

*MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE
FOR GRADEN MASTER I FARMASI*

BESTEMMELSE AV hCG-ISOFORMER I URIN

Bruk av immunoaffinitet og LC-MS som analyseverktøy

Silje Bøen Torsetnes



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2009

BESTEMMELSE AV hCG-ISOFORMER I URIN

Bruk av immunoaffinitet og LC-MS som analyseverktøy

Silje Bøen Torsetnes

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden februar 2008 til mai 2009.

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Stipendiat Hanne Lund, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

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

1. INNHALDSFORTEGNELSE

1.	INNHALDSFORTEGNELSE	3
2.	SAMMENDRAG	6
3.	FORORD	7
4.	FORKORTELSER OG BEGREP	8
4.1	NOMENKLATUR FOR PROTEOLYSE AV HCG.....	11
5.	INNLEDNING OG PROBLEMSTILLING	12
5.1	PROBLEMSTILLING	13
6.	TEORI	14
6.1	HCG.....	14
6.1.1	<i>Struktur</i>	14
6.1.2	<i>Biologisk forekomst av hCG</i>	18
6.1.3	<i>Immunoassays og analyse av hCG</i>	21
6.2	PRØVEOPPARBEIDELSE.....	21
6.2.1	<i>SPE</i>	22
6.2.2	<i>Immunoaffinitet</i>	22
6.3	LC-MS.....	24
6.3.1	<i>Separasjon: HPLC</i>	24
6.3.2	<i>Deteksjon: MS</i>	25
6.4	PROTEOMIKK	28
6.4.1	<i>Biomarkører</i>	28
6.4.2	<i>Fremgangsmåte for bestemmelse av biomarkører</i>	28
6.4.3	<i>Proteolyse av proteiner: signaturpeptid</i>	29
6.5	AMINOSYRER, PEPTIDER OG PROTEINER.....	31
6.5.1	<i>hCG-isoformer i løsnning</i>	31

6.6	URIN	33
6.6.1	<i>Analyse av urin</i>	33
7.	MATERIALER OG METODER.....	35
7.1	KJEMIKALIER, ANALYTTER OG UTSTYR	35
7.2	TILLAGING AV LØSNINGER, BUFFERE OG UTSTYR.....	38
7.3	PROSEDYRER FOR PROTEOLYSE.....	42
7.3.1	<i><u>In-solution</u>-proteolyse</i>	42
7.3.2	<i><u>In-well</u>-proteolyse</i>	43
7.4	PRØVEFORBEREDELSE OG PRØVEOPPARBEIDELSE.....	44
7.4.1	<i>Prosedyre for SPE</i>	44
7.4.2	<i>Prosedyre for immunocapture</i>	45
7.5	LC-MS FOR ANALYSE AV HCG	46
7.5.1	<i>Oppsett av apparatur</i>	46
7.5.2	<i>HPLC</i>	46
7.5.3	<i>MS</i>	47
7.6	DATABASER OG DATAVERKTØY	49
7.6.1	<i>ProteinProspector</i>	49
7.6.2	<i>BLAST</i>	50
8.	RESULTATER OG DISKUSJON.....	51
8.1	KARTLEGGING AV POTENSIELLE SIGNATURPEPTIDER.....	51
8.1.1	<i>Identifikasjon av produkter fra isoformene</i>	51
8.1.2	<i>Kontroll av peptiders spesifisitet</i>	57
8.2	PRØVEOPPARBEIDELSE.....	60
8.2.1	<i>Optimalisering av SPE-betingelser</i>	60

8.2.2	<i>Testing av valgt SPE prosedyre</i>	64
8.3	OPTIMALISERING AV PROTEOLYSEFORHOLD	66
8.3.1	<i>Proteolyse over tid <u>in-solution</u></i>	66
8.3.2	<i>Effekt av denatureringsagens</i>	67
8.4	URINPRØVER	70
8.4.1	<i>Protelyse <u>in-well</u></i>	71
8.4.2	<i>Proteolyse <u>in-solution</u></i>	77
8.4.3	<i><u>In-well</u> vs <u>in-solution</u> prosedyre</i>	82
8.5	ANDRE BEMERKNINGER	84
8.5.1	<i>Feilkilder</i>	84
8.5.2	<i>Carry-over effekt</i>	84
9.	KONKLUSJON	86
10.	KILDELISTE	87
11.	APPENDIKS	91

2. SAMMENDRAG

En LC-MS-metode for bestemmelse av de ulike hCG-isoformer i urin ble utviklet. For å kunne utføre slike analyser ble en ”bottom-up”-strategi valgt der proteinene blir spaltet ved hjelp av trypsin.

Ved hjelp av MS/MS, BLAST og ProteinProspector ble følgende tryptiske produkter identifisert som spesifikke for hCG og dets isoformer (signaturpeptider):

VLQGVLPALPQVVCNYR (T5) for hCG og hCG β , GVNPVVSYAVALSCQCALCR (T9) for hCG og hCG β , LQGVLPALPQVVCNYR (nT5(45-60)) for hCGn og hCG β n, VLPALPQVVCNYR (nT5(48-60)) for hCGn og hCG β n og GVNPVVSYAVALSCQCAL (cfT9) for hCG β cf. Disse peptidene ble i arbeidet bestemt ved LC-MS i SIM-modus på følgende m/z -verdier: T5 (m/z : 964,0 og 643,0), T9 (m/z : 1114,0 og 743,0), nT5(45-60) (m/z : 914,5 og 610,0), nT5(48-60) (m/z : 765,4 og 510,6) og cfT9 (m/z : 955,5 og 639,3).

For å rense opp samt oppkonsentrere signaturpeptidene ble en SPE-metode optimalisert. Følgende SPE-betingelser viste seg å være optimale:

- Sorbent: C8-materiale
- Vaskeløsninger: 5 % MeCN i 20 mM FA og/eller 15 % MeCN i vann
- Elueringsløsning: 80 % MeCN i 0,1 % TFA

Isoformene til hCG ble bestemt i urin enten ved å trypsinere direkte (*in-solution*) eller ved å rense opp med immuaffinitetsekstraksjon (*in-well*) før tryptisering, separasjon og deteksjon. De to prosedyrene ble sammenliknet og det viste at begge tilnærmingene var gjennomførbare. Begge metodene ble benyttet på urin fra gravide og følgende signaturpeptider ble identifisert ved analysene:

- *in-well*: T5, T9 og cfT9
- *in-solution*: T5 (metoden ble utført med høy temperatur for denaturering som viste seg å ikke være optimal for *in-solution* proteolyse av urin)

3. FORORD

Jeg vil først og fremst takke mine inspirerende veiledere Hanne Lund, Trine Grønhaug Halvorsen og Léon Reubsæet for uvurderlig hjelp gjennom givende diskusjoner og tålmodig tett oppfølging under arbeidet med masteroppgaven.

Videre vil jeg takke Bjørn Winter for praktisk apparaturveiledning i tide og utide og alle ved avdelingen for sosiale stunder og oppmuntring.

En spesiell takk til mine foreldre for beroligende ord og motivasjon, og til mine kjære venner for støtte og forståelse.

Oslo, mai 2009

Silje Bøen Torsetnes

4. FORKORTELSER OG BEGREP

α -subenhet	Den uspesifikke proteinkjeden til hCG
β -subenhet	Den spesifikke proteinkjeden til hCG
ABC	Ammoniumbikarbonat
β cf	Tilsvarende hCG β cf (se hCG β cf)
β CTP	C-terminalsegmentet (93-145) av β hCG
BLAST	Basic local alignment search tool, verktøy for å søke om likhet av sekvenser mot sekvensdatabaser
cT9	Tryptisk peptid av hCG β cf
CG	Choriongonadotropin
CID	Kollisjonsindusert dissosiasjon
Da	Dalton, enhet for molekylvekt
Digest	Proteolyse, kløyving av peptidbinding
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, enzymekoblet immunoassay
ESI	Elektrosprayionisering
FA	Formic acid, metansyre, maursyre
FSH	Follikkelstimulerende hormon
g	Gram, enhet for vekt
Gonadotropiner	Overordnede kjønnshormoner
GTN	Gestational trophoblastic neoplasm

GTD	Gestational trophoblastic disease, graviditetsrelatert trofoblastsykdom
Isoform	Brukt om de ulike hCG-variantene
IE	Internasjonale enheter tilsvarer IU: international units
hCG	Humant choriogonadotropin
hCG α	hCG sin α -subenhet
hCG β	hCG sin β -subenhet
hCG β cf	Nicked isoform av hCG β
hCG β n	Nicked isoform av hCG β
hLH	Humant luteiniserende hormon
hyperglykosylert	Proteiner med markert høyere forekomst av sukkerenheter
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
Kryptorkisme	testisretensjon, tilstand hvor testiklene ikke har normal beliggenhet
LC	Liquid Chromatography = væskrokromatografi
MeCN	Acetonitril
Min	Minutter
”missed cleavages”	Resultat av ufullstendig proteolyse
mol	Enhet for stoffmengde
MS	Mass Spectrometry = massespektrometri
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry = tandem massespektrometri

<i>m/z</i>	Masse-ladnings-forhold
Nicked	Endogen enzymatisk degradert peptidbinding
nT5	Tryptisk peptid fra nicked β -subenhet
Neoplasi	Autonom vekst av celler (benign og malign form)
PBS	Forfatbuffer med samme osmotiske trykk som vevsvæskene
PSTT	Placental site trophoblastic tumor, tropoblastisk tumor lokalisert ved placenta
Pituitær	Hypofyserelatert
Preeklampsia	Hypertensiv svangerskapskomplisjjon
RP	Reversed phase, omvendt fase
RIA	Radioimmunoassay
Rpm	Revolutions/rounds per minute
S/N	Signal-to-noise ratio, signal-til-støyforhold
SIM	Selected ion monitoring
Spike	Tilsette, brukt om å tilsette hCG til urin i denne oppgaven
St.dev	Standardavvik
SQ	Singel Quadropol
T5	Tryptisk peptid fra β -subenheten
T9	Tryptisk peptid fra β -subenheten

t_R	Retensjonstid
TFA	Trifluoroacetic acid, trifluoroeddiksyre
TOF	Time of Flight = flyvetid masseanalysator
Trypsinerte peptider	Brukt om peptidprodukter dannet ved tryptisk proteolyse av hCGs isoformer
TSH	Thyreoidestimulerende hormon
WADA	World Anti-Doping Agency

4.1 NOMENKLATUR FOR PROTEOLYSE AV HCG

Tryptiske peptider angis aaTx(i-ii) der bokstavene betyr følgende: Stor bokstav T står for trypsin; aa angir hvilken hCG-isoform peptidet kommer fra; x viser plassering av peptidet fra fullstendig trypsinklipp regnet fra β -subenheten sin N-terminus; og i-ii står for aminosyrene som starter og slutter sekvensen til det tryptiske peptidet (aa og i-ii brukes kun når det er nødvendig for å skille peptider).

Eksempel 1: cfT9, er et produkt av det niende tryptiske peptidet fra β -subenheten. cf står for at peptidet er et produkt av hCG β cf. hCG β cf består av aminosyrekjedene 6-40 og 55-92. T9 fra hCG eller hCG β består av aminosyrenkjeden 75-94. cfT9 er dermed kortere enn da det ender etter aminosyre 92.

Eksempel 2: nT5(48-60), er *nicked* variant av T5, som er det femte tryptiske peptidet fra β -subenheten, der kløyving av peptidkjeden mellom aminosyre 47 og 48 gjør at nT5(48-60) først begynner ved aminosyre 48 og ikke ved 44 som T5. Betegnelse av aminosyresekvensen i parentes gjør at ulike nT5-varianter kan skilles fra hverandre. I denne oppgaven analyseres både nT5(48-60) og nT5(45-60).

APPENDIKS 2 viser tabell over tryptisk klipp av β -subenheten og under 6.1.1 beskrives de aktuelle isoformene av hCG.

5. INNLEDNING OG PROBLEMSTILLING

hCG er et endogent proteinhormon. Forhøyede nivåer av hCG i urin og blod kan indikere graviditet, noen graviditetsrelaterte lidelser og visse former for neoplasi, som testikkel- og ovariekreft [1, 2]. hCG brukes klinisk for å behandle visse former for infertilitet hos menn og kvinner, samt kryptorkisme, forsinket pubertet og hypogonadisme for menn [3]. hCG-preparater har også vist anti-HIV-effekt, men det er uklart om det skyldes selve hCG [4]. I tillegg kan hCG misbrukes av noen idrettsutøvere for å gi konkurransefordeler eller forhindre bivirkninger av misbruk av syntetiske anabole steroider [5, 6], og hCG står derfor på WADAs dopingliste [7, 8]

For å påvise og eventuelt også kvantifisere hCG brukes hovedsakelig immunoassays [2]. Flere av de ulike isoformene som utgjør total hCG er av klinisk relevans [9], og det er i hovedsak totalt hCG, β hCG eller et utvalg av de ulike hCG-variantene som måles.

Det har tidligere vært, og er fremdeles, en viss usikkerhet forbundet til ulike antistoffers evne til å binde de ulike hCG-isoformene. Fravær av heterogene av referanseprøver og uklar klassifisering og nomenklatur av isoformene er noen av årsakene til dårlige immunoassays for hCG, der det er blitt vist store resultatsprik ved analyse av de samme prøvene [10]. Fra disse har en rekke falske positive og falske negative resultater fått fatale konsekvenser for noen pasienter [2, 11]. I nyere tid har vært stort fokus på spesifisitet av antistoff for de rette isoformene av hCG, som kan være essensielt for kunne trekke riktige slutninger fra måleresultatene. Økt bevissthet og forbedrede analyseteknikker har slik gjort at hCG har fått en rolle som klinisk biomarkør [11].

En enkel LC-MS metode som raskt og spesifikt kan detektere alle hCGs isoformer i en analyse vil ha et stort potensial. Utvikling av en slik metode vil kunne gjøre det mulig å anvende LC-MS som et verktøy for evaluering av epitopers evne til å binde hCGs isoformer, og dermed kunne si noe om spesifisiteten til det respektive antistoffet. I tillegg vil metoden kunne brukes i diagnostikk da det er av høy klinisk verdi å kunne differensiere mellom de ulike isoformene.

5.1 PROBLEMSTILLING

Hovedmålet med oppgaven var å kunne detektere ulike hCG-isoformer i urin. For å kunne nå dette ble følgende delmål satt:

- Ved å klippe hCG fra Pregnyl[®] i bufrede løsninger skal aktuelle signaturpeptider for hCG-isoformer identifiseres ved LC-MS/MS-analyse og benyttelse av databaserte proteomikkverktøy
- Implementering av LC-MS i SIM-modus for bestemmelse av de valgte signaturpeptidene
- Utprøving av to fremgangsmåter for opprensning av urin med formål å detektere isoformer av hCG i urin ved hjelp av LC-MS-analyse
- Teste LC-MS-metoden samt prøveopparbeidelse på urin fra gravide

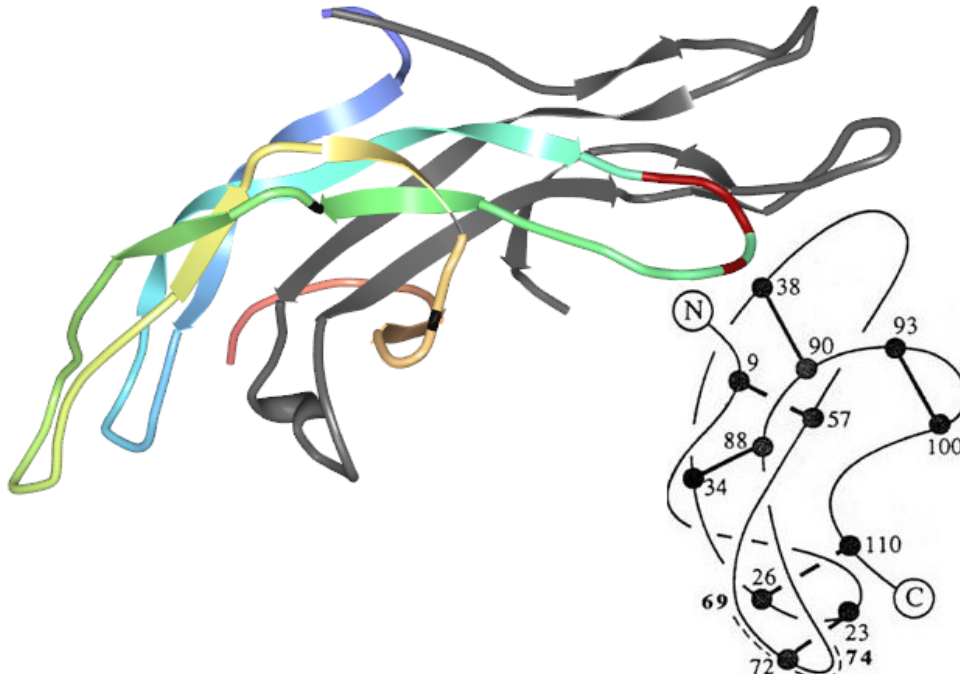
6. TEORI

6.1 HCG

Choriongonadotropin (CG) er et gonadotropin som forekommer i flere arter. Når hormonet forekommer i mennesker benevnes det som humant choriongonadotropin (hCG).

6.1.1 Struktur

hCG deler stor strukturlikhet med hLH, TSH og FSH, som tilhører samme hormonfamilie. Disse glykoproteinene er heterodimere, bygget opp av en α - og en β -subenhet. α -subenheten er lik for disse glykoproteinene, mens β -subenheten, som sørger for den biologiske spesifisiteten, er unik for de ulike hormonene [10, 12]. Figur 1 (t.v.) viser krystallstrukturen av hCGs subenheter. Intakt hCG er en dimer bygget opp av en β -subenhet på 145 aminosyrer og en α -subenhet på 92 aminosyrer assosiert ved non-kovalente interaksjoner. hCG har normalt 11 disulfidbroer, 5 innen α -subenheten og seks innen β -subenheten. Til høyre i Figur 1 illustreres lokasjon av β -subenhetens disulfidbroer.



Figur 1 Krystallstrukturen til heterodimeren hCG i farger (t.v.) [13] og en enkel illustrering av β -subenhetens disulfidbindinger (t.h.) [14]. I krystallstrukturen er hCG α er farget grå og hCG β følger regnbuens farger, der blå starter ved β -subenhetens N-terminal og lys rød avslutter ved C-terminalen. Aminosyrene 44, 45 og 48 er farget røde og aminosyrene 60, 92 og 94 er svarte. I den andre figuren markeres disulfidbindinger ved å dra strek (—) mellom aminosyrene, markere dem med svart fylt sirkel (●) samt at plasseringen av aminosyren i kjeden er skrevet på.

Oligosakkarider ut gjør omlag 20-30 % av hCGs molekylærvekt. Det er to N-koblede (aspargin) oligosakkarider til α -subenheten og to N-koblede oligosakkarider til β -subenheten. I tillegg er det fire O-koblede (serin) oligosakkarider til C-terminalsegmentet av β -subenheten [1, 2]. De aktuelle aminosyrene som har tilkoblede sukkerenheter er vist i Figur 2.

IFCCs standardisering av gonadotropin og gonadotropins isoformer angir nomenklatur for og definerer seks klinisk betydningsfulle former av hCG [9, 15]:

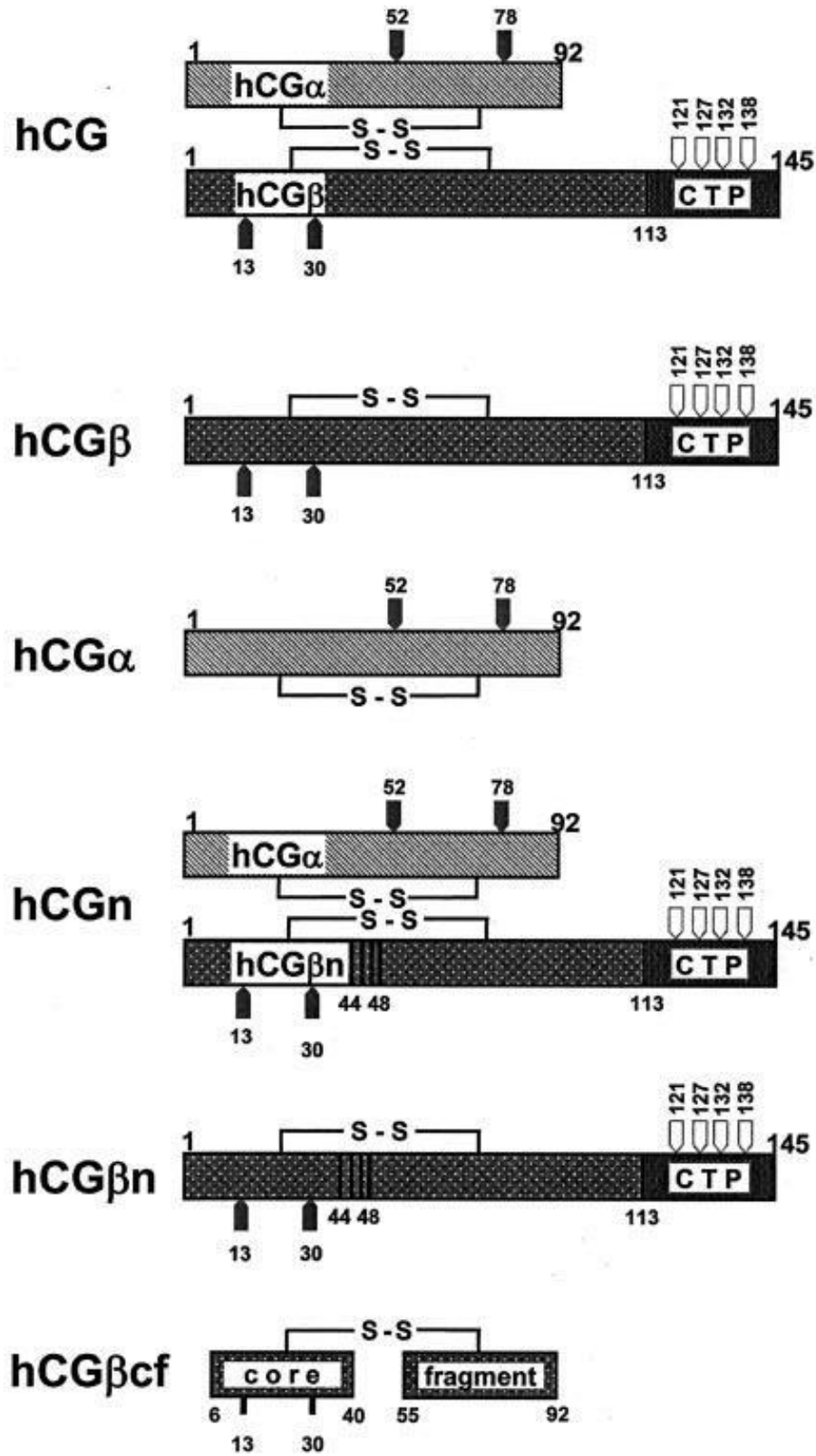
- hCG: intakt hCG, bestående av både α - og β -subenhet
- hCGn: nicked hCG, delvis degradert hCG med brutte peptidbindinger i området til hCG β -40-50
- hCG α : α -subenhet
- hCG β : β -subenhet
- hCG β n: nicked β -subenhet, delvis degradert med brutte peptidbindinger i området til hCG β -40-50
- hCG β cf: β -core fragment, der residuene hCG β n-6-40 bindes til hCG β n-55-92 av fire eller fem disulfidbindinger [1, 16] (illustrert i Figur 3, side 20)

Disse isoformene illustreres i Figur 2 og kan også forekomme i hypo- og hyperglykosylerte former, der tilkoblede sukkerenheter er henholdsvis større og mindre enn vanlig [1, 2, 14, 16]. *Nicking* av β -subenheten innebærer enzymindusert brudd mellom aminosyrer i proteinkjeden. Litteraturen nevner at denne nickingen forekommer mellom aminosyrene 47-48 og 92-93, men også mellom andre aminosyrer som mellom 44-45 [1, 2, 17]. Nicking mellom aminosyrene 92-93 vil spalte av β CTP og molekylet vil raskt degraderes til hCG β cf [1]. Aminosyresekvensene til noen hCG-isoformer vises i Tabell 2.

Mengden hCG angis ofte i IE. Tabell 1 viser forholdet mellom enhetene IE, gram og mol samt molekylvekt for to av hCG-isoformene.

Tabell 1 Konvertering av måleenheter [9]. Oversikt over molekylvekt og forholdene mellom gram og IE samt mol og IE for hCG og hCG β .

Forkortelse	Molekylvekt	$\mu\text{g}/\text{IE}$	pmol/IE
hCG	37,5 kDa	0,11	2,9
hCG β	23,5 kDa	1	42,5



Figur 2 Struktur og IFCC-nomenklatur av hCG og viktige hCG metabolitter/isoformer [15]. S-S er disulfidbindinger, \blacktriangle og \triangle er henholdsvis N- og O-bundede karbohydrater, og CPT er karboksylterminalpeptid.

Tabell 2 Aminosyresekvensen til hCG-isoformer. Forløpere er ikke inkludert. Aminosyrekjedene er sammenhengende, men kuttet opp etter hver tiende aminosyre for økt leseligheten. **-nicking-** er satt inn der peptidbindinger er brutt. S-S står for disulfidbroer som holder de to aminosyrekjedene i hCGβcf sammen.

hCGα	SAPDVQDCPE CTLQENPFFS QPGAPILCMG CCFSRAYPTP LRSKKTMLVQ KNVTSESTCC VAKSYNRVTV MGGFKVENHT AHCSTCYH KS
hCGβ	SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GGPKDHPLTC DDPRFQDSSS SKAPPSLPS PSRLGPSDT PILPQ
hCGβn(44-45)	SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MTRV- nicking -LQGVLPALPQ VVCNYRDVRF ESIRLPGCPR GVPVSYAV ALSCQCALCR RSTTDCGGPK DHPLTCDDPR FQDSSSSKAP PPSLPSRL PGPSDTPILP Q
hCGβn(47-48)	SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MTRVLQG- nicking -VLPALPQVVC NYRDVRFESI RLPGCPRGVN PVVSYAVALS CQCALCRRST TDCGGPKDHP LTCDDPRFQD SSSSKAPPS LPSRLPGP SDTPILPQ
hCGβcf	nicking -RPRCRPINATLAVEKEGCPV CITVNTTICA GYCPT- nicking -S-S- nicking -VCNYRDVRF SIRLPGCPRG VNPVSYAVA LSCQCALC- nicking -

6.1.2 Biologisk forekomst av hCG

hCG-isoformer kan forekomme i blod og urin. Hypofysen til friske menn og kvinner i alle aldre produserer en liten mengde hCG [18]. Denne bakgrunnsforekomsten av hCG er generelt høyere med alderen, og høyere for kvinner enn menn, med tendens til kovarians med FSH [18, 19]. Pituitær hCG brukes om tilfeller der økte hCG-verdier har mulig sammenheng med økt FSH og ikke graviditetstilstander eller neoplasi [18, 20].

Analyse av hCG er i størst grad brukt for deteksjon og monitorering av graviditet. Som Tabell 3 viser observeres også påvirkning av hCG-nivåer i sammenheng med spontanabort, graviditet utenfor livmoren, screening for Down syndrom og ved høy risiko for preeklampsia [1, 2, 21, 22].

Ulike former for hCG uttrykkes ved ulike kreftsykdommer [16, 23]. Figur 3 viser strukturen til 15 varianter av hCG som finnes i serum og urinprøver ved normale eller abnormale graviditeter, GTD eller andre maligniteter. Tabell 3 viser forekomst av noen isoformer av hCG i blod og urin ved graviditet, graviditetsrelaterte tilstander og tilfeller av neoplasi. Svangerskapsrelatert trofoblastsykdom, GTD, er delt inn de benigne formene av hydatiform mola og de maligne formene invasive mola, choriokarsinom, PSTT og epiteloid trofoblasttumor [24]. hCG-isoformer er også markører for germ cell tumor og andre nontrofoblaste svulster [1, 25].

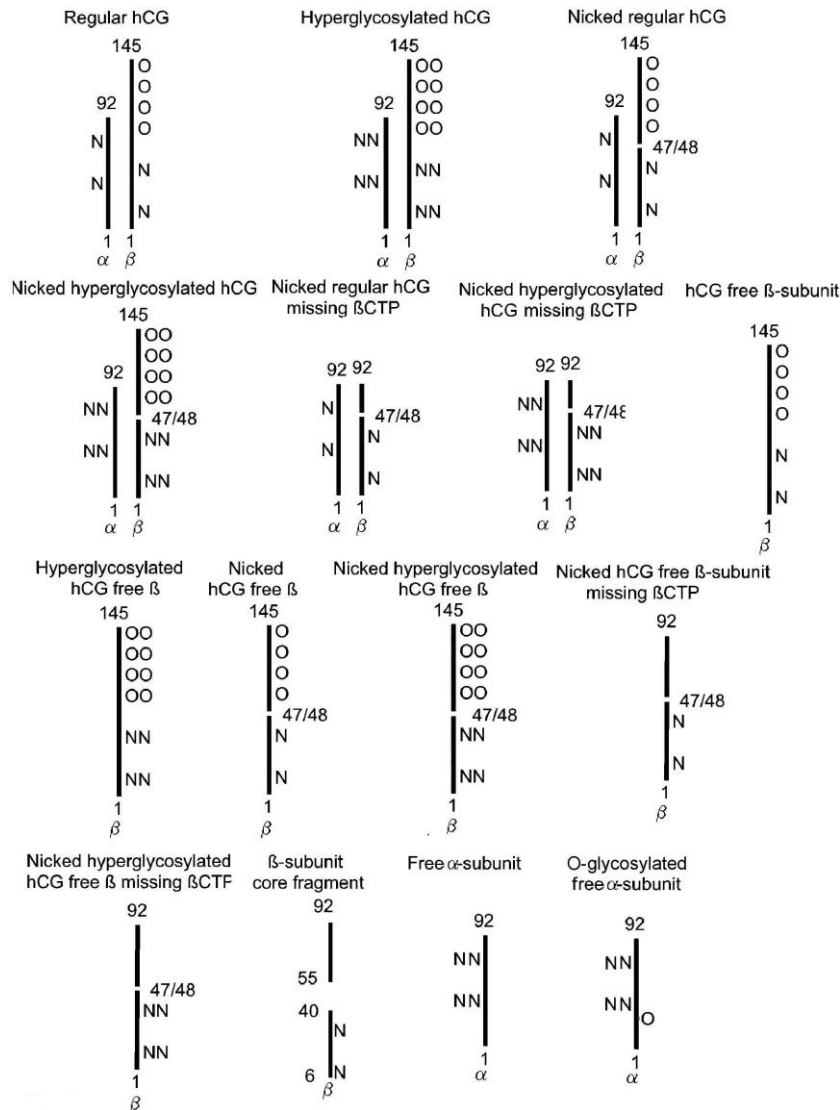
Deteksjon av de ulike isoformene kan gi en indikasjon på hvor aggressiv sykdommen er, monitorere behandlingen, overvåke sykdomsforløpet og screene risikogrupper [1, 2, 11]. Tabell 3 viser hvordan nivåene på noen hCG-isoformer påvirkes i ulik grad ved ulike patologiske tilstander. Choriokarsinom og testikkel germ cell tumor produserer primært hyperglykosylert hCG. For testikkelkreft er total hCG den beste biomarkøren for sykdomsmasse, mens hyperglykosylert hCG er den optimale markøren for tumorens evne til metastasering [2]. Nivået av intakt hCG er høyt i de fleste former av normal og abnormal graviditet. Ved spontanabort og ektopisk graviditet er nivåene lavere enn ved vanlig graviditet, mens ved Down syndrom-graviditet er nivåene fordoblet.

Tabell 3 Forekomst av vanlig hCG, hyperglykosylert hCG og hyperglykosylert fritt hCG β i blod og urin: en gjengitt oversatt tabell fra Cole L.A. [1]. $\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$ indikerer at isoformen er hovedforekomst ved tilstanden, $\sqrt{\quad}$ indikerer at isoformen alltid er til stede, \pm indikerer lave nivåer eller fravær, $\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$ MK og $\sqrt{\quad}$ MK indikerer at forhøyede nivåer og \pm MK, X MK indikerer defekt eller fravær av markøren og X markerer totalt fravær.

	hCG	Hyperglykosylert hCG	Hyperglykosylert hCG β
Graviditet			
Tidlig graviditet (3-5 uker)	\pm	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	$\sqrt{\quad}$
Graviditet (≥ 6 uker)	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	$\sqrt{\quad}$	$\sqrt{\quad}$
Biokjemisk graviditet	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	\pm MK	\pm
Spontanabort	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	\pm MK	\pm
Ektopisk graviditet/graviditet utenfor livmoren	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	\pm MK	\pm
Down syndrom-graviditet	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$ MK	$\sqrt{\quad}$ MK	$\sqrt{\quad}$ MK
Preeklampsia	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	\pm MK	\pm
Pituitær	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	X	$\sqrt{\quad}$
Neoplasi			
Hydatidiform mola	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	$\sqrt{\quad}$	\pm
Invasive mola	$\sqrt{\quad}$	$\sqrt{\quad}$	$\sqrt{\quad}$
Choriokarsinom	\pm	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$ MK	$\sqrt{\quad}$
Latent tropoblastisk sykdom (quiescent GTD)	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$	X MK	X
Tropoblastisk tumor relatert til placenta (PSTT)	$\sqrt{\quad}$	\pm	$\sqrt{\quad}$
Testikkel germ cell tumor	\pm	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$ MK	$\sqrt{\quad}$
Non-gestasjonal malignitet	\pm	\pm	$\sqrt{\sqrt{\sqrt{\quad}}}$ MK

Hyperglykosylert hCG og fri β -subenhet har autokrine og cytokine egenskaper, som innebærer at de promoterer invasjon, vekst og malignitet. Fritt beta produseres av de fleste gynekologiske maligne former. Høye nivåer av hCG β indikerer dårligere prognose for å bekjempe kreftformer som ovariekreft, endometriekreft og livmorskreft [1].

hCG β cf er et renalt proteolytisk degraderingsprodukt av hCG og hCG β og er ofte å finne i urin. Det er også påvist tilstedeværelse av hCG β cf i kreftceller [17], men på grunn av kort halveringstid av hCG β cf er serumnivåene sjelden veldig høye [1, 17]. hCG β cf fra urin brukes som en generell tumormarkør for alle non-gestasjonale maligniteter [1]. Degraderingen av hCG som gir nicked isoformer (vist i Figur 3), utføres av sirkulatoriske proteaser [1]. Makrofager, assosiert med kreftvev, skiller ut proteaser som fører til økt nicking av hCG ved kreft [1]. Økt forekomst av nickede former av hCG kan derfor forventes ved kreft.



Figur 3 De 15 mest vanlig hCG-variantene som forekommer i blod og urin, under graviditet, GTD eller andre former for neoplasi [1]. Tall referer til aminosyren på polypeptidet lest fra N- til C-terminalen av intakt hCG, N og O til henholdsvis N- og O-bundede oligosakkarider, NN og OO til hyperglykosylerte og store oligosakkarider og β CTP er C-terminalsegmentet(93–145).

6.1.3 Immunoassays og analyse av hCG

Immunoassays, som ELISA og RIA er biokjemiske metoder for å bestemme innholdet av en substans (for eksempel hCG) i en løsning. Ulike mekanismer kan gi uttrykk for tilstedeværelse og eventuelt kvantifisere analytten. Immunoassays kan rammes av falske positive og falske negative dersom testmetodens affinitet, spesifisitet og selektivitet ikke er tilstrekkelig god [26].

I litteraturen er det beskrevet problemer med falske positive resultater og falske negative resultater for hCG-isoformer. Immunoassaytester for hCG førte en periode til feilstilte diagnoser på grunnlag av testene, som i verste fall resulterte i initiering av unødvendig kreftbehandling eller at kreftpasienter ikke fikk korrekt diagnose [1, 11]. Noen av grunnene til dette er listet opp under 6.2.2. Det er blitt gjort store fremskritt innen hCG-feltet det siste tiåret. Ny kunnskap om hCGs isoformer gjør at det kliniske bruksområdet er bredere og immunoassaytestene er forbedret.

Noen forskere mener mulighetene for å differensiere mellom ulike hCG-isoformer fortsatt er for mangelfull [1]. Blant annet finnes det fortsatt ingen standard for hyperglykosylert varianter av hCG som strengt tatt er nødvendig for å standardisere hCG-tester. Det finnes imidlertid tester som hevder å måle alle former for hCG.

6.2 PRØVEOPPARBEIDELSE

Før analyttene i biologiske væsker kan analyseres på avansert utstyr som LC-MS må som regel prøven forberedes i flere trinn for å bevare analysekolonnens egenskaper og ha kontroll på ioniseringen for introduksjon i massespektrometret [27-29]. Det kan være nødvendig å fjerne salter eller andre stoffer som kan interfare med preanalyse-prosessen eller selve analysen [27, 28]. Forbedring av separasjon kan oppnås gjennom blant annet redusering av prøvens kompleksitet. For urinprøver er det viktig å fjerne ioner og andre stoffer som kan påvirke nøyaktigheten og oppløsning [28]. I tillegg kan oppkonsentrering være essensielt for øke sensitiviteten [30]. Lav proteinkonsentrasjon i urin, også av hCG, gjør ofte oppkonsentrering nødvendig [28]. Omvendt fase-SPE og immunoekstraksjon er benyttet i denne oppgaven og er derfor beskrevet i mer detalj.

6.2.1 SPE

Fast-fase ekstraksjon kan både rense, separere og oppkonsentrere analytter fra en prøveløsning. Ekstraksjonen er basert på stoffenes fordeling mellom en stasjonærfase og en væskefase. Sorbenten har ideelt sett funksjonelle grupper som selektivt interagerer med analytten og ikke forurensningene i prøveløsningen. Når interaksjonskreftene mellom analytten og sorbenten er større enn mellom analytten og væsken vil analytten retarderes og isoleres på sorbenten [31].

Fast-fase-ekstraksjonen utføres som regel i fire steg:

1. Kondisjonering: For å fukte sorbentens overflate og aktivere funksjonelle grupper suges løsning med høy løsemiddelstyrke gjennom materialet først. Deretter vaskes det med løsning av lav løsemiddelstyrke for å klargjøre kolonnen.
2. Prøvepåsetning: Prøveløsningen med lav løsemiddelstyrke suges gjennom SPE-kolonnen. Sorbenten har tilstrekkelig med funksjonelle grupper som retarderer analytten.
3. Vask: Vaskeløsningen som brukes bør ha tilstrekkelig høy løsemiddelstyrke til at den vasker ut forurensningene av kolonnen. Analytten forblir retardert av sorbenten da interaksjonen mellom sorbent og analytt er større enn interaksjonen mellom løsemiddel og analytt.
4. Eluering: Et løsemiddel som bryter interaksjonene mellom analytt og sorbent, men ikke interaksjoner med forurensinger og sorbent, ekstraherer analytten til løsningen.

Omvendt fase brukes til å ekstrahere upolare stoffer fra vandige prøveløsninger. Analytten retarderes på sorbenten av hydrofobe interaksjoner. De hydrofobe interaksjonene brytes av organiske løsemidler som MeCN, metanol og tetrahydrofuran. Løsemiddelstyrken kan eventuelt justeres ved å blande den organiske løsningen med et annet organisk løsemiddel eller en annen blandbar løsning som vann eller buffer.

6.2.2 Immunoaffinitet

Forskerne Milstein, Köhler og Jerne fikk i 1984 *Nobelprisen i fysiologi og medisin* (<http://nobelprize.org>) for teorier over immunsystemets spesifikke oppbygning og styring, og for oppdagelsen av prinsippene for fremstilling av monoklonale antistoffer. Monoklonale antistoffer rettet mot ulike antigen (proteiner) kan fremstilles i nærmest ubegrensede mengder med en spesifisitet som gjør dem svært verdifulle til forsknings- og diagnostiske formål.

Prøveopparbeidelse basert på affinitetsekstraksjon benytter seg av antistoffets karakteristiske egenskap til å inngå spesifikke interaksjoner med tilhørende målprotein. Antigenets (målproteinets) del som inngår interaksjon med antistoffet kalles epitop. Denne interaksjonen kan benyttes for å opprense og/eller oppkonsentrere målproteiner eller -peptider fra komplekse prøver før LC-MS-analyse [33].

Immunobasert opprenskning er basert på molekylær gjenkjennelse for å separere stoffer med høy affinitet og selektivitet. Antistoffet festes gjerne til magnetkuler [34] eller brønner. Ved kombinasjon med LC-MS kan høy selektivitet ved MS veie opp for eventuell lav antistoffspesifisitet. Immunocapture-prøveopparbeidelsen kan utføres i fire steg:

1. Vaske og forberede antistoffoverflaten
2. Tilsette prøveløsning og riste moderat så antigen finner antistoff å interagere med
3. Prøveløsning fjernes og overflaten vaskes med en løsning som ikke bryter interaksjonen mellom antistoff og antigen
4. Løsning som bryter interaksjonen tilsettes før direkte analyse eller egnet matrix for videre preanalytisk behandling

Antistoffer for hCG

Tidligere gav mangel på kunnskap om hCG dårlige forutsetninger for å lage selektive antistoff for de ulike variantene av hCG [2]. Immunokit som skulle måle samme isoformer hadde høy heterogenitet, noe som gav dramatiske konsekvenser adressert under 6.1.3. Noen av grunnene til dette var [2, 10, 11]:

- utilstrekkelig informasjon om antigenegenskaper for isoformene
- mangel på produktinformasjon om hvilken del av molekylet de monoklonale antistoffene passet for
- ufullstendig oversikt over forekomst av hCG-isoformer og fravær av nomenklatur og definisjoner av isoformene
- heterogenitet av standarder for variantene av hCG

I senere tid har epitopstudier og kunnskap om hCG gjort det mulig med nøyaktig molekylær modellering og bestemmelse av de spesifikke isoformene [10]. Avdekking av den tredimensjonale strukturen av hCG, fastsatt nomenklatur for klinisk relevante isoformer (se 6.1.1), innføring standarder for de fleste isoformene (med unntak for hyperglykosylerte former) og avdekking av uegnede epitoper er noen av grunnene til at antistoffer kan anvendes klinisk.

6.3 LC-MS

LC-MS, kort for HPLC-MS, er en kjemisk analyseteknikk som kombinerer væskekromatografiens fysiske separasjonsevne med massespektrometriets deteksjonsevne. Kombinasjonen av væske- og massespektrometri begynte tidlig på 1970-tallet og har utmerket seg som en viktig analytisk teknikk de siste tiårene. LC-MS(/MS) muliggjør analyser med høy sensitivitet og selektivitet. Disse egenskapene gir gode utsikter for bruk i klinisk analyse [29].

6.3.1 Separasjon: HPLC

Kromatografi omfatter analytiske metoder som benyttes for å skille kjemiske forbindelser ved å bruke en mobilfase, en væske eller gass, til å frakte analytter over en stasjonær fase, væske eller fast stoff. I væskekromatografi er mobilfasen en væske og stasjonærfasen vanligvis porøse partikler med stor overflate dekket av aktive grupper.

Væskekromatografi baserer seg på at en væske (mobilfase) presses gjennom en kolonne pakket med stasjonærfase, som retarderer stoffene. Analyttene separeres etter affiniteten mellom mobilfasen og kolonnen. Når mobilfasen frakter stoffene ut av kolonnen detekteres analyttene av en detektor. Det ideelle er å få smale symmetriske gaussformede topper som er godt separerte.

Den kromatografiske metoden og egenskapene til stasjonærfasen og mobilfase bør velges på grunnlag av de kjemiske egenskapene til analyttene og matriksen analytten befinner seg i [31].

Omvendt fase

Kromatografi med omvendt fase (RP) er godt egnet for peptid- og proteinseparasjon.

Omvendt fase benyttes for å separere relativt hydrofobe analytter, med en stasjonærfase som er mer hydrofob enn mobilfasen. De retarderende interaksjonene vil hovedsaklig være Van de Waalske krefter og dispersjonskrefter. Videre bør porestørrelsen eller et eventuelt ikke-porøstmateriale tilpasses analytten for å gi optimale steriske forhold og effektive separasjoner. For store molekyler, som proteiner, velges større porestørrelser eller et eventuelt ikke-porøstmateriale [35]. I tillegg til de kjemiske egenskapene til analytt i prøveløsning, stasjonærfase og mobilfase er væskehastighet, partikkelstørrelse, lengde på kolonne og temperatur parametre med innflytelse på retensjon.

6.3.2 Deteksjon: MS

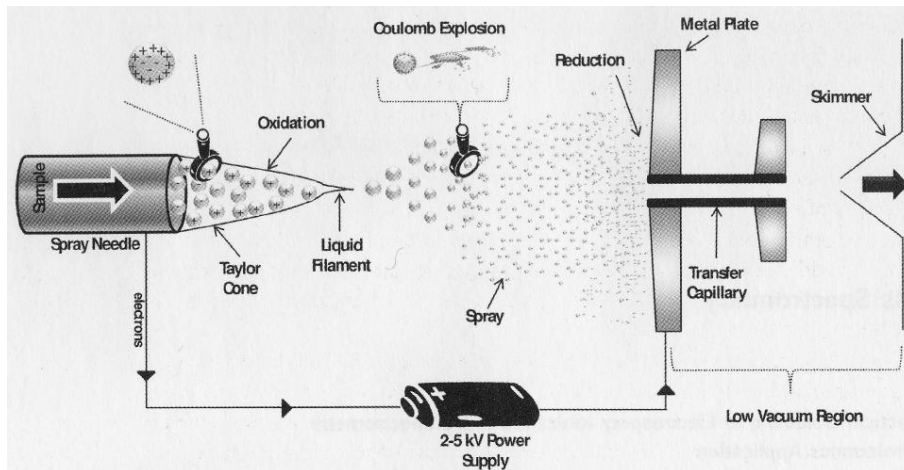
MS-basert proteomikk har raskt blitt førstevalget for identifikasjon og karakterisering av proteiner [14]. Proteiners produksjon av ioner, ioneseparasjon og deteksjon basert på m/z gjør at MS kan identifisere proteiner med høy spesifisitet og sensitivitet [14]. MS sørger for sentrale parametre i proteomikk: sensitivitet, oppløsning, massenøyaktighet og evnen til å generere informasjonsrike massespektra fra peptidfragmenter (MS/MS) [36]. Forbindelser ned på femtogramnivå (10^{-15} g) kan nøyaktig og presist detekteres av MS.

Massespektrometriske målinger utføres på ioniserte analytter i gassfase. Massespektrometere består essensielt av en ionekilde, en masseanalysator og en detektor. Ionekilden ioniserer analytter fra prøven. Ionene separeres av en masseanalysator basert på m/z -forholdet. Mengden ioner som masseanalysatoren slipper gjennom registreres av detektoren [36, 37].

De to vanligste kombinasjonene av ioniseringsteknikk og MS-type innen peptid og proteinanalyse er MALDI-TOF-MS og ESI-MS/MS [38]. Både ESI og MALDI er myke ioniseringsteknikker, som innebærer at ioniseringen i liten grad fragmenterer molekylet [14]. De virker ganske forskjellig, og gir komplimenterende informasjon [14]. ESI-MS produserer ofte flere ladninger på analytten, som gjør ESI-MS mer egnet til analyse av peptider enn hele proteiner. MALDI-TOF kan gi nøyaktig og presis masse til hele proteiner siden den stort sett generer masser til enkelt ladede proteiner [37].

Ionisering: ESI

I 2002 gikk Nobelprisen i kjemi blant annet til John B. Fenn for utvikling av metoder for identifikasjon og strukturanalyse av biologiske makromolekyler, med spesielt fokus på ESI [14]. Mekanismen for ESI illustreres i Figur 4 og beskrives som følger: væske, fra for eksempel et HPLC-system, pumpes gjennom et kapillær med et pålagt spenningspotensial. Væsken prøver å holde på stadig mer energi slik at væsken sprayes ut av kapillæråpningen med Taylor cone-form av små ioniske dråper. Spenningspolariteten bestemmer hvilke ioner (positive eller negative) som drives mot en motelektrode, mens en tørkegass bidrar til at størrelsen på dråpene reduseres raskt. Når overflatespenningen i dråpene ikke lenger kan holde på ladningene fisjonerer de av såkalte coulomb eksplosjoner. Prosessen gjentas til alle ladede ioner er frigjort fra de små dråpene [14]. Før ionene entrer masseanalysatoren fokuseres ionestrømmen av skimmere og linser [37]. I løpet av MS-prosessen reduseres trykket, gjennom flere trinn, fra atmosfæres trykk ved ESI til vakuum.



Figur 4 ESI prosessen [27]. Spenningspolariteten fører til dannelse av en sky av små ioniserte dråper fra Taylor cone, videre desolivering ved coulomb-eksplisjoner, frem til ionene er frie for solvent og fokuseres gjennom en intermediat vakuumregion før de ledes inn i MSen.

ESI i positiv modus er vanlig å bruke på proteiner og peptider, som gjerne har en netto positiv ladning ved sur pH. ESI vil gi mange ladninger for store proteiner, mens små tryptiske peptider ofte får dobbel positiv ladning $[M+2H]^{2+}$ [38].

ESI er ofte koblet til en ionefelle, singelkvadrupol (SQ) eller trippelkvadrupol (QqQ). SQ har god nok sensitivitet til å detektere og monitorere kjente analytter. Ionefelle og QqQ er masseanalytatorer med mulighet for MS/MS, som gir strukturinformasjon gjennom CID av ionene.

Masseanalytator: SQ

En kvadrupol består av fire metallsylindre, arrangert parallelt med vekslende elektrisk spenning mellom to motstående anoder og katoder. Kvadrupolen fungerer som et filter før detektoren, ved at kun ioner innen et masseintervall og med tilhørende m/z -verdier oscillerer stabilt gjennom det magnetiske feltet. Ionene bringes inn i z-retning, påvirkes av en vekslende spenning og ioner som er stabile i xz- og yz-retning vil passere gjennom kvadrupolen og detekteres. I denne oppgaven er det brukt full sveip (scan) og selected-ion-monitoring (SIM) for deteksjon av peptidene.

Masseanalytator: ionefelle

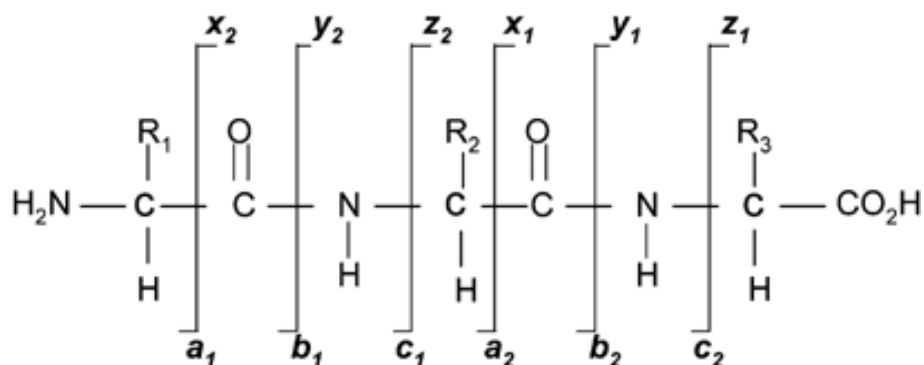
Fragmentering av peptidene ble utført av en ionefelle i denne oppgaven. Grunnprinsippet for fragmentering ved hjelp av MS/MS går ut på at de genererte peptidionene først separeres etter m/z , som ved singel MS. Deretter utsettes de gjenværende ionene for kollisjonsindusert dissosiasjon (CID), der kinetisk energi fra kollisjon med gassmolekyler overføres til indre energi, som fører til fragmentering av peptidet. Fragmentene analyseres, i et nytt MS-steg,

etter deres m/z -fordeling, som resulterer i et ioneproduktspektrum, med mulighet for å bestemme eller verifisere peptidets aminosyresekvens.

Ionefellen består av to end-cap'er og en ringelektrode. Ionene dirigeres inn i ionefellen gjennom den ene end-cap'en og bremses av en gass. En spenning og spenningsveksling selekterer ut ioner etter deres m/z -verdier og destabiliserer ioner med lavere og høyere m/z -verdier. Videre gjør økt spenning at de selekterte ionene fragmenteres av kollisjon med heliumgass [14]. Detektoren registrerer til slutt m/z -verdiene til fragmentene. Omlag 50 % av ionene kommer inn til detektoren.

Fragmentering av peptider: MS/MS

Peptiders aminosyresekvens kan bestemmes ved hjelp av tandem MS. En skjematisk representasjon av den aksepterte nomenklaturen av mulige fragmenteringer av peptider, vist i Figur 5, ble lagt frem av Roepstorff og Fohlman [39].



Figur 5 Fragmentering av peptidion av CID [40]. Representasjon av nomenklaturen for fragmenteringer av peptidkjeden viser at hovedsakelig peptidryggraden fragmenteres.

a-, b- og c-ioner dannes ved N-terminalen av peptidet, mens x-, y-, og z-ioner er tilhørende fragmentering for C-terminaldelen av peptidet. Den hyppigst forekommende fragmenteringen, der bindingen mellom karbonyloksygenet og amidnitroget brytes og gir y- og b-ioner, krever minst energi. Når den positive ladningen holdes på C-terminalen av det originale peptidet gir fragmenteringen et y-ion, mens hvis det holdes på N-terminalen gir det et b-ion. Når en eller flere aminosyrer har funksjonelle grupper med positiv ladning kan fragmentene detekteres som ioner selv om ikke den positive ladningen går over til den delen av peptidet ved fragmentering.

Peptider er bygget opp av aminosyrer med samme grunnkjelett, men ulike funksjonelle grupper, R_x (se Figur 5), som gir dem ulike masser. Programvare kan generere m/z -verdier for fragmentene tilhørende et peptid. For å bekrefte en peptidsekvens må in-silico-verdiene i rimelig grad falle sammen med de observerte verdiene fra MS/MS-analysen.

6.4 PROTEOMIKK

Feltet proteomikk omfatter studier av et biosystems proteinuttrykk, kodet av genomet. Proteomet er, i motsetning til genomet, et dynamisk multidimensjonalt område [37, 41]. Omfanget av proteinuttrykk i ulike celler som en organisme består av, den subcellulære lokasjonen, post translasjon modifikasjoner, interaksjoner med andre proteiner og strukturefunksjonsforhold kan være av interesse innenfor proteomikk.

6.4.1 Biomarkører

Proteiner reflekterer fysiologiske prosesser i en celle eller en organisme. Proteomikk kan således karakterisere informasjon om systemets biologi ved å studere proteinforekomst i biologiske prøver [37, 41]. Utviklingen innen immunometriske og massespektrometriske metoder anvendt innen proteomikk har åpnet for nye muligheter til å finne proteiner med diagnostisk verdi [42]. Tilgjengeligheten av genom-sekvenser og utvikling av en rekke analyseverktøy, som databaser med proteinsekvens og brukervennlig verktøy for bioinformatikk, har lagt grunnlaget for og lettet det analytiske arbeidet [37].

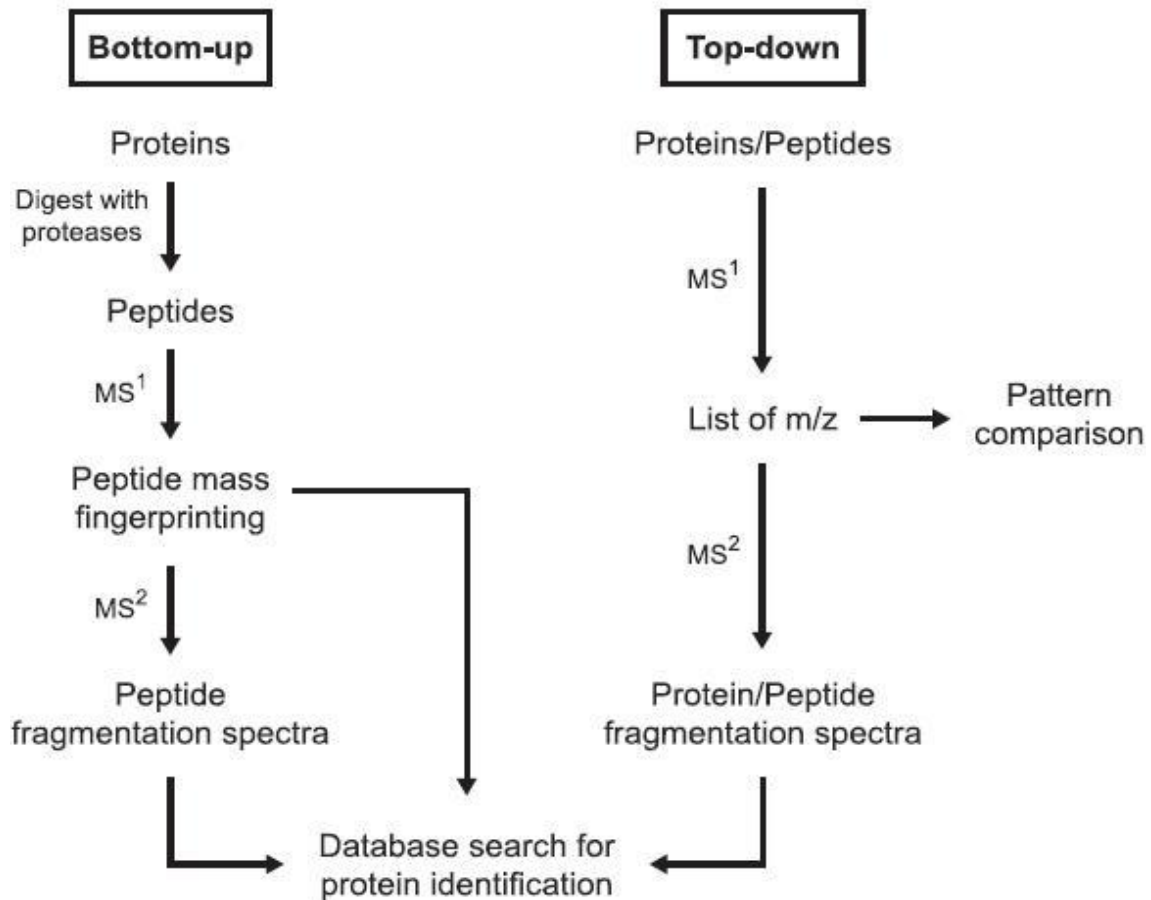
En substans fra en organisme som kvalitativt eller kvantitativt kan brukes til å indikere en biologisk tilstand kalles en biomarkør [32]. Biomarkører kan være sykdomsspesifikke fingeravtrykk, som med klinisk formål kan gi en tidlig diagnose av sykdom, gi grunnlag for å vurdere terapierespons, brukes for å monitorere forløpet i sykdommen og gi sykdomsprognose.

6.4.2 Fremgangsmåte for bestemmelse av biomarkører

Figur 6 viser to hovedfremgangsmåter til å identifisere proteiner med diagnosisk verdi. Ved analytisk protein-MS brukes oftest fremgangsmåten ”bottom-up”, der proteinet kløyves av en protease og peptidproduktets m/z identifiseres gjennom MS. Pålitelig identifikasjon utføres basert på peptidmasse-fingeravtrykk eller basert på fragmenteringsspektra [27, 43]. Ved ”top-down” fremgangsmåte bringes intakt aminosyrekjede, uten proteolytisk kløyving, inn i MSen [28, 43].

Ved targeted eller målrettet proteinanalyse er fokuset på spesifikke proteiner som antas å kunne være biomarkører. Hypoteser basert på logiske biologiske resonnementer eller tidligere forskning kan være grunnlag for valg av et protein. Bottom-up-fremgangsmåte og proteolyse ved hjelp av trypsin er blitt utført på flere matrikser for targeted proteinanalyse. Eksempler på dette er: Prion i hjernevev, cardiac troponin i hjertevev, hemoglobin A2 i fullblod, Zn- α 2

glykoprotein og PSA i serum, bovine somatotropin i melk og plasma og cystatin C i bufrede løsninger[38]. Analyse av hCG i urin er også blitt utført ved en slik fremgangsmåte [23].



Figur 6 To hovedfremgangsmåter for MS-analyse av protein som biomarkørkandidater [43]. Figuren viser bottom-up og top-down fremgangsmåte, der MS^1 er den første MS-målingen og MS^2 er den andre MS-målingen med CID og fragmentering av aminosyrekjedene.

6.4.3 Proteolyse av proteiner: signaturpeptid

ESI-MS(/MS) blir sjelden brukt til kvantifikasjon av intakte proteiner som biomarkører.

Lavere signalintensitet, som følge av en bredere ladningsfordeling av større molekyler, gir ofte for lav sensitivitet for kvantifikasjon [38]. De vesentlig lavere massene til peptider og færre ladninger, sammenliknet med proteiner, resulterer i økt følsomhet og nøyaktighet i MS-målingene [30, 37]. Skal et protein detekteres med høy sensitivitet og nøyaktighet med ESI bør det derfor enzymatisk deles til peptider. Dersom MS skal utføres på intakte proteiner er MALDI mer egnet enn ESI [14].

I denne oppgaven ble en "bottom-up" strategi valgt. Som Figur 6 illustrerer innebærer det at et protein omdannes til peptider ved å tilsette en protease, et degraderende polypeptid, som kløyver peptidbindinger. For analytiske formål bør proteasen være et stabilt, velkarakterisert

enzym, med veldefinerte spesifisiteter. Det må være tilgjengelig med høy renhet og være robust for applikasjon i varierte omstendigheter. Eksempler på noen proteaser som møter disse kravene er trypsin, chymotrypsin, glu C, lys C og asp N [37].

Trypsin

Trypsin er den mest brukte proteasen i proteomikk [27, 37]. Serine-proteasen blir primært skaffet fra bukspyttkjertel fra gris eller kveg. Trypsin kløyver aminosyresekvenser etter lysin og arginin i C-terminalretningen, med mindre disse aminosyrene etterfølges av prolin [27, 37]. De to aminosyrene har ofte en passende avstand mellom seg for å gi peptider med ideell størrelse for MS-analyse [37]. Enzymatisk klipp etter de basiske aminosyrene sørger for jevn fordeling av positive ladninger på peptidene, som kan være en fordel ved MS i positiv ESI-modus. Fordeling av svært basiske aminosyrer gjør de tryptiske peptidproduktene protonerte ved elektropray.

Signaturpeptid

Bottom-up-fremgangsmåte utføres der signaturpeptider, peptider som er spesifikke for og støkiometrisk relatert til proteinene, skal bestemmes og detekteres ved analyse. Ved tryptisk proteolyse av et kjent protein kan en programvare, som ProteinProspector, generere sannsynlige m/z verdier for de tryptiske peptidene. Gjennom søkemotorer, som BLAST fra NCBI, kan spesifisiteten det tryptiske peptidene har for proteinet kalkuleres for å vurdere om det er egnet som et signaturpeptid. Peptidet bør være på 6 aminosyrer eller lenger, da kortere peptider sjelden er unike ved søking i databaser [37, 38]. Peptidsekvenser med aminosyrer på 6-20 aminosyrer er optimalt for sammenlikning mot databaser og MS-analyse [37]. Ut over å være spesifikt for proteinet skal et signaturpeptid ha en forekomst relatert mengde protein, slik at signalintensiteten fra et signaturpeptid er direkte relatert proteinet.

Visse områder av proteinet kan i særlig grad være utsatt for modifikasjon som vil innvirke på massen og eventuelt også de kjemiske egenskapene. Skal den degraderte formen detekteres må peptider fra andre områder velges eller det modifiserte peptidet detekteres. For hCG skal modifiserte former av ett protein detekteres, og forskjellene mellom dem brukes for å detektere de ulike isoformene.

6.5 AMINOSYRER, PEPTIDER OG PROTEINER

Proteiner er de hyppigst forekommende biologiske makromolekyler som opptrer i og som en del av alle celler. Proteiner utøver biologiske funksjoner i kroppen med stor diversitet [44]. Sammenhengende aminosyrekjeder bygger grunnkjelettet til peptider og proteiner, som er lengre polymerer. Proteinets egenskaper er betinget av dets molekylstruktur, som igjen avhenger av hvilke aminosyrer fra Tabell 4 som inngår i molekylet og i hvilken rekkefølge de er bundet til hverandre.

Proteinets primærstruktur er aminosyrer kovalent bundet sammen av substituerte amidbindinger kalt peptidbindinger. Peptider på under 10 aminosyrer har ofte ikke en tredimensjonal folding, men potensialet for en sekundær eller tertiær struktur øker med økende peptidkjedelengde [44, 45]. Inter- og intramolekulære interaksjoner som hydrogenbindinger, ioniske interaksjoner, hydrofobe non-kovalente interaksjoner eller eventuelle kovalente bindinger, som disulfidbroer, er årsaker til sekundære og tertiære konformasjoner [44-46].

6.5.1 hCG-isoformer i løsning

Proteiner har vanligvis en stabil tredimensjonal struktur i løsning [46]. Upolare kjeder skjermes fra solventen når det er energetisk fordelaktig at hydrofobe områder vender mot hverandre, mens de hydrofile gruppene vender ut [47]. For at trypsin skal komme til for proteolyse (se under 6.4.3) av hCG-isoformer må områdene eksponeres i løsning. Det betyr at molekylet må denatureres slik at tredimensjonal folding brytes.

Det er nødvendig å bryte kovalente disulfidbindinger i β -subenheten (se 6.1.1) som bidrar sterkt til den tredimensjonale konformasjonen. Hvert av de valgte signaturpeptidene (se 8.1) inneholder dessuten en cysteinaminsyre som deltar i en disulfidbinding (sekvenser for signaturpeptider i Tabell 19 side 59 og disulfidbindinger illustreres i Figur 1 side 14). Bindingene må derfor brytes med et reduserende agens for at konformasjonen ikke skal hemme trypsineringen og proteolysen skal resultere i de predikerte peptidene. Varme og tilsetning av denatureringsagenser kan bidra til å folde ut hCG-isoformer [48]. For å forhindre at cysteinaminsyrene skal reagere med hverandre etter reduksjonen tilsettes et alkylende agens.

Tabell 4 De essensielle aminosyrene. Disse aminosyrene er fungerer som byggesteiner for peptider og proteiner.

Aminosyre	3-bokstav- betegnelse [49, 50]	1-bokstav- betegnelse [49, 50]	Residual monoisotop- masse [50]	Type sidekjede (R) [49]	Hydrofobisitet- indeks [44]
Alanin	Ala	A	71,04	upolar	1.8
Arginin	Arg	R	156,10	basisk	-4.5
Aspargin	Asn	N	114,04	polar	-3.5
Asparginsyre	Asp	D	115,03	sur	-3.5
Cystein	Cys	C	103,01	upolar	2.5
Fenylalanin	Phe	F	147,07	upolar	2.8
Glutamin	Gln	Q	128,06	polar	-3.5
Glutaminsyre	Glu	E	129,04	sur	-3.5
Glycin	Gly	G	57,02	upolar	-0.4
Histidin	His	H	137,06	basisk	-3.2
Isoleucin	Ile	I	113,08	upolar	4.5
Leucin	Leu	L	113,08	upolar	3.8
Lysin	Lys	K	128,09	basisk	-3.9
Metionin	Met	M	131,04	upolar	1.9
Prolin	Pro	P	97,05	upolar	-1.6
Serin	Ser	S	87,03	polar	-0.8
Treonin	Thr	T	101,05	polar	-0.7
Tryptofan	Trp	W	186,08	upolar	-0.9
Tyrosin	Tyr	Y	163,06	polar	-1.3
Valin	Val	V	99,07	upolar	4.2

6.6 URIN

Biologiske prøver er vanligvis komplekse matrikser med mange ulike komponenter med et vidt spenn av molekyllmasser. Urin er en oppløsning av organiske og uorganiske stoffer som skilles ut gjennom nyrene og samles opp i urinblæren. Oppløsningen inneholder filtrat fra blodet, og består hovedsakelig av vann og avfallsprodukter fra stoffskiftet og av stoffer som må fjernes for at elektrolytt- og syre-base-balansen skal opprettholdes [51].

Syreoverskudd fra stoffskiftet gjør at urin ofte er svakt sur med pH mellom 4 og 6. Normal urin er som regel klar og gul fra urokrom. Urinen som samles opp om natten er mørkest og mest konsentrert. Ved avkjøling kan uklarerheter observeres grunnet utfelling av tungtløselige salter [51]. Urinens karakter er avhengig av parametre som tid på døgnet, fastende eller etter måltider, før eller etter fysisk aktivitet om morgenen, midtstråle eller ”full” urin og ikke minst fysiologiske diversiteter og patologiske tilstander.

Urinkonsentrasjonen av hCG-isoformer varierer gjerne fra det dobbelte av serumkonsentrasjon og ned til en tiendedel av serumkonsentrasjonen avhengig av væskeinntak og diuresen [1].

6.6.1 Analyse av urin

Siden oldtiden har urin blitt testet ved sykdom. Glukose i urinen, ved diabetes eller redusert renalfunksjon, ble ”detektert” ved å smake på urinen eller undersøke om den tiltrakk seg maur. Høy tilstedeværelse av albumin, gjennom en skumtest, indikerte renal sykdom [43]. En rekke analysemetoder har siden da blitt utviklet for deteksjon av biomarkører i urin.

I friske menneskers urin har proteomikk-profilering avdekket tilstedeværelse av 1000 ulike protein-genprodukter og fragmenter fra større proteiner [43]. Utallige proteiner og peptider kan finnes i et menneskes urin. De kommer fra glomerulær filtrasjon av blodplasma, avfallsstoffer fra celler, apoptose, proteolytisk degradering av proteiner bundet til celleoverflater og sekresjon av exosomer. Gode analyser av protein- og peptidnivåer kan avsløre forekomsten av biomarkører med klinisk relevans. [43]

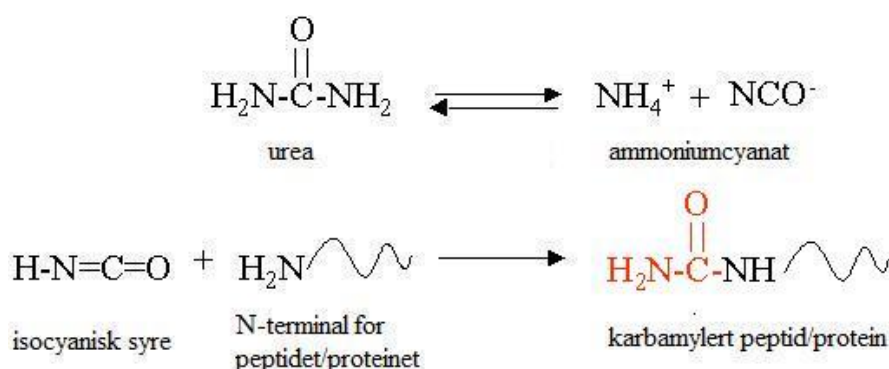
Potensielle analytiske utfordringer

Innen klinisk proteomikk er urin en attraktiv non-invasiv kilde for biomarkører. Urin er tilgjengelig i store mengder og er relativt stabil sammenliknet med andre matrikser [52].

Urinmatriksen byr derimot på en rekke utfordringer. I motsetning til andre matrikser har urin

stor variasjon i proteinkonsentrasjon, saltnivå (som Na^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- og SO_4) og interfererende stoffer. Det innebærer at urinprøver kan ha ulik pH, bufferkapasitet og konsentrasjon av både analytt og andre molekyler. Dessuten er konsentrasjonen av målproteinene som skal analyseres ofte lav [53].

Saltene, den organiske komponenten urea og andre urinsubstanser kan modifisere proteiner på andre måter og i en annen grad enn i plasma. Ureat, salt av urinsyre, kan beskytte mot oksidasjon av lipoproteiner. Ammonium og ammoniakk er involvert i fosforilering, nitrering og oksidasjon og urea i karbamylering, fosforylering og metylering [54, 55]. Urea er i likevekt med ammoniumcyanat som vist i Figur 7. Varme bidrar til å skyve denne likevekten mot høyre. Isocyanisk syre kan så reagere med lysin, arginin, cystein eller N-terminalen til aminosyresekvensen [48]. Slike modifiseringer lysin og arginin gjør disse områdene uegnet for proteolyse med trypsin.



Figur 7 Ureas reaksjonsvei til karbamylering [56]. Urea foreligger i likevekt med ammoniumcyanat. Protonert cyanat, isocyanisk syre kan reagere med lysin, arginin, cystein eller N-terminalen til aminosyresekvensen, der sistenevnte er vist som eksempel i figuren.

Human urin inneholder antitrypsin-stoffer tilhørende en familie av trypsinhekkere (UTI) [57], som kan inhibere trypsinaktivitet. Det er blitt vist at noen antitrypsin-stoffer kan inaktiveres helt eller delvis ved oppvarming. En typisk variant av α_1 -antitrypsin får kraftig redusert inhiberingsaktivitet ved oppvarming til lag 65°C i 15 min for løsning med pH 7,5 [58].

Innen metodeutvikling, validering og bruk av LC-ESI-MS er det viktig å være på vakt etter interfererende matrikseffekter. Matrikseffekter innebærer forandring i ioniseringseffekter av stoffer, som følge av tilstedeværelsen av koeluerende stoffer [29]. Tilstedeværelse av saltkomponenter kan gi ionesuppresjon [54]. Effektene kan ofte ikke sees direkte på kromatogrammet, men kan avsløres ved å gjennomføre postekstraksjonstilsetning eller post-kolonneinfusjon.

7. MATERIALER OG METODER

7.1 KJEMIKALIER, ANALYTTER OG UTSTYR

Tabell 5 til Tabell 10 viser til reagenser og utstyr som er blitt brukt i oppgaven.

Tabell 5 Liste over benyttede kjemikalier. Stoffene er listet etter alfabetisk etter forkortelse eller navn for stoffet med molekylformel bak.

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
ABC, NH_4HCO_3	>99,5 %	Fluka, Buchs SG, Sveits
Dinatriumfosfatdihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99,5%	Merck, Norge
DTT, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	>99 %	Fluka, Buchs SG, Sveits
Guanidinhydroklorid, CH_6ClN_3	>98 %	Alfa Aesar, Karlsruhe, Tyskland
IAA, $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$	>99 %	Sigma-Aldrich, Norge
Ionebyttet vann, H_2O	Renset med EASYpure™	-
Kaliumdihydrogenfosfat, KH_2PO_4	-	-
Kaliumklorid, KCl	-	-
MeCN, CH_3CN	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
MeOH, CH_3OH	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Maursyre, HCOOH	≥ 95 %	Fluka, Buchs SG, Sveits
Natriumklorid, NaCl	99,5%	Merck, Darmstadt, Tyskland
Saltsyre, HCl	99,7 %	Prolab, Oslo, Norge
TFA, $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$	>98 %	Sigma-Aldrich, Norge
Tris, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	>99,9 %	Sigma, St.Louis, MO, USA
Ureum, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	>98,5 %	Sigma-Aldrich, Norge

Tabell 6 Liste over benyttede proteiner

Protein	Kvalitet	Leverandør
Pregnyl [®] , hCG 5000 IE	Legemiddel, pulver til injeksjonsvæske (for SPC se APPENDIKS 6)	N. V. Organon, Oss, Nederland
Trypsin fra bovin pankreas	Essensielt saltfri (frysetørket)	Sigma, St.Louis, MO, USA

Tabell 7 Liste over utstyr til LC-MS

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/injektor	Sil-10AD VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Blandekammer	FCV-10ALVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Detektor	LC-MS-2010 A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Pumper	LC-10AD VP LC7A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Programvare	Class VP Chromatography Datasystem Version 4.3	Shimadzu, Kyoto, Japan
Separasjonskolonne	Biobasic C8, 50mm*5µm	Thermo Electron corporation Cheshire, UK
Software	LCMSsolution version 2.04	Shimadzu, Kyoto, Japan
System controller	SCL-10AVP	Shimadzu, Kyoto, Japan

Tabell 8 Liste over utstyr til LC-MS/MS

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/injektor	Ultimate WPS-300TSL	Dionex Corporation, Sunnydale, CA, USA
Detektor	Finnigan LCQ	Thermo Electron Corporation, Cheshire, UK
Separasjonskolonne	Biobasic C8, 50mm*5µm	Thermo Electron Corporation, Cheshire, UK
Programvare	Xcalibur [™] version 2.0	Instrument-Teknikk AS, Østerås, Norge
Pumper	Ultimate LPG-3000M	Dionex Corporation, Sunnydale, CA, USA

Tabell 9 Øvrig utstyr: forbruksvarer

Utstyr	Modell	Produsent
Empore C8	Empore Extraction Discs C8 47 mm	Teknolab
Empore C18	Empore Extraction Discs C8 47 mm	Teknolab
Eppendorfrør	Brand microtubes 1,5 mL	Sigma-Aldrich, Norge
Glass pesteur pipetter	150 mm	Prolab
Immunoassaybrønner for hCG	type 27 (epitop 271 fra [9])	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
LoBind eppendorfrør for proteiner	Protein LoBind Tube 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Pipettespisser	Finntip	Labsystems, Helsinki, Finland

Tabell 10 Øvrig utstyr: ikke forbruksvarer

Utstyr	Modell	Produsent
Automatpipetter	Finnpipette [®]	Labsystems, Helsinki, Finland
Inkubator ovn	Termaks	Termax, Bergen, Norge
Inndamping med mulighet for justerbar varme og nitrogengass	Pierce Reacti-Therm III	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
pH-meter	Beckman ϕ ISFET pH Meter	Beckman, USA
Sentrifuge	Eppendorf centrifuge 5804	Hettich Zentrifugen, Tyskland
Vannrenseanlegg	EASY Pure UV	Barnstead, Dubuque, USA
Vekt	MXS205 Dual Range	Mettler Toledo, Greifensee, Sveits
VibraMax Rystemaskin	VibraMax 100	Heidolph, Tyskland
Vortex mikser	Vibrofix VF1 electronic	Janke & Kunkel IKA-WERK, Staufen, Tyskland

7.2 TILLAGING AV LØSNINGER, BUFFERE OG UTSTYR

Ammoniumbikarbonat-buffer

ABC-buffer ble alltid laget fersk for dagen og oppbevart kaldt.

100 mM ABC-buffer: 80 mg ammoniumbikarbonat tilsettes 10 mL ionebyttet vann.

500 mM ABC-buffer: 400 mg ammoniumbikarbonat tilsettes 10 mL ionebyttet vann.

Trypsinløsning

Trypsin ble veid inn og forsiktig løst i ABC-buffer **umiddelbart** før tilsetning i proteinløsning.

Trypsin-stamløsning på 1,0 mg/mL: 1,0 mg trypsin tørrstoff løses i 1 mL 100 mM ABC-buffer.

hCG-stamløsning og simulerte pasientprøver

Pregnyl[®]-ampullene ble oppbevart i kjøleskap etter produsentens spesifikasjoner. En ampulle av Pregnyl[®] (Organon) inneholder en pulverblanding med 5000 IE av hCG. I tillegg til hCG inneholder hver Pregnyl[®]-ampulle natriumdihydrogenfosfat (0,25 mg), dinatriumhydrogenfosfat (0,25 mg), natriumkarboksymetylcellulose (0,05 mg) og mannitol (5 mg) [3]. Oppløst hCG (hCG-stamløsning) ble oppbevart i LoBind eppendorfrør i kjøleskap (2-8 °C) i inntil en uke etter oppløsning.

hCG-stamløsning på 5000 IE/mL: Innholdet i en Pregnyl[®]-ampulle løses i 1,0 mL ionebyttet vann og overføres eventuelt til LoBind eppendorfrør for oppbevaring. hCG-stamløsning fortynnes ved å tilsette ionebyttet vann, plasma eller urin for å gi hCG-løsninger med ønsket konsentrasjon.

Simulerte pasientprøver: 100 µL hCG-stamløsning tilsettes 900 µL blank urin for å gi hCG-konsentrasjon på 500 IE/mL. Denne løsningen fortynnes videre ned med blank urin til løsninger med konsentrasjonene 50 IE/mL, 5 IE/mL, 0,5 IE/mL og 0,05 IE/mL.

Reduserende agens

Løsningen lages fersk rett før tilsetning i proteinløsning og innveid pulver mellomlagres ved behov i kjøleskap.

50 mM DTT-løsning: 7,7 mg DTT tørrstoff løses i 1,0 mL 100 mM ABC-buffer. Hansker bør brukes ifølge HMS.

Alkylerende agens

IAA ble veid inn og tilsatt ABC-buffer rett før tilsetning i proteinløsning. IAA er lyssensitivt og bør skjermes for lys så godt det lar seg gjøre. Kort mellomlagring bør være under 8 °C, for IAA degraderes raskt ved høyere temperaturer.

100 mM IAA-løsning: 18,6 mg IAA tørrstoff løses i 0,5 mL kald 100 mM ABC-buffer. Høy toksisitet påkrever hansker, labfrakk og briller ifølge HMS.

Denatureringsagens

Ureas molekylmasse og tetthet er på henholdsvis 60,06 g/mol og 1,35 g/mL. Guanidin hydroklorids molekylmasse og tetthet er på henholdsvis 95,5 g/mol og 1,35 g/mL. Begge denatureringsløsningene må varmes opp og ristes godt for at stoffene skal oppløses. Det bør lages en lavere konsentrasjon om løsningen krystalliseres i pipettespissen.

12 M urealøsning: 2,20 g tørrstoff av urea (>98,5 % renhet) tilsettes 100 mM ABC-buffer opp til 3 mL eller 732 mg tørrstoff løses i 460 µL ABC-buffer til en oppløsning på 1 mL.

9 M guanidinløsning: 434 mg guanidin hydroklorid (>99 % renhet) løses i 175 mL 100 mM ABC-buffer til en oppløsning på 0,5 ml.

Løsninger til SPE

100 % TFA fortynnet med ionebyttet vann, oppbevares i kjøleskap (2-8 °C) og holdbarheten settes til en uke.

10 % (v/v) TFA: en ampulle 1 ml 100 % TFA brytes av og appliseres en målekolbe over halvfyllt med ionebyttet vann. Kolben etterfylles med ionebyttet vann opp til 10 ml.

0,1 % (v/v) TFA-løsning: 100 µL av løsningen tilsettes en annen målekolbe, som etterfylles til 10 mL ionebyttet vann for å gi en løsning med 0,1 % TFA.

Elueringsløsningen 0,1 % (v/v) TFA-løsning og MeCN i forhold 20:80: 8 mL MeCN blandes med 2 mL 0,1 % (v/v) TFA-løsning.

Immunocaptureagenser

*Stamløsning av 10*PBS-buffer:* 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ * 2H₂O og 240 mg KH₂PO₄ tilsettes ionebyttet vann opp til 100 mL.

*1*PBS-buffer:* 10 mL av 10*PBS-buffer tilsettes en målekolbe som etterfylles med ionebyttet vann til 100 ml.

*1*PBS-buffer med 0,05 % Tween:* 25 µL av Tween-20 tilsettes 5 mL 10*PBS som fortynnes til 1*PBS ved å tilsette ionebyttet vann opp til 50 mL. Det kan være problematisk å få ut den viskøse Tween-20-løsningen av pipetten. Et overskudd av den viskøse Tween-20-løsningen kan fylles i pipettespissen, tuppen tørkes av og angitt volum tilsettes løsningen ved å trykke frem til pipetten gir motstand. Overskuddet i pipetten kastes.

Tris-HCl: a.) pH skal innstilles med HCl-løsning som lages først: 7 deler ionebyttet tilsettes 1 del HCl. b.) 121,8 mg Tris tilsettes en 100 mL målekolbe. Ionebyttet vann tilsettes målekolben så den blir over halvfull. pH'en justeres så til 7,4 med den tillagede HCl-løsningen, før ionebyttet vann fylles på slik at totalt volum er 100 mL.

Mobilfaser

Mobilfase A er MeCN og 20 mM maursyre i forhold 5:95 (v/v). Mobilfase B er MeCN og 20 mM maursyre i forhold 95:5 (v/v).

20 mM maursyre: 755 µL 100 % HCOOH til 1,0 L ionebyttet vann. Når syre og vann skal blandes er hovedregelen at syren alltid pipetteres i vannet.

Mobilfase A (MFA): 50 mL MeCN tilsettes 950 mL 20 mM maursyreløsning.

Mobilfase B (MFB): 950 mL MeCN tilsettes 50 mL 20 mM maursyreløsning.

Immunocapturebrønn

Brønner for immunocapture med kapasitet på 0,5 IE hCG lages av Radiumhospitalet.

Brønnene er coatet med antistoff for epitop β₄ (type 271 Fig. 6 [10], Fig.2 [10], Table 3-4 [10] og fig. 13 A-B [10]) lokalisert på hCGs β-subenhet mellom aminosyre 68-77. Antistoffet har lav kryssreaktivitet med hLH og hLHβ. Brønnene er tilpasset prøvevolum på 100 µL og kan romme opp til 250 µL.

SPE-utstyr

SPE-tips: En pasteurpipette brukes til å trykke ut 6 små puter (diameter på om lag 1 mm) fra en 3M EMPORE[®] C8 disk. C8 materialet overføres fra pasteurpipetten til bunnen av en 10 μ L pipettespiss ved å dytte det over med metalltråd med passende tykkelse. De seks putene trykkes så forsiktig sammen ved å dyttes sammen ved hjelp av metalltråden.



Figur 8 SPE-tip. Bildet (t.v.) viser en tillaget SPE-tip med metalltråd som har dyttet ned sorbentmaterialet. Bildet (t.h.) viser SPE-tip plassert i et eppendorfrør klar til bruk.

Plastsprøyte med pipettespiss: En avklippet 1000 μ L pipettespiss tres på 20 mL plasticsprøyte slik at den passer ned i en SPE-tip og det er tett nok til å presse luft gjennom en SPE-tip.

7.3 PROSEDYRER FOR PROTEOLYSE

For å omdanne hCG-isoformer til kortere aminosyrekjeder som er bedre egnet for LC-MS analyse (se 6.4.3) tilsettes trypsin i hCG-løsningene. For å få en vellykket proteolyse (se 6.5.1) benyttes reduserende agens (DTT), varme og alkylerende agens (IAA) før trypsinering. Denatureringsagenser benyttes også i noen forsøk (se 1.b) og 3.b) under 7.3.1). Proteolysen utføres enten i LoBind eppendorfrør kalt *in-solution*-proteolyse (7.3.1) eller i brønner coatet med antistoff kalt *in-well*-proteolyse (7.3.2).

7.3.1 *In-solution*-proteolyse

Flytskjema for tryptisk klipp direkte i løsning av hCG i vandige prøver, der b.)-stegene kun gjennomføres i noen av metodene under 8.3.2:

1. a.) Pipetter hCG-løsning eller pasientprøve (gravidurin) over i et LoBind eppendorfrør og fortynn/pH-juster med 100 mM ABC-buffer (500 mM ved proteolyse i urinmatriks). Til 200 μ L prøveløsning tilsettes minst 700 μ L ABC-løsning.
b.) Alternativt steg: tilsett en denatureringsagens (urea 12 M eller guanidin 9 M) slik at konsentrasjonen blir i overkant av 8 M for urea eller 6 M for guanidin i hCG-løsningen
2. Tilsett 7 μ L 50 mM DTT-løsning til hCG-løsningen med omlag 0-500 IE hCG og pasientprøver (ukjent konsentrasjon)
3. Løsningen settes i varme (90 °C, eventuelt 60 °C) i 15 minutter
4. a.) La hCG-løsningen avkjøles til romtemperatur før 10 μ L 100 mM IAA-løsning tilsettes og løsningen settes **umiddelbart** mørkt i 15 minutter
b.) Alternativt steg (utføres dersom 1.b.) utføres): fortynn hCG-løsningen med 100 mM ABC-buffer slik at konsentrasjonen av urea er under 2 M eller konsentrasjonen av guanidin er under 1 M
5. Tilsett om lag 10 μ L 50 μ g/mL trypsinløsning til hCG-løsningen med 0-500 IE hCG og sett til inkubering ved 37 °C i varmeskap
6. Stopp proteolysen etter 10-20 timer (etter forsøk beskrevet under 8.3.1) ved å plassere løsningene i kjøleskap (2-8 °C) for avkjøling. Ved behov for prøveopprensning og/eller oppkonsentrering utføres først SPE-prosedyre som beskrevet under 7.4.1. Injisjer 20-40 μ L prøveløsning for LC-MS-analyse som beskrevet under 7.5.
7. Topphøydeintensitet fra hvert signaturpeptid som samsvarer verdiene i Tabell 14 leses av genererte MS-kromatogram.

7.3.2 *In-well*-proteolyse

Før tryptisk klipp *in-well* ekstraheres hCG-isoformer fra prøveløsningen ved hjelp av immunocapture. Prosedyre for immunocapture er beskrevet under 7.4.2. Prosedyren for immunocapture og *in-well*-proteolyse er utviklet av Hanne Lund, stipendiat ved Universitetet i Oslo. Metoden er utviklet for å ekstrahere hCG fra plasmaprøver, men er i denne oppgaven hovedsakelig brukt på urinprøver.

Prosedyren for *in-well* proteolyse fortsetter etter prosedyre for immunocapture 7.4.2. Figur 9 (side 45) illustrerer prosessen med immunobasert opprensning etterfulgt av *in-well* proteolysen beskrevet her.

Prosedyre for *in-well*-proteolyse er som følger for hver brønn:

1. Tilsett 100 μL ABC-buffer i brønnene
2. Tilsett 2 μL 50 mM DTT før brønnene plasseres i et varmeskap som holder 90 °C i 15 minutter
3. Avkjøl løsningene til romtemperatur før de tilsettes 3 μL 100 mM IAA og settes **umiddelbart** mørkt
4. Tilsett 2 μL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trypsinløsning
5. Sett brønnene til inkubering i varmeskap som holder 37 °C, i om lag 2,5 timer
6. Stopp proteolysen ved å avkjøle løsningene i kjøleskap (2-8 °C). Injisér 20-40 μL prøveløsning direkte for LC-MS-analyse som beskrevet under 7.5 eller utfør SPE for oppkonsentrering som beskrevet under 7.4.1.
7. Topp høydeintensitet fra hvert signaturpeptid som samsvarer verdiene i Tabell 14 leses av genererte MS-kromatogram.

7.4 PRØVEFORBEREDELSE OG PRØVEOPPARBEIDELSE

Løsninger kan inneholde stoffer som ikke kan injiseres direkte i LC-MS. For biologiske væsker er prøveopprensning strengt nødvendig. Beskrevne prosedyrer for SPE og immunoaffinitet ble benyttet til dette.

7.4.1 Prosedyre for SPE

Prosedyren for SPE som prøveopparbeidelse blir tilpasset ved å teste hvilke konsentrasjonsforhold som skal til for å eluere isoformene av SPE-materialet. Valg av SPE-materiale og SPE-løsninger begrunnes i 8.2.1. SPE-tippene plasseres i tillagede hull i toppen av lukkede eppendorfrør. Mesteparten av løsningene presses gjennom SPE-materialet ved hjelp av en sentrifuge satt til om lag 2000 rpm i 30-60 sekund for hver 50 µL. For at sorbenten ikke skal bli tørr trykkes resten av væsken manuelt gjennom ved at luft presses ned i SPE-tippene av en plastsprøyte med en avklippet pipettespiss tredd på (utstyr beskrevet under 7.2).

SPE-prosedyren er som følger for hver SPE-tip:

1. Plasser hver SPE-tip i et tillaget eppendorfrør. Aktiver sorbenten ved å applisere 2*50 µL MeCN og press gjennom hver SPE-tip
2. Vask sorbenten med 2*50 µL MFA, som appliseres og presses gjennom
3. Påsett og press 2*50 µL prøveløsning gjennom hver SPE-tip
4. Vask forurensinger av sorbenten ved å presse 2*50 µL MFA gjennom hver SPE-tip (se 8.2.1 for forslag om kombinasjon med en annen vaskeløsning)
5. Overfør SPE-tips til tillagede LoBind-eppendorfrør. 2*50 µL med elueringsløsning presses gjennom sorbenten for å eluere av analytter
6. Plasser LoBind-eppendorfrør på Pierce Reacti-Therm innstilt på 60 °C. Eluatløsningen dampes av ved hjelp av varme og nitrogengass styrt ned i løsningen
7. Tilsett 50-100 µL MFA i hvert LoBind-eppendorfrør, rist forsiktig på Vortex mikseren og overfør løsningen til vialer klare for injeksjon for LC-MS-analyse. Reløsning i 50 µL fremfor 100 µL MFA gir to ganger oppkonsentrering. Injiser 20-40 µL prøveløsning for LC-MS-analyse som beskrevet under 7.5.

Utbytte av SPE beregnes ofte som andel av direkteinjeksjon. hCG klippes ofte i 100 mM ABC-buffer som referanse for effekt ved modifikasjon på proteolyse eller SPE-metoden. Fordi minuttene av den kromatografiske separasjonen ikke går til MS-analyse blir det direkte injisert mellom tre og fem prøvevolum av denne klippløsningen uten SPE-opprensning. Gjennomsnittet av hvert signaturpeptid blir beregnet og brukt som referanse for å beregne

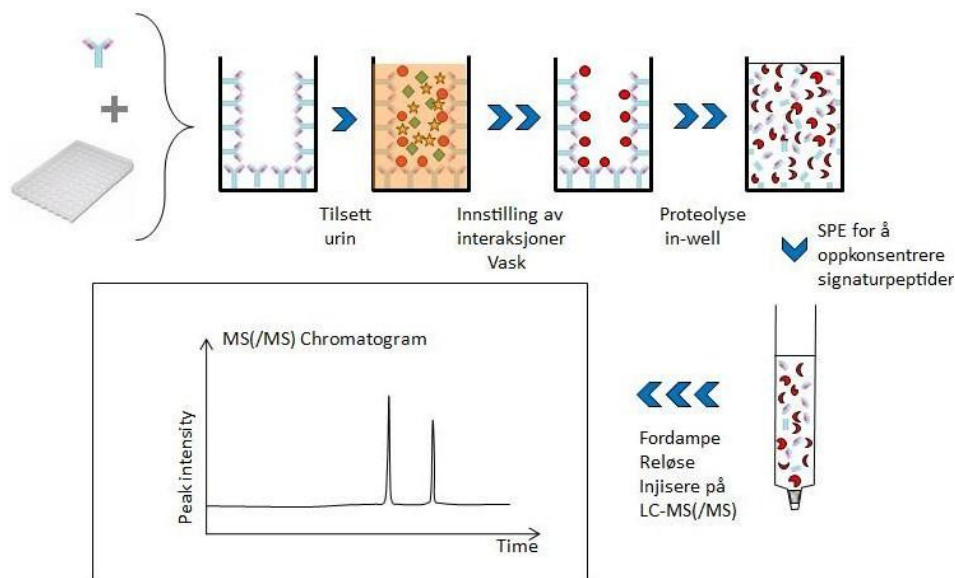
utbytte av de andre prøvene som analyseres etter SPE-opprensking og det korrigeres for en eventuell oppkonsentrering.

7.4.2 Prosedyre for immunocapture

Immunocapture innebærer innledende opprensning av prøveløsning i et prøveforberedelsestrinn, med etterfølgende *in-well* proteolyse beskrevet under 7.3.2. Disse prosedyrene er utviklet av Hanne Lund, stipendiat ved Universitetet i Oslo. Prosedyre for immunocapture er som følger:

1. Vask brønnene ved å tilsette 1*200 μ L 10 mM Tris-HCl
2. Appliser 100 μ L prøveløsning
3. Rist 500 rpm på Vibramax ristemaskin i 1 time
4. Fjern prøveløsning med vakuumsug
5. Vask brønnene ved å tilsette 200 μ L PBS med 0,05 % Tween. Rist gjerne kort på Vibramax ristemaskin (\leq 500 rpm) før løsningen fjernes med vakuumsug
6. Vask med 200 μ L 1*PBS-buffer. Rist gjerne kort på Vibramax ristemaskin (\leq 500 rpm) før løsningen fjernes med vakuumsug
7. Vask med 200 μ L Tris-HCl. Rist gjerne kort på Vibramax ristemaskin (\leq 500 rpm) før løsningen fjernes med vakuumsug

I Figur 9 vises den immunobaserte prosessen fra antistoffet selektiv interagerer med og fanger opp hCG-isoformene, mens forurensninger vaskes av. For videre trinn se *in-well*-proteolyse 7.3.2.



Figur 9 Immunoprosedyrer samlet. Oppbygningen av immunobasert proteolyse illustreres fra tillaging av antistoffcoatede brønner til injisering på LC-MS(/MS).

7.5 LC-MS FOR ANALYSE AV HCG

7.5.1 Oppsett av apparatur

Instrumentering- HPLC-MS

Systemet består av mobilfasereservoarer, pumper, blandekammer, autoinjektor, degasser, separasjonskolonne og MS-detektor.

7.5.2 HPLC

For SQ og ionefelle er disse betingelsene felles:

Injeksjonsvolum: 20-40 μL

Væskeshastighet: 50 $\mu\text{L}/\text{min}$

Kolonne: BioBasic C8

Mobilfaser: MFA og MFB som beskrevet under 7.2

Ved oppstart av LC-MS-systemene vaskes autoinjektoren med 5 % MeOH i ionebyttet vann og pumpene med MFA og MFB. Kolonnen ekvilibreres i minst 30 min ved 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, som er væskeshastighet under alle analyser.

Singelkvadrupol

Tabell 11 viser gradientbetingelsene for analysene på SQ. Mellom 24 og 37 min reekvilibreres kolonnen før neste injeksjon.

Tabell 11 Gradient ved analyse på SQ

Tid (min)	MFA (%)	MFB (%)
0,0	100	0
21,9	60	40
23,0	0	100
23,9	0	100
24,0	100	0
37,0	100	0

Ionefelle

Tabell 12 viser gradientbetingelsene for analysene på ionefelle. Mellom 34 og 43 min reekvilibreres kolonnen før neste injeksjon.

Tabell 12 Gradient ved MS/MS-analyser på ionefelle

Tid (min)	MFA (%)	MFB (%)
0,0	100	0
21,9	60	40
23,0	0	100
33,9	0	100
34,0	100	0
43,0	100	0

7.5.3 MS

Singelkvadrupol

SQ i SIM-modus er brukt i de fleste analysene og med betingelsene listet opp i Tabell 13. m/z -verdiene er listet opp Tabell 14. Detektoren ble skrudd på etter 5 min og skrudd av etter 25 min.

Tabell 13 SQs betingelser for MS-analyser

Ioniseringmodus	ESI (positiv)
Tørkegass	Nitrogen
Hastighet på tørkegass	10-20 L/min
Forstøvergass	Nitrogen
Hastighet på forstøvergass	1.5 L/min
Kildespenning	4.5 kV
Kapillærtemperatur	200 °C
Blokktemperatur	200 °C

Tabell 14 SQ m/z -verdier i SIM-modus. ID er peptidfragmenter beskrevet etter nomenklatur satt for tryptiske peptider (se 4.1) og r_t er retensjonstid

ID	z	m/z	r_t (min)
T5	2+	964.00	19,5-20,2
	3+	643.40	
T9	2+	1114.00	20,4-21,0
	3+	743.00	
nT5(45-60)	2+	914.45	19,2-19,5
	3+	609.90	
nT5(48-60)	2+	765.40	17,6-18,2
	3+	510.60	
cfT9	2+	955.45	21,0-21,8
	3+	637.30	

Ionefelle

Ionefellen ble brukt ved behov for MS/MS-funksjon. Betingelsene er beskrevet i Tabell 15. Ved hjelp av en switch-ventil ble kun flow mellom 4 min og 33,4 min overført til ionekilde og MS/MS.

Det ble gjort fragmentering av alle klipp-produkter ved å utføre dataavhengig scanning (data dependent scan). Systemet utfører en scan i singel MS-modus (scan event 1.) og velger det høyeste signalet til å fragmentere videre (scan event 2.). Etter å ha tatt opp maksimalt fire MS/MS-spektra vil det nest høyeste signalet fragmenteres, osv. Betingelsene for dataavhengig scan vises i Tabell 16.

Tabell 15 Ionefellens betingelser for MS/MS-analyser.

Ioniseringmodus	ESI (positiv)
Forstøvergass	Nitrogen
Hastighet på forstøvergass	20 arbitrære enheter
Kildespenning	4.5 kV
Kapillærtemperatur	200 °C

Tabell 16 Ionefjellens detektor-settninger. Deteksjon foretatt som to scan events, 1. scan og 2. MS/MS "data dependent scan".

1. Scan	350,0-2000,0
2. MS/MS "data dependent scan"	Mest intense ion fra 1. med dynamisk eksklusjon
Default charge state	2
Default isolation width	2,0
Normalized Collision Energy	35
Repeat count	4
Repeat duration	0,5 min
Exclusion list size	25
Exclusion duration	0,5 min
Exclusion mass width	3,0 a.m.u.
Reject mass width	1,0 a.m.u.

7.6 DATABASER OG DATAVERKTØY

7.6.1 ProteinProspector

For kontroll av hvilke hCG-klipp produkter og produkter fra fragmenter som dannes brukes ProteinProspector versjon 5.2.2 (<http://prospector.ucsf.edu>, MS-digest), et fritt tilgjengelig proteomikkverktøy. Søkene på hCG-sekvensene ble utført med følgende innstillinger:

Proteolyse: trypsin

Maksimum manglende klippede områder: 2

Konstante modifikasjoner: carboxymetyl

Variable modifikasjoner: ingen

Proteolysepeptidens m/z -område: 200-3000

Minimum peptidlengde: 4

Vis m/z for flere ladninger: \checkmark

Instrument: ESI-ION-TRAP-low-res

m/z -verdiene under høye topper i MS-kromatogrammet sjekkes for samsvarende m/z -verdier med in-silico-produkter av isoformene. Utført MS/MS og sammenlikning med in-silico fragmentering gir videre mulighet for bestemmelse av det tryptiske peptidet.

7.6.2 BLAST

For å kunne slå fast at det tryptiske peptidet er et produkt av proteinet, forutsetter det at peptidsekvensen er selektiv for proteinet, når analysematrisen er en biologisk prøve. For å kontrollere om tryptiske peptider er spesifikke for hCG-isoformer brukes Basic local alignment search tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) fra National Centre for Biotechnology Information (NCBI).

Protein BLAST (blastp) er et hjelpemiddel for søk av proteiner, der aminosyresekvenser fra en eller flere organismer sammenliknes med proteindatabaser. Blant annet opererer den med en innebygd algoritme som gir statistiske verdier (E-verdi og bit score) på hvor selektiv en aminosyresekvens er for et protein. Lav E-verdi indikerer lav sannsynlighet for at sekvensen ved tilfeldighet er lik og høy bit score indikerer høy peptidspesifisitet [59].

Protein-BLAST av tryptiske peptidsekvenser ble utført med følgende innstillinger:

Database: Swissprot protein sequences, versjon 57.1

Organisme: homo sapiens

Algoritme: blastp

Aktuelle (se 8.1) tryptiske peptidsekvenser som bestemmes som produkter av hCGs isoformer med høyest signal i MS-kromatogrammet utføres det protein BLAST på (resultater i Tabell 19).

8. RESULTATER OG DISKUSJON

8.1 KARTLEGGING AV POTENSIELLE SIGNATURPEPTIDER

Flere aspekter må tas i betraktning under prosessen med valg av signaturpeptider. Et viktig kriterium for at et peptid skal være egnet som et signaturpeptid for en biomarkør er unik spesifisitet for biomarkøren (se 6.5.1 og 7.6.2). For pålitelig kvantifikasjon bør ikke peptidet ha noen arginin eller lysin i sekvensen bortsett fra de C-terminale. Det er fordi produksjonen av ufullstendig trypsinerte peptider da er vanskelig å kontrollere [38].

Potensielle signaturpeptider ble selektert gjennom følgende steg:

1. Tryptisk klipp av hCGs isoformer ble simulert av ProteinProspector som beskrevet under 7.6.1. Resultatet for klipp-produkter av hCG β med 0-2 "missed cleavages" er vist i APPENDIKS 3. Tabell 17 viser de mulige tryptiske peptidene for hCG β med 6 eller flere aminosyrer og uten "missed cleavages".
2. For å vurdere biomarkørspesifisiteten for proteolyseproduktene ble søkemotoren Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), som beskrevet under 7.6.2, benyttet. Tabell 19 (side 59) viser resultat av protein-BLAST utført på bestemte tryptiske peptidsekvenser fra hCG-isoformer.

8.1.1 Identifikasjon av produkter fra isoformene

Potensielle signaturpeptider for hCG-isoformer velges på grunnlag av høy proteinspesifisitet, peptidene må være fullstendig trypsinert og ha høy MS-intensitet. Proteolyse ble utført i løsningen med høy konsentrasjon av hCG Pregnyl[®] på følgende måte:

hCG fra hCG-stamløsning ble løst i 100 mM ABC-buffer og *in-solution*-proteolyse ble utført som beskrevet under 7.3.1 med en utgangskonsentrasjon på om lag 100 IE/mL hCG. For LC-MS/MS-analyse ble 30 μ L av løsningen direkte injisert. MS-kromatogrammet for analysen er vist i Figur 10. De høyeste m/z -signalene tilhørende de tydelige toppene i MS-kromatogrammet ble sjekket mot m/z -verdier for *in-silico*-produktene med inntil 2 "missed cleavages", listet opp i APPENDIKS 3. Fragmentering ble utført på peptidene med m/z som gav høyest signal, som beskrevet under 7.5.3 "data dependent scan".

Fragmenteringsmønsteret sammenliknes mot databasens fragmentverdier, for å bekrefte eller avkrefte peptidets identitet. Tabell 18 viser samsvarende fragmentverdier for peptider

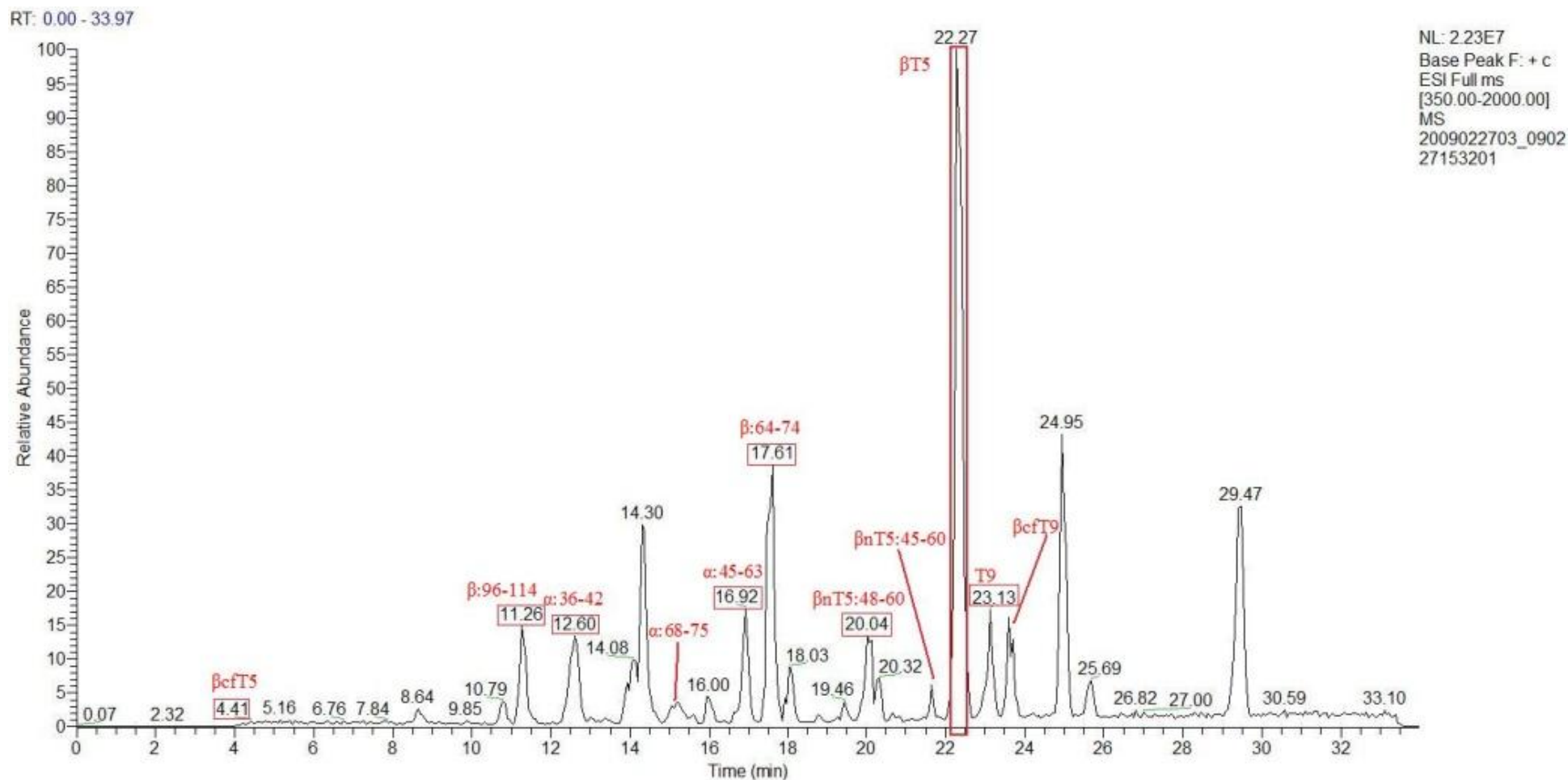
detektert ved MS/MS-analyse og in-silico-beregning av hCG-isoformer med inntil 2 ”missed cleavages” for trypsin.

Tabell 17 In-silico tryptiske peptider for β -subenheten til hCG. Tabellen lister opp alle fullstendig trypsinerte peptider med sekvenser bestående av 6 til 20 aminosyrer. I parentes står aminosyren før og etter sekvensen. ID er navn gitt etter nomenklatur beskrevet under 4.1.

ID	Aminosyresekvens
T2	(K) EPLRPR (C)
T3	(R) CRPINATLAVEK (E)
T5	(R) VLQGVLPALPQVVCNYR (D)
T8	(R) LPGCPR (G)
T9	(R) GVNPPVSYAVALSCQCALCR (R)
T11	(R) STTDCGGPK (D)
T12	(K) DHPLTCDDPR (F)
T13	(R) FQDSSSSK (A)
T14	(K) APPPSLPSR (L)
T15	(R) LPGPSDTPILPQ (-)

Figur 10 til Figur 12 viser fremgangsmåten for å identifisere tryptiske peptider etter proteolyse isoformenes, gjennom å gjøre det for peptidet kalt T5 (for nomenklatur se 4.1). Figur 10 viser MS-kromatogrammet, der signalet ved $t_R=22,27$ har høyest intensitet. Figur 11 viser massespekteret av dette signalet. m/z -verdiene ble sammenliknet med de teoretiske m/z -verdiene for tryptiske peptider produsert av ProteinProspector. De tre markerte m/z -verdiene i figuren stemmer overens med en, to og tre ganger ladet T5. Kun T5 gav disse m/z -verdiene, som sterkt antydte til identiteten til toppen ved 22,27 min.

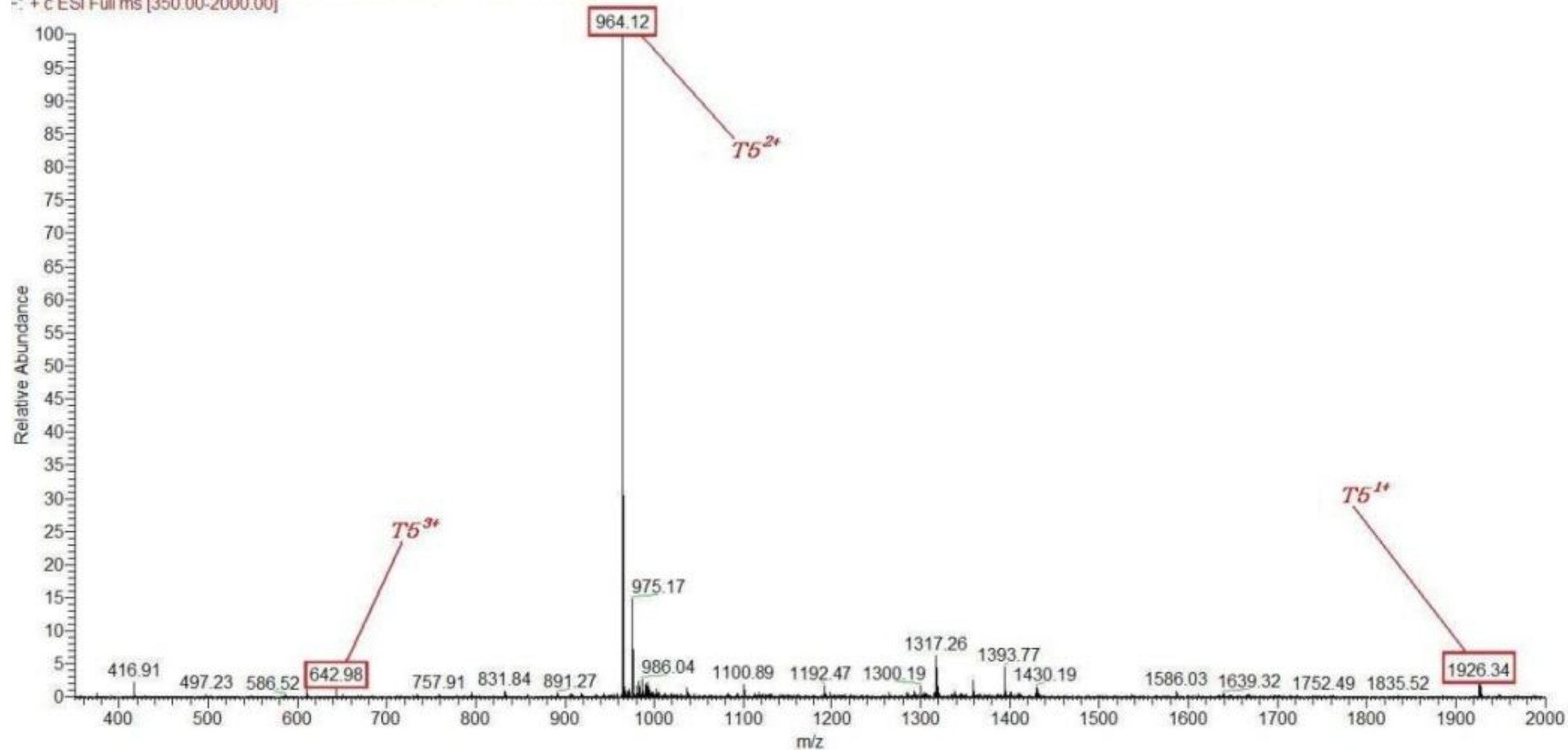
Figur 12 viser fragmenteringsspektrum for $m/z=964,1$ tilhørende peptidet som gir det høye signalet ved 22,27 min. De navngitte b og y-fragmentene stemmer overens med signaler fra de forventede b og y fragmenter fra T5-peptidet. Dette bekrefter identiteten til peptidet ved 22,27 min som T5. Tabell 18 viser korrelerende MS- og MS/MS- m/z for detekterte og in-silico-verdier for flere av signalene fra kromatogrammet i Figur 10.



Figur 10 MS-kromatogram for tryptisk klipp i hCG-løsning. MS-kromatogrammet viser base peak for $m/z=350-2000$ ved scan av trypsinert hCG fra Pregnyl® i 100 mM ABC-buffer, med direkteinjeksjon på 30 μ L, utført på ionefelle. Identifiserte trypsinerte peptider er skrevet over tilhørende topp (se Tabell 18). Rektangel rundt den høyest forekommende toppen viser uttrekk til Figur 11.

X-aksen angir retensjonstid i minutter. Y-aksen angir relativ deteksjonsintensitet i forhold til høyeste signal (her er 100 % signalet ved $t_R=22,27$ min).

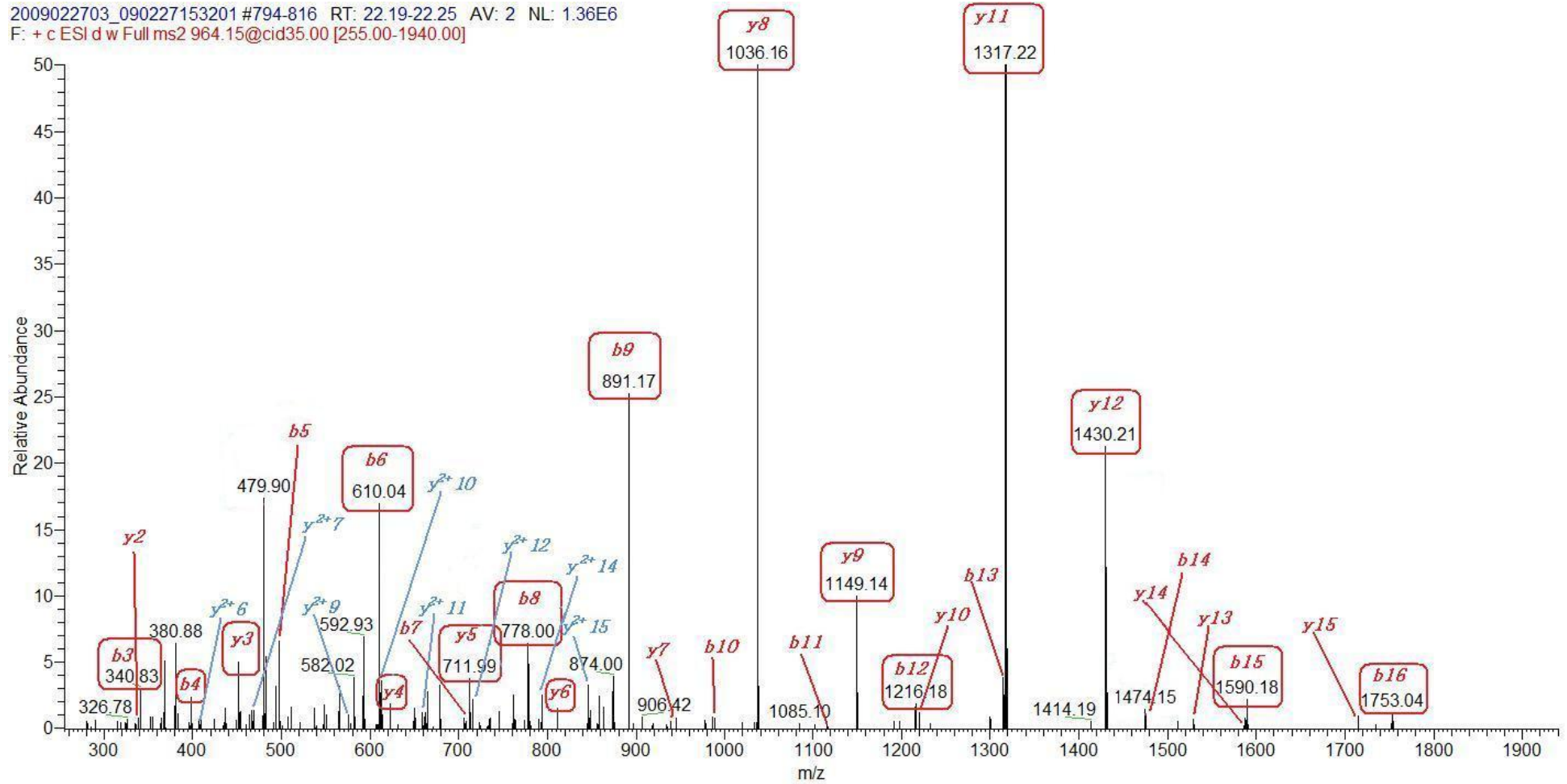
2009022703_090227153201 #798-813 RT: 22.10-22.48 AV: 8 NL: 1.12E7
+ c ESI Full ms [350.00-2000.00]



Figur 11 MS-spektrum for høyest signaltopp i Figur 10 (rektangel viser området). m/z uttrekk fra 22,1-22,5. m/z tilhørende peptidet T5 både en, to og tre ganger ladet er markert i figuren.

X-aksen angir m/z-verdi for detekterte peptider. Y-aksen angir relativ deteksjonsintensitet i forhold til høyest detekterte peptid (100 % for m/z=964,12).

2009022703_090227153201#794-816 RT: 22.19-22.25 AV: 2 NL: 1.36E6
F: + c ESI d w Full ms2 964.15@cid35.00 [255.00-1940.00]



Figur 12 MS/MS-spektrum av høyest detektert m/z ($m/z=964,1$ fra Figur 11) tilhørende høyeste topp i MS-kromatogrammet vist i Figur 10 (22,1-22,5 min). Overensstemmende m/z fra in silico-fragmentering av T5 med detekterte verdier er markert i MS/MS-spektrumet.

Y-aksen angir deteksjonsintensitet i forhold til høyest detekterte fragment ($m/z=1317,22$, intensitet=100 %) og er zoomet inn. X-aksen angir m/z-verdi for fragmentene.

Tabell 18 Oversikt over sammenfallende teoretiske og observerte b- og y-ioner for tryptiske peptider fra hCG-isoformer. ID, utover tilhørende del av hCG, er gitt når peptidsekvensen er vurdert videre. n "missed cleavages" angir antall steder trypsineringen er mislykket ved for å gi peptidet. Peptider med inntil 2 områder med ufullstendig klipp er studert.

Detektert peptid: Et peptid anses som detektert når det skiller seg ut som en topp fra støyen og får et kryss når det er over 4 % signal fra høyeste forekommende peptid.

Detektert fragment uten parentes: fragmentets signal er over 4 % av høyeste fragmentsignal tilhørende peptidet og m/z-verdiene for fragmentet er mindre enn 0,5 enheter fra teoretisk verdi.

Detektert fragment med parentes: fragmentets signal er 0,9-4 % av høyeste fragmentsignal tilhørende peptidet og/eller m/z-verdiene for fragmentet er 0,5-1,0 enheter fra teoretisk verdi.

ID	detekterte fragmenter	tid (min)		predikert m/z	målt m/z	start aminosyre	slutt aminosyre	n "missed cleavages"
cfT5	y5, (y4), y3, (b5-b4)	4,4	x x	811,38 406,19 ²⁺	811,1 405,9 og 406,4	55	60	0
T11-12	y16, (y15), y12, y10, (y9-y8), y6, b9-b11, b13, b16-b17	11,2	x x	2130,87 1065,94 ⁺² 710,96 ³⁺	- 1065,9 711,2	96	114	1
α	y5-y3, (y ²⁺ 6), y ²⁺ 5, (b2-4), (b6)	12,6	x x	817,46 409,23 ⁺²	817,2 409,2	36	42	0
α	y7-y4, (y3), (b3), (b6), b7	15	x	838,45 419,7 ²⁺	838,2 -	68	75	0
α	y7-y4, y ²⁺ 15, (y ²⁺ 13), (y ²⁺ 11), y ²⁺ 9-y ²⁺ 8, (y ²⁺ 7), y ²⁺ 6, b4-b5, b7, (b ²⁺ 17), (b ²⁺ 15), b ²⁺ 14, (b ²⁺ 13), b ²⁺ 11, (b ²⁺ 10), b ²⁺ 9-b ²⁺ 7, (b ²⁺ 6)	16,9	x x	2186,05 1093,53 ⁺² 729,35 ³⁺	- 1094,1 730,3	45	63	2
T7-8	y9, y8-y2, y ²⁺ 8-y ²⁺ 11, (y ²⁺ 7), y ²⁺ 5, b2-b6, (b7), b8-b10, b ²⁺ 5-b ²⁺ 6, b ²⁺ 8	17,6	x x	1332,67 666,84 ⁺²	1332,2 666,9	64	74	1
nT5(48-60)	(y11), y10, (y9), y8, (y7-y6), y5-y4, (y3-y2), (y ²⁺ 12), y ²⁺ 11, y ²⁺ 9-y ²⁺ 8, (y ²⁺ 3), (b3), b4-b5, (b6), b8-b9, (b10-b11)	20	x x	1529,81 765,41 ⁺² 510,60 ³⁺	1530,3 756,3 -	48	60	0
nT5(45-60)	y14, (y13), Y12-y8, (y7), y6-y4, (y3-y2), (y ²⁺ 15-y ²⁺ 10), (b3), b4-b5, b7-b8, (b11), (b15), (b ²⁺ 7-b ²⁺ 8), (b ²⁺ 10), (b ²⁺ 15)	21,6	x x	1827,98 914,49 ⁺² 609,99 ³⁺	- 914,3 609,3	45	60	0
T5	(y15-y14), y12-y11, (y10), y9-y8, (y6), y5-y4, (y3-y2), y ²⁺ 15-y ²⁺ 14, (y ²⁺ 12-y ²⁺ 11), y ²⁺ 10, (y ²⁺ 9-y ²⁺ 7), (b3-b4), b5-b6, (b7), b8-b9, (b10), (b12) b13, (b14-b16)	22,3	x	1927,05 964,03 ⁺² 643,02 ³⁺	1926,3 964,1 643	44	60	0
T9	y10-y7, y5-y2, (y ²⁺ 18), (y ²⁺ 13), b2-b3, b9-b13, b16-b18	23,1	x x	2227,02 1114,01 ⁺² 743,00 ³⁺	- 1114,1 743	75	94	0
cfT9	(y15), y13-y4, (b3), b6-b13, (b15-b16)	23,6	x x	1909,9 955,45 ²⁺ 637,30 ³⁺	1909,1 955,4 -	75	92	0

Tabell 18 viser observerte tryptiske peptider fra isoformer med opp til 2 ”missed cleavages”. Peptider med ” missed cleavages” er interessante å identifisere fordi de bekrefter ufullstendig proteolyse av visse områder av hCG. Det kan være med på å forklare hvorfor det ikke er noen tydelige topper fra peptider med null ”missed cleavages” observeres fra disse områdene.

8.1.2 Kontroll av peptiders spesifisitet

Med det mål å få stor bredde i anvendelsesområde av deteksjon ved hjelp av LC-MS settes fokuset på å detektere peptider fra ulike hCG-isoformer. Detekterte tryptiske peptider med ”missed cleavages” følges ikke videre opp (se 8.1). Fra Tabell 18 velges de tryptiske peptidene med null ”missed cleavages” som kan bekrefte følgende isoformer:

hCG β cf

Fra hCG β cf bekreftes de tryptiske peptidene cfT9 og cfT5. Figur 3 viser at cfT9 kan komme fra andre nicked isoformer som mangler β CTP, men slike isoformer har svært kort halveringstid i blod og degraderes raskt til β cf [1]. Resultatet fra BLAST-søk i Tabell 19 viser at ingen andre proteiner enn hCG inneholder aminosyresekvensene til verken cfT5 eller cfT9. Peptidet cfT5 (se Figur 10 ved $t_R \approx 4,4$ min) har en veldig lav forekomst sammenliknet med cfT9 (se Figur 10 ved $t_R \approx 23,6$). Siden peptidene er produkter av den samme isoformen og cfT5 kun kan observeres ved veldig høye konsentrasjoner er kun cfT9 egnet. Videre består cfT5 av kun 6 aminosyrer mens cfT9 har 18 aminosyrer, noe som indikerer at cfT9 antagelig er mer spesifikk for hCG β cf. Vesentlig høyere bit score for cfT9 enn cfT5 vises i Tabell 19 og bekrefter nettopp dette.

hCG α n og hCG β n

Nicking av hCG-isoformer kan forekomme mellom aminosyrene 42-43 [11, 14], 43-44 [23], 44-45 [1, 11, 14], 47-48 [1, 11] og 92-93 [1]. De mest klinisk relevante nicked isoformene (utenom hCG β cf) har brudd mellom aminosyre 44-45 eller 47-48 [1], der nicking mellom 47-48 er forekommer oftere enn mellom 44-45 [2].

Resultat av BLAST-søk i Tabell 19 viser at fullstendig trypsinklipp av disse modifiserte T5 områdene vil resultere i karakteristiske signaturpeptider for disse nicked isoformene. Peptidet nT5(48-60) kommer fra isoformer med brudd av peptidbinding mellom aminosyre

47 og 48. Peptidet nT5(45-60) er et produkt av nicked isoformer, med brudd mellom aminosyre 44 og 45.

hCG og hCG β

T5 og T9 er peptidprodukter av trypsinert hCG β og hCG som dimer. T5 er imidlertid ikke helt spesifikk for disse isoformene. Nicking mellom aminosyre 43 og 44 på β -subenheten forekommer sjelden og i liten grad [2, 11, 23], men nickingen kan allikevel være av klinisk relevans [60, 61]. Nickingen er etter arginin i C-terminal-retning, som gjør at aminosyresekvensene til de tryptiske peptidene nT5(43-44) og T5 vil være identiske. LC-MS vil med det ikke kunne differensiere mellom isoformer med eller uten nicking mellom aminosyre 43-44.

Peptidspesifisitet for T5, T9, nT5(45-60), nT5(48-60), cT5 og cT9

Det utføres protein-BLAST (7.6.2) av utvalgte tryptiske peptidsekvenser fra hCG-isoformer. Tabell 19 viser protein-BLAST for T5, T9, nT5(45-60), nT5(48-60), cT9 og cT9. β -subenhetene til flere glykoprotein hormoner likner hverandre (6.1.1), men det er en rekke aminosyrer som mangler og en rekke aminosyrer som er byttet ut med andre aminosyrer. Strukturen for hCGs β -subenhet er veldig lik hLHs β -subenhet, utenom de 30 aminosyrene ved C-terminalen og de tilhørende sukker-residuene til hCG. hLH β gir høyest dekning av aminosyresekvenser for peptidene fra hCG β .

Her vises sekvensen for β -subenheten til hCG i grått, delt opp etter hver tjuende aminosyre for å lette lesing, med aminosyrene som T5 og T9 består av i fet type og | viser området for nicking som gir nT5(45-60), nT5(48-60) og cT9 (se Tabell 4 side 32 for aminosyreforkortelser):

```
SKEPLRPRCRPINATLAVEK EGCPVCITVNTTICAGYCPT
MTRV|LQG|VLPALPQVVCNYR DVRFESIRLPGCPRGVNPVV
SYAVALSCQCAL|CRRSTTDC GGPKDHPLTCDDPRFQDSSS
SKAPPPSLPSPSRLPGPSDT PILPQ
```

Oversikten ovenfor viser plassering av BLAST-bekreftede spesifikke tryptiske peptider. Det faktum at de kan detekteres av LC-MS-analyse etter proteolyse og har vist seg spesifikke for hCG-isoformer bekrefter dem som signaturpeptider. Eventuelle hypoglykosylerte former av disse isoformene vil antagelig detekteres, men visse hyperglykosylerte former vil muligens

ikke detekteres. Dette er antagelig avhengig av hvorvidt trypsin kommer til de aktuelle områdene for proteolyse når sukkergruppene er større og mer komplekse [1, 62]. Prosedyren må testes på hyperglykosylerte standarder for å avgjøre om hyperglykosylerte isoformer detekteres.

Toppen fra nT5(45-60) fra klipp av hCG fra Pregnyl® er lav og det inkluderes derfor i varierende grad i detekterte signaturpeptider. Alle signaturpeptider regnes med andre ord som detekter selv om nT5(45-60) ikke detekteres.

Tabell 19 Resultatet av BLAST-søk på valgte peptider. Tre proteiner for hCG kommer opp i alle BLAST-søk, med identiske E-verdier og aminosyredekning. Disse hCG-proteinene er ulike forløpere og er her samlet under betegnelsen phCGβ. E-value er sannsynlighetsverdien for at sekvensen kan forekomme i proteinet ved tilfeldighet. Bit score er en spesifisitetsverdi der en høy verdi indikerer høy spesifisitet for sekvensen. Aminosyredekningen angir hvor mange av aminosyrene i proteinet som korrelerer med peptidsekvensen. Protein, E-verdi og aminosyredekning er skrevet i kursiv for de nest beste forslagene for aminosyredekning etter forslag hvor aminosyresekvenser har full overlapp.

ID	Aminosyre-sekvens	peptidsekvens	protein	Bit score	E-verdi	Aminosyre-dekning
T5	44-60	(R)VLQGVLPALPQVVCNYR(D)	phCGβ	57,9	4,0*10 ⁻¹⁰	17/17
			hLHβ	46,9	9,0*10 ⁻⁰⁷	14/17
T9	75-94	(R)GVNPVVSYAVALSCQCALCR(R)	phCGβ	66,8	9,0*10 ⁻¹³	20/20
			hLHβ	43,9	7,0*10 ⁻⁶	14/20
nT5	45-60	(-)LQGVLPALPQVVCNYR(D)	phCGβ	54,9	3,0*10 ⁻⁰⁹	16/16
			hLHβ	43,9	7,0*10 ⁻⁰⁶	13/16
nT5	48-60	(-)VLPALPQVVCNYR(D)	phCGβ	46,0	2,0*10 ⁻⁰⁶	13/13
			hLHβ	38,4	3,0*10 ⁻⁰⁴	11/13
cfT9	75-92	(R)GVNPVVSYAVALSCQCAL(-)	phCGβ	59,2	2,0*10 ⁻¹⁰	18/18
			hLHβ	40,1	1,0*10 ⁻⁰⁴	16/18
cfT5	55-60	(-)VVCNYR(D)	phCGβ	24,4	3,1	6/6
			Zn finger-protein 280D	21,4	24	5/5
			hLHβ	20,5	58	5/6

8.2 PRØVEOPPARBEIDELSE

Under prøvebearbeidelse brukes det ikke-flyktige salter og reagenser som det fortrinnsvis skal renses for før LS-MS-analyse. SPE ble valgt som prøveopparbeidelsesmetode for å fjerne slike stoffer.

8.2.1 Optimalisering av SPE-betingelser

Forbindelser i prøveløsninger som kan interferere med analysen skal ideelt sett vaskes av sorbenten med vaskeløsningen eller bli igjen på sorbenten etter eluering. To typer SPE-tips ble laget ved å fylle dem med enten C8- eller C18-materiale. For de to SPE-typer ble ulike konsentrasjoner av MeCN i ionebyttet vann og 0,1 % TFA-løsning benyttet for å teste ulike løsemiddelstyrker for vaskeløsning og elueringsløsning. For hver elueringskonsentrasjon MeCN testet ble en ny SPE-tip brukt. Hver elueringskonsentrasjon har minst to replikater. Utbyttet for hvert peptid beregnes som andelen av gjennomsnittet av minst fire direkteinjeksjoner (7.4.1).

SPE-prosedyre beskrives under 7.4.1. Følgende løsninger ble brukt:

Vaskeløsning: 20 mM FA

Prøveløsning: hCG-stamløsning klippet i 100 mM ABC-buffer ved hCG-konsentrasjon 50-500 IE/mL

Elueringsløsning ved test av vaskekonsentrasjon: ulike konsentrasjoner av MeCN i ionebyttet vann (C8: 15 %, 20 %, 25 %, 40 % og 50 % og C18: 15 %, 25 %, 50 % og 60 %)

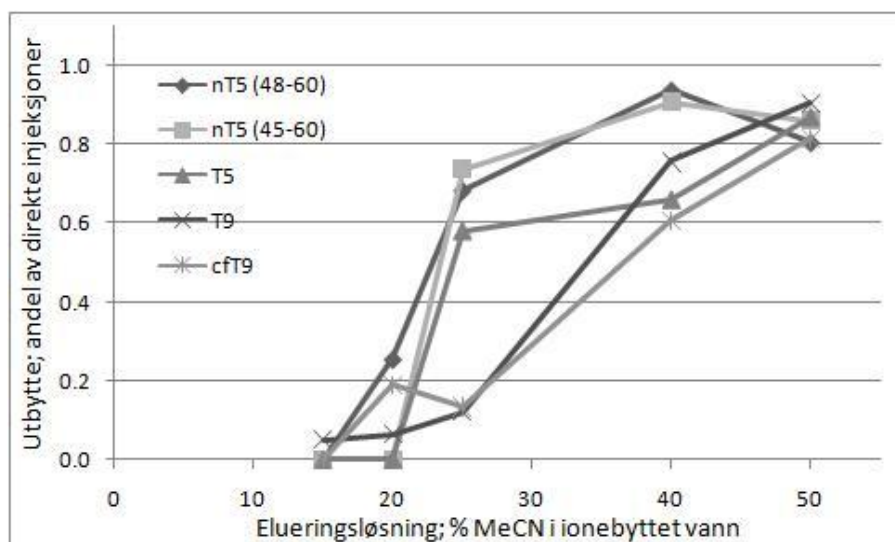
Elueringsløsning ved test av elueringskonsentrasjon: ulike konsentrasjoner av MeCN i 0,1 % TFA-løsning (C8: 50 %, 60 %, 70 %, 80 % og 90 %)

Test av vaskeløsning

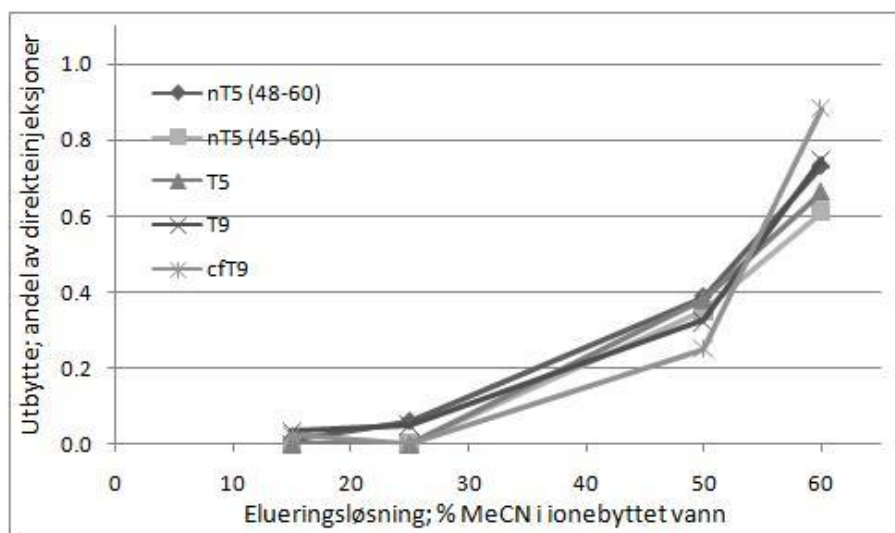
For å teste hvilken løsemiddelstyrke vaskeløsningen kan ha uten å eluere av signaturpeptidene brukes ulike konsentrasjoner av elueringsløsninger bestående av MeCN blandet med ionebyttet vann. Etter prøvopåsetning vaskes sorbenten med 1*50 µL FA før løsningene med lav løsemiddelstyrke simulerer eluering. For hver vaskeløsning ble det utført minst 3 paralleller.

Kommentarer til resultatene illustrert i Figur 13 og Figur 14:

- Figur 13 viser SPE med C8-materiale og ulike elueringskonsentrasjoner av MeCN. Gjennombrudd av peptider ser ut til å begynne ved konsentrasjon på rundt 20 % MeCN for de fleste peptidene. For enkelte av de hydrofobe forbindelsene ble det registrert utbytte ved lavere konsentrasjoner, som sannsynligvis skyldes carry-over effekt (se 8.5.2 for beskrivelse av problemet). C8-materialet kan i så fall vaskes med opp til 15 % MeCN. Det kan se ut som mest hydrofile peptidene elueres av i større grad ved 25 % MeCN enn de andre, mens elueringsandelen av alle peptidene er omtrent lik ved og etter 40 % MeCN. For å få eluert av peptidene må konsentrasjon over 40 % MeCN benyttes.
- Figur 14 viser SPE med C18-materiale og ulike elueringskonsentrasjoner av MeCN. Gjennombrudd av peptider ser her ut til å begynne ved 25 % MeCN. Vaskeløsninger med konsentrasjon på opptil 25 % kan benyttes for C18-materialet. Elueringsløsningen må ha en konsentrasjon på minst 50 % for å eluere av peptidene.
- Forsøkene tilsier at C18 kolonnen krever høyere løsemiddelstyrke enn C8 for å eluere av peptidene. Det er som forventet; høyere andel organisk fase kreves for å bryte de hydrofobe interaksjonene når sorbenten er mer hydrofob. Det ser ut til at konsentrasjonen på vaskeløsningen kan være på om lag 15 % for C8-sorbenten og opp til 25 % for C18-sorbenten.



Figur 13 SPE-utbytte ved C18-materiale. Gjennomsnittet av utbytteandel ($n \geq 3$) ved eluering med løsninger med ulik løsemiddelstyrke (15 %, 20 %, 25 %, 40 % og 50 % MeCN i ionebyttet vann).



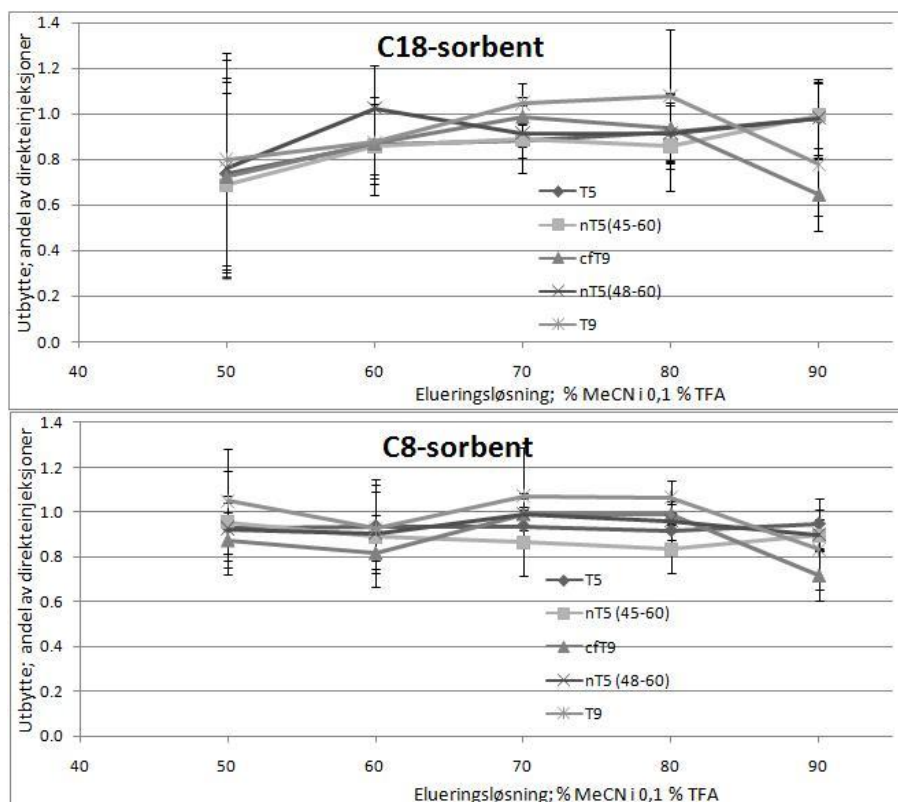
Figur 14 SPE-utbytte ved C18-materiale. Gjennomsnittet av utbytteandel ($n \geq 2$) ved eluering med løsninger med ulik løsemiddelstyrke (15 %, 25 %, 50 % og 60 % MeCN i ionebyttet vann).

Test av elueringsløsning

Forsøk på å få reproducerbart utbytte ved å eluere med høye konsentrasjoner av MeCN i ionebyttet vann mislyktes (ikke vist her). Derfor gjennomføres en test for i hvilken grad ulike konsentrasjoner av MeCN i 0,1 % TFA-løsning vil eluere av de valgte signaturpeptidene. Test av vaskeløsning indikerte at konsentrasjonen bør være over 40 % MeCN for å eluere av disse peptidene. Testen gjennomføres med samme prosedyre som ovenfor, men med andre elueringsløsninger.

Kommentarer til resultatene fremstilt grafisk i Figur 15:

- Grafene viser at SPE-utbyttet for T9 og cfT9 ble lavere ved den sterkeste elueringsløsningen på 90 % MeCN for både C8- og C18-materialet.
- Standardavviket vist over og under gjennomsnittet for SPE-utbytte for begge sorbentene er høyere ved elueringsløsninger på 50 % MeCN enn for de høyere konsentrasjonene. Ved 50 % MeCN har C18-materialet klart større standardavvik enn C8-materiale: Det kan komme av at kombinasjonen av løsemiddelstyrke og volum er nær grensen til å være tilstrekkelig høyt. For SPE-tips med både C8- og C18-materiale vil elueringsløsning med MeCN i konsentrasjonsområde 60-80 % gi høyt og konstant utbytte.



Figur 15 SPE-utbytte ved C18- (øverste graf) og C8-materiale (nederste graf). Gjennomsnittlig utbytteandel ($5 \leq n \leq 12$) ved eluering med løsninger med ulike løsemiddelstyrke (50 %, 60 %, 70 %, 80 % og 90 % MeCN i 0,1 % TFA). Errorbarene angir standardavvikene for utbytteandelen for hver konsentrasjon.

Valg av sorbent, vaskeløsning og elueringsløsning

Både C8 og C18-materialet later til å være egnet for opprensning av signaturpeptider, men C8-materiale viste tendens til lavere standardavvik for flere elueringskonsentrasjoner enn C18, og ble derfor valgt til videre bruk. Ved rensing av komplekse biologiske løsninger kan elueringskonsentrasjon på 70 % MeCN gi mindre hydrofobe forurensinger enn 80 % MeCN. Istedenfor å gå for løsningen med lavere løsemiddelstyrke velges elueringsløsning med 80 % MeCN med mulighet for mindre elueringsvolum enn 2*50 μ L.

MFA blir brukt som vaskeløsning i prosedyren, men en grundigere opprensning vil antagelig bli gjort ved å kombinere vask med 15 % MeCN og MFA i trinn 4 under 7.4.1. Etter prøvopåsetning kan først 1*50 μ L 15 % MeCN appliseres og trekkes gjennom og deretter kan 1*50 μ L MFA trekkes gjennom sorbenten. 15 % MeCN har høyere løsemiddelstyrke enn MFA og kan vaske ut fler hydrofobe forurensinger, mens MFA er sur løsning som kan vaske ut basiske forurensinger holdt tilbake av interaksjoner med restsilanol. Ved slik vask kan det være at mer forurensinger vaskes av kolonnen enn ved bruk av MFA eller 15 % MeCN alene.

8.2.2 Testing av valgt SPE prosedyre

Resultatene fra 8.2.1 gir grunnlag for valg av løsninger og solvent for SPE. SPE-materiale, vaskeløsning og elueringsløsning som ble brukt videre ble testet i et nytt forsøk for å 1) teste hvor stort elueringsvolum som må til for å eluere av signaturpeptidene av sorbenten og 2) teste for gjennombrudd av disse tryptiske peptidene før eluering.

Test av peptidgjennombrudd i SPE-fraksjoner

Til forsøket brukes:

SPE-materiale: C8

Vaskeløsning: MFA

Prøveløsning: 2*50 µL hCG-stamløsning klippet i 100 mM ABC-løsning (med hCG-konsentrasjon på 50 IE/mL før tilsetning av trypsin)

Elueringsløsning: 3*50 µL 80 % MeCN i 0,1 % TFA

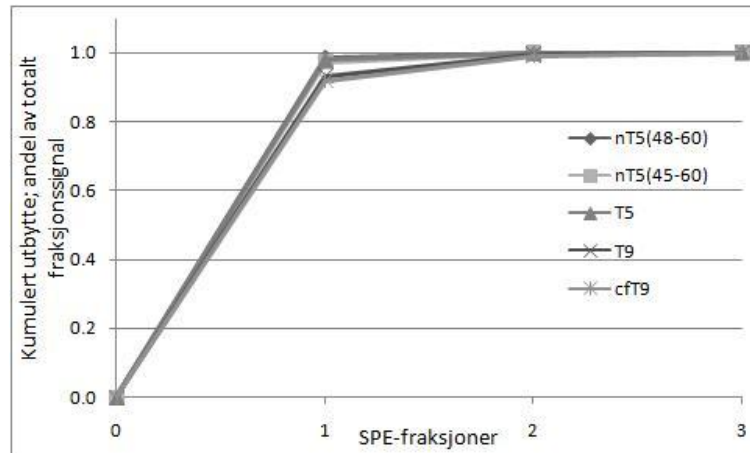
SPE-prosedyren avviker noe fra 7.4.1 på følgende områder: i.) Væskefraksjon fra prøveløsning og påfølgende vask ble samlet opp i et LoBind-eppendorfrør og ii.) hver elueringsfraksjon (å 50 µL) samles opp i et eget LoBind-eppendorfrør. Alle løsningene fra i.) og ii.) ble dampet til tørrhet, reløst i MFA og analysert for signaturpeptider. Dette forsøket ble gjennomført med 2 paralleller.

Gjennomsnittlig topphøyde ble beregnet for hvert signaturpeptid fra hver væskefraksjon og kumulert signal listet opp. Det kumulerte utbyttet som andel av totalt utbytte fremstilles grafisk i Figur 16. Analyse av fraksjonen med prøveløsningen og vaskeløsningen karakteriseres som 0 langs x-aksen. Analyse av første elueringsfraksjon betegnes som 1 langs x-aksene i grafene, andre elueringsfraksjon betegnes som 2, osv.

Resultatet er fremstilt grafisk i Figur 16:

- Grafen viser at det ikke er gjennombrudd av signaturpeptider ved prøvopåsetning og at vask med MFA ikke bryter interaksjonene mellom sorbent og peptider. Disse resultatene er i tråd med resultater fra forsøk beskrevet under 8.2.1, der vaskeløsningen er MeCN i ionebyttet vann og ikke MeCN i 20 mM FA (MFA).
- Figur 16 viser at det er nær full recovery for alle signaturpeptidene ved første elueringsfraksjon. Det er mest å vinne i recovery for cT9 og T9 ved å eluere med 100 µL fremfor 50 µL. Forsøket tilsier at det kan være tilstrekkelig å eluere med 50

μL da det er svært lav økning i recovery ved høyere elueringsvolum, med mindre det ansees viktig å tilstrebe fullt utbytte av hver av peptidene (se APPENDIKS 1 for tallene bak Figur 16). Alternativt kan elueringsvolumet settes til $60 \mu\text{L}$ for å sikre et stabilt utbytte og muligheter for høyere utbytte for cFT9, som er et produkt fra en klinisk relevant og en hyppig forekommende isoform i urin.



Figur 16 SPE-utbytte (andel av direkteinjeksjoner) av signaturpeptider ved ulike fraksjoner. Hver SPE-tip påsettes $100 \mu\text{L}$ hCG-stamløsning klippet i ABC-klipp ($C=50 \text{ IE/mL}$). Fraksjoner ble samlet separat, dampet til tørrhet, reløst i MFA og analysert av LC-MS. X-aksen betegner ulike SPE-fraksjoner: 0 er fra løsningen fra prøvepåsetning og vask, 1 er fra første $50 \mu\text{L}$ elueringsløsning, 2 er fra andre $50 \mu\text{L}$ elueringsløsning og 3 er fra tredje og siste $50 \mu\text{L}$ elueringsløsning.

SPE på urinprøver

Urin inneholder karbohydrat- og aminosyreprodukter, samt mer salter enn løsningene SPE er blitt testet for. Det er slike forurensninger som gjør opprensning av biologiske prøver meget viktig. Innholdsstoffer i urin kan også tenkes å påvirke SPE-forhold. Under 8.3.2 testes SPE for påvirkning av utbytte ved tilsetning av denatureringsagens etter proteolyse av hCG, med konklusjonen at SPE-utbyttet ikke påvirkes av disse stoffene. Et liknende SPE-forsøk kan utføres for med urin, der fortynningsrekker av ferdigklippet hCG tilsettes a) trypsinerte blanke urinprøver og b) 100 mM ABC-buffer, slik at SPE-utbyttet for a) og b) kan sammenliknes. I denne oppgaven blir MFA brukt som vaskeløsning, men under 8.2.1 er vask med $1 \times 50 \mu\text{L}$ 15% MeCN i ionebyttet vann etterfulgt av $1 \times 50 \mu\text{L}$ MFA foreslått for å få et renere eluat.

8.3 OPTIMALISERING AV PROTEOLYSEFORHOLD

Del 8.1 viser at LC-MS-analyse detekterte signaturpeptider for ulike isoformer av hCG fra preparatet Pregnyl[®]. For å kunne sammenlikne prøveopparbeidelsesteknikker og effekt av å modifisere forhold under proteolyse-prosedyrer er det viktig å sikre reproduserbarhet og like eller tilpassede optimale forhold for testene.

8.3.1 Proteolyse over tid *in-solution*

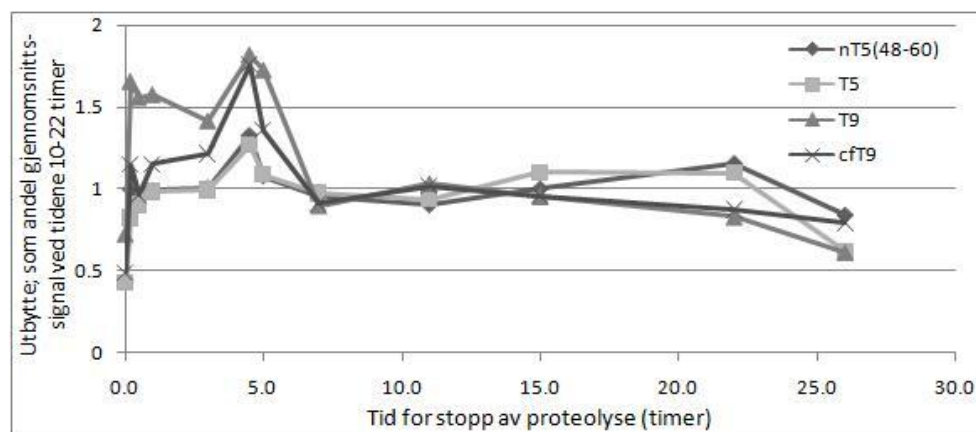
Ved tilsetning av trypsin til en løsning med hCG-isoformer er det rimelig å anta at dannelsen av disse produktene vil øke over tid, ettersom mer og mer proteiner blir klippet opp og mengde uklippet protein minker. For å få høye nivåer av tryptiske hCG-produkter og reproduserbar generering av peptider er det viktig å analysere løsningen når endepunktet for proteolysen er nådd.

For å følge produktannelsen over tid ble prøver tatt ut ved bestemte tidsintervaller.

Prosedyren beskrevet under 7.3.1 benyttes, hCG-stamløsning ble tilsatt slik at konsentrasjon i løsningen før klipping var på 50-500 IE/mL hCG. Løsningen ble klippet i 100 mM ABC-buffer og 20 µL prøveløsning ble direkte injisert for analyse på LC-MS (7.5). Fra hver prøve beregnes utbyttet av hvert signaturpeptid ved de ulike uttakstidene (1,5, 12, 30 og 60 minutter, og 3, 4,5, 5, 7, 11, 15, 22 og 26 timer) som andel av gjennomsnittlig topphøydesignal fra de respektive peptidene i området 11-22 timer. Intensitet ved 11-22 timer blir på denne måten brukt som referanse for utbyttet av peptidene. Hver måling har fra 2 til 4 paralleller. Kommentarer til Figur 17 som sammenfatter resultatene:

- Figur 17 viser en topp av peptiddannelse ved klippetid på 5 timer for alle peptider. En årsak til nedgang i signal over tid kan være degraderingsreaksjoner av de tryptiske peptidene, som oksidering, hydrolyse eller deamidering. Potensielle forurensningsprodukter av andre enzymer enn trypsin kan videre bryte ned trypsinerte peptider og slik gi minkende utbytte. Et annet scenario kan være at ionesuppresjon er årsak til lavere detektert signal over tid. Analyse av fortynnede prøver avkreftet derimot denne hypotesen.
- Det er optimalt med et høyt peptidutbytte som holder seg jevnt innen et håndterlig tidsrom. Optimal inkuberingstid bør med andre ord spenne et område der utbyttet er relativt høyt og konstant. Figur 17 viser liten variasjon av målte signaturpeptidene mellom 7 timer og 22 timer. Peptidutbyttet er høyest ved tid ≤ 5 timer, men

variasjonene i utbytte er stort. Det relative utbyttet av cfT9 spenner fra 150 % til 370 % ved måling av fire ulike proteolyser ved 5 timer. For å tilfredsstille vilkårene om både høyt og konstant utbytte settes inkubering 10-20 timer ved proteolyse *in-solution*.



Figur 17 *In-solution-proteolyse over tid. Trypsin inaktiveres ved at løsningen avkjøles (2-8 °C) for så å direkte injiseres for LC-MS-analyse. Grafen viser gjennomsnittlig peptidutbytte ($n \geq 2$) som andel av referansesignal ved ulike uttakstider, med linjer dratt fra et punkt til det neste.*

8.3.2 Effekt av denatureringsagens

Alle hCG-isoformer krever denaturering for at detekterbare tryptiske peptider skal genereres ved proteolyse og at trypsin skal komme til for å kløve peptidbindinger (som beskrevet under 6.5.1 og 6.4.3). I de innledende forsøkene stod varme og reduserende og alkylerende agens for denatureringen av hCG-isoformene. Nå testes effekten av å legge til en ytterligere substans, et denatureringsagens, i *in-solution* proteolysen.

Det er strengt nødvendig med opprensning av løsninger med denaturant før LC-MS-analyse. SPE, med prosedyre beskrevet under 7.4.1, er valgt til dette. Klipp ved tilsetning av denatureringsagens ble sammenliknet med klipp uten tilsetning av denatureringsagens. En eventuell påvirkning av utbyttet ønskes å kunne tilskrives effekt av denatureringsagenser. Siden salter og reagenser kan påvirke SPE-forhold, ble det først testet for påvirkning av denatureringsagenser på SPE-utbyttet.

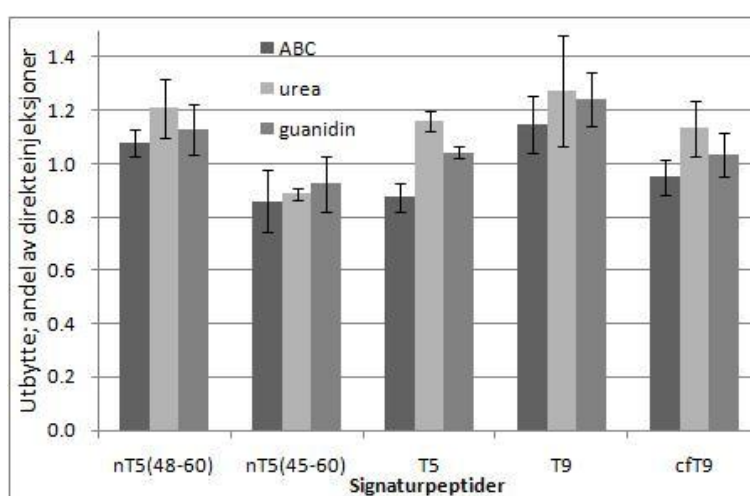
Effekt av denatureringsagens på SPE-utbytte

Prosedyren for *in-solution* prosedyre, beskrevet under 7.3.1 (uten b.)-steg) ble utført for å gi sluttkonsentrasjon på 100 IE/mL hCG før tilsetning av trypsin og proteolyse. Tre like volum fra denne klippede løsningen ble overført til LoBind eppendorfrør. Like volum av

guanidinløsning, urealøsning eller 100 mM ABC-buffer ble tilsatt hvert sitt LoBind eppendorfrør slik at konsentrasjoner av tryptiske produkter var lik. Den ene løsningen hadde en konsentrasjon av 2 M urea, den andre 1 M guanidin og den siste ble fortynnet med ABC-bufferen. Det ble laget tre eller fire replikater for hver av de tre løsningene. SPE ble gjennomført og utbytte beregnet som beskrevet i 7.4.1.

Figur 18 viser gjennomsnittlig utbytte av peptidene for hver av løsningene. Kommentarer:

- SPE-utbyttet av peptidene er om lag like stort, om ikke større for løsningene med denatureringsagens. De testede denatureringsagens har altså ikke negativ effekt på SPE-utbytte ved disse konsentrasjonene.



Figur 18 SPE-utbytte for løsninger klippet i ABC-buffer og deretter tilsatt henholdsvis ABC-buffer, urealøsning eller guanidinløsning. X-aksen viser identiteten til det tryptiske peptidet. Y-aksen angir utbyttet som andel av direkteinjeksjon av løsningen spiket med ABC-buffer. Errorbarene viser standardavvik for hvert signaturpeptid i hver løsning.

Effekt av denatureringsagens på proteolyseutbytte ved denaturering ved 90 °C

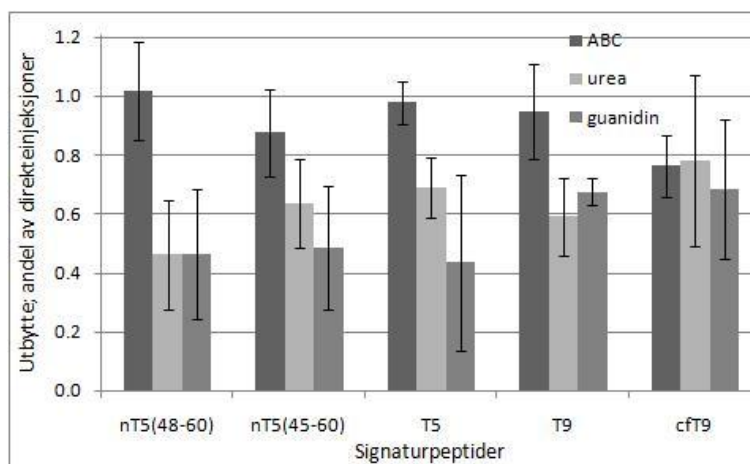
Denatureringsagensene ble tilsatt før denatureringsprosessen for å teste om tilstedeværelsen påvirker proteolyseutbyttet for signaturpeptidene. Dersom tilsetning av denatureringsagens øker utbyttet av noen av de tryptiske peptidene vil det gi analysemetoden økt sensitivitet.

SPE-prosedyren beskrevet under 7.4.1 ble utført der b.)-stegene denne gangen også gjennomført. Urea- og guanidinløsning ble tilsatt hver sine løsninger for å gi konsentrasjon av urea på over 8 M og konsentrasjon av guanidin på over 6 M før redusering og alkylering. b.)-steg ble utført med tilsetning av samme volum 100 mM ABC-buffer istedenfor denatureringsagens for å ha en referanseklipp. Før trypsin ble tilsatt, ble de tre løsningene fortynnet med likt volum 100 mM ABC-buffer slik at konsentrasjonen av urea ble under 2 M og konsentrasjonen av guanidin under 1 M. Det ble laget 6 slike replikater. SPE ble utført

som i eksperimentet og utbyttet for hvert signaturpeptid beregnet som andel av minst fire direkte injeksjoner av referanseklippen i ABC-buffer.

Samlede resultater illustreres i Figur 19. Kommentarer:

- Signalintensiteten fra signaturpeptidene er klart høyest fra løsningen kun tilsatt ABC-buffer. Dette viser at denatureringsagensene gav ingen eller negativ effekt på utbytte av signaturpeptidene. Det tenkes å komme av at denatureringsagens inducerer reaksjoner som modifierer aminosyrer (6.6.1) eller at denatureringsagens hemmer aktiviteten til trypsin.



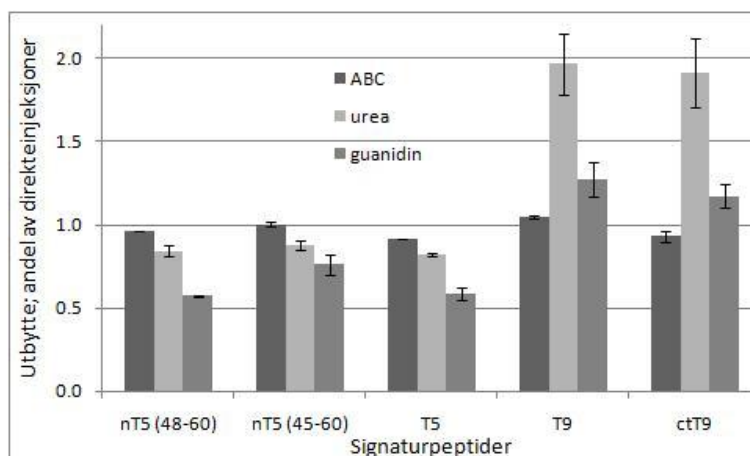
Figur 19 Effekt av denatureringsagenser på utbytte ved 90 °C. Hver kolonne representerer SPE-utbyttet for et signaturpeptid med tilsetning av ABC-buffer (ABC), urea eller guanidin før denaturering. Errorbarene viser standardavvikene for peptidene i de ulike denatureringsløsningene ($n \geq 6$).

Effekt av denatureringsagens på proteolyseutbytte ved denaturering ved 60 °C

Urea kan gi adverse reaksjoner ved for høy temperatur (nevnt under 6.6). Derfor utføres denatureringsforsøket også ved denatureringstemperatur på 60 °C, med to paralleller. Figur 20 viser gjennomsnittsutbytte beregnet som andel av direkteinjeksjon av løsningen fortynnet med ABC-buffer.

Kommentarer til Figur 20:

- Figuren viser høyere signal fra cfT9 og T9 i løsningen tilsatt urea enn i ABC-referansen. Det kan komme av økt utbytte ved tilsetning av denatureringsagens og/eller redusert utbytte referanseklipp på grunn av redusert temperatur (fra 90 °C til 60 °C) for denaturering. Tester av ulik temperatur ved denaturering følges opp for *in-solution* proteolyse i urin under 8.4.2.



Figur 20 Effekt av denatureringsagenser på utbytte ved 60 °C. Hver kolonne representerer SPE-utbyttet for et signaturpeptid med tilsetning av ABC-buffer (ABC), urea eller guanidin før denaturering. Enden av errorbarene viser målt signalintensitet for peptidene i de ulike denatureringsløsningene (n=2).

Konklusjon om bruk av denatureringsagens

Resultater i 8.4.2 viser at utbyttet ved denaturering ved 60 °C fremfor 90 °C i ABC-buffer gir lavere utbytte av peptidene. Forsøk på å reproducere resultatene ved denatureringstemperatur på 60 °C fikk svært varierende resultater. Variasjonene kan komme av at utbyttet ble sammenliknet med parallellkonsentrasjoner klippet i ABC-buffer ved 60 °C som ikke er optimal og muligens ikke reproducerbar denatureringstemperatur. Istedenfor å teste ut dette ble ressurser brukt på å teste om hCG fra Pregnyl[®] lot seg detektere i urin.

8.4 URINPRØVER

Signaturpeptider fra hCG og dets isoformer ble identifisert ved å gjennomføre to ulike prosedyrer for proteolyse i urin. Urinprøver (morgen midtstråleurin) fra friske ikke-gravide personer ble tilsatt hCG fra Pregnyl[®] for å simulere pasientprøver. Både å bruke immunoaffinitet som opprensning før trypsinering (8.4.1) og å klippe urinprøvene direkte uten dette prøveopparbeidelsestrinnet (8.4.2) ble utprøvd. Direkte tryptisk klipp i urinprøven krevde opprensning av urinløsningen før LC-MS-analyse. Til dette ble SPE benyttet. Analyse av urinprøver for gravide ble den endelige testen på om prosedyrene fungerte i praksis.

8.4.1 Protelyse *in-well*

En etablert immunobasert metode for å ekstrahere hCG-isoformer fra plasmaprøver ble forsøkt implementert på urinprøver. Prosedyrene brukt for prøveforberedelse og proteolyse beskrives under 7.4.2 og 7.3.2.

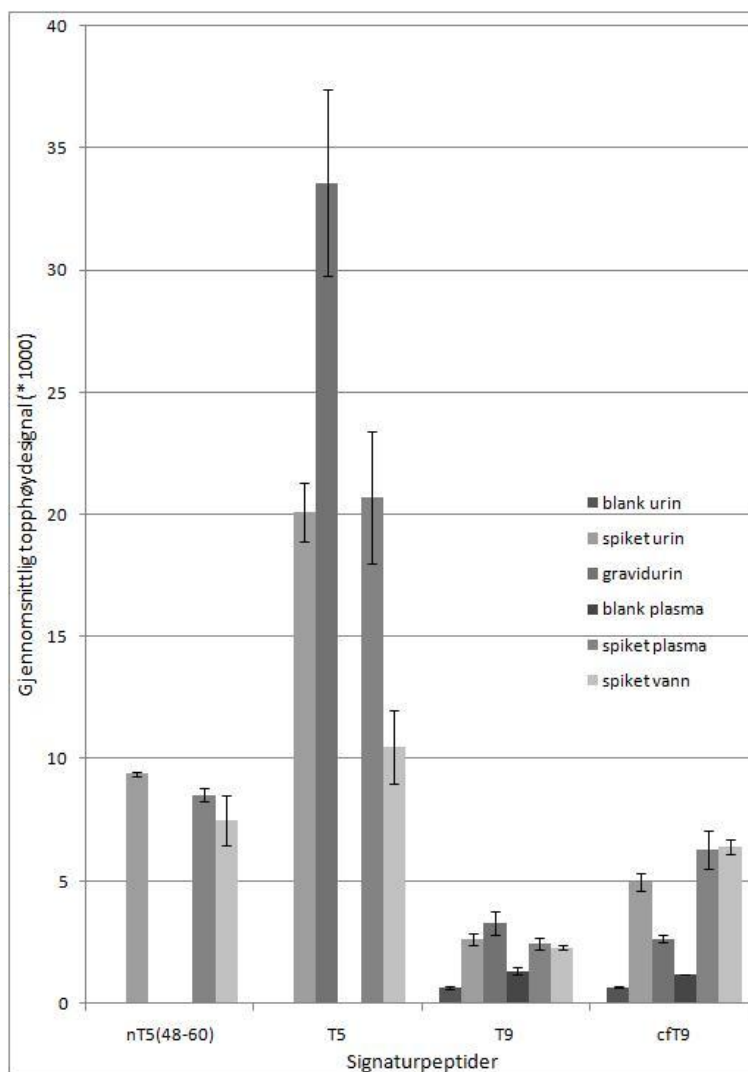
Innledende test

Immunoaffinitetsmetoden ble testet på følgende prøveløsninger: blank urin, urin tilsatt hCG-stamløsning (spiket urin) til en konsentrasjon på 50 IE/mL, urinprøve fra en gravid kvinne, blank plasma, plasma tilsatt hCG-stamløsning (spiket plasma) til en konsentrasjon på 50 IE/mL, samt ionebyttet vann tilsatt hCG-stamløsning til en konsentrasjon på 50 IE/mL. Plasmaprøvene ble tatt med som kontroll på prosedyren. Hver løsning hadde 2 paralleller og hCG-isoformene ble ekstrahert fra løsningene ved prosedyren beskrevet under 7.4.2 og proteolyse ble utført som beskrevet under 7.3.2. Etter inkubering i 3 timer og uten videre opprensning ble 40 µL av de respektive løsningene direkte injisert for LC-MS-analyse.

Høyden på stolpene Figur 21 viser gjennomsnittet av topphøydesignalet fra signaturpeptider, mens høyden på stolpene øverst til høyre i er differansen av de to verdiene for hver matriks.

Kommentarer til Figur 21:

- Figur 21 illustrerer at utbyttet fra ekstraksjon av hCG-isoformer fra urin er omtrent like stort som utbyttet fra plasma. Signalene fra de tryptiske peptidene er ganske like for spiket plasma og spiket urin. I og med at mengden hCG i de spikede prøvene overstiger kapasiteten til brønnene på 0,5 IE hCG avslører ikke testen om immuninteraksjonene er like sterke i plasma og urin.
- Gravidurin har svært høye signaler for T5, men lavere signaler enn de spikede løsningene for de målte nickede variantene og core fragment. Det kan forklares med at isoformene bak T5 fanges opp i større grad når det er mindre konkurransen fra andre isoformer til å oppta antistoffsetene. Det kan heller ikke utelukkes at de ulike isoformene kan ha ulik affinitet for antistoffet, i egenskap av konformasjon og/eller forhold i matriksen.
- Spiket vann har lavt signal for T5 og er dermed uegnet for sammenlikning av utbytte i senere forsøk.
- Blank plasma og blank urin har lave signaler for T9 og cfT9. Det kan skyldes carry-over beskrevet under 8.5.2. For nT5(48-60) og T5 gav de blanke matriksene ingen signaler i analysen av de blanke biologiske prøvene.



Figur 21 Test av affinitetsekstraksjonsprosedyre på urinprøver. Etter *in-well* proteolyse er prøvene direkte injisert (uten SPE) for LC-MS-analyse. Signal fra hvert signaturpeptid målt etter klipp i blank plasma og urin, spiket (tilsatt hCG) plasma, urin og vann og urinprøve fra en gravid kvinne (gravidurin). De spikede matriksene har hCG-konsentrasjon på 50 IE/mL som er over antistoffkapasiteten til brønnene. Enden av errorbarene viser topphøydesignal for peptidene ved de to parallelle ($n=2$).

Proteolyse over tid

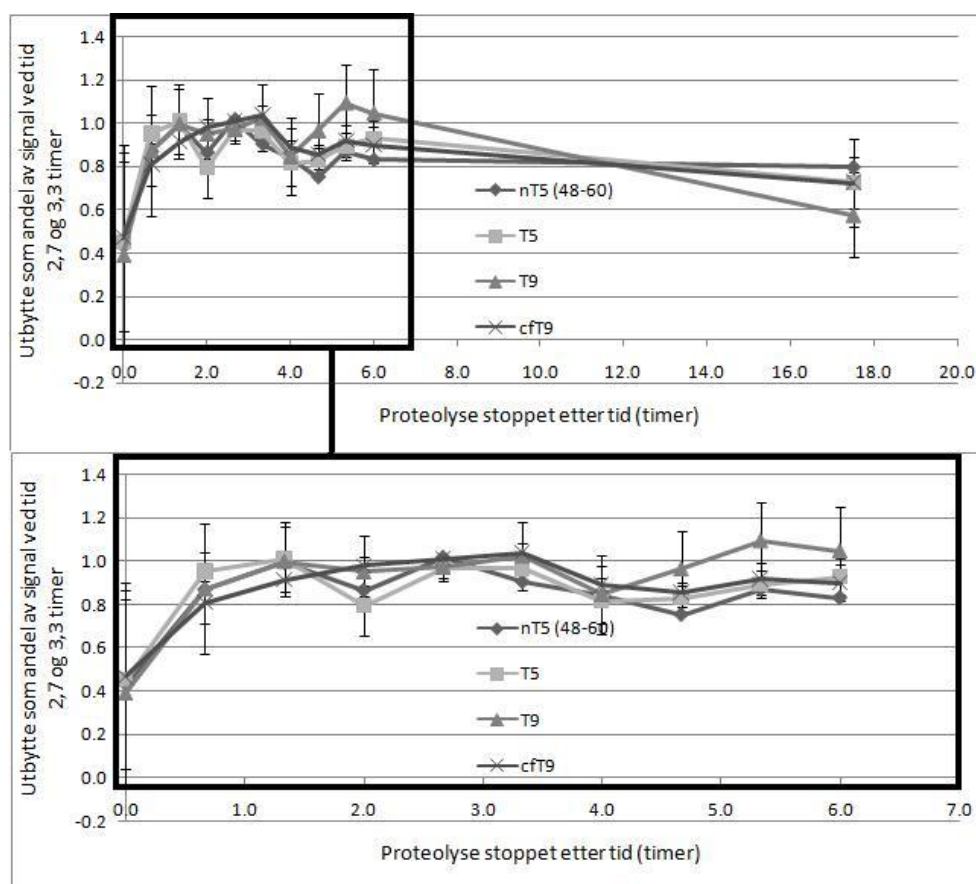
For å finne endepunktet for proteolysen *in-well* og innen hvilket tidsintervall peptidkonsentrasjonen er stabil utføres forsøk der prøver av en tryptisk klipp tas ut i løpet av en inkubasjon (utført *in-solution* i 8.3.1).

Immunoaffinitet av hCG-isoformer fra matriksene vann og 100 mM ABC-buffer (ikke vist i oppgaven) viste seg å være uegnet. Derfor blir optimal klippetid for *in-well* proteolyse gjennomført med kun urin som matriks, med hCG-konsentrasjon urin på 50 IE/mL og prosedyren utført som beskrevet under 7.4.2 og 7.3.2. For å kunne gjennomføre direkte injeksjon av hver prøve settes uttaksintervallene til 40 minutt, da hver kjøring tar 38

minutter, frem til 6 timer og så en siste måling ved 18 timer. Figur 22 viser resultatet av 3 replikater av proteolyse over tid.

Kommentarer:

- Grafene til venstre i Figur 22 viser at peptidsignalene er relativt stabile hvis prøven tas ut mellom 1 og 6 timer.
- Standardavvikene for de tryptiske peptidene er nokså jevne i perioden 1,3 til 6 timer, men for spesielt for T9 øker standardavviket ved og etter 3,3 timer. T9 har vist seg som et mindre egnet signaturpeptid for hCG og hCG β enn T5 (8.1.2), så lite vekt legges på å tilpasse metoden for T9. Kort inkuberingstid er tidsbesparende som derfor settes uttakstiden til 2,5 timer ($\pm 0,5$ time) for *in-well*-proteolyse.
- Som nevnt overstiger mengden hCG i tilsatt prøvevolum kapasiteten til brønnene. Resultatene er dermed avhengig av at mengden antistoff per brønn er lik for stabilt utbytte. Det er ikke testet for hvor reproduserbart mengden antistoff per brønn er, men nøyaktigheten ved tillaging er høy. Like fullt er dette et usikkerhetsmoment, som kan ha gjort at avvikene mellom signalutbytte kan ha økt.



Figur 22 Utbytte av *in-well*-proteolyse over tid. Ved 40 minutters uttaksintervall ($n=3$) beregnes utbyttet som andel topphøydesignalintensitet av valgte referansetider (gjennomsnitt). Grafen under er et uttrekk av grafen overfor der x-aksen kun går til 7 timer. Errorbarene angir standardavvikene for hvert signaturpeptid ved tidene.

Deteksjonsgrense

For at en metode for måling av hCG skal være klinisk relevant må metoden kunne detektere tilstrekkelig lave konsentrasjoner av hCG og dets isoformer. For å undersøke hvor lave konsentrasjoner av hCG-isoformer som kan forventes detektert i pasientprøver ble simulerte pasientprøver med ulike hCG-konsentrasjoner laget. Affinitetsopprensning (7.4.2) etterfulgt av *in-well* proteolyse (7.3.2) og LC-MS-analyse (7.5) ble utført for å gi en indikasjon på om metoden har potensial for klinisk bruk.

Simulerte pasientprøver ble laget ved at blank urin ble tilsatt hCG-stamløsning, som videre ble fortynnet med urin (konsentrasjoner hCG: 5 IE/mL, 0,5 IE/mL og 0,05 IE/mL). Deretter ble immunoaffinitetsopprensning (7.4.2) og *in-well* proteolyse (7.3.2) utført for disse hCG-løsningene og blank urin, før de ble direkte injisert på LC-MS. Hver prøve har to paralleller.

Samlede resultater vises i Figur 23 der grafen angir gjennomsnittet av topphøyden til de identifiserte signaturpeptidene fra urinprøvene med de respektive konsentrasjonene.

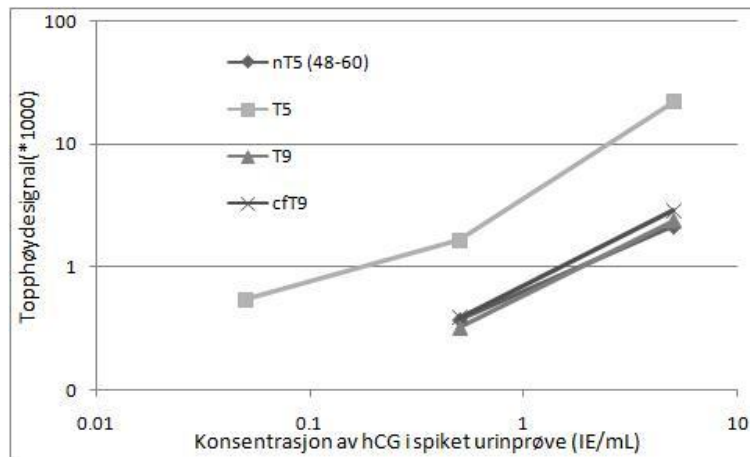
Kommentarer:

- Grafen viser en visuell tilnærmet linearitet. En oppkonsentrering med SPE kan ”løfte” kurven for å gi høyere signal fra signaturpeptidene.
- Støyintensiteten til de andre signaturpeptidene er omtrent lik eller lavere enn for T5, som gjør laveste deteksjonssignalgrense lik eller noe lavere. De laveste signalene ved klipp av prøven på 0,5 IE/mL var i grenseland for om de burde blitt registrert som detektert eller ikke, men inkluderes med forbehold om dette.

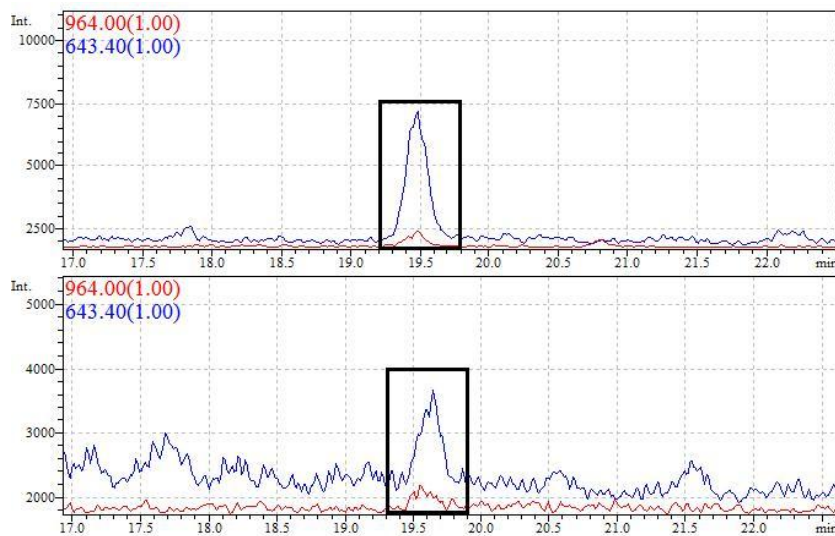
Figur 24 viser utklipp av kromatogram for analyse av urinprøver med hCG-konsentrasjon på 5 IE/mL og 0,5 IE/mL, og MS-kromatogram fra analyse av blank urin vises i

APPENDIKS 4. Kommentarer:

- Støyintensiteten for m/z tilhørende T5 er på om lag 160. Det innebærer at T5 kan detekteres når hCG-konsentrasjoner gir signalintensitet i underkant av 500 ($S/N=3$). Fra urinprøven med hCG-konsentrasjon på 50 mIE/mL er signalintensiteten til T5 i overkant av 500. Dette indikerer at konsentrasjoner av hCG og hCG β på konsentrasjoner ned til 50 mIE/mL kan detekteres hos pasienter. En ytterligere reduksjon av deteksjonsgrense kan forventes ved å inkludere SPE for oppkonsentrering.
- MS-kromatogrammet fra analyse av blank urinprøve viser ingen topper som interfererer med signaturpeptidenes signal og retensjonstid (for verdier se Tabell 14).



Figur 23 Topphøydesignal for immunoprosedyre utført på urinmatriks. hCG tilsatt urin for å gi ulike konsentrasjoner analyseres for signaturpeptider. X-aksen er logaritmisk og angir hCG-konsentrasjonen (IE/mL) i løsningene før prosedyren for proteolyse utføres. Målinger er gjort for løsninger med originalkonsentrasjon på, 5 IE/mL, 0,5 IE/mL og 0,05 IE/mL. Y-aksen er logaritmisk og angir gjennomsnittet (n=2) av topphøydesignal (*1000) fra peptidene lest av MS-kromatogrammet etter analyse.



Figur 24 Utklipp av to MS-kromatogram (in-well-prosedyre). Analyse av simulerte pasientprøver med hCG-konsentrasjon på 5 IE/mL vises i det øverste MS-kromatogrammet og 0,5 IE/mL i det nederste MS-kromatogrammet. X-aksen angir tid i minutter. Y-aksen angir signalintensitet (int).

8.4.2 Proteolyse *in-solution*

Prøveopparbeidelser er gjerne ressurskrevende. Dersom proteolyse direkte i prøveløsningen er like vellykket som ved proteolyse etter immunoaffinitetsekstraksjon åpner det for mulighet for å sløyfe det immunobaserte prøveforberedelsestrinnet. Det er derimot nødvendig med et opprensningstrinn etter proteolyse for å fjerne salter og stoffer som kan forstyrre analysen, som beskrevet under 6.1.3.

pH-test

Trypsin er avhengig av riktig pH (å pH 7-9 [63]) for optimal ytelse. Urin er en biologisk matriks med høy og variabel saltkonsentrasjon som innebærer variabel pH og bufferkapasitet som beskrevet under 6.6. En høy konsentrasjon av ABC-bufferen ble valgt for at løsningene skulle bli fortynnet minst mulig. For å sikre riktig pH under trypsinering ble pH målt i urin og urin tilsatt 500 mM ABC-buffer i forhold som vist i Tabell 20.

Kommentarer:

- Tabell 20 viser at pH er tilstrekkelig høy for trypsin når like store volum urin og 500 mM ABC-buffer blandes. Utprøvende småforsøk viser like fullt at utbyttet av trypsinerte peptider blir høyere når forhold 2:5 ble brukt sammenlinket med når forhold 1:1 ble brukt for urin:buffer. Det kan tenkes å komme av økt bufferkapasitet eller inaktivering stoffer som kan hemme tryptisk klipp. Derfor velges forholdet med høyest bufferandel.

Tabell 20 pH i urin. pH måles i 4 blanke urinløsninger (der pH-intervallet angis) og urinprøver fra gravide 3-, 6- og 9 måneder ut i svangerskapet (gravid 3 mnd, -6 mnd og -9 mnd). 500 mM ABC-buffer tilsettes urinprøvene i volumforholdene vist i tabellen og pH måles på nytt.

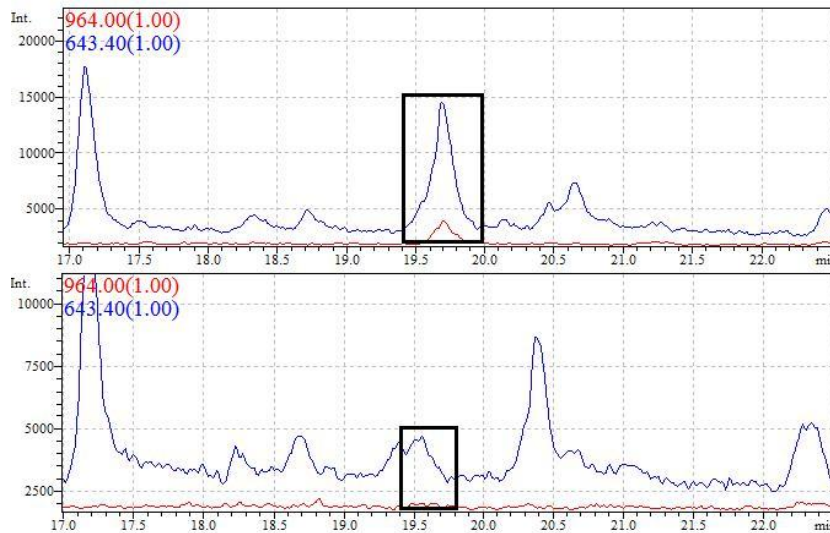
Løsninger	urin	urin:buffer	urin:buffer
Forhold	1	1:1	2:5
frisk blank	6,0-6,5	7,4-7,8	7,6-8,1
gravid 3 mnd	6,3	7,8	8,0
gravid 6 mnd	6,7	7,8	7,9
gravid 9 mnd	6,3	7,5	7,9

Deteksjonsgrense

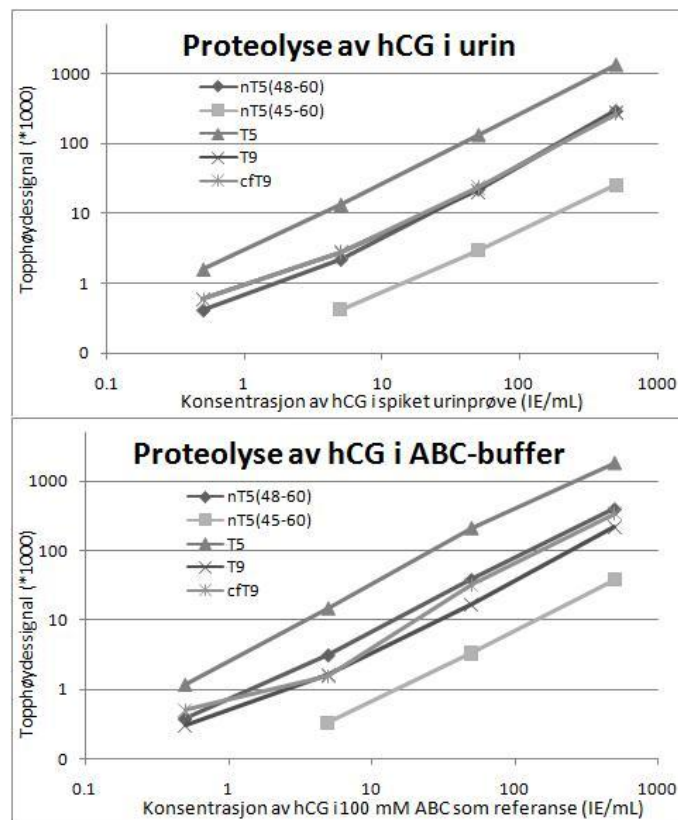
En av faktorene som avgjør om proteolyse *in-solution* (7.3.1) er en like god metode som proteolyse *in-well* (7.3.2) er hvor lave konsentrasjoner av hCG-isoformer i urin metodene kan måle. Simulerte pasientprøver ble laget med hCG-konsentrasjon på 500 IE/mL, 50 IE/mL, 5 IE/mL og 0,5 IE/mL i urin. For sammenlikning ble prøver med samme hCG-konsentrasjoner laget i 100 mM ABC-buffer og behandlet som urinprøver. Prosedyren for proteolyse *in-solution* ble utført som beskrevet under 7.3.1, der 200 μ L prøveløsning i det første trinnet ble tilsatt 500 μ L 500 mM ABC-buffer. Som beskrevet i prosedyren ble lik mengde DTT, IAA og trypsin tilsatt pasientprøver med ulike konsentrasjoner. For hver prøve ble det laget 2 paralleller. SPE-prosedyre som beskrevet under 7.4.1 gav to ganger oppkonsentrering av prøveløsningene.

Kommentarer til resultater illustrert i Figur 25 og Figur 26:

- Støynivået fra signalet m/z 643,4, det høyeste signalet fra det tryptiske peptidet T5, er på om lag 600 i urinprøvene og 250 i ABC-prøvene. Dette indikerer at T5 kan detekteres ved konsentrasjoner som gir topphøyde over henholdsvis 1800 og 750. Utklipp av to MS-kromatogram fra proteolyse av urinmatriks med hCG-konsentrasjon på 5 IE/mL og 0,5 IE/mL vises i Figur 25. Den viser at ved proteolyse av urinmatriks med 0,5 IE/mL hCG er topphøydesignalet fra T5 nesten ikke å skille fra støyen. Høyden til toppen tilhørende T5 er på 1800 som er den beregnede deteksjonsgrensen. Det ser ut som en interfererende topp med samme m/z -signal svært nær toppen tilhørende T5, som kan gjøre at deteksjonsgrensen bør settes noe høyere.
- Topphøyden i Figur 26 er gjennomsnittet av 2 paralleller for hver konsentrasjon i hver matriks. Grafene er visuelt lineære, men et forsøk på å reprodusere lineariteten ved å gjennomføre forsøket på nytt på andre blanke urinprøver mislykkes. Blankprøven ikke var helt fri for signaler fra de hydrofobe peptidene, som kan være carry-over-effekt (8.5.2) eller interfererende topper.



Figur 25 Utklipp av to MS-kromatogram (in-solution-prosedyre). Analyse av simulerte pasientprøver med hCG-konsentrasjon på 5 IE/mL vises i det øverste MS-kromatogrammet og 0,5 IE/mL i det nederste MS-kromatogrammet. X-aksen angir tid i minutter. Y-aksen angir signalintensitet (int).



Figur 26 Topphøydesignal for in-solution prosedyre utført på simulerte pasientprøver og ABC-sammenlikninger. Urin og 100 mM ABC-buffer tilsatt hCG fra Pregnyl® har lik konsentrasjon av hCG og prøvene behandles likt under prosedyren for proteolyse in-solution. Målinger er gjort for løsninger med simulert pasientkonsentrasjon på 500 IE/mL, 50 IE/mL, 5 IE/mL og 0,5 IE/mL vist langs x-aksen. Y-aksen angir gjennomsnittet (n=2) av topphøydesignalene (*1000) lest av MS-kromatogrammet etter analyse.

Ulike urinprøver og ulike denatureringstemperaturer

Urin er, som nevnt under 6.6, en biologisk matriks som kan inneholde svært variable mengder av salter og andre stoffer. *In-solution*-metoden må tåle slike endringer. I denne delen sammenliknes proteolyse *in-solution*-metoden på simulerte pasientprøver i både morgenurin og ettermiddagsurin. I samme forsøk varieres denatureringstemperaturen for å gi en indikasjon på om prosedyrene bør gjennomføres ved 90 °C eller 60 °C. Det ble gjort spesielt med tanke på at urin inneholder urea som ved varme og nøytralt eller basisk miljø (se 6.6) kan gi karbamylreaksjoner med hCG-isoformer.

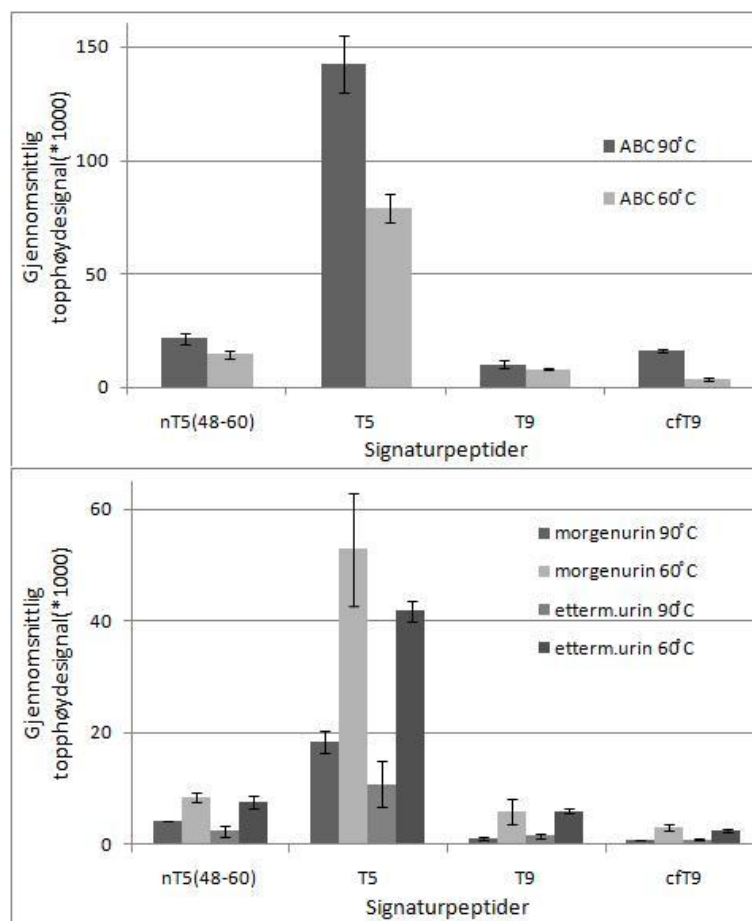
10 µL hCG-stamløsning tilsettes 990 µL av henholdsvis midtstrålemorgenurin, midtstråleettermiddagsurin og vann for å gi løsninger med hCG-konsentrasjon på 50 IE/mL. Prosedyren for *in-solution* proteolyse beskrevet under 7.3.1 ble fulgt, der 200 µL av hver av løsningene ble overført til nye LoBind eppendorfrør og tilsatt 800 µL 500 mM ABC-buffer i første steg. To paralleller ble laget av hver prøve. Deretter ble SPE-prosedyren beskrevet under 7.4.1 utført for alle prøver for opprensning og to ganger oppkonsentrering.

Resultatet vises i Figur 27, der stolpene i de to grafene viser gjennomsnittlig topphøydesignal for de tryptiske peptidene i løsningene, mens ytterpunktene av errorbarene viser de to topphøydesignalene gjennomsnittet er basert på. Kommentarer til Figur 27:

- Morgenurin er vanligvis mer konsentrert enn ettermiddagsurin, som kan tenkes å ha en påvirkning på prøveopparbeidelse- og analyseprosessen. Resultatet representert i grafen viser at usikkerheten i målingene er for stor til å vise noen tydelig signalforskjell for signaturpeptidene etter proteolyse i ettermiddagsurin og morgenurin.
- Avvikene mellom replikatene er i visse tilfeller store i forhold til topphøydesignalet fra signaturpeptidet. Errorbarene viser blant annet et stort avvik for målingene av T5 i morgenurin-matriksene som ble denatureert ved 90 °C. Variasjonene for urinmatriksene kan være tegn på at metoden kan ha behov for å tilpasses urin bedre.
- De store variasjonene i utbytte av proteolytiske produkter mellom replikaene gjør at konklusjonene som trekkes av forsøket må være milde og begrensede. Ved klipp i ABC-matriks ser det ut til at utbyttet av signaturpeptider er høyere ved denatureringstemperatur på 90 °C enn 60 °C. Det kan komme av økt denaturering av isoformene. En potensiell årsak til nedgang i utbytte når urinprøver denatureres ved 90 °C sammenliknet med 60 °C kan være økning i reduserende reaksjoner mellom hCG-

isoformer og urinkomponenter. Blant annet er ureas reaksjoner i den svake basiske løsningen kombinert med høy temperatur kjent for å kunne føre til karbamyleringsreaksjoner (6.6.1).

- Topp høydesignalene til flere av de signaturpeptidene er høyere ved proteolyse i 500 mM ABC-buffere enn i urinløsningene. Dersom antitrypsin er aktiv i urinen kan det være en årsak til redusert utbytte. En annen mulighet er at det er tilsatt for lite DTT, IAA eller trypsin på grunn av tilstedeværelse av andre proteiner. Dessuten kan utilstrekkelig opprensning av de klippede urinløsningene kan føre til ionesuppresjon, som det ikke er testet for.



Figur 27 In-solution-proteolyse i morgensurin, ettermiddagsurin og ABC-buffere (n=2). Enden av errorbarerne viser topp høydesignalet fra hvert signaturpeptid. Til høyre i de tre grafiske fremstillingene beskrives hvilke matriksløsninger som er tilsatt hCG og utført proteolyse i. Ettermiddagsurin er forkortet til etterm.urin og 90°C og 60°C som står bak matriksen angir temperaturen som ble brukt til denaturering.

8.4.3 *In-well vs in-solution* prosedyre

To prosedyrer for proteolyse av hCG-isoformer i urin har blitt testet ut på urin tilsatt hCG fra Pregnyl[®]. Begge metodene har med visse forbehold vist potensial for å være egnet til å klippe hCG-isoformer med følgende prosedyrer og karakteristika:

1. hCG-isoformer ekstraheres fra urinløsningene (7.4.2) før proteolyse *in-well* (7.3.2) utføres. SPE (7.4.1) kan utføres på løsningene for opprensing og oppkonsentrering.
 - Lavest detekterte konsentrasjon i urin (uten SPE): 0,05 IE/mL
 - Styrker: kortere tid for proteolyse, løsningen for proteolyse blir mer homogen og det blir mindre forurensinger fra andre urinprodukter under proteolyse, ressurskrevende manuell SPE er ikke nødvendig når de første minuttene av den kromatografiske separasjonen ikke analyseres, affinitetsopprensing er en mer spesifikk opprenskningsmetode enn SPE, kortere tid for tryptisk klipp
 - Svakheter: prosedyren trengs antagelig å tilpasses urinmatriks, store urinvolum blir ikke utnyttet når kun 100 µL urin kan settes på, krever tilgang på gode immunocapture-kit, avhengig av høy spesifikk affinitet for alle hCG-isoformer slik at ikke antistoffene mettes av andre urinkomponenter.
2. Proteolyse *in-solution* (7.3.1) utføres på urinprøvene, men påfølgende SPE (7.4.1) for opprenskning og oppkonsentrering.
 - Lavest detekterte konsentrasjon i urin (med SPE): 0,5 IE/mL
 - Styrker: opprenskningsutstyr er lettere tilgjengelig, godt utprøvd og anvendt metode på de fleste laboratorier,
 - Svakheter: lenger tid for proteolyse, manuell SPE er en ressurskrevende og mindre spesifikk opprenskningsmetode enn affinitetsekstraksjon, ikke reproduserbar proteolyse ved denatureringstemperatur på 90 °C, usikker inkubasjonstid (i oppgaven er det forutsatt lik tid for tryptisk klipp av hCG i urin som i 100 mM ABC-buffer, men dette er ikke nødvendigvis tilfellet)

Test på pasientprøver

Pasientprøver i form av tre urinprøver fra gravide og en blank urinprøve ble forsøkt analysert ved hjelp av de utprøvde metodene. *In-solution*-prosedyre (7.3.1) ble utført etterfulgt av SPE for opprenskning og oppkonsentrering (7.4.1). Denatureringsforsøket i 8.4.2 viste at den optimale temperatur for denaturering antageligvis er lavere enn 90 °C. Dette forsøket ble imidlertid utført før denatureringsforsøket, noe som medfører at denatureringstemperaturen i

dette forsøket er 90 °C. Immunoekstraksjon (7.4.2) ble utført etterfulgt av *in-well*-proteolyse (7.3.2) og direkte injeksjon av løsningen. Av begge prøveløsningene ble 40 µL injisert for LC-MS-analyse (7.5). MS-kromatogram som vist i APPENDIKS 4.

Kommentarer til deteksjon av signaturpeptider i gravidurin gjennom immunobasert prøveforberedelse etterfulgt av *in-well*-proteolyse:

- Metoden gav deteksjon av signaturpeptidene T5, T9 og cfT9 fra alle pasientprøvene. T9 og T5 kommer fra hCG eller hCGβ (eventuelt hyperglykosylerte former) og cfT9 fra hCGβcf. Disse hCG-isoformene var forventet å detektere i gravidurin. Det var også som forventet å ikke detektere nicked hCG-isoformer, da nicking først og fremst forekommer ved kreftsykdommer (nevnt under 6.1.2).
- Denne metoden ble også utført på urinprøve fra ikke-gravid frisk person. MS-kromatogrammene viste ingen interfererende toppe og lavt støynivå sammenliknet med *in-solution*-metoden.

Kommentarer til deteksjon av signaturpeptider i gravidurin ved proteolyse direkte i urinprøvene etterfulgt av SPE som opprensning:

- Metoden gav kun deteksjon av signaturpeptidet T5, hvorav den ene signaltoppen (fra gravidurin 3 måneder) er deformert. Flere replikater for den samme urinprøven viser denne forskjøvnede toppen. Det kan blant annet tenkes å være en interfererende topp fra et degradert endogent peptid.
- Når metoden ble utført på urinprøve fra ikke-gravid frisk person viste det ingen interfererende signal ved retensjonstiden for T5, men en topp ved retensjonstiden for T9 ble observert. Det er med stor sannsynlighet ikke et peptidsignal fra hCG-isoformer, for da ville T5 vært å forvente detektert.

Av disse to metodene fremtrer immunobasert opprensning etterfulgt av proteolyse *in-well* som den mest lovende fremgangsmåten for å senke deteksjonsgrensene og å få de reneste løsningene for analyse. Prosedyren har vist seg egnet til å detektere hCG i urin i konsentrasjoner man kan forvente i urinprøver til pasienter med ulike tumorer (viser til APPENDIKS 5 der konsentrasjoner av hCG-isoformer fra serumprøver tilhørende pasienter med tumorer er oppgitt). I urin kan man forvente fra to ganger høyere ned til en tiendedel av serumkonsentrasjonen (nevnt i 6.6), som tilsier (ved deteksjonsnivå på 50 mIE/mL) at hCG og hCGβ antagelig kan detekteres i visse kreftpasienters urin.

Det er antageligvis mulig å forbedre metodene ved å legge inn trinn eller bearbeide deler av prosedyrene. Den immunobaserte metoden brukt i denne oppgaven er utviklet for å ekstrahere hCG fra plasma. Urinens variabilitet og sammensetning av stoffer skiller seg fra plasma, som indikerer at metoden muligens bør tilpasses mer for å være optimal for urinmatrikser. Ved å lage større brønner med mer antistoff som coater overflaten kan også urinens store prøvevolum utnyttes. Ved selektiv opprensning av hCG-isoformer er det mulighet for at man kan, ved å bestemme signaturpeptid fra α -subenheten til hCG, også skille forekomst av hCG fra hCG β i prøven.

Sammenliknet med immunoaffinitetsekstraksjon er SPE er i høyere grad utsatt for koekstraksjon av analytter og matriks. Når flere trinn legges inn i opprensningsprosedyren øker faren for kontaminasjon og resultat med lavere pålitelighet. En mulig tilnærning kan være å sile urinprøvene for å fjerne store molekyler som kan interferere med proteolyseprosessen før *in-solution*-proteolyse.

8.5 ANDRE BEMERKNINGER

8.5.1 Feilkilder

Samme mengde DTT, IAA og trypsin ble brukt for alle konsentrasjoner i alle matrikser. Stoffene ble alltid tilsatt i stort overskudd, men ved biologiske prøver som urinmatriks er det fare for at mengdene likevel kan bli for lave på grunn av tilstedeværelsen av flere andre stoffer. For høy mengde av stoffene kan også ha en negativ innvirkning på tryptsinaktiviteten for hCG.

Ved *in-solution*-proteolyse ble den samme inkuberingstiden brukt ved klipp av hCG i 100 mM ABC-buffer, tilsatt denaturant i 100 mM ABC-buffer og ved urin eller vann tilsatt 500 mM ABC-buffer. Det er ikke usannsynlig at slike ulikheter i løsningene kan påvirke tryptsinaktiviteten og optimal inkuberingstid.

8.5.2 Carry-over effekt

Signal fra cfT9 og T9, signaturpeptidene med størst retensjonstid, ble av og til observert i blank prøve. For å teste for carry-over ble MFA injisert for LC-MS-analyse for signaturpeptider. Ved spesielt høye signaler fra signaturpeptider i foregående analyse kunne inntil 15 % av det forrige signalet observeres i en slik blank prøve.

Det ble ikke lagt inn vaskeprogram mellom hver kjøring, men det ble lagt inn en til to vaskeprogrammer mellom analyser med høy konsentrasjon når neste konsentrasjon var vesentlig lavere. Dessuten ble det tilstrebet å injisere økende konsentrasjoner for å unngå carry-over effekt. Det viser det seg imidlertid at vaskeprogrammet ikke alltid var egnet til å hindre carry-over effekt fra tidligere prøver, fordi topphøydesignalene fra signaturpeptidet T9 fortsatt forekom ved injeksjon av ionebyttet vann etter vask. Derfor kan liten vekt legges på lave signal fra spesielt T9.

9. KONKLUSJON

Det ble i denne oppgaven utviklet metoder for å detektere ulike isoformer av hCG, som separat har en diagnostisk verdi, i urin. Signaturpeptider for de ulike hCG-isoformene ble identifisert og en SPE-metode for opprensning av signaturpeptidene ble utviklet.

Ved proteolyse direkte i urinløsningen ble SPE inkludert som nødvendig opprensning før analyse på LC-MS. Alle signaturpeptidene, bestemt fra tryptisk klipp i bufret ionebyttet vann, ble detektert i urinløsning tilsatt høy konsentrasjon hCG fra Pregnyl[®]. Ved immunoaffinitetsekstraksjon etterfulgt av proteolyse i brønnene ble også alle signaturpeptider detektert. Proteolyse og deteksjon av hCG-isoformer var vellykket med begge metodene når fremgangsmåtene ble utført på urinprøver tilsatt relativt høye konsentrasjoner hCG, men ved gjennomføring av metodene på urin fra gravide viste den immunbaserte metoden seg å være bedre. *In-solution*-metoden ble imidlertid utført med denaturering ved 90 °C og ikke ved 60 °C, som senere viste seg å være optimalt. Ved å utføre begge proteolysetilnærmingene på urinprøver fra gravide ble signaturpeptider (*in-solution*-proteolyse: T5 og *in-well*-proteolyse: T5, T9 og cfT9) detektert.

Immunobasert prøveopprensning før proteolyse viste høyere sensitivitet enn *in-solution*-proteolyse etterfulgt av SPE-opprensning. Prøveforberedelsen har høy selektivitet og sørger for mer stabile proteolyseforhold enn *in-solution*-proteolyse. Med tanke på at innholdsstoffer kan interferere med trypsinaktivitet og modifisere analyttene er denne metoden mer egnet for klinisk applikasjon enn *in-solution*-proteolyse med påfølgende SPE.

10. KILDELISTE

- [1] Cole, L., New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7, 8.
- [2] Cole, L. A., Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clinical Chemistry* 1997, 43, 2233–2243.
- [3] Pregnyl eSPC, <http://www.legemiddelverket.no>, Statens Legemiddelverk, 2000. (besøkt april 2009)
- [4] Malatos, S., Neubert, H., Kicman, A. T., Iles, R. K., Identification of Placental Transforming Growth Factor- β and Bikunin Metabolites as Contaminants of Pharmaceutical Human Chorionic Gonadotrophin Preparations by Proteomic Techniques. *Molecular & cellular proteomics* 2005, 4, 984-992.
- [5] Tsivou, M., Livadara, D., Georgakopoulos, D. G., Koupparis, M. A., *et al.*, Stabilization of human urine doping control samples. *Analytical Biochemistry* 2009, 388, 179-191.
- [6] Stenman, U. H., Unkila-Kallio, L., Korhonen, J., Alfthan, H., Immunoprocudures for detecting human chorionic gonadotropin: Clinical aspects and doping control. *Clinical Chemistry* 1997, 43, 1997.
- [7] Worlds Anti-Doping Agency, The 2009 Prohibited List, 4.
- [8] Cowan, D. A., Kicman, A. T., Doping in Sport: Misuse, Analytical Tests, and Legal Aspects. *Clinical Chemistry* 1997, 43, 1110-1113.
- [9] Stenman, U. H., Tiitinen, A., Alfthan, H., Valmu, L., The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Human Reproduction Update* 2006, 12, 769-784.
- [10] Berger, P., Sturgeon, C., Bidart, J. M., Paus, E., *et al.*, The ISOBM TD-7 Workshop on hCG and related molecules. *Tumor Biology* 2002, 23.
- [11] Cole, L. A., Shahabi, S., Butler, S. A., Mitchell, H., *et al.*, Utility of Commonly Used Commercial Human Chorionic Gonadotropin Immunoassays in the Diagnosis and Management of Trophoblastic Diseases. *Clinical Chemistry* 2001, 47, 308-315.
- [12] Black, R. S., Bowers, L. D., in: Chapman, J. R. (Ed.), *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, Humana Press 200.
- [13] Laphorn, A. J., Harris, D. C., Isaacs, N. W., Crystal structure of human chorionic gonadotropin, RCSB Protein Data Bank, 1994.
- [14] Kicman, A. T., Parkin, M. C., Iles, R. K., An introduction to mass spectrometry based proteomics--Detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007, 260-262, 212-227.
- [15] Bristow, A., Berger, P., Bidart, J. M., Birken, S., *et al.*, Establishment, Value Assignment, and Characterization of New WHO Reference Reagents for Six Molecular Forms of Human Chorionic Gonadotropin. *Clinical Chemistry* 2005, 51, 177-182.
- [16] Jacoby, E. S., Kicman, A. T., Laidler, P., Iles, R. K., Determination of the glycoforms of human chorionic gonadotropin beta-core fragment by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 2000, 46, 1796-1803.

- [17] Okamoto, T., Niu, R., Matsuo, K., Furuhashi, M., *et al.*, Human chorionic gonadotropin [beta]-core fragment is directly produced by cancer cells. *Life Sciences* 2001, 68, 861-872.
- [18] Snyder, J. A., Haymond, S., Parvin, C. A., Gronowski, A. M., Grenache, D. G., Diagnostic Considerations in the Measurement of Human Chorionic Gonadotropin in Aging Women. *Clinical Chemistry* 2005, 51, 1830-1835.
- [19] Alfthan, H., Haglund, C., Dabek, J., Stenman, U. H., Concentrations of Human Choriogonadotropin, Its beta-Subunit, and the Core Fragment of the beta-Subunit in Serum and Urine of Men and Nonpregnant Women. *Clinical Chemistry* 1992.
- [20] Gronowski, A. M., Fantz, C. R., Parvin, C. A., Sokoll, L. J., *et al.*, Use of Serum FSH to Identify Perimenopausal Women with Pituitary hCG. *Clinical Chemistry* 2008, 54, 652-656.
- [21] Brameld, K. J., Dickinson, J. E., O'Leary, P., Bower, C., *et al.*, First trimester predictors of adverse pregnancy outcomes. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2008, 48, 529-535.
- [22] Mann, K., Saller, B., Hoermann, R., Clinical use of HCG and hCG beta determinations. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 1993, 97-104.
- [23] Liu, C.-L., Bowers, L. D., Immunoaffinity trapping of urinary human chorionic gonadotropin and its high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric confirmation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1996, 687, 213-220.
- [24] Abeler, V., in: Abeler, V. (Ed.), *Histologi*, Oslo Universitetssykehus HF 2009.
- [25] Madersbacher, S., Klieber, R., Mann, K., Marth, C., *et al.*, Free alpha-subunit, free beta-subunit of human chorionic gonadotropin (hCG), and intact hCG in sera of healthy individuals and testicular cancer patients. *Clinical Chemistry* 1992, 38, 370-376.
- [26] Ezan, E., Dubois, M., Francois, B., *Pharmaceutical Technology Europe*, Advanstar Communications 2008.
- [27] Barbour, J., Wiese, S., Helmut, E., Warscheid, B., in: Von Hagen, J. (Ed.), *Proteomics Sample Preparation*, Wiley-VCH, Darmstadt 2008.
- [28] Machtejevas, E., Unger, K. K., in: Von Hagen, J. (Ed.), *Proteomics Sample Preparation*, Wiley-VCH, Darmstadt 2008.
- [29] Taylor, P. J., Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 2005, 38, 328-334.
- [30] Barbour, J., Wiese, S., Helmut, E., Warscheid, B., in: Von Hagen, J. (Ed.), *Proteomics Sample Preparation*, Wiley-VCH, Darmstadt 2008.
- [31] Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., *Legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget 2004.
- [32] Bjørneboe, G., Biomarkør, *Store Norske Leksikon*, Kunnskapsforlaget 2009.
- [33] Zolotarjova, N., Martosella, J., Nicol, G., Bailey, J., *et al.*, Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *PROTEOMICS* 2005, 5, 3304-3313.
- [34] Zhang, L., Wang, X., Peng, X., Wei, Y., *et al.*, Immunoaffinity Purification of Plasma Membrane with Secondary Antibody Superparamagnetic Beads for Proteomic Analysis. *Journal of Proteome Research* 2007, 6, 34-43.

- [35] Hanai, T., in: Deyl, Z. (Ed.), *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Elsevier, Amsterdam 1998, pp. 1-45.
- [36] Aebersold, R., Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 198-207.
- [37] Liebler, D. C., *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology*, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2002.
- [38] Winther, B., Determination of early stage SCLC biomarker på LC-MS How to quantify femtomole levels og ProGRP in human serum. *Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet* 2008.
- [39] Roepstorff, P., Fohlman, J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* 1984, 11, 601.
- [40] Lim, M. S., Elenitoba-Johnson, K. S. J., Proteomics in pathology research. *Laboratory Investigation* 2004, 84, 1227-1244.
- [41] Petricoin, E. F., Zoon, K. C., Kohn, E. C., Barrett, J. C., Liotta, L. A., Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002, 1, 683-695.
- [42] Berg, J. P., Henninge, J., Lund, T., Påvisning av nye biomarkører i plasma-proteomet. *Norsk Epidemiologi* 2006, 16, 35-40.
- [43] Pisitkun, T., Johnstone, R., Knepper, M. A., Discovery of urinary biomarkers. *Molecular & cellular proteomics* 2006, 5, 1760-1761.
- [44] Nelson, D. L., Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York 2005.
- [45] Mant, C. T., Zhou, N. E., Hodges, R. S., in: Heftman, E. (Ed.), *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Elsevier, Amsterdam 1992, pp. B75-B150.
- [46] McMaster, M. C., *LC/MS: a practical user's guide*, John Wiley & Sons 2005.
- [47] Botstein, D., Laboratory 4: Biochemistry of Protein Folding 2007.
- [48] *Proteomic Digest*, IonSource.com 2000 (besøkt februar 2009).
- [49] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., *et al.*, *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York 2002.
- [50] *Amino Acid Browser*, Biological Magnetic Resonance Data Bank (besøkt 2009).
- [51] Kierulf, P., Urin, *Store Norske Leksikon*, Kunnskapsforlaget 2009.
- [52] Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., *et al.*, Urine in clinical proteomics. *Molecular & cellular proteomics* 2008, 7, 1850-1862.
- [53] Thongboonkerd, V., Practical points in urinary proteomics. *Journal of Proteome Research* 2007, 6.
- [54] Traum, A. Z., *Expert Review of Proteomics*, Expert Reviews Ltd 2008, pp. 715-719.
- [55] Traum, A. Z., Schachterb, A. D., in: Thongboonkerd, V. (Ed.), *Proteomics in Nephrology - Towards Clinical Applications*, Contributions to Nephrology 2008, pp. 29-36.
- [56] *Amino acid table*, IonSource.com, 2008 (besøkt februar 2009).
- [57] Raspi, G., Moro, A. L., Spinetti, M., Separation and quantitation of urinary trypsin inhibitors by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* 1988, 332, 48-51.

-
- [58] Lieberman, J., Heat Lability of Alpha1-Antitrypsin Variants. *Chest* 1973, 64, 579-584.
- [59] *The statistics of sequence similarity scores*, National Center for Biotechnology Information 2009 (besøkt mars 2009).
- [60] Liu, C., Bowers, L. D., Mass spectrometric characterization of nicked fragments of the b-subunit of human chorionic gonadotropin. *Clinical Chemistry* 1997, 43, 1172-1181.
- [61] Hoermann, R., Berger, P., Spoettl, G., Gillesberger, F., *et al.*, Immunological recognition and clinical significance of nicked human chorionic gonadotropin in testicular cancer. *Clinical Chemistry* 1994, 40, 2306-2312.
- [62] Cole, L. A., Hyperglycosylated hCG. *Placenta* 2007, 28, 977-986.
- [63] Sipos, T., Merkel, J. R., An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* 1970, 9, 2766-2775.

11. APPENDIKS

APPENDIKS 1

Tabellen viser kumulert utbytte for hver fraksjon. Prosentvis utbytte for hvert peptid er beregnet som andel av totalt peptidutbytte fra alle elueringsfraksjonene. 0 er fra vask og prøvepåsetning, 1 er første elueringsfraksjon (50 µL), 2 er neste elueringsfraksjon og 3 er siste elueringsfraksjon.

Fraksjon	nT5 (48-60)	nT5 (45-60)	T5	T9	cfT9	SUM
0	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
1	99 %	97 %	98 %	93 %	92 %	97 %
2	100 %	100 %	100 %	99 %	99 %	100 %
3	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

APPENDIKS 2

Tabellen viser aminosyresekvenser fra fullstendig tryptisk klippet β -subenheten til hCG. Aminosyrer i parentes er aminosyrene før og etter sekvensen før klipp. I kursiv og uthevet er peptidprodukter med 6-20 aminosyrer. x viser plassering av det tryptiske peptidet regnet fra β -subenheten sin N-terminus.

x	m/z	start	slutt	aminosyresekvens	antall aminosyrer
1	234,1	1	2	<u>(-) SK (E)</u>	2
2	767,5	3	8	<u>(K) EPLRPR (C)</u>	6
3	1372,7	9	20	(R) CRPINATLAVEK (E)	12
4	2665,1	21	43	<u>(K) EGCPVCITVNTTICAGYCPTMTR (V)</u>	23
5	1927,0	44	60	<u>(R) VLOGVLPALPOVVCNYR (D)</u>	17
6	389,2	61	63	<u>(R) DVR (F)</u>	3
7	651,3	64	68	<u>(R) FESIR (L)</u>	5
8	700,3	69	74	<u>(R) LPG CPR (G)</u>	6
9	2227,0	75	94	<u>(R) GVNPVVSYAVALSCOCALCR (R)</u>	20
10	175,1	95	95	<u>(R) R (S)</u>	1
11	923,4	96	104	<u>(R) STTDCGGPK (D)</u>	9
12	1226,5	105	114	<u>(K) DHPLTCDDPR (F)</u>	10
13	885,4	115	122	<u>(R) FODSSSSK (A)</u>	8
14	1105,6	123	133	<u>(K) APPPSLPSR (L)</u>	11
15	1234,7	134	145	<u>(R) LPGPSDTPILPO (-)</u>	12

APPENDIKS 3

Tabellen lister opp in-silico trypsinerte peptider av β -subenheten til hCG med 0-2 "missed cleavages". n angir antall "missed cleavages" i sekvensene. I parentes står aminosyren før og etter sekvensen. m/z er masse-ladningsforhold for aminosyrekjedene i form av at de er en gang eller to ganger ladet.

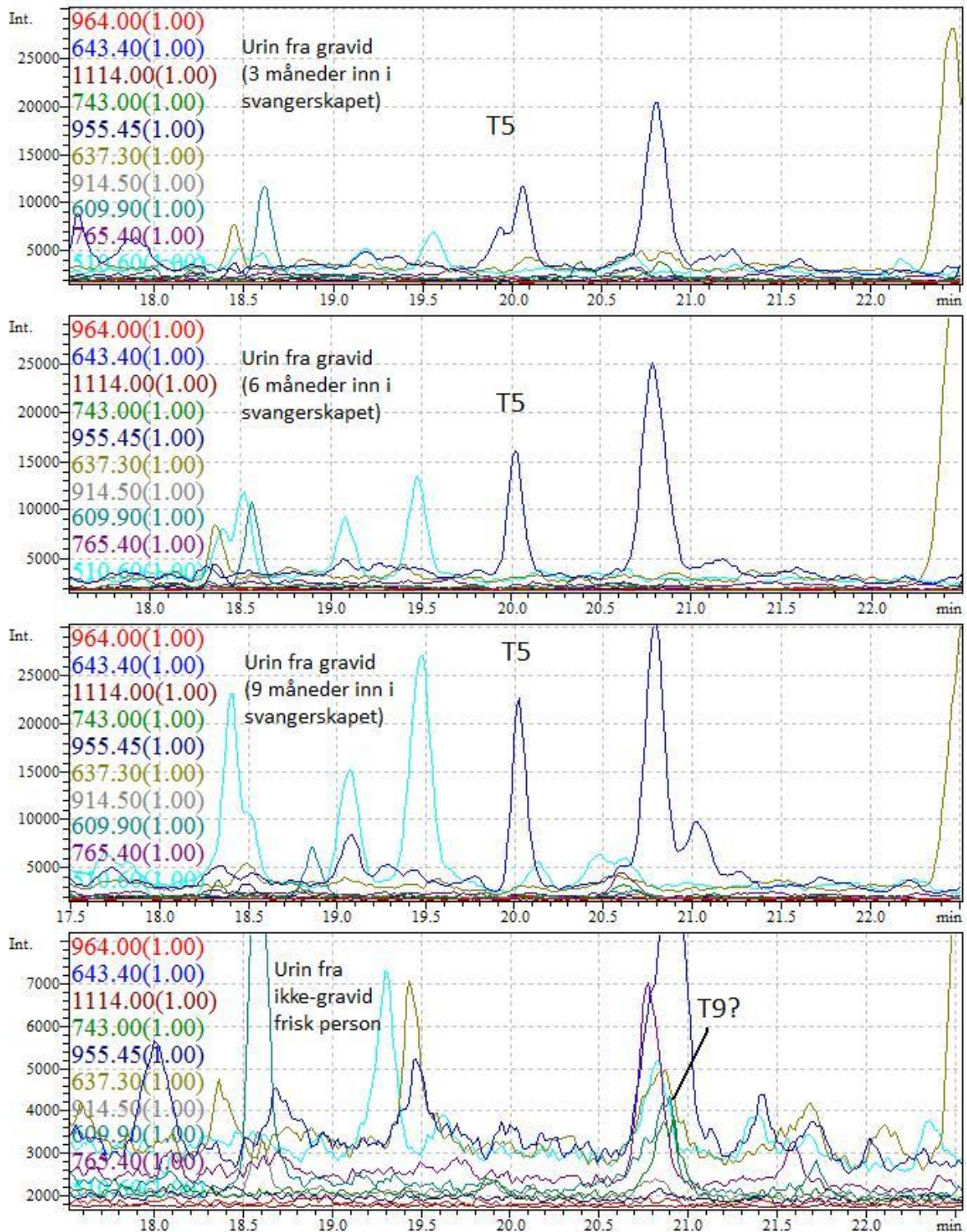
m/z	Start	Slutt	n "missed cleavages"	Sekvens for tryptisk peptid
700.3	69	74	0	<u>(R) LPGCPR(G)</u>
767.5	3	8	0	<u>(K) EPLRPR(C)</u>
885.4	115	122	0	<u>(R) FQDSSSSK(A)</u>
923.4	96	104	0	<u>(R) STTDCGGPK(D)</u>
982.6	1	8	1	<u>(-) SKEPLRPR(C)</u>
1021.5	61	68	1	<u>(R) DVRFESIR(L)</u>
1079.5	95	104	1	<u>(R) RSTTDCGGPK(D)</u>
1105.6	123	133	0	<u>(K) APPPSLPSPSR(L)</u>
1226.5	105	114	0	<u>(K) DHPLTCDDPR(F)</u>
1234.7	134	145	0	<u>(R) LPGPSDTPILPQ(-)</u>
1332.7	64	74	1	<u>(R) FESIRLPGCPR(G)</u>
1372.7	9	20	0	<u>(R) CRPINATLAVEK(E)</u>
1702.9	61	74	2	<u>(R) DVRFESIRLPGCPR(G)</u>
1927.0	44	60	0	<u>(R) VLQGVLPALPQVVCNYR(D)</u>
1972.0	115	133	1	<u>(R) FQDSSSSKAPPPSLPSPSR(L)</u>
2092.9	105	122	1	<u>(K) DHPLTCDDPRFQDSSSSK(A)</u>
2121.2	3	20	1	<u>(K) EPLRPRCRPINATLAVEK(E)</u>
2130.9	96	114	1	<u>(R) STTDCGGPKDHPLTCDDPR(F)</u>
2227.0	75	94	0	<u>(R) GVNPPVVSYAVALSCQCALCR(R)</u>
2287.0	95	114	2	<u>(R) RSTTDCGGPKDHPLTCDDPR(F)</u>
2297.2	44	63	1	<u>(R) VLQGVLPALPQVVCNYRDVR(F)</u>

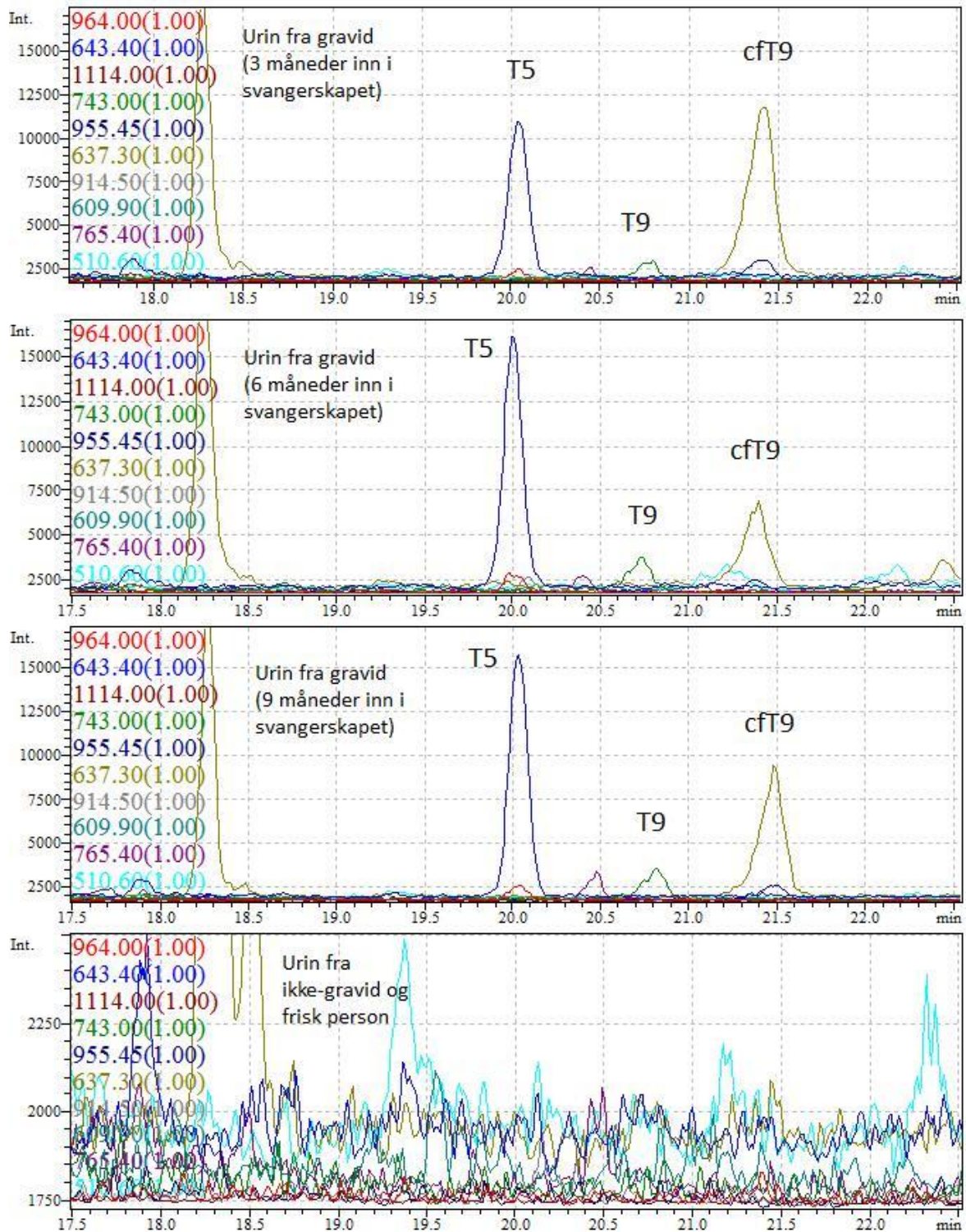
2321.3	123	145	1	<u>(K) APPPSLSPSRRLPGPSDTPILPQ(-)</u>
2336.3	1	20	2	<u>(-) SKEPLRPRCRPINATLAVEK(E)</u>
2383.1	75	95	1	<u>(R) GVNPVVSYAVALSCQCALCRR(S)</u>
2665.1	21	43	0	<u>(K) EGCPVCITVNTTICAGYCPTMTR(V)</u>
2908.3	69	94	1	<u>(R) LPGCPRGVNPVVSYAVALSCQCALCR(R)</u>
2929.6	44	68	2	<u>(R) VLQGVLPALPOVVCNYRDVRFESIR(L)</u>
2997.2	96	122	2	<u>(R) STTDCGGPKDHPLTCDDPRFQDSSSSK(A)</u>
3064.4	69	95	2	<u>(R) LPGCPRGVNPVVSYAVALSCQCALCRR(S)</u>
3179.5	105	133	2	<u>(K) DHPLTCDDPRFQDSSSSKAPPPSLSPSR(L)</u>
3187.6	115	145	2	<u>(R) FQDSSSSKAPPPSLSPSRRLPGPSDTPILPQ(-)</u>
3287.5	75	104	2	<u>(R) GVNPVVSYAVALSCQCALCRRSTTDCGGPK(D)</u>
3540.7	64	94	2	<u>(R) FESIRLPGCPRGVNPVVSYAVALSCQCALCR(R)</u>
4018.8	9	43	1	<u>(R) CRPINATLAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMTR(V)</u>
4573.1	21	60	1	<u>(K) EGCPVCITVNTTICAGYCPTMTRVLQGVLPALPOVVCNYR(D)</u>
4767.2	3	43	2	<u>(K) EPLRPRCRPINATLAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMTR(V)</u>
4943.3	21	63	2	<u>(K) EGCPVCITVNTTICAGYCPTMTRVLQGVLPALPOVVCNYRDVR(F)</u>

APPENDIKS 4

Bildene er utklipp av zoomede MS-kromatogram for proteolyse av urinprøver gjort *in-solution* og *in-well* som beskrevet under 8.4.3.

In-solution



In-well

APPENDIKS 5

Tabellen viser serumnivåer av hCG, hyperglykosylert hCG (hCG-H) og hCG β hos pasienttilfeller (n er antall pasientmålinger) med GTD og andre ikke-graviditetsrelaterte maligniteter rapportert fra USA hCG Reference Service (SD: standardavvik, IU:IE) [1].

Source	n	Total hCG mIU/ml median (range)	hCG-H mIU/ml molar ^a	hCG β mIU/ml molar ^a
			% of total hCG \pm SD	% of total hCG \pm SD
Complete hydatidiform mole (prior to evacuation)	30	192.995 (24.160– 3.704.084)	4,9 \pm 2,1%	7,1 \pm 20% ^b
Partial hydatidiform mole (prior to evacuation)	21	48.900 (11.600–220.114)	3,6 \pm 1,7%	5,8 \pm 22% ^b
Invasive mole, recurrent mole (at commencement of therapy)	72	869 (24–30.255)	30 \pm 35%	7,7 \pm 11%
Choriocarcinoma/GTN (at time of diagnosis)	102	16.298 (5,2–597.000)	61 \pm 41%	7,8 \pm 8,4%
Minimally invasive choriocarcinoma (at time of diagnosis) ^c	11	370 (13,1–2.364)	21 \pm 14%	8,3 \pm 6,2%
Quiescent GTD (at time of diagnosis) ^c	101	22 (1–212)	0,31% \pm 2,16%	2,7 \pm 8,4%
PSTT (at time of diagnosis) ^c	21	30 (1–231)	7,1 \pm 13%	61 \pm 21%
Other gynecologic malignancies (at time of diagnosis) ^c	14	33 (0,5–474)	0,55 \pm 1,3%	91 \pm 11%

^a Values are measured in molar units and converted to equivalents of hCG, assuming that 1 ng/ml hCG is 11 mIU/ml (using hCG 1st RR standard).

^b As published by Van Trommel et al.

^c As measured by USA hCG Reference Service, indicated diagnosis confirmed at biopsy by referring center.

APPENDIKS 6

SPC for PREGNYL[®] 5000 IE [3]:

1. LEGEMIDLETS NAVN

Pregnyl

2. KVALITATIV OG KVANTITATIV SAMMENSETNING

Humant koriongonadotropin (hCG) 5000 IE.

3. LEGEMIDDELFORM

Injeksjonssubstans

4. KLINISKE OPPLYSNINGER

4.1. Indikasjoner

Kvinner:

Indusering av ovulasjon ved nedsatt fertilitet på grunn av anovulasjon eller sviktende follikelmodning.

Induksjon av siste fase i follikelmodning før punktering i kontrollerte ovariale hyperstimuleringsprogrammer (ved medisinsk assisterte teknikker).

Lutealfasestøtte

Menn:

Sviktende gonadotropinutskillelse fra hypofysen som ved hypogonadotrop hypogonadisme og forsinket pubertet.

Kryptorkisme når anatomisk hinder ikke foreligger.

I kombinasjon med et FSH-preparat ved sterilitet, spesielt ved oligozoospermi og astenozoospermi.

4.2. Dosering og administrasjonsmåte

Kvinner:

Indusering av ovulasjon ved nedsatt fertilitet på grunn av anovulasjon eller sviktende follikelmodning. Vanligvis en injeksjon med 5000 - 10000 IE Pregnyl for å komplettere behandling med et FSH-preparat.

Forberedelse av follikler før punktering i kontrollerte ovariale hyperstimuleringsprogrammer. Vanligvis en injeksjon 5000 - 10000 IE Pregnyl for å komplettere behandling med et FSH-preparat.

Lutealfasestøtte: 2 til 3 gjentatte injeksjoner med 100 IE kan gis innen 9 dager etter ovulasjon eller innsetting av embryo (for eksempel dag 3, 6 og 9 etter indusering av ovulasjon).

Menn:

Hypogonadotrop hypogonadisme: 1000 - 2000 IE 2-3 ganger per uke. Er nedsatt fertilitet hovedårsaken, kan behandlingen kombineres med et follitropin (FSH) preparat.

2 - 3 ganger per uke i minst 3 måneder før noen bedring i spermatogenesisen kan forventes.

Under denne behandlingen bør substitusjonsbehandling med testosteron seponeres. Når bedringen i spermatogenesisen er inntrådt kan den opprettholdes med hCG alene.

Forsinket pubertet assosiert med gonadotrop hypofyseinsuffisiens: 1500 IE 2 - 3 ganger per uke i minst 6 måneder.

Kryptorkisme som ikke skyldes anatomiske skader: 2 år - 6 år: 500 - 1000 IE 2 ganger per uke i 6 uker. Over 6 år: 1500 IE 2 ganger per uke i 6 uker. Om nødvendig kan behandlingen gjentas.

Administrasjonsmåte

Etter at oppløsningsmiddelet er tilsatt den frysetørkede substansen skal den rekonstituerte Pregnylopløsningen administreres langsomt intramuskulært eller subkutant.

4.3. Kontraindikasjoner

Kjente eller mistenkte androgenavhengige tumorer, som prostatakreft eller brystkreft hos menn. Overfølsomhet for humant gonadotropin eller andre innholdsstoffer i preparatet.

4.4. Advarsler og forsiktighetsregler

Kvinner: Graviditet etter ovulasjonsinduksjon med gonadotropiner medfører økt risiko for flerbarnsfødsel. Kvinner som er under behandling for infertilitet, og spesielt kvinner som gjennomgår IVF har ofte eggledere som ikke fungerer normalt. Insidensen av ektopisk graviditet kan derfor være noe forhøyet. Tidlig ultralydsundersøkelse for å bekrefte en intrauterin graviditet er derfor viktig. Antall spontane aborter er høyere hos kvinner som får behandling for infertilitet enn hos normalbefolkningen. Tilstedeværelsen av ukontrollerte non-gonadale endokrinopater (f.eks. skjoldbruskkjertel, binyrebark eller hypofyse) bør utredes. Hos pasienter som behandles for infertilitet grunnet anovulasjon eller manglende follikkelmodning kan en innledende behandling med et FSH-preparat medføre uønsket ovarial hyperstimulering. Derfor bør det utføres ultralydsundersøkelse både før FSH behandling og med jevne mellomrom under behandlingen for å bekrefte follikkelutviklingen og for å bestemme østradiolnivået. Østradiolnivået kan stige meget raskt, f.eks. mer enn daglig dobling to til tre påfølgende dager, og kan sannsynligvis nå meget høye verdier. Diagnosen uønsket ovarial hyperstimulering kan bekreftes ved ultralydsundersøkelse. Hvis denne tilstanden opptrer (uavhengig av innledende behandling for IVF/ET, GIFT eller ICSI), skal FSH preparatet seponeres øyeblikkelig. I dette tilfelle skal graviditet unngås og hCG må ikke

gis. Gir man et LH-aktivt gonadotropin på dette stadium kan det indusere multiple ovulasjoner og ovarialt hyperstimuleringsyndrom. Denne forholdsregelen er spesielt viktig for pasienter med polycystisk ovariesyndrom. Kliniske symptomer på mildt ovarialt hyperstimuleringsyndrom er gastrointestinale problemer (smerte, kvalme, diaré), ømme bryster og mild til moderat forstørrelse av ovarier og ovariecyster. I sjeldne tilfeller oppstår livstruende ovarialt hyperstimuleringsyndrom. Dette er karakterisert av store ovariecyster (med tendens til å sprekke), ascites, vektøkning, ofte hydrothorax og av og til tromboemboliske komplikasjoner.

Menn: Behandling med hCG medfører øket produksjon av androgener. Av denne grunn bør hCG benyttes med forsiktighet til prepubertale gutter for å unngå risiko for prematur lukking av epifyseskivene og tidlig seksuell utvikling. Skjelettstatus bør kontrolleres regelmessig. Pasienter med latent eller manifest hjertesvikt, renal dysfunksjon, hypertensjon, epilepsi eller migrene (eller noen av disse i anamnesen) bør følges nøye, da forverring eller tilbakefall kan være forårsaket av økt androgen produksjon. Derfor må dosen reduseres ved kraftig stimulans av androgenproduksjonen.

4.5. Interaksjon med andre legemidler og andre former for interaksjon

Ingen interaksjoner av klinisk relevans er kjent.

4.6. Graviditet og amming

Preparatet kan brukes som støttebehandling i lutealfasen.

Preparatet skal ikke brukes ved amming.

4.7. Påvirkning av evnen til å kjøre bil og bruke maskiner

hCG-preparater antas ikke å påvirke evnen til å kjøre bil eller bruke maskiner.

4.8. Bivirkninger

Lokale reaksjoner som blåmerker, smerte, rødme, hevelse og kløe på injeksjonsstedet har vært rapportert. Av og til opptrer allergiske reaksjoner i form av smerte og/eller utslett på injeksjonsstedet. I sjeldne tilfelle forekommer mer utbredt utslett eller feber.

Kvinner: Uønsket ovarial hyperstimulering, ovarialt hyperstimuleringsyndrom. Se forsiktighetsregler punkt 4.4.

Menn: Væske og saltretensjon har vært sett ved bruk av store doser. Dette er et resultat av for høy androgenproduksjon. hCG behandling kan sporadisk forårsake gynekomasti.

4.9. Overdosering

Den akutte toksisiteten av gonadotropin fremstilt av urin er vist å være veldig lav. Det er ikke noen kjente symptomer på akutt parenteral overdose.

Ved overdosering kontakt Giftinformasjonssentralen

5. FARMAKOLOGISKE EGENSKAPER

5.1. Farmakodynamiske egenskaper

ATC-kode: G03G A01

Preparatet inneholder hCG som har luteiniserende (LH) effekt. LH er helt nødvendig for normal vekst og modning av kvinnelige og mannlige kjønnsceller samt gonadal produksjon.

Kvinner: hCG gis som erstatning for den endogene stigningen i LH. Denne inntreffer normalt midt i menstruasjonssyklus for å indusere den siste fase i follikkelmodningen som fører til ovulasjon. Preparatet gis også som erstatning for endogent LH under den luteale fase.

Menn: hCG gis for å stimulere produksjonen av testosteron i Leydig-cellene.

5.2. Farmakokinetiske egenskaper

Distribusjon: Maksimal hCG-konsentrasjon i plasma oppnås ca. 6 timer etter en enkelt intramuskulær eller subkutan injeksjon hos menn, og etter ca. 20 timer hos kvinner. Selv om det ble observert store interindividuelle forskjeller, kan den kjønnsrelaterte variasjonen etter intramuskulær injeksjon forklares ut i fra at kvinner har et tykkere glutealt fettlag.

Metabolisme: Ca 80 % blir metabolisert, hovedsakelig via nyrene.

Eliminasjon: Intramuskulær og subkutan injeksjon av hCG ble funnet å være bioekvivalent med hensyn til absorpsjon samt den tilsynelatende eliminasjonshalveringstiden på ca 33 timer. På bakgrunn av de anbefalte doseringsregimer og eliminasjonshalveringstid forventer man ikke akkumulering av hCG.

5.3. Prekliniske sikkerhetsdata

Ingen aktuelle data.

6. FARMASØYTISKE OPPLYSNINGER

6.1. Fortegnelse over hjelpestoffer

Natriumdihydrogenfosfat 0,25 mg, dinatriumhydrogenfosfat 0,25 mg, natriumkarboksymetylcellulose 0,05 mg og mannitol 5 mg.

Væskeampulle: Natriumklorid 9 mg, vann til injeksjonsvæsker til 1 ml.

6.2. Uforlikeligheter

Ingen relevant uforlikelighet er kjent.

6.3. Holdbarhet

3 år

Holdbar til utløpsdato angitt på pakningen.

Ferdig løsning skal brukes umiddelbart, resten skal kasseres.

6.4. Oppbevaringsbetingelser

Oppbevares ved 2°-15°C, beskyttet mot lys.

6.5. Emballasje (type og innhold)

3 ampuller, inneholder injeksjonssubstans 5000 IE hCG aktivitet.

3 ampuller, inneholder 1 ml oppløsningsmiddel.

6.6. Spesielle forholdsregler for destruksjon og annen håndtering

Vedlagte oppløsningsmiddel tilsettes injeksjonssubstansen før langsom i.m. eller s.c. injeksjon.

7. INNEHAVER AV MARKEDSFØRINGSTILLATELSEN

N.V. Organon

P.O.Box 20, 5340 Oss

Nederland

8. MARKEDSFØRINGSTILLATELSESNUMMER (NUMRE)

MTnr: 2222

9. DATO FOR FØRSTE MARKEDSFØRINGSTILLATELSE / SISTE FORNYELSE

20.03.67/ 21.07.99

10. OPPDATERINGSDATO

07.11.2000