

Risiinitoksiinin näytteenkäsittelymenetelmät LC-MS tunnistusta varten

Pro gradu -tutkielma
Tampereen yliopisto
Biolääketieteellisen teknologian yksikkö
Marraskuu 2013
Annika Kivioja

KIITOKSET

Tutkielma tehtiin yhteistyössä Puolustusvoimien Teknillisen Tutkimuslaitoksen Räjähde- ja suojelutekniikkaosaston kanssa Ylöjärvellä. Haluan kiittää työni ohjaajia dosentti Tarmo Humppia (PVTT) sekä FM Tuuli Haatajaa (PVTT) kiinnostavasta tutkielman aiheesta, asiantuntevista neuvoista sekä avusta, jota olen saanut tätä työtä suunniteltaessa sekä toteutettaessa. Kiitos myös kaikille muille työkavereille, joiden ansiosta työskentely PVTT:llä oli ilostuttava ja ikimuistoinen kokemus.

Suuri kiitos myös FM Timo Krögerille hänen asiantuntevasta ja väsymättömästä opastuksestaan massaspektrometrian saloihin ja erityisesti hänen loputtomasta kärsivällisyydestään oppilastaan kohtaan. Kiitos myös professori Janne Jänikselle sekä tämän tutkimusryhmälle neuvoista sekä avusta tutkielman toteutuksessa.

Kiitos myös professori Markku Kulomaalle (Tampereen yliopisto, IBT) ohjauksesta tutkielman toteuttamisessa sekä työn tarkastamisesta.

Lopuksi haluan kiittää vielä perhettäni, joka on tukenut ja kannustanut minua tämän pitkällisen prosessin loppuun saattamisessa. Suurin kiitos kuuluu kuitenkin ”Elviiralle”, joka viimeistään pisti vauhtia työn lopulliselle valmistumiselle.

Tampere, marraskuu 2013

Annika Kivioja

PRO GRADU TUTKIELMA

Paikka: Tampereen yliopisto, Biolääketieteellisen teknologian yksikkö
Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos PVTT,
Räjähde- ja suojelutekniikkaosasto, Suojelutekniikan tutkimusala

Tekijä: Kivioja, Annika Eveliina

Otsikko: Risiinitoksiinin näytteenkäsittelymenetelmät LC-MS tunnistusta varten

Sivumäärä: 87

Ohjaajat: Dosentti Tarmo Humppi, FM Tuuli Haataja

Tarkastajat: Professori Markku Kulomaa, dosentti Tarmo Humppi

Aika: Marraskuu 2013

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Risiini on risiinikasvin (*Ricinus communis*) siemenissä esiintyvä erittäin toksinen proteiini, joka estää solujen proteiinisynteesin. Risiinitoksiinia pidetään potentiaalisena aineena biologiseen uhkailuun tai -terrorismin. Myrkyllisyytensä ja yksinkertaisen valmistuksen sekä raaka-aineiden helpon saatavuuden vuoksi, uhka risiinitoksiinin käytöstä terrorismin yhteydessä onkin kasvanut viime vuosikymmenten aikana. Tutkimuksen tavoitteena on kehittää CBRN-kenttälaboratorion olosuhteisiin soveltuva nopea ja yksinkertainen näytteenkäsittelymenetelmä risiinitoksiinin puhdistamista varten ennen näytteiden LC-MS-analysointia.

Tutkimusmenetelmät: Tutkimuksessa verrattiin kolmen eri affiniteetikromatografiatriisin tehokkuutta risiinitoksiinin puhdistamisessa risiinijauhenäytteistä sekä maitonäytteistä. Tämän lisäksi tutkimuksessa vertailtiin kahta erilaista risiinin trypsinisointimenetelmää ja niiden vaatimaa digestioaikaa ennen näytteiden LC-MS-analysointia.

Tutkimustulokset: Työssä käytetyistä kromatografiamenetelmistä galaktoosimatriisi puhdisti risiinitoksiinia tehokkaimmin, mutta sen avulla ei ollut mahdollista erottaa toksiinia siementen sisältämästä agglutiniinista. Glukoosimatriisi puolestaan ei sitonut agglutiniinia, mutta myös sen toksiinin puhdistuskapasiteetti oli pienempi. Trypsinointimenetelmistä Trypsin spin column -menetelmä oli tulosten mukaan tehokkaampi ja vaadittu digestioaika oli lyhyempi.

Johtopäätökset: Affiniteetikromatografia, jossa hyödynnetään risiinin lektiiniominaisuuksia sekä Trypsin spin column -trypsinisointimenetelmä soveltuvat hyvin käytettäväksi risiinitoksiinin esikäsittelymenetelminä CBRN-kenttälaboratorion olosuhteissa. Lisätutkimuksia kuitenkin vaaditaan näiden menetelmien tehokkuuden optimoimiseksi.

MASTER'S THESIS

Place: University of Tampere, Institute of Biomedical Technology
The Finnish Defense Forces Technical Research Centre PVTT
Explosives and NBC Technology Division

Author: Kivioja, Annika Eveliina

Title: Sample treatment methods for ricin toxin LC-MS analysis

Pages: 87

Supervisor: Docent Tarmo Humpi, FM Tuuli Haataja

Reviewers: Professor Markku Kulomaa, Docent Tarmo Humpi

Date: November 2013

ABSTRACT

Background and aims: Ricin is a highly toxic protein found in the seeds of *Ricinus communis*. The toxin inhibits cell's protein synthesis. Ricin is a potential biothreat agent because of its toxicity, easy production and worldwide availability of the raw materials. It has been associated with several bioterrorism incidents in recent years. The aim of this study is to develop a fast and easy to use method for ricin toxin purification in CBRN-field laboratory conditions, that could be used before conducting LC-MS-analysis.

Methods: Three different affinity chromatography methods were compared in this study to purify ricin toxin from ricin powder and milk samples. In addition, two different ricin toxin trypsinization methods and their digestion times were compared before LC-MS-analysis.

Results: From the chromatography methods used, galactose matrix was the most efficient method to purify ricin even though matrix couldn't separate ricin toxin from agglutinin. Glucose matrix didn't bind agglutinin but its capacity to purify ricin was much smaller. From the trypsinization methods used, Trypsin spin column was more effective method and it needed shorter digestion time than the traditional trypsinization.

Conclusion: Affinity chromatography, which uses ricin toxin's lectin properties and Trypsin spin column -trypsinization method suit well in the CBRN-field laboratory conditions. However, both methods should be further studied to optimize their effectiveness and the sample treatment methods needed.

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET	7
1. JOHDANTO	9
2. KIRJALLISUUSKATSAUS	11
2.1 YLEISTÄ.....	11
2.1.1 Risiinitoksiini biologisena taisteluaineena.....	13
2.1.2 Risiinitoksiinin rakenne	15
2.1.3 Risiininäytteestä löytyvät proteiinit	17
2.2 RISIINITOKSIININ TOIMINTA EUKARYOOTTISOLUSSA.....	20
2.2.1 Sitoutuminen solun pinnalle ja endosytoosi	21
2.2.2 Kuljetus Golgin laitteeseen	22
2.2.3 Retrogradinen kuljetus Golgin laitteen läpi endoplasmiseen kalvostoon	23
2.2.4 Kulkeutuminen sytosoliin	25
2.2.5 Toiminta ribosomissa.....	27
2.3 MYRKYTYKSEN KLIINISET OIREET JA HOITO	28
2.4 TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVÄT RISIINITOKSIININ ESIKÄSITTELY- JA ANALYYSIMENETELMÄT.....	30
2.4.1 Affiniteettikromatografia	30
2.4.2 Massaspektrometria	32
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	36
4. MENETELMÄT	38
4.1 RISIINIJAUHEEN VALMISTAMINEN.....	38
4.2 AFFINITEETTIKROMATOGRAFIA SOKERIPYLVÄILLÄ	39
4.2.1 Affiniteettikromatografiapylväiden valmistaminen.....	39
4.2.2 Risiinitoksiinin puhdistaminen sokeriaffiniteettikromatografialla	39
4.3 VASTA-AINEVÄLITTEINEN KROMATOGRAFIA.....	40
4.3.1 Immunoaffiniteettikromatografiapylväiden valmistaminen	40
4.3.2 Risiinitoksiinin puhdistaminen immunoaffiniteettikromatografialla.....	41
4.4 RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN PYYHKÄISYNÄYTTEISTÄ SOKERIAFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA.....	42
4.5. RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN MAITONÄYTTEISTÄ SOKERIAFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA.....	43
4.6 AFFINITEETTIKROMATOGRAFIANÄYTTEIDEN PUHTAUDEN ARVIOINTI SDS-PAGE:LLA.....	44

4.7 AFFINITEETTIKROMATOGRAFIANÄYTTEIDEN PUHTAUDEN ARVIOIMINEN WESTERN BLOTILLA	45
4.8 AFFINITEETTIKROMATOGRAFIAMENETELMIEN TEHOKKUUDEN VERTAILU LIUSKATESTILLÄ	46
4.9 RISIINITOKSIININ TRYPSINOINTI.....	47
4.10 LC-MS ANALYYSI.....	49
5. TULOKSET	52
5.1 RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN AFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA RISIINIJAUHEESTA	52
5.2 RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN AFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA MAIDOSTA	56
5.3 RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN AFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA PYYHINTÄNÄYTTEISTÄ.....	58
5.4 RISIINITOKSIININ TRYPSINOINTI JA TRYPSINOINTIMENETELMIEN VERTAILU.....	58
5.5 PUHDISTETUN RISIINITOKSIININ LC-MS-ANALYYSI.....	70
6. TULOSTEN TARKASTELU.....	72
6.1 AFFINITEETTIKROMATOGRAFIAMENETELMIEN VERTAILU	72
6.2 MAITO- JA PYYHKÄISYNÄYTTEET.....	77
6.3 TRYPSINOINTI JA LC-MS-ANALYYSI.....	78
7. JOHTOPÄÄTÖKSET.....	83
8. LÄHDELUETTELO.....	84

LYHENTEET

A ₂₈₀	absorbanssi aallonpituudella 280 nm
ACN	asetonitriili
Asn	asparagiini
ATP	adenosiinitrifosfaatti
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumin
CBRN	<i>engl.</i> Chemical, Biological, Radiological and Nuclear Defence
COPI	kuljetusvesikkeleit pallystav proteiinikompleksi
CWC	kemiallisten aseiden kieltosopimus
Cys	kysteini
Da	dalton
DNA	deoksiribonukleiinihappo
ELISA	entsyymivalitteinen immunometrinen menetelm <i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmakalvosto
ERAD	ER:ss tapahtuva proteiinien hajotus <i>engl.</i> endoplasmic-reticulum associated protein degradation
ESI	shkosumutusionisaatio
FA	muurahaishappo
FT-ICR-MS	Fourier-muunnosionisyklotroniresonanssi massaspektrometri
Gal	galaktoosi
Glu	glukoosi
GTP	guanosiinitrifosfaatti
HCL	suolahappo
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
IS	kaasuvirtausavusteinen shkosumutus
kDa	kilodalton
KDEL	signaalisekvenssi
K _{cat}	reaktionopeusvakio
K _m	Michaelisin-Mentenin vakio

LC	nestekromatografia
LD ₅₀	aineen myrkyllisyyden mittayksikkö
LTQ	lineaarinen kvadropoli-ioniloukku
M	molaarisuus (mol/l)
MALDI	matriisiavusteinen laserdesorptioionisaatio
MS	massaspektrometria
MS/MS	tandemmassaspektrometria
m/z	massa-varaussuhde
MW	molekyylipaino
OPCW	kemiallisten aseiden kieltosopimuksen valvontajärjestö
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PDI	pelkistävä disulfidi-isomeraasi
PI-3	fosfoinositidi-3
QIT	kvadrupoli-ioniloukkumassaspektrometria
RCA ₆₀	risiinitoksiini
RCA, RCA ₁₂₀	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
RTA	risiinitoksiinin A-ketju
RTB	risiinitoksiinin B-ketju
1 RIP	1-tyypin ribosomeja inaktivoiva proteiini
2 RIP	2-tyypin ribosomeja inaktivoiva proteiini
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidi geelielektroforeesi
TEMED	tetrametyleenietyleenidiamidi
TNF- α	tuumorinekroositekijä alfa
Tris	tris(hydroksimetyyli)amniometaani

1. JOHDANTO

Risiini kuuluu kemiallisten aseiden kieltosopimuksessa (Chemical Weapons Convention, CWC) listattuihin aineisiin ja on ainoa sopimuksessa kielletty proteiini (Poli ym. 2007; Ler ym. 2006). Kemiallisten aseiden kieltosopimus on vuonna 1997 solmittu kansainvälinen sopimus, joka kieltää kehittämästä, tuottamasta, varastoimasta ja käyttämästä kemiallisia taisteluaineita ja sen oli vuoden 2011 alkuun mennessä allekirjoittanut yhteensä 188 maata. Erilaiset kemialliset sekä biologiset aseet ovat kuitenkin edelleen suuri uhka, sillä valtioiden väliset sopimukset eivät sido terroristijärjestöjen tai sopimukseen kuulumattomien valtioiden bioasekehitystä. Risiinitoksiinia on käytetty viime vuosien aikana useissa pienemmissä biorikoksissa ja sen käyttö on yleistynyt myös erilaisten radikaali- ja terrorismiryhmien toimesta (Virginia ym. 2012).

Suomessa päävastuu CBRN-terrorismin torjunnasta on poliisilla, mutta Puolustusvoimien tehtävänä on tukea muita viranomaisia CBRN-uhkien ennaltaehkäisyssä sekä torjunnassa (Mäkelä, 2007). Kemiallisilta sekä biologisilta aseilta suojauduttaessa niiden mahdollisimman varhainen havaitseminen ja tunnistaminen on ensiarvoisen tärkeää. Jotta tämä olisi mahdollista, tarvitaan riittävää välineistöä sekä tekniikkaa erilaisten agenssien tunnistamiseksi sekä niiltä suojautumiseksi. Puolustusvoimien CBRN-kenttälaboratorio on suunniteltu B- ja C-aseiden tunnistamista varten ja se toimii sodanajan suojelutehtävissä, viranomaisyhteistyössä sekä kansainvälisissä kriisinhallintatehtävissä (Mäkelä, 2007). Kenttälaboratorion toiminnan kannalta on tärkeää kehittää uusia, herkempiä sekä nopeampia tunnistusmenetelmiä, joiden ansiosta suojautuminen mahdollisilta biologisilta sekä kemiallisilta agensseilta olisi tehokkaampaa.

Tämän *pro gradu* -tutkielman tarkoituksena on selvittää eri affiniteettikromatografiamenetelmien tehokkuutta risiinitoksiinia sisältävien näytteiden puhdistamisessa CBRN-kenttälaboratorio-olosuhteissa ennen näytteiden LC-MS-analysointia. Tämän lisäksi tutkielmassa vertaillaan myös kahta erilaista trypsinisointimenetelmää ja sitä, miten ne soveltuvat risiinitoksiinin digestioimiseen

kenttälaboratossa. Vaikka risiinitoksiinin nopeaan tunnistamiseen on jo olemassa erilaisia risiini-vasta-aineiden toimintaan perustuvia pikatestejä, on myös muiden vasta-aineista riippumattomien tunnistusmenetelmien kehittäminen tärkeää. Tutkielmassa huomioidaan kehitettävien esikäsitelymenetelmien, eli puhdistamisen ja digestoinnin, nopeus ja helppous ennen kuin näytteiden sisältö analysoidaan oikeudellisesti pätevällä MS-menetelmällä joko kenttälaboratoriossa tai sen ulkopuolella.

Risiinitoksiinin lisäksi *Ricinus communis* -kasvin siemenistä löytyy myös *Ricinus agglutinin* -proteiini, joka vaikeuttaa risiinitoksiinin analytiikkaa. Vaikka risiinin siemenistä löytyvä agglutiniini ei ole myrkyllinen, se on rakenteeltaan ja lektiiniominaisuuksiltaan risiinitoksiinin kaltainen, minkä vuoksi sen erottaminen erilaisilla affiniteettikromatografiomenetelmillä voi olla vaikeaa. Koska tutkielma keskittyy vertailemaan risiinitoksiinin puhdistumista eri esikäsitelymenetelmillä, arvioidaan myös menetelmien tehokkuutta erottaa risiini sekä agglutiniini toisistaan. Kenttälaboratorion ensivastetoiminnan kannalta risiinitoksiinin erottaminen agglutiniinista ei aina ole välttämätöntä, sillä molempien proteiinien löytyminen näytteestä kertoo risiini-siementen käytöstä. Risiinitoksiinin oikeudellisesti pätevän analysoinnin kohdalla risiinitoksiini tulee kuitenkin luotettavasti pystyä erottamaan agglutiniinista.

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 YLEISTÄ

Risiini on risiinikasvin (*Ricinus communis*) siemenistä löytyvä erittäin toksinen proteiini, joka estää solujen proteiinisynteesin aiheuttaen solujen kuoleman (Kalb & Barr, 2009). Risiinikasvi kuuluu tyräkkikasvien heimoon (*Euphorbiaceae*) ja se elää laajalti trooppisissa oloissa ympäri maailmaa, erityisesti Afrikassa ja Aasiassa. Trooppisilta alueilta risiinikasvi on levinnyt myös subtrooppiselle sekä lauhkealle vyöhykkeille ja sitä esiintyy yleisesti rikkakasvina mm. läntisessä Amerikassa (Al-Tamimi & Hegazi, 2008). Viileämmillä alueilla, kuten Suomessa, sitä käytetään yksivuotisena koristekasvina. Risiinikasvi on pensasmainen, sillä on joko vihreät tai punertavat suuret lehdet ja se voi kasvaa jopa nelimetrisiksi (Coopman ym. 2009).



Kuva 2.1.1. *Ricinus communis*.



Kuva 2.1.2. Koristeelliset siemenkodat, joiden sisällä siemenet kehittyvät.

Risiinin siemenet ovat sileitä ja niiden pinnalla on tyypillisesti helposti tunnistettavia tummia tai vaaleita kuvioita. Siemenet eroavat tavallisesti väritykseltään jonkin verran

niiden tuottamien kasvilajikkeiden perusteella (Coopman ym. 2009). Risiinikasvin siemeniä käytetään yleisesti ympäri maailmaa risiiniöljyn tuottamiseen. Risiiniöljyä käytetään mm. teollisuuden voiteluaineena, maaleissa, kosmetiikassa ja jopa ulostuslääkkeenä. Risiiniöljyn suurimpia tuottajamaita ovat tällä hetkellä Intia, Kiina ja Brasilia. (Worbs ym, 2011; Doan, 2004) Vielä 1960-luvulle asti myös Yhdysvalloissa viljeltiin risiiniä laajalti risiiniöljyn tuotantoa varten, kunnes synteettiset öljyt tulivat markkinoille. (Doan, 2004) Viime vuosien aikana risiiniöljyn käyttömahdollisuuksia myös biopoltoaineen sekä biodieselin tuottamisessa on tutkittu. Siementen lisäksi, risiinikasvin lehtiä sekä juuria on käytetty vuosituhansien ajan perinteisessä kansanparannuksessa, kuten esimerkiksi tulehdusten hoidossa ja raskauden ehkäisyssä. (Worbs ym., 2011; Al-Tamimi & Hegazi, 2008)



Kuva 2.1.3. Siemeniä eri risiinikasvin lajikkeista.

Eniten risiinitoksiinia löytyy siemenistä, sekä siemeniä ympäröivistä suojaavista rakenteista. (Coopman ym. 2009) Risiinin siemenet sisältävät 1–5 % risiinitoksiinia riippuen kasvin lajikkeesta. Risiiniöljyn ei kuitenkaan pitäisi sisältää myrkyllistä toksiinia, sillä risiinitoksiini on vesiliukoinen eikä liukene risiiniöljyyn. (Worbs ym. 2011; Audi ym. 2005) Risiiniöljy koostuu pääasiassa risiinille tunnusomaisesta rasvahaposta (Ricinoleic acid), jota ei tavallisesti löydy muualta luonnosta. Siemenen

painosta noin 35–55 % on öljyä ja noin puolet jäljelle jäävästä massasta koostuu hiilihydraateista. (Wunschel ym. 2009; Poli ym. 2007) Risiiniöljy puristetaan siementen sisältämästä massasta, jolloin myrkyllinen risiinitoksiini jää puristusjätteeseen. Runsaasti proteiinia sisältävän sivutuotteen käyttömahdollisuuksia on tutkittu paljon ja paras vaihtoehto olisi sen hyödyntäminen karjan rehuna tai maanparannuksessa. Ongelmana on kuitenkin se, että puristusjätteen sisältämää risiinitoksiinia ei usein pystytä tehokkaasti inaktivoimaan edes riittävällä kuumennuksella. Tutkijat ovatkin yrittäneet kehittää myrkyttömän risiinikasvin öljyn tuotantoa varten siinä kuitenkin vielä onnistumatta. (Worbs ym. 2011)

Myös risiinin käyttömahdollisuuksia syöpähoidoissa on tutkittu viime vuosikymmenten aikana. Risiinitoksiinin ribosomeja inhiboiva alayksikkö voidaan kemiallisesti liittää tuumorispesifisiin vasta-aineisiin, jolloin toksiinin vaikutus kohdistuu ainoastaan syöpäsoluja kohtaan. Myös kokonainen risiinitoksiinimolekyylä, jonka sitoutumispotentiaalia normaalien solujen pinnalle on muunneltu, voidaan liittää monoklonaalisiin vasta-aineisiin. Risiiniä sisältävien immunotoksiinien tehoa erilaisia syöpätyyppejä vastaan on jo tutkittu ja niistä on saatu lupaavia tuloksia. Risiinitoksiinin ominaisuuksista on uskottu olevan hyötyä myös mm. luuydinsiirtojen sekä soluviljelyn yhteydessä. (Poli ym. 2007; Audi ym. 2005)

2.1.1 Risiinitoksiini biologisena taisteluaineena

Biologiset sekä kemialliset sodankäynnin välineet voidaan jakaa karkeasti mikro-organismeihin, toksiineihin sekä synteettisiin kemiallisiin aineisiin, jotka voivat aiheuttaa tuhoa ihmisille, eläimille tai kasveille. Toksiinit ovat biologista alkuperää olevia kemiallisia yhdisteitä tai proteiineja, jotka ovat peräisin kasveista, sienistä, eläimistä tai bakteereista. (Ler ym. 2006) Ne eroavat suuresti molekyylikooltaan, rakenteeltaan sekä vaikutustavaltaan. Toksiinit ovat tavallisesti huomattavasti myrkyllisempiä kuin synteettiset kemialliset taisteluaineet ja niiden välitön tunnistaminen näytteestä on rajoitetumpaa, mikä tekee toksiineista yhden potentiaalisimmista tulevaisuuden sodankäynnin välineistä. (Seto & Kanamori-Kataoka, 2005)

Bioaseen tehokkuuteen vaikuttavat mm. tappava annos, kyky lamaannuttaa kohdepopulaatio sekä toimivat levitysmenetelmät (Ler ym. 2006). Risiini on toksiini, jota voidaan toistaiseksi käyttää kemiallisen sodankäynnin sekä terrorismin yhteydessä pääasiassa vain hyvin kohdennetuissa iskuissa tiettyä ihmisryhmää vastaan tai salamurhien yhteydessä, koska suurikokoisen proteiinitoksiinin levittäminen kaasumaisessa muodossa on mahdotonta, sillä se ei haihdu (Virginia ym. 2012). Toksiinien tuottaminen on yleisesti ottaen yksinkertaista ja edullista sekä tarvittavat raaka-aineet ovat helposti saatavilla. Potentiaalistaan huolimatta, molekyyllipainoltaan suurikokoisten toksiinien, kuten risiinin, tehottomat levitysmenetelmät sekä toksiinituotannon heikko saanto rajoittavat niiden laajamittaista käyttöä terrorismissa sekä biologisessa sodankäynnissä. Risiinin kohdalla tehokkaita levitysmenetelmiä olisivat sen levittäminen aerosolina, ruokaan ja juomaveteen sekoittaminen tai suora injektointi elimistöön. (Virginia ym. 2012; Ganesan ym. 2010).

Risiiniä tuotettiin ensimmäistä kertaa sodankäyntiä varten Ensimmäisen maailmansodan aikana Yhdysvalloissa. Toisen maailmansodan aikana Yhdysvallat kehittivät risiiniä sisältävän pommin (W-pommi) yhteistyössä Iso-Britannian kanssa, mutta sitä ei koskaan ehditty käyttää sotatarkoituksiin. Vuonna 1989 Irak testasi todistettavasti risiinitoksiinin levitystä aerosolimuodossa omissa kokeissaan ja myös Iranin tiedetään tuottaneen risiiniä bioasetarkoituksissa. (Poli ym. 2007; Kumar ym. 2004) Viime aikoina useiden terroristijärjestöjen tiedetään tutkineen ja tuottaneen risiiniä. Al-Qaeda-organisaation tiedetään tuottaneen risiiniä vuonna 2002 ja Talibanien raportoidaan puolestaan käyttäneen risiiniä Afganistanissa vuonna 2001 (Virginia ym. 2012). Tunnetuin risiinitoksiinin väärinkäyttötapaus lienee kuitenkin bulgarialaisen toimittajan Georgi Markovin salamurha vuonna 1978. Murha-aseena käytettiin sateenvarjoa, jonka piikkiin oli asennettu risiiniä sisältävä pieni kuula, joka pistettiin huomaamattomasti uhrin ihon läpi. Markov kuoli risiinimyrkytyksen seurauksena muutaman päivän kuluttua. (Virginia ym. 2012; Doan 2004)

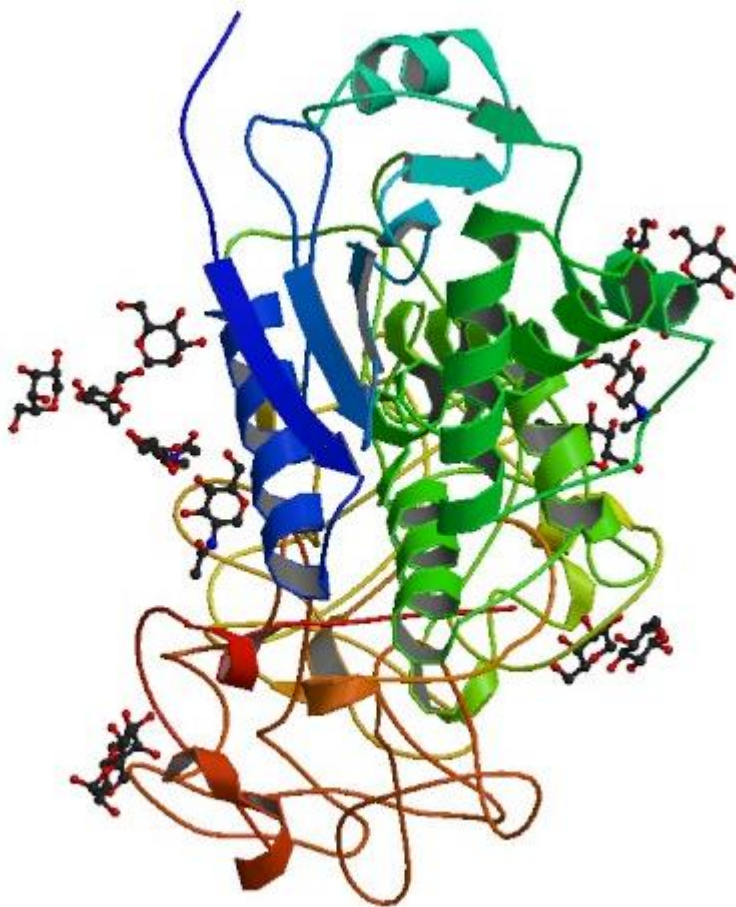
Risiinitoksiini on myrkyllisin sekä kaikkein helpoimmin saatavilla oleva kasvitoksiini, jota syntyy runsaasti vuosittain risiiniöljytuotannon sivutuotteena (Virginia ym. 2012; Ler ym. 2006). Laaja-alaisen viljelyn lisäksi risiinikasvia esiintyy vapaasti kasvavana esim. Afrikassa, Intiassa, Lähi-idässä sekä eteläisen Ranskan alueella, mikä helpottaa sen saatavuutta. Toksiinin eristäminen risiinikasvin siemenistä onnistuu helposti varsin yksinkertaisten menetelmien avulla ja ohjeita toksiinin tuottamiseen löytyy runsaasti erilaisilta Internet-sivuilta. Risiinin tappava annos (LD₅₀) on noin 3-15 µg/kg (Colburn, 2010; Poli ym. 2007). Vaikka risiinitoksiini ei ole yhtä myrkyllinen kuin esim. botuliinitoksiini tai stafylokokin enterotoksiini, aiheuttaa se siitä huolimatta huomattavan uhan (Poli ym. 2007). Risiinimyrkytykseen ei ole toistaiseksi olemassa vastalääkettä ja ainoastaan elintoimintoja tukevaa hoitoa voidaan antaa. Joitain tutkimuksia rokotteen kehittämisestä risiinitoksiinia vastaan on alkanut viime vuosien aikana. (Doan, 2004) Myrkyllisyytensä, pysyvyytensä, yksinkertaisen valmistuksen sekä raaka-aineiden helpon saatavuuden vuoksi uhka risiinitoksiinin käytöstä terrorismin yhteydessä onkin kasvanut viime vuosikymmenten aikana. (Virginia ym. 2012; Griffiths, 2011)

Risiini kuuluu kemiallisten aseiden kieltosopimuksessa (Chemical Weapons Convention, CWC) kiellettyihin aineisiin ja on ainoa sopimuksessa kielletty proteiini (Poli ym. 2007; Ler ym. 2006). Kemiallisten aseiden kieltosopimus on vuonna 1997 solmittu kansainvälinen sopimus, joka kieltää kehittämästä, tuottamasta, varastoimasta ja käyttämästä kemiallisia taisteluaaineita ja sen oli vuoden 2011 alkuun mennessä allekirjoittanut yhteensä 188 maata. Sopimuksen toteutumista valvoo Kemiallisten aseiden kieltojärjestö (Organisation of Prohibition of Chemical Weapons, OPCW). (Ganesan ym. 2010)

2.1.2 Risiinitoksiinin rakenne

Risiini on proteiini, joka koostuu kahdesta polypeptidiketjusta (RTA ja RTB) ja kuuluu tyyppin 2 ribosomeja inaktivoiviin proteiineihin (ribosome inactivating-protein, 2 RIP) (Musshof & Madea, 2009). Risiinitoksiinin molekyylipaino on noin 64–66 kDa ja se on tertiääriseltä rakenteeltaan globulaarinen. Proteiinin polypeptidiketjut ovat kiinnittyneet

toisiinsa yhdellä rikkisillalla ja molemmat alayksiköt toteuttavat omaa tehtäväänsä risiinitoksiinin toiminnassa. Rikkisilta muodostuu RTA:n 259. aminohapon sekä RTB:n 4. aminohapon välille (Kumar ym. 2011; Musshof & Madea,2009). Molemmat ketjut ovat glykoproteiineja ja niiden pinnalta löytyy useita mannoositähteitä (Poli ym. 2007).



Kuva 2.1.2.1. Risiinitoksiinin rakenne (RCSB Protein Data Bank, 2AAI).

A-ketju (RTA) on molekyylipainoltaan noin 32 kDa ja se vastaa proteiinin toksisista ominaisuuksista. (Kumar ym. 2011) A-ketju koostuu 267 aminohaposta ja sillä on kolme rakenteellista domeenia. RTA:n aktiivinen kohta on sijoittunut näiden kolmen domeenin rajapinnalle ja se vastaa toksiinin ribosomeja inhiboivasta vaikutuksesta. (Musshof & Madea, 2009) Tämän lisäksi A-ketjun rakenteesta on löydetty aktiivinen lipaasi kohta, jonka arvellaan olevan tärkeä toksiinin A-ketjun kulkeutumisessa solun sisällä (Poli ym.

2007). A-ketjun tertiäärinen rakenne sisältää kahdeksan α -kierrettä ja kahdeksan β -levyä (Hostetler, 2005).

Risiinitoksiinin B-ketju (RTB) on galaktoosi- tai N-asetyyliagalaktosamiinitähteisiin sitoutuva lektiini, joka on molekyylipainoltaan noin 34 kDa (Mussof & Madea, 2009). Lektiniit ovat proteiineja, jotka sitoutuvat liukoisiin hiilihydraatteihin tai solujen pinnalla oleviin sokerikomponentteihin ja vastaavat myös solujen mahdollisesta agglutinoitumisesta eli yhteenliimautumisesta (Doan, 2004). B-ketju ei ole katalyyttisesti aktiivinen, eikä omaa toksisia vaikutuksia, mutta se vastaa toksiinin sitoutumisesta kohdesolunsa pinnalle sekä sen kulkeutumisesta solun sisään (Mussof & Madea, 2009). Useiden solutyypin pinnalla on runsaasti erilaisia glykoproteiineja sekä glykolipidejä joihin risiinin B-ketju voi kiinnittyä. B-ketjulla on lisäksi myös useita sitoutumiskohtia, joiden avulla se pystyy muodostamaan vetysidoksia solupinnan galaktoosi- tai N-asetyyliagalaktosamiinitähteiden kanssa. Sitoutumiskohtien runsaan lukumäärän vuoksi yhden solun pinnalle voi kiinnittyä jopa 10^6 – 10^8 risiinimolekyyliä. (Doan, 2004)

Monet kasvit, kuten esimerkiksi ohra, tuottavat risiinin kaltaisia proteiineja, jotka eivät kuitenkaan ole eläinsoluille myrkyllisiä. Näillä proteiineilla on entsymaattisesti aktiivinen A-ketju, mutta niiden rakenteesta puuttuu proteiinin solun sisään kuljettava B-ketju, mikä vähentää merkittävästi proteiinin toksisuutta. Nämä proteiinit kuuluvat ribosomeja inaktivoivien proteiinien luokkaan I (1 RIP), eivätkä ole myrkyllisiä edes suurina määrinä syötyinä. (Musshoff & Madea, 2009; Poli ym. 2007)

2.1.3 Risiininäytteestä löytyvät proteiinit

Risiinitoksiini voi esiintyä eri muodoissa riippuen siementen tyypistä sekä risiinikasvin lajikkeesta. Risiinin siemenistä löytyvät risiinitoksiinin muodot voivat vaihdella eri risiinilajikkeiden välillä, mutta myös saman lajikkeen eri kasviyksilöiden välillä. Tämä johtuu siitä, että risiinitoksiinin tuotannosta vastaa yhden geenin sijaan pieni geeniperhe, eli proteiinin ilmentyminen on multigeenistä. Proteiinin eri isomuotojen muodostumisen

lisäksi risiinitoksiinilla on useita eri glykosylaatiomuotoja (esimerkiksi risiini I, II ja III). (Shegal ym. 2010)

Risiinin isomuotoja ovat esimerkiksi risiinin D- ja E-muodot. Myös risiinin siemenistä löytyvä *R. communis* agglutiniini (RCA) voidaan laskea kuuluvaksi risiinitoksiinin eri muotoihin, sillä se on rakenteeltaan hyvin risiinitoksiinin kaltainen ja sen ilmentymisestä vastaa sama geeniperhe (Shegal ym. 2010). Risiinin D- ja E-muodot ovat risiinin ja agglutiniinin muodostamia hybridejä, jotka muodostuvat geenien rekombinaation seurauksena. Risiini E muodostuu, kun risiinin A-ketju ja risiinin B-ketjun ja RCA:n muodostama hybridi yhdistyvät. D-muoto puolestaan koostuu kokonaan risiinistä (Araki & Funatsu, 1987). Risiinin eri isomuodot eroavat rakenteeltaan siis ainoastaan B-ketjun osalta. A-ketjut ovat identtiset, mutta B-ketjujen välillä löytyy eroa noin 15 %:n verran. B-ketjun aminohapporakenteen vaihtuessa, myös sen lektiiniominaisuudet muuttuvat, jolloin proteiini sitoutuu erilaisiin pintarakenteisiin. Tämän vuoksi risiinin isomuotojen toksisuus tiettyjä solutyyppejä kohtaan vaihtelee jonkin verran. Risiinin D- ja E-muodot voidaan erottaa toisistaan tunnistamalla eroavat peptidialueet tai vertailemalla eri muotojen sitoutumista hiilihydraatteihin (Kalb, 2009).

Tutkimusten mukaan, suurikokoiset siemenet sisältävän pääasiassa risiinin D-muotoa, kun taas pienempikokoiset siemenet sisältävät sekä toksiinin D-, että E-muotoa. (Kumar ym. 2011 ja 2004; Araki & Funatsu, 1987) Siementen ulkomuoto ei kuitenkaan pelkästään riitä sen sisältämien risiinimuotojen arvioimiseksi. Tärkein siemenistä löytyvän toksiinin muodon määrittävä tekijä on kasvin lajike, mutta myös esimerkiksi siementen kypsyysasteen sekä viljelyolosuhteiden on todettu vaikuttavan asiaan (Shegal ym. 2010).

Risiinikasvissa tapahtuvan biosynteesin johdosta sekä risiinistä, että agglutiniinista muodostuu ensin proteiinien esiasteet preprorisiini sekä preproagglutiniini (prepro-RCA), joista proteolyyttisen muokkauksen johdosta muodostuu lopulta aktiiviset proteiinit. Risiinin eri glykosylaatiomuodot puolestaan kehittyvät preprorisiinin posttranslationalisen muokkauksen lopputuloksena. Ennen preproproteiinin

proteolyttistä muokkaamista, proteiinin pääketjuun kiinnittyy sokerimolekyylejä tiettyihin asparagiinitähteisiin. N-glykosylaatio tapahtuu tyypillisesti tiettyissä kohdissa (A-ketjussa N10 tai N236, B-ketjussa N95 tai N135), mutta liitettävän sokerin ominaisuudet voivat vaihdella (Fredriksson ym. 2005; Kumar, 2011). Risiinin eri iso- sekä glykosylaatiomuodot eroavat toisistaan muun muassa molekyylipainonsa, elektroforeettisen liikkuvuutensa, sitoutumisessa vasta-aineisiin sekä toksisuutensa puolesta (Shegal ym. 2010). Erilaiset glykosylaatioasteet vaikuttavat proteiinin rakenteeseen ja edelleen myös sen toimintaan sekä toksisuuteen. Risiinin D-muodon onkin todettu olevan E-muotoa toksisempi (Kalb, 2009)

Kaikista risiiniä sisältävistä näytteistä löytyy tavallisesti myös toista risiinin kaltaista proteiinia, punasolujen yhteenliittymistä, eli agglutinaatiota, aiheuttavaa *Ricinus communis* agglutiniinia. Agglutiniini (RCA) on aminohapporakenteeltaan erittäin homologinen risiinin kanssa, mikä vaikeuttaa proteiinien erottamista toisistaan tavallisilla näytteenkäsittelymenetelmillä. Risiinistä poiketen, agglutiniini ei ole suoraan soluille myrkyllinen, mutta agglutinaatio-ominaisuutensa vuoksi se johtaa punasolujen sakkautumiseen ja tuhoutumiseen. (Virginia ym. 2012; Shegal ym. 2010)

Agglutiniini koostuu neljästä polypeptidiketjusta, jotka voidaan kuvata muodossa B-A-A-B, kun risiini puolestaan on kahdesta polypeptidiketjusta koostuva A-B heterodimeeri. Agglutiniinin (RCA_{120}) molekyylipaino on risiiniin (RCA_{60}) verrattuna kaksinkertainen. Siitä huolimatta, että proteiinien A-ketjut ovat jopa 93 % samankaltaiset, agglutiniini inhiboi jopa 14-kertaa heikommin ribosomien toimintaa eukaryoottisoluissa. Proteiinien B-ketjut ovat puolestaan vain noin 84 % samankaltaiset, mikä näkyy B-ketjun kyvyssä sitoutua erilaisiin pintarakenteisiin. Proteiinisekvenssien samankaltaisuudesta huolimatta risiini ja agglutiniini ovat kahden eri geenin tuotteita. Risiinin geenin on ajateltu kehittyneen evoluution aikana ensin, jonka jälkeen se on muodostanut agglutiniinin geenin kahdentuessaan. (Virginia ym. 2012; Lord & Spooner, 2011)

Risiini on 100–2000 kertaa toksisempi kuin agglutiniini, mikä voi osaltaan johtua agglutiniinin suuremmasta kyvystä agglutinoida punasoluja. Risiinin rakenteesta

poiketen, agglutiniini sisältää kaksi solun pintarakenteisiin kiinnittyvää B-ketjua. Tämän vuoksi agglutiniini pystyy kiinnittymään kahteen soluun yhtäaikaisesti ja liittämään solut yhteen, kun risiini voi sitoutua vain yhden solun pinnalle kerrallaan. (Lord & Spooner, 2011) Agglutiniini sitoutuu myös herkemmin punasolujen pinnalla oleviin glykoproteiineihin, kuin muiden solujen pintarakenteisiin. Tämän vuoksi se aiheuttaa pääasiassa punasolujen yhteenliimautumista, eikä pääse vaikuttamaan ribosomien toimintaan solujen sisälle. (Worbs, 2011) Agglutiniini ei imeydy ruoansulatuskanavasta merkittävässä määrin, joten sen vaikutukset tulevat esiin lähinnä, kun sitä injektoidaan suoraan verenkiertoon (Audi ym. 2005). Risiinin sekä agglutiniinin pitoisuudet risiinin siemenissä ovat samaa luokkaa, minkä lisäksi molemmat sitoutuvat risiinispesifisiin vasta-aineisiin. (Pinkerton, 1997)

Risiniini on toksinen alkaloidi (MW 164,1 g/mol), jota esiintyy risiinikasvin siemenissä sekä lehdistä (Darby ym. 2001) Risiniinin toksisen vaikutuksen on arveltu johtuvan elimistön tärkeimmän kiihottavan välittäjäaineen, glutamaatin, ylenmääräisestä vapautumisesta keskushermostossa. Tämä puolestaan inhiboi gamma-aminovoihapon A-tyypin reseptoreja aivojen postsynaptisissa hermosoluissa. Yhdenkään ihmisen ei kuitenkaan toistaiseksi tiedetä kuolleen risiniinin vaikutuksesta. (Audi ym. 2005) Risiniiniä on pidetty monesti risiinin epäsuorana indikaattorina, sillä sitä on aina läsnä risiiniä sisältävissä näytteissä. Tämän menetelmän avulla risiinin olemassaoloa elimistössä voidaan arvioida myös sellaisista näytteistä, joista risiiniä ei tavallisesti pystytä tunnistamaan, kuten esimerkiksi virtsasta. (Östin ym. 2007; Audi ym. 2005; Darby ym. 2001)

2.2 RISIINITOKSIININ TOIMINTA EUKARYOOTTISOLUSSA

Risiinitoksiini kulkeutuu solun sisälle endosytoosin avulla sen jälkeen, kun toksiinin B-ketju on sitonut proteiinin solun pinnalle. Useat bakteerit (esimerkiksi kurkkumätä- ja pernaruttobakteeri) otetaan solun sisälle erilaisten endosytoottisten reittien kautta ja vapautetaan solun sytosoliin suoraan endosomista sen sisäisen pH:n alentumisen

seurauksena. (Sandvig & Deurs, 2002) Risiinin matka sytosoliin on kuitenkin pidempi, sillä se kuljetetaan endosomista edelleen Golgin laitteeseen ja sieltä endoplasmiseen kalvostoon, josta entsyymaattisesti aktiivinen A-ketju päästetään lopulta sytosoliin. Risiinin reitti vaikutusalueelleen on siis retrogradinen, eli käänteinen, verrattuna solusta eritettävien proteiinien kulkeutumiseen solusta ulos. Muita samanlaisella retrogradisella kuljetuksella solun sisään otettavia toksiineja ovat muun muassa Shiga- sekä koleratoksiini. (Lord & Spooner, 2011; Sandvig & Deurs, 2002) Tutkimalla erilaisten proteiinitoksiinien kulkeutumista solun sytosoliin on saatu selville, että solussa on useita yhtäaikaista reittejä, jotka voivat kuljettaa toksiineja endosomeista Golgin laitteeseen ja edelleen ER-kalvostoon. Vaikka retrogradisen kuljetuksen perusidea on sama kyseistä reittiä käyttävillä toksiineilla, eroavat reitit molekyylylasolla toisistaan. Esimerkiksi Shiga-toksiinin käyttämä reitti tunnetaan jo hyvin, mutta risiinintoksiinin kohdalla paljon yksityiskohtia on vielä selvittämättä. (Sandvig ym. 2002; Sandvig & Deurs, 2002)

2.2.1 Sitoutuminen solun pinnalle ja endosytoosi

Risiinintoksiinin B-ketju vastaa toksiinin kulkeutumisesta solun sisään sitoutumalla solun erilaisiin pintarakenteisiin, jotka toimivat niin sanottuina toksiinireseptoreina. Koska risiinin B-ketju on galaktoosilektiini, se voi sitoutua solun erilaisiin pintakomponentteihin, joiden rakenteessa on esillä β -1,4-sidoksella kiinnittynyt galaktoositähde tai terminaalinen N-asetyylylgalaktosamiini. (Sandvig & Deurs, 2000) Erityisesti nisäkässolujen pinnalta löytyy runsaasti erilaisia glykolipidejä ja glykoproteiineja, joihin galaktoosi on sitoutunut suotuisalla tavalla. (Lord & Spooner, 2011) Risiinin on todettu sitoutuvan spesifisti myös N-asetyylylgalaktosamiinitähteen sisältäviin pintarakenteisiin, joita löytyy erityisesti punasolujen pinnalta (Worbs ym. 2011). Risiinin käyttämistä toksiinireseptoreista tiedetään vielä vähän, mutta osan risiinin sitoutumiskohdista arvellaan toimivan myös hormonireseptoreina. Risiinin laaja-alaisesta sitoutumisesta poiketen esimerkiksi kolera- ja Shiga-toksiini sitoutuvat vain kyseisille toksiineille spesifisiin toksiinireseptoreihin (Sandvig & Deurs, 2002).

Osa toksiinireseptorin välityksellä solun pinnalle sitoutuneista risiinitoksiineista otetaan solun sisään endosytoosin avulla muutaman tunnin sisällä sitoutumisesta. Risiinitoksiinin kuljetukseen käytetään todennäköisesti kaikkia solusta löytyviä endosytoosin muotoja ja useat eri sisäänottomekanismit voivat toimia yhtäaikaaisesti. Mitä endosytoosireittiä käytetään milloinkin riippuu pääasiassa solutyypistä, solun polaarisuudesta sekä siitä, millaiseen rakenteeseen toksiini on solun pinnalla sitoutunut. (Worbs ym. 2011; Sandvig ym. 2002; Lord & Spooner, 2011)

On arveltu, että normaaleissa olosuhteissa noin 50 % risiinin endosytoosista tapahtuu klatriinivälitteisen endosytoosin kautta. Risiinitoksiinin sitoutuminen reseptoriinsa saa aikaan klatriiniproteiinin kiinnittymisen solukalvoon ja saa sen taipumaan kuopalle, kunnes risiinin sisältävä vesikkeli kuroutuu irti muusta solukalvosta. Muita klatriinista rippumattomia endosytoosireittejä risiinitoksiinin kuljetuksessa ovat mm. makropinosytoosi, kaveolien välityksellä tapahtuva endosytoosi sekä muut huonommin tunnetut mekanismit. Endosytoosireitit pystyvät korvaamaan toistensa toimintaa. Jonkin reitin estyessä, muiden reittien suhteellinen osuus risiinin kuljetuksessa kasvaa. (Sandvig & Deurs, 2000) Tutkimusten mukaan, risiinin otto solun sisään on kuitenkin jonkin verran hitaampaa kuin muiden samoja endosytoosireittejä käyttävien molekyylien, minkä vuoksi risiinin toksisten vaikutusten kehittyminen viivästyy (Doan, 2004).

2.2.2 Kuljetus Golgin laitteeseen

Huolimatta siitä, millaisella endosytoosireitillä risiinitoksiini on solun sisään kuljetettu, se päätyy lopulta varhaiseen endosomiin. On arveltu, että myös eri endosytoosireittejä pitkin soluun kuljetetut molekyylit voivat päätyä samaan endosomiin (Sandvig ym. 2002). Varhainen endosomi on kaksoiskalvorakenteinen organelli, joka sijaitsee solun ulkoreunalla ja jonka sisällä pH on tyypillisesti muuta ympäristöä alhaisempi. pH:n alenemisesta huolehtii endosomin kalvorakenteesta löytyvä Na^+/H^+ -protonipumppu, joka ATP:n energiaa hyväksikäyttämällä pumppaa protoneja endosomin sisään. Alhainen pH mahdollistaa useiden toksiinien irtoamisen solukalvoreseptoristaan sekä pääsyn suoraan

varhaisesta endosomista sytosoliin. pH:n muutos vaikuttaa esimerkiksi botuliinitoksiinin konformaatioon ja saa aikaan sen kulkeutumisen endosomin seinämän läpi sytosoliin. Sytosolin korkeampi pH puolestaan saa botuliinitoksiinin palautumaan natiiviin konformaatioonsa ja mahdollistaa sen toiminnan solussa. (Lord ym. 1999)

Risiin kohdalla pH:n muutos ei kuitenkaan muuta proteiinin konformaatiota niin, että suora siirtyminen endosomista sytosoliin olisi mahdollinen. Risiini voi jatkaa matkaansa varhaisesta endosomista useaan eri suuntaan. Osa risiiniä sisältävistä varhaisista endosomeista yhdistyy kierrätettävien ja solunpinnalle palaavien endosomien kanssa, jolloin toksiini kuljetetaan takaisin solun ulkopuolelle. Toisaalta risiini voidaan kuljettaa myöhäisen endosomin kautta lysosomiin, jossa toksiini hajotetaan proteolyttisesti. Vain pieni osa solun sisään otetusta toksiinista kulkeutuu Golgin laitteen *trans*-sivulle ja jatkaa matkaansa Golgin laitteen kautta edelleen endoplasmakalvostoon ja sieltä edelleen solun sytosoliin. (Lord & Spooner, 2011)

Tutkimusten mukaan, risiini kulkeutuu varhaisesta endosomista suoraan Golgin laitteeseen kulkematta myöhäisen endosomin kautta. Tästä kertoo se, että risiiniä kuljettavien endosomien pinnalta ei löydy myöhäiselle endosomille ominaista Rab7-proteiinia. Tämän lisäksi risiinin kulkeutumisen endosomista Golgin laitteeseen on todettu olevan riippumaton Rab9:n toiminnasta, joka tavallisesti välittää mannoosi-6-fosfaatti reseptoreihin sitoutuneiden ligandien kuljetusta endosomista Golgiin. Vesikkeleiden kuljetusta Golgin laitteeseen voidaan säädellä myös riippuen siitä, tuleeko endosomi solun apikaaliselta- vai basolateraaliselta puolelta (Sandvig & Deurs, 2000). Muiden tekijöiden, joiden on arveltu vaikuttavat ja säätelevät risiinitoksiinin kuljetusta Golgin laitteeseen ovat muun muassa solukalvon kolesterolipitoisuus, proteiinikinaasi A ja Ca^{2+} /kalmoduliinikompleksi. (Sandvig & Deurs, 2002; Sandvig ym. 2002)

2.2.3 Retrogradinen kuljetus Golgin laitteen läpi endoplasmiseen kalvostoon

Retrogradisella kuljetuksella tarkoitetaan kohti solun keskustaa suuntautuvaa molekyylien tai organellien kuljetusta. Retrogradinen kuljetus toimii yhteistyössä solusta

ulospäin suuntautuvan kuljetuksen (anterograde transport) kanssa ja yhdessä ne säätelevät solun sisäistä tasapainotilaa esimerkiksi solukomponenttien kierrättämisen osalta (Sannerud ym. 2003). Erityisen tärkeässä roolissa retrogradisen kuljetuksen on todettu olevan hermosolujen toiminnan ja kehittymisen kannalta (Zweifel ym. 2005). Toksiinit, jotka eivät pysty kulkeutumaan endosomin seinämän läpi suoraan sytosoliin, kuten risiini, joutuvat hyödyntämään retrogradista kuljetusta saadakseen toksiinin A-ketjun solun sytosoliin.

Risiin kohdalla, suurin osa retrogradisen kulkeutumisen mekanismeista on vielä selvittämättä, sillä risiinin kulkeutumisesta eri organelleissa on vaikea visualisoida (Rapak ym. 1997). KDEL-sekvenssin omaavien molekyylien kuljettaminen Golgin laitteen läpi endoplasmakalvostoon on yksi tunnetuimpia retrogradisen kuljetuksen mekanismeja. Siinä KDEL-sekvenssin sisältävät molekyylit, kuten koleratoksiini ja useat kalvoproteiinit, sitoutuvat Golgin laitteen eri osissa sijaitseviin KDEL-reseptoreihin ja kuljetetaan COPI-päällystetyissä vesikkeleissä endoplasmakalvostoon. (Sannerud ym. 2005; Sandvig & Deurs, 2000; Sandvig ym. 2002) Risiinitoksiinilla ei kuitenkaan ole kyseistä sekvenssiä ja sen kuljetuksen arvellaan tapahtuvan COPI-vesikkeleistä riippumattomalla mekanismilla. Kyseisestä mekanismista tiedetään vielä vähän, mutta sen arvellaan liittyvän Rab6A GTPaasin toimintaan, joka puolestaan vuorovaikuttaa dyneiini-dynaktiini kompleksin kanssa. Dyneiinikompleksi todennäköisimmin kuljettaa risiinitoksiinin vesikkeleissä Golgin laitteesta endoplasmakalvostoon mikrotubuluksia pitkin. (Sannerud ym, 2005) Risiintoksiini voidaan mahdollisesti kuljettaa myös COPI-vesikkeleissä ilman, että risiini on sitoutunut KDEL-reseptoriin (Sandvig & Deurs, 2002). On myös arveltu, että molekyylit, joihin risiini sitoutuu endosytoosin yhteydessä, voisivat vastata toksiinin kuljettamisesta endoplasmakalvostoon KDEL-sekvenssin puuttuessa. Toisaalta molekyyli, johon risiini sitoutuu solun pinnalla voi kuljettaa toksiinin ensin *trans*-Golgiin, jossa toksiinin B-ketju sitoutuu Golgin laitteen ja endoplasmakalvoston välillä sukkuloivaan molekyyliin. (Rapak ym. 1997)

Myös membraanien lipidikoostumuksen on todettu vaikuttavan risiinin kuljetukseen solun sisällä. Fosfolipaasi A₂s (PLA₂) on entsyymi, joka katalysoi glyserofosfolipidien

hydrolyysia lysofosfolipideiksi sekä vapaiksi rasvahapoiksi. Lysofosfolipidit puolestaan lisäävät membraanin kaarevuutta vaikuttaen kalvojen ominaisuuksiin sekä toimintaan. PLA₂:n aktiivisuuden on todettu olevan tärkeää membraanien kuroutumisessa ja yhdistymisessä kaikissa solunsisäisissä kalvokuljetustapahtumissa. Risiin kohdalla PLA₂:n aktiivisuus on välttämätöntä Golgi-ER kuljetuksen kannalta. (Klokk ym. 2011)

2.2.4 Kulkeutuminen sytosoliin

Risiinitoksiinin A-ketjun translokaatio ER:stä sytosoliin on tärkein risiinin solutoksisten vaikutusten ilmenemistä rajoittava tekijä (Bilge ym. 1995). Risiinitoksiini saapuu endoplasmakalvoston luumeniin laskostuneena ja stabiilina holotoksiinina, joka ei ole entsyymaattisesti aktiivinen. ER:n luumenissa risiinitoksiinin A- ja B-ketjut erotetaan toisistaan pelkistävän disulfidi-isomeraasi (PDI) entsyymien johdosta ennen kuin RTA voi kulkeutua sytosoliin. (Lord & Spooner, 2011) RTB:n irtoaminen rikkisidoksen katkeamisen myötä poistaa steerisen esteen RTA:n aktiivisesta kohdasta ja mahdollistaa RTA:n aktivoitumisen ja translokaation sytosoliin. Holotoksiinin pelkistyminen on täysin riippuvainen PDI:n toiminnasta eikä proteiinin proteolyttistä katkaisua tai laskostumisen purkamista tarvita, kuten muiden toksiinien kohdalla. Mekanismia, jolla PDI pelkistää risiinitoksiinin ei vielä tarkalleen tunneta, mutta PDI:n tiedetään katalysoivan sekä disulfididisidosten katkaisemista, muodostamista, että isomerisaatiota. (Spooner ym. 2004)

Päästäkseen endoplasmakalvostosta sytosoliin, RTA:n arvellaan käyttävän hyväkseen endoplasmakalvoston omaa proteiinin hajotus mekanismia ERAD:a, jonka tehtävänä on tunnistaa sekä poistaa tuntemattomat ja väärin laskostuneet proteiinit ER:stä. Mekanismin toimintaan kuuluu poistettavan proteiinin kuljettaminen ER:n kalvon läpi sytosoliin, proteiinin ubikitinaatio ja nopea hajottaminen proteasomissa. (Hoseki ym., 2010; Schäfer & Wolf, 2009; Di Cola ym. 2005) Irtauduttuaan holotoksiinista, RTA:n laskostuminen osittain muuttuu, minkä johdosta ERAD tunnistaa RTA:n endoplasmakalvostosta poistettavaksi proteiiniksi. Syynä RTA:n laskostumisen muuttumiseen on pääasiassa termodynaaminen epätasapaino sekä RTA:n kiinnittyminen endoplasmakalvostoon heti holotoksiinista irtoamisensa jälkeen. RTA:n konformaation muutos on edellytys sen

kulkeutumiselle ER:n kalvon läpi. (Lord & Spooner, 2011; Di Cola ym, 2005) Tutkimuksien mukaan, endoplasmakalvostossa sijaitseva Sec61p proteiini on pääasiassa vastuussa risiinitoksiinin siirtämisessä endoplasmakalvostosta sytosoliin (Sandvig ym. 2002; Sandvig & Deurs, 2000). Solun normaalissa toiminnassa Sec61p on osana ERAD mekanismia ja mahdollistaa transmembraaniproteiinin sekä juuri syntetisoitujen proteiinien siirtymisen sytosolista endoplasmakalvoston luumeniin, että väärin laskostuneiden proteiinien kuljettamisen sytosoliin (Schäfer & Wolf, 2009; Di Cola ym. 2005).

Toisin kuin ER:stä hajotettavaksi kuljetettavat proteiinit, RTA pääsee poistumaan ERAD reitiltä ennen sen kulkeutumista proteasomiin ja saavuttamaan uudelleen aktiivisen konformaationsa. Sytosoliin päästyään RTA on proteolyttisille entsyymeille alttiissa konformaatioissa, mutta siitä huolimatta vain pieni osa RTA-molekyyleistä hajoitetaan tässä vaiheessa. Hajotukseen kuljetettavat proteiinit merkitään ER:ssä polyubikitiniini ketjuilla, jotka kiinnitetään proteiinin lysiinitähteisiin. RTA:n alhaisen lysiinipitoisuuden arvellaankin olevan syynä siihen, että se pääsee pakenemaan ERAD reitiltä ja välttämään proteolyttisen hajoituksen. (Spooners ym. 2008; Di Cola ym. 2005) RTA:n uudelleen laskostuminen sekä aktivoituminen vaativat ribosomin läsnäolon ja aktivoituneen RTA:n rakenne on hyvin proteolyttistä hajotusta estävä. Tutkimusten mukaan, RTA:n laskostumisen käynnistää todennäköisimmin ribosomaalisten proteiinien tai ribosomaalisen RNA:n läsnäolo (Argent ym. 2000). Myös sytosolisilla Hsc70-luokan kaperoneilla on vaikutus RTA:n kohtaloon, sillä ne säätelevät tasapainoa RTA:n uudelleen laskostumisen ja hajoutuksen välillä. Hsc70 toimii RTA:n uudelleen laskostumista edistävänä kaperonina, kun taas Hsp90 tekee tehottomaksi osan sytosoliin saapuvasta RTA:sta stimuloimalla sen ubiquitinaatiota. HOP on säätelyproteiini näiden kahden reitin välillä. (Lors & Spooner, 2011; Spooner ym. 2008) Myös BAG-2 ja Hip kaperonien on todettu avustavan RTA:n uudelleen aktivoitumisessa (Spooners ym. 2008) Edellä mainittujen kaperonien pitoisuus ja toiminta solussa määrittävät viimekädessä risiinin toksisuuden. Kyseisten kaperonien puuttuessa, RTA ei voi saavuttaa aktiivista konformaatiotaan, eikä solutoksia vaikutuksia muodostu. (Lord & Spooner, 2011; Argent ym. 2000)

Vaikka RTA vastaa varsinaisten toksisten vaikutusten muodostumisesta, uskotaan myös RTB:n toimivan aktiivisesti solun sisällä. Tutkimusten perusteella uskotaan, että myös RTB voi jossain määrin kulkeutua ER:n lumenista sytosoliin (Sandvig ym. 2002). Sen lisäksi, että RTB mahdollistaa toksiinin pääsyn solun sisään, se vaikuttaa tutkimusten perusteella osallistuvan myös toksiinin kuljettamiseen retrogradisesti. RTB voi sitoutua solun sisäisiin galaktoositähteisiin, joita löytyy toksiinin reitin varrelta ja osaltaan tehostaa toksiinin kulkeutumista endosytoosireitiltä endoplasmakalvostoon. RTB:n on todettu lisäksi suojelevan RTA:ta endosomaalisilta sekä lysosomaalisilta proteolyttisiltä entsyymeiltä ja näin tehostavan RTA:n toksisia vaikutuksia. (Bilge ym. 1995)

2.2.5 Toiminta ribosomissa

Päästyään sytosoliin ja saavutettuaan aktiivisen konformaationsa, RTA tekee toimintakyvyttömäksi proteiineja tuottavia ribosomeja depurinoimalla ribosomaalista RNA:ta nopeammin, kuin solu ehtii tuottamaan uusia ribosomeja. RTA on spesifinen N-glykosidaasi, joka poistaa adeniinitähteen paikasta A₄₃₂₄, ribosomin 60S alayksikön 28S ribosomaalisen RNA:n esillä olevasta konservoituneesta 12:sta nukleotidin sekvenssistä. (Kumar ym. 2011; Schieltz ym. 2011) Sekvenssiä 5'-AGUACGAGAGGA-3' kutsutaan sarsiini-risiini silmukaksi, joka toimii polypeptidiketjun elongaatiota katalysoivana tekijänä ja sen rakenteen muuttuminen pysäyttää proteiinisynteesin peruuttamattomasti, mikä johtaa solun kuolemaan. Depurinaation seurauksena muuntuneen kohdan lähellä olevat fosfodiesterisidokset ovat alttiina hydrolyysille, mikä estää proteiinisynteesin aloittavien elongaatiotekijöiden, kuten EF-Tu:n ja EF-G:n, kiinnittymisen ribosomikompleksiin. (Shi ym. 2012; Doan, 2004)

Risiinin Michaelisin-Mentenin vakio (K_m) on 0.1 $\mu\text{mol/L}$ yhtä ribosomia kohti ja reaktionopeusvakio (K_{cat}) 1500/min. Tämä tarkoittaa sitä, että yksi risiinimolekyylillä pystyy inaktivoimaan jopa 1500 ribosomia minuutissa, jolloin yksi RTA-molekyylillä pystyy tuhoamaan lähes kaikki solun ribosomit alle kahdessa tunnissa. Tämän vuoksi risiinin tappava-annos voi olla niinkin alhainen kuin 1 $\mu\text{g/kg}$ (Hostetler, 2005).

Solut, joiden ribosomien 28S:n rakenteesta puuttuu sarsiini-risiini silmukka eivät ole alttiita RTA:n vaikutuksille. Tämän vuoksi, risiini ei tyypillisesti ole myrkyllinen kasvisoluille tai bakteereille. (Olsnes ym. 1975)

Sen lisäksi, että RTA estää solun proteiinisynteesin, sen on todettu aiheuttavan soluissa oksidatiivista stressiä. Se puolestaan johtaa soluissa ohjatun solukuoleman, eli apoptoosin, aktivoitumiseen ja siitä seuraaviin solumuutoksiin, kuten esimerkiksi kromatiinin kondensaatioon, DNA:n fragmentaatioon sekä solukalvon poimuuntumiseen (Sandvig ym. 2002). Solun proteiinisynteesin pysähtyminen johtaa aina solun kuolemaan, mutta se ei välttämättä ole ainoa apoptoosin käynnistävä tekijä. Tutkimusten mukaan, RTA saattaa aiheuttaa apoptoosia useiden, toistaiseksi tuntemattomien mekanismien kautta. RTA:n on todettu aiheuttavan muun muassa suoraa DNA:n fragmentoitumista, mikä voi toimia yhtenä solun apoptoosiin ajanvana signaalina. Myös RTB:n on arveltu aiheuttavan apoptoosia lektiiniaktiivisuutensa avulla tietyissä solutyypeissä, mutta sen tarkempaa toimintamekanismia ei vielä tunneta. (Hasegawa ym. 2000)

Risiini saa aikaan fagosytoottisten solujen, kuten magrofagien, ylenmääräistä aktivoitumista, nämä puolestaan tuottavat vapaita happiradikaaleja sekä tuumorinekroositekijä alfaa (TNF- α). TNF- α toimii inflammaation säätelijänä tehostaen muiden inflammaatioreaktioon osallistuvien molekyylien tuottoa. Vapaat happiradikaalit puolestaan reagoivat herkästi lähes kaikenlaisten solurakenteiden kanssa ja aiheuttavat myös inflammaatiota sekä suurempia solu- ja kudolvaurioita. (Suntres ym. 2005)

2.3 MYRKYTYKSEN KLIINISET OIREET JA HOITO

Risiinimyrkytyksen oireet riippuvat pääasiassa reitistä, jota kautta toksiiini on elimistöön kulkeutunut, sekä toksiiinin määrästä. Myös eri eläinlajit reagoivat risiiniin eri tavoin ja kehittävät erilaisia oireita. Hevonen on tutkimusten mukaan eläinlajeista herkimpiä risiinin vaikutuksille. Risiinin taipumus aiheuttaa reittispesifejä oireita johtuu puolestaan todennäköisesti sen lektiiniominaisuuksista. Elimistöön päästyään, risiini sitoutuu

nopeasti lähimpänä olevien solujen pinnan hiilihydraatteihin ja aiheuttaa kohdesolujen kuolemasta johtuvia myrkytysoireita. (Poli ym. 2007; Franz & Jaax, 1997)

Toistaiseksi risiinimyrkytyksen hoitoon ei ole olemassa vastalääkettä ja ainoastaan myrkytyksen oireita voidaan hoitaa. Toksiinin imeytymistä ruuansulatuskanavasta voidaan hillitä lääkehiilen avulla ja ripulin aiheuttamaa nestehukkaa voidaan ehkäistä nesteyttämällä sekä ylläpitämällä elimistön elektrolyyttitasapainoa. Elintoimintojen tarkkaileminen useamman päivän ajan on tärkeää, jotta mahdollisesti kehittyvä monielinvaurio voitaisiin tunnistaa ajoissa. Toksiinin pitoisuuden ollessa riittävän alhainen, elintoimintoja ylläpitävä sairaalahoito on toisinaan riittänyt myrkytyksen hoitoon ja potilas on voinut toipua täysin (Doan, 2004).

Pienillä pitoisuuksilla risiinitoksiinin aiheuttamat myrkytysoireet ovat tyypillisesti vähäisempiä, kun toksiini kulkeutuu suun kautta ruuansulatuskanavaan. Syynä tähän on todennäköisesti risiinin heikko kyky absorboitua ruuansulatuskanavan epiteelin läpi, sekä se, että jotkut ruuansulatuskanavan entsyymeistä pystyvät pilkkomaan risiiniä (Poli ym. 2007; Franz & Jaax, 1997). Suun kautta otettuna, risiinin tappavan annoksen on arvioitu olevan noin 1–20 mg/kg (Musshoff ja Madea, 2009; Audi ym. 2005). Ruuansulatuskanavasta risiini kulkeutuu lymfa- sekä verenkierron välityksellä pääasiassa maksaan, munuaisiin sekä pernaan. Kaikkein alteimpina risiinin vaikutuksille ovat Kupfferin solut sekä magrofaagit, minkä vuoksi risiinimyrkytys voi johtaa myös maksan vaurioitumiseen (Poli ym. 2007; Franz & Jaanx, 1997). Ensimmäisten myrkytysoireiden ilmaantumiseen kestää yksilöstä sekä toksiinin määrästä riippuen 4–6 tuntia tai enemmän. Suun kautta kulkeutuneen risiinin tyypillisiä oireita ovat: huonovointisuus, vatsanalueen kipu ja krampit, ripuli, ruuansulatuskanavan verenvuoto, nestehukka, kuume, pupillien laajeneminen, päänsärky, verisuonten laajeneminen ja lopulta shokki. Myös valkosoluarvot voivat nousta jopa viisinkertaiseksi tavalliseen verrattuna. Oireet ovat tyypillisesti epäspesifejä ja kertovat elimistön laaja-alaisesta vaurioitumisesta. Toksiinin määrän ollessa riittävän suuri, myrkytys johtaa 4–36 tunnin kuluessa verenpaineen alenemiseen, maksan sekä munuaisten toiminnan heikkenemiseen sekä mahdollisesti kuolemaan (Poli ym. 2007; Audi ym. 2005; Franz & Jaax, 1997).

Pureskelematta nielty risiinin siemen voi kulkeutua elimistön läpi aiheuttamatta lainkaan oireita, mutta jos siemen on vaurioitunut, toksisiin vapautuminen kovan kuoren alta on todennäköisempää. Voimakkaimmat myrkytysoireet aiheuttaa risiinin siemenistä valmistettu jauhe, mutta jo kahden syödyn ja pureskellun siemenen on todettu aiheuttaneen aikuisen ihmisen kuoleman (Challoner & McCarron, 1990).

Risiinitoksiinin vaikutukset ovat voimakkaammat, kun toksiiini kulkeutuu elimistöön hengitysteiden kautta tai injektioituna. Ehjän ihon läpi suurikokoinen proteiini ei kuitenkaan kulkeudu. Lihakseen tai ihonalaiskudokseen injektioitu risiini aiheuttaa voimakkaan paikallisen imukudoskuolion, ruoansulatuskanavan verenvuotoa sekä maksan, munuaisten ja pernan vaurioitumista. Injektioalueella esiintyy tavallisesti kudoshuoliota, joka altistaa sekundaarisille tulehduksille. Hengitysteiden kautta tapahtuneita kuolemaan johtaneita risiinimyrkytyksiä ihmisillä ei ole toistaiseksi tapahtunut, mutta sitä on tutkittu eläinkokeilla. Risiinin siemenistä lähtöisin olevan pölyn tiedetään kuitenkin aiheuttavan allergisia oireita risiinikasvin tai risiinin siementen parissa työskentelevillä henkilöillä. Oireisiin kuuluvat mm. nenän, nielun ja silmien kutiaminen, turpoaminen ja hengityksen vaikeutuminen. Eläinkokeista saatujen tietojen mukaan hengitysteiden kautta tapahtuvan risiinimyrkytyksen oireina ovat mm. nesteiden kertyminen keuhkoihin sekä keuhkoputkien ja keuhkokudoksen kuolio. (Poli ym. 2007; Franz & Jaanx, 1997)

2.4 TUTKIMUKSESSA KÄYTETTÄVÄT RISIINITOKSIININ ESİKÄSITTELY- JA ANALYYSIMENETELMÄT

2.4.1 Affiniteettikromatografia

Risiinitoksiinin esikäsittelymenetelmä tulee valita käytettävän analyysimenetelmän sekä sen asettamien vaatimusten mukaan. Massaspektrometrinen analyysin kohdalla on tärkeää, että tutkittavasta näytteestä poistetaan ylimääräiset analyysiä häiritsevät yhdisteet ja proteiinit, jotta analyysin antama tulos olisi luotettava. Risiinin vasta-aineiden toimintaan perustuvien analyysimenetelmien kohdalla risiinitoksiini pystytään usein

tunnistamaan myös epäpuhtaammasta näytteestä. Erilaisia kromatografisia menetelmiä voidaan käyttää risiinitoksiinia sisältävän näytteen puhdistamiseen ennen toksiinin lopullista analysoimista massaspektrometrillä. Tässä työssä toksiinin puhdistamisessa käytetään affiniteettikromatografiaa, joka perustuu toksiinin luonnolliseen taipumukseen sitoutua joko risiinispesifiin vasta-aineisiin tai erilaisiin sokeritähteisiin. Muita risiinin esikäsitellyssä yleisesti käytettäviä kromatografisia menetelmiä ovat mm. geelisuodatus- sekä ioninvaihtokromatografia. (Griffiths, 2011; Ketola ym. 2010)

Risiinitoksiinin B-ketjun lektiiniominaisuutta, eli taipumusta sitoutua tietynlaisiin sokeritähteisiin, käytetään hyväksi puhdistettaessa toksiinia sokeriaffiniteettikromatografialla. Kromatografiassa on kaksi faasia: kiinteä faasi sekä liikkuva faasi. Kiinteänä faasina työssä käytetään agarosigeeliä, johon toksiinin sitoutumisen kohteena olevat sokeritähteet ovat kiinnitetty kovalenttisesti. Sokeritähteinä tutkimuksessa käytetään N-asetyyliagalaktosamiinia sekä N-asetyyli-glukosamiinia, joista ensimmäinen on risiinitoksiinin luonnollinen solukalvoreseptori. Liikkuva faasi puolestaan sisältää puhdistettavan näytteen, joka liikkuu kiinteän faasin läpi matriisin kanssa reagoimattoman puskurin kuljettamana. Kromatografian aikana risiinitoksiinin B-ketju sitoutuu kiinteään faasiin kiinnittyneisiin sokeritähteisiin muodostamiensa vetysidosten ansiosta. Tämän jälkeen pylväsmatriisia pestään pesuliuoksella, jolloin pylvästä poistuu kaikki muu matriisiin sitoutumaton materiaali. Lopuksi sokeritähteisiin kiinnittynyt risiinitoksiini irrotetaan kromatografiapylvästä eluutioliuksen avulla. Eluutioliuos sisältää laktoosia, joka kilpailee risiinitoksiinin kanssa sitoutumisesta kiinteän faasin sokeritähteisiin. Laktoosipitoisuuden ollessa tarpeeksi suuri se syrjäyttää risiinin ja sitoutuu sen paikalle, jolloin puhdistunut toksiini poistuu pylvästä eluutioliuksen mukana.

Toinen tutkimuksessa käytetty affiniteettikromatografian muoto hyödyntää risiinitoksiinin sitoutumista kiinteään faasiin liitettyyn risiinispesifiseen vasta-aineeseen. Immunoaffiniteettikromatografian toimintatapa on muuten samanlainen kuin sokeriaffiniteettikromatografiassa, mutta risiinin pylväsmatriisiin sitovana partikkelina toimii sokeritähteen sijaan risiinispesifinen vasta-aine. Sitoutunut risiini eluoidaan

kromatografiapylväästä pH-muutoksen avulla, jolloin proteiinin sekä sen vasta-aineen välille muodostuneet sidokset katkeavat.

2.4.2 Massaspektrometria

Risiinitoksiinin analytiikassa käytettävä menetelmä tulee valita käyttötarkoituksen mukaan. Kenttäolosuhteissa risiinitoksiinin analyysimenetelmältä vaaditaan nopeutta ja helppokäyttöisyyttä mahdollisten suojelutoimien ripeän aloittamisen mahdollistamiseksi ja tähän tarkoitukseen soveltuvat parhaiten erilaiset pikatestit. Kun analyysimenetelmältä vaaditaan oikeudellista pätevyyttä sekä korkeampaa luotettavuutta on massaspektrometria tehokkaampi menetelmä. Massaspektrometrian luotettavuus risiinin analytiikassa perustuu tutkittavan proteiinin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien tunnistamiseen eikä esimerkiksi vasta-aineiden toimintaan, mikä vähentää mahdollisen ristikontaminaation mahdollisuutta. Tämän vuoksi massaspektrometria on erittäin herkkä sekä tarkka analyysimenetelmä, jossa väärän positiivisen tuloksen mahdollisuus on häviävän pieni analyysimenetelmän korkean erotuskyvyn sekä spesifisyyden ansiosta. Lisäksi massaspektrometrian vaatimat näytteen esikäsittelymenetelmät ovat suhteellisen yksinkertaisia (Griffiths, 2011; Ketola ym. 2010)

Proteiinit ovat suuria biomolekyylejä, jotka hajoavat helposti. Herkän rakenteensa vuoksi ne eivät yleisesti ottaen kestä kuumennusta ja niiden erottelu sekä ionisaatio tulee tehdä mahdollisimman hellävaraisesti. Proteiinien analytiikassa sähkösumutus-ionisaatio (ESI) sekä matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio (MALDI) ovat tärkeimmät massaspektrometrian sovellusalat, sillä niitä pidetään riittävän hellävaraisina ionisaatiomenetelminä. ESI sopii hyvin myös risiinin analysointiin ja sen avulla proteiinin tai sen peptidien molekyyli-massa voidaan määrittää luotettavasti useasti varautuneiden ionien perusteella. (Griffiths, 2011; Ketola ym. 2010)

ESI-ionilähde muuttaa näyteliuoksen kaasufaasiin ionilähteen suuren jännitteen johdosta. Kaasuvirtausavusteisessa sähkösumutuksessa (IS), näyte johdetaan inertin kaasuvirtauksen avulla ohuen teräskapillaarin päähän, jossa neste muodostaa pieniä

pisaroita. Näytteen sisältämät yhdisteet ionisoidaan molekyyli-ioneiksi liuottimen haihtuessa ja liuospisaroiden hajotessa yhä pienemmiksi pisaroiksi. Tutkijat eivät kuitenkaan ole yksimielisiä siitä, millä mekanismeilla ionit syntyvät. Kapilaarin päässä on voimakas sähkökenttä, jonka avulla oikean varauksen omaavat ionit ohjataan detektorille ja väärän varauksen omaavat ionit puolestaan kapilaarin seinämille. Detektorille johdetut ionit tunnistetaan niiden massa/varaus (m/z) -arvojen perusteella. Sähkösumutuksen avulla voidaan tuottaa useasti varautuneita negatiivisia sekä positiivisia ioneita riippuen yhdisteen rakenteesta sekä käytetyistä liuottimista. Peptidien ionisaatiossa syntyy tyypillisesti kahdesti varautuneita ioneita, joiden analysoinnissa ESI on paras menetelmä. Sähkösumutus on hellävarainen ionisaatiomenetelmä, sillä se johtaa harvemmin tutkittavien yhdisteiden fragmentoitumiseen, mikä puolestaan on todennäköisempää muilla ionisaatiomenetelmillä. (Ketola ym. 2010)

MALDI on alun perin kehitetty suurten, haihtumattomien yhdisteiden analysointiin ja se perustuu orgaanisten yhdisteiden laserabsorptioon. Tällä menetelmällä matriisiin sidottu orgaaninen näyte saatetaan kokonaisina molekyyleinä kaasufaasiin. Sen käyttö on kuitenkin rajallista kokonaisten proteiinien analytiikassa, sillä se sopii parhaiten yhdisteille, joiden moolimassa on alle 1000 Da. Tämän lisäksi MALDI tuottaa pääasiassa yhdesti varautuneita ioneja ja on ESI:ä huonompi ionisaatiomenetelmä entsyymaattisesti hajotettujen proteiinien peptidien analysoinnissa. Koska MALDI tuottaa ESI:ä vähemmän useasti varautuneita ioneita se soveltuukin paremmin monimutkaisempien seosten analysointiin ja tuottaa yksinkertaisemman ja helpommin luettavamman spektrin. (Ketola ym. 2010) MALDI:n käyttö ESI-menetelmän sijaan on perusteltua, kun risiinitoksiinin halutaan tunnistaa suoraan esimerkiksi elintarvike- tai kliinisistä näytteistä (Kalb & Barr, 2009).

Massaspektrometrian avulla voidaan saada tietoa sekä proteiinin rakenteesta ja siinä tapahtuneista muutoksista tai vain tunnistaa ja kvantitoida tietyn tutkittavan proteiinin läsnäoloa näytteestä. Kokonaisen proteiinin rakennetta voidaan tutkia FT-ICR-MS-laitteen avulla tulkitsemalla sen MS/MS-spektriä. Rakennemäärityksen yhteydessä proteiini voidaan myös hajottaa entsyymaattisesti pienempiin osiin ja selvittää syntyneiden

peptidien aminohapposekvenssi. Tällöin muutokset rakenteessa, kuten esimerkiksi post-translationalisen muokkautumisen aikana tapahtuvat glykosylaatiot, fosforylaatiot, asetylaatiot ja rikkisiltojen muodostuminen on helppo havaita. (Ketola ym. 2010) Suurikokoisten proteiinien kuten risiinin kohdalla, proteiinin molekyylipainoa on vaikea arvioida siinä tapahtuneiden postranslationalisten muutosten vuoksi, sillä massaspektri sisältää tyypillisesti useita monoisotooppisia ionipiikkejä. Risiinin digestiossa muodostuneiden peptidien tarkan molekyylipainon määrittämisessä käytetäänkin tavallisesti LC-MS/MS-analyysiä, jossa yksittäinen peptidi pilkkotaan edelleen tandemmassaspektrometriassa. Peptidin pilkkoutumisspektriä tulkitsemalla saadaan määritettyä sen tarkka molekyylipaino sekä sen rakenteessa tapahtuneet muutokset. (Ketola ym. 2010; Seto & Kamanori-Kataoka, 2005)

Proteiinin entsymaattista hajottamista peptideiksi käytetään yleisesti myös risiinitoksiinin tunnistamisen yhteydessä. Valittu entsyymi pilkkoo peptidiketjun tietyistä kohdista ja syntyvät peptidit muodostavat kyseiselle proteiinille ominaisen ”sormenjäljen”, jota verrataan proteiinikirjaston tietokantaan tutkittavan proteiinin tunnistamiseksi. Jotta proteiini voidaan luotettavasti tunnistaa, tulee mitattujen peptidien aminohapposekvenssi vastata jotakin tietokannasta löytyvän proteiinin aminohappojärjestystä. Proteiinin tunnistamisessa voidaan käyttää hyväksi myös yksittäisten markkeripeptidien löytymistä, jotka ovat ainoastaan kyseiselle proteiinille ominaisia peptidipätkiä. Teoriassa voidaan olettaa, että jo yhden tietylle proteiinille spesifisen peptidipätkän löytyminen riittäisi todistamaan kyseisen proteiinin läsnäolon näytteessä, mutta se ei vielä riitä proteiinin pitoisuuden määrittämiseen (Norrgran ym. 2009). Risiinin analytiikassa käytettävät markkeripeptidit tulisi valita niin, että ne eivät sisällä tunnettuja proteiinin glykosylaatiokohtia. Peptidi, johon on liittynyt jokin sokeriosa, ei sovellu käytettäväksi markkeripeptidinä, ellei liittyneiden sokeriryhmien tarkkaa paikkaa ja rakennetta etukäteen tiedetä. Analyysimenetelmä, joka perustuu tryptisten peptidien tunnistamiseen, ei sovellu risiinitoksiinin aktiivisuuden määrittämiseen, sillä se vaatisi kokonaisen ja toiminnallisen proteiinin läsnäolon näytteessä. Myös monimutkainen näytematriisi voi heikentää toksiinin peptidien tunnistamista, minkä vuoksi risiinitoksiinin puhdistaminen,

esimerkiksi kromatografiaa käyttämällä, on suositeltavaa ylimääräisen taustasignaalin häivyttämiseksi. (Ketola ym. 2010)

Tavallisimmin proteiinien pilkkomisessa massaspektrometrian yhteydessä käytetään trypsiiniä, joka katkaisee peptidiketjun aina lysiinin ja arginiinin happopuolelta. Tryptisillä peptideilla on protonoituva ryhmä molemmissa päissään ja sen vuoksi ne muodostavat tavallisesti kahdesti varautuneita ioneita. ESI-menetelmä soveltuu MALDI:a paremmin tryptisten ionien tunnistamiseen sillä se antaa voimakkaamman signaalin kahdesti varautuneille ioneille. ESI:n yhteydessä voidaan käyttää nestekromatografia (LC), jonka avulla peptidit voidaan erotella asetonitriiligradientin avulla. Tämä tehostaa tryptisten peptidien moolimassojen mittaamista sekä identifiointia, kun peptidit irtoavat vuorollaan käytettävästä LC-kolonnista eivätkä saavu kerralla detektorille. (Ketola ym. 2010; Seto & Kanamori-Kataoka, 2005)

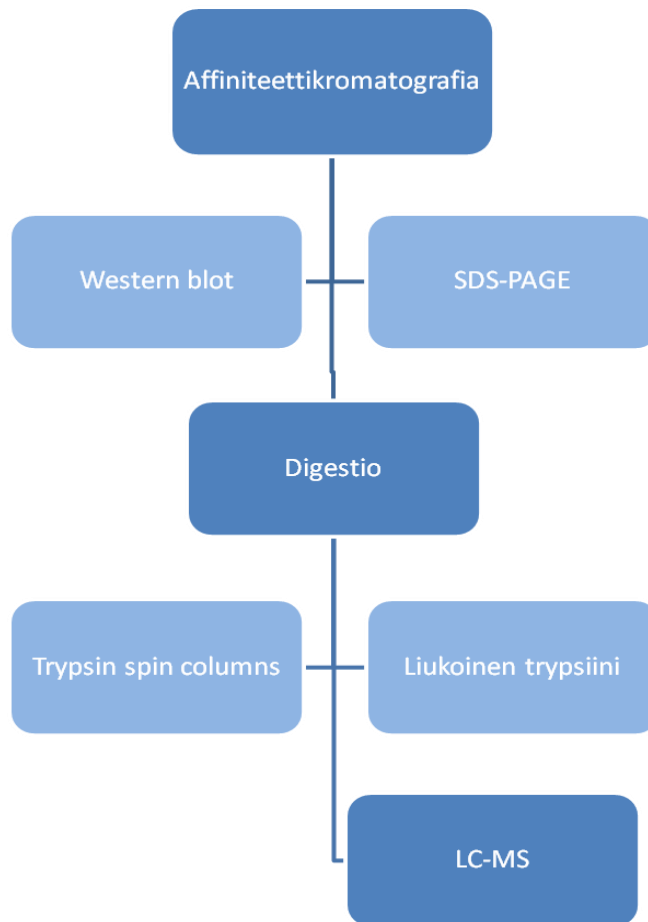
Proteiinit ovat tyypillisesti liukoisia vesi-asetonitriili tai vesi-metanoli-liuoksiin, jota käytetään hyväksi peptidien LC-erottelussa. Kyseisten liuottimien käyttö mahdollistaa myös sähkösumutus-ionisaatiomenetelmän käytön, sillä ne ovat helposti haihtuvia ja mahdollistavat tutkittavien molekyylien ionisoitumisen. Peptidien LC-erottelun yhteydessä käytetään tyypillisesti C4-, C8- tai C18-kolonnia sekä asetonitriiligradienttia, jonka ansiosta näytteen sisältävät peptidit irtoavat kolonnista vähitellen ominaisuuksiensa mukaan tietyssä asetonitriilipitoisuudessa. Kolonnin halkaisija valitaan näytemäärän ja ionilähteen mukaan. Valittu halkaisija vaikuttaa kolonnin läpi kulkevan ajoliuoksen nestevirtaukseen ja edelleen mittauksen herkkyyteen. Vain osa ionilähteestä lähtevistä ioneista voidaan kerätä massaspektrometriin, joten nestevirtauksen alentaminen lisää mittauksen herkkyyttä vähentämällä hukkaan menevän näytteen osuutta. Proteiininäytteiden kohdalla tutkittavan analyytin pitoisuus on usein pieni, jolloin alhaisen nestevirtauksen sekä halkaisijaltaan kapeamman kolonnin käyttö on perusteltua. Nestevirtauksen ollessa pieni voidaan ajoa puolestaan nopeuttaa käyttämällä lyhyempää kolonnia. LC-ajoliuokseen lisätään tavallisesti jotakin heikkoa happoa, kuten muurahaihappoa, jotta tutkittavien molekyylien ionisoituminen protonoitumalla olisi tehokkaampaa. (Ketola ym. 2010)

3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää CBRN-kenttälaboratorio-olosuhteissa suoritettava nopea ja yksinkertainen näytteenkäsittelymenetelmä risiinitoksiinin puhdistamiselle ennen LC-MS analysointia. Työssä selvitettiin onko sokerimatriisilla toteutettu affiniteettikromatografia riittävä puhdistusmenetelmä risiinitoksiinia sisältäville näytteille. Työssä vertailtiin kahta erilaista sokeriaffiniteettimatriisia ja arvioidaan niiden kykyä sitoa risiinitoksiinia. Sitoutumiskapasiteetiltaan tehokkaamman sokerimatriisin näytteenpuhdistuskykyä tutkittiin edelleen puhdistamalla risiinitoksiinia kahdesta erilaisesta näytematriisista affiniteettikromatografialla.

Risiininäytteiden puhdistamisen lisäksi *pro gradu*-työssä vertailtiin kahta risiinitoksiinin trypsinisointimenetelmää sekä niiden vaatimaa digestioaikaa. Digestiossa muodostuneet tryptiset peptidit analysoitiin työn loppuksi LC-MS-menetelmällä.

Työn tuloksia voidaan tulevaisuudessa käyttää pohjana uusien analyysimenetelmien kehittämisessä, joiden avulla risiinitoksiini voidaan tunnistaa erilaisista näytteistä nopeasti ja suurella herkkyydellä. Tutkimuksesta saadut tulokset voivat auttaa myös muiden toksisten lektiiniproteiinien, kuten abriinin, tunnistuksen kehittämisessä. Tämän kaltaisten menetelmien kehittäminen on edellytys Puolustusvoimien CBRN-kenttälaboratorion toimintakyvyn ylläpitämisen sekä kehittämisen kannalta. Laboratorion tärkeimpänä tehtävänä on tunnistaa näytteistä mahdolliset kemialliset ja biologiset taisteluaineet sekä erilaiset toksinit sotilaallisen päätöksenteon tueksi.



Kuva 3.1. Työn eteneminen.

4. MENETELMÄT

4.1 RISIINIJAUHEEN VALMISTAMINEN

Tutkimuksen ensimmäisenä vaiheena valmistettiin puhdistamatonta risiinijauhetta, jota käytettiin näytemateriaalina useassa työn eri vaiheessa. Useita erilaisia ”keittokirja” ohjeita toksisen risiinijauheen valmistamisesta on kiertänyt Internetin keskustelupalstoilla ja erilaisilla sivustoilla jo yli kymmenen vuoden ajan. Työssä käytettiin yleisimmin Internetissä esiintyvää ohjetta (Zoklet.net), sillä erolla, että ainesosat punnittiin ja mitattiin tarkasti. Risiinijauhe valmistettiin risiinikasvinsiemenistä (*Ricinus communis*) zanzibariensis mix-siemenseoksesta, joka sisälsi siemeniä eri risiinilajikkeista. Siemenet hankittiin Siemenvesa Oy:ltä (Suomi).

Varsinainen risiinin käyttöliuos valmistettiin liuottamalla haluttu määrä valmista risiinijauhetta 1x fosfaattipuskuriin (PBS). Risiinijauheen arvioidaan sisältävän risiinitoksiinia 1-5 %, mutta sen tarkkaa määrää ei tiedetty. Risiinin käyttöliuoksen laimennokset sekä risiinitoksiinin määrä eri liuoksissa käy ilmi taulukossa 4.1.1 Standardina puhtaalle risiinitoksiinille käytettiin työn eri vaiheissa Sigma-Aldrich:n (USA) puhdasta risiinin A-ketjua.

Taulukko 4.1.1. Risiinijauhe- 1 x PBS-käyttöliuoksen pitoisuudet. Taulukosta käy ilmi käyttöliuosten laimennokset, risiinijauheen pitoisuus liuoksessa sekä risiinitoksiinin laskennalliset sekä keskimääräinen pitoisuus liuoksessa.

	Risiinijauheen pitoisuus (mg/ml)	Risiinin pitoisuus		
		Jos risiiniä 1 % jauheessa (mg/ml)	Jos risiiniä 5 % jauheessa (mg/ml)	Keskimääräinen risiinin pitoisuus (mg/ml)
1	100	1	5	3
2	10	0.1	0.5	0.3
3	1	0.01	0.05	0.03
4	0.1	0.001	0.005	0.003
5	0.01	0.0001	0.0005	0.0003

4.2 AFFINITEETTIKROMATOGRAFIA SOKERIPYLVÄILLÄ

4.2.1 Affiniteettikromatografiapylväiden valmistaminen

Työssä valmistettiin kaksi affiniteettikromatografiapylvästä, joiden matriiseina käytettiin N-asetyyli-D-galatosamiini-Agaroosia (A2787, Sigma-Aldrich, USA) sekä N-asetyyli-D-glukosamiini-Agaroosia (A2278, Sigma-Aldrich, USA). Molemmat pylväät valmistettiin samalla tavalla: 700 µl matriisisuspensiota pipetoitiin 0.8 ml Pierce® Centrifuge Columneihin (Thermo Scientific) ja sentrifugoitiin 3000 rpm 2 min. (MiniSpin, Eppendorf, Saksa). Sentrifugoinnin jälkeen affiniteettimatriisi oli tiivistynyt ylimääräisen suspensiopuskurin poistuttua, ja sen tilavuus oli n. 350 µl. Ennen käyttöä, affiniteettipylväät tasapainotettiin 3,5 ml:lla 1 x PBS:ää, eli kymmenkertaisella tilavuudella matriisin tilavuuteen nähden. Samaa affiniteettipylvästä pystyttiin käyttämään uudelleen 3–4 kertaa sen tehon heikkenemättä. Käyttökertojen välillä matriisi pestiin 1ml:lla käytetyllä eluenttia sekä tasapainotettiin uudelleen 3,5 ml:lla 1 x PBS. Valmiit affiniteettipylväät säilytettiin + 4 °C:ssa ja pidemmän säilytyksen ajaksi pylväisiin lisättiin 500µl 1 x PBS + 0,01 % (w/v) natriumatsidia (Sigma-Aldrich, USA), mikä esti bakteerien kasvun kromatografiapylväissä säilytyksen aikana.

4.2.2 Risiinitoksiinin puhdistaminen sokeriaffiniteettikromatografialla

Tasapainotettuun sokeriaffiniteettikromatografiapylväeseen pipetoitiin 200 µl 10 mg/ml risiinijauhe- 1 x PBS-liuosta, inkuboitiin huoneenlämmössä n. 5–15 min, minkä jälkeen matriisiin sitoutumaton materiaali poistettiin pylvästä imemällä neste 10 ml ruiskulla pylvään läpi. Centrifuge Columni ja ruisku yhdistettiin toisiinsa tiiviisti luer lock yhteensopivilla liittimillä.

Matriisia pestiin 1 x PBS:llä niin kauan, että kaikki sitoutumaton materiaali oli poistunut matriisista. Tämä saatiin selville mittaamalla pesunäytteiden A_{280} NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä (NanoDrop Technologies, Inc. USA) ja määrittämällä siitä näytteen

sisältämän proteiinkonsentraation. Pylvääseen lisättiin kerrallaan 500 µl 1 x PBS:ää ja se imettiin ruiskun avulla pylvään läpi. Kun matriisia oli pesty yhteensä 4 ml:lla 1 x PBS:ää, näytteen A_{280} oli lähellä nollaa ja sitoutumattoman materiaalin katsottiin poistuneen matriisista.

Matriisiin sitoutunut risiinitoksiini eluoiitiin pylväistä 0.5 M laktoosi- 1 x PBS-liuoksella. Eluutio suoritettiin 100 µl:n fraktioissa ja eluutionäytteet säilytettiin proteiinipitoisuuden mittaamista varten. Eluentin lisäämisen jälkeen pylvästä sentrifugoitiin 3000 rpm 2 min ajan MiniSpin sentrifugilla (Eppendorf, Saksa) ja näytteen proteiinipitoisuus (A_{280}) mitattiin NanoDropilla (NanoDrop Technologies, Inc. USA). Eluutiota toistettiin, kunnes eluutionäytteiden proteiinipitoisuudet olivat lähellä nollaa. Kolme suurimman proteiinipitoisuuden omaavaa fraktiota yhdistettiin. Tällä tavalla varmistettiin, että kaikki risiinitoksiini irtoaa matriisista ja että muodostuva puhdas toksininäyte ei turhaan laimene ylimääräisellä eluentilla. Puhdistetut risiinitoksiininäytteet säilytettiin -18 °C:ssa seuraavia työvaiheita varten.

4.3 VASTA-AINEVÄLITTEINEN KROMATOGRAFIA

4.3.1 Immunoaffiniteetikromatografiapylväiden valmistaminen

Immunoaffiniteetikromatografiapylväiden valmistamisessa käytettiin Pierce® NHS-Activated Agarose Dry Resin-kromatografiapylväitä (Thermo scientific, USA), jotka sisälsivät valmiina kromatografiamatriisin kuivassa muodossa. Pylväät valmisteltiin käyttöä edeltävänä päivänä, liittämällä risiini-vasta-aine (R2E4, Ani Biotech, Suomi) kovalenttisesti matriisiin.

R2E4-vasta-ainelaimennosta laimennettiin edelleen yhdistämällä 100 µl vasta-ainetta ja 300 µl 1 x PBS:ää. Vasta-ainelaimennos pipetoitiin kromatografiapylvääseen, jossa oli 33 mg kuivaa agarosiresiiniä. Pylvästä pidettiin ravistelijalla huoneenlämmössä 2 tunnin ajan, jonka aikana vasta-aine kiinnittyi kromatografiamatriisiin kovalenttisesti.

Inkuboinnin jälkeen pylväs sentrifugoitiin 1000 rpm, 1 min ajan (MiniSpin, Eppendorf, Saksa) ylimääräisen nesteen poistamiseksi. Kuivan matriisin turpoamiskapasiteetti on 6–7,5 ml/g, joten valmistetun matriisin tilavuudeksi muodostui noin 200 µl. Matriisi pestiin yhteensä 800 µl, eli nelinkertaisella tilavuudella matriisin tilavuuteen nähden, 1 x PBS:llä. Vasta-aineen kiinnittämisen jälkeen matriisiin jääneet mahdolliset aktiiviset kohdat blokattiin lisäämällä 400 µl 1 M Tris-HCl-puskuria (pH. 7.4), minkä jälkeen pylvästä inkuboitiin jälleen ravistelijalla huoneenlämmössä puolen tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen ylimääräinen neste poistettiin sentrifugoimalla 1000 rpm 1 min. Immunoaffiniteettimatriisia pestiin lopuksi vielä 1 x PBS:llä, niin kauan, että matriisista ei enää poistunut proteiinia. Tämä selvitettiin mittaamalla pesuliuosten A_{280} NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä (NanoDrop Technologies, Inc. USA). Käyttövalmiiseen affiniteettipylvääseen lisättiin 400 µl 1 x PBS + 0,05 % natriumatsidia (Sigma-Aldrich, USA) ja säilytettiin + 4 °C:ssa seuraavaan päivään.

4.3.2 Risiinitoksiinin puhdistaminen immunoaffiniteetikromatografialla

Immunoaffiniteetikromatografiapylväs otettiin huoneenlämpöön tasapainottumaan noin puoli tuntia ennen käyttöä. Säilytyspuskuri sentrifugoitiin pois pylvästä (1000 rpm, 2 min; MiniSpin, Eppendorf, Saksa) ja matriisi tasapainotettiin yhteensä 3 ml:lla 1 x PBS:ää 500 µl fraktioissa. Jotta sokeri- ja immunoaffiniteetikromatografiapylväiden kykyä puhdistaa risiinitoksiinia voitaisiin verrata keskenään, laitettiin puhdistettavaa näytettä immunoaffiniteettipylvääseen samassa suhteessa matriisin tilavuuteen nähden kuin sokeripylväänkin kohdalla. Tämän vuoksi immunoaffiniteettipylvääseen pipetoitiin 170 µl, 10 mg/ml risiinijauhe-1 x PBS-liuosta ja inkuboitiin ravistelijalla huoneenlämmössä 2 h ajan. Inkuboinnin jälkeen sitoutumaton materiaali sentrifugoitiin pois pylvästä ja läpitulleesta liuksesta mitattiin A_{280} NanoDrop spektrofotometrillä risiinitoksiinin sitoutumistehokkuuden arvioimiseksi. Tämän jälkeen matriisia pestiin yhteensä 3 ml:lla 1 x PBS:ää 500 µl fraktioissa ja jokaisesta pesuliuksesta mitattiin A_{280} . Kun spektrofotometrimittausten perusteella matriisista ei enää irronnut proteiinia, eluoiitiin sitoutunut risiinitoksiini 0.2 M Glysiini-HCl-liuoksella, pH. 2,5–3 (Sigma-Aldrich, USA), 500 µl fraktioissa ja mitattiin näytteiden A_{280} . Eluointia jatkettiin, kunnes

proteiinia ei enää irronnut, yhteensä 5,5 ml:lla eluutiopuskuria. Suurimman proteiinipitoisuuden omaava fraktio valittiin varsinaiseksi puhdistetuksi risiinitoksiini näytteeksi ja säilytettiin – 18 °C:ssa seuraavia työvaiheita varten.

Käytön jälkeen immunoaffiniteettipylväs pestiin yhteensä 8 ml:lla 1 x PBS:ää ja tasapainotettiin yhteensä 4 ml:lla 1 x PBS + 0.05 % natriumatsidi-liuosta (Sigma-Aldrich, USA). Pylväs säilytettiin + 4 °C:ssa seuraavaa käyttökertaa varten. Oikein säilytettyä immunoaffiniteettipylvästä voi käyttää uudelleen sen tehon heikkenemättä muutamia kertoja.

4.4 RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN PYYHKÄISYNÄYTTEISTÄ SOKERIAFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA

Risiinijauhe-pyyhkäisynäytteet valmistettiin CBRN-kenttälaboratorion työohjeiden mukaisesti (TYO 055.23: B näytteenotto-ohje, CBRN-kenttälaboratorio. Versio 01.3, Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos 20.062011. Ei julkinen.). Risiinijauhetta levitettiin ohuelti muoviselle petrimaljalle ja maljan pohjalta pyyhkäistiin kerran nukkapuikolla. Nukkapuikon pää katkaistiin eppendorf-putkeen, jossa oli 400 µl 1 x PBS:ää. Putkea sekoitettiin (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc, USA) voimakkaasti useasti jauheen liukenemisen tehostamiseksi ja annettiin seistä huoneenlämmössä noin tunnin ajan.

Pyyhkäisynäytteiden sisältämä risiinitoksiini puhdistettiin sekä galaktoosi- että glukoosisokeripylväillä ja kummankin matriisin kohdalla puhdistettiin 3 kappaletta rinnakkaista pyyhkäisynäytettä. Molemmat sokeriaffiniteettipylväät sisälsivät 350 µl matriisia ja ne tasapainotettiin yhteensä 4 ml:lla 1 x PBS:ää ennen käyttöä. Molempien sokeriaffiniteettipylväiden kohdalla puhdistus tapahtui samalla tavalla. Pyyhkäisynäyte (n. 400 µl) pipetoitiin affiniteettipylvääseen ja annettiin inkuboitua 15 min välillä sekoittaen. Jokaista näytettä pestiin yhteensä 3,5 ml:lla 1 x PBS:ää 500 µl:n fraktioissa ja

pesuliuosten A_{280} mitattiin NanoDrop spektrofotometrillä. Kun matriisista ei enää irronnut proteiinia, eluoiitiin sitoutunut risiinitoksiini 0.5 M laktoosi-1 x PBS:llä (Sigma-Aldrich, USA) 100 μ l:n fraktoissa ja mitattiin fraktioiden A_{280} . Kolme suurimman proteiinipitoisuuden omaavaa fraktioita yhdistettiin varsinaiseksi puhdistetuksi risiinitoksiininäytteeksi.

4.5. RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN MAITONÄYTTEISTÄ SOKERIAFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA

Valmistettiin risiinijauhe-1 x PBS-maitonäytteitä, joista risiinitoksiini puhdistettiin galaktoosisokeriaffiniteettikromatografiapylväällä. Risiinitoksiinia sisältävien maitonäytteiden avulla tutkittiin, pystytäänkö sokeriaffiniteettikromatografialla puhdistamaan toksiinia elintarvikenäytteistä. Maitona käytettiin Valion laktoositonta Eila-maitojuomaa (1412 J 30.12.12 0149 6.1), josta valmistettiin viisi eri näytelaimennosta, lisäämällä eri määrät 10 mg/ml risiinijauhe-1 x PBS-käyttöliuosta maitojuomaan, niin että näytteen lopputilavuus oli 10 ml. Näytelaimennokset käyvät ilmi taulukosta 4.5.1.

Taulukko 4.5.1. Risiini-maitonäytteiden laimennokset. Risiinitoksiinin pitoisuus maitonäytteessä on laskettu olettaen, että risiinijauhe sisältää risiinitoksiinia 5 %.

Näyte	Maitojuomaa (ml)	10 mg/ml risiinijauhe-1xPBS (ml)	Lopputilavuus (ml)	Risiinitoksiinin pitoisuus (mg/ml)	Risiinitoksiinin pitoisuus (μ g/ml)
M1	8.5	1.5	10	0,025	25
M2	9.1	0.9	10	0,015	15
M3	9.7	0.3	10	0,005	5
M4	9.9	0.1	10	0,0017	1,7
M5	9.97	0.03	10	0,0005	0,5
M6	9.997	0.003	10	0,00005	0,05

Kromatografiapylvään matriisin tilavuus oli 350 µl ja matriisi tasapainotettiin yhteensä 4 ml:lla 1 x PBS:ää ennen käyttöä. Jokaisen maitonäytteen kohdalla risiinitoksiinin puhdistaminen suoritettiin samalla tavalla: 10 ml:n näyte ajettiin kromatografiapylvään läpi 500 µl:n fraktioissa imemällä näyte 10 ml:n ruiskun avulla. Kun koko näyte oli ajettu matriisin läpi, pylvästä pestiin yhteensä 15,5 ml:lla 1 x PBS:ää 500 µl:n fraktioissa. Pesuliuksista mitattiin A_{280} NanoDrop spektrofotometrillä, kunnes proteiinia ei enää irronnut pylvästä. Sitoutunut risiinitoksiini eluoitiin 0.5 M laktoosi-1 x PBS:llä 100 µl:n fraktioissa, mitattiin A_{280} ja kolme suurimman proteiinipitoisuuden omaavaa fraktiota yhdistettiin. Puhdistetut risiinitoksiininäytteet säilytettiin - 18 °C:ssa seuraavia työvaiheita varten. Maitonäytteiden välissä kromatografiapylväs pestiin 4ml:lla 1 x PBS, ennen seuraavan näytteen puhdistamista.

4.6 AFFINITEETTİKROMATOGRAFIANÄYTTEIDEN PUHTAUDEN ARVIOINTI SDS-PAGE:LLA

Affiniteetikromatografialla puhdistettujen risiinitoksiininäytteiden puhtautta tutkittiin SDS-PAGE:n avulla. SDS-PAGE-geeli valmistettiin kokonaisuudessaan 12 % polyakryyliamidigeelistä ilman erillistä ylägeeliä Laemmli protokollan mukaisesti (Laemmli, 1970) käyttäen BioRad:in Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell-laitteistoa (USA). (3,35 ml deionisoitua vettä; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8; 100 µl 10 % (w/v) SDS; 4,0 ml akryyliamidia; 50 µl 10% (w/v) ammoniumpersulfaattia; 5µl TEMED; reagenssit Sigma-Aldrich, USA)

Affiniteetinäytteiden puhtautta tutkittiin sekä natiivi- että pelkistettyjen SDS-PAGE-näytteiden avulla. Pelkistettyjen SDS-PAGE-näytteiden kohdalla, näytepuskuriin lisättiin noin 5 % kokonaistilavuudesta 2-merkaptetaanolia (Sigma-Aldrich, USA) ja näytteitä kuumennettiin 95 °C:ssa 5 min. ajan. Natiivin SDS-PAGE-geelin kohdalla näytepuskuriin ei lisätty pelkistävää merkaptetaanolia, eikä näytteitä kuumennettu. Sekä natiivit, että pelkistetyt näytteet laimennettiin näytepuskurilla 1/1 suhteessa ja syntynyttä

laimennosta pipetoitiin geelin kaivoon 10 µl. Molekyylipainomarkkeerina käytettiin Prestained SDS-PAGE Standard #161–0318, broad range (Bio-Rad, USA), jonka avulla elektriforeesiajon etenemistä sekä proteiinien siirtymistä geeliltä western blot membraanille voitiin tarkastella.

Elektroforeesiajo suoritettiin käyttämällä PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, USA) 120V vakiojännitettä ja ajon pituus oli keskimäärin n. 2,5 tuntia. SDS-PAGE-geeli värjättiin Coomassie Brilliant Blue -värillä yhden tunnin ajan, jonka jälkeen ylimääräinen väri poistettiin värinpoistoliuoksella (Laemmli, 1970). SDS-PAGE-geeliä pidettiin värinpoistoliuoksessa sekoittajalla (Edmund Bühler GmbH, Saksa), kunnes ylimääräinen taustaväri oli hävinnyt, eli keskimäärin 1–2 tuntia. Värinpoistoliuos vaihdettiin kertaalleen uuteen käsittelyn aikana.

4.7 AFFINITEETTIKROMATOGRAFIANÄYTTEIDEN PUHTAUDEN ARVIOIMINEN WESTERN BLOTILLA

Western blot-menetelmän avulla varmistettiin, että SDS-PAGE-geelissä näkyvät bändit ovat risiinitoksiinia. Western blot suoritettiin Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell-laitteistolla (Bio-Rad, USA) sen käyttöohjeen mukaisesti. Ennen Western blottia värjäämätöntä SDS-PAGE-geeliä huuhdeltiin Western blot-ajopuskurissa 5 min. ajan sekoittajalla (Edmund Bühler GmbH, Saksa). Ajopuskuri (3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, USA); 14,5 g glysiiniä (Sigma-Aldrich, USA); 200 ml metanolia ja täydennys deionisoidulla vedellä yhteen litraan) jäähdytettiin lähelle 0 °C ennen käyttöä. Geelin huuhtelun jälkeen kasattiin Western blot kelkka ja ajettiin 1 h, 100 V. Ajon jälkeen membraani siirrettiin 30 minuutiksi blokkaukoliuokseen (1 x PBS + 1 % BSA (Sigma-Aldrich, USA)) sekoittajalle. Blokkauksen jälkeen membraani siirrettiin primaarivasta-aineliuokseen 45 minuutiksi. Primaarivasta-aineena käytettiin kahden risiinvasta-aineen seosta (R2E4 ja R10E5, Ani Biotech, Suomi), jotka laimennettiin suhteessa 1/2500 liuokseen, jossa oli 1 x PBS + 0,1 % BSA. Ennen sekundaarisen vasta-aineen lisäämistä,

membraani pestiin kolme kertaa 1 x PBS:llä aina viiden minuutin ajan. Sekundaarivasta-aineena käytettiin Anti-mouse IgG, alkalinen fosfataasi-konjugaattia (Sigma-Aldrich, USA), joka laimennettiin suhteessa 1/1000 liuokseen, jossa oli 1 x PBS + 0,1 % BSA. Membraania pidettiin sekundaari vasta-aineliuoksessa 30 min. sekoittajalla, minkä jälkeen membraani pestiin jälleen kolmesti 1 x PBS:llä sekä kerran Tris-HCl-puskurilla (1 ml 1,5M Tris-HCl pH 8.8 + 49 ml deionisoitua vettä). Western blotin viimeisenä vaiheena membraani siirrettiin substraattiliuokseen, joka sai aikaan risiinitoksiinia sisältävien proteiinivyöhykkeiden värjäytymisen (1 tabl. Sigmafast#BCIP/NBT B5655 (Sigma-Aldrich, USA) + 10 ml deionisoitua vettä). Värjäytymisen jälkeen membraanin annettiin kuivua.

4.8 AFFINITEETTİKROMATOGRAFIAMENETELMIEN TEHOKKUUDEN VERTAILU LIUSKATESTILLÄ

Affiniteetikromatografialla puhdistettujen risiinitoksiininäytteiden toksiinipitoisuutta ja samalla puhdistusmenetelmien tehoa tutkittiin ennen LC-MS analyysiä ENVI Assay system gold, ricin toxin test -liuskatestillä (Environics, Suomi). Galaktoosi-, glukoosisekä immunoaffiniteetikromatografialla puhdistetuista risiinitoksiininäytteistä valmistettiin laimennussarjat 1 x PBS:ään laimentamalla edellinen näyte aina kaksinkertaisesti. Valmistetut laimennokset olivat 1/2, 1/4, 1/16 ja 1/32. Jokaisen näytteen ja laimennoksen kohdalla liuskatesti suoritettiin samalla tavalla: 30 µl laimennettua näytettä lisättiin liuskatestin puskuriin ja säiliö käännettiin ylösalaisin niin, että puskuri oli kosketuksissa primaarivasta-aineen sisältämän korkin kanssa noin 15 sekunnin ajan. Testiliuskalle annosteltiin näytepuskuriä 4 pisaraa ja testiliuskan annettiin seistä tasaisella pinnalla huoneenlämmössä noin 15 minuutin ajan. Tuloksen arvioimiseksi, tarkasteltiin silmämääräisesti muodostuuko positiivisesta risiininäytteestä kertova viiva kontrolliviivan viereen.

Myös affiniteetikromatografialla maito- sekä pyyhkäisynäytteistä puhdistettuja risiinitoksiininäytteitä arvioitiin liuskatestien avulla. Kyseisistä näytteistä ei tehty erillisiä laimennoksia, vaan jokaisesta näytteestä pipetoitiin suoraan 30 µl liuskatestin puskuriin. Testi sekä arviointi suoritettiin kuten edellä.

4.9 RISIINITOKSIININ TRYPSINOINTI

Ennen trypsinointia puhdistetut risiinitoksiininäytteet esikäsiteltiin, jotta trypsiinientsyymien teho olisi paras mahdollinen. LC-MS-analyysissä puhtaan risiinitoksiinin standardina käytettiin 0.85 mg/ml risiinin puhdasta A-ketjua (Sigma-Aldrich, USA), joka esikäsiteltiin myös muiden risiininäytteiden tavoin. Affiniteetikromatografialla puhdistetut risiinitoksiininäytteet denaturoitiin, pelkistettiin sekä alkyloitiin ennen trypsinointia. Sigman puhdas risiinin A-ketju sisältää jo valmiiksi pelkistimen, joten näytettä ei tarvinnut pelkistää erikseen. Näytteet denaturoitiin + 95 °C vesihauteessa 5 min ajan. Pelkistäminen ja alkylointi suoritettiin käyttämällä Sigma-Aldrichin ProteoPrep Reduction and Alkylation kittiä (PROTRA, Sigma-Aldrich, USA) tuotteen ohjeen mukaisesti. Jäähdyneeseen näyteliuokseen lisättiin 25 µl pelkistävää TPB-kantaliuosta (200 mM tributyylifosfiini) aina 1 ml proteiiniliuosta kohden ja inkuboitiin huoneenlämmössä 30 min ajan. Pelkistämisen jälkeen näytteet alkyloitiin lisäämällä 30 µl IAA-kantaliuosta (0.5 M iodoasetamidi) aina 1 ml proteiiniliuosta kohden ja inkuboitiin 1h huoneenlämmössä. IAA:n vaikutus neutraloitiin lisäämällä inkuboinnin jälkeen jälleen 25 µl TPB-kantaliuosta 1 ml proteiiniliuosta kohden ja inkuboitiin vielä 15 min huoneenlämmössä.

Trypsinointi suoritettiin työssä kahdella eri menetelmällä: käyttämällä Sigma-Aldrichin Proteomics Grade Trypsin spin columnia (TT0010, Sigma-Aldrich, USA), joissa trypsiini on sidottu spin pylvään silica-matriisiin tai käyttämällä Promegan Sequencing Grade Modified Trypsin-liukoista trypsiiniä (V5111, Promega, USA). Työn yhtenä vaiheena tarkasteltiin sekä vertailtiin näiden kahden trypsinointimenetelmän tehokkuutta

ja vaatimaa aikaa sekä etsittiin optimaalista digestioaikaa risiinitoksiininäytteille LC-MS-analyysin avulla.

Ennen käyttöä, Trypsin spin column -pylväät valmisteltiin pesemällä ja tasapainottamalla ne käytettävillä puskureilla tuotteen ohjeen mukaisesti. Ensin pylväästä poistettiin mahdolliset ilmakuplat sentrifugoimalla sitä 5 min ajan 5000 rpm (MiniSpin, Eppendorf, Saksa) sekä tulpan, että korkin ollessa paikallaan. Tämän jälkeen pylväästä poistetaan tulppa ja sentrifugoitiin 3 min 3000 rpm pylvään sisältämän glyserolin poistamiseksi. Seuraavaksi pylväs huuhdeltiin 200 µl:lla pesupuskuria (100 mM ammoniumbikarbonaattia + 2M urea) ja sentrifugoitiin 3 min 3000 rpm, minkä jälkeen pylväs huuhdeltiin vielä uudelleen 200 µl:lla pelkää 100 mM ammoniumbikarbonaattiliuosta. Lopuksi pylväs pestiin vastaavalla tavalla kolmesti 200 µl:lla MilliQ-vettä. Ylimääräisen nesteen poistamiseksi pylväästä, se sentrifugoitiin vielä 5 min 5000 rpm. Ennen näytteen lisäämistä trypsiini-pylvääseen, se laimennettiin kolminkertaisesti 100 mM ammoniumbikarbonaatilla. 100 µl näytelaimennosta pipetoitiin trypsiini-pylvääseen ja näyte sentrifugoitiin pylvään matriisiin sisään 1000 rpm, 30 s. Trypsiini-pylvään tehon ja näytteen vaatiman digestioajan vertailemiseksi risiinin puhdasta A-ketjua inkuboitiin trypsiini-pylväässä eripituisia aikoja. Käytetyt digestioajat olivat 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h ja yön yli. Peptidit eluointiin pylväästä lisäämällä 150 µl MilliQ-vettä ja sentrifugoimalla pylväs kuivaksi. Peptidinäytteet säilytettiin LC-MS-analyysia varten – 18 °C:ssa. Samaa trypsiinipylvästä voitiin käyttää uudelleen jopa 4 kertaa sen tehon heikkenemättä. Ennen uutta käyttökertaa pylväs pestiin ja tasapainotettiin kuten ennen ensimmäistä käyttöä. Trypsiinipylväs käytettiin aina viimeistään samana päivänä kuin se oli tasapainotettu eikä se säilynyt jääkaapissa yön yli kun se oli kertaalleen jo käytetty.

Promegan liukaisen trypsiinin kohdalla, käytettiin trypsiini/proteiini suhdetta 1/35. Kuiva trypsiini-entsyymi tuli liuottaa ennen käyttöä: 20 µg kuivaa trypsiiniä liuotettiin 200 µl:aan 50 mM etikkahappoliuosta ja ylimääräinen trypsiiniliuos säilytettiin – 18 °C. Trypsiiniliuosta lisättiin digestoitavaan näytteeseen käytetyssä suhteessa ja inkuboitiin + 37 °C:ssa haluttu aika. Myös liukaisen trypsiinin kohdalla risiinin puhdasta A-ketjua

digestoitii eripituisia aikoja optimaalisen digestioajan löytämiseksi. Käytetyt digestioajat olivat samat kuin trypsiini-pylväällä: 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h ja yön yli. Trypsinin vaikutusta ei erikseen inhiboitu, vaan valmiit näytteet pakastettiin ja säilytettiin -18 °C:ssa, jolloin digestio ei enää jatku

Taulukko 4.9.1. Digestoitavat risiininäytteet.

Risiinin A-ketju

- Digestioaikojen vertailu molemmilla trypsinointimenetelmillä
- Optimaalisen digestiomenetelmän sekä -ajan määrittäminen

Affiniteettikromatografianäytteet

- Sokeriaffiniteettikromatografialla puhdistetut risiininäytteet
- Digestio + LC-MS-analyysi risiinin todentamiseksi näytteestä

4.10 LC-MS ANALYYSI

LC-MS analyysissä käytettiin Thermo Scientific Accela HPLC-pumppua sekä automaattista näytteen syöttäjää, jotka olivat yhdistetty Thermo Scientific Finnigan LXQ -massaspektrometriin. Työssä LC-MS-analyysi suoritettiin käyttämällä sähkösumutus ionisaatiomenetelmää (ESI), jota pidetään yleisesti ottaen hellävaraisena ionisointimenetelmänä erityisesti peptidinäytteille. Analysaattorina käytetyssä massaspektrometrissä oli lineaarinen kvadropoli-ioniloukku (LTQ).

Nestekromatografissa käytettiin Thermo Scientific Hypersil Gold (50 x 2,1 mm) C18 käänteisfaasikolonniä, jonka partikkelikoko oli 1,9 µm. Se on mm. orgaanisille näytteille soveltuva yleiskolonni, jonka suhteellisen pieni pituus sekä tehokas erottelukyky mahdollistaa nopean HPLC-ajon sekä paremman herkkyyden kuin pidemmät kolonnit.

ESI-mittauksissa käytetään yleisesti orgaanisia liuottimia kuten metanolin, asetonitriilin tai isopropanolin vesiliuoksia. Pelkkää vettä ei käytetä nestekromatografian liuottimena, vaan siihen tulee lisätä pieni määrä helposti haihtuvaa emästä tai happoa ionisaation helpottamiseksi. Tässä työssä liuottimina käytettiin asetonitriiliä (ACN) sekä vettä, johon oli lisätty 0,1 % muurahaishappoa (H₂O+FA(0,1 %)).

LC-MS-ajon pituus oli 15 min, jonka aikana HPLC-liuottimien gradienttia muutettiin taulukon 4.10.1 mukaisesti nestevirtauksen pysyessä vakiona (200 µl/min). Nestekromatografia aloitettiin alhaisella asetonitriilipitoisuudella kahden minuutin ajan, jonka jälkeen sen pitoisuutta lähdettiin nostamaan seuraavan kymmenen minuutin aikana H₂O+FA(0,1 %):n pitoisuuden vähetessä. Tutkittavan näytteen sisältävien peptidien oletetaan irtoavat kolonnista todennäköisesti aikavälillä 2–10 min, jonka jälkeen kolonnia pestiin vielä asetonitriilillä kahden minuutin ajan. Gradienttiajon lopuksi asetonitriilin pitoisuus laskettiin jälleen alhaiseksi ja kolonnia huuhdeltiin runsaalla vedellä kahden minuutin ajan HPLC-kolonnin stabiloimiseksi.

Taulukko 4.10.1. HPLC-gradienttiajo.

No.	Aika (min)	H ₂ O+FA(0,1%) (%)	ACN (%)	µl/min
0	0	98	2	200
1	2	85	15	200
2	10	60	40	200
3	11	2	98	200
4	12	2	98	200
5	13	98	2	200
6	15	98	2	200

HPLC-gradienttiajon aikana massaspektrometri suoritti kahdenlaista mittausta samanaikaisesti: full scan massa-alueelta 300–2000 ja zoom scan massa-alueelta 400–1250. Full scan on nopea, mutta ei riittävän tarkka mittaustapa. Tämän vuoksi suoritimme zoom scan -mittauksen, joka mittasi hitaammin, mutta tarkemmin massalukualuetta, jolta markkeripeptidi-ionien tulisi löytyä. Zoom scan -mittausta käyttämällä LC-MS-mittauksessa pystytään myös herkemmin havaitsemaan kahdesti

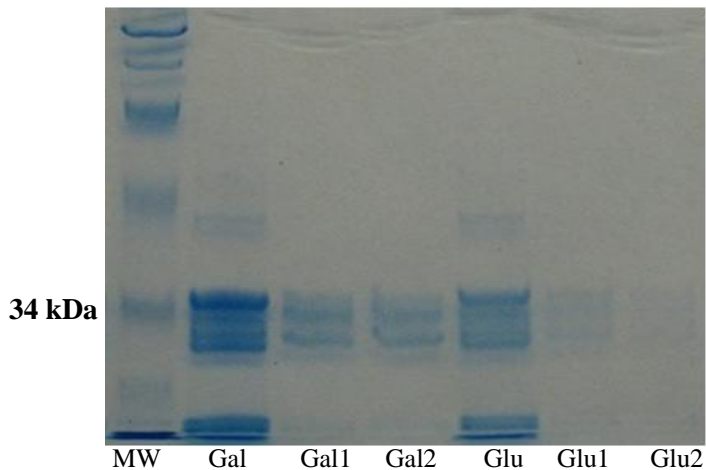
varautuneet ionit. Mittausten intensiteettien ollessa alhainen, ei MS/MS-mittauksia suoritettu.

LC-MS-mittaustuloksia varmistettiin vielä analysoimalla 4h Trypsin spin column -menetelmällä trypsinoitu risiinitoksiinin A-ketjun näyte uudelleen Fourier-muunnosionisyklotroniresonanssi (FT-ICR) massaspektrometrillä, joka on huomattavasti herkempi ja tarkempi massaspektrometri. Mittaus suoritettiin Brukerin 12-T APEX-Qe FT-ICR massaspektrometrillä suorasyöttönä ilman nestekromatografia, laimentamalla näyte suoraan asetonitriili/vesi/etikkahappo (100:100:2, v/v) -liuokseen ilman erillisiä puhdistusvaiheita. FT-ICR-massaspektrometrissä käytettiin myös sähkösumutus-ionisaatio menetelmää (ESI), mutta aiemmasta ioniloukku massaspektrometristä poiketen laitteistossa käytettiin nanospray ionilähdettä, joka mahdollistaa pienemmän nestevirtauksen sekä suuremman mittausherkkyyden. FT-ICR -mittaus suoritettiin yhteistyössä Joensuun yliopiston sekä professori Jäniksen tutkimusryhmän kanssa.

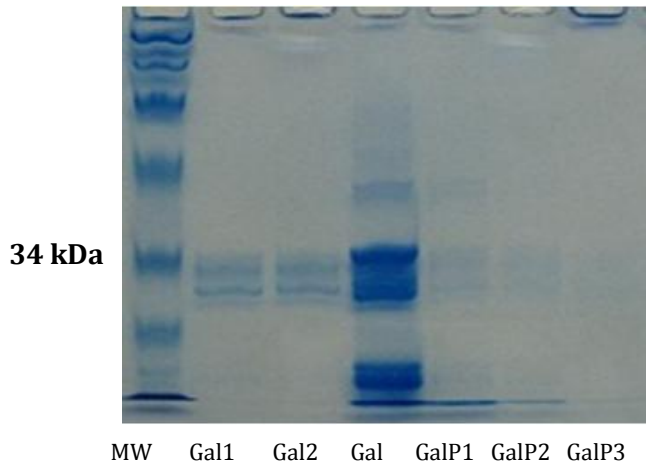
5. TULOKSET

5.1 RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN AFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA RISIINIJAUHEESTA

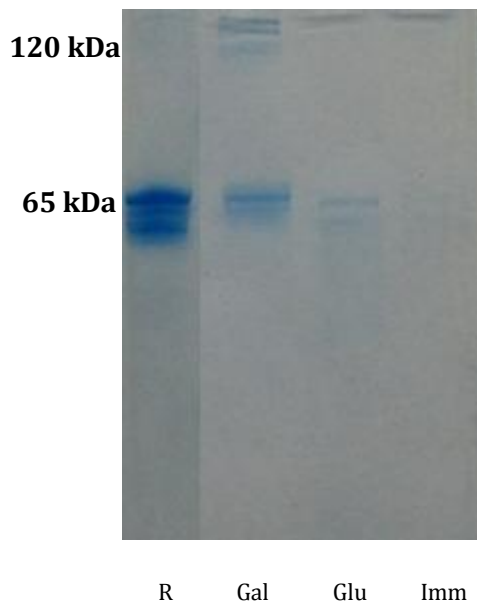
Risiinitoksiinin puhdistumista risiinijauhetta sisältävistä näytteistä eri affiniteettikromatografiapylväillä arvioitiin sekä SDS-PAGE- että Western blot -menetelmällä. Risiinitoksiinin sekä sen eri muotojen puhdistumista näytteen sisältämistä muista proteiineista tutkittiin ensin käyttämällä denaturoituja näytteitä. Edellä mainitut tulokset ovat esitetty kuvissa 5.1.1 ja 5.1.2.



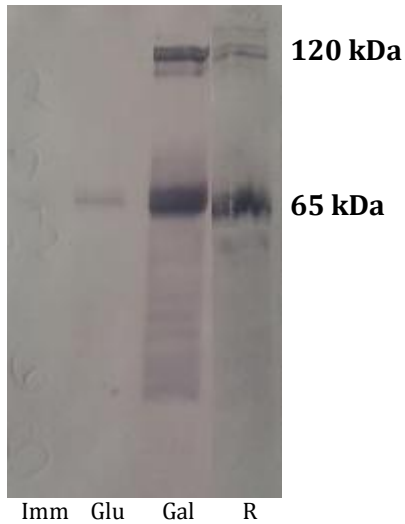
Kuva 5.1.1 SDS-PAGE-kuva denaturoidun risiinitoksiinin puhdistumisesta galaktoosi- sekä glukoosi affiniteettipylväillä risiinijauheesta. MW= molekyylimarkkeeri, Gal= puhdistamaton risiininäyte, Gal1= 1. galaktoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Gal2 = 2. galaktoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Glu= puhdistamaton risiininäyte, Glu1= 1. glukoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Glu2= 2. glukoosipylväällä puhdistettu risiininäyte.



Kuva 5.1.2. SDS-PAGE-kuvadenaturoidun risiinitoksiinin puhdistumisesta galaktoosiaffiniteettipylväällä risiinijauheesta. MW= molekyylimarkkeeri, Gal1= 1. galaktoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Gal2= 2. galaktoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Gal= puhdistamaton risiinijauhenäyte, GalP1= galaktoosipylvään 1. pesupuskuri, Gal2= galaktoosipylvään 2. pesupuskuri, Gal3= galaktoosipylvään 3. pesupuskuri.



Kuva 5.1.3 SDS-PAGE-kuva natiivin risiinitoksiinin puhdistumisesta affiniteetikromatografialla risiinijauheesta. R= puhdistamaton risiinijauhe 1xPBS, Gal= galaktoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Glu= glukoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Imm= immunoaffiniteetikromatografiapylväällä puhdistettu risiininäyte.



Kuva 5.1.4 Western blot kuvan 5.1.3 SDS-PAGE-geelistä. R = puhdistamaton risiinjauhe 1x PBS, Gal = galaktoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Glu = glukoosipylväällä puhdistettu risiininäyte, Imm = immunoaffiniteettikromatografiapylväällä puhdistettu risiininäyte.

Kuvassa 5.1.3 agglutiniinin sitoutumista eri sokeripylväisiin sekä immunoaffiniteettipylvään sitomiskapasiteettia arvioitiin käyttämällä natiiveja risiininäytteitä. Agglutiniini sekä risiinibändien oikeellisuus varmistettiin vielä vasta-aine välitteisesti Western blot-menetelmällä (kuva 5.1.4).

Käytettyjen affiniteettikromatografiapylväiden sitomiskapasiteetin arvioimiseksi ja vertailemiseksi, puhdistettuja risiinitoksiininäytteitä analysoitiin vielä ENVI Assay system gold, ricin toxin test -liuskatestien (Environics, Suomi) avulla. Eri menetelmillä puhdistetuista risiininäytteistä valmistettiin laimennokset ja etsittiin raja-arvo, jolloin risiinitoksiinin pitoisuus on niin pieni, että liuskatesti ei sitä enää tunnista. Näin pystyttiin arvioimaan mikä käytettävistä menetelmistä onnistui sitomaan eniten toksinia käytetyistä risiininäytteistä. Liuskatestien tulokset ovat esitetty kuvissa 5.1.5–5.1.7.



Kuva 5.1.5 Risiinitoksiinin todentaminen galaktoosiaffiniteetikromatografianäytteistä liuskatestillä.



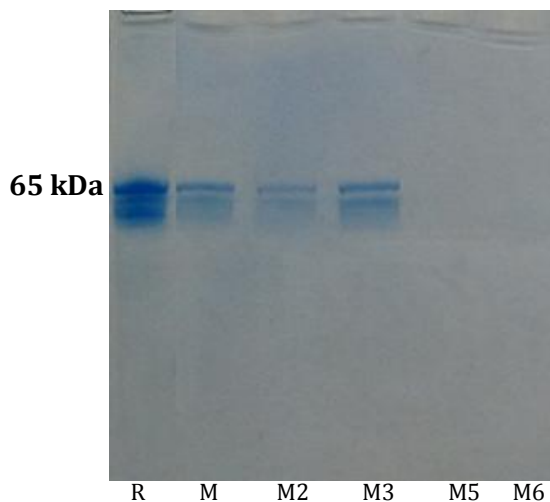
Kuva 5.1.6 Risiinitoksiinin todentaminen glukoosiaffiniteetikromatografianäytteistä liuskatestillä.



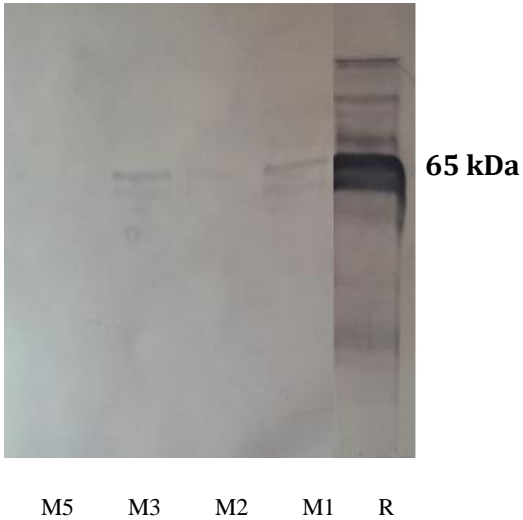
Kuva 5.1.7 Risiinitoksiinin todentaminen immunoaffiniteetikromatografianäytteistä liuskatestillä.

5.2 RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN AFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA MAIDOSTA

Galaktoosiaffiniteetikromatografiapylvällä puhdistettujen risiini-maitonäytteiden avulla etsittiin pienintä risiinitoksiinin pitoisuutta, joka pystytään näytteestä vielä tunnistamaan. Näytteiden alustavassa arvioinnissa käytettiin SDS-PAGE- sekä Western blot -menetelmiä, joiden tulokset ovat esitetty kuvissa 5.2.1 sekä 5.2.2. Lisäksi risiinin läsnäolo näytteissä varmistettiin vielä liuskatesteillä (kuva 5.2.3).



Kuva 5.2.1 SDS-PAGE-kuva natiivin risiinitoksiinin puhdistumisesta galaktoosiaffiniteetikromatografiapylvällä maitonäytteistä. R = puhdistamaton risiini jauhe 1xPBS, $c(\text{risiinitoksiini}) = 170 \mu\text{g/ml}$; M1 = maitonäyte, $c(\text{risiinitoksiini}) = 25 \mu\text{g/ml}$; M2 = maitonäyte, $c(\text{risiinitoksiini}) = 15 \mu\text{g/ml}$; M3 = maitonäyte, $c(\text{risiinitoksiini}) = 5 \mu\text{g/ml}$; M5 = maitonäyte, $c(\text{risiinitoksiini}) = 0,5 \mu\text{g/ml}$; M6 = maitonäyte, $c(\text{risiinitoksiini}) = 0,05 \mu\text{g/ml}$.



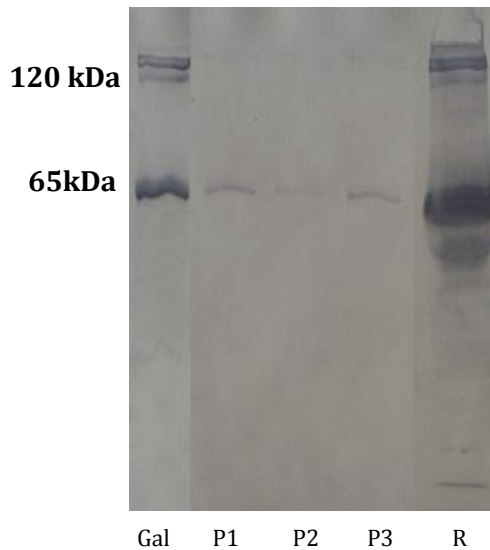
Kuva 5.2.3 Western blot -kuva natiivin risiinitoksiinin puhdistumisesta galaktoosiaffiniteetikromatografiapylväällä maitonäytteistä. R = puhdistamaton risiinjauhe 1xPBS , c(risiinitoksiini)= 170 µg/ml; M1 = maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 25 µg/ml; M2= maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 15 µg/ml; M3= maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 5 µg/ml; M5= maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 0,5 µg/ml; M6= maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 0,05 µg/ml.



Kuva 5.2.3 Risiinitoksiinin tunnistaminen maitonäytteistä liuskatestillä. M1 = maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 25 µg/ml; M2= maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 15 µg/ml; M3= maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 5 µg/ml; M5= maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 0,5 µg/ml; M6= maitonäyte, c(risiinitoksiini)= 0,05 µg/ml.

5.3 RISIINITOKSIININ PUHDISTAMINEN AFFINITEETTIKROMATOGRAFIALLA PYYHINTÄNÄYTTEISTÄ

Pyyhintänäytteiden affiniteettikromatografia suoritettiin käyttämällä galaktoosipylvästä. Pyyhintänäytteitä valmistettiin kolme rinnakkaista P1, P2 ja P3. Puhdistettujen pyyhintänäytteiden arvioimiseksi käytettiin Western blot-menetelmää (kuva 5.3.1).

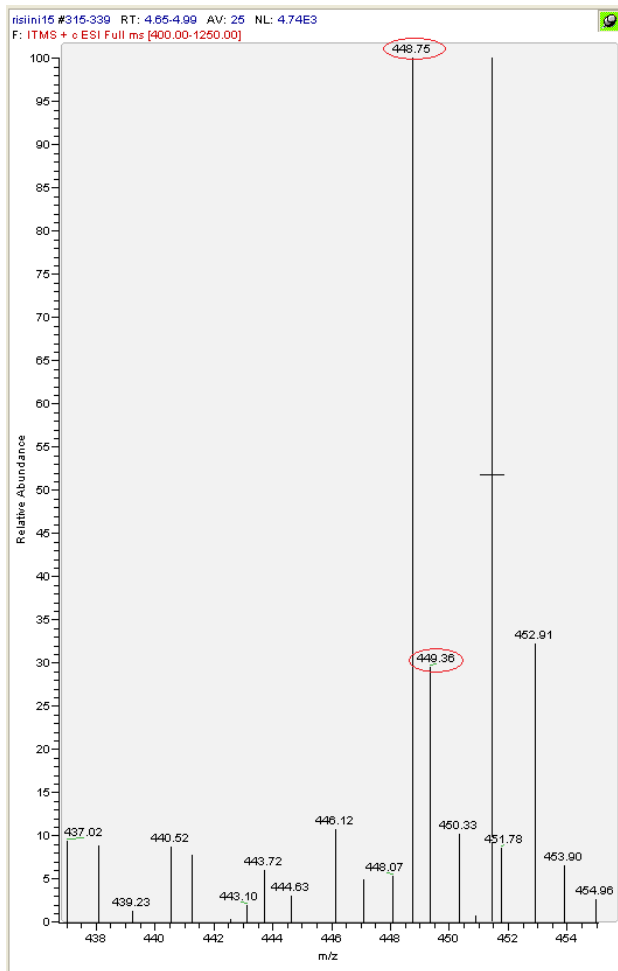


Kuva 5.3.1 SDS-PAGE-kuva natiivin risiinitoksiinin puhdistumisesta galaktoosi-affiniteettikromatografiapylväällä pyyhintänäytteistä. Gal = galaktoosipylväällä puhdistettu risiinitoksiini risiinijauheesta 1xPBS, P1 = 1. pyyhintänäyte, P2 = 2. pyyhintänäyte, P3 = 3. pyyhintänäyte, R = puhdistamaton risiinijauhe 1xPBS (10 mg/ml).

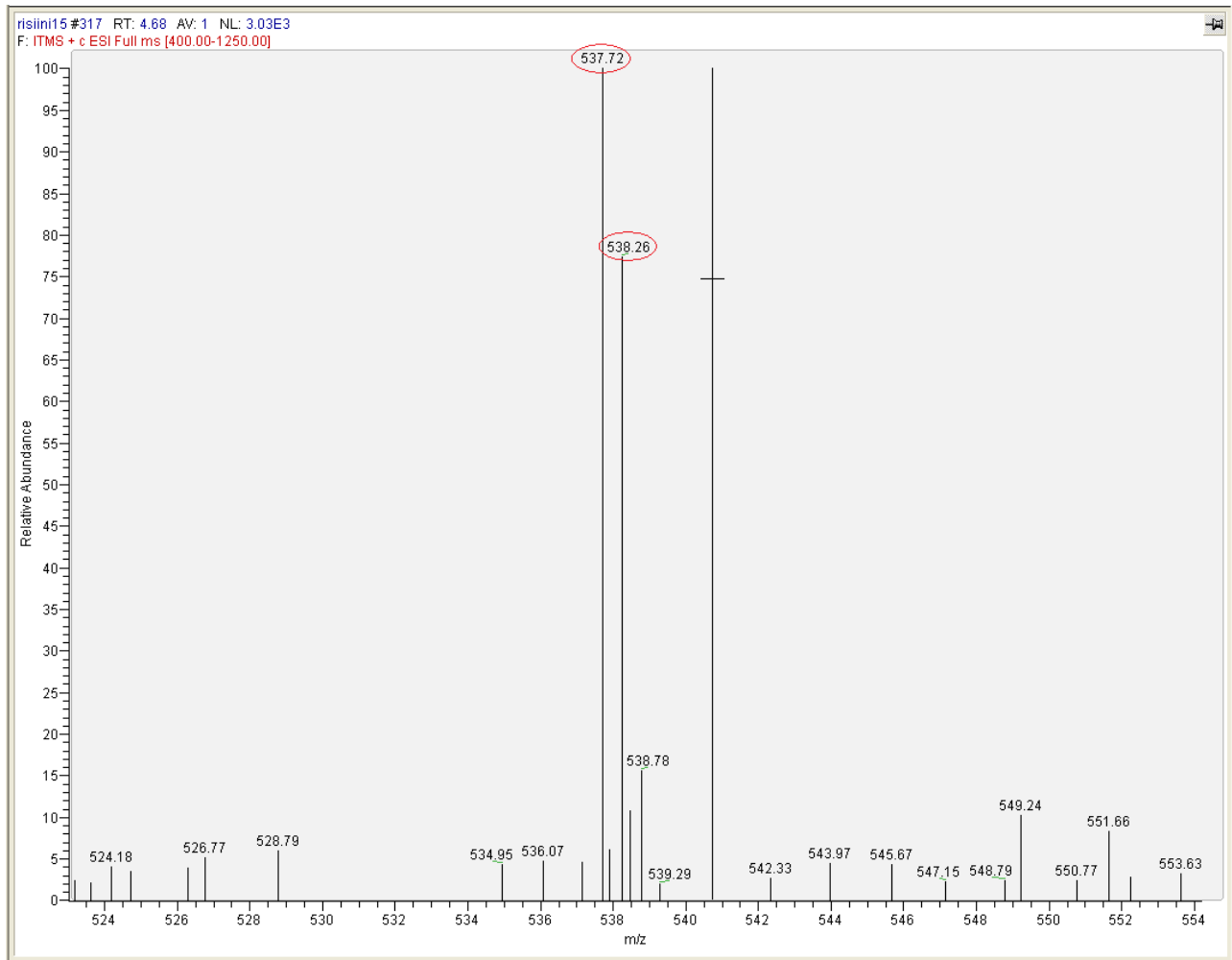
5.4 RISIINITOKSIININ TRYPSINOINTI JA TRYPSINOINTIMENETELMIEN VERTAILU

Tässä työssä risiinin läsnäoloa näytteessä tutkitaan etsimällä risiinitoksiinille ominaisia markkeripeptidejä LC-MS-menetelmän avulla. Eri trypsinointimenetelmien tehokkuutta vertailtaessa risiinitoksiinin trypsinoitavana muotona käytettiin pelkästään puhdasta risiinin A-ketjua, josta muodostuu trypsinisoinnin yhteydessä kahdesti varautuneita peptidejä. Risiinitoksiinin identifioiviksi markkeripeptideiksi valikoitiin kolme

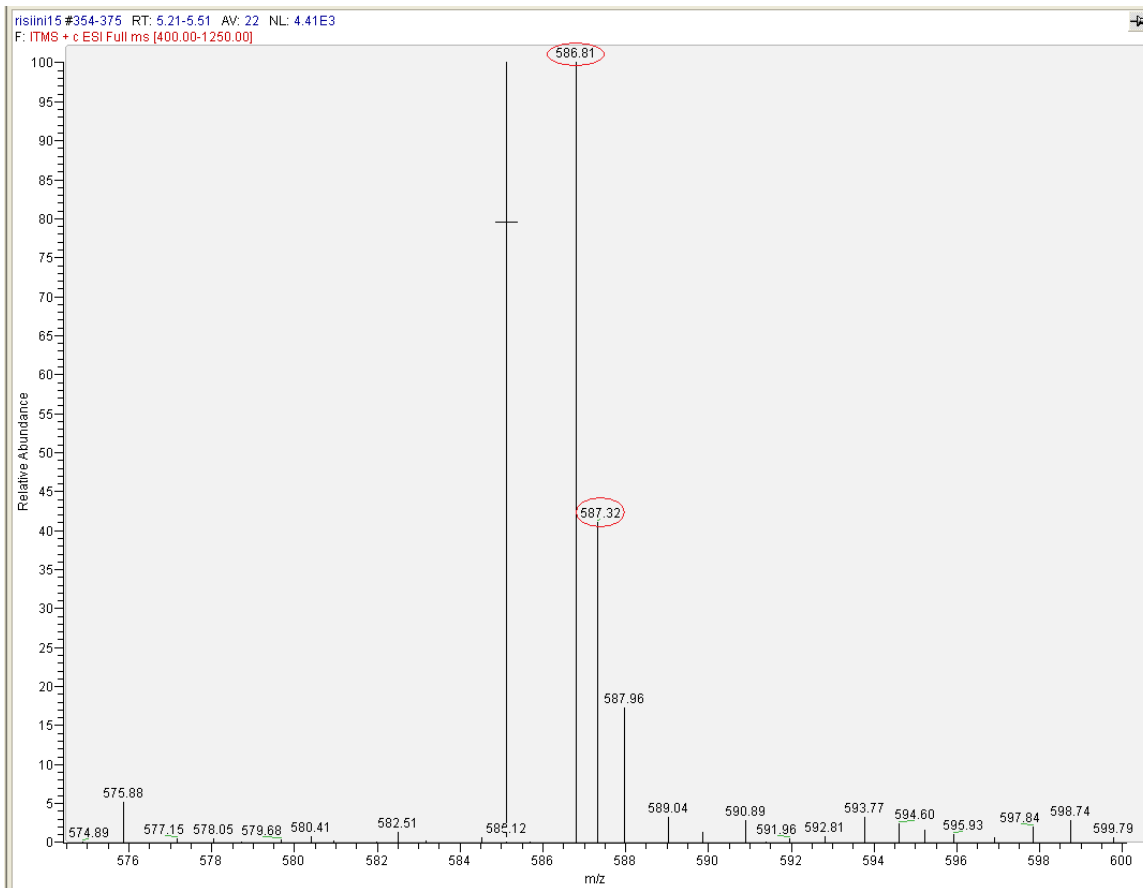
risiinitoksiinin A-ketjulle ominaista markkeripeptidiä, jotka ovat havaituilta m/z arvoiltaan $488,8^{2+}$, $537,8^{2+}$ sekä $586,8^{2+}$. (Fredrikson ym., 2005) Näistä markkereista $488,8^{2+}$ erottaa risiinitoksiinin agglutiniinista. Etsittävät ionit ovat kahdesti varautuneita ($z = 2$), joten yhtä markkeripeptidiä vastaavat isotooppiikkit esiintyvät massaspektrissä $\frac{1}{2}$ atomimassayksikön päässä toisistaan. Risiinitoksiinin tunnistamiseen käytettyjen markkeripeptidien esiintyminen risiinin A-ketjua sisältävässä näytteessä on esitetty kuvissa 5.4.1–5.4.3.



Kuva 5.4.1. Risiinin A-ketjun LC-MS-massaspektri. Kuvassa esitetty tarkemmin A-ketjun $m/z = 488,8^{2+}$ markkeripeptidiä vastaavat isotooppiikkit.

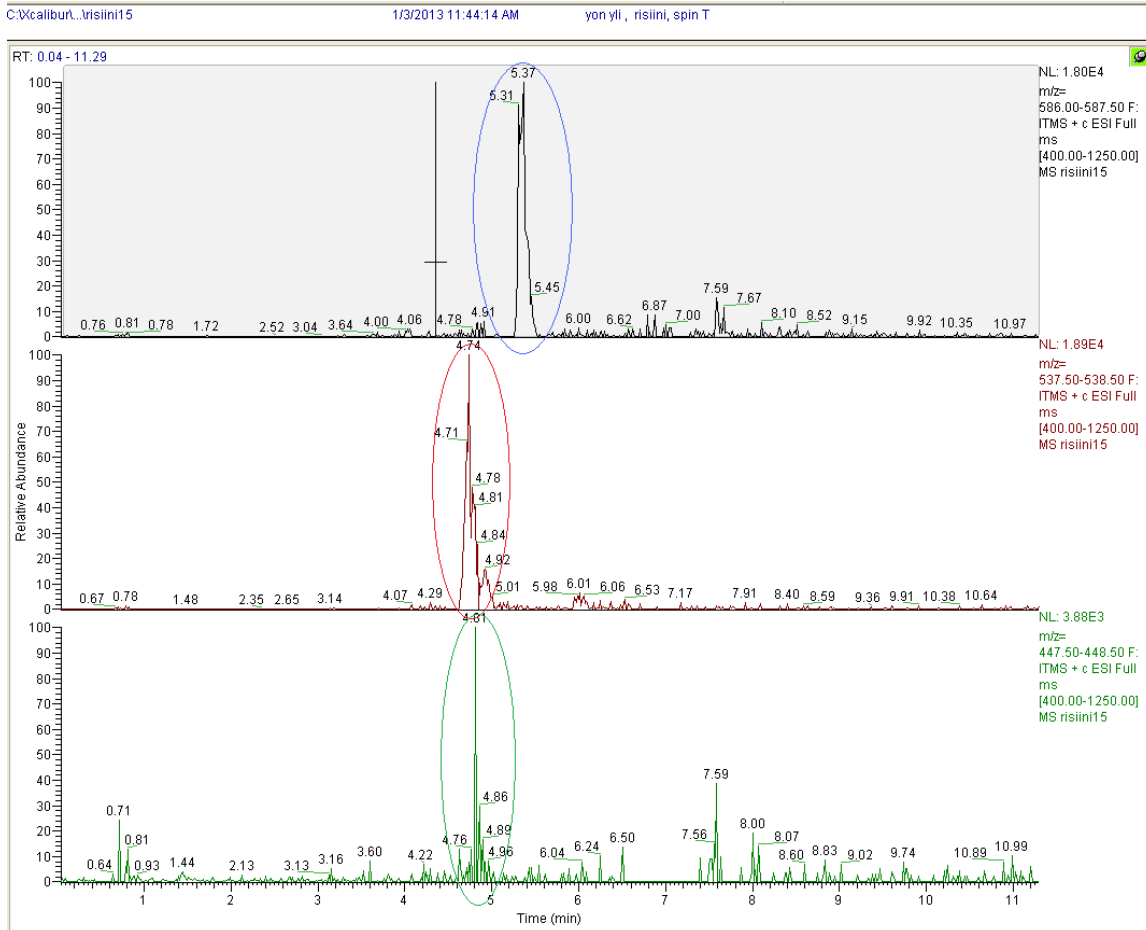


Kuva 5.4.2. Risiinin A-ketjun LC-MS-massaspektri. Kuvassa esitetty tarkemmin A-ketjun $m/z = 537,8^{2+}$ markkeripeptidiä vastaavat isotooppiikit.

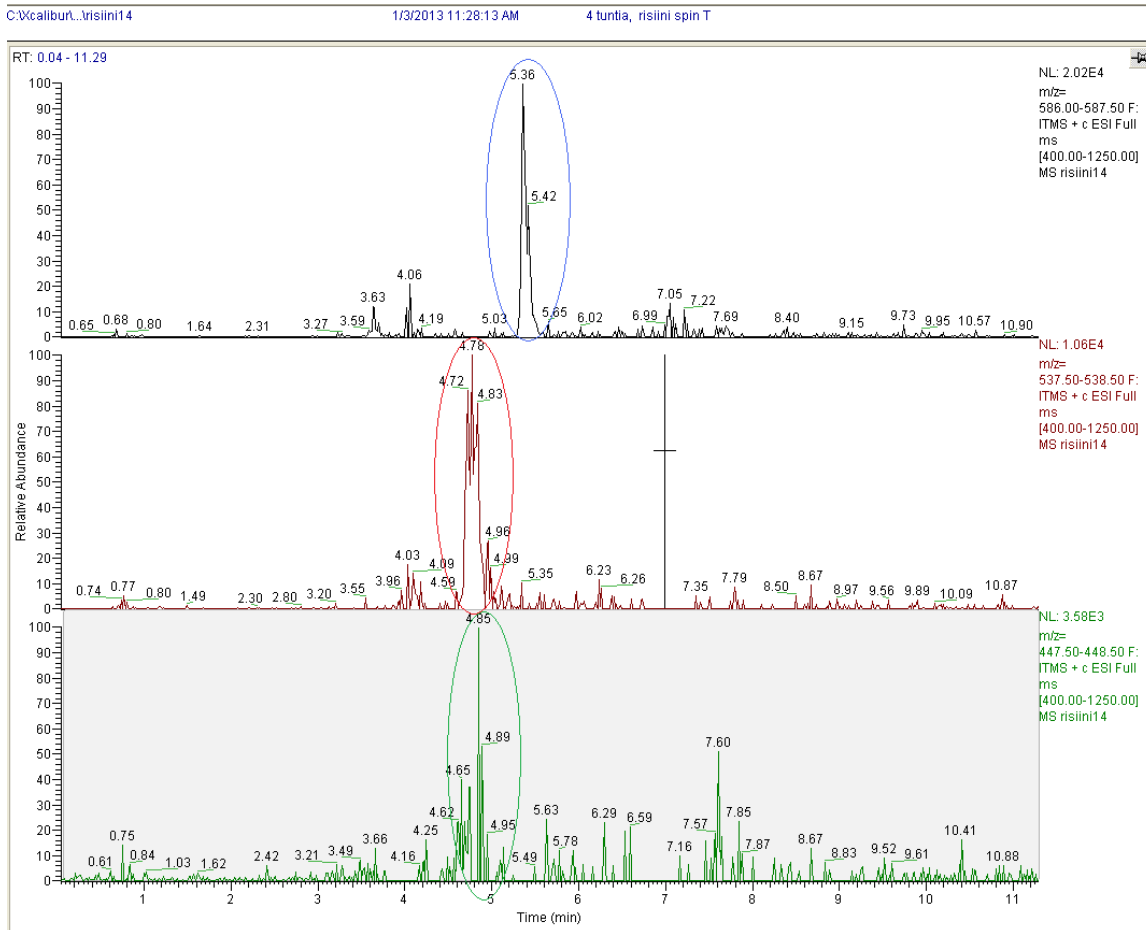


Kuva 5.4.3. Risiinin A-ketjun LC-MS-massaspektri. Kuvassa esitetty tarkemmin A-ketjun $m/z = 586,8^{2+}$ markkeripeptidiä vastaavat isotooppiikit.

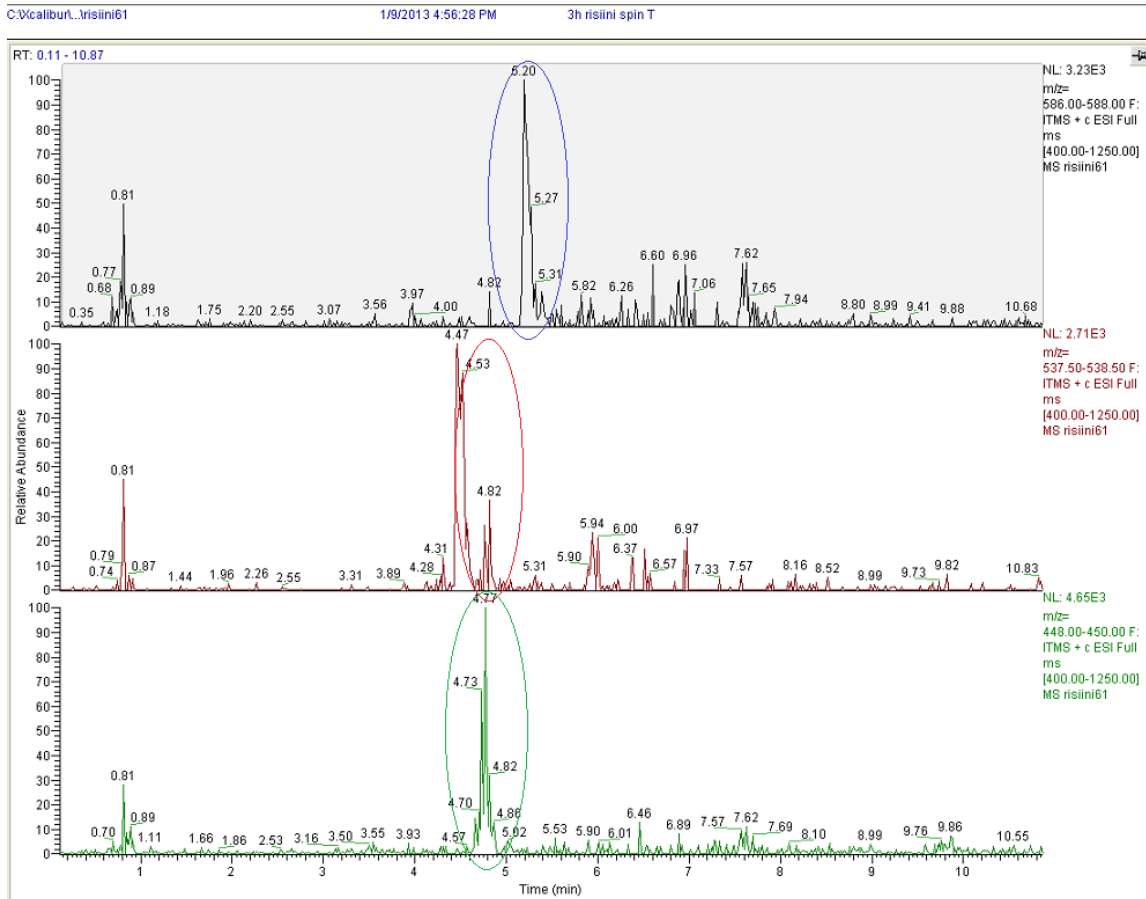
Risiinitoksiinille riittävän trypsinointiajan ja parhaan trypsinointimenetelmän selvittämiseksi, eri menetelmillä trypsinoiduista puhtaan risiinitoksiinin A-ketjun näytteistä etsittiin edellä esitettyjä markkeripeptidejä. Liukoisen trypsiinin sekä Trypsin spin column -menetelmän eroja esittävät LC-MS-tulokset ovat esitetty kuvissa 5.4.4–5.4.9. Kuvaajat esittävät tietylle massa-alueelle rajattua kokonaisonivirtaa (TIC), jossa näkyy haluttujen piikkien intensiteetti ajan funktiona. Kussakin kuvaajassa on käytetty kolmea erilaista tarkempaa massa-alueen rajausta tutkittavien markkeripeptidien mukaan ($m/z = 586.00– 587.50$; $m/z = 537.50– 538.50$; $m/z = 447.50– 448.50$).



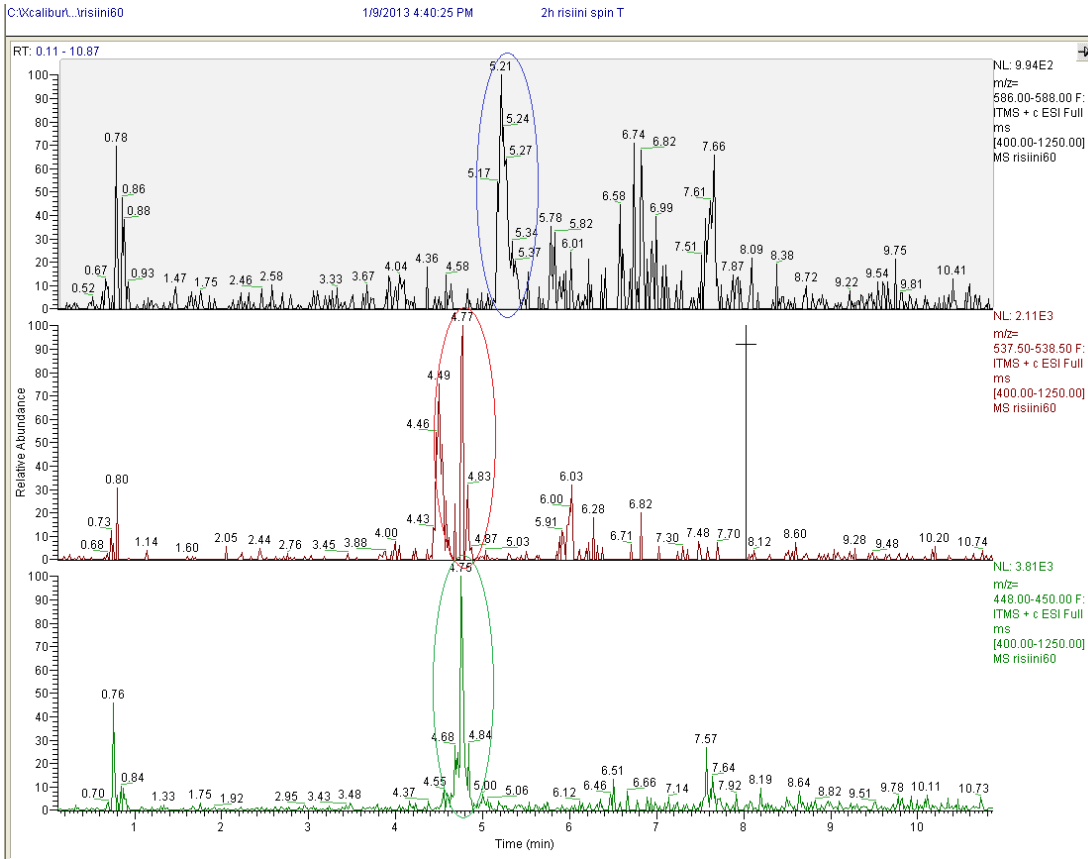
Kuva 5.4.4. Risiinin A-ketjun tryptisten peptidien LC-MS-ionikromatogrammi. Trypsinointi on suoritettu Trypsin spin column -menetelmällä yön yli. Kuvassa näkyy kolmen eri markeripeptidin (sin. $m/z = 586,8^{2+}$, pun. $m/z = 537,8^{2+}$, vihr. $m/z = 448,8^{2+}$) eluutioaika sekä intensiteetti.



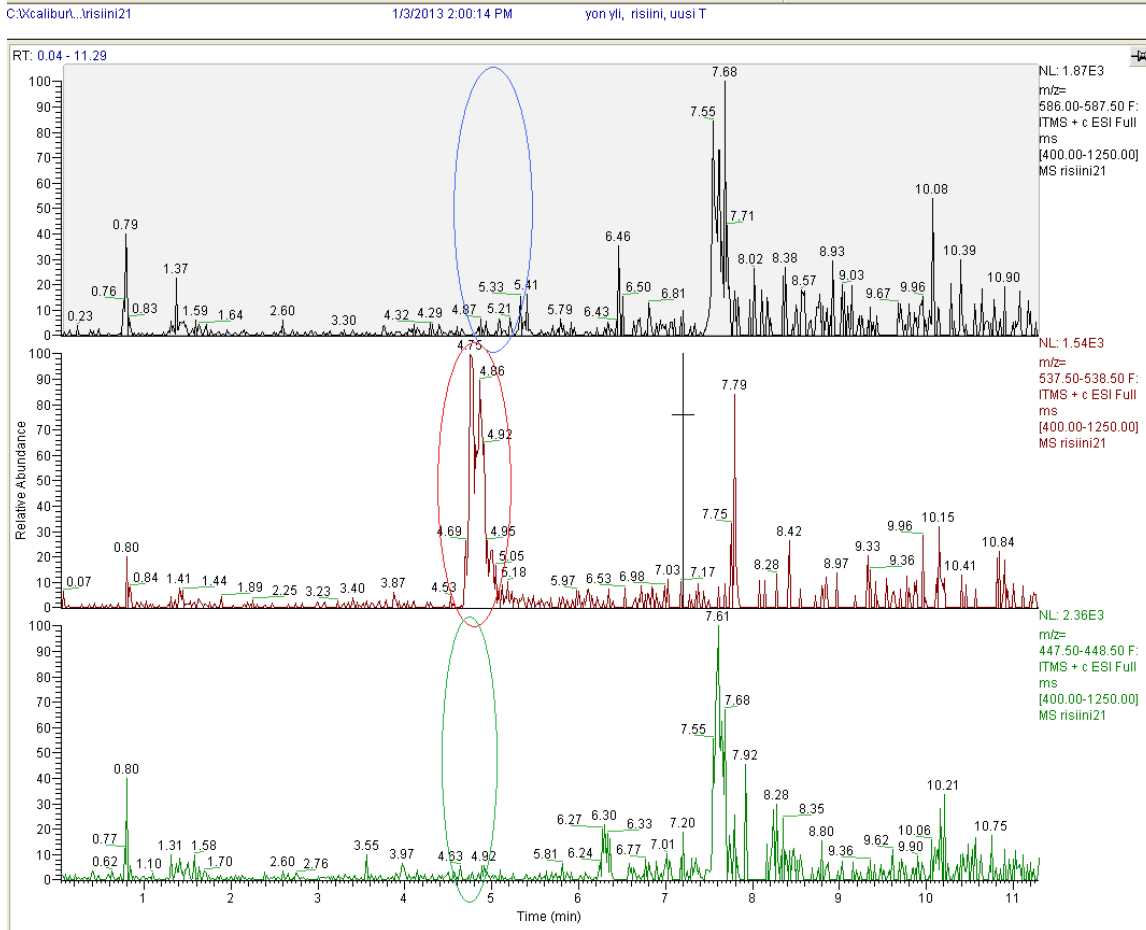
Kuva 5.4.5. Risiinin A-ketjun tryptisten peptidien LC-MS-ionikromatogrammi. Trypsinointi on suoritettu Trypsin spin column -menetelmällä 4h ajan. Kuvassa näkyy kolmen eri markkeripeptidin (sin. $m/z = 586,8^{2+}$, pun. $m/z = 537,8^{2+}$, vihr. $m/z = 448,8^{2+}$) eluutioaika sekä intensiteetti.



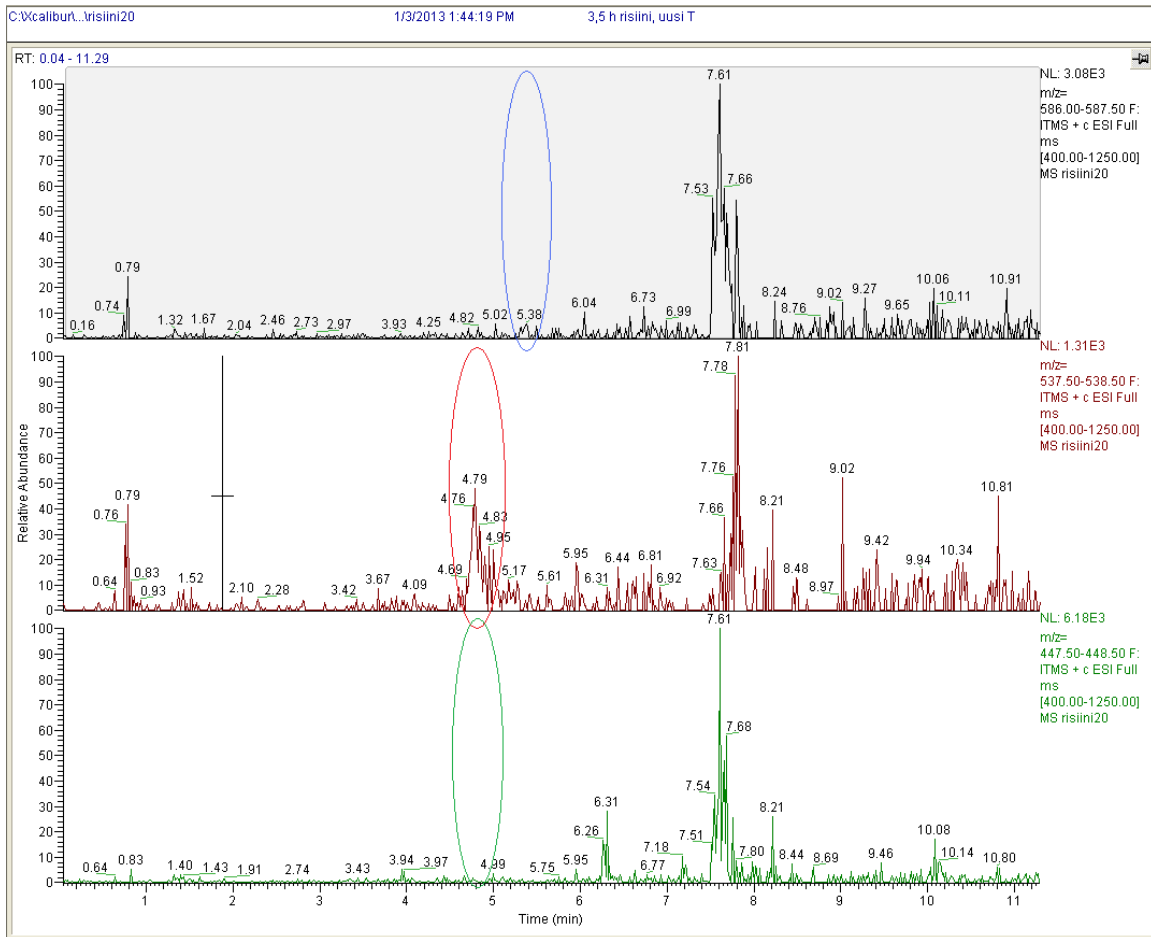
Kuva 5.4.6. Risiinin A-ketjun tryptisten peptidien LC-MS-ionikromatogrammi. Trypsinointi on suoritettu Trypsin spin column -menetelmällä 3h ajan. Kuvassa näkyy kolmen eri markkeripeptidin (sin. $m/z = 586,8^{2+}$, pun. $m/z = 537,8^{2+}$, vihr. $m/z = 448,8^{2+}$) eluutioaika sekä intensiteetti.



Kuva 5.4.7. Risiinin A-ketjun tryptisten peptidien LC-MS-ionikromatogrammi. Trypsinointi on suoritettu Trypsin spin column -menetelmällä 2h ajan. Kuvassa näkyy kolmen eri markeripeptidin (sin. $m/z = 586,8^{2+}$, pun. $m/z = 537,8^{2+}$, vihr. $m/z = 448,8^{2+}$) eluutioaika sekä intensiteetti.



Kuva 5.4.8. Risiinin A-ketjun tryptisten peptidien LC-MS-ionikromatogrammi. Trypsinointi on suoritettu liukoisella trypsiinillä yön yli. Kuvassa näkyy kolmen eri markkeripeptidin (sin. $m/z = 586,8^{2+}$, pun. $m/z = 537,8^{2+}$, vihr. $m/z = 448,8^{2+}$) eluutioaika sekä intensiteetti.



Kuva 5.4.9. Risiinin A-ketjun tryptisten peptidien LC-MS-ionikromatogrammi. Trypsinointi on suoritettu liukoisella trypsiinillä 3,5h ajan. Kuvassa näkyy kolmen eri markkeripeptidin (sin. m/z = 586,8²⁺, pun. m/z = 537,8²⁺, vihr. m/z = 448,8²⁺) eluutioaika sekä intensiteetti.

Kuvassa 5.4.10 on esitetty 4h Trypsin spin column -menetelmällä trypsinoidun risiinin A-ketjun näytteen FT-ICR-massaspektrometritulokset. Ensimmäisenä on esitetty mittauksen sekvenssikattavuus ja risiinin A-ketjun aminohappojärjestykseen on alleviivattu mittaauksessa tunnistetut tryptiset peptidifragmentit, joita oli yhteensä neljä kappaletta. Aminohappojärjestyksestä näkyvät sinisellä myös kohdat, joista trypsiini katkaisee peptidiketjun.

IFPKQYPIINFTTAGATVQSYTNFIRAVRGRLLTTGADVRRHEIPVLPNRVGLPINQRFILV 60
 503.31 1073.60

ELSNHAELSVTLALDVTNAYVVGYRAGNSAYFFHPDNQEDAEAITHLFTDVQNR~~Y~~TFAFG 120

GNYDRLEQLAGNLRNIELGNPLEEAI~~S~~ALYYYYSTGGTQLPTLARSFIICIQMISEAAR 180
 1309.57

FQYIEGEMRTRIRYNRRSAPDPSVITLENSWGRLLSTAIQESNQGAFASPIQLQRRNGSKF 240
 2258.17

SVYDVSILIPIIALMVYRCAPPPSSQF 267

Kuva 5.4.10. FT-ICR-mittauksen sekvenssikattavuus.

Taulukossa 5.4.1 on esitetty FT-ICR-mittausten numeerinen mittausdata, josta käyvät ilmi mm. identifioidut peptidit, muut löydetyt peptidit joita ei kuitenkaan ole pystytty identifioimaan sekä viimeisenä tryptiset peptidit, jotka näytteestä olisi pitänyt löytyä. Kuvassa 5.4.11 on esitetty FT-ICR-mittausten ionikromatogrammi.

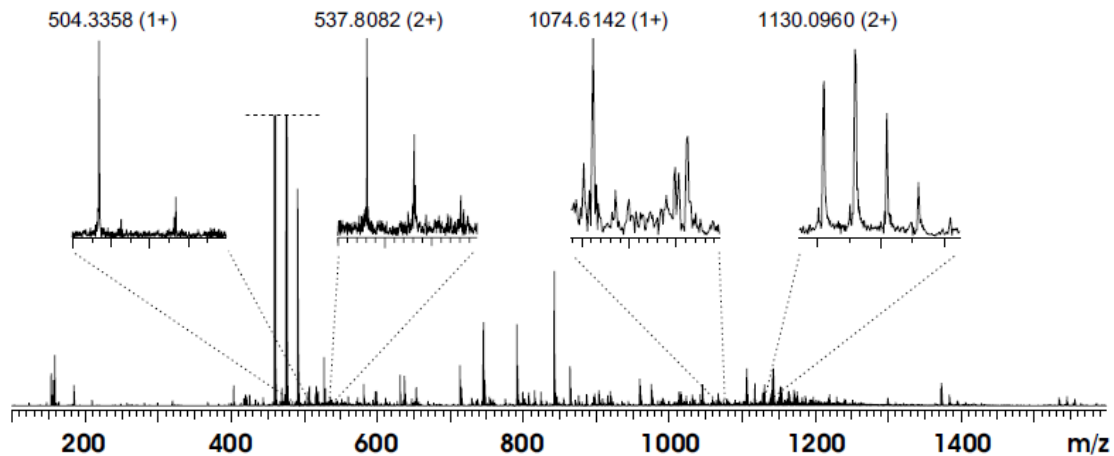
Taulukko 5.4.1. FT-ICR-mittauksen numeerinen data.

```
Residue coverage: 16% [45 of 267]
Peptide hits: 4 Modified: 0 Not identified: 75
Peptides identified without modifications:
input found dev. mc from-to sequence
503.328 / 503.311 -34 0 1- 4 IFPK
1073.602 / 1073.598 -3 0 40- 48 HEIPVLPNR
1309.594 / 1309.573 -16 0 115-125 YTFAFGGNYDR
2258.188 / 2258.166 -10 0 214-234 LSTAIQESNQGAFASPIQLQR
Peptides identified with modifications:
Mass values not identified:
276.15 283.17 299.24 317.25 332.21 337.22 339.23
348.20 353.22 355.22 371.22 380.30 388.24 402.28
404.29 418.27 436.36 452.35 458.34 474.34 490.33
506.33 526.26 559.39 572.33 580.38 630.44 636.45
652.44 712.49 728.49 744.44 774.49 790.51 798.56
806.50 814.56 823.41 841.51 863.49 885.47 902.51
918.51 934.51 943.43 958.58 974.57 990.57 1022.47
1030.64 1041.52 1044.46 1066.44 1174.07 1749.84 1771.82
1787.79 1793.80 1809.78 1815.78 1974.92 1996.90 2210.12
2232.09 2254.07 2280.16 2339.21 2596.21 2743.29 2765.27
2787.23 2809.22 3065.34 3087.35 3109.33
```

Search parameters:
 Peak type: M/Monoiso Precision: 0.005% Multicharge search: No
 Enzyme check: Trypsin exact fit only Modification file: AA.MOD Max: 2
 Input data:

276.1463	283.1673	299.2375	317.2478	332.2087	337.2205	339.2294
348.2038	353.2163	355.2243	371.2202	380.2975	388.2356	402.2795
404.2858	418.2737	436.3594	452.3546	458.3414	474.3353	490.3335
503.3278	506.3279	526.2569	559.3915	572.3256	580.3808	630.4425
636.4453	652.4384	712.4890	728.4864	744.4410	774.4916	790.5058
798.5617	806.4999	814.5556	823.4063	841.5057	863.4852	885.4692
902.5118	918.5114	934.5082	943.4326	958.5794	974.5743	990.5720
1022.4693	1030.6413	1041.5162	1044.4594	1066.4377	1073.6017	1174.0742
1309.5939	1749.8365	1771.8169	1787.7857	1793.8047	1809.7813	1815.7815
1974.9183	1996.8989	2210.1188	2232.0879	2254.0732	2258.1876	2280.1559
2339.2102	2596.2107	2743.2899	2765.2657	2787.2333	2809.2234	3065.3362
3087.3499	3109.3333					

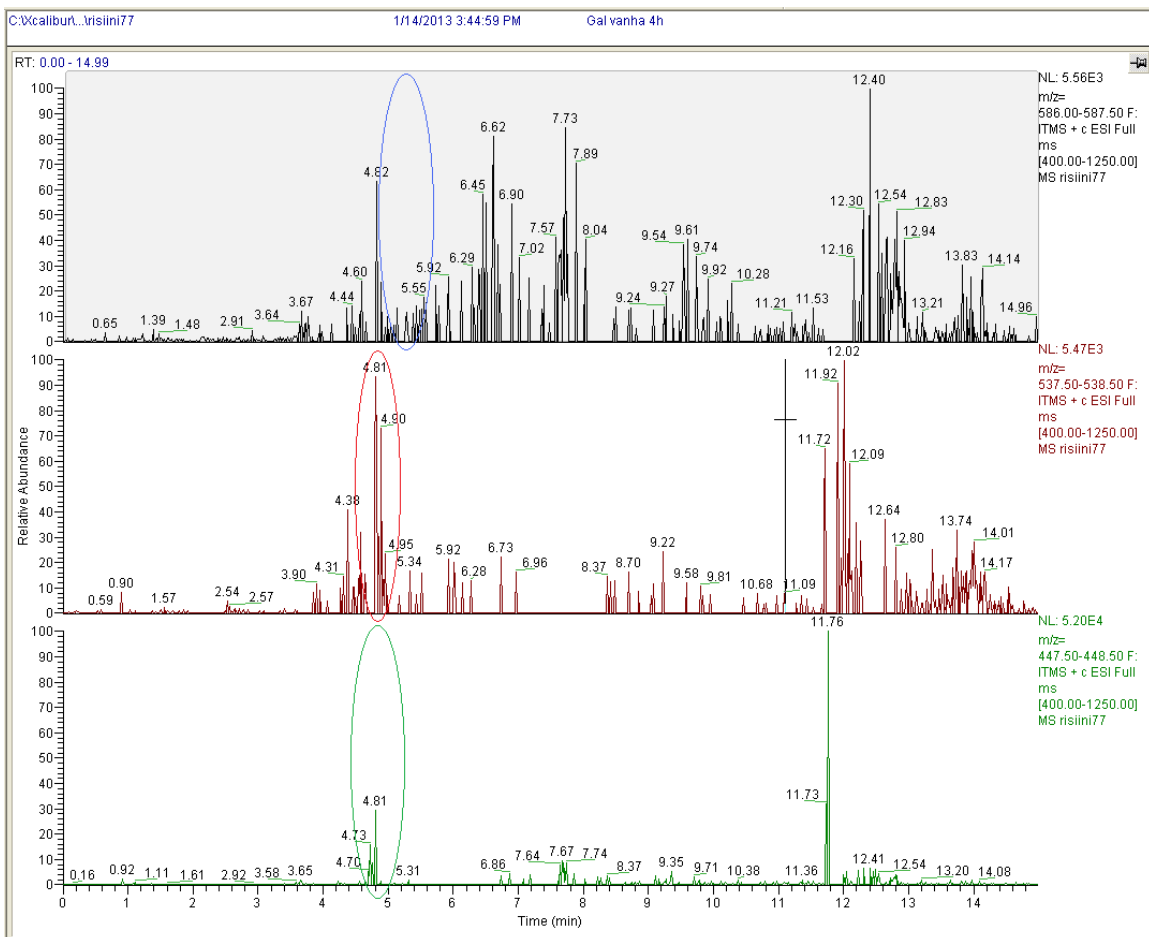
Risiini A-ketju (näyte 3) näyte/ACN/HOAc 100:100:2



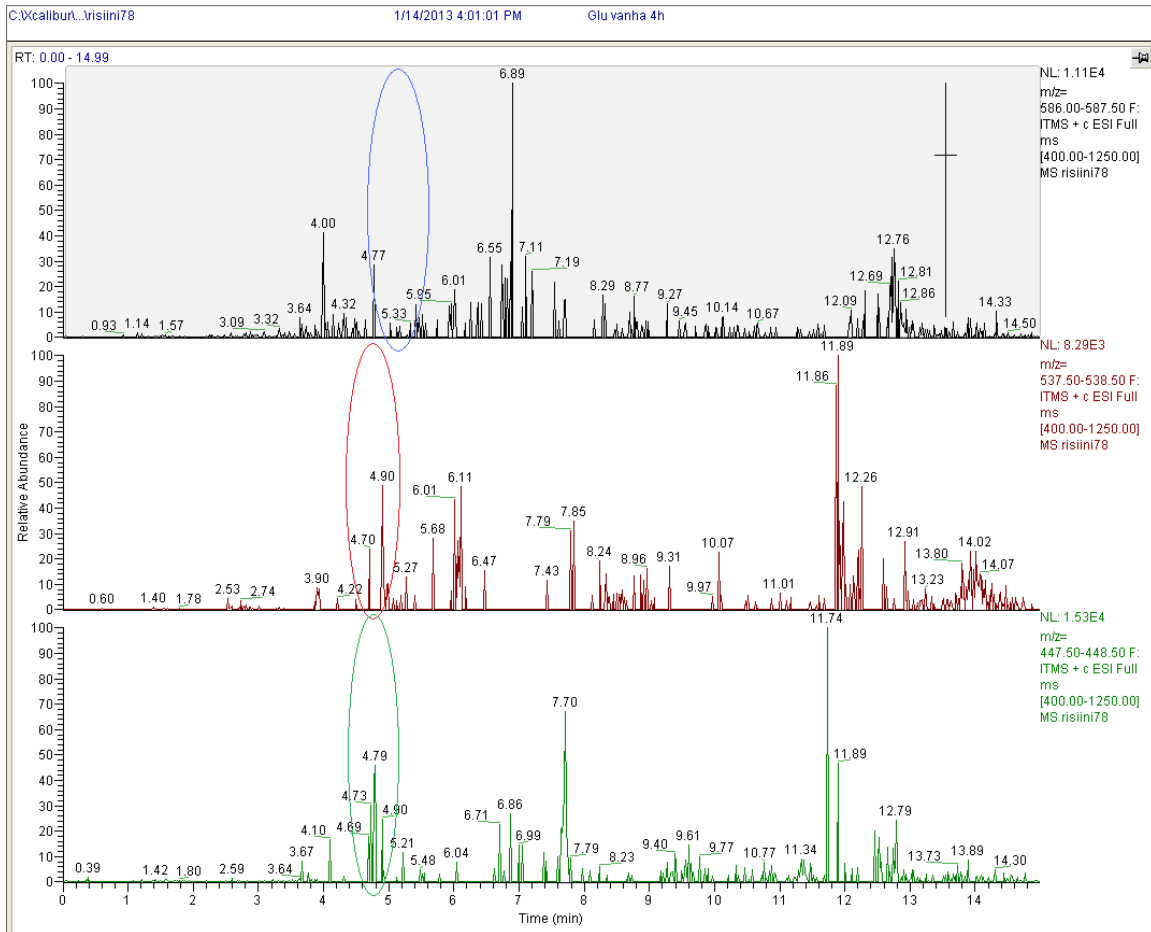
Kuva 5.4.11. FT-ICR-massaspektrometrimittauksen massaspektri. Risiinin A-ketju on trypsiinoitu 4h ajan liukoisella trypsiinillä. Kuvassa suurennukset identifioitujen peptidien piikeistä.

5.5 PUHDISTETUN RISIINITOKSIININ LC-MS-ANALYYSI

Galaktoosi- sekä glukoosiaffiniteetikromatografiapylväällä puhdistettujen risiinitoksiininäytteiden LC-MS-tulokset ovat esitetty kuvissa 5.5.1–5.5.2. Erona aikaisempiin LC-MS-mittauksiin on, että Trypsin spin column -menetelmällä trypsinoidut näytteet sisälsivät alun perin koko risiinitoksiinin pelkän risiinin A-ketjun sijaan. Siitä huolimatta, että näytteestä tulisi löytyä nyt myös risiinin B-ketjulle ominaisia markkeripeptidejä, kuvissa on esitetty ainoastaan aiemmin määritellyt A-ketjun markkeripeptidit.



Kuva 5.5.1. Galaktoosiaffiniteetikromatografiapylväällä puhdistetun risiinin tryptisten peptidien LC-MS ionikromatogrammi. Trypsinointi on suoritettu Trypsin spin column -menetelmällä 4h ajan. Kuvassa näkyy kolmen eri markkeripeptidin (sin. $m/z = 586,8^{2+}$, pun $m/z = 537,8^{2+}$, vihr. $m/z = 448,8^{2+}$) eluutioaika sekä intensiteetti.



Kuva 5.5.2. Glukoosiaffiniteetikromatografiapylväällä puhdistetun risiinin tryptisten peptidien LC-MS-ionikromatogrammi. Trypsinointi on suoritettu Trypsin spin column -menetelmällä 4h ajan. Kuvassa näkyy kolmen eri markeripeptidin (sin. $m/z = 586,8^{2+}$, pun. $m/z = 537,8^{2+}$, vihr. $m/z = 448,8^{2+}$) eluutioaika sekä intensiteetti.

6. TULOSTEN TARKASTELU

6.1 AFFINITEETTIKROMATOGRAFIAMENETELMIEN VERTAILU

Kuvan 5.1.1 perusteella, affiniteettikromatografialla puhdistetut risiinitoksiininäytteet sisältävät hyvin suurella todennäköisyydellä risiinitoksiinin lisäksi myös *Ricinus agglutinin*-proteiinia. Agglutiniini on lektiiniominaisuuksiltaan ja rakenteeltaan hyvin risiinitoksiinin kaltainen ja tämän vuoksi sen luotettava erottaminen risiinitoksiinista affiniteettikromatografian avulla on haasteellista. Kuvassa 5.1.1 puhdistettujen risiinitoksiininäytteiden kohdalla näkyy useiden eri proteiinvyöhykkeiden muodostama patteristo, eivätkä pelkästään pelkistetyille risiinille ominaiset vyöhykkeet. Risiinitoksiinin pelkistyessä disulfididisidos risiinin A- ja B-ketjun välillä katkeaa ja ketjut irtoavat toisistaan. Toisistaan erkaantuneet peptidiketjut kulkeutuvat SDS-PAGE-geelissä itsenäisesti ja erottuvat molekyylipainonsa mukaisesti. Agglutiniini puolestaan hajoaa pelkistyessään neljäksi polypeptidiketjuksi, jotka ovat molekyylipainoiltaan lähellä risiinin A- ja B-ketjujen painoa (30–35 kDa). Puhdistettujen risiinitoksiininäytteiden ylimääräiset proteiinvyöhykkeet kuvassa 5.1.1 selittyvät todennäköisesti agglutiniinin läsnäololla.

Näytteiden Gal1 ja Gal2 kohdalla geelissä on näkyvissä ainakin kolme proteiinvyöhykettä. Ne eivät ole kuitenkaan kovin tarkkarajaisia, koska vyöhykkeet saattavat sisältää päällekkäin joitain saman molekyylipainon omaavia peptidiketjuja. Pisimmälle ajautunut proteiinvyöhyke kuvaa todennäköisesti risiinin A-ketjua, jonka molekyylipaino on noin 32 kDa. Samalle kohdalle ajautuu myös agglutiniinin kevyin polypeptidiketju. Lyhyimmän matkan ajautunut proteiinvyöhyke kuvaa risiinitoksiinin raskaampaa B-ketjua, joka on molekyylipainoltaan noin 34 kDa. Näiden kahden proteiinvyöhykkeen väliin jää agglutiniinille ominainen kolmas vyöhyke.

Sekä risiinin, että agglutiniinin pelkistyessä syntyneiden polypeptidien tarkan molekyylipainon määrittäminen työn tulosten perusteella oli kuitenkin vaikeaa. Tämän lisäksi näytteet voivat sisältää risiinitoksiinin eri glykosylaatiomuotoja, mikä voi olla

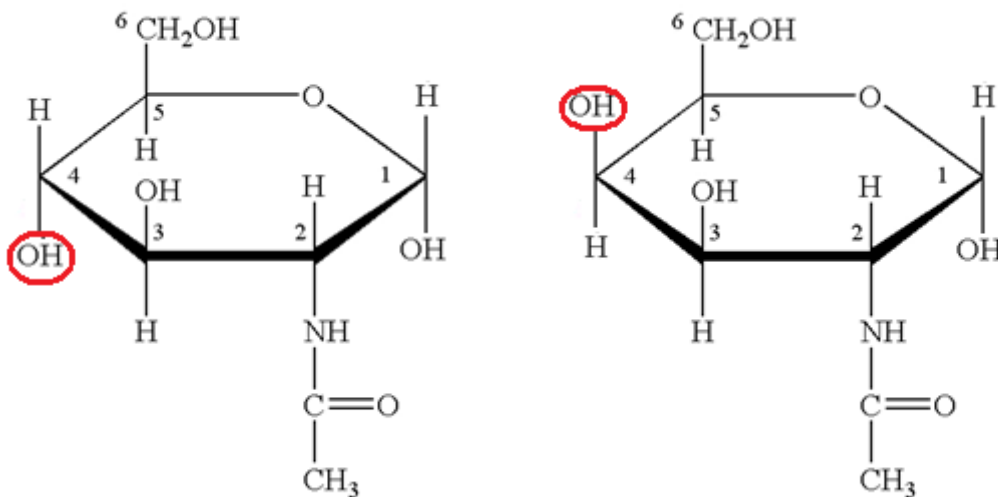
myös syynä siihen, miksi proteiinibändit eivät ole kovin tarkkarajaisia. Siemenet, joita on käytetty risiinijauheen valmistamiseen, olivat peräisin eri risiinikasvilajikkeista ja voivat siis sisältää luonnostaan risiinitoksiinin eri muotoja. Työssä käytettyjen menetelmien perusteella, näytteistä löytyvien eri toksiinimuotojen tarkempi tunnistaminen ei kuitenkaan ole mahdollista.

Kuvassa 5.1.3 eri affiniteettikromatografiamenetelmillä puhdistettuja risiinitoksiininäytteitä on vertailtu käyttämällä natiiveja, eli ei pelkistettyjä, risiininäytteitä. Natiivien proteiininäytteiden kohdalla risiinitoksiinin A- ja B-ketjut yhdistävä disulfidisidos on ehjä ja pitää peptidiketjut yhdessä, jolloin ne ajautuvat SDS-PAGE-geelissä yhtenä rintamana. Natiiveista SDS-PAGE-näytteissä näkyy kuitenkin yksi selkeämpi proteiinivyöhyke 65 kDa:n kohdalla sekä toinen molekyylipainoltaan hieman pienempi ja rajoiltaan häilyvämpi vyöhyke. Tämä voi puolestaan viitata siihen, että näytteissä on todennäköisesti läsnä useampaa risiinitoksiinin eri glykosylaatiomuotoa. Tämän vuoksi puhtaiden natiivien toksiininäytteiden kohdalla geelissä näkyy ylimääräinen, ei-selvärajainen vyöhyke yhden selvän vyöhykkeen sijaan. Kaksi erillistä proteiinivyöhykettä näkyvät selkeämmin kuvassa 5.2.1, jossa on kuvattu risiinitoksiinin puhdistumista maitonäytteistä.

Risiinijauheen valmistuksessa asetoniuutto saostaa siementen sisältämän proteiinin, jolloin muodostuu jauhetta, joka sisältää 1–5 % risiinitoksiinia. Risiinitoksiini puhdistuu affiniteettikromatografian yhteydessä risiinijauheen sisältämistä muista proteiineista ja sitoutuu molempiin käytettyihin sokeriaffiniteettikromatografiapylväisiin. Verratessa kuvan 5.1.1 puhdistamattomia (Gal, Glu) sekä puhdistettuja risiininäytteitä (Gal1, Gal2, Glu1, Glu2) huomataan ylimääräisten proteiinivyöhykkeiden poistuvan pesujen aikana ja jättäen ainoastaan risiinitoksiinille ominaiset vyöhykkeet näkyviin puhdistettujen näytteiden kohdalla molekyylipainoalueelle 32–34 kDa. Kuten aikaisemmin todettiin, agglutiniini ei sokeriaffiniteettikromatografian aikana kuitenkaan todennäköisesti poistu näytteistä, mihin viittaa agglutiniinille ominainen ylimääräinen proteiinivyöhyke risiinin A- ja B-ketjun välissä puhdistettujen toksiininäytteiden kohdalla. Osa risiinitoksiinista jää tämän lisäksi sitoutumatta kromatografiapylväeseen ja poistuu pesujen aikana. Tämä käy

ilmi kuvan 5.1.2 pesuluoksista otettujen näytteiden kohdalla (GalP1, GalP2, GalP3), joissa näkyy heikosti muun poistuvan ylimääräisen materiaalin lisäksi myös risiinitoksiinille ominaisia proteiinivyöhykkeitä.

Kuvan 5.1.1 mukaan risiinitoksiini sitoutuu sekä galaktoosi- että glukoosiaffiniteetikromatografiapylväisiin. Risiinitoksiinin B-ketju on rakenteeltaan galaktoosilektiini, joka sitoutuu solun pinnalle β -1,4-sidoksella kiinnittyneisiin galaktoositähteisiin tai terminaaliseen N-asetyyligalaktosamiiniin. (Sandvig ja Deurs, 2000). Kirjallisuuden mukaan risiinin B-ketju voi mahdollisesti sitoutua myös N-asetyyliglukoosiamiinitähteitä sisältäviin pintarakenteisiin, joita työssä käytetty glukoosiaffiniteetikromatografiatriisi jäljittelee (Worbs ym. 2011). Glukosamiini sekä galaktosamiini eroavat rakenteeltaan ainoastaan hiileen numero 4 kiinnittyneen OH-ryhmän aseman osalta kuten käy ilmi kuvasta 6.1.1. Tämä pieni rakenteellinen ero suosii risiinitoksiinin B-ketjun sitoutumista N-asetyyligalaktosamiiniin tehokkaammin kuin N-asetyyliglukosamiiniin.



Kuva 6.1.1. Vasemmalla glukosamiinin ja oikealla galaktosamiinin rakenne.

Risiinitoksiini sitoutuu työn tulosten perusteella tehokkaammin galaktoosimatriisiin, jolloin galaktoosiaffiniteetikromatografiapylväällä suoritettu risiinitoksiinin

puhdistaminen takaa suuremman saannon. Tämä siitäkkin huolimatta, että affiniteetikromatografiamatriisin valmistaja arvioi glukoosimatriisilla olevan jopa 4–8 kertaa parempi sitomiskapasiteetti kuin käytetyllä galaktoosimatriisilla. Valmistajan arvio matriisien sitomiskapasiteetista perustuu matriisin sisältämien vapaiden tähteiden määrään. Ero sitoutumisen tehokkuudessa eri kromatografiamatriisien välillä käy ilmi kun vertaillaan kuvan 5.1.1 galaktoosi- ja glukoosipylväillä puhdistettujen näytteiden SDS-PAGE-geelissä 32–34 kDa:n alueella näkyvien bändien (Gal1, Gal2, Glu1 ja Glu2) intensiteettiero. Molempien puhdistusmenetelmien alussa risiinitoksiinia on ollut saman verran suhteessa käytetyn kromatografiamatriisin tilavuuteen ja toksiinin puhdistaminen on suoritettu samalla tavalla molempien kromatografiamatriisien kohdalla.

Vaikka eri affiniteetikromatografiapylväiden risiinitoksiinin sitomiskapasiteettiero käy ilmi jo SDS-PAGE-geelikuvasta, arvioitiin sitä työssä myös ENVI Assay system gold, ricin toxin test -liuskatestien avulla. Kuvista 5.1.5 sekä 5.1.6 käy selkeästi ilmi, että risiinitoksiinin pitoisuus galaktoosimatriisilla puhdistetussa näytteessä on huomattavasti suurempi kuin glukoosimatriisilla puhdistetussa näytteessä. Liuskatesti antoi positiivisen tuloksen vielä kun alkuperäinen puhdistettu näyte oli laimennettu 16-kertaisesti. Galaktoosimatriisilla puhdistettu näyte puolestaan antoi enää hyvin heikon positiivisen tuloksen 4-kertaisen laimennoksen kohdalla. Liuskatestien antamaa tulosta voidaan tässä työssä pitää hyvin luotettavana, sillä tunnistus perustuu risiinivasta-aineiden toimintaan ja testi pystyy tunnistamaan risiinitoksiinin aina 5 ng/ml pitoisuuteen asti.

Immunoaffiniteetikromatografiamatriisin avulla risiinitoksiinin puhdistaminen onnistui myös, mutta sen toksiinin sitomiskapasiteetti oli huomattavasti sokeriaffiniteettimatriiseja alhaisempi kuten käy ilmi kuvista 5.1.3 ja 5.1.4. Kuvassa 5.1.3 galaktoosimatriisilla puhdistetun risiinitoksiinin proteiinivyöhykkeet (Gal) näkyvät selkeästi 65 kDa:n kohdalla, glukoosimatriisinäytteen (Glu) kohdalla niiden ollessa jo selkeästi haaleammat. Immunoaffiniteettimatriisilla puhdistetun risiinitoksiininäytteen (Imm) kohdalla proteiinivyöhykkeet ovat enää hyvin heikosti havaittavissa, mikä kertoo matriisin alhaisesta sitomiskapasiteetista. Risiinitoksiinin läsnäolo myös Imm-näytteessä pystyttiin todistamaan paremmin kuvan 5.1.4 avulla, jossa risiiniä sisältävät proteiinivyöhykkeet

ovat värjätty risiivivasta-aineiden avulla Western blot -menetelmällä. Immunoaffiniteettimatriisin heikosta sitomiskapasiteetista kertoo myös kuva 5.1.7, jossa risiinitoksiini-liuskatestin viimeinen positiivinen tulos saadaan jo kaksinkertaisesti laimennetun puhtaan toksiininäytteen kohdalla.

Jotta immunoaffiniteetikromatografia- sekä sokeriaffiniteetikromatografiamatriiseja sekä niiden risiinitoksiinin sitomiskapasiteetteja voidaan jossain määrin verrata, lisättiin puhdistettavaa risiinjauheliuosta pylvääseen samassa suhteessa kromatografiamatriisin tilavuuteen verrattuna. Immunoaffiniteettimatriisin sitomiskapasiteettia on kuitenkin etukäteen vaikea määrittää, sillä käytettävissä oli vain hyvin vähän tietoa käytetyn risiini vasta-aineen ominaisuuksista. On mahdollista, että käytetty vasta-aine ei sitoudu kaikkiin näytteessä oleviin risiinitoksiinin glykosylaatiomuotoihin, mikä osaltaan voi vähentää puhdistuneen risiinitoksiinin määrää. Toisaalta kuva 5.2.3 antaa viitteitä siitä, että Western blotissa käytetty vasta-aineyhdistelmä sitoutuu kaikkiin näytteistä löytyviin toksiinimuotoihin, sillä puhdistettujen maitonäytteiden kohdalla erottuu kaksi proteiinivyöhykettä 65 kDa:n kohdalla, jotka poikkeavat vain hieman molekyylipainoiltaan. Kuvassa näkyy kuitenkin myös jonkin verran vasta-aineen epäspesifistä värjäytymistä etenkin puhdistamattoman risiinjauhenäytteen kohdalla, minkä vuoksi risiinitoksiinin todellisten proteiinivyöhykkeiden sijainnin sekä intensiteetin määrittäminen on hankalampaa.

Työn tulosten perusteella käytetyllä galaktoosiaffiniteetikromatografiamatriisilla oli selvästi paras risiinitoksiinin sitomiskapasiteetti ja immunoaffiniteetikromatografiamatriisilla huonoin. Glukoosimatriisin ja immunoaffiniteettimatriisin välisessä sitomiskapasiteetissa ei ollut suurta eroa, mutta galaktoosimatriisi satoi risiiniä huomattavasti enemmän.

Työn tulosten perusteella risiiniagglutiniini sitoutui pelkästään galaktoosiaffiniteettimatriisiin, mikä käy ilmi kuvasta 5.1.4. Koska risiinitoksiini ja risiiniagglutiniini ovat rakenteeltaan hyvin samanlaisia, käytetty risiivivasta-aine sitoutuu hyvin suurella todennäköisyydellä myös agglutiniiniin, joka kuitenkin eroaa risiinistä

natiivissa SDS-PAGE-geelissä huomattavasti suuremman molekyylipainonsa ansiosta. Agglutiniini erottuu kuvassa 5.1.4 puhdistamattoman (R) sekä galaktoosiaffiniteettikromatografialla puhdistetun toksiininäytteen (Gal) kohdalla selkeänä proteiinivyöhykkeenä molekyylipainon 120 kDa alueella. Vastaavaa vyöhykettä ei kuitenkaan ole erotettavissa glukoosiaffiniteettikromatografialla puhdistetun näytteen (Glu) kohdalla. Johtopäätöksenä työssä saaduista tuloksista voidaan sanoa, että glukoosiaffiniteettikromatografiamatriisia käyttämällä agglutiniini voidaan erottaa risiinitoksiinista yhden puhdistusvaiheen aikana, mutta sen sitomiskapasiteetti on huomattavasti galaktoosimatriisia alhaisempi.

6.2 MAITO- JA PYYHKÄISYNÄYTTEET

Työssä käytetyillä menetelmillä M3-maitonäyte oli laimein risiinitoksiinia sisältävä maito-risiininäyte, josta toksiini pystyttiin vielä havaitsemaan SDS-PAGE- ja Western blot -menetelmien avulla. M3-maitonäytteen risiinipitoisuus on noin 5 µg/ml, mikä on myös työssä saavutettu risiinitoksiinin detektion raja maitonäytteestä. Kuvassa 5.2.1 risiinitoksiinia vastaavat proteiinivyöhykkeet ovat selkeästi havaittavissa kolmessa vahvimmassa maito-risiininäytteessä (M1, M2 ja M3), kun kolmen laimeamman näytteen (M4, M5 ja M6) kohdalla mitään proteiinivyöhykettä ei enää havaita. SDS-PAGE:lla saadut tulokset ovat yhteneväiset Western blotin tulosten kanssa (kuva 5.2.3), sillä sielläkin vyöhykkeet ovat havaittavissa vain kolmen vahvimman näytteen kohdalla. Myöskään risiini-liuskatesteillä toksiinia ei pystytty luotettavasti tunnistamaan enää laimeammista näytteistä. Kuvasta 5.2.3 näkyy, että liuskatesti antaa viimeisen positiivisen tuloksen M3-maitonäytteen kohdalla.

Risiinitoksiini pystyttiin Western blot -menetelmän avulla tunnistamaan myös galaktoosiaffiniteettikromatografiamatriisilla puhdistetuista pyyhkäisynäytteistä. Kolmen rinnakkaisen puhdistetun pyyhkäisynäytteen välillä on pieni intensiteettiero (kuva 5.3.1), koska näytteenottoaiheeseen on voinut tarttua eri määrä risiinijauhetta. Koska

pyyhintänäytteiden puhdistamisessa käytettiin galaktoosimatriisia, risiinitoksiinia ei pystytty erottamaan agglutiniinista. Agglutiniinille ominainen proteiinivyöhyke näkyikin pyyhintänäytteiden kohdalla Western blot -kuvassa 5.3.1 erittäin haaleana membraanin yläreunassa 120 kDa:n kohdalla.

6.3 TRYPSINOINTI JA LC-MS-ANALYYSI

Risiinitoksiinin digestoitumista peptideiksi kahdella eri trypsinointimenetelmällä vertailtaessa tutkittiin näytteistä eri digestioaikoina löytyvien kolmen eri risiinin A-ketjulle ominaisen markkeripeptidin löytymistä LC-MS-menetelmällä. Kun markkeripeptidit ovat valittu luotettavasti, niiden löytyminen näytteestä antaa vahvan näytön risiinitoksiinin läsnäolosta. Tällöin proteiinin koko peptidiketjun tunnistamista ei välttämättä tarvitse suorittaa, kun tarkoituksena on ainoastaan vertailla trypsinisointimenetelmien tehokkuutta. Vasta kun risiinitoksiini halutaan lopullisesti ja luotettavasti identifioida näytteestä esimerkiksi FT-ICM-massaspektrometrillä, tulee riittävä määrä koko proteiinin pilkkoutumisesta muodostuvia peptidejä löytyä.

LC-MS-tulosten arvioinnissa otettiin huomioon kuinka selkeästi etsittyjä markkeripeptidejä vastaavat piikit esiintyivät ionikromatogrammissa ja ovatko niiden intensiteetit riittävät verrattuna taustasignaaliin. Markkeripiikin intensiteetin katsottiin olevan riittävä, kun se oli n. 2/3 korkeampi kuin sen läheisyydessä esiintyvät taustasignaalin aiheuttamat piikit. Lisäksi markkeripeptidien retentioajan tuli pysyä samana. Markkeripeptidi $m/z = 586,8^{2+}$ irtosi kromatografiapylvästä aina n. 5,3 min kohdalla, $m/z = 537,8^{2+}$ ja $m/z = 448,8^{2+}$ puolestaan molemmat 4,7 min kuluttua mittauksen aloittamisesta. Risiinitoksiinin identifiointia sekä sen riittävää pilkkoutumista voidaan pitää hyvänä, kun kaikki kolme markkeripeptidiä löytyvät näytteestä riittävällä intensiteetillä. Täysin aukottoman identifioinnin suorittamiseksi näytteestä tulisi löytyä myös loput risiinitoksiinille ominaiset tryptiset peptidit, mutta tässä työssä ei pyritty muiden peptidien ensisijaiseen tunnistamiseen.

4h:n inkubaatioaika on työn tulosten perusteella riittävä risiinitoksiinin digestoinnille Trypsin spin column -menetelmällä. LC-MS-mittauksessa näytteestä pystyttiin identifioimaan kaikki kolme risiinitoksiinin A-ketjun markkeripeptidiä. Kuvassa 5.4.5 markkeripeptidejä vastaavat piikit erottuvat selkeästi ja niiden intensiteetti on voimakas verrattuna taustasignaaliin. Kun inkubaatioaikaa pidennettiin kestäämään yön yli, pienenee taustasignaalin osuus LC-MS-mittaustuloksissa vielä jonkin verran ja markkeripeptidejä kuvantavat piikit tulevat tarkemmiksi. Suurta merkitystä risiinitoksiinin tunnistamisen kannalta trypsinointiajan pidentämisellä 4 tunnista yön yli ei kuitenkaan ole. Liukoisen trypsiinin kohdalla markkeripeptidejä vastaavia piikkejä ei löytynyt edes yön yli digestoidusta näytteestä.

Digestioajan lyhentyessä risiinitoksiinin A-ketjulle ominaisten markkeripeptidien tunnistaminen näytteestä käy vaikeammaksi. Inkubaatioajan ollessa 3h, markkeripeptidit $m/z = 586,8^{2+}$ ja $m/z = 448,8^{2+}$ erottuvat selkeästi kuvasta 5.4.6 ja niitä vastaavien piikkien intensiteetit ovat voimakkaita. Markkeripeptidin $m/z = 537,8^{2+}$ piikin intensiteetti on kuitenkin jostain syystä huomattavasti oletettua alhaisempi, minkä vuoksi 3h inkubaatioaikaa ei voida työn tulosten perusteella pitää riittävänä risiinin luotettavalle tunnistamiselle. Trypsinointiajan ollessa 2h (kuva 5.4.7), taustasignaalin voimakkuus lisääntyy huomattavasti eivätkä markkeripeptidien piikit enää ole yhtä selkeitä kuin pidemmillä inkubaatioajoilla. Vaikka markkerispesifit piikit erottuvat edelleen hyvin, ovat niiden intensiteetit huomattavasti alhaisempia. Piikkien korkeus suhteessa taustan aiheuttamien piikkien korkeuteen ei ole yhtä suuri kuin pidemmillä digestioajoilla, minkä vuoksi mittaustulosta ei voida pitää kovin luotettavana. Työn tulosten mukaan, 2 h tai sitä lyhyempää digestioaikaa Trypsin spin column -menetelmällä ei voida pitää riittävänä risiinitoksiinin trypsinoinnissa, jotta toksiini voitaisiin luotettavasti tunnistaa näytteestä LC-MS-menetelmällä. Valmistajan mukaan useimmille proteiineille 15 minuutin digestioaika Trypsin spin column -menetelmällä on riittävä, mutta risiinitoksiinin kohdalla menetelmä vaatii selvästi pidemmän vaikutusajan.

Edellä esitettyjen tulosten pohjalta, affiniteetikromatografialla puhdistettujen risiinitoksiininäytteiden digestointi suoritettiin Trypsin spin column -menetelmällä ja digestioajaksi valittiin 4h. Trypsinoinnin jälkeen näytteistä oli tarkoitus tunnistaa kolme aiemmin tutkittua A-ketjun markkeripeptidiä LC-MS-menetelmällä sekä joitain risiinin B-ketjulle ominaisia markkereita. Galaktoosi- sekä glukoosi-affiniteetikromatografiapylväillä puhdistettujen risiinitoksiininäytteiden LC-MS-mittaustulosten (kuva 5.5.1 ja 5.5.2) perusteella, mitään kolmesta risiinin A-ketjun markkeripeptidistä ei pystytty identifioimaan. Joitain satunnaisia piikkejä näkyy molempien näytteiden mittaustuloksissa etsittyjen markkeripeptidi-ionien kohdalla, mutta mahdollisen signaalin intensiteetti on joka tapauksessa niin alhainen verrattuna taustasignaaliin, ettei luotettavaa identifiointia toksiinin osalta voida tehdä. Myöskään risiinin B-ketjulle ominaisia markkereita ei pystytty työn aikana määrittämään. Syy MS-mittauksen epäonnistumiseen on todennäköisesti kokonaisen risiinitoksiinin riittämätön digestoituminen.

Koska käytössämme olleen LC-MS -laitteiston herkkyys oli kohtalaisen alhainen, on mahdollista, että osa näytteen sisältävistä tryptisistä peptideistä on jäänyt mittauksessa huomaamatta. Tämän vuoksi yksi trypsinointinäytteistä analysoitiin FT-ICR-massaspektrometrillä, sillä saavutettavan suuremman herkkyyden vuoksi. Lisämittaus tuki aiempia LC-MS-mittausten tuloksia siltä osin, että vain muutamia risiinille tyypillisiä tryptisiä peptidejä löytyi näytteestä, jossa risiinin A-ketju oli digestoitu 4h ajan liukoisella tysiinillä. Vain neljä risiinille ominaista tryptistä peptidiä pystyttiin luotettavasti tunnistamaan ja 75 näytteestä löytyvää peptidiä jäi tunnistamatta, jolloin sekvenssikattavuus oli vain 16 %. Tämä ei riitä risiinitoksiinin luotettavaan identifioimiseen, sillä sekvenssikattavuuden tulisi olla yli 80 %.

TF-ICR-mittauksessa tunnistettiin työssä etsityistä markkereista ainoastaan 537,8²⁺-markkeripeptidi, jonka aminohappojärjestys on HEIPVLNQR. Tämän lisäksi löytyi yhdesti varautunut risiinin A-ketjulle ominainen 504,4⁺-markkeri (IFPK), kahdesti varautunut 1130,1²⁺-markkeri (LSTAIQENSQGAFASPIQLQR), sekä 655,8²⁺-markkeri (YTFAFGGNYDR). Vaikka vain yksi työssä alun perin etsitty markkeripeptidi pystyttiin

FT-ICR-mittauksen avulla identifioimaan, tarjosivat tulokset muuta hyödyllistä informaatiota. Koska risiinitoksiinin sekä *Ricinus agglutinin*-proteiinin A-ketjut ovat lähes 94 % samankaltaiset aminohappojärjestykseltään, tulee näytteestä löytyä myös nämä kaksi proteiinia toisistaan erottavia markkereja, jotta risiinitoksiini voitaisiin luotettavasti tunnistaa. Markkerit 504,4⁺, 655,8²⁺, 1130,1²⁺ ovat ainoastaan risiinitoksiinin A-ketjulle ominaiset ja niiden avulla risiini voidaan erottaa agglutiniinista.

Vaikka risiinitoksiinia ei näiden mittaustulosten ansiosta voitu vielä kokonaan tunnistaa, löytyi sen läsnäolosta vahvoja viitteitä ja se poissulki mahdollisuuden, että näyte sisältäisi pelkkää agglutiniinia. Toisaalta työssä käytetyt risiinitoksiinin markkeripeptidit olisi voinut valita niin, että kaikki etsityt markkerit olisivat olleet ainoastaan risiinille ominaisia. Nyt vain 537,8²⁺ -markkeria voidaan käyttää erottamaan risiini ja agglutiniini toisistaan. Kaksi muuta etsittyä peptidiä löytyvät myös agglutiniinin rakenteesta. Kuitenkin, jos tutkittava näyte on alun perin ”terroristiohjeen” mukaisesti risiiniinisiemenistä valmistettua jauhetta, voidaan myös näytteestä löytyvää *Ricinus agglutiniinia* pitää eräänlaisena viitteenä risiinitoksiinin läsnäolosta tai ainakin risiiniikasvin siementen käytöstä, sillä *Ricinus agglutinin*-proteiinia ei löydy muista kuin risiiniikasveista. Tämä voi olla riittävä tunnistustarkkuus silloin, kun halutaan kehittää menetelmä risiinitoksiinin nopeaan ilmaisuun.

Proteiinin onnistunut digestio on edellytys tryptisten peptidien mittaamiseen perustuvan MS-analyysin onnistumiselle. Jos digestio ei ole tapahtunut loppuun, näytteestä ei löydy kaikkia risiinitoksiinille ominaisia peptidejä ja myös osa markkeripeptideistä voi puuttua. TF-ICR-mittaustulosten mukaan näyte kuitenkin sisälsi muita tunnistamattomia peptidejä aina 3 kDa saakka, mikä todennäköisesti kertoo trypsinoinnin epäonnistumisesta tai näytteestä löytyvistä epäpuhtauksista. Digestion epäonnistuminen voi johtua riittämättömästä trypsinointiajasta, vääristä trypsinointiolosuhteista tai toksiinin riittämättömästä esikäsitteystä ennen digestiota. Todennäköistä on, että trypsiini ei ole pilkkonut proteiinin polypeptidiketjua jokaisesta mahdollisesta trypsiinille spesifisestä kohdasta, vaan näytteeseen on jäänyt useita liian pitkiä peptidipätkiä, joita ei pystytty tunnistamaan risiinille ominaisiksi peptideiksi. Trypsinointiajan ollessa liian pitkä,

entsyymi voi puolestaan alkaa pilkkoa polypeptidiketjua epäspesifisistä kohdista, jolloin syntyvät peptidit ovat liian lyhyitä. Trypsin spin column -menetelmän kohdalla tämän ei kuitenkaan pitäisi olla mahdollista, koska trypsiini on sidottu matriisiin, josta näyte eluoidaan pois digestion päätteeksi. Liian pitkästä trypsinointiajasta ei liukoisenkaan trypsiinin kohdalla pitäisi olla kysymys, sillä kirjallisuuden mukaan, liukoisen trypsiinin käyttö vaatii tavallisesti vähintään 4h trypsinointiajan.

Tulosten mukaan risiinin A-ketju digestoitu ja etsityt markkeripeptidit löytyvät MS-mittauksessa, kun trypsinointi aika on riittävän pitkä. Digestoivan entsyymin toiminnalle ei siis ole estettä. Kokonaisen risiinitoksiinin kohdalla digestiota ei kuitenkaan tapahdu vastaavassa ajassa. Tämä voi johtua siitä, että kokonaisen toksiinin denaturointi ja pelkistäminen eivät ole onnistuneet, mikä hidastaa tai jopa estää trypsiinin toiminnan. Proteiinin ollessa liian tiukasti laskostuneena, trypsiini ei pääse fyysisesti riittävän lähelle, jotta se pystyisi suorittamaan aminohappoketjun katkaisun. Koska risiinitoksiinin MS-analyysi ei onnistunut edes suhteellisen yksinkertaisesta näytematriisista, ei työssä lähdetty lainkaan analysoimaan risiinitoksiinia maitonäytteistä.

7. JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä käytetyistä kromatografiamenetelmistä galaktoosimatriisi puhdisti risiinitoksiinia tehokkaimmin, mutta sen avulla ei ollut mahdollista erottaa toksiinia risiinijauheen sisältämästä agglutiniinista. Glukoosimatriisi puolestaan ei sitonut agglutiniinia, mutta myös sen toksiinin puhdistuskapasiteetti oli pienempi. Työn antamien lupaavien tulosten perusteella tutkimusta kannattaa tulevaisuudessa jatkaa molempien kromatografiematriisien osalta, sillä ne soveltuisivat hyvin käytettäväksi CBRN-kenttälaboratorion olosuhteissa. Puhdistusprotokollaa säätämällä, voitaisiin glukoosimatriisin kohdalla kasvattaa risiinitoksiinin sitoutumista sekä puhdistumisen tehokkuutta ja saavuttaa näin luotettava yksivaiheinen kromatografiamenetelmä risiinitoksiinin sekä agglutiniinin erottamiseksi. Kehittämällä galaktoosimatriisin käyttöä risiinitoksiinin puhdistamisessa erilaisista näytematriiseista, voitaisiin kehittää toimiva ja nopea sovellus risiinitoksiinin puhdistamiseen tilanteissa, joissa sen erottaminen agglutiniinista ei ole tarpeen.

Työn tulosten mukaan Trypsin spin column -menetelmällä suoritettu trypsinointi digestoi risiinitoksiinin tehokkaammin kuin perinteinen liukoinen trypsiini. Trypsin spin column -menetelmällä riittävä digestioaika oli n. 4h, kun taas perinteisellä menetelmällä toimittuna kaikkia markkeripeptidejä ei löydetty edes yön yli kestäneen digestion jälkeen. Tulokset antavat viitteitä siitä, että Trypsin spin column -menetelmällä on suuri potentiaali risiinitoksiinin digestoinnissa verrattuna perinteiseen trypsinointimenetelmään, mutta digestio-olosuhteiden optimointi kyseisen menetelmän kohdalla vaatii vielä lisätutkimuksia. Trypsin spin column -menetelmä soveltuisi hyvin CBRN-kenttälaboratorion olosuhteisiin helppokäyttöisyytensä vuoksi, jos sen vaatimaa digestioaikaa saataisiin lisätutkimusten ansiosta lyhennettyä valmistajan lupaamaksi 15 minuutiksi.

8. LÄHDELUETTELO

Al-Tamimi F, Hegazi A. A case of castor bean poisoning. Sultan Qaboos Univ Med J. 2008;8(1):83–87.

Aragi T, Funatsu G. The complete amino acid sequence of the B-chain of ricin E isolated from small-grain castor bean seeds. Ricin E is a gene recombination product of ricin D and *ricinus communis* agglutinin. Biochim. Biophys. Acta 1987;911:191–200.

Argent R, Parrott A, Day P, Roberts L, Stockley P, Lord J, Radford S. Ribosome-mediated Folding of Partially Unfolded Ricin A-chain. The Journal of Biological Chemistry 2000;275(13):9263–9269.

Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning. JAMA 2005;294:2342–2351.

Bilge A, Warner C, Press O. Translocation of Ricin A-chain into Proteoliposomes Reconstituted from Golgi and Endoplasmic Reticulum. The Journal of Biological Chemistry 1995;40:23720–23725.

Challoner K, McCarron M. Castor bean intoxication. Ann. Emerg. Med. 1990;19(10):1177–1183.

Colburn H, Wunschel D, Kreuzer H, Moran J, Antolic K, Melville A. Analysis of carbohydrate and fatty acid marker abundance in ricin toxin preparations for forensic information. Anal. Chem. 2010;82:6040–6047.

Coopman V, Leeuw M, Cordonnier J ja Jacobs W. Suicidal death after injection of castor bean extract (*Ricinus communis* L.). Forensic Science International 2009;189:e13–e20.

Darby S, Miller M, Allen R. Forensic Determination of Ricin and the Alkaloid Marker Ricinine From Castor Bean Extracts. J Forensic Sci 2001;46(5):1033–1042.

Di Cola A, Frigerio L, Lord J, Roberts L, Ceriotti A. Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Ricin A Chain Has Unique and Plant-Specific Features. Plant Physiology 2005;137:287–296.

Doan L. Ricin: Mechanism of toxicity, clinical manifestations, and vaccine development. Chlinical toxicology 2004;42(2):201–208.

Franz D, Jaax N. Ricin toxin. Textbook of military medicine: medical aspects of chemical and biological warfare. 1997, s. 631–642.

Fredriksson S, Hulst A, Artursson E, de Jong A, Nilsson C, van Baar B. Forensic identification of neat ricin and of ricin from crude castor bean extracts by mass spectrometry. Anal. Chem. 2005;77:1545–1555.

Ganesan G, Raza S, Vijayaraghavan R. Chemical warfare agents. J Pharm Bioallied Sci. 2010;2(3):166–178.

Griffiths G. Understanding ricin from a defensive viewpoint. Toxins (Basel) 2011;3(11):1373–1392.

Hasegawa N, Kimura Y, Oda T, Komatsu N, Muramatsu T. Isolated ricin B-chain-mediated apoptosis in U937 cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000;64(7):1422–1429.

Hoseki J, Ushioda R, Nagata K. Mechanism and Components of Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. J. Biochem. 2010;147(1)19–25.

Hostetler M. Ricin and Other Toxalbumins. The Encyclopedia of Toxicology (Wexler P ym.) 2. painos, 2005. Elsevier pp. 702–704.

Kalb S, Barr J. Mass Spectrometric Detection of Ricin and its Activity in Food and Clinical Samples. Anal. Chem. 2009;81:2037–2042.

Klokk T, Lingelem A, Myrann A, Sandvig K. Role of Phospholipase A₂ in Retrograde Transport of Ricin. Toxins 2011;3:1203–1219.

Ketola R, Kostianen R, Kotiaho T, Vainiotalo P. Massaspektrometrian perusteet. Suomen Massaspektrometrian Seura ry, 2010.

Kumar O, Nashikkar A, Jayaraj R, Vijayaraghavan R. Purification and biochemical characterisation of risin from castor seeds. Defence Science Journal 2004;54(3):345–351.

Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680–685.

Ler S, Lee F, Gopalakrishnakone P. Trends in detection of warfare agents: Detection methods for ricin, *staphylococcal enterotoxin B* and T-2 toxin. Journal of chromatography A 2006;1133:1–12.

Lord J, Smith D, Roberts L. Toxin entry: how bacterial proteins get into mammalian cells. Cellular Microbiology 1999;1(2):85–91.

Lord J, Spooner R. Ricin Trafficking in Plant and Mammalian Cells. Toxins 2011;3:787–801.

Musshof F, Madea B. Ricin poisoning and forensic toxicology. Drug Test. Analysis 2009; 1:184–191.

Mäkelä J. CBRNE-terrorismi: Turhaa pelottelua vai varteenotettava riski? Maanpuolustuskorkeakoulu Strategian laitos, Julkaisusarja 4: Työpapereita N o 21, 2007.

Pinkerton S. Selection of castor with divergent concentrations of ricin and RCA using radial immunodiffusion. *Crop Science*, 1997. Saatavilla (12.9.2012)

Poli M, Roy C, Huebner K, Franz D, Jaax N. Chapter 15, Ricin. *Textbook of military medicine - Medical aspects of biological Warfare*. U.S Army Medical Department, 2007.

Rapak A, Falnes P, Olsnes S. Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94:3783–3788.

Sandvig K, Deurs B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *The EMBO Journal* 2000;19(22):5943–5950.

Sandvik K, Grimmer S, Lauvrak SU, Torgersen ML, Skretting G, Deurs B, Iversen TG. Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. *Histochem Cell Biol* 2002;117:131–141.

Sandvig K, Deurs B. Transport of toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS letters* 2002;529:49–53.

Sannerud R, Saraste J, Goud B. Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route: pathways and machinery. *Current Opinion in Cell Biology* 2003;15:438-445.

Schietz D, McGrath S, McWilliams L, Rees J, Bowen M, Kools J, Dauphin L *et.all.* Analysis of active Ricin and castorbean proteins in a Ricin preparation castor bean extract, and surface swabs from public health investigation. *Forensic Science International* 2011;209:70–79.

Schäfer A, Wolf D. Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *The EMBO Journal* 2009;28:2874–2884.

Seto Y, Kanamori-Kataoka M. Mass spectrometric strategy for the determination of natural and synthetic organic toxins. *Journal of Health Science* 2005;51(5):519–529.

Shi X, Khade P, Sanbonmatsu K, Joseph S. Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis. *J. Mol. Biol* 2012;419:125–138.

Spooner R, Watson P, Marsden C, Smith D, Moore K, Cook J, Lord J, Roberts L. Protein disulphide-isomerase reduces ricin to it's a and B chains in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 2004;383:285– 293.

Spooner R, Hart P, Cook J, Pietroni P, Rogon C, Höhfeld J, Roberts L, Lord M. Cytosolic chaperones influence the fate of toxin dislocated from the endoplasmic reticulum. *PNAS* 2008;105(45):17408–17413.

Suntres Z, Stone W, Smith M. Ricin-induced tissue toxicity: The role of oxidative stress. *J Med CBR Def* 2005;3. Saatavilla (18.10.2012): http://www.jmedcbr.org/Issue_0301/Suntres/Suntres_1205.html.

Virginia I. Roxas-Duncan and Leonard A. Smith (2012). *Ricin Perspective in Bioterrorism*, Bioterrorism, Dr. Stephen Morse (Ed.), ISBN: 978-953-51-0205-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/bioterrorism/ricin-perspective-in-bioterrorism>

Worbs S, Köhler K, Pauly D, Avondet M, Scaher M, Dorner M, Dorner B. Ricinus communis Intoxications in human and veterinary medicine – A summary of real cases. *Toxins* 2011;3:1332–1372.

Wunschel D, Kreuzer H, Antolic K, Colburn H, Moran J, Melville A. Analysis of ricin toxin preparations for carbohydrate and fatty acid abundance and isotope ratio information. Prepared for U.S Department of Energy under contract DE-AC05-76RL01830.

Zweifel L, Kuruvilla R, Ginty D. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signaling. *Nature Reviews, Neuroscience* 2003;6:615–625.

Östin A, Bergström T, Fredrikson S, Nilsson K. Solvent-Assisted trypsin digestion of ricin for Forensic Identification by LC-ESI MS/MS. *Anal. Chem* 2007;79:6271–6278.

Internetviitteet:

Risiinijauheen valmistus. Saatavilla:

<http://www.zoklet.net/bbs/showthread.php?t=103946> (4.3.2013)