



MÄLARDALENS HÖGSKOLA
Institutionen för biologi
och kemiteknik
Box 325, 631 05 Eskilstuna

Effekter av vanadin föreningar på fosfatas i olika celler

Helaleh Hamidi

Examensarbete, 15hp, avancerad nivå
Ämne: Biologi/Kemiteknik
Handledare: Dr. Magnus Neumüller
Examinator: Pr. Carl Pålsson

1. SAMMANFATTNING

Enligt tidigare undersökningar har vanadinföreningar visat sig ha insulinliknande effekter både *in vitro* och *in vivo*.⁶

Syftet med detta examensarbete var att prova ut en teknik för att testa effekten av vanadinföreningar på två olika celltyper: adherenta celler (AA-celler) och suspensionsceller (K562-celler).

När insulinet binder till sin receptor på cellytan är det starten på en biologisk respons. Insulinreceptorn är ett tyrosinkinase som transporterar fosfatgrupper från ATP till tyrosin på sin egen peptidkedja. De aktiverade tyrosinkinase-receptorerna kan aktivera ett antal signalmolekyler, bland annat proteinkinase B. Tyrosin som är fosfolyserat, defosfolyseras senare av proteinet tyrosinfosfatase (PTP). Insulinets signaleringsvägar är kontrollerade av omvändbara fosforeringsreaktioner. Patogenes av insulinresistens i typ 2-diabetes och övervikt är sammanlänkade av den normala signaleringens responsen till insulin.

I denna studie undersöktes effekten av vanadat och ett antal ligander som bildar komplex med vanadat. Den största vikten lades vid att undersöka vilka koncentrationer av ämnena som var icke-toxiska vid cellodling och därmed inte leder cellerna till apoptos.

Först testades att föreningarna inte gav ändring i pH. Därefter testades deras effekter på celler. Med endast vanadat observerades celltoxiska effekter vid koncentrationer över $1\mu\text{M}$. I nästa steg behandlades AA-cellerna med fyra olika koncentrationer av vanadat tillsammans med olika ligander. K562-celler behandlades bara med vanadat och ligand 2. Resultaten visar att koncentrationer upp till och med $1\mu\text{M}$ vanadat inte hade några negativa effekter på cellerna. Varken apoptos eller onormal minskning i antal celler observerades.

Slutligen testades effekter av vanadinföreningarna på PTP-aktiviteten i odlade celler. I kitet som användes fanns detektorn "Green Reagent" som kan identifiera fritt fosfat genom färgändring från gul till grön. Cellerna behandlades med vanadat och efter 24 timmar gjordes en cellextraktion. Cellextrakten späddes 10 gånger, sedan tillsattes detektorn Green Reagent efter 15 min. Analys gjordes med hjälp av en Elisa-läsare. Resultaten visar att med ökande koncentration av vanadat påverkades cellerna så att PTP-aktiviteten ökades.

Detta är ett intressant resultat i ljuset av att vanadat rapporteras ha insulinliknande effekt. En tänkbar förklaring är att defosforeringen av insulinreceptorn krävs för att aktivera insulinresponsen i celler.

Innehållsföreteckningar

1. SAMMANFATTNING	2
2. INTRODUKTION	4
2.1 Insulin	4
2.2 Effekter av insulin och Typ 2-diabetes	4
2.3 Insulinreceptorn och respons mekanismen.....	4
2.4 Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B).....	5
2.5 Vanadater	6
3. MATERIAL OCH METODER	7
3.1 Material	7
3.2 Metod	9
4. RESULTAT OCH DISKUSSION.....	11
4.1 Resultat	11
4.2. Diskussion	18
<i>Referensföreteckning.....</i>	19

2. INTRODUKTION

2.1 Insulin

Hormonet insulin är ett protein uppbyggt av två kedjor av aminosyror. Hos människan, liksom hos övriga däggdjur, bildas insulinet i de langerhanska öarna i pankreas (bukspottskörteln). De langerhanska öarna består till största delen av Beta-celler som producerar insulin.⁹

2.2 Effekter av insulin och Typ 2-diabetes

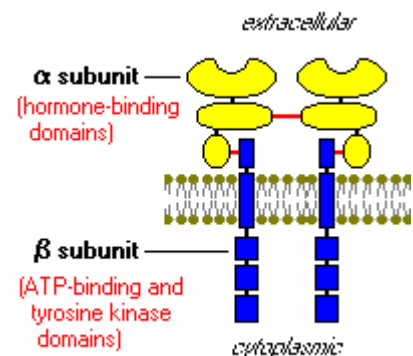
Insulin har många effekter på kroppens olika celler. Dess huvudsakliga uppgift är att sänka blodsockerhalten. Detta märks redan några minuter efter en insulininjektion. Insulinsignalen ökar upptaget av glukos i framför allt muskelcellerna. Insulinets effekter på dels muskel och fettceller men också leverceller kommer alltså att bidra till en sänkning av blodsockerhalten. Insulin är en nyckelspelare i kontrollen av intermediär metabolism. Den har betydande effekter på både kolhydrat- och lipidmetabolism, och klara effekter även på protein och mineralmetabolism. Följaktligen har fel i insulinsignalering allvarliga effekter på många organ och vävnader.¹

Typ 2-diabetes är den vanligaste formen av diabetes (ca 90 %), i vilken man drabbas av insulinresistens. Cellerna tar inte upp glukos och blodsockervärdet ökar, det kommer mer insulin från pankreas men det räcker inte till. Typ 2 karakteriseras av att kroppens olika celler blir mindre känsliga för insulin.⁹

2.3 Insulinreceptorn och respons mekanismen

Insulinreceptorer finns på ytan av de flesta celler och de är stora proteinmolekyler som består av två delar som binds samman av svavelbryggor (Bild 1). Alfa-enheten sticker ut från cellytan och beta-enheten sticker ner inuti cellen.²

Insulinreceptorn är ett tyrosinkinase. Med andra ord kan man säga att den fungerar som ett enzym som överför fosfatgrupper från ATP till tyrosin. När insulinet binder till sin receptor på cellytan, är det starten på en kedja av händelser. Bindning av insulin till alpha-subenheter får beta-subenheter att fosforylera sig själva (autofosforylering), vilket aktiverar den katalytiska aktiviteten hos receptorn. Den aktiverade receptorn fosforylerar sedan ett antal intracellulära proteiner, vilket förändrar deras aktivitet och genererar en biologisk respons.⁷



B
Bid1: Insulinreceptorn⁷

Flera intracellulära proteiner har identifierats som fosforyleringssubstrat för insulinreceptorn.

2.5 Vanadater

Vid typ 2-diabetes (även kallad icke-insulinberoende diabetes) bildas insulin, men känsligheten för insulin är minskad. Därför räcker inte insulinet till för att hålla blodsockret i balans. Vanadinföreningar, där vanadin kan ha olika oxidationstal, har visat sig ha insulinliknande effekter. Denna effekt upptäcktes så tidigt som 1899⁶.

I vår studie användes vanadin i sitt högsta oxidationstal, +5. Sådana vanadinföreningar kallas vanadater.

Hur vanadinföreningar fungerar och vilka effekter de har för att imitera eller förstärka insulinet, är inte totalt utrett men det är säkert att funktionen hos många viktiga enzymer förändras. Vanadinföreningar har många positiva effekter, men även oönskade effekter kan uppkomma. Detta kan orsaka besvärliga följdverkningar eller förgiftningssymptom. För att lösa sådana problem och för att förhindra oönskade reaktioner vid behandling av vanadinföreningar, behövs ytterligare undersökningar. Man kan leta efter lämpliga föreningar som kan binda till vanadinet och på så sätt förhindra olämpliga reaktioner mellan vanadin och oönskade enzymer.¹⁰

I denna studie har vi undersökt effekten av några sådana kandidatföreningar på celler.

3. MATERIAL OCH METODER

3.1 Material

AA-celler (Melanomceller)*

K562-celler (chronic myelogenous leukemia, bone marrow)*

DMEM (Dulbecco s Modified EAGLE medium medium)

L-glutamin

Penicillin/Streptomycin

FCS (Fetal Kalv Serum)

Na₂HPO₄

NaH₂PO₄

NaCl

dH₂O

Trypsin

Tryptan blue

PBS (buffert)

RIPA (buffert)

Hepes

NaOH

HCl

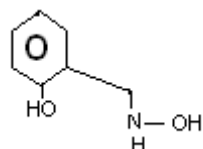
KMnO₄ (kaliumpermanganat)

Vanadat (H₂VO₄⁻)

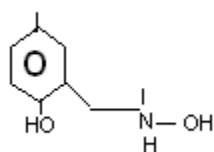
NH₂OH, HCl

H₂O₂

Ligand 1 (2-hydroxyaminomethylphenol) **



Ligand 2 (2-hydroxyaminomethyl-4-methylphenol) **



Instrument

pH-meter

Autoklav

Laf- bänk

Elisa Läsare

Ljuskroskop

Stereomikroskop

Centrifug

Haemocytometer

Skåpinkubator

Bordscentrifug 5417R eppendorf microcentrifuge

Ordinarie laboration utrustning

*isolerade vid Karolinska Sjukhuset i Stockholm

**syntetiserad av Sarah Augus-Dunne, kemilaboratoriet Mälardalens Högskola

Medium

Preparation av brukslösningar till cellodling

DMEM Dulbecco s Modified EAGLE medium, 500 ml, Invitrogen Life technologies
Till 500 ml medium tillsattes 50 ml totalt kalvserum (FCS), 5 ml penicillin/streptomycin och 5 ml L-glutamin.

Trypsin lösning

1 g trypsin löstes upp i 250 ml PBS och sterilfilterades och portionerades ut i 5 ml i 15 ml centrifugerör och frystes in.

PBS buffert, 500ml

Lösning A: 0,2 M NaH_2PO_4

Lösning B: 0,2 M Na_2HPO_4

4,75 ml A+20, 25ml B+4,5g NaCl blandades och sedan tillsattes vatten tills en volym av 500 ml uppnåddes. Lösningens pH-värde justerades till 7.4 och lösningen autoklaverades sedan.

RIPA-buffert enligt Santa Cruze Protokoll

1% igepal CA-630	1,0 ml
0,5 % sodiumdeoxycholate	0,5 ml
0,1 % SDS	0,1 ml
PBS	99,0 ml

Inhibitor 10 mg/ml PMSF i isopropanol, 10 μl /ml RIPA, tillsattes strax innan användning

Protein Tyrosine Posphatase 1B Assay Kit, Colorimetric Cat. No.539736 Calbiochem⁸

Kiten består av:

- Protein Tyrosin Phosphatase 1B, human, Recombinant, Cat.No.KP8401.
- PTP1B Substrate (EGFR residues 988-998), Cat No.KP8402.
- Assay Buffer, Cat No.KP8403.
- Green Reagent, Cat.No.KP8404.
- Phosphate Standard, Cat.No. KP8405.
- RK-682 inhibitor, Cat.No.KP8406.
- BSA (Bovine Serum Albumin), Cat.No.KP8407
- ½ Volum plate, Cat.No.KP8408

3.2 Metod

3.2.1 Cellodling³

Cellerna odlades i 50 ml odlingsflaskor i DMEM medium och inkuberades i 37°C. AA-celler spetsades när de uppnått ca 80 % konfluens.

K-562-celler räknades dagligen och spittades när antalet blev $3 \times 10^6 / \text{mm}^3$. Lösningar av olika vanadinföreningar gjordes i hepes (10 mM). Sedan justerades pH till 7,3. Effekten av alla föreningar på pH i mediet testades för att se om de inte gav ändring i pH. Hela processen gjordes sterilt i laf- bänk och alla substanser steriliserades innan cellbehandlig.

3.2.2- Behandling med Vanadat

AA-celler odlades till 70 % konfluens. Olika koncentrationer av vanadat testades på cellerna (tabell1). Syftet var att identifiera vid vilken koncentration vanadat blev toxiskt.

Tabell 1 Koncentrationer av vanadat i olika flaskor med AA-celler

Flaska (nr.)	Koncentration (μM)
1	10
2	1
3	0,1
4	1
5 (Kontroll)	0

Cellerna observerades med hjälp av mikroskop efter 0, 3, 6, 24 och 48 timmar. I nästa steg togs den högsta koncentrationen bort, då denna hade en apoptotisk effekt på cellerna. Experimenten fortsattes sedan med övriga fyra utvalda koncentrationer av vanadat och vanadat tillsammans med ligander.

3.2.3 Effekter av vanadat på celltillväxt och morfologi

Tabell 2 visar en lista på de utvalda substanser som användes på AA-celler och K562-celler. Vanadat blandades med ligand i förväg, komplexbildningen med liganderna är mycket snabb Cellerna odlades i 50 ml medium och behandlades med 50 μM substans.

Tabell 2 Substans lista

Vanadat	Ligand
H_2VO_4^-	-
H_2VO_4^-	NH_2OH , HCl
H_2VO_4^-	H_2O_2
H_2VO_4^-	Ligand1 (2-hydroxyaminomethylphenol)
H_2VO_4^-	Ligand2 (2-hydroxyaminomethel-4-methylphenol)

AA-celler observerades med hjälp av mikroskop efter 0, 3, 6, 24 och 48 timmar.
K562-celler observerades och räknades efter 6, 18 och 24 timmar.

3.2.4 Effekt av Vanadat på PTP 1B aktiviteten i celler

Steg 1- lysering av celler

RIPA-buffert gjordes enligt recept och användes för att lysera celler.

RIPA extraktion av AA-celler

Mediet togs bort från odlingsflaskorna och cellerna tvättades en gång med 2 ml iskall PBS.
Sedan tillsattes 500 µl iskall RIPA buffert+ PMSF till varje flaska. Flaskorna inkuberades på isbädd i fem minuter och vickades under tiden.
Cellerna skrapades loss från flaskbotten och extraktet överfördes till ett eppendorfsrör.

Preparation av RIPA extrakt av K562-celler

Cellerna centrifugerades ner vid 300g. i fem minuter och tvättades en gång med 2 ml PBS.
Sedan togs varje pellet upp i 500µl iskall RIPA buffert +PMSF.

Steg 2- PTP 1B aktivitets mätningar⁸

I det här steget användes ett kit för PTP1B aktivitetsmätning. I kiten fanns detektorn ”Green Reagent” som kan identifiera fritt fosfat genom färgändring från gul till grön.

Först gjordes en standardkurva för att prova effekten av detektorn ”Green Reagent” på fosfatstandard enligt kit manualen.⁸

Sedan gjordes en PTP1B tidskurva för att prova påverkan av tid på effekten av enzymet.⁸
AA-celler odlades, och extraherades med RIPA buffert som tidigare beskrivits.

Cellextrakt späds 10 gånger innan prövning. Sedan tillsattes PTP 1B. Proven togs efter 0, 3, 6, 9, 12 och 15 minuter.

Slutligen undersöktes effekten av vanadat behandling på PTP aktiviteten i odlade celler.
Cellerna (AA-celler och K562-celler) lyserades 24 timmar efter behandling med vanadat.
Cellextrakt gjordes och späddes 10 gånger. Reaktionen avslutades efter 15 min med tillsättning av Green Reagent.

4. RESULTAT OCH DISKUSSION

4.1 Resultat

I början av studien testades föreningarnas effekt på pH. Resultaten visar att vanadat tillsammans med de utvalda liganderna inte hade några effekter på PH.

Effekter av vanadat på cellmorfologi och tillväxt

Arbetet kom till stor del att gå ut på att hitta rätt koncentrationer av våra vanadatföreningar. Inverkan av olika koncentrationer av vanadat på cellerna undersöktes. Mikroskopering av cellerna visade att den högsta koncentration av vanadat var toxisk för cellerna. Många celler visade apoptotisk morfologi efter 24 timmar. I kontrollflaskan var cellerna normala. Efter 48 timmar fanns det inga levande celler i flaska 1 (10 μ M vanadat). Liknande resultat sågs med K-562-celler. Så koncentrationen över 1 μ M av vanadat hade apoptoteska effekter (bild 4 & 5). medan de behandlade cellerna (AA-celler och K-562) växte normalt vid koncentration under 1 μ M och ingen onormal celldöd kunde observeras.

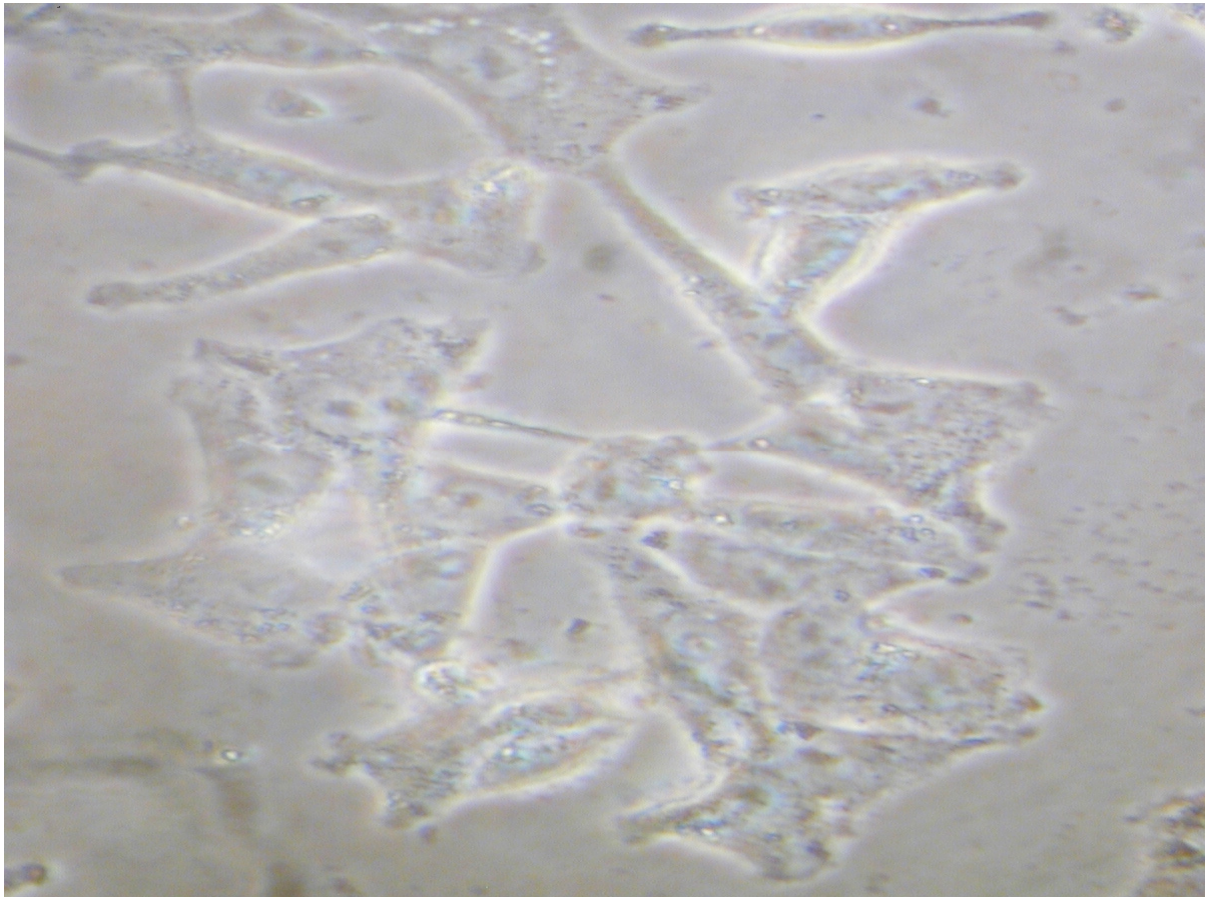


Bild 4- Normala AA-celler innan behandling

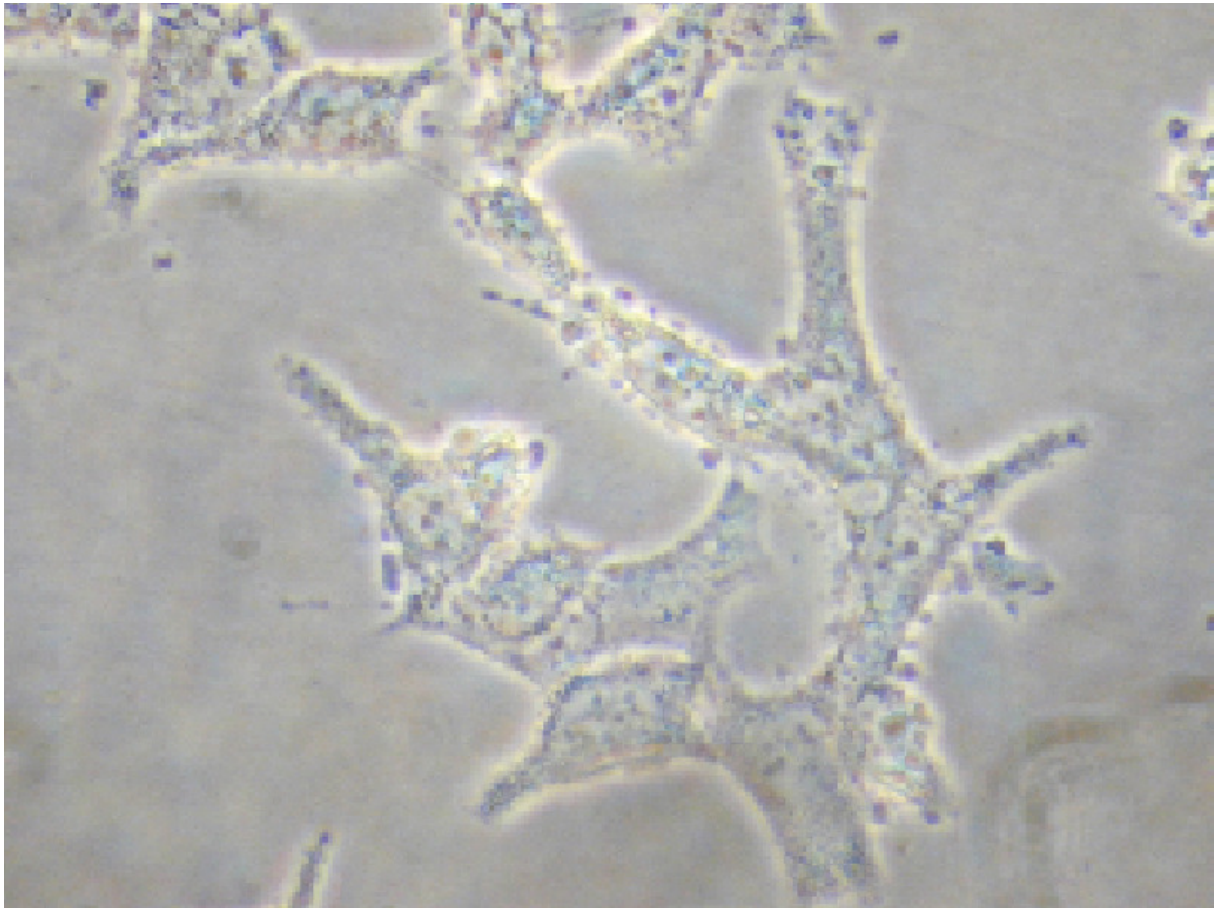


Bild 5. Tydlig apoptos observerades i AA-celler 24 timmar efter behandling med vanadat

Utifrån resultaten valdes fyra olika koncentrationer av vanadat som inte hade negativa effekter på cellerna. Detta var 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM och 0,001 μM .

I nästa steg undersöktes effekten av Vanadat på PTP 1B aktiviteten i cellerna. Först gjordes en standardkurva för att prova detektionen av detektorn "Green Reagent" och fosfatstandard med hjälp av en Elisa Läsare. Resultaten presenterades i figur 1.

Abs.(nm)	Konc.(μm)
0,453	2
0,383	1
0,353	0,5
0,343	0,25
0,32	0,125
0,25	0,063
0,312	0

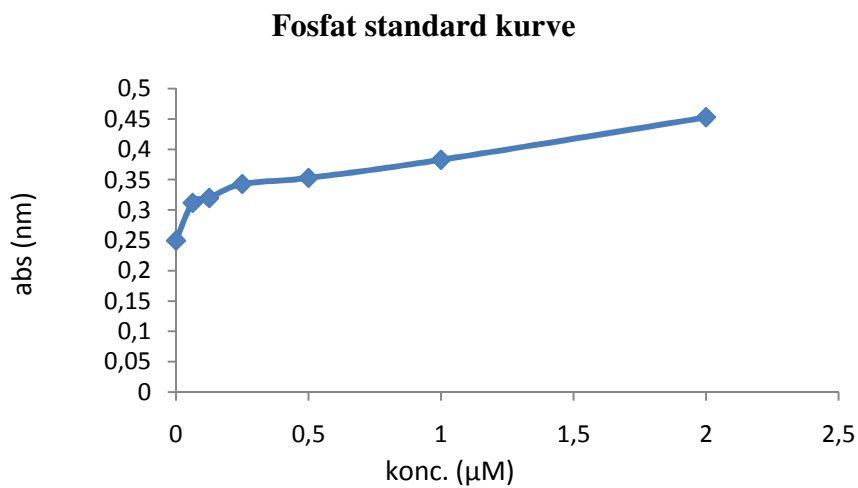


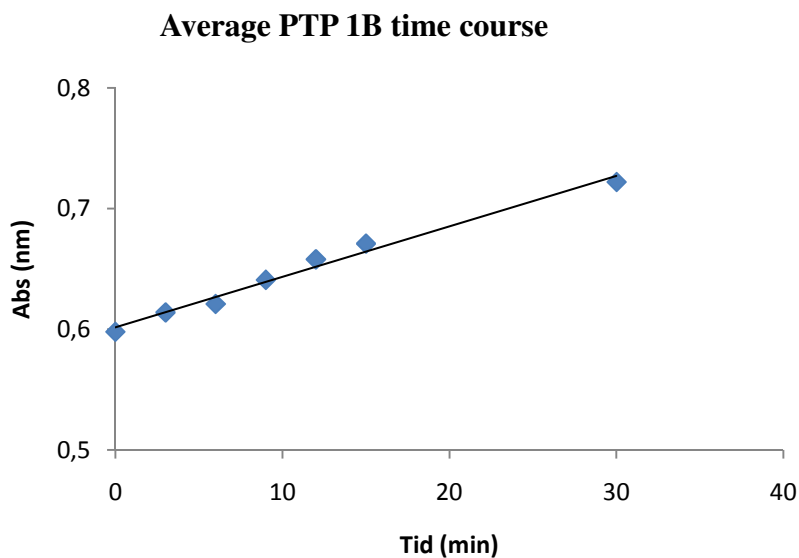
Figure 1 Fosfat standard kurva

Effekt av vanadat på PTP 1B aktiviteten i celler

Sedan gjordes en PTP1B tids kurva för att bestämma en lämplig tid för reaktionen. Cellerna lyserades och cellextraktion gjordes. Extraktet späddes 10 gånger innan provning. Sedan togs proven efter 0, 3, 6, 9, 12 och 15 minuter. Vi valde att använda 15 minuters reaktionstid.

Resultaten analyserades med hjälp av en Elisa läsare och kurvor ritades.(Figur 2)

Tid (min)	Abs (nm)
30	0,722
15	0,671
12	0,658
9	0,641
6	0,621
3	0,614
0	0,598

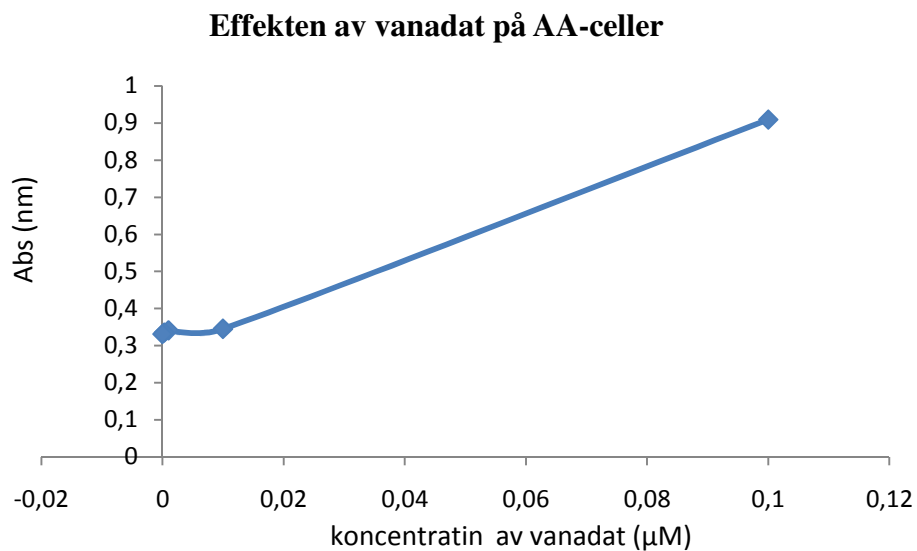


Figur2. Average PTP 1B time course

Slutligen undersöktes effekten av vanadat på celledtrakten. Resultaten normaliserades mot kontrollen och mot fosfatstandardkurvan som gjordes innan. Utifrån resultaten från Elisa instrumentet ritades en kurva. (Figur 3)

Tyvärr medgav tiden inte undersökning av effekterna av de andra vanadatföreningarna. Resultaten visar att med ökning i koncentration av vanadat i cellerna ökar färgändringen. Detta innebär att vanadat hade verkan på cellerna som släppte fritt fosfat. Effekten ökade med ökande vanadat-koncentration.

Abs. (nm)	Konc.(μM)
0,909	0,1
0,345	0,01
0,341	0,001
0,335	0,0003
0,331	0,00001



Figur 3. Kurva över effekten av vanadat på PTP 1 B aktiviteten i AA-celledtrakten efter 24 timmar



Figur 4- Mikrotiter plattan nedan visar effekten av vanadat på cellextrakten från AA-celler och K562-celler. Längst ned ses fosfatstandardkurvan.

4.2. Diskussion

Syftet med examensarbetet var prova ut en teknik för att testa effekten av vanadinföreningar på AA-celler och K562-celler. Tidigare undersökningar har visat att vanadinföreningar har insulinliknande effekter.

I denna studie valdes vanadat och några ligander som kan bilda komplex med vanadat. Dessa komplex kan eventuellt ha mindre negativa effekter på cellerna än fritt vanadat. Resultaten visade att koncentrationer under $1\mu\text{M}$ av vanadat och komplex är lämpligt för liknande undersökningar. Så att kunna hålla låg koncentration av vanadat föreningar under experimentet är viktig.

Effekten av vanadat på PTP 1B aktiviteten i cellerna undersöktes. Normalisering av resultat mot kontrollen och mot fosfatstandardkurvan och tidkurvan som gjordes innan visar en ökning av mängden av fritt fosfat med ökning av koncentration av vanadat i lösning. Det vill säga PTP 1B förefaller att aktiveras av vanadatbehandling.

Detta skulle kunna motsäga tidigare rapporter om att vanadat har en insulinliknande effekt, då PTP 1B har som uppgift att defosforylera receptorn, vilket borde leda till dess inaktivering. Å andra sidan skulle det kunna tänkas att själva defosforyleringen är det steg som skickar signalen vidare för aktivering av glukos upptag.

en annan tänkbar möjlighet är att det bara är nyfosforylerade insulin receptor som startar signal kedjan och att av ökad PTP1B aktivitet ger en snabbare defosforylering och därmed aktivare insulinreceptorer och ett effektivare glukosupptag.

I denna studie gjordes celleextraktion av cellerna och effekten av vanadatföreningar testades med detta extrakt, vilket kan påverka resultaten. Cellextrakten innehåller många andra faktorer och olika enzymer som är okända under undersökningen och kan påverka resultaten.

Referensföreteckning

1. Nicolas C.Priss & Lewis Stevens; *Fundamentals of Enzymology: Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins*. s 237-260
2. Aktuell medicinsk forskning 2002, *diabetes, forskning - framstegen – framtiden*; Stockholm : MFR, 1988.s.39-45
3. Neumuller Magnus; *laborationskompendium i Cellodlingsteknik*. Mälardalens högskola, 2006
4. Carl-David Agardh, Christian Berne & Jan Östman ; *Diabetes*
5. Prof.L.N.Johanson; *Protein phosphatase recognition* Laboratory of Molecular Biophysics Laboratory Journal 2000
6. András Gorzsás; *Vanadate and Peroxovanadate Complexes of Biomedical Relevance A speciation approach with focus on diabetes*. Department of Chemistry Inorganic Chemistry Umeå University Umeå, Sweden 22 april 2005 s.8,19
7. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2005/Dresser/My%20favorite%20Protein.html>
8. CALBIOCHEM; *protein Phosphatases in Signal Transduction*
9. <http://www.sjukvardsradgivningen.se/artikel.asp?CategoryID=23937>, 2006-11-14
10. <http://forskningsfronter.vr.se/main.asp?page=main&type=proj&classid=46&projectid=4653#>