

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

Etablering av metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser og studier av cystatiner i makrofager og kreftceller

Hilde Rakvaag

Mai 2007



**Institutt for farmasi
Det Medisinske Fakultet
Universitetet i Tromsø**

**Utført ved
Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet
Universitetet i Oslo**

FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden oktober 2006 til mai 2007. Hovedveiledere ved Universitetet i Oslo har vært professor Harald Thidemann Johansen og professor Rigmor Solberg. Internveileder ved Universitetet i Tromsø har vært professor Thrina Loennechen.

Jeg vil takke mine veiledere Harald Thidemann Johansen og Rigmor Solberg for god hjelp både under utførelse av oppgaven og under skriveprosess. Takk til Thrina Loennechen som gjorde det mulig for meg å skrive masteroppgave i Oslo.

Jeg vil også rette en stor takk til avdelingsingeniør Hilde Nilsen for uvurderlig hjelp på labben, og for å alltid ha vært tilgjengelig for spørsmål.

Takk til alle i fjerde etasje ved Farmasøytisk institutt for et godt og inkluderende arbeidsmiljø. En spesiell takk til mine medstudenter på lesesalen, som har gjort oppholdet mitt på Blindern veldig bra.

Tilslutt vil jeg takke Ida for en hyggelig tid i Oslo.

Oslo,
Mai 2007

Hilde Rakvaag

INNHOLDSFORTEGNELSE

FORORD.....	2
INNHOLDSFORTEGNELSE.....	3
FORKORTELSER.....	5
SAMMENDRAG.....	6
1 INNLEDNING.....	7
1.1 Kreft.....	7
1.2 Metastasering.....	7
1.3 Cysteinproteaser.....	7
1.3.1 Cysteinproteasers rolle i kreftutvikling.....	8
1.4 Cystatiner.....	9
1.4.1 Cystatiners rolle i kreftutvikling.....	10
1.4.2 Cystatin C.....	10
1.4.3 Cystatin M.....	10
1.4.4 Cystatin F.....	11
1.5 Mål med oppgaven.....	12
2 MATERIALER.....	13
2.1 Biologisk materiale.....	13
2.2 Kjemikalier og reagenser.....	14
2.3 Løsninger.....	16
3 METODER.....	21
3.1 Celledyrking.....	21
3.1.1 Tining og dyrking.....	21
3.1.2 Splitting.....	21
3.2 Celleforsøk.....	22
3.2.1 Utsåing og stimulering.....	22
3.2.2 Høsting.....	22
3.3 Måling av totalprotein.....	22
3.4 Western blotting.....	23
3.5 Etablering av metode og måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser.....	24
3.5.1 Prøveopparbeidelse.....	24
3.5.2 Måling av inhibitorisk aktivitet.....	25
3.5.3 Kvantifisering av inhibitorisk aktivitet i cellelysater og medier.....	25
3.6 Transfeksjon og ekspresjon av cystatin M.....	25
4 RESULTATER.....	27
4.1 Etablering av funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser.....	27
4.2 THP-1 celler.....	27
4.2.1 Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i THP-1 celler.....	28
4.2.2 Uttrykk av cystatiner i THP-1 celler.....	30

4.3 Xenografter	33
4.3.1 Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i xenografter	33
4.3.2 Uttrykk av cystatiner i xenografter	34
4.4 Kreftcellelinjer	35
4.4.1 Inhibitorisk aktivitet i kreftcellelinjer	36
4.4.2 Uttrykk av cystatiner i kreftcellelinjer	36
4.5 Cystatin M-transfekterte HEK 293 celler	37
4.5.1 Inhibitorisk aktivitet i cystatin M-transfekterte HEK 293 celler	37
5 DISKUSJON	39
5.1 Etableringen av en funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser	39
5.2 Cystatiner i THP-1 celler	41
5.3 Cystatiner i xenografter og kreftcellelinjer	43
6 KONKLUSJON	45
7 REFERANSER	46
8 APPENDIX	49
8.1 Prosedyre for proteinmåling	49
8.2 Prosedyre for TCA-felling og fremstilling av elektroforeseprøver	50
8.3 Prosedyre for Western blotting	51

FORKORTELSER

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovint serum albumin
cDNA	Komplementært DNA
dH ₂ O	Destillert vann
DTT	Ditiotreitol
E-64	Trans-epoksysuksinyl-L-leukylamido (4-guanidino)butan
FBS	Føtalt bovint serum (kalveserum)
ECL	Økt kjemiluminisens
HEK	Humane nyreepitelceller fra foster
HEPES	N-(2-hydroksyetyl)piperazin-N'- (2-etansulfonsyre)-heminatriumsalt
IE	Inhibitorisk enhet
kDa	Kilo Dalton
LAF	Laminær luftstrøm
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
MMP	Matriksmetalloproteinase
NH ₂ Mec	7-amino-4-metylkumarin
PBS	Fosfatbufret saltvann
PMA	Forbol-12-myristat-13 acetat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAMS	Tumorassosierte makrofager
TCA	Triklorediksyre
TEMED	N,N,N,N'-tetra-metyl-etylendiamin
TGF-β	Transformerende vekstfaktor-beta
TPA	Tetradecanoylforbolacetat
Tris	Tris(hydroksymetyl)-aminometan
T-TBS	Trisbufret saltløsning med Tween
Z-phe-arg-NHMec	Benzyloksykarbonyl-fenyl-arginin-NHMec

SAMMENDRAG

Makrofager kan utgjøre en betydelig del av en kreftsvulst. Det er tidligere vist at monocytter ved differensiering mot makrofager uttrykker økte mengder av enkelte cysteinproteaser. Maligne celler er vist å bruke cysteinproteaser i forbindelse med metastasering, og endogene cysteinproteasehemmere antas å kunne hemme denne prosessen. Det var derfor interessant å studere reguleringen i uttrykk og aktivitet av cystatiner ved differensiering av monocytiske celler mot makrofager.

Det ble etablert en funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i laboratoriet ved hjelp av fluorometrisk måling med cysteinproteasen papain som enzym. Metoden ble brukt til å måle inhibitorisk aktivitet av cystatiner i THP-1 celler (en human monocyttlignende akutt leukemisk cellelinje), i diverse humane kreftcellelinjer, i diverse xenografter (human/mus), og i cystatin M-transfekte HEK 293 celler (nyreepitelceller).

THP-1 celler ble stimulert med PMA (40 ng/ml) i 24 timer, og dyrket i opptil 10 dager. Ved stimulering med PMA gikk cellene fra å være frittlevende monocytter til å bli adherente makrofager. Grad av inhibitorisk aktivitet ble regnet ut i inhibitoriske enheter per mg totalprotein for cellelysater og inhibitoriske enheter per ml for cellemedier. En inhibitorisk enhet (IE) ble definert som den konsentrasjonen som må til for å hemme 50 % av papainaktiviteten. Uttrykk av cystatin C, M og F ble analysert ved hjelp av immunodeteksjon (Western blotting). Det ble sett på endring av total inhibitorisk aktivitet over tid, og en eventuell sammenheng mellom inhibitorisk aktivitet og uttrykk av cystatin C, M og F.

Målingene i medieprøver fra cystatin M-transfekte celler viste tydelig økt inhibitorisk aktivitet i de transfekte cellene, noe som bekreftet at metoden fungerte for å måle hemming forårsaket av ekstracellulært cystatin M. Det ble observert en tidsavhengig økning i inhibitorisk aktivitet både i cellelysater og cellemedier. Uttrykk av cystatin C og M ble detektert, men ikke cystatin F. Det ble observert en sammenheng mellom den tidsavhengige økningen i ekstracellulær inhibitorisk aktivitet og uttrykk av ekstracellulært cystatin M.

1 INNLEDNING

1.1 Kreft

Kreft oppstår når celler i kroppen i varierende grad blir autonome og får evnen til å unndra seg kroppens naturlige kontroll- og reguleringsmekanismer. Disse cellene vil da kunne ekspandere på bekostning av normale celler, og vil etter hvert danne en kreftsvulst. Kreftceller deler seg ikke nødvendigvis raskere enn friske celler, men forholdet mellom celledød (apoptose) og celledeling er i ubalanse. Kreftutvikling skjer når det oppstår mutasjoner i gener som i normale celler har sentrale reguleringsfunksjoner. Slike mutasjoner er en trinnvis prosess, og full malignitet er resultatet av en rekke suksessive mutasjoner. De mutasjonene som fører til kreft skjer ofte i protoonkogener eller tumorsuppressorgener. Kreft utvikles da som en konsekvens av at gener som vanligvis stimulerer til normal cellevekst (protoonkogener) får økt aktivitet (da kalt onkogener), eller ved at gener som normalt sørger for å holde celleveksten under kontroll (tumorsuppressorgener) inaktiveres. Karakteristiske trekk for kreftceller er at de i mindre grad differensieres, og dermed taper sin opprinnelige funksjon. De får evne til å stimulere karsdannelse (angiogenese), og til å bevege seg utenfor egne vevsgrenser og invadere nytt vev (metastasing) [1].

1.2 Metastasing

Spredning av kreftceller til nytt vev er det største problemet i behandling av kreft. I friske mennesker sørger ulike kontrollmekanismer for at ulike vev beholder sin integritet. Ved spredning av kreft fungerer ikke lenger alle kontrollmekanismene slik de skal, og over tid kan enkelte cellepopulasjoner i en kreftsvulst få egenskaper som gjør dem i stand til å spre seg systemisk via blod- eller lymfekar og invadere nytt vev. Slike egenskaper er evnen til å løsrive seg fra naboceller, til å danne nye blodkar, og til å ødelegge ekstracellulær matriks og penetrere karvegger [1].

1.3 Cysteinproteaser

Proteaser er enzymer som katalyserer irreversibel spaltning av peptidbindinger i proteiner og peptider. Dette skjer via et nukleofilt angrep på karbonylkarbonet, etterfulgt av en hydrolyse. Proteasene er delt inn i 5 hovedgrupper (serin-, aspartat-, threonin-, metallo-, og cysteinproteaser) basert på mekanismen som brukes for å generere en nukleofil i det aktive

setet. I cysteinproteasene fungerer aminosyren cystein som nukleofil, derav navnet [2]. Cysteinproteaser i mennesket kan deles inn i 4 familier: papainfamilien (C1), calpainfamilien (C2), legumainfamilien (C13) og caspasefamilien (C14) [3].

Papainfamilien har fått navnet sitt fra et planteenzym isolert fra papaya [4], og består av enzymer som alle har en viss likhet i aminosyresekvens, enten generelt eller kun i det aktive setet [2]. Papainfamilien er den av familiene som har flest representanter i menneskekroppen. De mest kjente papainlignende cysteinproteasene er de lysosomale cathepsinene B, H og L, som er observert i alle undersøkte vev og celler i kroppen [2,3]. Disse finnes hovedsakelig i det lysosomale/endosomale system, men skilles også ut for å virke ekstracellulært [3]. Calpainene er intracellulære cysteinproteaser, og finnes i cellenes cytosol [3]. Noen calpainer er uttrykt i alle vev, mens andre er mer vevsspesifikke. Calpainenes funksjoner i menneskekroppen er fremdeles ikke fullstendig klarlagt [2]. Legumainfamilien har fått navnet sitt fra den lysosomale cysteinproteasen legumain, som for øvrig er den eneste representanten i denne familien som hittil er oppdaget i menneskekroppen [3]. Legumain finnes i en rekke vev, blant annet nyrer, lever, milt, livmor og hjerte. Legumain er også observert i mange typer kreftsvulster [5-7]. Mye er fremdeles uvisst om legumains rolle i kroppen, men enzymet er vist å inngå i prosesser som osteoklastinhibisjon [8], antigenpresentasjon i MHC-II [9], og aktivering av matriks-metalloproteinase-2 (MMP-2) og økt metastasering av kreftsvulster [7,10]. Caspasene har strukturelle likheter med legumain [11], og finnes uttrykt i cytosol i de fleste celler i menneskekroppen. Det er til nå funnet 11 representanter for denne familien i mennesket, men funksjonen til alle disse er ikke fullstendig kjent [2].

Cysteinproteaser deltar i en rekke biologiske prosesser i menneskekroppen, både intracellulært og ekstracellulært. De er blant annet involvert i omsetning av kroppens egne proteiner, degradering av fremmede proteiner (for eksempel i forbindelse med presentasjon av antigener), apoptose og omsetning av ekstracellulær matriks [2].

1.3.1 Cysteinproteasers rolle i kreftutvikling

Flere patofysiologiske tilstander er satt i sammenheng med en ubalanse i cysteinproteasenes aktivitet, blant annet utvikling og spredning av kreft. I forbindelse med kreftcellenes nedbrytning av ekstracellulær matriks og penetrering av karvegger ved metastasering, skiller de ut cysteinproteaser [2]. Cysteinproteaser er vist å være involvert i flere stadier i

kreftprogresjon fra immortalisering og transformasjon av cellene tidlig i forløpet, til tumorinvasjon og angiogenese, og tilslutt metastasering og resistensutvikling mot legemidler [12]. En rekke studier har funnet en sammenheng mellom kreftcellers produksjon av cysteinproteaser, invasivitet og klinisk prognose. Det har blant annet blitt observert økte cathepsin B-nivåer i mange ulike kreftsvulster [2], og kreftceller med en overekspressjon av legumain har vist økt grad av invasivitet og metastasering [7].

Cysteinproteasene er bare ett av flere ekstracellulære proteolytiske systemer som er involvert i vevsdegradering i forbindelse med invasivitet og metastasering ved kreft. Blant andre proteolytiske systemer er plasminogenaktiveringskaskaden (PA) og matriks-metalloproteinaser (MMP) viktige systemer som har blitt nøye studert. Begge har veldokumentert betydning i forhold til invasivitet og metastasering i forbindelse med kreft [13,14].

1.4 Cystatiner

Cystatinene er en stor gruppe naturlige cysteinproteasehemmere [4]. Deres viktigste rolle er sannsynligvis å beskytte celler og vev mot ukontrollert degradering fra lysosomale cysteinproteaser. I mennesket er det kjent ca 12 funksjonelle cystatiner. Disse kan deles inn i 3 typer basert på sekvenslikheter og hvor mange "cystatin-motiver" og disulfidbindinger de har. Type 1 (stefinene) er intracellulære proteiner som hovedsakelig finnes i cellens cytosol, men som også kan være til stede i kroppsvæsker i betydelige konsentrasjoner. De er de minste av cystatinene, inneholder ingen disulfidbindinger, og har en generell struktur som ligner "cystatin-motivet" i andre cystatiner. To stefiner finnes i mennesket: cystatin A og B. Type 2 (cystatinene) er litt større, hovedsakelig ekstracellulære sekreterte proteiner, og er tilstedet i de fleste kroppsvæsker i ulike konsentrasjoner. De inneholder 2 disulfidbindinger og har ett "cystatin-motiv". Dette er den største gruppen, og under denne gruppen finner man blant annet cystatin C, M og F. Type 3 (kininogenene) er store intravaskulære proteiner med høy molekylvekt, bestående av flere domener, blant annet et bradykininholdig domene. De finnes i lever, plasma og synovialvæske. De inneholder 8 disulfidbindinger og 3 "cystatin-motiver". De humane variantene er H- (høy molekylvekt) og L- (lav molekylvekt) kininogener [15].

Alle funksjonelle cystatiner er hemmere av cysteinproteaser i papainfamilien, og noen (cystatin C, M og F) hemmer også enzymer i legumainfamilien [15]. Cystatinene hemmer

cysteinproteasene gjennom en reversibel binding ved å binde seg til enzymet på en måte som blokkerer det aktive setet, og dermed hindrer substratet i å komme til. Bindingen skjer ikke direkte til det aktive setet, noe som hindrer at cystatinet selv blir spaltet i interaksjonen [4]. Type 1- og 2-cystatinene danner et ekvimolart kompleks med proteasen, mens multidomenene i type 3-cystatinene gjør dem i stand til å binde to proteasemolekyler samtidig [15].

1.4.1 Cystatiners rolle i kreftutvikling

Cystatiner er viktige i mange fysiologiske og patofysiologiske prosesser i kroppen. De cytoplasmiske stefinene og de sekreerte type 2 cystatinene er involvert i blant annet celleproliferasjon, celledifferensiering, migrasjon og immunmodulering [12]. Som viktige hemmere av cysteinproteaser kan cystatinene tenkes å spille en rolle i utviklingen av kreft. Bildet er imidlertid komplekst, siden enkelte cystatiner muligens både kan stimulere og hemme kreftutvikling [12].

1.4.2 Cystatin C

Cystatin C er et type 2 cystatin bestående av 120 aminosyrer. Det er det mest studerte humane cystatinet, og også det mest utbredte i menneskekroppen. Genet for cystatin C er lokalisert på kromosom 20, og er et konstitutivt uttrykt gen. Cystatin C produseres i alle vev, og finnes i alle kroppsvæsker. Evnen til å hemme alle undersøkte proteaser i papainfamilien gjør det til en viktig ekstracellulær cysteinproteasehemmer i mennesket. Cystatin C finnes i tilstrekkelig høye konsentrasjoner i alle kroppsvæsker til å kunne hemme enhver lysosomal protease som skilles ut [15]. På grunn av lav molekylvekt (13 kDa) elimineres cystatin C effektivt fra serum ved hjelp av glomerulær filtrasjon i nyrene, og blir derfor mye brukt som markør for glomerulær filtrasjons hastighet (GFR) [16]. I kontrast til cystatin M, ser det ikke ut til at uttrykket av cystatin C varierer betydelig mellom premaligne og maligne celler [17], men til tross for dette har cystatin C vist seg å ha interessante effekter på kreftceller. Proteinet har blitt vist å effektivt kunne hemme *in vitro* kreftcellemediert degradering og invasivitet av en ekstracellulær matriks [18-21]. I en studie på muterte mus uten uttrykk av cystatin C, ble det imidlertid vist redusert metastasering i disse musene sammenlignet med normale mus [22].

1.4.3 Cystatin M

Cystatin M er et type 2 cystatin bestående av 121 aminosyrer. Genet for cystatin M ligger på kromosom 11, mens andre humane type 2 cystatingener ligger på kromosom 20 [15]. Cystatin

M uttrykkes hovedsakelig i epitelceller i ulike vev i mennesket [15,23]. Selv om de fleste type 2 cystatiner er ekstracellulære hemmere av cysteinproteaser, fungerer cystatin M både intra- og ekstracellulært [23,24]. Cystatinet ble oppdaget som en cDNA-sekvens i et søk etter nye cystatiner i et humant cDNA bibliotek laget av amniotiske celler og hud fra foster, og ble i denne forbindelse kalt cystatin E [25]. Uavhengig av dette ble cystatinet oppdaget omtrent samtidig av en annen forskningsgruppe som jobbet med å identifisere gener involvert i metastasering av brystkreft. Det ble oppdaget som en cDNA-sekvens som kun var tilstede i primærsvulst og ikke i metastasesvulst fra én og samme pasient. Sekvensen viste seg å kode for et nytt protein som av denne gruppen ble kalt cystatin M [26]. Økt uttrykk av cystatin M i brystkreftceller er vist å signifikant redusere migrasjon og matrigelinvasjon *in vitro* samt vekst av primærtumor og metastasering *in vivo* [17]. Det er i flere arbeider vist at cystatin M er nedregulert ved brystkreft [26-28]. Ved å hemme uttrykket av cystatin M i en metastatisk oral kreftcellelinje, ble det observert at aktiviteten av cysteinproteaser økte, mens den inhibitoriske aktiviteten både intracellulært og i mediet ble redusert. Kreftcellene med hemmet uttrykk av cystatin M viste, sammenlignet med kontrollcellene, markant økt proliferasjonsrate, *in vitro* motilitet og matrigelinvasivitet [29]. I en studie for å identifisere molekyler assosiert med metastasering i en plateepitelcancer fra munnhule ble det imidlertid vist en oppregulering av cystatin M i metastatisk vev i forhold til i primærtumor [24].

1.4.4 Cystatin F

Cystatin F er et type 2 cystatin bestående av 126 aminosyrer [15]. Det finnes hovedsakelig i hematopoetiske celler, og blir også kalt leukocystatin [30,31]. Et særlig høyt uttrykk har blitt observert i perifere blodceller, milt og thymus [31]. Regulering av genet for cystatin F har blitt undersøkt i en human premyeloid cellelinje (U937) [32]. Det ble vist at differensiering mot en makrofagliggende cellelinje ved hjelp av stimulering med en forbolester førte til nedregulering i uttrykket av cystatin F. Det ble også observert at en stor fraksjon av hemmeren er lokalisert intracellulært i lysosomlignende granuler i U937 celler, noe som er uvanlig for type 2 cystatiner. Dette tyder på at cystatin F kan ha intracellulære funksjoner som for eksempel regulering av enzymer involvert i antigenpresentasjon [15,32]. Ekspresjonen av genet for cystatin F har blitt vist å være oppregulert i kreftcellelinjer i menneske og mus, noe som tyder på at cystatin F kan være involvert i å fremme metastasering av kreftsvulster [12,33,34].

1.5 Mål med oppgaven

Det vil bli forsøkt etablert en funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i laboratoriet ved hjelp av fluorescensmålinger med papain som enzym. Metoden vil bli benyttet til å måle inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i THP-1 celler, utvalgte humane kreftcellerlinjer, utvalgte xenograft (human/mus), samt i cystatin M-transfekte HEK 293 celler.

Makrofager kan utgjøre en betydelig del av en kreftsvulst [35]. Det er tidligere vist at monocytter ved differensiering mot makrofager får økt uttrykk av enkelte cysteinproteaser og økt enzymaktivitet [5,36,37]. I den forbindelse er det interessant å studere produksjon og aktivitet av ulike cystatiner i makrofaglignende THP-1 celler. Det er ønskelig å se på hvilke cystatiner som produseres, tidsrespons på produksjonen av cystatiner i makrofagutviklingen, og inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser. Sammenhengen mellom uttrykk av cystatiner og inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser vil bli studert.

2 MATERIALER

2.1 Biologisk materiale

Følgende biologiske materialer ble brukt:

THP-1 celler (American Type Culture Collection, TIB-202)

Cellemedium fra cystatin M-transfektete HEK 293 celler (American Type Culture Collection, CRL-1573), levert fra Radiumhospitalet.

Humane kreftcellelinjer fra Radiumhospitalet (Tabell 2.1)

Xenografter (human /mus) fra Radiumhospitalet (Tabell 2.2)

Tabell 2.1: Kreftcellelinjer brukt i analyser av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser og Westernforsøk.

Kreftcellelinje (human)	Krefttype
OHS	Osteosarkom
III1b	Modifisert utgave av OHS. Transfektet med vektor med ribozym som ødelegger proteinet S100A4
pH β	Modifisert utgave av OHS. Transfektet med vektor, men uten ribozym som ødelegger S100A4.
SKBr3	Brystkreft
MA11	Brystkreft
LOX	Hudkreft/føflekkreft
FEMX	Hudkreft/føflekkreft
HeLa	Livmorhalskreft
HCT116	Tykkarmskreft
HT29	Tykkarmskreft

Tabell 2.2: Xenograft brukt i analyser av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser og Westernforsøk.

Xenograft (human/mus)	Krefttype
OHS	Osteosarkom
II11 β	Modifisert utgave av OHS. Transfektet med vektor med ribozym som ødelegger proteinet S100A4
HeLa	Livmorhalskreft
FUL	Lungekreft
THX	Hudkreft/føflekkreft

2.2 Kjemikalier og reagenser

2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin	Pierce, Boule Nordisk AS
Akrylamid/Bis løsning (37,5:1) (Monomer stamløsning)	BioRad, Hercules, USA
Ammoniumpersulfat	BioRad, Richmond, CA, USA
Brij 35	Sigma-Aldrich
Bromfenolblått	Sigma-Aldrich
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Merck, Darmstadt, Tyskland
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck
Complete mini Protease inhibitor cocktail tablets	Roche, Basel, Sveits
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad
DL-Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
ECL	GE Healthcare/Amersham, England og Pierce, Rockford, USA
E64	Sigma-Aldrich
Etanol	Arcus, Oslo, Norge
Fettfri tørrmelk	Normilk, Stavanger, Norge
Fungizone	Bristol-Meyers Squibb, NY, USA

Føtalt kalveserum	Gibco Life Tech., Invitrogen AS, Norge
Glukose	Sigma-Aldrich
Glycin	VWR international, England
HEPES-løsning	Sigma-Aldrich
Isobutanol	Merck
KCl	Prolabo, Paris, Frankrike
KH ₂ PO ₄	Prolabo
Metanol	Merck
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Prolabo
NaCl	Prolabo
Na ₂ EDTA	Chemi-Teknik, Berlin, Tyskland
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Merck
Natriumcitrat	May & Baker LTD, Dagenham, Storbritannia
Natriumpyrovat	Gibco
n-oktyl-β-D-glukopyranosid	Sigma-Aldrich
Nutridoma-SP	Roche
Papain	Sigma-Aldrich
Penicillin+Streptomycin	Sigma-Aldrich
PMA	Sigma-Aldrich
Ponceau S løsning	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein Standard	BioRad
RPMI 1640 med L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Østerrike
SDS	BioRad
TCA	Merck
TEMED	BioRad
Tris (base)	Sigma-Aldrich
Tryptanblått	Sigma-Aldrich
Tween 20	BioRad
X-ray developer LX 24	Kodak, Oslo, Norge
X-ray fixer AL 4	Kodak
Z-phenyl-arginin-NHMec	BACHEM, Bubendorf, Sveits

2.3 Løsninger

Til celledyrking:

THP-1 medium

RPMI 1640 medium m/ 2mM glutamin og 1.5g/l Na bikarbonat	500 ml
Glukose (10 %)	22,5 ml
1 M HEPES	5 ml
100 mM natriumpyrovat	5 ml
14,3 M 2-merkaptoetanol	1,7 µl
FBS	50 ml
10000 U/ml Penicillin+10 mg/ml streptomycin	5 ml
250 µg/ml Fungizone (amphotericin B)	5 ml

THP-1 medium

med serumerstatning

RPMI 1640 medium m/ 2mM glutamin og 1.5g/l Na bikarbonat	500 ml
Glukose (10 %)	22,5 ml
1 M HEPES	5 ml
100 mM natriumpyrovat	5 ml
14,3 M 2-merkaptoetanol	1,7 µl
10000 U/ml Penicillin+10 mg/ml streptomycin	5 ml
250 µg/ml Fungizone (amphotericin B)	5 ml
Nutridoma-SP	5,5 ml

Lysisbuffer (pH 5,8)

Natriumcitrat	100 mM
Na ₂ (EDTA)	1 mM
n-oktyl-β-D-glukopyranosid	1 % (w/v)

Lysisbuffer m/inhibitor (pH 5,8)

Lysisbuffer	10 ml
Roche Complete mini Protease inhibitor cocktail tablets	1 tbl

Løsning E til tryptanblått

NaCl	8,5 g
KCl	500 mg
KH ₂ PO ₄	50 mg
Na ₂ HPO ₄	60 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
HEPES	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150 mg
dH ₂ O	ad 1 l

Tryptanblått (0,4 % w/v)

Tryptanblått	400 mg
Løsning E	ad 100 ml

PBS

NaH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	6 g
NaCl	8 g
dH ₂ O	ad 1 l

Til Western:

Gelbuffer (1,5 M Tris-Cl pH 8,8)

Tris (base)	36 g
dH ₂ O	ad 200 ml

Stack-gelbuffer (0,5 M Tris-Cl pH 6,8)

Tris (base)	3 g
dH ₂ O	ad 200 ml

SDS (10 %)

SDS	5 g
dH ₂ O	ad 100 ml

Ammoniumpersulfat (10 %)

Ammoniumpersulfat	5 g
dH ₂ O	ad 50 ml

Separasjonsgel (14 %)

dH ₂ O	3,5 ml
1,5 M Tris-Cl pH 8,8	3,3 ml
Monomer stamløsning	6 ml
SDS-løsning (10 %)	130 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	65 µl
TEMED	6,5 µl

Stack-gel (4 %)

dH ₂ O	6 ml
0,5 M Tris-Cl pH 6,8	2,5 ml
Monomer stamløsning	1,3 ml
SDS-løsning (10 %)	100 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	50 µl
TEMED	10 µl

Elektroforesebuffer (pH 8,3)

Tris (base)	7,6 g
Glycine	36 g
SDS	2,5 g
dH ₂ O	2,5 l

Blottingbuffer (pH 8,3)

Tris (base)	12 g
Glycine	58 g
Metanol	800 ml
dH ₂ O	ad 4 l

T-TBS (pH 7,5)

Tris (base)	2,5 g
NaCl	11,5 g
Tween 20	1 ml
dH ₂ O	ad 2 l

Blotto

Fettfri tørrmelk	25 g
T-TBS	500 ml
Varmes opp og filtreres	

Til måling av inhibitorisk aktivitet:

Papainassaybuffer (pH 6,5)

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	14 g
Na ₂ EDTA	0,4 g
Brij 35	0,1 g

Aktivert papinassaybuffer (pH 6,5)

Papainassaybuffer	30 ml
DTT (200 mM)	307 µl

Natriumacetatbuffer (pH 4,5)

Eddiksyre (1 M)	1,4 ml
dH ₂ O	ad 500 ml

Papainfortynning (100 000 X)

Delfortynning:

Papainsuspensjon (18 mg protein/ml)	10 µl
Natriumacetatbuffer (50 mM)	990 µl

Sluttfortynning:

Delfortynning	10 µl
Natriumacetatbuffer (50 mM)	9990 µl

Z-Phe-Arg-NHMec (34 µM)

Z-Phe-arg-NHMec (1 mM)	680 µl
dH ₂ O	ad 20 ml

3 METODER

3.1 Celledyrking

Det ble dyrket THP-1 celler, som er en human monocyttlignende cellelinje opprinnelig isolert fra en akutt monocyttisk leukemi hos en 1 år gammel gutt. Ved stimulering med en forbolester (PMA) differensierer THP-1 celler til makrofaglignende celler som i stor grad ligner kroppens egne makrofager [38].

3.1.1 Tining og dyrking

THP-1 cellene ble oppbevart på flytende nitrogen. De ble tint opp på vannbad ved 37 °C i ca 60 sekunder til det var en liten isklump igjen. Beholderen med cellene ble dreid hele tiden under opptiningen, og vasket med 70 % etanol. Det ble overført 1 ml cellesuspensjon til en 75 cm² Costar dyrkingsflaske, og tilsatt 9 ml THP-1 medium bestående av RPMI 1640 medium inneholdende 4,5 g/l glukose, 10 mM HEPES, 1 mM natriumpyrovat, 0,05 mM 2-merkaptoetanol, 10 % (v/v) føtalt kalveserum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin og 2,5 µg/ml Fungizone (amphotericin B). Flasken ble inkubert i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO₂ over natt. Dagen etter ble cellene spunnet ned ved sentrifugering ved 800 g i 5 min, medium ble sugd av, og nytt medium ble tilsatt.

3.1.2 Splitting

Cellene ble splittet når konsentrasjonen i flasken var nær 1×10^6 celler/ml ved at 1 ml cellesuspensjon (ca 1×10^6 celler) ble pipettert ut, overført til en ny flaske og tilsatt 9 ml THP-1 medium. Dette ble gjort ca 1 gang per uke, og 10 ml THP-1 medium ble tilsatt hver 3. dag.

Alt arbeid med cellene ble utført i aseptisk LAF-benk for å hindre kontaminering av cellekulturen.

3.2 Celleforsøk

3.2.1 Utsåing og stimulering

Før utsåing til forsøk ble 100 µl cellesuspensjon tilsatt 100 µl 0,4 % filtrert tryptanblått, og antall celler ble talt i et Bürker tellekammer. Cellene ble deretter sentrifugert ved 800 g i 5 minutter, og cellepelleten ble vasket 3 ganger med RPMI 1640 medium uten tilsetninger. Cellepelleten ble resuspendert i serumfritt THP-1 medium til en konsentrasjon på $0,5 \times 10^6$ celler per ml.

Til forsøk ble $1,5 \times 10^6$ celler sådd ut per 25 cm² Costar dyrkingsflaske. PMA ble tilsatt til en totalkonsentrasjon på 40 ng/ml i de flaskene som skulle stimuleres, noe som førte til at cellene ble adherente. Etter 24 timers PMA-stimulering ble cellene vasket, og det ble tilsatt nytt medium uten PMA. Det ble utført henholdsvis 3- og 10-dagers forsøk, hvor cellene ble dyrket i henholdsvis 3 og 10 dager etter at de hadde vært stimulert med PMA i 24 timer, og PMA deretter var vasket bort. Ustimulerte celler ble brukt som kontroll. Antall høstinger varierte mellom forsøkene (se Resultater).

3.2.2 Høsting

Mediet ble pipettert av og tatt vare på ved hvert høstingstidspunkt. Cellene ble vasket 3 ganger med PBS, og lysert med 1,5 ml lysisbuffer bestående av 100 mM natriumcitrat, 1 mM Na₂(EDTA) og 1 % (w/v) n-oktyl-β-D-glukopyranosid. Ved høsting av ustimulerte celler ble cellene spunnet ned ved hjelp av sentrifugering ved 800 g i 5 minutter før mediet ble forsiktig pipettert av. Ved høsting av prøver til Western ble det benyttet lysisbuffer tilsatt Roche Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablett (1 tablett til 10 ml lysisbuffer). Prøvene ble oppbevart ved -20 °C frem til analysering.

3.3 Måling av totalprotein

For å måle totalkonsentrasjonen av protein i cellelysater ble BioRad Protein Assay benyttet, som er basert på metode av Bradford [39]. Absorbansen ble målt i en Wallac VictorTM, Perkin Elmer mikroplateleser ved 595 nm. En standardkurve for BSA ble benyttet for å finne totalproteinkonsentrasjonen i prøvene.

Proteinmåling ble utført på cellelysater til måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser og til Western. Totalprotein ble ikke målt i cellemedier. Standardversjonen med et måleområde fra 50 til 300 µg/ml protein ble hovedsakelig benyttet. Alternativ versjon med et måleområde fra 8 til 80 µg/ml ble benyttet til prøver med lavt innhold av protein (se Appendix, 8.1 Prosedyre for proteinmåling).

3.4 Western blotting

Det ble kjørt Western på lysater og medier fra THP-1 celler, og på lysater fra humane kreftcellelinjer og xenografter (human /mus).

Cellelysaten gjennomgikk tre fryse-tine-runder, hvor de ble frosset ved -20 °C og tint igjen ved 30 °C. Prøvene ble opparbeidet ved hjelp av TCA-felling, slik at alle prøvene hadde lik konsentrasjon av proteiner. Denne konsentrasjonen varierte mellom de ulike biologiske prøvematerialene. I noen forsøk måtte det appliseres mindre mengder protein av enkelte prøver på grunn av lite protein. Totalproteinkonsentrasjonen i lysatene ble justert på grunnlag av proteinmåling beskrevet ovenfor (se Appendix, 8.2 Prosedyre for TCA-felling og fremstilling av elektroforeseprøver).

Etter TCA-felling ble prøvene applisert på gel. Dersom det var mulig, ble ikke den ytterste brønnen benyttet. Som standard ble det brukt 2,5 µl Precision plus proteinTM (se Appendix, 8.3 Prosedyre for Western blotting).

Tabell 3.1: Antistoff brukt i Westernforsøk med respektive fortyninger.

Primærantistoff (leverandør)	Fortynning av primærantistoff	Sekundærantistoff (leverandør)	Fortynning av sekundærantistoff
Anti-cystatin C, monoklonalt (R&D)	1:500	geit anti-mus (BioRad)	1:1500
Anti-cystatin F, monoklonalt (R&D)	1:500	geit anti-mus (Pierce)	1:1000
Anti-cystatin M, monoklonalt (R&D)	1:500	geit anti-mus (Pierce)	1:1000
Anti-cystatin M, polyklonalt (R&D)	1:250	kanin anti-geit (Dako)	1:2000

3.5 Etablering av metode og måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser

Det ble etablert en funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i laboratoriet. Metoden er basert på hemming av aktiviteten til papain som måles ved hjelp av et syntetisk peptidsubstrat (Z-fenylalanin-arginin-NHMec). Etter spaltning frisettes den fluorescerende gruppen NH₂Mec, og en økning av fritt NH₂Mec vil dermed gi økt grad av fluorescens, noe som samsvarer med høy aktivitet av papain. Opplysninger brukt i metoden ble basert på metode av Abrahamson [40]. Papain ble fortynnet i 50 mM natriumacetatbuffer (pH = 4,5), og målingen av aktivitet ble gjort i en svakt sur fosfatbuffer (papainassaybuffer, pH = 6,5) med sluttkonsentrasjonene 100 mM NaH₂PO₄·H₂O, 1 mM Na₂EDTA og 1 mM DTT.

Det ble gjort et innledende forsøk for å bestemme en egnet fortynning av papain for videre forsøk. Det ble laget en fortynningsrekke av papain (18 mg protein/ml suspensjon) med 100, 1000, 10 000, 100 000 og 1 000 000 gangers (×) fortynninger. De sterkeste fortynningene (100× og 1000×) ga fullstendig spaltning av peptidsubstratet i løpet av 10 min. Det ble valgt en 100 000 gangers fortynning som egnet fortynningsgrad basert på at det her var mulig å måle en jevn og betydelig substratspaltning i løpet av 10 min, samtidig som forbruket av substrat var så lite at konsentrasjonen i liten grad endret seg.

E-64 er en irreversibel inhibitor av de fleste cysteinproteaser, inkludert papain. I innledende forsøk ble E-64 brukt til å hemme all proteolytisk aktivitet i papainsuspensjonen, og den molare konsentrasjonen av papain etter fortynning (100 000 ganger) ble estimert til å være mellom 10 og 20 nM.

3.5.1 Prøveopparbeidelse

Lysater og medier ble kokt i 5 min og sentrifugert ved 10 000 g og 4 °C i 5 min. Supernatanten ble overført til nye rør, og pelleten ble kastet. Det ble målt inhibitorisk aktivitet i lysater og medier fra THP-1 celler, i lysater fra kreftcellelinjer (se tabell 2.1) og xenografter (se tabell 2.2), og i medier fra cystatin M-transfektete HEK 293 celler.

3.5.2 Måling av inhibitorisk aktivitet

Det ble benyttet svarte flatbunnede 96-brønners Costar mikroplater. Papainsuspensjon fortynnet 100 000 ganger ble tilsatt alle brønner i et volum på 20 µl. Alle prøver ble så tilsatt i et volum på 17 µl. Blindprøve besto av 20 µl natriumacetatbuffer + 17 µl papainassaybuffer uten DTT. Hver brønn ble så ved hjelp av autoinjektor i mikroplateleseren tilsatt 83 µl papainassaybuffer med DTT. Platen ble ristet i 10 sekunder og inkubert ved 37 °C i 10 minutter, før det ved hjelp av autoinjektor ble tilsatt 50 µl substratløsning (34 µM Z-fenylalanin-arginin-NHMec) til en sluttkonsentrasjon på 10 µM, og et sluttvolum per brønn på 170 µl. Det ble umiddelbart målt fluorescens ved 355 nm eksitasjon og 460 nm emisjon. For hver brønn ble det utført 10 målinger med 1 minutt mellomrom og 3 sekunders risting før hver måling. Målingen ble foretatt ved 37 °C. Økning i fluorescens per sekund ble målt, og alle prøver ble utført i triplikat.

3.5.3 Kvantifisering av inhibitorisk aktivitet i cellelysater og medier

Cystatiners hemming av cysteinproteaser skjer gjennom en reversibel mekanisme. Dette innebærer et problem i forhold til at ulike grader av inhibisjon er vanskelig å sammenligne direkte. Vi valgte derfor å sammenligne alle prøver ved samme grad av inhibisjon (50 %). For å oppnå dette måtte det etableres en rekke ulike fortyninger og en standardkurve ble brukt for å estimere hvilken fortyning som tilsvarer 50 % hemming av papain. En inhibitorisk enhet (IE) ble i denne oppgaven definert som den konsentrasjonen av inhibitorisk aktivitet som må til for å hemme 50 % av papainaktiviteten under prøvebetingelsene beskrevet over. Inhibitorisk aktivitet ble regnet ut i IE/mg totalprotein for lysater og IE/ml for medier.

3.6 Transfeksjon og ekspresjon av cystatin M

Transfeksjon og ekspresjon av cystatin M ble utført av postdoc John Briggs ved Tumorbiologisk avdeling, Radiumhospitalet. I korte trekk gikk dette ut på følgende: Ekspresjonsplasmid med humant cystatin M (hCST6) var gitt av Professor Daniel Keppler, Department of Cellular Biology & Anatomy, Louisiana State University Health Science (LSUHSC), USA. Plasmidet inneholdt full-lengde cystatin M cDNA (475 bp) som var klonet inn i KpnI/EcoRI-setene i polylinkeren til den mammalske ekspresjonsvektoren pTracer-CMV2 (6,2 kb; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Denne vektoren bruker CMV-promoteren til å drive ekspresjonen av det innsatte genet [17].

HEK 293 celler ble brukt til transfeksjon. HEK 293 er nyreepitelceller isolert fra humant foster, og mye brukt til formålet da de er enkle å transfektere og dyrke. Cellene ($2,5-10 \times 10^5$) ble ved 90-95 % konfluens transient transfektert med plasmid ved bruk av liposom-metode (Lipofectamine™ 2000; Invitrogen). Mengde plasmid:liposom varierte fra 1:0,5-1:5. Transfektete celler ble dyrket i 18-48 timer før høsting. Dyrkningsmedium ble mottatt fra Radiumhospitalet for analyser av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser.

4 RESULTATER

4.1 Etablering av funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser

Cellelysater og cellemedier fra THP-1 celler ble brukt som modell for etablering av en funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser basert på fluorometrisk måling med papain som enzym. En ukjent og varierende grad av inhibitorisk aktivitet i lysater og medier gjorde det til en utfordring å titrere seg inn i ønsket fortynningsområde. Det ble først forsøkt målt inhibitorisk aktivitet av ufortynnede lysater og medier. Disse målingene viste inhibitorisk aktivitet, men graden av papainhemming var så sterk for de fleste prøver at de i liten grad lot seg sammenligne. Basert på disse målingene ble det derfor laget ulike fortynningsrekker inntil man hadde kommet fram til egnede fortynningsområder for lysater og medier. Optimal fortynning resulterte i hemming på omlag 50 % av papainaktiviteten, og målet var å sammenligne prøver med ulik aktivitet ved samme grad av hemming.

Det ble konstantert et egnet fortynningsområde for lysater i området 0,5-100 % av ufortynnet prøve, og for medier i området 5-100 % av ufortynnet prøve. Dette ble videre brukt som et grunnlag ved analysering av THP-1 forsøk, xenografter, kreftcellelinjer og transfekterte HEK 293 celler. Til tross for disse retningslinjene var det likevel ofte nødvendig å titrere seg inn til riktig fortynningsgrad i hvert enkelt tilfelle grunnet variasjon i inhibitorisk aktivitet i ulike prøver.

4.2 THP-1 celler

Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser ble undersøkt i lysater og medier fra THP-1 celler ved hjelp av fluorometrisk måling med papain som enzym, og uttrykk av cystatiner ble undersøkt etter elektroforese og immunoblotting ("Western"). Generelt ble THP-1 celler dyrket i 3 til 10 dager etter en 24 timers stimulering med PMA (40 ng/ml). Celler ble lysert og medium høstet for å analyseres med hensyn på inhibitorisk aktivitet mot papain og innhold av cystatin C, M og F for å se på om PMA-stimuleringen påvirket cellenes produksjon av cystatiner. Uttrykk i ustimulerte celler ble sammenlignet med uttrykk i celler som var stimulert med PMA i 24 timer. Tilsvarende ble cystatinproduksjonen i celler dyrket i 3-10

dager etter PMA-stimulering sammenlignet med hverandre med hensyn på en eventuell endring i produksjon over tid. I tillegg var det interessant å undersøke om det kunne måles inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i cellelysater og cellemedier, og om en eventuell aktivitet endret seg ved dyrkning i 3-10 dager etter PMA-stimulering. En analyse av inhibitorisk aktivitet i medier var interessant fordi cystatiner er sekretoriske proteiner som skilles ut i mediet. Det ble sett på sammenhengen mellom cellenes produksjon av cystatiner og inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i både lysater og medier.

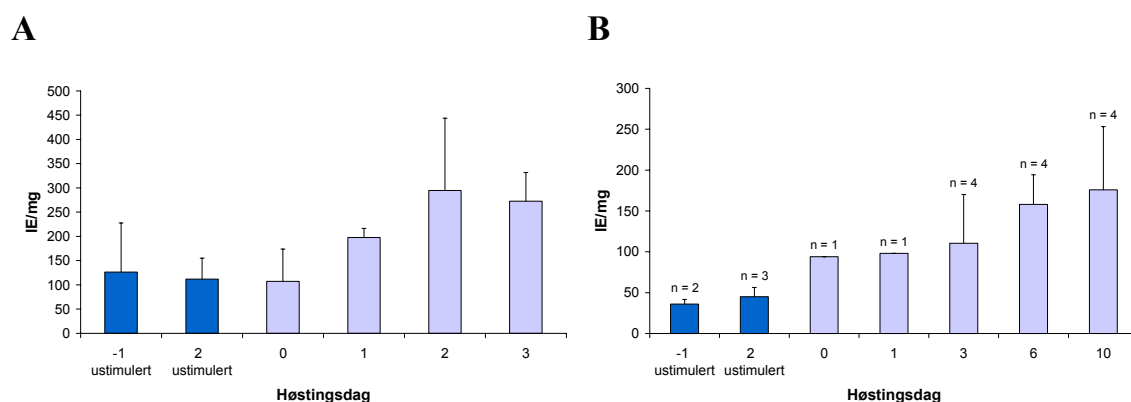
Lysing av celler og høsting av medium ble utført følgende dager: Dag -1 (forsøksstart, utsåing av celler og tilsetting av 40 ng/ml PMA), dag 0 (celler eksponert for PMA i 24 timer), dag 1 (1 døgn etter PMA-stimulering), dag 2 (2 døgn etter PMA-stimulering), dag 3 (3 døgn etter PMA-stimulering), dag 6 (6 døgn etter PMA-stimulering) og dag 10 (10 døgn etter PMA-stimulering). I tillegg ble det høstet ustimulerte celler på dag -1 (forsøksstart) og på dag 2 (celler har vært dyrket i 3 døgn etter utsåing uten PMA-stimulering). Det ble ikke høstet ved alle tidspunkter i alle forsøk.

4.2.1 Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i THP-1 celler

Det ble registrert inhibitorisk aktivitet mot papain i lysater fra THP-1 celler ved alle prøvedager. I 3-dagers forsøket (figur 4.1.A) var det ingen forskjell i inhibitorisk aktivitet mellom ustimulerte celler og celler som var stimulert med PMA i 24 timer. Det ble imidlertid observert en økning i inhibitorisk aktivitet i celler dyrket i ett døgn etter stimulering (dag 1) sammenlignet med ustimulerte kontrollceller. Dette gjaldt både sammenlignet med ustimulerte celler høstet ved forsøksstart (dag -1) og ustimulerte celler som var dyrket i 3 døgn (dag 2). Det var en ytterligere økning i inhibitorisk aktivitet i celler dyrket i 2 døgn etter stimulering (dag 2). For celler dyrket i 3 døgn etter stimulering (dag 3) var aktiviteten igjen litt lavere, men fremdeles høy sammenlignet med både kontrollceller og celler høstet på dag 0 og 1.

I 10-dagers forsøket (figur 4.1.B) ble det observert en økning i inhibitorisk aktivitet for de stimulerede cellene høstet på dag 0 sammenlignet med de ustimulerte kontrollcellene. Fra dag 0 til dag 3 var det ingen forskjell i inhibitorisk aktivitet, mens det fra dag 3 til 10 var en jevn økning. Totalt sett var det ca 4 ganger så høy inhibitorisk aktivitet i celler dyrket i 10 dager etter PMA-stimulering som i ustimulerte kontrollceller.

Generelt viste 3-dagers forsøkene høyere grad av inhibitorisk aktivitet ved alle dager sammenlignet med 10-dagers forsøkene. Graden av økning i inhibitorisk aktivitet fra dag -1 til dag 3 økte likevel i omtrent samme grad i de to forsøksoppsettene (2-3 ganger økning i aktivitet). Ustimulerte kontrollceller høstet på dag 2 viste tilnærmet lik grad av inhibitorisk aktivitet som ustimulerte kontrollceller høstet ved forsøksstart både i 3- og 10-dagers forsøkene.

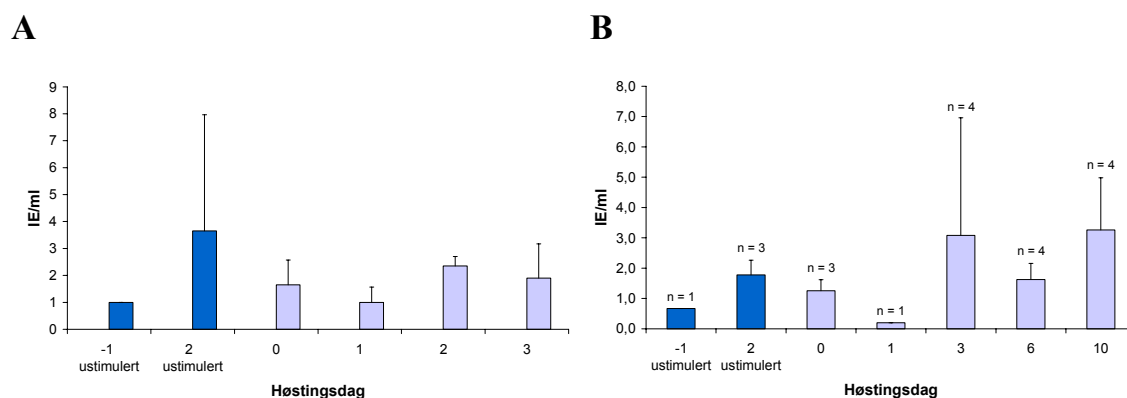


Figur 4.1: Tidsrespons av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i lysater fra PMA-stimulerte THP-1 celler.

Celler ($1,5 \times 10^6$) ble stimulert med PMA (40 ng/ml) i 24 timer før cellelysater ble høstet etter 0-3 dager (A, $n=2$) eller 0-10 dager (B, $n=1-4$). To ustimulerte kontroller ble høstet og lysert ved henholdsvis forsøksstart (dag -1 ustimulert) og etter dyrking i 3 døgn fra utsåing (dag 2 ustimulert). Inhibitorisk aktivitet ble målt fluorometrisk med papain som enzym (se Metode) og er uttrykt i inhibitoriske enheter per mg totalprotein (IE/mg) \pm standardavvik.

Det ble registrert inhibitorisk aktivitet i medier fra THP-1 celler ved alle dager. Figur 4.2.A viser en tendens til økning i inhibitorisk aktivitet fra mediumprøven høstet ved forsøksstart til mediumprøven høstet ved dag 0, hvor cellene hadde vært dyrket i medium tilsatt PMA i 24 timer. Den ustimulerte prøven høstet etter 3 døgn dyrking (2 ustimulert) viste høyere aktivitet enn prøver fra de andre dagene, men hadde et stort standardavvik. På dag 1 var aktiviteten den samme som ved forsøksstart (dag -1), mens den igjen økte fra dag 1 til 2. Fra dag 2 til 3 var det en liten nedgang i aktivitet. Nytt medium ble tilsatt ved hvert tidspunkt som medium ble høstet.

Figur 4.2.B viser en tendens til økning i inhibitorisk aktivitet fra mediumprøven høstet ved forsøksstart (dag -1) til mediumprøven høstet ved dag 0. Ustimulert prøve høstet etter 3 døgn hadde litt høyere aktivitet enn prøven høstet ved forsøksstart, men hadde også litt høyere aktivitet enn ved dag 0. Som for 3-dagers forsøket var aktiviteten igjen lavere ved dag 1, før den økte til dag 3. Ved dag 6 var aktiviteten igjen blitt lavere, mens ved dag 10 var den omtrent den samme som ved dag 3. Det må her tas hensyn til at mediene ved dag 3 og 6 hadde vært i kontakt med celler i 3 døgn, mens mediet ved dag 10 hadde vært i kontakt med celler i 4 døgn. Medier ved dag 0 og 1 hadde vært i kontakt med celler i ett døgn, mens mediet ved dag -1 i liten grad hadde vært i kontakt med celler. Det kan likevel antas en økning i inhibitorisk aktivitet fra ett døgns dyrking etter PMA-stimulering (dag 1) og til dag 10.



Figur 4.2: Tidsrespons av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i medier fra PMA-stimulerte THP-1 celler.

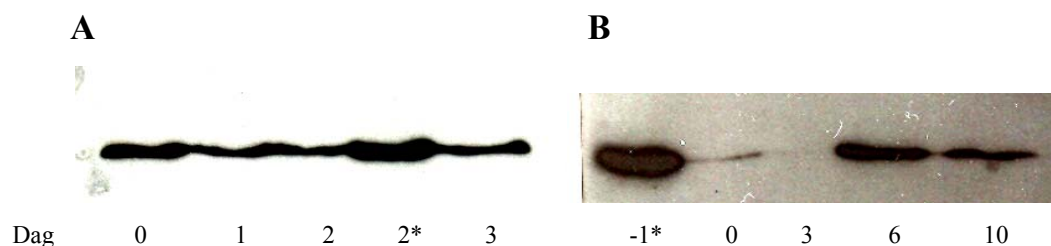
Celler ($1,5 \times 10^6$) ble stimulert med PMA (40 ng/ml) i 24 timer før medier ble høstet etter 0-3 dager (A, $n = 2$) eller 0-10 dager (B, $n = 1-4$). Medier fra to ustimulerte kontroller ble høstet ved henholdsvis forsøksstart (dag -1 ustimulert) og etter dyrking i 3 døgn fra utsåing (dag 2 ustimulert). Inhibitorisk aktivitet ble målt fluorometrisk med papain som enzym (se Metode) og er uttrykt i inhibitoriske enheter per ml medium (IE/ml) \pm standardavvik.

4.2.2 Uttrykk av cystatiner i THP-1 celler

Cystatin C i cellelysater og cellemedier fra THP-1 celler ble detektert ved hjelp av monoklonalt antistoff mot cystatin C og kjemiluminiscens etter elektroforese og blotting. Cystatin C har en molekylvekt på ca 13 kDa, og ble observert i cellelysater og cellemedier ved alle høstingsdager.

Western blotting av cellelysater fra THP-1 celler dyrket i 3 dager etter PMA-stimulering (figur 4.3.A) viste ingen tendens til regulering av uttrykk av cystatin C i løpet av 3 dager. Det var en liten nedgang i uttrykk av cystatin C fra celler høstet på dag 0 (stimulert med PMA i 24 timer) til celler høstet på dag 1 (dyrket i 1 døgn etter PMA-stimulering). Ustimulerte kontrollceller dyrket i 3 døgn (dag 2*) viste det sterkeste uttrykket av cystatin C.

Western blotting av cellelysater fra THP-1 celler dyrket i 10 dager etter PMA-stimulering (figur 4.3 B) viste i samsvar med 3-dagers forsøket sterkest uttrykk av cystatin C for de ustimulerte kontrollcellene (dag -1*). Uttrykket av cystatin C minket kraftig etter tilsetning av PMA (dag 0) og var enda svakere ved dag 3. Etter 6 til 10 dager var proteinproduksjonen tilbake, men proteinbåndet var svakere enn for kontrollen.



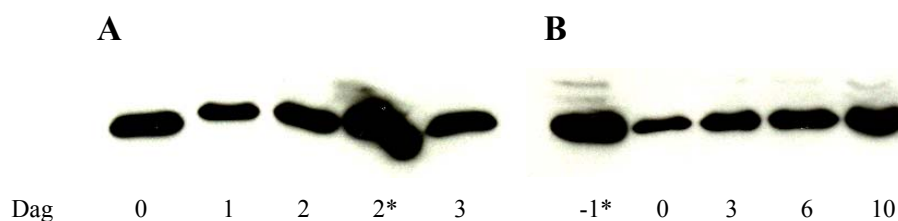
Figur 4.3: Tidsrespons av uttrykk av cystatin C i lysater fra PMA-stimulerte THP-1 celler.

Celler ($1,5 \times 10^6$) ble stimulert med PMA (40 ng/ml) i 24 timer før cellelysater ble høstet etter 0-3 dager (A, $n=1$) eller 0-10 dager (B, $n=2$). Ustimulerte kontrollceller ble høstet og lysert etter dyrking i 3 døgn fra utsåing (dag 2*; A) og ved forsøksstart (dag -1*; B). Lik mengde totalprotein (30 μ g) ble applisert på gel, og det ble kjørt elektroforese og Western blotting. Uttrykk av cystatin C ble detektert vha. monoklonalt antistoff mot cystatin C og kjemiluminiscens.

Western blotting av cellemedier fra THP-1 celler dyrket i 3 døgn etter PMA-stimulering (figur 4.4 A) viste som for cellelysater en liten nedgang i uttrykk av cystatin C fra celler høstet på dag 0 (stimulert med PMA i 24 timer) til celler høstet på dag 1 (dyrket i ett døgn etter PMA-stimulering). Det var en liten økning i uttrykk av cystatin C fra dag 1 til dag 3, hvor mengden igjen var omtrent som ved dag 0. De ustimulerte kontrollcellene dyrket i 3 døgn (dag 2*) viste det sterkeste uttrykket av cystatin C.

Western blotting av cellemedier fra THP-1 celler dyrket i 10 dager etter PMA-stimulering (figur 4.4 B) viste i samsvar med 3-dagers forsøket sterkest uttrykk av cystatin C for de

ustimulerte kontrollcellene (dag -1*). Som for lysater minket uttrykket av cystatin C også i medier etter tilsetting av PMA (dag 0), mens ved dag 3 var uttrykket i mediene sterkere. Det fortsatte å øke til dag 10, og i motsetning til i lysatene (figur 4.3.B) var uttrykket her en del sterkere ved dag 10 enn ved dag 6. Det må tas hensyn til at mediet på dag 10 hadde vært i kontakt med celler i 4 døgn (fra dag 6 til dag 10), mens mediet ved dag 6 hadde vært i kontakt med celler i 3 døgn (fra dag 3 til dag 6). Mediet på dag 0 hadde kun vært i kontakt med celler i ett døgn.



Figur 4.4: Tidsrespons av uttrykk av cystatin C i medier fra PMA-stimulerte THP-1 celler.

Celler ($1,5 \times 10^6$) ble stimulert med PMA (40 ng/ml) i 24 timer før medier ble høstet etter 0-3 dager (A, n = 1) eller 0-10 dager (B, n = 2). Medier fra ustimulerte kontrollceller ble høstet etter dyrking i 3 døgn fra utsåing (dag 2*; A) og ved forsøksstart (dag -1*; B). Likt volum (10 μ l) oppkonsentrert medium (40 \times) ble applisert på gel, og det ble kjørt elektroforese og Western blotting. Uttrykk av cystatin C ble detektert vha. monoklonalt antistoff mot cystatin C og kjemiluminiscens.

Cystatin M i cellelysater fra THP-1 celler ble forsøkt detektert ved hjelp av både monoklonalt og polyklonalt antistoff mot cystatin M, mens det for cellemedier kun ble brukt polyklonalt antistoff mot cystatin M, siden dette viste seg å være det mest effektive. Cystatin M har en molekylvekt på ca 15 kDa, og ble hovedsakelig observert i medieprøver.

Western blotting av cellelysater fra THP-1 celler dyrket i 3 og 10 dager etter PMA-stimulering viste lite innhold av cystatin M. Det ble ikke detektert proteinbånd for cystatin M i 3-dagers forsøket (n = 1), mens 10-dagers forsøkene (n = 3) ga svake proteinbånd ved en ustimulert prøve i ett forsøk og ved en dag 6-prøve i et annet forsøk (resultater ikke vist).

Western blotting av cellemedier fra THP-1 celler dyrket i 3 dager etter PMA-stimulering viste svake proteinbånd for cystatin M ved alle dager (resultater ikke vist). Uttrykket var så svakt at det ikke var mulig å se en eventuell forskjell mellom prøvedagene.

Western blotting av cellemedier fra THP-1 celler dyrket i 10 dager etter PMA-stimulering (figur 4.5) viste et økende uttrykk av cystatin M fra dag 0 til dag 10. Ved dag 0 var proteinbåndet svakt, ved dag 3 og 6 var det sterkere, mens det ved dag 10 var mye sterkere. Det må tas hensyn til at mediet ved dag 10 hadde vært i kontakt med celler i 4 døgn, mot 3 døgn ved dag 3 og 6, og ett døgn ved dag 0. Den ustimulerte kontrollen (dag 2*) viste ikke uttrykk av cystatin M.



Figur 4.5: Tidsrespons av uttrykk av cystatin M i medier fra PMA-stimulerte THP-1 celler.

Celler ($1,5 \times 10^6$) ble stimulert med PMA (40 ng/ml) i 24 timer før medier ble høstet etter 0-10 dager. Medier fra ustimulerte kontrollceller ble høstet etter dyrking i 3 døgn fra utsåing (dag 2*). Likte volum (10 µl) oppkonsentrert medium (40×) ble applisert på gel, og det ble kjørt elektroforese og Western blotting. Uttrykk av cystatin M ble detektert ved hjelp av polyklonalt antistoff mot cystatin M og kjemiluminiscens. $n = 2$.

Cystatin F ble forsøkt detektert ved hjelp av monoklonalt antistoff mot cystatin F og kjemiluminiscens i et 10-dagers THP-1 forsøk, men ingen proteinbånd ble observert.

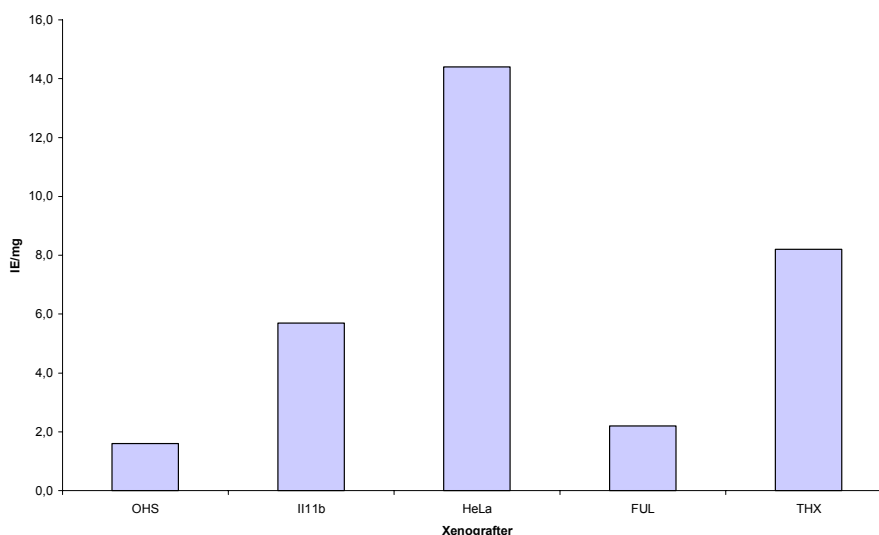
4.3 Xenografter

Humane kreftcellelinjer ble injisert subkutant i mus. Biopsier fra 5 ulike xenograftsvulster ble mottatt fra Radiumhospitalet (tabell 2.2). Lysater av disse ble analysert for inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser ved hjelp av fluorimetrisk måling med papain som enzym, og for innhold av cystatin C, M og F etter elektroforese og Western blotting. Nivå av og sammenheng mellom inhibitorisk aktivitet og uttrykk av cystatiner i de ulike xenograftene ble analysert.

4.3.1 Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i xenografter

Det ble registrert inhibitorisk aktivitet mot papain i lysater fra alle xenograftene (figur 4.6). Høyest inhibitorisk aktivitet ble målt i xenograftet fra livmorhalsen (HeLa), som hadde en aktivitet i overkant av 14 IE/mg totalprotein. Xenograftet fra hud/føflekk (THX) hadde den

nest høyeste aktiviteten på i overkant av 8 IE/mg totalprotein. Osteosarkom-xenograftet II11b hadde en aktivitet på ca 6 IE/mg totalprotein, mens osteosarkom-xenograftet OHS hadde en aktivitet i underkant av 2 IE/mg totalprotein. Lungexenograftet (FUL) hadde også en aktivitet på ca 2 IE/mg totalprotein.



Figur 4.6: Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i xenografter (human /mus).

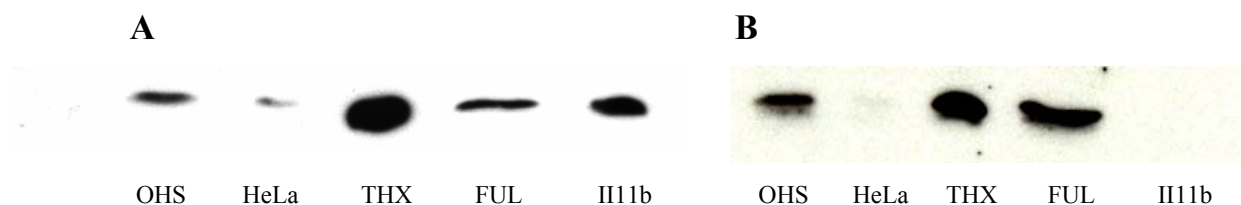
Inhibitorisk aktivitet ble målt fluorometrisk med papain som enzym (se Metode) i lysater fra følgende xenografter: OHS (osteosarkom), II11b (modifisert utgave av OHS), HeLa (livmorhalskreft), FUL (lungekreft) og THX (hudkreft/føflekkreft). Inhibitorisk aktivitet er uttrykt i inhibitoriske enheter per mg totalprotein (IE/mg). $n = 1$.

4.3.2 Uttrykk av cystatiner i xenografter

Uttrykk av cystatin C i lysater fra xenografter ble detektert ved hjelp av monoklonalt antistoff mot cystatin C og kjemiluminiscens etter elektroforese og blotting. Det ble observert proteinbånd for cystatin C i alle xenograftene (figur 4.7 A). Sterkest proteinbånd ble observert for xenograftet fra hud/føflekk (THX) ved en molekylvekt på ca 13 kDa, som tydelig viste innhold av cystatin C. Osteosarkom-xenograftene (OHS og II11b) og lunge-xenograftet (FUL) ga også tydelige proteinbånd i området 13 kDa. Xenograftet fra livmorhalsen (HeLa) viste lavest uttrykk av cystatin C.

Uttrykk av cystatin M i lysater fra xenografter ble detektert ved hjelp av monoklonalt antistoff mot cystatin M og kjemiluminiscens etter elektroforese og blotting. Cystatin M ble detektert ved en molekylvekt på ca 15 kDa i alle xenograftene bortsett fra osteosarkom-xenograftet II11b (figur 4.7 B). Det lignende osteosarkom-xenograftet (OHS) viste imidlertid et klart proteinbånd for cystatin M. Xenograftet fra hud/føflekk (THX) viste, som for cystatin C, også et sterkt uttrykk av cystatin M. Lunge-xenograftet (FUL) viste et tilsvarende sterkt uttrykk som xenograftet fra hud/føflekk. Xenograftet fra livmorhalsen (HeLa) viste et veldig svakt uttrykk av både cystatin M og C, til tross for at dette xenograftet var det som viste absolutt høyest inhibitorisk aktivitet (figur 4.6).

Uttrykk av cystatin F i cellelysater fra xenografter ble forsøkt detektert ved hjelp av monoklonalt antistoff mot cystatin F og kjemiluminiscens etter elektroforese og blotting. Cystatin F har en molekylvekt på ca 14,5 kDa, men det ble ikke observert noen proteinbånd i dette området (resultater ikke vist, n = 1).



Figur 4.7: Western blotting av cystatin C (A) og cystatin M (B) i lysater fra xenografter (human /mus).

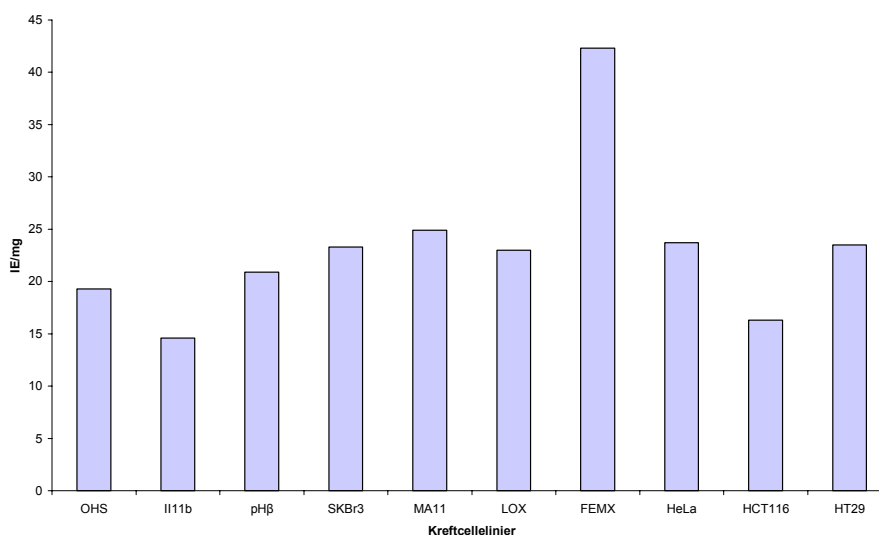
Følgende xenografter ble analysert: OHS (osteosarkom), HeLa (livmorhalskreft), THX (hudkreft/føflekkreft), FUL (lungekreft) og II11b (modifisert utgave av OHS). Lik mengde (30 µg) totalprotein ble applisert på gel, og det ble kjørt elektroforese og blotting. Uttrykk av cystatin C (A, n = 2) og cystatin M (B, n = 2) ble detektert ved hjelp av monoklonalt antistoff mot henholdsvis cystatin C og M, og kjemiluminiscens.

4.4 Kreftcellerlinjer

Lysater fra 10 kreftcellerlinjer ble mottatt fra Radiumhospitalet (tabell 2.1). Disse ble analysert for inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser ved hjelp av fluorimetrisk måling med papain som enzym, og for innhold av cystatin M ved hjelp av elektroforese og immunoblotting ("Western").

4.4.1 Inhibitorisk aktivitet i kreftcellerlinjer

Det ble registrert inhibitorisk aktivitet mot papain i cellelysater fra alle kreftcellerlinjene (figur 4.8). Det var høyest inhibitorisk aktivitet i en cellelinje fra hudkreft/føflekkreft (FEMX). Denne skilte seg ut fra de resterende med en aktivitet på i overkant av 40 IE/mg totalprotein. Majoriteten av lysatene hadde en inhibitorisk aktivitet i området 20-25 IE/mg totalprotein. To cellelinjer skilte seg ut ved å ha lavere aktivitet på ca 15 IE/mg totalprotein. Disse var fra tykktarmskreft (HCT116) og osteosarkom (II11b).



Figur 4.8: Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i cellelysater fra humane kreftcellerlinjer.

Inhibitorisk aktivitet ble målt fluorimetrisk med papain som enzym (se Metode) i cellelysater fra følgende kreftcellerlinjer: OHS (osteosarkom), II11b (modifisert utgave av OHS), pHβ (modifisert utgave av OHS), SKBr3 (brystkreft), MA11 (brystkreft), LOX (hudkreft/føflekkreft), FEMX (hudkreft/føflekkreft), HeLa (livmorhalskreft), HCT116 (tykktarmskreft) og HT29 (tykktarmskreft). Inhibitorisk aktivitet er uttrykt i inhibitoriske enheter per mg totalprotein (IE/mg). $n = 1$.

4.4.2 Uttrykk av cystatiner i kreftcellerlinjer

Uttrykk av cystatin M i cellelysater fra kreftcellerlinjer ble detektert ved hjelp av polyklonalt antistoff mot cystatin M og kjemiluminiscens etter elektroforese og blotting. Det ble observert proteinbånd for cystatin M ved ca 15 kDa for 4 av kreftcellerlinjene (figur 4.9). Cellerlinjene som viste innhold av cystatin M var brystkreftcellerlinjene (SKBr3 og MA11) og tykktarmskreftcellerlinjene (HCT116 og HT29). Tykktarmskreftcellerlinjen HCT116 ga et sterkt proteinbånd, mens den andre tykktarmskreftcellerlinjen og brystkreftcellerlinjene ga

relativt svake proteinbånd. Cellelinjene fra hudkreft/føflekkreft (LOX og FEMX), osteosarkomcellelinjene (OHS og II11b), og livmorhalscellelinjen (Hela) ga ingen proteinbånd for cystatin M (data ikke vist). En tredje osteosarkomcellelinje (pH β) ble ikke analysert pga. mangel på prøvemateriale. Det ble ikke kjørt Western av cystatin C på grunn av mangel på prøvemateriale.



Figur 4.9: Western blotting av cystatin M i cellelysater fra humane kreftcellelinjer.

Følgende kreftcellelinjer ble analysert: SKBr3 (brystkreft), MA11 (brystkreft), HCT116 (tykktarmskreft) og HT29 (tykktarmskreft). Lik mengde totalprotein (30 μ g) ble applisert på gel, og det ble kjørt elektroforese og blotting. Uttrykk av cystatin M ble detektert vha. polyklonalt antistoff mot cystatin M. n = 1.

4.5 Cystatin M-transfektete HEK 293 celler

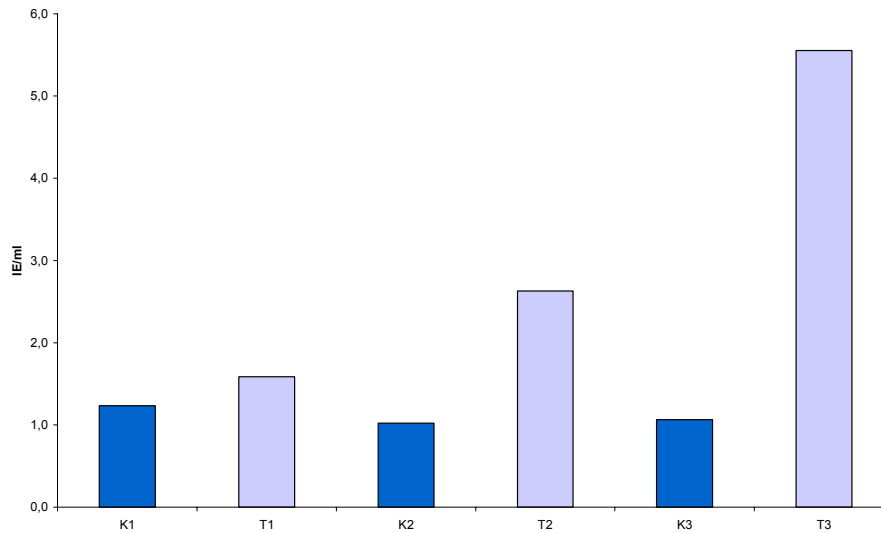
Humant cystatin M cDNA ble transfektet inn i humane nyreepitelceller (HEK 293). Medier fra 3 forsøk med disse cellene og fra tilsvarende kontrollceller ble mottatt fra Radiumhospitalet og analysert for inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser ved hjelp av fluorometriske målinger med papain som enzym.

Det var særlig interessant å se på inhibitorisk aktivitet i disse cellene, siden en eventuell økt inhibitorisk aktivitet i de transfektete cellene sammenlignet med kontrollene kunne bekrefte den etablerte metoden for måling av inhibitorisk aktivitet, da man vil forvente en økning i inhibitorisk aktivitet mot papain ved tilstedeværelse av cystatin M.

4.5.1 Inhibitorisk aktivitet i cystatin M-transfektete HEK 293 celler

Det var en tydelig tendens til at celler transfektet med cystatin M skilte ut cystatin M (T1-3) til mediet og hadde større inhibitorisk aktivitet enn utransfektete kontrollceller (K1-3; figur 4.10). Inhibitorisk aktivitet i medium fra kontrollcellene var omtrent lik i de 3 forsøkene og på ca 1 IE/ml. Medium fra de transfektete cellene viste ulik grad av inhibitorisk aktivitet i de 3 transfeksjonene, men aktiviteten var i alle tilfellene høyere enn for de tilsvarende

kontrollcellene. I transfeksjon 1 var det en liten økning (ca 1/4) i inhibitorisk aktivitet fra kontroll (K1) til transfektert (T1). I transfeksjon 2 var forskjellen litt større (ca 2,5 ganger økning), mens den var størst i transfeksjon 3 (ca 5 ganger økning).



Figur 4.10: Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i medier fra HEK 293 celler med eller uten cystatin M cDNA.

HEK 293 celler ble liposomtransfektet med cystatin M cDNA. Inhibitorisk aktivitet ble målt fluorimetrisk med papain som enzym (se Metode) i medium fra 3 forsøk med transfekterte og utransfektet celler. Inhibitorisk aktivitet er uttrykt i inhibitoriske enheter per ml medium (IE/ml). K = kontrollceller. T = transfektet celler.

n = 1.

5 DISKUSJON

Makrofager er observert å utgjøre en betydelig del av mange kreftsvulster. Dette ble lenge tolket som et tegn på at immunsystemet var blitt aktivert for å motarbeide kreftutviklingen, men senere har det blitt klart at tumorassosierte makrofager (TAMS) spiller en viktig rolle i tumorinvasjon og metastasering [35]. Det har i flere eksperimentelle tumormodeller blitt vist at tilstedeværelsen av en inflammatorisk respons, ofte forårsaket av makrofager, er nødvendig for utviklingen av kreft [41]. TAMS produserer både enzymer og hemmere som sammen regulerer degradering av ekstracellulær matriks, en viktig prosess i utviklingen av kreft [35]. I en tidligere studie utført av vår forskningsgruppe er det vist en kraftig oppregulering (over 500-ganger på mRNA-nivå) av cysteinproteasen legumain ved differensiering av monocytter mot makrofager (0-10 dager), og det ble også observert en tilsvarende økning i enzymaktiviteten [5]. Cysteinproteaser er vist å være involvert i utvikling og metastasering av kreft, og endogene cysteinproteasehemmere antas å kunne motvirke dette [12]. I denne forbindelse var det interessant å studere en eventuell endring i uttrykk av hemmere (cystatiner) og inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser under differensieringen av monocytter mot makrofager.

5.1 Etableringen av en funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser

Det ble etablert en funksjonell metode for måling av inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i vårt laboratorium, hovedsakelig etter metode av Abrahamson [40]. Den eksogene cysteinproteasen papain ble brukt som enzym, da denne ligner flere viktige proteaser i kroppen (som cathepsin B og L). Interaksjonen mellom cysteinproteaser og cystatiner er av reversibel karakter, og ved økende inhibitorisk aktivitet får man en eksponentiell nedgang i gjenværende papainaktivitet. Det ble lagt vekt på at metoden skulle sammenligne inhibitorisk aktivitet i ulike prøver på en nøyaktig måte, også i og mellom prøver med svært høy grad av enzymhemming. Det ble derfor valgt å sammenligne prøvene ved 50 % hemming av enzymaktiviteten. Dette ble gjort fordi en direkte sammenligning av to ufortynnede prøver vil kunne gi et feilaktig inntrykk av prøvenes grad av inhibitorisk aktivitet, og dermed kunne være misvisende for hvor forskjellig prøvene egentlig kan være. Dette fordi prøver med forskjellig, men svært høy grad av inhibitorisk aktivitet, vil redusere

all enzymaktivitet (metning). Det ble derfor laget en fortynningsrekke (4 fortynninger) av hver enkelt prøve, for deretter ved hjelp av en standardkurve å sammenligne prøvene ved en gitt grad av enzymhemming (50 %). En fortynningsrekke av hver prøve er tidkrevende, men gir muligheten til å sammenligne prøvene på en mer nøyaktig måte enn ved direkte sammenligning av ufortynnede prøver.

For å ha et kvantitativt mål på den inhibitoriske aktiviteten i de ulike prøvene, ble det i denne oppgaven brukt benevnningen inhibitorisk enhet (IE). Denne ble definert som den konsentrasjonen av inhibitorisk aktivitet som må til for å hemme 50 % av papainaktiviteten under de gitte prøvebetingelser. Siden totalt proteininnhold varierte mellom de ulike prøvene grunnet ulikt antall celler, ble aktiviteten korrigert for totalprotein i lysatene. I mediene ble det ikke korrigert for totalprotein, siden man vet at proteininnholdet i medier er svært lavt grunnet en stor fortynningseffekt av utskilte proteiner og bruk av serumfritt medium.

Ved prøveopparbeidelse for måling av inhibitorisk aktivitet ble prøvene kokt i 5 minutter og deretter sentrifugert. Dette ble gjort for å denaturere og fjerne eventuelle endogene cysteinproteaser som måtte være tilstede i prøvene for å kunne være sikker på at enzymaktiviteten som ble målt skyldtes aktivitet av eksogent papain. I følge Vigneswaran et al [29] er cystatiner stabile under koking og vil ikke ødelegges. Dette kan imidlertid være et svakt punkt i metoden, da vi ikke kan være helt sikre på at all inhibitorisk aktivitet bevares ved koking.

For å bekrefte den etablerte metoden ble den brukt til å måle inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i medier fra cystatin M-transfektete HEK 293 celler. Det ble observert en tydelig økt inhibitorisk aktivitet i medier fra de transfektete cellene i forhold til kontrollcellene, noe som tyder på at metoden egner seg til å måle inhibitorisk aktivitet av cystatin M. Dette bekreftet også at cystatin M-aktiviteten opprettholdes gjennom kokeprosessen av prøvene.

Metoden måler generell inhibitorisk aktivitet mot papain. Dette betyr at det i cellelysater i stor grad (hovedsakelig) måles aktivitet av de intracellulære cystatinene (cystatin A og B). En eventuell endring i inhibitorisk aktivitet målt i cellelysater vil derfor ikke gi grunnlag for å trekke en konklusjon om hvilke cystatiner den inhibitoriske aktiviteten skyldes. Ved måling i

cellemedier vil man derimot spesifikt måle inhibitorisk aktivitet av type 2 cystatiner (cystatin C, M og F), som er skilt ut av cellene.

5.2 Cystatiner i THP-1 celler

Det ble brukt THP-1 celler som modell for å kunne studere utviklingen i produksjon og aktivitet av cysteinproteaseinhibitorer (cystatiner) ved differensiering av monocytter mot makrofager. THP-1 celler differensierer mot makrofaglignende celler ved stimulering med forbolesteren PMA. Dette skjer ved at PMA aktiverer proteinkinase C-medierte intracellulære mekanismer, noe som resulterer i hemming av celleproliferasjon og differensiering mot makrofaglignende celler [5]. THP-1 cellelinjen egner seg derfor godt, og er tidligere blitt brukt i vårt laboratorium og av andre som modell for å studere endringer i ekspresjon ved differensiering mot makrofager [5].

Det ble vist en tidsavhengig økning i inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser i både lysater og medier fra THP-1 celler etter stimulering med PMA og påfølgende differensiering mot makrofaglignende celler. Graden av inhibitorisk aktivitet (IE/mg) varierte imidlertid en del mellom de ulike forsøkene. Cellelysater fra 3-dagers forsøk skilte seg ut med generelt høy grad av inhibitorisk aktivitet ved alle forsøksdagene, men resultatene hadde til dels store standardavvik. Alle forsøkene viste imidlertid samme tendens til en tidsavhengig økning i inhibitorisk aktivitet, noe som tyder på at cellenes produksjon av cystatiner øker når monocytter differensierer mot makrofager, og at økte mengder cystatiner blir skilt ut i mediet. Hvilke cystatiner som står for den observerte inhibitoriske aktiviteten i cellelysaterne kan man derimot ikke fastslå ut fra dette. Økt inhibitorisk aktivitet i mediene viser imidlertid at differensieringen fører til en økt produksjon av sekretoriske cystatiner (C, M og F).

En tidligere studie av cystatin F i en human premyeloid cellelinje (U937) [32], som er en tilsvarende cellelinje som THP-1, viste at differensiering mot makrofager ved stimulering med en forbolester (TPA) førte til en 2,5 gangers nedregulering i cystatin F. Cystatin F ble observert både i celler og medier, men uttrykket var høyest ekstracellulært. Uttrykket av cystatin C i den samme studien ble mindre påvirket og viste 1,6 gangers nedregulering [32]. Bruk av et kommersielt tilgjengelig monoklonalt antistoff mot cystatin F detekterte ikke proteinet i THP-1 celler, verken i lysater eller medier. Nathanson et al [32] brukte i sin studie

et polyklonalt cystatin F antistoff (human-kanin [31]), og bruk av ulike typer antistoffer kan være årsak til ulike resultater i studiene.

Uttrykk av cystatin C (ca 13 kDa) ble detektert både i lysater og medier. Det var en tidsavhengig økning i styrken av proteinbåndene fra lysatprøvene. Derimot var økningen i båndene fra medieprøvene liten, og det er vanskelig å si om dette representerer en reell økning i uttrykket av cystatin C, siden Western er en semikvantitativ metode. Det ble i alle forsøkene med cystatin C observert sterke proteinbånd for de ustimulerte prøvene sammenlignet med de PMA-stimulerte prøvene, noe som betyr at ustimulerte THP-1 celler i stor grad uttrykker cystatin C. Differensieringsprosessen mot makrofager førte heller ikke til en oppregulering av cystatin C i forhold til cellenes opprinnelige nivå av cystatinet. Dette samsvarer med tidligere observasjoner av liten påvirkning av forbolestere på uttrykk av cystatin C i mononukleære celler [32]. Cystatin C er konstitutivt uttrykt, og forventes i liten grad å være regulert.

Resultatene i denne oppgaven viser at cystatin M oppreguleres ved differensiering fra monocytter mot makrofager. Det ble vist en klar tidsavhengig økning av cystatin M (ca 15 kDa) i medier fra 0-10 dager etter PMA-stimulering. Et sterkt proteinbånd ble observert etter 10 dager i motsetning til et knapt synlig bånd i ustimulerte celler. Den observerte tidsavhengige økningen i inhibitorisk aktivitet i medieprøvene og et svært lavt uttrykk av cystatin M i cellelysaten, samsvarer med at cystatin M er et sekretorisk protein som skilles ut ekstracellulært, og dermed hovedsakelig forventes observert i mediet.

I forbindelse med forskningsgruppens tidligere observasjoner av en kraftig oppregulering av cysteinproteasen legumain og en økt enzymaktivitet ved differensiering av THP-1 celler mot makrofager, er det interessant at uttrykket av cystatin M samt inhibitorisk aktivitet både intra- og ekstracellulært også ser ut til å øke. Cystatin M er den eneste endogene proteasehemmeren som er vist å effektivt hemme legumain ($K_i = 0,0016$ nM). Cystatin C og F er også vist å kunne hemme legumain, men i mye høyere konsentrasjoner [15]. Legumain er tidligere vist å kunne være involvert i prognose av tykktarmskreft [42]. I et pågående studie i samarbeid med Tumorbiologisk avdeling (Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF) vil derfor ekspresjonen av legumain og cystatin M bli analysert immunhistokjemisk og sammenlignet i et stort materiale av biopsier fra tykktarmskreft.

5.3 Cystatiner i xenograft og kreftceller

I forbindelse med cystatinenes rolle som hemmere av cysteinproteaser, har uttrykk av disse blitt studert i ulike krefttyper [12]. De fleste av studiene viser en sammenheng mellom nedregulering av cystatiner og kreftutvikling, noe som tyder på at cystatiner kan ha en beskyttende rolle ved utvikling og spredning av kreft. Det har imidlertid også blitt vist en sammenheng mellom økt uttrykk av både cystatin C, M og F og progresjon av kreft, og det ser for eksempel ut som at cystatin F kan virke direkte stimulerende ved metastasering av kreft til leveren [33]. Det er også mulig at ett og samme cystatin kan virke både stimulerende og hemmende på kreftutvikling [12]. Videre kan det tenkes at balansen mellom cysteinproteaser og deres inhibitorer er viktigere enn selve uttrykket av det enkelte enzym eller den enkelte inhibitoren [2].

Cystatin C har i flere studier blitt vist å kunne hemme degradering av ekstracellulær matriks og invasivitet av kreftceller [19-21]. Men studier har også vist motsatt effekt av cystatin C, der det ser ut til at cystatin C kan virke stimulerende på celledelingsprosessen [43,44] og øke metastasering ved kreft [22]. Cystatin C sin effekt mot kreft kan delvis skyldes det nylig oppdagete faktum at proteinet fungerer som en TGF- β -reseptor antagonist [18]. Ved å binde til TGF- β kan cystatin C sette i gang en negativ feedback prosess som fører til hemming i TGF- β -signaleringen [18]. TGF- β er imidlertid assosiert både med stimulering og hemming av kreftutvikling, noe som kanskje kan forklare de motstridende observasjonene rundt cystatin C sin rolle i forbindelse med kreft [12].

Mange av studiene som har studert cystatin M i forbindelse med kreft har omhandlet cystatin M i forhold til brystkreft. De viser en tendens til at genet for cystatin M (CST6) er nedregulert ved denne krefttypen, eller at kreften blir mindre aggressiv ved tilstedeværelse av cystatin M [17,26-28,45-47]. Vi har blant annet sett på uttrykk av cystatin M i to brystkreftcellerlinjer (MA11 og SKBr3). Av 10 undersøkte kreftcellerlinjer var det kun disse to brystkreftcellerlinjene og to cellerlinjer fra tykktarmskreft som viste uttrykk av cystatin M. Uttrykket var relativt svakt og ganske likt mellom de to brystkreftcellerlinjene. Den inhibitoriske aktiviteten mot cysteinproteaser var ganske lik for alle de undersøkte kreftcellerlinjene, med unntak av en hudkreftcellerlinje (FEMX) med høyere inhibitorisk aktivitet enn de andre. Det kunne derfor ikke observeres noen sammenheng mellom inhibitorisk aktivitet og uttrykk av cystatin M. Dette er ikke overraskende, siden cystatin M er

et sekretorisk protein, og det i lysater mest sannsynlig vil være de intracellulære cystatinene som står for det meste av den inhibitoriske aktiviteten. Vi kan ut fra våre resultater ikke si noe om uttrykket av cystatin M er opp- eller nedregulert i de to brystkreftcellelinjene, da vi ikke har noen kontroll fra normalt vev å sammenligne med. Men det kan konkluderes med at cystatin M er tilstede i disse cellelinjene, mens det ikke er tilstede i cellelinjer fra osteosarkom, hudkreft/føflekkreft og livmorhalskreft. Det ble i en tykktarmskreftcellelinje vist absolutt sterkest uttrykk av cystatin M, og dette følges opp i et pågående studie av biopsier fra tykktarmskreft (se Diskusjon 5.2).

Inhibitorisk aktivitet mot cysteinproteaser ble vist i alle xenografter som ble undersøkt, men det ble ikke vist noen direkte sammenheng mellom uttrykk av cystatin C, M eller F og graden av inhibitorisk aktivitet i xenografter. Det ble observert at xenograftet fra livmorhalsen (HeLa) hadde høyest grad av inhibitorisk aktivitet av de undersøkte xenograftene, men det hadde det laveste uttrykket av både cystatin C og M, og ikke noe observerbart cystatin F. Ved måling av inhibitorisk aktivitet i xenografter besto prøvene av lysater av xenografter. Disse forventes å primært inneholde de intracellulære cystatinene A og B (stefiner) [15], som i stor grad kan være årsaken til den målte inhibitoriske aktiviteten. Dette kan forklare manglende samsvar mellom målt inhibitorisk aktivitet og uttrykk av cystatin C, M og F.

6 KONKLUSJON

Det ble i denne oppgaven etablert en funksjonell metode for fluorimetrisk måling av inhibitorisk aktivitet mot papain til videre bruk i vårt laboratorium. Metoden ble validert ved påvisning av økt inhibitorisk aktivitet i cellemediet etter transfeksjon av cystatin M cDNA (CST6) i HEK 293 celler.

Det ble vist en tidsavhengig økning i inhibitorisk aktivitet mot papain i både cellelysater og cellemedier fra THP-1 celler, og en sammenheng ble observert mellom økning i inhibitorisk aktivitet ekstracellulært over tid, og økt uttrykk av cystatin M ekstracellulært.

Det ble registrert inhibitorisk aktivitet mot papain i alle undersøkte kreftcellelinjer og xenografter, men det ble ikke observert noen sammenheng mellom inhibitorisk aktivitet og uttrykk av cystatin C, M eller F.

7 REFERANSER

1. Christoffersen T, Fodstad Ø, Smeland EB, Dahl O: Elektronisk utgave av Cytostatikaboken, www.farmakoterapi.uio.no/cytostatika/In, 1999.
2. Dickinson DP: Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:238-275.
3. Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C, Barrett AJ: Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem* 1997;272:8090-8098.
4. Rzychon M, Chmiel D, Stec-Niemczyk J: Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* 2004;51:861-873.
5. Almlöf M, Solberg R, Nilsen H, Johansen HT: Legumain expression and activity increases in differentiating THP-1 cells. Manuscript 2007.
6. Gawenda J, Traub F, Luck HJ, Kreipe H, von Wasielewski R: Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2006.
7. Liu C, Sun C, Huang H, Janda K, Edgington T: Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy. *Cancer Res* 2003;63:2957-2964.
8. Choi SJ, Reddy SV, Devlin RD, Menea C, Chung H, Boyce BF, Roodman GD: Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption. *J Biol Chem* 1999;274:27747-27753.
9. Schwarz G, Brandenburg J, Reich M, Burster T, Driessen C, Kalbacher H: Characterization of legumain. *Biol Chem* 2002;383:1813-1816.
10. Chen JM, Fortunato M, Stevens RA, Barrett AJ: Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase. *Biol Chem* 2001;382:777-783.
11. Chen JM, Rawlings ND, Stevens RA, Barrett AJ: Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett* 1998;441:361-365.
12. Keppler D: Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Lett* 2006;235:159-176.
13. Romer J, Nielsen BS, Ploug M: The urokinase receptor as a potential target in cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2004;10:2359-2376.
14. Overall CM, Kleinfeld O: Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6:227-239.
15. Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM: Cystatins. *Biochem Soc Symp* 2003:179-199.
16. Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D: Plasma concentrations of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than simply a marker of glomerular filtration rate. *Clin Chem* 2005;51:321-327.
17. Shridhar R, Zhang J, Song J, Booth BA, Kevil CG, Sotiropoulou G, Sloane BF, Keppler D: Cystatin M suppresses the malignant phenotype of human MDA-MB-435S cells. *Oncogene* 2004;23:2206-2215.
18. Sokol JP, Schiemann WP: Cystatin C antagonizes transforming growth factor beta signaling in normal and cancer cells. *Mol Cancer Res* 2004;2:183-195.

19. Konduri SD, Yanamandra N, Siddique K, Joseph A, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Kouraklis G, Swaroop A, Kyritsis AP, Rao JS: Modulation of cystatin C expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. *Oncogene* 2002;21:8705-8712.
20. Corticchiato O, Cajot JF, Abrahamson M, Chan SJ, Keppler D, Sordat B: Cystatin C and cathepsin B in human colon carcinoma: expression by cell lines and matrix degradation. *Int J Cancer* 1992;52:645-652.
21. Coulibaly S, Schwihla H, Abrahamson M, Albini A, Cerni C, Clark JL, Ng KM, Katunuma N, Schlappack O, Glossl J, Mach L: Modulation of invasive properties of murine squamous carcinoma cells by heterologous expression of cathepsin B and cystatin C. *Int J Cancer* 1999;83:526-531.
22. Huh CG, Hakansson K, Nathanson CM, Thorgeirsson UP, Jonsson N, Grubb A, Abrahamson M, Karlsson S: Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene. *Mol Pathol* 1999;52:332-340.
23. Zeeuwen PL, Van Vlijmen-Willems IM, Jansen BJ, Sotiropoulou G, Curfs JH, Meis JF, Janssen JJ, Van Ruissen F, Schalkwijk J: Cystatin M/E expression is restricted to differentiated epidermal keratinocytes and sweat glands: a new skin-specific proteinase inhibitor that is a target for cross-linking by transglutaminase. *J Invest Dermatol* 2001;116:693-701.
24. Vigneswaran N, Wu J, Zacharias W: Upregulation of cystatin M during the progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma from primary tumor to metastasis. *Oral Oncol* 2003;39:559-568.
25. Ni J, Abrahamson M, Zhang M, Fernandez MA, Grubb A, Su J, Yu GL, Li Y, Parmelee D, Xing L, Coleman TA, Gentz S, Thotakura R, Nguyen N, Hesselberg M, Gentz R: Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem* 1997;272:10853-10858.
26. Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R: Identification, cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer. *J Biol Chem* 1997;272:903-910.
27. Ai L, Kim WJ, Kim TY, Fields CR, Massoll NA, Robertson KD, Brown KD: Epigenetic Silencing of the Tumor Suppressor Cystatin M Occurs during Breast Cancer Progression. *Cancer Res* 2006;66:7899-7909.
28. Schagdarsurengin U, Pfeifer GP, Dammann R: Frequent epigenetic inactivation of cystatin M in breast carcinoma. *Oncogene* 2006.
29. Vigneswaran N, Wu J, Nagaraj N, James R, Zeeuwen P, Zacharias W: Silencing of cystatin M in metastatic oral cancer cell line MDA-686Ln by siRNA increases cysteine proteinases and legumain activities, cell proliferation and in vitro invasion. *Life Sci* 2006;78:898-907.
30. Halfon S, Ford J, Foster J, Dowling L, Lucian L, Sterling M, Xu Y, Weiss M, Ikeda M, Liggett D, Helms A, Caux C, Lebecque S, Hannum C, Menon S, McClanahan T, Gorman D, Zurawski G: Leukocystatin, a new Class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1998;273:16400-16408.
31. Ni J, Fernandez MA, Danielsson L, Chillakuru RA, Zhang J, Grubb A, Su J, Gentz R, Abrahamson M: Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1998;273:24797-24804.
32. Nathanson CM, Wasselius J, Wallin H, Abrahamson M: Regulated expression and intracellular localization of cystatin F in human U937 cells. *Eur J Biochem* 2002;269:5502-5511.
33. Morita M, Yoshiuchi N, Arakawa H, Nishimura S: CMAP: a novel cystatin-like gene involved in liver metastasis. *Cancer Res* 1999;59:151-158.

34. Morita M, Hara Y, Tamai Y, Arakawa H, Nishimura S: Genomic construct and mapping of the gene for CMAP (leukocystatin/cystatin F, CST7) and identification of a proximal novel gene, BSCv (C20orf3). *Genomics* 2000;67:87-91.
35. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P: Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42:717-727.
36. Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Yamazaki N, Matsushima K: Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* 1999;94:837-844.
37. Krause SW, Rehli M, Kreutz M, Schwarzfischer L, Paulauskis JD, Andreesen R: Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 1996;60:540-545.
38. Auwerx J: The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47:22-31.
39. Bradford MM: Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding., 1976.
40. Abrahamson M: Cystatins. *Methods Enzymol* 1994;244:685-700.
41. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A: Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211-217.
42. Murthy RV, Arbman G, Gao J, Roodman GD, Sun XF: Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2293-2299.
43. Sun Q: Growth stimulation of 3T3 fibroblasts by cystatin. *Exp Cell Res* 1989;180:150-160.
44. Tavera C, Leung-Tack J, Prevot D, Gensac MC, Martinez J, Fulcrand P, Colle A: Cystatin C secretion by rat glomerular mesangial cells: autocrine loop for in vitro growth-promoting activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:1082-1088.
45. Rivenbark AG, Jones WD, Coleman WB: DNA methylation-dependent silencing of CST6 in human breast cancer cell lines. *Lab Invest* 2006;86:1233-1242.
46. Song J, Jie C, Polk P, Shridhar R, Clair T, Zhang J, Yin L, Keppler D: The candidate tumor suppressor CST6 alters the gene expression profile of human breast carcinoma cells: down-regulation of the potent mitogenic, motogenic, and angiogenic factor autotaxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:175-182.
47. Zhang J, Shridhar R, Dai Q, Song J, Barlow SC, Yin L, Sloane BF, Miller FR, Meschonat C, Li BD, Abreo F, Keppler D: Cystatin m: a novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:6957-6964.

8 APPENDIX

8.1 Prosedyre for proteinmåling

Standardversjon for mikrotiter-plate:

1. Bruksløsning av fargereagens lages ved å blande 1 del Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Coomassie Brilliant Blue G-250) med 4 deler vann. Løsningen filtreres.
2. 10 µl standardløsninger av serumalbumin fortynnet med lysisbuffer i konsentrasjonene 0, 50, 100, 150, 200, 250 og 300 µg/ml fordeles i mikroplatebrønner. Det benyttes 2 paralleller.
3. 10 µl prøve fordeles i mikroplatebrønner. Det benyttes 2 paralleller.
4. 200 µl fargereagens tilsettes alle brønner.
5. Platen inkuberes i romtemperatur i 5 minutter før absorbansen blir målt i en mikroplateleser ved 595 nm.

Alternativ versjon for mikrotiter-plate:

1. Bruksløsning av fargereagens lages ved å blande 4 deler Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate med 11 deler vann. Løsningen filtreres.
2. 50 µl standardløsninger av serumalbumin fortynnet med lysisbuffer i konsentrasjonene 0, 5, 10, 25, 50, 75 og 100 µg/ml fordeles i mikroplatebrønner. Det benyttes 2 paralleller.
3. 50 µl prøve fordeles i mikroplatebrønner. Det benyttes 2 paralleller.
4. 150 µl fargereagens tilsettes alle brønner.
5. Platen inkuberes i romtemperatur i 5 minutter før absorbansen blir målt i en mikroplateleser.

8.2 Prosedyre for TCA-felling og fremstilling av elektroforeseprøver

1. 1,2 ml prøve overføres til et eppendorfrør
2. 120 μ l 100 % TCA tilsettes og blandes ved hjelp av vortex. Rørene står deretter på is i minst en halv time. De sentrifugeres så ved 10 000 g og 4 °C i 5 minutter. Supernatanten suges av og kastes.
3. Pelleten vaskes med 1,2 ml 1 % TCA. Rørene sentrifugeres, og supernatanten suges av og kastes.
4. Pelletene løses i 30 μ l 0,1 M NaOH.
5. Det tilsettes 10 μ l 4 \times prøvebuffer
6. Det tilsettes 10 % β -merkaptoetanol og 5 % bromfenolblått regnet ut som prosent av totalt sluttvolum.
7. Prøvebuffer (1 \times) tilsettes tilslutt i ulike volum utregnet på grunnlag av proteinmåling, slik at man oppnår lik konsentrasjon av protein i alle prøvene.
8. Prøvene kokes i 5 minutter slik at proteinene denatureres.

Prøvene står på is under denne prosessen.

8.3 Prosedyre for Western blotting

Støping av gel:

1. Gelstøpingsformen settes sammen
2. 14 % separasjonsgel lages etter oppskrift (se løsninger). Ammoniumpersulfat og TEMED tilsettes til slutt.
3. Løsningen blandes godt og fylles i støpeformen til ca 2 cm fra toppen. Det sjekkes at kanten på gelen er i vater.
4. 200 µl isobutanol tilsettes i hver gel for å fjerne eventuelle bobler og for å hindre uttørking av gelen.
5. Gelen settes til stivning i ca 45 minutter.
6. Isobutanolen helles av, og det skylles med dH₂O.
7. 4 % stack-gel lages etter oppskrift (se 2.3 Løsninger), og formen fylles helt opp. Kammer plasseres i hver gel, og det etterfylles med gel.
8. Gelen settes til stivning i ca 45 minutter.
9. Støpeformen tas fra hverandre, og gelene vaskes i dH₂O. Gelene kan deretter enten brukes direkte eller oppbevares i fuktig papir i kjøleskap til neste dag.

Elektroforese:

1. Gelene festes i elektroforesekaret, og karet fylles opp med elektroforesebuffer (se 2.3 Løsninger). Brønnene fylles også med buffer.
2. Prøver og standard appliseres på gelene. Prøver loades slik at totalproteinmengden er lik i hver brønn.
3. Vannkjøling settes på, og elektroforesen startes. Strømmen settes til 200 V.
4. Elektroforesen stoppes når bromfenolbåndene har nådd nedre ende av gelen. Dette tar i overkant av 1 time.

Blotting:

1. Nitrocellulosemembraner (Hybond-ECL, Amersham, Storbritannia), filterpapir og cellofan skjæres til, og fuktes i blottingbuffer (se 2.3 Løsninger).
2. Geler, membraner, filterpapir og cellofan legges som en sandwich i blottingmaskinen slik at membranene ligger nærmere anoden enn gelene. Blottingbuffer tilsettes mellom hvert lag.

3. Det sjekkes at det ikke er glippe mellom sandwich og plastplate i bunnen av blottingmaskinen.
4. Strøm kobles til, og 1 kg vekt plasseres på toppen av maskinen. Det blottes i 45 min.
5. Ferdige membraner farges i 1 minutt med Ponceau S løsning, skylles og kopieres i kopimaskin mellom to overheadark.

Deteksjon:

1. Membranen legges i dH₂O i noen minutter, deretter 10 minutter i T-TBS (se løsninger).
2. Membranen blokkes i Blotto (se løsninger) i 60 minutter ved romtemperatur og vipping.
3. Blokkerløsningen helles av og primærantistoff løst i Blotto tilsettes. Det benyttes 10 ml Blotto per membran. Fortynningen avhenger av type primærantistoff. Det inkuberes på kjølerom med vipping over natt.
4. Neste dag vaskes membranen 3×10 minutter med Blotto ved romtemperatur og vipping.
5. Peroxydasemerket sekundærantistoff løst i 10 ml Blotto tilsettes. Fortynning avhenger av type sekundærantistoff. Det inkuberes i 60 minutter ved romtemperatur og vipping.
6. Sekundærantistoff helles av, og det vaskes 3 × 10 minutter med Blotto ved romtemperatur og vipping.
7. Membranen skylles 2 ganger med T-TBS. Deretter vaskes det 2×10 minutter med T-TBS ved romtemperatur og vipping.

Fremkalling:

1. Membranen inkuberes 5 minutter i enhanced chemiluminiscense (ECL) fra GE Healthcare/Amersham eller Pierce. Reagensene blandes i forholdet 1:1 etter oppskrift fra produsent rett før inkubasjon.
2. Membranen pakkes inn i plastfolie, og legges i kassett sammen med film (Biomax MS film, Kodak) i 1, 5, 15, 30 og 60 minutter (eksponeringstid varieres ettersom hvor mye protein/sterke bånd man får).
3. Filmen legges over i fremkaller (x-ray developer LX24) i 30 sekunder, skylles i vann, legges i fix (x-ray fixer AL4) i 5 minutter, og i vann i 1 minutt.
4. Syngene Gene Tools[®] benyttes for å ta bilde av filmen.