INSTITUTIONEN FÖR BIOLOGI OCH MILJÖVETENSKAP

KARAKTERISERING AV EN PLASMABUREN SIGNALMOLEKYL SOM STIMULERAR FRISÄTTNING AV SFINGOSIN-1-FOSFAT FRÅN RÖDA BLODKROPPAR

Matilda Nordström

Uppsats för avläggande av naturvetenskaplig kandidatexamen med huvudområdet Biologi

BIO602, Examenskurs i Biologi, 15 hp

Grundnivå

Termin/år: Vt 2022

Handledare: Anders Nilsson. Institutionen för neurovetenskap och fysiologi

Examinator: Catharina Olsson. Institutionen för biologi och miljövetenskap

Innehållsförteckning

Sammanfattning **3**
Abstract **3**
Introduktion **4**
S1P syntes och receptorer 4
S1P signalering 4
Luckorna i forskningen 4
Syftet med projektet 5
Material och Metod **5**
Proteinfällning 5
Spin kolonner 5
Utarma och eludera albumin från plasma 6
Preparering av plasma och röda blodkroppar 6
Vätskekromatografi – masspektrometri analys 7
Standardkurva och kvantifiering av S1P 8
Resultat **10**
Diskussion **12**
Spin kolonner 12
Utarma och eludera albumin från plasma 12
Proteinfällning av human och bovin plasma 12
Osäkerheter i metoden 13
Betydelse för fortsatt forskning av S1P 13
Slutsats 13
Tackord **13**
Referenser **14**

Sammanfattning
I blodet finner man den bioaktiva sfingolipiden sfingosin-1-fosfat (S1P), där den är en viktig del i exempelvis angiogenesis. S1P syntetiseras i hepatocyter, vaskulärt endotel och blodceller och transporteras med hög-densitet lipoprotein (HDL) eller albumin i plasma. I röda blodceller kan S1P ackumuleras och även frisättas. Tidigare laboratorieexperiment antyder att det finns en signal i plasman som stimulerar frisättningen av S1P och att molekylen troligtvis är ett protein. Syftet med detta arbete är att karakterisera och om möjligt identifiera signalmolekylen. Metoden bestod av flera delar, till att börja med proteinfällning av plasman. Fälld och hel plasma genomgick sedan fraktionering med spin kolonner med olika storlekar på filter (50kD, 100kD, 300kD) för att avgöra om storleken på proteinet påverkar frisättningen av S1P. Blodprov togs från frivillig och de röda blodkropparna separerades ut innan de tillsättes till obehandlad eller bearbetad plasma. Efter inkubering extraherades lipider från proverna och analyserades sedan med LC-MS. Även plasma där albumin avlägsnats användes för att studera om detta protein och/eller andra faktorer bundna till albumin påverkar frisättningen av S1P. Resultaten visar att S1P har frisläppts i proverna med plasma som fraktionerats med alla tre filterstorlekarna men inte från proverna där plasmaproteinerna fällts ut. Det visar även att ingen frisläppning av S1P från röda blodkroppar noterades när de inkuberats med plasma där albumin hade avlägsnats. Slutsatsen från dessa resultat är att molekylen som signalerar frisläppningen av S1P antagligen är ett protein bundet till albumin och att detta komplex är större än 300kD.

Nyckelord
Sfingosin-1-fosfat (S1P); Röda blodceller; Plasma; Signalmolekyl; LC-MS

Abstract
Bioactive sphingolipid Sphingosine-1-phosphate (S1P) is found in blood, where it plays an important part in, for example, angiogenesis. S1P is synthesized in hepatocytes, vascular endothelium and blood cells, then transported with high-density lipoprotein (HDL) or albumin in plasma. S1P can accumulate in, and be released from red blood cells. In experiments, red blood cells (human) were removed from the plasma to examine under which conditions they released S1P. S1P only released from the blood cells when incubated in plasma, not other types of media. This poses the question, what kind of molecule in plasma controls the release of S1P from red blood cells? Previous experiments shows that the molecule might be a protein. The purpose of this study is to characterize and, if possible, identify the signalling molecule. The method consisted of several parts, initially with protein precipitation of the plasma. Precipitated and whole plasma was then fractionated with spin columns with different filter sizes (50kD, 100kD, 300kD) to determine if the size of the protein affects the release of S1P. Blood samples were taken from volunteers and the red blood cells were separated out before being added to untreated or treated plasma. After incubation, lipids were extracted from the samples and then analyzed by LC-MS. Albumin depleted plasma was also incubated with red blood cells to investigate the effect it might have on the release of S1P. Results shows S1P release in the samples with plasma fractionated with all three filter sizes but not from the samples where the plasma proteins are filtered out. It also shows that S1P was not released when incubated with albumin depleted plasma. The conclusion from this study is that the molecule that signals the release of S1P is likely a protein bound to albumin, and this complex is larger than 300kD.

Keywords
Sphingosine-1-phosphate (S1P); Red blood cells; Plasma; Signaling molecule; LC-MC

Introduktion

Sfingosin-1-fosfat (S1P) är en bioaktiv sfingolipid som fungerar som både en ligand för membranreceptorer och intracellulär budbärare (Ksiazek et al., 2015). Det finns många olika typer av sfingiolipider, men basen består alltid av lång-kedjad sfingosin-bas som kan liknas vid lipidens ryggrad. Den vanligaste kedjan i mänsklig plasma är sfingosin (d18:1), medan sfinganin (d18:0) and sfingodienin (d18:2) kan finnas, men då i låga koncentrationer (Quehenberger et al., 2010). I ryggradsdjur finns S1P i den extracellulära miljön i de flesta vävnader där den kan reglera cell-cell interaktion och kan därför påverka differentiering, överlevnad och migration av cellerna (Mendelson et al., 2014). S1P finns i hög koncentration i blodet men även i andra typer av vävnader men då i lägre koncentrationer. S1P syntetiseras i hepatocyter, vaskulärt endotel och blodceller och kan sedan transporteras med hög-densitetlipoprotein (HDL) eller albumin i plasma. I röda blodceller kan S1P ackumuleras och därifrån även frisättas (Bode et al., 2010).

S1P syntes och receptorer

På plasmamembranet och även i lysosomer omvandlas sfingolipider först till ceramid och till slut sfingosin (Proia och Hla 2015). Fosforylering med hjälp av sfingosin kinaser leder till syntes av S1P. En alternativ syntesväg är även via de novo syntes av ceramider. S1P kan sedan att ta en av tre olika vägar. Första är att bli transporterad av till exempel SPNS2 (spinster homolog 2), vilket är ett protein som transporterar S1P i kroppen, på det sättet kan S1P sedan interagera med G-protein-kopplade receptorer. Andra innebär att S1P blir nedbruten av S1P lyase till fosfoetanolamin för att sedan medverka i glykolipid biosyntes. Tredje vägen är att S1P defosforyleras av S1P fosfatas för att brytas ner till sina tidigare beståndsdelar. En av beståndsdelarna är sfingosin som sedan används till ceramidsyntes (Proia och Hla 2015).

S1P receptorer är utspridda över hela kroppen där det påverkar många olika system såsom immunitet, hjärtat och angiogenes (Hanel, Andreani et al. 2007). S1P fungerar som en specifik ligand för fem olika G-protein-kopplade receptorer, som kan reglera cellulära processer som exempelvis migration, överlevnad, adhesion och celldelning. S1P receptorerna på lymfocyter måste vara aktiva för att de ska kunna ta sig ut från sekundära lymfoida organ, vilket betyder att S1P kan ses som ansvarig för att upprätthålla lymfocyt cirkulationen i blodet (Hanel, Andreani et al. 2007).

S1P signalering

S1P signalering är en del av viktiga processer såsom neovaskularisering och angiogenesis, vilket innebär tillväxt av blodkärl från redan existerande blodkärl (Gaengel et al., 2012). Patologisk neovaskularisering är en stor bidragande faktor till blindhet i olika ögonsjukdomar. En tidigare studie undersökte vad S1P spelar för roll i detta och hur man skulle kunna regalera det för att motverka blindhet (Eresch et al., 2018).

Det har även visats att S1P spelar en betydande roll i utvecklingen av äggstockscancer. Det var länge okänt exakt vad S1P hade för roll i cancerutvecklingen, men en nyligen publicerad studie har nu ändrat på det (Dai et al., 2017). Studien visade att S1P och dess signalväg står för nybildningen av blodkärl i äggstockscancern. I celler där man stimulerade frisättning av S1P inducerade den utsöndring av angiogena faktorer. När man sedan försökte blockera S1P hämmades uttrycket av dessa angiogena faktorer. Att förstå hur S1P kan regleras kan alltså vara ett steg närmare att sakta ner utvecklingen av äggstockscancer (Dai et al., 2017).

Luckorna i forskningen

Även fast S1P har en betydande roll i olika processer vet man idag fortfarande väldigt lite om hur dess koncentration i cirkulation kontrolleras av de röda blodkropparna. I tidigare experiment har man tagit reda på under vilka omständigheter som S1P frisläpps från röda blodkroppar (Hanel et al., 2007). Genom att ta blodprov från människor där man sedan separerade de röda blodkropparna från plasman och de vita blodkropparna, kunde man inkubera röda blodkropparna i både plasma och andra medium för att jämföra. Resultaten visade att S1P endast frisläpps när de röda blodkropparna är inkuberad i plasma (Hanel et al., 2007). Detta antyder på att det borde finnas en signal i plasman som styr frisättning av S1P.

Plasma består av 90% vatten och är viktig för att transportera ämnen till och från celler, men den består även av tusentals olika typer av plasmaprotein, alltså skulle den okända signalmolekylen kunna vara ett protein (Hanel et al., 2007). I ett tidigare experiment från Anders Nilssons labb (opublicerad data) har man visat att

signalen inte är en lipid utan den nuvarande teorin är att signalen från plasman är ett protein som är större än 100 kD.

Syftet med projektet

S1P spelar en viktig roll i olika processer i kroppen och patogenes av svårbotade sjukdomar så som ögonsjukdomar och cancer. Information kring signalmolekylen som styr frisättningen av S1P skulle ta oss ett steg närmare en tid där vi lättare kan styra lipiden för exempelvis utvinna nya metoder att bota sjukdomarna den är en del av. Frågeställningen för detta arbete lyder då, vad är det för molekyl i plasman som styr frisättningen av S1P från röda blodkroppar? Syftet med projektet är att karaktärisera och om möjligt identifiera molekylen. Utifrån tidigare experiment är hypotesen att molekylen troligtvis är ett protein.

Material och Metod

För att karaktärisera signalmolekylen inkuberades röda blodceller med plasma och analyserades därefter med LC-MS/MS (Vätskekromatografi–masspektrometri). Analysen från LC-MS kunde sedan visa hur mycket S1P fanns i varje prov.

Plasman preparerades på olika sätt. Den genomgick proteinfällning, fraktionering med spin kolonner samt att albumin var utarmad och eluderad från plasman. Dessa steg resulterade i flera olika lösningar som inkuberades med de röda blodkropparna för att ta reda på vilken som bäst kunde signalera till de röda blodkropparna att frisätta S1P.

Proteinfällning

För att separera ut proteinerna gjordes en proteinfällning av bovin plasma som sedan skulle analyseras och jämföras med bovin plasma som inte har genomgått en proteinfällning. Den bovina plasman var beställd från en leverantör och var inte framtagen under denna laboration. Till att börja med tillsattes 500 µl plasma och 1500 acetonitril till 6 olika 2 ml eppendorfrör. Proverna fick sedan sitta i is i 30 minuter innan de kördes på vortex i några sekunder var. Proverna centrifugerades på 16000xg i 5 minuter, och sedan fördes 700 µl av supernatanten till ett 12x75 mm glasrör. Supernatanten dunstades under kvävgas på låg värme och löstes sedan upp i 467 µl ddH2O. Även pelleten sparades och dunstades på speed vac och löstes sedan i 500 µl 0,9 % NaCl+50 mM Tris-HCl.

Supernatanten och pelleten sattes in i frysen för att sedan användas till nästa steg när proverna kördes genom olika så kallade spinn-kolonner. Hela processen gjordes om igen, denna gång med human plasma, vilket kom från extraheringen av de röda blodkropparna.

Spin kolonner

För att avgöra vilken storlek det var på proteinet som kunde stimulera frisättning av S1P från röda blodkroppar användes spinnkolonner med filter med tre olika porstorlekar. Kolonnerna som användes var Amicon Ultra-2mL Centrifugal Filters 50 kD, Cytiva Vivaspin 500 100 kD MWCO och Sartorius Centrisart 1 300000 MWCO PES. Tre olika varianter användes för att kunna få ut olika storlekar på proteinerna för att analysera och ta reda på om det gör någon skillnad i S1P frisättningen. Till varje spinnkolonn följde det med ett protokoll med metod, denna metod följdes till stor del, men vissa ändringar gjordes.

Kolonnerna med storleken 50 kD och 100 kD följde till en början samma metod. Steg ett var att sätta ihop kolonnerna, storlek 50 kD bestod av tre delar och 100 kD bestod av två. Två av varje fylldes med 500 µl bovin plasma som i förra steget gick igenom en preteinfällning, och två med 500 µl hel bovin plasma. Alla lock stängdes sedan ordentligt och kolonnerna centrifugerades i 60 minuter på 4000xg i 10 °C.

Efter centrifugeringen togs botten av på kolonnen med storleken 50 kD och innehållet fördes över till nya eppendorfrör. Botten sattes inte tillbaka igen utan kolonnen vändes och uppochner och centrifugerades igen i 2 minuter på 1000xg i 10 grader. Botten på kolonnen med storleken 100kD togs även bort och fördes över till nya eppendorfrör, och även denna skulle vändas upp och ner och centrifugeras igen. Men eftersom den endast bestod av två delar fick den vändas upp och ner i ett större rör som inte hade följt med i förpackningen. Även denna kolonn centrifugerades i 2 minuter på 1000xg i 10 grader. Sedan togs kolonnerna ut och även

dessa prover fördes över till nya eppendorfrör. Nu fanns det 8 olika prover från varje kolonn och dessa spädes ut med 0,9% NaCl+HCl till 500 µl.

För kolonnen med storleken 300 kD följdes den tillhörande metoden. Till att börja med avlägsnades locket och det inre röret togs bort och ställdes upp och ner på en ren yta. Sedan fylldes två rör med den fällda plasma och två med hel plasma. Det inre röret sattes tillbaka med membranet först så att den kunde vila ovanpå plasman i botten på det större röret. För att membranet skulle bli tillräckligt fuktigt av plasman fick rören stå i 5 minuter innan nästa steg. Sedan centrifugerades kolonnerna i 5 minuter på 2500xg i 10 grader. Lösningen som nu hade filtrerats upp i det inre röret pipetterades upp så fort som möjligt och fördes över till ett eppendorfrör. Det inre röret togs sedan bort med en pincett och den koncentrerade lösningen i det stora röret fördes över till nya eppendorfrör. Även dessa lösningar spädes ut med 0,9% NaCl+HCl till 500 µl.

Utarma och eludera albumin från plasma

För att undersöka albumins påverkan på S1P signalering användes EZAlbumin Depletion Kit (Spin Column) från BioVision. Metoden som användes kommer ifrån protokollet som följde med i förpackningen. För att förbereda de 5 kolonnerna som skulle användas klipptes botten av kolonnen och korken skruvades upp lätt. Sedan placerades kolonnerna i eppendorfrör och centrifugerades på 1500xg i 1 minut, för av avlägsna lagringsbufferten. Efter centrifugeringen slängdes eppendorfröret med bufferten och sedan tvättades kolonnen genom att lägga till 0,2 ml av EZAlbumin Binding Buffer och centrifugeras på 1500xg i 1 minut. Mellan varje centrifugering slängdes det som samlats i eppendorfröret, sedan upprepades tvättningen tre gånger.

Till varje kolonn tillsattes sedan 10 µl human plasma och 90 µl av EZAlbumin Binding Buffer, sedan stängdes locket ordentligt och kolonnen vändes upp och ner upprepade gånger. Den humana plasman hade tidigare framtagits av Anders Nilsson. Kolonnerna inkuberades sedan på en ”rotary shaker” i rumstemperatur i 30 minuter. För att sedan kunna utvinna det albumin-utarmade provet placerades kolonnen i ett nytt eppendorfrör och centrifugerades på 1500xg i 1 minut.

Nästa steg började genom att lösa ut den albumin som var fast i kolonnen med 0,2 ml av EZAlbumin Elution Buffer och centrifugera på 1,500xg i 1 minut. Detta steg upprepades 4 gånger och varje gång sparades lösningen från eppendorfröret och ett nytt användes till nästa centrifugering. Efter varje tvättning lades lösningen från alla 5 rören ihop till ett prov. Dessa rör gick sedan igenom vacuum-indunstning för att få ner provernas volym till 50 µl.

Preparering av plasma och röda blodkroppar

Blod från en frivillig försöksperson samlades in i 4 ml Li-Hep rör utan gel (13x75mm). Rören vändes sedan 5 gånger innan de centrifugerades i 20 minuter vid 5000xg i 4 °C. Rören placerades sedan på is. Med en Pasteur-pipett flyttades ca tre fjärdedelar av plasman till ett nytt rör medan resterande plasma och buffy coat slängdes. Buffy-coat är antikoagulerat blod som efter centrifugeringen innehåller det mesta av leukocyterna och trombocyterna.

Tre fjärdedelar av resterande röda blodkropparna togs från botten med en Pasteur-pipett och fördes över till ett nytt 12x75 mm glasrör. Till de röda blodkropparna blandades två volymer fosfatbuffrad saltlösning (PBS) med 7,2 pH försiktigt ner. Sedan centrifugerades rören i 5 minuter vid 1200xg i 4 °C. Supernatanten togs sedan bort och PBS tvättningen upprepades igen och rören centrifugerades åter i 5 minuter vid 1200xg i 4°C. Supernatanten togs bort en sista gång och kvar återstod bara röda blodkroppar, som nu skulle inkuberas med plasma som i tidigare steg i metoden preparerats på olika sätt i en 96-hålsplatta (se figur 1).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Rep 1	A	RBC + Plasma	RBC + RPMI	Endast plasma	Endast pellet	Endast superna-ntant	Superna-tant av pellet	RBC + pellet	RBC + supernat-ant	RBC + supernat-ant av pellet	RBC + 300 Spin filtrerat (hel)	RBC + 300 Spin concentr-at (hel)	RBC + 300 Spin filtrerat (fälld)
Rep 2	B	RBC + Plasma	RBC + RPMI	Endast plasma	Endast pellet	Endast superna-ntant	Superna-tant av pellet	RBC + pellet	RBC + superna-tant	RBC + supernat-ant av pellet	RBC + 300 Spin filtrerat (hel)	RBC + 300 Spin concentr-at (hel)	RBC + 300 Spin filtrerat (fälld)
Rep 1	C	RBC + 300 Spin concentr-erat (fälld)	RBC + 50 kD filtrerad (hel)	RBC + 50 kD concentr-erad (hel)	RBC + 100 kD filtrerad (hel)	RBC + 100 kD concentr-erad (hel)	RBC + 50 kD filtrerad (fälld)	RBC + 50kD concentr-erad (fälld)	RBC + 100 kD filtrerad (fälld)	RBC + 100 kD concentr-erad (fälld)	RBC + Human plasma (hel)	RBC + Human plasma pellet (fälld)	RBC + Human plasma supernat-ant (fälld)
Rep 2	D	RBC + 300 Spin concentr-erat (fälld)	RBC + 50 kD filtrerad (hel)	RBC + 50 kD concentr-erad (hel)	RBC + 100 kD filtrerad (hel)	RBC + 100 kD concentr-erad (hel)	RBC + 50 kD filtrerad (fälld)	RBC + 50kD concentr-erad (fälld)	RBC + 100 kD filtrerad (fälld)	RBC + 100 kD concentr-erad (fälld)	RBC + Human plasma (hel)	RBC + Human plasma pellet (fälld)	RBC + Human plasma supernat-ant (fälld)
Rep 1	E	RBC + Albumin depleted sample	RBC + Eluted albumin sample										

Figur 1: 96 håls-plattan med de olika lösningarna som inkuberades i 4 timmar. Rep är förkortning för replikat. Pelleten och supernatanten av plasman kommer från proteinfällningssteget i metoden.

Till en 96-hålsplatta tillsattes olika kombinationer av lika delar röda blodkroppar och plasma som preparerats på olika sätt eller tillväxtmedium (RPMI 1640). Vilka lösningar de olika brunnarna innehöll kan ses i figur 1. I vissa brunnar uteslöts de röda blodkropparna. Den sammanlagda volymen i brunnarna var alltid 100 µl.

Plattan inkuberades därefter på skak 60 RPM vid 37°C i 4 timmar. Efter inkuberingen flyttades 75 µl lösning från varje brunn till ett eppendorfrör och centrifugerades sedan i 2 minuter vid 16000xg. Därefter flyttades 25 µl av supernatanten till ett nytt eppendorfrör för att nu genomgång en lipidextraktion.

Lipidextraktionen genomfördes för att kunna analysera proverna med vätskekromatografi kopplat till masspektrometri (LC-MS/MS). Till varje prov tillsattes 200 µl metanol innehållandes 100 µM denaturerad S1P (d7S1P, Avanti Polar Lipids, USA) och de vortexades i 30 sekunder var. Därefter centrifugerades proverna i 2 minuter vid 16000xg och sedan fördes 150 µl av supernatanten över till 300 µl LC vialer. LC vialerna är speciellt anpassade vialer designade för att passa in på LC-MS maskinen för analys.

Vätskekromatografi – masspektrometri analys

Proverna analyserades på en Agilent 1260 Infinity HPLC system kopplad till en Agilent 6470 trippel kvadupol massspektrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) utrustad med en Jet Stream elektrosprayjoniseringskälla. Protokollet för LC-MS utgår ifrån en tidigare rapport av Cecilia Frej med kollegor, men med några ändringar anpassade till våra prover (Frej et al., 2015).

Ett prov på 5 µl injicerades till LC systemet för analys. S1P separerades på en Acclaim C30 2,1 x 50 mm 3-µm analyskolonn kopplad till en 2.1 x 10 mm 5-µm skyddskassett (ThermoFisher Scientific, Thermo Electron Sweden AB, Hägersten, Sverige) med en temperatur på 50 °C. Mobilfas A bestod av metanol:aceton:vatten (68:29:2) och B bestod av vatten. Mobilfaserna var båda kompletterade med 0.1% myrsyra. Elektrosprej jonkällan höll en temperatur av 300 °C och använde N_2 gas med ett flöde på 6 l/min och nebulizer tryck på 40 psi. Sheath gas (N_2) temperatur var 300 °C och sheath gasflöde 10 l/min. Alla proverna analyserades i positivt läge med kapillär och munstycksspänning inställd på 4500V, respektive 500 V. S1P detekterades genom att använda multiple-reaction-monitoring (MRM) inställningarna (se tabell 1). MRM inställningarna är viktiga för att LC-MS ska detektera analyten som ska studeras. I detta fall ska både S1P och denaturerad S1P studeras. Denaturerad S1P verkar som den interna standarden.

Tabell 1: Multiple-reaction-monitoring (MRM) inställningar

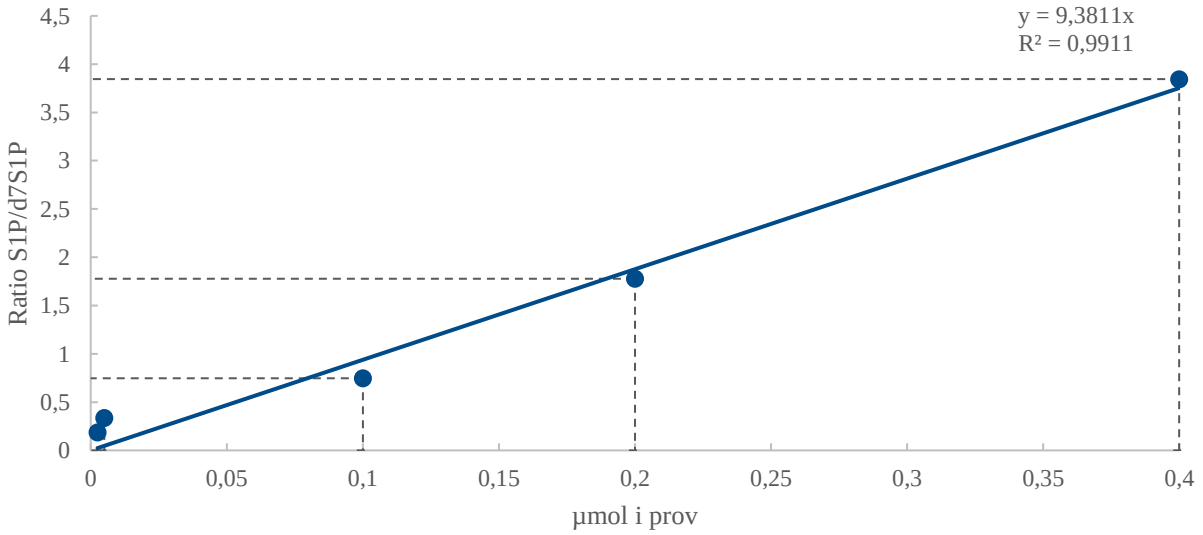
S1P	Prekursor jon (m/z)	Produkt jon (m/z)	Dwell time (ms)	Fragmentor-energi (V)	Kollisionsenergi (V)	Polaritet
d7S1P	387.3	271.1	80	81	27	Positiv
dhS1P	382.2	266.3	80	81	27	Positiv
S1P	380.3	264.5	80	81	27	Positiv
18:2 S1P	378.2	262.3	80	81	27	Positiv

Standardkurva och kvantifiering av S1P

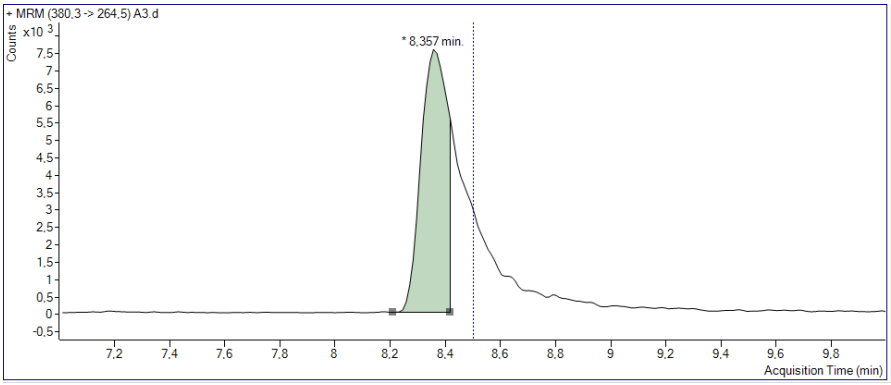
Från kromatogramen som ges av LC-MS (se figur 3) kan mängden S1P i proven bestämmas. Kvantifieringen gjordes med programvaran Agilent MassHunter Quantitativ Analysis 10.0 (Agilent). Först gjordes en integrering för att få fram arean under kurvan (AUC). Därefter beräknades förhållandet mellan S1P och den interna standarden d7S1P. Med hjälp av en standardkurva kunde sedan koncentrationen av S1P i proverna räknas i Microsoft Excel. Ju större arean under kurvan är, desto mer S1P finns det i provet. För att få ut den rätta arean integrerades topparna och tabellen med resultaten fördes över till Excel. I figur 3 visas ett exempel på hur arean av S1P integreras i programmet. I Excel kunde sedan koncentrationen av S1P i proverna räknas ut med hjälp av standardkurvan, vilken kan ses i figur 2, som förberetts tidigare. Arean för S1P dividerades med arean för d7S1P i varje prov och utifrån standardkurvan räknades koncentrationen i plasman fram. I Excel gjordes även grafer för att presentera resultaten.

Standardkurvan, vilken kan ses i figur 2, skapades genom att tillsätta olika kända mängder av S1P till LC-MS och sedan plotta mängd mot kvoten S1P/d7S1P. Standardkurvan ger oss en ekvation för förhållandet som med arean för S1P och d7S1P för att få reda på koncentrationen av S1P i varje prov.

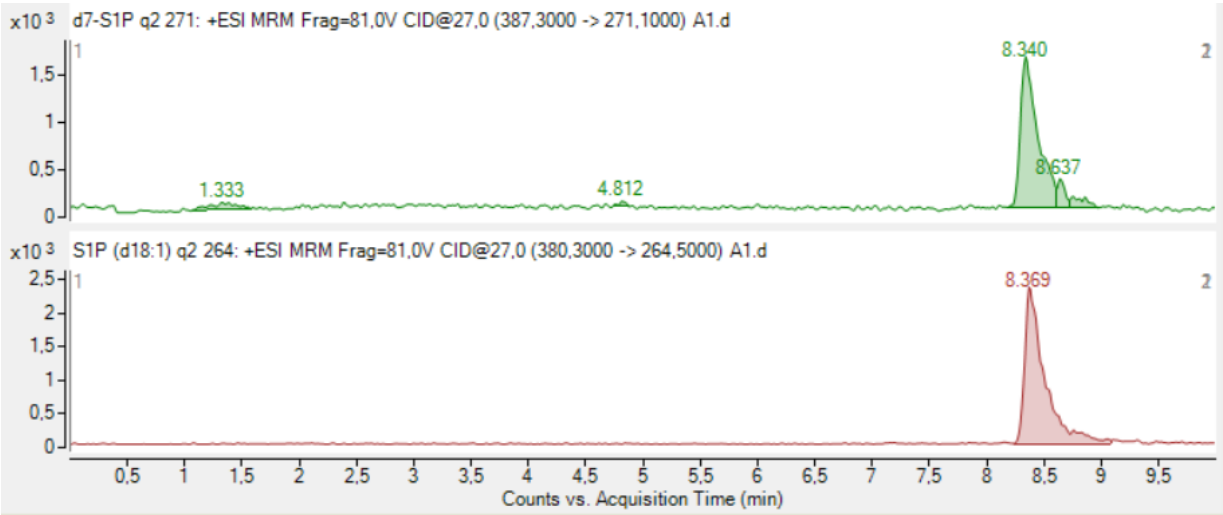
Det första steget var att dunsta 500 µl S1P 10 µM under kvävgas. När vätskan försvunnit från röret tillfördes det 1,25 ml metanol för att ge röret till en koncentration av 4 µM. Med denna lösning gjordes sedan en seriespädning i fem steg. Efter seriespädningen fanns det sju rör med olika koncentrationer: 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 µM S1P samt en kontroll med endast metanol. Inga replikat gjordes. Nästa steg var att till sju nya eppendorfrör tillsätta 200 µl metanol innehållandes S1P (d7S1P, Avanti Polar Lipids, USA) och 25 µl MS serum. Till varje rör tillsattes även 25 µl av S1P lösning som gjordes i förra steget, varje rör fylldes med en ny koncentration S1P. Därefter blandades proverna med vortex i 30 sekunder innan proverna centrifugerades på 16000xg i 2 minuter. I sista steget överfördes 150 µl av supernatanten till en LC vial för att sedan kunna analyseras.



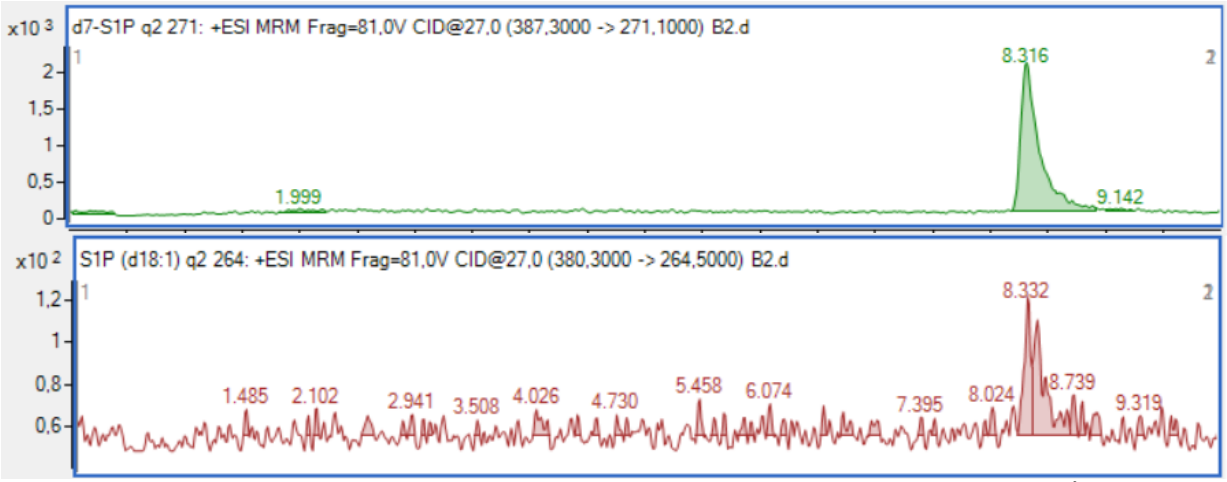
Figur 2. Standardkurvan. Används för att omvandla arean av S1P i proverna framtagen av LC-MS i form av toppar, till koncentrationen av S1P i proverna.



Figur 3. Kromatogram från LC-MS. Toppen representerar mängden S1P. Genom att integrera fås ett värde på arean under kurvan (AUC) som sedan används för att beräkna den faktiska koncentrationen i provet.



Figur 4. Kromatogram från ett prov med röda blodkroppar och plasma. Den övre gröna toppen visar vår interna standard, denaturerad S1P i ett prov. Den nedre röda toppen visar S1P. Figuren kommer ifrån analysprogrammet Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 (Agilent). X-axeln representerar tiden det tar för analyten (S1P och d7S1P i detta fall) att passera kolumnen till detektorn. Y-axeln visar antalet "counts" (molekyler av analyten) som räknas av spektrometer detektorn per tidpunkt.

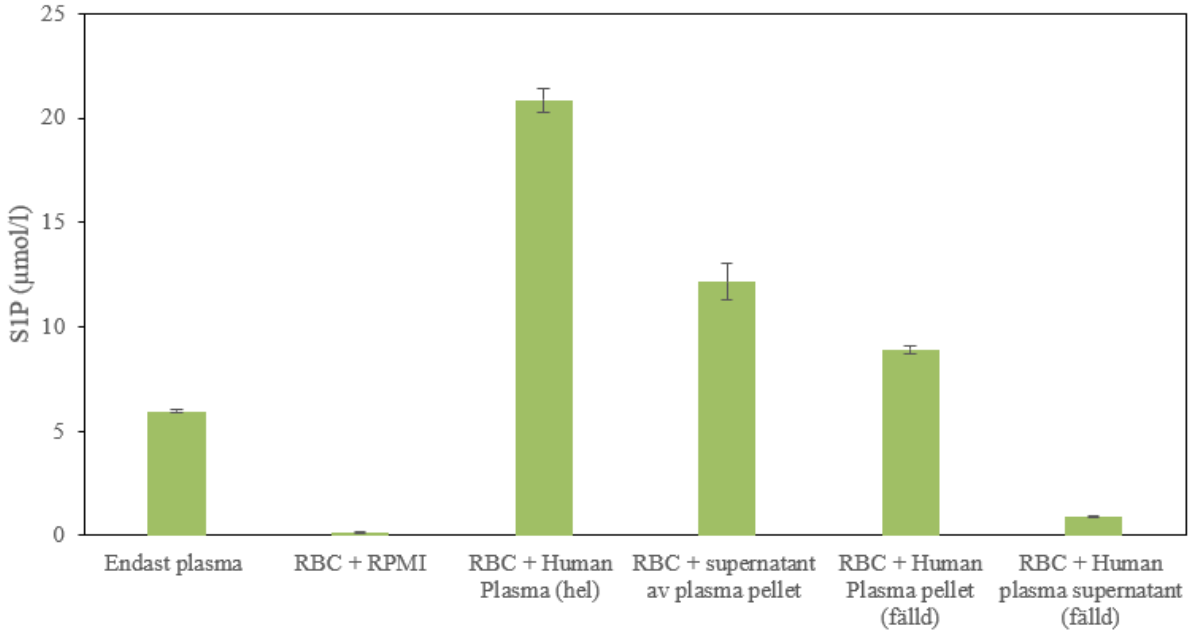


Figur 5. Mängden S1P i ett prov med röda blodkroppar och RPMI medium. Den övre gröna toppen visar vår intern standard, denaturerad S1P. Den nedre röda toppen är S1P. Figuren kommer ifrån analysprogrammet Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 (Agilent). X-axeln representerar tiden det tar för analyten (S1P och d7S1P i detta fall) som analyseras att passera kolumnen till masspektrometer detektorn. Y-axeln visar antalet molekyler (counts), vilket är en representation av hur mycket analyt som finns i provet. Arean under kurvan är baserad på antalet "counts" (molekyler av analyten) som räknas av spectrometer detektorn under en tidpunkt.

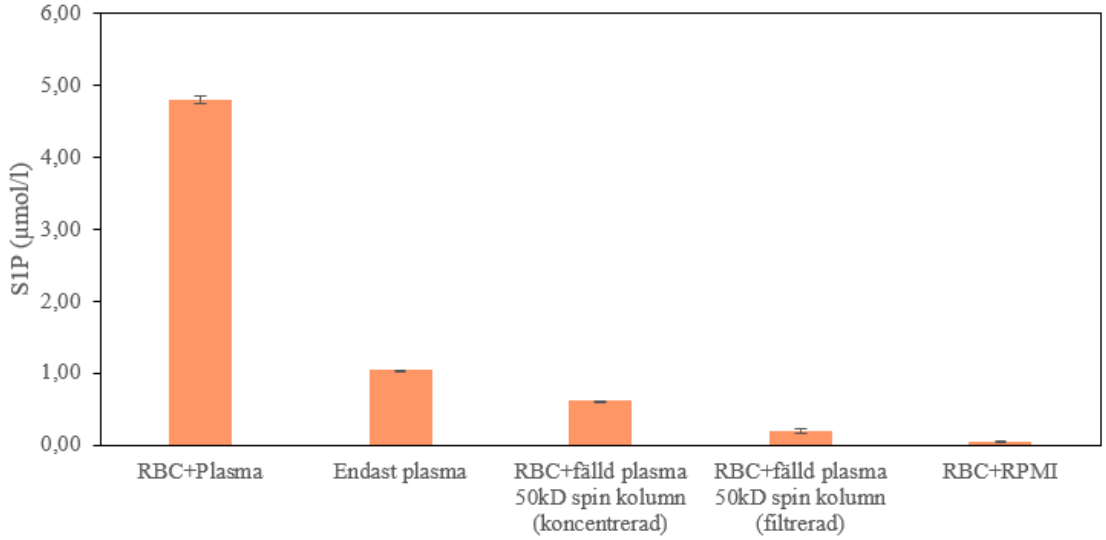
Resultat

Figur 4 och 5 visar exempel på kromatogram från två olika prover. De övre graferna representerar den interna standarden (denaturerad S1P) medan de röda visar hur mycket S1P som frisats i provet. Mer frisattes när de röda blodkropparna inkuberats med plasma (figur 4) än när de inkuberats med RPMI (figur 5). Figur 5, där de röda blodkropparna inkuberats i RPMI, visar inte en tydlig topp jämfört med figur 4, utan massa små toppar. Detta indikerar en osäkert och tyder på att det inte finns någon tydlig substans av S1P i proverna där de röda blodkropparna inte inkuberades i plasma.

Resultaten i figur 6 och 7 visar skillnaden i S1P koncentration i fälld och hel plasma. I figur 6 är det human plasma som presenteras och i figur 7 är det bovin (ko) plasma. Figur 6, med human plasma, visar tydligt att det fortfarande finns aktiv S1P även efter att plasman har genomgått proteinfällning. Figur 7, med bovin plasma, visar att det inte finns någon aktiv S1P efter att plasman har genomgått proteinfällning.

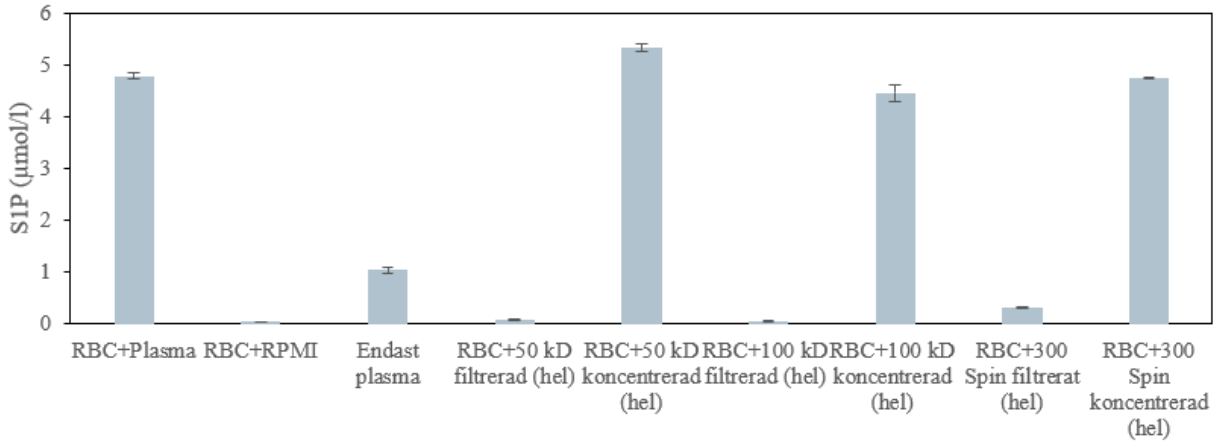


Figur 6. Proven är medelvärdet av koncentrationen S1P (µmol/l) från 2 replikat. S1P (µmol/l) i fälld och hel human plasma. RBC står för röda blodkroppar.



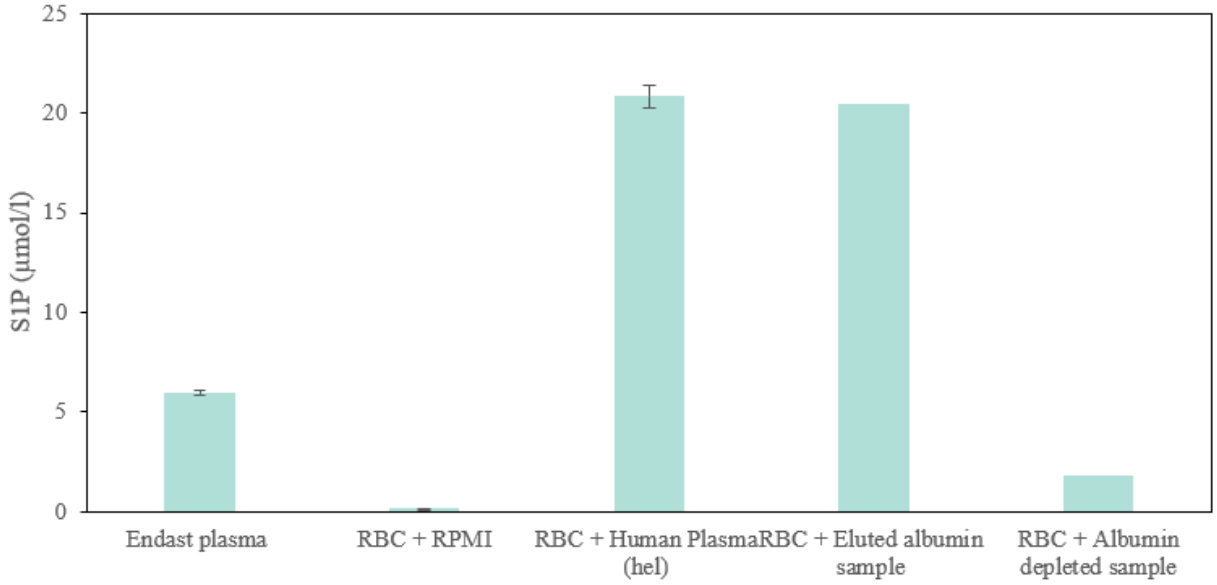
Figur 7. Proven är medelvärdet av koncentrationen S1P (µmol/l) från 2 replikat. S1P (µmol/l) i fälld och hel bovin plasma. RBC står för röda blodkroppar.

I figur 8 kan man se koncentrationen S1P i prover där plasma har fraktionerats i spinkolonner med olika filterstorlekar. I proverna där proteinerna större än porstorleken har samlats kan man se en hög koncentration av S1P, medan de prover där proteinerna har filtrerats bort finns det nästan ingen S1P. I grafen kan man se att alla proverna med proteiner större än porstorleken har en hög koncentration frisatt S1P oavsett filterstorlek.



Figur 8. Mängden S1P som frisatts från röda blodceller som inkuberats med plasma som filterats genom spinnkolonner av olika storlek (50, 100 och 300 kD). Data som visas är medelvärde± standardavvikelse för N=2 replikat.

I figur 9 ser man skillnaden i S1P koncentration i prover med eller utan albumin. I provet där albumin hade avlägsnats är S1P koncentrationen väldigt låg, till och med lägre än provet med endast plasma. I provet där albuminet fanns i hög koncentration var även koncentrationen av S1P hög, ungefär lika hög som provet med röda blodkroppar och human plasma.



Figur 9. Proven är medelvärdet av koncentrationen S1P (µmol/l) från 2 replikat. S1P (µmol/l) i prover med och utan albumin i plasman. Även kontroll prover ingår. Human plasma användes. RBC står för röda blodkroppar.

Diskussion

Resultatet visar att S1P endast frisätts i prover där det finns aktiva plasmaprotein. Det blev även mer frisättning av S1P när proverna innehöll mer albumin. Vi såg även att proteinerna i bovin plasma inte behöll sin aktivitet efter en proteinfällning, medan proteinerna i human plasma gjorde det. Resultatet tyder på att signalmolekylen som styr frisättningen av S1P från röda blodkroppar är ett protein, vilket stämde in på vår hypotes. Resultatet antyder även att proteinet eller det komplex som proteiner ingår i, antagligen inkluderar albumin, och är större än 300 kD.

Spin kolonner

Precis som tidigare studier kunde även vi se att de röda blodkropparna frisläppte S1P när de inkuberades i plasma. Blodkropparna inkuberades även i andra medium så som RPMI och även här fick vi samma resultat som tidigare studier, ingen S1P aktivitet (Hanel et al., 2007). Plasma innehåller många plasmaprotein med många olika uppgifter, de mest förekommande är albumin (65 kD), globulin (93 kD) och fibrinogen (420 kD) (Hanel et al., 2007). I vårt experiment filtrerade vi bort protein från plasman för att se om ett protein var nödvändigt för att frisätta S1P. Proteinerna var filtrerade vid tre olika storlekar, där den största var 300 kD, för att undersöka om storleken på proteinet hade någon betydelse. Efter plasman filtrerats och det mesta av proteinerna var borta och den inkuberades med röda blodceller frisätts inte längre S1P. Eftersom samtliga tre filterstorlekar filtrerade bort det mesta av substansen som behövs för att stimulera frisättningen kan man dra slutsatsen att proteinet är större än 300 kD.

Det finns en möjlighet att det inte bara är signalproteinet som är 300 kD, utan den kan ingå i ett komplex med en annan molekyl i plasman. För att få en bättre förståelse och en mer exakt bild av proteinet skulle nästa steg i arbetet vara att utföra proteomik på proteinerna i proven. Även gelfiltrering hade varit ett bra sätt att bättre identifiera proteinet. Med gelfiltrering kan man separera proteiner av olika storlekar, och sedan undersöka mer exakt vilken storlek som har mest påverkan på frisättningen av S1P (Duong-Ly & Gabelli, 2014).

Utarma och eludera albumin från plasma

Utifrån tidigare studier kunde vi utgå från att det fanns en chans att närvaron av albumin påverkade frisättningen av S1P (Adamson et al. 2014). Deras resultat visade att koncentrationen S1P sjönk med en lägre albumin koncentration. Vi utgick från att våra experiment skulle visa liknande resultat, vilket de gjorde då det var ytterst lite S1P som var frisatt vid frånvaron av albumin. Figur 9 visar även att det finns en hög koncentration S1P i provet där albumin finns mycket koncentrerat. Detta kan betyda att mycket albumin leder till mycket signalprotein vilket i sin tur leder till en stor frisättning av S1P.

Albumin aktiverar inte signalproteinet i sig, utan hypotesen är att albumin bär med sig signalmolekylen i ett komplex. Albumin är dock 65 kD vilket är mindre än det största filtret storleken på 300 kD. Detta innebär att i teorin borde provet som innehöll plasman som hade filtrerat bort alla protein under 300 kD fortfarande innehålla frisatt S1P. Eftersom hypotesen är att signal proteinet är bundet till albumin inte borde gått igenom filtret eftersom den är större än 300 kD. Även fast detta kan väcka tveksamheter i mina slutsatser så tyder ändå resultaten på att en frånvaro av albumin leder till mindre frisättning av S1P. Det kan även betyda att proteinet albumin bildar ett komplex med är mycket större vilket gör att de tillsammans blir över 300 kD. Eftersom tidigare studier även har kommit fram till dessa resultat tror jag att det finns en stor chans att albumin har en viktig roll. I framtida experiment hade det varit intressant att undersöka om det finns andra protein förutom albumin som signalproteinet kanske bildar komplex med.

Proteinfällning av human och bovin plasma

Experimentet med spin kolonnerna utfördes med bovin (ko) plasma. Det visade sig att bovin plasma inte hade kvar någon aktivitet i sina proteiner efter att de hade genomgått proteinfällning. För att undersöka om all plasma var lika känslig för proteinfällning utfördes samma fällning på human plasma. Figur 6 och 7 visar skillnaden i koncentrationen av S1P i fälld och icke fälld plasma mellan bovin och human plasma. I figur 6 kan man se att det fortfarande finns en hög koncentration av S1P efter att human plasman genomgått proteinfällning. Figur 7 visar hur bovin plasma endast innehåller en hög nivå av frisatt S1P när plasman inte genomgått proteinfällning. Alltså är den aktiva substansen/signalen i bovin plasma är känsligare för denaturering än motsvarande i human plasma. Eftersom bovin plasma inte innehöll någon S1P efter fällning så kunde man inte tolka några resultat från spin kolonnerna med fällda prover. Detta gjorde att vi inte hade

lika mycket data att analysera vilket gjorde det svårare att komma fram till en mer definitiv slutsats. För att gå vidare med projektet skulle nästa steg vara att bara använda human plasma i experimentet med spin kolonnerna. Eftersom vi nu vet att human plasma håller genom en fällning så hade vi även kunnat få resultat från spin kolonnerna innehållandes fälld plasma.

Osäkerheter i metoden

På grund av den korta tiden som var utsatt till metoden fanns det inte mycket tid över för förbättringar under tiden experimenten utfördes. Endast två replikat av alla prover gjordes, och experimentet som testade albumins påverkan hade inga replikat alls. Fler replikat hade starkt trovärdigheten av mina slutsatser. Även fast replikaten var få var skillnaden i frisatt S1P mellan proverna i experimentet så pass stora att jag litar på att våra tolkningar av resultatet är korrekta.

Det största problemet med metoden var att vi använde bovin plasma, vilket inte gav oss tydliga resultat eftersom proteinerna i plasman inte behöll sin aktivitet genom proteinfällningen. Det finns inga tidigare studier på varför proteinfällning skulle inaktivera proteinerna i plasman, eller varför det var en sådan stor skillnad mot human plasma där proteinerna höll sig aktiva. Vidare forskning krävs för att ta reda på vad som skiljer proteinerna i bovin och human plasma åt. Det finns andra typer av proteinfällning som inte är lika aggressiva som kanske hade fungerat för bovin plasma, så som en fällning med en pH gradient. Proteinfällningen var till för att separera ut den del av de proteiner som finns i plasma och få ut en aktiv fraktion vad gäller aktivering av röda blodkroppar.

Eftersom den bovina plasman inte gav oss de resultat vi sökte valde vi att ta bort den delen av resultatet och fokuserade på experimenten som gav tydliga resultat. Det är inte optimalt att ignorera resultat men i detta fall fungerade det bra eftersom vi ändå kunde bevisa att plasmaproteiner krävdes för signalering av S1P med den bovina plasman som inte hade genomgått proteinfällning. Förfining av metoden där albumin filtrerades bort hade kunnat ge mer trovärdiga resultat. Eftersom bufferten som användes för att filtrera bort albuminet var väldigt stark finns det en chans att den tog sönder de röda blodkropparna under inkubering. Det gör det svårt att veta om det är på grund av den höga koncentrationen albumin det är en hög frisättning av S1P eller har den bara släppts fri när blodkropparna gick sönder (Nilsson, personlig information, 16 maj, 2022). Genom att använda en annan buffert hade vi kunnat utesluta denna felkälla och vara säkra på att frisättningen av S1P endast berodde på närvaron av albumin.

Betydelse för fortsatt forskning av S1P

Genom att identifiera signalmolekylen som styr frisättningen av S1P får vi en djupare förståelse för hur S1P fungerar i vår kropp och på längre sikt, efter fler studier och experiment, hade man kanske kunnat reglera den på ett sätt som passar oss. S1P är till exempel en stor del i utvecklingen av nya blodkärl i cancerformer så som äggstockscancer. Hade man då haft vetskapen om vad för protein som styr frisättningen av S1P, så hade man kanske kunnat bromsa cancerns spridning och utveckling. Eftersom S1P är en del av många viktiga processer i kroppen är det betydelsefullt att fortsätta forska på de protein som styr dess frisättning.

Slutsats

Syftet med arbetet var att försöka karaktärisera och om möjligt identifiera signalmolekylen som styr frisättningen av S1P från röda blodkroppar. Hypotesen som byggde på tidigare studier var att det vi letade efter var ett protein på över 100 kD. Resultatet från detta arbete stämmer med hypotesen då även vi fann att signalmolekylen troligen är ett protein. Utifrån resultaten kan man även dra slutsatsen att proteinet troligen är bunden till albumin, och detta komplex är större än 300 kD.

Tackord

Ett speciellt tack till min handledare Anders Nilsson som har hjälpt mig genom detta arbete.

Referenser

Adamson, R. H., Clark, J. F., Radeva, M. Kheirolomoom, A., Ferrara, K. W., Curry, F. E. (2014). Albumin modulates S1P delivery from red blood cells in perfused microvessels: mechanism of the protein effect. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,* 306(7): H1011-H1017.

Bode, C., Sensken, S. C., Peest, U., Beutel, G., Thol, F., Levkau, B., Li, Z. G., Bittman, R., Huang, T., Tolle, M., van der Giet, M., Graler, M. H. (2010). Erythrocytes Serve as a Reservoir for Cellular and Extracellular Sphingosine 1-Phosphate. *Journal of Cellular Biochemistry,* 109(6): 1232-1243.

Dai, L., Liu, Y. X., Xie, L., Wu, X., Qiu, L. H., Di, W. (2017). Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in ovarian cancer angiogenesis. *Oncotarget,* 8(43): 74947-74961.

Duong-Ly, K. C., Gabelli, S. B. (2014). Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins. *Laboratory Methods in Enzymology: Protein, Pt C.,* 541: 105-114.

Eresch, J., Stumpf, M., Koch, A., Vutukuri, R., Ferreiros, N., Schreiber, Y., Schroder, K., Devraj, K., Popp, R., Hattenbach, L. O., Pfeilschifter, J., Pfeilschifter, W. (2018). Sphingosine Kinase 2 Modulates Retinal Neovascularization in the Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science,* 59(2): 653-661.

Frej, C., Andersson, A., Larsson, B., Guo, L. J., Norstrom, E., Happonen, K. E., Dahlback, B. (2015). Quantification of sphingosine 1-phosphate by validated LC-MS/MS method revealing strong correlation with apolipoprotein M in plasma but not in serum due to platelet activation during blood coagulation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 407(28): 8533-8542.

Gaengel, K., Niaudet, C., Hagikura, K., Siemsen, B. L., Muhl, L., Hofmann, J. J., Ebarasi, L., Nystrom, S., Rymo, S., Chen, L. L., Pang, M. F., Jin, Y., Raschperger, E., Roswall, P., Schulte, D., Benedito, R., Larsson, J., Hellstrom, M., Fuxe, J., Uhlen, P., Adams, R., Jakobsson, L., Majumdar, A., Vestweber, D., Uv, A., Betsholtz, C. (2012). The Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1PR1 Restricts Sprouting Angiogenesis by Regulating the Interplay between VE-Cadherin and VEGFR2. *Developmental Cell,* 23(3): 587-599.

Hanel, P., Andreani, P., Graler, M. H. (2007). Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *Faseb Journal,* 21(4): 1202-1209.

Ksiazek, M., Chacinska, M., Chabowski, A., Baranowski, M. (2015). Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *Journal of Lipid Research,* 56(7): 1271-1281.

Mendelson, K., Evans, T., Hla, T. (2014). Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development,* 141(1): 5-9.

Proia, R. L., Hla, T. (2015). Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *Journal of Clinical Investigation,* 125(4): 1379-1387.

Quehenberger, O., Armando, A. M., Brown, A. H., Milne, S. B., Myers, D. S., Merrill, A. H., Bandyopadhyay, S., Jones, K. N., Kelly, S., Shaner, R. L., Sullards, C. M., Wang, E., Murphy, R. C., Barkley, R. M., Leiker, T. J., Raetz, C. R. H., Guan, Z. Q., Laird, G. M., Six, D. A., Russell, D. W., McDonald, J. G., Subramaniam, S., Fahy, E., Dennis, E. A. (2010). Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research,* 51(11): 3299-3305.