

Utvikling av en kvantitativ proteomikkmetode for P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod

Ben André Jensen



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

Utvikling av en kvantitativ proteomikkmetode for P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod

Masteroppgave i farmakologi for graden *Master i farmasi*
Oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,
Universitetet i Oslo



Veiledere:

Post doc Monica Hermann, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Professor Leon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

© Ben André Jensen

2013

Utvikling av en kvantitativ proteomikkmetode for P-glykoprotein i mononukleære celler fra perifert blod

Ben André Jensen

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne oppgaven er utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap under veiledning av post doc Monica Hermann. Arbeidet ble påbegynt i august 2012 og avsluttet mai 2013.

Først vil jeg rette en stor takk til min hovedveileder Monica Hermann. Til tross for graviditet, bekkenløsning, barn og mann tidvis i Nordsjøen har du virkelig engasjert, motivert og «guidet» meg gjennom dette året på en svært god måte. Takk for gode dager på lab, hyggelige samtaler av faglig og mindre faglig karakter, konstruktive tilbakemeldinger i skriveprosessen og tålmodighet da spørsmålene fra meg strømmet på. Jeg vil også få rette en stor takk til professor Léon Reubsaet ved avdeling for farmasøytisk kjemi for gode bidrag og råd under metodeutviklingen.

Videre må jeg få takke professor Hege Christensen som tok over stafettpinnen ved innspurten da Monica måtte gi seg. Takk for gode innspill, ditt gode humør og tiden din i en ellers hektisk periode. Takk til overingeniør Siri Johannesen for hjelp med gelelektroforese på lab og råd underveis i metodeutviklingen.

Jeg må få takke min fantastiske kommende kone Marit Lid Bjerkvik for korrekturlesing, oppmuntrende ord og tålmodighet i prosessen. Tak til Kim David Jensen med hjelp til å lage figurer. Takk til farmakokinetikk-gruppen og andre ansatte i 4. etasje for et godt og inkluderende miljø. Og sist men ikke minst vil jeg takke mine medstudenter i 4. etasje for mye latter, utallige kaffepauser, matpauser og andre pauser. Dere har alle bidratt til at jeg har storkost meg dette året. Dere er en herlig gjeng!

Blindern 10. mai, 2013

Ben André Jensen

Innholdsfortegnelse

Forord	4
Innholdsfortegnelse	5
Forkortelser	7
Sammendrag	9
1 Innledning.....	11
1.1 Variabilitet i legemiddelrespons	11
1.1.1 Farmakodynamisk variabilitet.....	12
1.1.2 Farmakokinetisk variabilitet.....	12
1.2 Transportører	14
1.2.1 P-glykoprotein	15
1.3 P-glykoproteins rolle i behandlingsresistens	20
1.4 Proteomikk.....	21
1.5 Signaturpeptid.....	21
1.6 utfordringer med membranbunnede proteiner	22
1.7 Apparatur for homogenisering av celler	23
1.8 Prøveopparbeidelse.....	24
1.9 LC-MS/MS	26
1.10 Hensikten med oppgaven	28
2 Materialer og metode	29
2.1 Kjemikalier	29
2.2 Utstyr	31
2.3 Løsninger	33
2.4 Standard av P-glykoprotein	36
2.4.1 Gelelektroforese av standard.....	36
2.4.2 Repeterbarhet av uttak.....	36
2.5 Antistoffer.....	37
2.6 Immunoekstraksjon	37
2.6.1 Prosedyre for direkte immunoekstraksjon (direkte IP)	37
2.6.2 Avkobling av magnetiske kuler før proteolyse.....	38
2.6.3 Prosedyre for indirekte immunoekstraksjon (indirekte IP)	38
2.6.4 Forsøk utført med direkte og indirekte immunoekstraksjon	40

2.7	Proteolyse	40
2.8	Optimalisering av prosedyre for immunoekstraksjon og proteolyse.....	41
2.8.1	Tid på HulaMixer®	41
2.8.2	Resuspending under IP	42
2.8.3	Tilsetting av surfaktant til ulike tidspunkt under IP og proteolyse	42
2.8.4	Antistoffkonsentrasjoner	44
2.9	Isolering av mononukleære celler i perifert blod.....	45
2.10	Metoder for homogenisering av PBMC og membranisolering.....	45
2.10.1	Dounce homogenisator.....	46
2.10.2	Sonikering	46
2.10.3	Precellys	46
2.11	Fast-fase-ekstraksjon.....	50
2.12	LC-MS/MS	51
3	Resultater.....	53
3.1	Gelelektroforese.....	53
3.2	Repeterbarhet av uttak	54
3.3	Immunoekstraksjon	54
3.4	Optimalisering av prosedyre for immunoekstraksjon og proteolyse.....	54
3.4.1	Tid på HulaMixer®	54
3.4.2	Resuspending under IP	55
3.4.3	Tilsetting av surfaktanter til ulike tidspunkt under IP og proteolyse	56
3.4.4	Antistoffkonsentrasjoner	58
3.5	Metoder for homogenisering av lymfocytter og membranisolering.....	59
3.5.1	Precellys	59
4	Diskusjon.....	61
5	Konklusjon	68
	Litteraturliste	70

Forkortelser

ABC	Ammoniumbikarbonat
ABC-transportører	ATP-bindende kassett-transportører
ACN	Acetonitril
ADME	Absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon
ATP	Adenosintrifosfat
BCRP	Brystkreftresistens protein
CYP enzymer	Cytokrom P450 enzymer
DTT	Ditiotreitol
ESI	Elektrospray ionisering
HIV	Humant immunsviktivirus
IAA	Iodoacetic acid (jodeddiksyre)
IL	Interleukin
IP	Immunoekstraksjon
kDa	Kilodalton
LC	Væskerkromatografi
LLOQ	Lower limit of quantification (laveste kvantifiseringsgrense)
MDR	Multidrug resistance
mQ-vann	Milli-Q vann
MRP	Multidrug resistance-related protein

MS	Massespektrometer
NBD	Nukleotidbindende domene
PBMC	Mononukleære celler fra perifert blod
PBS	Fosfatbufret saltvann
PBST	Fosfatbufret saltvann med 0,02 % Tween 20
P-gp	P-glykoprotein
Rpm.	Runder per minutt
SDC	Natrium deoxycholat
SIL-peptid	Stabil isotop labeled-peptid
SPE	Fast-fase-ekstraksjon
TMD	Transmembrant domene
YB-1	Y-boks-bindende protein-1
Å	Ångstrøm

Sammendrag

Introduksjon: Ulik funksjon av legemiddeltransportører kan gi opphav til interindividuell variasjon i legemiddelrespons. ATP-bindende kassett (ABC)-transportøren P-glykoprotein (P-gp) uttrykkes blant annet i ulike blod-vevs barrierer, tarmen, nyrene, leveren og i lymfocytter. Transportøren påvirker opptak og distribusjon av en rekke legemidler og innen enkelte terapiområder resulterer dette i legemiddelresistens. For ulike immunosuppressiva hindres distribusjon til det intracellulære målmolekylet, og dette kan føre til behandlingsresistens og økt fare for rejeksjon hos transplanterte pasienter. Å kunne kvantifisere transportøren er av interesse, men er per dags dato ikke utført i humant vev ved hjelp av LC-MS/MS. Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en kvantitativ proteomikkmetode til å måle proteinuttrykket av P-gp i mononukleære celler fra perifert blod (PBMC).

Metode: Til metodeutvikling ble en standard av cellemembraner fra insektsceller transfektert med humant *ABCB1* (P-gp, MDR1) benyttet. Innledningsvis ble homogenisering utført ved bead-beating (Precellys[®] 24). Prøvene ble deretter rensset ved immunoekstraksjon (IP) med magnetiske kuler (Dynabeads[®]) og en kombinasjon av to ulike antistoff mot P-gp, UIC-2 som interagerer med proteindelen på utsiden av membranen og JSB-1 som interagerer med proteindelen på innsiden. Effekten av ulike surfaktanter (digitonin, natrium deoxycholat og PPS Silent[®]) på IP og proteolyse ble undersøkt. Trypsin ble benyttet for proteolyse av proteiner som ble utført etter standardprotokoll; 2 timer eller over natten inkubering etter reduksjon og alkylering med 10 mM ditiotreitol og 50 mM jodeddiksyre. Videre opprensing av prøven ble utført ved fast-fase-ekstraksjon med C8 materiale. Signaturpeptidet (AGAVAEVLAIR) ble målt ved hjelp av LC-MS/MS der responsen for dette representerte mengde P-gp i prøven.

Resultater: Utbyttet av P-gp i standard økte fra omtrent 3% opptil 36% av utbyttet ved direkte proteolyse, da antistoffet ble bundet til P-gp før de magnetiske kulene ble tilsatt (indirekte IP). Under IP ble det vist at kombinasjon av de to antistoffene (0,5 µg + 0,5 µg) ga omtrent tre ganger høyere utbytte enn ved bruk av JSB-1 alene (0,5 µg) og 60% høyere enn ved UIC-2 alene (0,5 µg). Bruk av 0,3 µg av hvert antistoff ble vist å være optimalt for 0,2 µL standard da ulike konsentrasjoner ble undersøkt. I tillegg ble det vist at tilstedeværelse av 200 µg/mL digitonin under IP økte utbyttet med 23%, i forhold til IP uten digitonin. Homogenisering ved bead-beating (Precellys[®] 24) der antistoffene ble tilsatt forut for

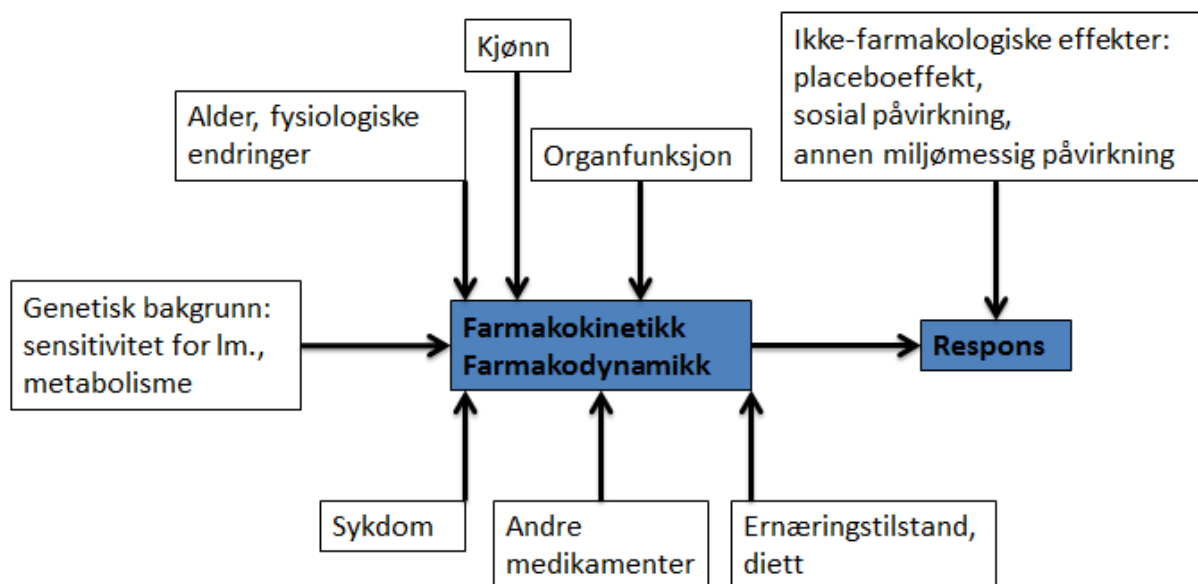
behandlingen, ga utbytte av P-gp fra standard, og økt homogeniseringstid ga også økt utbytte av P-gp.

Konklusjon: Det har blitt utviklet en metode for å detektere P-gp i membraner fra transfekterte insektceller. Videre arbeid med optimalisering av metoden er nødvendig, før vellykkede analyser av lave nivåer av transportøren i PBMC kan utføres.

1 Innledning

1.1 Variabilitet i legemiddelrespons

Interindividuell variasjon i legemiddelrespons er et velkjent klinisk problem. Ved inntak av samme dose observeres store ulikheter i respons, fra manglende effekt hos enkelte individer til kraftig effekt og betydelige bivirkninger hos andre. Variabiliteten kan skyldes genetiske, fysiologiske, patofysiologiske eller miljømessige faktorer [1], som fører til variasjon i legemidlenes farmakokinetikk (absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon) og farmakodynamikk (reseptorinteraksjon og reseptorrespons) [2]. Generelt er det estimert at 15-30% av interindividuell variasjon i legemiddelmetabolisme og respons skyldes genetisk variasjon i legemiddelmetaboliserende enzymer og transportører [1], men for enkelte legemidler er estimatet hele 95% [3]. Pasientens overbevisning om at et legemiddel vil ha effekt (placebo) eller ikke (nocebo), er også en viktig faktor som påvirker behandlingsresponsen [2]. Sykdomstilstand, alder, kjønn, etnisitet, legemiddelinteraksjoner, diett og kroppsvekt er andre faktorer som påvirker individers respons på legemidler [4] (figur 1).



Figur 1. Oversikt over faktorer som påvirker et legemiddels farmakokinetikk og farmakodynamikk. Modifisert fra Stamer og Stuber [5].

1.1.1 Farmakodynamisk variabilitet

Til tross for lik konsentrasjon på virkestedet oppleves individuell variasjon ved legemiddelbehandling. Dette skyldes ulikheter i legemidlers farmakodynamikk, som i størst grad påvirkes av polymorfisme i gener som koder for målmolekyler. Ulike varianter av genene gir opphav til ulikheter i målmolekylene, og fører derfor til forskjeller i legemidlenes sensitivitet [1, 2]. Eksempler på målmolekyler med kjente genetiske varianter er opioidreseptorer, β_2 -adrenerge reseptorer, dopaminreseptorer, serotoninreseptorer og angiotensinkonverterende enzym. I tillegg til genetiske polymorfismer kan patologiske faktorer, reseptortetthet, funksjon av signalmolekyler (f.eks. kinaser og fosfataser) og annen legemiddelbehandling føre til farmakodynamisk variasjon [2]. Ved sykdom og legemiddelbehandling eksponeres personer for endogene og eksogene mediatorer som kan bidra til regulering av mengde og funksjon av reseptorer [6]. I tillegg kan det ved polyfarmasi oppstå farmakodynamiske interaksjoner. For eksempel vil kompetitiv binding av to legemidler til samme reseptor kunne føre til variasjon i behandlingsresponsen [6].

1.1.2 Farmakokinetisk variabilitet

Farmakokinetikk er læren om hastighet og grad av legemiddelabsorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon (ADME), og beskriver forholdet mellom et legemiddels plasmaprofil og dosering. Dette er prosesser som påvirkes av genetiske og ikke-genetisk betingede variasjoner i nyre- og leverfunksjon, gastrointestinal fysiologi, legemiddelmetabolisme, legemiddeltransportørfunksjon, diett, alder og kroppsvekt, i tillegg til legemiddelinteraksjoner [2, 7-9]. Individuelle ulikheter i ADME bidrar til variasjon mellom individer i respons på legemiddelbehandling [8].

Variasjon i legemiddelabsorpsjon kan skyldes forskjeller i transittid i ventrikkelen og tarmmotilitet. Dette gir opphav til variasjon både mellom individer, og i ett individ ved ulike anledninger [2]. Legemiddelabsorpsjon påvirkes også av matinntak. Avhengig av type mat, måltidsstørrelse og legemidlets fysikalsk-kjemiske egenskaper vil absorpsjonen reduseres eller økes, forsinkes eller akselereres [10]. Ulike typer mat kan i tillegg påvirke enzymer som metaboliserer legemidler, ved å indusere eller inhibere disse, og på denne måten påvirke legemidlers biotilgjengelighet [11-13].

Legemidlers farmakokinetikk påvirkes ved endret funksjon i eliminerende organer som nyrer og lever. Endret nyrefunksjon skyldes forandringer i glomerulær filtrasjon, tubulær sekresjon og tubulær reabsorpsjon [7], og fører til redusert renal eliminasjon av legemidler. I tillegg kan legemidlenes vevsdistribusjon påvirkes ved væskeopphopning i kroppen og økt fri fraksjon (reduert proteinbinding) [7, 14]. Leverens funksjon reduseres ved kroniske leversykdommer som kan føre til endringer i legemidlers farmakokinetikk ved tre mekanismer; redusert blodstrøm til lever (viktigst for høyekstraherbare legemidler), redusert syntese av plasma-proteiner (albumin og alfa₁-surt glykoprotein) og redusert legemiddelmetabolisme [8]. Den nedsatte eliminasjonen fører til at legemidlene får økt halveringstid og plasmakonsentrasjon. Dette medfører økt fare for akkumulering av legemiddel i kroppen og fare for toksiske effekter.

Endringer i legemiddelmetabolisme kan skyldes polymorfisme i gener som koder for enzymer involvert i fase I og fase II metabolisme. Cytokrom P450 (CYP) -enzymssystemet er best kjent, og er ansvarlig for en stor del av fase I metabolismen (oksidasjon og reduksjon) for en rekke eksogene stoffer. Enzymene konverterer substratene til elektrofile intermediater. Noen av substratene konjugeres deretter av fase II enzymer til vannløselige derivater før de skilles ut av kroppen [15], andre metaboliseres kun av fase I enzymer for så å elimineres. Polymorfisme i gener som koder for metaboliserende enzymer som for eksempel CYP-enzym, butyrylcholinesterase [16], N-acetyltransferase [17] og UDP-glukuronosyl-transferaser [18] fører til endringer i enkelte legemidlers farmakokinetikk. Ulik grad av metabolisme fører til ulike plasmakonsentrasjoner ved inntak av samme dose og derfor individuell variasjon i legemiddelrespons [1].

Fra et legemiddel administreres til det når sitt mål-molekyl må det krysse biologiske membraner. Avhengig av legemidlets fysikalsk-kjemiske egenskaper krysses membranene eksempelvis ved passiv diffusjon, eller aktiv transport ved hjelp av transportører. Fordi transportørene spiller en rolle i distribusjon av legemidler, vil konsekvensen av polymorfisme i gener som koder for disse påvirke legemidlers farmakokinetikk [19]. Generelt er forskjellene av mindre betydning for systemisk eksponering ved polymorfisme i transportører enn ved polymorfisme i metaboliserende enzymer. Få legemidler får mer enn tre ganger økt systemisk eksponering som følge av polymorfisme i legemiddeltransportører [19]. Intracellulær legemiddelkonsentrasjon bestemmes av balansen mellom transport inn (influks) og transport ut (effluks) av cellen [20]. Slik regulerer legemiddeltransportører den vevsspesifikke

konsentrasjonen av dets substrater, og plasmakonsentrasjonen vil derfor ikke gjenspeile eksponeringen i spesifikke vev [21]. Av den grunn kan enkelte legemidlers variasjon i respons og toksiske effekter være større enn endringen i plasmakonsentrasjonen ville tilsi [19].

1.2 Transportører

Transportører er store membranbunnete proteiner som uttrykkes i ulike vev i kroppen. De påvirker stoffers evne til å krysse biologiske barrierer ved å transportere dem over cellemembraner. På denne måten kontrolleres influks av essensielle næringsstoffer og ioner, og effluks av cellulært avfall, toksiner, legemidler og andre xenobiotika. Transporten kan være passiv, med en konsentrasjonsgradient, eller aktiv, mot en konsentrasjonsgradient. Transportproteinene deles inn i flere superfamilier, der ATP-bindende kassett-transportører (ABC-transportører) er en av de viktigste superfamiliene involvert i distribusjon av legemidler [22].

Transportører i ABC-familien finnes både i ekstracellulære og intracellulære membraner, og består hovedsakelig av efflukstransportører som eksporterer substrater ved en energikrevende prosess mot en konsentrasjonsgradient [23]. Det er oppdaget 49 gener som koder for disse transportørene i det humane genom, og superfamilien er delt inn i syv underfamilier betegnet med bokstavene A-G (ABCA-G) [24, 25]. Blant de mest studerte transportørene i denne gruppen er multidrug resistance-related proteins (MRP, ABCC), brystkreftresistens protein (BCRP, ABCG) og P-glykoprotein (P-gp, ABCB1) [23].

ABC-transportørene har fellestrekk i sin struktur og transportfunksjon (figur 3). Alle inneholder to transmembrane domener, koblet til to nukleotidbindende domener som danner en funksjonell transportør [26]. De transmembrane domenene er svært hydrofobe og danner «kanalen» for transport gjennom cellemembranen. Energien tilegnes ved binding og hydrolyse av ATP i de nukleotidbindende domenene. ABC-transportørene kan kategoriseres på bakgrunn av struktur. Noen er såkalte halvtransportører, da er det nukleotidbindende domenet sammenkoblet med kun et transmembrant domene, og den funksjonelle enheten består av enten en homo- eller heterodimer av to halvtransportører. Andre er fulltransportører, da er to domener tilsvarende halvtransportørene sammenkoblet [27].

1.2.1 P-glykoprotein

P-gp ble først oppdaget av Juliano og Ling i 1976 [28] og er i dag den best studerte transportøren. Proteinets er kodet for av genet *ABCB1* og er også kjent ved navnet multidrug resistant protein-1 (MDR1). Navnet kommer av at transportøren kan føre til resistens mot ulike legemidler.

Distribusjon

P-gp uttrykkes i membraner på den siden av cellen som vender mot lumen i tarmen og ulike sekretoriske celler som nyrene, leveren og binyrene [29]. Her bidrar transportøren til å fremme eliminering og begrense opptak av legemidler fra tarmen. Videre er nivået av P-gp høyt i enkelte blod-vevs barrierer som blod-hjerne-barrieren, blod-placenta-barrieren og blod-testis-barrieren, og spiller en viktig rolle i å begrense distribusjon til vevene [30]. P-gp uttrykkes også i andre celletyper, som f.eks. i perifere T-lymfocytter [31], hvor uttrykk av transportøren er vist å påvirke legemiddelbehandlingen innen enkelte terapiområder [32].

```

1 mdlegdrngg akkknffkln nksekdkkek kptvsvfsmf rysnwldkly mvvgtlaaai
61 hgagvlplmml vfgemtdifa nagnledlms nitnrndind tgffmnlced mtryayyyysg
121 igagvlvaay iqvsfwclaa grqihkirkq ffhaimrqi gwfdvhdvge lntrltddvs
181 kinegigdki gmffqsmatf ftgfivgftr gwkltlvila ispvlglsaa vwakilssft
241 dkellayaka gavaeevlaa irtviafggq kkelerynkn leeakrigik kaitanisig
301 aaflliyasy alafwygttl vlsgeysigq vltvffsvli gafsvqqasp sieafanarg
361 aayeifkiid nkpsidsysk sghkpdnikg nlefrnvhfs ypsrkevki kgnlnkvqsg
421 qtvalvgngs cgksttvqlm qrlydptegm vsvdgqdir invrflreii gvvsqepvlf
481 attiaeniry grenvtmdei ekavkeanay dfimklphkf dtlvgergaq lsggkqria
541 iaralvrnpk illldeatsa ldteseavvq valdkarkgr ttiviahrls tvrnadviag
601 fddgvivekg nhdelmkek iyfklvtmq agnevelena adeskseida lemssndsrs
661 slirkrstrr svrgsqadr klstkealde sippvsfwri mklnltewpy fvvgvfcaii
721 ngglqafai ifskiigvft riddpetkrq nsnlfsllfl algiisfitf flqgftfgka
781 geiltkrlry mvfrsmlrqd vswfddpnt tgalttrlan daaqvkgag srlavitqni
841 anlgtgiiis fiygwqltll llaivpii ai agvvenkmls ggalkdkkel egsgkiatea
901 ienfrtvvsl tqeqkfehmy aqslqvpyn slrkahifgi tfsftqammy fsyagcfrfg
961 aylvahklms fedvllvfa vvfamavvq vssfapdyak akisaahiim iiektplids
1021 ysteglmnt legnvtfgev vfnyptrpdi pvlqglslev kkgqtlalvg ssgcgkstvv
1081 qlerfydpl agkvllldgke ikrlnvqwr ahlgivsqep ilfdcsiaen iaygdnsrvv
1141 sqeeivraak eanihafies lpnkystkv gkgtqlsggq kqriaiaral vrqphillld
1201 eatsaltes ekvvqealdk aregrtcivi ahrlstiqna dliivvfqng vkehghthqql
1261 laqkgyfsm vsvqagtkrq

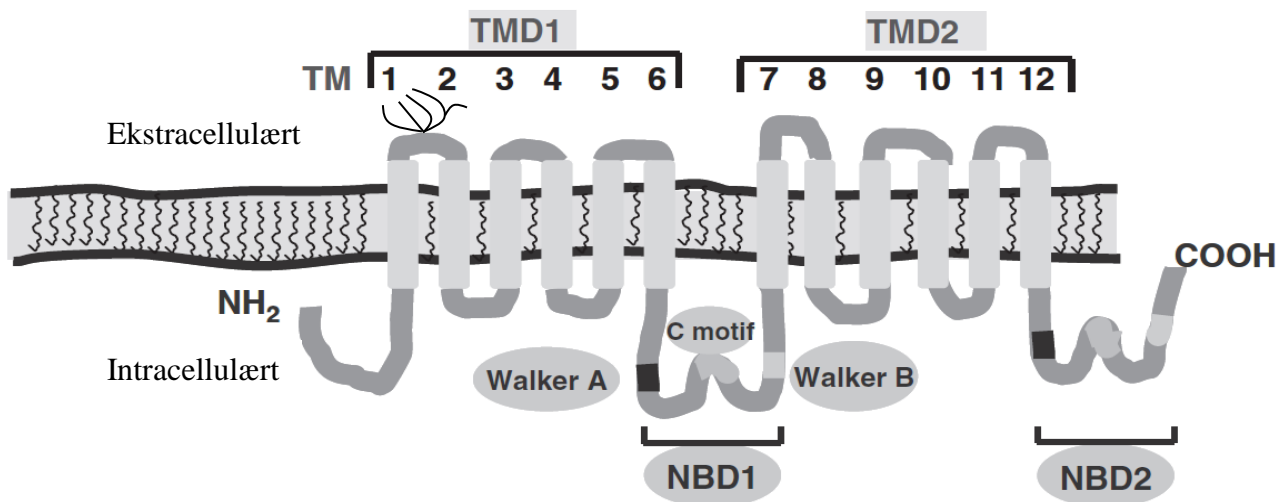
```

Figur 2. En oversikt over sekvensen til P-glykoprotein [33].

Struktur

P-gp består av 1280 aminosyrer (figur 2) og syntetiseres som et 140 kDa protein. Dette modnes ved glykosylering til et 170 kDa glykoprotein [34]. Glykosyleringen antas å påvirke ekspresjonen av P-gp i plasmamembranen og transportørens normalfunksjon [35]. Den ikke-glykosylerte formen av proteinet uttrykkes i et lavere antall i cellemembranen, og mangler

enkelte av egenskapene til den glykosylerte formen. P-gp er en fulltransportør av to homologe halvdelene [36] (figur 3), sammenkoblet med en linker-region bestående av seksti aminosyrer [37]. Hver av de to halvdelene består av seks transmembrane segmenter som utgjør et transmembrant domene. Disse domenene orienterer seg slik at det dannes en vei for transport gjennom membranen. De transmembrane domenene etterfølges av hvert sitt nukleotidbindende domene lokalisert intracellulært [24]. Hvert nukleotidbindende domene består av sekvenser av omtrent 220 aminosyrer, Walker A- og Walker B- sekvensene på hver side av C-linker regionen [38], og i tillegg D-, H-, Q- og A loopene. Disse er involvert i binding og hydrolyse av ATP [37]. Studier viser at proteinet innehar flere substratbindingssteder og allosteriske bindingssteder som er lokalisert i de transmembrane domenene [39-41]. De mange bindingsstedene ansees som en mulig forklaring på transportørens brede substratspesifisitet.

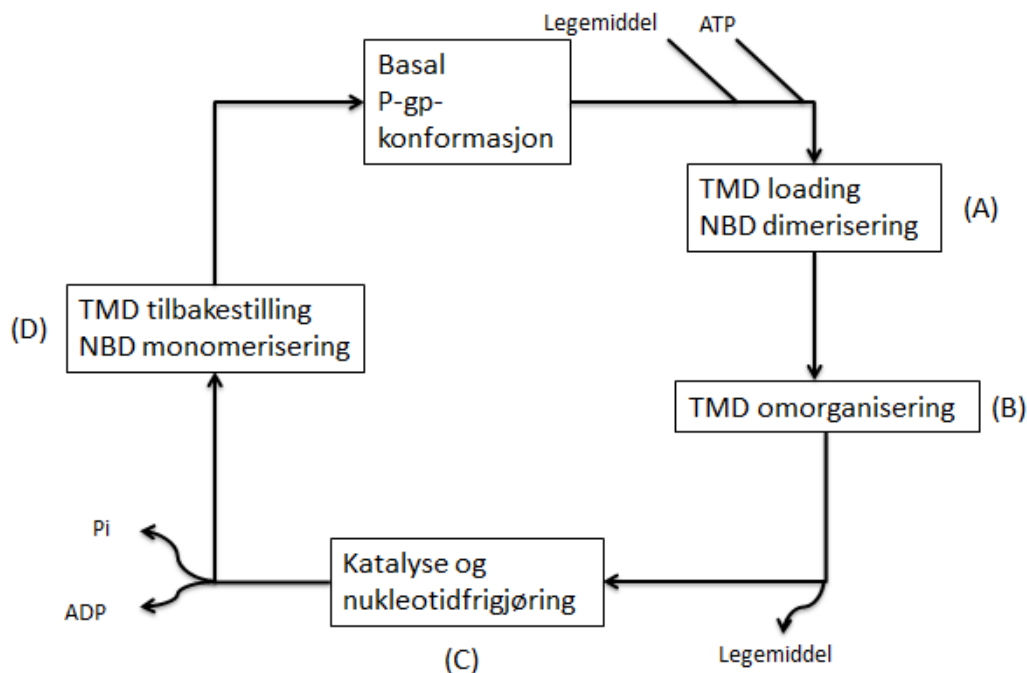


Figur 3. P-glykoproteinets struktur. Transportøren består av to homologe halvdelene av et transmembrant domene (TMD) og et nukleotidbindende domene (NBD). Halvdelene er sammenkoblet av en linker-region av Walker A og Walker B sekvensene på hver side av C-linker-regionen (C-motif). Proteinets første ekstracellulære sekvens er glykosylert. Modifisert fra Zhou SF et al. [24].

Transportmekanisme

Transport av molekyler over cellemembranen ved hjelp av P-gp er en kompleks funksjon som involverer kommunikasjon mellom ulike bindingssteder og de nukleotidbindende domenene (figur 4). Innledningsvis har transportøren en konformasjon der høyaffinitetsbindingssteder for substratene er rettet inn i cellen, og de nukleotidbindende domenene befinner seg i en åpen konfigurasjon. Substratene binder et av bindingsstedene i de transmembrane domenene, og dette igangsetter kommunikasjon mellom de transmembrane domenene og de nukleotidbindende domenene [42]. ATP binding til de nukleotidbindende domenene fører til

konformasjonsendringer i de transmembrane domenene [43]. Når substratet og ATP er bundet, endres konformasjonen ytterligere og de nukleotidbindende domenene danner en dimer [44]. For å muliggjøre en effektiv transport må høyaffinitetsbindings seter inne i cellen omdannes til lavaffinitetsbindings seter utenfor membranen, slik at substratet kan frigjøres. Dette inntreffer enten ved dimeriseringen av de nukleotidbindende domenene, eller når dimeren brytes. Etter substratfrigjøringen følger hydrolyse av nukleotidet og en ADP- og fosfat -bundet transportør dannes. Under hydrolysen skjer ytterligere konformasjonsendringer. Deretter frigjøres ADP og fosfat, og transportøren tilbakestilles til utgangspunktet [42].



Figur 4. Mekanisme for transport av P-glykoprotein. A: Interaksjonen mellom legemiddel og transportør inntreffer, og de nukleotidbindende domenene (NBD) dimeriserer. B: De transmembrane domenene (TMD) omorganiseres slik at legemidlet frigjøres på motsatt side av membranen. C: ATP hydrolyseres og frigjøres fra NBD. D: NBD-dimeren separeres og TMD orienteres tilbake til basalkonformasjonen. Modifisert fra Callagan R et al. [42].

Substrater

Transportøren har mange og svært ulike substrater. Størrelsen varierer fra 330 Da til over 4000 Da [45, 46], og substratenes struktur varierer i stor grad. P-gp transporterer alt fra små organiske kationer, karbohydrater og aminosyrer, til makromolekyler som proteiner og polysakkarider [24]. Både eksogene (tabell 1) og endogene molekyler transporteres. Studier indikerer at mulige endogene substrater er plateaktiverende faktor [47], glykolipider [48], kortkjedet fosfatidylkolin [49] og cytokiner som interleukin (IL)-2, IL-4 og interferon- γ [50, 51]. Fellestrekk ved mange av substratene er at de har likheter i avstanden mellom

hydrogenbindingsakseptorer i deres struktur. Det er ofte to eller tre grupper med en avstand på 2,5 og 4,6 Å [52]. Substratenes bindingsaffinitet er vist å øke med antall hydrogenbindingsakseptorer med disse avstandene [53]. Mange av substratene har også fellestrekk ved at de er svake amfifile, relativt hydrofobe, inneholder ofte en aromatisk ring og et positivt ladet nitrogen atom [54]. I tillegg til en rekke substrater finnes stoffer som inhiberer og induserer P-gp (tabell 1).

Som følge av sin brede substratspesifisitet og distribusjon i mange ulike vev, påvirker P-gp distribusjonen av mange legemidler. I tillegg spiller transportøren muligens også en rolle i regulering av apoptose [55], og i regulering av volum-aktiverede kloridkanaler [56].

Tabell 1 Eksempler på substrater, indusere og inhibitorer av P-glykoprotein. Modifisert fra Zhou SF et al. [24]

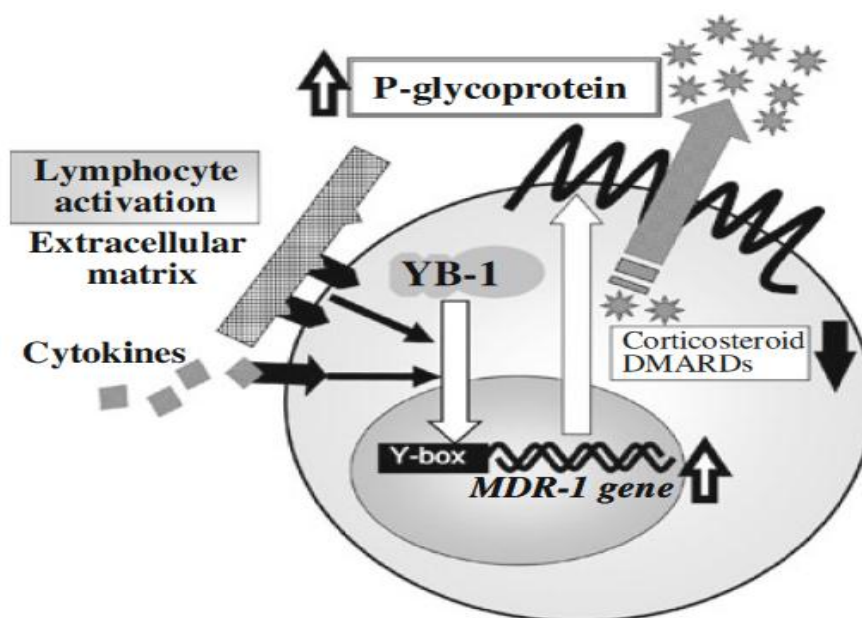
Substrater	Indusere	Inhibitorer
Amitryptilin	Amiodaron	Amiodaron
Ciklosporin	Bromokriptin	Atorvastatin
Cortisol	Doxorubicin	Bromokriptin
Dexametason	Erytromycin	Ciklosporin
Digoxin	Etoposid	Cortisol
Docetaxel	Fenobarbital	Diltiazem
Doxorubicin	Hypericum Perforatum	Erytromycin
Erytromycin	Indinavir	Ketokonazol
Etoposid	Insulin	Kinidin
Imatinib	Morfin	Progesteron
Indinavir	Nifedipin	Ritonavir
Irinotekan	Rifampicin	Takrolimus
Ketokonazol	Takrolimus	Vinblastin
Kinidin	Vinkristin	
Klorpromasin		
Loperamid		
Losartan		
Metylprednisolon		
Morfin		
Rifampicin		
Ritonavir		
Saquinavir		
Sirolimus		
Takrolimus		
Verapamil		
Vinkristin		

Overlappende substratspesifisitet mellom P-gp og CYP3A4

CYP3A4 og P-gp har ofte felles lokalisering og deler mange substrater og inhibitorer som for eksempel erytromycin, itraconazol og HIV-proteasehemmere [57]. Samlokaliseringen av proteinene kan medføre at mengde substrat som metaboliseres av CYP3A4, delvis kontrolleres av P-gp. Et eksempel på dette er i tarmen hvor substrater som absorberes i enterocytene pumpes ut av P-gp. Dette gir økt transittid, slik at CYP3A4 får bedre tilgang på substratene. Dermed øker metabolismen og substratenes biotilgjengelighet reduseres [58].

Regulering av ekspresjonen i lymfocytter

Hvilende lymfocytter uttrykker P-gp i liten grad, men ekspresjonen av proteinet øker ved inflammasjon [32, 59]. Tsujimura et al. har vist at transkripsjonen av *ABCB1* er direkte regulert av transkripsjonsfaktoren humant Y-boks-bindende protein-1 (YB-1) [59]. Transkripsjonsfaktoren påvirkes igjen av cytokinet IL-2, ved at denne aktiverer og fremmer translokasjon av YB-1 til kjernen (figur 5). YB-1 induserer deretter transkripsjonen av *ABCB1* og dermed øker ekspresjonen av P-gp i lymfocyttenes cellemembran [32, 59, 60]. Hyaluronan, en bestanddel av ekstracellulær matriks, er også vist å indusere ekspresjonen av transportøren ved aktivering av YB-1.



Figur 5. Oversikt over regulering av *ABCB1*(*MDR1*) i lymfocytter, og påfølgende økt ekspresjon av P-gp i cellemembranen. Hentet fra artikkel av Tsujimura et. al [32].

1.3 P-glykoproteins rolle i behandlingsresistens

Resistens mot legemiddelbehandling er et velkjent klinisk problem innen enkelte terapiområder. Cytostatika, immunosuppressiva, antiepileptika og HIV-proteasehemmere er eksempler på viktige legemiddelgrupper hvor den kliniske effekten påvirkes av P-gp [61]. Interaksjoner med legemiddeltransportøren fører til endret absorpsjon og vevsdistribusjon, og kan medføre behandlingsresistens ved at legemidlet ikke når sitt målmolekyl [24]. Transportørens betydning i behandlingsresistens påvirkes av ulike polymorfe former av proteinet, grad av ekspresjon, interaksjoner med andre xenobiotika og antakelig om proteinet er glykosylert eller ikke [24, 35, 62]. I tillegg til transportfunksjonen spekuleres det i om andre mekanismer kan bidra til behandlingsresistens. Innen kreftbehandling er det foreslått at P-gp kan bidra til resistens ved å påvirke apoptose [63].

Enkelte immunosuppressiva er substrater for P-gp og har sitt virkested intracellulært i lymfocytter. Behandlingseffekten av disse kan dermed påvirkes ved endret transportør-ekspresjon og funksjon. Det er i de fleste tidligere studier blitt konkludert med at P-gp ekspresjonen nedreguleres ved inflammasjon [64], men i senere tid har det motsatte blitt vist i lymfocytter [32]. Tsujimura et al. har vist høy ekspresjon av P-gp i CD4+, CD8+ og CD19+ lymfocytter hos pasienter med systemisk lupus erythomatosus. Ekspresjonen av transportøren korrelerte med sykdomsaktiviteten, og var høyere hos pasienter som ikke responderte på behandling med prednisolon [65]. I en annen studie utført av Yudoh K et al. ble det vist økt ekspresjon av P-gp i CD4+ Th1-celler hos pasienter med revmatoid artritt [66]. Også i denne studien var P-gp ekspresjonen signifikant høyere hos legemiddelresistente enn hos pasienter som responderte på behandlingen. Dette støttes av en studie utført av Suzuki et al. [67]. I tillegg er det i lymfocytter isolert fra nyretransplanterte pasienter med akutt reaksjon vist en oppregulering av P-gp, noe som i teorien vil føre til lavere intracellulær konsentrasjon av f.eks. ciklosporin [68]. Dette ble vist av Falck et al. som målte lavere intracellulære konsentrasjoner av ciklosporin i T-lymfocytter tre dager før en reaksjonsepisode ble oppdaget [69]. Studiene indikerer økt ekspresjon av transportøren ved inflammasjon, og at oppreguleringen gir utfordringer knyttet til legemiddelbehandling med substrater som har sitt virkested intracellulært i lymfocytter.

1.4 Proteomikk

Proteomikk er studien av hele eller store deler av proteomet, på samme måte som at genomikk er studien av hele eller store deler av genomet. Proteomet er en betegnelse på alle uttrykte proteiner i for eksempel en celle. Alle cellene i en organisme har de samme genene som koder for proteiner, men ikke alle proteinene uttrykkes i hver celle. Et individ har derfor ett genom, men mange proteomer. Proteomikk skiller seg fra proteinkjemi ved at fokuset baserer seg på komplekse proteinblandinger, samspill mellom proteiner og deres rolle som del av et større system heller enn studie av individuelle proteins struktur og funksjon. Proteomikk egner seg til kartlegging av proteomet, undersøke proteinekspressjonen ved ulike tilstander (sykdom, celler i utvikling etc.), kartlegge protein-protein interaksjoner og undersøke post-translasjonelle modifikasjoner [70]. Det kan skiller mellom «discovery» proteomikk (som beskrevet over) og «targeted proteomikk». Ved «targeted proteomikk» er målet å monitorere få utvalgte proteiner av interesse, med høy sensitivitet, god repeterbarhet og med kvantitativ nøyaktighet [71]. Targeted proteomikk er benyttet i denne oppgaven. Etter analysen med orbitrap som detektor, ble selekterte masser studert, slik at deteksjon av et enkelt peptid ble mulig.

For utførelse av proteomikkstudier kreves fire essensielle verktøy: databaser med proteinsekvenser og komplette gensekvenser, massespektrometer, programvare som kan koble MS-data til spesifikke proteinsekvenser og separasjonsteknikker for proteiner [70]. MS-baserte analyser kan grovt deles i to kategorier; top-down og bottom-up. Ved top-down analyseres intakte proteiner. Ved bottom-up strategi isoleres innledningsvis proteiner før disse proteolyseres ved kjemiske eller enzymatiske prosesser til peptider, og peptidene analyseres og representerer de proteolyserte proteinene [72]. Peptidene separeres typisk etter fysikalsk-kjemiske egenskaper ved væske-kromatografi og analyseres med MS [73, 74]. I denne oppgaven er bottom-up strategien benyttet.

1.5 Signaturpeptid

Et protein proteolyseres ved hjelp av spesifikke proteaser, for eksempel trypsin, slik at de samme peptidene dannes hver gang proteolysen utføres. Blant disse peptidene velges ved hjelp av et dataprogram (f.eks. Proteome Discoverer fra Thermo Scientific) en aminosyre-sekvens som er unik for proteinet. Ved MS/MS analysen vil signalet for peptidet representere

proteinet fra prøven. Dette kan brukes i både kvalitative og kvantitative analyser av proteiner. Peptidet kalles et signaturpeptid og inneholder typisk mellom 6 og 20 aminosyrer, noe som er ideelt for MS-analyse. En sekvens med færre enn 6 aminosyrer er oftest for kort til å være unikt for proteinet [70]. Andre karakteristika av betydning ved valg av signaturpeptid, er at det gir en høy respons ved analyse og har en egnet retensjonstid [75].

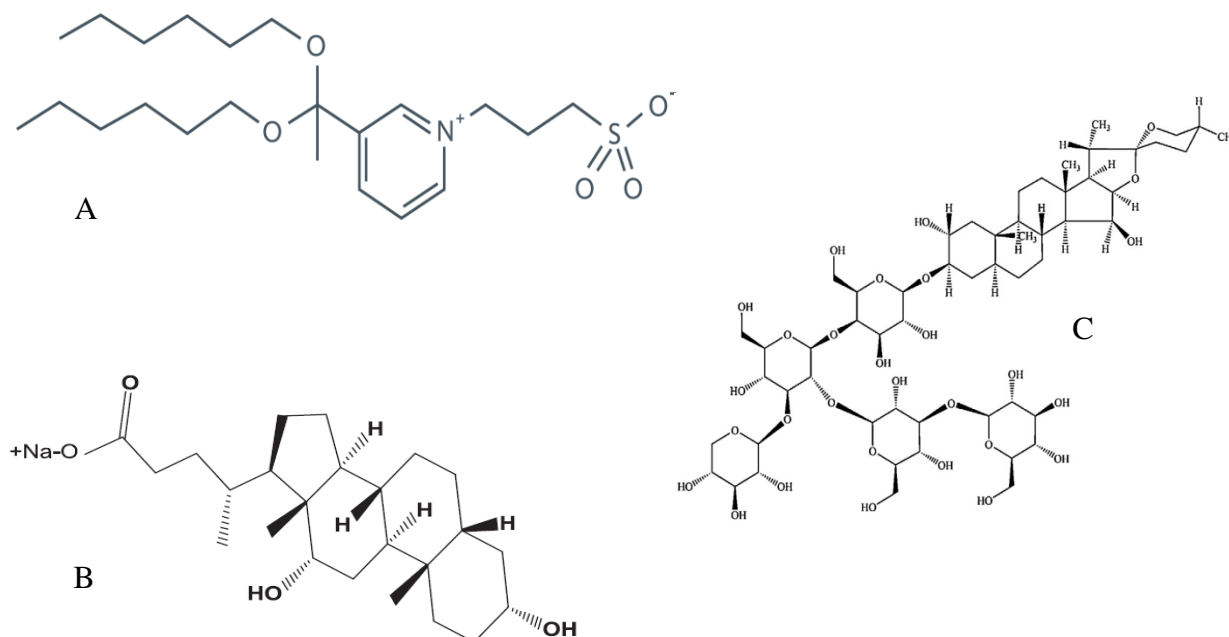
1.6 utfordringer med membranbunnede proteiner

Det er anslått at 23,4% av genene i det humane genom koder for transmembrane proteiner [76], og defekter i disse er vist å ha betydning for ulike sykdommer [77-79]. Å kunne analysere disse er derfor av stor interesse, men byr på ulike utfordringer. Celler uttrykker en rekke proteiner, og en av hovedutfordringene er knyttet til det lave uttrykket av membranproteiner i forhold til den totale mengden uttrykte proteiner. Dette medfører at oppkonsentrering av analytten blir nødvendig. Proteinenes lave løselighet i vandige buffere gir også utfordringer ved analyse. Mange membranproteiner inneholder transmembrane sekvenser av hydrofobe aminosyrer, som gjør dem lite vannløselige. Proteinenes grad av hydrofobisitet avhenger av antall transmembrane sekvenser [80]. Jo flere transmembrane sekvenser, jo mer øker proteinenes hydrofobe karakter. Syrer, ulike løsningsmidler og surfaktanter kan benyttes for å øke proteinenes løselighet [80]. I denne oppgaven ble ulike surfaktanter benyttet for å øke løseligheten av P-gp.

Surfaktanter

Surfaktanter er amfifile stoffer som inneholder både hydrofile og hydrofobe grupper. Stoffene kategoriseres som ioniske, ikke-ioniske eller zwitterioniske avhengig av om molekylet er påført ladning eller ikke. Tilsats av surfaktanter ansees som den beste metoden for å øke membranproteiners løselighet. Dette skyldes at deres amfifile karakter delvis etterligner fosfolipidlaget i cellemembranen [80]. Surfaktanter har en kritisk micellekonsentrasjon. Ved konsentrasjoner over denne, ordner molekylene seg i aggregater (miceller). I en vandig løsning vil molekylene i en micelle ordne seg slik at de hydrofile delene av molekylet er i kontakt med løsningen og de hydrofobe delene orienterer seg inn i micellen. Mengde og type surfaktant som kreves for tilstrekkelig oppløsning av membranproteiner avhenger blant annet av surfaktantens og analyttens fysikalsk-kjemiske egenskaper, type prøvebuffer, surfaktantens kompatibilitet med metoden, om proteinets funksjon må bevares eller ikke og om protein-protein interaksjoner må opprettholdes [81, 82].

Surfaktantene digitonin (ikke-ionisk), PPS[®] Silent (zwitterionsik) og natrium deoxycholot (SDC) (anionisk) ble benyttet i denne oppgaven (figur 6).



Figur 6. Strukturformelen til A: PPS (zwitterion) [83], B: natrium deoxycholot (SDC, anion) [84] og C: digitonin (ikke-ionisk) [85].

1.7 Apparatur for homogenisering av celler

For å isolere P-gp fra mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) må cellene homogeniseres slik at membranfragmenter dannes. Dette kan utføres på ulike måter. Dounce homogenisator, sonikering og bead-beating med Precellys[®] 24 ble benyttet i denne oppgaven.

Dounce homogenisator

Dounce homogenisator består av en glassbeholder formet som en sylinder med lukket bunn, og en tilhørende pistill av glass eller teflon. Pistillen er spesialtilpasset slik at diameteren er nesten like stor som glassbeholderens indre diameter. Ved rotasjon og bevegelse av pistillen opp og ned i glassbeholderen (slag) blir væsken tvunget til å bevege seg i det smale rommet mellom glassbeholderen og pistillen slik at cellene skades. Metoden er relativt skånsom slik at organeller og deler av cellemembranen vil være intakt, men den er også tidkrevende [86].

Sonikator

Ved sonikering homogeniseres cellene ved hjelp av ultralyd. Dette kan utføres i et ultralydbad, eller ved metoder der apparaturen har et lydhode som føres direkte ned i prøven. Intensiteten ved sistnevnte metode er betydelig høyere (100 ganger) enn ved ultralydbad. Når ultralydbølger sendes ut i mediet dannes små hulrom i løsningen. Hulrommene har et negativt trykk, vakuum, og deres størrelse varierer med intensiteten. Jo høyere intensitet, jo større blir hulrommene. Etter noen mikrosekunder kollapser hulrommene og det skapes en sjokkbølge i mediet som fører til at celler og cellekomponenter ødelegges. Større hulrom gir opphav til en kraftigere sjokkbølge. Metoden er svært effektiv og behandlingen er kraftig, slik at de fleste celleprøver brytes ned på få sekunder. Begrensninger ved metoden er at den utvikler varme og er lite effektiv på faste vev [87, 88].

Bead-beaters

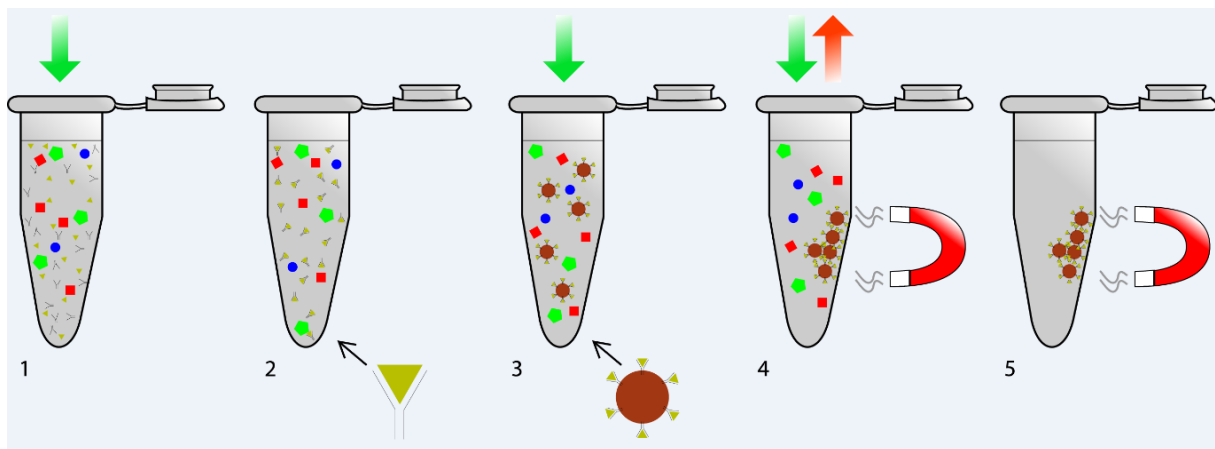
Homogenisering av biologiske materialer med bead-beaters er en effektiv metode. Prøvene og en egnet buffer plasseres i rør inneholdende små kuler av keramikk, glass eller metall. Materialet homogeniseres ved at rørene påføres kraftige bevegelser i ulike retninger, slik at kulene settes i bevegelse og knuser materialet. Ved å variere rørene og kulenes materiale og størrelse, maskinens hastighet (rpm) og antall sykluser, kan ulike biologiske materialer homogeniseres. Precellys[®]24 er en type bead-beater. Apparatet kan homogenisere opptil 24 prøver samtidig, og typisk tid for utførelsen er 30 sekunder. Sammenlignet med tradisjonelle homogeniseringsmetoder (morter og pistill, vortex miksing etc.), gir behandling med Precellys[®] et høyere utbytte av intakt DNA, RNA og proteiner [89].

1.8 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelse er nødvendig for å oppnå sensitive og nøyaktige analyser av proteiner i lave konsentrasjoner løst i komplekse matriser [70]. Ulike metoder kan benyttes, men hensikten er den samme; å fjerne forurensninger slik at matriksens kompleksitet reduseres, og hvis nødvendig oppkonsentrere analytten [90]. Ved MS deteksjon vil sjansen for å identifisere mange peptider øke ved redusert matrikskompleksitet, og MS-detektoren kan lettere gi nyttige data [70]. I denne oppgaven er immunoekstraksjon, proteolyse og fast-fase ekstraksjon benyttet.

Immunoekstraksjon

Immunoekstraksjon (IP) av utvalgte proteiner ved hjelp av antistoffer, muliggjør selektiv isolering og oppkonsentrering av proteiner (figur 7). Ekstraksjonen består normalt av fire hovedtrinn; immobilisering av antistoff, tilsetning av antigen, vask og eluering av antigen. Antistoffene kan immobiliseres ved binding til f.eks. brønner eller magnetiske kuler [91]. I denne oppgaven ble magnetiske kuler dekket med protein G benyttet, og to ulike antistoffer. Disse ble bundet til kulene via protein G. Immobiliseringen av antistoffene ble utført både før (direkte IP) og etter (indirekte IP) antistoff-antigen kompleksene ble dannet.



Figur 7. Illustrasjon av immunoekstraksjon: 1. Prøven og antistoffene tilsettes. 2. Antistoff-antigenkomplekser dannes. 3. Magnetiske kuler tilsettes og det dannes komplekser av kuler, antistoff og antigen. 4. Prøven plasseres i magnetstativ og vaskes slik at forurensinger fjernes. 5. Det ønskede proteinet er isolert fra prøvematriks.

Proteolyse av proteiner med trypsin

For å øke analysemetodenes sensitivitet, proteolyseres proteiner til peptider før analysen utføres. Peptider bestående av omtrent 6-20 aminosyrer er ideelle for MS analyse. Proteolysen kan utføres med ulike proteaser eller ved kjemisk spaltning. Proteolyse med trypsin er den hyppigst brukte metoden, og ble benyttet i denne oppgaven [70]. Trypsin er en serin-protease som hydrolyserer proteiner på karboksylsiden av aminosyrene arginin og lysin, når disse ikke er etterfulgt av en prolin i aminosyrekjeden [92]. Avstanden mellom arginin og lysin i mange proteiner er slik at peptidene som dannes får en lengde som egner seg til analyse ved LC-MS/MS [70].

For store proteiner som P-gp, er forbehandling med 1,4-ditiotreitol (DTT) og 2-jodeddiksyre (IAA) av betydning. DTT reduserer disulfidbindinger og denaturerer på denne måten proteiner. Etterbehandling med IAA gir alkylering av sulfhydrylgruppene på cystein, og

hindrer dannelse av nye disulfidbindinger i proteinet. Denatureringen forbedrer proteasens tilgang til peptidbindingene og kan dermed forbedre proteolysen [93].

Fast-fase-ekstraksjon

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) er en metode for opprensing, isolering og oppkonsentrering av stoffer. Avhengig av stoffers fysikalsk-kjemiske egenskaper vil disse fordele seg ulikt mellom et fast stoff (sorbent) og en væske. Dersom stoffets interaksjon er kraftigere med sorbenten enn væsken, vil stoffet isoleres på sorbentens overflate. Væsken presses gjennom sorbenten ved sentrifugering eller vakuum. SPE utføres i fire trinn:

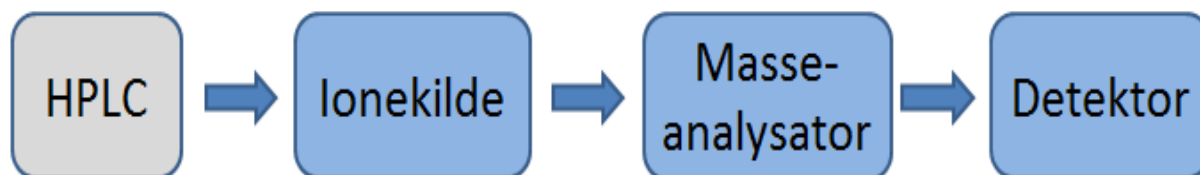
1. Kondisjonering: et løsningsmiddel som fukter funksjonelle grupper på sorbenten tilsettes, slik at de funksjonelle gruppene reiser seg og overflatearealet øker.
2. Tilsetting av prøve: ønsket prøvevolum tilsettes i en prøveløsning med svak løsemiddelstyrke.
3. Vask: forurensninger som er svakere bundet til sorbenten enn analytten vaskes bort. Vaskeløsningen bør ha en elueringsstyrke som er sterkere enn prøveløsningen, men må ikke være så sterk at analytten vaskes ut.
4. Eluering: et løsningsmiddel med tilstrekkelig elueringsstyrke til at analytten slipper sorbenten, benyttes. Elueringsstyrken må ikke være for sterk slik at unødvendige forurensninger kommer med [90].

1.9 LC-MS/MS

Separasjon: væskekromatografi (LC)

Væskekromatografi er en separasjonsteknikk der analytten befinner seg i væskefase og transporteres gjennom en kolonne i en væske (mobilfasen). Det skilles mellom normalfasekromatografi, omvendtfasekromatografi og eksklusjonskromatografi. For separasjon av peptider er omvendtfasekromatografi den hyppigst anvendte metoden [94], og er også benyttet i denne oppgaven. Kolonnen er da pakket med en stasjonærfase av hydrofobt materiale, oftest C-18 materiale (bundet til silika), og mobilfasen består av en vandig bufferløsning og organiske løsemidler som er blandbare med vann (f.eks. acetonitril og metanol). Separasjonen baserer seg på stoffenes ulike polaritet som gir opphav til ulike

interaksjoner med stasjonærfasen. Avhengig av stoffenes hydrofobe interaksjoner, vil de retarderes ulikt og separeres på sin vei gjennom kolonnen [90].



Figur 8. Proteinene separeres i HPLC-systemet og føres deretter inn i massespektrometeret som består av tre hoveddeler; ionekilde, masseanalysator og detektor.

Ionekilde: elektropray ionisering (ESI)

Analyse av peptider med et massespektrometer avhenger av at disse befinner seg som ioner i gassfase. Derfor må peptidene omdannes fra væskefase til gassfase ved fordamping og påføres en ladning. Elektropray ionisering (ESI) er den mest brukte metoden for konverteringen. Væskestrømmen kommer fra LC-systemet og inn i ionekilden [95] (figur 8), hvor væsken strømmer gjennom et kapillær påført høy spenning (2-5 kV), og sprayes deretter ut slik at aerosoler fylt med ladede peptider dannes. Grunnet både spenningsforskjellen og tørkegassen, blir dråpene raskt mindre og de ladede molekylene nærmer seg hverandre. På grunn av repulsive krefter mellom ionene eksploderer dråpene til enda mindre dråper i en prosess kalt «coulomb explosion». Denne prosessen gjentas til peptidionene befinner seg som enkeltioner i gassfase. ESI kan utføres i positiv eller negativ mode, avhengig av om kapillæret har positiv eller negativ ladning. I denne metoden er positiv mode benyttet, og peptidene ble derfor påført en positiv ladning [70, 95, 96].

Deteksjon: massespektrometri (MS)

Peptidene kommer fra ionekilden som ioner i gassfase (figur 7). Dette muliggjør deteksjon med MS, som kun kan utføres under slike forhold. En MS består av tre hoveddeler: ionekilden hvor analytten ioniseres og omdannes til gassfase, masseanalysatoren hvor forholdet mellom masse og ladning (m/z) bestemmes, og en detektor som angir antall molekyler med en gitt m/z [97]. I denne oppgaven ble Orbitrap benyttet. Denne masseanalysatoren egner seg godt til analyse av proteiner, peptider, oligosakkarider og glykopeptider. Blant fordelene med bruk av Orbitrap masseanalysator er høy oppløsning (opp til 150 000), og høy grad av massenøyaktighet (2-5 ppm). I en slik masseanalysator vil

innledningsvis peptidene ioniseres av en elektropray ionisator. Ionene som dannes transporteres i flere trinn til en lineær kvadrupol ionefelle, også kalt en lagringskvadrupol. Når et tilstrekkelig antall ioner er akkumulert, åpnes lagringskvadrupolen slik at peptidene overføres ved elektrostatiske krefter til Orbitrap masseanalysatoren, hvor peptidionenes masse over ladning (m/z) bestemmes [98].

1.10 Hensikten med oppgaven

P-gp uttrykkes i lymfocytter og gir utfordringer knyttet til behandling med legemidler som er substrater for transportøren, og har sitt virkested intracellulært i cellene. Ekspresjonen av transportøren er vist å oppreguleres i denne typen celler ved inflammasjon, og dette gir opphav til økt fare for behandlingsresistens ved immunosuppresjon av transplanterte pasienter, med påfølgende økt fare for rejeksjon. Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en metode for å kvantifisere P-gp i lymfocytter ved hjelp av LC-MS/MS. En slik metode vil være nyttig for å studere forholdet mellom P-gp-uttrykk og grad av immunosuppresjon.

2 Materialer og metode

2.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Leverandør
<i>Standard:</i>	
Membraner fra transfekterte insektceller (<i>ABCBI</i>)	BD Biosciences, San Jose, California, U.S.A.
<i>Til immunoekstraksjon:</i>	
Fosfatbufret saltvann (PBS)	Lonza, Verviers, Belgia
Tween 20	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
Mus-anti-MDR1 UIC-2	Millipore A/S, Norge
Mus-anti MDR1 JSB-1	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
<i>Til proteolyse:</i>	
DL-ditiotreitol (DTT) ($\geq 99,0\%$)	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
Jodeddiksyre (IAA) ($\geq 99,0\%$)	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
Ammoniumbikarbonat (ABC) ($\geq 99,5\%$)	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
Trypsin fra bovin pankreas	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
<i>Til optimalisering av metoden:</i>	
Natrium deoxycholat (SDC)	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
PPS [®] Silent Surfaktant	Protein Discovery inc, Knoxville, TN, U.S.A
Digitonin	Sigma-Aldrich inc., St.Louis, MO, U.S.A.
Complete Mini proteaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland
Tris-(hydroksymetyl)aminometan	VWR international, Leuven, Belgia
Glysin	VWR international, Leuven, Belgia
Saltsyre, HCl, 35%	VWR international, Leuven, Belgia

Kjemikalier	Leverandør
<i>Til fast-fase-ekstraksjon:</i>	
Acetonitril, for LC-MS ($\geq 99,9\%$)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Metanol, for LC-MS ($\geq 99,9\%$)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Trifluoroeddiksyre ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, U.S.A.
<i>Til homogeniseringsforsøk:</i>	
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumkarbonat (Na_2CO_3)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
<i>Til LC-MS/MS:</i>	
Maursyre, for MS ($\sim 98\%$)	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, U.S.A.
Acetonitril, for LC-MS ($\geq 99,9\%$)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Metanol, for LC-MS ($\geq 99,9\%$)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
<i>Til gelelektroforese:</i>	
NuPAGE [®] Antioksidant	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
NuPAGE [®] MOPS SDS elektroforesebuffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
NuPAGE [®] LDS prøvebuffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
Standard: Precision Plus Protein [™] Standard	Bio-Rad Laboratories Inc., California, U.S.A
Eddiksyre (100%)	VWR international, Leuven, Belgia
Coomassi Brilliant Blue	Bio-Rad Laboratories Inc., California, U.S.A
<i>Andre kjemikalier:</i>	
Nitrogengass (N_2)	AGA Progas A/S, Oslo, Norge
Etylacetat	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, U.S.A.
Trypanblått 0,4% oppløsning	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, U.S.A.

2.2 Utstyr

Utstyr	Produsent
<i>Til immunoekstraksjon:</i>	
Prøveblender: HulaMixer™	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
Magnetstativ: Dynal MPC® -M	Dynal A.S, Oslo, Norge
Magnetiske kuler: Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
<i>Til proteolyse:</i>	
Thermomixer Comfort eppendorf 1,5 mL	Fisher Scientific, Oslo, Norge
<i>Til fast-fase ekstraksjon:</i>	
Universal 32R kjølesentrifuge	Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
Silika C8 materiale til fast-fase-ekstraksjon:	Phenomenex Inc., Torrance, CA, U.S.A.
<i>Til LC-MS/MS:</i>	
Ultimate 3000 system bestående av:	
Pumpe: LPG-3x00 micropump	Dionex corp, Sunnyvale, CA, U.S.A.
Autosampler: WPS3000RS	Dionex corp, Sunnyvale, CA, U.S.A.
Flow manager: FLM 3300	Dionex corp, Sunnyvale, CA, U.S.A.
LTQ XL ionefelle MS	Thermo, San José, CA, U.S.A
LTQ-Orbitrap-MS	Thermo, San José, CA, U.S.A.
Separasjonskolonne (15 cm x 75 µm, silika C18 materiale, 3 µm partikkelstørrelse)	Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.
Programvare: Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.
<i>Til homogenisering og isolering av PBMC:</i>	
Vibra Cell sonikator	Sonics & Materials inc. Danbury, CT, U.S.A.
Precellys® 24	Bertin Corp, Rockville, MD, U.S.A.
Dounce homogenisator: kontes glass Dual1® 20	VWR international, Leuven, Belgia

Utstyr	Produsent
Ultralydbad, Branson 220	Branson Ultrasonic Corp, Danbury, CT, U.S.A.
Multifuge 4KR Heraeus	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Tyskland
Optima™ MAX Ultracentrifuge 130 000 rpm	Beckman Coulter, Fullerton, CA, U.S.A.
Universal 32R kjølesentrifuge	Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
Leucosep™ aseptiske rør (12 mL)	Greiner Bio-One North America Inc., Monroe, NC, U.S.A.
Falconrør (14 mL)	BD Biosciences, San Jose, California, U.S.A.
Countess celleteller	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
<i>Til gelelektroforese:</i>	
Ferdigstøpt gel: NuPAGE® 4-12% Bis-Tris	Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.
XCell SureLock™ Elektroforesecelle	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Electrophoresis Power Supply- EPS 600	Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, U.S.A.
<i>Øvrig utstyr:</i>	
Wirlmikser	IKA Works, Inc., Wilmington, NC, U.S.A.
pH-meter	Beckman, Coulter, Inc., Fullerton, CA, U.S.A.
Vekt, Metler AE 2000	Mettler Toledo, Sveits
Vannrenseanlegg: Milli-Q® Integral 3	Millipore A/S, Norge
Automatpipetter Finnpipette®	Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.
Pipettespisser (wide mouth) Finntip®	Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.
Glasspasteurpipetter	VWR international, Leuven, Belgia
Eppendorfrør, protein LoBind (1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Eppendorf safe-lock rør (2,0 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland

Utstyr	Produsent
Vialer (32 x 11,6 mm)	Matriks AS, Oslo, Norge
Hvite korker til vialer	Holger Teknologi AS, Oslo, Norge
Inserts (31 x 6 mm, 0,1 mL)	VWR international, Leuven, Belgia
Bordsentrifuge	Labnet international Inc., Woodbridge, NJ, U.S.A.

2.3 Løsninger

Løsning til direkte immunoekstraksjon:

Fosfatbufret saltvann med 0,02% Tween 20 (PBST)	20 µL Tween 20 blandes med 100 mL fosfatbufret saltvann (PBS).
---	--

Løsninger til prosedyre for avkobling av magnetiske kuler:

50 mM Glysin med pH 2,8	187,7 mg glysin tørrstoff veies inn og løses i 50 mL mQ-vann. Justeres til pH 2,8 ved tilsetning av HCl.
1 M trisbuffer med pH 7,5	6,0 g trisbuffer tørrstoff veies inn og løses i 50 mL mQ-vann. Justeres til pH 7,5 ved tilsetning av HCl.

Løsninger til proteolyse:

50 mM ammoniumbikarbonat-buffer (ABC-buffer)	40 mg ABC tørrstoff veies inn og løses i 10 mL ionebyttet vann (mQ-vann) umiddelbart før bruk.
100 mM Ditiotritol (DTT)	15,4 mg tørrstoff veies inn og står på is til det løses i 1 mL 50 mM ABC-buffer umiddelbart før bruk
500 mM jodeddiksyre (IAA)	46,5 mg tørrstoff veies inn og står på is til det løses i 0,5 mL 50 mM ABC-buffer umiddelbart før bruk.
0,1 mg/mL trypsin løsning	En stamløsning på 1 mg/mL lages først ved at 1 mg trypsin tørrstoff veies inn og står på is til det løses i 1 mL 50 mM ABC-buffer umiddelbart før bruk. Deretter overføres 100 µL 1 mg/mL stamløsning til ett nytt eppendorfrør og tilsettes 900 µL 50 mM ABC-buffer.

Fast-fase ekstraksjon:

20 mM maursyre	75,4 μ L 100% maursyre blandes i 100 mL mQ-vann. Blandingen er holdbar i 3 måneder.
10% trifluoreddiksyre (TFA)	1 mL 100% TFA blandes i 9 mL mQ-vann. Blandingen er holdbar i 1 måned.
0,1% TFA	100 μ L 10 % TFA blandes i 9,9 mL mQ-vann. Blandingen er holdbar i 1 uke.
Elueringsløsning: ACN: 0,1% TFA (80:20)	200 μ L 0,1% TFA blandes i 800 μ L ACN

Gelelektroforese:

Elektroforesebuffer	40 mL NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer blandes med 760 mL destillert vann.
LDS-prøvebuffer	13 μ L destillert vann blandes med 5 μ L NuPAGE [®] LDS Sample Buffer og 2 μ L 0,5 M ditiotreitol (DTT).
Avfargingsvæske	50% metanol, 10% eddiksyre i destillert vann. Til 1 L: <ul style="list-style-type: none"> - 500 mL metanol - 100 mL eddiksyre - 400 mL destillert vann
Coomassieblue fargsvæske	0,125% coomassieblue i avfargingsvæske (beskrevet over) Til 500 mL: <ul style="list-style-type: none"> - 625 μL coomassieblue - 499,375 mL avfargingsvæske

Løsninger til homogeniseringsforsøk:

Complete Mini proteaseinhibitor	1 tablett Complete Mini løses i 10 mL mQ-vann. Denne løsningen ble benyttet til å lage de to løsningene under.
10 mM NaHCO ₃	4,2 mg NaHCO ₃ veies inn som tørrstoff og løses i 5 mL mQ-vann inneholdende Complete Mini proteaseinhibitor.

200 mM Na ₂ CO ₃	106 mg Na ₂ CO ₃ veies inn som tørrstoff og løses i 5 mL mQ-vann inneholdende Complete Mini proteaseinhibitor.
Complete Mini stamløsning (proteaseinhibitor)	1 tablett Complete Mini løses i 1,5 mL mQ-vann. Benyttet ved bead-beating.

Løsninger til LC-MS/MS:

Mobilfase A	95% mQ-vann, 5% ACN, maursyre 0,1% av vannmengden. Til 500 mL: <ul style="list-style-type: none"> - 475 mL mQ-vann - 25 mL ACN (hypergrade for LC-MS) - 475 µL maursyre (for massespektrometri)
Mobilfase B	95% ACN, 5% mQ-vann, maursyre 0,1% av vannmengden Til 500 mL: <ul style="list-style-type: none"> - 475 mL ACN (hypergrade for LC-MS) - 25 mL mQ-vann - 25 µL maursyre (for massespektrometri)
Loadingbuffer	2% ACN i mQ-vann inneholdende 20 mM maursyre <ul style="list-style-type: none"> - 500 mL mQ-vann - 377 µL maursyre - 10 mL ACN (hypergrade for LC-MS)
Vaskeløsning	50% metanol, 50 % mQ-vann Til 500 mL: <ul style="list-style-type: none"> - 250 mL metanol (hypergrade for LC-MS) - 250 mL mQ-vann

2.4 Standard av P-glykoprotein

Til metodeutviklingen ble en standard av P-gp fra insektcellemembraner fra BD Biosciences benyttet. Standarden er laget ved at humant P-gp cDNA uttrykkes ved hjelp av baculovirus (*Autographa californica*) infiserte insektceller (BTI-TN-5B1-4). Totalt proteininnhold inkludert P-gp, er 5 mg/mL [99]. Gelelektroforese og repeterbarhet av uttak ble utført for å karakterisere standarden.

2.4.1 Gelelektroforese av standard

For å undersøke renheten av standarden ble gelelektroforese utført. Prøvene ble laget i tre ulike fortyngninger, 1:5, 1:2 og 3:4. I prøven med 1:5 fortyngning ble 10 µL standard tilsatt 15 µL fosfatbufret saltvann (PBS) og 25 µL prøvebuffer (LDS-prøvebuffer). Tillaging av prøven med 1:2 fortyngning ble utført ved blanding av 15 µL standard og 15 µL prøvebuffer. En prøve med 3:4 fortyngning ble laget ved at 15 µL elektroforesestandard (Bio-Rad) ble blandet med 5 µL prøvebuffer. Prøvene ble satt til oppvarming ved 95°C i 5 minutter.

Det ble benyttet egnede ferdigstøpte geler (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel) og gelkar (Invitrogen™, Novex® Mini-Cell). Deretter ble 800 mL elektroforesebuffer tilsatt karet og i det midterste kammeret ble 500 µL antioksidant (NuPAGE®) tilsatt. Kammen på gelen ble tatt forsiktig av, før 15 µL av hver prøve og 5 µL standard ble tilsatt brønnene. Strømløkket ble satt på og elektroforesen ble startet. Spenningen ble satt til 200 V og sto på til proteinene var godt fordelt i gelen, slik at størst mulig båndseparasjon ble oppnådd. Gelen ble deretter farget med coomassie blå og deretter avfarget med en løsning av 10% eddiksyre og 50% metanol, i destillert vann.

2.4.2 Repeterbarhet av uttak

Standarden består av membranfragmenter som er suspendert i en løsning og er derfor ikke homogen. Standarden må derfor resuspenderes før prøveuttak, og ulikheter i uttaket kan skyldes ufullstendig resuspending. Av denne grunn ble repeterbarheten av uttak undersøkt. Uttak av 2 µL og 0,2 µL standard per prøve ble forsøkt. For prøvene med 2 µL ble uttaket utført ved direkte pipettering over i eppendorfrør. Fordi volumet 0,2 µL er for lite for pipettering, ble det utført et større uttak og laget en stamløsning bestående av 3,2 µL standard og 316,8 µL PBS. Det ble først tilsatt 46,8 µL PBS og standard. Dette ble blandet på

wirlmikser, før det resterende PBS volumet ble tilsatt. Deretter ble dette blandet i 5 minutter på risteblokk ved 1000 rpm, før 20 μL ble overført til hvert eppendorfrør. Denne metoden ble benyttet ved uttak av 0,2 μL standard gjennom hele metodeutviklingen. Det ble laget fem paralleller for hver av proteinmengdene. For i størst mulig grad å isolere variasjon i prøveuttak fra annen variasjon i metoden, ble det utført proteolyse av prøvene uten forutgående IP.

2.5 Antistoffer

To ulike antistoffer ble benyttet i metoden, UIC-2 og JSB-1. Antistoffene er mus-anti-MDR1 monoklonale antistoff. UIC-2 er av typen IgG2a og binder til ekstracellulær epitop på P-gp. Antistoffet leveres av Millipore i en konsentrasjon på 1 mg/mL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). JSB-1 binder epitop intracellulært på P-gp og leveres av InvitrogenTM i en konsentrasjon på 83,30 mg/L (0,0833 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Ved uttak av små mengder antistoff ble det laget en fortykning slik at volumet av uttaket ble stort nok for pipettering. Av UIC-2 ble det laget en 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ løsning i PBS, slik at det ved uttak av f.eks. 0,3 μg ble pipettert ut 3 μL .

2.6 Immunoekstraksjon

2.6.1 Prosedyre for direkte immunoekstraksjon (direkte IP)

For oppkonsentrering av P-gp ble det benyttet immunoekstraksjon med magnetiske kuler (Dynabeads[®]) (figur 11). Innledningsvis ble kulene preparert i henhold til produsentens anbefaling før de ble benyttet videre. Kulesuspensjonen ble resuspendert på HulaMixer[®] i 5 minutter før 25 μL ble overført til hvert eppendorfrør. Rørene ble deretter plassert i magnetstativ og supernatanten fjernet. Kulene ble vasket i to omganger ved tilsetning av 200 μL PBS. Mellom hver tilsetning ble kulene tatt av magnetstativet, resuspendert ved forsiktig pipettering og plassert i magnetstativ før supernatanten ble fjernet. Ønsket mengde antistoff ble fortyknet i 200 μL PBS med 0,02% Tween 20 (PBST). Dette ble så tilsatt de magnetiske kulene og blandet ved rotering på HulaMixer[®] i 10 minutter ved romtemperatur, slik at kule-antistoffkomplekser ble dannet (figur 9-A). Deretter ble rørene plassert i magnetstativ, supernatanten ble fjernet og kulene resuspendert i 200 μL PBST. Rørene ble igjen plassert i magnetstativet og supernatanten ble fjernet. Prøvematerialet ble løst i PBS til et totalvolum på 200 μL før dette ble tilsatt kule-antistoffkompleksene. Deretter ble blandingen resuspendert

ved forsiktig pipettering og rotert på HulaMixer[®] i 10 minutter ved romtemperatur. Prøvene ble så vasket på tilsvarende måte som under preparering av kulene. I tre omganger ble 200 µL PBS tilsatt. Mellom hver tilsetning ble magneten fjernet og prøvene resuspendert ved forsiktig pipettering. Etter siste vask ble prøvene satt på magnet og supernatanten ble fjernet før prøvene ble reløst i 100 µL PBS og overført til et rent protein LoBind eppendorfrør. Dette ble gjort for å unngå co-eluering av proteiner bundet til rørens vegg.

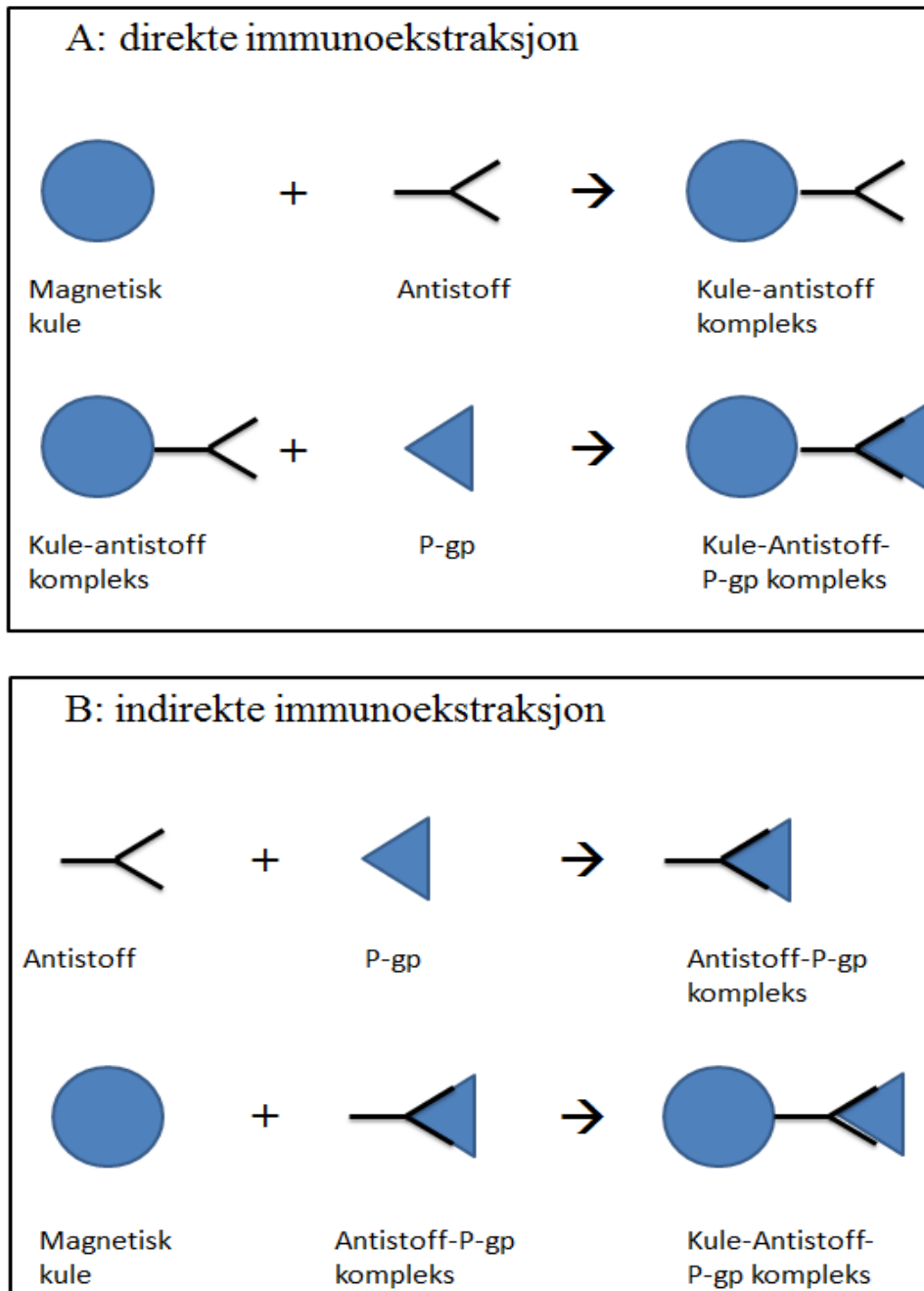
2.6.2 Avkobling av magnetiske kuler før proteolyse

Hvert membranfragment i P-gp-standarden inneholder trolig mer enn ett P-gp-protein. Ettersom hvert P-gp teoretisk vil kunne ha antistoff og en magnetisk kule bundet til seg, kan det tenkes at kulene vil blokkere for trypsin slik at proteolysen blir ufullstendig. For å unngå dette potensielle problemet ble det forsøkt og fjerne kulene før proteolysen. Prosedyren for direkte IP ble benyttet (punkt 2.6.1), og kulene ble fjernet som anbefalt av produsenten [100]. Etter IP ble prøvene plassert i magnetstativet og supernatanten fjernet. Prøvene ble tatt av magneten og 20 µL glycin-HCl med pH 2,8 ble tilsatt. Dette ble blandet ved forsiktig pipettering (unngå skumming) og rotert på HulaMixer[®] i 2 minutter ved romtemperatur. Røret ble plassert i magnetstativ og supernatanten overført til et nytt eppendorfrør. pH ble deretter justert til 7,5 ved tilsetning av 9,5 µL trisbuffer (pH 7,5). Før proteolyse ble det tilsatt mQ-vann til et totalvolum på 100 µL. Deretter ble proteolyse utført som beskrevet under punkt 2.7 ved tilsetning av DTT, IAA og Trypsin.

2.6.3 Prosedyre for indirekte immunoekstraksjon (indirekte IP)

Ved indirekte IP ble prøvematerialet løst i PBS og deretter tilsatt antistoff i ønsket mengde. Prøvematerialet løst i PBS og antistoff utgjorde til sammen et totalvolum på 200 µL. Blandingen ble rotert på HulaMixer[®] i 30 minutter ved romtemperatur slik at antistoff-antigen komplekser ble dannet (figur 9-B). Kulene ble preparert ved at Dynabeads[®] ble resuspendert på HulaMixer[®] i 5 minutter før 25 µL ble overført til hvert protein LoBind eppendorfrør. Rørene ble plassert i magnetstativ, og supernatanten ble fjernet. Kulene ble deretter vasket i to omganger ved tilsetning av 200 µL PBS. Mellom hver tilsetning ble kulene tatt av magnetstativet, resuspendert ved forsiktig pipettering og plassert i magnetstativet før supernatanten ble fjernet. Antistoff-antigenkomplekset ble tilsatt de magnetiske kulene og rotert på HulaMixer[®] i 15 minutter ved romtemperatur. Prøvene ble plassert i magnetstativ,

supernatanten fjernet og prøvene ble vasket tre ganger med 200 μL PBS, på tilsvarende måte som beskrevet for vask av Dynabeads[®] over. Til sist ble supernatanten fjernet, prøvene reløst i 100 μL PBS og overført til rene protein LoBind eppendorfrør.



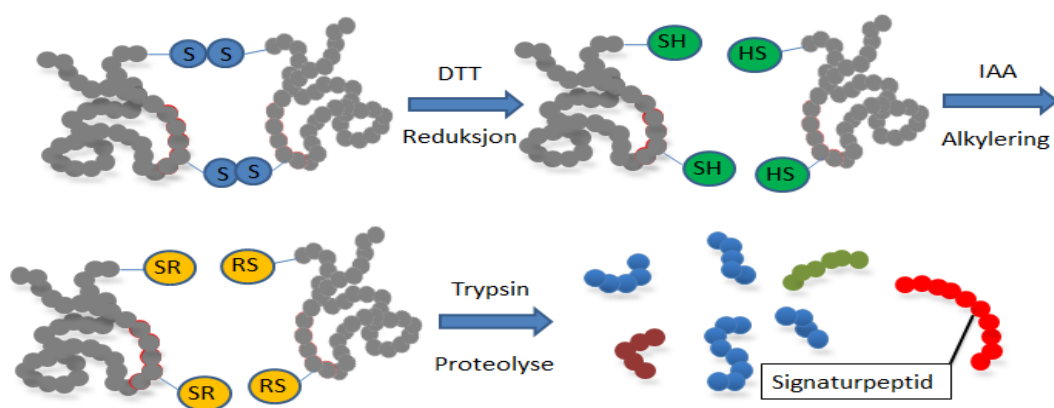
Figur 9. Illustrerer forskjell på direkte og indirekte immunoekstraksjon. A: direkte immunoekstraksjon der antistoff tilsettes de magnetiske kulene slik at kule-antistoffkomplekser dannes før P-gp tilsettes. Deretter dannes komplekser av kuler, antistoffer, og P-gp. B: indirekte immunoekstraksjon der antistoff og P-gp blandes, slik at det dannes komplekser bestående av P-gp og antistoff. Deretter tilsettes de magnetiske kulene og det dannes komplekser av kuler, antistoffer, og P-gp.

2.6.4 Forsøk utført med direkte og indirekte immunoekstraksjon

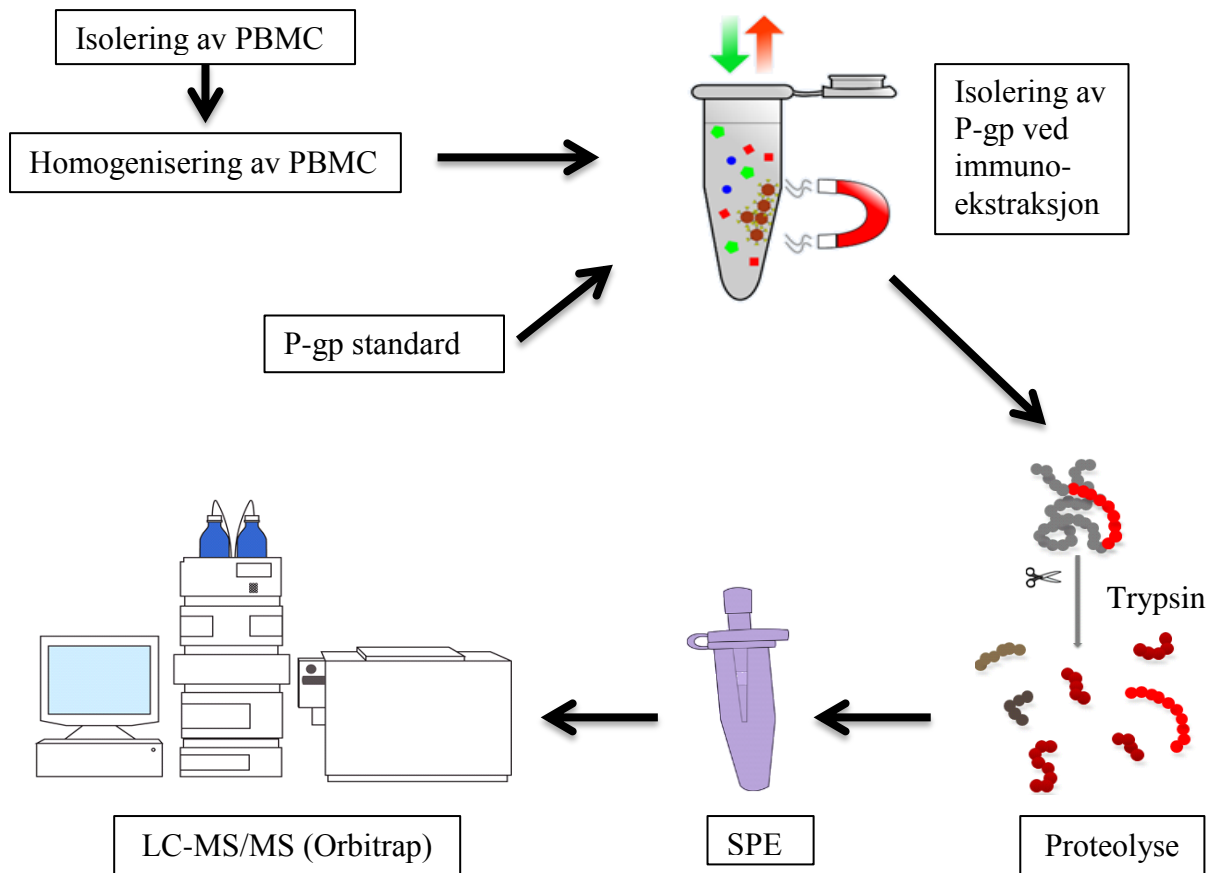
Innledningsvis ble det utført forsøk med direkte (punkt 2.6.1) og indirekte IP (punkt 2.6.3) for sammenligning av metodene. Forsøk med direkte IP ble utført tre ulike dager ved bruk av 0,5 – 5 μL standard og det ble laget 2 - 4 paralleller per forsøksdag. Indirekte IP ble utført tre ulike dager med 2 paralleller der alle inneholdt 2 μL standard. Begge antistoffene ble forsøkt for de to metodene.

2.7 Proteolyse

Prøvene ble reløst i 100 μL ammoniumbikarbonat-buffer (ABC). Deretter ble 11 μL 100 mM ditiotretitol (DTT) tilsatt og inkubert på risteblokk i 30 minutter ved 50°C. På denne måten ble proteinene redusert slik at disulfidbindingene ble brutt og proteinet utfoldet (figur 10). Prøvene ble avkjølt til romtemperatur før 12 μL 500 mM jodeddiksyre (IAA) ble tilsatt og plassert mørkt i 45 minutter ved romtemperatur for å hindre re-folding av proteinet. Proteolysen ble deretter utført ved tilsetning av 12,5 μL 0,1 mg/mL trypsin og blandet raskt på wirlmikser. Dette ble plassert på risteblokk ved 37°C. Prøvene ble proteolysert 2 timer eller over natten etter hva som var hensiktsmessig de ulike forsøksdagene. Proteolysen av P-gp var mer fullstendig (høyere dekningsgrad) ved proteolyse over natten, men for det valgte signaturpeptidet (punkt 2.12) var det ingen forskjell i topphøyde etter to timer i forhold til proteolyse over natten. Proteolysen ble stoppet ved tilsetning av 10 μL maursyre (fortynnet 1:10). Prosedyren er noe modifisert fra Lund et al. [101].



Figur 10. Proteolyse av P-gp. DTT tilsettes og reduserer disulfidbindinger mellom cysteiner i proteinet. Jodeddiksyre gir alkylering av sulfhydrylgruppene (SH-gruppene) og hindrer re-folding av proteinet. Denaturert protein gjør at trypsin kommer lettere til for å proteolysere slik at peptider dannes. Et peptid er valgt som signaturpeptid.



Figur 11. Oversikt over gangen i analysen. Mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) isoleres og homogeniseres deretter. Standard tilsettes dersom dette er aktuelt. Prøven opprensnes ved immunoekstraksjon, enten ved direkte eller indirekte IP. Deretter proteolyseres proteinene ved hjelp av trypsin. Prøven opprensnes med fast-fase-ekstraksjon (SPE) før den inndampes, reløses i loadingbuffer og analyseres ved LC-MS/MS.

2.8 Optimalisering av prosedyre for immunoekstraksjon og proteolyse

Innledende forsøk viste at indirekte IP ga betydelig bedre utbytte enn direkte IP. Optimalisering av prosedyren for IP er derfor utført med indirekte IP:

2.8.1 Tid på HulaMixer®

For optimalisering av metoden ble ulike tider for rotering på HulaMixer® forsøkt, etter tilsatt av antistoff til antigen. De ulike tidene var 15 minutter, 30 minutter og 1,5 time. I forsøket ble 2 μL standard og 1 μg UIC-2 tilsatt hver prøve med et totalvolum på 200 μL . Øvrige betingelser var som beskrevet under punkt 2.6.3.

2.8.2 Resuspendering under IP

Under immunoekstraksjon vaskes prøvene med PBS. I denne prosessen må kule-antistoff-antigenkomplekset resuspenderes ved forsiktig pipettering. For at prosessen skal være tilstrekkelig skånsom, ble ulike metoder testet. Resuspenderingen ble utført ved hjelp av pasteurpipetter i glass, wide-mouth pipetter med en åpning på 1,1 mm i diameter og vanlige 1000 µL pipettespisser (Optifit). De ulike pipettespissene ble også benyttet ved vask under prepareringen av de magnetiske kulene. Dette ble utført i to separate forsøk. Resuspendering med glasspipetter og vanlige pipettespisser ble sammenlignet ved bruk av 2 µL standard, og da wide-mouth pipettespisser og vanlige pipettespisser ble sammenlignet ble 0,2 µL standard benyttet. Forsøkene ble utført i triplikater.

2.8.3 Tilsetning av surfaktant til ulike tidspunkt under IP og proteolyse

Tilsetning av ulike surfaktanter under proteolyse

I et forsøk på å forbedre proteolysen ble natrium deoxycholot (SDC), PPS silent[®] (PPS) og digitonin tilsatt og var til stede under proteolysen. Konsentrasjonene av surfaktantene i prøvene var henholdsvis 1% for PPS og SDC og 20 µg/mL digitonin. Forsøket ble utført i triplikater, og surfaktantene ble tilsatt før tilsetning av DTT. Videre ble prosedyren for proteolyse som beskrevet under punkt 2.7 benyttet.

Før prøvene ble analysert med LC-MS/MS ble SDC, PPS og digitonin fjernet. SDC ble fjernet ved tilsetning av 100 µL etylacetat etterfulgt av blanding på wirlmikser i 1 minutt. Blandingen ble sentrifugert i 2 minutter ved 16 000 g. Den organiske fasen (øverst) ble kastet, og den vandige fasen ble benyttet videre i metoden. Da maursyren ble tilsatt etter proteolysen ble prøvene satt i romtemperatur i 1 time slik at PPS ble hydrolysert og ikke lenger var til hinder for analysen. Digitonin ble vasket bort ved fast-fase-ekstraksjon, og ble dermed eliminert før analyse med LC-MS/MS.

Tilsetning av ulike surfaktanter etter IP

For å forbedre utbyttet ved immunoekstraksjonen ble det forsøkt tilsetning av surfaktantene PPS, SDC og digitonin. Disse ble tilsatt etter at kule-antistoff-antigenkomplekset var dannet. Etter tilsetningen fikk surfaktantene virke på membranene i 15 minutter på HulaMixer[®], for så å bli vasket bort ved tilsetning av 200 µL PBS tre ganger. Mellom hver tilsetning ble kule-

antistoff-antigenkomplekset resuspendert ved forsiktig pipettering, satt på magnet og supernatanten ble fjernet. Etter siste vask ble komplekset resuspendert i 100 µL PBS og overført til rene protein LoBind eppendorfrør. Hver prøve inneholdt 2 µL standard og 1 µg UIC-2. Konsentrasjonen av de ulike surfaktantene i prøvene var henholdsvis 0,05% PPS og SDC og 100 µg/mL digitonin. Forsøket ble utført i triplikater.

Tilsetting av digitonin etter IP

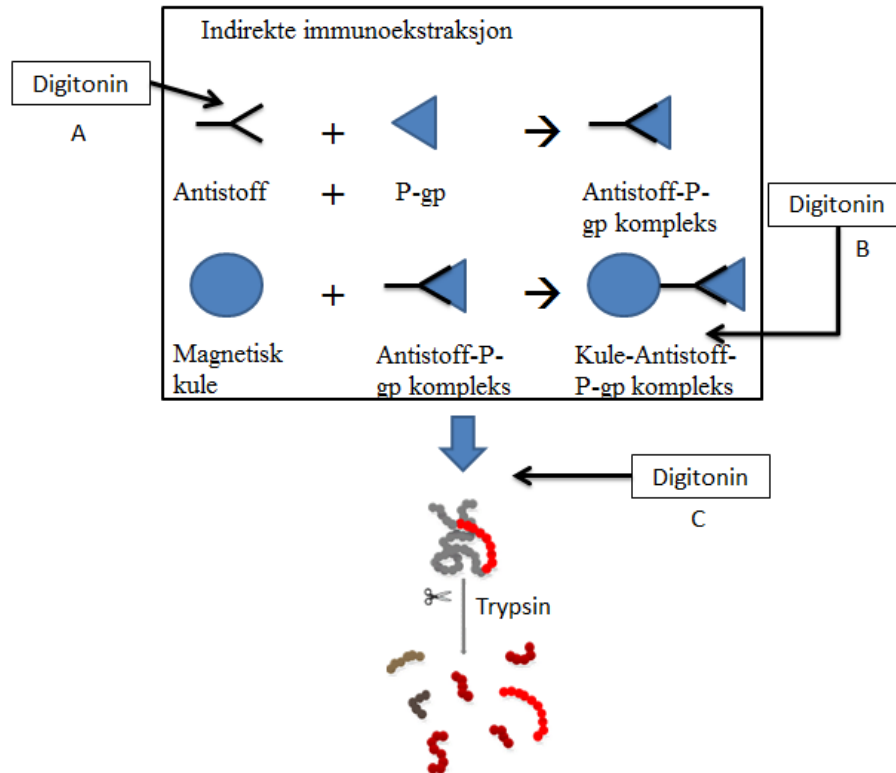
Innledende forsøk viste at tilsats av digitonin resulterte i best utbytte etter immunoekstraksjon. Av den grunn ble digitonin benyttet i videre forsøk. Ulike konsentrasjoner ble testet ved at det ble laget to paralleller av hver konsentrasjon på 1 µg/mL, 5 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL og 600 µg/mL, der surfaktanten ble tilsatt etter IP. Prøvene ble rotert på HulaMixer[®] i 15 minutter, før surfaktanten ble vasket bort ved tilsetting av 200 µL PBS i tre omganger. Mellom hver tilsetting ble kulene tatt av magnetstativet, resuspendert ved forsiktig pipettering og plassert i magnetstativet før supernatanten ble fjernet. Prosedyren for indirekte IP som beskrevet under punkt 2.6.3 ble benyttet frem til tilsetting av digitonin, deretter var prosedyren som i avsnittet over. Hver prøve inneholdt 1 µg UIC-2 og 2 µL standard.

Tilsetting av digitonin på ulike trinn i IP-prosedyren

For å undersøke effekten av digitonin på ulike trinn i metoden, ble 200 µg/mL tilsatt til ulike tidspunkt (figur 12). Prøvene ble sammenlignet med direkte proteolyse (uten forutgående IP) og IP uten surfaktant. Digitonin ble tilsatt og var til stede under hele IP, etter IP som beskrevet i avsnittet over og før proteolyse. Det ble laget to paralleller for hvert tilsetningstidspunkt. Hver prøve ble tilsatt 0,3 µg UIC-2 og 0,3 µg JSB-1 i kombinasjon, til 0,2 µL standard.

Ulike konsentrasjoner digitonin under IP

Ulike konsentrasjoner digitonin under IP ble undersøkt (1 µg/mL, 5 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL og 519 µg/mL), og sammenlignet med IP uten surfaktant og med surfaktant tilsatt etter IP. Surfaktanten ble tilsatt før antistoff og antigen ble rotert på HulaMixer[®] (punkt 2.6.3). Hver prøve inneholdt 0,2 µL proteinstandard og ble tilsatt 0,3 µg av hvert antistoff.



Figur 12. Digitonin tilsatt til ulike tidspunkt i prosedyren. A: digitonin ble tilsatt før komplekset av antistoff og P-gp ble dannet, og var til stede under hele IP. B: digitonin ble tilsatt etter komplekset av kule, antistoff og P-gp ble dannet, og virket på membranen i 15 minutter før den ble vasket bort. C: digitonin ble tilsatt før proteolyse, og var til stede under proteolysen.

2.8.4 Antistoffkonsentrasjoner

To ulike antistoffer ble benyttet under utvikling av metoden. UIC-2 interagerer med epitop på utsiden av membranen og JSB-1 med epitop på innsiden av membranen. Antistoffene ble hver for seg testet i ulike mengder. Prosedyren for indirekte IP ble benyttet (punkt 2.6.3), og antistoffene ble tilsatt i mengdene 0,05 μg , 0,1 μg , 0,5 μg og 1 μg per prøve. Hver prøve hadde et totalvolum på 200 μL og var tilsatt 0,2 μL standard. Forsøket ble utført i duplikater.

Etter å ha testet antistoffene hver for seg i ulike konsentrasjoner ble en kombinasjon av disse forsøkt. Innledningsvis ble 0,5 μg UIC-2 og 0,5 μg JSB-1 benyttet hver for seg, og sammenlignet med en kombinasjon av de to i samme mengde (0,5 μg +0,5 μg). Videre ble kombinasjon av antistoffene forsøkt med ulike mengder: 0,05 μg , 0,1 μg , 0,2 μg , 0,3 μg og 0,5 μg av hvert antistoff per prøve. Prosedyren for indirekte IP ble benyttet (punkt 2.6.3) og hver prøve hadde et totalvolum på 200 μL og inneholdt 0,2 μL standard. Forsøkene ble utført i duplikater.

2.9 Isolering av mononukleære celler i perifert blod

Mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) ble isolert ved gradientsentrifugering. For isoleringen ble det tatt utgangspunkt i produktbeskrivelsen til Leucoseprørene. I et 14 mL Falconrør ble 4 mL EDTA-blod og 4 mL PBS forsiktig tilsatt og blandet. Det fortynnede blodet ble forsiktig tømmt over i et Leucoseprør før blandingen ble sentrifugert ved 1 000 g i 10 minutter ved romtemperatur, på en sentrifuge med innsats som svinger ut (Multifuge). Under sentrifugeringen ble det dannet et tydelig sjikt av PBMC. Væsken over ble pipettert ut til det var omtrent 5 mm igjen over sjiktet, og væsken ble kastet. Sjiktet ble så overført ved pipettering til et 14 mL Falconrør, før løsningen ble vasket ved forsiktig tilsetning av 5 mL PBS, og blandet ved å vende røret 6 ganger. Løsningen ble sentrifugert ved 300 g i 10 minutter ved romtemperatur (Multifuge). Supernatanten ble fjernet før pelleten som ble dannet under sentrifugeringen ble resuspendert i 4 mL PBS ved forsiktig risting og sirkulering av røret. Cellene ble satt i kjøleskap frem til celletelling. Til celletelling ble det benyttet 10 μ L trypanblått tilsatt 10 μ L celsesuspensjon i et nytt protein LoBind eppendorfrør. Det ble tilsatt 10 μ L av blandingen på et objektglass, og cellene ble talt ved hjelp av Countess celledetektor. Cellepelletten ble deretter preparert for lagring til senere analyse ved at celsesuspensjonen i Falconrøret ble sentrifugert ved 300 g i 10 minutter ved romtemperatur (Hettich), før supernatanten ble fjernet og pelleten ble reløst i 1 mL PBS. Denne blandingen ble overført til et protein LoBind eppendorfrør, sentrifugert ved 300 g i 10 minutter (Hettich) og supernatanten ble fjernet. Hvert eppendorfrør inneholdt i gjennomsnitt $1,15 \times 10^7$ celler. Cellepelletten ble lagret ved -70°C til senere bruk.

2.10 Metoder for homogenisering av PBMC og membranisolering

Før celleprøvene kan analyseres, må cellene homogeniseres slik at membranfragmenter inneholdende det ønskede proteinet dannes. I denne oppgaven ble tre metoder for homogenisering av PBMC forsøkt, Dounce homogenisator, sonikering og bead-beating med Precellys[®] 24.

2.10.1 Dounce homogenisator

Homogenisering av PBMC ble innledningsvis forsøkt ved bruk av Dounce homogenisator. En tablett proteaseinhibitor (Complete Mini[®]) ble løst i 10 mL mQ-vann, og løsningen ble benyttet ved tillaging av 10 mM NaHCO₃. Hver cellepellet fra fire prøver ble resuspendert i 200 µL kald 10 mM NaHCO₃ (pH 8) med proteaseinhibitor. Cellene sto til svelling i 10 minutter før de ble overført til homogenisatoren og homogenisert ved 25 slag. De homogeniserte cellene ble deretter overført til eppendorfrør og sentrifugert ved 10 000 g i 10 minutter ved 4°C (Hettich), slik at kjerner, hele celler og mitokondrier sedimenterte til bunnen. Supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør og justert til 100 mM Na₂CO₃ ved tilsetning av 200 µL, 200 mM Na₂CO₃. Løsningen ble deretter sonikert i 20 minutter i vannbad før den ble sentrifugert på ultrasentrifuge ved 120 000 g i 1,5 time ved 4°C (Beckman Coulter). Supernatanten ble kastet og pelleten ble oppbevart ved -80°C til IP. To prøver ble reløst ved sonikering (intensitet på 20), og to ved pipettering før IP [102].

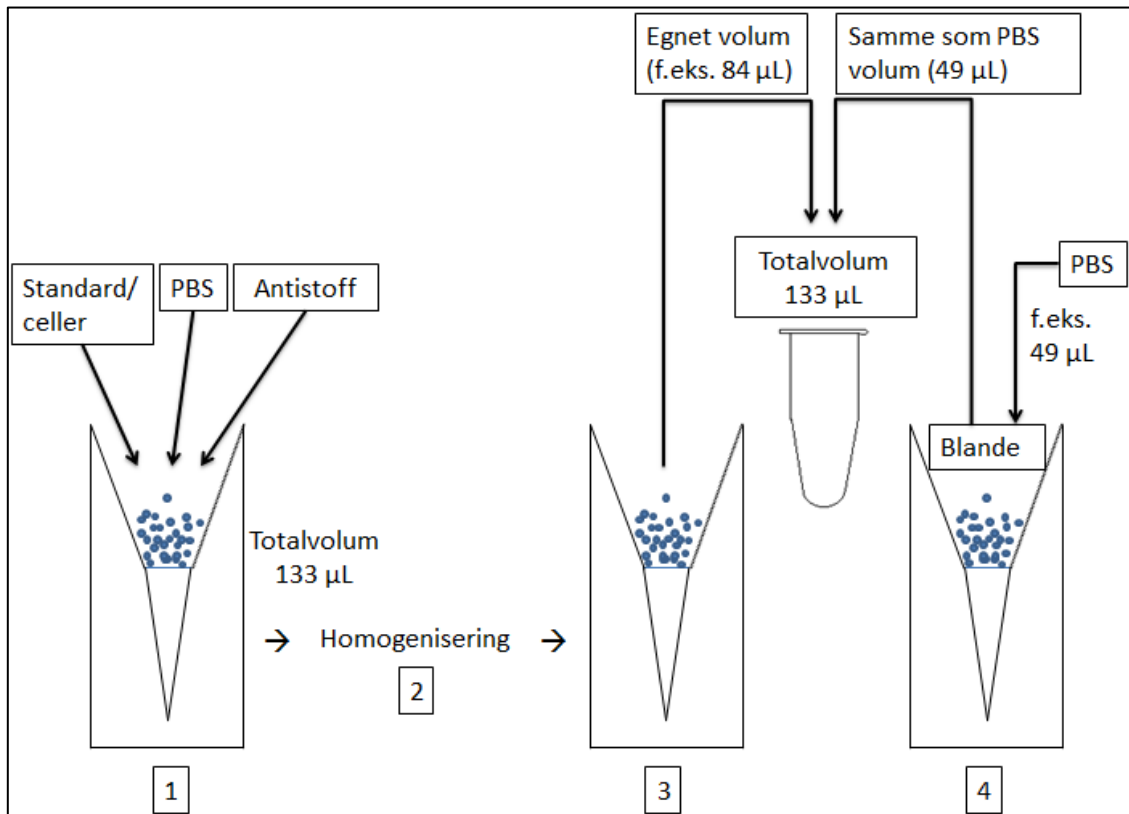
2.10.2 Sonikering

Sonikeringen ble utført med Vibra Cell fra Sonics & Materials Inc. Cellepelletten fra fire prøver ble hver for seg reløst i 200 µL kald 10 mM NaHCO₃ (pH 8) inneholdende proteaseinhibitor, som beskrevet i avsnittet over. Cellene sto til svelling i 10 minutter. Sonikering ble utført i 4 sekunder per prøve. To prøver med en intensitet på 20 og to på 50. Prøvene ble overført til eppendorfrør og sentrifugert ved 10 000 g i 10 minutter ved 4°C (Hettich). Supernatanten ble deretter overført til et nytt eppendorfrør og justert til 100 mM Na₂CO₃ ved tilsetning av 200 µL, 200 mM Na₂CO₃. Løsningen ble ytterligere sonikert i 20 minutter i vannbad og sentrifugert på ultrasentrifuge ved 120 000 g i 1,5 time ved 4°C (Beckman Coulter). Supernatanten ble kastet og pelleten oppbevart ved -80°C til IP.

2.10.3 Precellys

Apparaturen benyttet for utførelsen var Precellys[®] 24 med 0,5 mL rør inneholdende glasskuler med 0,5 mm i diameter. Hastigheten ble satt til 5 000 rpm og ulike homogeniseringstider ble forsøkt. Etter homogeniseringen ble prøvene raskt sentrifugert (2 sek.) på en liten bordsentrifuge. Samtlige prøver ble reløst i 100 µL loadingbuffer før analyse. De små glasskulene i precellysrørene gjorde uttak av prøvematerialet vanskeligere. For å få med mest mulig prøvemateriale uten glasskuler, ble et størst mulig volum først overført til et

eppendorfrør uten at glasskulene fulgte med (figur 13). Deretter ble et bestemt volum PBS tilsatt precellysrørene, dette ble blandet, og et tilsvarende volum ble overført til eppendorfrørene. Av denne grunn ble ikke alt prøvematerialet overført fra precellysrørene til eppendorfrørene, og noe materiale ble liggende igjen blant glasskulene.



Figur 13. Prøveuttak fra Precellysrørene. 1: prøvene tilsettes standard og/eller celler, PBS og enkelte antistoff, før behandling. 2: dette homogeniseres. 3: et egnet volum overføres til eppendorfrøret. 4: precellysrøret tilsettes et bestemt volum PBS og dette blandes. Tilsvarende volum overføres til eppendorfrøret. Volumet justeres tilsvarende antistoffmengden avhengig av om antistoff er tilsatt før (49 µL) eller etter (42,5 µL) homogeniseringen.

I innledende forsøk ble ulike betingelser for homogenisering ved bead-beating undersøkt (tabell 2, nr. 1). Prøvene ble tilsatt 2 µL standard og 98 µL 50 mM ABC og ble deretter proteolysert direkte etter homogenisering. Homogeniseringen ble utført i 10, 20, 30 og 2x15 sekunder med to paralleller av hver. Rørene ble plassert på is før og etter homogenisering, og prøvene som ble homogenisert i 2x15 sekunder ble i tillegg avkjølt mellom de to kjøringene. Før proteolysen ble 50 µL fra hvert precellysrør overført til nye eppendorfrør (figur 13), 50 µL 50 mM ABC ble tilsatt precellysrørene og blandet, før nye 50 µL ble overført til eppendorfrørene. Videre ble proteolyse, SPE og analyse utført som tidligere beskrevet.

Tabell 2. Oversikt over forsøk med homogenisering av PBMC ved hjelp av Precellys® 24.

Nummer	Mengde standard	Celler	Protease-inhibitor	Antistoff før/etter	Tid i Precellys	Antall paralleller
1	2 µL	Nei	Nei	Kun proteolyse	10, 20, 30 og 2x15 sekunder	2
2	0,2 µL	Nei	Nei	Etter	30 og 60 sekunder	2
3	0,2 µL	Ja	Nei	Etter	30 sekunder	2
4	0,2 µL	Ja	Ja	Etter	30 sekunder	2
5	Ingen	Ja	Nei	Etter	30 sekunder	2
6	Ingen	Ja	Ja	Etter	30 sekunder	2
7	0,2 µL	Nei	Nei	Før	10 og 30 sekunder	2
8	0,2 µL	Nei	Nei	Før	2x30 og 3x30 sekunder	2
9	0,2 µL	Ja	Nei	Før	3x30 sekunder	2
10	0,2 µL	Ja	Ja	Før	3x30 sekunder	2
11	Ingen	Ja	Nei	Før	3x30 sekunder	2
12	Ingen	Ja	Ja	Før	3x30 sekunder	2

Ulike betingelser med Precellys® ble forsøkt etterfulgt av IP. Fire prøver av 0,2 µL standard (tabell 2, nr. 2), fire med blanding av 0,2 µL standard og lymfocytter (tabell 2, nr. 3 og 4), og fire prøver med kun lymfocytter ble benyttet (tabell 2, nr. 5 og 6). To av prøvene med kun

standard ble homogenisert i 30 sekunder og to i 60 sekunder. To av prøvene med blanding av standard og celler, og to med kun lymfocytter ble tilsatt 28,5 μL proteaseinhibitor (en tablett Complete Mini løst i 1,5 mL PBS). Før homogenisering hadde prøvene et totalvolum på 126,4 μL , bestående av standard/celler, PBS og proteaseinhibitor som beskrevet. Prøvene ble homogenisert i 30 sekunder. Etter homogeniseringen ble 84 μL fra hvert precellysrør overført til nye protein LoBind eppendorfrør (figur 13). Deretter ble 42,5 μL PBS tilsatt precellysrørene og blandet, før samme volum ble overført til eppendorfrørene. Indirekte IP ble utført med 0,3 μg av hvert antistoff og 200 $\mu\text{g/mL}$ digitonin (67 μL , 600 $\mu\text{g/mL}$ ble tilsatt og blandet rett etter tilsetning, slik at totalvolumet ble 200 μL).

Bead-beating med tilsetning av antistoff før homogenisering ble forsøkt (tabell 2, nr. 7). Hver prøve ble tilsatt 0,2 μL standard og 0,3 μg av hvert antistoff. To prøver ble homogenisert i 10 sekunder og to i 30 sekunder. Disse ble sammenlignet med to prøver der antistoffene ble tilsatt etter Precellys[®] (homogenisert i 30 sek), og to prøver der IP ble utført uten forutgående homogenisering. Før behandlingen inneholdt prøvene uten antistoff 126,4 μL og prøvene med antistoff 133 μL bestående av standard og PBS, i tillegg til antistoff som beskrevet. Etter homogeniseringen ble 84 μL fra hvert precellysrør overført til nye protein LoBind eppendorfrør (figur 13). Deretter ble 42,5 μL PBS overført til prøvene som allerede inneholdt antistoff og 49 μL til de resterende. Dette ble blandet, og tilsvarende volum ble overført til eppendorfrørene. Indirekte IP ble utført med 200 $\mu\text{g/mL}$ digitonin til stede (som i avsnittet over).

Homogenisering i 2x30 og 3x30 sekunder ble også forsøkt under samme betingelser som beskrevet i avsnittet over (tabell 2, nr. 8). Prøvene ble sammenlignet med prøver der antistoff ble tilsatt etter homogenisering, to behandlet med Precellys[®] i 2x30 sekunder og to i 3x30 sekunder, og to prøver der IP ble utført uten forutgående homogenisering.

Blanding av lymfocytter og standard (tabell 2, nr. 9 og 10), og rene lymfocytprøver (tabell 2, nr. 11 og 12) ble forsøkt med tilsetning av 0,3 μg av hvert antistoff før homogenisering. Homogeniseringen ble utført i 3x30 sekunder. Prøvene med standard ble tilsatt 0,2 μL . Av prøvene med celler ble det laget prøver med 28,5 μL proteaseinhibitor (1 tablett Complete Mini i 1,5 mL PBS) og prøver uten. Celleprøvene ble tint, fryst i 5 minutter og deretter tint igjen før proteaseinhibitoren ble tilsatt. Deretter ble antistoffene og PBS tilsatt til et

totalvolum på 133 μL . Prøvene ble homogenisert og mellom hver runde i Precellys ble rørene avkjølt på is. Etter homogeniseringen ble 82 μL fra hvert precellysrør overført til nye protein LoBind eppendorfrør (figur 13). Precellysrørene ble deretter tilsatt 51 μL PBS, dette ble blandet, og tilsvarende volum ble overført til eppendorfrørene. Før IP ble 67 μL (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) digitonin tilsatt og blandet på wirlmikser rett etter tilsetning til hvert rør. Prøvene ble sammenlignet med prøver med kun standard, både med og uten homogenisering før IP. Forsøket ble utført i duplikater og det ble gjort indirekte IP etter homogeniseringen.

2.11 Fast-fase-ekstraksjon

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) ble utført ved hjelp av selvlagde kolonner av en 200 μL pipettespiss, silika-C8 materiale og eppendorfrør. Seks ringer av silika-C8 materiale ble stanset ut med en pasteurpipette i glass og plassert i en pipettespiss (Optifit 200 μL) ved hjelp av en ståltråd. Det ble laget hull i lokkene på 2 mL eppendorfrør og pipettene med kolonnemateriale ble plassert i rørene (figur 14). Væsken tilsatt under prosedyren ble dermed samlet i rørene etter den ble presset gjennom kolonnen ved sentrifugering (Hettich). Betingelsene for sentrifugeringen gjennom hele prosedyren var 2 100 g, men sentrifugeringstiden varierte noe fra trinn til trinn.



Figur 14.
Egenprodusert SPE-
kolonne plassert i
eppendorfrør

Innledningsvis ble kolonnen kondisjonert ved tilsetning av 100 μL acetonitril (ACN) og sentrifugert i 2 minutter. Deretter ble 100 μL 20 mM maursyre tilsatt og sentrifugert 2 minutter. Prøvematerialet ble tilsatt kolonnen og sentrifugert i 3 minutter. Vasking ble så utført ved tilsetning av 100 μL 20 mM maursyre og sentrifugering i 2 minutter. Til sist ble kolonnen flyttet over i et nytt protein LoBind eppendorfrør (1,5 mL) og eluert ved tilsetning av 100 μL elueringsvæske bestående av 80% ACN og 20% 0,1% trifluoreddiksyre.

Etter ekstraksjonen ble eluatet inndampet med nitrogen gass ved 60°C, og oppbevart ved -20°C til analysetidspunktet. Prøvene ble reløst i loadingbuffer før analyse på LC-MS/MS.

2.12 LC-MS/MS

Instrumenteringen benyttet for analysen var Ultimate 3000 LC-system fra Dionex, LTQ XL ionefelle MS og LTQ Orbitrap Discovery fra Thermo Scientific.

Prøvene ble analysert ved omvendtfasekromatografi med LC-MS/MS. Kolonnen var 15 cm og 75 μm i diameter og pakket med silika C18 materiale (Thermo Scientific). Injeksjonsvolumet var 20 μL og analysetiden var 90 minutter per prøve. Gradienteluering ble benyttet og ble innledet med 90% mobilfase (MF) A og 10% MF B. Mengde MF B ble gradvis økt til 60% ved 60 minutter. Fra 60 til 61 minutter var mengde MF stabil, og deretter ble MF B satt til 100% og var konstant til 64 minutter. Resten av analysen ble 90% MF A og 10% MF B benyttet. Væskehastigheten var 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$ til 75 minutter ut i kjøringen. Den ble da oppjustert til 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ til 86 minutter ut i kjøringen, da ble hastigheten tilbakejustert til 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

For vurdering av analyseresultatene har topphøyden blitt benyttet fremfor toppens areal. Dette skyldes at arealet er vanskeligere å angi nøyaktig dersom to topper f.eks. ikke er fullstendig grunnlinjeseperert. Topphøyden angis av datamaskinen og vil være nøyaktig uavhengig av om grunnlinjeseparasjon er fullstendig.

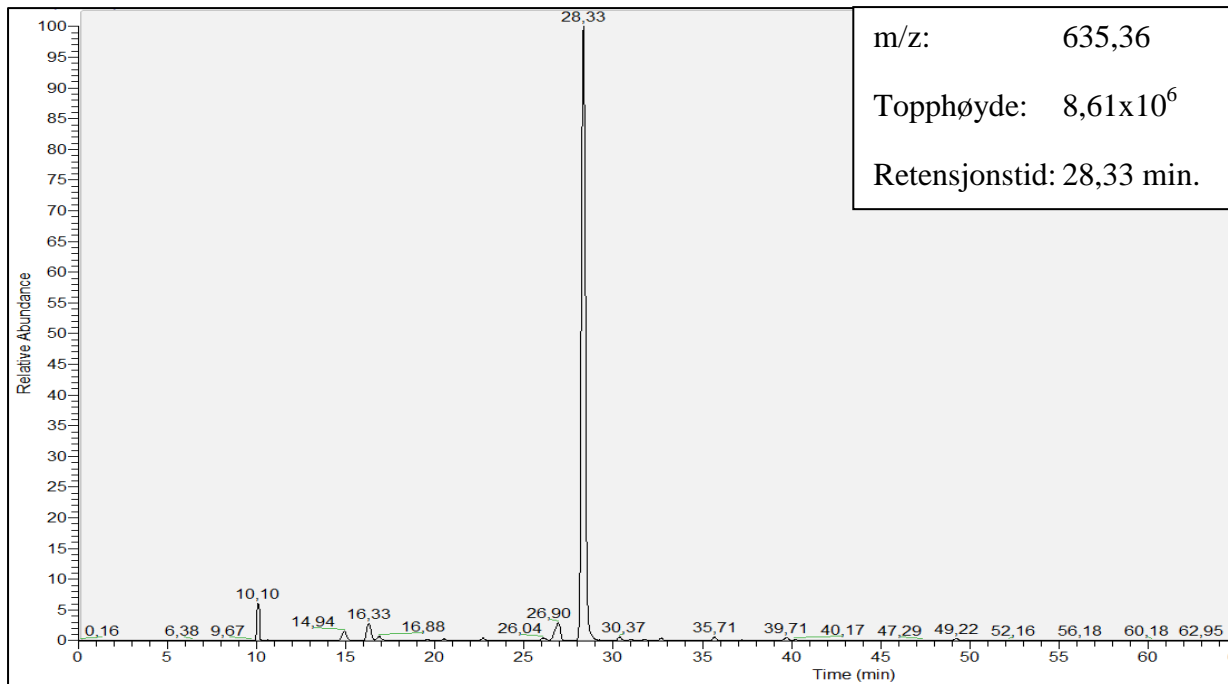
Valg av signaturpeptid

I tidligere studier der kvantitativ måling av P-gp har blitt utført, er to ulike signaturpeptider benyttet, NTTGALTTR [103] og AGAVAEVLAIR [102]. Innledende forsøk, der kun proteolyse, SPE og analyse med LC-MS/MS ble utført, viste at proteolysen oftere var fullstendig for AGAVAEVLAIR, og dette ble derfor valgt som signaturpeptid. Dette ble undersøkt ved hjelp av dataprogrammet Proteome Discover. Signaturpeptidet består av 13 aminosyrer som er et passe antall til analyse ved LC-MS/MS (mellom 6 og 20). Retensjonstiden for signaturpeptidet var omtrent 30 minutter med ovenfornevnte analysebetingelser.

Evaluering av resultater

Ettersom metoden er under utvikling er den foreløpig ikke validert. Påliteligheten av resultatene som framkommer under utviklingen og som danner grunnlaget for videre beslutninger er likevel vurdert ved å bestemme analysemetodens presisjon (LC-MS/MS). En metodes presisjon angir hvor like flere analyser av samme prøve er. Dette ble undersøkt ved

at samme prøver ble analysert gjentatte ganger. Intradag variasjonen for prøvene var $\leq 10,48\%$ relativt standardavvik. Disse ble målt tre ganger i løpet av et døgn. Dette avviket viser at variasjonen i analysen er så lav at valgene vi har tatt under metodeutviklingen på bakgrunn av resultatene fra samme analyse er pålitelige.



Figur 15. Forholdet mellom signaturpeptidets topphøyde og støyens topphøyde, for prøve med 0,2 μ L standard.

Laveste kvantifiseringsgrense (Lower limit of quantification, LLOQ) beregnes ved at forholdet mellom analyttens topphøyde og høyden av støyet beregnes ($\frac{S}{N}$). Dette forholdet skal normalt være under 10. Kromatogrammet i figur 15 viser analyttens topphøyde ved bruk av den minste mengden standard benyttet under metodeutviklingen, 0,2 μ L. Forholdet mellom analyttens topphøyde og støyen er høyere enn 10, og godt innenfor LLOQ.

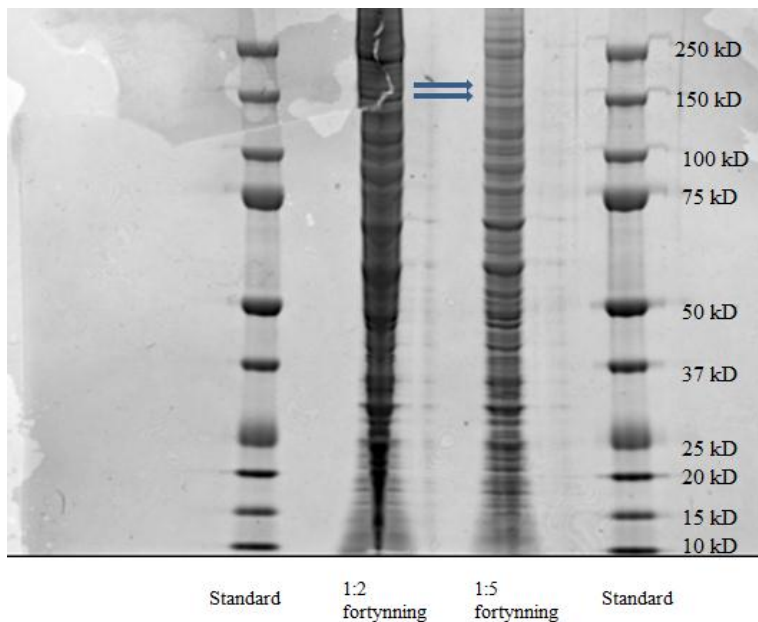
«Carry over»

Ved analyse av prøver inneholdende P-gp kan noe av analytten ligge igjen i systemet og overføres til den neste prøven som analyseres. Dette kalles «carry over». Ved å kjøre en blank prøve (kun loadingbuffer) etter en prøve inneholdende standard kan dette undersøkes. En blank prøve ble analysert etter en prøve inneholdende 0,2 μ L standard. Signalet for P-gp i blankprøven ($5,32 \times 10^5$) utgjorde 1,34% av signalet i standarden. En blankprøve ble også analysert etter en prøve inneholdende 2 μ L standard. Topphøyden for P-gp utgjorde 1,04% av topphøyden i standarden. Dette indikerer en lav «carry over».

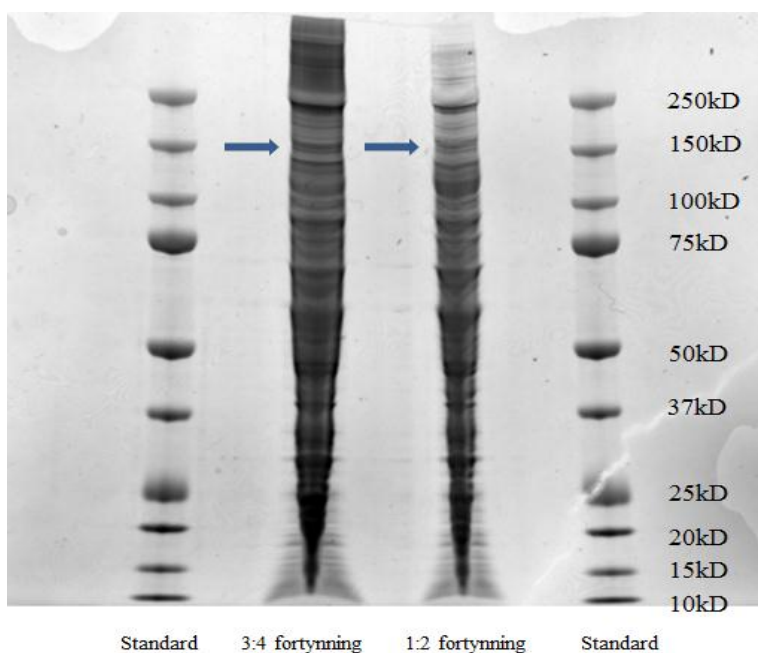
3 Resultater

3.1 Gelelektroforese

Gelelektroforesen viste at standarden inneholdt svært mange ulike proteiner. P-gp har molekylvekt på 140 kDa eller 170 kDa, avhengig av om proteinet er glykosylert eller ikke. Det var to svake bånd omtrent i dette området som antakelig representerte P-gp (figur 16 og 17).



Figur 16. Gelelektroforese av P-gp standard (1:5 fortynning). Nederste pil indikerer bånd på 140 kD, ikke-glykosylert P-gp. Øverste pil indikerer bånd på 170 kD, glykosylert P-gp.



Figur 17. Gelelektroforese av P-gp standard. Pilene markerer båndene som representerer P-gp. Til venstre er 3:4 fortynningen og 1:2 fortynning er til høyre.

3.2 Repeterbarhet av uttak

Testing av repeterbarhet av uttak viste liten variasjon både ved direkte pipettering av 2 µL standard og ved uttak av 0,2 µL til hver prøve. Variasjonen var noe høyere ved uttak av 0,2 µL, men den var fortsatt så lav at dette ansees akseptabelt. Gjennomsnittlig topphøyde ved uttak av 0,2 µL standard ble $1,65 \times 10^7$ med relativt standardavvik på 7%. Uttakene på 2 µL hadde gjennomsnittlig topphøyde $7,13 \times 10^7$, med relativt standardavvik på 2%.

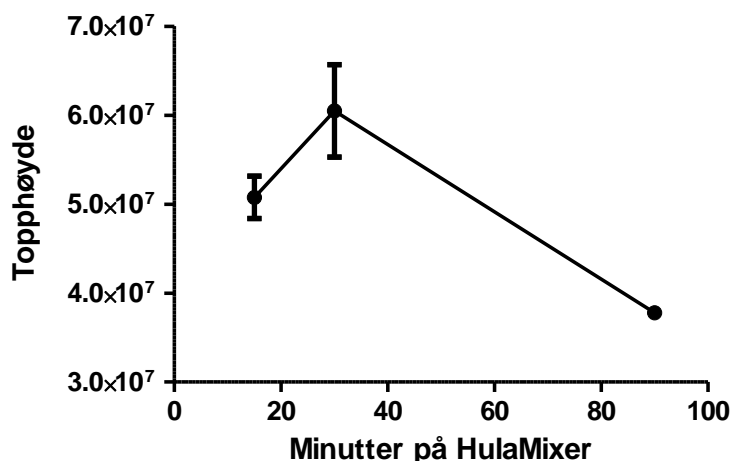
3.3 Immunoekstraksjon

Direkte IP fungerte dårlig, da denne metoden kun ga et utbytte på mellom 0% og 3% i forhold til direkte proteolyse. Forsøk med å koble av Dynabeads[®] (punkt 2.6.2) ga ingen målbare mengder P-gp. Endring av rekkefølgen for tilsetning av kuler, antistoff og prøvemateriale (indirekte IP, punkt 2.6.3) ga derimot en betydelig økning i utbytte, sammenlignet med den opprinnelige metoden som produsenten av Dynabeads[®] anbefaler (direkte IP, punkt 2.6.1). Sammenlignet med direkte proteolyse av prøven, ble utbyttet fra 12-36%, avhengig av hvilket antistoff som ble benyttet. Utbyttet ved bruk av UIC-2 var høyere enn i forsøkene hvor JSB-1 ble benyttet. Indirekte IP ble derfor valgt som standard prosedyre for videre forsøk.

3.4 Optimalisering av prosedyre for immunoekstraksjon og proteolyse

3.4.1 Tid på HulaMixer[®]

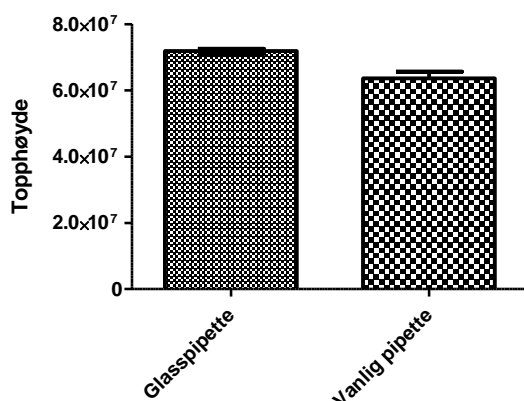
Undersøkelse av ulike tider for rotering på HulaMixer[®] ved dannelse av P-gp-antistoffkomplekset, viste at utbyttet etter 30 minutters rotering i gjennomsnitt ble 19% bedre enn det gjennomsnittlige utbytte etter 15 minutters rotering (figur 18). Etter 1,5 times rotering på HulaMixer[®] ble utbyttet 38% lavere enn etter 30 minutter. For videre forsøk ble 30 minutters rotering benyttet.



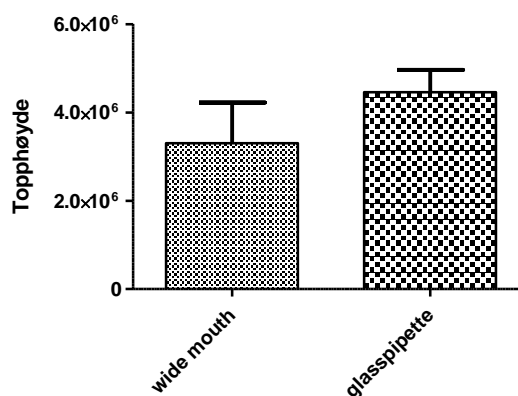
Figur 18. Grafen viser gjennomsnittlig topphøyde (\pm SEM) ved rotering på HulaMixer[®] til ulike tider ved dannelse av antistoff-P-gp komplekset. Det ble benyttet 2 μ L standard og 1 μ g UIC-2 (n=3).

3.4.2 Resuspending under IP

Ved resuspending med glasspipetter ble utbyttet i gjennomsnitt 13% (\pm 4,5, SEM) bedre enn ved bruk av vanlige 1000 μ L pipettespisser (figur 19). Utbyttet ved resuspending med wide-mouth pipettespisser utgjorde i gjennomsnitt 74% (\pm 14, SEM) av utbyttet ved resuspending med glasspipetter (figur 20). Det relative standardavviket for utbyttet av P-gp ved resuspending med wide-mouth ble 48%. Senere forsøk viste at den høye variasjonen ikke var representativt for utbyttet etter resuspending med wide-mouth pipettespisser. Tre andre forsøk viste betydelig mindre variasjon, med relative standardavvik på 7,6%, 13,6% og 7,7%. Det er ønskelig at forsøket skal kunne gjennomføres på ca. 12 timer. Siden bruk av wide-mouth/vanlige pipetter er svært arbeidsbesparende ble wide-mouth pipetter benyttet i senere forsøk.



Figur 19. Resuspending ved bruk av pasteur glasspipette og vanlig 1000 μ L pipettespiss (Optifit). Benyttet 2 μ L standard (n=3). Viser gjennomsnitt \pm SEM.

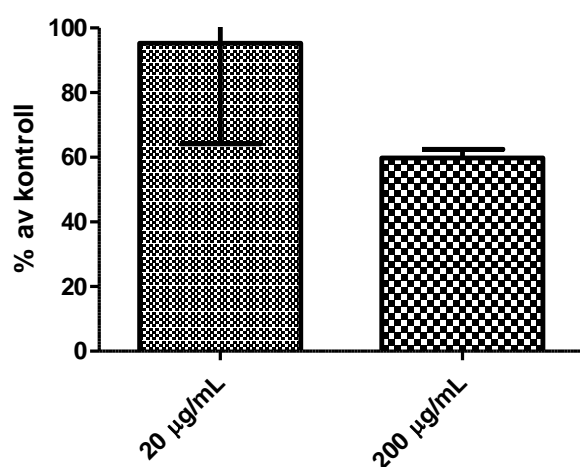


Figur 20. Resuspending ved bruk av wide-mouth pipettespisser (200 μ L) og pasteur glasspipette. Benyttet 0,2 μ L standard. n=3 for wide-mouth, n=4 for glasspipette. Viser gjennomsnitt \pm SEM.

3.4.3 Tilsetning av surfaktanter til ulike tidspunkt under IP og proteolyse

Tilsetning av ulike surfaktanter under proteolyse

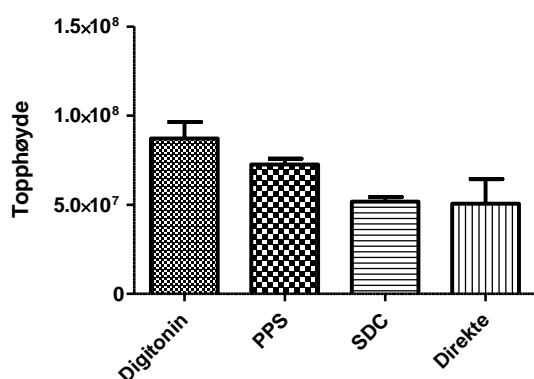
Tilsetning av surfaktantene SDC og PPS under proteolysen ga ikke signal for signaturpeptidet. Ved tilsetning av 20 µg/ml digitonin ga analysen signal tilsvarende utbyttet for proteolyse uten tilsatt surfaktant (topphøyde ca. $2,65 \times 10^7$). Tilsetning av 200 µg/mL digitonin ga et 40% lavere utbytte sammenlignet med gjennomsnittlig topphøyde uten surfaktant (figur 21).



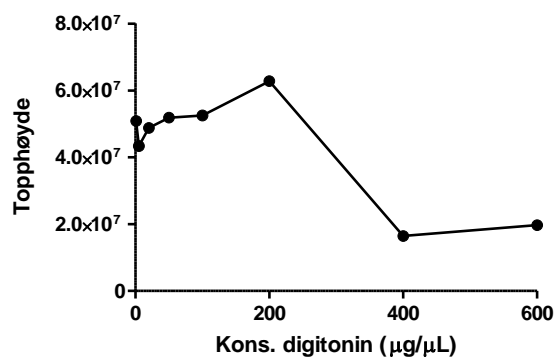
Figur 21. Figuren viser utbyttet som prosent av kontroll (gjennomsnitt + SEM) (IP uten surfaktant) ved tilsetning av digitonin under IP. n=4 (200 µg/mL), n=3 (20 µg/mL). Viser gjennomsnitt ± SEM.

Tilsetning av ulike surfaktanter etter IP

Utbyttet økte i forhold til kontroll ved å tilsette surfaktanter etter indirekte IP, for deretter å vaske bort surfaktantene før proteolyse. Tilsetning av digitonin ga det høyeste utbyttet, etterfulgt av PPS og deretter SDC (figur 22). Gjennomsnittlig topphøyde ved tilsetning av digitonin ble omtrent 69% bedre enn ved SDC og direkte proteolyse. Ut fra disse resultatene ble digitonin valgt for utførelse av videre forsøk. Ulike konsentrasjoner av digitonin etter IP ble deretter forsøkt for ytterligere optimalisering av metoden. Utbyttet ble høyest ved tilsetning av 200 µg/mL digitonin med en topphøyde på $6,28 \times 10^7$ (figur 23). Konsentrasjoner nærmere den kritiske micellekonsentrasjonen på 615 µg/mL ga redusert utbytte. Ved 600 µg/mL ble utbyttet 69% lavere enn ved 200 µg/mL. Derfor ble 200 µg/mL digitonin benyttet for videre forsøk.



Figur 22. Immunoekstraksjon med ulike surfaktanter. Det ble brukt 0,01% digitonin, 0,05% PPS og 0,05% SDC (n=3). Viser gjennomsnitt ± SEM.



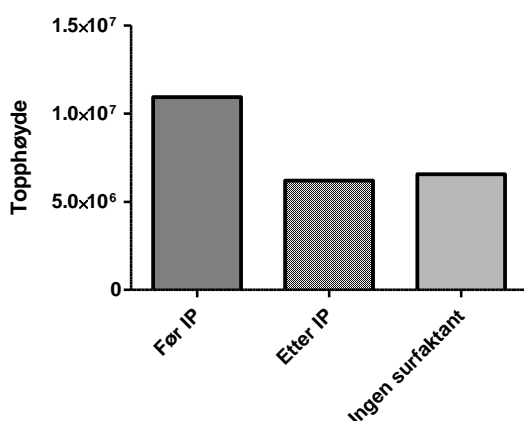
Figur 23. Immunoekstraksjon med ulike konsentrasjoner digitonin. Det ble benyttet 2 µL standard og 1 µg UIC-2 per prøve (n=2).

Tilsetning av digitonin på ulike trinn i IP-proseduren

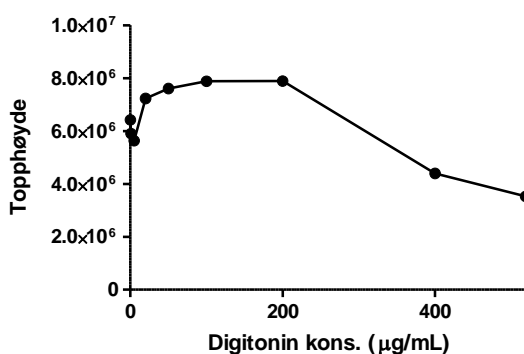
Da 200 µg/mL digitonin ble tilsatt til ulike tidspunkt i prosedyren, ga tilsetning av digitonin før IP det beste utbyttet (figur 24). Topphøyden ble da $1,1 \times 10^7$, noe som vil si 67% større utbytte enn ved utførelse av IP uten digitonin. Tilsetning av digitonin etter IP ga 43% lavere utbytte enn ved tilsetning før IP.

Ulike konsentrasjoner digitonin under IP

Ulike konsentrasjoner av digitonin tilsatt før IP viste at 100 µg/mL og 200 µg/mL ga best utbytte (figur 25). Begge konsentrasjoner hadde en topphøyde på $7,9 \times 10^6$ som er 23% høyere enn utbyttet uten surfaktant. Ved konsentrasjoner nærmere den kritiske micelle-konsentrasjonen for digitonin (615 µg/mL) sank utbyttet betydelig. Resultatet ved tilsetning av 519 µg/mL utgjorde 45% av utbyttet med 200 µg/mL surfaktant. I tidligere forsøk ga 200 µg/mL digitonin stabile og reproducerbare data. Denne konsentrasjonen ble derfor benyttet i videre forsøk.



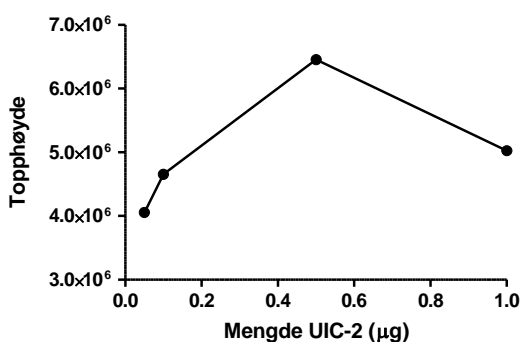
Figur 24. Tilsetning av 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ digitonin før og etter IP. Prøvene er tilsatt 0,2 μL standard og 0,3 μg av hvert antistoff ($n=2$).



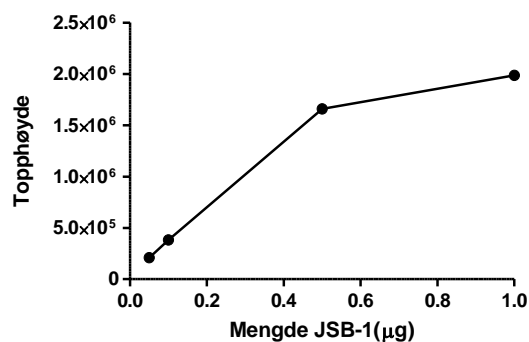
Figur 25. Tilsetning av ulike konsentrasjoner digitonin før IP. Prøvene er tilsatt 0,2 μL standard og 0,3 μg av hvert antistoff ($n=2$).

3.4.4 Antistoffkonsentrasjoner

Under testing av økende konsentrasjoner av de to antistoffene, ble det vist at 0,5 μg per prøve for UIC-2 ga det beste utbyttet av P-gp (figur 26). Topp høyden med 0,5 μg ble 6.5×10^6 og var 59% høyere enn utbyttet med 0,05 μg av antistoffet. Ved bruk av 1 μg UIC-2 falt utbyttet med 22%. Et tilsvarende forsøk med samme mengden antistoff ble utført med JSB-1. I dette forsøket ga 1 μg antistoff det beste resultatet med en gjennomsnittlig topp høyde på $1,99 \times 10^6$ (figur 27). Forsøkene viste at UIC-2 ga et høyere og mer stabilt utbytte enn JSB-1.

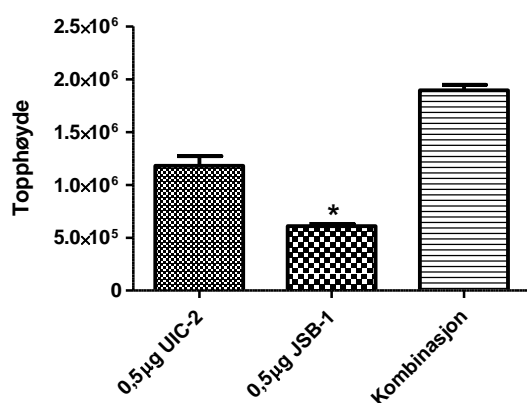


Figur 26. Indirekte IP med ulike mengder av antistoffet UIC-2. Prøvene er tilsatt 0,2 μL standard ($n=2$).

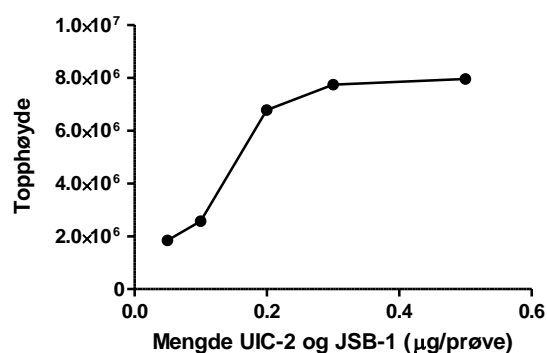


Figur 27. Indirekte IP med ulike mengder av antistoffet JSB-1. Prøvene er tilsatt 0,2 μL standard ($n=2$).

Da de to antistoffene ble kombinert økte utbyttet ytterligere i forhold til da antistoffene ble benyttet hver for seg (figur 28). UIC-2 brukt alene ga en gjennomsnittlig topphøyde på $1,18 \times 10^6$ og JSB-1 alene ga en gjennomsnittlig topphøyde tilsvarende halvparten av UIC-2. Kombinasjonen av antistoffene ble omtrent tre ganger bedre enn bruk av JSB-1 alene, og 60% bedre enn bruk av UIC-2 alene. Da ulike mengder antistoff i kombinasjon ble testet viste resultatene at 0,3 μg og 0,5 μg av hvert antistoff ga de beste resultatene med en gjennomsnittlig topphøyde på omtrent $7,9 \times 10^6$ (figur 29). Fra 0,1 μg til 0,2 μg økte utbyttet omtrent to og en halv gang. Ved antistoffmengder over dette flatet kurven ut. For videre forsøk ble 0,3 μg av hvert antistoff benyttet.



Figur 28. Indirekte IP med kombinasjon av antistoffene UIC-2 og JSB-1 (0,5 μg + 0,5 μg) og antistoffene hver for seg. Prøvene inneholdt 0,2 μL standard. n=3 for UIC-2 og kombinasjon, * n=2 for JSB-1. Viser gjennomsnitt \pm SEM.

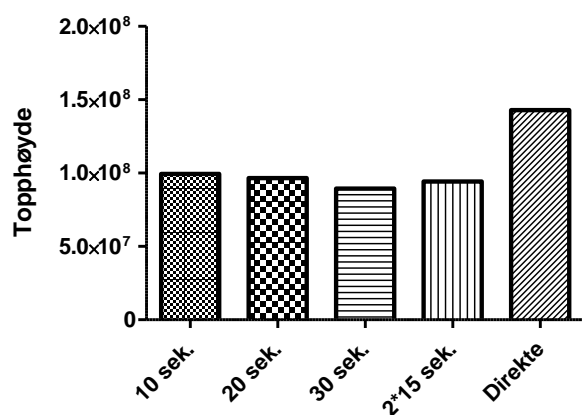


Figur 29. Indirekte IP med ulike mengder av kombinasjon av antistoffene UIC-2 og JSB-1. Prøvene inneholdt 0,2 μL standard (n=2).

3.5 Metoder for homogenisering av lymfocytter og membranisolering

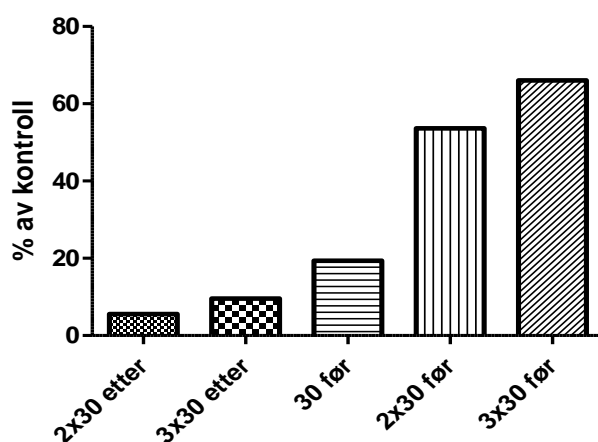
3.5.1 Precellys

Homogenisering med Dounce og sonikering ga ikke detekterbare mengder av signaturpeptidet. Homogenisering ved såkalt bead-beating ved hjelp av Precellys[®] ble derfor forsøkt. Det innledende forsøket med Precellys[®], der ulike betingelser ble testet med standard uten etterfulgt IP (tabell 2, nr. 1), ga resultater som vist i figur 30. Alle betingelsene som ble testet ga omtrent samme utbytte av P-gp. Prøvene ga i gjennomsnitt 33% lavere utbytte sammenlignet med kontrollen (Topphøyde $9,49 \times 10^7$ vs. $1,4 \times 10^8$).



Figur 30. Ulike betingelser for homogenisering med Precellys uten etterfulgt immunoekstraksjon. Prøvene inneholdt 2 μ L standard (n=2).

I det påfølgende forsøket med Precellys ble homogenisering av lymfocytter og blanding av lymfocytter og proteinstandard inkludert. Forsøket ga ikke detekterbart utbytte av P-gp (tabell 2, nr. 2-6). Analysen av standard tilsatt antistoff før behandling i Precellys, ga resultater ved homogenisering i 30 sekunder (tabell 2, nr. 7), men ikke ved 10 sekunder. Topp høyden ble $1,69 \times 10^6$, noe som utgjør omtrent 20% av topp høyden til prøvene som ikke ble homogenisert før IP ($8,56 \times 10^6$). Forlengt homogenisering med Precellys ser ut til å gi økt utbytte. Prøvene som ble behandlet i 2x30 sekunder, og hvor antistoffene ble tilsatt før homogenisering, ga et utbytte på 54% (tabell 2, nr. 8). Tilsvarende prøver behandlet i 3x30 sekunder ga et utbytte på 66% av prøven uten forbehandling med Precellys (topp høyde $1,07 \times 10^7$) (figur 31). De rene celleprøvene og prøvene med blanding av celler og standard, der antistoffene ble tilsatt før homogeniseringen, ga ikke signal for P-gp (tabell 2, nr. 9-12).



Figur 31. Antistoff tilsatt før og etter homogenisering av standard med Precellys. Prøvene er behandlet i ulike tider. Utbyttet er oppgitt som prosent av kontroll, som er IP utført uten forutgående homogenisering (n=2).

4 Diskusjon

Ved hjelp av prøveopparbeidelse med immunoekstraksjon, proteolyse og fast-fase-ekstraksjon etterfulgt av analyse med LC-MS/MS, ble det vist at P-gp kan detekteres i membraner fra transfekterte insektceller. Til tross for optimalisering av metoden og gode resultater fra forsøk med P-gp standard, har det med de benyttede betingelsene ikke vært mulig å detektere P-gp i mononukleære celler. Videre arbeid med optimalisering og undersøkelse av ulike komponenter i PBMC som kan forstyrre analysen er nødvendig.

Ved å bytte til indirekte IP økte utbyttet mange ganger i forhold til utbyttet ved direkte IP. En viktig grunn til dette kan ha vært at antistoffet kom lettere i kontakt med antigenet. Hvert membranfragment inneholder antakelig mer enn ett P-gp-molekyl. Teoretisk sett vil hvert P-gp kunne binde ett antistoff og en magnetisk kule. Da antistoffet ble immobilisert før tilsetning av antigen (direkte IP), kan det tenkes at kulene ved sterisk hindring forstyrret interaksjonen mellom antistoff og antigen. Dette var muligens et mindre problem da antistoffet ble tilsatt før kulene. Interaksjonen mellom antistoff og antigen ble ikke hindret, og utbyttet ble følgelig økt. Videre er det beskrevet at det er en fordel å benytte indirekte IP når antistoffer med lav affinitet for antigen benyttes [104]. Dette skyldes at ved å la interaksjonen mellom antistoff og antigen inntreffe uten de magnetiske kulene til stede, forbedres antistoffets bindingskinetikk. I tillegg vil antistoffer med lav affinitet ofte kreve lengre inkubasjonstid for dannelse av antistoff-antigenkomplekset. Ved denne metoden ble antigenet tilsatt tidligere i prosessen og interaksjonen fikk dermed lengre tid til å inntreffe. En annen ulempe med direkte IP er at kulene er til stede i prøvene i lengre tid enn ved indirekte IP. Dermed øker faren for uspesifikke bindinger av andre proteiner [104], noe som kan føre til fortrenkning av de tilsatte antistoffene og derfor gi redusert utbytte. Indirekte IP ga gode og repeterbare utbytter av P-gp standard og ble derfor benyttet i videre forsøk.

For å øke utbyttet ytterligere ble ulike konsentrasjoner av antistoffene forsøkt, både hver for seg og i kombinasjon. Fordi antistoffer er svært kostbare ble mengde standard i disse forsøkene redusert fra 2 μL til 0,2 μL , slik at mengde antistoff også kunne reduseres. Standarden inneholdt mange proteiner og så ut til å bestå av under 10% P-gp (figur 16 og 17). Ut i fra denne antakelsen ville hver prøve ved tilsetning av 0,2 μL standard maksimalt inneholdt 0,1 μg P-gp. Forholdet mellom mengde P-gp og antistoff var da 1:6 ved tilsetning av 0,3 μg av hvert av de to antistoffene. Produsenten av UIC-2 (Millipore) anbefaler fra 1-5 μg

antistoff per mL cellelysat. Mengde UIC-2 i denne oppgaven (0,3 µg) utgjorde 1,5 µg per mL, som var innenfor dette området. Da ulike mengder antistoff ble testet, ga denne antistoffkonsentrasjonen best utbytte. Mengden antistoff ansees derfor å være tilfredsstillende. Under metodeutviklingen ble det vist at antistoffet UIC-2 ga et høyere og mer stabilt utbytte enn JSB-1, men kombinasjonen av antistoffene ga det beste resultatet. Utbyttet ved kombinasjon av de to viste seg å være bedre enn summen av antistoffene hver for seg. Antistoffene binder hver sin epitop, JSB-1 på proteindelen på innsiden og UIC-2 på proteindelen på utsiden av membranen. I tilfeller der det ene antistoffet ikke binder sin epitop, kan det tenkes at det andre antistoffet vil binde epitopen på motsatt side av membranen. Det kan tenkes at dette øker sannsynligheten for en vellykket dannelse av P-gp-antistoffkomplekset og bidrar til et økt utbytte av immunoekstraksjonen.

Et annet tiltak som ble utført for å øke utbyttet av P-gp var tilsetning av surfaktanter under IP og proteolyse. PPS[®], SDC og digitonin ble valgt fordi disse tilhører ulike klasser av surfaktanter, henholdsvis et zwitterion, et anion og en ikke-ionisk surfaktant. De ulike ladningene kan tenkes å ha ulik innvirkning på P-gp strukturen og derfor føre til ulik bindingsaffinitet for antistoffet. Mechetner og Roninson viste i en studie at UIC-2 ikke binder denaturert protein ved western metodikk [105]. Det kan derfor antas at antistoffet ikke bindes dersom epitopens struktur er endret. De ladede surfaktantene vil i tillegg binde seg til ladede grupper i proteinet. Aminosyrer som lysin, arginin, aspartat og glutamat er ladet ved fysiologisk pH [106]. SDC og PPS[®] vil binde lysin og arginin som er positivt ladede aminosyrer. Aspartat og glutamat er negativt ladede og vil kunne binde den positive ladningen på PPS[®]. Dersom bindingen forekommer i bindingssetet til antistoffet, eller i nærheten av dette, vil antistoff-antigen interaksjonen hindres og resultere i et lavere analyseresultat. Surfaktantenes ulike evne til å øke proteinets løselighet kan også tenkes å påvirke utbyttet. På bakgrunn av surfaktantenes ulike egenskaper kan det derfor tenkes at disse påvirker utbyttet ulikt. Resultatene fra innledende forsøk i denne oppgaven ga best resultater for digitonin, og denne ble derfor tilsatt under IP i videre forsøk. De tre ovennevnte surfaktantene ble tilsatt i et forsøk på å forbedre proteolysen med trypsin. Dette resulterte i redusert proteolyseutbytte ved tilsetning av digitonin, og udetekterbare mengder av P-gp ved tilsetning av SDC og PPS[®]. Miliotis et al. og Zhang et al. benyttet PPS[®] under proteolyse av P-gp [102, 103], og Lund et al. utførte proteolyse uten surfaktant [101]. Under proteolyse vil både P-gp og trypsin påvirkes av surfaktantene. På samme måte som under IP vil de ulike surfaktantene kunne føre til ulike strukturelle endringer i proteinene, som kan resultere i at trypsin får økt eller redusert

tilgang til P-gp. Masuda et al. og Lin et al. har vist i ulike studier at SDC forbedrer proteolyse med trypsin, spesielt for proteolytisk resistente proteiner [107, 108]. Forsøkene utført med SDC i denne studien resulterte i utfelling i prøven og ga ikke detekterbart utbytte av P-gp. Surfaktanten har antakelig reagert med matrikskomponenter og derfor felt ut. Fordi surfaktantene førte til redusert utbytte, og proteolyse uten disse ga gode og repeterbare resultater, ble ikke surfaktanter benyttet i videre forsøk.

Under indirekte IP dannes først et kompleks mellom antigen og antistoff, deretter tilsettes magnetiske kuler og antigen-antistoff-kulekomplekser dannes. I prosessen må kompleksene resuspenderes og i denne oppgaven ble dette utført ved forsiktig pipettering. De dannede kompleksene er relativt store og det kan derfor tenkes at kompleksene brytes ved resuspending med pipettespisser med liten åpning. Pipetter med større åpning, pasteurpipetter i glass og wide-mouth pipettespisser, ble derfor forsøkt og sammenlignet med vanlige pipettespisser. Resultatene viser best utbytte og minst variasjon ved bruk av pasteur glasspipetter i begge forsøkene, men resuspending med disse pipettene er mer arbeids- og tidkrevende enn bruk av pipettespisser. Da det er ønskelig at metoden skal kunne utføres i løpet av omtrent tolv timer, ble wide-mouth pipetter benyttet i senere forsøk til tross for at utbyttet ville blitt noe høyere med glasspipetter. Fordi alle prøvene i ett forsøk ble behandlet likt og utbyttet ved resuspending med wide-mouth ble vist å være stabilt, vil ikke dette ha betydning for valg tatt på grunnlag av analyseresultater der wide-mouth pipettespisser er benyttet. Lund et al. resuspenderte sine prøver med vortex miksing under IP [101]. Fordelen med denne metoden er at prøvevolum ikke mistes ved resuspending. Ved pipettering vil det alltid være noe væske igjen i pipettespissen, og ved gjentatte resuspenderinger vil dette potensielt kunne gjøre utslag på analyseutbyttet. Vortex miksing er en hardere behandling enn resuspending ved forsiktig pipettering. Styrken på bindingen mellom de magnetiske kulene og antistoffene, og bindingen mellom antistoffene og antigenene er ukjent. Dersom bindingene er svake, vil disse kunne brytes under resuspenderingen. Hardere behandling vil teoretisk sett gi flere bindingsbrudd med resulterende tap av P-gp. Invitrogen[®] beskriver i sin prosedyre for bruk av Dynabeads[®] en metode for å kryssbinde antistoffene til de magnetiske kulene [104]. Dette ville kanskje muliggjøre en hardere resuspending, men indirekte IP kan da ikke utføres. Gevinsten ved å benytte indirekte IP utgjør mer enn en mulig gevinst ved å bytte til vortex miksing for resuspending.

Før P-gp i PBMC kan analyseres, må cellene homogeniseres. Dette ble forsøkt utført med tre ulike metoder; Dounce homogenisator, sonikator og bead-beating ved hjelp av Precellys®. Dersom metoden for homogenisering endrer proteinets konformasjon slik at antistoffenes epitop endres, kan det tenkes at antistoffets bindingsaffinitet reduseres, noe som igjen vil kunne føre til et lavere utbytte. I denne metoden gjelder det antakelig i størst grad for UIC-2, siden dette antistoffet som tidligere nevnt er vist å ikke binde denaturert protein ved western metodikk [105]. Andre forhold som kan resultere i redusert utbytte ved homogenisering, er skumdannelse ved metoder som Dounce og bead-beating. På bakgrunn av proteiners fysikalsk-kjemiske egenskaper er det nærliggende å tro at skumdannelsen skyldes proteininnholdet i homogenatet og at disse delvis befinner seg i skummet. Skummet er vanskelig å overføre til eppendorfrørene og en ufullstendig overføring gir tap av standard med redusert utbytte som konsekvens. Dette kan være en del av grunnen til at P-gp ikke lar seg detektere, men det kan sannsynligvis ikke forklare hele tapet. Under utvikling av metoden og etter å ha forsøkt de tre nevnte metodene for homogenisering uten detekterbart utbytte, ble bead-beating valgt for videre forsøk. Dette er en svært enkel og tidsbesparende homogeniseringsmetode i forhold til Dounce og sonikering. Metoden er også vist å gi høyere utbytte av intakt protein enn tradisjonelle homogeniseringsmetoder [89], noe som antakelig er av betydning for bindingsaffiniteten til UIC-2. I et forsøk på å forbedre metoden ble antistoff tilsatt før homogeniseringen, noe som resulterte i detekterbare mengder av P-gp. Når antistoffet er til stede under homogeniseringen får antistoff-antigen interaksjonen lengre tid til å inntreffe, noe som vil gi mulighet for økt utbytte. Dette ser ut til å være tilfelle da dette samsvarer med resultatene, som indikerer at lengre homogeniseringstid ved tilsats av antistoffer før behandlingen gir et større utbytte.

To forskningsgrupper har tidligere målt P-gp ved LC-MS/MS i humane celler. I disse metodene ble det benyttet transfekterte cellesystemer der nivået av P-gp er betydelig høyere enn i PBMC [102, 103]. I tillegg til den lave ekspresjonen, er en ekstra utfordring ved å måle P-gp i PBMC at cellene antakelig inneholder komponenter som interfererer med metoden. Bakgrunnen for denne mistanken er at analyse av standard alene gjorde det mulig å detektere P-gp, men ved å utføre analysen med en blanding av standard og PBMC ga analysen ikke detekterbare mengder P-gp. Dette indikerer at cellekomponenter forhindrer en vellykket immunoekstraksjon, eller bryter ned proteinet. PBMC består blant annet av antistoffproduserende celler (lymfocytter). Det kan derfor tenkes at antistoffer som frigjøres under homogenisering fortrenger de tilsatte antistoffene fra de magnetiske kulene og på denne

måten reduserer utbyttet. De magnetiske kulene tilsettes i overskudd i prosedyren og fordi utbyttet ikke bare reduseres, men ikke lar seg detektere, er det lite sannsynlig at dette er eneste årsak. I tillegg til antistoffer inneholder PBMC proteaser som potensielt kan proteolysere antistoffene og P-gp. Dersom antistoffene proteolyseres vil dette resultere i redusert ekstraksjon av P-gp ved IP. Ulike proteaser kløyver proteiner på ulike steder i aminosyresekvensen. Uspesifikk proteolyse av P-gp kan potensielt kløyve signaturpeptidet, og dermed ødelegge grunnlaget for deteksjon av proteinet i metoden. I et forsøk på å forhindre dette, ble en proteaseinhibitor som hemmer serin-, cystein- og metalloproteaser tilsatt før homogeniseringen. Tilsetningen resulterte i udetekterbare mengder P-gp, både for prøver med kun standard og prøver inneholdende standard og PBMC. Resultatet indikerer at proteasehemmeren i seg selv hindrer en vellykket analyse. Dette kan skyldes at proteasehemmeren ikke er tilstrekkelig vasket bort før proteolysen med trypsin, slik at den proteolytiske funksjonen hemmes. Dersom dette er tilfelle vil ikke signaturpeptidet dannes og dermed vil ikke P-gp detekteres. Ved å legge til flere vasketrinn i prosedyren før proteolyse, vil sannsynligheten for at tilstrekkelige mengder proteaseinhibitor er til stede i prøven ved tilsetning av trypsin minimeres, og følgelig vil faren for at dets funksjon hemmes, bli redusert.

Tidligere kvantitative analyser av P-gp i transfekterte celledsystemer er utført av Zhang et al. og Miliotis et al. [102, 103]. Sistnevnte benyttet en gelbasert separasjonsteknikk, der proteinene separeres etter størrelse. Ved en slik metode vil separasjon av proteiner med liknende størrelser være vanskelig, slik at opprensingen av prøvene potensielt kan bli dårligere enn ved å benytte spesifikke antistoffer som i denne metoden. Zhang et al. separerte proteiner ved å sentrifugere membranfragmentene og fjerne supernatanten inneholdende cytosoliske proteiner. Deretter ble ekstraksjonsbuffer tilsatt slik at membranproteinene ble oppløst. Supernatanten kunne dermed benyttes videre. Dette gir en opprensing av prøven, men metoden er ikke like selektiv som ved bruk av spesifikke antistoffer. Prøvene ble deretter proteolysert og de dannede peptidene ble injisert i LC-MS/MS-systemet. De mange peptidene kan potensielt forstyrre signalet og redusere metodens sensitivitet. Ved å benytte spesifikke antistoffer til opprensing av prøvene, etterfulgt av opprensing med fast-fase-ekstraksjon og oppkonsentrering ved inndamping og reløsing i et mindre volum, vil antallet forurensende proteiner reduseres. På denne måten vil deteksjonsgrensen antakelig senkes ytterligere i forhold til i de tidligere arbeidene. En annen fordel ved denne metoden i forhold til metoden utviklet av Miliotis et al., er at det å benytte bead-beating til homogenisering fremfor Dounce homogenisator er svært tidsbesparende og gjør metoden mer anvendelig.

Ettersom den utviklede metoden gir gode resultater ved analyse av standard men ikke ved analyse av blanding av celler og standard, vil en naturlig fortsettelse av metodeutviklingen være å eliminere komponenter i cellen som potensielt kan forstyrre analysen. Ved å tilsette magnetiske kuler til cellehomogenatet, vil disse kunne binde uønskede antistoffer som er frigjort fra lymfocytene ved homogenisering. Fjernes deretter de magnetiske kulene, vil de forurensende antistoffene elimineres fra prøven og en eventuell fortrenning av de tilsatte antistoffene fra de magnetiske kulene vil muligens ikke inntreffe. Eventuelt kan prøvene sentrifugeres etter homogenisering, slik at membranfragmenter inneholdende P-gp synker til bunnen og cytosoliske proteiner vil være løst i supernatanten. Ved å fjerne supernatanten etter sentrifugeringen vil mange proteiner, inkludert antistoffer og proteaser, og andre forurensinger bli eliminert fra prøvene. Zhang et al. benyttet seg av dette i sin prosedyre for ekstraksjon av membranproteiner [103]. Deretter vil IP kunne utføres som beskrevet i 2.6.3. Om antistoffer frigjort fra PBMC er et reelt problem for analysen kan undersøkes. Standard, antistoff og kuler behandles som beskrevet i avsnitt 2.6.3. I tillegg homogeniseres to prøver med PBMC. Magnetiske kuler tilsettes det ene røret med PBMC, slik at antistoffer fra lymfocytene binder seg. Ved å fjerne supernatanten vil antistoffene henge igjen på de magnetiske kulene slik at disse elimineres fra prøvene. Til celleprøven hvor antistoffene er fjernet tilsettes halvparten av prøven med standard. Den resterende halvdel med standard tilsettes homogenatet hvor antistoffene ikke er fjernet. Dersom analysen av blandingen hvor antistoffene er fjernet gir utbytte av P-gp, og blandingen hvor antistoffene ikke er fjernet ikke gir utbytte av P-gp, vet vi at antistoffene er en del av problemet. En homogeniseringsprosedyre med fjerning av antistoff i de mononukleære cellene før IP, vil da kunne utvikles.

I tillegg til utfordringer med komponenter i cellene, er det lave nivået av P-gp i PBMC i forhold til i de transfekterte cellemodellene en utfordring. Dette medfører at en lavere deteksjonsgrense for signaturpeptidet kreves. Ved å bytte fra Orbitrap til trippelkvadrupol kan man selektere hvilke masser som skal analyseres før analysen igangsettes. Ved en slik analyse vil en lavere deteksjonsgrense muliggjøres, og sannsynligheten for en vellykket analyse vil dermed øke. Videre må det lages en standardkurve for at P-gp skal kunne kvantifiseres. Ved hjelp av et syntetisk peptid tilsvarende det valgte signaturpeptidet og et SIL-peptid (stabil isotop labeled-peptid) som intern standard, kan en standardkurve lages. SIL-peptidet er identisk signaturpeptidet, men det vil være litt tyngre og kan derfor separeres fra signaturpeptidet ved analyse. Løsninger med ulike kjente konsentrasjoner av det syntetiske

peptidet tillages og prøvene tilsettes en fast kjent konsentrasjon SIL-peptid. Løsningene analyseres ved LC-MS/MS. Ratio mellom topphøyden til signaturpeptidet og topphøyden til intern standarden beregnes og plottes på y-aksen. På x-aksen plottes konsentrasjonen av det syntetiske peptidet. Dette vil ikke korrigere for tap av P-gp under IP og proteolyse, men forutsatt at dette er relativt stabilt, vil analyseresultatene kunne benyttes til sammenligning av ulike prøver.

5 Konklusjon

Det har blitt utviklet en metode for å detektere P-gp i membraner fra transfekterte insektceller ved hjelp av; immunoekstraksjon (IP), proteolyse, fast-fase-ekstraksjon og analyse med LC-MS/MS. Metoden baserer seg på analyse av et signaturpeptid som representerer P-gp under analysen. Immobilisering av antistoff etter antistoff-antigen interaksjonen er inntruffet (indirekte IP) ble vist å øke utbyttet betydelig. Videre bidro kombinasjon av to antistoff og tilsats av digitonin før IP til økt utbytte av P-gp. For analyse av mononukleære celler kreves homogenisering av cellene innledningsvis, slik at membranfragmenter dannes. Bead-beating (Precellys[®]) med tilsats av antistoff før homogenisering ga utbytte av P-gp ved undersøkelser med standard. Videre arbeid med optimalisering av metoden er nødvendig før vellykkede analyser av lave nivåer av transportøren i PBMC isolert fra fullblod kan utføres.

Litteraturliste

1. Musshoff, F., U.M. Stamer, and B. Madea, *Pharmacogenetics and forensic toxicology*. Forensic Sci Int, 2010. **203**(1-3): p. 53-62.
2. Lin, J.H., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic variability: a daunting challenge in drug therapy*. Curr Drug Metab, 2007. **8**(2): p. 109-36.
3. Evans, W.E. and H.L. McLeod, *Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 538-49.
4. Belle, D.J. and H. Singh, *Genetic factors in drug metabolism*. Am Fam Physician, 2008. **77**(11): p. 1553-60.
5. Stamer, U.M. and F. Stuber, *The pharmacogenetics of analgesia*. Expert Opin Pharmacother, 2007. **8**(14): p. 2235-45.
6. Brunton, L., B. Chabner, and B. Knollmann, *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 12 ed. 2011: McGraw-Hill Companies Inc.
7. Verbeeck, R.K. and F.T. Musuamba, *Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. **65**(8): p. 757-73.
8. Delco, F., et al., *Dose adjustment in patients with liver disease*. Drug Saf, 2005. **28**(6): p. 529-45.
9. Blouin, R.A. and G.W. Warren, *Pharmacokinetic considerations in obesity*. J Pharm Sci, 1999. **88**(1): p. 1-7.
10. Fleisher, D., et al., *Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications*. Clin Pharmacokinet, 1999. **36**(3): p. 233-54.
11. Kappas, A., et al., *Effect of charcoal-broiled beef on antipyrine and theophylline metabolism*. Clin Pharmacol Ther, 1978. **23**(4): p. 445-50.
12. Pantuck, E.J., et al., *Stimulatory effect of brussels sprouts and cabbage on human drug metabolism*. Clin Pharmacol Ther, 1979. **25**(1): p. 88-95.
13. Lown, K.S., et al., *Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2545-53.
14. Lam, Y.W., et al., *Principles of drug administration in renal insufficiency*. Clin Pharmacokinet, 1997. **32**(1): p. 30-57.
15. Nebert, D.W., *Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist?* Am J Hum Genet, 1997. **60**(2): p. 265-71.
16. Kalow, W. and D.R. Gunn, *The relation between dose of succinylcholine and duration of apnea in man*. J Pharmacol Exp Ther, 1957. **120**(2): p. 203-14.
17. Hein, D.W., et al., *Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases: a symposium in honor of Wendell W. Weber*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(12): p. 1425-32.
18. Guillemette, C., *Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes*. Pharmacogenomics J, 2003. **3**(3): p. 136-58.
19. Lai, Y., et al., *Impact of drug transporter pharmacogenomics on pharmacokinetic and pharmacodynamic variability - considerations for drug development*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. **8**(6): p. 723-43.
20. Lin, J.H., *Tissue distribution and pharmacodynamics: a complicated relationship*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(1): p. 39-65.
21. Kushihara, H. and Y. Sugiyama, *In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(1): p. 37-52.

22. Giacomini, K.M., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
23. Klaassen, C.D. and L.M. Aleksunes, *Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(1): p. 1-96.
24. Zhou, S.F., *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 802-32.
25. Vasiliou, V., K. Vasiliou, and D.W. Nebert, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. Hum Genomics, 2009. **3**(3): p. 281-90.
26. Procko, E., et al., *The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter*. FASEB J, 2009. **23**(5): p. 1287-302.
27. Biemans-Oldehinkel, E., M.K. Doeven, and B. Poolman, *ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1023-35.
28. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.
29. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7735-8.
30. Fromm, M.F., *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(8): p. 423-9.
31. Chaudhary, P.M., E.B. Mechetner, and I.B. Roninson, *Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes*. Blood, 1992. **80**(11): p. 2735-9.
32. Tsujimura, S. and Y. Tanaka, *Treatment strategy based on targeting P-glycoprotein on peripheral lymphocytes in patients with systemic autoimmune disease*. Clin Exp Nephrol, 2012. **16**(1): p. 102-8.
33. Uniprot. *P08183 (MDR1_HUMAN)*. 2013 [cited 2013 03.04]; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/p08183>.
34. Richert, N.D., et al., *Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells*. Biochemistry, 1988. **27**(20): p. 7607-13.
35. Greer, D.A. and S. Ivey, *Distinct N-glycan glycosylation of P-glycoprotein isolated from the human uterine sarcoma cell line MES-SA/Dx5*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1770**(9): p. 1275-82.
36. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *The dileucine motif at the COOH terminus of human multidrug resistance P-glycoprotein is important for folding but not activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2522-8.
37. Li, Y., et al., *The structure and functions of P-glycoprotein*. Curr Med Chem, 2010. **17**(8): p. 786-800.
38. Walker, J.E., et al., *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. EMBO J, 1982. **1**(8): p. 945-51.
39. Morris, D.I., et al., *Localization of the forskolin labeling sites to both halves of P-glycoprotein: similarity of the sites labeled by forskolin and prazosin*. Mol Pharmacol, 1994. **46**(2): p. 329-37.
40. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39706-10.

41. Martin, C., et al., *The multi-drug resistance reversal agent SR33557 and modulation of vinca alkaloid binding to P-glycoprotein by an allosteric interaction*. Br J Pharmacol, 1997. **122**(4): p. 765-71.
42. Callaghan, R., R.C. Ford, and I.D. Kerr, *The translocation mechanism of P-glycoprotein*. FEBS Lett, 2006. **580**(4): p. 1056-63.
43. Rosenberg, M.F., et al., *Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8294-9.
44. Tomblin, G., et al., *Properties of P-glycoprotein with mutations in the "catalytic carboxylate" glutamate residues*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46518-26.
45. Lam, F.C., et al., *beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein*. J Neurochem, 2001. **76**(4): p. 1121-8.
46. Aller, S.G., et al., *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1718-22.
47. Ernest, S. and E. Bello-Reuss, *Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(11): p. 2306-13.
48. De Rosa, M.F., et al., *Role of multiple drug resistance protein 1 in neutral but not acidic glycosphingolipid biosynthesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7867-76.
49. van Helvoort, A., et al., *MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine*. Cell, 1996. **87**(3): p. 507-17.
50. Raghu, G., et al., *Monoclonal antibodies against P-glycoprotein, an MDR1 gene product, inhibit interleukin-2 release from PHA-activated lymphocytes*. Exp Hematol, 1996. **24**(10): p. 1258-64.
51. Drach, J., et al., *Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1747-54.
52. Seelig, A. and E. Landwojtowicz, *Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers*. Eur J Pharm Sci, 2000. **12**(1): p. 31-40.
53. Seelig, A., *A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein*. Eur J Biochem, 1998. **251**(1-2): p. 252-61.
54. Sharom, F.J., *The P-glycoprotein multidrug transporter*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 161-78.
55. Robinson, L.J., et al., *Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts*. Biochemistry, 1997. **36**(37): p. 11169-78.
56. Hardy, S.P., et al., *Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels*. EMBO J, 1995. **14**(1): p. 68-75.
57. Kim, R.B., et al., *Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein*. Pharm Res, 1999. **16**(3): p. 408-14.
58. Cummins, C.L., W. Jacobsen, and L.Z. Benet, *Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(3): p. 1036-45.
59. Tsujimura, S., et al., *Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes*. Genes Cells, 2004. **9**(12): p. 1265-73.
60. Eliseeva, I.A., et al., *Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions*. Biochemistry (Mosc), 2011. **76**(13): p. 1402-33.

61. Sharom, F.J., *ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(1): p. 105-27.
62. Leslie, E.M., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **204**(3): p. 216-37.
63. Goda, K., Z. Bacso, and G. Szabo, *Multidrug resistance through the spectacle of P-glycoprotein*. Curr Cancer Drug Targets, 2009. **9**(3): p. 281-97.
64. Christensen, H. and M. Hermann, *Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 8.
65. Tsujimura, S., et al., *Clinical relevance of the expression of P-glycoprotein on peripheral blood lymphocytes to steroid resistance in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(6): p. 1676-83.
66. Yudoh, K., et al., *Increased expression of multidrug resistance of P-glycoprotein on Th1 cells correlates with drug resistance in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(9): p. 2014-5.
67. Suzuki, K., et al., *Tacrolimus, a calcineurin inhibitor, overcomes treatment unresponsiveness mediated by P-glycoprotein on lymphocytes in refractory rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2010. **37**(3): p. 512-20.
68. Gotzl, M., et al., *MDR1 gene expression in lymphocytes of patients with renal transplants*. Nephron, 1995. **69**(3): p. 277-80.
69. Falck, P., et al., *Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients*. Transplantation, 2008. **85**(2): p. 179-84.
70. Lieber, D.C., *Introduction to proteomics*. 2002, United States of America: Humana Press Inc.
71. Doerr, A., *Mass spectrometry-based targeted proteomics*. Nat Methods, 2013. **10**(1): p. 23.
72. Walsh, G.M., et al., *Mass spectrometry-based proteomics in biomedical research: emerging technologies and future strategies*. Expert Rev Mol Med, 2010. **12**: p. e30.
73. Angel, T.E., et al., *Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(10): p. 3912-28.
74. Chen, G. and B.N. Pramanik, *Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects*. Drug Discov Today, 2009. **14**(9-10): p. 465-71.
75. Fusaro, V.A., et al., *Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(2): p. 190-8.
76. Kanapin, A., et al., *Mouse proteome analysis*. Genome Res, 2003. **13**(6B): p. 1335-44.
77. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
78. Arispe, N. and M. Doh, *Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease A β (1-40) and (1-42) peptides*. FASEB J, 2002. **16**(12): p. 1526-36.
79. Mitchell, K.J., T. Tsuboi, and G.A. Rutter, *Role for plasma membrane-related Ca²⁺-ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic beta-cell Ca²⁺ homeostasis revealed by RNA silencing*. Diabetes, 2004. **53**(2): p. 393-400.
80. Vuckovic, D., et al., *Membrane proteomics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Analytical approaches and challenges*. Proteomics, 2013. **13**(3-4): p. 404-23.
81. Helbig, A.O., A.J. Heck, and M. Slijper, *Exploring the membrane proteome--challenges and analytical strategies*. J Proteomics, 2010. **73**(5): p. 868-78.

82. Arnold, T. and D. Linke, *The use of detergents to purify membrane proteins*. Curr Protoc Protein Sci, 2008. **Chapter 4**: p. Unit 4 8 1-4 8 30.
83. Protein Discover Inc. *PPS silent surfactant solubilizes membrane proteins and cleaves to eliminate detergent interference*. 2009 [cited 2013 06.05]; Available from: http://archosie.shared.hosting.zen.co.uk/Editor/assets/pdi/brochures,%20apps%20and%20ppts/pps_datasheet_product.pdf.
84. Fan, D., et al., *Enhancement by sodium caprate and sodium deoxycholate of the gastrointestinal absorption of berberine chloride in rats*. Drug Dev Ind Pharm, 2012.
85. Eid, S.Y., M.Z. El-Readi, and M. Wink, *Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells*. Phytomedicine, 2012. **19**(14): p. 1307-14.
86. Dey, P. and J. Harborne, *Plant biochemistry*. 1997, San Diego: Academic Press.
87. Santos, H., C. Lodeiro, and J. Capelo-Martinez, *The power of ultrasound*. 2009, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
88. Burden, D. *Guide to the Homogenization of Biological Samples*. 2008 07.09.08 [cited 2013 06.05]; Available from: <http://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/Homogenization%20Guide%20ver.1.pdf>.
89. Verollet, R., *A major step towards efficient sample preparation with bead-beating*. Biotechniques, 2008. **44**(6): p. 832-3.
90. Pedersen-Bjergaard, S. and K. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*, 2004, Fagbokforlaget: EU.
91. Halquist, M.S. and H. Thomas Karnes, *Quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of macromolecules using signature peptides in biological fluids*. Biomed Chromatogr, 2011. **25**(1-2): p. 47-58.
92. Matthiesen, R. and K.E. Mutenda, *Introduction to proteomics*. Methods Mol Biol, 2007. **367**: p. 1-35.
93. Li, F., D. Fast, and S. Michael, *Absolute quantitation of protein therapeutics in biological matrices by enzymatic digestion and LC-MS*. Bioanalysis, 2011. **3**(21): p. 2459-80.
94. Xie, F., R.D. Smith, and Y. Shen, *Advanced proteomic liquid chromatography*. J Chromatogr A, 2012. **1261**: p. 78-90.
95. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **872**(1-2): p. 1-22.
96. Kicman, A.T., M.C. Parkin, and R.K. Iles, *An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **260-262**: p. 212-27.
97. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
98. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
99. BD Bioscience Company, *BD Gentest human P-glycoprotein (P-gp or MDR1) Membranes*, 2001.
100. Life Technologies Corporation. *Dynabeads Protein G*. 2011 [cited 2013 07.05]; Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/DynabeadsProteinG_man.pdf.
101. Lund, H., et al., *Immuno-MS based targeted proteomics: highly specific, sensitive, and reproducible human chorionic gonadotropin determination for clinical diagnostics and doping analysis*. Anal Chem, 2012. **84**(18): p. 7926-32.

102. Miliotis, T., et al., *Development of a highly sensitive method using liquid chromatography-multiple reaction monitoring to quantify membrane P-glycoprotein in biological matrices and relationship to transport function*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(12): p. 2440-9.
103. Zhang, Y., et al., *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry based targeted proteomics quantification of P-glycoprotein in various biological samples*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011. **25**(12): p. 1715-24.
104. Life Technologies Corporation. *Dynabeads Protein G*. 2013 [cited 2013 02.05]; Available from:
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/dynabeadsproteing_man.pdf.
105. Mechetner, E.B. and I.B. Roninson, *Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5824-8.
106. Nelson, D. and M. Cox, *Leninger Principles of biochemistry fourth edition*. 2005, New York: W.H. Freeman and Company.
107. Masuda, T., M. Tomita, and Y. Ishihama, *Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis*. Journal of proteome research, 2008. **7**(2): p. 731-740.
108. Lin, Y., et al., *Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins*. Anal Biochem, 2008. **377**(2): p. 259-66.