

DOKTORAND: Håvard Loftheim
GRAD: Philosophiae doctor
FAKULTET: Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
INSTITUTT: Farmasøytisk Institutt
FAGOMRÅDE: Analytisk kjemi/Farmakologi
VEILEDERE: Professor Léon Reubsæet og Professor Anders Åsberg
DISPUTASDATO: 16.9.2011

AVHANDLINGENS TITTEL: *Searching for biomarkers of acute rejection in renal transplant recipients – development and optimization of a urinary proteomic approach*

Analyse av urinprøver fra nyretransplanterte pasienter har ført til identifisering av 11 proteiner som kan ha sammenheng med akutte reaksjonsepisoder hos denne pasientgruppen. Akutte reaksjonsepisoder har vist å øke risikoen for organavstøtning og de identifiserte proteinene kan potensielt brukes som et verktøy for monitorering av "tilstanden" til det transplanterte organet og justere behovet for medikamentell behandling til enhver tid. For pasienten vil dette kunne medføre færre behandlingstrengende perioder og ikke minst lengre levetid for den transplanterte nyren. Bruk av urin som prøvematriks er også fordelaktig sammenlignet med å utføre biopsi, som er nåværende standard, på grunn av svært enkel og tilgjengelig prøvetakning. Flere av de identifiserte proteinene var koblet til de samme biologiske prosessene og ble inndelt i 2 hovedgrupper basert på biologisk funksjon; proteiner relatert til immunrespons og proteiner relatert til cellevekst.

I identifikasjonsarbeidet har hele proteinuttrykket i urin blitt analysert, mellom 500 og 1000 proteiner i hver enkelt prøve. For å kunne oppnå dette, har høyoppløselig og sensitiv massespektrometri blitt brukt til å detektere og massebestemme proteiner i svært lave konsentrasjoner. En urinprøve er i utgangspunktet en svært kompleks matriks, noe som gjør opprensning av proteinene i prøven nødvendig for å få utført analysen. Første del av dette arbeidet var derfor fokusert rundt optimalisering av prøveopparbeidelsen i urin inkludert opprensning og oppkonsentrering der en robust metode med best mulig utbytte var målet. For å kunne identifisere så mange proteiner som mulig, ble prøvekompleksiteten ytterligere redusert ved kjemisk separasjon av den gjenværende proteinblandingen i ulike fraksjoner rett før analyse i massespektrometeret. Dette ble gjort ved hjelp av kromatografi hvor ulike separasjonsmetoder i flere dimensjoner har blitt evaluert i dette arbeidet.

For å identifisere oppregulerte proteiner ved akutte reaksjonsepisoder ble urinprøver ved reaksjonstidspunktet sammenlignet med urinprøver rett etter transplantasjon hos hver enkelt pasient. Dette ble gjort ved hjelp av relativ kvantifisering med en stabil isotop (^{18}O), hvor proteinnivåer i ulike prøver kan sammenlignes direkte. Et stort optimaliseringsarbeid ble gjort før denne kvantifiseringsmetoden ble tatt i bruk på pasientprøver. Dette resulterte i en mer strømlinjeformet metode med en reduksjon av total tidsbruk fra over 30 timer til under 5 timer hvor i tillegg mindre variasjon og økt utbytte ble observert.