

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE

FOR GRADEN MASTER I FARMASI

ANALYSE AV T-LYMFOCYTTER OG TARMCELLER FOR Å DETEKTERE P-GLYKOPROTEIN

Malin Brekke



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2010

ANALYSE AV T-LYMFOCYTTER OG TARMCELLER FOR Å DETEKTERE P-GLYKOPROTEIN

Malin Brekke

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden februar 2009 til mai 2010.

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Stipendiat Håvard Loftheim, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Post Doc Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

FORORD

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere Léon Reubsaet, Håvard Loftheim og Trine Grønhaug Halvorsen for uvurderlig hjelp og støtte under arbeidet med masteroppgaven. Dere har alltid vært åpne for spørsmål og diskusjoner, og gitt god opplæring og oppfølging under hele arbeidet.

Takk til Anders Åsberg for faglige bidrag og hjelp underveis.

En stor takk også til Siri Johannesen for super hjelp og opplæring på lab, og for alt du har hjulpet til med underveis.

Jeg vil også takke alle ved avdelingen for legemiddelanalyse, både ansatte og masterstudenter, for hyggelig samvær og godt miljø.

Blindern, mai 2010

Malin Brekke

1. INNHALDSFORTEGNELSE

1.	INNHALDSFORTEGNELSE	4
2.	SAMMENDRAG	7
3.	FORKORTELSER	9
4.	INNLEDNING OG PROBLEMSTILLING	12
4.1	PROBLEMSTILLING.....	13
5.	TEORI	14
5.1	AMINOSYRER, PEPTIDER OG PROTEINER	14
5.2	P-GLYKOPROTEIN	15
5.2.1	<i>Egenskaper og biologisk forekomst.....</i>	16
5.2.2	<i>Struktur og figurer.....</i>	17
5.2.3	<i>Substrater og modulatorer</i>	18
5.3	PROTEOMIKK.....	19
5.4	PROTEOLYSE AV PROTEINER.....	19
5.4.1	<i>Trypsin</i>	20
5.5	PRØVEOPPARBEIDELSE	20
5.5.1	<i>Fast-fase-ekstraksjon (SPE).....</i>	21
5.5.2	<i>Immunoaffinitetsekstraksjon.....</i>	22
5.6	WESTERN BLOTT	22
5.7	LC-MS.....	23
5.7.1	<i>Separasjon (HPLC).....</i>	23
5.7.2	<i>Deteksjon (MS).....</i>	24

INNHALDSFORTEGNELSE

5.7.3	<i>Fragmentering av peptider (MS/MS)</i>	29
5.8	DATAVERKTØY.....	30
6.	MATERIALER OG METODER	33
6.1	PROTEINER, KJEMIKALIER OG UTSTYR.....	33
6.2	TILLAGING AV LØSNINGER OG BUFFERE.....	39
6.3	PRØVEFORBEREDELSE.....	44
6.3.1	<i>Isolering av T-lymfocytter</i>	44
6.3.2	<i>Cellefraksjonering/homogenisering av tarm</i>	46
6.3.3	<i>Måling av totalprotein</i>	47
6.4	PROSEDYRER FOR PROTEOLYSE.....	47
6.4.1	<i>Prosedyre for in-solution proteolyse</i>	48
6.4.2	<i>Prosedyre for in-well proteolyse</i>	49
6.4.3	<i>Prosedyre for in-gel proteolyse</i>	49
6.5	PRØVEOPPARBEIDELSE.....	51
6.5.1	<i>Immunoaffinitetsekstraksjon</i>	51
6.5.2	<i>SDC-forsøk</i>	53
6.6	WESTERN BLOTT PÅ TARMPRØVE.....	55
6.7	SPE.....	56
6.8	LC-MS/MS FOR ANALYSE.....	58
6.8.1	<i>HPLC</i>	58
6.8.2	<i>MS/MS</i>	59
6.9	DATAVERKTØY.....	60
6.9.1	<i>ProteinProspector</i>	60

INNHALDSFORTEGNELSE

6.9.2	<i>Proteome Discoverer</i>	61
7.	RESULTATER OG DISKUSJON	63
7.1	PRØVEFORBEREDELSE	63
7.1.1	<i>Måling av totalprotein</i>	63
7.2	DIREKTE IN-SOLUTION PROTEOLYSE.....	64
7.2.1	<i>T-lymfocytprøver</i>	64
7.2.2	<i>Tarmprøver</i>	73
7.3	PRØVEOPPARBEIDELSE	77
7.3.1	<i>Immunoaffinitetsekstraksjon</i>	77
7.3.2	<i>SDC-forsøk</i>	84
7.4	WESTERN BLOTT OG GELELEKTROFORESE	87
7.5	LC-MS/MS	91
7.6	DATAVERKTØY	92
8.	KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID	93
9.	KILDELISTE	97
10.	APPENDIKS	101

2. SAMMENDRAG

Det ble forsøkt å isolere og påvise P-glykoprotein (P-gp) i humane prøver av T-lymfocytter og tarmceller ved å benytte ulike metoder for prøveopparbeidelse. Metodene ble fulgt av fast-fase-ekstraksjon (SPE) med selvlagde C18 SPE-tipper og LTQ Orbitrap LC-MS/MS. Programvaren Proteome Discoverer og søkealgoritmen SEQUEST ble brukt til å identifisere proteiner i prøvene. De forskjellige (prøveopparbeidelses) metodene som ble benyttet var:

- Immunoaffinitetsekstraksjon med in-well proteolyse. Metoden ga som forventet færre proteintreff, i gjennomsnitt ~ 2 treff pr. parallell av T-lymfocytprøve og ~ 9 treff pr. parallell av tarmprøve, enn direkte in-solution proteolyse med eller uten den overflateaktive forbindelsen SDC.
- Direkte in-solution proteolyse av prøver. Metoden ga i gjennomsnitt ~ 47 proteintreff pr. parallell for T-lymfocytprøve, og ~11 treff pr. parallell for tarmprøve. Det var treff på både proteiner som finnes i alle eukaryote celler, slik som histoner, og også på proteiner som er mer spesifikke for noen typer celler, slik som plastin-2 i T-lymfocytprøve og defensin-5 i tarmprøve.
- Bruk av surfaktanten SDC for å ekstrahere/løse P-gp ut av membranen, og in-solution proteolyse. Metoden ga i gjennomsnitt ~ 29 proteintreff pr. parallell av T-lymfocytprøve. Mange av proteinene var de samme som ble sett etter direkte in-solution proteolyse av T-lymfocytter, som myeloperoxidase, protein S100-A9, protein S100-A8 og talin-1.
- Gelelektroforese med in-gel proteolyse. Selv om P-gp ble påvist på gelen ved hjelp av westernblotting, ble ikke proteinet påvist etter proteolyse og påfølgende LC-MS/MS-analyse.

SAMMENDRAG

Gen ontologi (GO) kommentarer (forklaringer) ble funnet for en rekke av proteinene i T-lymfocytprøve, og de største gruppene av cellulære proteiner som ble identifisert var plasmamembran-, cellekjerne-, kromosomale-, og ekstracellulære proteiner.

Selv om ikke P-gp ble detektert i prøvene etter analyse, viser resultatene med en del proteintreff at proteolyse, LC-MS/MS-analyse og påfølgende identifisering av proteiner ved hjelp av Proteome Discoverer og SEQUEST fungerer for andre proteiner i prøvene.

3. FORKORTELSER

ABC	Ammoniumbikarbonat
ACN	Acetonitrill
a.m.u.	Enhet til å uttrykke atommasser (atomic mass unit)
API	Atmospheric pressure ionization
ATP	Adenosintrifosfat (energi for cellene)
BFB	Bromfenolblå
BSA	Bovine serum albumin
CID	Kollisjonsindusert dissosiasjon
CNS	Sentralnervesystemet
CYP	Cytokrom P450 (enzymfamilie)
Da	Dalton, enhet for molekylvekt
DC	Direct current
DMP	Dimethyl pimelimidate dihydrochloride
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Elektrospray ionisasjon
g	Sentrifugeringseffekt som forteller hvor mange ganger ”tyngre” partiklene er under sentrifugering enn ved henstand
GO	Gen ontologi
HCOOH	Maursyre

FORKORTELSER

HNP	Human neutrophil defensins
HPLC	High performance liquid chromatography
IAA	Iodoacetic acid
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilovolt
L	Liter
LC-MS	Liquid chromatography- mass spectrometry
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MDR	Multidrug resistance
MeOH	Metanol
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
min	Minutter
MS	Massespektrometri
MS/MS	Tandem MS
<i>m/z</i>	Masse-ladnings-forhold
PBS	Phosphate buffered saline
P-gp	P-glycoprotein
RF	Radio frequency
rpm	Rounds per minute
SDC	Sodium deoxycholate
SDS	Sodium dodecyl sulfate/sodium lauryl sulfate
sek	Sekunder

FORKORTELSER

SPE	Fast-fase-ekstraksjon
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-tetra-methyl-ethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic acid (trifluoreddiksyre)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
v/v	Volumprosent

4. INNLEDNING OG PROBLEMSTILLING

2009 var et rekordår for nyretransplantasjoner i Norge, og det ble totalt transplantert 292 nyrer[1]. Etter transplantasjoner blir transplanterte behandlet med immunsuppressiva for å unngå at kroppen frastøter det transplanterte organet. En type immunsuppressiv behandling er kalsinevrinhemmere som ciklosporin og takrolimus. Disse gir en selektiv immunosuppressiv effekt ved å blokkere aktivering og proliferasjon av T-lymfocytter som er sentrale ved immunologiske reaksjoner[2]. Det er kjent at både ciklosporin A og takrolimus er modulatorer og transportsubstrater for P-glykoprotein (P-gp)[3]. Etter transplantasjon kan undereksponering av ciklosporin A føre til akutt eller kronisk rejeksjon av organet. Falck et al. har utført arbeid som viste at det var en nedgang i den intracellulære konsentrasjonen av ciklosporin A i T-lymfocytter før en rejeksjonsepisode, i tillegg til at det generelt var lavere intracellulære nivåer av ciklosporin A i T-lymfocytene til pasienter som opplevde rejeksjon[4]. En hypotese som kan forklare dette er at P-gp er oppregulert på T-lymfocytene til pasienter som får immunsuppressiv behandling, slik at konsentrasjonen inne i T-lymfocytene blir for lav, som igjen kan føre til rejeksjon. Arbeid som har sett på sammenhengen mellom P-gp nivå og rejeksjonsepisoder og arbeid som har sett på sammenhengen mellom bruk av kalsinevrinhemmere og P-gp nivå er beskrevet i litteraturen[5-10], men konklusjonene er ikke alltid sammenfallende. Det er derfor interessant å undersøke om nivåene av P-gp er oppregulert hos pasienter som utsettes for en rejeksjonsepisode i forhold til de pasientene som ikke opplever en rejeksjonsepisode.

4.1 Problemstilling

Det var ønsket å kunne bruke LC-MS til å undersøke nivåene av P-gp hos pasienter. Bruk av LC-MS til dette er etter viten ikke beskrevet i litteraturen. For å utarbeide egnet prøveopparbeidelsesmetode og LC-MS metode til å isolere og måle P-gp, trengs det først tilgjengelig P-gp. Problemet er at P-gp ikke går an å få tak i som rens substans. Eneste kilde til P-gp var humant materiale, i første omgang blod, og etter hvert var også tarmprøver tilgjengelige. Målet med oppgaven var derfor å isolere og påvise P-gp fra humane T-lymfocytter og tarmceller ved hjelp av ulike metoder for prøveopparbeidelse og LC-MS/MS-analyse.

5. TEORI

5.1 Aminosyrer, peptider og proteiner

Proteiner er biologiske makromolekyler som finnes i alle celler, og i alle deler av celler. Proteiner er polymerer av aminosyrer, og varierer mye i størrelse og i hvilke biologiske funksjoner de har. Det er 20 forskjellige aminosyrer (Tabell 1) som vanligvis finnes i proteiner, og alle har en karboksylgruppe og en aminogruppe bundet til det samme karbonatomet. Sidekjedene varierer fra aminosyre til aminosyre, noe som gjør at aminosyrene blant annet har forskjellig struktur, størrelse, ladning og løselighet. Når aminosyrer bindes kovalent til hverandre, gjennom en peptidbinding, dannes det peptider og proteiner. Når det dannes en peptidbinding mellom to aminosyrer avgis det et vannmolekyl, og den massen som er igjen for en aminosyre etter avspaltning av et vannmolekyl kalles residualmassen ($\Delta m = -18$). Strukturen som beskriver alle kovalente bånd som binder sammen aminosyreresidualene i en polypeptidkjede, kalles primærstrukturen til polypeptidet. Hvis tre aminosyrer bindes til hverandre med to peptidbindinger, kalles det et tripeptid, mens når for eksempel mange aminosyrer er bundet til hverandre, kalles produktet et polypeptid. Polypeptider med molekylmasser over 10.000 kalles proteiner [11].

Tabell 1: Oversikt over aminosyrer[11].

AMINOSYRE	FORKORTEELSE	SYMBOL	RESIDUAL MASSE
Alanin	Ala	A	71
Arginin	Arg	R	156
Asparagin	Asn	N	114
Asparaginsyre	Asp	D	115

TEORI

Cystein	Cys	C	103
Fenylalanin	Phe	F	147
Glutamin	Gln	Q	128
Glutaminsyre	Glu	E	129
Glycin	Gly	G	57
Histidin	His	H	137
Isoleucin	Ile	I	113
Leucin	Leu	L	113
Lysin	Lys	K	128
Metionin	Met	M	131
Prolin	Pro	P	97
Serin	Ser	S	87
Treonin	Thr	T	101
Tryptofan	Trp	W	186
Tyrosin	Tyr	Y	163
Valin	Val	V	99

5.2 P-glykoprotein

P-glykoprotein (P-gp, ABCB1, MDR1) er et membranprotein, og fungerer som en ATP-avhengig eksportør av kroppsfermede stoffer fra celler. Betydningen til proteinet ble først oppdaget på grunn av rollen det utgjør i utviklingen av multidrug resistance (MDR) i kreftceller mot forskjellige anti-cancer midler.

Nå er det kjent at transporteren ikke bare er utbredt i kreftceller, men også i normale vev med utskillingsfunksjoner [12].

5.2.1 Egenskaper og biologisk forekomst

P-gp tilhører ATP-binding cassette (ABC) superfamilien av proteiner. ABC superfamilien er en av de største protein familiene som finnes, og P-gp er et av de mest studerte medlemmene av denne familien[13]. ABC superfamilien består av mer enn 100 membrantransportører og kanaler, og er involvert i mange funksjoner, slik som utstøting av skadelige stoffer, opptak av næring, transport av ioner og peptider og celledsignaling. Proteinene er uttrykt i alt fra bakterier og planter til pattedyr. I mennesker deles ABC-transportørene inn i 7 subfamilier, P-gp tilhører ABCB (MDR/TAP) subfamilien. P-gp eksisterer også i flere forskjellige isoformer, som har over 70 % sekvenslikhet. I mennesker blir P-gp kodet av to MDR gener, MDR1 og MDR3, og disse er lokalisert på kromosom 7. P-gp er uttrykt på en celle-og vevs spesifikk måte, men kan bli induert av miljøfaktorer som hetesjokk, cytokiner, kjemoterapeutikum, UV-stråling, oksygen frie radikaler og tumor suppressor gener[14].

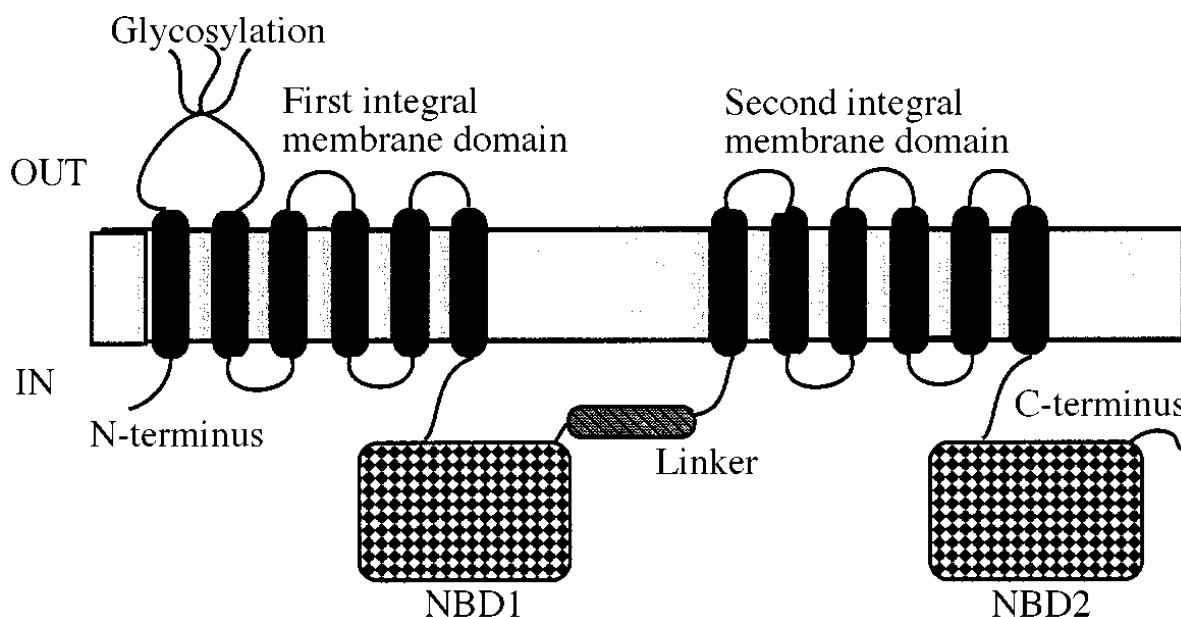
P-gp er kjent for å spille en sentral rolle i absorpsjon og distribusjon av legemidler, og co-lokalisasjonen med metaboliseringsenzymet CYP 3A4 i tynntarmen og leveren bidrar stort til den rollen. Man tenker at proteinet fungerer som et forsvar mot kroppsfremmede stoffer ved å begrense absorpsjon fra tarm og fremme effluks av stoffene til galle og urin. I tillegg gir P-gp beskyttelse av hjernen, testikler og foster på grunn av at proteinet er uttrykt i de respektive blod-vevs barrierene. Det vil si at proteinet beskytter ved å hindre absorpsjonen av toksiske stoffer, og at det også kan beskytte sensitive indre organer mot toksiske stoffer som allerede har fått tilgang til sirkulasjonen. P-gp finnes blant annet i lever, tynntarm, tykktarm, nyrer, CNS, testikler, morkake og leukocytter[12, 13].

5.2.2 Struktur og figurer

Humant P-gp er et 170 kDa polypeptid, som består av 1280 aminosyrer. Hele aminosyresekvensen vises i Figur 1. Aminosyrene er organisert i to tilsvarende deler, hver på 610 aminosyrer, som består av 6 transmembrane (TM) segmenter og et intracellulært nukleotid-bindende domene (NBD) (Figur 2). De to delene er koblet sammen av en linker region på ca. 60 aminosyrer[13, 14]. P-gp blir syntetisert i endoplasmatisk retikulum som et glykosylert intermediat, og karbohydratdelen blir modifisert videre i golgiapparatet, før proteinet blir eksportert til celleoverflaten. P-gp er glykosylert på den første ekstracellulære loopen[14].

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	MVVGTLAAII
61	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSDIND	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG
121	IGAGVLVAAY	IQVSFWCLAA	GRQIHKIRKQ	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS
181	KINEVIGDKI	GMFFQSMATF	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVGLLSAA	VWAKILSSFT
241	DKELLAYAKA	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	SIEAFANARG
361	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIK	NLEFRNVHFS	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG
421	QTVALVGNNG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	VSDVDQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF
481	ATTIAENIRY	GRENVMTDEI	EKAVKEANAY	DFIMKLPKHF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA
541	IARALVRNPK	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	LEMSSNDSRS
661	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSWFRI	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII
721	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA
781	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKAIG	SRLAVITQNI
841	ANLGTGIIIS	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGAGKIATEA
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	FSYAGCFRFG
961	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	AKISAAHIIM	IEKTPLIDS
1021	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV
1081	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV
1141	SQEEIVRAAK	EANIHAFILES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD
1201	EATSALDTES	EKVVEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	VKEHGTHQQL
1261	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ				

Figur 1: Sekvensen til P-gp[15].



Figur 2: Topologisk kart og domene organisering av P-gp, foreslått fra primærsekvensen[16].

5.2.3 Substrater og modulatorer

P-gp kan interagere med mange strukturelt ulike forbindelser, som må fordele seg inn i fettlaget i membranen før de kan interagere med P-gp og pumpes ut. Substrater inkluderer blant annet naturlige produkter, kjemoterapeutikum, steroider og peptider. Substratene er typisk svakt amfipatiske og relativt hydrofobe, mange inneholder aromatiske ringer og et positivt ladet tertiært nitrogen atom. En rekke legemidler som brukes i behandling av sykdommer er også substrater for P-gp. Proteinet kan derfor redusere oral biotilgjengelighet av terapeutiske legemidler og mengde legemiddel som kommer til hjernen, noe som begrenser effektiviteten av behandlingen[13].

En annen gruppe forbindelser kalles modulatorer, og disse kan reversere MDR i intakte celler ved å blokkere effluksaktiviteten til P-gp. Det virker som om de fleste modulatorene binder seg til proteinet i substrat-bindingslommen, og konkurrerer med transportsubstratene. Mange modulatorer, inkludert verapamil og ciklosporin A, er også kjent for å være transportsubstrater av P-gp. Modulatorene tilhører også forskjellige strukturelle klasser, og har lignende molekylære kjennetegn som

substratene. Modulatoren kan være viktig klinisk, fordi co-administrasjon av modulatorer og substrater har potensiale til å bedre opptak av substratene i tarm og levering til virkested i hjernen, i tillegg til å øke den cytotoxiske effekten anti-cancer legemidler har på kreftceller[13].

Legemidler som transporteres av P-gp inkluderer blant annet legemidler mot kreft, hjertemedisiner, HIV- proteasehemmere, immunosuppressiva, antibiotika, β -adrenoceptor antagonist og antihistaminer[12].

5.3 Proteomikk

Proteomet består av alle proteiner som et genom koder for, og proteomikk er studiet av alle proteiner som utgjør proteomet. Hovedpoenget med proteomikk er å karakterisere atferden til et system, i motsetning til bare atferden av en enkelt komponent. Vanligvis analyseres komplekse blandinger, og multiprotein systemer blir studert. Fokuset er på samspillet mellom bestemte proteiner, som igjen er en del av et større nettverk. Identifikasjon av proteiner gjøres ikke med fullstendig sekvens analyse, men i stedet delvis sekvens analyse. Og ved hjelp av databaser kan proteiner i blandingen identifiseres ved å sammenligne de delvise sekvensene til kjente proteiner[17].

5.4 Proteolyse av proteiner

Dagens MS instrumenter kan måle molekylvekten til intakte proteiner med relativt høy nøyaktighet. Likevel er målinger av massene til intakte proteiner mindre brukt enn målinger av peptidmasser. En av grunnene til det er at sensitiviteten av målinger på intakte proteiner ikke er like god som sensitiviteten som oppnås ved målinger på peptidmasser og MS/MS analyser av peptider. Proteinene kløyves derfor til peptider ved hjelp av en protease.

Ved proteolyse av proteiner er det ønskelig å få peptidfragmenter på 6-20 aminosyrer. Det er fordi disse peptid lengdene er ideelle for MS-analyse og sammenligninger til databaser[17]. Proteasene som brukes bør være stabile, velkjente og ha en definert spesifisitet. I tillegg må de være tilgjengelige, ha høy renhet og være robuste[17]. En av proteasene som tilfredsstillt kravene er trypsin.

5.4.1 Trypsin

Trypsin er en serin-protease og er den proteasen som blir mest brukt innen proteomikk. Trypsin skaffes først og fremst fra bukspyttkjertelen til gris og kveg. Trypsin kløyver protein sekvenser etter aminosyrene lysin og arginin, bortsett fra når prolin er bundet til en av disse i C-terminal retning. Det betyr at trypsin vil kløyve proteiner hyppigere enn en protease som bare kløyver etter en aminosyre. Peptidene man får etter kløyving med trypsin har ofte en lengde som passer bra til MS-analyse, og det forklares av fordelingen til lysin og arginin i proteiner. Det er også en fordel at enzymet har god aktivitet både i løsning og ved in-gel proteolyse [17].

5.5 Prøveopparbeidelse

Blod, plasma og urin er eksempler på prøvematerialer som er komplekse blandinger, der komponenter av interesse kan finnes i veldig lave konsentrasjoner. Det er derfor enten nødvendig å fjerne forbindelser som ikke ønskes, eller å isolere komponenter av interesse, i fra resten av prøvematerialet. Når komponentene i tillegg foreligger i lave konsentrasjoner må prøveopparbeidelsen også fokusere på å oppkonsentrere komponentene, slik at analyseapparatet kan detektere dem[18]. Både fast-fase-ekstraksjon (SPE) og immunoaffinitetsekstraksjon er eksempler på metoder som isolerer visse komponenter fra resten av prøvematerialet.

5.5.1 Fast-fase-ekstraksjon (SPE)

SPE benyttes til å isolere, rense og konsentrere stoffer fra væsker, og basis for ekstraksjonen er stoffets evne til å fordele seg mellom et fast stoff og en væske. Det er en forutsetning at det faste stoffet, sorbenten, har funksjonelle grupper på overflaten som gir interaksjon med analytten. Biologiske prøver er vandige, og for å ekstrahere upolare analytter fra vandige løsninger velger man ofte en sorbent for omvendt-fase-ekstraksjon. Ekstraksjonen er da basert på hydrofobe interaksjoner mellom analytten og sorbenten. Forbindelser som ikke har interaksjon med sorbenten, eller har svak interaksjon med sorbenten, vil kunne vaskes vekk i prosessen. Hele prosessen utføres i 4 trinn:

1. Kondisjonering
2. Prøvepåsetning
3. Vask
4. Eluering

Kondisjonering gjøres for å fukte og aktivere sorbenten, slik at prøveløsningen får god kontakt med de funksjonelle gruppene til sorbenten. Ofte er det metanol som brukes til å kondisjonere omvendt-fase-kolonner, og etter kondisjonering vaskes metanolen vekk. *Prøveløsning* med svak elueringsstyrke settes på og suges gjennom kolonnen, og analytten interagerer med sorbenten. Deretter *vaskes* kolonnen for å bli kvitt forurensninger som er svakere bundet til sorbenten enn det analytten er.

Elueringsstyrken på denne løsningen skal være sterkere enn prøveløsningen, men ikke så sterk at analytten også vaskes ut. Tilslutt *elueres* analytten ut av kolonnen ved å sette på en løsning med sterk nok elueringsstyrke til å bryte alle interaksjonene mellom analytt og sorbent. Det er ønskelig at elueringsstyrken er slik at analytten kan eluere i et lite volum, samtidig som at elueringsstyrken ikke er så stor at forurensninger som er sterkere bundet enn analytten også blir eluert[18].

5.5.2 Immunoaffinitetsekstraksjon

Immunoaffinitetsekstraksjon som prøveopparbeidelse baserer seg på molekylær gjenkjennelse av antigener ved bruk av antistoffer. Antistoffene bindes kovalent eller ikke-kovalent til en passende sorbent, og dette kalles sammen en immunosorbent. På grunn av at antigen-antistoff interaksjonen har høy affinitet og selektivitet, kan det gjøres ekstraksjon, opprensning og oppkonsentrering i et steg. Antistoffene er veldig selektive mot analytten (antigenet), og immunosorbenten kan derfor ekstrahere og isolere analytten fra komplekse matrikser og store volumer[19]. Protein A- eller G-baserte sorbenter er eksempler der antistoffet kan bindes ikke-kovalent til sorbenten. Protein G og protein A binder antistoffene i Fc-regionen, slik at antistoffene orienteres med antigen bindingssetene ut mot løsningen[19]. Det finnes flere forskjellige sorbenter, og antistoffer kan også festes til brønner eller kuler.

5.6 Western blott

Western blotting, også kalt protein blotting eller immunoblotting, er en metode som brukes for å detektere et protein fra en blanding av mange proteiner. Western blott består av fem steg:

1. Elektroforese
2. Blotting
3. Merking
4. Deteksjon
5. Bildeanalyse

Proteinene i en blanding blir separert etter molekylvekt, eller isoelektrisk punkt, ved å kjøre en polyakrylamid gelelektroforese (PAGE)[20].

Prinsippet bygger på proteinenes evne til å migrere gjennom gelen når det legges på et elektrisk felt. Små proteiner migrerer raskere enn store proteiner. På grunn av at proteiner har ulik elektrisk ladning, tilsettes SDS til proteinprøvene og buffere. Det gjøres for å gi alle proteinene en negativ ladning, slik at alle vandrer i retning av den positive elektroden[21]. Etter elektroforesen blir proteinene overført, *blottet*, over på en membran, ofte en nitrocellulosemembran. Deretter *merkes* målproteinene med antistoff. Først tilsettes målproteinene et primærantistoff, som er spesifikt for målproteinene, før primærantistoffet blir merket med et sekundærantistoff. Målproteinene blir *detektert* ved at det tilsettes et deteksjonsreagens. Reagenset reagerer med en gruppe bundet til det sekundære antistoffet, og dette gir et signal som kan detekteres. Signalet kan for eksempel fanges ved bruk av *bildefilm*[20].

5.7 LC-MS

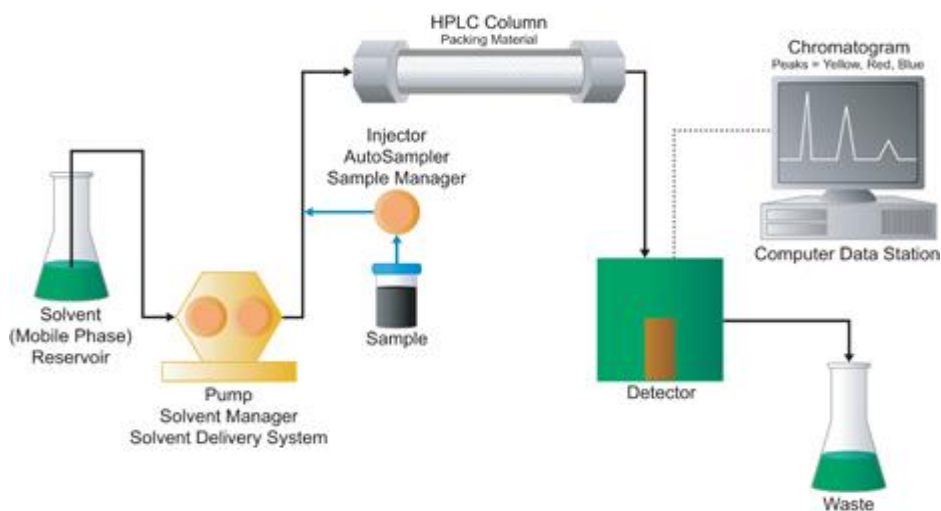
Liquid chromatography-mass spectrometry, eller væskekromatografi-massespektrometri, kobler en kromatografisk separasjon med høy oppløsning, sammen med en sensitiv og spesifikk MS-deteksjon[22]. LC-MS(/MS) er den analytiske teknikken som foretrekkes når man analyserer peptider, fordi den gir veldig selektive og sensitive målinger[23].

5.7.1 Separasjon (HPLC)

Kromatografi er en samlebetegnelse på separasjonsmetoder som brukes til å skille forbindelser fra hverandre. HPLC baserer seg på at mobilfase (væske) presses gjennom en kolonne, som er pakket med et materiale (stasjonærfase) som retarderer analyttene. Prøveløsning med analyttene injiseres i HPLC-systemet før kolonnen, og blir detektert etter hvert som de blir eluert av kolonnen[18].

Et HPLC-system (Figur 3) er oppbygd slik:

reservoar for mobilfaser → pumpe → injektor → kolonne → detektor → data



Figur 3: HPLC-system[24]

Det finnes ulike prinsipper for separasjon, blant annet *omvendt-fase-kromatografi*, som er det viktigste separasjonsprinsippet i væskechromatografi. Hvis man benytter omvendt-fase-kromatografi er stasjonærfasen hydrofob, og mobilfasen en vandig løsning. Stasjonærfasene fremstilles vanligvis ved at hydrofobe grupper bindes til silanolgruppene på silikamateriale. På omvendt-fase-materialer vil analyttene retarderes ved hydrofobe interaksjoner med stasjonærfasen, og det er spesielt van der Waals-krefter som er viktig for retensjonen. [18].

5.7.2 Deteksjon (MS)

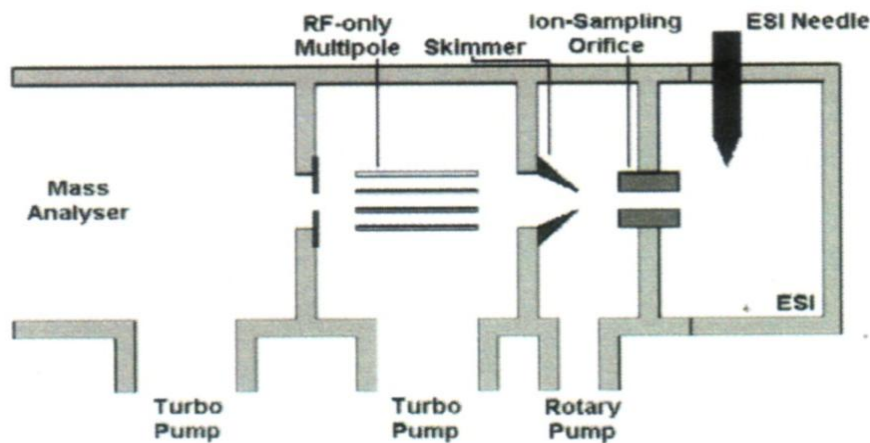
Massespektrometri (MS) er den metoden som foretrekkes til å analysere komplekse proteinblandinger[25]. Ionekilden mellom HPLC og MS omdanner komponentene i en blanding til ioner, og analyserer de på bakgrunn av forholdet mellom masse og ladning (m/z)[17]. MS målinger av ioniserte analytter gjøres i gassfase.

Et massespektrometer består av en ionekilde, en masseanalysator som måler m/z -verdien til de ioniserte analyttene, og en detektor som registrerer mengden av ioner ved hver m/z -verdi[25]. Ved å bruke et massespektrometer som detektor i denne oppgaven ønskes det å få god sensitivitet, høy oppløsning og god massenøyaktighet. Disse parametrene er viktige for å detektere peptider i lave konsentrasjoner, skille mellom ioner med veldig lik m/z -verdi og for å vite at de målte verdiene av ioner og fragmenter er så nære den sanne verdien som mulig[17].

IONISERING: ESI

De to mest brukte teknikkene for å ionisere proteiner og peptider til MS analyse er elektropray ionisasjon (ESI) og matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). MALDI kobles ofte til time-of-flight (TOF) masseanalysatoren for å analysere intakte proteiner eller relativt enkle peptidblandinger[25, 26], mens ESI i LC-MS foretrekkes til å analysere komplekse prøver. ESI ioniserer analytter fra en løsning, og kobles derfor lett til separasjonsmetoder som baserer seg på væske, slik som kromatografi [25]. Ved ESI produseres det en sky av ioniserte dråper av væskestrømmen som kommer fra utgangen av kapillæret og inn i ionekilden. Først blir væsken ved utgangen av kapillæret forstøvet ved hjelp av nitrogen slik at det dannes en aerosol. Etter utgangen av kapillæret legges det på høy spenning, som igjen gir et høyt elektrisk potensial, og fører til produksjon av ioniserte dråper. Dette skjer ved atmosfærisk trykk, og det kalles derfor atmospheric pressure ionization (API). Nitrogengass brukes til å fordampe væske fra dråpene. Når dråpene blir mindre blir ladningstettheten større, noe som medfører ustabile dråper som deler seg til mindre dråper. Denne prosessen kalles Coulombeksplosjon, og prosessen fortsetter til ionene er fri for væske. Deretter slipper ionene igjennom en smal åpning inn til høyt vakuum i masseanalysatoren. Figur 4 viser en API kilde der ESI brukes. ESI er en myk ioniseringsteknikk, det vil si at det stort sett dannes molekylioner, og at molekylionene ikke fragmenterer videre[18, 22, 27].

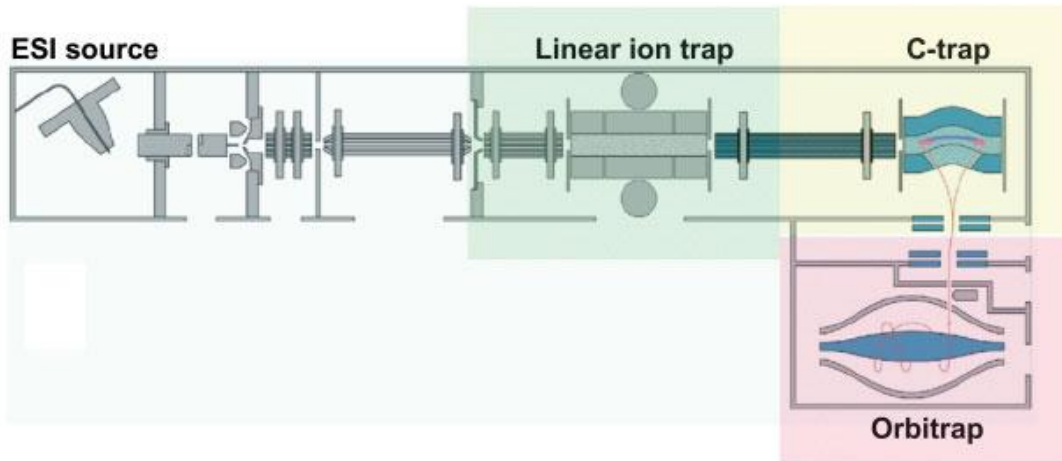
Ved positiv mode MS produseres protonerte ioner, mens ved negativ mode MS produseres deprotonerte ioner[22]. I løsninger med pH 3,5 eller lavere er aminer i peptider og proteiner protonert, og det gir peptidene og proteinene en netto positiv ladning. Positiv ladning på peptidionene favoriserer fragmentering av ionene, i tillegg til at HPLC kromatografien av peptider er bedre ved sure pH-verdier. Derfor er det mest vanlig at ESI i positiv mode brukes for å analysere peptider i sure løsninger [17]. Det er flere typer masseanalytatorer som kan kobles til ESI[17], men i denne oppgaven er det brukt en LTQ Orbitrap.



Figur 4: En API kilde når ESI brukes[27].

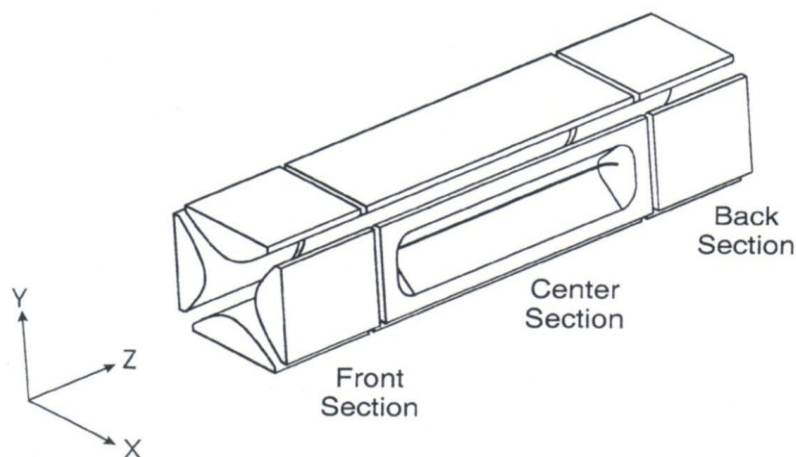
MASSEANALYSATOR: LTQ ORBITRAP

LTQ Orbitrap (Figur 5) er et system som består av to masseanalytatorer, en lineær ionefelle og en orbitrap[28].



Figur 5: Oversikt over LTQ Orbitrap[28].

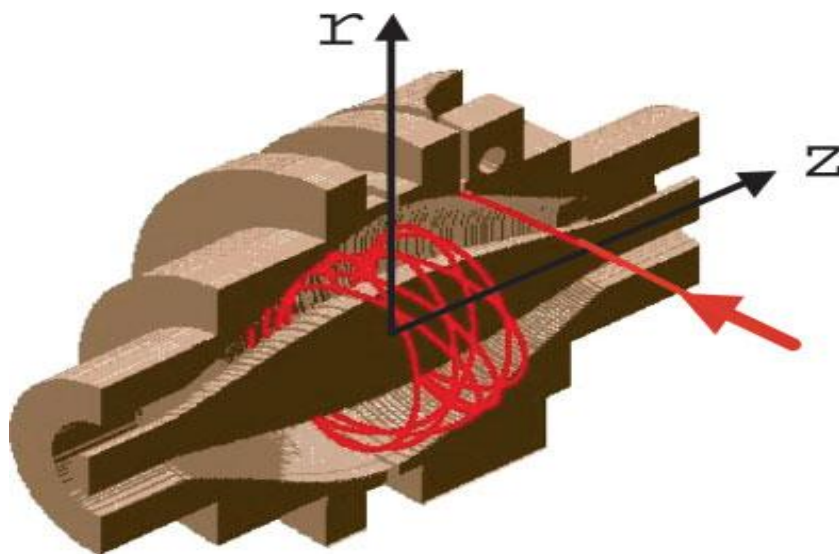
Ionefellen fanger og samler ioner for å kunne analysere dem[17]. I den lineære ionefellen (Figur 6) blir ioner fanget radially av et to dimensjonalt (2D) RF felt, og aksialt ved at stopp-potensialer legges på elektrodene i endene[29]. I denne oppgaven ble ionefellen brukt til fragmentering av ioner og MS/MS-analyse. Før fragmentering blir ioner av interesse isolert i ionefellen, før de fragmenteres ved at ionene kolliderer med gass. Dette kalles kollisjonsindusert dissosiasjon (CID). Fragmentene blir fanget i ionefellen før de blir skannet ut på bakgrunn av m/z -verdiene[17].



Figur 6: 2D lineær ionefelle[30].

C-trap/fellen er en RF-kvadrupol som samler opp og lagrer ioner, og denne ekstra lagringen øker den analytiske kapasiteten til instrumentet. Orbitrapen blir fylt med en puls av ioner som har blitt lagret i C-fellen[28].

Orbitrapen (Figur 7) ble introdusert i 2005 og er en relativt ny type masseanalysator, som gir veldig god massenøyaktighet og ekstremt høy oppløsning. Orbitrapen er en ionefelle, men ikke lik tradisjonelle ionefeller. Masseanalysatoren fanger ioner som er i bevegelse i et elektrostatisk felt. Det elektrostatiske feltet inne i orbitrapen tvinger ionene til å bevege seg i komplekse spiralmønstre rundt en sentral elektrode. Ionene som er i bevegelse gir opphav til strøm, og denne strømmen kan detekteres av en forsterker. En Fourier transform brukes til å finne de oscillerende frekvensene (pendelfrekvensene) til ioner med forskjellige masser, slik at man kan få nøyaktig bestemmelse av m/z -verdiene til ionene i orbitrapen[28].



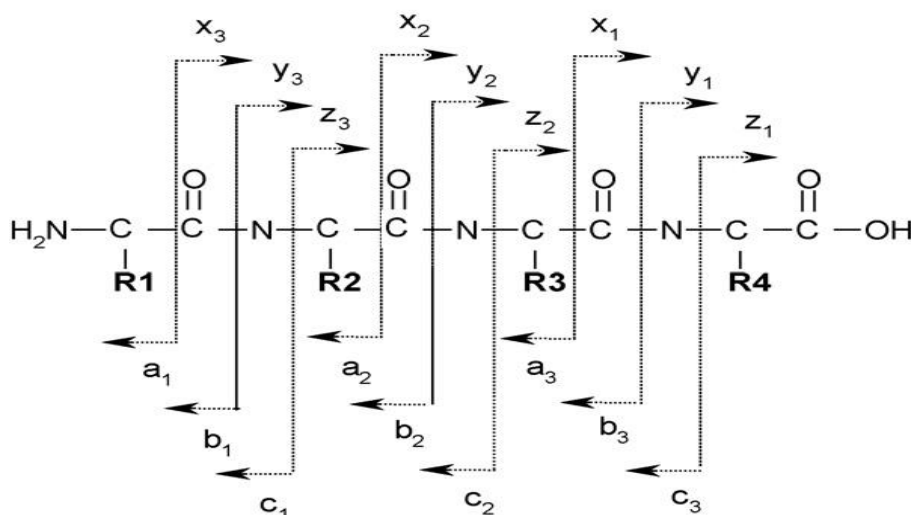
Figur 7: Orbitrap masseanalysator[31].

Det er raskere og mer praktisk å fragmentere ioner i en annen masseanalysator enn en orbitrap. Fordi lineære ionefeller er sensitive, raske og kan gjøre MS^n , brukes denne som partner til orbitrapen. Masseanalysatorene kan brukes alene eller sammen avhengig av hva analysen krever.

For eksempel kan man bruke begge masseanalytorene parallelt, der et spekter av precursorionet blir tatt opp med høy oppløsning og massenøyaktighet i orbitrapen, mens den raske lineære ionefellen fragmenterer og detekterer MS/MS-spektra av valgte peptider[28]. Det var på denne måten masseanalytorene ble benyttet i denne oppgaven.

5.7.3 Fragmentering av peptider (MS/MS)

Fragmentering av peptider, MS/MS, kan brukes til å tolke peptidsekvenser. Når peptider fragmenteres er det teoretisk sett flere bånd som kan bli brutt, men vanligvis skjer bruddet langs peptidets backbone. Når båndet mellom karbonyl oksygenet og amid nitrogenet blir brutt dannes det y-ioner og b-ioner (Figur 8). Når et peptidion med to ladninger fragmenteres, kan det dannes et b-og et y-ion samtidig fra samme peptid, mens hvis et peptidion med bare en ladning fragmenteres, dannes det enten et b-ion eller et y-ion. Andre brudd langs peptidets backbone kan gi a-, c-, z-, og x-ioner, men de observeres sjelden i MS/MS-spektra. Det kommer av at disse fragmenteringene krever mer energi enn bruddene som gir b- og y-ioner. Et fragment som har positiv ladning på C-terminalen av det originale peptidionet kalles et y-ion, mens et fragment som har positiv ladning på N-terminalen av det originale peptidionet kalles et b-ion. Hvis man har de teoretiske b- og y-ion fragmentene til et peptid, kan man sammenligne disse verdiene med et faktisk MS/MS-spekter, og undersøke om de observerte b-og y-ion fragmentene sammenfaller med de teoretiske. På den måten kan b- og y-ion fragmentene brukes til å bekrefte aminosyresekvensen til et peptid[17].



Figur 8: Nomenklaturen til vanlige ioner etter fragmentering av peptider[23].

5.8 DATAVERKTØY

Innen proteomikk finnes det mange verktøy som hjelper til med å identifisere proteiner fra MS/MS-data.

Proteome Discoverer

Proteome Discoverer er en programvare plattform for proteomikkanalyser.

Programvaren gjør det mulig å kombinere, sammenligne og analysere data fra forskjellige kilder, og brukes til identifisering og kvantifisering av proteiner.

Identifisering av proteiner i Proteome Discoverer kan gjøres ved hjelp av søkealgoritmene SEQUEST, Z-Core eller Mascot. Ved å bruke InforSense, en integrert virtuell maskin, er det mulig og blant annet ekstrahere data fra relevante allmenn tilgjengelige databaser og forene det med informasjonen om proteinenes identitet. Dette er nyttig ved LC-MS(/MS)-analyser av komplekse proteinblandinger der det identifiseres mange proteiner. InforSense kan gi relevant informasjon om alle de identifiserte proteinene, inkludert gen ontologi (GO) kommentarer (forklaringer), post-translasjon modifikasjoner (PTM's) og litteratur referanser[32, 33].

Bruk av SEQUEST til protein identifikasjon

Måten algoritmer/programmer identifiserer proteiner på er ved at de direkte korrelerer MS/MS-data med peptidsekvenser i databaser, uten å tolke alle MS/MS-spektrene hver for seg. SEQUEST var det første programmet som identifiserte proteiner på denne måten, og programmet ble introdusert av John Yates og Jimmy Eng i 1995. SEQUEST og lignende algoritmer gir brukeren muligheten til raskt å evaluere store mengder LC-MS/MS-data for å identifisere proteiner. Ved bruk av SEQUEST definerer man ulike parametere brukt i et eksperiment, som for eksempel hvilket enzym som ble brukt til proteolyse, hvilke kjemiske modifikasjoner som kan være tilstede, samt velge en database som MS/MS-dataene skal sammenlignes med. Ved et søk blir alle proteinene i databasen utsatt for en virtuell proteolyse med det aktuelle enzymet, og dette gir en liste over mulige peptider som kan sammenlignes med MS/MS-scan dataene. Hvert MS/MS-scan analyseres ved at peptider som har lik masse som precursorionet velges ut fra databasen, og teoretiske MS/MS-spektra blir generert for alle de valgte peptidene. Det MS/MS-spekteret som ønskes analysert blir sammenlignet med de teoretiske MS/MS-spektrene, og det kalkuleres en score for hvert treff mellom MS/MS-scan data og de teoretiske MS/MS-spektrene. De beste treffene for hvert MS/MS-scan blir rapportert, og SEQUEST identifiserer den peptidsekvensen fra databasen som passer best til hvert MS/MS-scan. Men SEQUEST vurderer ikke hvor godt treffet er. Det vil si at SEQUEST finner det beste treffet, selv om det egentlig ikke er et bra treff. Derfor er det viktig at brukeren selv bestemmer hvilke treff som er bra nok og hvilke som ikke kan aksepteres. Som hjelp til å bestemme dette vises det hvilke proteiner i databasen som passet best til MS/MS-scan dataene, og proteinene listes opp etter hvor mange peptidsekvenser i proteinet som har blitt identifisert som treff. Et protein er mest sannsynlig riktig identifisert når flere peptidsekvenser innen proteinet er blitt foreslått som treff av høy kvalitet mot MS/MS-spektra i dataene[17].

IPI: The International Protein Index

IPI er en integrert proteindatabase. IPI ble utviklet for å kunne tilby fullstendige datasett med informasjon om proteomene til mennesker, mus og rotter. Datasettene er bygget opp med informasjon fra databasene Swiss-Prot, TrEMBL, Ensembl og RefSeq[34].

6. MATERIALER OG METODER

6.1 PROTEINER, KJEMIKALIER OG UTSTYR

Tabellene nedenfor viser proteiner, kjemikalier og utstyr som ble brukt i oppgaven.

Tabell 2: Proteiner

PROTEIN	KVALITET	LEVERANDØR
Anti-P-glycoprotein 170-180	Ikke angitt	Boehringer Mannheim GmbH
BSA (bovine serum albumin)	≥ 96,0 %	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Mab to P-glycoprotein (human) (JSB-1)	Ikke angitt	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
MEPE (Recombinant Human MEPE)	> 90,0 %	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Monoclonal Anti-human MEPE Antibody (Mouse IgG1)	Ikke angitt	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Sekundært antistoff: Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP Conjugate 1:1500	Blotting Grade Affinity Purified	Bio-Rad Laboratories Inc, CA,USA
Trypsin fra bovin pankreas	Essensielt saltfri (frysetørket)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

MATERIALER OG METODER

Tabell 3: Kjemikalier

KJEMIKALIE	KVALITET	LEVERANDØR
Acetonitrill	≥ 99,9 %	VWR International, BDH Prolabo, EC
30 % Akrylamid/BIS solution, 37,5:1	Electrophoresis Purity Reagent	Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA
Ammoniumbikarbonat	≥ 99,5 %	Fluka, Tyskland
Ammonium persulfat	Electrophoresis Purity Reagent	Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA
β-merkaptoetanol	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromfenolblå	Electrophoresis Purity Reagent	Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA
DMP	Ikke angitt	Sigma-Aldrich, Sveits
DTT	≥ 99,0 %	Fluka, India
ECL kjemiluminescense reagens (ECL TM western blotting detection reagents)	Ikke angitt	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
EDTA	≥ 99,0 %	Prolabo
Elektroforesestandard: Precision Plus Protein Dual Color Standards	Ikke angitt	Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA
Etanolamin	≥ 98,0 %	Fluka, Steinheim, Tyskland
Etylacetat	≥ 99,5 %	VWR International, England
Fettfri tørrmelk	Ikke angitt	Normilk AS, Oslo, Norge (gave)
Glycerol	≥ 99,5 %	Prolabo

MATERIALER OG METODER

Glycin	≥ 99,7 %	Merck, Darmstadt, Tyskland
IAA	~ 99,0 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropylpropanol	Ikke angitt	Arcus produkter AS, Norge
Kodak GBX røntgenfiksator	Ikke angitt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kodak GBX røntgenfremkaller	Ikke angitt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Konsentrert HCl (Hydrochloric acid fuming)	37 %	Merck, Darmstadt, Tyskland
Maursyre	> 98,0 %	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol	≥ 99,8 %	VWR International, BDH Prolabo, EC
Natriumklorid	≥ 99,5 %	Sigma, Steinheim, Tyskland
10 X PBS Wash Buffer	Ikke angitt	BioE Inc, St.Paul, MN, USA
Ponceau S solution 0,1 % (w/v) i 5 % (v/v) acetic acid	Ikke angitt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Prepacyte®-TC	Ikke angitt	BioE Inc, St.Paul, MN, USA
SDC	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich, Italia
SDS	Electrophoresis Purity Reagent	Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA
Sukrose	For biokjemi	Merck, Darmstadt, Tyskland

MATERIALER OG METODER

TEMED	Ikke angitt	Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA
TFA	$\geq 98,0 \%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trietanolamin	$> 99,0 \%$	Fluka
Tris	$> 99,0 \%$	Fluka, Sveits
Tween-20	Ikke angitt	Fluka, Sveits
Urea	$\geq 98,0 \%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Vann	HPLC kvalitet	Merck, Darmstadt Tyskland
VitaLyse™ 10X Lysing Buffer	Ikke angitt	BioE Inc, St.Paul, MN, USA

Tabell 4: Utstyr til LC-MS/MS

UTSTYR	MODELL	PRODUSENT
Autosampler	Ultimate 3000 RS	Dionex, Sunnyvale USA
Pumpe	Ultimate 3000 Pump	Dionex, Sunnyvale USA
Flow manager	Ultimate 3000 Flow Manager	Dionex, Sunnyvale USA
Kolonne	BioBasic C8. Dim. 50 mm × 1mm × 5 µm	Thermo Scientific, San Jose, CA, USA
Ionefelle	LTQXL	Thermo Scientific, San Jose, CA, USA
Orbitrap	LTQ Orbitrap Discovery	Thermo Scientific, San Jose, CA, USA
Programvare	Xcalibur version 2.0.7	Thermo Scientific, San Jose, CA, USA

MATERIALER OG METODER

Tabell 5: Annet utstyr som er forbruksvarer

UTSTYR	MODELL	PRODUSENT
Brønner	Reacti-Bind Protein G Coated Clear Strip Plate	Pierce, Rockford, USA
Empore C18	Empore Extraction Disks Octadecyl (C18) 47mm	Teknolab, Norge.
Eppendorfrør	Brand Microtubes 1,5 mL	Brand, Tyskland
Eppendorfrør, LoBind	Protein LoBind Tube 1,5mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Filterpapir	-	Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA
Glass pasteur-pipetter	150 mm	VWR
Inserts	Micro-insert 0.1 mL clear glass	VWR
Kodak film	Kodak BioMax MS Film	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kork til vialer	C4010-1A target blue screw caps	National Scientific, Rockwood, USA
Nitrocellulose-membraner	Amersham TM Hybond TM -ECL	GE Healthcare
pH-papir	Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt, Tyskland
Pipettespisser	Finntip	Labsystems, Helsinki, Finland
Septer til korker	C4010-10 10 mm septer	National Scientific, Rockwood, USA
Vialer	-	National Scientific, Rockwood, USA

MATERIALER OG METODER

Tabell 6: Annet utstyr som ikke er forbruksvarer

UTSTYR	MODELL	PRODUSENT
Automatpipetter	Finnpipette	Labsystems, Helsinki, Finland/Thermo
Magnetrører	-	Alphalab, Variomag, Tyskland
pH-meter	826 pH mobile, 827 pH lab	Metrohm, Sveits
Ristemaskin(plate)	Vibramax 100	Heidolph, Tyskland
Sentrifuge (liten)	Galaxy Mini Centrifuge	VWR, Korea
Sentrifuge (stor)	Centrifuge 5804	VWR, Oslo, Norge
Sentrifuge	Hettich Zentrifugen, Universal 32R	Tuttlingen, Germany
Sonikator	Vibra Cell	Sonics&Materials Inc., Danbury, USA
Speedvac	SPD121P-230	Thermo Electron Corporation, Milford, USA
Ultralydbad	-	VWR, Malaysia
Vannrenseanlegg	EASYpure UV	Barnstead Storage System, USA
Varmeovn	-	J.P. Selecta, Spain
Varmeskap	Termaks	Termaks, Bergen, Norge
Vekt	XS205 Dualrange	Mettler Toledo AS, Norge
Victor ³ _{TM}	1420 Multilabel Counter	PerkinElmer, Singapore
Vippe	Vari-Mix	Barnstead/Thermolyne, USA
Vippemaskin	Invitrogen Dynabeads MX Mixer Base	ATR Inc., USA
Vortexmikser	IKA MS 3 Digital	Fisher Scientific, Norge

6.2 TILLAGING AV LØSNINGER OG BUFFERE

50 mM ammoniumbikarbonat-buffer

50 mM ABC-buffer: 40 mg ammoniumbikarbonat veies ut og tilsettes 10 mL ionebyttet vann. Ny ABC-buffer ble laget for hver dag og oppbevart i kjøleskap.

20 mM maursyre

En 500 mL målekolbe fylles et stykke opp med ionebyttet vann før det tilsettes 377 μ L konsentrert maursyre (HCOOH). Deretter fylles kolben opp med ionebyttet vann til målestreken.

Mobilfaser

Mobilfase A: MeOH og 20 mM HCOOH i forhold 5:95 (v/v).

Mobilfase B: MeOH og 20 mM HCOOH i forhold 95:5 (v/v).

Når det lages 500 mL mobilfaser tilsettes det i A 25 mL MeOH + 475 mL 20 mM HCOOH, og i B 475 mL MeOH + 25 mL 20 mM HCOOH.

Antistoffløsninger

Gammelt antistoff: Utgangskonsentrasjonen på antistoffet antatt å være 50 μ g/mL. For å få en antistoffløsning med konsentrasjon på 1 μ g/mL tas det ut 20 μ L av 50 μ g/mL løsningen og tilsettes 980 μ L TBS-buffer.

Nytt antistoff: Utgangskonsentrasjonen på antistoffet er 250 μ g/mL. For å få en antistoffløsning med konsentrasjon på 1 μ g/mL tas det ut 4 μ L av 250 μ g/mL løsningen og tilsettes 996 μ L TBS-buffer. For å få en konsentrasjon på 20 μ g/mL tas det ut 80 μ L av 250 μ g/mL løsningen og tilsettes 920 μ L TBS-buffer.

Trypsinløsninger

1 mg/mL trypsin: 1 mg trypsin veies inn og løses i 1 mL ABC-buffer. Innveid trypsin står i fryseren til den løses i 50 mM ABC-buffer rett før bruk.

100 µg/mL trypsinløsning lages ved å ta ut 100 µL av 1mg/mL løsningen og fortynne med 900 µL 50 mM ABC-buffer.

10 ng/µL trypsinløsning lages ved å ta ut 100 µL av 100 µg/mL løsningen og fortynne med 900 µL 50 mM ABC-buffer.

BSA (bovine serum albumin)

1mg/mL BSA: 1 mg BSA veies inn og løses i 1 mL 50 mM ABC-buffer.

DTT (reduserende forbindelse)

50 mM DTT: 7,7 mg DTT veies inn og løses i 1,0 mL ionebyttet vann.

1 mM DTT lages ved å ta ut 20 µL av 50 mM løsningen og fortynne med 980 µL ionebyttet vann.

6,5 mM DTT: 1 mg veies inn og løses i 1 mL ionebyttet vann.

IAA (alkylerende forbindelse)

200 mM IAA: 18,6 mg IAA veies inn og løses i 0,5 mL ionebyttet vann.

54 mM IAA: 10 mg veies inn og løses i 1 mL ionebyttet vann.

50 mM IAA: 9,3 mg IAA veies inn og løses i 1,0 mL ionebyttet vann.

5 mM IAA lages ved å ta ut 100 µL av 50 mM løsningen og fortynne med 900 µL ionebyttet vann.

5 % SDC (50 mg/mL)

10 mg SDC veies inn og løses i 200 μ L 50 mM ABC-buffer.

Immunoaffinitet-løsninger

10 \times TBS

TBS skal bli 50 mM Tris og 150 mM NaCl, pH 7,5.

100 mL 10 \times TBS: 6,055 g Tris og 8,766 g NaCl veies ut og tilsettes til en målekolbe. Ionebyttet vann tilsettes, og stoffene løses opp. Vann tilsettes nesten til 100 mL. pH justeres med konsentrert HCl, og deretter fylles kolben opp til målestreken med ionebyttet vann.

1 \times TBS

Til 100 mL: 10 mL 10 \times TBS blandes med 90 mL ionebyttet vann. pH blir riktig her, og trenger ikke justeres.

TBS med 0,05 % Tween-20

Til 50 mL: 5 mL 10 \times TBS tilsettes 25 μ L Tween-20 og fylles med ionebyttet vann til 50 mL.

200 mM trietanolamin, pH 8,9

Til 100 mL: 2,65 mL trietanolamin tilsettes en målekolbe med litt ionebyttet vann. Vann tilsettes nesten til 100 mL. pH justeres med konsentrert HCl, og kolben fylles deretter til målestreken med ionebyttet vann.

100 mM etanolamin, pH 8,9

Til 100 mL: 601 μ L etanolamin tilsettes en målekolbe og kolben fylles nesten til 100 mL med ionebyttet vann. pH justeres med konsentrert HCl, og kolben fylles deretter til målestreken med ionebyttet vann.

TBS med 2 M urea, pH 7,5

Til 50 mL: 6,007 g urea veies inn og løses i en målekolbe tilsatt TBS. TBS tilsettes nesten til 50 mL. pH justeres med 0,5 M HCl, og kolben fylles deretter til målestreken med TBS.

0,1 M glycin med 2 M urea, pH 2,9

Til 50 mL: 0,375 g glycin og 6,007 g urea veies inn og løses i en målekolbe tilsatt ionebyttet vann. Vann tilsettes nesten til 50 mL. pH justeres med konsentrert HCl, og kolben fylles deretter opp til målestreken med ionebyttet vann.

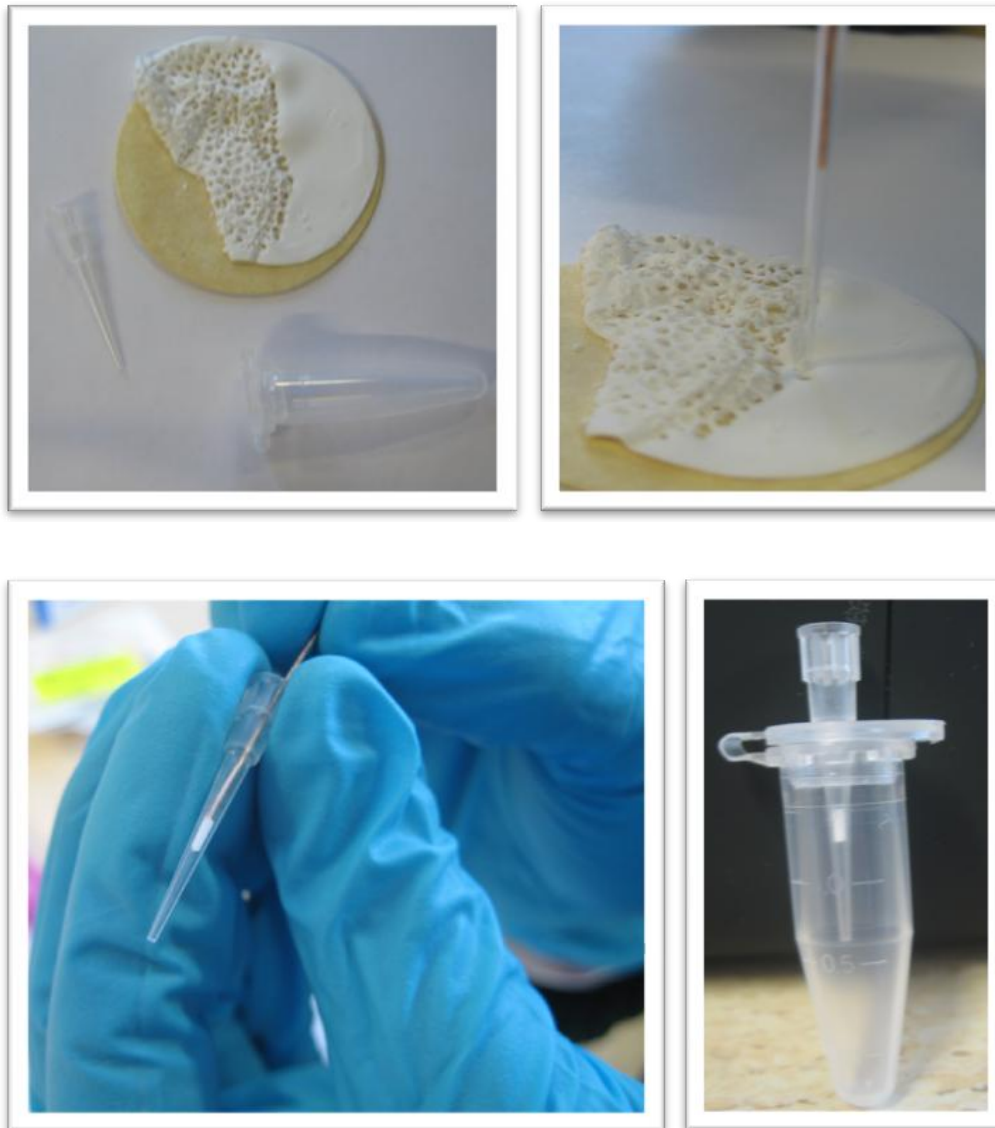
50 mM DMP i 200 mM trietanolamin

Volum av løsning lages etter behov, og løsningen lages fersk til hvert forsøk.

Til 1,2 mL: 15,55 mg DMP veies inn og løses i 1,2 mL 200 mM trietanolamin.

Utstyr og løsninger til fast-fase-ekstraksjon (SPE)

SPE-tip: En pasteurpipette brukes til å presse ut 6 små puter fra en EMPORE C18 disk. C18 materialet overføres fra pipetten til bunnen av en 10 µL pipettespiss ved å dytte putene ut med en metalltråd. Deretter presses putene forsiktig sammen i pipettespissen med metalltråden, slik at C18 materialet blir pakket tettere sammen og overflaten til materialet blir så rett som mulig. Deretter lages det hull i lokkene på eppendorfrør og SPE-tips kan settes ned i eppendorfrørene (Figur 9).



Figur 9: Bildene viser utstyret, utførelsen og det ferdige resultatet når man lager SPE-tips.

SPE-løsninger

5 mL 50 % ACN/H₂O: 2,5 mL ACN og 2,5 mL ionebyttet vann blandes.

5 mL 80 % ACN/20 mM HCOOH: 4 mL ACN og 1mL 20 mM HCOOH blandes.

6.3 PRØVEFORBEREDELSE

Prøveforberedelser måtte gjøres for å isolere T-lymfocytter fra fullblod, og for å homogenisere tarmprøve. Det ble også målt totalprotein i en T-lymfocyttest prøve.

6.3.1 Isolering av T-lymfocytter

T-lymfocytter kan isoleres fra fullblod ved hjelp av PrepaCyte-TC cellesepareringsmedium. PrepaCyte består av en blanding av antistoffer med affinitet til spesifikke antigener uttrykt på overflaten til forskjellige blodceller, og fremmer agglutinerings og sedimentering av disse cellene. I den gjenværende supernatanten vil det i hovedsak være T-lymfocytter. VitaLyse tilsettes for å lysere eventuelle gjenværende erythrocytter.

Aller først ble det tappet 4 rør med blod. PBS (phosphate buffered saline) og VitaLyse ble fortynnet 10 ganger før bruk. Prosedyren nedenfor ble fulgt.

Prosedyre for isolering av T-lymfocytter

- 7 mL blod fra hvert rør overføres til hvert sitt sliffør og tilsettes 7 mL romtemperert PrepaCyte.
- Blandingen med blod og PrepaCyte blandes forsiktig ved ca. 15 tilbake/fram bevegelser pr. min i 30 min på vippe i romtemperatur. Det er viktig å unngå skumming og ikke la de røde blodcellene feste seg.
- Etter 30 min vipping skal rørene stå rett opp og ned i 30 min med avtatt propp, men dekket med aluminiumsfolie.
- Så fjernes supernatanten forsiktig, uten å røre ved det røde laget, og overføres til et nytt sliffør. Bunnfallet kastes.

MATERIALER OG METODER

- Ca. 4 mL PBS tilsettes (likt volum som supernatanten), og det blandes lett.
- Deretter sentrifugeres det ved 540 g i 7 min.
- Supernatanten tas av med en lang pipette og kastes. Bunnfallet tas vare på, som er de isolerte cellene.
- 10 mL VitaLyse tilsettes rørene med celler og blandes ved å vippe røret frem og tilbake. Deretter skal rørene stå i 15 min for lysering.
- Det sentrifugeres ved 540 g i 7 min, før supernatanten tas av og kastes. Bunnfallet tas vare på.
- 7 mL PBS tilsettes til rørene med celler for vasking, og det blandes ved å vippe røret frem og tilbake.
- Deretter sentrifugeres det igjen ved 540 g i 7 min, før supernatanten tas av og bunnfallet tas vare på. Det er viktig å få det så tørt som mulig uten å få med celler når supernatanten tas av.
- 7 mL PBS tilsettes igjen til rørene, og blandes ved å vippe røret frem og tilbake. Her kan man ta ut 50 μ L fra hvert rør, og tilsette i hvert sitt eppendorfrør. Dette for senere å se i mikroskop at man har fått isolert celler. Det ble gjort i denne oppgaven, og det så bra ut.
- Steget med sentrifugering gjentas, supernatanten tas av og bunnfallet tas vare på.
- 1 mL 20 % / 20 % / 60 % ACN/MeOH/deionisert vann tilsettes bunnfallet i hvert sliffør, og blandes på vortex.
- Rørene merkes og settes i fryser.

På grunn av at T-lymfocytterne ble løst i ACN/MeOH/H₂O måtte disse prøvene alltid inndampes på Speedvac ved 50 °C og reløses i egnet buffer før videre prøveopparbeidelse.

6.3.2 Cellefraksjonering/homogenisering av tarm

Prosedyre for cellefraksjonering

En glassplate vaskes med isopropylpropanol og skylles deretter med 70 % sprit. Av biopsibiten kuttet det av biter med ønsket størrelse, her to biter av 50 mg hver, med en steril skalpell. Bitene veies og legges i hvert sitt Precellys rør (CK 28 kit) ved hjelp av en steril pinsett. I hvert Precellys rør er det også 6 kuler, som er der for å fremme homogenisering av tarmprøven. Rørene tilsettes 0,32 M sukrosebuffer i et standardisert forhold der biopsibiten utgjør 5 % av løsningen. Rørene settes i Precellys 24 maskinen (Bertin Technologies) og kjøres ved 5000 rpm 3-4 × 50 sekunder, med 3 minutters pause mellom hver runde. Mellom hver runde på 50 sekunder settes rørene på is for nedkjøling. Deretter kan prøvene i rørene kombineres i et nytt rør, og homogenatet fryses ned ved -70 °C.

SUKROSEBUFFER 0,32 M, pH 7,4	Mengde
0,32 M sukrose	27,4 g
10,0 mM trizma-base	0,3 g
1,0 mM EDTA	0,093 g
Dest. vann	ad 250 mL

6.3.3 Måling av totalprotein

For å vite at man bruker tilstrekkelige mengder DTT, IAA og trypsin når det utføres proteolyse av proteiner er det viktig å vite ca. hvor mye protein det er i en prøve. Det var ønsket å ha 1 µg DTT pr. 50 µg protein, 5 µg IAA pr. 50 µg protein og 1 µg trypsin pr. 40 µg protein.

100 µL prøve av T-lymfocytter ble dampet inn på Speedvac, 50 °C, og reløst i 100 µL 50 mM ABC-buffer. Prøven ble sonikert med en Vibra Cell sonikator for å løse opp cellepluggen som ikke ble løst opp i buffer. 1 mg/mL BSA i 50 mM ABC-buffer ble brukt til å lage standardkurve.

Utførelsen av selve proteinmålingen følger prosedyren ”Måling av totalprotein”, standardversjon for mikrotiter-plate, måleområde fra 50 til 300 µg/mL protein (vedlagt i APPENDIKS 1).

6.4 PROSEDYRER FOR PROTEOLYSE

Proteolyse av proteiner ble utført både i løsning (in-solution), i brønner (in-well) og i gel (in-gel).

DTT er en reduserende forbindelse som tilsettes for å redusere S-S-bindinger i proteiner. Dette gjøres for at trypsin lettere skal komme til for å kløyve proteinet. Etter redusering tilsettes en alkylerende forbindelse, IAA, for å hindre at de frie SH-gruppene oksiderer til S-S-bindinger. Etter alkylering tilsettes trypsin for å sette i gang proteolysen.

6.4.1 Prosedyre for in-solution proteolyse

Mengde DTT, IAA og trypsin som ble brukt ved in-solution proteolyse av T-lymfocytprøver og tarmprøver var ulik, og beskrives derfor hver for seg.

1. T-lymfocytter

1. Ta ut 100 μL prøve til hvert sitt LoBind eppendorfrør. Damp prøvene inn på Speedvac (50 °C) og reløs i 100 μL nylagd 50 mM ABC-buffer.
2. Tilsett 6 μL 1 mM DTT i hvert rør, og sett rørene på varmeblokk som holder 95 °C i 15 min. Avkjøl rørene.
3. Tilsett 5 μL 5 mM IAA i hvert rør, og sett rørene umiddelbart på et mørkt sted i 15 min.
4. Tilsett 1,2 μL 1 mg/mL trypsin i 50 mM ABC-buffer i hvert rør. Inkuber rørene ved 37 °C over natten i et varmeskap.

2. Tarmceller

1. 100 μL prøve i et LoBind eppendorfrør tilsettes 4 μL 50 mM DTT. Sett røret på varmeblokk som holder 95 °C i 15 min. Avkjøl røret.
2. Tilsett 6 μL 200 mM IAA, og sett røret umiddelbart på et mørkt sted i 15 min.
3. Tilsett 1 μL 1 mg/mL trypsin i 50 mM ABC-buffer. Røret inkuberes ved 37 °C over natten i et varmeskap.

6.4.2 Prosedyre for in-well proteolyse

Utgangsprosedyren for in-well proteolyse var den samme for både T-lymfocytter og tarmceller:

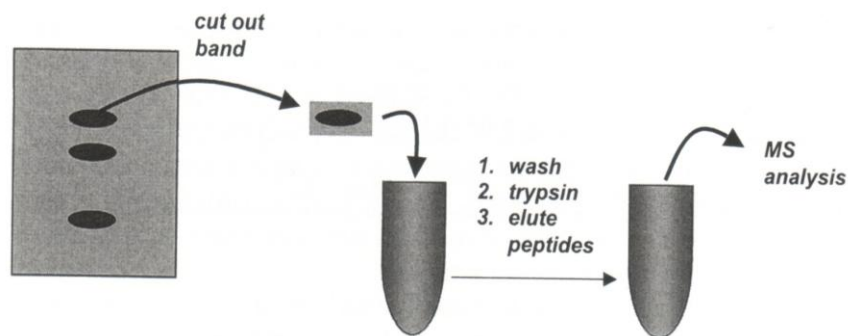
1. Etter vask av brønner; tilsett hver brønn 90 μ L 50 mM ABC-buffer.
2. Tilsett 4 μ L 50 mM DTT i hver brønn, og sett de i varmeskap ved 95 °C i 15 min. Det er veldig viktig at brønnene dekkes til, slik at ikke bufferen fordamper. Deretter avkjøl brønnene.
3. Tilsett hver brønn 6 μ L 200 mM IAA, og sett de umiddelbart på et mørkt sted i 15 min.
4. Tilsett 1 μ L 100 μ g/mL trypsin i 50 mM ABC-buffer til brønnene, og rist på Vibramax ristepate ved 500 rpm i 5 min.
5. Inkuber brønnene ved 37 °C over natten i et varmeskap.

6.4.3 Prosedyre for in-gel proteolyse

Utførelsen av in-gel proteolyse (Figur 10) fulgte prosedyren nedenfor:

1. Kutt gelen i små biter (<1 mm diameter) med skalpell og legg bitene i hvert sitt LoBind eppendorfrør. Er bitene dobbelt så store, doubles mengden DTT, IAA og trypsin.
2. Vask hver gelbit to ganger med 100 μ L ionebyttet vann. Ta vekk vannet med en pipette mellom hver vask.
3. Krymp gelbitene ved å tilsette 120 μ L ACN. Gelbitene blir hvite. Ta ACN vekk.

4. Tilsett 30 μL 6,5 mM DTT i hvert rør, og inkuber rørene ved romtemperatur i 60 min. Ta DTT vekk.
5. Krymp gelbitene ved å tilsette 60 μL ACN. Ta ACN vekk.
6. Tilsett 30 μL 54 mM IAA i hvert rør, og inkuber rørene ved romtemperatur i mørket i 30 min. Ta IAA vekk.
7. Krymp med 60 μL ACN. Ta ACN vekk.
8. Svell med 60 μL 50 mM ABC-buffer. Ta vekk buffer.
9. Repeter pkt. 7 og 8.
10. Krymp med 100 μL ACN. Ta ACN vekk.
11. Tilsett 10 μL 10 ng/ μL trypsin i 50 mM ABC-buffer. Inkuber på is i 30 min.
12. Tilsett 10-20 μL 50 mM ABC-buffer for å dekke gelbitene.
13. Inkuber ved 37 °C over natten i et varmeskap.



Figur 10: In-gel proteolyse. Bånd av interesse kuttet ut av en gel og gelbåndet vaskes. Trypsin tilsettes og penetrerer gelmatriksen slik at protein kløyves til peptider. Peptidene blir deretter vasket ut av gelen[17].

6.5 PRØVEOPPARBEIDELSE

Biologiske prøver er komplekse blandinger som ikke kan injiseres direkte inn i et LC-MS system uten forutgående prøveopparbeidelse. Og fordi det man leter etter kan finnes i veldig lave konsentrasjoner i denne komplekse matriksen, er det viktig både med opprensning og oppkonsentrering.

6.5.1 Immunoaffinitetsekstraksjon

Immunoaffinitet ble benyttet for både prøver av T-lymfocytter og tarmprøver. T-lymfocytprøvene ble først dampet inn på Speedvac, 50 °C, og reløst i 100 µL TBS-buffer for å kunne brukes i immunoaffinitetsekstraksjonen. Tarmceller i sukrosebuffer ble brukt uten noen forbehandling. Immunoaffinitetsekstraksjon (Figur 11) ble utført etter følgende prosedyre i innkjøpte protein G coated 96-wells plater:

DAG 1:

Immobilisering av antistoff

1. Vask brønner med 3×200 µL TBS med 0,05 % Tween-20. Bruk vakuumsug til å fjerne løsninger fra brønnene mellom hver tilsetning.
2. Tilsett 100 µL 1 µg/mL antistoff.
3. Inkuber ved romtemperatur i 30 min på en Vibramax ristepate ved 500 rpm. Fjern løsningene fra brønnene etter inkubering.

Kryssbinding av antistoff til Protein G

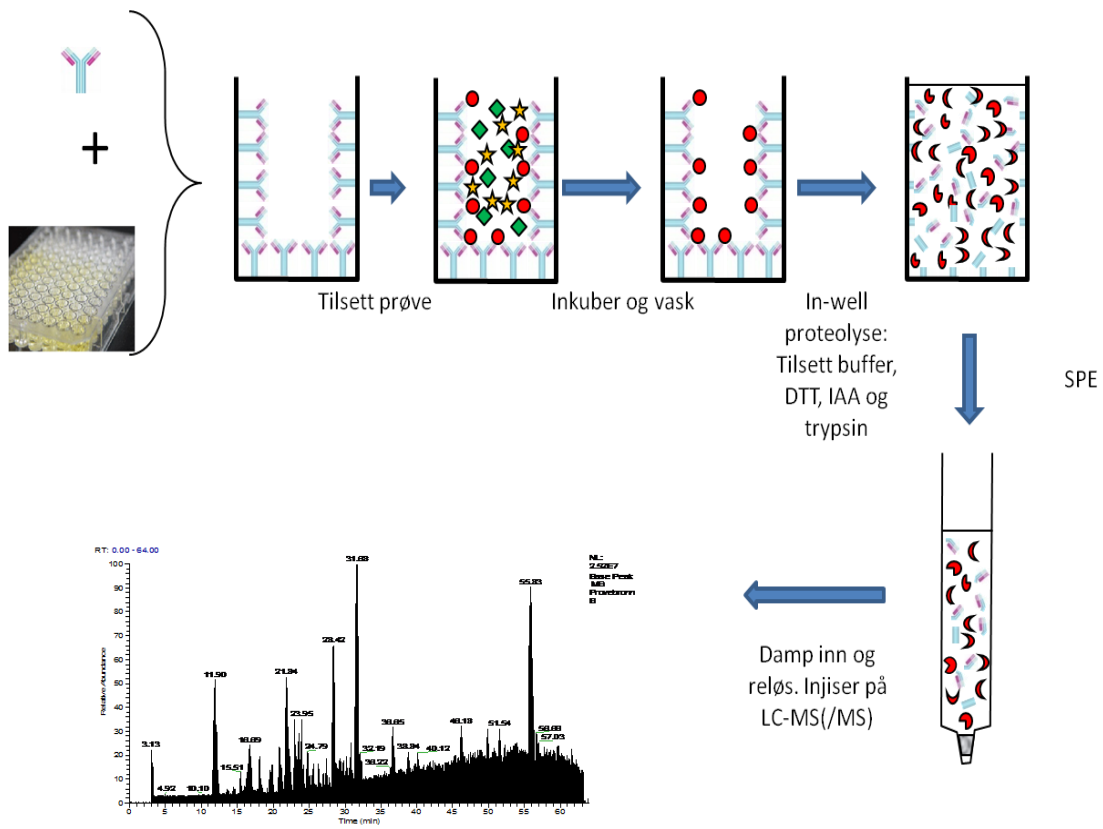
1. Tilsett 200 μL 200 mM trietanolamin, deretter fjern trietanolaminen fra brønnene.
2. Tilsett 200 μL 50 mM DMP i trietanolamin. Inkuber ved romtemperatur i 60 min på Vibramax ristepate ved 500 rpm.
3. Fjern løsningen og vask med 200 μL 200 mM trietanolamin.
4. Fjern løsningen og blokker ved å tilsette 200 μL 100 mM etanolamin. Bland ved romtemperatur i 15 min på Vibramax ristepate ved 500 rpm.
5. Fjern løsningen og tilsett 200 μL 0,1 M glycin med 2 M urea. Dette gjøres for å ta vekk ubundet antistoff. Deretter fjern glycin med urea løsningen.
6. Vask med 2×200 μL vaskebuffer, TBS-buffer.

Binding av antigen

1. Fjern vaskeløsningen, og vask videre med 3×200 μL TBS med 0,05 % Tween-20.
2. Fjern vaskeløsningen og tilsett 100 μL prøve eller blank (TBS-buffer) til brønnene. Inkuber ved romtemperatur i 60 min på Vibramax ristepate ved 500 rpm.
3. Fjern løsningen og vask med 3×200 μL TBS med 2 M urea (når kryssbundet) eller TBS med 0,05 % Tween-20 (når kryssbinding ikke gjøres).
4. Fjern løsningen og vask med 3×200 μL TBS-buffer.
5. In-well proteolyse gjøres (som beskrevet i kapittel 6.4.2).

DAG 2:

1. Ta innholdet i brønnene over i hvert sitt LoBind eppendorfrør så fort som mulig.
2. SPE (som beskrevet i kapittel 6.7).
3. Analyse på LTQ Orbitrap.



Figur 11: Figuren viser hele forsøket med immunoaffinitet, in-well proteolyse, SPE og LC-MS/MS-analyse.

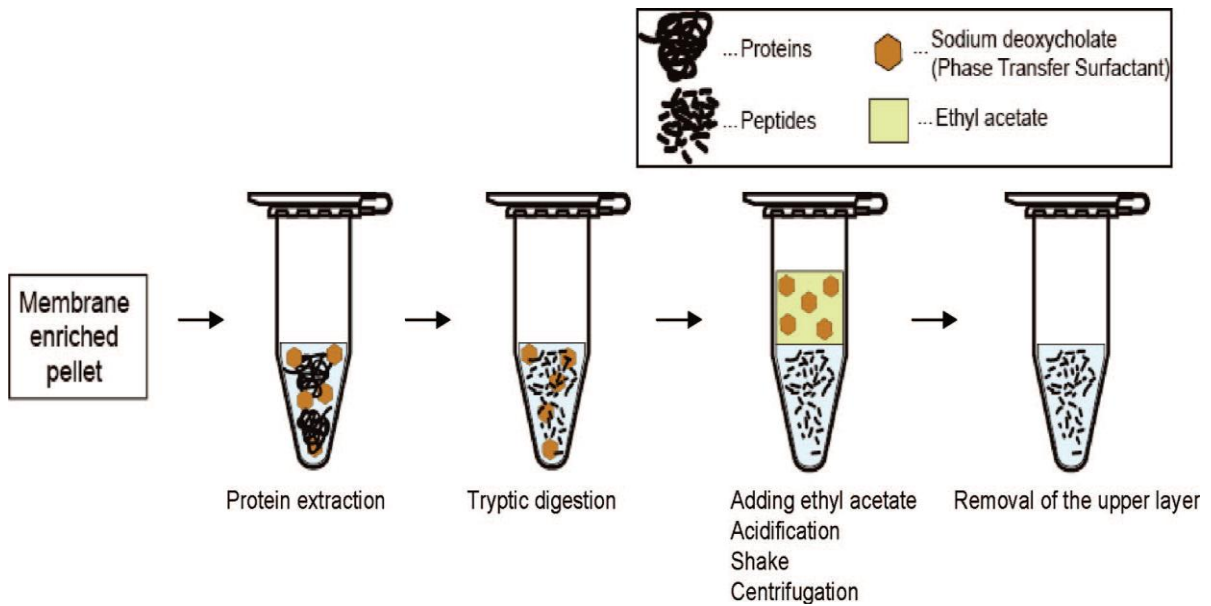
6.5.2 SDC-forsøk

Når man jobber med membranproteiner kan det være vanskelig å ekstrahere eller løse ut proteinene fra membraner, og den påfølgende proteolysen kan også være problematisk[35]. Det finnes derfor mange protokoller for å øke løseligheten og forbedre proteolysen av membranproteiner.

En av protokollene, utviklet av Masuda, Tomita og Ishihama, bruker surfaktanten SDC for å øke løseligheten til hydrofobe proteiner, øke aktiviteten til trypsin og bedre trypsinets tilgjengelighet til proteiner som er denaturert under ekstraksjonsprosessen[35]. Prosedyren til SDC-forsøket (Figur 12) på T-lymfocytter nedenfor er en modifisert prosedyre av den som er beskrevet av Masuda, Tomita og Ishihama.

Prosedyre

1. Reløs 100 μL inndampet prøve i 100 μL 50 mM ABC-buffer som inneholder 5 % SDC.
2. Ekstraher i 5 min ved 95 °C.
3. Tilsett 6 μL 1 mM DTT og sett rørene på varmeblokk som holder 95 °C i 15 min. Avkjøl rørene.
4. Tilsett 5 μL 5 mM IAA og sett rørene umiddelbart på et mørkt sted i 15 min.
5. Fortynn 10 ganger ved å ta ut 10 μL av prøven til hvert sitt nye LoBind eppendorfrør og tilsett i hvert rør 90 μL 50 mM ABC-buffer.
6. Tilsett 1,2 μL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsin til hvert rør, og inkuber ved 37 °C over natten.
7. Tilsett 100 μL etylacetat.
8. Surgjør med 5 μL 10 % TFA for å få pH ~2.
9. Rist rørene i 1 min før de sentrifugeres ved 15700 g i 2 min.
10. Ta av det øverste laget som består av etylacetat. Behold det underste laget og gjør SPE.



Figur 12: Oversikt over analyse der phase transfer surfactanten SDC benyttes. SDC blir separert fra peptidene ved å tilsette et organisk løsemiddel og deretter surgjøre. SDC går over i den organiske fasen og vannfasen kan brukes videre[35].

6.6 Western blott på tarmprøve

Western blott kan benyttes for å forsikre seg om at målproteinene man leter etter, som her er P-gp, finnes i prøvene. I tillegg kan western blott brukes til å finne omtrentlig beliggenhet av P-gp i elektroforese gelen.

Det ble laget to 10 % SDS geler, og det trengs en nitrocellulosemembran til hver gel. Prøven ble brukt både kokt og ukokt, fortynnet og ufortynnet. Primærantistoffet som ble benyttet var JSB-1(anti P-gp) i 1:100 fortynning. Det sekundære antistoffet var geit anti-mus IgG (H+L)-HRP konjugat 1:1500.

Prøve 1: Ufortynnet prøve, kokt; 50 µL prøve + 50 µL 2×samplebuffer (se APPENDIKS 5).

Prøve 2: Ufortynnet prøve, ukokt; 50 μL prøve + 50 μL 2 \times samplebuffer.

Prøve 3: 10 ganger fortynnet prøve, kokt; 5 μL prøve + 45 μL destillert vann + 50 μL 2 \times samplebuffer.

Prøve 4: 10 ganger fortynnet prøve, ukokt; 5 μL prøve + 45 μL destillert vann + 50 μL 2 \times samplebuffer.

15 μL av prøvene ble satt på gelen i hver sin brønn, og i to brønner ble det satt på 5 μL av elektroforesestandarder (Precision Plus Protein Dual Color Standards).

Utførelsen av hele western forsøket fulgte prosedyren som er vedlagt i APPENDIKS 2, og oppskrifter på løsninger til forsøket er vedlagt i APPENDIKS 5.

6.7 SPE

SPE ble gjort på alle prøver før LC-MS/MS-analysen. I tippene kunne det maksimalt settes på 50 μL væske, og løsningene ble presset gjennom tippene ved å sentrifugere ved 2000 g i 1-2 min. For de løsningene som hadde høyere viskositet måtte antall g og minutter økes.

Prosedyre for SPE

Sentrifugering ved 2000 g i 1-2 min gjøres mellom hver påsettelse.

1. Kondisjoner sorbenten med 2 \times 50 μL 50 % ACN/H₂O.
2. Vask sorbenten med 2 \times 50 μL 20 mM HCOOH.

3. Prøvepåsetting:

- Prøver der det bare er gjort en direkte in-solution proteolyse settes det på 1×10 µL prøve.
- Prøver der det er gjort gelelektroforese og in-gel proteolyse settes det på 1×40 µL prøve.
- Prøver der det er gjort annen prøveopparbeidelse i tillegg til proteolyse settes det på 2×50 µL prøve.

4. Vask sorbenten med 2×50 µL 20 mM HCOOH.

5. Overfør SPE-tippene til nye LoBind eppendorfør.

6. Eluer ved å sette på 1×50 µL 80 % ACN/20 mM HCOOH.

7. Damp inn eluatene på Speedvac ved 50 °C, og reløs i 50 µL mobilfase A. Eppendorfrørene ristes på vortex før løsningene overføres til vialer. Injiser 35 µL for LC-MS/MS-analyse på LTQ Orbitrap.

6.8 LC-MS/MS for analyse

6.8.1 HPLC

HPLC-betingelser

Injeksjonsvolum: 35 μ L

Væskehastighet: 50 μ L/min

Kolonne: BioBasic C8, 50 mm \times 1 mm, 5 μ m partikkelstørrelse.

Mobilfase A: MeOH og 20 mM HCOOH i forhold 5:95 (v/v).

Mobilfase B: MeOH og 20 mM HCOOH i forhold 95:5 (v/v).

Tabell 7 viser gradienten som ble benyttet.

Tabell 7: Gradienten

TID (min)	MFA (%)	MFB (%)	Væskehastighet(μ L/min)
0,0	100	0	50
55,0	0	100	50
59,0	0	100	50
59,5	100	0	50
64,5	100	0	50
65,0	100	0	100
69,0	100	0	100
70,0	100	0	50

6.8.2 MS/MS

Deteksjonen ble foretatt i 2 scan events og ESI ble gjort i positiv mode. I scan event 1 utfører orbitrapen en full scan singel MS-analyse (se Tabell 8). De mest intense ionene fra scan event 1 velges ut og fragmenteres av ionefellen i scan event 2. Det benyttes dynamisk eksklusjon for å skaffe så mye informasjon som mulig. Etter det er tatt opp maksimalt to MS/MS-spektra av det mest intense ionet blir dette ionet satt på en ekskluderingsliste. Da kan det nest høyeste ionet fragmenteres, og slik fortsetter prosessen. Dette bidrar til at ioner med lavere intensitet også blir fragmentert. Etter et ion har vært på ekskluderingslisten i 30 sekunder fjernes det fra listen, og ionet kan igjen fragmenteres (se Tabell 9). Andre MS-betingelser vises i Tabell 10.

Tabell 8: Scan event 1; FTMS

Scantid	3-64 min
Scan	m/z -område 250-2000
Oppløsning	30000

Tabell 9: Scan event 2; ITMS

”Data dependent” MS/MS scan	Mest intense ion fra scan event 1 med dynamisk eksklusjon
Activation type	CID
Normalized collision energy	35,0
Isolation width	2,0
Default charge state	2
Minimum signal threshold (counts)	100.000
Reject mass width	0,5 a.m.u.

Forts.tabell 9

Betingelser for dynamisk eksklusjon:	
Repeat count	2
Repeat duration	30,0 sek
Exclusion list size	200
Exclusion duration	30,0 sek
Exclusion mass width low	0,5 a.m.u.
Exclusion mass width high	3,0 a.m.u.

Tabell 10: Andre MS-betingelser

Tørkegass	Nitrogen
Hastighet på tørkegass	10-20 L/min
Forstøvergass	Nitrogen
Kildespenning	5 kV
Kapillærtemperatur	275 °C

6.9 Dataverktøy

6.9.1 ProteinProspector

Når man vet hvilket protein man leter etter, og har sekvensen til dette proteinet, kan ProteinProspector brukes til å finne ut hvilke peptider som dannes ved proteolyse av proteinet, og hvilke b- og y-ioner som dannes ved fragmentering av peptidene.

ProteinProspector kan derfor benyttes når man manuelt leter i MS(/MS)-spektra etter peptider som stammer fra målproteinene. ProteinProspector er tilgjengelig på internett (<http://prospector.ucsf.edu>), og for å gjøre en simulert proteolyse av et protein må fanen "MS-digest" velges. Ved søk på P-gp ble følgende innstillinger benyttet:

Proteolyse: Trypsin

Maksimum antall steder klipping mangler: 0

Konstante modifikasjoner: Carboxymethyl (C)

Variable modifikasjoner: Oxidation (M)

Peptidens *m/z*-område: 300-2000

Minimum lengde av peptider: 6 aminosyrer

Vis flere ladninger: Huket av

Protein sekvens: Sekvensen til P-gp

Instrument: ESI-ION-TRAP-low-res

6.9.2 Proteome Discoverer

Ved å kjøre resultatfilen fra en analyse gjennom Proteome Discoverer kan man få identifisert hvilke proteiner som er tilstede i prøven. Etter analyse på T-lymfocytter og tarmceller ble alle resultatfilene undersøkt ved hjelp av Proteome Discoverer.

Innstillingene som ble benyttet var:

Søkealgoritme: SEQUEST

Aktiveringstype: CID

Gruppe spektra: Huket av slik at "Same Measured Mass-to-Charge" vises.

Database: ipi.HUMAN.v3.67.fasta

Enzym: Trypsin

Variable modifikasjoner (Dynamic Side Chain Modifications): Oxidation (M)

Konstante modifikasjoner (Static Side Chain Modifications): Carboxymethyl (C)

Ellers skal alt stå slik som det allerede vises.

Det ble også ofte brukt decoy-database og filter:

Decoy-database søk: Huket av "Search Against Decoy Database".

Filter kan først legges inn etter at søket er ferdig og trefflisten vises. Innstillingene som ble benyttet var:

- Peptidfilter: "Peptid Confidence" ble valgt og det ble huket av for "inverted" og "Peptide Confidence-Value" ble satt til "Low".
- Proteinfiler: "Peptides Per Protein" ble valgt, og resten av alternativene for det filteret skal være slik at "Number of Peptides" står som 1, og både "Count Only Rank 1 Peptides" og "Count Peptide Only in Top Scored Proteins" skal være huket av.

7. RESULTATER OG DISKUSJON

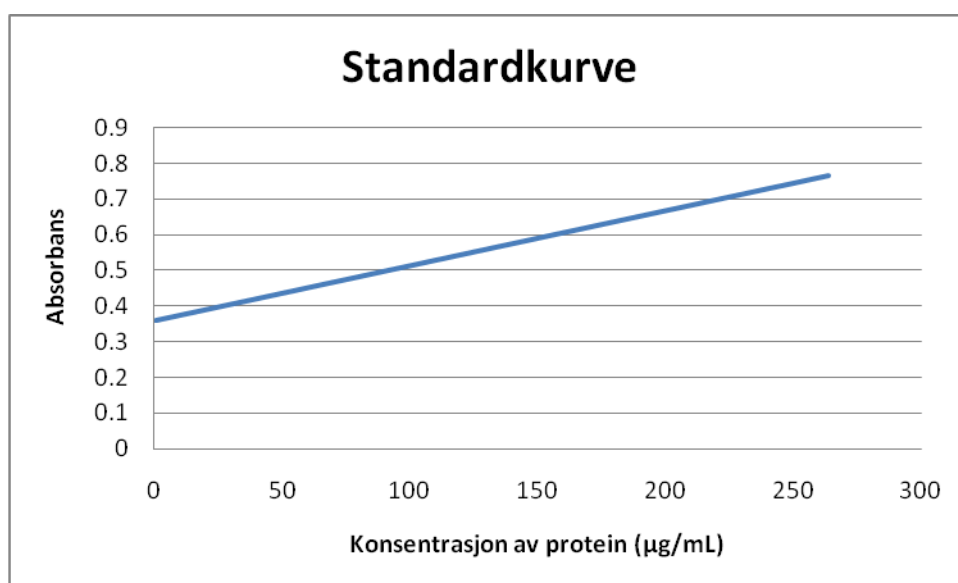
7.1 PRØVEFORBEREDELSE

7.1.1 Måling av totalprotein

I den første målingen viste det seg at konsentrasjonen av protein i T-lymfocytprøven var høyere enn 300 $\mu\text{g/mL}$, og at konsentrasjonen var utenfor standardkurven. Prøven ble derfor fortynnet 10 ganger og 50 ganger, og det ble gjort en ny måling.

Totalprotein ble målt til å være $\sim 460 \mu\text{g/mL}$, og standardkurven var fin (Figur 13).

Denne konsentrasjonen av protein ble brukt til å regne ut passende mengder DTT, IAA og trypsin for proteolyse av T-lymfocytprøver.

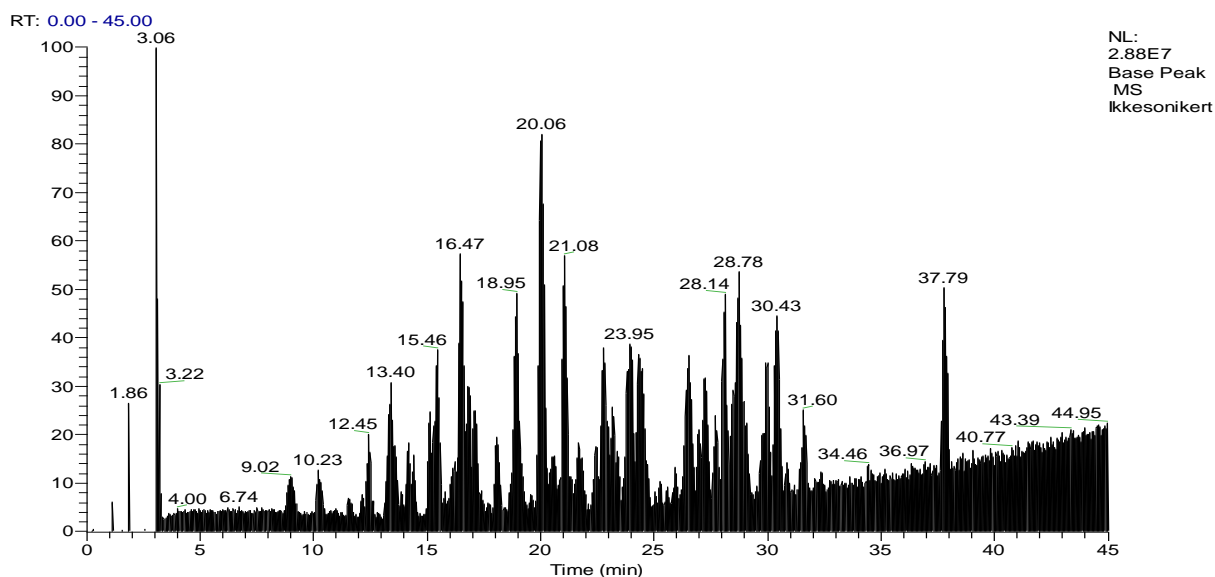


Figur 13: BSA standardkurve ved måling av totalprotein.

7.2 DIREKTE IN-SOLUTION PROTEOLYSE

7.2.1 T-lymfocytprøver

I det første forsøket ble det gjort direkte proteolyse på 2 paralleller, hver av 100 μL prøve. Prøven i det ene røret ble sonikert for å løse opp cellepluggen i løsningen, mens den andre prøveløsningen ble brukt som den var. Ellers ble proteolysen av T-lymfocytprøve utført som beskrevet i kapittel 6.4.1, med påfølgende SPE og LC-MS/MS som beskrevet tidligere i oppgaven. Resultatfilene ble gjennomført i Proteome Discoverer med innstillingen beskrevet i kapittel 6.9.2. Kromatogrammene til både prøven som ble sonikert og prøven som ikke ble sonikert (Figur 14) viste mange topper, men det var ingen treff på P-gp i Proteome Discoverer. Liste over de 20 øverste proteintreffene fra prøven som ikke ble sonikert vises i Tabell 11 og alle proteinene som det var treff på fra både sonikert prøve og ikke sonikert prøve vises i APPENDIKS 6.



Figur 14: Base peak kromatogrammet til prøve som ikke ble sonikert. Metode 1.

RESULTATER OG DISKUSJON

Tabell 11: Liste over de 20 øverste proteintreffene fra prøve som ikke ble sonikert. Tabellen viser hvor stor del av det aktuelle proteinet som peptidtreffene dekker (coverage), antall peptider fra proteinet som det er treff på (# peptides), hvor mange aminosyrer proteinet består av (# AAs), hvor bra treffet er (jo høyere score jo bedre) og en beskrivelse (navn) av proteinet.

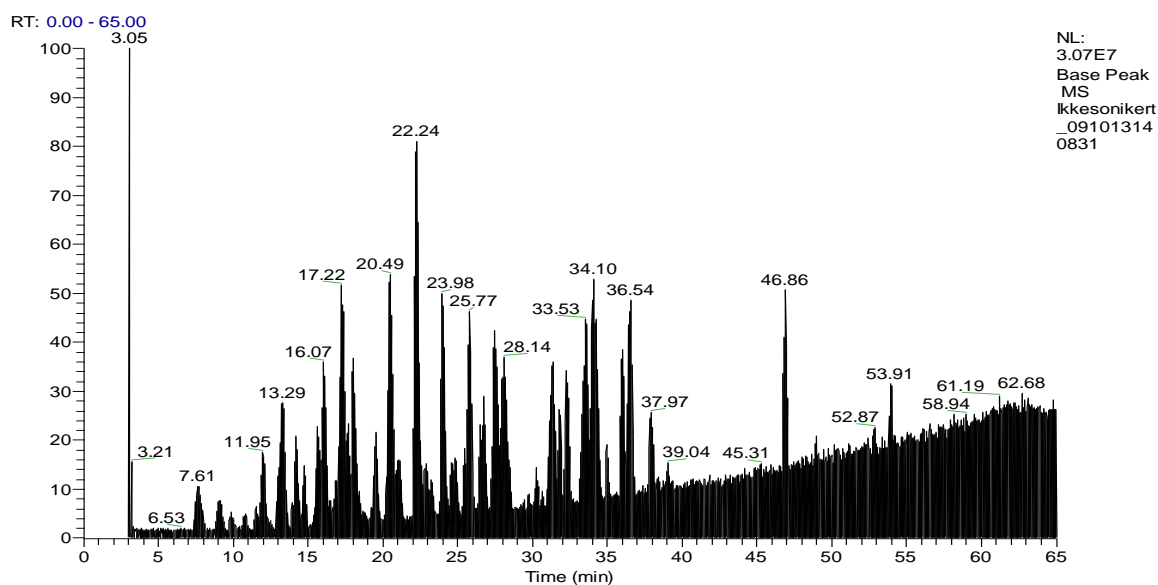
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	39.89	13	351	45.54	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00922693.1	27.41	10	343	36.02	cDNA FLJ53662, highly similar to Actin, alpha skeletal muscle
IPI:IPI00236554.1	19.69	10	650	32.53	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00027462.1	45.61	7	114	30.67	Protein S100-A9
IPI:IPI00007047.1	49.46	7	93	23.79	Protein S100-A8
IPI:IPI00298994.6	2.20	5	2541	20.66	Talin-1
IPI:IPI00019502.3	4.64	7	1960	20.39	Isoform 1 of Myosin-9
IPI:IPI00789477.1	8.26	5	666	19.41	cDNA FLJ58679, highly similar to Lactotransferrin
IPI:IPI00453473.6	32.04	5	103	17.78	Histone H4
IPI:IPI00553169.5	2.42	4	2315	14.52	Putative uncharacterized protein FLNA
IPI:IPI00418471.6	7.94	4	466	13.70	Vimentin
IPI:IPI00220403.3	20.63	3	126	13.55	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00291175.7	4.50	4	1066	13.17	Isoform 1 of Vinculin
IPI:IPI00909239.1	4.96	4	887	12.12	actinin, alpha 1 isoform c
IPI:IPI00654755.3	17.01	2	147	10.73	Hemoglobin subunit beta
IPI:IPI00216691.5	31.43	3	140	9.94	Profilin-1
IPI:IPI00795257.3	12.29	2	293	8.99	32 kDa protein
IPI:IPI00940673.1	5.69	3	457	8.79	cDNA FLJ53217, highly similar to Transketolase
IPI:IPI00410714.5	21.83	3	142	8.61	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00027409.1	8.20	2	256	7.81	Myeloblastin

Mange av proteinene som vises i listene til den sonikerte prøven og prøven som ikke ble sonikert, er de samme. Det er blant annet flere treff på aktin og histoner. Aktin er et muskelprotein som finnes i nesten alle eukaryote celler. Histoner pakker og ordner DNA til strukturelle enheter kalt nukleosomer, og finnes i alle eukaryote celler. Alle eukaryote celler har fem store klasser av histoner, H1, H2A, H2B, H3 og H4[11]. Det er derfor naturlig at både aktin og histoner er tilstede i prøvene. Noen av de andre proteinene som forekommer i både den sonikerte prøven og prøven som ikke ble sonikert er uthevet i tabell 11. Protein S100-A9 er et kalsiumbindende protein som blant annet har antimikrobiell aktivitet mot bakterier og sopp.

Proteinet inngår i et kompleks med protein S100-A8, og finnes for eksempel i hvite blodceller [36]. Talin-1 er et protein som bindes med høy affinitet til vinculin, og som antagelig er involvert i forbindelsen av store cytoskjelett strukturer til plasmamembranen. I lymfocytter er proteinet konsentrert i regioner med celle-celle kontakt [37]. Myosin-9 ser ut til å ha en rolle i for eksempel cytokinese (deling av cellens cytoplasma i to) og celle fasong, og finnes blant annet i hvite blodceller[38]. Plastin-2 (vises i lister i APPENDIKS 6) er et aktin-bindende protein som har en rolle i aktivering av T-celler, og finnes derfor blant annet i T-lymfocytter [39]. Vimentin, et medlem av intermediær filament familien, er også et protein som finnes i T-lymfocytter [40]. Proteinene myeloperoxidase er ansvarlig for mikrobedrepende aktivitet mot et bredt spekter av organismer, og er en del av forsvarssystemet til granulocytter[41]. På grunn av at hvite blodceller som nøytrofile granulocytter og lymfocytter er en del av immunforsvaret[42], er det logisk at de inneholder proteiner som har en type antimikrobiell virkning. Selv om prøven egentlig bare skal bestå av T-lymfocytter er det nok slik at ikke alle de andre hvite blodcellene ble luket ut i isoleringsprosessen, slik at resultatene viser proteiner fra disse cellene også. Resultatene tyder på at metoden har fungert, at proteiner tilstede i prøven blir proteolysert, men viser også at metoden ikke fungerer for P-gp. Det kan for eksempel komme av at konsentrasjonen av P-gp er så lav at proteinet ikke ses når mange andre proteiner er tilstede, det kan hende tilstedeværelsen av andre typer celler gjør det mer vanskelig å få detektert små mengder P-gp i prøven, det kan hende prosedyren for proteolyse ikke er bra nok til å få P-gp ut av membranen eller det kan være andre grunner til at P-gp ikke detekteres.

Prøvene ble fryst ned, og senere ble det gjort ny SPE og analyse på denne ferdigklippede prøveløsningen. Denne gangen ble LC-MS/MS metoden forandret. ”Repeat count” ble endret til 1, og lengden på gradienten ble økt med 20 min. Scantiden økte derfor fra 64,0 til 84,0 minutter. Dette ble gjort for å få

MS/MS-spektra av flere peptidioner, og for å spre toppene utover i kromatogrammet. Kromatogrammet vises i Figur 15.



Figur 15: Base peak kromatogram til prøve som ikke var sonikert. Metode 2.

De to kromatogrammene i figur 14 og 15 er veldig like, og det ser ikke ut som mange nye topper har kommet frem. Forskjellen mellom kromatogrammene er at toppene i figur 15 kommer senere enn det de samme toppene gjør i kromatogrammet i figur 14. Det er en tidsforskyvning som forventes når tiden gradienten bruker er økt.

Resultatfilene ble også gjennomført i Proteome Discoverer, og det ble benyttet decoy- database og filter som beskrevet i kapittel 6.9.2. Det ble søkt mot decoy- database for å fjerne falske positive treff, og filter ble brukt for å få mer sikre treff. Det var ingen treff på P-gp. Liste over de 20 øverste proteintreffene fra prøven som ikke ble sonikert vises i Tabell 12, og alle proteiner det var treff på både i den sonikerte prøven og prøven som ikke ble sonikert vises i APPENDIKS 7. Tabellene i APPENDIKS 6 og 7 viser at flere proteintreff ble funnet når den nye metoden ble benyttet enn når prøvene ble analysert med den opprinnelige metoden. Selv om det var flere proteintreff, var det mange treff på de samme proteinene.

RESULTATER OG DISKUSJON

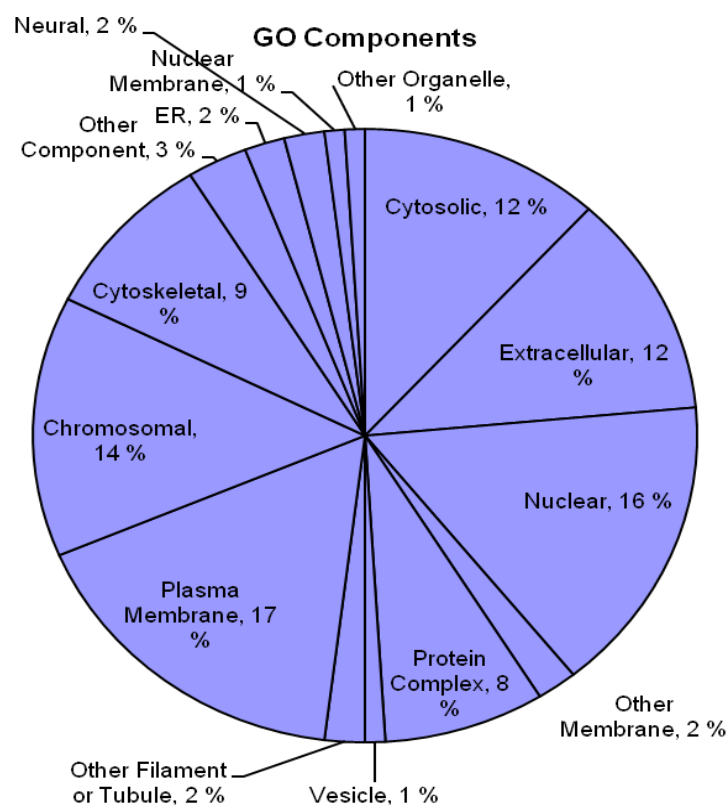
Tabell 12: Liste over de 20 øverste proteintreffene fra prøve som ikke ble sonikert.

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00021439.1	36.27	14	375	53.40	Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00298994.5	8.11	15	2553	48.36	Talin-1
IPI:IPI00291175.6	14.37	13	1065	40.43	Isoform 1 of Vinculin
IPI:IPI00023006.1	23.87	10	377	38.40	Actin, alpha cardiac
IPI:IPI00019502.2	6.53	10	1959	37.11	Myosin-9
IPI:IPI00236554.1	22.00	11	650	33.06	Isoform H14 of Myeloperoxidase precursor
IPI:IPI00027462.1	50.88	10	114	32.46	Protein S100-A9
IPI:IPI00298860.5	14.06	8	711	27.27	Growth-inhibiting protein 12
IPI:IPI00644576.1	3.87	8	2607	26.36	Filamin A, alpha
IPI:IPI00013508.5	12.22	9	892	26.03	Alpha-actinin-1
IPI:IPI00007047.1	48.39	6	93	19.22	Protein S100-A8
IPI:IPI00021263.3	30.61	6	245	18.66	14-3-3 protein zeta/delta
IPI:IPI00646867.1	12.99	6	431	18.01	Vimentin
IPI:IPI00216691.4	43.88	6	139	16.64	Profilin-1
IPI:IPI00220644.7	9.43	5	530	16.09	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2
IPI:IPI00453473.5	40.20	5	102	15.08	Histone H4
IPI:IPI00643920.2	8.19	4	623	14.98	Transketolase
IPI:IPI00654755.2	46.58	5	146	13.67	Hemoglobin beta subunit
IPI:IPI00010471.4	9.42	5	626	12.13	Plastin-2
IPI:IPI00006690.1	6.15	4	715	11.82	Eosinophil peroxidase precursor

For å undersøke om flere membranproteiner ble identifisert i den sonikerte prøven i forhold til prøven som ikke var sonikert, ble InforSense benyttet på disse dataene. Resultatene viste at 13 % av proteinene som ble identifisert i den sonikerte prøven var plasmamembranproteiner, mens 17 % av proteinene i prøven som ikke hadde blitt sonikert var plasmamembranproteiner. Det ble funnet flere proteiner i prøven som ikke var sonikert enn i prøven som var sonikert (APPENDIKS 7), noe som kan være grunnen til at det var flere treff på membranproteiner i prøven som ikke ble sonikert. Det tyder på at sonikering ikke var nødvendig verken for å øke antall identifiserte plasmamembranproteiner, eller antall proteiner generelt. Figur 16, 17 og 18 viser resultatene av gen ontologi (GO) kommentarene (forklaringene) for prøven som ikke ble sonikert, og figur 19, 20 og 21 viser resultatene for prøven som ble sonikert.

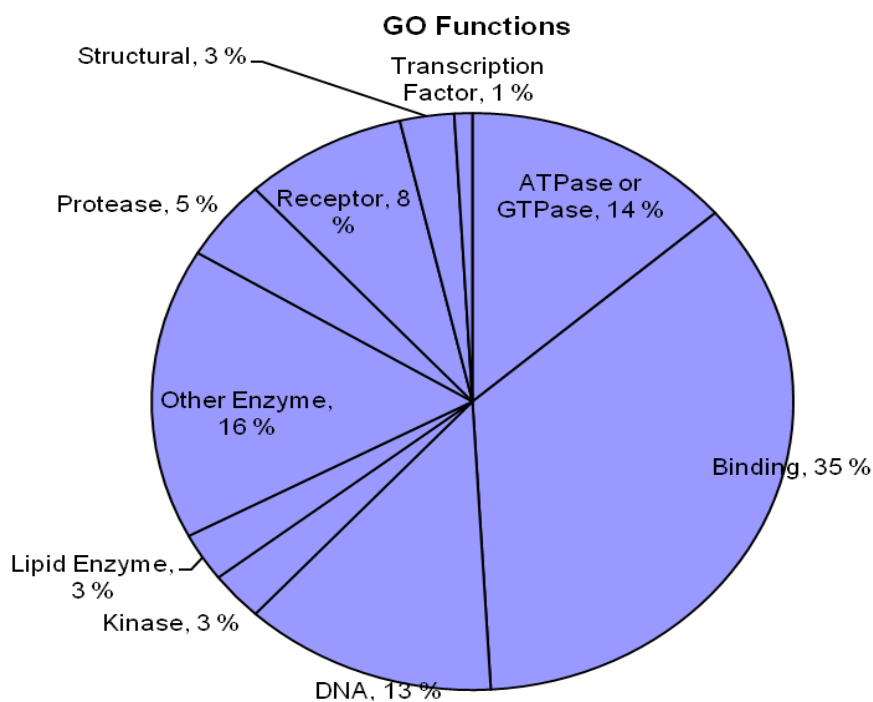
RESULTATER OG DISKUSJON

GO Components figurene viser hvilke typer av cellulære proteiner som har blitt identifisert, for eksempel prosentandelen av ekstracellulære proteiner. GO Functions figurene viser hvilke molekylære funksjoner de identifiserte proteinene har, for eksempel prosentandelen av proteinene som er enzymer. GO Processes figurene viser hvilke biologiske prosesser proteinene påvirker, for eksempel prosentandel av proteinene som påvirker cellyklus. For den sonikerte prøven greide InforSense å finne GO Components for 74 % av proteinene, GO Functions for 79 % av proteinene og GO Processes for 70 % av proteinene, mens for prøven som ikke ble sonikert var verdiene henholdsvis 75 %, 81 % og 68 %. Selv om det var stor likhet mellom figurene til sonikert prøve og ikke sonikert prøve, vises de største forskjellene i Tabell 13. Det er vanskelig å vite grunnen til forskjellene som observeres, om det er en konsekvens av sonikering eller om det er et helt tilfeldig resultat.

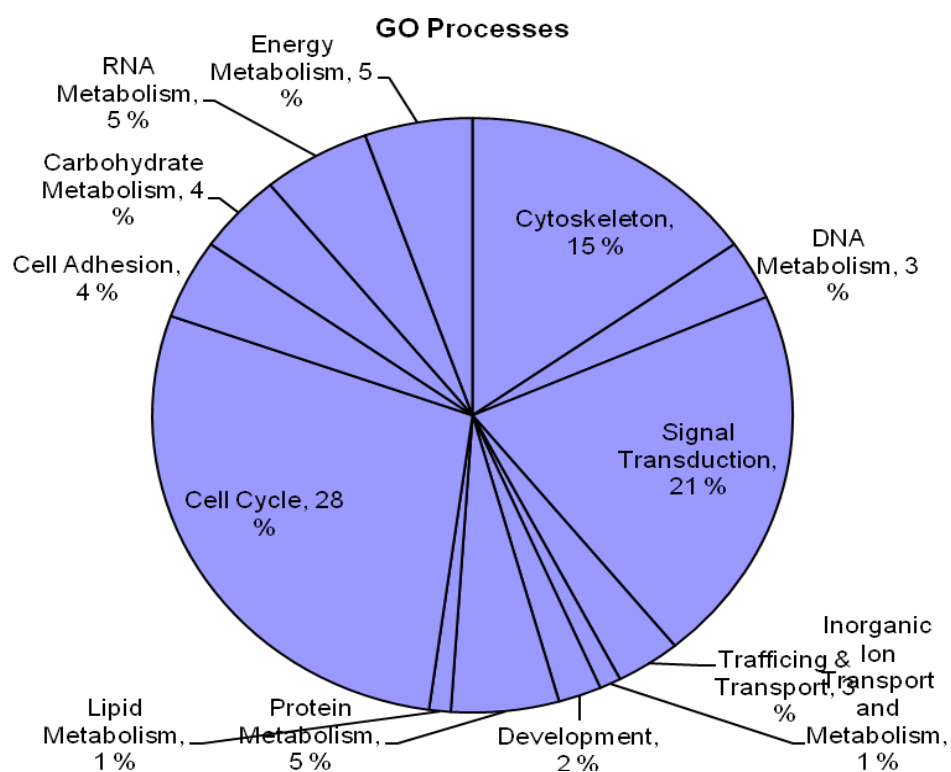


Figur 16: GO Components for prøve som ikke ble sonikert.

RESULTATER OG DISKUSJON

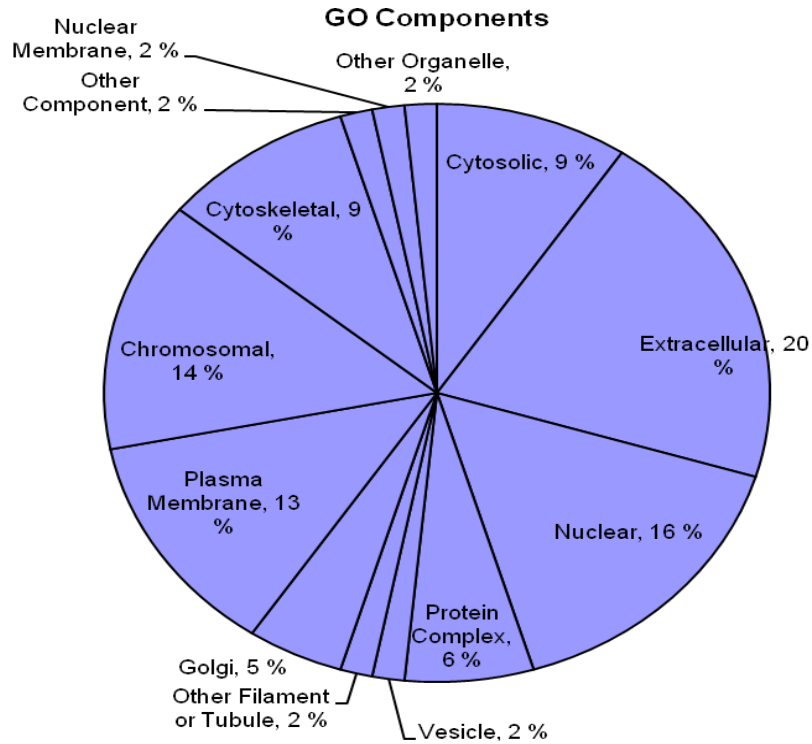


Figur 17: GO Functions for prøve som ikke ble sonikert.

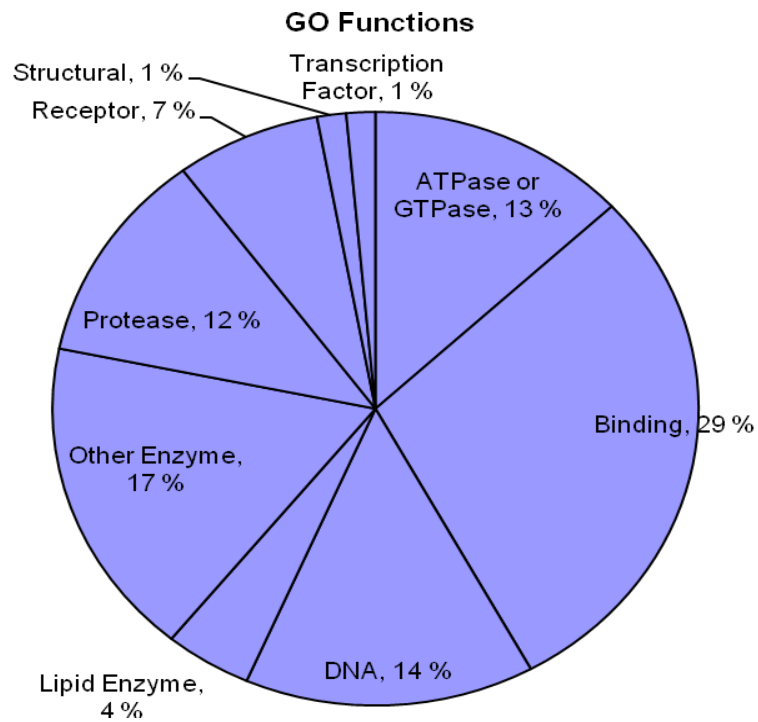


Figur 18: GO Processes for prøve som ikke ble sonikert.

RESULTATER OG DISKUSJON

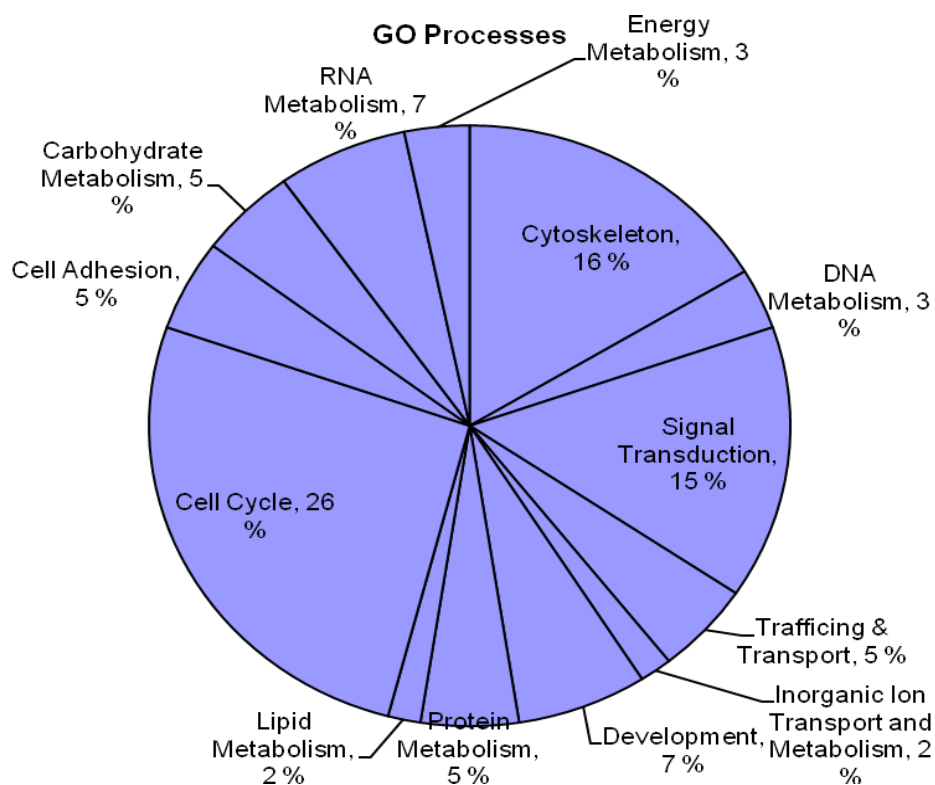


Figur 19: GO Components for sonikert prøve.



Figur 20: GO Functions for sonikert prøve.

RESULTATER OG DISKUSJON



Figur 21: GO Processes for sonikert prøve.

Tabell 13: Forskjeller mellom GO kommentarene til sonikert prøve og prøve som ikke ble sonikert.

	Sonikert prøve	Ikke sonikert prøve
GO Components	Større andel ekstracellulære proteiner. Mangler gruppe for nerve-, ER (endoplasmatisk retikulum)- og andre membranproteiner.	Større andel plasmamembranproteiner. Mangler gruppe for golgi-proteiner.
GO Functions	Større andel proteaser. Mangler gruppe for kinaser.	Større andel av proteiner som har med binding/tilknytning å gjøre.
GO Processes	Større andel av proteiner som er knyttet til utvikling.	Større andel av proteiner som er knyttet til signaltransduksjon (omforming av signaler).

7.2.2 Tarmprøver

Direkte proteolyse av tarmprøve ble gjort etter beskrivelsen i kapittel 6.4.1. På grunn av viskositeten til prøven ble SPE-tippene tette når prøven ble satt på. Prøven ble derfor fortynnet 10 ganger med 20 mM HCOOH før prøvepåsetting, og volumet for prøvepåsetting på SPE-tippene ble derfor 2×50 µL. Ellers ble LC-MS/MS og påfølgende databehandling utført som beskrevet før i oppgaven.

Tabell 14 og Tabell 15 viser proteintreffene.

Tabell 14: Liste over proteintreff fra parallell 1.

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	22.22	6	351	14.40	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00448925.6	11.78	4	399	12.33	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00453473.6	28.16	4	103	10.41	Histone H4
IPI:IPI00736860.3	12.12	4	330	8.32	Putative uncharacterized protein ENSP00000374988 (Fragment)
IPI:IPI00946286.1	0.35	1	2570	4.23	alpha 3 type VI collagen isoform 4 precursor
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	3.22	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00909649.3	15.89	1	107	2.29	Protein
IPI:IPI00018971.8	3.37	1	475	2.28	52 kDa Ro protein
IPI:IPI00551024.4	2.09	1	575	2.18	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)

Tabell 15: Liste over proteintreff fra parallell 2.

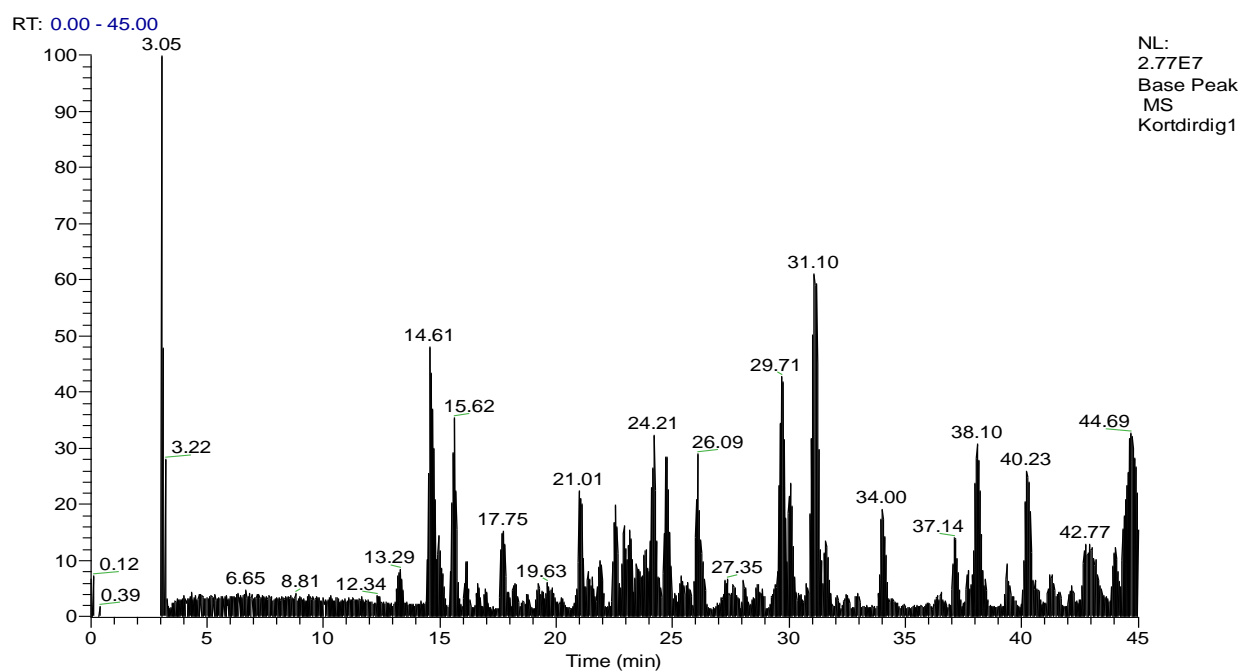
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00217465.5	24.88	5	213	17.07	Histone H1.2
IPI:IPI00410714.5	23.24	5	142	15.80	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00220403.3	37.30	3	126	14.32	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00654755.3	30.61	5	147	12.15	Hemoglobin subunit beta
IPI:IPI00008298.1	12.77	1	94	5.15	Defensin-5
IPI:IPI00902967.1	6.56	1	122	4.63	cDNA FLJ44468 fis, clone UTERU2026025, moderately similar to SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 2
IPI:IPI00917545.1	19.23	1	52	3.50	Putative uncharacterized protein ACTG2
IPI:IPI00742780.1	1.78	1	563	2.89	FLJ00279 protein (Fragment)
IPI:IPI00014165.1	8.70	1	115	2.74	Histone H2A
IPI:IPI00939576.1	10.48	1	105	2.51	cDNA FLJ75025, highly similar to Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA), transcript variant 2, mRNA

RESULTATER OG DISKUSJON

IPI:IPI00219381.5	10.10	1	99	2.34	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2
IPI:IPI00398805.1	13.64	1	66	1.91	H2A histone family, member V isoform 4
IPI:IPI00291755.6	0.37	1	1887	1.82	Isoform 1 of Nuclear pore membrane glycoprotein 210
IPI:IPI00843996.1	7.26	1	124	1.79	Splicing factor, arginine/serine-rich 3, isoform CRA_a

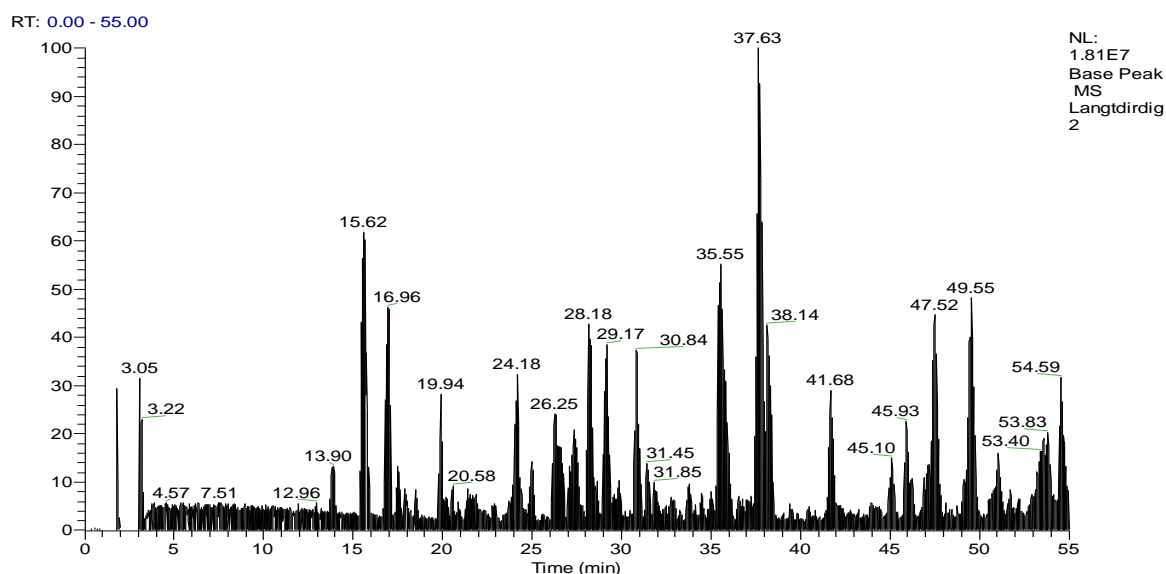
Det ble gjort ny SPE og analyse på denne ferdigklippede prøveløsningen. Det meste ble gjort som gangen før, men det ble brukt to LC-MS/MS metoder, den korte metoden forklart i kapittel 6.8 og den lengre metoden forklart i 7.2.1.

Kromatogrammer vises i Figur 22 og Figur 23.



Figur 22: Base peak kromatogrammet til tarmprøve analysert med kort metode.

RESULTATER OG DISKUSJON



Figur 23: Base peak kromatogrammet til tarmprøve analysert med lang metode.

Selv om toppene muligens ble litt mer spredt utover i kjøringen, var det ikke noe treff på P-gp når disse resultatfilene ble gjennomført ved hjelp av Proteome Discoverer. Liste over proteintreffene i prøvene som ble kjørt med den korte metoden og den lange metoden vises i Tabell 16 og Tabell 17.

Tabell 16: Liste over proteintreff fra prøven analysert med kort metode.

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00217465.5	6.10	1	213	15.57	Histone H1.2
IPI:IPI00220403.3	26.19	3	126	13.94	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00654755.3	24.49	2	147	13.62	Hemoglobin subunit beta
IPI:IPI00410714.5	14.08	2	142	12.77	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00008298.1	17.02	1	94	5.67	Defensin-5
IPI:IPI00021785.2	10.85	1	129	2.95	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial
IPI:IPI00014165.1	8.70	1	115	2.68	Histone H2A
IPI:IPI00942961.1	4.41	1	295	2.65	Putative uncharacterized protein ALDOB
IPI:IPI00329461.5	4.64	1	388	2.51	Isoform 1 of Myosin light chain kinase family member 4

RESULTATER OG DISKUSJON

Tabell 17: Liste over proteintreff fra prøven analysert med lang metode.

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00217465.5	16.43	4	213	12.37	Histone H1.2
IPI:IPI00410714.5	14.08	2	142	10.24	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00654755.3	24.49	2	147	9.80	Hemoglobin subunit beta
IPI:IPI00220403.3	26.19	2	126	8.76	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00894523.1	21.21	2	99	4.77	Putative uncharacterized protein ACTB
IPI:IPI00008298.1	17.02	1	94	4.56	Defensin-5
IPI:IPI00942961.1	4.41	1	295	3.24	Putative uncharacterized protein ALDOB
IPI:IPI00216773.4	2.78	1	396	2.58	ALB protein
IPI:IPI00554648.3	2.90	1	483	2.56	Keratin, type II cytoskeletal 8
IPI:IPI00847184.1	4.86	1	391	2.48	Isoform 2 of Tetratricopeptide repeat protein 23
IPI:IPI00234154.1	1.26	1	793	2.29	Ankyrin repeat domain-containing protein 56
IPI:IPI00014165.1	8.70	1	115	2.11	Histone H2A
IPI:IPI00007765.5	1.33	1	679	2.05	Stress-70 protein, mitochondrial

Tabell 14 – 17 viser at det ikke er noen vesentlig forskjell mellom antall proteintreff når kort eller lang metode brukes. Et interessant treff er proteinet defensin-5, som vises i 3 av de 4 listene over proteiner fra tarmprøvene. Dette proteinet har antimikrobiell effekt, og blir utskilt fra paneth-celler i tynntarmen [43]. Treff på dette proteinet er derfor logisk å få når man analyserer prøve fra deler av tynntarmen der det er paneth-celler. Det er også flere treff på hemoglobin, som finnes i store mengder i røde blodceller[44, 45], og histoner. Dette er naturlige treff å få, og det viser at den direkte proteolysen har fungert på disse proteinene. Hvorfor ikke P-gp detekteres er det vanskelig å finne en konkret grunn til. Men konsentrasjonen av P-gp i forhold til alle andre proteiner, og hvor vanskelig det er å få P-gp løst ut av membranen, er punkter som er usikre. I tillegg til at prosedyren for SPE og metoden for LC-MS/MS kanskje kunne optimaliseres, er dette ting som kan påvirke om proteinet detekteres eller ikke.

7.3 PRØVEOPPARBEIDELSE

7.3.1 Immunoaffinitetsekstraksjon

T-lymfocytprøver

100 µL prøve av T-lymfocytter ble tilsatt brønner som var coated med anti-P-gp. I halvparten av brønnene var antistoffet kryssbundet til protein G, mens i den andre halvparten av brønnene ble ikke antistoffet kryssbundet.

Immunoaffinitetsekstraksjonen fulgte utgangsprosedyrene for immunoaffinitet (kapittel 6.5.1) og in-well proteolyse. SPE og LC-MS/MS-analyse ble utført som beskrevet i kapittel 6.7 og 6.8. Det ble ikke funnet noe spor av P-gp når resultatfilene ble gjennomført i Proteome Discoverer, men de få proteinene det var treff på vises i APPENDIKS 8.

Immunoaffinitetsekstraksjon ble benyttet flere ganger, og prosedyren ble modifisert når nye strategier ble prøvd ut. Tabell 18 gir en oversikt over de neste immunoaffinitetsekstraksjonene som ble utført på T-lymfocytprøver, og hvert forsøk blir beskrevet mer utfyllende etter tabellen.

RESULTATER OG DISKUSJON

Tabell 18: Oversikt over de forskjellige immunoaffinitetsekstraksjonene som ble utført på T-lymfocytprøver.

REKKEFØLGE	BESKRIVELSE	HENSIKT
1.	Nytt forsøk som utgangsproseduren, men også utført med noen brønner der det ikke tilføres antistoff (i stedet for antistoff ble det tilsatt 100 μ L TBS-buffer).	For å prøve ut utgangsproseduren en gang til, og i tillegg undersøke uspesifikk binding av protein til brønnene.
2.	Immunoaffinitetsekstraksjonen utføres som før, men med et nytt antistoff.	For å se om bruk av et nyere antistoff gir bedre binding til P-gp og fører til at proteinet kan detekteres.
3.	Prøve ble tilsatt antistoff før blandingen ble tilført brønnene.	For å gi antistoffet god mulighet og tid til å fange opp P-gp i prøven, og at komplekset antistoff + P-gp senere kan bindes til protein G.

1. Proteinene neutrophil defensin 1 ble i det første forsøket vist som treff i alle brønnene som var tilsatt prøve, men ikke sett i brønner som var tilsatt TBS-buffer (blank prøve). Proteinene blir kløyvet til to kjeder, har antimikrobiell virkning og er spesielt rikholdig i (nøytrofile) granulocytter[46, 47]. Men det er også blitt funnet ekspresjon av gener som koder for human neutrophil defensins (HNP) 1-3 i nylig isolerte lymfocytter, og observert sekresjon av α -defensiner fra lymfocytter. α -defensiner er en fellesbetegnelse for HNP 1-4. Disse resultatene indikerer at HNP 1-3, i tillegg til de kjemotaktiske egenskapene α -defensiner har til å rekruttere blant annet T-celler, også er effektor kandidater til den bakteriedrepende aktiviteten i lymfocytter [48].

RESULTATER OG DISKUSJON

For å undersøke om neutrophil defensin 1 som del av T-lymfocytprøven faktisk ble bundet til anti-P-gp, eller om det ble bundet med uspesifikk binding til brønnene, ble det utført et nytt forsøk der prøve ble tilsatt i brønner både med og uten antistoff. Dersom neutrophil defensin 1 bare hadde blitt sett i resultatene der prøve ble tilsatt i brønner med antistoff, ville det bety at proteinet binder seg til antistoffet. Resultatene (Tabell 19) viste derimot at neutrophil defensin 1 også ble funnet i prøver som hadde blitt tilsatt brønner uten antistoff. Det betyr at proteinet ble bundet til brønnene via uspesifikk binding, og at det ikke ble bundet til anti-P-gp. At proteinet ble bundet uspesifikt har ingen annen betydning enn at tanken om at deler av T-lymfocytprøven binder seg til anti-P-gp ikke er gyldig. Proteinene ble heller ikke her sett i brønner som var tilsatt blank prøve. Liste over alle proteintreffene fra prøver i de forskjellige brønnene vises i APPENDIKS 9.

Tabell 19: Proteintreffene i prøvene som ble tilsatt brønner uten antistoff.

Prøve i brønn uten antistoff, parallell 1					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00007047.1	11.83	1	93	4.76	Protein S100-A8
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	4.43	Neutrophil defensin 1
Prøve i brønn uten antistoff, parallell 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00220327.4	6.52	4	644	14.09	Keratin, type II cytoskeletal 1
IPI:IPI00005721.1	15.96	2	94	5.71	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00007047.1	11.83	1	93	4.20	Protein S100-A8
IPI:IPI00807522.1	7.77	1	103	2.54	ACTB protein (Fragment)
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.27	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00019359.4	1.44	1	623	2.16	Keratin, type I cytoskeletal 9

- I neste forsøk ble antistoffet byttet ut med et nyere antistoff, JSB-1. Det var ønskelig å prøve ut et nytt antistoff som forhåpentligvis ville være bedre egnet til denne typen immunoaffinitetsforsøk, og som derfor ville gi et annet resultat

enn det som var oppnådd med det gamle. JSB-1 er et monoklonalt antistoff mot P-gp som er lagd i mus, og som gjenkjenner en epitop i cytoplasmadelen av proteinet. Antistoffet ble benyttet i samme konsentrasjon som i de tidligere immunoaffinitetsekstraksjonene, og det ble kryssbundet til protein G i halvparten av brønnene. Alle resultatfilene ble gjennomløst i Proteome Discoverer, men P-gp ble ikke funnet. Liste over proteintreffene fra prøver i de forskjellige brønnene vises i APENDIKS 10.

Selv om bytte av antistoff ikke ga deteksjon av P-gp, ble JSB-1 antistoffet benyttet i alle de resterende forsøkene.

3. Neste strategi som ble forsøkt var å tilsette antistoff til prøve før blandingen ble tilsatt i brønner. Tanken bak var at ved å gi antistoffet god anledning og tid til å komme i kontakt med hele prøveløsningen, ville antistoffet få bedre mulighet til å få tak i og binde P-gp. På grunn av at antistoff og prøve ble blandet før tilsetning i brønnene, ble ikke antistoffet kryssbundet til protein G.

3 paralleller av 100 μL prøve i LoBind eppendorfrør ble tilsatt 100 μL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antistoff. Deretter ble rørene satt til risting ved 800 rpm i 2,5 timer ved romtemperatur. Dette ble gjort for å fremme binding av antistoff til epitopen på proteinet, og dermed ble inkuberingstiden for antistoff og prøve økt fra 1 time ved 500 rpm, som ble brukt i de andre immunoaffinitetsekstraksjonene, til 2,5 timer ved 800 rpm. Brønnene ble vasket med $3 \times 200 \mu\text{L}$ TBS med 0,05 % Tween-20, før 200 μL prøve med antistoff ble tilsatt hver brønn. Det ble inkubert ved romtemperatur i 60 min på Vibramax risteplate ved 500 rpm, ristingen ble økt litt etter hvert. Her ønskes det at antistoffet binder seg til protein G, slik at komplekset antistoff + protein ikke tas ut av brønnene i det neste trinnet sammen med resten av løsningen. Løsningene ble tatt ut av brønnene og det ble vasket med $3 \times 200 \mu\text{L}$ TBS med 0,05 % Tween-20.

RESULTATER OG DISKUSJON

Deretter ble det vasket med 3×200 µL TBS-buffer, før 90 µL 50 mM ABC-buffer ble tilsatt i hver brønn. Konsentrasjon og mengde av DTT, IAA og trypsin ble endret i dette forsøket for å passe til mengde protein det var tilstede i 100 µL prøve. Derfor ble det redusert med 6 µL 1 mM DTT, alkylert med 5 µL 5 mM IAA og proteolyse ble utført ved å tilsette 1,2 µL 1 mg/mL trypsin. Bortsett fra disse mengdene ble in-well proteolysen utført som beskrevet i kapittel 6.4.2. Resultatfilene ble gjennomført i Proteome Discoverer, men P-gp ble ikke funnet. Liste over proteintreffene som ble sett i de 3 parallellene fra dette forsøket vises i Tabell 20.

Tabell 20: Proteintreffene fra prøvene som ble inkubert med antistoff før blandingen ble tilsatt brønnene.

Prøvebrønn A, parallell 1					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00011694.1	4.05	2	247	5.30	Trypsin-1 precursor
IPI:IPI00640057.1	2.63	1	228	2.07	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Prøvebrønn B, parallell 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00011694.1	4.05	2	247	5.17	Trypsin-1 precursor
IPI:IPI00292532.5	4.71	1	170	2.25	Antibacterial protein FALL-39 precursor
IPI:IPI00744304.1	2.25	1	935	2.24	CDNA FLJ45907 fis, clone OCBBF3027969, weakly similar to Homo sapiens myosin IIIA
Prøvebrønn C, parallell 3					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00011694.1	4.05	1	247	2.94	Trypsin-1 precursor
IPI:IPI00640057.1	2.63	1	228	2.31	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1

Av resultatene kan man se at spor av tilsatt trypsin blir funnet igjen i prøvene. Major histocompatibility complex er vist som treff i andre kjøring, både i prøver og blank-prøver, så det legges ikke vekt på det treffet. Det er få treff på proteiner når immunoaffinitetsekstraksjon benyttes, noe som er logisk når komponenter som ikke binder seg til antistoffet egentlig fjernes fra brønnene i prosessen.

Siden antistoffer binder spesielle komponenter veldig spesifikt, er det mest sannsynlig at de proteinene det er treff på har bundet seg til brønnene, slik som neutrophil defensin 1, og ikke til antistoffet.

Tarmprøver

I den første immunoaffinitetsekstraksjonen med tarmceller ble utgangsprosedyrene for immunoaffinitet og in-well proteolyse (kapittel 6.4.2) fulgt, og antistoff ble kryssbundet til protein G i alle brønnene. Resultatfilene etter LC-MS/MS-analyse ble gjennomført i Proteome Discoverer. P-gp ble ikke oppdaget, men liste over proteintreff vises i APPENDIKS 11.

I Tabell 21 vises strategiene som ble prøvd i et nytt forsøk, og de beskrives mer utfyllende under tabellen.

Tabell 21: Oversikt over de neste strategiene som ble utført på tarmprøve.

	BESKRIVELSE	HENSIKT
1.	Konsentrasjonen av antistoffet JSB-1 ble økt til 20 µg/mL.	For å undersøke om en høyere konsentrasjon av antistoffet ville påvirke resultatet positivt.
2.	Prøven ble redusert og alkylert før den ble tilsatt brønner.	For å undersøke om antistoffet lettere vil binde seg til P-gp hvis S-S-bindingene i proteinet allerede var redusert og proteinet alkylert.
3.	Det ble utført forsøk med proteinet MEPE og anti-MEPE i egne brønner etter utgangsprosedyren.	Anti-MEPE og MEPE har vellykket blitt benyttet i immunoaffinitetsekstraksjoner tidligere, og ved å bruke dette proteinet og antistoffet kan det testes ut om prosedyren fungerer.

1. For å vite at ikke for lav konsentrasjon av anti-P-gp var grunnen til at ikke P-gp ble detektert, ble konsentrasjonen av antistoffet JSB-1 økt til 20 µg/mL. 3 paralleller med tarmprøve ble derfor utført i følge utgangsprosedyren for immunoaffinitetsekstraksjon, bare med økt mengde antistoff.
2. 3 paralleller av tarmprøve ble også redusert og alkylert før blandingen ble tilsatt brønner. Tanken var at ved å tilsette en ferdig redusert og alkylert prøveløsning til brønnene ville det kanskje være lettere for antistoffet å få tak i den delen av P-gp, epitopen, som bindes av antistoffet.

100 µL prøve i LoBind eppendorfrør ble redusert med 4 µL 50 mM DTT ved 95 °C i 15 min, før rørene ble avkjølt. Deretter ble 6 µL 200 mM IAA tilsatt for alkylering i 15 min i mørket. Selve immunoaffinitetsekstraksjonen fulgte utgangsprosedyren, men konsentrasjonen av antistoff som ble benyttet var 20 µg/mL. Disse brønnene ble i trinn 1 av in-well proteolysen tilsatt 100 µL 50 mM ABC-buffer i stedet for 90 µL (fordi de allerede reduserte og alkylerte prøvene i disse brønnene ikke skulle tilsettes 4 µL DTT og 6 µL IAA), og brønnene ble satt til side når løsningene i de andre brønnene ble redusert og alkylert. Brønnene ble senere tilsatt trypsin samtidig med de andre.

3. Proteinet MEPE og anti-MEPE ble også benyttet i dette forsøket. Siden det var kjent at dette proteinet og antistoffet hadde fungert i lignende forsøk tidligere, er de nyttige å bruke for å undersøke om prosedyren fungerer og utføres riktig. Dersom MEPE hadde blitt identifisert i prøvene etter LC-MS/MS-analyse ville det bety at immunoaffinitetsprosedyren fungerte, og at den burde ha fungert for P-gp også.

10 µg/mL anti-MEPE løsning ble lagd ved å blande 4 µL 1mg/mL anti-MEPE med 396 µL TBS-buffer, og 1 µg/mL MEPE løsning ble lagd ved å blande 4 µL 100 µg/mL MEPE med 396 µL serum. 2 paralleller med MEPE og anti-MEPE ble utført etter utgangsprosedyren for immunoaffinitet.

For å se om MEPE ville binde seg uspesifikt til brønnen, ble det i en brønn tilsatt MEPE uten at anti-MEPE var tilført brønnen. I stedet for anti-MEPE ble brønnen tilsatt TBS-buffer.

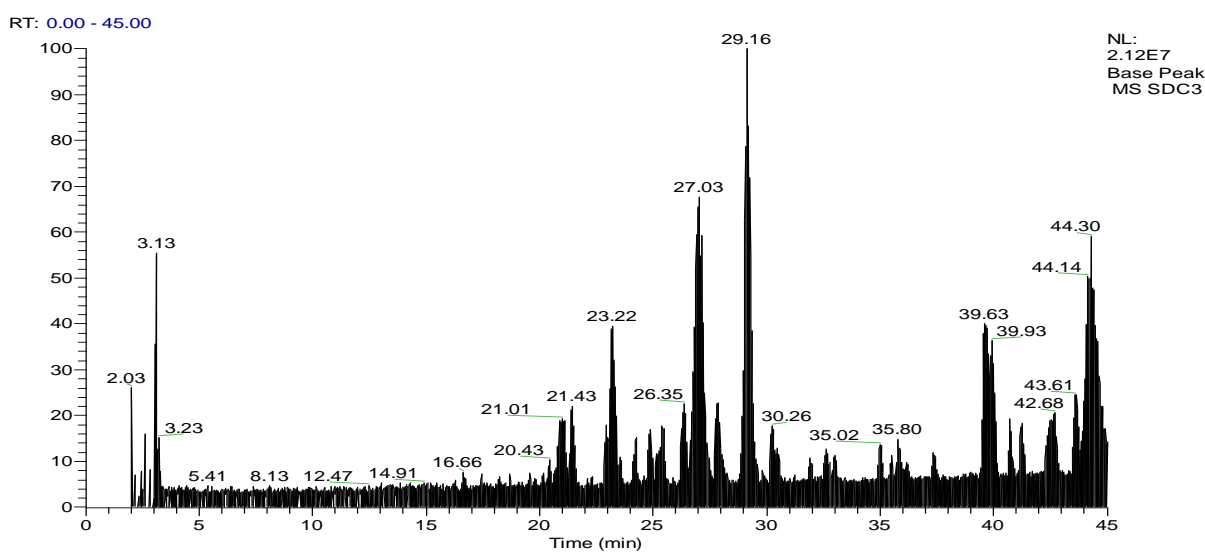
Alle resultatfilene fra LC-MS/MS-analyse ble gjennomført i Proteome Discoverer, og resultatene vises i APPENDIKS 12. Det ble ikke funnet P-gp, og det et var heller ikke treff på MEPE i de prøvene det skulle ha vært. Det kan være flere grunner til det. For eksempel er det mulig at prosedyren ikke ble utført riktig, det kan hende antistoffene ikke har god nok binding til protein G slik at både antistoffer og protein blir vasket vekk, eller det kan være noe annet galt et sted i prosedyrene som fører til at det ikke fungerer.

Det er vanskelig å vite akkurat hvorfor immunoaffinitetsekstraksjonene ikke fungerte. Antistoffet, JSB-1, var ikke benyttet før, og det ble en del prøving og feiling underveis. Dersom antistoffet ikke blir bundet godt nok til protein G kan det føre til at både antistoff og protein blir vasket vekk i prosessen, slik at det ikke vil være noe antistoff eller prøve igjen i brønnene. Det er mange steg i prosedyren, og derfor er det også mange steder det er mulig å gjøre feil underveis.

7.3.2 SDC-forsøk

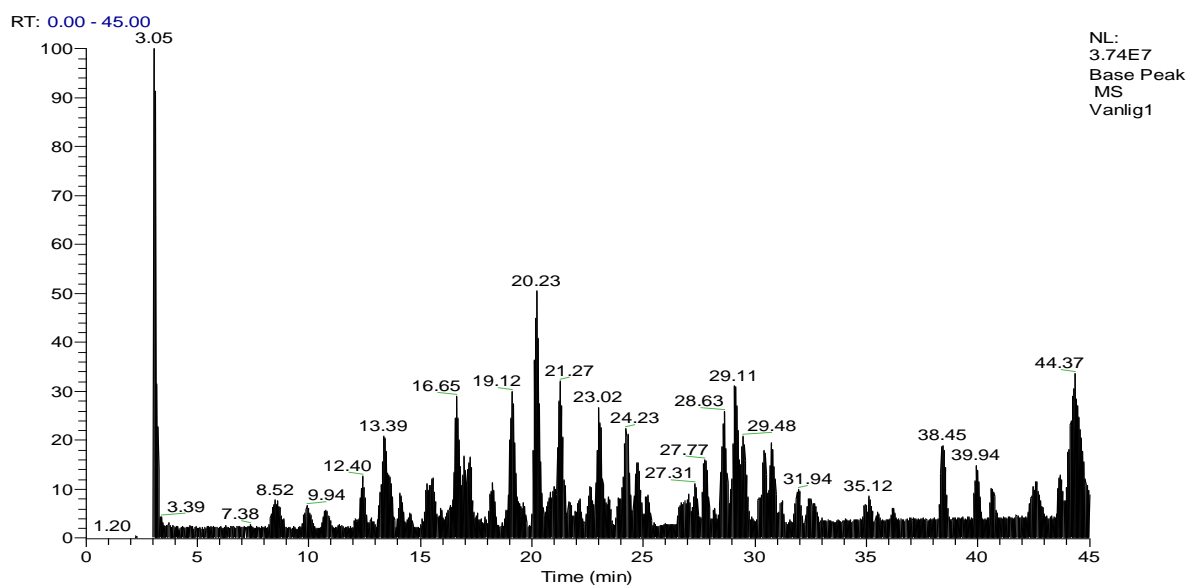
Forsøket med SDC ble utført på 100 µL T-lymfocytprøve. Etter alkylering ble prøven fortynnet (punkt 5 i prosedyren), der 3×10 µL av prøven ble tatt ut, og hver del fortynnet med 90 µL 50 mM ABC-buffer. Derfor ble resten av prosedyren utført på 3 paralleller av prøve opparbeidet med SDC. Utførelsen fulgte prosedyren som er beskrevet i kapittel 6.5.2, men punkt 9 med risting og sentrifugering ble gjort 2 ganger for å oppnå bedre skille mellom fasene. Samtidig ble det også utført direkte proteolyse på 2 paralleller av 100 µL T-lymfocytprøve, som beskrevet i kapittel 6.4.1. Prøvepåsetting ved SPE var 2×50 µL for paralleller som ble opparbeidet med SDC, og 10 µL for prøver som ble opparbeidet uten SDC.

Etter LC-MS/MS ble alle resultatfilene gjennomført ved hjelp av Proteome Discoverer. Base peak kromatogrammene til en parallell av SDC-prøvene og en parallell av prøve det ble utført direkte proteolyse på vises i Figur 24 og Figur 25. Listene over proteintreffene for alle parallellene vises i APPENDIKS 13. Man kan se at antallet proteintreff i dette forsøket ikke er like stort som antallet etter direkte proteolyse, som ble beskrevet tidligere i resultatdelen (kapittel 7.2.1). Likevel er mange av proteintreffene de samme, for eksempel myeloperoksidase, protein S100-A9, protein S100-A8, profilin-1 og talin-1. Fordi at proteintreffene med best score stort sett er de samme som ble sett i tidligere resultater, og at generelt de fleste proteintreffene er de samme, ser det ikke ut som om prosedyren ga noen særlig gevinst av flere membranproteiner i første omgang.



Figur 24: Base peak kromatogrammet til parallell 3 av prøve opparbeidet med SDC-prosedyren. Kromatogrammet viser ingen store topper før etter 20 min av kjøringen.

RESULTATER OG DISKUSJON



Figur 25: Base peak kromatogrammet til parallell 1 av prøve som ble opparbeidet uten SDC. Her er toppene fordelt mer utover i kromatogrammet enn de er i figur 24. Dette ligner mer på kromatogrammene i kapittel 7.2.1 som ble sett etter analyse av T-lymfocytprøve.

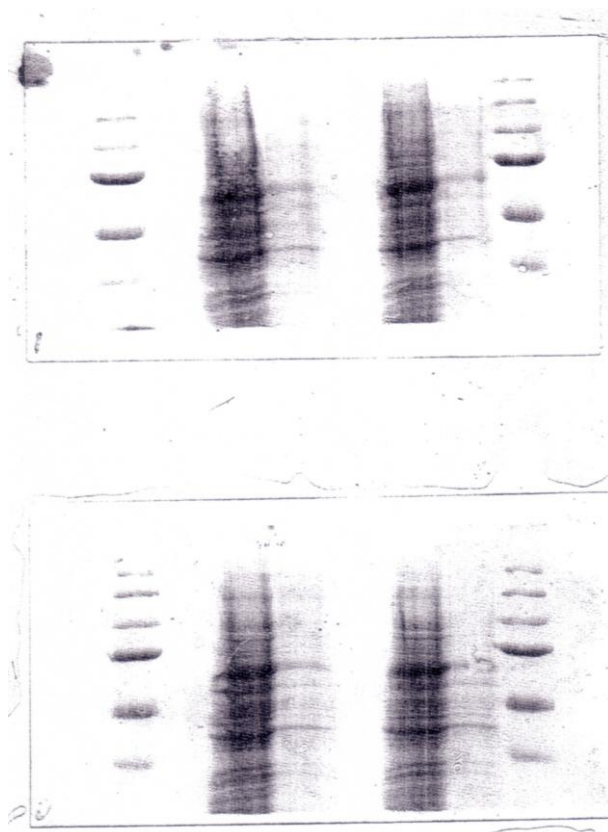
Prøvene ble oppbevart en stund i fryser etter SPE og inndamping før de ble reløst i mobilfase og analysert på LTQ Orbitrap. Det er mulig det hadde vært flere protein-treff hvis prøvene hadde blitt analysert med en gang. Ellers burde nok prosedyren blitt prøvd ut noen flere ganger for å få optimalisert både utførelsen og betingelsene for prosedyren. Tarmprøver ble tilgjengelige kort tid etter dette forsøket var gjort. På grunn av at det syntes å være større sannsynlighet for å kunne påvise P-gp i tarmprøver, ble det startet å jobbe med tarmprøvene, og dette forsøket ble ikke gjentatt.

7.4 Western blott og gelelektroforese

Western blott ble utført for å undersøke at det helt sikkert var P-gp i tarmprøvene. Tanken var den at hvis det ble fremkalt fine bånd på filmen som passet til massen til P-gp, kunne beliggenheten til båndet på filmen brukes til å kutte ut et bånd fra en elektroforese gel. Og et bånd som er kuttet ut fra en gel der det er gjort elektroforese på tarmprøve, kan det senere utføres en in-gel proteolyse på.

Det første immunblottet ble utført med 10 % SDS geler, som beskrevet i kapittel 6.6. Det ble synlige bånd på filmen etter fremkalling. Ved hjelp av elektroforese-standarden var det mulig å finne ut at massen til proteinet/proteinene i båndet kunne passe med massen til P-gp.

For at P-gp skulle ha mulighet til å vandre litt lengre i gelen ble det i neste forsøk lagd to 8 % SDS geler. Det ble brukt de samme prøvene som i det første forsøket, kokte og ukokte, fortynnet og ufortynnet. Bilder av nitrocellulosemembranene etter farging med ponceau-løsning vises i Figur 26, og det er tydelig at protein har blitt overført til membranene. JSB-1 antistoffet ble her brukt i 1:500 fortynning på en membran og i 1:100 fortynning på den andre membranen. Denne gangen var derimot ikke forsøket vellykket, det var ingen synlige bånd på filmen etter fremkalling.

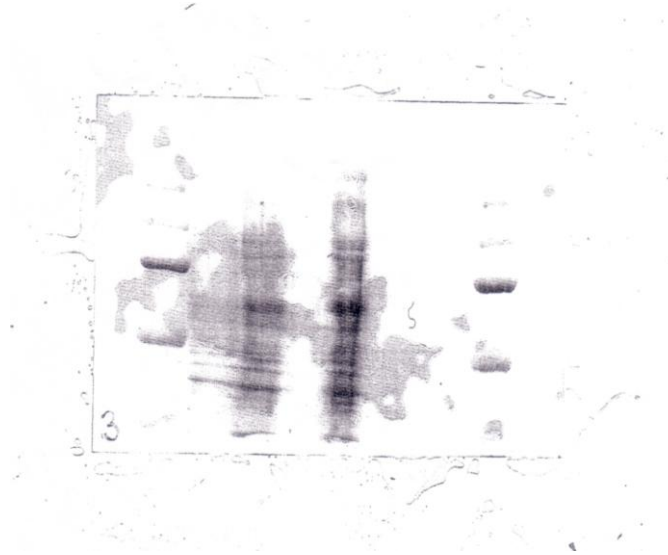


Figur 26: Nitrocellulosemembranene etter farging med ponceau-løsning. Farging gjøres for å se at protein er overført til membranen. I de ytterste brønnene på hver side (brønn 2 og 9 av 10 brønner) er elektroforesestandarder satt på. I brønn 4 er det satt på kokt ufortynnet prøve, i brønn 5 kokt fortynnet prøve, i brønn 7 ukokt og ufortynnet prøve, og i brønn 8 ukokt fortynnet prøve. Det er tydelig å se på intensitetene av fargingen at mer protein er overført der det er satt på prøve som ikke er fortynnet, noe som er logisk.

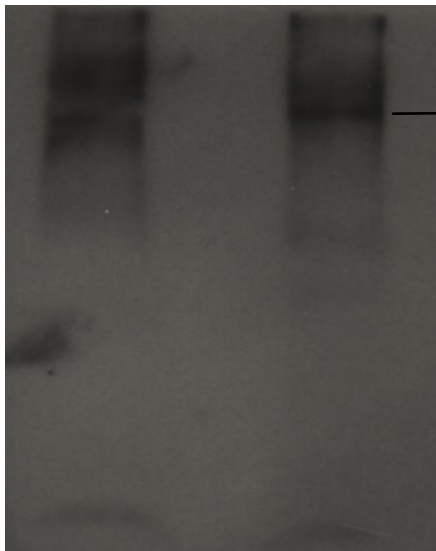
Det ble derfor lagd to nye 8 % SDS geler. Ny prøve ble lagd ved å blande 150 μ L tarmhomogenat og 150 μ L 2 \times samplebuffer (som inneholder 5 % BFB og 10 % β -merkaptoetanol). Det ble også lagd ny antistoffløsning av JSB-1 i fortynning 1:100. Det ble kjørt elektroforese på gelene, der både prøve og elektroforesestandard var påsatt. På den ene gelen var det satt på standard i brønn 1 og 10, og prøve i brønn 2-9. Denne gelen ble lagt i kjøleskap for senere å kunne kutte ut et bånd fra. Den andre gelen ble hele immunoblott-prosedyren kjørt på, som beskrevet i APPENDIKS 2. Bilde av nitrocellulosemembranen etter farging med ponceau-løsning vises i Figur 27.

RESULTATER OG DISKUSJON

Ved fremkalling var det et bånd synlig på filmen (Figur 28). Båndet lå ikke langt ifra et bånd for standarden som svarte til en masse på 150 kDa. Det passet bra i forhold til P-gp som har en masse på 170 kDa.



Figur 27: Nitrocellulosemembranen etter farging med ponceau-løsning. I brønn 2 + 9 er elektroforesestandarden satt på, og prøve er satt på i brønn 4+6.

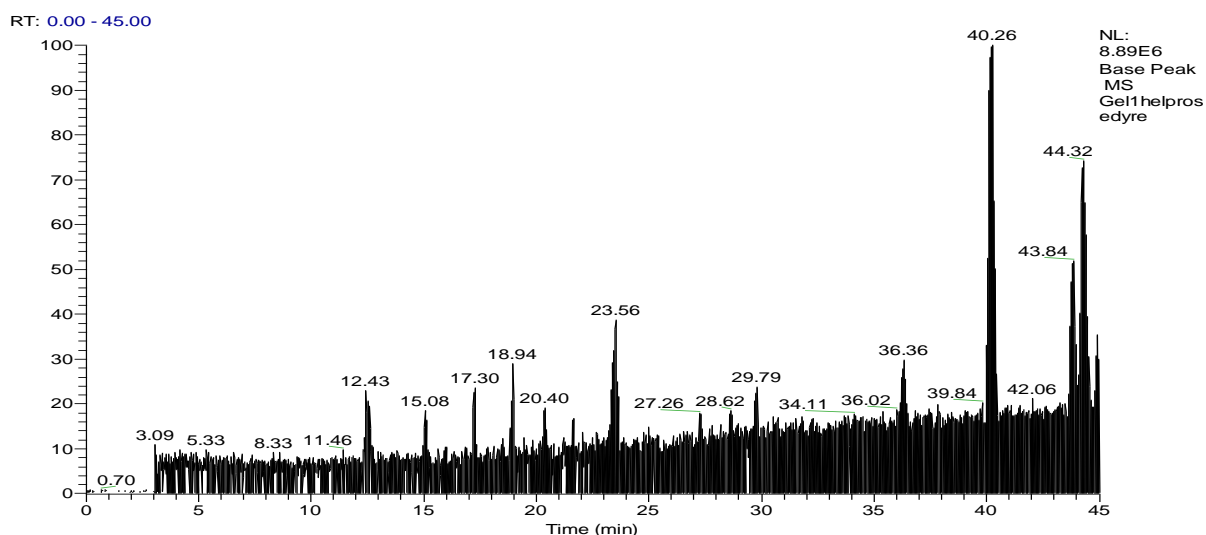


Dette båndet kunne passe til en masse på ~ 170 kDa.

Figur 28: Bilde av bånd etter fremkalling.

RESULTATER OG DISKUSJON

For å kunne finne beliggenheten til P-gp i elektroforese gelen ble filmen sammenlignet med både nitrocellulosemembranen, og et ark med oversikt over massene til proteinene i elektroforesestandard. Fra gelen det var kjørt elektroforese på ble det kuttet ut et langt bånd der hvor det var sannsynlig at P-gp var tilstede. Båndet ble kuttet på langs av gelen slik at det inkluderte alle brønnene der prøve var påsatt. Det ble deretter gjort in-gel proteolyse på biter av dette båndet. 2 biter av båndet ble det utført in-gel proteolyse på som beskrevet i kapittel 6.4.3, og 2 biter av båndet ble det utført in-gel proteolyse på uten alle vaske/krympe/svelle trinn, men bare med redusering, alkylering og trypsinering. Etter SPE og LC-MS/MS ble alle resultatfilene gjennomført ved hjelp av Proteome Discoverer. Resultatene (APPENDIKS 14) viste veldig få proteintreff, og det var ikke treff på P-gp. Det var treff på forskjellige typer keratiner, som kan komme fra hud. Disse ble nok tilført under opparbeidingen av prøven. Figur 29 viser base peak kromatogrammet til den ene parallellen hele in-gel prosedyren ble utført på.



Figur 29: Base peak kromatogram av prøve etter in-gel proteolyse.

Det kan være flere grunner til at P-gp ikke ble detektert i prøvene. Det hadde vært en stor fordel og hatt mulighet til å optimalisere både western blott og in-gel proteolysen. Jo mer tydelig og presist (separert fra andre bånd) båndet ser ut ved fremkalling, jo større sannsynlighet er det for at man greier å kutte ut akkurat den biten av gelen der P-gp befinner seg. Båndet som ble kuttet ut fra gelen var i tillegg ganske langt, og det ble ikke rukket å utføre in-gel proteolyse på alle bitene fra hele båndet. Derfor kan det hende at de bitene det ble utført in-gel proteolyse på ikke var fra de mest optimale stedene av båndet. I tillegg kan det være flere steg i in-gel proteolysen som ikke er optimale, og som kunne blitt forsøkt å forandre på. For eksempel er det ikke sikkert riktige mengder DTT, IAA og trypsin ble benyttet i forhold til mengde protein. Riktig utførelse av prosedyrene er også viktig, og da er det en fordel å ha gjort forsøkene mer enn en gang. Med litt mer tid tilgjengelig kunne både prosedyren for western blott og in-gel proteolysen blitt utprøvd flere ganger.

7.5 LC-MS/MS

Den eneste endringen som ble gjort på LC-MS/MS delen var at metoden ble forandret på, som beskrevet i 7.2.1. Lengden på gradienten ble økt med 20 min, slik at scantiden økte fra 64,0 til 84,0 min. I tillegg ble "repeat count", under dynamisk eksklusjon, endret fra 2 til 1. Endringene ble gjort for å få MS/MS-spektra av flere peptidioner, og for å få spredt toppene mer ut i kromatogrammet i tilfelle flere topper lå over hverandre. Dette ble lagret som en ny metode, og denne metoden ble brukt ved to anledninger, ved analyse av T-lymfocytprøve og tarmprøve etter direkte proteolyse.

7.6 DATAVERKTØY

Proteome Discoverer ble benyttet etter hver analyse. Innstillingene ble brukt slik det står beskrevet i 6.9.2, og decoy-database og filter ble benyttet etter ønske.

ProteinProspector ble benyttet til å skaffe en liste over teoretiske peptider som dannes ved proteolyse av P-gp. Denne listen, i tillegg til oversikten over b- og y-ioner som dannes ved fragmentering av peptidene, ble benyttet til manuelt å undersøke noen LC-MS/MS kjøring. Delvis manuell undersøkelse ble gjort på noen kjøring for å se om det kunne oppdages noen signaturpeptider som stammet fra P-gp. Det var derimot lite som ble oppdaget. Masser av peptider som teoretisk kunne passe til peptider fra P-gp kunne ofte ikke bekreftes, fordi det ikke var tatt opp MS/MS-spektra for de m/z -verdiene.

8. KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID

Hovedmålsetningen i denne oppgaven var å isolere og påvise P-gp fra humane T-lymfocytter og tarmceller ved hjelp av ulike metoder for prøveopparbeidelse og LC-MS/MS-analyse. For å kunne gjøre dette var det viktig å finne ut hvilke prøveopparbeidelsesmetoder som fungerte og kunne brukes, i tillegg til å utføre LTQ Orbitrap analyser og påfølgende databehandling ved hjelp av programvare platformen Proteome Discoverer og søkealgoritmen SEQUEST for å identifisere proteiner.

Ulike teknikker som immunoaffinitetsekstraksjon, in-solution proteolyse med og uten den overflateaktive forbindelsen SDC og gelelektroforese med in-gel proteolyse ble tilpasset for å bestemme P-gp i T-lymfocytter og tarmceller.

LTQ Orbitrap analysene viste at in-solution proteolysene fungerte som forventet, noe som baseres på identifikasjonen av proteiner som finnes i T-lymfocytter, for eksempel plastin-2, talin-1 og vimentin, og identifikasjon av det tarmcelle spesifikke proteinet defensin-5. Antall proteintreff pr. parallell av T-lymfocytprøve etter in-solution proteolyse var i gjennomsnitt ~ 47, for tarmprøve var antallet pr. parallell ~ 11. Det kan derfor sies at metoden fungerte for prøveløsningene, men ikke for P-gp. Det kan for eksempel komme av at det er lav konsentrasjon av P-gp i prøvene, og at deteksjonsgrensen ikke var tilstrekkelig.

Analysene viste også at det som forventet var færre proteintreff etter immunoaffinitetsekstraksjon med in-well proteolyse, i gjennomsnitt ~ 2 treff pr. parallell av T-lymfocytprøve og ~ 9 treff pr. parallell for tarmprøve, enn etter direkte in-solution proteolyse med eller uten SDC. Men resultatene etter forsøket med MEPE og anti-MEPE tyder på at metoden for immunoaffinitetsekstraksjonen ikke fungerer optimalt for verken MEPE eller P-gp.

For T-lymfocytprøve som ble opparbeidet med den overflateaktive forbindelsen SDC og in-solution proteolyse viste resultatene etter LTQ Orbitrap analyser i gjennomsnitt ~ 29 proteintreff pr. parallell. Mange av proteintreffene var de samme som ble sett etter direkte in-solution proteolyse uten surfaktant, for eksempel myeloperoksidase, protein S100-A9, protein S100-A8, profilin-1 og talin-1. Selv om P-gp ikke ble detektert etter ett forsøk med SDC, betyr ikke det nødvendigvis at prosedyren ikke vil kunne fungere ved gjentatte forsøk eller på annet prøvemateriale. Det kan hende også her at deteksjonsgrensen ikke er tilstrekkelig, og at det er derfor P-gp ikke detekteres.

P-gp ble påvist i tarmprøve ved hjelp av immunoblotting etter gelelektroforese. LTQ Orbitrap analyser på gelbiten på stedet P-gp befant seg ga ingen P-gp identifikasjon. Dette kan tyde på at P-gp mistes i de påfølgende stegene, for eksempel at P-gp ikke fås ut av gelen ved in-gel proteolyse, og at det derfor ikke detekteres ved LC-MS/MS-analyse. Det ble bare rukket å gjøre et forsøk på å påvise P-gp fra gelen, slik at i teorien er det mange ting som kunne vært optimalisert.

Ved hjelp av InforSense ble det funnet GO kommentarer (forklaringer) for en rekke av proteinene som ble funnet i T-lymfocytprøve etter direkte in-solution proteolyse. Resultatene viste at mange forskjellige grupper av cellulære proteiner ble identifisert, og de største gruppene var plasmamembran-, cellekjerne-, kromosomale-, og ekstracellulære proteiner. Det ble også identifisert hvilke molekylære funksjoner proteinene hadde og hvilke biologiske prosesser de påvirker. 3 av proteinene i T-lymfocytprøven som ble klassifisert som plasmamembranproteiner, isoform 1 av vinculin, annexin A1 og thrombospondin-1 precursor, er uthevet i tabellene i APPENDIKS 7. Treff på disse proteinene viser at selv om ikke membranproteinet P-gp ble detektert, ble andre proteiner som er assosiert med membranen detektert etter analyse med denne metoden.

Det ble sett proteiner som finnes i alle, eller nesten alle, eukaryote celler, proteiner som blant annet finnes i hvite blodceller og T-lymfocytter, og i tarmprøve ble det også

sett et protein som finnes spesielt mye i visse tarmceller. Selv om ikke P-gp ble detektert i prøvene etter LC-MS/MS-analyser, viser resultatene med en del proteintreff at proteolysen, LTQ Orbitrap LC-MS/MS-analyser og påfølgende databehandling ved hjelp av Proteome Discoverer og søkealgoritmen SEQUEST har fungert. I tillegg har det blitt funnet ut hvilke opparbeidelsesmetoder som ikke har fungert like bra, for eksempel immunoaffinitetsekstraksjon, og hvilke som er lovende, men som må optimaliseres, som for eksempel immunoblotting og in-gel proteolyse. Med tanke på videre arbeid med prøvematerialet er det veldig nyttig å finne ut av hvilke metoder som ikke fungerer så bra, og hvilke metoder som er lovende å arbeide videre med.

Videre arbeid

Dersom det hadde vært mulig å fortsette med oppgaven ville det vært mest interessant og fortsatt analysene på tarmprøvene, fordi det er et gunstig materiale å lete etter P-gp i. Først hadde det vært nyttig og målt totalprotein i en tarmprøve, slik at en omtrentlig konsentrasjon er kjent, og at mengder av for eksempel DTT, IAA og trypsin kunne tilpasses den konsentrasjonen. Den mest lovende veien å gå hadde vært og optimalisert prosedyren for western blott. Ved å optimalisere western kunne man fått separert proteinene i løsningen bedre på gelen, slik at båndet med P-gp hadde blitt tydeligere og mer avgrenset. På den måten hadde det vært enklere å få kuttet ut akkurat det området i gelen som er rikest på P-gp. Siden det fremkalte bildet viste synlig bånd etter western forsøket, og P-gp likevel ikke ble detektert etter analysen på Orbitrap, må det være i stegene etter gelelektroforesen at P-gp forsvinner. In-gel proteolysen burde absolutt blitt utprøvd flere ganger og eventuelt metoden modifisert for å få ut P-gp av gelen. Det kunne også blitt vurdert om noe innen fast-fase-ekstraksjonen, LC-MS/MS-analysen eller utførelsen av de forskjellige delene av forsøket burde blitt forandret. Et eksempel kunne vært å optimalisere LC-MS/MS delen ved å nedskalere til nano LC-MS/MS, for å bedre sensitiviteten.

KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID

Det hadde også vært interessant å prøve ut forsøket med surfaktanten SDC på tarmprøve. Prosedyren ble ikke benyttet på tarmprøve i denne oppgaven, og siden den bare ble forsøkt en gang på T-lymfocytprøve, er det mulighet for at metoden hadde fungert bedre ved bruk av annet materiale.

Dersom det hadde vært ønsket å fortsette og jobbe med immunoaffinitetsekstraksjon måtte arbeid blitt lagt ned i å finne ut hvorfor ikke metoden fungerte, og i hvilket trinn det skjærer seg. Eventuelt hadde det vært mulig å prøve ut nye strategier for ekstraksjonen, slik som det ble forsøkt i oppgaven.

9. KILDELISTE

1. Einrem, B. *Godt år for transplantasjonsvirksomheten*. 2010 18. februar, 2010 [cited 6. april, 2010]; Available from: http://www.rikshospitalet.no/ikbViewer/page/no/pages/hygiene/aktuelt/artikkel?p_doc=460710.
2. Frøland, S.S. *T18.1.3 Annen immunsuppressiv behandling*. 2007 [cited 6. april, 2010]; Available from: <http://www.legemiddelhandboka.no/xml/>.
3. Saeki, T., et al., *Human P-glycoprotein transports cyclosporine-A and FK506*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. **268**(9): p. 6077-6080.
4. Falck, P., et al., *Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients*. *Transplantation*, 2008. **85**(2): p. 179-184.
5. Vergara, E., et al., *P-glycoprotein expression in acute kidney graft rejection*. *Transplantation Proceedings*, 1998. **30**(5): p. 2425-2426.
6. Melk, A., et al., *P-glycoprotein expression is not a useful predictor of acute or chronic kidney graft rejection*. *Transplant International*, 1999. **12**(1): p. 10-17.
7. Kotrych, K., et al., *Peripheral blood lymphocytes P-glycoprotein (P-gp, gp-170) expression in allogenic kidney transplant patients*. *Nephrology*, 2006. **11**(3): p. 257-260.
8. Koziolok, M.J., et al., *Expression of multidrug resistance P-glycoprotein in kidney allografts from cyclosporine A-treated patients*. *Kidney International*, 2001. **60**(1): p. 156-166.
9. Delaney, M.P., et al., *Constitutive and acquired resistance to calcineurin inhibitors in renal transplantation: role of P-glycoprotein-170*. *Transplant International*, 2000. **13**(4): p. 276-284.
10. Parasrampur, D.A., et al., *Effect of calcineurin inhibitor therapy on P-gp expression and function in lymphocytes of renal transplant patients: A preliminary evaluation*. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2002. **42**(3): p. 304-311.
11. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. fourth edition ed. 2005, New York: W.H. Freeman and Company. 1119.
12. Fromm, M.F., *The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. **54**(10): p. 1295-1310.

13. Sharom, F.J., *Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1)*. *Biochem Cell Biol*, 2006. **84**(6): p. 979-92.
14. Hennessy, M. and J.P. Spiers, *A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter*. *Pharmacol Res*, 2007. **55**(1): p. 1-15.
15. UniProt. [cited 11. mars, 2010]; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08183>.
16. Higgins, C.F., et al., *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein*. *Seminars in Cancer Biology*, 1997. **8**(3): p. 135-142.
17. Liebler, D.C., *Introduction to Proteomics- Tools for the New Biology* 2002, Totowa: Humana Press Inc.
18. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS. 503.
19. Delaunay, N., V. Pichon, and M.C. Hennion, *Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000. **745**(1): p. 15-37.
20. GEHealthcare. [cited 14.mars ,2010]; Available from: http://www.gelifesciences.com/aprix/upp01077.nsf/Content/western_blot_site~new_to_blotting.
21. GEHealthcare. [cited 14. mars, 2010]; Available from: http://www.gelifesciences.com/aprix/upp01077.nsf/Content/western_blot_site~electrophoresis.
22. Lim, C.K. and G. Lord, *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. *Biol Pharm Bull*, 2002. **25**(5): p. 547-57.
23. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2008. **872**(1-2): p. 1-22.
24. Waters. [cited 15. mars, 2010]; Available from: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=it_IT&cid=10049055.
25. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. *Nature*, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
26. 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.
27. Niessen, W.M., *Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening*. *J Chromatogr A*, 2003. **1000**(1-2): p. 413-36.
28. Scigelova, M. and A. Makarov, *Orbitrap mass analyzer - Overview and applications in proteomics*. *Proteomics*, 2006: p. 16-21.
29. Douglas, D.J., A.J. Frank, and D.M. Mao, *Linear ion traps in mass spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2005. **24**(1): p. 1-29.

30. Schwartz, J.C., M.W. Senko, and J.E.P. Syka, *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): p. 659-669.
31. Hu, Q.Z., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. Journal of Mass Spectrometry, 2005. **40**(4): p. 430-443.
32. ThermoScientific. *Proteome Discoverer 1.1*. 2010 [cited 23. mars, 2010]; Available from:
<http://www.thermo.com/com/cda/product/detail/1,1055,10142329,00.html>.
33. ThermoScientific. *Thermo Scientific Proteome Discoverer*. 2008 [cited 15. mars, 2010]; Available from:
http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_9645.pdf.
34. Kersey, P.J., et al., *The International Protein Index: An integrated database for proteomics experiments*. Proteomics, 2004. **4**(7): p. 1985-1988.
35. Masuda, T., M. Tomita, and Y. Ishihama, *Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis*. J Proteome Res, 2008. **7**(2): p. 731-40.
36. UniProt. [cited 23. april, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P06702>.
37. UniProt. [cited 24. april, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y490>.
38. UniProt. [cited 25. april, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P35579>.
39. UniProt. [cited 26. april, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P13796>.
40. UniProt. [cited 27. april, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P08670>.
41. UniProt. [cited 28. april, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P05164>.
42. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 2001: Gyldendal Norske Forlag AS.
43. UniProt. [cited 30. april, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q01523>.
44. UniProt. [cited 3. mai, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P69905>.
45. UniProt. [cited 1. mai, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P68871>.
46. Vorland, L.H. *Naturlig forekommende antimikrobielle peptider –lovende nye antibiotika, eller ris til egen bak?* 2001 [cited 27. april, 2010]; Available from:
http://www.tidsskriftet.no/index.php?seks_id=442632.
47. UniProt. [cited 2. mai, 2010]; Available from:
<http://www.uniprot.org/uniprot/P59665>.

48. Agerberth, B., et al., *The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3086-3093.

10. APPENDIKS

APPENDIKS 1

Proteinmåling

Page 1 of 3

Opprettet 18. mars 1997

Revidert 2. februar 2005

Måling av totalprotein

Prinsipp for metoden:

Når Coomassie-fargestoff i en sur løsning bindes til protein, skjer det en endring i absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm. Absorbans måles i mikroplateleser ved 595 nm. Originalreferanse: Bradford, M.M., Anal. Biochem. 72, 248 - 254, 1976. Dessuten: Instruksjonsprotokoll for "Bio-Rad Protein Assay"

STANDARDVERSJON FOR MIKROTITER-PLATE

Måleområde fra 50 til 300 mikrogram/ml protein.

Utførelse :

1. Bruksløsning av fargereagens lages ved å blande en del konsentrat og 4 deler vann. Filtrereres. Holdbar i 2 uker ved værelsestemperatur. Bruk briller ved filtreringen!!
2. 10 mikroliter prøve/standard fordeles i mikroplatebrønner. Vanligvis kjøres 2 paralleller av både standard og prøver. Blindprøve er 0 protein.
3. 200 ul fargereagens tilsettes alle brønner.
4. Victor slås på og temperatur stilles til 25 grader.
5. Måling ved hjelp av BioRad-protein

Standardkurve: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300

Sterilfiltrert Bio-Rad Protein Assay fargeløsning: 10 mL Bio-Rad med Coomassie Brilliant Blue G-250 og 40 mL destillert vann.

APPENDIKS 2

PROSEDYRE FOR WESTERN BLOTT

STØPING AV GEL

- Utstyr som trengs til støpeform er: plastring, 3 stk plastbiter, plastplater (1 stor og 7 små trengs når man skal lage 2 geler), metallplate, spacere (0,75 mm), glassplate.
- Gel lages etter oppskrift (vedlagt i Appendiks 3). APS og TEMED tilsettes samtidig. Løsningen blandes med pipette og gelen tilsettes støpeformen. For å fjerne bobler og rette ut gelen tilsettes 200 μ L isobutanol i hver gel.
- Gelen må stå i 45 min eller til man ser at gel har stivnet.
- Skyll med destillert vann for å fjerne rester av isobutanol, og tørk med papir.
- 4 % Stackgel lages etter oppskrift (vedlagt i Appendiks 3), og formene fylles helt opp. Kammer plasseres i hver gel og man etterfyller eventuelt med mer gel.
- Gelen må stå i nye 45 min eller til den har stivnet.
- Platene tas deretter fra hverandre med kniv, og hver gel vaskes med vann for å fjerne gelrestene.
- Gelene er nå klare til å kjøre elektroforese. De kan også pakkes inn med fuktig papir og lagres i kjøleskap til en annen dag, maks 3-4 dager.

GELELEKTROFORESE

- Skjema for elektroforese fylles ut
- Utstyr som trengs til elektroforesen er: gelkar, strømhoder, klyper og korte pakninger.
- Gelplatene settes på strømhodene; metalldelen skal inn på begge sider og klyper settes på. Det er viktig å ikke trykke for hardt på platene. Alt plasseres i gelkaret og kjøleslanger kobles til.
- Elektroforesebuffer helles i bak gelene og i karet, slik at det er nok buffer til strømvandring.
- Kammene tas ut, og brønnene skylles litt med en pipette.
- Prøver (opptil 20 µL) og standard tilsettes. Det er en fordel å ikke bruke de ytterste brønnene.
- Strømløkket settes på, og elektroforesen startes. Program P1; 200 V i ca. 80 min.

BLOTTING

- Utstyr som trengs til blotting: blottemaskin, kar, kniv, 6 stk. filterpapir, 2 stk. membraner (merkes med 1 eller 2 med blyant) og 1 stk. cellofan. Disse kuttet i riktig størrelse etter strømstanseren i plast som ligger i bunnen av blottemaskinen (ca. 6x8 cm).
- Alt fuktes i ca. 5-10 min i et eget kar med blottebufferen.
- Sandwich lages etter Hoefers metoden, semidry blotting (vedlagt i APPENDIKS 4)

APPENDIKS

- Det er viktig å fjerne stackingelen før man legger gelen på membranen. Blottebuffer tilsettes mellom hvert lag i sandwichen med pipette. Unngå luftbobler.
- Undersøk at sandwichen ligger riktig, deretter kobles strøm til lokket og blottingsmaskinen kobles til strømuttaket. En vekt på 1 kg settes på lokket. Program P2; 100mA i 45 min.
- Ferdig blott farges i Ponceau i 1 min, og skylles deretter i destillert vann. Dette gjøres for å se hvor mye protein som har blitt overført til membranen.

DETEKSJON AV IMMUNOBLOTT

- Membranene legges i destillert vann i noen minutter, deretter legges de i T-TBS i 10 min.
- Membranene blokkes i Blotto i 60 min ved romtemperatur og med vipping
- Blokkerløsningen helles av. Deretter tilsettes primært antistoff som er løst i Blotto. 10 mL antistoff i Blotto tilsettes pr. membran. Dette inkuberes over natt på kjølerom og med vipping.
- Dagen etter tas antistoffløsningen av. Denne kan man eventuelt ta vare på i kjøleskap i noen dager eller fryses ned.
- Deretter vaskes membranene 3-4 ganger i 5-15 min med Blotto i romtemperatur og med vipping.
- Det sekundære antistoffet tilsettes, 10 mL pr. membran. Dette inkuberes i 45-60 min ved romtemperatur og med vipping.
- Det sekundære antistoffet kastes, og membranene vaskes 3-4 ganger i 5-15 min med Blotto ved romtemperatur og med vipping.

- Membranene skylles 2 ganger med T-TBS, og deretter vaskes de 2 ganger 10-15 min med T-TBS ved romtemperatur og med vipping.

BILDEFREMKALLING/MØRKEROM

- Utstyr som trengs til mørkerom: 5 mL pipetter med spisser, pinsett, klokke, saks, liten skål, ECL-reagens og kassett til eksponering av film.
- Løsninger som lages til på forhånd:
 1. ECL-reagens (Amersham): 4 mL fra hver flaske tilsettes i liten skål
 2. Fremkaller: 50 mL fremkaller blandes med 150 mL vann
 3. Fix: 50 mL fix blandes med 150 mL vann
- Membranene inkuberes i ECL-reagens i 1 min. Deretter pakkes de inn i plastfolie.
- Rødt lys slås på, og vanlig lys må slukkes.
- Film og membran legges sammen i en kassett til eksponering av film. Tiden man velger til å fremkalle varierer, men man kan for eksempel begynne med 1 min.
- Filmen legges over i fremkalles i ca. 30 sek, før den skylles i vann. Deretter legges filmen over i fix i 5 min. Lyset kan slås på etter ca. 2 min.
- Filmen legges over i vann i 1 min, og henges deretter til tork.

APPENDIKS 3

Støping av polyakrylamid geler

Monomer stamløsning:	Acrylamid	58.54 g	<i>Sterilfiltreres, avgasses!</i>
(30% T 2.7% C)	BIS	1.60 g	<i>Lagres mørkt og ved 4°</i>
	Dest. vann	til 200 ml	

Gel buffer:	Tris (base)	36.30 g	<i>Sterilfiltreres, avgasses!</i>
(1.5 M tris-Cl pH 8.8)	Dest. vann	til 200 ml	<i>Juster pH til 8.8 med HCl</i>

Stack gel buffer:	Tris (base)	3.00 g	<i>Sterilfiltreres, avgasses!</i>
(0.5 M tris-Cl pH 6.8)	Dest. vann	til 200 ml	<i>Juster pH til 6.8 med HCl</i>

SDS 10%:	SDS	10.00 g	<i>Oppbevares ved romtemp.!!</i>
	Dest. vann	til 100 ml	

Amm. persulfat:	Amm. persulf.	5.00g	<i>Fryses i småposjoner (500 µl)</i>
(10%)	Dest. vann	til 50 ml	<i>Kastes en dag etter tining.</i>

Geloppskrifter (til 2 stk)

	4% Stack gel	6 %	8 %	10%	12%	14%
Dest. vann (MPK)	6.10	6.96 ml	6.08 ml	5.23 ml	4.36 ml	3.48 ml
1.5 M tris-Cl pH 8.8	*)	3.25 ml	3.25 ml	3.25 ml	3.25 ml	3.25 ml
Monomer løsning	1.30 ml	2.60 ml	3.47 ml	4.33 ml	5.20 ml	6.07 ml
SDS løsning (10%)	100 µl	130 µl	130 µl	130 µl	130 µl	130 µl
Amm. persulf. (10%)	50 µl	65 µl	65 µl	65 µl	65 µl	65 µl
TEMED	10 µl	6.5 µl	6.5 µl	6.5 µl	6.5 µl	6.5 µl
Totalvolum	10.0 ml	13.0 ml	13.0 ml	13.0 ml	13.0 ml	13.0 ml

Dette volumet (13.0 ml) er nok til to Hoefer Mighty Small geler, når de støpes samtidig i den minste støperammen.

***) Til Stack gel benyttes Stack gel buffer 0.5 M tris-Cl pH 6.8: 2.50 ml**

APPENDIKS 4

Instructions-Hoefer TE 70 SemiPhor

100mA - 45 min (20V → 70V)

A transphor sandwich consists of one piece of filter paper, one membrane, and one gel, as shown in Figure 2.

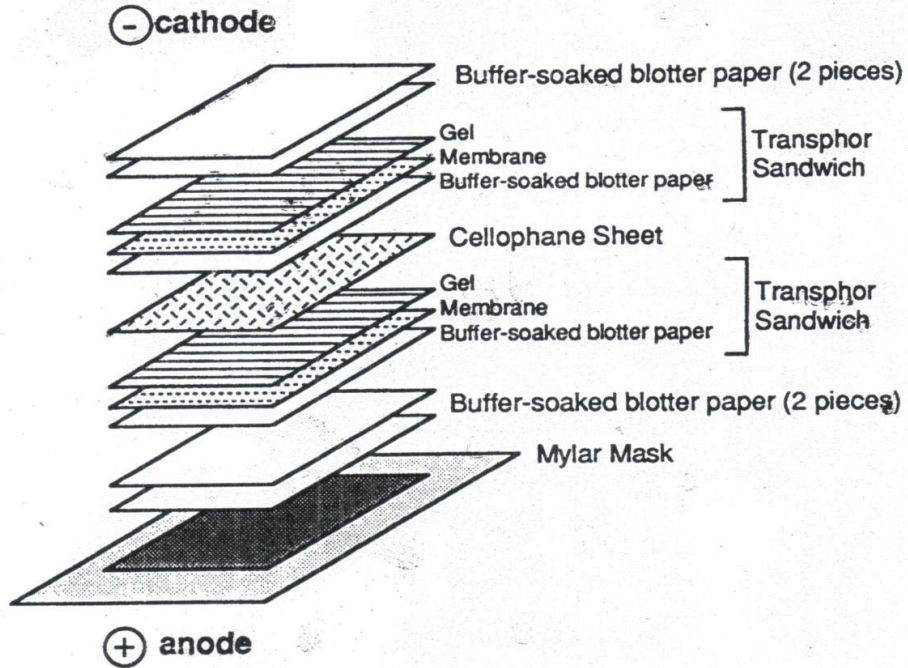


Figure 2. Arrangement of the filter (blotter) paper, membrane(s), cellophane sheet(s), and gel(s) for transfer. A transphor sandwich consists of one piece of filter paper, one membrane, and one gel.

Notes:

- If you are transferring overloaded gels or for a long period of time, place cellophane between transphor sandwiches to prevent transfer of proteins through a membrane to the next transphor sandwich. Cut the cellophane just slightly smaller than the gels since it swells when wet.
- Proteins on the surface of your gels will bind to the membranes as soon as contact is made. Therefore, position the gel correctly the first time you place it on top of the membrane; don't reposition it.

APPENDIKS 5

LØSNINGER OG BUFFERE TIL WESTERN BLOTT

2 x Samplebuffer

	Sluttkonsentrasjon	Mengde
0,5M Tris HCL pH 6,8	0,0625M	6,25 mL
SDS 10%	1%	5,0 mL
Glycerol 100%	15%	7,5 mL
Dest. vann	Justeres opp til 50 mL	31,25 mL

Samplebufferen brukt i oppgaven inneholdt i tillegg 5 % bromfenolblå og 10 % β -merkaptoetanol.

Elektroforesebuffer, pH 8,3

	Mengde
0,025 M Tris ($M_w=121,14$)	7,6 g
0,192 M glycin ($M_w=78,07$)	36,0 g
0,1% SDS	2,5 g
Dest. vann	Tilsettes til 2,5 L. Blandes godt. Trenger ikke justere pH, den er på 8,3.

APPENDIKS

Blottebuffer, pH 8,3

	Mengde
0,025 M Tris	12,0 g
0,192 M glycin	57,6 g
20 % metanol	800 mL
0,02 % SDS	0,8 g
Dest. vann	Tilsett 3200 mL. Blandes godt. Trenger ikke justere pH, den er på 8,3.

Blotto (oppbevares i kjøleskap)

Trenger ca. 125 mL til hver membran.

T-TBS tilsettes 50 g/L fettfri tørrmelk. Blandingen filtreres gjennom Whatman 4 filterpapir.

T-TBS (TBS med 0,05% Tween-20, oppbevares i kjøleskap)

10 mM Tris

100 mM NaCl

Dest. vann

pH justeres til 7,5 og tilsettes 0,05% Tween-20

APPENDIKS

APPENDIKS 6

SONIKERT PRØVE

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	28.21	8	351	41.07	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00236554.1	14.62	7	650	38.04	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00027462.1	49.12	6	114	32.45	Protein S100-A9
IPI:IPI00789477.1	5.56	3	666	19.59	cDNA FLJ58679, highly similar to Lactotransferrin
IPI:IPI00418471.6	12.02	5	466	16.04	Vimentin
IPI:IPI00453473.6	38.83	4	103	15.25	Histone H4
IPI:IPI00007047.1	23.66	3	93	14.57	Protein S100-A8
IPI:IPI00216691.5	37.14	4	140	13.72	Profilin-1
IPI:IPI00298994.6	1.26	3	2541	11.42	Talin-1
IPI:IPI00291175.7	3.28	3	1066	10.46	Isoform 1 of Vinculin
IPI:IPI00909239.1	3.72	3	887	9.69	actinin, alpha 1 isoform c
IPI:IPI00019502.3	0.82	1	1960	8.59	Isoform 1 of Myosin-9
IPI:IPI00027409.1	8.20	2	256	7.49	Myeloblastin
IPI:IPI00796316.4	2.70	2	705	5.93	cDNA FLJ53327, highly similar to Gelsolin
IPI:IPI00292532.6	5.20	1	173	5.92	Cathelicidin antimicrobial peptide precursor
IPI:IPI00299547.4	14.14	2	198	5.89	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	5.81	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00908754.1	16.79	2	137	5.63	cDNA FLJ50714, moderately similar to Ras-related protein Rap-1b
IPI:IPI00553169.5	0.95	2	2315	5.54	Putative uncharacterized protein FLNA
IPI:IPI00478908.3	8.95	2	257	5.49	29 kDa protein
IPI:IPI00794605.1	7.45	1	161	5.05	18 kDa protein
IPI:IPI00006510.1	5.54	2	451	4.97	Tubulin beta-1 chain
IPI:IPI00010471.5	1.44	1	627	4.28	Plastin-2
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	4.15	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00549413.2	7.84	1	204	4.13	Annexin A1
IPI:IPI00796636.1	12.38	1	105	3.62	Hemoglobin (Fragment)
IPI:IPI00759806.1	3.52	1	341	3.37	Isoform MBP-1 of Alpha-enolase
IPI:IPI00217465.5	5.16	1	213	2.99	Histone H1.2
IPI:IPI00644531.1	6.42	1	187	2.73	21 kDa protein
IPI:IPI00025427.2	7.50	1	160	2.59	Eosinophil cationic protein
IPI:IPI00909247.1	2.30	1	305	2.56	cDNA FLJ51655, highly similar to Actin-like protein 2
IPI:IPI00413922.7	13.40	1	97	2.55	11 kDa protein
IPI:IPI00642414.1	7.47	1	174	2.47	Adenylyl cyclase-associated protein
IPI:IPI00027769.1	3.75	1	267	2.47	Neutrophil elastase

APPENDIKS

IPI:IPI00027463.1	8.89	1	90	2.38	Protein S100-A6
IPI:IPI00936736.1	2.16	1	647	2.29	hypothetical protein XP_002342652
IPI:IPI00398805.1	13.64	1	66	2.23	H2A histone family, member V isoform 4
IPI:IPI00009328.4	3.41	1	411	2.19	Eukaryotic initiation factor 4A-III

IKKE SONIKERT PRØVE

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	39.89	13	351	45.54	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00922693.1	27.41	10	343	36.02	cDNA FLJ53662, highly similar to Actin, alpha skeletal muscle
IPI:IPI00236554.1	19.69	10	650	32.53	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00027462.1	45.61	7	114	30.67	Protein S100-A9
IPI:IPI00007047.1	49.46	7	93	23.79	Protein S100-A8
IPI:IPI00298994.6	2.20	5	2541	20.66	Talin-1
IPI:IPI00019502.3	4.64	7	1960	20.39	Isoform 1 of Myosin-9
IPI:IPI00789477.1	8.26	5	666	19.41	cDNA FLJ58679, highly similar to Lactotransferrin
IPI:IPI00453473.6	32.04	5	103	17.78	Histone H4
IPI:IPI00553169.5	2.42	4	2315	14.52	Putative uncharacterized protein FLNA
IPI:IPI00418471.6	7.94	4	466	13.70	Vimentin
IPI:IPI00220403.3	20.63	3	126	13.55	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00291175.7	4.50	4	1066	13.17	Isoform 1 of Vinculin
IPI:IPI00909239.1	4.96	4	887	12.12	actinin, alpha 1 isoform c
IPI:IPI00654755.3	17.01	2	147	10.73	Hemoglobin subunit beta
IPI:IPI00216691.5	31.43	3	140	9.94	Profilin-1
IPI:IPI00795257.3	12.29	2	293	8.99	32 kDa protein
IPI:IPI00940673.1	5.69	3	457	8.79	cDNA FLJ53217, highly similar to Transketolase
IPI:IPI00410714.5	21.83	3	142	8.61	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00027409.1	8.20	2	256	7.81	Myeloblastin
IPI:IPI00816288.1	29.55	1	44	7.23	Thymosin beta-4-like protein 1
IPI:IPI00299547.4	14.14	2	198	6.57	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
IPI:IPI00010779.4	7.66	2	248	6.45	Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain
IPI:IPI00217465.5	5.63	2	213	6.35	Histone H1.2
IPI:IPI00010471.5	1.44	1	627	6.20	Plastin-2
IPI:IPI00005721.1	19.15	2	94	6.18	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00019038.1	5.41	1	148	5.76	Lysozyme C
IPI:IPI00478908.3	8.95	2	257	5.71	29 kDa protein
IPI:IPI00028064.1	4.31	1	255	5.55	Cathepsin G
IPI:IPI00908754.1	8.76	1	137	5.41	cDNA FLJ50714, moderately similar to Ras-related protein Rap-1b
IPI:IPI00006510.1	5.54	2	451	5.01	Tubulin beta-1 chain

APPENDIKS

IPI:IPI00292532.6	5.20	1	173	4.47	Cathelicidin antimicrobial peptide precursor
IPI:IPI00549413.2	7.84	1	204	4.01	Annexin A1
IPI:IPI00465439.5	3.85	1	364	3.34	Fructose-bisphosphate aldolase A
IPI:IPI00796633.1	7.14	1	210	3.18	22 kDa protein
IPI:IPI00019449.1	9.32	1	161	3.11	Non-secretory ribonuclease
IPI:IPI00642414.1	7.47	1	174	2.80	Adenylyl cyclase-associated protein
IPI:IPI00296099.6	0.94	1	1170	2.71	Thrombospondin-1
IPI:IPI00930416.1	11.20	1	125	2.60	Putative uncharacterized protein
IPI:IPI00012011.6	8.43	1	166	2.47	Cofilin-1
IPI:IPI00218629.3	0.94	1	953	2.46	Isoform 3 of Integrin alpha-IIb
IPI:IPI00302467.2	3.96	1	328	2.40	Coiled-coil domain-containing protein 54
IPI:IPI00027769.1	3.75	1	267	2.39	Neutrophil elastase
IPI:IPI00916517.1	4.10	1	317	2.34	Putative uncharacterized protein HNRNPA2B1
IPI:IPI00798127.1	11.82	1	685	2.29	ubiquitin C
IPI:IPI00936352.1	1.11	1	901	2.27	actinin, alpha 3
IPI:IPI00025427.2	7.50	1	160	2.25	Eosinophil cationic protein
IPI:IPI00413922.7	13.40	1	97	2.23	11 kDa protein
IPI:IPI00847373.1	1.24	1	1047	2.21	hypothetical protein LOC54627
IPI:IPI00219682.6	2.78	1	288	2.17	Erythrocyte band 7 integral membrane protein
IPI:IPI00644531.1	6.42	1	187	2.17	21 kDa protein
IPI:IPI00945621.1	2.33	1	301	2.17	Putative uncharacterized protein B4GALT4
IPI:IPI00844600.1	8.43	1	83	2.13	Putative uncharacterized protein S100A12 (Fragment)
IPI:IPI00759806.1	3.52	1	341	2.12	Isoform MBP-1 of Alpha-enolase
IPI:IPI00152653.3	0.17	1	4624	2.09	Dynein heavy chain 5, axonemal
IPI:IPI00924803.1	1.39	1	502	1.85	PTCD1 protein

APPENDIKS

APPENDIKS 7

SONIKERT PRØVE

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00236554.1	21.69	12	650	39.25	Isoform H14 of Myeloperoxidase precursor
IPI:IPI00021439.1	22.93	9	375	37.09	Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00027462.1	61.40	9	114	28.21	Protein S100-A9
IPI:IPI00013508.5	13.34	9	892	25.95	Alpha-actinin-1
IPI:IPI00298994.5	3.60	7	2553	25.13	Talin-1
IPI:IPI00644576.1	3.76	8	2607	24.92	Filamin A, alpha
IPI:IPI00291175.6	7.42	7	1065	24.38	Isoform 1 of Vinculin
IPI:IPI00007047.1	39.78	4	93	18.12	Protein S100-A8
IPI:IPI00021263.3	17.55	3	245	15.65	14-3-3 protein zeta/delta
IPI:IPI00298860.5	6.61	4	711	13.21	Growth-inhibiting protein 12
IPI:IPI00654755.2	46.58	5	146	12.88	Hemoglobin beta subunit
IPI:IPI00478908.2	12.05	4	448	12.69	50 kDa protein
IPI:IPI00549413.2	25.00	4	204	11.24	Annexin A1
IPI:IPI00453473.5	21.57	3	102	11.16	Histone H4
IPI:IPI00020101.7	20.80	2	125	10.91	Histone H2B.a/g/h/k/l
IPI:IPI00643920.2	2.89	2	623	10.48	Transketolase
IPI:IPI00216691.4	21.58	2	139	10.44	Profilin-1
IPI:IPI00410714.4	10.64	2	141	9.19	Hemoglobin alpha subunit
IPI:IPI00641047.2	4.63	3	712	8.72	Gelsolin
IPI:IPI00719746.1	20.90	1	67	7.33	LOC440686 protein
IPI:IPI00010471.4	3.83	2	626	7.12	Plastin-2
IPI:IPI00006690.1	2.94	2	715	6.35	Eosinophil peroxidase precursor
IPI:IPI00219365.2	3.47	2	576	6.26	Moesin
IPI:IPI00027509.3	2.12	1	707	5.72	Matrix metalloproteinase-9 precursor
IPI:IPI00027409.1	8.20	2	256	5.51	Myeloblastin precursor
IPI:IPI00292993.4	5.34	2	487	5.28	bactericidal/permeability-increasing protein precursor
IPI:IPI00012011.5	15.15	2	165	4.81	Cofilin-1
IPI:IPI00006510.1	4.21	2	451	4.73	Tubulin beta-1 chain
IPI:IPI00748943.1	5.90	2	424	4.71	Similar to tubulin, beta polypeptide paralog
IPI:IPI00027497.4	2.69	1	557	4.65	Glucose-6-phosphate isomerase
IPI:IPI00024095.2	7.76	2	322	4.49	Annexin A3
IPI:IPI00644531.1	10.70	2	187	4.45	21 kDa protein
IPI:IPI00019345.1	6.52	1	184	4.34	Ras-related protein Rap-1A precursor
IPI:IPI00003817.2	6.50	1	200	4.26	Rho GDP-dissociation inhibitor 2

APPENDIKS

IPI:IPI00296099.5	1.97	2	1170	4.23	Thrombospondin-1 precursor
IPI:IPI00413922.3	8.67	1	150	4.04	Isoform Smooth muscle of Myosin light polypeptide 6
IPI:IPI00479979.1	5.45	1	110	3.95	13 kDa protein
IPI:IPI00719280.1	11.79	1	229	3.92	ubiquitin B precursor
IPI:IPI00292532.5	5.29	1	170	3.89	Antibacterial protein FALL-39 precursor
IPI:IPI00759806.1	3.52	1	341	3.88	Isoform MBP-1 of Alpha-enolase
IPI:IPI00216773.4	4.29	1	396	3.21	ALB protein
IPI:IPI00022246.1	5.18	1	251	2.97	Azurocidin precursor
IPI:IPI00299547.4	7.58	1	198	2.77	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin precursor
IPI:IPI00743137.1	7.87	1	178	2.71	Similar to aldolase A
IPI:IPI00747201.1	5.96	1	218	2.70	FGA protein
IPI:IPI00219217.2	2.70	1	333	2.59	L-lactate dehydrogenase B chain
IPI:IPI00297550.7	1.64	1	731	2.57	Coagulation factor XIII A chain precursor
IPI:IPI00398805.1	13.64	1	66	2.46	H2A histone family, member V isoform 4
IPI:IPI00025427.1	7.50	1	160	2.44	Eosinophil cationic protein precursor
IPI:IPI00740800.1	6.14	1	228	2.40	PREDICTED: similar to Phosphoglycerate mutase 1 (Phosphoglycerate mutase isozyme B) (PGAM-B) (BPG-dependent PGAM 1) isoform 4
IPI:IPI00027444.1	2.90	1	379	2.33	Leukocyte elastase inhibitor
IPI:IPI00002818.1	5.20	1	250	2.30	Isoform 1 of Kallikrein-11 precursor
IPI:IPI00005159.3	1.78	1	394	2.29	Actin-like protein 2
IPI:IPI00219097.3	6.25	1	208	2.25	High mobility group protein B2
IPI:IPI00024548.3	2.37	1	295	2.23	StAR-related lipid transfer protein 7
IPI:IPI00217468.2	4.89	1	225	2.18	Histone H1.5
IPI:IPI00419585.8	7.32	1	164	2.14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
IPI:IPI00644250.1	28.95	1	38	2.10	4 kDa protein
IPI:IPI00032137.1	1.11	1	901	2.10	Alpha-actinin-3
IPI:IPI00396977.2	0.20	1	5580	2.03	Isoform 7 of Nesprin-1

IKKE SONIKERT PRØVE

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00021439.1	36.27	14	375	53.40	Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00298994.5	8.11	15	2553	48.36	Talin-1
IPI:IPI00291175.6	14.37	13	1065	40.43	Isoform 1 of Vinculin
IPI:IPI00023006.1	23.87	10	377	38.40	Actin, alpha cardiac
IPI:IPI00019502.2	6.53	10	1959	37.11	Myosin-9
IPI:IPI00236554.1	22.00	11	650	33.06	Isoform H14 of Myeloperoxidase precursor
IPI:IPI00027462.1	50.88	10	114	32.46	Protein S100-A9

APPENDIKS

IPI:IPI00298860.5	14.06	8	711	27.27	Growth-inhibiting protein 12
IPI:IPI00644576.1	3.87	8	2607	26.36	Filamin A, alpha
IPI:IPI00013508.5	12.22	9	892	26.03	Alpha-actinin-1
IPI:IPI00007047.1	48.39	6	93	19.22	Protein S100-A8
IPI:IPI00021263.3	30.61	6	245	18.66	14-3-3 protein zeta/delta
IPI:IPI00646867.1	12.99	6	431	18.01	Vimentin
IPI:IPI00216691.4	43.88	6	139	16.64	Profilin-1
IPI:IPI00220644.7	9.43	5	530	16.09	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2
IPI:IPI00453473.5	40.20	5	102	15.08	Histone H4
IPI:IPI00643920.2	8.19	4	623	14.98	Transketolase
IPI:IPI00654755.2	46.58	5	146	13.67	Hemoglobin beta subunit
IPI:IPI00010471.4	9.42	5	626	12.13	Plastin-2
IPI:IPI00006690.1	6.15	4	715	11.82	Eosinophil peroxidase precursor
IPI:IPI00478908.2	10.49	3	448	11.68	50 kDa protein
IPI:IPI00219018.6	14.97	3	334	11.61	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IPI:IPI00410714.4	10.64	2	141	11.31	Hemoglobin alpha subunit
IPI:IPI00641047.2	4.49	3	712	10.94	Gelsolin
IPI:IPI00549413.2	19.61	3	204	9.63	Annexin A1
IPI:IPI00169383.2	5.53	2	416	7.87	Phosphoglycerate kinase 1
IPI:IPI00219365.2	4.86	3	576	7.59	Moesin
IPI:IPI00419585.8	18.29	2	164	7.53	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
IPI:IPI00645452.1	7.98	3	426	7.48	Tubulin, beta polypeptide
IPI:IPI00465439.4	7.16	2	363	7.45	Fructose-bisphosphate aldolase A
IPI:IPI00740392.1	12.86	2	210	7.43	PREDICTED: similar to Triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase) isoform 6
IPI:IPI00747201.1	12.39	2	218	7.27	FGA protein
IPI:IPI00413922.3	19.33	2	150	7.25	Isoform Smooth muscle of Myosin light polypeptide 6
IPI:IPI00644531.1	16.04	2	187	6.36	21 kDa protein
IPI:IPI00027509.3	2.12	1	707	6.26	Matrix metalloproteinase-9 precursor
IPI:IPI00292993.4	5.34	2	487	5.95	bactericidal/permeability-increasing protein precursor
IPI:IPI00299547.4	7.58	2	198	5.85	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin precursor
IPI:IPI00479979.1	5.45	2	110	5.62	13 kDa protein
IPI:IPI00296099.5	1.97	2	1170	5.13	Thrombospondin-1 precursor
IPI:IPI00027409.1	8.20	2	256	4.76	Myeloblastin precursor
IPI:IPI00037070.2	2.43	1	493	4.67	Isoform 2 of Heat shock cognate 71 kDa protein
IPI:IPI00019345.1	12.50	2	184	4.60	Ras-related protein Rap-1A precursor
IPI:IPI00607708.1	3.02	1	331	4.51	Isoform 2 of L-lactate dehydrogenase A chain
IPI:IPI00552768.1	15.29	1	85	4.50	Thioredoxin
IPI:IPI00719746.1	20.90	1	67	4.50	LOC440686 protein
IPI:IPI00216699.1	1.96	1	663	4.46	Isoform 2 of Unc-112-related protein 2
IPI:IPI00024095.2	6.21	2	322	4.45	Annexin A3

APPENDIKS

IPI:IPI00027497.4	2.69	1	557	4.27	Glucose-6-phosphate isomerase
IPI:IPI00642414.1	5.75	1	174	4.25	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1
IPI:IPI00292532.5	5.29	1	170	4.09	Antibacterial protein FALL-39 precursor
IPI:IPI00219525.9	2.28	1	482	4.08	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating
IPI:IPI00027463.1	7.78	1	90	3.93	Protein S100-A6
IPI:IPI00719280.1	11.79	1	229	3.75	ubiquitin B precursor
IPI:IPI00219682.5	3.48	1	287	3.73	Erythrocyte band 7 integral membrane protein
IPI:IPI00556609.1	1.81	1	551	3.62	Integrin alpha-IIb variant (Fragment)
IPI:IPI00293276.9	9.65	1	114	3.31	Macrophage migration inhibitory factor
IPI:IPI00220828.8	27.91	1	43	3.01	Thymosin beta-4
IPI:IPI00003817.2	6.50	1	200	2.97	Rho GDP-dissociation inhibitor 2
IPI:IPI00640191.1	11.36	1	132	2.96	High-mobility group box 1
IPI:IPI00217468.2	4.89	1	225	2.70	Histone H1.5
IPI:IPI00025427.1	7.50	1	160	2.69	Eosinophil cationic protein precursor
IPI:IPI00219097.3	6.25	1	208	2.49	High mobility group protein B2
IPI:IPI00022446.1	11.88	1	101	2.46	Platelet factor 4 precursor
IPI:IPI00027444.1	2.90	1	379	2.41	Leukocyte elastase inhibitor
IPI:IPI00398805.1	13.64	1	66	2.41	H2A histone family, member V isoform 4
IPI:IPI00022246.1	5.18	1	251	2.39	Azurocidin precursor
IPI:IPI00419983.2	5.83	1	206	2.28	Histone H1t
IPI:IPI00740800.1	6.14	1	228	2.28	PREDICTED: similar to Phosphoglycerate mutase 1 (Phosphoglycerate mutase isozyme B) (PGAM-B) (BPG-dependent PGAM 1) isoform 4
IPI:IPI00382804.1	4.85	1	227	2.24	EEF1A protein (Fragment)
IPI:IPI00434755.2	7.23	1	166	2.23	Similar to MIC2L1 isoform E4
IPI:IPI00556621.1	1.84	1	651	2.19	Ras inhibitor RIN1 variant (Fragment)
IPI:IPI00012011.5	8.48	1	165	2.18	Cofilin-1
IPI:IPI00479359.6	1.37	1	586	2.13	villin 2
IPI:IPI00514669.1	11.36	1	88	2.11	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3
IPI:IPI00010796.1	1.97	1	508	2.10	Protein disulfide-isomerase precursor
IPI:IPI00746851.1	2.11	1	475	2.08	Integrin beta chain, beta 2 variant (Fragment)
IPI:IPI00032137.1	1.11	1	901	2.07	Alpha-actinin-3
IPI:IPI00337790.1	0.79	1	1270	2.03	Isoform 2 of Ras GTPase-activating protein SynGAP
IPI:IPI00297550.7	1.64	1	731	2.02	Coagulation factor XIII A chain precursor
IPI:IPI00743987.1	7.63	1	131	1.98	Hypothetical protein FLJ20802

APPENDIKS

APPENDIKS 8

Prøvebrønn A (blank): Ingen treff					
Prøvebrønn B (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00220327.4	6.06	4	644	10.08	Keratin, type II cytoskeletal 1
Prøvebrønn C (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	2.77	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00398805.1	13.64	1	66	2.34	H2A histone family, member V isoform 4
Prøvebrønn D (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	2.84	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.08	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
KRYSSBINDING					
Prøvebrønn E (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.23	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Prøvebrønn F (blank): Ingen treff					
Prøvebrønn G (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	15.96	2	94	3.58	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	1.92	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Prøvebrønn H (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	2.43	Neutrophil defensin 1

APPENDIKS

APPENDIKS 9

Prøvebrønn A (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00220602.5	6.09	1	230	2.37	Isoform 3 of Fermitin family homolog 1
Prøvebrønn B (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00008483.1	3.04	1	527	2.38	Amine oxidase [flavin-containing] A
IPI:IPI00478374.2	4.14	1	532	2.06	Zinc finger protein 350
Prøvebrønn C (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	19.15	2	94	4.20	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00292532.6	4.62	1	173	2.15	Cathelicidin antimicrobial peptide precursor
Prøvebrønn D (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.33	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	2.26	Neutrophil defensin 1
KRYSSBINDING					
Prøvebrønn E (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00737429.3	0.65	1	2769	2.50	Teneurin-4
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.46	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00924656.1	0.90	1	2115	2.39	228 kDa protein
IPI:IPI00024870.1	0.98	1	1938	2.19	smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform SM2A
IPI:IPI00005163.3	8.82	1	204	2.06	ADP-ribosylation factor-like protein 15
Prøvebrønn F (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00924656.1	0.90	1	2115	2.62	228 kDa protein

APPENDIKS

Prøvebrønn G (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	2.43	Neutrophil defensin 1
Prøvebrønn H (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	15.96	2	94	3.53	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.31	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Prøve i brønn uten antistoff 1					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00007047.1	11.83	1	93	4.76	Protein S100-A8
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	4.43	Neutrophil defensin 1
Prøve i brønn uten antistoff 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00220327.4	6.52	4	644	14.09	Keratin, type II cytoskeletal 1
IPI:IPI00005721.1	15.96	2	94	5.71	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00007047.1	11.83	1	93	4.20	Protein S100-A8
IPI:IPI00807522.1	7.77	1	103	2.54	ACTB protein (Fragment)
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.27	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00019359.4	1.44	1	623	2.16	Keratin, type I cytoskeletal 9

APPENDIKS

APENDIKS 10

Prøvebrønn A (blank): Ingen treff					
Prøvebrønn B (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00924656.1	0.90	1	2115	2.79	228 kDa protein
Prøvebrønn C (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	3.93	Neutrophil defensin 1
Prøvebrønn D (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	19.15	2	94	4.47	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00915829.1	3.46	1	549	2.24	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
IPI:IPI00815659.3	7.14	1	252	1.68	CMT1A duplicated region transcript 1 protein
KRYSSBINDING					
Prøvebrønn E (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00924656.1	0.90	1	2115	2.43	228 kDa protein
Prøvebrønn F (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00924656.1	0.90	1	2115	2.13	228 kDa protein
Prøvebrønn G (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	19.15	2	94	4.84	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00877899.1	2.72	1	331	2.07	39 kDa protein
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.01	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00294398.1	4.14	1	314	1.78	Isoform 1 of Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial
Prøvebrønn H (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00005721.1	19.15	2	94	4.88	Neutrophil defensin 1

APPENDIKS

APPENDIKS 11

KRYSSBINDING					
Brønn A (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00448925.6	6.02	2	399	7.16	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00796636.14	20.95	2	105	5.67	Hemoglobin (Fragment)
IPI:IPI00793917.1	9.28	2	237	4.74	27 kDa protein
IPI:IPI00141938.4	14.04	2	114	3.82	H2A histone family, member V isoform 2
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	3.75	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00917545.1	19.23	1	52	2.68	Putative uncharacterized protein ACTG2
IPI:IPI00909649.3	15.89	1	107	2.63	Protein
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.24	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00382804.1	4.85	1	227	2.22	EEF1A protein (Fragment)
IPI:IPI00868816.1	7.69	1	117	1.98	Pseudogene candidate
IPI:IPI00453473.6	7.77	1	103	1.90	Histone H4
Brønn B (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	3.76	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00793202.1	10.00	1	120	2.90	14 kDa protein
IPI:IPI00008483.1	3.04	1	527	2.89	Amine oxidase [flavin-containing] A
IPI:IPI00796636.14	12.38	1	105	2.30	Hemoglobin (Fragment)
IPI:IPI00382804.1	4.85	1	227	2.12	EEF1A protein (Fragment)
Brønn C (prøve)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00448925.6	11.78	3	399	12.43	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00796636.14	20.95	2	105	3.65	Hemoglobin (Fragment)
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	3.52	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00793202.1	10.00	1	120	2.60	14 kDa protein
IPI:IPI00924656.1	0.90	1	2115	2.37	228 kDa protein
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.30	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00019359.4	1.44	1	623	2.20	Keratin, type I cytoskeletal 9
IPI:IPI00398805.1	13.64	1	66	2.00	H2A histone family, member V isoform 4
IPI:IPI00868816.1	7.69	1	117	1.85	Pseudogene candidate

APPENDIKS

Brønn D (blank)					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00796697.1	3.61	1	388	2.25	42 kDa protein
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	1.99	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Brønn E (blank): Ingen treff					

APPENDIKS

APPENDIKS 12

Brønn A, tarmprøve					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	22.22	6	351	14.40	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00448925.6	11.78	4	399	12.33	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00453473.6	28.16	4	103	10.41	Histone H4
IPI:IPI00736860.3	12.12	4	330	8.32	Putative uncharacterized protein ENSP00000374988 (Fragment)
IPI:IPI00946286.1	0.35	1	2570	4.23	alpha 3 type VI collagen isoform 4 precursor
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	3.22	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00909649.3	15.89	1	107	2.29	Protein
IPI:IPI00018971.8	3.37	1	475	2.28	52 kDa Ro protein
IPI:IPI00551024.4	2.09	1	575	2.18	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)
Brønn B, tarmprøve					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	22.22	6	351	17.52	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00787323.2	12.42	5	443	12.82	Similar to Keratin, type II cytoskeletal 8
IPI:IPI00448925.6	7.02	3	399	11.27	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00453473.6	35.92	4	103	8.61	Histone H4
IPI:IPI00736860.3	6.36	3	330	7.42	Putative uncharacterized protein ENSP00000374988 (Fragment)
IPI:IPI00410714.5	16.90	2	142	6.31	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00796636.14	20.95	2	105	5.27	Hemoglobin (Fragment)
IPI:IPI00398805.1	13.64	1	66	2.43	H2A histone family, member V isoform 4
IPI:IPI00220403.3	8.73	1	126	2.38	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.08	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Brønn C, tarmprøve					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	22.22	6	351	14.40	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00448925.6	11.78	4	399	12.33	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00453473.6	28.16	4	103	10.41	Histone H4
IPI:IPI00736860.3	12.12	4	330	8.32	Putative uncharacterized protein ENSP00000374988 (Fragment)
IPI:IPI00946286.1	0.35	1	2570	4.23	alpha 3 type VI collagen isoform 4 precursor
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	3.22	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00909649.3	15.89	1	107	2.29	Protein
IPI:IPI00018971.8	3.37	1	475	2.28	52 kDa Ro protein
IPI:IPI00551024.4	2.09	1	575	2.18	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)

APPENDIKS

Brønn D, blank					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00008483.1	3.04	1	527	2.20	Amine oxidase [flavin-containing] A
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	1.95	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Brønn E, blank: Ingen treff					
Brønn F, anti-MEPE og MEPE, parallell 1					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00783987.2	16.18	26	1663	68.35	Complement C3 (Fragment)
IPI:IPI00745872.2	17.08	11	609	29.78	Isoform 1 of Serum albumin
IPI:IPI00021841.1	34.46	9	267	24.67	Apolipoprotein A-I
IPI:IPI00448925.6	9.52	4	399	13.04	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00909649.3	33.64	2	107	5.13	Protein
IPI:IPI00021857.1	27.27	2	99	4.95	Apolipoprotein C-III
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.36	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00924656.1	0.90	1	2115	2.24	228 kDa protein
IPI:IPI00642632.1	14.15	1	106	1.98	HCG2010697
IPI:IPI00829711.2	5.49	1	182	1.95	Putative uncharacterized protein IGHA2
IPI:IPI00021855.1	10.84	1	83	1.85	Apolipoprotein C-I
IPI:IPI00418164.4	1.40	1	783	1.81	Isoform 1 of Coiled-coil domain-containing protein 30
IPI:IPI00455173.4	0.03	1	26926	1.78	Isoform 3 of Titin
Brønn G, anti-MEPE og MEPE, parallell 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00783987.2	17.08	24	1663	75.54	Complement C3 (Fragment)
IPI:IPI00745872.2	32.35	22	609	62.31	Isoform 1 of Serum albumin
IPI:IPI00021841.1	32.58	9	267	29.21	Apolipoprotein A-I
IPI:IPI00448925.6	14.79	5	399	16.13	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00827754.3	10.08	3	377	8.81	Ig gamma-3 chain C region
IPI:IPI00909649.3	28.04	2	107	5.75	Protein
IPI:IPI00021857.1	27.27	2	99	4.98	Apolipoprotein C-III
IPI:IPI00944677.1	10.73	2	233	4.80	IGL@ protein
IPI:IPI00431645.1	3.56	1	281	2.49	HP protein
IPI:IPI00829711.2	5.49	1	182	2.40	Putative uncharacterized protein IGHA2
IPI:IPI00924656.1	0.90	1	2115	2.32	228 kDa protein
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.03	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1

APPENDIKS

Brønn H, MEPE uten anti-MEPE					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00783987.2	14.91	22	1663	62.95	Complement C3 (Fragment)
IPI:IPI00021841.1	26.97	7	267	17.89	Apolipoprotein A-I
IPI:IPI00448925.6	14.29	5	399	13.25	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00021857.1	27.27	3	99	7.86	Apolipoprotein C-III
IPI:IPI00736860.3	12.12	4	330	7.72	Putative uncharacterized protein ENSP00000374988 (Fragment)
IPI:IPI00795633.1	2.68	1	448	2.36	CLU
IPI:IPI00021855.1	10.84	1	83	2.16	Apolipoprotein C-I
IPI:IPI00642632.1	14.15	1	106	2.13	HCG2010697
Brønn A2, red.+alk. før tilsett. til brønner, parallell 1					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00654755.3	54.42	8	147	22.06	Hemoglobin subunit beta
IPI:IPI00745872.2	12.64	7	609	18.94	Isoform 1 of Serum albumin
IPI:IPI00220327.4	7.14	4	644	15.34	Keratin, type II cytoskeletal 1
IPI:IPI00410714.5	16.90	3	142	12.97	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00894365.2	19.37	6	351	12.78	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00453473.6	29.13	3	103	6.46	Histone H4
IPI:IPI00021304.1	3.10	2	645	4.71	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
IPI:IPI00220403.3	8.73	1	126	4.51	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00007188.5	4.36	1	298	4.45	ADP/ATP translocase 2
IPI:IPI00009865.4	1.54	1	584	4.11	Keratin, type I cytoskeletal 10
IPI:IPI00019359.4	1.44	1	623	3.99	Keratin, type I cytoskeletal 9
IPI:IPI00942961.1	4.41	1	295	3.41	Putative uncharacterized protein ALDOB
IPI:IPI00382804.1	4.85	1	227	2.28	EEF1A protein (Fragment)
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.10	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00419986.3	6.72	1	134	2.00	Retinol-binding protein 2
IPI:IPI00217465.5	4.69	1	213	1.97	Histone H1.2
IPI:IPI00946754.1	7.04	1	142	1.96	Protease serine 1
IPI:IPI00645674.1	8.33	1	108	1.87	Glutathione S-transferase A3

APPENDIKS

Brønn B2, red.+alk. før tilsett. til brønner, parallell 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00654755.3	36.73	4	147	13.53	Hemoglobin subunit beta
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	7.33	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00453473.6	7.77	1	103	4.28	Histone H4
IPI:IPI00007188.5	4.36	1	298	3.36	ADP/ATP translocase 2
IPI:IPI00217465.5	5.16	1	213	2.75	Histone H1.2
IPI:IPI00878282.1	5.08	1	197	2.32	Putative uncharacterized protein ALB

Brønn C2, red.+alk. før tilsett. til brønner, parallell 3					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	22.22	6	351	14.40	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00448925.6	11.78	4	399	12.33	Putative uncharacterized protein IGHG1
IPI:IPI00453473.6	28.16	4	103	10.41	Histone H4
IPI:IPI00736860.3	12.12	4	330	8.32	Putative uncharacterized protein ENSP00000374988 (Fragment)
IPI:IPI00946286.1	0.35	1	2570	4.23	alpha 3 type VI collagen isoform 4 precursor
IPI:IPI00410714.5	10.56	1	142	3.22	Hemoglobin subunit alpha
IPI:IPI00909649.3	15.89	1	107	2.29	Protein
IPI:IPI00018971.8	3.37	1	475	2.28	52 kDa Ro protein
IPI:IPI00551024.4	2.09	1	575	2.18	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)

APPENDIKS

APPENDIKS 13

SDC-forsøk parallell 1					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00236554.1	9.85	5	650	23.16	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00453473.6	34.95	5	103	19.68	Histone H4
IPI:IPI00220403.3	21.43	6	126	18.07	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00216691.5	20.71	3	140	15.06	Profilin-1
IPI:IPI00298994.6	2.01	4	2541	14.59	Talin-1
IPI:IPI00028064.1	9.41	2	255	11.79	Cathepsin G
IPI:IPI00217465.5	6.10	2	213	9.45	Histone H1.2
IPI:IPI00007047.1	12.90	2	93	8.46	Protein S100-A8
IPI:IPI00081836.3	21.09	2	128	8.34	Histone H2A type 1-H
IPI:IPI00019038.1	8.11	1	148	6.98	Lysozyme C
IPI:IPI00027509.5	1.56	1	707	5.58	Matrix metalloproteinase-9
IPI:IPI00925411.1	10.00	1	120	5.29	Putative uncharacterized protein PPIA
IPI:IPI00795257.3	9.22	2	293	5.00	32 kDa protein
IPI:IPI00025427.2	10.00	2	160	4.84	Eosinophil cationic protein
IPI:IPI00929198.1	1.01	1	1972	3.91	Isoform 4 of Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B
IPI:IPI00910322.1	9.74	1	154	3.46	cDNA FLJ52936, weakly similar to Tropomyosin alpha-4 chain
IPI:IPI00942539.1	3.51	1	342	2.88	Putative uncharacterized protein ACTN4
IPI:IPI00027409.1	4.69	1	256	2.83	Myeloblastin
IPI:IPI00384282.1	7.09	1	141	2.49	Cytovillin 2 (Fragment)
IPI:IPI00022246.1	5.18	1	251	2.47	Azurocidin
IPI:IPI00908754.1	8.03	1	137	2.27	cDNA FLJ50714, moderately similar to Ras-related protein Rap-1b
SDC-forsøk, parallell 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00027462.1	32.46	4	114	25.02	Protein S100-A9
IPI:IPI00453473.6	34.95	5	103	24.03	Histone H4
IPI:IPI00236554.1	8.00	4	650	17.04	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00220403.3	23.81	7	126	16.24	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00298994.6	2.44	5	2541	14.78	Talin-1
IPI:IPI00007047.1	12.90	2	93	10.38	Protein S100-A8
IPI:IPI00026272.2	8.46	1	130	9.46	Histone H2A type 1-B/E
IPI:IPI00028064.1	5.10	1	255	9.16	Cathepsin G
IPI:IPI00217465.5	11.27	3	213	8.50	Histone H1.2
IPI:IPI00216691.5	19.29	2	140	8.19	Profilin-1

APPENDIKS

IPI:IPI00027509.5	1.56	1	707	6.17	Matrix metalloproteinase-9
IPI:IPI00220327.4	1.86	1	644	5.83	Keratin, type II cytoskeletal 1
IPI:IPI00909239.1	2.71	2	887	5.48	actinin, alpha 1 isoform c
IPI:IPI00888126.1	3.57	1	364	4.86	similar to pyruvate kinase, muscle
IPI:IPI00019038.1	8.11	1	148	4.83	Lysozyme C
IPI:IPI00024095.3	4.95	1	323	4.75	Annexin A3
IPI:IPI00794605.1	7.45	1	161	3.35	18 kDa protein
IPI:IPI00925411.1	10.00	1	120	2.86	Putative uncharacterized protein PPIA
IPI:IPI00022246.1	5.18	1	251	2.72	Azurocidin
IPI:IPI00553169.5	0.56	1	2315	2.63	Putative uncharacterized protein FLNA
IPI:IPI00027409.1	4.69	1	256	2.62	Myeloblastin
IPI:IPI00025427.2	7.50	1	160	2.60	Eosinophil cationic protein
IPI:IPI00003515.1	0.51	1	1979	2.30	Thyroid receptor-interacting protein 11
IPI:IPI00552280.2	3.51	1	313	2.23	Bactericidal/permeability-increasing protein
IPI:IPI00908754.1	8.03	1	137	2.22	cDNA FLJ50714, moderately similar to Ras-related protein Rap-1b

SDC-forsøk, parallell 3

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00021439.1	30.13	9	375	34.24	Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00453473.6	38.83	8	103	24.62	Histone H4
IPI:IPI00027462.1	35.96	6	114	21.10	Protein S100-A9
IPI:IPI00236554.1	11.23	6	650	20.54	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00789477.1	7.21	4	666	17.23	cDNA FLJ58679, highly similar to Lactotransferrin
IPI:IPI00020101.9	21.43	6	126	14.17	histone cluster 1, H2bg
IPI:IPI00217465.5	11.27	3	213	10.44	Histone H1.2
IPI:IPI00026272.2	20.77	4	130	10.28	Histone H2A type 1-B/E
IPI:IPI00216691.5	20.71	3	140	10.24	Profilin-1
IPI:IPI00019502.3	1.28	2	1960	8.83	Isoform 1 of Myosin-9
IPI:IPI00298994.6	1.42	3	2541	8.55	Talin-1
IPI:IPI00007047.1	12.90	2	93	7.72	Protein S100-A8
IPI:IPI00418471.6	2.58	1	466	7.27	Vimentin
IPI:IPI00028064.1	9.41	2	255	7.25	Cathepsin G
IPI:IPI00019038.1	8.11	1	148	6.86	Lysozyme C
IPI:IPI00909239.1	2.71	2	887	5.11	actinin, alpha 1 isoform c
IPI:IPI00888126.1	6.32	2	364	5.04	similar to pyruvate kinase, muscle
IPI:IPI00027444.1	3.43	1	379	4.93	Leukocyte elastase inhibitor
IPI:IPI00006690.1	3.64	2	715	4.82	Eosinophil peroxidase
IPI:IPI00553169.5	0.56	1	2315	4.12	Putative uncharacterized protein FLNA
IPI:IPI00910322.1	9.74	1	154	3.38	cDNA FLJ52936, weakly similar to Tropomyosin alpha-4 chain
IPI:IPI00220327.4	1.86	1	644	3.28	Keratin, type II cytoskeletal 1

APPENDIKS

IPI:IPI00642414.1	7.47	1	174	3.05	Adenylyl cyclase-associated protein
IPI:IPI00929198.1	1.01	1	1972	2.91	Isoform 4 of Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B
IPI:IPI00879535.1	12.24	1	98	2.61	Alpha-tubulin isotype H2-alpha (Fragment)
IPI:IPI00216071.3	8.45	1	142	2.59	Eosinophil lysophospholipase
IPI:IPI00027509.5	1.56	1	707	2.53	Matrix metalloproteinase-9
IPI:IPI00025427.2	7.50	1	160	2.44	Eosinophil cationic protein
IPI:IPI00022246.1	5.18	1	251	2.42	Azurocidin
IPI:IPI00334799.8	0.38	1	5033	2.42	Isoform 3 of Ryanodine receptor 1
IPI:IPI00027409.1	4.69	1	256	2.41	Myeloblastin
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	2.41	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00065388.6	3.39	1	590	2.34	coiled-coil domain containing 17
IPI:IPI00384282.1	7.09	1	141	2.32	Cytovillin 2 (Fragment)
IPI:IPI00908754.1	8.03	1	137	2.27	cDNA FLJ50714, moderately similar to Ras-related protein Rap-1b
IPI:IPI00909658.1	7.14	1	196	2.16	cDNA FLJ52759, highly similar to Plastin-2
IPI:IPI00333126.1	2.03	1	542	2.13	Leucine-rich repeat-containing protein 56

SDC-forsøk, parallell 4

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00021439.1	38.40	9	375	35.97	Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00453473.6	42.72	6	103	23.23	Histone H4
IPI:IPI00236554.1	8.00	4	650	21.27	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00789477.1	5.26	3	666	16.04	cDNA FLJ58679, highly similar to Lactotransferrin
IPI:IPI00216691.5	20.71	4	140	13.88	Profilin-1
IPI:IPI00298994.6	2.44	5	2541	13.82	Talin-1
IPI:IPI00019502.3	2.91	4	1960	13.37	Isoform 1 of Myosin-9
IPI:IPI00007047.1	12.90	2	93	11.86	Protein S100-A8
IPI:IPI00026272.2	20.77	3	130	9.25	Histone H2A type 1-B/E
IPI:IPI00028064.1	9.41	2	255	8.90	Cathepsin G
IPI:IPI00019038.1	13.51	2	148	6.86	Lysozyme C
IPI:IPI00220403.3	9.52	2	126	5.60	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00794605.1	7.45	1	161	5.03	18 kDa protein
IPI:IPI00642725.1	3.38	1	355	4.83	40 kDa protein
IPI:IPI00553169.5	0.56	1	2315	4.16	Putative uncharacterized protein FLNA
IPI:IPI00027509.5	1.56	1	707	4.14	Matrix metalloproteinase-9
IPI:IPI00929198.1	1.01	1	1972	3.65	Isoform 4 of Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B
IPI:IPI00910322.1	9.74	1	154	3.15	cDNA FLJ52936, weakly similar to Tropomyosin alpha-4 chain
IPI:IPI00217465.5	6.10	1	213	3.01	Histone H1.2
IPI:IPI00925411.1	10.00	1	120	2.83	Putative uncharacterized protein PPIA
IPI:IPI00032112.3	12.23	1	229	2.82	GTP-binding protein Di-Ras3
IPI:IPI00642414.1	7.47	1	174	2.82	Adenylyl cyclase-associated protein

APPENDIKS

IPI:IPI00909239.1	1.35	1	887	2.74	actinin, alpha 1 isoform c
IPI:IPI00027409.1	4.69	1	256	2.35	Myeloblastin
IPI:IPI00025427.2	7.50	1	160	2.30	Eosinophil cationic protein
IPI:IPI00643231.1	12.17	1	115	2.26	Annexin A1
IPI:IPI00333126.1	2.03	1	542	2.26	Leucine-rich repeat-containing protein 56
IPI:IPI00022246.1	5.18	1	251	2.23	Azurocidin
IPI:IPI00909781.1	3.81	1	236	2.19	cDNA FLJ52536, highly similar to Tubulin beta-4 chain
IPI:IPI00759806.1	3.52	1	341	2.19	Isoform MBP-1 of Alpha-enolase
IPI:IPI00909658.1	7.14	1	196	2.17	cDNA FLJ52759, highly similar to Plastin-2
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	2.12	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00027444.1	2.90	1	379	2.06	Leukocyte elastase inhibitor
IPI:IPI00024095.3	2.79	1	323	2.03	Annexin A3

Direkte proteolyse, parallell 1

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	23.65	8	351	32.00	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00236554.1	5.23	3	650	17.44	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00007047.1	38.71	4	93	15.34	Protein S100-A8
IPI:IPI00453473.6	21.36	3	103	13.57	Histone H4
IPI:IPI00220403.3	20.63	2	126	10.39	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00789477.1	5.56	3	666	10.16	cDNA FLJ58679, highly similar to Lactotransferrin
IPI:IPI00298994.6	0.83	2	2541	7.28	Talin-1
IPI:IPI00216691.5	21.43	2	140	6.94	Profilin-1
IPI:IPI00553169.5	0.56	1	2315	6.39	Putative uncharacterized protein FLNA
IPI:IPI00010471.5	1.44	1	627	6.10	Plastin-2
IPI:IPI00299547.4	14.14	2	198	5.69	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
IPI:IPI00027409.1	8.20	2	256	5.49	Myeloblastin
IPI:IPI00909239.1	2.37	2	887	5.03	actinin, alpha 1 isoform c
IPI:IPI00291175.7	2.25	2	1066	4.86	Isoform 1 of Vinculin
IPI:IPI00816288.1	29.55	1	44	4.64	Thymosin beta-4-like protein 1
IPI:IPI00789337.3	5.88	1	170	4.30	cDNA FLJ51775, highly similar to 14-3-3 protein zeta/delta
IPI:IPI00028064.1	3.14	1	255	3.95	Cathepsin G
IPI:IPI00953417.1	6.17	1	243	2.72	cDNA FLJ53012, highly similar to Tubulin beta-7 chain
IPI:IPI00025427.2	7.50	1	160	2.67	Eosinophil cationic protein
IPI:IPI00909247.1	2.30	1	305	2.61	cDNA FLJ51655, highly similar to Actin-like protein 2
IPI:IPI00910322.1	6.49	1	154	2.59	cDNA FLJ52936, weakly similar to Tropomyosin alpha-4 chain
IPI:IPI00552689.1	4.62	1	173	2.42	Vimentin
IPI:IPI00946754.1	7.04	1	142	2.39	Protease serine 1
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	2.36	Neutrophil defensin 1

APPENDIKS

Direkte proteolyse, parallell 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00894365.2	31.05	9	351	35.51	cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1
IPI:IPI00236554.1	7.08	4	650	22.26	Isoform H14 of Myeloperoxidase
IPI:IPI00007047.1	23.66	2	93	18.44	Protein S100-A8
IPI:IPI00453473.6	38.83	4	103	12.62	Histone H4
IPI:IPI00298994.6	1.81	4	2541	10.73	Talin-1
IPI:IPI00789477.1	4.95	3	666	10.67	cDNA FLJ58679, highly similar to Lactotransferrin
IPI:IPI00216691.5	21.43	2	140	9.24	Profilin-1
IPI:IPI00909239.1	2.37	2	887	7.11	actinin, alpha 1 isoform c
IPI:IPI00553169.5	0.56	1	2315	6.66	Putative uncharacterized protein FLNA
IPI:IPI00299547.4	14.14	2	198	6.08	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
IPI:IPI00291175.7	1.03	1	1066	5.91	Isoform 1 of Vinculin
IPI:IPI00220403.3	8.73	1	126	5.50	Histone H2B type 1-B
IPI:IPI00027409.1	8.20	2	256	5.05	Myeloblastin
IPI:IPI00789337.3	5.88	1	170	5.04	cDNA FLJ51775, highly similar to 14-3-3 protein zeta/delta
IPI:IPI00549413.2	14.22	2	204	4.98	Annexin A1
IPI:IPI00005721.1	9.57	1	94	4.29	Neutrophil defensin 1
IPI:IPI00010471.5	1.44	1	627	3.85	Plastin-2
IPI:IPI00217465.5	5.16	1	213	2.96	Histone H1.2
IPI:IPI00025427.2	7.50	1	160	2.86	Eosinophil cationic protein
IPI:IPI00946754.1	7.04	1	142	2.66	Protease serine 1
IPI:IPI00936352.1	1.11	1	901	2.53	actinin, alpha 3
IPI:IPI00909247.1	2.30	1	305	2.41	cDNA FLJ51655, highly similar to Actin-like protein 2
IPI:IPI00759806.1	3.52	1	341	2.38	Isoform MBP-1 of Alpha-enolase
IPI:IPI00795002.1	5.11	1	176	2.27	19 kDa protein
IPI:IPI00926266.2	2.37	1	295	2.05	cDNA FLJ30053 fis, clone ADRGL1000144, highly similar to StAR-related lipid transfer protein 7

APPENDIKS

APPENDIKS 14

Hel gelprosedyre, parallell 1					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00220327.4	8.39	5	644	13.36	Keratin, type II cytoskeletal 1
IPI:IPI00021304.1	8.99	5	645	12.45	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
IPI:IPI00009865.4	8.39	5	584	8.97	Keratin, type I cytoskeletal 10
IPI:IPI00073454.2	1.33	1	828	2.50	Isoform 2C2A' of Collagen alpha-2(VI) chain
IPI:IPI00946754.1	7.04	1	142	2.21	Protease serine 1
IPI:IPI00291136.4	0.88	1	1028	2.08	Collagen alpha-1(VI) chain
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	1.96	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Hel gelprosedyre, parallell 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00946754.1	7.04	1	142	2.26	Protease serine 1
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.09	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
IPI:IPI00794706.1	5.74	1	122	1.89	cDNA FLJ37184 fis, clone BRALZ2001559, highly similar to Regulator of G-protein signaling 20
Gelprosedyre uten vask, krymp., og svell. Parallell 1					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	1.77	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
Gelprosedyre uten vask, krymp., og svell. Parallell 2					
Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description
IPI:IPI00640057.2	2.63	1	228	2.02	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1