

---

# **Blodplasmahantering för proteomics**

**GX2020**

**Marcus Ismail**

**Handledare: Christer Ericsson**

**Handledare och examinator: Sven Hamp**

---

---

<b>BAKGRUND</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>SYFTE</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>DIREKTIV</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>PRECISERING AV UPPGIFTEN OCH AVGRÄNSNINGAR</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>REFERENSRAM</b> .....	<b>- 6 -</b>
BLODETS CELLULÄRA BESTÅNDSDELAR -----	- 7 -
BLODKOAGULERING-----	- 7 -
VAL AV KOAGULATIONSINHIBITOR -----	- 8 -
FUNKTIONER HOS STUDERADE PROTEINER-----	- 8 -
FRAKTIONERING -----	- 9 -
SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS PAGE) -----	- 10 -
WESTERN BLOT -----	- 10 -
<b>MATERIAL OCH METOD</b> .....	<b>- 11 -</b>
UTRUSTNING -----	- 11 -
KEMIKALIER -----	- 11 -
<b>METODER</b> .....	<b>- 14 -</b>
PROVBEREDNING-----	- 14 -
FRAKTIONERING -----	- 14 -
TIDSSKUDIE -----	- 14 -
ULTRAFILTRERING-----	- 14 -
PRECIPITERING -----	- 14 -
SDS-PAGE-----	- 14 -
WESTERN BLOT -----	- 15 -
COLLOIDAL BLUE STAINING -----	- 15 -
<b>RESULTAT OCH DISKUSSION</b> .....	<b>- 16 -</b>
IDENTIFIERING AV KOAGULATIONSAKTIVERING OCH INHIBERING -----	- 16 -
LÅNGTIDSFÖRVARING AV PLASMA OCH DESS EFFEKT PÅ CELLINTEGRITET-----	- 17 -
PROTEINFRISÄTTNING FRÅN CELLER, VID 4°C OCH 22°C, UPP TILL 72H -----	- 19 -
EFFEKT AV LÅNGVARIG FÖRVARING PÅ PROTEININTEGRITET-----	- 21 -
EFFEKT AV APPLICERAD FYSISK STRESS PÅ CELLINTEGRITET-----	- 23 -
FUNNA RESULTAT I PERSPEKTIV TILL AKTUELL KÄNNEDOM-----	- 23 -
PRAKTISK ANVÄNDNING FÖR PROTEINANALYS -----	- 24 -
REKOMMENDATIONER -----	- 25 -
<b>REFERENSER</b> .....	<b>- 26 -</b>
<b>BILAGA 1</b> .....	<b>- 28 -</b>
<b>BILAGA 2</b> .....	<b>- 29 -</b>

---

## Bakgrund

Blodets funktion är bl.a. att distribuera syre och näring och som försvar i kroppen genom immunologiska funktioner. Blod består dels av plasma som är i vätskefas dels av en cellulär fas bestående av leukocyter (vita blodkroppar), erythrocyter (röda blodkroppar) och trombocyter (blodplättar). Plasma innehåller bl.a. bärarproteiner och proteiner involverade i koagulationskaskaden. Erythrocyter svarar i huvudsak för kroppens syretransport, leukocyter är ansvariga för kroppens immunologiska försvar och blodplättar är bl.a. inblandade i koagulation. Erythrocyter och trombocyter har ingen cellkärna till skillnad från leukocyterna, som därmed innehåller DNA.

Plasma och serum är biologiska prover från människa som visar en stor mångfald i avseende på protein innehåll. Plasma och serum är det biologiska prov från människa som visar störst mångfald av proteiner. Detta gör att plasma och serum anses ha stor potential som källa för biomarkörer. Biomarkörer kan bl.a. bidra till både diagnos och övervakning av sjukdomstillstånd. Biomarkörer i plasma skulle bidra till en lättare diagnostisering och en inte lika invasiv provtagning som vid t ex biopsi. Plasma och serums lättillgänglighet kan också bidra till en tidigare upptäckt av sjukdom, tidigare behandling och i vissa sjukdomar därmed större möjlighet för överlevnad. Skadad vävnad "läcker ut" i blodomloppet och kan fungera som markörer för sjukdom. Studier tyder på att många, kanske alla, sjukdomstillstånd ger förändringar på proteiners mängd och struktur (Anderson and Anderson 2002).

Nedbrytningsprodukter från all vävnad i kroppen har en möjlighet att läcka ut i blodcirkulationen. Både fysiologisk och patofysiologisk information kan därför finnas tillgänglig i blodomloppet (Anderson and Anderson 2002).

Blodprover har visat svårigheter vid jämförelser beroende på ett flertal yttre faktorer. Det kan förekomma variationer t ex mellan friska och sjuka individer i avseende på koagulationsaktivering. Tumörpatienter har visat ökad koagulationsaktivering jämfört med friska individer (Mousa 2003; Zakarija and Kwaan 2003). För att kunna genomföra proteomikstudier på prover krävs det att resultaten är reproducerbara och att proverna kan jämföras med varandra. Yttre faktorer som tex kön, medicinering, provtagning och provbehandling har visats ha påverkan på provernas integritet. Det är därför viktigt att utvärdera yttre faktorer påverkan.

Frågan om plasma eller serum är lämpligast att använda som analysmaterial är vida diskuterad. Ett problem är att plasma och serum har visat stora skillnader i proteinprofiler (Luque-Garcia and Neubert 2006). Mycket talar för att plasma är lämpligast. Rai et al (2005) hävdar att plasma är att föredra framför serum. Serumpreparation är beroende av biokemiska processer. Serumpreparation är därför svår att standardisera då tid, temperatur, medicinering m.m. kan påverka proteinprofilen i serum. Serum bör därför undvikas vid utredning av biomarkörer på peptidnivå (Rai, Gelfand et al. 2005). Serum visar också en ökning med >40 % av peptidinhåll specifika för serum jämfört med plasma (Tammen, Schulte et al. 2005). Serum har fördelen att det saknar koagulationsinhibitorer vilka tillsätts till

---

plasma. Dessa inhibitorer kan potentiellt störa analys eller påverka resultat (Luque-Garcia and Neubert 2006). Serum har använts länge och finns arkiverat i stor utsträckning och kan vara värdefull i vetenskaplig utvärdering av biomarkörer. Men försiktighet måste dock iaktas vid uttolkning av resultat från arkiverat material som annars kan leda till felaktiga slutsatser (Rai, Gelfand et al. 2005).

Human Proteome Organization (HUPO) arbetar bl.a. med att standardisera hantering och analys av biomedicinska preparat. The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project (HUPO PPP) startade 2001 med förhoppningar om att öka utvecklingen inom proteomikstudier och organisera samarbeten internationellt inom forskning och utbildning. HUPO PPP's långsiktiga mål är att utföra omfattande studier inom plasma- och serum proteomik. Genom identifiering av biologiska variationer inom individer och över populationer med hänseende till genetik, näring och andra faktorer. HUPO PPP rekommenderar användning av EDTA plasma för protein analyser (Omenn, States et al. 2005).

Vid användande av plasma minimeras spontana reaktioner jämförelse med serum. Detta bör också tas i beaktande vid utredning om lämplighet för proteomikstudier. Spontana reaktioner kan antas ge variabilitet i analysmaterial. Detta kan i sin tur påverka reproducerbarheten. Efter provtagning sätter koagulationskaskader genast igång. Bland annat kan detta ge upphov till variationer i prover. För att kunna använda blod för biomarkörstudier krävs det bl.a. kunskap om hur blodet påverkas efter provtagning och eventuella variationer.

Provtagning kan påverka resultat, reproducerbarhet och validitet i studien (Rai and Vitzthum 2006). Läckage från erythrocyter, leukocyter och trombocyter behöver studeras vidare, då dessa kan antas bidra till oönskade proteiner och peptider vilket kan leda till störningar i analys och variabilitet prover emellan. Allmän proteolys kan studeras genom status hos plasmaproteiner. Koagulationsaktivering kan studeras med hjälp av proteiner specifikt aktiverade i samband med koagulation. Genom att studera läckage från blodceller, koagulationsaktivering och proteolys hoppas vi kunna utfärda ett optimerat protokoll av blodhanteringen, med avseende på tid och temperatur (4 °C vs rumtemperatur). Blodplättar har visat s.k. kall aktivering vid 4 °C och läckage är därför möjlig, vid 22 °C är inte kall aktivering av blodplättar ett problem. Andra möjliga yttre effekter kan däremot visa sig ha effekt vid 22 °C (proteolys i större utsträckning m.m.). I studien kommer dessa temperaturer och olika tider att jämföras för att försöka fastställa effekt och lämpligast variabler med avseende på tänkta studier.

## **Syfte**

Effekt av pre-analytisk yttre påverkan på blod för *in vitro* studier och studier med blod som potentiella biomarkörer är inte utredd tillräckligt. Vi har därför studerat hur hanteringen av blod efter provtagning med avseende på tid och temperatur påverkar blodprovers protein-komponent (i synnerhet K<sub>2</sub>EDTA-plasma, K<sub>2</sub>EDTA-helblod och

---

serum).

Genom att studera inverkan av tid och temperatur på läckage, proteolys och koagulationsaktivering beroende på provförhållanden (tid och temperatur) hoppas vi kunna utfärda rekommendationer för hur blod ska hanteras. Detta gjordes i syfte att på lämpligast sätt kunna användas för proteinanalys, biomarkörstudier med flera studier.

## **Direktiv**

Blodhantering skall utvärderas med avseende på tid och temperatur. En optimering av befintlig hantering önskar man genomföra. Påverkan av tid och temperatur på proteinnivå skall studeras. Med utgångspunkt från HUPO PPP's rekommendationer angående proteinanalyser, kommer K<sub>2</sub>EDTA användas som koagulationsinhibitor. Följande komponenter i blod kommer att användas för analys: K<sub>2</sub>EDTA plasma, serum, erythrocyter, buffy coat och blodplättar. Blodprover är i huvudsak från tumörpatienter, prover från friska patienter finns också att tillgå.

Följande proteiner används för att analysera status hos prover: albumin, fibrinogen, globin, histon H4, Platelet factor 4 (PF4) och trombin. Antikroppar mot dessa proteiner (antigen) tillhandahölls och fanns tillgängliga på lab.

Primära metoder som skall användas är blodfraktionering, spektrofotometri för proteinkvantbestämning, SDS-PAGE och Western blot.

Andra metoder kan komma att bli aktuella och en utvärdering tillsammans med handledare bestämmer ifall metod är aktuell och önskvärd.

Metoder som tillkommit arbetet inkluderar ultrafiltrering, proteinfärgning och protein-precipitering.

## **Precisering av uppgiften och avgränsningar**

Studie av färska och åldrade blodprover kommer att inleda arbetet. De åldrade proverna från tumörpatienter får fungera som extremvärden då dessa är åldrade i flera månader och förvarade vid 4°C. Proteinerna albumin, trombin, fibrin, globin, PF4 och H4 skall studeras i de olika fraktionerna (hel blod, plasma, serum, buffy coat och erythrocyter). Studien kommer därefter inriktas på att med hjälp av lärdomarna från extremt ådrade prover söka finna bästa möjliga hantering av färska prover. Färska och åldrade prover hanterade vid 4°C och 22°C kommer att studeras vid detta stadiet. Fortsättningen av studien baseras på tidigare funna resultat och optimerade metoder. Denna fas avser att försöka finna lämpligast tillämpbara förhållanden för optimerad hantering med avseende på minimerad celllys och proteolys. Blodprov från friska patienter skall studeras under ett tidsintervall från 1-72h och temperaturerna 4°C och 22°C. Studien avser kunna svara på frågor gällande proteolys (specifik och allmän) och förekomsten av celllys vid 4°C och 22°C och vid olika tidpunkter. Utifrån nämnda kriterier skall studien resultera i rekommendationer om hantering av blod för proteinanalys. Studien avgränsas till utvärdering i huvudsak med SDS-PAGE och western blot för immunologiska undersökningar. Studien avgränsas till analys av

---

serum och K<sub>2</sub>EDTA behandlat blod. Andra koagulationsinhibitorer (sodiumcitrat, heparin osv) skall ej studeras.

## Referensram

Plasma/serum innehåller proteiner med ca 10<sup>10</sup>-10<sup>12</sup> gångers koncentrationsomfång. Albumin i den högst koncentrerade änden och interleukiner i den lägst koncentrerade. Blod består till nästan hälften av röda blodkroppar, eventuellt läckage från dessa skulle kunna komplicera analys. De 22 vanligast förekommande proteinerna i plasma, utgör 99 % av plasma. Plasma och serum innehåller höga koncentrationer (35-50 mg/ml) av proteinet serumalbumin (Anderson and Anderson 2002). Nämnda faktorer belyser komplexiteten och visar hur svår analys av lågt koncentrerade proteiner är, då högt koncentrerade proteiner stör och minskar känsligheten i analysen. Dagens mätutrustning för massivt parallell analys av proteiner når ofta inte upp till den höga känslighet som krävs vid blodanalyser. Eventuellt läckage av proteiner från skadad vävnad, vilka kan utgöra potentiella biomarkörer förväntas att finnas endast i låga koncentrationer i blodet jämfört med övriga blodproteiner.

Plasma erhålles då någon slags koagulationsinhibitor (EDTA, citrat, eller heparin) tillsätts till nytaget blodprov. Val av koagulationsinhibitor beror på behov utifrån den studie som man önskar genomföra (Rai, Gelfand et al. 2005). Tillsats av koagulationsinhibitor förhindrar blodet att koagulera. Blodprovet centrifugeras därefter och plasma kan samlas upp som den övre fasen (vätskefasen). Under plasma kommer den cellulära fasen av erythrocyter, trombocyter och leukocyter att befinna sig. Även dessa kan samlas upp vid behov, leukocyter kommer att befinna sig som en vit hinna (buffy coat) precis under plasma. I den undre fasen kommer erythrocyter och trombocyter att befinna sig.

Serum fås genom att låta blodet koagulera under 30 min innan blodet centrifugeras. Man kan använda en "serum-separator" tub för detta ändamål. En sådan innehåller en inert katalysator för att hjälpa koagulering. Den innehåller även en gel konstruerad med en densitet som ska bidra till en avgränsning mellan vätskefasen och den cellulära fasen, vilket underlättar separation (Luque-Garcia and Neubert 2006).

---

### ***Blodets cellulära beståndsdelar***

***Leukocyter*** är blodets cellulära del av immunförsvaret. Leukocyter syntetiseras i benmärgen. Leukocyter delas vidare in i myeloida och lymfoida celler. Myeloida celler består av monocyter, makrofager, dendritiska celler, neutrofiler, eosinofiler, basofiler, Natural Killer (NK) celler och mast celler. Lymfoida celler består av T-lymfocyter som genomgår vidare utveckling i Thymus och B-lymfocyter som vidareutvecklas i benmärgen (Honeyman MC, Harrison LC, 2004). Leukocyter innehåller en cellkärna och innehåller således DNA.

***Erythrocyter*** svarar för transport av syre (O<sub>2</sub>) i cirkulationen, från lungorna till vävnader i kroppen, och avlägsning av koldioxid (CO<sub>2</sub>) från vävnader. En mogen erythrocyt är 7,5-8,7 µm stor, innehåller ingen cellkärna och inga organeller. Cellen är flexibel och kan passera genom kapillärer med en diameter av 3 µm. Cellen innehåller huvudsakligen proteinet hemoglobin, vilket svarar för transport av syre och koldioxid. Erythrocyter har en livstid på 120 dagar i cirkulationen och avlägsnas framförallt i mjälten och levern (Gershon H, 2001).

***Trombocyter*** (blodplättar) är 1-2 µm i diameter, saknar cellkärna och är diskformade. Cellerna syntetiseras från megakaryocyter i benmärgen och har en kritisk roll i hemostas. Hemostas omfattar de fysiologiska processer som förhindrar förblödning vid kärlskada samtidigt som blodet hålls flytande. Vid kärlskada fäster blodplättar till det skadade området och aktiveras. Aktiveringen leder till frisläpp av proteiner som i sin tur rekryterar nya blodplättar. Blodplättarna bildar en tillfällig plugg och bistår generation av fibrin genom koagulationskaskaden av proteiner (Deitcher S R, Chiang T M, 2001). Se bilaga 1 för koagulationskaskaden.

### ***Blodkoagulering***

Blodkoagulering är beskriven i detalj många gånger i litteraturen, bl.a. av Jolyon Jesty (2005). Vid skada av endotelceller initieras blodkoagulation, som består av två system. Det ena svarar för aktivering och aggregering av blodplättar som bildar en plugg. Detta initieras av blodplättars kontakt med kollagen. Det andra systemet initieras av membranproteinet Tissue Factor (TF), som finns i kärlväggar bakom endotela celler. Vid skada "blottas" kärlväggen och TF kommer i kontakt med faktor VII. Detta leder till en kaskad av reaktioner som producerar en rad specifika proteaser.

TF är det fysiologiska proteinet vid initiering av koagulering. *In vitro* har det visat sig att det finns ytterligare en kaskad, som initieras av faktor XII i kontakt med negativt laddade ytor. Negativa ytor är vanligtvis av icke fysiologisk natur som glas, silikater m.fl. Denna kaskad (intrinsic pathway) orsakar blod koagulering i provrör av glas. Oavsett om sådan aktivering sker *in vivo* eller ej, kan man anta att den är liten jämfört med TF initiering (extrinsic pathway). Trombin konverterar fibrinogen till en molekyl som spontant bildar en fibringel. Initialt är denna korslinkade fibringel relativt svag, men stärks och blir mer stabil av enzymet faktor XIIIa. Faktor XIII aktiveras av

---

trombin till faktor XIIIa. För en mer detaljerad beskrivning av koagulationskaskaden se bilaga 1.

### ***Val av koagulationsinhibitor***

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) är en aminopolykarboxyl syra som är negativt laddad vid fysiologiskt pH. EDTA bildar komplex med metalljoner och hindrar dem från vidare reaktion (Rai, Gelfand et al. 2005). Genom att binda  $\text{Ca}^{2+}$  fungerar EDTA som koagulationsinhibitor, då  $\text{Ca}^{2+}$  är nödvändig i många steg i koagulationskaskaden (se bilaga 1). Vid mätningar på divalenta katjoner kan EDTA påverka analysresultat. EDTA bör därför undvikas vid sådana mätningar (Rai, Gelfand et al. 2005). EDTA har även visats orsaka aktivering i egenskap av formförändring hos blodplättar (Zucker and Borrelli 1954). Vilket även kyla orsakar hos blodplättar.

Heparin är ett naturligt förekommande protein i kroppen som inhiberar koagulation. Heparin är en glykosaminoglykan med sulfatgrupper som förlänger koagulationstiden. Det är en starkt laddad molekyl som i lösning kompetitivt förhindrar molekyler från att binda till laddade ytor (Rai, Gelfand et al. 2005). Heparin binder till antitrombin III som är en koagulationsinhibitor (se bilaga 1) och förstärker dess effekt. Ett problem med användande av heparin är bindning (ospecifikt) till många proteiner (Rai and Vitzthum 2006).

Citrat binder  $\text{Ca}^{2+}$ . Blodplättar har visats stabila vid användning av citrat (Luque-Garcia and Neubert 2006). Citrat har visats ge falska låga värden vid immuno assay mätningar. Ett annat problem är att citrat tillsätts i flytande form som en lösning och således ger en spädande effekt på provet (Rai, Gelfand et al. 2005).

### ***Funktioner hos studerade proteiner***

***Albumin*** är ett 69 kDa stort protein. Den främsta uppgiften hos albumin är att reglera det kolloidosmotiska trycket. På så vis förhindras plasmaförluster genom kapillärer (Guyton and hall, 1996). Albumin fungerar bl.a. även som bärarprotein. Albumin används i denna studie som en indikator på generell proteolys i blod och som intern kontroll.

***Protrombin*** är ett 72 kDa stort protein som tillhör de så kallade serinproteaserna. Blodkoagulering består av en rad enzymatiska reaktioner som till sist orsakar en olöslig fibrinkoagel. Protrombin är inblandad i slutsteget av denna reaktion. Protrombin aktiveras till trombin av faktor Xa i närvaro av faktor Va, calciumjoner och en fosfolipidyta. Trombin klyver sedan fibrinogen till fibrin som bildar ett koagel. Trombin är också inblandad i aktivering av faktor V, VIII, XIII, protein C och stimulering av blodplättar att bl.a. genomgå konformation av form (Degen and Davie 1987).



---

Analys av trombin i blod kan ge indikationer om blodet är koagulationsaktiverat. Albumin och trombin är så kallade plasmaproteiner. De syntetiseras i levern.

**Hemoglobin** är ett protein ansvarigt för syretransport i blodet. Hemoglobin återfinns i de röda blodkropparna. Hemoglobin består av en hemgrupp (innehållande järn) och en proteingrupp (globin). Fyra kedjor med var och en innehållande en hemgrupp och ett globin bildar en hemoglobinmolekyl. Det finns fyra olika typer av kedjor;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , och  $\delta$ -kedjor. Dessa kan sitta ihop i olika kombinationer. Den vanligast förekommande i vuxen människa är hemoglobin A, en kombination av två  $\alpha$ - och två  $\beta$ -kedjor. Detektion av globin i plasma indikerar lys av röda blodkroppar.

**Histon H4** är ett kärnprotein tillhörande histonfamiljen som bundet till kromosomer packar ihop dessa. Kromosomerna är lindade runt histoner och bildar kromatin. Histoner finns i vita blodkroppar som är cellkärnbärande och därmed innehåller DNA. Detektion av histon H4 påvisar läckage av vita blodkroppar.

**Platelet factor 4** (PF4 eller CXCL4) tillhör den så kallade CXC chemokinfamiljen. CXC kemokiner är heparinbindande proteiner, C-terminus i proteinet är heparinbindande. Vidare har PF4 visats ha inhiberande effekt på angiogenes som är en viktig egenskap för tumörer. (Strieter, Burdick et al. 2006). PF4 deltar i koagulering av blod och har rapporterats ha både prokoagulerande och antikoagulerande egenskaper i olika studier. Den fysiologiska rollen hos PF4 är inte helt förstådd. (Amelot, Tagzirt et al. 2007). PF4 återfinns i  $\alpha$ -granuler inuti blodplättar, vid aktivering av blodplättar frisläpps PF4. Detektion av PF4 i plasma påvisar därför läckage/aktivering av blodplättar.

### **Fraktionering**

Ett problem som tidigare påpekats är den oerhört ojämna fördelningen mellan proteinkoncentrationer i plasma och serum. De tio vanligaste proteinerna står för 90 % av plasma/serums totala proteinmassa. Detta leder till att signaler från mindre förekommande proteiner kan gå dolda eller maskerade förbi upptäckt. Fraktionering är därför av relevans för att öka sannolikheten att upptäcka övriga signaler (Luque-Garcia and Neubert 2006). Biomarkörer antas vara mest sannolika att finnas i låg koncentration. Blod fraktioneras genom centrifugering. Generellt är det rekommenderat att serum och plasma centrifugeras 1300-2000  $\times$  g i 15 min inom 1 h efter provtagning. Rekommenderad temperatur är 15-24  $^{\circ}$ C om inte annat är sagt för specifika analyser (Rai and Vitzthum 2006).

---

## ***Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE)***

Laddade joner migrerar i elektriska fält. Proteiner vid pH annat än sin isoelektriska punkt (pI) kommer därför att migrera. Migreringshastigheten kommer att bero på laddningsdensiteten (laddning/massa). Ju större kvot, desto snabbare kommer molekylerna att vandra. Polyakrylamidgel används eftersom det är relativt inert i sammanhanget och minskar konvektion och därmed ökar upplösning.

I en polyakrylamidgel separeras molekyler inte bara beroende på laddningsdensitet utan även beroende på storlek, på grund av porer i gelen. Detta leder till att proteiner med samma laddningsdensitet kan separeras beroende på storlek. Polymerisering av akrylamid monomerer i långa kedjor korslänkas med bisakrylamid och porer bildas i gelen. Porer storlek kan justeras utifrån behov och denna är starkt beroende av koncentrationen akrylamid.

Polymerisering av akrylamid initieras med tillsats av t ex ammoniumpersulfat (APS). Som accelerator för polymerisering tillsätts *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED). Fria radikaler bildas då persulfat katalyseras av TEMED och polymerisering initieras.

Elektrofores kan köras både som dissocierande och icke-dissocierande system. I de flesta fallen används dissocierande system. Som dissocierar proteiner till deras individuella polypeptidsubenheter. Den vanligast använda dissocierande agenten är sodium dodecyl sulfate (SDS). Överskott av SDS tillsätts provet och hettas till 100 °C i närvaro av en tiol som bryter disulfid bindningar, t ex 2-mercaptoetanol.

Polypeptider binder SDS med en konstant kvot av 1,4 g SDS/g av polypeptid. Polypeptidens egna laddning är försumbar jämfört med SDS negativa laddning. SDS-polypeptidkomplex kommer därför ha nästintill identisk laddningsdensitet och således migrera beroende på polypeptidens storlek (BD Hames & D Rickwood 1988).

### ***Western Blot***

Western blot är en teknik för att överföra proteiner från gel till membran. Sådan överföring beskrevs först av Towbin et al (1979). Proteinerna immobiliseras på membranet. Vanligen används membran är nitrocellulosa och polyvinylidendifluorid (PVDF). Proteiner migrerar från gelen över till membranet med hjälp av elektrisk ström. Proteinbanden kommer att hamna på membranet i samma position som de suttit på gelen (i förhållande till övriga protein band). Proteiner binder till membranet med hydrofobisk interaktion.

Western blot har många användningsområden. Vid immunologiska studier inkuberas membranet med antikropp och analys av specifika proteiner möjliggörs.

Primär antikropp binder till specifikt antigen på membranet. Därefter inkuberas membranet med sekundär antikropp specifik mot primära antikroppen, som t.ex. är fluorescensmärkt. Specifika antigen kan därför analyseras och kvantifieras.

---

## Material och metod

### *Utrustning*

Sarstedt filtropur S 0.2 #83.182.001  
Elektroforeskär  
Transferkär för western blot  
Skakbord, Stoal lifesciences, The bellydancer  
Whatman 3MM  
Membranfilter – nitrocellulosa (Whatman, Protran BA 83 #10402468)  
Fuji film CCD kamera  
Epson scanner  
Millipore, Amicon Ultra-4, 50000 MWCO #UFC805024  
K<sub>2</sub>EDTA-behandlade provrör (BD K2E 18.0 mg, #367525)

### *Primära antikroppar:*

Mouse monoclonal [1G2] to Human Serum Albumin (Abcam #ab28405)  
Hemoglobin  $\beta/\gamma/\delta$  (H-76) (Santa Cruz #sc-21006)  
Rabbit polyclonal to PF4 (abcam #ab9561)  
Goat polyclonal to Fibrinogen (Abcam #ab6666)  
Rabbit polyclonal to Histone H4 (Abcam #ab10158),  
Sheep polyclonal to Prothrombin (Abcam #ab9020)

### *Sekundära antikroppar:*

Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species specific whole antibody (from donkey)  
(Amersham #NA934)  
Anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep)  
(Amersham #NA931)  
Rabbit polyclonal to sheep IgG H&L (HRP) (Abcam #ab6747)

### *Kemikalier*

Amersham Biosciences, 2-D Clean Up kit #80-6484-51

Invitrogen, Colloidal Blue Staining Kit #LC6025

*Tris-Hcl, pH 6.8, 1M, 250 ml*

20.285 g Trizma base  
ddH<sub>2</sub>O to 250 ml  
set pH with conc. HCl to 6.8

*SDS 10 % solution, 100 ml*

10 g SDS  
ddH<sub>2</sub>O to 100 ml

---

*SDS sample buffer 1X, 100 ml*

12.5 ml Tris-HCl  
10 ml glycerol  
20 ml 10 % SDS solution  
1 ml  $\beta$ -mercapto-ethanol  
50  $\mu$ g Bromphenolblue  
56 ml ddH<sub>2</sub>O

*SDS sample buffer 2X, 100ml*

25 ml Tris-HCl  
20 ml glycerol  
40 ml 10 % SDS  
2 ml  $\beta$ -mercapto-ethanol  
100  $\mu$ g Bromphenolblue  
18 ml ddH<sub>2</sub>O

<i>12 % gel</i>	1 gel	2 gels (ml)
ddH <sub>2</sub> O	9.9	19.8
Acrylamide	12	24
Tris buffer pH 8.8	7.5	15
SDS 10 %	0.3	0.6
Ammoniumpersulfate	0.3	0.6
TEMED	0.012	0.024

*SDS electrophoresis buffer (5 l)*

15.1 g Trisbase (0,125 M final)  
72 g glycine (0,96 M final)  
5.0 g SDS (10 % final)  
H<sub>2</sub>O to 5 l, check pH (should be between 8-9)

<i>Stacking gel</i>	1 gel	2 gels (ml)
ddH <sub>2</sub> O	3.4	6.8
Acrylamide	0.85	1.7
Tris buffer pH 6.8	0.625	1.25
SDS 10 %	0.05	0.1
Ammoniumpersulfate	0.05	0.1
TEMED	0.05	0.010

*TBS-T*

Trizbase 6.059 g  
NaCl 45 g  
Tween 20 5 g  
DdH<sub>2</sub>O up to 5 l, set pH with concentrated HCl to 7.4.

---

*Transfer buffer (5 l)*

Trizabase 29.1 g  
glycine 146.4 g  
SDS 5 g  
Methanol 1000 ml

ddH<sub>2</sub>O up to 4 l, mix well, then add methanol (1 l). Check pH (should be between 8-9).

*Blocking buffer*

1.25 g nonfat dry milk  
20 ml TBST

*Stripping buffer*

176 µl β-mercapto-ethanol  
5 ml SDS 10 %  
1.5 ml Tris-HCl, pH 6,8  
18.5 ml ddH<sub>2</sub>O

---

## **Metoder**

### ***Provberedning***

Blodprover från patienter och friska frivilliga samlades i 10 ml K<sub>2</sub>EDTA-rör (BD K2E 18.0 mg, ref 367525). Rören inverterades försiktigt 10 gånger. För åldring av prover förvarades dessa vid 4°C under flera månader.

### ***Fraktionering***

Blodprover centrifugerades (4°C, 1500 x g, 15 min), plasma, erythrocyter och buffy coat och/eller helblod, pipetterades upp och användes också för vidare analys.

Alikvoter på 0.1 ml späddes initialt med 1x SDS sample buffer (1:10) och hettades upp till 70°C i 5 minuter. Alikvoter och ursprungsprover sparades i frys vid -20°C.

### ***Tidsstudie***

Blodprover togs i K<sub>2</sub>EDTA rör, som varsamt inverterades 10 gånger. Prover avsattes för hantering vid 4°C resp. 22°C. Efter 1 timme centrifugerades första proverna (10 min, 1500 x g, vid 4°C och 22°C beroende av hanteringsförhållanden). Proverna filtrerades (Sarstedt, Filtropur S 0.2 #83.1826.001) för att erhålla blodplätt-reducerad plasma. Direkt därefter frystes proverna i flytande N<sub>2</sub>. Proceduren repeterades vid 2, 3, 4, 8, 24 och 72 h.

### ***Ultrafiltrering***

I vissa fall då det var önskvärt att kvantifiera mängden av lågmolekylära proteiner centrifugerades plasmaprover (30 min, 3220 x g, 25°C) i ultrafilter-centrifugrör (Millipore, Amicon Ultra-4, 50,000 MWCO). Prover späddes i 9 M urea före centrifugering. Retentatet, innehållande proteiner över 50 kDa) hamnade ovanför filtret. Filtratet bestående av proteiner mindre än 50 kDa som användes till analys av H4, PF4 och globin kunde samlas upp från bottenröret under filtret. Eliminering av proteiner större än 50 kDa möjliggör större laddningsvolym och därmed känsligare analys.

### ***Precipitering***

Ett kit användes för proteinprecipitering (Amersham Biosciences, 2-D Clean Up Kit #80-6484-51). Proceduren som användes var tagen från tillverkarens bifogade protokoll. Med hjälp av precipitering och återsolubilisering kunde föroreningar i prover avlägsnas. Detta bidrog till mer lättolkade resultat av western blots och mindre ”smearing”.

### ***SDS-PAGE***

Geler tillverkades manuellt. Först göts separationsgelen som fick stelna 30 min innan stackinggelen göts ovanpå med kam (brunnar). Denna fick stelna i 30 min innan

---

användning. SDS electrophoresis buffer blandades och hälldes i elektroforeskärlet. Prover laddades i brunnarna på gelen och elektroforesen utfördes vid 240 V och 30-45 mA (per gel).

### ***Western Blot***

Transfer buffer blandades och hälldes i transferkärlet. Nitrocellulosamembran placerades på valfri sida av gelen och Whatman 3MM papper placerades på vardera sida av gelen, ett ovanpå nitrocellulosapappret och ett på motsatt sida av gelen. Transferten kördes över natt med en strömstyrka på 500 mA. Nitrocellulosamembran tvättades i TBS-T i ca 2 minuter. Därefter inkuberades membranet med blocking buffer i 1 timme.

Nitrocellulosamembran inkuberades därefter med primär antikropp i minst 4 timmar. Därefter tvättades membranet i TBS-T: 2 korta sköljningar, 1x15 min, 2x5 min. Membranet inkuberades sedan med sekundär antikropp i 1 timme. Därefter tvättades membranet med TBS-T: 1x15 min, 4x5 min. Inkuberingar och tvättar utfördes på skakbord (Stovall Lifesciences, The Bellydancer).

Till membranet sattes därefter lika delar av ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents (5 ml av vardera). Membranet inkuberades i 1 minut innan framkallning. Detektion gjordes med en kyld Fuji film CCD kamera.

### ***Colloidal Blue Staining***

I vissa fall färgades totalprotein. Ett kit användes för färgning av totalprotein (Invitrogen<sup>TM</sup>, Colloidal Blue Staining Kit #LC6025). Proceduren som användes var tagen från det medföljande protokollet. Staining solution blandades ihop och gelen fick stå på skak i ca 12 timmar (minst 3 timmar enligt protokoll). Gelerna tvättades därefter i avjoniserat vatten för att få bort eventuell bakgrundbindning. Gelerna scannades med bildscanner.

---

## Resultat och diskussion

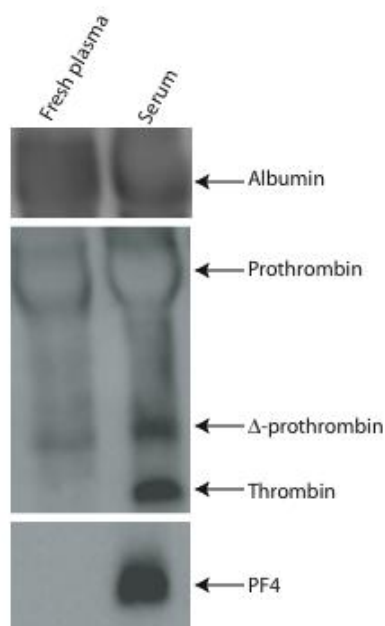
### *Identifiering av koagulationsaktivering och inhibering*

Serum visade förekomst av trombin, vilket inte detekterades i K<sub>2</sub>EDTA-plasma. Samtidigt kunde protrombin detekteras i både serum K<sub>2</sub>EDTA-plasma (fig 1). Protrombin är den inaktiva formen och trombin den aktiva formen av proteinet, vilket visar att K<sub>2</sub>EDTA-plasma och serum kan särskiljas baserat på deras koagulationsstatus. Vid långtidsförvaring av K<sub>2</sub>EDTA-plasma i kyla under flera månader visades inte heller någon aktivering av protrombin till trombin. Serum visar även kraftig frisättning av PF4 från blodplättar. PF4 kan detekteras i K<sub>2</sub>EDTA-plasma inkuberad vid rumstemperatur eller vid förvaring i kyla under lång tid. Däremot kunde ingen PF4 detekteras vid 4°C vid kortvarig inkubation under 72 h. Detektering av trombin och höga halter av PF4 kan därför tjäna som markörer för koagulationsaktivering och tvärtom kan inhibering identifieras då markörproteiner inte detekterats. Dessa markörer skulle därför vara tjänliga vid bestämning av huruvida prover är serum eller plasma, om detta är oklart

Sammanfattningsvis kan koagulationsaktivering och inhibering särskiljas genom analys av PF4 och trombin, i K<sub>2</sub>EDTA-plasma visade det även sig att inhiberingen varit fullständig.

Fibrin ströks ur studien, då trombin ansågs vara lika kraftfull som indikator för koagulering. Fibrins dåliga resultat med avseende på separation p.g.a. dess storlek på 340 kDa och uteblivna peptidmönster, bidrog även till exkluderingen.





**Figur 1. Serum kan urskiljas från plasma med Western blot.**

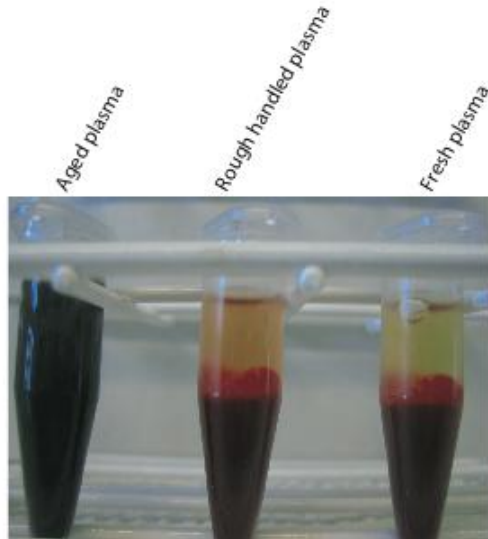
Western blot av serum och färsk plasma med antikroppar mot albumin, pro-trombin och PF. Serum och plasma kan skiljas åt med avseende på trombin. Trombin är en klyvningsprodukt då pro-trombin aktiveras till trombin i koagulationskaskaden. Plasma visar ingen koagulationsaktivering medan serum visar kraftig aktivering. Serum visar även kraftigt frisläpp av PF4. Färsk plasma visar ingen frisättning av PF4 från blodplättar. Albumin och pro-trombin fungerar som interna kontroller.

### *Långtidsförvaring av plasma och dess effekt på cellintegritet*

K2EDTA-plasma förvarades under flera månader vid 4°C, dessa långtidsförvarade prover avsågs användas som ett slag av extremvärde. Vid fraktioneringsförsök av dessa prover visade det sig att det inte gick att sedimentera cellerna till skillnad från färska prover, vilket tyder på celllys (fig 2). Proverna kan betraktas som helblod utifrån dess visuella utseende, då ingen vätskefas kan erhållas vid fraktionering. I åldrade blodprover detekterades PF4, H4 och globin, med andra ord samtliga använda markörer för celllys eller frisättning från celler (fig. 3). Färsk plasma visade ingen frisättning av något av markörproteinerna.

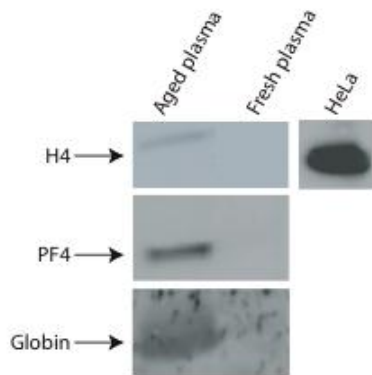
Erythrocyter, leukocyter och blodplättar visar celllys och frisättning vid långtidsförvaring i kyla. Inkubering under lång tid visar sig därför vara av stor inverkan på provernas cellintegritet.

Längre förvaring i kyla rekommenderas inte, p.g.a. den observerade kraftiga celllysen.



**Figur 2. Frisättning från erythrocyter kan uppskattas visuellt efter centrifugering av  $K_2EDTA$ -helblod.**

Åldrad plasma visade kraftig celllys, ingen vätskefas kunde erhållas vid centrifugering (Aged plasma). Plasma som utsattes för 1 min vortex (Rough handled plasma) visade en något rödare färg än färsk plasma hanterad korrekt, vilket tyder på lysis av röda blodkroppar.



**Figur 3. Intracellulär proteinfrisättning kan detekteras efter långvarig förvaring av  $K_2EDTA$ -helblod.** Western blot med antikroppar mot H4, PF4 och globin. Ultrafiltrerad och precipiterad åldrad och färsk. Histon H4, PF4 och globin är markörer för cellulär frisättning hos leukocyter, blodplättar och erythrocyter respektive. Åldrad plasma visar frisättning av alla tre celltyper vid långvarig förvaring. Färsk plasma visar ingen frisättning från någon av celltyperna. HeLa cellextrakt användes för positiv kontroll till histon H4.

---

### *Proteinfrisättning från celler, vid 4°C och 22°C, upp till 72h*

Då celler visade kraftig frisättning vid långvarig förvaring, studerades effekten av kortvarig inkubering vid 4°C och 22°C upp till 72h. Varken leukocyter eller erythrocyter visade någon frisättning vid de olika temperaturerna och under 72h (data visas ej). Däremot visade blodplättar frisättning av PF4 vid 22°C men inte vid 4°C (fig. 4a). Frisättningen av PF4 vid 22°C verkade vara konstant upp till 24h och därefter större frisättning vid 72 h (fig. 4a).

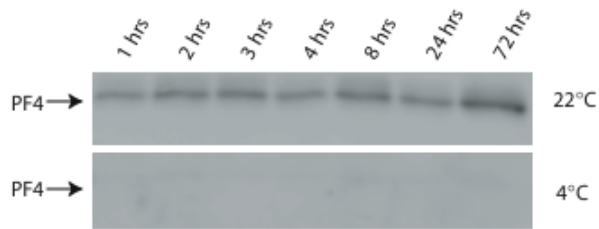
EDTA har visats orsaka aktivering som uttrycks i formförändring hos blodplättar, både vid kallhantering och vid rumstemperatur (Zucker and Borrelli 1954; White and Escolar 2000). I detta avseende borde därför kallhanterade prover och prover behandlade i rumstemperatur ha samma morfologi. Kallhantering av prover verkar därför vara att föredra för biomarkörstudier, då eventuell frisättning i okontrollerad form kan generera falsk-positiva markörer och komplicera analys.

Albumin visade ingen degradering från tiden 1h upp till 72h innan fraktionering (fig 4b). Detta tyder på en relativt liten generell proteolys, då albumin som är ett rikligt förekommande kan förväntas ge upphov till likaledes relativt rikligt förekommande nedbrytningsprodukter som därmed skulle kunna detekteras lättare än nedbrytningsprodukter från mindre rikligt förekommande proteiner.

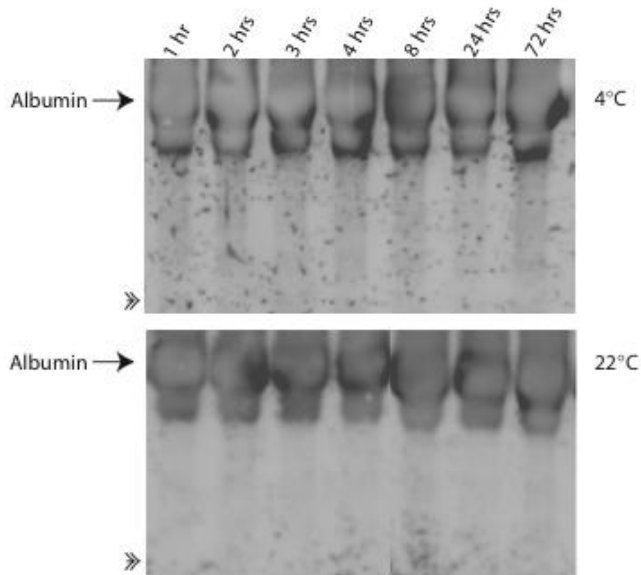
Sammanfattningsvis kunde ingen frisättning av PF4 från blodplättar detekteras vid 4°C upp till 72 h. Vid 22°C visades endast frisättning av PF4 från blodplättar och inte från leukocyter och erythrocyter. Frisättningen verkar även konstant upp till 24 h för att därefter öka och vara mer uttalad vid 72h.

Vid övriga markörer verkar proverna ha samma integritet vid 4°C och 22°C (data visas ej). Varken H4 eller globin har kunnat detekteras i tidsstudien.

4A



4B



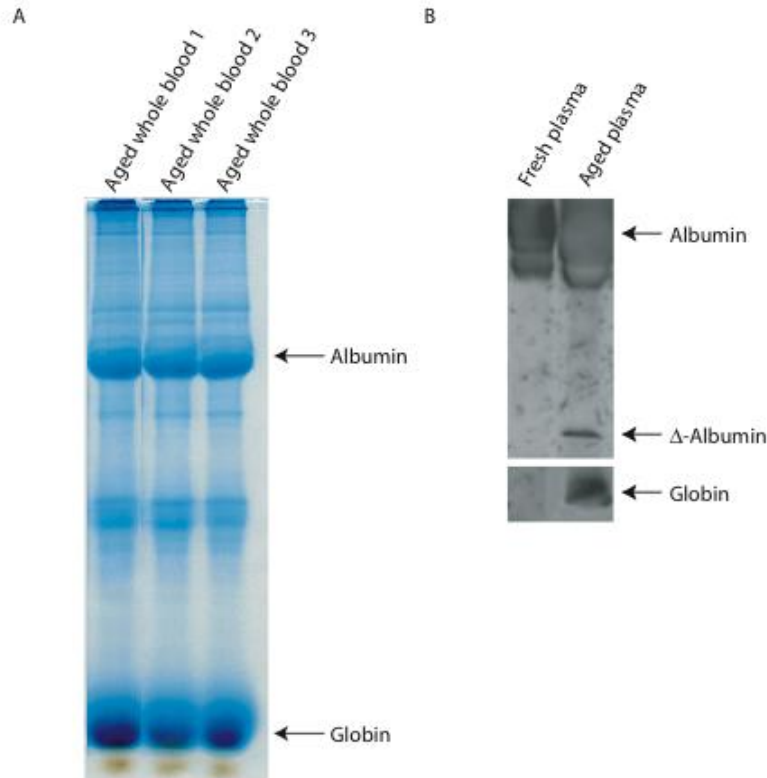
**Figur 4. Kallhantering av K<sub>2</sub>EDTA-blod minimerar cellulär proteinfrisättning vid kortvarig inkubering.** Western blot av plasma preparerad i ett tidsintervall mellan 1h-72. Proverna är eliminerade från blodplättar, ultrafiltrerade och precipiterade. **A)** Antikropp mot PF4; Prover behandlade vid 22 °C visar en konstant frisättning av PF4 från blodplättar upp till 24h, därefter ökar frisättningen vid 72h. Vid 4 °C detekterades inget PF4 under studerat tidsintervall upp till 72h. **B)** Antikropp mot albumin; Ingen nedbrytning av albumin kunde detekteras, varken vid 4°C eller 22°C. Kort pil indikerar bandstorlek av eventuellt nedbrytningsfragment hos albumin, som ses enbart efter extremt lång inkubering (fig. 5).

---

### *Effekt av långvarig förvaring på proteinintegritet*

Plasma innehåller många olika proteaser, t.ex. medlemmar av koagulations- och fibrinolys-kaskaderna. Både koagulering och fibrinolys regleras av inhibitorer och andra regulatorer. De 3020 plasmaproteiner som identifierades av HUPO PPP underkastades en bioinformatisk analys. Av de 3020 proteinerna, identifierades 60 eller ca 2% av proteinerna som endo- och exopeptidaser av olika klasser. Av de 60 proteaserna visade sig 17 tillhöra koagulations- och fibrinolyskaskader. 14 proteasinhibitorer identifierades varav 10 tillhörde koagulations- och fibrinolyskaskader (bilaga 2). För att utreda huruvida proteolys eller inhibering av proteolys dominerade studerades det generella proteinmönstret hos åldrat hel-blod som genomgått cellulär lys/frisättning. Denna analys genomfördes med SDS-PAGE och en totalfärgning av proteiner på gel. Proteinprofilerna visades vara relativt lika i de olika proverna, förvarade under olika lång tid vid 4°C. Albumin och globin verkar vara intakta och detekterades vid deras förutsedda molekylvikter (fig. 5a). Detta tyder på en relativt liten nedbrytning har ägt rum i proverna. För att mer specifikt studera albumin och globin genomfördes western blot. Albumin visade då en liten nedbrytningsprodukt, men fortfarande en stor andel intakt albumin (fig. 5b). Globin visade ingen minskning i innehåll och ingen nedbrytningsprodukt kunde identifieras (fig. 5b).

Av detta kunde slutsatsen att trots kraftig celllys så verkar proteolys vara relativt liten vid studerade kriterier, även då prover förvarats under flera månader vid 4°C.



**Figur 5. Relativt liten proteinnedbrytning vid långvarig förvaring av  $K_2EDTA$ -blod.**

**A)** SDS-PAGE av åldrat helblod, analyserat med proteinfärgning (Coomassie Brilliant Blue). Albumin och globin detekterades i hög koncentration vid deras förväntade molekylvikter. Detta tyder på relativt liten nedbrytning av proteinerna, trots en kraftig frisättning/lysering av åtminstone erythrocyter i det åldrade blodet (se fig. 2). **B)** Western blot av färsk och åldrad plasma med antikroppar mot albumin och globin. Känsligheten och specificiteten hos tekniken ger en känsligare analys än proteinfärgningen och ett nedbrytningsfragment hos albumin kunde detekteras. Men albumin är till stor del fortfarande intakt vid dess estimerade molekylvikt. Ingen reducering i halt av globin eller något nedbrytningsfragment kunde heller detekteras.

---

### ***Effekt av applicerad fysisk stress på cellintegritet***

För att undersöka eventuella effekter av hård fysisk behandling på celler i helblod, utsattes prover för hård fysisk stress. Proverna vortexades vid maxhastighet under 1 min. Detta gjordes för att efterlikna effekter som kan uppstå vid transport. Blodceller sedimenterades därefter med centrifugering och provernas supernatant studerades visuellt. Ett icke-hemolytiskt blodprov uppvisar en typisk gulaktig färg (fig. 2), prov som utsattes för hård fysisk behandling uppvisade i vissa fall ett mer rödaktigt utseende (fig. 2). Den röda färgen som uppstår beror på läckage av erythrocyter, då hem-gruppen i hemoglobin ger en röd färg. Hård fysisk behandling kan tydligen ha en påverkan på cellintegriteten. Detta verkar dock variabelt då inte alla prover uppvisade denna färgförändring. Någon vidare utredning gällande orsaker till denna variabilitet utfördes inte. Risken för hemolys antyder att försiktighet bör tas vid hantering (t ex vid transport) av prover och att man screenar prover för hemolys och dokumenterar innan prover fryses.

### ***Funna resultat i perspektiv till aktuell kännedom***

Våra resultat överensstämmer i stor utsträckning med kliniskt kemiska riktlinjer för hantering av blod, för transfusioner. Enligt Blajchman et al (1979) kan erythrocyter sparas i 3 veckor vid 4 °C utan förluster av funktion och livsduglighet. Blodplättar kan sparas i 72 h vid 22 °C. Däremot är vissa koagulationsfaktorer mindre stabila, faktorer V och VIII visar en tidig degradering efter upptining av färskfrusen plasma (Blajchman, Shepherd et al. 1979). Erythrocyter har en livstid på 120 dagar *in vivo* (Gershon H, 2001), blodplättar har en livstid på 7-10 dagar *in vivo* (Deitcher, Chiang 2001). Vitamin K-beroende koagulationsfaktorer (VII, IX, X, trombin m.fl.) har halveringstider mellan 4-60 tim. Detta belyser vikten av att anpassa procedur beroende av vad man studerar. Det är stor mångfald bland protein biomarkörer, typ av provtillsatser, maxtider och temperaturer använda (tabell 2). Direkt jämförbara till denna studie är analys av protein fraktioner, hemoglobinfraktioner där EDTA plasma används. Vid PF4 analys rekommenderas EDTA med tillsats av theophylline och prostaglandin PGE1 och förvaring på is. Vid PF4 analys rekommenderas vidare en fraktionering inom 90 min. Kallhantering, användning av EDTA-plasma och fraktionering inom 90 minuter verkar vara gemensamma nämnare för dessa studier och således våra studier och rekommenderas därför för denna typ av studier. Hantering inom 90 minuter är också en realistisk tidsperiod för hantering i sjukhusmiljö.

Det finns mycket värdefull information att hämta från den kliniska kemien och för blodtransfusioner. I många fall verkar detta förbises vid biomarkörstudier och proteinanalyser. Det är viktigt att belysa denna redan kända information. I klinisk kemi är det ett välkänt faktum att blodplättar för transfusioner bevaras bäst vid 22 °C under de förhållanden som används i detta sammanhang. Funna resultat

---

visar däremot på motsatsen, att 4 °C verkar lämpligast för proteinanalyser. Detta överensstämmer med den kliniska kemins riktlinjer.

Slichter et al (1978) belyser vikten av nödvändiga åtgärder vid hantering av blodplättar vid rumstemperatur: metod för beredning av blodplätt-koncentrat, pH, plasmavolyum, förvaringsbehållare, omskakning m.fl. Prover vid rumstemperatur har en högre metabolisk omsättning än vid kyla (Slichter 1978). Åtgärder som nämnt ovan tas sällan vid proteinanalyser. Att inte vidta nödvändiga åtgärder vid rumstemperatur kan därför leda till oönskade artefakter. Så länge inte procedurer för kompensation för den ökade metaboliska omsättningen vidtas vid protein analyser verkar kallhantering vara att föredra, enligt funna resultat.

Awad et al (2004) rapporterade att inga signifikanta förändringar av International Normalized Ratio (INR) eller plasma-aktivitet skedde under en 24 h period.

Studerade proteiner innefattade faktorerna II (protrombin), VII, IX och X (Awad, Selim et al. 2004).

Hsieh et al (2006) studerade proteinprofiler med MALDI-TOF MS. De fann att vid rumstemperatur skedde endast minimala förändringar av proteinprofilerna efter 6 h. Efter 8 h var förändringarna mer observerbara. Vid 4 °C visades inga signifikanta förändringar vid 24 h inkubation (Hsieh, Chen et al. 2006).

### ***Praktisk användning för proteinanalys***

Ultrafiltrering har visat sig ha ökat känsligheten för detektion av markörer för cellys markant. Med en ”cut off” vid 50 kDa avlägsnas störande proteiner som är större än 50 kDa. Vissa av dessa finns i hög koncentration, som t.ex. albumin.

Detektion av små mängder PF4 och H4 kan därför ha möjliggjorts med ultrafiltrering. Vid kombination av ultrafiltrering och precipitering ökades känsligheten ytterligare och detektion av PF4 i blodprover från 30 min till 72 h ökade markant. Precipitering bidrar till renare prover då salter och föroreningar skiljs från proteiner. Ultrafiltrering har utifrån funna resultat visats öka känsligheten i detektion ca 20-faldigt.

En kombination av ultrafiltrering och precipitering har ytterligare ökat känsligheten i detektion ca 80-faldigt.

Uppfattningen om att biomarkörer återfinns i den lågmolekylära delen av prover har på senare tid fått ökat inflytande (Petricoin, Ardekani et al. 2002; Petricoin, Belluco et al. 2006).

Hänsyn bör tas till funna resultat vid proteinanalyser. Vid biomarkörstudier används ofta ”high throughput” analyser som masspektrometri. Vid sådana undersökningar av en stor mängd information, finns en stor risk för missbedömningar. Analyser kan överskuggas av koagulationsaktivering, cellys och indirekt påverkan av patologi som inte nödvändigtvis återspeglar ett specifikt sjukdomstillstånd. Funna resultat visar tydligt att t.ex. serum med ökad koagulation kan bidra till en sådan ökad problematik. Ökad koagulationsaktivering hos tumörpatienter är ett välkänt fenomen (Mousa 2003; Zakarija and Kwaan 2003). Tumörpatienter har även ökad tendens till cachexi, ökad avmagring (Boddaert, Gerritsen et al. 2006). Förändringar i koncentration av plasmaproteiner p.g.a. cirkulerande inflammatoriskt associerade cytokiner, akutfas-



---

reaktanter är också associerade med sjukdom (Gabay and Kushner 1999). Sådana händelser verkar ibland vara förbisedda vid analyser. Frågan om man studerar tidigare kända fysiologiska responser eller gör nya upptäckter kan därför ibland ifrågasättas (Davis and Patterson 2007). Kanske kan i slutändan hänsyn tas till både välkända fysiologiska och patofysiologiska fenomen i kombination med mer specifika markörer för gynnsamma diagnostiska analyser.

### ***Rekommendationer***

Kallhanterad K<sub>2</sub>EDTA plasma verkar vara att föredra framför serum. Vi föreslår användning av ett protokoll för blodplätt-reducerad, koagulationsinhiberad EDTA plasma, frysta inom 90 min (se bilaga 3 för fullständigt protokoll) för att reducera risken av ökad proteinkomplexitet *in vitro*. Vi föreslår användning av valideringsmarkörer för inhibering eller aktivering av koagulation, celllys och proteinnedbrytning för provstatus. Vidare föreslår vi användning av ultrafiltrering och precipitering vid analys av mindre proteiner/peptider, då detta har visats öka känsligheten för detektion markant.

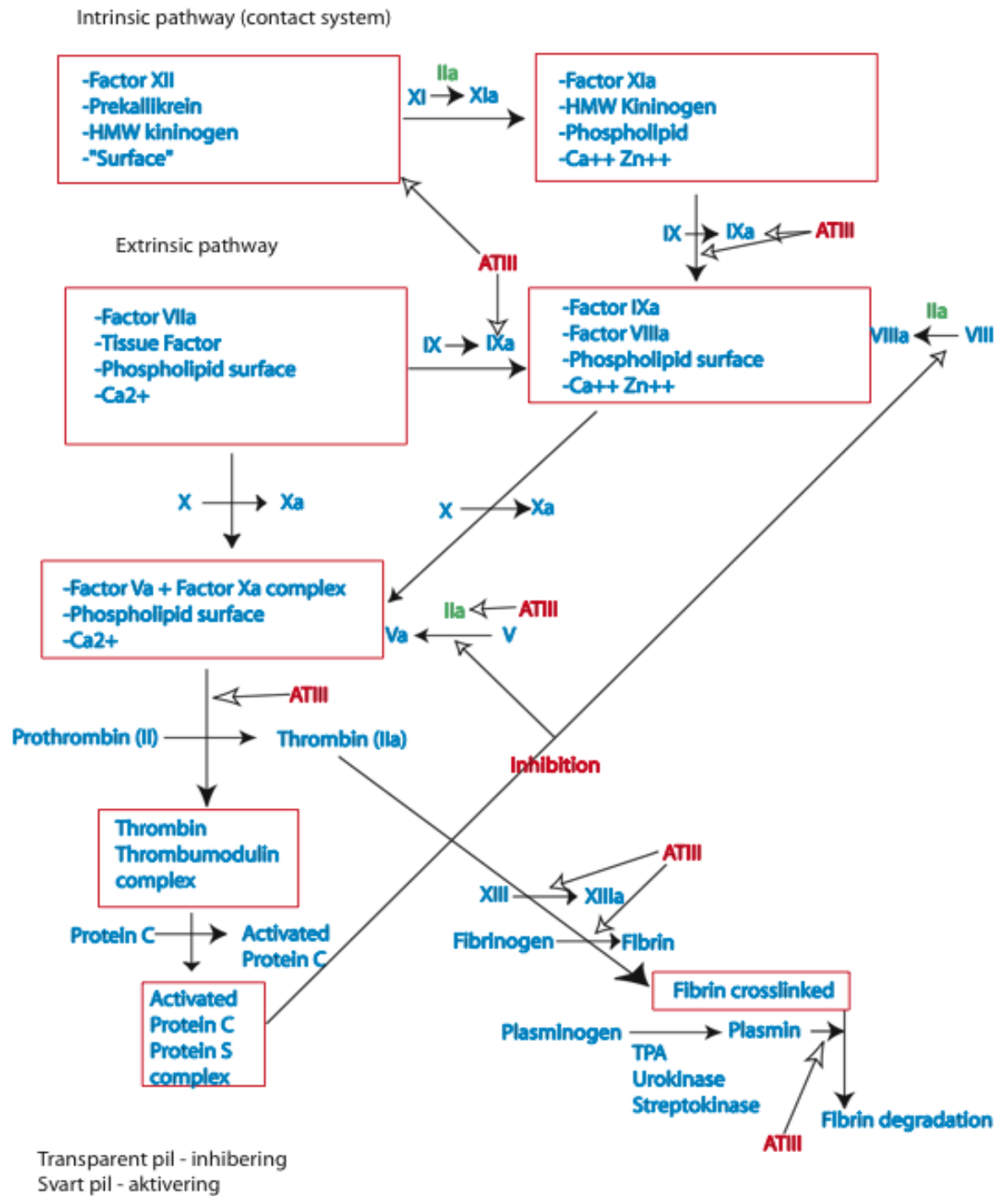
Med utmaningen att samla icke-variabla prover föreslår vi att man konsekvent registrerar verkliga handlingsparametrar, och inte enbart de parametrar man utgått ifrån att nå. Utvärdering med valideringsmarkörer bör göras även då hantering har skett enligt standardprotokoll.

---

## Referenser

- Amelot, A. A., M. Tagzirt, et al. (2007). "Platelet Factor 4 (CXCL4) Seals Blood Clots by Altering the Structure of Fibrin." J Biol Chem **282**(1): 710-720.
- Anderson, N. L. and N. G. Anderson (2002). "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects." Mol Cell Proteomics **1**(11): 845-67.
- Awad, M. A., T. E. Selim, et al. (2004). "Influence of storage time and temperature on international normalized ratio (INR) levels and plasma activities of vitamin K dependent clotting factors." Hematology **9**(5-6): 333-7.
- Blajchman, M. A., F. A. Shepherd, et al. (1979). "Clinical use of blood, blood components and blood products." Can Med Assoc J **121**(1): 33-42.
- Boddaert, M. S., W. R. Gerritsen, et al. (2006). "On our way to targeted therapy for cachexia in cancer?" Curr Opin Oncol **18**(4): 335-40.
- Bonini, P., M. Plebani, et al. (2002). "Errors in laboratory medicine." Clin Chem **48**(5): 691-8.
- Boone, D. J., S. D. Steindel, et al. (1995). "Transfusion medicine monitoring practices. A study of the College of American Pathologists/Centers for Disease Control and Prevention Outcomes Working Group." Arch Pathol Lab Med **119**(11): 999-1006.
- Davis, M. T. and S. D. Patterson (2007). "Does the serum peptidome reveal hemostatic dysregulation?" Ernst Schering Res Found Workshop(61): 23-44.
- Degen, S. J. and E. W. Davie (1987). "Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin." Biochemistry **26**(19): 6165-77.
- Gabay, C. and I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med **340**(6): 448-54.
- Hsieh, S. Y., R. K. Chen, et al. (2006). "Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling." Proteomics **6**(10): 3189-98.
- Luque-Garcia, J. L. and T. A. Neubert (2006). "Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry." J Chromatogr A.
- Mousa, S. A. (2003). "Antithrombotics in thrombosis and cancer." Expert Rev Cardiovasc Ther **1**(2): 283-91.
- Omenn, G. S., D. J. States, et al. (2005). "Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database." Proteomics **5**(13): 3226-45.
- Petricoin, E. F., A. M. Ardekani, et al. (2002). "Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer." Lancet **359**(9306): 572-7.
- Petricoin, E. F., C. Belluco, et al. (2006). "The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery." Nat Rev Cancer **6**(12): 961-7.
- Rai, A. J., C. A. Gelfand, et al. (2005). "HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples." Proteomics **5**(13): 3262-77.

- 
- Rai, A. J. and F. Vitzthum (2006). "Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: implications for clinical proteomics." *Expert Rev Proteomics* **3**(4): 409-26.
- Slichter, S. J. (1978). "Preservation of platelet viability and function during storage of concentrates." *Prog Clin Biol Res* **28**: 83-100.
- Strieter, R. M., M. D. Burdick, et al. (2006). "Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis." *Eur J Cancer* **42**(6): 768-78.
- Tammen, H., I. Schulte, et al. (2005). "Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display." *Proteomics* **5**(13): 3414-22.
- White, J. G. and G. Escolar (2000). "EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading." *Platelets* **11**(1): 56-61.
- Zakarija, A. and H. C. Kwaan (2003). "Bleeding and thrombosis in the cancer patient." *Expert Rev Cardiovasc Ther* **1**(2): 271-81.
- Zucker, M. B. and J. Borrelli (1954). "Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold." *Blood* **9**(6): 602-8.
- Guyton A C, Hall J E, 1996, *Textbook Of Medical Physiology*, W.B Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, ISBN: 0-7216-5944-6
- Hames B D & Rickwood, 1988, *Gel Electrophoresis Of Proteins*, IRL Press, Oxford, Washington DC, ISBN: 0-904147-22-3
- Jesty, J, 2005, Blood Coagulation, Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons
- Gershon H, 2001, Erythrocytes, Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons
- Deitcher S R, Chiang T M, 2001, Platelets, Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons
- Kuijpers T W, Roos D, 2001, Neutrophils, Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons
- Honeyman M C, Harrison L C, 2004, Immunity: Humoral and Cellular, Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons



*Proteases*

<i>Protein Name</i>	<i>UniProt AC/isoform ID</i>
"fibrinogen alpha/alpha-e chain precursor, splice isoform alpha"	P02671-1
fibrinogen beta chain precursor [contains: fibrinopeptide b]	P02675
fibrinogen gamma chain precursor (pro2061)	P02679-1
prothrombin precursor	P00734
coagulation factor v precursor	P12259
coagulation factor viii precursor	P00451
coagulation factor ix precursor	P00740
coagulation factor x precursor	P00742
"coagulation factor xi precursor, splice isoform 1"	P03951-1
coagulation factor xii precursor	P00748
"coagulation factor xiii, a1 polypeptide "	P00488
coagulation factor xiii b chain precursor	P05160
von willebrand factor precursor	P04275
plasminogen precursor	P00747
plasma kallikrein precursor	P03952
kallikrein 13 precursor	Q9UKR3
urokinase-type plasminogen activator precursor	P00749

**Protease inhibitors**

<i>Protein Name</i>	<i>UniProt AC/isoform ID</i>
antithrombin-III precursor	P01008
plasma protease c1 inhibitor precursor	P05155
"kininogen precursor, splice isoform HMW (alpha-2-thiol proteinase inhibitor)"	P01042-1
alpha-2-antiplasmin precursor	P08697
heparin cofactor ii precursor	P05546
vitamin k-dependent protein s precursor	P07225
protein z-dependent protease inhibitor precursor	Q9UK55
vitamin-k-dependent protein c precursor	P04070
"tissue factor pathway inhibitor precursor, splice form alpha (tfpi)"	P10646-1
plasminogen-related protein b precursor	Q02325

**Miscellaneous peptidases/proteases****Bilaga 2:2(3)**

<i>Protein Name</i>	<i>UniProt AC/isoform ID</i>
"Predicted Peptidase S1A, chymotrypsin"	NULL 85
glutamate carboxypeptidase-like protein 2 precursor	Q6UWK2
carboxypeptidase n 83 kda chain	
(carboxypeptidase n regulatory subunit) (fragment).	P22792
carboxypeptidase b2	Q96IY4
carboxypeptidase n catalytic chain precursor	P15169
membrane alanine aminopeptidase precursor	P15144
similar to peptidase d	P12955
dipeptidyl peptidase iv	P27487
carboxypeptidase b-like protein	Q9P2Y6
putative dipeptidase	Q9H4A9
tripeptidyl-peptidase ii	P29144
carboxypeptidase d precursor	Q86SH9
blood plasma glutamate carboxypeptidase precursor	Q9Y5X6
n-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase ii	Q9Y3Q0
neprilysin-like metallopeptidase 2	Q96PH9
"leishmanolysin-like peptidase, variant 2 "	Q96KR5
Predicted Signal peptidases I	NULL 2
"Predicted Peptidase S1, chymotrypsin"	NULL 2
cytosol aminopeptidase	P28838
complement c1r-like proteinase	Q9NZP8
procollagen c-proteinase enhancer protein precursor	Q15113
prenylcysteine oxidase precursor	Q9UHG3
"mannan-binding lectin serine protease 2 precursor, splice isoform	O00187-1
"a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif,	NULL 10
"similar to testicular metalloprotease-like, disintegrin-like, cysteine-rich protein ivb "	NULL 7
similar to mannan-binding lectin serine protease 1 metalloprotease 1	Q8IUV8 O95204
"similar to testicular metalloprotease-like, disintegrin-like, cysteine-rich protein ivb "	NULL 5
adamts-7 precursor (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 7)	Q9UKP4
adamts-12 precursor (EC 3.4.24.-) (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12)	P58397
urokinase receptor-associated protein uparap	Q7LGE7
matrix metalloproteinase-14 precursor (ec 3.4.24.-) (mmp-14)	NULL3

---

**Bilaga 2:3(3)**

adams-3 precursor (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3)	O15072
"ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15, splice isoform 1 (ec 3.1.2.15) (ubiquitin thiolesterase 15) (ubiquitin-specific processing protease 15) (deubiquitinating enzyme 15) (unph-2) (unph4)"	Q9Y4E8-1
Predicted OTU-like cysteine protease	Q9NU18
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6 (ec3.1.2.15) (ubiquitin thiolesterase 6) (ubiquitin-specific processing protease 6) (deubiquitinating enzyme 6) (proto-oncogene tre-2)	P35125-3
matrix metalloproteinase-17 precursor (ec 3.4.24.-) (mmp-17)	Q9ULZ9-1
matrix metalloproteinase-15 precursor	P51511
26s protease regulatory subunit 7	P35998
"caspase-6 precursor, splice isoform alpha (EC 3.4.22.-) (apoptotic protease MCH-2)"	P55212-1
"atp-dependent metalloprotease ftsh1 homolog, splice isoform 1"	Q96TA2-1
"similar to probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase faf-y (ubiquitin thiolesterase faf-y) (ubiquitin-specific processing protease faf-y) (deubiquitinating enzyme faf-y) (fat facets protein related, y-linked) (ubiquitin-specific protease 9, y ... "	NULL 2
"transmembrane protease, serine 4 "	Q5XKQ6

**Miscellaneous protease inhibitors**

<i>Protein Name</i>	<i>UniProt AC/isoform ID</i>
"Kininogen precursor, splice isoform LMW (alpha-2-thiol proteinase inhibitor)"	P01042-2
maspin precursor (protease inhibitor 5)	NULL 6
metalloproteinase inhibitor 1 precursor	P01033
serine protease inhibitor kazal-type 5 precursor	Q9NQ38

**Search phrases:** peptidase, proteinase, protease, thrombin, coagulation, heparin, tissue factor, plasmin, kallikrein, serine, cysteine, aspartic, metallo, threonine, factor, urokinase, streptokinase, protein S, protein C, thrombomodulin, fibrin