sijasta (Narayanan & Page 1976, 5464, 5470), mutta kliinistä merkitystä ilmiölle ei vielä ole. Homotrimeerisen kollageenin mineralisoituminen on vähäistä ja rakennetta stabiloivat poikkisiltarakenteet poikkeavat intaktista muodosta, minkä vuoksi se on haurasta ja heikompaa verrattuna terveeseen tukikudokseen (Han ym. 2008, 123).

Aggressiivista rintasyöpää sairastavien henkilöiden seerumista on löydetty huomattavan korkeita PINP-pitoisuuksia verrattuna terveiden aikuisten PINP/PICP-tasoihin, ja PINP-ylimäärän onkin arveltu johtuvan homotrimeerin variantin (hotPINP) erittymisestä vereen. (Kauppila, Jukkola, Melkko, Risteli, Turpeenniemi-Hujanen, Vuorinen & Risteli 2001, 2293, 2295; Clouth & Oremek 2011, 2–3.) Sairauksien diagnostiikan kannalta olisi erittäin hyödyllistä, jos molempien trimeeristen antigeenien pitoisuudet voitaisiin määrittää erikseen ilman, että ne on ensin eroteltu kromatografisesti toisistaan. Saatavilla olevilla immunologisilla analysointimenetelmillä se ei kuitenkaan ole mahdollista. (Kauppila ym. 2001, 2296.)

2.1.2 Nykyiset kaupalliset PINP-määritysmenetelmät

Tällä hetkellä markkinoilla on tarjolla kaksi automatisoitua PINP-analysointimenetelmää, intakti-PINP (Immunodiagnostic Systems) ja totaali-PINP (Roche Diagnostic). Intakti-PINP on kehitetty mittaamaan ainoastaan trimeeristä antigeeniä, kun taas totaali-PINP tunnistaa näytteestä myös monomeerin. Totaalimenetelmän kehittämisen taustalla ovat aikaisemmat tutkimustulokset, joiden perusteella intakti-PINP hajoaa verenkierrossa lämpötilan vaikutuksesta monomeeriksi. Myöhemmin on kuitenkin todettu, ettei trimeerisen variantin denaturoitumisella ole yhteyttä monomeerin esiintymiselle seerumissa. (Koivula ym. 2010, 1454, 1456; Koivula ym. 2012, 923.)

Kliinisesti tärkein ero kahden menetelmän välillä on se, ettei totaali-PINP sovellu munuaispotilaiden näytteiden analysoimiseen. Normaalisti pienikokoiset peptidit pilkkoutuvat ja suodattuvat primäärivirtsaan munuaisten hiussuonikeräissä. Koska dialyysihoidolla ei täysin pystytä korvaamaan terveiden munuaisten suodatusominaisuuksia, munuaispotilaiden seerumissa voi olla moninkertainen pitoisuus monomeeriä verrattuna intaktiin muotoon. Näin ollen totaali-PINP-menetelmällä mitatut korkeat PINP-arvot eivät anna todellista kuvaa luunmuodostumisnopeudesta. Intakti-PINP-menetelmällä saataviin arvoihin korkeilla monomeeripitoisuuksilla ei sen sijaan ole kliinisesti merkittävää vaikutusta, sillä ristireagointi trimeerisen muodon kanssa jää erittäin vähäiseksi. (Koivula 2010, 1456; Koivula ym. 2012, 922.)

2.1.3 Kollageenien denaturaatio

Denaturoitumisella tarkoitetaan proteiinien sekundääri- ja tertiäärirakenteiden tuhoutumista niitä koossa pitävien sidosten katketessa jonkin ulkoisen tekijän vaikutuksesta. Proteiinin primäärirakenne eli yksittäinen polypeptidiketju pysyy muuttumattomana, sillä ilmiönä denaturaatio ei ole tarpeeksi voimakas katkaistakseen aminohappojen välisiä vahvoja peptidisidoksia. Denaturoituminen voidaan aiheuttaa esimerkiksi nostamalla lämpötilaa, käyttämällä eri entsyymejä ja pelkistimiä, pH-muutoksilla tai UV-säteilyn avulla. Konformaation muuttuessa proteiinit menettävät samalla toiminnalliset ominaisuutensa. (Ophardt 2003, hakupäivä 2.11.2013; Bettelheim, Brown, Campbell & Farrell 2007, 575–579.)

Säikeisen kollageenin muodostavat yksittäiset molekyylit rakentuvat kolmesta toistensa ympärille kietoutuneesta polypeptidiketjusta. Ketjujen väliset vetysidokset sekä poikittaiset, kovalenttiset ristisidokset helikaalisten alueiden välillä stabiloivat kollageenisäikeet kestämään suurta rasitusta ruumiinlämpötilassa. Lämpötilan noustessa kineettinen energia kasvaa ja lisääntyvä värinä vaurioittaa molekyyliden välisiä sidoksia sekä ketjujen sisäisiä vuorovaikutuksia. Tällöin kolmoiskierteinen kollageeni hajoaa ja polypeptidiketjut irtoavat toisistaan. Lämpötilan laskiessa takaisin lähele ruumiinlämpötilaa polypeptidiketjut palautuvat spontaanisti alkuperäiseen helikaaliseen konformaatioonsa. Tätä ilmiötä kutsutaan proteiinien renaturoitumiseksi. (Bettelheim ym. 2007, 575–579; Murray, Bender, Botham, Kennelly, Rodwell & Wei 2012, 38–39.)

Denaturaation vaikutusta antigeeniin voidaan tutkia laboratorio-olosuhteissa koeputkessa (*in vitro*). Vasta-aineen sitoutumiskohta eli epitooppi on antigeenin pinnalla oleva, usein muutamasta aminohaposta tai monosakkaridista koostuva alue. Antigeenissä voi olla lukematon määrä eri epi-

tooppeja, ja vasta-aineiden kyky sitoutua antigeeniin on riippuvainen epitoopin kolmiulotteisesta rakenteesta. Mikäli epitooppi on lineaarinen eli lyhyt yksittäinen jatkuva ketju, denaturointi ei todennäköisesti vaikuta sen ominaisuuksiin. Konformaationaalinen epitooppi sen sijaan muodostuu useammasta antigeenin alueesta, ja antigeenin tertiäärirakenteen tuhoutuessa epitooppi menettää kykynsä sitoa vasta-ainetta. Määrittämällä vasta-aineiden sitoutuminen ennen ja jälkeen denaturoinnin saadaan tietoa antigeeni-vasta-aine-kompleksista. (Chemicon International Inc., hakupäivä 8.11.2013.)

Tässä opinnäytetyössä määritettävä antigeeni eli PINP denaturoitiin pitämällä tutkittavia näytteitä lämpöhauteessa +70 °C:ssa kymmenen minuutin ajan. PINP:n denaturoituessa trimeeri rakenne hajoaa ja α -ketjut irtoavat toisistaan (Risteli, Kauppila, Jukkola, Marjoniemi, Melkko & Risteli 2002, 117).

2.2 Monoklonaaliset vasta-aineet

Monoklonaaliset vasta-aineet (mAb) ovat rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan identtisiä, soluviljelyn avulla monistettuja immunoglobuliineja, joita käytetään yleisesti lääketieteellisissä ja farmakologisissa menetelmissä ja esimerkiksi syöpähoidoissa. Laaja-alainen käyttö perustuu vasta-aineiden kykyyn sitoutua spesifisesti vain yhdenlaiseen antigeenin pinnalla olevaan epitooppiin aina samanlaisella affiniteetillä. Lisäksi mAb:ja pystytään pakastamaan ja sulattamaan käyttöä varten ilman uudelleenkarakterisointia, mikä tuo huomattavan edun verrattuna esimerkiksi polyklonaalisiin vasta-aineisiin. (Janeway, Travers, Walport & Shlomchik 2005, 698; Zhang, Chen, Liu & Qian 2007, 89; Kindt, Goldby & Osborne 2007, 106; Kricka & Wild 2010, 150.)

Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan laboratorio-olosuhteissa fuusioimalla pernan soluja myeloomasolujen kanssa niin sanotuiksi hybridoomasoluiksi. Kun koe-eläin immunisoidaan halutulla antigeenillä, eläimen immuunijärjestelmä aktivoituu ja pernan B-lymfosyyteissa käynnistyy vastaainetuotanto vierasta proteiinia vastaan. Muutaman päivän kuluttua perna poistetaan ja siitä saatavat solut siirretään solususpensioon yhdessä myeloomasolujen eli loputtomasti jakaantuvien syöpäsolujen kanssa. Fuusioitumista edistetään käsittelemällä solususpensiota esimerkiksi polyetyleeniglykolilla, joka mahdollistaa yhdistymisen muuttamalla solujen plasmamembraanin rakennetta. Fuusioituneilla hybridoomasoluilla on sekä syöpäsolun että pernasolun ominaisuuksia. (Janeway ym. 2005, 697–698.)

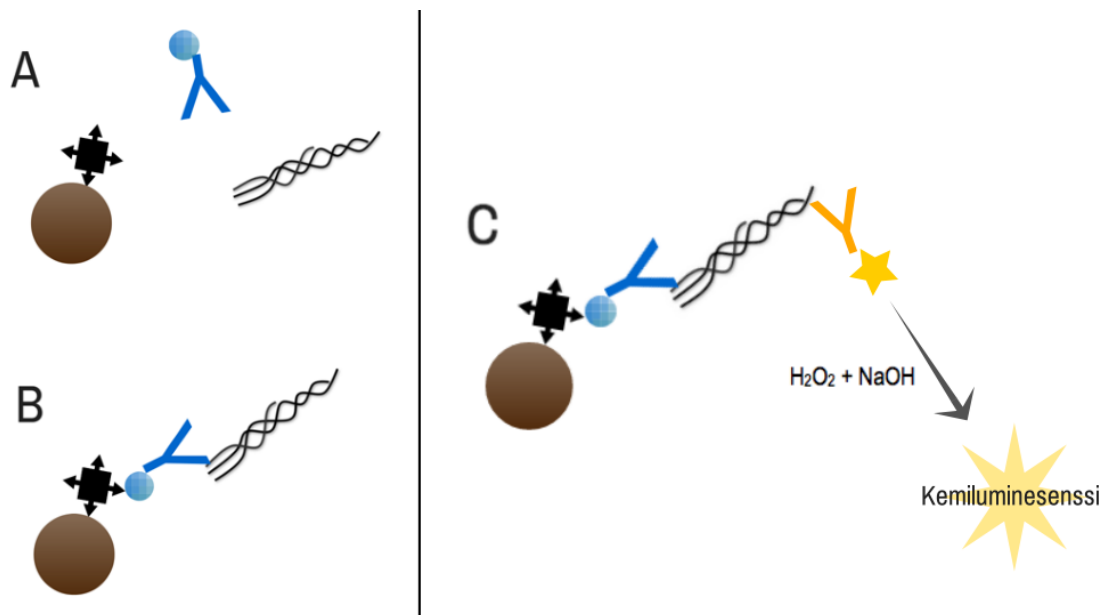
Hybridomasolut erotellaan fuusioitumattomista soluista inkuboimalla solususpensiota HAT (hypoksantiini-aminopteriini-tymidiini)-kasvatusliuoksessa. Liuoksen sisältämä aminopteriini estää DNA-synteesin myeloomasoluissa ja fuusioitumattomat pernan B-solut kuolevat muutaman päivän kuluttua monistuttuaan rajallisesti vaihtoehtoisen DNA-synteesireitin kautta, joten ainoastaan fuusioituneet solut pysyvät elinkelpoisina. Koska immunisoituneet solut muodostavat useita erilaisia vasta-ainemolekyylejä antigeenin eri epitoppeja kohtaan, yksittäiset solut erotellaan 96-kuoppalevylle ja haluttua vasta-ainetta tuottavat hybridomasolut seulotaan kloonauksen varten esimerkiksi ELISA:n (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) avulla. Kloonamalla valittuja solulinjoja voidaan käytännössä tuottaa rajattomasti yhdestä solusta peräisin olevaa monoklonaalista vasta-ainetta. (Liddell 2005, 150; Kindt ym. 2007, 105, 155.)

2.3 Sandwich-CLIA

Tässä opinnäytetyössä käytetyn automaattisen IDS-iSYS-analysaattorin analysointimenetelmä perustuu kemiluminesenssiin (chemiluminescence immunoassay, CLIA) eli näkyvän valon emittoitumiseen kemiallisten reaktioiden seurauksena. Monoklonaaliseen vasta-aineeseen merkkiaineksi liitetty akridiumesteri hajoaa alkalisissa olosuhteissa epästabiileiksi välituotteiksi, joiden hajoamisessa muodostuu valoa. Näkyvän valon intensiteetti mitataan analysaattorilla luminometrin avulla ja emittoituneen valon määrä on suoraan verrannollinen mitattavan aineen eli antigeenin pitoisuuteen. iSYS ilmoittaa mittaustuloksen RLU-arvona (relative light units).

Tässä opinnäytetyön menetelmässä mitattava antigeeni sidotaan streptavidiinillä avulla rautaoksidia sisältäviin paramagneettipartikkeleihin. Paramagnetismilla tarkoitetaan atomien dipolimomentista johtuvaa magneettisuuden muotoa, joka ilmenee ainoastaan ulkoisen magneettikentän vaikuttaessa aineeseen. Ilman ulkoista magneettikenttää paramagneettiset mikropartikkelit käyttäytyvät kuten mikä tahansa aine ja liikkuvat reaktioseoksessa vapaasti. Streptavidiini on puolestaan bakteerien tuottama proteiini, jossa on neljä sitoutumiskohtaa biotiinille. Streptavidiini sitoo biotiinia erittäin suurella affiniteetillä ja spesifisyydellä, joten proteiinilla päällystettyjen paramagneettipartikkeleiden avulla näytematriksista voidaan sitoa biotinyloituja molekyylejä, tässä tapauksessa monoklonaalisia vasta-aineita. Biotinylointi ei heikennä proteiinien biologista aktiivisuutta, minkä vuoksi streptavidiini-biotiinikompleksia käytetään laajasti bioteknologiassa sekä immunologisissa määrityksissä. (Kricka & Wild 2005, 205.)

Sandwich-CLIA:ksi kutsutun menetelmän toimintaperiaate on esitetty kaavamaisesti kuviossa 2. Biotinyloitu monoklonaalinen vasta-aine (B-mAb) sitoutuu affiniteettinsa mukaisesti inkuboinnin aikana reaktioseoksessa mitattavaan antigeeniin eli PINP:n johonkin varianttimuotoon (intakti/hot/het/monomeeri) ja akridiumesterillä leimattu monoklonaalinen vasta-aine (L-mAb) antigeenin vastakkaiselle puolelle. Streptavidiinipäällysteiset paramagneettipartikkelit sitovat edellä esitetyn kompleksin matriksista. Mikropartikkelit siirretään reaktioastian eli kyvetin reunaan magneettikentän avulla ja kaikki sitoutumaton aines pestään pois. Kyvetiin lisätyn vetyperoksidin ja natriumhydroksidin vaikutuksesta akridiumesteri hajoaa lähettäen valoa, joka havaitaan luminometrialä. Emittoituneen valon määrä ja siten myös tulokseksi saatava RLU-arvo on sitä suurempi, mitä enemmän reaktioseoksessa on mitattavaa antigeeniä. (Immunodiagnostic Systems 2011, 8, 13.)

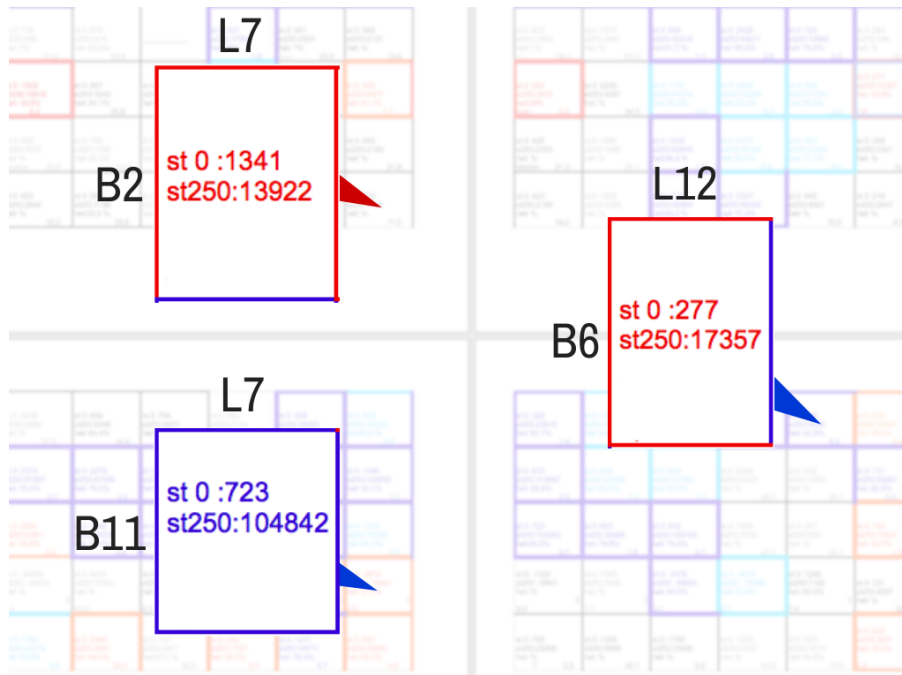


KUVIO 2. Sandwich-CLIA:n toimintaperiaate (mukaillen: Koivula 2006, 45). Kaaviossa käytetyt merkinnät ovat: ruskea ympyrä = paramagneettipartikkeli, musta nuolilla merkitty neliö = streptavidiini, sinisellä ympyrällä merkitty Y-kirjain = biotinyloitu vasta-aine, tähdellä merkitty Y-kirjain = akridiumesterillä leimattu vasta-aine, musta molekyyli = PINP, H₂O₂ = vetyperoksidi ja NaOH = natriumhydroksidi.

2.3.1 Monoklonaalisten vasta-aineiden valinta

Tässä opinnäytetyössä käytetyt kolme monoklonaalista vasta-aineparia on valittu Juha Ristelin tutkimusryhmässä tehdyn taulukon perusteella (kuvio 3). Ristelin ryhmässä 2000-luvun alussa tutkittiin kolmeatoista Orion Diagnostican tuottamaa intakti-PINP:iin sitoutuvaa monoklonaalista vasta-ainetta, jotka olivat joko biotinyloitu tai leimattu akridiumesterillä. Vasta-aineista saatiin yhteensä 169 erilaista leimaparia, joiden sitoutuminen heterotrimeeriseen ja homotrimeeriseen PINP-varianttiin mitattiin käyttämällä streptavidiinilla päällystettyjä 96-kuoppalevyjä ja Victor²-merkkistä multicounteria. Vasta-ainepareista seitsemän sitoutui ensisijaisesti homotrimeeriseen PINP-varianttiin. Edellä mainituista vasta-ainepareista tähän opinnäytetyöhön valittiin kaksi: L-mAb12 ja B-mAb6 sekä L-mAb7 ja B-mAb2 (hot-parit). Lisäksi valittiin yksi heterotrimeeristä PINP:tä suosiva niin sanottu intakti vasta-ainepari, L-mAb7 ja B-mAb11. (Marjoniemi, Hakalahti, Immonen, Niemi, Novamo & Risteli 2001, S246.)

Tässä opinnäytetyössä PINP:n eri variantteja puhdistettiin pleura- ja askitesnesteestä. Koska hotPINP sisältää 50 % enemmän negatiivisesti varautuneita fosfaattiryhmiä verrattuna heterotrimeeriin, suurin osa hotPINP:stä saatiin eroteltua ioninvaihtokromatografian (DEAE) avulla matalassa pH:ssa (5,0). Lisäksi erotteluun käytettiin muun muassa geelisuodatusta ja hydrofobista kromatografiaa. Puhdistamisesta on kerrottu tarkemmin luvussa 3.2.



KUVIO 3. Leimaparien L-mAb12 ja B-mAb6, L-mAb7 ja B-mAb2 sekä L-mAb7 ja B-mAb11 valitseminen heterotrimeriseen ja homotrimeriseen PINP-varianttiin sitoutumisen perusteella. Kuviossa käytetyt lyhenteet ovat: st 0 = taustan RLU-arvo testausvaiheessa ja st250 = korkean standardin RLU-arvo testausvaiheessa.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Tämän opinnäytetyön kokeellinen laboratorio-osuus tehtiin Oulun yliopiston Diagnostiikan laitoksen Kliinisen kemian laboratoriossa kevään 2013 aikana. Työn tarkoituksena oli verrata kolmea eri mAb-paria mitattaessa PINP:n eri varianttimuotoja IDS-iSYS-analysaattorilla. Tavoitteena oli löytää optimoinnin avulla pitoisuudet sekä vasta-ainepareille että tutkittaville antigeeneille siten, että hotPINP-vasta-aineparien sitoutuminen homotrimeeriin antigeeniin olisi mahdollisimman spesifistä. Vastaavasti tavoitteena oli optimoida intakti-PINP-vasta-ainepari sitomaan spesifisesti hetPINP näytematriksista. Tämän lisäksi mielenkiinnon kohteena oli selvittää, poikkeavatko opinnäytetyössä käytettyjen preparaattien antigeenit toisistaan, ja kiinnittyvätkö tutkimuksen kohteena olevat leimatut vasta-aineet eri soluviljelynäytteiden antigeeneihin.

Kokeellisen osuuden lähtökohdaksi asetettiin viisi tutkimuskysymystä:

1. Miten mAb-parien pitoisuudet optimoidaan mitattaessa sandwich-CLIA-menetelmällä?
2. Miten eri antigeenien pitoisuudet optimoidaan?
3. Miten eri lähtömateriaaleista puhdistetut preparaatit eroavat toisistaan?
4. Miten antigeenien denaturaatio vaikuttaa vasta-aineiden sitoutumiseen?
5. Voidaanko eri mAb-pareja hyödyntää soluviljelynäytteiden tutkimisessa?

3.1 Käytetyt reagenssit ja triggerit

Tässä opinnäytetyössä käytettiin kahta aikaisemmin laboratoriossa leimattua vasta-aineparia (L-mAb7 ja B-mAb2 sekä L-mAb7 ja B-mAb1) ja tässä työssä leimattua vasta-aineparia (L-mAb12 ja B-mAb6). Kaikki työssä käytetyt vasta-aineet ovat Orion Diagnostican tuottamia. Leimauksessa käytettiin pääasiassa Ristelin laboratoriossa itse valmistettuja liuoksia ja puskureita, jotka on koottu liitteeseen 1. Näytteiden analysoimisessa tarvittavat reagenssikitit koottiin itse ja niiden sisällöstä on kerrottu tarkemmin seuraavissa luvuissa.

Määrittämiä varten IDS-iSYS-analysaattorilla käytettiin kaupallisia systeemi- ja pesuaineliuoksia, joita tarvitaan analyysien aikana kyvettien, nestetilojen, neulojen sekä magneettipartikkelien pesuun ja huuhteluun. Lisäksi käytettiin kaupallisia A ja B trigger-liuoksia, jotka analysaattori lisää automaattisesti kyvetteihin luminometrillä. Trigger A:n sisältämä happamaan liuokseen laimennet-

tu vetyperoksidi sekä trigger B:n laimea natriumhydroksidi yhdessä aikaansaavat akridiumesterin virittymisen korkeampaan, epästabiliin energiatilaan. Luminometrillä mitattava valo on peräisin akridiumesterin viritystilan purkautumisesta. (Immunodiagnostic Systems 2011, 8, 12.)

Osana laadunvarmistusta laitteella käytettiin päivittäisten huoltotoimenpiteiden yhteydessä CCS-testikasettia (Cartridge Check System) analysaattorin eri moduulien toiminnan tarkistamiseen ja taustasignaalien mittaamiseen. Kaupallinen CCS-kasetti koostuu viidestä reagenssista, joita laite käyttää yhdessä systeemi- ja pesuaineliuosten kanssa laitteelle valmiiksi ohjelmoidun testausohjelman ajamiseen. Ohjelmaan kuuluu esimerkiksi taustasignaalien mittaaminen ja pipetointitilavuuksien tarkistaminen. Testausohjelmassa mitatut RLU-arvot siirretään Excel-laskentataulukkoon, jossa tulokset lasketaan ja analysoidaan automaattisesti. Mikäli tulokset ovat kaikilla osa-alueilla hyväksytyissä rajoissa, laite on toimintakunnossa varsinaisten näytteiden analysointia varten. (Immunodiagnostic Systems 2011, 45–48.)

Itse koottujen kittien lisäksi analysaattorilla käytettiin kaupallista Human Intact PINP -kittiä (Immunodiagnostic Systems) referenssinä antigeeninäytteiden testausvaiheessa. Kitti koostuu viidestä reagenssipullosta, jotka sisältävät analyseissä käytettävät leimatut monoklonaaliset vastaaineet, puskurin sekä liuottimen näytteiden laimentamista varten. Lisäksi kitti sisältää PBS:ään (Phosphate Buffered Saline) laimennetut streptavidinipäälysteiset paramagneettipartikkelit (Seradyn Streptavidin Speedbeads).

3.2 Preparaattien puhdistaminen ja antigeenipitoisuuden analysoiminen

Het- ja hotPINP-näytteet puhdistettiin Ristelin tutkimusryhmässä pleura- ja askitesnesteestä. Preparaatit on kerätty Oulun yliopistollisen sairaalan röntgenin ja eri vuodeosastojen potilaiden ylijäämänäytteistä vuoden 2011 aikana. Keräystä varten on saatu ylilääkärin myöntämä ylijäämänäytteiden käyttö lupa.

Sulatetut preparaatit suodatettiin ja saostettiin ammoniumsulfaatilla (NH_4SO_4). Sentrifugoinnissa erottunut sakka liuotettiin tislattuun veteen ja dialysoitiin kolmeen kertaan sekä tislattua vettä että ammoniumasetaattia (pH 5,0) puskurina käyttäen. Dialysoitu näyte sentrifugoitiin ja sakka puhdistettiin ioninvaihtokromatografialla (DEAE). Eluutiopuskurista kerätyistä fraktioista mitattiin antigeenipitoisuudet SP15-RIA:lla (radioimmunoassay) ja saatujen arvojen perusteella fraktiot yhdistettiin erillisiksi het- ja hot-PINP-näytteiksi. Näytteet dialysoitiin ja kuivattiin lyofilisoimalla näytteitä

yön yli. Lyofilisoinnin jälkeen näytteiden puhdistamista jatkettiin geelifiltraatiolla, korkeapainenes-tekromatografialla (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) ja käänteiskromatografialla (Reversed Phase Chromatography). Jokaisen puhdistusvaiheen jälkeen kerätyistä fraktioista mitattiin antigeenipitoisuus SP15-RIA:lla ja vain osa fraktioista siirrettiin seuraavaan puhdistusvaiheeseen.

Eri PINP-näytteiden antigeenipitoisuus arvioitiin mittaamalla tislattuun veteen laimennettujen näytteiden RLU-arvot kaupallisella intakti-PINP-menetelmällä. Lisäksi pleuranesteestä puhdistettujen PINP-näytteiden proteiinipitoisuus mitattiin Merck Milliporen Direct Detect -analysointimenetelmällä. Menetelmä perustuu infrapunaspektroskopiaan, jossa proteiinitietojen rakenne karakterisoidaan spektriin hajotetun säteilyn avulla. Molekyylit absorboivat säteilyä tietyllä frekvenssillä, ja mittaamalla aminosidoksiin spesifisesti imeytyvän säteilyn määrä voidaan laskea näytteen kokonaisproteiinipitoisuus ilman erillistä aminohappoanalyysiä. (Merck Millipore 2014, hakupäivä 25.2.2014.)

Kahden sekä pleura- että askitesnesteestä puhdistetun het- ja hotPINP-näytteen puhtautta sekä näytteiden sisältämiä proteiinitietuja arvioitiin PAGE:n (polyakryyliamidigeelielektroforeesi) avulla. Elektroforeesissa negatiivisesti varautuneet molekyylit liikkuvat geelissä sähkövirran vaikutuksesta kohti positiivista elektrodia ja järjestäytyvät molekyylipainonsa mukaisesti. PAGE-ajoa varten näytteet denaturoitiin lämpöhauteessa (+70 °C) 10 minuutin ajan ja pelkistettiin DTE:llä (dithioerythritol).

3.3 Vasta-aineen biotinylointi

MAb6 biotinyloitiin itse laboratorion ohjeen mukaisesti. Biotinylointi aloitettiin vaihtamalla vastaaineliuoksen liuottimen tilalle biotinylointipuskuri (liite 1) ultrasuodattamalla. Ultrasuodatus perustuu nesteen kulkeutumiseen paine-eron avulla huokoisen kalvon läpi. Kalvon mikrohuokoset estävät suurikokoisia hiukkasia ja molekyylejä, kuten proteiineja, kulkeutumasta suodokseen. Suodatukseen käytettiin Milliporen ULTRAFREE-4-putkea.

Suodatetun vastaaineliuoksen proteiinipitoisuus arvioitiin mittaamalla suodoksen absorbanssi spektrofotometrillä aallonpituudella 280 nm ($A_{280 \text{ nm}}$) ja tarvittavan biotiinin määrä laskettiin Thermo Scientificin ohjeen mukaan. Leimaukseen käytettiin sulfo-NHS-LC-biotiiniä (Pierce Chemical Co.), joka liuotettiin tislattuun veteen.

Koska biotiinia lisättiin ylimäärin, reaktioseokseen vapaaksi jäänyt biotiini eroteltiin leimatusta vasta-aineesta geelisuodatuskromatografialla geelipylväässä. Puhdistaminen perustuu eri kokoisten ja muotoisten molekyylien liikkumiseen agarosigeelissä nesteen mukana eri nopeuksilla. Mitä pienempiä molekyylit ovat, sitä hitaammin ne geelissä liikkuvat, sillä pienikokoiset molekyylit mahtuvat geelin mikrohuokosiin ja niiden kulkeutuminen hidastuu. Geelinä käytettiin Pharmacia Biotechin Sepharose 6B -geeliä. Geelipylvään läpi pumpatusta eluointipuskurista (liite 1) kerättiin fraktionkerääjällä 80 fraktiota, joiden proteiinipitoisuus mitattiin spektrofotometrillä ($A_{280 \text{ nm}}$).

Puhdistetun B-mAb6-poolin proteiinipitoisuus arvioitiin Bio-Radin DC Protein Assay -menetelmällä. Kolorimetrisessä menetelmässä 0,9 % NaCl-liuoksella laimennetut näytteet sekä standardit pipetoitiin kuoppalevyille yhdessä reagenssien A ja B kanssa. Reagenssien sisältämien kuparitartraatin sekä laimean Folin-reagenssin reagoidessa aminohappojen kanssa alkalisissa olosuhteissa muodostuu sininen värireaktio, jonka intensiteetti on suoraan verrannollinen näytteen proteiinipitoisuuteen. Näytteiden sekä standardien intensiteetti mitattiin spektrofotometrillä ($A_{780 \text{ nm}}$). Lisäksi mitattiin taustan eli laimentamiseen käytetyn 0,9 % NaCl-liuoksen absorbanssi.

3.4 Vasta-aineen leimaaminen akridiumesterillä

MAb12 leimattiin akridiumesterillä laboratorion oman ohjeen mukaan. Ennen leimausta vasta-aineliuoksen liuotin vaihdettiin AcE-leimauspuskuriin (liite 1) ultrasuodatuksella. Suodatetun vasta-aineliuoksen proteiinipitoisuus arvioitiin spektrofotometrillä ($A_{280 \text{ nm}}$) tarvittavan akridiumesterin määrän laskemiseksi. Vasta-aineen leimaamiseen käytettiin acridium-4'-NHS in dimethylformamide -liuosta (Immunodiagnostic Systems). Leiman lisäämisen jälkeen reaktion annettiin edetä tunnin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen se pysäytettiin lisäämällä seokseen 1 M etanoli-amiiniliuosta (pH 8). Vapaaksi jäänyt akridiumesteri sitoutuu etanoliamiinin aminoryhmiin (Bangs Laboratorios, Inc. 2002, hakupäivä 30.1.2014).

Leimattu vasta-aine puhdistettiin geelisuodatuskromatografialla Superdex 2000 -agarosigeelillä (Pharmacia Biotech) pakatussa pylväässä. Eluointipuskuria (liite 1) kerättiin fraktionkerääjällä yhteensä 90 fraktiota, joiden absorbanssit mitattiin spektrofotometrillä ($A_{280 \text{ nm}}$).

3.5 Leimattujen vasta-aineiden pitoisuuksien optimointi

Vasta-aineiden leimaamisen jälkeen eri leimaparien sitoutumista testattiin pleura-antigeenista puhdistettuihin het- ja hotPINP-näytteisiin. Näytteiden analysointia varten koottiin omat reagenssikitit itse valmistetuista reagensseista vastaamaan kaupallisen intakti-PINP-kitin sisältöä, lukuun ottamatta vasta-aineliuoksia. Pullojen 1 (Magnetic particles), 4 (Assay buffer) ja 5 (Diluent) sisältö pidettiin vakiona ja leimattujen vasta-aineiden pitoisuutta vaihdettiin ajojen välillä. Vasta-aineiden konsentraatio säädettiin laboratoriossa itse valmistetuilla AcE- ja Biot-Diluyenteilla (pullot 2 ja 3), jotka ominaisuuksiltaan vastasivat kaupallisen intakti-PINP-kitin leimattujen vasta-aineiden laimennosliuoksia.

Analysoitavista het- ja hotPINP-näytteistä tehtiin 1:100 näytelaimennokset laimennospuskuriin. Ensimmäisissä testiajoissa tarkistettiin, toimivatko leimatut vasta-aineparit ylipäättään halutulla tavalla, eli poikkeavatko eri leimapareilla samoista näytteistä mitatut luminesenssit toisistaan. Tuloksia verrattiin sekä laboratoriossa aikaisemmin mitattuihin sekä kaupallisella intakti-PINP-menetelmällä saatuihin tuloksiin.

Leimattujen vasta-aineiden pitoisuusoptimoinnissa testattiin, miten mAb-liuosten konsentraatioiden muuttaminen vaikuttaa näytteiden RLU-arvoihin. Jokaisella leimaparilla tehtiin useita testiajoja, joissa joko B-mAb-konsentraatio pidettiin vakiona ja L-mAb-konsentraatiota vaihdettiin täinpäinvastoin. PINP-näytteiden RLU-arvojen lisäksi huomio kiinnitettiin taustan, eli analysoinnissa käytettyjen liuosten ja puskureiden, antaman signaalin muuttumiseen.

3.6 Antigeenipitoisuuden optimointi

Antigeeninäytteiden pitoisuuden optimoimista varten kaikista kahdeksasta het- ja hotPINP-näytteestä tehtiin laimennossarjat (1:100 – 1:3200) laimentamalla näytteet laimennospuskuriin. Sarjan jokainen näyte analysoitiin kolmella eri vasta-aineparilla, joiden pitoisuudet valittiin optimoinnista saatujen tulosten perusteella.

3.7 Antigeenin denaturointi

Denaturoinnin vaikutusta antigeeni-vasta-ainekompleksin muodostumiseen testattiin denaturoimalla pleura-antigeeniä vesihauteessa (+70 °C) 10 minuutin ajan. Pleuranesteestä puhdistetuista het- ja hotPINP-näytteistä tehtiin laimennossarjat diluenttiin ja sarjan jokaisesta näytteestä mitattiin RLU-arvot sekä intaktia että tässä työssä itse leimattua hot-paria käyttäen ennen ja jälkeen denaturoinnin. Koska näytteiden renaturoitumisnopeudesta ei ollut tietoa, jokainen laimennossarja denaturoitiin ja mitattiin analyysointilaitteella yksitellen loppuun asti ennen seuraavan sarjan aloittamista. Näin vältettiin denaturoitujen näytteiden jäähtyminen ja siten mahdollinen renaturoituminen takaisin natiiviin konformaatioon ennen analyysin aikaista vasta-aineiden lisäämistä ja kiinnittymistä antigeeniin.

3.8 Soluviljelynäytteiden mittaaminen intaktilla leimaparilla

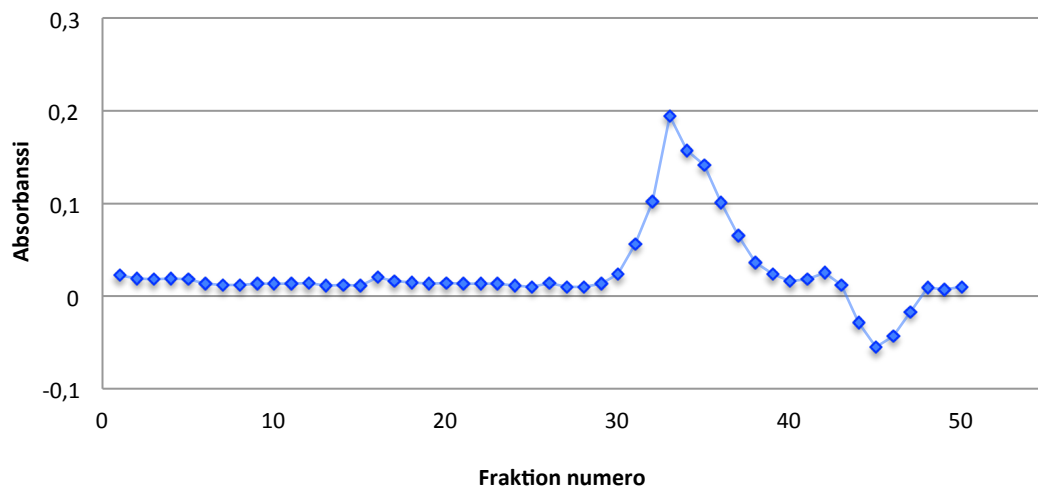
Koska useat eri solulinjat tuottavat vaihtelevassa määrin kollageenia, vasta-aineiden sitoutumista soluviljelynäytteisiin testattiin mittaamalla näytteiden RLU-arvot intaktilla leimaparilla. Analysointeihin valittiin sekä kaupallisia ATCC-solulinjoja että Ristelin tutkimusryhmässä aikaisemmin käytettyjä, alun perin OYS:n reumapotilaiden synoviaalisista fibroblasteista erilaistettuja ja monistettuja solunäytteitä. Mittauksia varten näytteet lyofilisoitiin suurempaan konsentraatioon ja dialysoitiin yön yli. Näytteet puhdistettiin HPLC:llä ja eluutiopuskurista kerätyistä fraktioista mitattiin RLU-arvot. Mittaus poikkesi het- ja hotPINP-näytteiden analysoimisesta siten, että iSYS-analyysointilaitteen analysointiohjelmasta poistettiin näytteiden automaattinen esilaimennos riittävän antigeenikonsentraation säilyttämiseksi.

4 TULOKSET

Saadut tulokset on esitetty työn alussa asetettujen tutkimuskysymysten mukaisessa järjestyksessä. Tulosten arvioimiseen ja tulkitsemiseen on käytetty apuna Ristelin ryhmässä aikaisemmin saatuja tutkimustuloksia sekä tässä työssä saatuja julkaisemattomia mittaustuloksia.

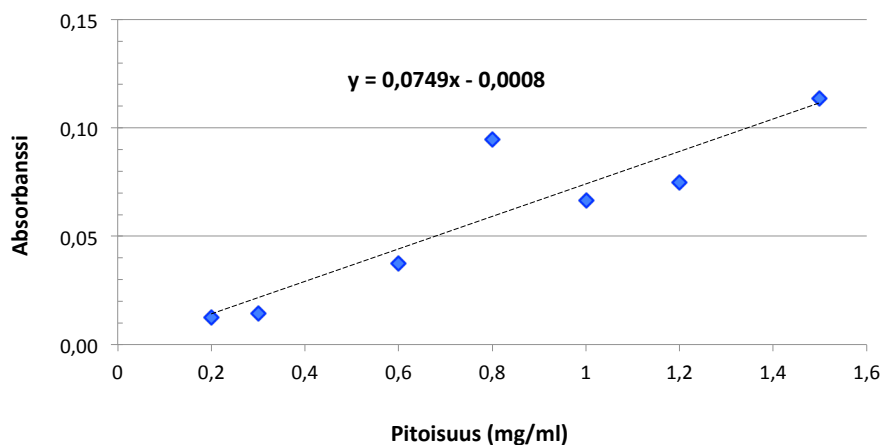
4.1 Esivalmistelut

Biotinyloidun vasta-aineen puhdistusvaiheessa kerättyjen fraktioiden absorbanssit ($A_{280\text{ nm}}$) on esitetty kuviossa 4. Pylvästä erottui kaksi piikkiä, joista ensimmäinen sisälsi kooltaan suuremman ja siten geelissä nopeammin liikkuvan biotinyloidun vasta-aineen. Piikin kymmenen huippufraktiota (fraktiot 30–39) kerättiin yhdeksi pooliksi, johon lisättiin biotinyloidun vasta-aineen säilöliuosta (liite 1).



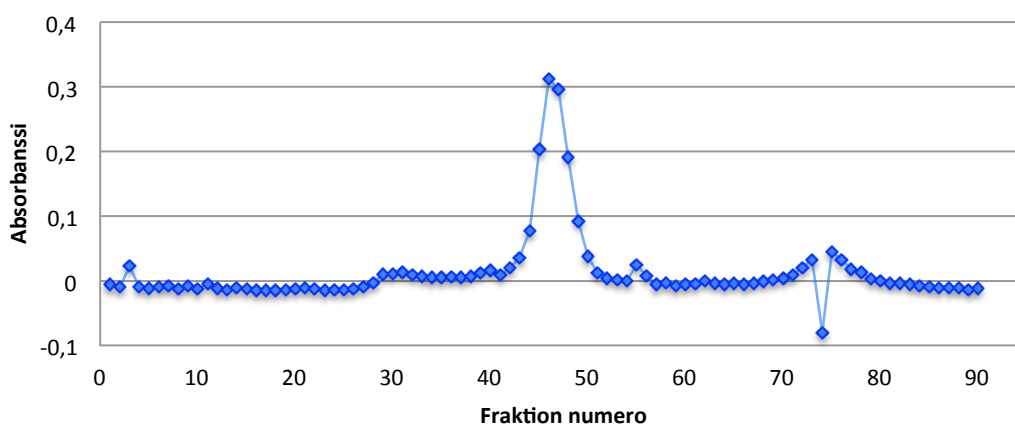
KUVIO 4. Biotinyloidun vasta-aineen puhdistuksessa kerättyjen fraktioiden absorbanssit aallonpituudella 280 nm.

B-mAb6-poolin proteiinipitoisuuden arvioinnissa spektrofotometrillä mitattujen standardien absorbanssit on esitetty kuviossa 5. Mittapisteiden kautta kulkeva kuvaaja y piirrettiin graafisella tasoituksella ja käyrän yhtälön avulla laskettiin poolin proteiinipitoisuus. Huomioimalla taustan absorbanssit pitoisuudeksi saatiin 0,78 $\mu\text{g/ml}$.



KUVIO 5. Standardien absorbanssimittaustuloksista ($A_{780\text{ nm}}$) laadittu käyrä puhdistetun B-mAb6-poolin pitoisuuden arvioimiseksi. Standardisuoran pisteessä 0,8 mg/ml on tapahtunut todennäköisesti pipetointivirhe ja piste jätettiin huomioimatta standardisuoraa käyttäessä.

Akridiumesterillä leimatun vasta-aineen puhdistuksessa kerättyjen fraktioiden absorbanssimittaustulokset on esitetty kuviossa 6. Kuviosta erottuu kolme piikkiä, joista ensimmäinen eli suurin piikki sisälsi leimatun vasta-aineen. Piikin huippufraktiot (40–50) kerättiin yhdeksi pooliksi, johon lisättiin leimakannan säilöliuos (liite 1).



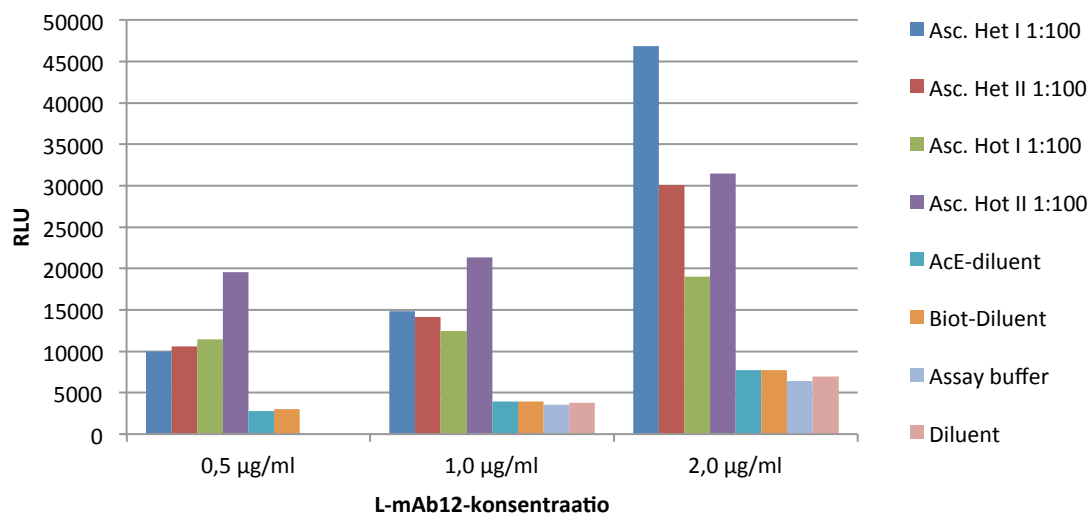
KUVIO 6. Akridiumesterillä leimatun vasta-aineen puhdistuksessa kerättyjen fraktioiden absorbanssit aallonpituudella 280 nm.

4.2 Miten mAb-parien pitoisuudet optimoidaan?

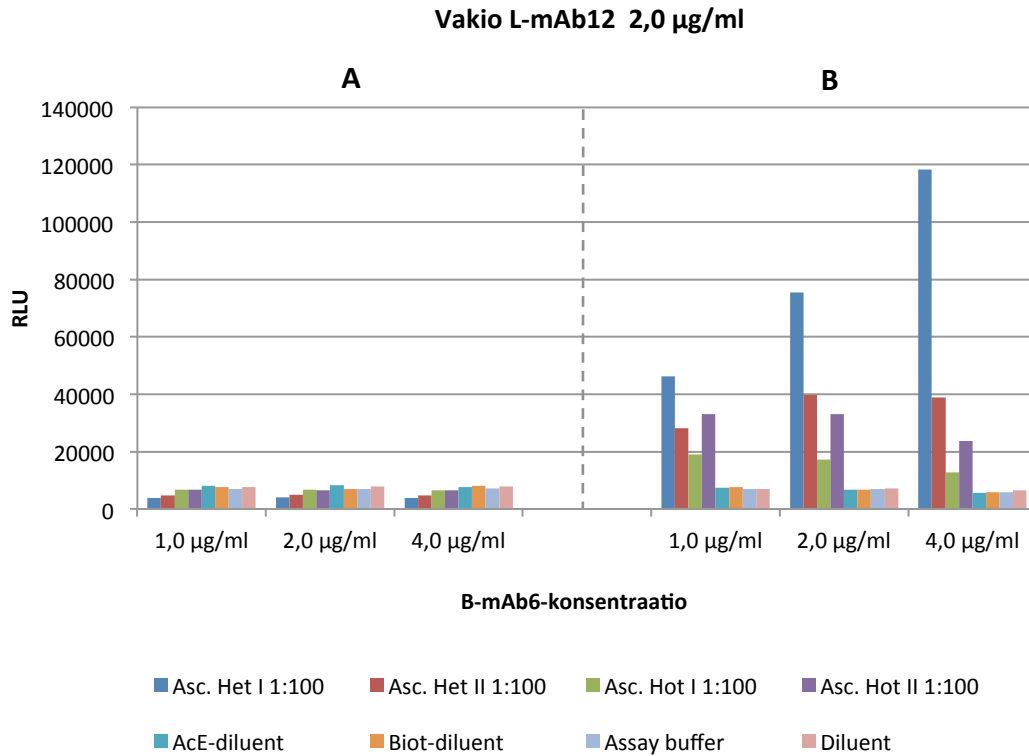
Leimattujen vasta-aineiden pitoisuusoptimointia varten analysoitujen pleura- ja askitesantigeeni-näytteiden sekä taustojen RLU-arvot on esitetty kuvioissa 7–10. Tulosten perusteella kaikille mAb-pareille valittiin pitoisuudet niin, että kyseisillä konsentraatioilla mitatessa antigeenin RLU-arvo olisi mahdollisimman korkea taustojen pysyessä kuitenkin matalalla. Tuloksista nähdään, että vasta-aineiden konsentraation muuttamisella voidaan vaikuttaa siihen, miten leimaparit sitoutuvat eri antigeenivariantteihin. Antigeeninäytteiden pitoisuusoptimointia varten leimaparit säädettiin tulosten perusteella seuraavasti: L-mAb12 pitoisuuteen 0,2 µg/ml ja B-mAb6 pitoisuuteen 1,0 µg/ml, L-mAb7 pitoisuuteen 2,0 µg/ml ja B-mAb11 pitoisuuteen 2,0 µg/ml sekä L-mAb7 pitoisuuteen 1,0 µg/ml ja B-mAb11 pitoisuuteen 2,0 µg/ml.

MAb-parien pitoisuusoptimoinnin aikana huomattiin, että leimatut vasta-aineet ovat herkkiä pakastus-sulatussyklin toistumiselle. Koska kaikkien leimaparien optimointi vei aikaa useita työpäiviä, vasta-aineliuokset pakastettiin päivän päätteeksi ja sulatettiin seuraavana aamuna uudelleen käyttöä varten. Kuviossa 8 on esitetty askitesantigeeninäytteiden RLU-arvot mitattuna hot-PINP-vasta-aineparilla L-mAb12 ja B-mAb6. Kohdassa A mittauksiin on käytetty jo aikaisempina päivinä käytössä olleita ja siten useita kertoja pakastettuja ja sulatettuja vasta-aineliuoksia. Mitattu signaali jää todella matalaksi kaikissa näytteissä ja vasta-aineiden sitoutuminen antigeeniin on jopa taustaa heikompaa. Kohdassa B samat antigeeninäytteet on analysoitu uudelleen vain kertaalleen sulatetuista vasta-aineista valmistetuilla liuoksilla. Tausta jää edelleen matalaksi, mutta nyt vasta-aineet ovat sitoutuneet antigeeninäytteisiin halutulla tavalla ja RLU-arvot ovat huomattavasti korkeammat kuin aikaisemmissa ajoissa.

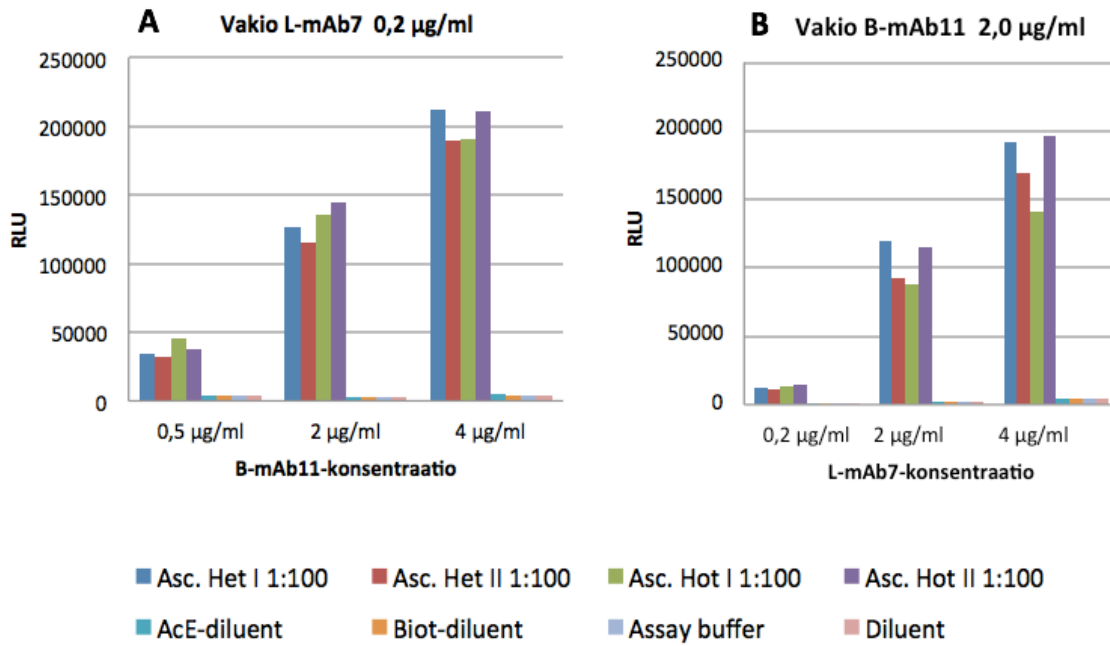
Vakio B-mAb6 1,0 µg/ml



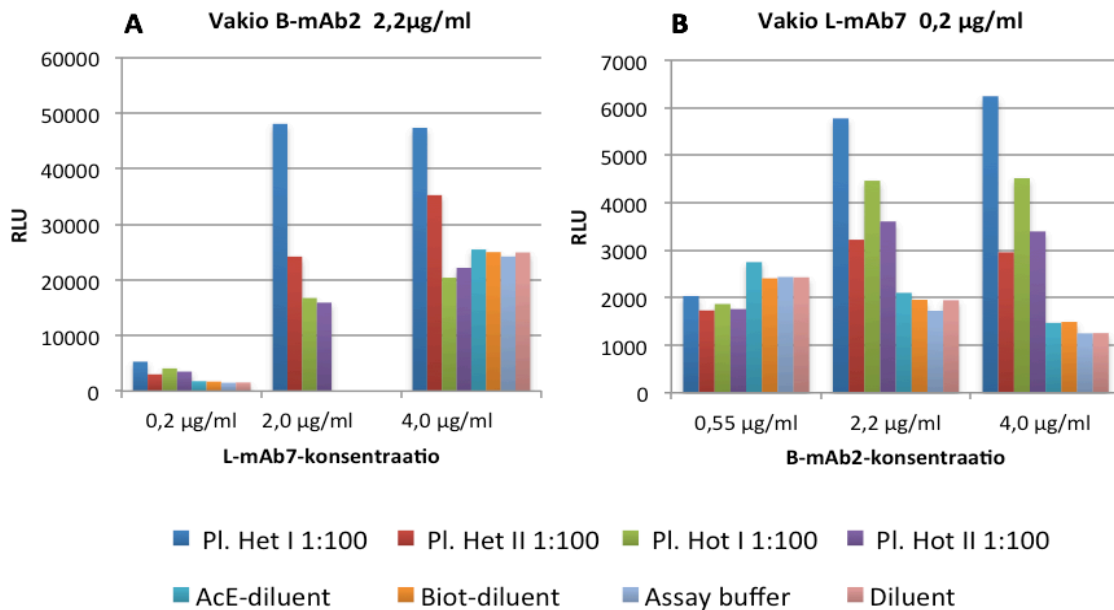
KUVIO 7. Askitesantigeeninäytteiden RLU-arvot mitattuna hot-PINP-vasta-aineparilla L-mAb12 ja B-mAb6. Kuviossa käytety lyhenteet ovat: Asc = askitesnesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I, Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II, AcE = akridiumesterileimattu ja Biot = biotinyloitu.



KUVIO 8. A: Askitesantigeeninäytteiden RLU-arvot mitattuna useaan kertaan sulatetuista vastaaineliuksista valmistetulla hot-PINP-vasta-aineparilla. B: Askitesantigeeninäytteiden RLU-arvot mitattuna uusista sulatetuista vastaaineliuksista valmistetulla hot-PINP-vasta-aineparilla. Asc = askitesnesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I, Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II, AcE = akridiumesterileimattu ja Biot = biotinyloitu.



KUVIO 9. Askitesantigeeninäytteiden RLU-arvot mitattuna intakti-PINP-vasta-aineparilla L-mAb7 ja B-mAb11. Asc = askitesnesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I, Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II, AcE = akridiumesterileimattu ja Biot = biotinyloitu.

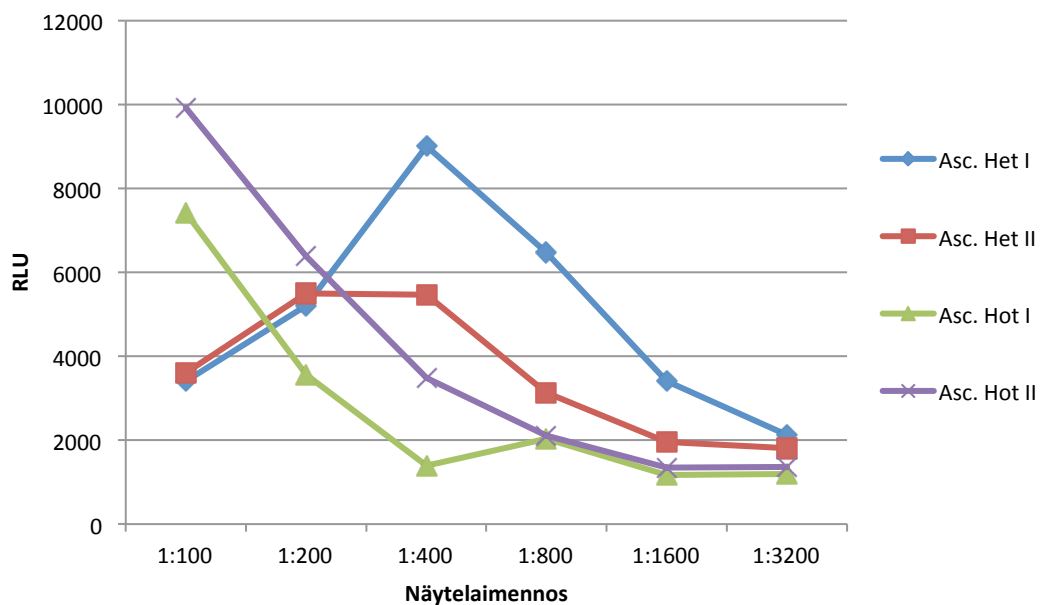


KUVIO 10. Pleura-antigeeninäytteiden RLU-arvot mitattuna hot-PINP-vasta-aineparilla L-mAb7 ja B-mAb2. Kuviossa käytety lyhenteet ovat: PI = pleuranesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I, Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II, AcE = akridiumesterileimattu ja Biot = biotinyloitu.

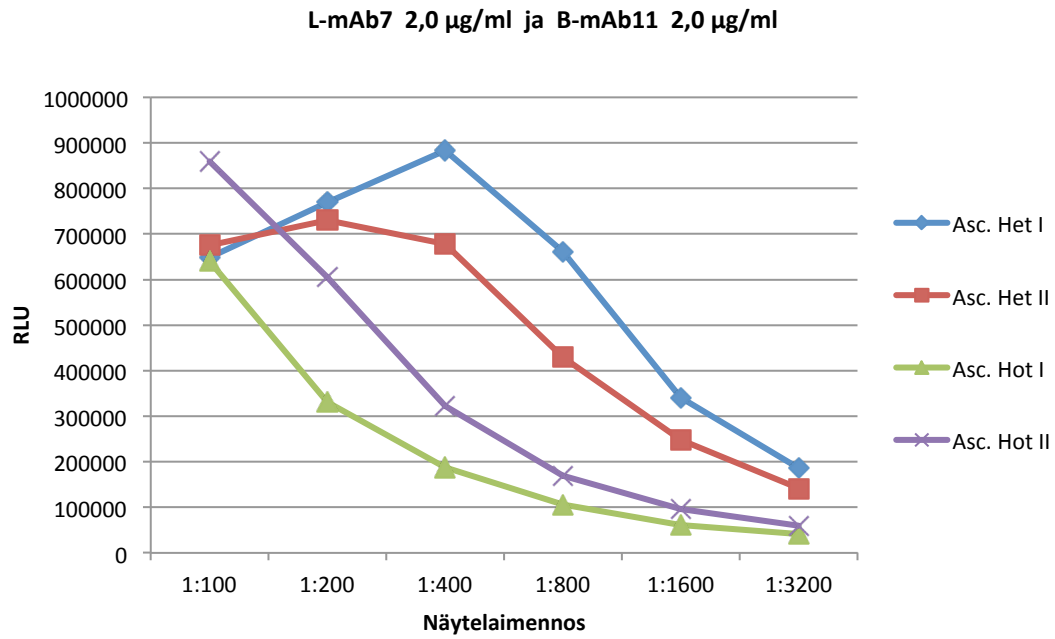
4.3 Antigeeninäytteiden pitoisuusoptimointi

Askites- ja pleura-antigeeninäytteiden titraustulokset eri leimapareilla mitattuna on esitetty kuvioissa 11–16. Tulosten perusteella kaikki näytteet titrautuvat hyvin, eli mitattu luminesenssi pienee näytepitoisuuden laimettaessa. Tässä työssä optimoitu antigeenin näytepitoisuus valitaan alueelta, jossa käyrä laskee lineaarisesti. Koska het- ja hotPINP-näytteiden pitoisuuksia ei säädetty vastaamaan toisiaan ennen optimointia, hetPINP-näytteiden kohdalla on havaittavissa hook-efekti 1/100–1/400 laimennussuhteissa lähes kaikilla vasta-ainepareilla mitattuna. Ilmiö näkyy kuvioissa 11–12 ja 14–15 punaisella ja sinisellä käyrällä. Hook-efektillä tarkoitetaan tilannetta, jossa korkea analyytin arvo antaa valheellisen negatiivisen tuloksen tai liian matalan signaalin, koska ylimäärä mitattavaa antigeeniä suhteessa kiinnittyviin vasta-aineisiin häiritsee mittaustuloksen antavan vasta-aine-antigeeni-merkkiaine-kompleksin muodostumista. (Davies 2005, 112.)

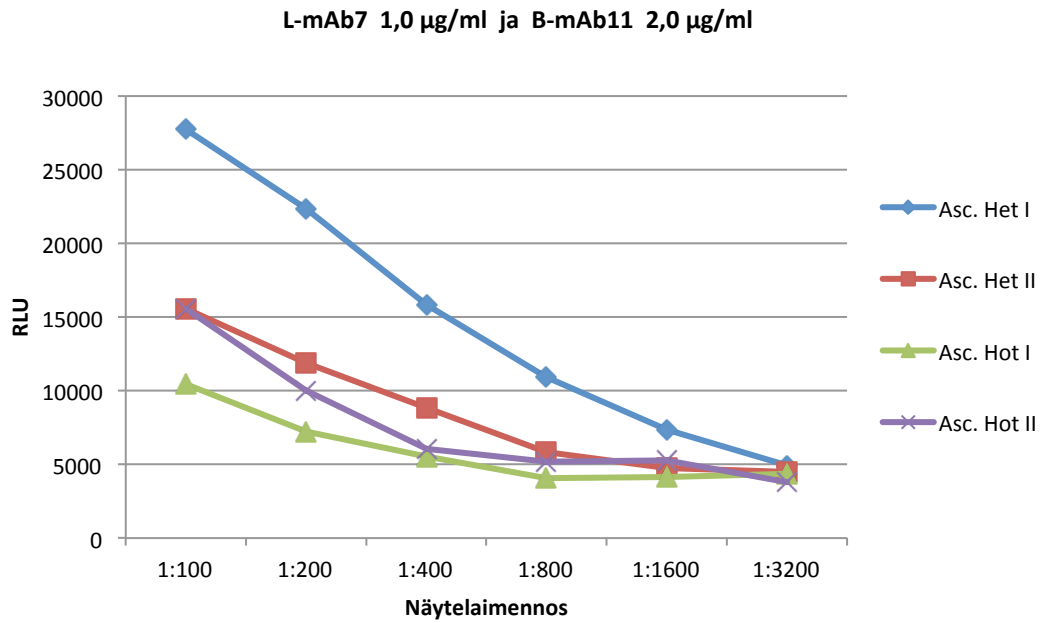
L-mAb12 0,2 µg/ml ja B-mAb6 1,0 µg/ml



KUVIO 11. Askitesantigeenin titraustulokset Hot-PINP-vasta-aineparilla L-mAb12 ja B-mAb6. Kuviossa käytetyt lyhenteet ovat: Asc. = askitesnesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I ja Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II.

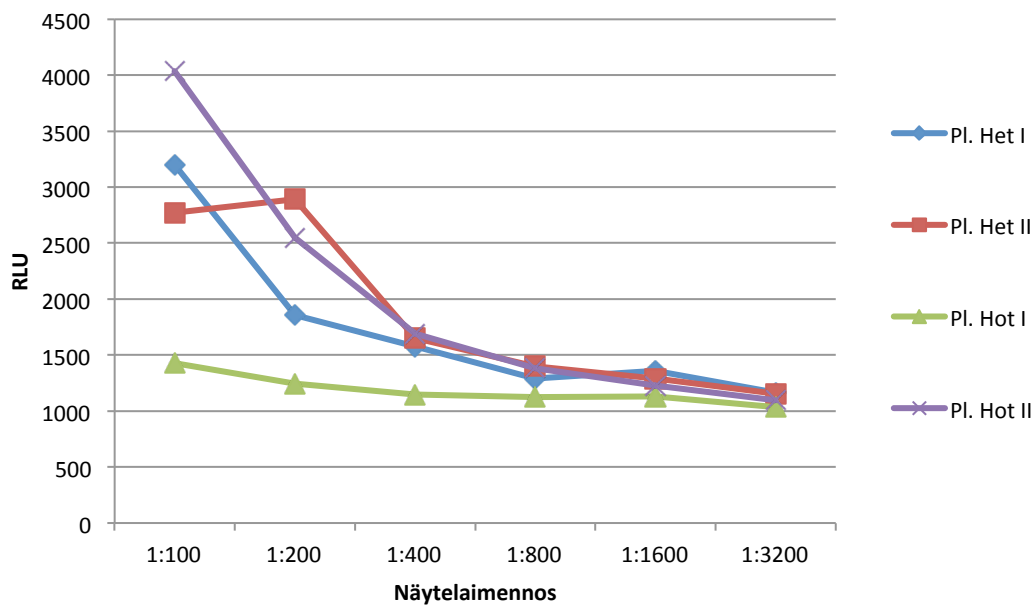


KUVIO 12. Askitesantigeenin titraustulokset käytettäessä intakti-PINP-vasta-aineparia L-mAb7 ja B-mAb11. Kuviossa käytetyt lyhenteet ovat: Asc. = askitesnesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I ja Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II.



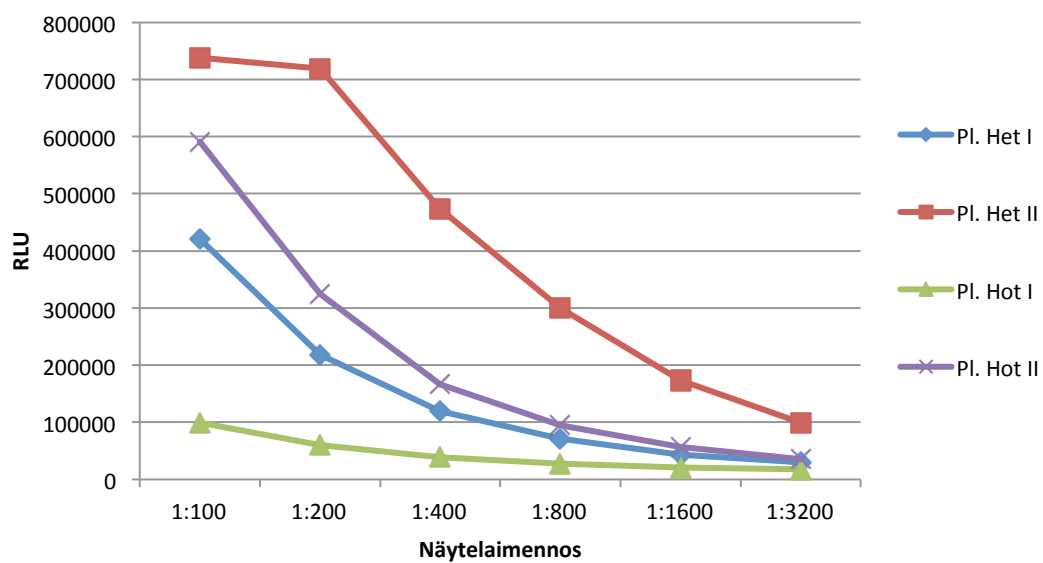
KUVIO 13. Askitesantigeenin titraustulokset mitattaessa hot-PINP-vasta-aineparilla L-mAb7 ja B-mAb11. Kuviossa käytetyt lyhenteet ovat: Asc. = askitesnesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I ja Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II.

L-mAb12 0,2 µg/ml ja B-mAb6 1,0 µg/ml

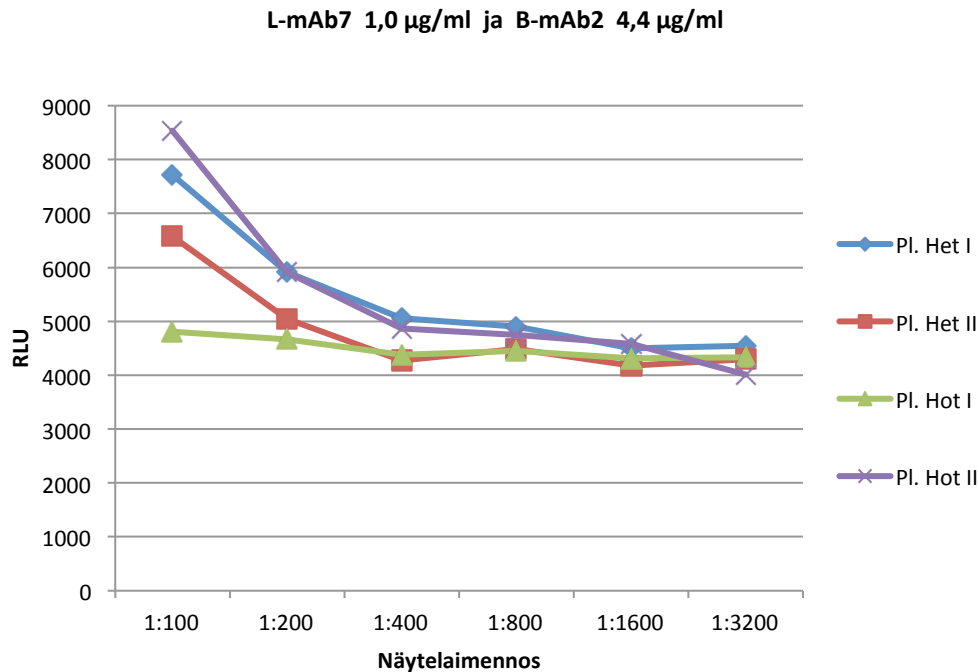


KUVIO 14. Pleura-antigeenin titraustulokset käytettäessä hot-PINP-vasta-aineparia L-mAb12 ja B-mAb6. Kuviossa käytetyt lyhenteet ovat: PI. = pleuranesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I ja Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II.

L-mAb7 2,0 µg/ml ja B-mAb11 2,0 µg/ml



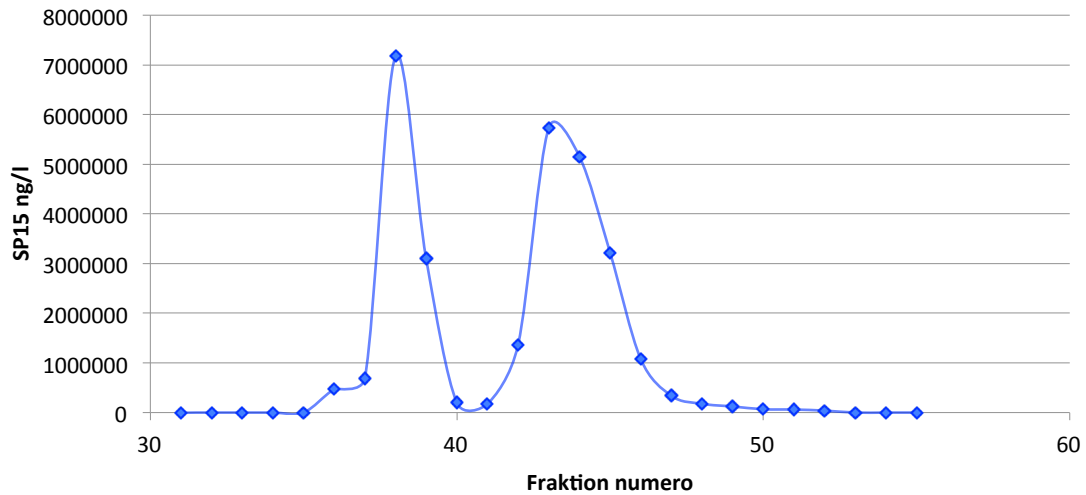
KUVIO 15. Pleura-antigeenin titraustulokset mitattaessa intakti-PINP-vasta-aineparilla L-mAb7 ja B-mAb11. Kuviossa käytetyt lyhenteet ovat: Pl. = pleuranesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I ja Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II.



KUVIO 16. Pleura-antigeenin titraustulokset mitattaessa hot-PINP-vasta-aineparilla L-mAb7 ja B-mAb2. Kuviossa käytety lyhenteet ovat: Pl. = pleuranesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I ja Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II.

4.4 Miten eri lähtömaterialaaleista puhdistetut preparaattit eroavat toisistaan?

Askites- ja pleuranesteestä eroteltujen het- ja hotPINP-näytteiden viimeisessä puhdistusvaiheessa kerättyjen fraktioiden antigeenipitoisuudet mitattiin SP15-RIA:lla ja askitesnesteestä lähtöisin olevan hotPINP-näytemateriaalin mittaustulokset on esitetty kuviossa 17. Kuviossa erottuu kaksi selkeää piikkiä, joiden kohdalta fraktiot yhdistettiin erillisiksi hotPINP I - ja hotPINP II -näytteiksi. Sama menettely toistettiin kaikkien het- ja hotPINP-näytteiden kohdalla.



KUVIO 17. Askitesnesteestä puhdistetun hotPINP-näytteen jakaminen hotPINP I (fraktiot 37–39) - ja hotPINP II (fraktiot 42–46) -näytteiksi ioninvaihtokromatografiassa kerättyjen fraktioiden anti-geenipitoisuuden perusteella

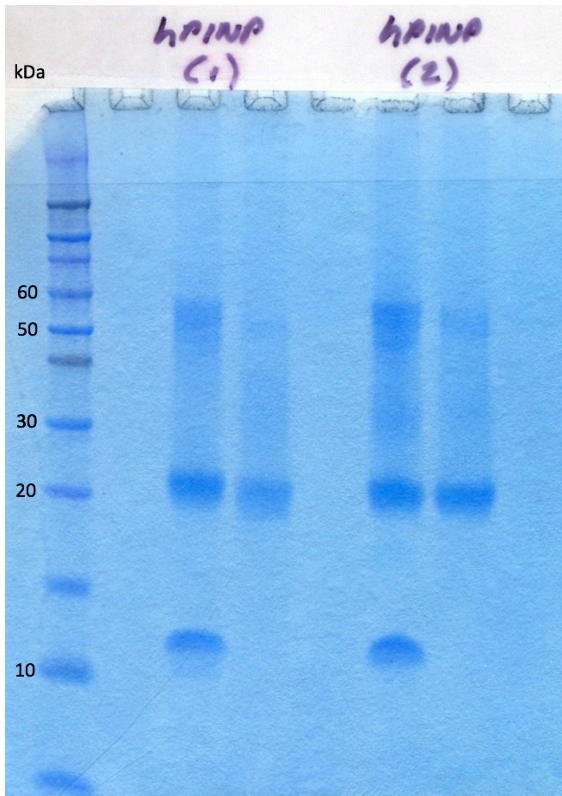
Kahdesta alkuperäisestä preparaatista saatiin eri puhdistusvaiheiden jälkeen eroteltua yhteensä kahdeksan tutkittavaa PINP-näytettä, jotka sisälsivät joko pleura- tai askitesnesteestä peräisin olevaa heterotrimeeriä tai homotrimeeriä antigeeniä. Tässä opinnäytetyössä näytteet on nimetty *Het I* -, *Het II* -, *Hot I* - sekä *Hot II* -näytteiksi ja niiden alkuperä on tuloksissa merkitty etuliitteillä *Pl.* (pleuraneste) tai *Asc.* (askitesneste).

Kaupallisen intakt-PINP-menetelmän mittaustulosten perusteella lasketut sekä pleura-antigeeninäytteistä Direct Detect -menetelmällä mitatut proteiinipitoisuudet on esitetty taulukossa 1. Tulosten perusteella sekä pleura- että askitesnesteessä on huomattavasti enemmän heterotrimeeristä varianttia verrattuna homotrimeeriseen muotoon. Pleura-antigeeninäytteiden kahdella eri menetelmällä mitatut proteiinipitoisuudet poikkeavat jonkin verran toisistaan, mutta tulokset ovat kuitenkin suuntaa antavia ja tämän työn tarkoitusta ajatellen riittävän tarkkoja. Kun tiedetään, missä PINP-näytteissä antigeeniä on eniten ja missä vähiten, on helpompi tulkita näytteiden pitoisuusoptimoinnista saatuja tuloksia.

TAULUKKO 1. Het- ja hotPINP-näytteiden proteiinipitoisuudet kahdella eri menetelmällä mitattuna

Näyte		Intakti-PINP mg/ml	Direct Detect mg/ml
Pleura	Het I	0,76	0,49
	Het II	0,84	0,70
	Hot I	0,17	0,18
	Hot II	0,43	0,28
Askites	Het I	1,44	
	Het II	0,81	
	Hot I	0,19	
	Hot II	0,52	

PAGE-ajon tulokset proteiinistandardille sekä Het II - ja Hot II -näytteille on esitetty kuviossa 18. Pleuranesteestä lähtöisin olevat näytteet on nimetty kuvioon vyöhykkeiden yläpuolelle hPINP(1)-merkinnällä ja askitesnesteestä lähtöisin olevat näytteet hPINP(2)-merkinnällä. Kun verrataan PINP-näytteiden geelissä näkyviä vyöhykkeitä proteiinistandardiin, voidaan arvioida eri α -ketjujen molekyylipainot. α 1-ketjut, joita kaikki eri PINP-näytteet sisältävät, ovat kooltaan noin 20 kDa ja pelkästään het-näytteiden sisältämät α 2-ketjut noin 11 kDa. Kaikissa näytteissä noin 55 kDa:n kohdalla näkyvät vyöhykkeet ovat todennäköisesti trimeeristä antigeeniä, eli näytteiden denaturoituminen ennen PAGE-ajoa ei ole ollut täydellistä. Tulosten perusteella näytteiden voidaan todeta olevan puhtaita, sillä eri vyöhykkeet erottuvat toisistaan selkeästi ja vyöhykkeiden välissä ei ole nähtävissä ylimääräisiä vyöhykkeitä.

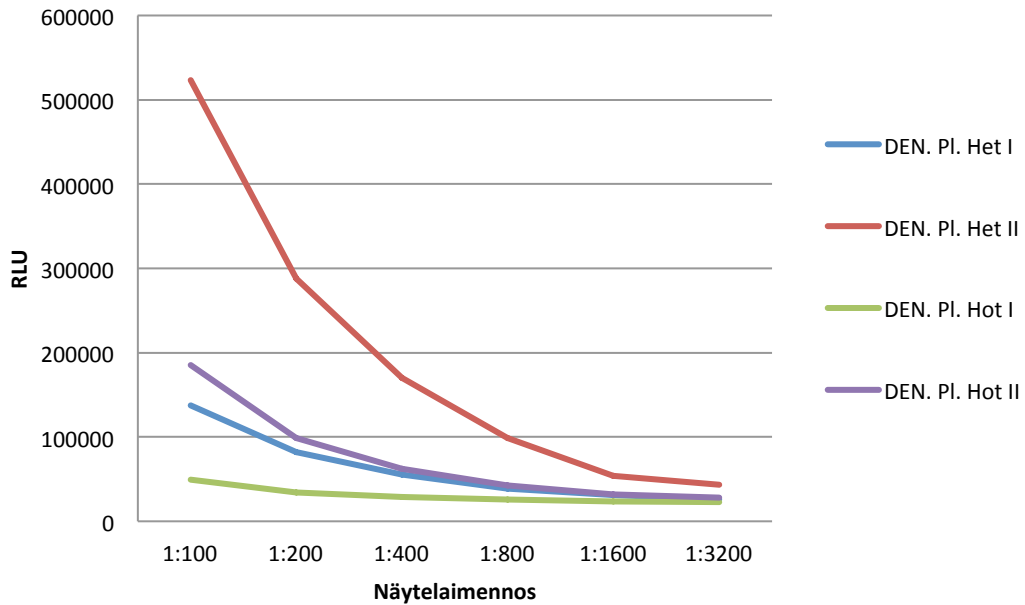


KUVIO 18. PAGE proteiinistandardille sekä pleura- ja antigeenipreparaateista puhdistetuille het- ja hot-PINP-näytteille. Näytteet on pipetoitu geeliin vasemmalta lähtien järjestyksessä: proteiinistandardi, pleura-antigeenista puhdistettu heterotrimeerinen PINP-näyte II, pleura-antigeenista puhdistettu homotrimeerinen PINP-näyte II, askitesnesteestä puhdistettu heterotrimeerinen PINP-näyte II ja askitesnesteestä puhdistettu homotrimeerinen PINP-näyte II.

4.5 Antigeenin denaturointi

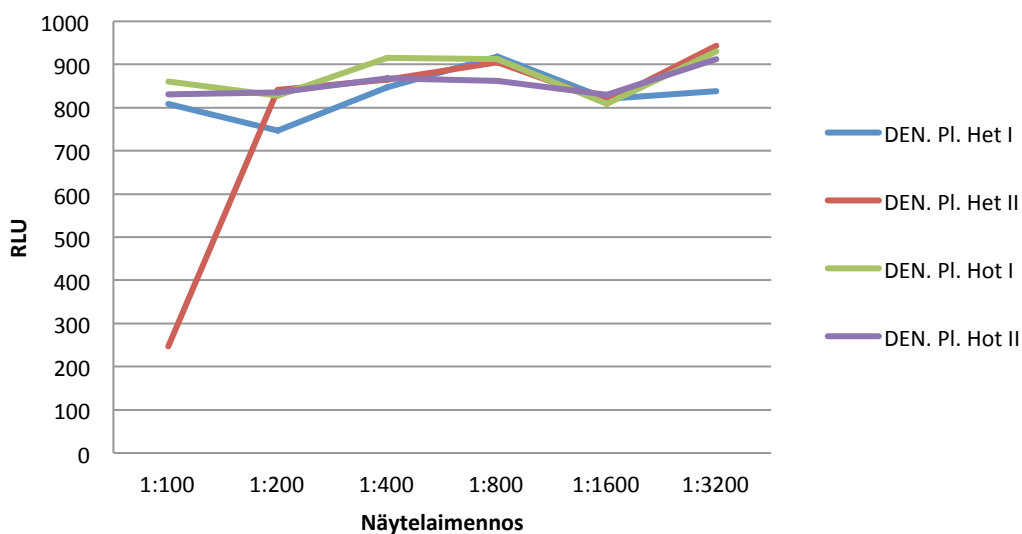
Pleura-antigeenin denaturoinnista saadut tulokset on esitetty kuvioissa 19–20. Verratessa denaturoitujen ja denaturoimattomien näytteiden tuloksia keskenään huomataan, että denaturoimattomien näytteiden RLU-tasot ovat selvästi korkeammat. Hot-parilla mitattujen denaturoitujen pleura-antigeeninäytteiden RLU-tasot jäävät jopa matalammiksi kuin vasta-ainepitoisuusoptimoinnissa mitattujen taustojen arvot, joten kyseinen leimapari ei juuri reagoi denaturoituun antigeeniin. Tulosten perusteella voidaan todeta, että lämpödenaturointi tuhoaa ainakin osittain antigeenin rakenteen ja sen epitopin, johon tässä työssä käytetyt vasta-aineparit sitoutuvat. Näin ollen menetelmän voidaan osoittaa olevan herkkä antigeenin konformaation muutoksille.

L-mAb7 2,0 µg/ml ja B-mAb11 2,0 µg/ml



KUVIO 19. Denaturoitujen pleura-antigeeninäytteiden RLU-arvot mitattuna intakti-PINP-vasta-aineparilla L-mAb7 ja B-mAb11. Kuviossa käytety lyhenteet ovat: DEN. = denaturoitu, PI. = pleu- ranesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP- näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I ja Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II.

L-mAb12 0,2 µg/ml ja B-mAb6 1,0 µg/ml



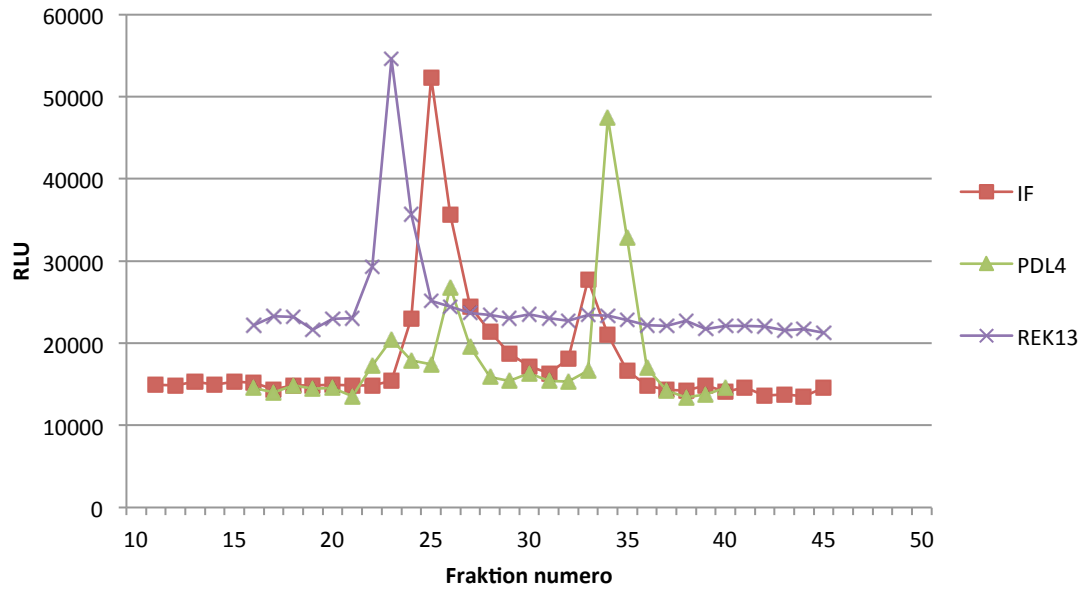
KUVIO 20. Denaturoitujen pleura-antigeeninäytteiden RLU-arvot mitattuna hot-PINP-vasta-aineparilla L-mAb12 ja B-mAb6. Kuviossa käytety lyhenteet ovat: DEN. = denaturoitu, PI. = pleuranesteestä puhdistettu, Het I = heterotrimeerinen PINP-näyte I, Het II = heterotrimeerinen PINP-näyte II, Hot I = homotrimeerinen PINP-näyte I ja Hot II = homotrimeerinen PINP-näyte II.

4.6 Voidaanko eri mAb-pareja hyödyntää soluviljelynäytteiden tutkimisessa?

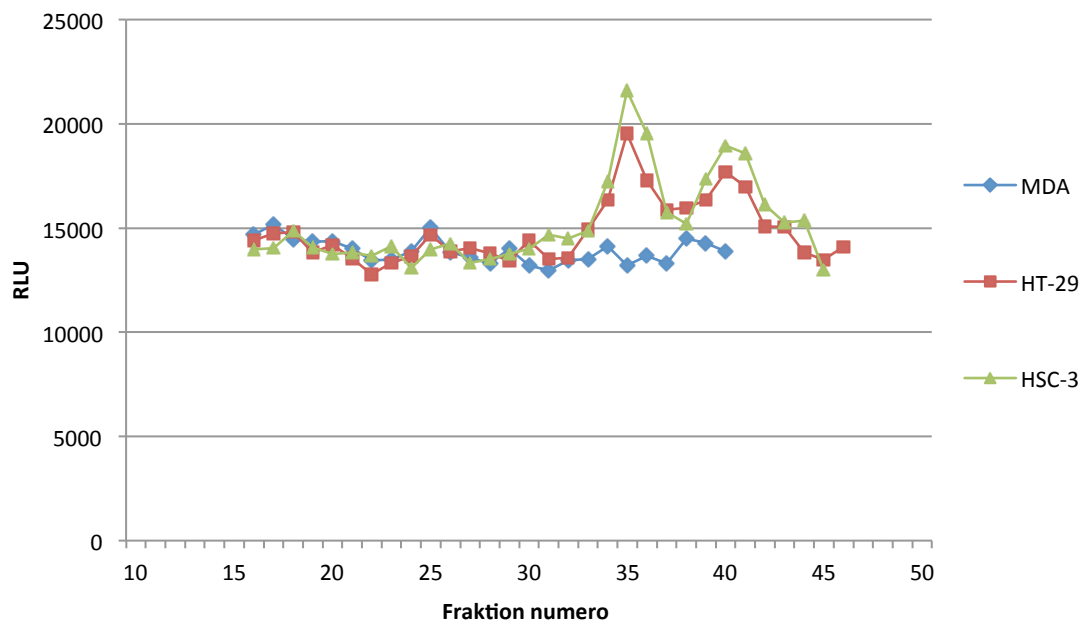
Soluviljelynäytteiden puhdistuksessa kerätyistä fraktioista intaktilla leimaparilla mitatut RLU-arvot on esitetty kuvioissa 21 ja 22. Kaikissa näytteistä lukuun ottamatta rintasyöpäsolulinjaa mittaustuloksissa erottuu yhdestä kolmeen erillistä piikkiä, joissa RLU-taso nousee moninkertaiseksi verrattuna perustasoon. Koska näytteet on puhdistettu HPLC:llä ja siten proteiinit ovat erottuneet toisistaan koon perusteella, soluviljelynäytteissä todetaan olevan useita erikokoisia antigeenejä. Kun verrataan esimerkiksi ienfibroblasti- ja paradontaaliligamenttisolunäytteiden tuloksia (kuvio 21) toisiinsa huomataan, että korkeat RLU-arvot on mitattu samojen fraktionumeroiden kohdalla. Tämän perusteella kyseiset solulinjat sisältävät toistensa kanssa samankokoista antigeeniä.

Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että mAb-pareja on mahdollista hyödyntää soluviljelynäytteiden tutkimisessa. Tämän työn pohjalta ei kuitenkaan pystytä tarkasti sanomaan, minkä kokoista antigeeniä näytteet sisältävät ja mitä PINP-varianttia eri piikit mahdollisesti edustavat. Kuviossa 22 syöpäsolujen syntetisoimien antigeenien voidaan olettaa olevan het- ja hotPINP:tä,

joista hetPINP vastaa kahdesta erottuvasta piikistä ensimmäistä ja vastaavasti hotPINP jälkimäistä piikkiä. Kuviossa 21 suurempikokoinen antigeeni on mahdollisesti propeptidia, johon on kiinnittyneenä osa varsinaisesta kollageenimolekyylistä. Pienemmän antigeenin arvellaan olevan heterotrimeeristä propeptidia.



KUVIO 21. Ienfibroblasti- (IF), parodontaaliligamentti- (PDL4) ja synoviaalisten fibroblastisolu-
näytteiden (REK13) RLU-arvot mitattuna intakti-PINP-vasta-aineparilla L-mAb7 ja B-mAb11.



KUVIO 22. Syöpäsolunäytteiden RLU-arvot mitattuna intakti-PINP-vasta-aineparilla L-mAb7 ja B-mAb11. Eri syöpäsolulinjat ovat: MDA = rintasyöpä, HT-29 = paksusuolen syöpä, HSC-3 = kielisyöpä.

5 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia leimattujen vasta-aineparien sitoutumista eri preparaateista puhdistettuihin antigeeninäytteisiin ja selvittää, miten eri lähtömateriaaleista puhdistetut antigeenit eroavat toisistaan. Työn tavoitteena oli optimoida sellaiset leimatut mAb-parit, että niiden sitoutuminen het- ja hotPINP-variantteihin olisi mahdollisimman spesifistä. Lisäksi tutkittiin denaturoinnin vaikutusta antigeeni-vasta-aine-kompleksin muodostumiseen ja optimoidun intaktin vasta-aineparin sitoutumista soluviljelynäytteisiin.

Kokonaisuudessaan työ onnistui hyvin ja eteni ennalta laaditun suunnitelman mukaan, vaikka osa testauksista ja analyysiajoista jouduttiin tekemään useampaan kertaan oikean vasta-aine-antigeenisuhteen löytämiseksi. Vasta työn aikana huomattu leimattujen vasta-aineiden herkkyyden pakastus-sulatussyklin toistumiselle aiheutti jonkin verran ylimääräistä työtä, sillä mAb-parien optimointivaiheessa toimimattomista vasta-aineista ehdittiin valmistaa useita eri konsentraatioilla olevia liuoksia analyysiajoja varten. Samoin osa näytteistä ja referenssinä käytetyistä kaupallisista antigeenikontrolleista jouduttiin konsentroimaan riittävän proteiinipitoisuuden saamiseksi, mikä ei työn aloitusvaiheessa ollut vielä tiedossa.

Työn aikana testattiin joidenkin antigeeninäytteiden laimentamista laimennospuskurin sijasta PBS-Tweeniin. Liuottimen vaihdolla oli vaikutusta erityisesti taustan antaman signaalin vahvuudelle, joten tulosten kannalta olisi ollut ehkä järkevää ajaa kaikki näytteet rinnan sekä laimennospuskuriin että PBS-Tweeniin laimennettuna. Lisäksi mAb-parien pitoisuusoptimoinnissa käytettiin laimennospuskuriin suhteessa 1/100 laimennettuja antigeeninäytteitä, mutta näytepitoisuusoptimoinnin tuloksena huomattiin, että valituilla mAb-pareilla mitattuna hetPINP-näytteissä antigeenikonsentraatio oli liian suuri vielä 1/400 laimennoksessakin. Antigeeninäytteiden konsentraatioita ei myöskään säädetty vastaamaan toisiaan, mikä olisi ollut tulosten tulkinnan kannalta hyödyllistä. Jos tätä työtä haluaa viedä eteenpäin, mAb-parit kannattaisi optimoida uudelleen eri näyteliuotinta käyttäen ja tarpeeksi suurilla laimennossuhteilla.

Vaikka kollageeneja ja niiden hajoamistuotteita on tutkittu jo vuosikymmenien ajan, on aihe edelleen ajankohtainen. Homotrimeerisen kollageenimuodon olemassaolo ja sen liittyminen erinäisiin tukikudoksen sairauksiin on jo tiedossa, mutta kaiken kaikkiaan homotrimeerejä variantteja on tutkittu todella vähän. Vaikka tämän työn perusteella ei voida suoraan pystyttää uutta analysoin-

timenetelmää hotPINP:n mittaamiseksi, sitä voidaan käyttää hyödyksi uuden menetelmän kehittämisessä.

Tästä opinnäytetyöstä saadut tulokset sekä työn aikana ilmenneet ongelmat herättävät paljon kysymyksiä, mikä on jatkotutkimusta ajatellen erittäin hyvä asia. Koska tällä hetkellä sairaaloissa rutiinikäytössä olevilla analysaattoreilla PINP:tä mitataan seerumista, myös joidenkin tässä työssä käytettyjen mAb-parien sitoutumista testattiin seerumissa olevaan PINP-antigeeniin. Tulosten perusteella näyttäisi siltä, että seerumissa oleva PINP käyttäytyy eri tavalla kuin kehon muista nesteistä puhdistettu antigeeni. Yksi jatkotutkimusaihe voisikin olla mahdollisen eri lähteistä olevien antigeenien rakenne- tai kokoeron tutkiminen. Toisena aiheena voisi olla soluviljelynäytteissä tämän työn tulosten perusteella havaittujen erikokoisten antigeenien tutkiminen. Koska aikaisemman tutkimustiedon perusteella on epäilty, että ientulehdusalueen fibroblastisolut tuottavat homotrimeeriä kollageenia, olisi mielenkiintoista selvittää, vastaako tässä työssä tutkitun ienfibroblastisolunäytteen antigeeneistä jokin hotPINP-varianttia. Lisäksi eri leimaparien avulla voitaisiin tutkia sellaisia solulinjoja jotka tuottavat pelkästään homotrimeeristä kollageenia. Myös antigeenin denaturoinnin vaikutusta vasta-aineiden sitoutumiseen voitaisiin tutkia myös muiden kuin pleuranesteestä puhdistetun antigeeniin avulla.

Työ oli aiheena erittäin mielenkiintoinen ja ainutlaatuinen tilaisuus oppia paljon uutta sekä biokemiasta että immunologiasta. Aikaisemmin kemiaa yliopistossa opiskelleena oli mielenkiintoista huomata käytännön tasolla ero kemiallisten ja biokemiallisten reaktioiden välillä. Kemian töitä tehdessäni olen pystynyt laskemaan, millaiseen lopputulokseen käyttämilläni reagensseilla pääsen. Sen sijaan biokemiallisiin reaktioihin vaikuttavia tekijöitä on niin paljon, että on lähes mahdotonta etukäteen tietää, mitä molekyylien välillä eri ympäristöissä tapahtuu. Samalla ymmärsin aivan uudella tavalla biokemiallisen ja lääketieteellisen tutkimuksen luonteen ja sen, miksi tutkimustyö vie niin paljon aikaa. Lisäksi työ antoi minulle paljon tietoa ja osaamista eri biokemian tutkimusmenetelmien käytöstä sekä kokemusta isojen asiakokonaisuuksien hallinnasta ja etukäteissuunnittelusta.

LÄHTEET

Bailey, A. J., Sims, T. J. & Knott, L. 2002. Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (34), 176–182.

Bangs Laboratorioes, Inc. 2002. Covalent coupling. Hakupäivä 30.1.2014 <http://www.bangslabs.com/sites/default/files/bangs/docs/pdf/205.pdf>.

Bettelheim, F. A., Brown, W. H., Campbell, M. K. & Farrell, S. O. 2007. *Introduction to general, organic & biochemistry*. 8. painos. Thomson Brooks/Cole.

Chemicon International Inc. *Introduction to Antibodies*. Hakupäivä 8.11.2013 http://www.biochem.wisc.edu/faculty/weibel/lab/methods/introduction_to_antibodies.pdf?bcsi_scan_7cec9f03dcb71299=0&bcsi_scan_filename=introduction_to_antibodies.pdf.

Clouth, A. & Oremek, M. G. 2011. Value of Procollagen Type I Aminoterminal Propeptide in Women with Breast Cancer with regard to Metastases. *Pathology Research International* 2011.

Davies, C. 2005. *Concepts*. Teoksessa: Wild, D. (toim.) *The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier, 103–133.

Han, S., McBridem D. J., Losert, W. & Leikin, S. 2008. Segregation of type I collagen homo- and heterotrimers in fibrils. *Journal of Molecular Biology* 383 (1), 122–132.

HUSLAB-liikelaitos 2011. Tutkimusohjekirja. Prokollageeni I:n aminoterminaalinen propeptidi, seerumista. Hakupäivä 18.3.2014 <http://huslab.fi/ohjekirja/4496.html>.

Immunodiagnostic Systems 2011. *IDS-iSYS User Manual*, Software version 10.XX. Po-uilly-en-Auxois, France.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. 2005. *Immunobiology – the immune system in health and disease*. 6. painos. New York: Garland Science Publishing.

Kauppila, S., Jukkola, A., Melkko, J., Risteli, L., Turpeenniemi-Hujanen, T., Vuorinen, K. & Risteli, J. 2001. Aminoterminal Propeptide of the α 1-Homotrimer Variant of Human Type I Procollagen (hotPINP) in Malignant Pleural Effusion. *Anticancer Research* 21 (4A), 2293-2296.

Kindt, T. J., Goldsby, R. A. & Osborne, B. A. 2007. *Kuby Immunology*. 6. painos. New York: W. H. Freeman and Company.

Koivula, M.-K. 2006. Autoantibodies binding citrullinated type I and II collagens in rheumatoid arthritis. Oulun yliopisto. Kliinisen kemian laitos. Väitöskirja.

Koivula, M.-K., Richardson, J., Leino, A., Valleala, H., Griffiths, K., Barnes, A., Konttinen, Y.T., Garrity, M. & Risteli, J. 2010. Validation of an automated intact N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) assay. *Clinical Biochemistry* 43 (10), 1453–1457.

Koivula, M.-K., Ruotsalainen, V., Björkman, M., Nurmenniemi, S., Ikäheimo, R., Savolainen, K., Sorva, A. & Risteli, J. 2010. Difference between total and intact assays for N-terminal propeptide of type I procollagen reflects degradation of pN-collagen rather than denaturation of intact propeptide. *Annals of Clinical Biochemistry* 47 (10), 67–71.

Koivula, M.-K., Risteli, L. & Risteli, J. 2012. Measurement of aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum. *Clinical Biochemistry* 45 (12), 920–927.

Kricka, L. & Wild, D. 2005. Signal generation and detection systems (Excluding homogenous assays). Teoksessa: Wild, D. (toim.) *The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier, 192–211.

Kuznetsova, N., McBride, D. J. & Leikin, S. 2001. Osteogenesis Imperfecta Murine: Interaction Between Type I Collagen Homotrimers. *Journal of Molecular Biology* 309 (01), 807–815.

Liddel, E. 2005. Antibodies. Teoksessa: Wild, D. (toim.) *The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier, 144–166.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Damell, J. 2000. Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. Teoksessa: Freeman, W. H. (toim.) Molecular Cell Biology. 4. painos. New York. Hakupäivä 3.4.2014 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/>.

Marjoniemi, E., Hakalahti, L., Immonen, M., Niemi, S., Novamo, A. & Risteli, J. 2001. Sandwich CLIA for the Variants of the Aminoterminal Propeptide of Type I Procollagen. Journal of Bone and Mineral Research (16), S246.

Merck Millipore 2014. How the Direct Detect spectrometer uses FTIR Technology for protein quantitation. Hakupäivä 25.2.2014 https://www.millipore.com/life_sciences/flx4/direct_detect&tab2=2#tab2=2.

Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W. & Wei, P. A. 2012. Harper's Illustrated Biochemistry. 29. painos. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill.

Narayanan, A. S. & Page, R. C. 1976. Biochemical Characterization of Collagens Synthesized by Fibroblasts Derived from Normal and Diseased Human Gingiva. The Journal of Biological Chemistry 251 (18), 5464-5471.

Ophardt, C.E. 2003. Virtual Chembook. Denaturation of Proteins. Hakupäivä 2.11.2013 <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/568denaturation.html>.

Risteli, J., Kauppila, S., Jukkola, A., Marjoniemi, E., Melkko, J. & Risteli, L. 2002. Biomarkers of bone formation. Teoksessa: Trull, A. K., Demers, L. M., Holt, D. W., Johnston, A., Tredger, J. M. & Price C. P. (toim.) Biomarkers of Disease – An Evidence-Based Approach. Cambridge University Press, 115–121.

Risteli, J. & Risteli, L. 2010. Luusto ja muu sidekudos. Teoksessa: O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) Laboratoriolääke – Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaat-tikustannus, 179–187.

Risteli, L. 1993. Assay of Collagen Metabolism. Helsinki: Kirjapaino Libris Oy.

Zhang, Q., Chen, G., Liu, X. & Qian, Q. 2007. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy. *Cell Research* (17), 89–99.

LIITE 1. TYÖSSÄ KÄYTETYT PUSKURIT

Akridiumesterileimaus

Leimauspuskuri

4,0 g NaCl
8,4 g NaHCO₃

Liutetaan 1000 ml:aan tislattua vettä.
pH 8,0–8,4.

10 X PBS

19,4 g K₂HPO₄ x 3 H₂O
2,35 g KH₂PO₄
90,0 g NaCl

Liutetaan 1000 ml:aan tislattua vettä.
pH 6,6–7,4.

Eluutiopuskuri

1,0 g Pluronic F127
0,5 g NaN₃
100 ml 10 X PBS

Lisätään 700 ml tislattua vettä. Säädetään
pH 7,0–7,6 ja täytetään 1000 ml:ksi.

Leimakannan säilöliuos

9,97 g NaH₂PO₄ x H₂O
1,98 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
10 g BSA (Bovine Serum Albumin)
222 mg NaN₃

Liutetaan 200 ml:ksi tislattulla vedellä.
pH 5,8–6,2.

Biotiinileimaus

Leimauspuskuri

2,76 g NaH₂PO₄ x H₂O

Liutetaan 1000 ml:ksi tislattulla vedellä.
pH 8,5 (säätö 1 M NaOH:lla)

Eluutiopuskuri

14,7 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O
2,4 g Na₂HPO₄ x H₂O
9,0 g NaCl
0,5 ml Proclin 300

Liutetaan 1000 ml:ksi tislattulla vedellä.
pH 7,4 g (säätö NaOH:lla tai HCl:lla).

Leimakannan säilöliuos

1,47 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
0,24 g NaH₂PO₄ x H₂O
0,9 mg NaCl
0,05 ml Proclin 300
4 g BSA (4 %)
0,1 g Gentamysiini (0,1 ‰)

Liutetaan 100 ml:ksi tislattulla vedellä.
pH 7,4 (säätö NaOH:lla tai HCl:lla). Lopuksi
suodatetaan.