

# **LAPTM4B och S1P interaktioner i A431-celler**

Elin Karlsson

Medicine Kandidat

Medicinska Fakulteten

Helsingfors 21.01.2020

Avhandling

[elin.j.karlsson@helsinki.fi](mailto:elin.j.karlsson@helsinki.fi)

Handledare: Kid Törnquist

HELSINGFORS UNIVERSITET

Mediciska fakulteten

## HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty <b>Medicinska Fakulteten</b>		Laitos – Institution – Department <b>Minerva Foundation Insitute for Medical Research</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Elin Karlsson</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>LAPTM4B och S1P interaktioner i A431-celler</b>			
Oppiaine – Läroämne – Subject <b>Medicin</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Fördjupade studier</b>	Aika – Datum – Month and year <b>21.01.2020</b>	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages <b>22 + 5 (bilagor)</b>	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>LAPTM4B är ett transmembranprotein som finns i lysosomer och sena endosomer. En isoform av proteinet, LAPTM4B-35 är ofta överuttryckt i flera cancerformer och det främjar bland annat cancercellernas proliferaion och migration samt reglerar cellernas endocytos. Proteinet påverkar intracellulär cellsignalering genom flera olika rutter. LAPTM4B påverkar cellernas sfingolipid-metabolism som också har en central roll för cancercellers proliferaion och migration. I detta projekt undersöktes effekten av LAPTM4B-knockout på uttrycket av sfingosin 1-fosfat receptorer i A431-celler och resultaten jämfördes med uttrycket av samma receptorer i LAPTM4B-överuttryckande A431-celler. Vi kunde se ett minskat uttryck av sfingosin 1-fosfat receptor 1 (S1PR1) i LAPTM4B-knockout celler. I projektet undersöktes även hur dessa cellers migration påverkades då de stimulerades av sfingosin 1-fosfat (S1P). Ett tydligt tecken var att varje gång cellerna stimulerades med S1P blev migrationen av cellerna mindre. Effekten var lägre i LAPTM4B-knockout celler jämfört med i vild typs A431-celler. I projektet ingick en undersökning av halten glutation i LAPTM4B-knockout celler jämfört med i LAPTM4B-överuttryckande celler. Resultaten från dessa experiment var att LAPTM4B-knockout celler innehåller lägre halter av glutation än LAPTM4B-överuttryckande celler. Detta projekt understöder att det finns interaktioner mellan sfingolipid-sigalering och LAPTM4B och ger ny information om endosomala sigaleringsmekanismer.</p> <p>(193 ord)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>LAPTM4B; Cancer; Sfingosin 1-fosfat; Glutation</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>HELDA – Helsingfors universitetes digitala arkiv</b>			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## Innehållsförteckning

<b>1. Inledning</b>	3
<b>2. Litteraturoversikt</b>	4
2.1 Skivepitelkarcinom	4
2.2 LAPTM4B	4
2.3 Sfingolipidmetabolism	5
2.4 Sfingosin 1-fosfat och sfingosin 1-fosfat receptorer	6
2.4.1 S1PR1	6
2.4.2 S1PR2	6
2.4.3 S1PR3	7
2.4.4 S1PR4 och 5	7
2.5 Glutation	7
<b>3. Avhandlingens målsättning</b>	8
<b>4. Material och metoder</b>	9
4.1 Cellodling	9
4.2 Transfektion av celler	9
4.3 Framställning av celllysats	10
4.4 Western blot	10
4.5 Migration	11
4.6 Bestämning av glutationskoncentration	11
<b>5. Resultat</b>	12
5.1 Proteinuttrycket av S1PR1 är signifikant lägre i LAPTM4B-knockout A431-celler jämfört med vild typs A431-celler	12
5.2 Sfingosin 1-fosfat har en inhiberande effekt på migrationen av A431-celler	14
5.3 LAPTM4B tenderar att öka glutationskoncentrationen i A431-celler	15
<b>6. Diskussion</b>	16
6.1 LAPTM4B modulerar uttrycket av S1P receptorer	16
6.2 Migration	16
6.3 LAPTM4B påverkar upptaget av metaboliter som behövs för GSH-syntesen	17
6.4 Svagheter i projektet	17
6.5 Slutsatser och framtida visioner	18
<b>7. Tillkännagivande</b>	19
<b>Källförteckning</b>	20
<b>Bilaga 1, Material &amp; Kemikalier</b>	23
<b>Bilaga 2, Recept</b>	25

## 1 Inledning

Cancer är en heterogen grupp av sjukdomar som har blivit allt vanligare i takt med att medellivslängden ökat. För att cancer ska uppkomma krävs flera mutationer i cellerna som utvecklas till cancerceller. Många gener har en extra stor betydelse vid uppkomsten av olika cancerformer. De här generna reglerar normalt cellfunktionen och styr över att cellerna växer i normal takt och anpassar sig till de signaler de får från omgivningen. Om tillräckligt många gener muteras kan cellerna bli resistent mot signaler från omgivningen och de kan börja dela sig okontrollerat.

LAPTM4B är en gen som har visat sig öka risken för vissa cancerformer om den muteras (1). Tidigare forskning har visat att LAPTM4B påverkar vissa cellfunktioner genom interaktioner med ceramid (2), som är en prekursor för sfingosin-1-fosfat (S1P), en viktig molekyl i många cancerceller. I detta projekt var tanken att undersöka interaktioner mellan LAPTM4B och S1P i skivepitelkarcinomceller, A431-celler, genom att studera om det förekommer skillnader i uttrycket av S1P-receptorer i LAPTM4B-knockout celler jämfört med LAPTM4B-överuttryckande celler. Vi undersökte även hur de olika LAPTM4B-modifierade cellernas migration påverkades då de stimulerades med S1P.

I projektets sista del var vi intresserade av att undersöka om halterna av glutation i A431-celler påverkas av LAPTM4B. Glutation är en tripeptid som bland annat fungerar som en antioxidant. Antioxidanter är viktiga för cancercellernas överlevnad eftersom de kan minska på mängden reaktiva, toxiska syreradikaler som bildas i cancercellernas ökade metabolism (3).

I första delen av denna avhandling, i kapitel 2, presenteras bakgrundsinformation om de ämnen som forskningen undersökte. I kapitel 4 beskrivs det material samt metoderna som användes i projektet och resultaten från forskningen presenteras i kapitel 5.

## 2 Litteraturoversikt

### 2.1 Skivepitelkarcinom

Det finns tre huvudsakliga varianter av hudcancer. Melanom, basalcellskarcinom (basaliom) som är den vanligaste hudcanceren och skivepitelkarcinom. Den andra vanligaste hudcanceren är skivepitelkarcinom med en incidens på ca 1600 nya fall per år i Finland (4). Den främsta orsaken till skivepitelkarcinom är UV-strålning som skadar DNA i epitelcellerna så att mutationer uppstår. Andra riskfaktorer för denna cancerform är ett nedsatt immunförsvar, joniserande strålning, karcinogener från industrin, brännsår och kroniska sår som inte läker. Vanliga mutationer som förekommer i skivepitelkarcinom är aktiverande mutationer i RAS och inaktiverande mutationer i Notch-receptorer som behövs för en normal differentiering av skivepitelceller. Skivepitelkarcinom kan utvecklas även på interna områden som i munsvälget, lungan, matstruben och anus. Dessa tenderar ofta att vara aggressivare än skivepitelkarcinom på huden. Cancern kan metastasera till närliggande lymfnoder. Sannolikheten för att tumören ska metastasera är beroende av hur tjock tumören är och om den har invaderat subcutis-lagret i huden. (5)

Risken att drabbas av denna hudcancer ökar med stigande ålder. Då tumören hittas är den oftast ca 1 till 3cm i diameter. Behandling av skivepitelkarcinom sköts genom att kirurgiskt operera bort tumören. Om tumören finns på en plats varifrån den inte kan opereras bort kan den behandlas med strålbehandling (6).

### 2.2 LPTM4B

Lysosom-associerat protein transmembran-4b genen (LPTM4B), är en onkogen som kodar för det membranomgående proteinet LPTM4B. Genen kodar för två isoformer av proteinet, LPTM4B-35 och LPTM4B-24. Isoformen LPTM4B-35 innehåller 91 extra aminosyror i N-terminalen som inte finns i LPTM4B-24 och de extra aminosyrorna bygger upp ett prolinrikt domän som fungerar som ett bindningsställe för SH3-domän som finns i många signalmolekyler. Därför är det främst isoformen LPTM4B-35 som har visat sig främja olika cancertumörers proliferation och potential till metastasering.

LPTM4B är ett integralt membranprotein med fyra membranomgående delar. Det har ett lysosom-lokaliserande domän i C-terminalen och förekommer i lysosomers membran och i sena

endosomer. LAPTM4B-genen uttrycks i flera olika sorters vävnader, bland annat i hjärtat, skelettmuskler, testiklar och i livmodern. Genens lokus finns på kromosom nummer 8 och innehåller sju exoner och sex introner. Man känner till två allelvarianter för LAPTM4B-genen, allel ett och två. I flera vanliga cancerformer blir LAPTM4B överuttryckt och detta verkar oftast vara kopplat till förekomsten av allel två. Denna allel anses därför vara en riskfaktor för utvecklingen av somliga cancerformer (7). Ett överuttryck av LAPTM4B, speciellt isoformen LAPTM4B-35 verkar främja tumörers proliferation, invasion och potential till metastasering. Uppreglering av genen har även påvisat främja cellers autofagi och på detta sätt bidra till en ökad resistens mot kemoterapi vid cancerbehandling. Cancerceller verkar dessutom bli mer resistenta mot apoptos om LAPTM4B är överuttryckt (8).

## 2.3 Sfingolipidmetabolism

Alla eukaryoters cellmembran innehåller sfingomyelin. I celler pågår en ständig metabolism av sfingomyelin. Sfingomyelinet bryts ner till ceramid av enzymet sfingomyelinas. Den här reaktionen sker inne i cellers sena endosomer. Ceramid kan sedan omvandlas vidare till sfingosin av enzymet ceramidas. Sfingosinet transporteras ut ur den sena endosomen genom en okänd mekanism och kan sedan fosforyleras av enzymet sfingosin kinas 1 eller dess isoform sfingosin kinas 2. Produkten som bildas i fosforyleringen kallas sfingosin 1-fosfat (S1P). S1P kan reversibelt omvandlas tillbaka till sfingosin av enzymet S1P fosfatas eller så kan S1P brytas ner till hexadecanal och fosfatoetanolamin av enzymet S1P lyas. Alla reaktionssteg i metabolismen av sfingomyelin är reversibla. Sfingosin kan användas för nybildning av sfingomyelin istället för att ombildas till S1P och i detta fall transporteras sfingosinet till endoplasmatiska retiklet där det tillbakabildas till ceramid som sedan kan transporteras till trans-Golgi via membrantransportproteinet CERT (Ceramide transfer-protein). Härifrån används sedan ceramidet för syntesen av sfingomyelin. (9)

Sfingomyelinets metaboliter fungerar som viktiga signalmolekyler i cellerna och även som intracellulära modulatorer för olika enzymer. De cellulära processer som regleras av metaboliterna är viktiga för cellernas välmående. I cancer förekommer ofta en störd metabolism av de här lipiderna. Sfingosin och ceramid är viktiga bland annat för apoptos-signalerings i cellerna. S1P kan påverka cellsignalerings genom att aktivera G-protein kopplade receptorer som finns på cellernas plasmamembran. (10)

## 2.4 Sfingosin 1-fosfat och sfingosin 1-fosfat receptorer

Sfingosin 1-fosfat (S1P) är en metabolit av sfingomyelin som reglerar flera cellulära processer. Syntesen och nedbrytningen av S1P sköts huvudsakligen av enzymerna Sfingosin kinas 1 och S1P lyas. S1P är en viktig signalmolekyl då det gäller cellers proliferation, migration, angiogenes och överlevnad. (11)

En störd metabolism av S1P är relaterad till flera olika sorters sjukdomar, som kardiovaskulära sjukdomar, autoimmuna sjukdomar och framför allt cancer (12). S1P verkar parakrint genom att binda fem olika G-protein kopplade receptorer som finns på cellernas plasmamembran. Receptorerna kallas S1PR 1 till 5. S1PR 1 till 3 finns i de flesta celler hos människan medan uttrycket av S1PR 4 och 5 är mera vävnadsspecifikt. Då S1P binder till sin receptor sker en konformationsförändring i receptorn som får till stånd en dissociation av G-proteinet som finns bundet till receptorn. Beroende på vilken G-proteinunderenhet som aktiveras, kommer en viss intracellulär signalkaskad att starta i cellen, som leder till förändringar i en cellulär process, till exempel i cellproliferationen.

### 2.4.1 S1PR 1

Då S1PR 1 aktiveras medföljer en inaktivering av adenylyl cyklas och en aktivering av fosfolipas C (PLC). PLC-aktiveringen får till stånd en frigörelse av intracellulärt kalcium. Andra signalmolekyler som aktiveras genom S1PR 1 är ERK1/2, PI3K-Akt och Rac. De här signalmolekylerna är viktiga vid regleringen av proliferation, migration och angiogenes. Angiogenes innebär nybildning av blodkärl. De här cellulära processerna är viktiga egenskaper för cancer-celler. Det har visat sig att S1P kan stimulera dessa processer i vissa cancerformer genom att aktivera S1PR 1. (13)

### 2.4.2 S1PR 2

Aktivering av S1PR 2 är specifik för olika sorters celler. S1PR 2 har i flera vävnader i människokroppen visat sig ha inhiberande effekter på cellulära processer såväl i normala celler som i cancer-celler. I vissa celler har en aktivering av S1PR 2 haft en inhiberande effekt på cellernas proliferation och migration. På vilket sätt S1PR 2 får till stånd denna inhiberande effekt är vävnadsspecifikt och kan ske genom aktivering eller inhibering av sekundära budbärare och

signalmolekyler. I vissa celler har S1PR 2-signalering lett till motsatta effekter där cellernas migration och överlevnad har främjats. Sammanfattningsvis är effekterna av S1PR 2-aktivering cellspecifik och beroende av hurdana signalmolekyler som aktiveras. (14)

### 2.4.3 S1PR 3

Då S1P binder S1PR 3 kan effekter som ökad kalciumfrisättning, proliferation och migration ses i cellerna. Receptorn har visat sig ha en främjande betydelse för vissa cancertumörers utveckling genom dessa effekter. Effekterna kan uppnås via olika signalrutter, till exempel genom aktivering av PI3K-Akt, Rac och PLC. (15)

### 2.4.4 S1PR 4 och 5

S1PR 4 och 5 uttrycks inte i lika hög grad som S1PR 1 till 3. De här receptorerna är de minst studerade av S1P receptorer och aktiveringen av dem verkar vara vävnadsspecifik (16). Sammanfattningsvis kan konstateras att S1P-receptorerna har en betydande roll för cellernas välmående och speciellt i cancer regleras betydelsefulla cellulära processer som avgör hur bra cancercellerna kan överleva, proliferera och migrera.

## 2.5 Glutation

Glutation är en tripeptid som består av aminosyrorna glutamin, cystein och glycin. Tripeptiden finns i alla levande celler och fysiologiska vätskor hos friska människor. Den kan antingen förekomma i reducerad form (90%) eller i disulfid-form (10%). Den största delen av glutatinet i cellerna finns i cytosolen (17). Denna molekyl deltar i viktiga cellulära processer, bland annat som kofaktor i olika biologiska reaktioner, vid detoxifiering av läkemedel, i syntesen av leukotriener och prostaglandiner, i produktionen av cytokiner och lagringen av cystein. Glutation är även en antioxidant som deltar i nedbrytningen av fria radikaler och förhindrar oxidation av olika biomolekyler.

Syntesen av glutation sker i cytosolen med glutamin, cystein och glycin som utgångsämnen. Genom två ATP-beroende enzymatiska reaktioner kommer cystein att konjugeras till glutamat så att dipeptiden gamma-glutamylcystein bildas. I den andra reaktionen adderas glycin till gamma-glutamylcystein vilket resulterar i bildningen av reducerat glutation. Efter detta kan glutatinet oxideras av fria radikaler eller enzymatiskt av glutation peroxidaser, eller så förblir tripeptiden i sin reducerade form. (18)



Koncentrationen av glutathion har visat sig vara relevant i flera sjukdomar, bland annat i olika cancerformer och andra sjukdomar som involverar oxidativ stress (19). Oxidativ stress är en stressituation som kan skapas i celler som utsätts för skador av fria radikaler. Bildningen av fria radikaler är en naturlig process i cellerna, men under en del förhållanden kan bildningen bli för stor, till exempel om celler utsätts för hypoxi, strålningsskador, vävnadsskador eller inflammation (20). Vid oxidativ stress ökar omvandlingen av reducerat glutathion till oxiderat glutathion. Ackumulering av den oxiderade formen är celltoxisk. Cancerceller utsätts för mycket oxidativ stress på grund av en hög metabolism. Därför gynnas cancercellerna av glutathion som fungerar som en antioxidant som kan minska risken för skador som uppstår i cellerna som följd av den oxidativa stressen. Det har visat sig att koncentrationen av glutathion ofta är högre i cancerceller jämfört med koncentrationen i friska celler. (21)

### **3 Avhandlingens målsättning**

LAPTM4B har påvisats vara överuttryckt i många cancerformer. Transmembranproteinet verkar ha förmåga att främja cancertumörers proliferation, invasion och metastasering. LAPTM4B kan göra tumörerna mera resistenta mot apoptos och läkemedel (22). S1P är en metabolit som påverkar cellsignalering på flera olika sätt. Även denna metabolit finns ofta i extra höga koncentrationer i cancerceller. Forskning har visat att S1P stimulerar cancercellers proliferation och migration.

Syftet med den här avhandlingen var att undersöka om LAPTM4B och S1P-signaleringen har interaktioner och tillsammans påverkar A431-cellers migration och glutathion-metabolism. Icke-publicerad forskning (Blom et al.) har visat att A431-celler som saknar LAPTM4B innehåller lägre halter av flera metaboliter som ingår i glutathionsyntesen jämfört med vild typs A431-celler, bland annat aminosyran cystein. I detta projekt ville vi därför undersöka om koncentrationerna av glutathion varierar i A431-celler beroende på om LAPTM4B är överuttryckt eller saknas i cellerna. Dessutom ville vi undersöka om stimulering av cellerna S1P inverkar på glutathionhalterna.

Specifika syften med denna avhandling var följande:

- 1) Undersöka om LAPTM4B modulerar uttrycket av S1P-receptorer 1 till 3.
- 2) Undersöka om LAPTM4B och S1P tillsammans påverkar A431-cellers migration.
- 3) Undersöka om överuttryck eller avsaknad av LAPTM4B påverkar A431-cellers glutat-ion-koncentration.

## 4 Material och metoder

### 4.1 Cellodling

I projektet användes fyra olika cellinjer av A431-celler, skivepitelkarcinomceller, som hade fåtts från Anatomiska enheten, Biomedicum, på Medicinska Fakulteten, Helsingfors Universitet (Blom et al). En cellinje var vild typs A431-celler, den andra var en knockout av LAPTM4B och i två cellinjer var LAPTM4B överuttryckt; BF-Flag och ATM3/BF-Flag. För mer information om framställningen av de olika cellinjerna, vänligen läs: (23), "Supporting Information". Cellerna odlades i odlingsmedium (bilaga 2) på 10 cm odlingskålar och förvarades i en vattenmättad atmosfär med 5% koldioxid och 95% luft i 37 grader Celsius, i en inkubator. Mediet byttes ut varannan dag och cellerna delades då de var ca 70% till 80% konfluenta. För att lösgöra cellerna från odlingskålen användes Trypsin EDTA (Bilaga 1).

### 4.2 Transfektion av celler

Under projektet transfekterades vild typs A431-celler med siRNA för att nedtysta S1P receptorer 2 och 3 som användes som kontroller för Western Blot vid undersökning av uttrycket av S1P-receptor 2 och 3. Fyra miljoner vild typs A431-celler transfekterades med specifika siRNA-molekyler (Bilaga 1), så att deras uttryck av S1PR 2 och 3 blev nedtystat i cellerna. Som kontroll transfekterades även två miljoner vild typs A431-celler med kontroll-siRNA (Bilaga 1) och de fungerade som referensceller. Transfektionen utfördes genom elektroporation vid 240 V och 975  $\mu$ F vilket fick cellmembranen att tillfälligt brytas ned så att siRNA-molekylerna kunde inkorporeras i cellernas genom. Efter elektroporationen överfördes cellerna till nytt medium och odlades i 24 timmar innan de användes för framställning av celllysats.

### 4.3 Framställning av cellysat

Cellysat framställdes genom att först aspirera bort det medium som cellerna vuxit i. Cellerna lades på is för att alla cellfunktioner skulle upphöra. Cellerna tvättades med Fosfatbuffrad saltlösning, PBS (Bilaga 1). PBS aspirerades sedan bort från odlingskålen och ca 150µl lysatbuffert (bilaga 2) tillsattes. Cellerna skrapades ner till kanten av odlingskålen och samlades upp i Eppendorf provrör som sedan centrifugerades med 13 000 rpm i 15 minuters tid. Supernatanten flyttades efter detta till ett rent Eppendorf provrör och en proteinkoncentrationsmätning utfördes. Till näst tillsattes Laemmli Sample Buffer (LSB) i cellysaten (bilaga 2). Replikaten kokades ett par minuter efter att LSB hade tillsatts. De färdiga cellysaten frystes ner i -20 grader Celsius för att senare kunna användas vid Western blot.

### 4.4 Western blot

För att undersöka uttrycket av S1P-receptorer 1 till 3 i LAPTM4B-knockout- och LAPTM4B-överuttryckande celler användes Western blot. Metoden går ut på att detektera specifika protein med hjälp av antikroppar. Först tillverkades två sorters 10% SDS-polyakrylamidgeler (SDS-PAGE), en övre och en nedre, med olika akylamid-koncentrationer och pH. Gelerna tillverkades enligt BioRad TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bilaga 1). Glasplattorna som användes var 1,5mm. I gelen laddades cellysaten beroende på proteinkoncentrationen så att varje brunn innehöll samma mängd protein. Proteinkoncentrationsmätningen utfördes med BCA Protein Assay Reagent Kit (Bilaga 1). För undersökning av S1PR 1 användes 10 µg protein och vid undersökningen av S1PR 2 och 3 användes 30 µg protein. Som proteinmarkör användes Page Ruler plus prestained protein ladder (Bilaga 1).

Under elektroforesen separerades proteinerna i lysaten från varandra. Som körbuffert användes 1 x TGS (Bilaga 1). Den elektriska spänningen vid elektroforesen var 300V. Efter elektroforesen överfördes proteinerna från polyakrylamidgelen till ett membran, BioRad TranBlot Turbo Mini-size LF PVDF Membrane. Överföringen utfördes med BioRad Trans-Blot Turbo Transfer System (Bilaga 1) och efter detta blockerades membranen i 5% fettfri mjölk tillsammans med Tris-buffrad saltlösning med 0,1% Tween (TBST). Blockeringen varade i en timme.

Det sista steget i Western Blot är immunoblotting. Här visualiseras proteinerna som man är

intresserad av genom att specifika, markerade antikroppar för proteinet binder till det. Efter blockeringen med mjölk tvättades membranet tre gånger med TBST och sedan inkuberades det med en primär antikropp över natten i temperaturen +4 grader Celsius. Följande dag tvättades membranet tre gånger med TBST och inkuberades sedan med en sekundär antikropp som binder till den primära antikroppens Fc-del. Den sekundära antikroppens koncentration var 1:3000. Den sekundära antikroppens roll är att visualisera antigen-antikroppskomplexet. Detta fås till stånd genom att den sekundära antikroppen är bunden till enzymet pepparrotsperoxidas (eng. Horseradish peroxidase, HRP) som vid kontakt med ECL-lösning (Bilaga 1), får till stånd en ljusreaktion som kan detekteras. Visualiseringen utfördes med BioRad ChemiDoc Touch Imaging System. Hsc70 (eng. Heat shock cognate 71 kDa protein) användes som laddningskontroll så att resultaten kunde normaliseras (Bilaga 1).

## 4.5 Migration

Migrationsexperiment utfördes i 6,5mm diameters Transwell kamrar med porstorleken 8  $\mu\text{m}$ . Membranen täcktes in med humant kollagen IV, 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  och fick sedan torka i laminarskåp över natten. Nästa dag blöttes kamrarna upp med serumfritt medium (Bilaga 2) i 37 grader Celsius i en timme innan experimentet påbörjades. Cellerna som användes i experimentet odlades i serumfritt medium i en dag innan experimentet sattes igång. Cellerna lades sedan i den övre kammaren i 200  $\mu\text{l}$  serumfritt medium. Mängden celler som användes var 10 000 celler per kammare. Som kemoattraktant tillsattes medium som innehöll LS-FBS med eller utan 100 nM SIP till den nedre kammaren. Den totala volymen var 800  $\mu\text{l}$ . Som proliferationsinhibitor användes 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Mitomycin C som tillsattes i både den övre och den nedre kammaren. Cellerna fick migrera i 16 timmar varefter celler som inte migrerat torkades bort med en bomullspinne. De migrerade cellerna fixerades i 2% paraformaldehyd i 10 min och färgades sedan under 5 min med 0,1% kristallviolett i 20% metanol. Membranen sköljdes efter detta i PBS och vatten och torkades. Cellerna räknades i mikroskop med 40 x förstoring (Bilaga 1).

## 4.6 Bestämning av glutatation koncentration

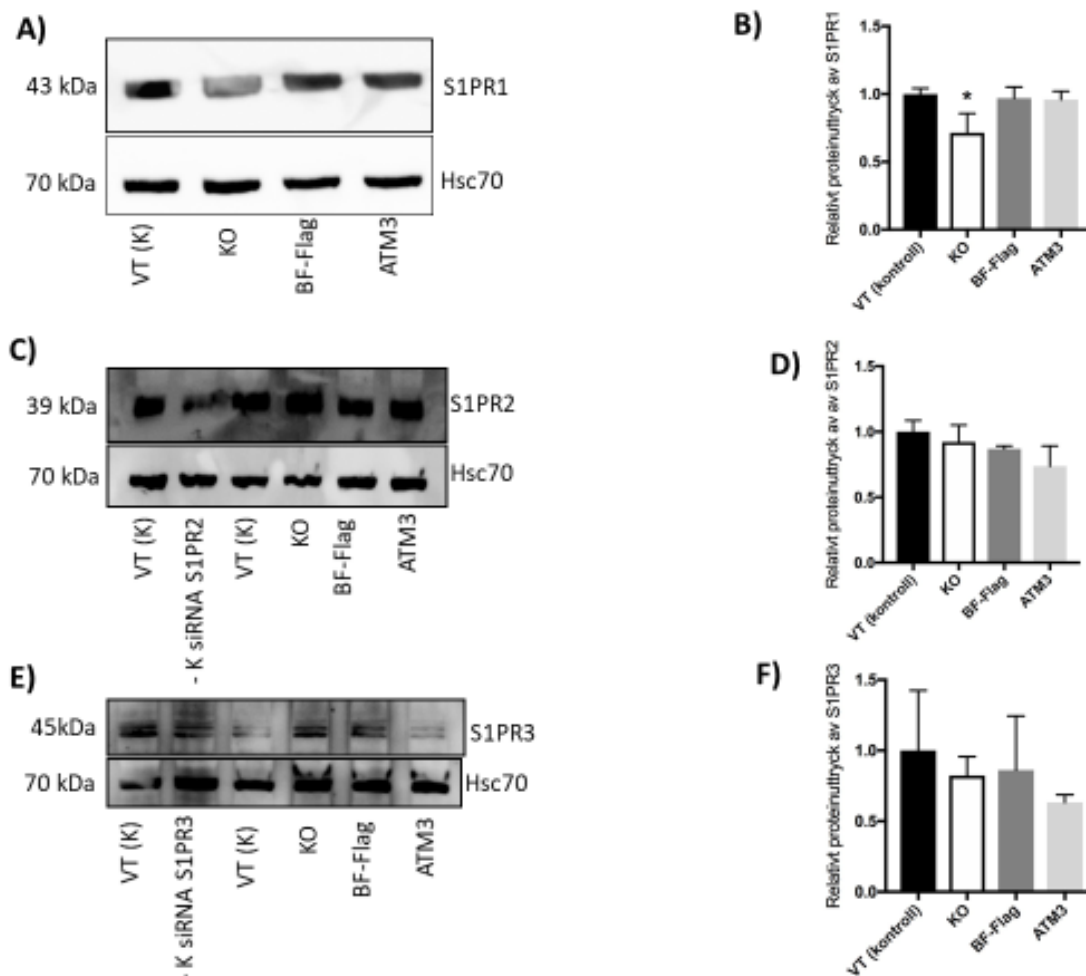
För att bestämma koncentrationen av metaboliten glutatation i cellerna användes Glutathione Assay Kit. Innan experimentet påbörjades fick cellerna växa i serumfritt medium i ett dygn. För experimentet användes 3,3 miljoner celler per cellinje. Först lösgjordes cellerna från odlings-

skålen med Trypsin EDTA och sattes i serumfritt medium. Cellerna räknades med en automatiserad cellräknare och volymen kunde sedan justeras så att det fanns 3,3 miljoner celler per cellinje. Cellerna tvättades med PBS och centrifugerades i 1ml PBS med 2400 rpm i två minuter. Efter detta mättes volymen av pelleten. Supernatanten aspirerades bort. Till pelleten adderades tre gånger pelletens volym av 5% Sulfosalicylsyra. För att stoppa alla cellfunktioner frystes cellerna ner i flytande kväve och tinades sedan upp i vattenbad med värmen +37 grader Celsius. Detta upprepades två gånger varefter cellproven fick vila fem minuter i +4 grader Celsius. Sedan centrifugerades proven på 10 000 x g i 10 minuter. Efter detta kunde proven användas för mätning av koncentrationen glutation i cellerna. Mätningarna utfördes enligt anvisningarna i Glutathione Assay Kit. Experimentet upprepades tre gånger och varje gång utfördes experimentet i duplikat.

## 5 Resultat

### 5.1 Proteinuttrycket av S1PR1 är signifikant lägre i LAPTM4B-knock-out A431-celler jämfört med vild typs A431-celler

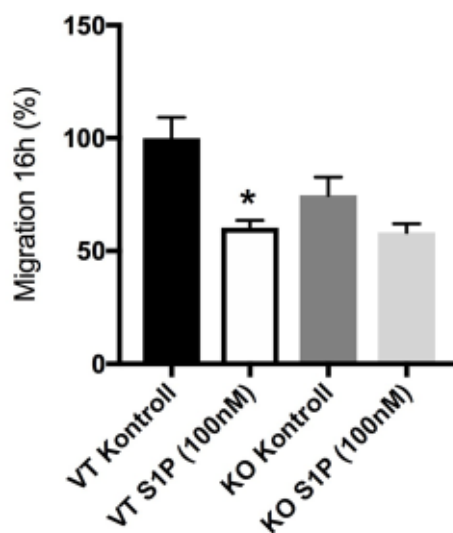
S1P-receptorer är kända för att ha en regulatorisk roll i cellmigration och proliferation. Proteinuttrycket av S1PR1, 2 och 3 undersöktes genom Western Blot-analys. I resultaten framkommer att LAPTM4B-knockout A431-celler har en nedreglering av S1PR1 jämfört med vild typens A431-celler. En signifikant skillnad i S1PR1-uttryck mellan BF-Flag- och ATM3-celler, som överuttrycker LAPTM4B, jämfört med vild typens A431-celler kunde inte detekteras (Figur 2, A-B). Då uttrycket av S1PR2 och S1PR3 undersöktes kunde inga signifikanta skillnader i uttrycket av receptorerna framkomma mellan de olika A431-cellinjerna (Figur 1, C-F).



**Figur 1. Undersökning av uttrycket av sfingosin 1-fosfat receptorer 1 till 3 i LAPTM4B-nedstade och -överuttryckta A431-celler.** Uttrycket av sfingosin 1-fosfat receptorer 1 till 3 undersöktes genom Western blot. Statistisk analys utfördes med One-Way Anova. Signifikansen anges med \* som representerar ett p-värde på  $\leq 0,05$ . Resultatet anges som medeltal + SEM (n=3). **A)** Representativt immunoblott för analys av S1PR1 i LAPTM4B-nedstade (KO) och LAPTM4B-överuttryckande (BF-Flag, ATM3) celler jämfört med referenscellerna (VT (K)). **B)** Kvantifierat proteinuttryck av S1PR1. **C)** Representativt immunoblott för analys av S1PR2 i LAPTM4B-nedstade (KO) och LAPTM4B-överuttryckande (BF-Flag, ATM3) celler jämfört med referenscellerna (VT (K)). Dessutom användes en negativ kontroll av siRNA-transfekterade vild typs A431-celler med nedstätt uttryck av S1PR2 (-K siRNA S1PR2). **D)** Kvantifierat proteinuttryck av S1PR2. **E)** Representativt immunoblott för analys av S1PR3 i LAPTM4B-nedstade (KO) och LAPTM4B-överuttryckande (BF-Flag, ATM3) celler jämfört med referenscellerna (VT (K)). Dessutom användes en negativ kontroll av siRNA-transfekterade vild typs A431-celler med nedstätt uttryck av S1PR3 (-K siRNA S1PR3). **F)** Kvantifierat proteinuttryck av S1PR3.

## 5.2 Sfingosin 1-fosfat har en inhiberande effekt på migrationen av A431-celler

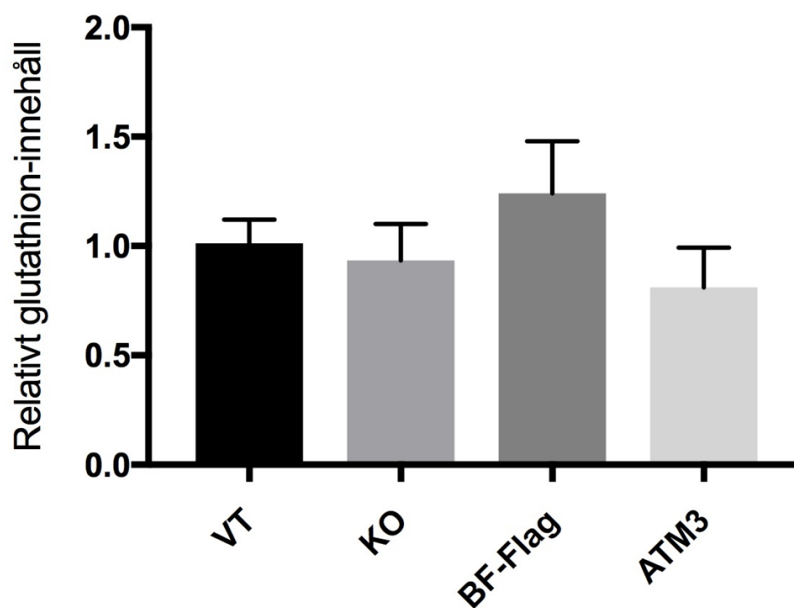
S1P har visat sig vara en viktig signalmolekyl för cellers migration (24). Beroende på vilken av receptorerna S1PR 1 till 5 som aktiveras kan effekten antingen vara pro-migratorisk eller anti-migratorisk. För att undersöka om nedstygning eller överuttryck av LAPTM4B inverkar på migrationen av A431-celler utfördes ett 16 timmars långt migrationsexperiment i Transwell-kamrar. Migrationsexperimentet kunde påvisa en signifikant minskning av migrationen i både vild typs A431-celler och LAPTM4B-knockout A431-celler efter att de hade stimulerats med 100nM S1P. Effekten var mindre i LAPTM4B-knockout celler jämfört med vild typs A431-celler.



**Figur 2. Undersökning av vild typs (VT) och LAPTM4B-knockout (KO) A431-cellers migration under stimulering med sfingosin 1-fosfat.** Migrationen varade i 16 timmar. Som kontroller användes vild typs (VT) och LAPTM4B-knockout (KO) A431-celler som inte stimulerades med S1P. Statistisk analys utfördes med One-Way ANOVA. Signifikansen anges med \* som representerar ett p-värde på  $\leq 0,05$ . Resultatet anges som medeltal + SEM (n=3).

### 5.3 LAPTM4B tenderar att öka glutathion koncentrationen i A431-celler

Glutathion är en metabolit som fungerar i så gott som alla celler, bland annat som antioxidant. Metaboliten hittas ofta i högre koncentrationer i cancerceller, vilket kan förklaras av den oxidativa stressen som cancercellerna utsätts för (25). Eftersom icke-publicerad forskning (Blom et al.) har visat att LAPTM4B-knockout celler innehåller lägre koncentrationer av metaboliter som behövs för glutathion-syntesen, fanns det intresse för att undersöka den egentliga halten av glutathion i LAPTM4B-knockout A431-celler jämfört med vildtyps- och LAPTM4B-överuttryckande A431-celler. Resultaten mättes i nanomol glutathion per 1 miljon celler. LAPTM4B-knockout A431-celler har en tendens till lägre halter glutathion än vildtyps A431-celler, vilken inte var statistiskt signifikant. Samtidigt har celler som överuttrycker vildtyps LAPTM4B (BF-Flag) högre halter av glutathion. Överexpression av en inaktiv LAPTM4B mutant har ingen effekt på glutathion. (Figur 3)



**Figur 3. Mätning av glutathion-halten i A431-celler med nedtystat och överuttryckt LAPTM4B.**

Med hjälp av Glutathione Assay Kit (Bilaga 1) mättes halten av metaboliten glutathion i vild typs (VT), LAPTM4B-knockout (KO), och LAPTM4B-överuttryckande (BF-Flag och ATM3) A431-celler. Statistisk analys utfördes med One-Way ANOVA. Resultaten anges som medeltal + SD (n=3).



## 6 Diskussion

### 6.1 LPTM4B modulerar uttrycket av S1P receptorer

I Western Blot experimentet framkom inga signifikanta skillnader i uttrycket av S1P receptorer i de olika cellinjerna, förutom att S1PR1 uttrycks mindre i LPTM4B-knockout celler jämfört med A431-vildtyps celler. Orsaken till detta kunde möjligtvis bero på att LPTM4B reglerar uttrycket av S1PR1 genom att öka endocytosen av receptorn från cellmembranet och främja nedbrytningen av receptorn i intracellulära vesikler. I de flesta celler har man kunnat se att S1PR1 har en stimulerande effekt på cellers migration (26). I detta projekt visade migrationsexperimenten att LPTM4B-knockout celler migrerade mindre än LPTM4B-överuttryckande celler och detta stämmer därför överens med att S1PR1-uttrycket är minskat i LPTM4B-knockout celler. Den här undersökningen stöder därför hypotesen om att S1PR1 har en pro-migratorisk effekt.

### 6.2 Migration

Eftersom S1P bromsade ner migrationen av A431-celler, både de som saknade LPTM4B och de som överuttryckte LPTM4B, skulle man kunna anta att effekten fås genom en aktivering av S1PR2 som har visat sig ha en anti-migratorisk effekt i flera celler (27). I Western Blot framkom dock inte att S1PR2 skulle ha uttryckts extra starkt i någon cellinje och därför verkar det även logiskt att den allmänna trenden för så väl LPTM4B-knockout- som LPTM4B-överuttryckande celler var att S1P-stimulering hade en inhiberande effekt på migrationen. Att effekten var mindre i LPTM4B-knockout celler jämfört med A431-vild typs celler skulle kunna bero på att LPTM4B-knockout celler antagligen redan från början innehåller högre endogena koncentrationer av S1P än vild typs A431-celler (Blom et al, opublicerat). Studier har visat att LPTM4B deltar i frisättningen av ceramid från sena endosomer (28) och om LPTM4B är nedtystat i celler ackumuleras ceramiden i de sena endosomerna. Ceramid kan brytas ned till S1P via flera reaktionsmellansteg och detta kunde förklara varför A431-celler med avsaknad av LPTM4B har en lägre endogen koncentration av S1P jämfört med vildtyps A431-celler.

### 6.3 LAPTM4B påverkar upptaget av metaboliter som behövs för glutationsyntesen

I glutationexperimentet framkom att LAPTM4B-överuttryckande celler innehåller högre halter glutation jämfört med LAPTM4B-knockout celler. Den här effekten skulle kunna bero på att LAPTM4B deltar i regleringen av import och export av vissa aminosyror som behövs som metaboliter vid syntesen av glutation. Tidigare studier har visat att lysosomalt LAPTM4B krävs för aktiveringen av vissa aminosyratransportörer i lysosomerna och därför har en central roll då det gäller cellernas upptag av olika metaboliter (29).

Icke-publicerade forskningsresultat (Blom et al) har visat att LAPTM4B-knockout celler innehåller lägre koncentrationer av vissa metaboliter som behövs i glutationsyntesen, till exempel kunde man se att LAPTM4B-knockout celler innehöll lägre intracellulära halter av aminosyran cystein som är en av aminosyrorna som bygger upp tripeptiden glutation. Hypotesen är att då LAPTM4B inte finns närvarande blir intaget av cystein mer begränsat och därför bildas inte lika mycket glutation i cellen.

### 6.4 Svagheter i projektet

Uttrycket av S1P-receptorer 1 till 3 undersöktes genom Western Blot som är en metod med flera mellansteg som alla kräver specifika beaktanden. Om membranerna inte blockeras tillräckligt länge innan den primära antikroppen appliceras på membranet eller om membranerna inte tvättas ordentligt mellan två olika faser av experimentet kan slutresultaten påverkas och bli otydliga. Antikroppen för S1PR3 var en polyklonal antikropp vilket gav mer svårtolkade resultat. Även antikroppen för S1PR2 gav flera gånger otydliga resultat och var svår att visualisera. Ovannämnda faktorer bidrog till att Western Blot resultaten gav en hel del variation och man kunde tänka sig att resultaten inte blev signifikanta på grund av detta.

Resultaten för migrationsexperimentet innehöll mycket variation och detta kan eventuellt förklaras med att cellerna som hade migrerat räknades manuellt under mikroskop och ibland fastnade celler som inte hade migrerat på membranet. Detta kan ha varit missvisande vid cellräkningen. Att ATM3 och BF-Flag innehåller mycket varierande halter glutation kan bero på hur ATM3-cellinjen har framställts.

## 6.5 Slutsatser och framtida visioner

Detta forskningsprojekt stöder hypotesen om att LAPTM4B och sfingosin-metaboliter har interaktioner i celler då det gäller cellsignalerings. Resultaten som framkommer i projektet understöder att LAPTM4B har en främjande effekt på cancercellers migration och syntes av glutat-ion. På basen av resultaten som har fåtts från det här projektet kan man i framtiden fortsätta undersöka interaktionerna mellan S1P-receptorer och LAPTM4B.

Resultaten som man fick från glutatationexperimentet kan tillämpas för att i framtiden undersöka mer specifikt i vilka steg av glutatationsyntesen som LAPTM4B har en reglerande verkan. Det vore intressant att mäta den cytosoliska halten av aminosyran cystein i LAPTM4B-knockout celler och jämföra resultaten med halten i LAPTM4B-överuttryckande celler. Det vore även bra att upprepa samma sorters experiment som ingick i detta projekt med flera olika typers cancerceller utöver skivepitelskarcinomceller för att undersöka om resultaten är de samma.

## **7 Tillkännagivande**

Jag vill tacka professor Kid Törnqvist och Minerva Foundation Institute for Medical Research på Biomedicum, Helsingfors för att jag fick möjligheten att arbeta med detta projekt under sommaren 2019. Jag vill tacka professor Törnqvist för att ha gett mig möjligheten till att få en inblick i forskningsvärlden och forskning på cellnivå som var totalt obekant för mig då projektet påbörjades. Tack för en mycket god handledning under projektets gång.

Jag vill även tacka docent Tomas Blom från Helsingfors Universitets anatomiska enhet som vi samarbetade med under sommaren och som gav mycket god handledning åt mig under hela projektets gång. Tack vare samarbetet hade jag tillgång till det material som behövdes för att kunna utföra projektet.

Ett stort tack till mina arbetskamrater Muhammad Yasir Ashgar och Taru Lassila som introducerade mig till allt praktiskt laboratoriearbete som jag utförde under sommaren och för all övrig handledning och motivation ni gav mig.

## Källförteckning

- (1) Meng Y, Wang L, Chen D, Chang Y, Zhang M, Xu JJ, Zhou R, Zhang QY. LAPTM4B: an oncogene in various solid tumours and its functions. *Oncogene* 2016, Dec 15;35(50):6359-6365.
- (2) Blom T, Li S, Dichlberger A, Back N, Kim YA, Loizides-Mangold U, et al. LAPTM4B facilitates late endosomal ceramide export to control cell death pathways. *Nat Chem Biol* 2015 October 01;11(10):799-806.
- (3) Desideri E, Ciccarone F, Ciriolo MR. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients* 2019 August 16;11(8):10.3390/nu11081926.
- (4) Kaikki syövästä. Available at: <https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/syopataudit/ihosyopa/>. Accessed 23.10.2019; 2019.
- (5) Kumar V, Abbas A.A., Aster J.C. Robbins Basic Pathology. Upplaga 10. Philadelphia, Pennsylvania. Elsevier; 2018
- (6) Duodecim Terveyskirjasto [Internet]. Ihon okasolusyöpä. Available at: [https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00674](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00674). Accessed 23.10.2019; 2019.
- (7) Meng Y, Wang L, Chen D, Chang Y, Zhang M, Xu JJ, Zhou R, Zhang QY. LAPTM4B: an oncogene in various solid tumours and its functions. *Oncogene* 2016, Dec 15;35(50):6359-6365.
- (8) Blom T, Li S, Dichlberger A, Back N, Kim YA, Loizides-Mangold U, et al. LAPTM4B facilitates late endosomal ceramide export to control cell death pathways. *Nat Chem Biol* 2015 October 01;11(10):799-806.
- (9) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (10) Maceyka M, Rohrbach T, Milstien S, Spiegel S. Role of Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate Axis in Hepatocellular Carcinoma. *Handb Exp Pharmacol* 2019 July 19.
- (11) Maceyka M, Rohrbach T, Milstien S, Spiegel S. Role of Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate Axis in Hepatocellular Carcinoma. *Handb Exp Pharmacol* 2019 July 19.

- (12) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (13) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (14) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (15) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (16) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (17) Desideri E, Ciccarone F, Ciriolo MR. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients* 2019 August 16;11(8):10.3390/nu11081926.
- (18) Desideri E, Ciccarone F, Ciriolo MR. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients* 2019 August 16;11(8):10.3390/nu11081926.
- (19) Hanko M, Svorc L, Plankova A, Mikus P. Overview and recent advances in electrochemical sensing of glutathione - A review. *Anal Chim Acta* 2019 July 25;1062:1-27.
- (20) Kumar V, Abbas A.A., Aster J.C. *Robbins Basic Pathology*. Upplaga 10. Philadelphia, Pennsylvania. Elsevier; 2018
- (21) Desideri E, Ciccarone F, Ciriolo MR. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients* 2019 August 16;11(8):10.3390/nu11081926.
- (22) Meng Y, Wang L, Chen D, Chang Y, Zhang M, Xu JJ, Zhou R, Zhang QY. LAPT4B: an oncogene in various solid tumours and its functions. *Oncogene* 2016, Dec 15;35(50):6359-6365.
- (23) Zhou K, Dichlberger A, Martinez-Seara H, Nyholm TKM, Li S, Kim YA, et al. A Ceramide-Regulated Element in the Late Endosomal Protein LAPT4B Controls

Amino Acid Transporter Interaction. ACS Cent Sci 2018 May 23;4(5):548-558.

- (24) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (25) Desideri E, Ciccarone F, Ciriolo MR. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients* 2019 August 16;11(8):10.3390/nu11081926.
- (26) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (27) Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Tornquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018 November 01;1865(11 Pt B):1668-1677.
- (28) Blom T, Li S, Dichlberger A, Back N, Kim YA, Loizides-Mangold U, et al. LAPT4B facilitates late endosomal ceramide export to control cell death pathways. *Nat Chem Biol* 2015 October 01;11(10):799-806.
- (29) Milkereit R, Persaud A, Vanoaica L, Guetg A, Verrey F, Rotin D. LAPT4B recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation. *Nature Communications* 2015, 7250.

## Bilaga 1

### Material

Mikroskop, Axiovert 40 C	Carl Zeiss, Germany
Elektroporationsapparat	Gene Pulser Xcell, USA
BioRad TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit	BioRad, Singapore
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Fisher Scientific
TranBlot Turbo Mini-size LF PVDF Membrane	BioRad, Singapore
Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad, Singapore
ChemiDoc Touch Imaging System	BioRad, Singapore
Glutathione Assay Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Transwell kamrar	Corning Inc.; Corning, NY, USA
TC 20 TM Automated Cell Counter	BioRad, Singapore

### Kemikalier:

Beta-merkaptoetanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromfenol blå	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM-medium, låg glukoshalt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FAF (serumfritt medium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetalkalvserum (FBS)	Gibco, Grand Island, NY, USA
Fettfritt mjölkpulver	Valio, Helsingfors, Finland
Glycerol	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kollagen IV	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-glutamin	Gibco, Grand Island, NY, USA
Metanol	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Mitomycin C	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumklorid	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA



NP-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Page Ruler plus prestained protein ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Grand Island, NY, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Puromycin	Gibco, Grand Island, NY, USA
Sfingosin 1-fosfat	Biomol, Plymouth, PA, USA
Sulfosalicyl syra 5%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS	Fisher Scientific, Geel, Belgium
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-klorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Western lightning plus-ECL-kit	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

### **Primära antikroppar:**

Kanin anti-S1PR1	Abcam
Kanin anti-S1PR3	Santa Cruz
Mus anti-S1PR2	Santa Cruz
Råtta anti-Hsc70	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA

### **Sekundära antikroppar:**

HRP-konjugerad anti-mus	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)
HRP-konjugerad anti-råtta	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)
HRP-konjugerad get-anti-kanin	Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)

### **siRNA:**

siKontroll	TAG, Copenhagen, Denmark
siS1PR2	TAG, Copenhagen, Denmark
siS1PR3	TAG, Copenhagen, Denmark

## Bilaga 2

### Recept

#### Odlingsmedium:

Cellinje	Medium
Vild typ A431	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM (eng. Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium), låg glukoshalt</li> <li>• 10% kalvserum (FBS, eng. Fetal Bovine Serum)</li> <li>• 1% L-glutamin</li> <li>• 1% Penicillin-Streptomycin</li> </ul>
Knockout LAPTM4B, A431	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM, låg glukoshalt</li> <li>• 10% kalvserum</li> <li>• 1% L-glutamin</li> <li>• 1% Penicillin-Streptomycin</li> </ul>
ATM3/BF-Flag, A431	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM, låg glukoshalt</li> <li>• 10% kalvserum</li> <li>• 1% L-glutamin</li> <li>• 1% Penicillin-Streptomycin</li> <li>• 1 ug/ml Puromycin</li> </ul>
BF-Flag, A431	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM, låg glukoshalt</li> <li>• 10% kalvserum</li> <li>• 1% L-glutamin</li> <li>• 1% Penicillin-Streptomycin</li> <li>• 1 ug/ml Puromycin</li> </ul>

**Serumfritt medium:**

- DMEM, låg glukoshalt
- 0,2% FAF
- 1% Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin

**Lysatbuffert**

- 10mM Tris
- 150mM Natriumklorid
- 7mM EDTA
- 0,5% NP-40, pH 7,7
- Proteasinhistorer: 0,2mM PMSF, 0,5ulg/ml leupeptin

**3 x Laemmlibuffert (LSB):**

- 30% Glycerol
- 3% SDS
- 0,1875M Tris-klorid, pH 6,8
- 0,015% 1ml Bromfenol blå
- 3% Beta-merkaptotanol
- H<sub>2</sub>O

**1 x TBST**

- 10 x TBST     100 ml
- H<sub>2</sub>O            900 ml
- Tween 20       1 ml

**10x Fosfatbuffrad saltlösning (PBS)**

- NaCl
- KCl
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- MQ Water
- pH: 7,4

**Antikroppar:**

<b>Receptor</b>	<b>Primär antikropps koncentration</b>	<b>Sekundär antikropp</b>
<b>S1PR1</b>	1:500	Kanin
<b>S1PR2</b>	1:500	Mus
<b>S1PR3</b>	1:500	Kanin
<b>Hsc70</b>	1:5000	Råtta