

HOVEDOPPGAVE I FARMAKOLOGI FOR MASTERGRADEN I FARMASI

# Identifisering av PAX- og MMP-uttrykk i tre prostatakraft-cellelinjer

---

Av

Elisabeth Weibust



2009

## Utført ved

Avdeling for farmakologi, Institutt for farmasi

Det medisinske fakultet

Universitetet i Tromsø

## Veiledere

Førsteamanuensis Ingvild Mikkola, Institutt for farmasi, UiT

Førsteamanuensis Elisabeth Sundkvist, Institutt for farmasi, UiT



## **Forord**

Masteroppgaven ble utført ved avdeling for farmakologi, institutt for farmasi ved universiteter i Tromsø i perioden oktober 2008 til mai 2009. Prosjektet ble veiledet av Ingvild Mikkola og Elisabeth Sundkvist.

Jeg vil takke mine to hovedveiledere for god opplæring og veiledning gjennom hele oppgaven. En stor takk også til Yury Kiselev for all hjelp på labben. Til alle de andre på avdelingen, tusen takk for inspirasjon, veiledning og mye godt humør! Dere har gjort dette til et morsomt og lærerikt år.

Til slutt vil jeg takke venner, familie og spesielt min kjære Steinar for støtte, oppmuntring og mange gode råd.

Tromsø, mai 2009

Elisabeth Weibust



## Sammendrag

Invasjon og metastasering er den vanligste årsaken til død hos kreftpasienter og dermed et alvorlig klinisk problem. Det er derfor viktig å forske på dette området for å finne mekanismene bak disse prosessene. Matriks metalloproteinaser, (MMPer) er overuttrykt i flere kreftformer. PAX6 er en transkripsjonsfaktor som er vist å regulere uttrykket av matriks metalloproteinase 2 og 9 (MMP-2 og MMP-9) i henholdsvis glioblastomaceller og ved sårheling i hornhinnen hos mus. PAX6 uttrykket og påvirkningen av eventuelt MMPer og andre gener som er assosiert med metastase i andre kreftcellelinjer ble studert i denne oppgaven. PAX6 uttrykket ble identifisert i de tre prostatakreft cellelinjene ved hjelp av RT-PCR. Uttrykket av eventuelt andre gen som er assosiert med PAX6 eller metastasering ble kartlagt ved hjelp av RT-PCR, og genene som viste samme uttrykksmønster som PAX6 ble undersøkt videre. Transfeksjon med siRNA eller plasmidvektor ble utført for henholdsvis å slå ut eller innføre uttrykk av PAX6. Forandring av genuttrykk ble undersøkt ved hjelp av Q-PCR og Western blott. Invasjonsevnen til PC3 cellene ble undersøkt med celleinvasjonsassay. Resultatene viser at PAX6 uttrykkes i PC3 og DU145 cellelinjene, mens LNCaP cellene mangler PAX6 uttrykk. Vi ser også at en nedregulering av PAX6 i PC3 cellene fører til redusert uttrykk av MMP-9, MMP-14, TIMP-3, S100A4 og uPA. Invasjonsassayet viser en mulig sammenheng mellom økt PAX6 uttrykk og migrasjon av celler.



## Forkortelser

BM	Basal membran
bp	basepar
cDNA	complementary DNA
Ct	Cycle threshold
dH <sub>2</sub> O	Deionisert vann
ddH <sub>2</sub> O	Autoklavert milliQ vann
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ECM	Ekstracellulær matriks
FBS	Fetal bovine serum (fetalt kalveserum)
kDa	kilodalton
miRNA	microRNA
MMP	Matriks metalloproteinase
PAX	Paired box
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline 0,1 % tween 20
PCR	Polymerase chain reaction
Q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	rounds per minute (runder per minutt)
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
S100	En gruppe kalsiumbindende proteiner
SDS	Natriumdodekylsulfat
siRNA	small interfering RNA
scr	scrambled
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
uPA	urokinase plasminogen aktivator
uPAR	urokinase plasminogen aktivator reseptor





# Innholdsfortegnelse

Forord .....	3
Sammendrag .....	5
Forkortelser .....	7
1 Innledning .....	13
1.1 Kreft.....	13
1.2 Invasjon og metastasering .....	14
1.3 Paired box gen .....	15
1.3.1 PAX6.....	16
1.4 Matriks metalloproteinaser .....	17
1.4.1 Tissue inhibitor of metalloproteinases .....	18
1.5 S100 proteiner.....	19
1.6 Urokinase plasminogen activator og Urokinase plasminogen aktivator reseptor .....	19
1.7 Formål med oppgaven .....	21
2 Materiale og metode .....	23
2.1 Dyrking av kreftceller.....	24
2.2 Transfeksjon av celler.....	25
2.2.1 Transfeksjon med plasmid .....	25
2.2.2 Transfeksjon med siRNA .....	25
2.3 Invasjons assay .....	26
2.4 RNA preparasjon ved hjelp av TRIzol .....	27

2.5	DNase behandling av RNA .....	27
2.6	cDNA.....	28
2.6.1	Transkriptor Revers Transkriptase .....	28
2.6.2	Superscript III Revers Transkriptase.....	29
2.7	Polymerase chain reaction (PCR).....	30
2.7.1	Revers Transkriptase-PCR (RT-PCR) .....	30
2.7.2	Kvantitativ PCR (Q-PCR).....	31
2.8	Elektroforese.....	32
2.8.1	Gelelektroforese av PCR produkt .....	32
2.8.2	Western blott .....	34
2.8.3	Zymografi.....	39
2.9	Kloning av RT-PCR produkt og transformasjon av kompetente DH5 $\alpha$ ( <i>E.coli</i> ) bakterier .....	42
2.10	DNA Midiprep.....	43
2.11	DNA Miniprep.....	44
2.12	Kutting av DNA med restriksjonsenzym.....	45
2.13	Sekvensering.....	45
3	Resultater .....	47
3.1	RT-PCR .....	47
3.2	Sekvensering.....	52
3.3	Transfeksjon av PC3 og LNCaP celler for å slå ut eller tilføre PAX6 genekspressjon	54

3.4	Q-PCR .....	55
3.5	Western blott.....	60
3.6	Zymografi .....	62
3.7	Cellemigrasjonsassay.....	64
4	Diskusjon .....	65
5	Konklusjon.....	73
6	Referanser .....	75



# 1 Innledning

## 1.1 Kreft

Ordet kreft stammer fra det greske ordet cancer som betyr krabbe. Det var Hippocrates, legekunstens far, som gav navnet å beskrive lidelser hvor cellevekst spredde seg ukontrollert til hele kroppen, og til slutt tok livet av pasienten (Becker et al., 2003).

Det har de siste tiårene vært en økning av antallet nye krefttilfeller. Denne økningen kommer av en økt risiko for de vanligste kreftformene, men kan også relateres til bedre diagnostisering og en aldrende populasjon. Det ble i kreftregisteret i Norge registrert 25 943 nye krefttilfeller i 2007, noe som var en økning på 6 % fra året før (Freddie, 2008).

Ved mutasjoner i kontrollmekanismene i cellyklusen vil det oppstå ukontrollert celledeling som fører til en voksende cellemasse kalt tumor eller svulst (Becker et al., 2003). Tumoren kategoriseres i to hovedgrupper ut fra dens potensielle kliniske adferd. De godartede tumorene har fått navnet benigne, mens ondartede tumorene omtales som maligne (Kumar and Robbins, 2007). Benigne tumorer er lokaliserte masser som ikke har evnen til spredning, mens maligne tumorer kan invadere nærliggende vev og andre deler av kroppen og kan dermed i større grad bli livstruende for pasienten (Becker et al., 2003). På norsk kalles maligne tumorer for kreft, som er en fellesbetegnelse på ondartede svulster.

Det er syv essensielle forandringer i cellens fysiologi som kollektivt beskriver kreftceller: Cellene har egen forsyning av vekstsignaler, tapt følsomhet for veksthemmende signaler, motstand mot celledød (apoptose), ubegrenset potensiale for replikasjon, evnen til å stimulere dannelse av blodårer (angiogenese), invasjon og spredning (metastasing) (Hanahan and Weinberg, 2000) og kreftrelatert inflammasjon (Mantovani, 2009).

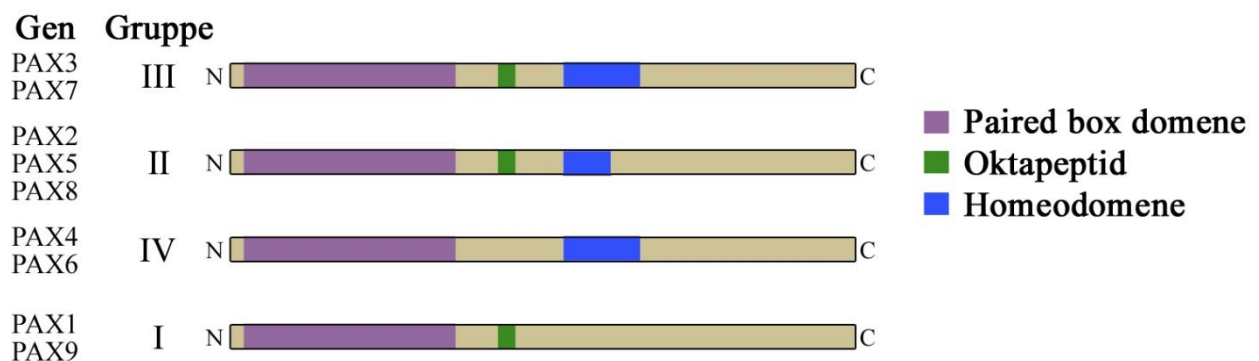
## 1.2 Invasjon og metastasering

Direkte spredning av kreftceller til nærliggende vev kalles invasjon, mens spredning via blod og lymfe til steder i kroppen, som også kan være langt borte fra opphavsstedet, kalles metastasering. Den nye kolonien med kreftceller kalles derfor en metastase (Becker et al., 2003). Spredning og etablering av tumorer andre steder i kroppen enn primærtumoren er den vanligste årsaken til død hos kreftpasienter og dermed et alvorlig klinisk problem. Det er denne egenskapen som skiller en benign fra en malign tumor (Brooks et al., 2009).

Metastasering er en kompleks prosess med flere essensielle trinn. Når tumormassen overstiger en diameter på 2 mm trenger den tilførsel av næringsstoffer og mulighet til å kunne frakte bort avfallsstoffer. Tumorcellene skiller derfor ut signaler som fremmer angiogenesen. De nye blodårene gir tilførsel av oksygen og næring til tumoren og avfallsstoffene kan fraktes bort. Cellene løsner fra hverandre ved å innaktivere membranproteiner, som E-cadherin, som fungerer som lim mellom cellene. Tap av adhesjon til nærliggende celler fører til apoptose i normale celler, mens tumorceller er resistente mot dette. Cellene kan nå rive seg løs fra primærtumoren, men for at de skal kunne bevege seg bort fra opphavsstedet må de kunne trenge gjennom basalmembraner (BM) og ekstracellulær matriks (ECM) som omgir tumoren. ECM består av collagener, glykoproteiner og proteoglykaner. Tumorcellene må skille ut proteolytiske enzymer som bryter ned ECM og BM for å kunne trenge igjennom. Matriks metalloproteinaser (MMP) og urokinase plasminogen er eksempler på slike enzymer. Kreftcellene blir så spredt i kroppen via lymfe eller blodåresystemet og må kunne feste seg til endotelceller som grenser til målorganet. Her må cellene igjen kunne invadere BM og ECM for å etablere seg på nytt og danne en ny voksende tumor (Brooks et al., 2009, Kumar and Robbins, 2007).

### 1.3 Paired box gen

Paired box (PAX) gen består av en liten, men viktig gruppe gener som koder for et sett med transkripsjonsfaktorer. Ni PAX gener er beskrevet hos pattedyr med homologer hos nematoder, fluer, frosker, fisker og fugler. PAX genene ligger på hvert sine kromosom og har fått navnet etter sekvensen som koder for et 128 aminosyrer langt DNA-bindings domene (paired domene) lokalisert i aminotermus. Dette domene danner sekvensspesifikk kontakt med DNAet. Noen PAX gener har også et homeodomene som kan binde DNA (Wilson et al., 1995). Basert på strukturen og nærvær eller fravær av homeodomenet og et oktapeptid, er PAX familien delt inn i fire undergrupper (figur 1) (Robson et al., 2006).



**Figur 1: Strukturelle domener og gruppering av PAX genene:** Alle PAX genene består av det 128 aminosyrer lange paired domenet og med unntak av gruppe IV (PAX4 og PAX6) har også alle PAX genene en oktapeptid region. Gruppe III og IV har homeodomenet, gruppe II (PAX2, PAX5 og PAX8) har et trunkert homeodomene, mens gruppe I (PAX1 og PAX9) helt mangler dette domenet. Figuren er basert på figur 1 i referansen (Robson, et al. 2006).

PAX uttrykk er primært observert i fosterutviklingen der de fremmer celledeling, celledifferensiering, migrasjon og overlevelse (Dahl et al., 1997). Denne rollen kommer av evnen til å gjenkjenne spesifikke DNA sekvenser som regulerer uttrykket av spesifikke målgener. PAX uttrykket blir redusert i de fleste vev når fosterutviklingen er fullført, men det er beskrevet at noen vev opprettholder PAX uttrykket, eller det reaktiveres ved behov. Heterozygote mutasjoner i PAX gen fører til store defekter i utviklingen av organer, mens homozygote mutasjoner ikke er forenelig med liv. For PAX6 er det for eksempel vist at heterozygote mutasjoner resulterer i defekter i øyet, mens homozygote mutasjoner hos mus gir manglende øyne, nasale strukturer og deler av hjernen og de dør kort tid etter fødselen (Wang et al., 2008). PAX gen er ofte uttrykt i kreft og man mener at endogent uttrykk av PAX gen er viktig for vekst og overlevelse i kreftceller (Muratovska et al., 2003).

### 1.3.1 PAX6

PAX6 tilhører undergruppe IV i PAX familien. Genet består av paired box domenet som kjennetegner alle PAX genene, homeodomenet og et C-terminalt transaktiveringsdomene. Både paired domenet og homeodomenet har uavhengig DNA-bindingsaktivitet, men de kan også virke sammen for å mediere transkripsjon. Det er observert flere isoformer av PAX6. Den vanligste er en spleiseform kalt PAX(5a) som forekommer ved å inkludere ekson 5a. Dette gir et protein med 14 aminosyrer ekstra i paired domenet. Tillegget av disse aminosyrene forandrer DNA-bindingsspesifisiteten til paired domenet og dette kan føre til at de to PAX6 isoformene binder og regulerer uttrykket av forskjellige målgen. Forholdet mellom uttrykket av de to isoformene varierer i forskjellige vev, men man har observert at den forholdsmessige fordelingen holdes konstant innen samme vev (Pinson et al., 2006, Simpson and Price, 2002).

PAX6 er en essensiell transkripsjonsfaktor for utviklingen av øyet, sentralnervesystemet og endokrine kjertler (bukspyttkjertelen hos mennesket) hos virvel- og virvelløse dyr (Simpson and Price, 2002). PAX6 kan påvirke celledeling, determinering, differensiering og celledød i normal utvikling og onkogenesen ved å påvirke uttrykket av gener (Simpson and Price, 2002). I utviklingen av øyet aktiverer PAX6 blant annet uttrykket av gener som koder for  $\beta$ -krystalliner som er viktige i utviklingen av linsen i øyet. PAX6 er også aktiv i den senere utviklingen av øyet og bølger av PAX6 uttrykkes ved hvert utviklingsstadium (Chi and Epstein, 2002). I bukspyttkjertelen har mangel på PAX6 hos mus vist komplett tap av de glukagonproduserende  $\alpha$  cellene, og  $\beta$ -,  $\delta$ -, og  $\gamma$ -cellene klarer ikke å danne de endokrine øyene som produserer insulin (Chi and Epstein, 2002).

PAX6 uttrykk har både blitt assosiert med gode og dårlige prognoser hos kreftpasienter. PAX6 har vært beskrevet med en tumorsupressorfunksjon i glioblastomaceller der det ved fravær av PAX6 ble sett høyere grad av invasjon enn der PAX6 var til stede (Zhou et al., 2005). Glioblastoma er en aggressiv kreftform med høy grad av invasjon og dårlig prognose for pasientene. Matriks metalloproteinase 2 (MMP-2) og andre MMPer er vist å være assosiert med invasjon og metastase. Det er funnet en sammenheng mellom MMP-2 og PAX6 og studiet viste at PAX6 nedregulerte MMP-2 uttrykket og dermed invasjonsevnen til glioblastomacellene (Mayes et al., 2006). Andre forskere har derimot vist at PAX6 har et



onkogenpotensial ved at PAX6 transfektert inn i cellelinjer og injisert subkutant inn i mus, induserer tumordannelse (Simpson and Price, 2002). En annen matriks metalloproteinase, MMP-9, er vist å aktiveres av PAX6 ved sårheling i hornhinnen der migrasjon av celler også er viktig (Sivak et al., 2000, Ramaesh et al., 2006). Rollen til PAX6 i forhold til MMP-2 og MMP-9 er interessant fordi overuttrykk av disse proteinasene i stor grad er assosiert med invasjon og metastasering i kreftceller.

#### **1.4 Matriks metalloproteinaser**

Degradering av ekstracellulær matriks (ECM) er en viktig del av utviklingen, morfogenesen, reparasjon av vev og remodelering. Denne prosessen er godt regulert under fysiologiske forhold, men forstyrrelser i denne reguleringen kan forårsake sykdommer som artritt, fibrose og kreft. En rekke proteinaser er involvert i degraderingene av ECM, men hovedgruppen er matriks metalloproteinaser (MMPene). Aktiviteten til de fleste MMPer i vev er lav eller neglisjerbar under normale forhold, men kan induseres når remodelering av EMC er nødvendig som under sårheling og dannelsen av nye blodårer (Brooks et al., 2009). MMP uttrykket er kontrollert på transkripsjonsnivå av inflammatoriske cytokiner, vekstfaktorer, hormoner, celle til celle og celle til matriks interaksjoner. MMP aktiviteten reguleres også ved aktivering av zymogener som plasmin og hemmes av endogene inhibitorer som tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPer) (Nagase et al., 2006).

MMPene deles inn i seks grupper etter struktur og substratspesifisitet (tabell 1): Kollagenaser, gelatinaser, stromelysiner, matrilysin, membrantype (MT)- MMPer og andre. Felles for alle MMPene er at de har et katalytisk domene koordinert av sink som katalyserer proteinkomponenter i ECM og aktiverer latente vekstfaktorer, celleoverflatereseptorer og adhesjonsmolekyler (Yan and Boyd, 2007). En typisk MMP består av et propeptid på rundt 80 aminosyrer, et katalytisk metalloproteinasedomene på rundt 170 aminosyrer, et "hinge-region" peptid av varierende lengde og et hemopexin domene på rundt 200 aminosyrer. Hemopexin domenet er viktig for substrat gjenkjenning og binding av TIMPene (Murphy and Nagase, 2008).

**Tabell 1: Oversikt over Matriks metalloproteinaser med navn og nummerering:** Tabellen er basert på tabell 2 i referansen (Murphy and Nagase, 2008).

Enzym	MMP
Interstitisial Kollagenase 1	MMP-1
Neutrofil Kollagenase 2	MMP-8
Neutrofil Kollagenase 3	MMP-13
Gelatinase A	MMP-2
Gelatinase B	MMP-9
Stromelysin 1	MMP-3
Stromelysin 2	MMP-10
Matrilysin 1	MMP-7
Matrilysin 2	MMP-26
Stromeolysin 3	MMP-11
MT1-MMP	MMP-14
MT2-MMP	MMP-15
MT3-MMP	MMP-16
MT5-MMP	MMP-24
MT4-MMP	MMP-17
MT6-MMP	MMP-25
Makrofag elastase	MMP-12
-	MMP-19
Enamelysin	MMP-20
-	MMP-21
CA-MMP	MMP-23
-	MMP-27
Epilysin	MMP-28

#### 1.4.1 Tissue inhibitor of metalloproteinases

Det er til nå oppdaget fire tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPer) hos mennesker. TIMP-1 og TIMP-3 er glykoproteiner, mens TIMP-2 og TIMP-4 inneholder ikke karbohydrater. TIMPene er små molekyler på 1228 kDa og består av to domener; et N-terminalt domene på 125 aminosyrer og et mindre C-terminaldomene på 65 residuer. TIMPene danner enten tette ikke-kovalente bindinger med MMPene i et 1:1 støkiometrisk kompleks og hemmer de dermed direkte, eller de regulerer selve aktiveringsprosessen. TIMPene har en hemmende effekt på alle MMPer testet så langt (Murphy and Nagase, 2008). TIMPene har likevel noen MMPer de regulerer i større grad. TIMP-1 hemmer hovedsakelig MMP-9, mens TIMP-2 hemmer MMP-2 og bidrar også til aktivering av pro-MMP-2. TIMP-3 er den eneste TIMPen som er bundet til ECM. Denne TIMPen hemmer flere membranbundne MMPer og spiller en sentral rolle i flere viktige reaksjoner som cellevekst, celledød og

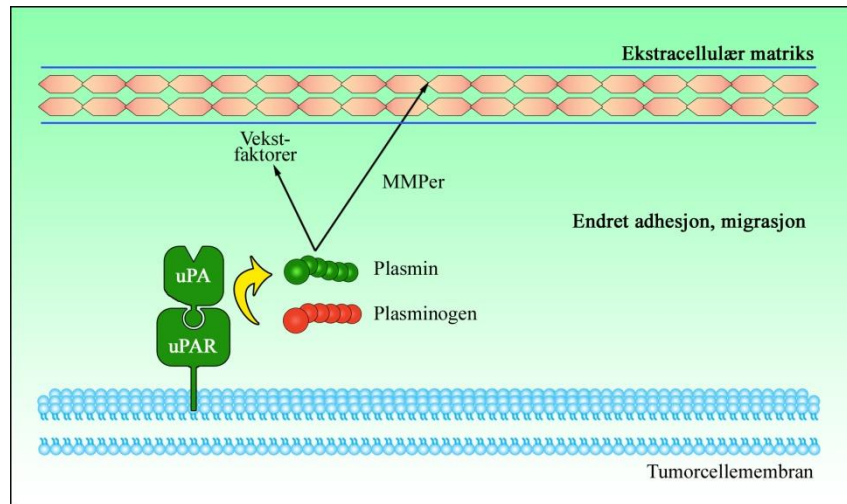
reparasjoner i vev (Rosenberg, 2009). En tett balanse mellom proteinasene og hemmerene er viktig for normal funksjon i kroppen (Brooks et al., 2009).

## **1.5 S100 proteiner**

S100 er en gruppe kalsiumbindende proteiner som har 20 medlemmer distribuert vevsspesifikt. Det første S100 proteinet ble oppdaget i hjernen av Moore og gitt navnet S100 fordi proteinene er løselige (soluble) i 100 % mettet ammoniumsulfat (Garrett et al., 2006). S100 proteinene har en "EF-hand" bestående av generelt 12 aminosyrer med mulighet til selektivt å binde  $Ca^{2+}$  med høy affinitet. Proteinene er involvert i blant annet kontroll av cellyklusen, enzymaktivering og regulering muskelkontraksjoner (Mazzucchelli, 2002). De senere årene har det vært mye fokus på blant annet S100A4 proteinet fordi det har vist seg at S100A4 er uttrykt ved metastasering og tumorprogresjon (Garrett et al., 2006).

## **1.6 Urokinase plasminogen activator og Urokinase plasminogen aktivator reseptor**

Urokinase plasminogen aktivator systemet er en gruppe serin proteinaser som består av urokinase-type plasminogen aktivator (uPA), vevstype plasminogen aktivator (tPA), plasminogen aktivator hemmere (PAI-1 og PAI-2) og en uPA reseptor (uPAR). uPA aktiveres når proteinet bindes til uPAR og en lysin-isoleucin peptidbinding brytes. uPA kan deretter katalysere aktiveringen av plasminogen til plasmin ved å bryte en arginin-valin binding (figur 2). Plasmin fremmer frigjøringen av proteolytiske enzymer som gelatinase, fibronectin, fibrin, laminin og latente former av kollagenaser og stromeolysiner. Plasmin aktiverer også uPA ved positiv feedback aktivering. Aktiveringen av plasmin kan hemmes og dette skjer ved hjelp av antiproteinaser PAI-1 og PAI-2. Hemmingen skjer da enten direkte eller ved å påvirke overflateuttrykk og internalisering. De to PAI-ene hemmer både uPA og tPA og er begge assosiert med metastase, vekst og overuttrykk er assosiert med dårlige prognose ved kreft. uPAR er viktig for mange kjente funksjoner som cellebevegelse og adhesjon gjennom ECM degradering. Man tror at det meste av aktiveringen til uPA er avhengig av uPAR, mens uPAR kan være aktiv uten binding til uPA (Mazar, 2008, Dass et al., 2008).



**Figur 2: Aktiveringen av plasminogen til plasmin:** uPA bindes til uPAR og peptidbinding brytes. uPA-uPAR komplekset aktiverer deretter plasmin til plasminogen ved å bryte en peptidbinding. Plasmin er nå aktivert og kan frigjøre proteolytiske enzymer og aktivere MMPer. Figuren er forenklet og basert på figur 1A i referansen (Mazar, 2008).

## 1.7 Formål med oppgaven

Vi har observert uttrykk av PAX6 i prostatakreftcellelinjen PC3. Matrix metalloproteinaser MMP-2 og MMP-9 er knyttet til kreftutvikling generelt og er vist å være regulert av PAX6 i henholdsvis glioblastoma og sårheling i hornhinna. Vi er derfor interessert i å se om:

- PAX6 kan regulere uttrykk av MMP-2 og MMP-9 i PC3 og to andre prostatakreft cellelinjer, LNCaP og DU145.
- det er noe mønster i endogent uttrykk av diverse PAX og MMP gener, samt TIMP1, S100 og uPA/uPAR i disse tre cellelinjene.
- manipulert uttrykk av PAX6 vil ha en effekt på noen av disse genene og på migreringspotensialet til cellene.



## 2 Materiale og metode

**Tabell 2: Primersekvenser og forventet PCR produkt.**

Primere	Sekvens skrevet 5' til 3'	Produkt	Produsent
Primer HPRT	F: GGGGGCTATAAAATTCCTTTGC R: TTCAACACTTCGTGGGGTCC	312bp	Operon
Primer HPRT (n)	F: ACCCCACGAAGTGTGGATA R: AAGCAGATGGCCACAGAACT	248bp	Operon
Primer MMP-1	F: TTGAAGCTGCTTACGAATTTGC R: GTCCCTGAACAGCCAGTACTT	99bp	Eurogentec S.A.
Primer MMP-2	F: TGGGACAAGAACCAGATCACATA R: CGAGCAAAGGCATCATCCA	963bp	Eurogentec S.A.
Primer MMP-3	F: TTTAAAGGAAATCAATTCTGGGCTAT R: GAGGAAACCTAGGGTGTGGAT		Eurogentec S.A.
Primer MMP-7	F: GGATGGTAGCAGTCTAGGGATTAECT R: GGAATGTCCCATACCCAAAGAA		Eurogentec S.A.
Primer MMP-9	F: CCACCACAACATCACCTATTGG R: GAAGGCGGGGCAA		Eurogentec S.A.
Primer MMP-13	F: TGGCATTGCTGACATCATGA R: GCCAGAGGGCCCATCAA	76bp	Eurogentec S.A.
Primer MMP-14	F: GCCTGCGTCCATCAACT R: ACACCCAATGCTTGTCTCCTTT		Eurogentec S.A.
Primer PAX2	F: AACGTGTCAGGCACACAGAC R: ACTTAGTAAGGCGGGTGTGC	228bp (122bp)	Operon
Primer PAX3	F: CACGGCTGCGTCTCCAA R: AGGCGTTGTCACCTGCTT	99bp	Operon
Primer PAX5	F: CCTCTCTCTCCAGGGACT R: GCCCACAGAAAAGCAAGAAG	279bp	Operon
Primer PAX6 (H)	F: CAACTCCATCAGTTCCAACG R: TGGATAATGGGTCTCTCAAACCTC	145bp	Eurogentec S.A.
Primer PAX6 (I)	F: CAGCTCGGTGGTGTCTTTGTG R: CTCGGACAGTAATATGTCTCG	342bp 300bp	Operon
Primer zPAX6	F: CAGCTCGGCGGTGTGTTTCGTC R: CTGGGTATATTATCGTTTGTG		Operon
Primer S100A4	F: AGTTCAAGCTCAACAAGTCAGAACTAA R: TCATCTGTCCTTTCCCAAGA		Eurogentec S.A.
Primer S100A7A	Sekvens ikke oppgitt av produsent	108bp	QantiTect (HSS100A7A-1)
Primer TIMP-1	F: CCAGCGCCCAGAGAGACA R: AGCAACAACAGGATGCCAGAA	96bp	Eurogentec S.A.
Primer TIMP-2	F: CACCCAGAAGAAGAGCCTGAA R: GGCAGCGCGTGATCTT		Eurogentec S.A.
Primer TIMP-3	Sekvens ikke oppgitt av produsent	105bp	Qiagen (QT00046382)
Primer uPA	Sekvens ikke oppgitt av produsent	181bp	SuperArray (PPH00796B)
Primer uPAR	Sekvens ikke oppgitt av produsent	87bp	SuperArray (PPH00797B)
Primer M13	R: AACAGCTATGACCATG		Operon (SP030)

## 2.1 Dyrking av kreftceller

Celler lagret i flytende nitrogen ble tint raskt ved å tilsette forvarmet dyrkningsmedium. Cellene ble overført til en 75 cm<sup>2</sup> dyrkningsflaske med filterkork og inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Hver 2.-3. dag ble cellene splittet 1:10 ved å fjerne dyrkningsmediet, vaske med steril PBS, løsne cellene fra plasten med 1 ml Trypsin- EDTA (1X) (SIGMA) og deretter nøytralisere med dyrkningsmedium. Ni deler av mediet med celler ble fjernet og friskt dyrkningsmedium ble tilsatt til den resterende ene delen med celler. Cellene ble inkubert videre ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

- DU145 cellelinje (ATCC HTB-81) fra prostatakraft i menneske med metastase til hjernen. Dyrket i MEM (x1) medium (Invitrogen) med 10 % fetalt kalveserum (FBS, Biochrom AG) og antibiotika (Penicillin 100 U/mL og Streptomycin 100 µg/µL).
- LNCaP cellelinje (ATCC CRL-1740) fra prostatakraft i menneske med metastase til lymfe. Dyrket i RPMI- 1640 (x1) medium (Biochrom AG) med 10 % FBS, og antibiotika (Penicillin 100 U/mL og Streptomycin 100 µg/µL).
- PC3 cellelinje (ATCC CRL-1435) fra prostatakraft i menneske med metastase til bein. Dyrket i F-12 Kaighn's modification medium (Invitrogen) med 10 % FBS og antibiotika (Penicillin 100 U/mL og Streptomycin 100 µg/µL).

### Phosphate-buffered saline (PBS)

ddH<sub>2</sub>O            800 mL

NaCl                8 g

KCl                 2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>          1,44 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>          0,24 g

pH justert med 18,5 % HCL til pH 7,4

ddH<sub>2</sub>O til        1000 mL



## **2.2 Transfeksjon av celler**

### **2.2.1 Transfeksjon med plasmid**

Plasmid DNA laget med Midiprep ble brukt ved transfeksjon av LNCaP celler. Det ble sådd ut 60 000 celler per brønn på seksbrønnersbrett og transfeksjonen ble utført neste dag når cellene var omtrent 40 % konfluente. Plasmidet pCi-PAX6 ble brukt til å transfektere inn plasmid med PAX6 uttrykk. Plasmidet pCi-neo ble brukt som kontroll (tom vektor) og pEGFP-CI ble brukt som en markør på transfeksjonseffektiviteten da dette plasmidet produserer grønt fluoriserende protein (GFP).

Per brønn på et seksbrønnersbrett ble det laget en transfeksjonsmiks med 2,5 µg pCi-PAX6 eller pCi-neo, 0,5 µg pEGFP-CI plasmid og 250 µL Optimem (Invitrogen). I et annet rør ble det blandet 2 µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen) og 250 µL Optimem. Reagensene ble blandet hver for seg og stod i romtemperatur i 5 minutter. Deretter ble Lipofectamin 2000 blandingen tilsatt plasmidene og inkubert ved romtemperatur i 20 minutter. Mediet på cellene ble skiftet til 500 µL forvarmet (37 °C) Optimem og transfeksjonsmiksen ble så tilsatt i brønnene. Cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 4 timer før mediet ble skiftet til vanlig dyrkningsmedium. Etter 24 timer ble samme prosedyre gjentatt for å øke transfeksjonseffektiviteten. Cellene ble høstet 48 timer etter siste transfeksjon. Cellene ble studert med Nikon Axiovert S100 mikroskop

### **2.2.2 Transfeksjon med siRNA**

Det ble sådd ut 60 000 celler per brønn på seksbrønnersbrett og transfeksjonen ble utført dagen etter når cellene var omtrent 40 % konfluente. DU145 og PC3 cellene ble transfektert med PAX6 #114168 siRNA (AM16708A, Ambion) for å slå ut PAX6 uttrykket. Uspesifikt scr #2 siRNA (4613, Ambion) ble brukt som kontroll og Fluoricient oligo (Invitrogen) ble brukt som markør på transfeksjonseffektiviteten.

Per brønn på et seksbrønnersbrett ble det laget en transfeksjonsmiks med 1,5 µL PAX6 siRNA (10 µM) eller 1,5 µL av scr siRNA (10µM), 0,5 µL Fluorecent oligo (20 µM) og 500 µL Optimem. I et annet rør ble laget en blanding med 1,5 µL Lipofectamin 2000 og 500 µL Optimem. Blandingene ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter før

Lipofectamin 2000 blandingen ble tilsatt røret med siRNA. Transfeksjonsblandingen ble inkubert i romtemperatur i 20 minutter.

Cellene ble tilsatt 1 ml av transfeksjonsblandingen og inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Etter 4 timer ble det skiftet tilbake til vanlig dyrkningsmedium for DU145 cellene, mens PC3 cellene stod med transfeksjonsmediet over natten. Cellene ble høstet eller brukt til videre forsøk 48 timer etter transfeksjon. Cellene ble studert med Nikon Axiovert S100 mikroskop.

### **2.3 Invasjons assay**

Det ble brukt BD BioCoat™ Tumor Invasion System fra BD Biosciences.

Før cellene ble overført til invasionsbrønnene ble de vasket én gang med PBS og deretter tre ganger med 0,1 % BSA medium. Cellene ble så sultet i 5 timer med 0,1 % BSA medium ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. For å farge cellene ble mediet skiftet til 2 mL 0,1 % BSA medium tilsatt 10 µg/mL DilC12(3) (BD Biosciences) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 1 time.

Platen for invasions assayet ble tint og membranene hydrert ved å tilsette 500 µL forvarmet (37 °C) steril PBS i hver brønn. Brettet ble inkubert ved 37°C i 2 timer. PBS ble fjernet forsiktig med pipette for ikke å skade matrigelen.

Cellene ble vasket tre ganger med PBS for å fjerne overskuddsfarge, trypsinert med 200 µL trypsin og nøytralisert i 800 µL 0,1 % BSA medium. Celleantallet ble detektert ved hjelp av tellekammer og det ble tilsatt riktig mengde medium for å få en cellekonsentrasjon på  $1 \times 10^5$  celler/mL. 500 µL av celleduspensjonen ble hatt i hver brønn og deretter ble det tilsatt 750 µL medium med 10 % FBS i basalkammeret. Cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 20 timer. Celletettheten ble målt med Spectra MAX Gemini EM.

#### 0,1 % BSA medium

Albumin bovine serum (Fluka Biochemika) 0,1 g  
F-12 Kaights modification (Invitrogen) 99,9 g  
Sterilfiltrert før bruk

## 2.4 RNA preparasjon ved hjelp av TRIzol

RNA fra celler i seksbrønnersbrett ble høstet i 0,5 mL TRIzol (Invitrogen) per brønn. Cellene ble skrapet løs med celleskraper og deretter ble to og to brønner overført til samme eppendorfrør. Rørene ble innkubert i romtemperatur noen minutter og deretter lagret ved -70 °C, eller brukt direkte til å lage RNA.

Per 1mL Trizol ble det tilsatt 200 µl kloroform (Fluka) og ristet hardt i 15-20 sekunder. Eppendorfrøret stod deretter i romtemperatur i 2-3 minutter før det ble sentrifugert ved 12000 rpm i 15 minutter med Biofuge fresco (Heraeus instruments) sentrifuge ved 4 °C. Den øverste fasen ble forsiktig overført til et nytt eppendorfrør og tilsatt 500 µL isopropanol (Arcus). Røret ble vendt 6-7 ganger og satt i romtemperatur i 10 minutter før det ble sentrifugert ved 12000 rpm i 10 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble fjernet forsiktig og RNA pelleten vasket i 1 mL 75 % etanol (Arcus). Eppendorfrøret ble vortexet og sentrifugert ved 7500 rpm i 5 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble igjen fjernet forsiktig og pelleten lufttørket i 10 minutter til all etanolen var fordampet. RNApelleten ble resuspendert i 50-100 µL nukleasefritt vann (Ultra pure water, Biocrom AG) og inkubert på varmeblokk ved 57 °C i 10 minutter. Eppendorfrøret ble deretter satt på is og sentrifugert kort. Arbeidet ble utført i RNA-avtrekkskap og det ble brukt hansker og filterspisser for å hindre kontaminering med RNase.

## 2.5 DNase behandling av RNA

RNA ble rensert med QIAgen sitt DNeasy Plus kitt for å ta bort eventuelt genomisk DNA. Nukleasefritt vann ble tilsatt til 100 µL før det ble tilsatt 350 µL RLT pluss buffer. Blandingen ble overført til en DNA eliminator kolonne med 2 mL samlerør. Kolonnen ble kjørt på 13000 rpm i 30 sekunder for å bli kvitt genomisk DNA. Væsken i samlerørene ble tilsatt 350 µL 70 % etanol og overført til en RNeasy spin kolonne med 2 mL samlerør. Kolonnene ble sentrifugert på 13000 rpm i 15 sekunder. Spinnkolonnemembranen ble vasket med 700 µL RWI buffer og sentrifugert på 13000 rpm i 15 sekunder. Kolonnen ble vasket to ganger til med 500 µL RPR buffer. Den første gangen ble det sentrifugert ved 13000 rpm i 15 sekunder, mens det den andre gangen ble sentrifugert i 2 minutter for å bli kvitt så mye buffer som mulig. Kolonnen ble overført til et nytt 2 mL samlerør og sentrifugert 1 minutt for

å bli kvitt all resterende buffer. Kolonnen ble nå overført til 1,5 mL eppendorfrør og RNAet ble eluert i 30  $\mu$ L nukleasefritt vann ved sentrifugering ved 13000 rpm i 1 minutt. Eluatet ble spunnet gjennom kolonnen en gang til for å øke utbyttet av RNA. Arbeidet ble utført i RNA-avtrekkskap og det ble brukt hansker og filterspisser for å hindre kontaminering med RNase. Det ble brukt MiniSpin eppendorfsentrifuge.

RNA konsentrasjonen ble målt med NanoDrop ND-200 Spectrophotometer og prøvene ble deretter lagret ved  $-70^{\circ}\text{C}$ , eller brukt direkte i cDNA syntese.

## 2.6 cDNA

cDNA ble laget på to måter. Enten ved hjelp av Transkriptor Revers Transkriptase fra Roche, eller ved hjelp av Superskriptor III Revers Transkriptase fra Invitrogen.

### 2.6.1 Transkriptor Revers Transkriptase

Reagensene ble blandet på is

RNA (5 $\mu$ g)	X $\mu$ L
Random hexamer primer (pdN <sub>6</sub> ), (1,6 $\mu$ g/ $\mu$ l) (Amersham)	4 $\mu$ L
Nukleasefritt vann (til 26 $\mu$ l)	Y $\mu$ L

Eppendorfrøret ble innkubert på varmeblokk ved  $65^{\circ}\text{C}$  i 10 minutter og deretter satt rett på is i 1 minutt. Det ble så tilsatt

Transcriptor RT Reactionbuffer (5x) (Roche)	8 $\mu$ L
dNTP mix (10 $\mu$ M av hver) (Promega)	4 $\mu$ L
RNAsin (Promega)/ CRI (TaKaRa)	1 $\mu$ L
Tanscriptor Revers Transkriptase (Roche)	1 $\mu$ L

Røret ble vortexet og spunnet kort i sentrifuge før det ble inkubert på varmeblokk ved  $25^{\circ}\text{C}$  i 10 minutter,  $55^{\circ}\text{C}$  i 30 minutter og  $85^{\circ}\text{C}$  i 30 minutter. Røret ble deretter satt direkte på is, spunnet kort i sentrifuge og lagret ved  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6.2 Superscript III Revers Transkriptase

RNA ble tint på is. I et eppenforf rør ble det tilsatt

RNA (5 µg)	X µL
random hexamer primer (pdN <sub>6</sub> ) (0,25 µg/ µl) (Amersham)	2 µL
dNTP mix (10mM av hver) (Promega)	2 µL
Nukleasefritt H <sub>2</sub> O (til 26 µl)	Y µL

Eppendorføret ble innkubert på varmeblokk ved 65 °C i 5 minutter og deretter satt rett på is i 1minutt før det ble spunnet kort i bordsentrifuge. Det ble så tilsatt

5 x First- Strand reaction buffer (Invitrogen)	8 µL
0,1 M DTT (Invitrogen)	1 µL
RNAsin (Promega) / CRI (TaKaRa)	1 µL
Superscript III RT (200 enheter/ µL) (Invitrogen)	1 µL

Eppendorfrøret ble igjen plassert på varmeblokk ved 25 °C i 5 minutter, 50 °C i 45 minutter og tilslutt 70 °C i 15 minutter. cDNAet ble deretter satt rett på is, spunnet kort i bordsentrifuge og lagret ved -20 °C.

## 2.7 Polymerase chain reaction (PCR)

### 2.7.1 Revers Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Det ble laget én mastermiks for hvert primersett og vortexet kort for å blande reagensene.

Master miks per PCR reaksjon:

10 x DyNAzyme PCR buffer (Finnzymes)	1 µL
Forward primer (10 µM)	1 µL
Revers primer (10 µM)	1 µL
dNTP miks (10 µM av hver) (Promega)	1 µL
DyNAzyme (2 U/L) (Finzyme)	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O (til 50 µl)	39,5 µL

2 µL cDNA ble overført til PCR rør og 48 µL mastermiks ble deretter tilsatt og prøvene spunnet kort i en sentrifuge. PCR prøvene ble kjørt med en PTC-200 Peltier Thermal Cycler fra KEBO lab med disse innstillingene:

- Denaturering ved 94 °C, 2 minutter
- 35 sykluser med:
  - Denaturering ved 94 °C i 30 sekunder
  - Binding av primer til templat ved 57 °C i 30 sekunder
  - Syntese av DNA ved 72 °C i 45 sekunder
- Syntese av DNA ved 72 °C i 5 minutter
- Nedkjøling til 4°C, uendelig

HPRT primersettet ble kjørt med disse innstillingene:

- Denaturering ved 94 °C, 2 minutter
- 25 sykluser med:
  - Denaturering ved 94 °C i 30 sekunder
  - Binding av primer til templat ved 55 °C i 30 sekunder
  - Syntese av DNA ved 72 °C i 45 sekunder
- Syntese av DNA ved 72 °C i 5 minutter
- Nedkjøling til 4°C, uendelig

### 2.7.2 Kvantitativ PCR (Q-PCR)

Det ble laget én mastermiks for hvert av primersettene i forsøket for å gjøre det praktisk enklere, men også for å eliminere aktuelle feilkilder som pipetteringsfeil.

Mastermiks per PCR reaksjon

2x Brilliant II Syber Green Q-PCR master mix (Stratagene)	12,5 µl
Forward primer (10 µM)	0,5 µl
Revers primer (10 µM)	0,5 µl
Nukleasefritt vann (til 23 µl)	9,5 µl

23 µL mastermiks ble overført til hvert Q-PCR rør og tilsatt 2 µL cDNA (fortynnet 1:5 med nukleasefritt vann). Det ble kjørt to duplikater per prøve og to kontroller for hvert primersett. Én kontroll uten revers transkriptase enzym (NORT) og én kontroll uten templat (NTC). Q-PCR rørene ble spunnet 5 sekunder ved 1000 rpm i en eppendorf Centrifuge 5810 R. Alle prøvene ble kjørt 48 sykluser med smeltekurve etter endt program (se under). Det ble brukt en MX3000P Stratagene Q-PCR med disse innstillingene:

- Denaturering ved 95 °C
- 48 sykluser med
  - Denaturering ved 95 °C i 30 sekunder
  - Binding av primer til templat ved 60 °C i 1 minutt
  - Syntese av DNA ved 72 °C i 30 sekunder
- Smeltekurve
  - Denaturering ved 95 °C i 1 minutt
  - 55 °C i 30 sekunder
  - Temperaturøkning til 95 °C i 30 sekunder

Resultatene ble analysert med MxPro-Mx3000P v3.20 Build 340, Schema 74 © 2006 Stratagen

## **2.8 Elektroforese**

### **2.8.1 Gelelektroforese av PCR produkt**

1,00 g agarose (MedProbe) og 100 ml 1 X TAE buffer ble varmet 3 minutter i mikrobølgeovn til agarosen var smeltet. Den varme blandingen ble avkjølt til mellom 60-70 °C. 10 µl etidiumbromid (10 mg/mL SIGMA) ble tilsatt i en støpingsform og den varme gelblandingen ble helt over og etidiumbromiden blandet inn. En kam ble satt ned for å lage brønner og gelen stod i romtemperatur i ca 30 minutter for å stivne.

Etter at gelen var stivnet ble den overført til et elektroforesekammer som ble fylt opp med 1xTAE buffer. Det ble satt på 6 µL av en 1 Kb pluss markør (10787-018, Invitrogen). RT-PCR produktene ble tilsatt 10 µl 6xT gel loading buffer og 20 µl av prøvene ble satt på gelen. Gelen ble kjørt på 80 V i 30-60 minutter. Bilder ble tatt av gelen med Gel Doc 2000 BIO RAD.





**Figur 3: DNA markør:** 1 kb Plus DNA markør fra Invitrogen med angitt størrelse på DNA baseparene.

#### 50 x TAE

Tris(base)	242 g
11,4 % Eddiksyre	57,1 mL
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 mL
dH <sub>2</sub> O til	1000 mL

Fortynnet 1:50 før bruk

#### 0,5M EDTA

Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	18,61 g
dH <sub>2</sub> O	80 mL
Justert pH med NaOH pellets til pH 8,0	
dH <sub>2</sub> O til	100 mL

#### 6XT gel loading buffer

Xylen Cyanol FF	0,25 %
Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0)	60 mM
SDS	0,6 %
Sukrose i vann	40 % (w/v)

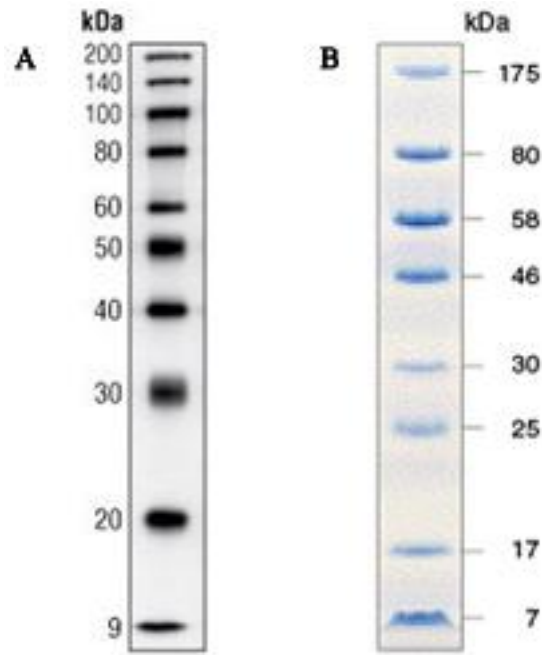
## 2.8.2 Western blott

Tillaging av proteinprøver:

Cellene i seksbrønnersbrett ble vasket med PBS og deretter tilsatt 100-200  $\mu\text{L}$  2xSDS gel loading buffer. Cellene ble skrapet løs med celleskraper, overført til eppendorfrør, kokt på vannbad i 5 minutter og deretter sonikert i 3x30 sekunder med Bioruptor UCD-200. Biotin markør (7727, Cell Signaling) og prestained markør (P7708S, New England) ble blandet i hvert sitt eppendorfrør 1:1 med 2xSDS gel loading buffer og deretter kokt 5 minutter på vannbad.

Til akrylamidgelen ble det brukt glassplater med en avstand på 1,5 mm. Det ble laget en separerende gel som ble fylt opp mellom glassplatene til kammeret var 2/3 fullt. Over den separerende gelen ble det forsiktig hatt på MilliQ vann slik at gelen fikk en jevn overflate når den stivnet. Etter 20 minutter var gelen polymerisert og vannet over gelen ble helt ut. Den konsentrerende gelen ble laget og fylt opp til det var 2 mm igjen til øvre kant av glassplaten. En kam med 10 brønner ble forsiktig satt ned mellom glassplatene slik at det ikke var bobler i gelen. Etter 20 minutter var også den konsentrerende gelen polymerisert og kammen med brønnene ble fjernet.

Den ferdige gelen ble overført til et gelkjøringskammer (BIO-RAD) og det ble fylt opp med 1xgelkjøringsbuffer. 20  $\mu\text{L}$  av proteinprøvene og 16  $\mu\text{L}$  av markørene ble satt på gelen. Gelen ble kjørt på 120 V i 2 timer.



**Figur 4: Protein markører til Western blott:** (A) Biotin markør fra Cell Signaling vist med 11 % SDS-PAGE gel og (B) prestained markør fra New England vist med 10-20 % SDS-PAGE gel.

Blotting av membranen:

Den konsentrerende gelen ble fjernet og deretter ble gelen, to svamper, fire filterpapir (Amersham) og Hybondmembran (Amersham) preinkubert i blottebufferen i 15 minutter. Oppsettet til blottingen ble satt opp slik fra den siden som skulle vende mot den positive polen i blottekammeret.

- Svamp
- To filterpapir
- Hybondmembran
- SDS-PAGE gel
- To filterpapir
- Svamp

Oppsettet ble satt i blottekammeret (BIO-RAD) og det ble fylt opp med 1 L blottebuffer. Blottingen ble kjørt på 100 V i 1 time med magnetrører.

Farging med antistoff:

Det ble sjekket at proteinene hadde kommet over på membranene ved å se at prestained markøren vist. Membranen ble deretter overført til et 50 mL rør, vasket kort med dH<sub>2</sub>O og tilsatt 10 mL 5 % blokkeringsbuffer. Røret ble satt med rotering ved 4 °C over natten.

Blokkeringsbufferen ble fjernet og det ble tilsatt nye 4 mL 5 % blokkeringsbuffer og aktuelt primær antistoff. Membranen ble satt med rotering ved 4 °C over natt.

Dagen etter ble membranene vasket med 10 mL PBST i 3 minutter. Dette ble repetert fem ganger. Det ble tilsatt 4 mL blokkeringsbuffer, anti biotin antistoff og sekundert antistoff. Membranen ble satt med rotering i romtemperatur i 1 time før den ble vasket på nytt fem ganger med 10 ml PBST i 3 minutter per vask.

Membranen ble kort tørket mot et papir. Western blott luminol reagens løsning A og B (Santa Cruz Biotechnology) ble blandet i eppendorfrør i forholdet 1:1 og fordelt over membranene. Løsningen fikk virke 1 minutt før den overflødig væsken ble fjernet og membranene lagt i en plastlomme. Bildet ble tatt med Fujifilm LAS-3000 intelligent dark box.

Membranene ble strippet med 20 mL 0,5 M NaOH i 5 minutter på vippebrett. De ble deretter nøytralisert med dH<sub>2</sub>O og blokket med 10 mL 5 % blokkebuffer ved 4 °C over natt. Actin primær antistoff ble tilsatt og videre prosedyre ble gjort på samme måte som nevnt tidligere ved merking med antistoff.

**Tabell 3: Antistoff til Western blott:** Antistoffene med fortynningsforhold brukt i oppgaven.

Antistoff	Fortynning	Produsent
Actin-antistoff	1:2000	SIGMA (A 2066)
Anti biotin antistoff	1:2000	Cell Signaling (7075)
PAX5- antistoff	1:800	Abcam (ab15164)
PAX6-antistoff (C-terminal)	1:1000	Chemicon (AB5409)
PAX6-antistoff (paired domenet)	1:500	Santa Cruz Biotechnology (sc-53108)
Anti-kanin antistoff HRP-konjugert	1:2000	BP Pharmingen (554021)
Geit anti-mus antistoff HRP-konjugert	1: 2000	Santa Cruz Biotechnology (sc-2031)

### 2xSDS gel-loading buffer

Tris HCL	100 mM
SDS	4 % (w/v)
Bromphenol blå	0,2 % (w/v)
Glycerol	20 % (v/v)
Dithiothreitol	200 mM (tilsatt rett før bruk)

### 1 M Dithiothreitol (DTT)

Dithiothreitol	3,09 g
0,01 M NaCH <sub>3</sub> COO (pH 5,2)	20 mL

### 10 % Separerende gel:

Acrylamid Bis 40 % (Merck)	2,6 mL
1,5 M TrisBase	2,5 mL
MilliQ vann	4,8 mL
10 % APS	100 µL
TEMED (Promega)	10 µL

### 4 % Konsentrerende gel:

Acrylamid Bis 40 %, 29:1 (Merck)	250 µL
0,5 M TrisBase	650 µL
MilliQ vann	1,6 mL
10 % APS	25 µL
TEMED (Promega)	2,5 µL

### 0,5 M TrisBase

Tris(base)	6,05 g
dH <sub>2</sub> O	80 mL
20 % SDS	2 mL
pH justert med 18,5 % HCl til pH 6,8	
dH <sub>2</sub> O til	100 ml

### 10 % APS

Ammoniumpersulfat (ICN Biomedicals) 10 g  
MilliQ vann 100 mL

### 1,5 M TrisBase

Tris(base) 18,2 g  
dH<sub>2</sub>O 80 mL  
20 % SDS 2 mL  
pH justert med 18,5 % HCl til pH 8,8  
dH<sub>2</sub>O til 100 mL

### 10xGelkjøringsbuffer

Tris(base) 30 g  
dH<sub>2</sub>O 800 mL  
Glycine 144 g  
SDS 10 g  
pH just med 18,5 % HCl  
H<sub>2</sub>O til 1000 mL  
Fortynnet 1:10 før bruk

### Blottebuffer

Tris(base) 1,88 mg  
Glycine 23,25 mg  
Metanol 150 mL  
MilliQ vann 850 mL

### 5 % Blokkeringsbuffer

Tørrmelk (Semper) 2,5 g  
1xPBST til 50 mL

### PBST

Phosphat buffered saline 1000 mL  
Tween 20 1 mL

### 2.8.3 Zymografi

Cellene ble vasket tre ganger med serumfritt medium 48 timer etter transfeksjon. 2 mL serumfritt medium ble tilsatt i hver brønn og cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 48 timer. Det ble tatt bilder av brønnene for å kunne vurdere celleantallet. Cellemediet ble høstet og overført til eppendorfrør. For å bli kvitt eventuelle løse celler i mediet ble rørene sentrifugert i 2 minutter ved 2000 rpm (Biofuge fresco fra Heraeus instruments) ved 4 °C. 900 µL av mediet ble overført til nytt eppendorfrør og tilsatt 100 µL fryseløsning. Enzymprøvene ble lagret ved -20 °C.

Tillaging av enzymprøver:

Enzymprøvene ble tint på is. 20 µL av hver prøve ble overført til nye eppendorfrør og tilsatt 5 µL 5xSDS. Én kontroll av 20 µL THP-1 (kondisjonert medium fra monocytter som inneholder MMP-9) for MMP-9 og blanke prøver med 20 µL 1 M HEPES ble overført til eppendorfrør og tilsatt 5 µL 5xSDS gel loading buffer.

Til akrylamidgelen ble det brukt glassplater med en avstand på 0,75 mm. Det ble laget en 9 % separerende gel som ble fylt opp mellom glassplatene til kammeret var 2/3 fullt. Over gelen ble det hatt på MilliQ vann for å gjøre gelen jevn og hindre bobler. Gelen stod 20 minutter, vannet ble helt ut, 4 % konsentrerende gel tilsatt og en kam med 10 brønner ble satt ned til slutt. Gelen stod i nye 20 minutter før den ble overført til gelkjøringskammer (BIO-RAD) og 1xgelkjøringsbuffer ble fylt opp i kammeret. Det ble satt på 20 µL av hver prøve, kontroll og blanke prøver. De blanke prøvene ble satt på i de tomme brønnene for å hindre ujevne bånd på gelen. Gelkammeret ble satt i en isboks og kjørt 30 minutter på 100 V før spenningen ble økt til 150 V i 1 time.

Gelen ble forsiktig tatt ut av gelkjøringskammeret og lagt i en petriskål med 50 mL vaskebuffer. Gelen ble vasket på svak risting i 15 minutter, ny vaskbuffer ble tilsatt og det ble vasket i 30 minutter. Vaskebufferen ble erstattet med assaybuffer, skålen ble forseglet med parafilm og inkubert over natt på 45 rpm i inkubator på 37 °C.

Farging av gelen:

Assaybufferen ble fjernet og gelen tilsatt 50 mL 1:1 0,2 % fargeløsning og 20 % eddiksyre. Gelen ble satt på svak risting 1 time før den ble avfarget med 50 mL avfargingsvæske ved svak risting i 15 minutter. Det ble tilsatt frisk avfargingsvæske og gelen stod med svak risting i 30 minutter. Avfargingsvæsken ble erstattet med 100 mL milliQ vann og det ble tatt bilde av gelen med Gel Doc 2000 BIO RAD.

#### Fryseløsning

CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,147 g
1 M Hepes	10 mL

#### 1 M Hepes

Hepes	23,813 g
-------	----------

pH justert med NaOH til pH 7,5

MilliQ vann til	100 mL
-----------------	--------

Autoklavert før bruk

#### 5xSDS gel loading buffer

10 % SDS	10 g
Tris(base)	3,78 g
MilliQ vann	80 mL

pH justert med 18,5 % HCL til pH 7,4

Bromphenol blue	0,1 g
Sucrose	20 g

#### 9 % separerende gel:

Akrylamid bis 40 %, 29:1 (Merck)	1125 µL
1,5 M TrisBase	1250 µL
2 % Gelatin	250 µL
TEMED (Promega)	4 µL
10 % APS	37,5µL



#### 4 % konsentrerende gel

Akrylamid bis 40 %, 29:1 (Merck)	190 µL
MilliQ vann	925 µL
0,5 M TrisBase	375 µL
TEMED (Promega)	1,5 µL
10 % APS	7,5 µL

#### 2 % Gelatin

Gelatin	2 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL

#### Vaskebuffer

Triton	20 mL
1xBasisbuffer	780 mL

Løst med varme og magnetrører

#### 10xBasisbuffer

Tris(base)	60,4 g
dH <sub>2</sub> O	800 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7,4 g
10 mM ZnCl <sub>2</sub>	1,0 mL

pH justert med 18,5 % HCl til pH 7,5

dH <sub>2</sub> O til	1000 mL
-----------------------	---------

Fortynnet 1:10 før bruk

#### Assaybuffer

Tris(base)	12,1 g
Tris HCl	63,0 g
NaCl	117 g
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	9,8 g
Brij 35 30 % = 0,2 %	6,7 mL
dH <sub>2</sub> O til	1000 mL

### 0,2 % Fargeløsning

Comassie brilliant blue R-250	0,8 g
dH <sub>2</sub> O	160 mL
Metanol	240 mL

### 20 % Eddiksyre

dH <sub>2</sub> O	800 mL
Eddiksyre konsentrert	200 mL

### Avfargignsvæske

Metanol	240 mL
Eddiksyre	80 mL
dH <sub>2</sub> O	480 mL

## **2.9 Kloning av RT-PCR produkt og transformasjon av kompetente DH5 $\alpha$ (*E.coli*) bakterier**

Det ble brukt Invitrogens TOPO TA klonings kitt, men bakteriene ble ikke benyttet grunnet dårlig bakterie batch. Kompetente DH5 $\alpha$  bakterier (*E.coli* t1 res.) ble istedenfor benyttet.

PCR produkt fra RT-PCR ble benyttet.

PCR produkt	4 $\mu$ L
Saltløsning (Invitrogen)	1 $\mu$ L
TOPO vektor (Invitrogen)	1 $\mu$ L

Reaksjonsblandingen ble inkubert i eppendorfrør i 15 minutter ved romtemperatur og deretter satt på is. Det ble brukt 4  $\mu$ L av denne reaksjonsblandingen og fortynnet med 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. De kompetente DH5 $\alpha$  bakteriene ble tint på is og reaksjonsblandingen ble tilsatt. Røret stod på is i 1 time og ble deretter varmesjokket på vannbad ved 37 °C i 2 minutter. Røret ble tilsatt 5 ml SOC medium (Invitrogen) og satt på risting i inkubator (Unitson HT infors) ved 37 °C og 225 rpm i 45 minutter. Bakterierøret ble spunnet ned ved sentrifugering på 4000 rpm (eppendorf Centrifuge 5810 R) i 5 minutter, det meste av supernatanten fjernet og bakteriene

resuspendert i det resterende mediet. En ampicillinplate (LB medium med 15,0 g/L agar og 100 µg/mL Ampicillin) med 40 µL 100 mM IPTG (Isopropylthio-β-D-galactosid, Promega) og 40 µL 40 mg/mL X-gal (Promega) ble forvarmet i inkubator ved 37 °C. Det ble så tilsatt 100 µL bakterieløsning på platen. Løsningen ble fordelt på platen med steril glasstav og platen stod deretter i romtemperatur til væsken var absorbert. Bakterieplaten ble inkubert over natt ved 37 °C. Kolonier ble plukket og DNA ekstrahert som beskrevet under DNA miniprep.

## 2.10 DNA Midiprep

Isolering av plasmid DNA ble utført med Midi Prep Kitet til QIAgen.

En liten del frosne bakterier ble overført til 500 mL erlenmeierkolbe med 100 mL LB medium med antibiotika. Dette ble gjort under sterile forhold for å hindre kontaminasjon med andre bakterier. Kolbene ble inkubert (Unitson HT infors) ved 37 °C og 225 rpm over natt.

Overnattkulturen ble sentrifugert ved 6000 g i 15 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble fjernet og pelleten resuspendert i 8 mL P1 buffer. Videre ble 8 mL P2 buffer tilsatt og rørene inkubert i romtemperatur i 5 minutter. For å nøytralisere løsningene ble det tilsatt 8 mL N3 buffer og inkubert i 15 minutter. Rørene ble deretter sentrifugert ved 20000 g i 30 minutter ved 4 °C. Supernatanten med plasmid DNAet ble overført til et nytt rør med filtrering gjennom cellostoppapir for å fjerne eventuelle cellerester. Kolonnen ble ekvillibrert med 4 mL QBT ekvillibrerings buffer og prøven ble dryppet gjennom kolonnen. Kolonnen ble vasket to ganger med 10 mL QC vaskebuffer og deretter ble prøven eluert med 5 mL elueringsbuffer. Eluatet ble tilsatt 3,5 mL isopropanol, blandet godt og sentrifugert ved 15000 g i 30 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble forsiktig fjernet og DNA pelleten ble vasket med 2 mL 70 % etanol. Røret ble igjen spunnet ved 15000 g i 10 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble forsiktig fjernet og DNA pelleten tørket i eksikator i 10 minutter. Pelleten ble deretter resuspendert i 100 µL TE buffer.

DNA konsentrasjonen ble målt med NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer.

### LB medium med 100 µL/mL Ampicillin

Tryptone	10 g
Gjærekstrakt	5 g
NaCl	171 g
Ampicillin	50 µg/mL
ddH <sub>2</sub> O til	1000 mL
pH justert med NaOH til pH 7,0	

### 10xTris EDTA (TE) buffer

TrisHCL	100 mM
EDTA	10 mM

## **2.11 DNA Miniprep**

Fra bakterieplatene med klonede PCR produkt ble det høstet hvite kolonier med sterile tannpirkere. Tannpirkerne ble overført til hver sitt falconrør med 3 mL LB-medium med 100 µg/mL ampicillin. Rørene ble inkubert ved 37 °C og 225 rpm over natt.

Isolering av plasmid DNA fra overnattkulturen ble utført med buffrene fra QIAgens Miniprep kitt.

1,5 mL av overnattkulturen ble overført til eppendorfrør som ble spunnet ned ved 13000 rpm (Biofuge pico sentrifuge fra Heraeus instruments) i 20 sekunder. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 100 µL P1 buffer. 100 µL P2 buffer ble tilsatt og rørene vendt forsiktig. Rørene stod i romtemperatur i 3 minutter før 140 µL N3 buffer ble tilsatt og rørene igjen vendt forsiktig. Rørene ble så sentrifugert ved 13000 rpm i 10 minutter. Supernatanten ble overført til nytt rør, tilsatt 350 µL isopropanol, vortexet og stod i romtemperatur i 5 minutter før rørene igjen ble spunnet på 13000 rpm og supernatanten fjernet. For å vaske pelleten ble det tilsatt 500 µL 70 % etanol og rørene ble igjen spunnet på 13000 rpm i 5 minutter. Etanolen ble fjernet og rørene satt i eksikator i ca 10 minutter. DNA pelleten ble resuspendert i 50 µL TE-buffer.

DNAkonsentrasjonen ble målt med NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

## 2.12 Kutting av DNA med restriksjonsenzym

Plasmid DNA ble kuttet for å kunne identifisere størrelsen til DNA båndene klonet fra RT-PCR reaksjonen. Det ble laget en mastermiks med alle reagensene utenom DNA.

10xTA	2 $\mu$ L
EcoRI (TaKaRa)	0,3 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	12,7 $\mu$ L

15  $\mu$ L mastermiks ble overført til PCR rør og tilsatt 5  $\mu$ L plasmid DNA. Rørene ble innkubert ved 37 °C i 1,5 timer slik at enzymet fikk tid til å virke. Deretter ble det tilsatt 5  $\mu$ L 6xT gel loading buffer. 12  $\mu$ L av hver prøve ble satt på en 1 % agarosegel. Gelen ble kjørt på 80 V i 45 minutter. Bildet av gelen ble tatt med Gel Doc 2000 BIO RAD.

### 10xTA buffer

Tris HCl	330 mM
NaOH	660 mM
Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	100 mM

## 2.13 Sekvensering

Til sekvensering skal mengden DNA ligge på 200-500 ng per reaksjon.

DNA templat (~300 ng)	8 $\mu$ L
5xSekvenseringsbuffer	3 $\mu$ L
BigDye 3.1(Applied Biosystems)	2 $\mu$ L
Revers M13 primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ L

Reagensene ble blandet og prøvene ble kjørt med RT-PCR med disse innstillingene:

- Denaturering ved 94 °C, 1 minutt
- 36 sykluser med:
  - Denaturering ved 94 °C i 1 minutt
  - Binding av primer til templat ved 63 °C i 2 minutter
  - Syntese av DNA ved 72 °C i 2 minutter
- Syntese av DNA ved 72 °C i 10 minutter
- Nedkjøling til 4°C, uendelig

Prøvene ble levert til sekvensering på sekvenseringslaboratoriet plan 6 MH bygget. Prøvene ble sekvensert med 3130xl Genetic Analyzer Hitachi fra Applied Biosystems.

#### 5xSekvenseringsbuffer

Tris HCl      400 mM

MgCl<sub>2</sub>        10 mM

pH justert med til pH 9,0

### 3 Resultater

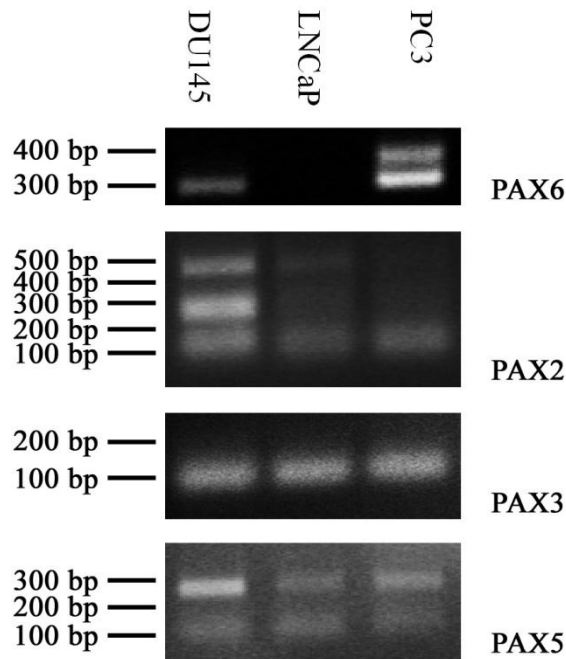
I denne masteroppgaven ble det bruk tre cellelinjer fra prostatakreft med spredning til forskjellig vev. DU145 er en cellelinje som ble isolert fra en lesjon i hjernen hos en pasient med prostatakreft og en tre år lang historie med lymfatisk leukemi. LNCaP cellene ble isolert fra lymfeknute hos en mann med påvist metastatisk prostatakreft. PC3 cellene ble isolert fra beinmetastase grad IV fra prostata adenokarsinom (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>).

#### 3.1 RT-PCR

Vi ville se på uttrykket av PAX6 i DU145, LNCaP og PC3 cellelinjene. Det var deretter interessant å se om PAX6 påvirker uttrykket av MMP-2 og MMP-9 i disse tre cellelinjene og om eventuelt også andre gener assosiert med kreft reguleres av PAX6. RT-PCR ble brukt som metode for raskt å kartlegge hvilke cellelinjer som uttrykker PAX6 og de andre genene. Generelt for alle RT-PCR resultatene er at hvert primersett er testet med cDNA laget fra minst to forskjellige passasjenummer. Det vil si at minst to RT-PCR reaksjoner er kjørt for hvert primersett. Der primersett gav sprikende resultater eller uklare bilder ble RT-PCR reaksjonene repetert (opptil fem ganger).



**Figur 5: mRNA uttrykk i DU145, LNCaP og PC3 cellelinjene vist ved hjelp av RT-PCR:** Tilnærmet likt uttrykk av "husholdningsgenet" HPRT ble detektert i cDNA fra de tre forskjellige cellelinjene før de ble brukt i RT-PCR reaksjoner. Dette ble gjort for hver nye cDNA preparering. Bildet er representativt for det vi aksepterte av nivåforskjeller i HPRT uttrykket i cDNAet før det ble brukt i andre RT-PCR reaksjoner. Posisjonen til de nærmeste DNA fragmentene i 1 Kb pluss markøren er vist til venstre for bildet.

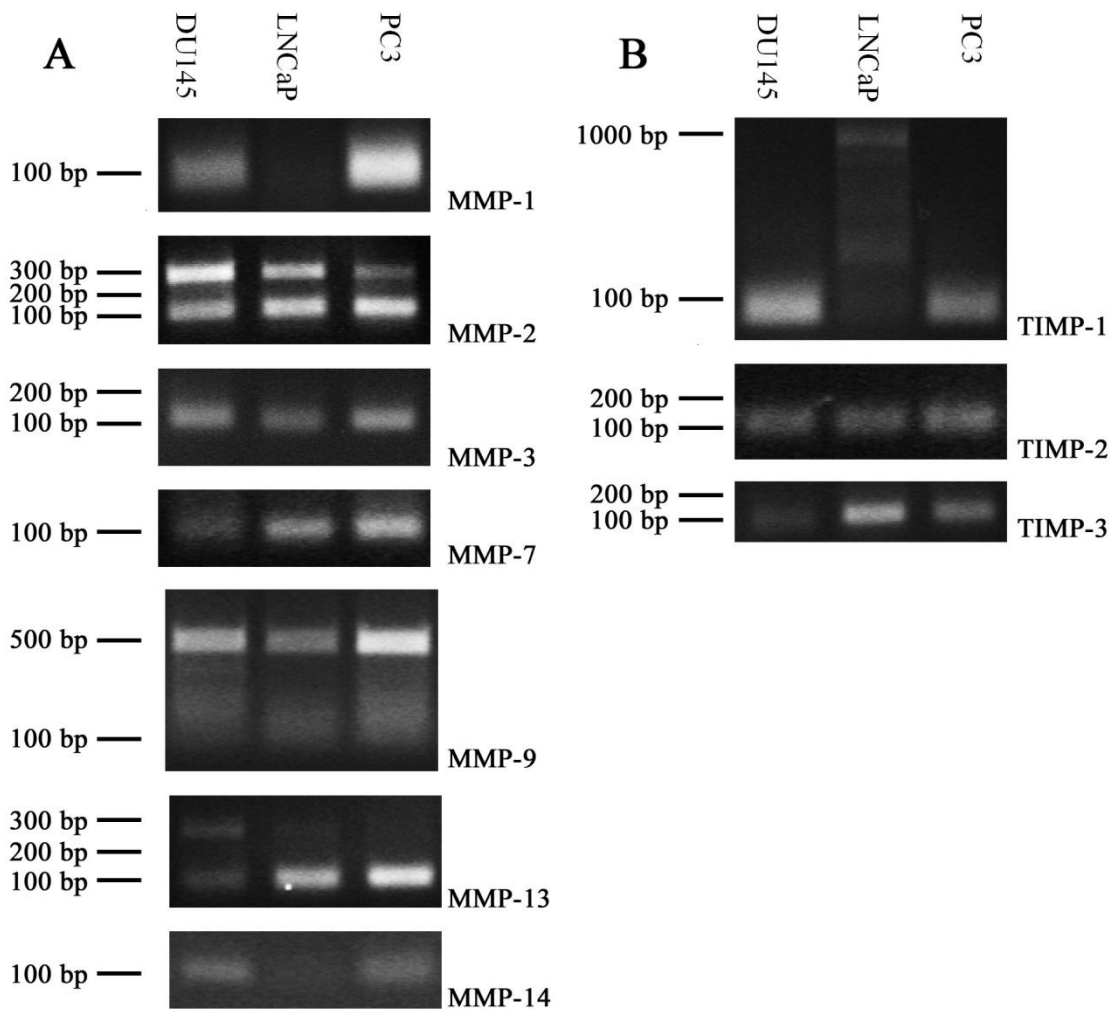


**Figur 6: mRNA uttrykk av PAX gen i DU145, LNCaP og PC3 vist ved hjelp av RT-PCR:** Flere RT-PCR prøver ble kjørt på samme agarosegel med 1 kb pluss DNA markør. Andre RT-PCR prøver kjørt på samme gel er derfor klippet bort. Posisjonen til nærmeste DNA base markør er indikert ved siden av bildet. PAX6 og PAX6(5a) isoformene i PC3 cellene er observert i samme mengdeforhold i to forsøk. PAX2 produktet på 122 bp vises i alle tre cellelinjene, men andre uspesifiserte bånd er også synlige. PAX3 produktet på 99 bp uttrykkes i alle tre cellelinjene. PAX5 uttrykkes i alle tre cellelinjene med et produkt på rundt 300 bp, men uttrykket er noe sterkere i DU145 cellene. Båndene på rundt 100 bp antas å være primerdimere.

HPRT er et husholdningsgen som ikke forventes å være regulert av PAX6. Som kontroll på at lik mengde cDNA ble brukt for hver av cellelinjene i RT-reaksjonen med de forskjellige primersettene ble nivået av HPRT ble undersøkt for hvert nye cDNA preparering. Mengde cDNA inn i RT-PCR reaksjonen ble justert ved eventuelle forskjeller. Bildet av HPRT nivået er vist som illustrasjon i figur 5.

RT-PCR primerne til PAX6 er designet slik at de også uttrykker PAX6 sin 42 bp lengre isoform PAX6(5a) dersom denne er uttrykt i cellelinjen. I figur 6 ser vi at DU145 har PAX6, mens PC3 har både PAX6 og PAX6(5a) isoformen. Vi ser at PAX6(5a) isoformen er noe svakere uttrykt enn PAX6. LNCaP har ikke uttrykk av PAX6. Forskjellen på PAX6 og PAX6(5a) produktene er så liten at for å kunne skille disse isoformene måtte gelen kjøres i to timer. PAX3 primersettet viser at nivået av PAX3 er likt i de tre cellelinjene. PAX2 og PAX5 genuttrykket følger hverandre når vi ser på hvordan genene er uttrykt i de tre cellelinjene. DU145 har høyest uttrykk av genene, mens PC3 og LNCaP har et svakere uttrykk. Flere bånd observeres for PAX2 i DU145 og det var vanskelig å si noe om hva de forskjellige båndene





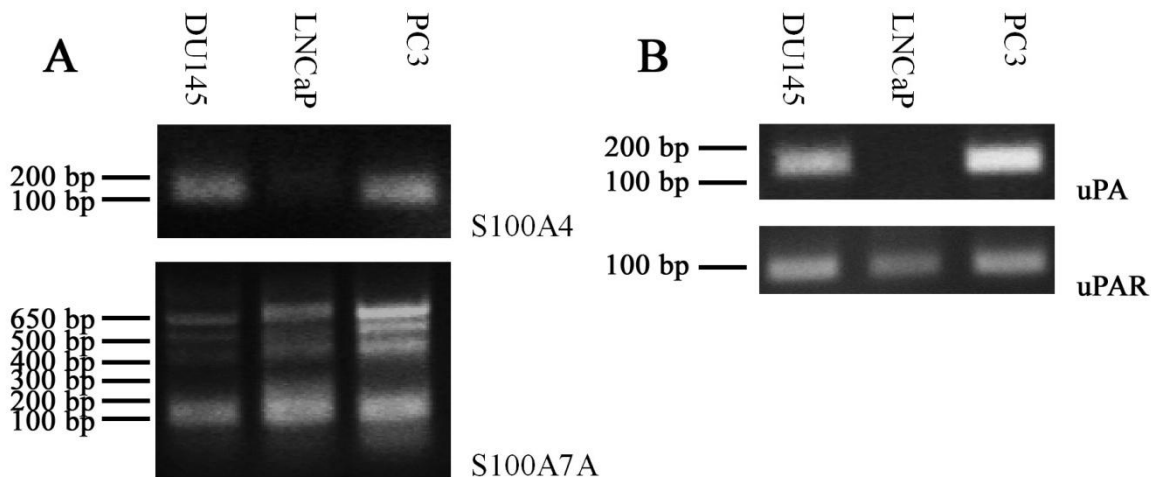
**Figur 7: mRNA uttrykk av (A) MMP og (B) TIMP gener i DU145, LNCaP og PC3 cellelinjene vist ved hjelp av RT-PCR:** (A) MMP-1, -3, -9 og -14 uttrykkes sterkere i DU145 og PC3 cellene. Båndene i MMP-2 er ikke det forventede RT-PCR produktet som skal være på 963 bp. MMP-7 og -13 er uttrykt svakt i DU145, mens PC3 og LNCaP cellene har et sterkere uttrykk av disse genene. LNCaP mangler eller har svakt uttrykk av disse MMPene. (B) TIMP-1 uttrykkes i DU145 og PC3 cellene. I LNCaP prøven er det kontaminering med genomisk DNA vi ser på 1029 bp. TIMP-2 er uttrykt i alle cellene. TIMP-3 viste sprikende resultater og RT-PCR ble derfor utført fem ganger med forskjellig cDNA. Dette resultatet har gått igjen i 3 av 5 ganger og er derfor tatt med i figuren. For alle de andre prøvene ble RT-PCR utført to til tre ganger.

kom av. Forventet produkt var for denne primeren på 228 bp og 122 bp siden primerne var lokalisert i ekson 8 og 10 og dermed i teorien kan lage et spleiseprodukt med og uten ekson 9. Det stemmer med det nederste båndet for PAX2 som vistes rundt markørens bånd på 100 bp. PAX5 produktet ser vi på rundt 300 bp, men vi ser også svake uspesifikke bånd for PAX5 på rundt 100 bp.

Figur 7A viser MMP uttrykkene i de tre cellelinjene. MMP-2 og MMP-9 er kjente målgen for PAX6 i andre cellelinjer. RT-PCR produktene for MMP-2 har en forventet størrelse på 956 bp. De to båndene vi observerer her er på rundt 300 bp og 100 bp, og har altså ikke forventet produktstørrelse. For MMP-9 følger uttrykket mønsteret vi ser for PAX6. Det er høyt uttrykk i DU145 og PC3, mens det i LNCaP cellelinjen, som mangler PAX6, ser ut til å være lavere uttrykk av MMP-9. Genuttrykket for MMP-1, MMP-3, og MMP-14 følger det samme mønsteret som for MMP-9 og RT-PCR produktene har forventet størrelse. MMP-7 og MMP-13 ser ut til å uttrykkes likt i de tre cellelinjene. Disse to MMPene har lavere uttrykk i DU145 cellelinjen, mens det er sterkere bånd i LNCaP og PC3 prøvene. Det noe høyere båndet i DU145 for MMP-13 er genomisk DNA. Primerne går over et intron på 176 bp som gir et produkt på 252 bp og dette stemmer med størrelsen på produktet vi ser. Det spesifikke RT-PCR produktet for MMP-13 er på kun 76 bp.

For å oppsummere ser det ut til at MMP-1, -3, -9 og -14 følger det samme mønster som PAX6 i de tre cellelinjene. MMP-7 og MMP-13 har et inverst uttrykksmønster av PAX2 og PAX5 i disse cellelinjene.

TIMP-3 var nedregulert av PAX6 i et genekspressjons-microarray gjort på Flpln-3T3 muse fibroblastcellelinjer med og uten PAX6 (egne data fra Ingvild Mikkola, ikke publisert). Så etter å ha kartlagt MMP uttrykket i de tre cellelinjene gikk vi over til å se på uttrykk av TIMP gener. I figur 7B ser vi uttrykket til tre TIMPgener. Det ser ut til at TIMP-2 er uttrykt likt i alle de tre cellelinjene. Uttrykket av de to andre TIMPene er derimot motsatt av hverandre. Det ser ut til at TIMP-1 er uttrykt i DU145 og PC3 cellelinjene, mens det for TIMP-3 er LNCAP som har sterkest uttrykk av genet med et svakere uttrykk i PC3 og ingenting i DU145 cellene. TIMP-1 primersettet gir et høyere bånd i LNCaP prøven. Dette er identifisert som genomisk DNA da primersettet går over et intron som vil gi et produkt på 1029 bp.



**Figur 8: mRNA uttrykk av (A) S100A4 og S100A7A, (B) uPA og uPAR genene i DU145, LNCaP og PC3 cellelinjene vist med RT-PCR:** (A) S100A4 er uttrykt i DU145 og PC3 cellene. Alle cellelinjene uttrykker S100A7A med produkt på 108 bp, men har også mange uidentifiserte bånd. (B) DU145 og PC3 cellene har uttrykt uPA, mens LNCaP mangler uttrykk av dette genet. Forsøk med uPAR primersettet ble utført fem ganger på grunn av dårlig bildekvalitet og diffuse bånd på gelen. Det er likevel samsvar i resultatene som alle ser ut til å vise at uPAR er uttrykt i alle tre cellelinjene. For alle de andre prøvene ble RT-PCR utført to til tre ganger.

S100A7A og uPA ble vist å være oppregulert av PAX6 i microarrayet på Flpln-3T3 cellene. S100 proteiner og uPA er assosiert med ECM og kreft og er derfor relevante for dette studiet. I figur 8A ser vi at S100A4 følger samme mønster som PAX6. Vi ser ikke S100A4 i LNCaP cellelinjen, mens DU145 og PC3 uttrykker S100A4. S100A7A primerne ga fire bånd på gelen. Det nederste båndet er på rundt 100 bp og stemmer over ens med den forventede produktstørrelsen på 108 bp. Siden de andre båndene så ut til å variere i uttrykk mellom cellelinjene spekulerer vi på om de kunne være isoformer av S100A7A. RT-PCR produkt fra dette primersettet ble derfor klonet og sekvensert (se beskrivelse og resultater senere).

I figur 8B ser vi uttrykket av uPA og uPAR i DU145, LNCaP og PC3 cellene. Størrelsen på båndene sammenfaller med forventet størrelse og vi kan fastslå at det er riktig produkt vi observerer. Uttrykket for uPA ser ut til å følge samme mønster som PAX6, mens uPAR er uttrykt i alle tre cellelinjene, men kanskje noe svakere i LNCaP cellene.

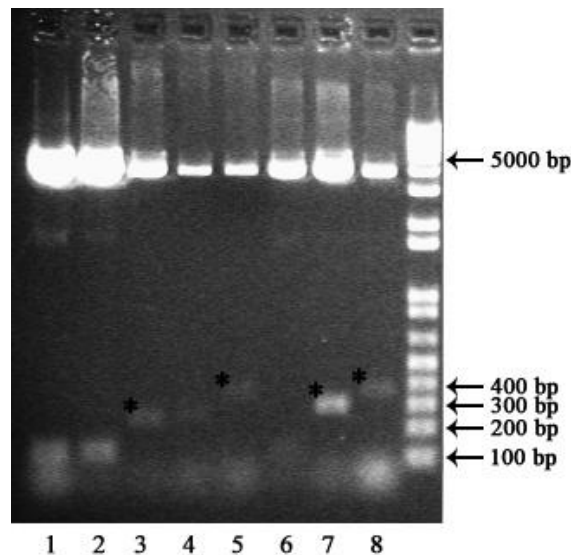
For å oppsummere resultatene etter RT-PCR ser det ut til at disse genene følger samme uttrykksmønster som PAX6: MMP-1, -3, -9, -14, TIMP-1, S100A4 og uPA har uttrykk i DU145 og PC3 cellelinjene og svakere eller helt fravær av uttrekk i LNCaP cellene. TIMP-3

har motsatt uttrykk av PAX6, og uttrykkes best i LNCaP cellene, noe som støtter resultatet fra microarrayet.

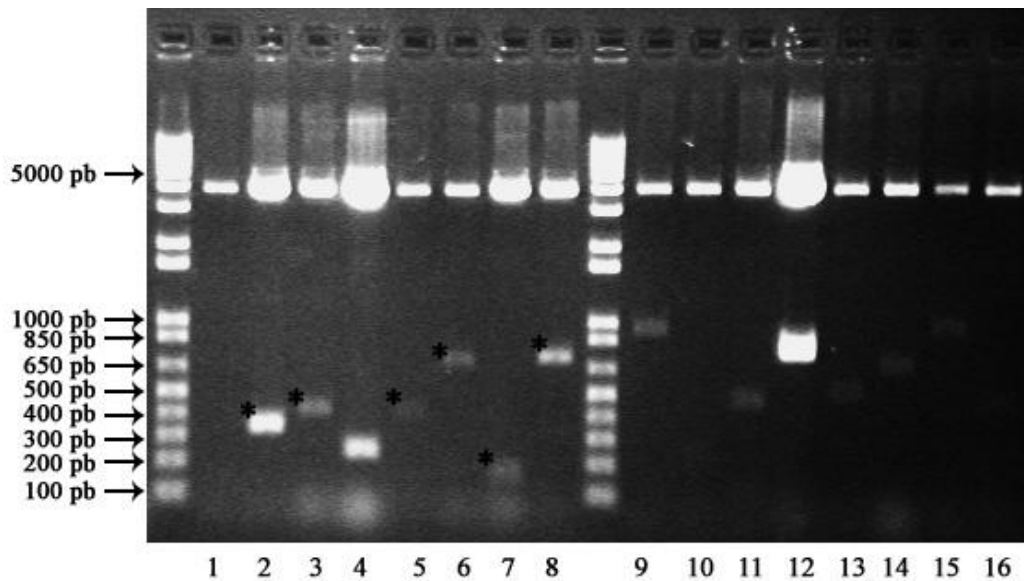
### 3.2 Sekvensering

Det ble observert flere bånd enn forventet etter gelelektroforese av RT-PCR produkt fra PAX2 og S100A7A primersettene. Fordi det var så mange bånd var det interessant å se om dette var isoformer potensielt regulert av PAX6. For å identifisere båndene ble RT-PCR produktene klonet i en TOPO-TA vektor og transformert til kompetente DH5 $\alpha$  bakterier. Det ble brukt RT-PCR produkt fra DU145 cDNA for kloning av båndene observert med PAX2 primersettet og PC3 cDNA for kloning RT-PCR produkt fra S100A7A primersettet. Disse to cellelinjene ble brukt fordi det var disse cellelinjene som uttrykte flest bånd med de aktuelle primersettene.

Forskjellige bakteriekolonier ble plukket og plasmid DNA ble renset, kuttet og kjørt på gel. Plasmidene vises på gelen som bånd på litt under 5000bp. Båndene som har en størrelse mellom 100 bp og 1000 bp er de klonede RP-PCR produktene. Noen aktuelle bånd for hvert primersett ble plukket ut og sekvensert.



**Figur 9: Kloning av RT-PCR produkter fra PX2 primersett:** RT-PCR produkter fra PAX2 primersettet klonet i plasmid, renset, kuttet og kjørt på 1 % agarosegel i 45 minutter. Størrelsen på DNA fragmentene i 1 kb pluss DNA markøren er markert på høyere side. DNA fragmentene som ble sekvensert er markert med stjerne.



**Figur 10: Kloning av RT-PCR produkter fra S100A7A primersett:** RT-PCR produkter fra S100A7A primersettet klonet i plasmid, renset, kuttet og kjørt på 1 % agarosegel i 45 minutter. Størrelsen på 1 kb pluss markøren er markert på venstre side. DNA fragmentene som ble sekvensert er markert med stjerne.

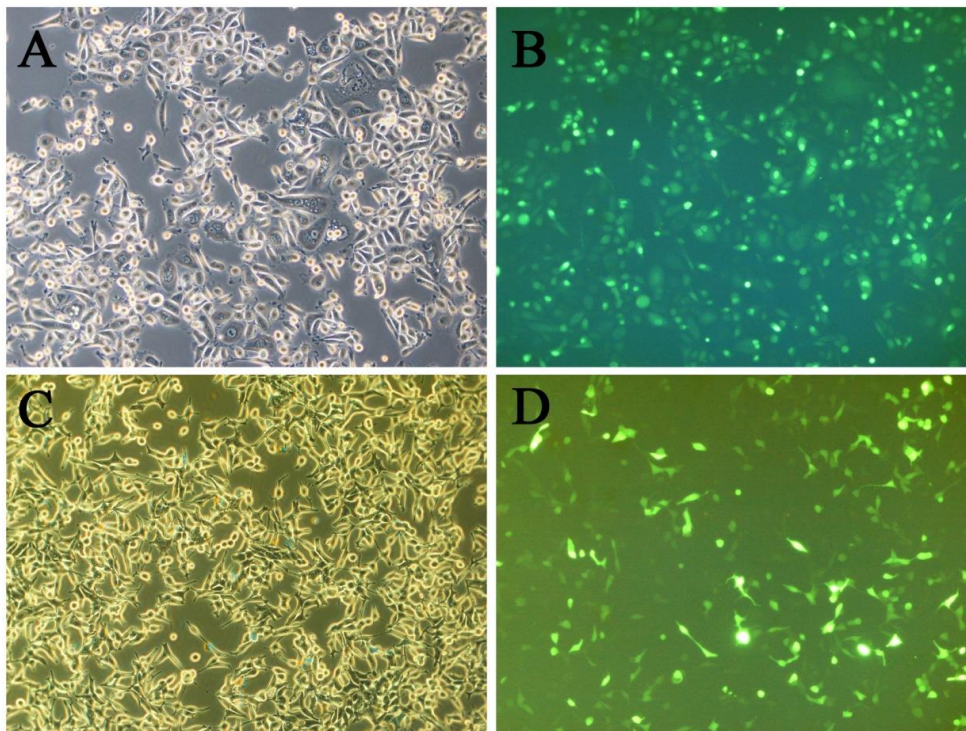
Båndene 3, 5, 7 og 8 ble sekvensert for PAX2. Sekvensene ble blastet mot genomsekvensen i Ensemble. For prøve 5, 7, og 8 fikk vi ingen treff. Disse båndene er dermed uspesifikke produkter, mens for bånd 3 fant vi treff og båndet er identifisert som PAX2. Dette stemmer med det forventede PAX2 produktet på 228 bp. Bånd 1 og 2 kan stemme med størrelsen på det andre PAX2 produktet på 122 bp, men disse to båndene ble ikke sekvensert så det blir bare spekulasjoner.

I figur 10 ser vi de klonede båndene fra S100A7A primersettet. Båndene 2, 3, 5, 6, 7 og 8 fra S100A7A ble sekvensert ble og blastet mot genomsekvensen i Ensemble. Det ble funnet treff for ett av båndene. Dette båndet ble identifisert som genet PRKAAI på kromosom fem. Dette produktet har ingen sammenheng med S100A7A. S100A7A primersettet ble bestilt fra QIAGEN. Funnene viser at primersettet ikke er optimale for å identifisere dette genet og de mange båndene gjør at primerne ikke kan brukes i Q-PCR. Vi ser her ingen produkter på rundt 100 bp som kunne vært det forventede produktet til S100A7A primersettet. Dette kan skyldes at vi ikke plukket bakteriekolonier som inneholdt dette produktet og trenger nødvendigvis ikke å bety at ikke primersettet gjenkjenner S100A7A, men siden disse primerne gir så mange uspesifikke bånd er de ubrukelige, og ny primere bør bestilles.

### 3.3 Transfeksjon av PC3 og LNCaP celler for å slå ut eller tilføre PAX6 genekspresjon

At gener har samme uttrykksmønster som PAX6 behøver ikke å bety at de er regulert av PAX6. For å se på om de potensielle målgenene reguleres av PAX6 og at forskjellene ikke skyldes andre egenskaper i cellelinjene, ble PAX6-protein uttrykksvektor transfektert inn i LNCaP cellene, mens PAX6 siRNA ble transfektert inn i PC3 cellene. Figur 11 illustrer transfeksjonseffektiviteten ved transfeksjon med siRNA og plasmidvektor.

Transfeksjonseffektiviteten med siRNA i PC3 cellene var på rundt 90 % (figur 11 A og B). Ved transfeksjon av PAX6 plasmid i LNCaP cellene ble det i første forsøk observert en effektivitet på rundt 30 %, noe som vi ønsket å forbedre. Ved dobbeltransfeksjon ble effektiviteten til transfeksjonen økt til nærmere 70 % (figur 11 C og D). De transfekterte cellene ble høstet og Q-PCR ble brukt til å analysere endring i genuttrykket, mens Western blott ble brukt for å se på eventuelt endret proteinuttrykk i cellene med endret PAX6 genuttrykk.



**Figur 11: Transfeksjon av PC3 og LNCaP celler (Bilder tatt 48 timer etter transfeksjon med 10xobjektiv):** Bilde (A) viser PC3 celler transfektert med scr siRNA i hvitt lys. (B) Bildet viser de samme cellene tatt med lys av en følgelengde som synliggjør grønt fluoriserende protein. Bilde (C) viser LNCaP celler transfektert med pCi-PAX6 i hvitt lys. (D) Bildet viser de samme cellene med lys av en bølgelengde som synliggjør grønt fluoriserende protein.

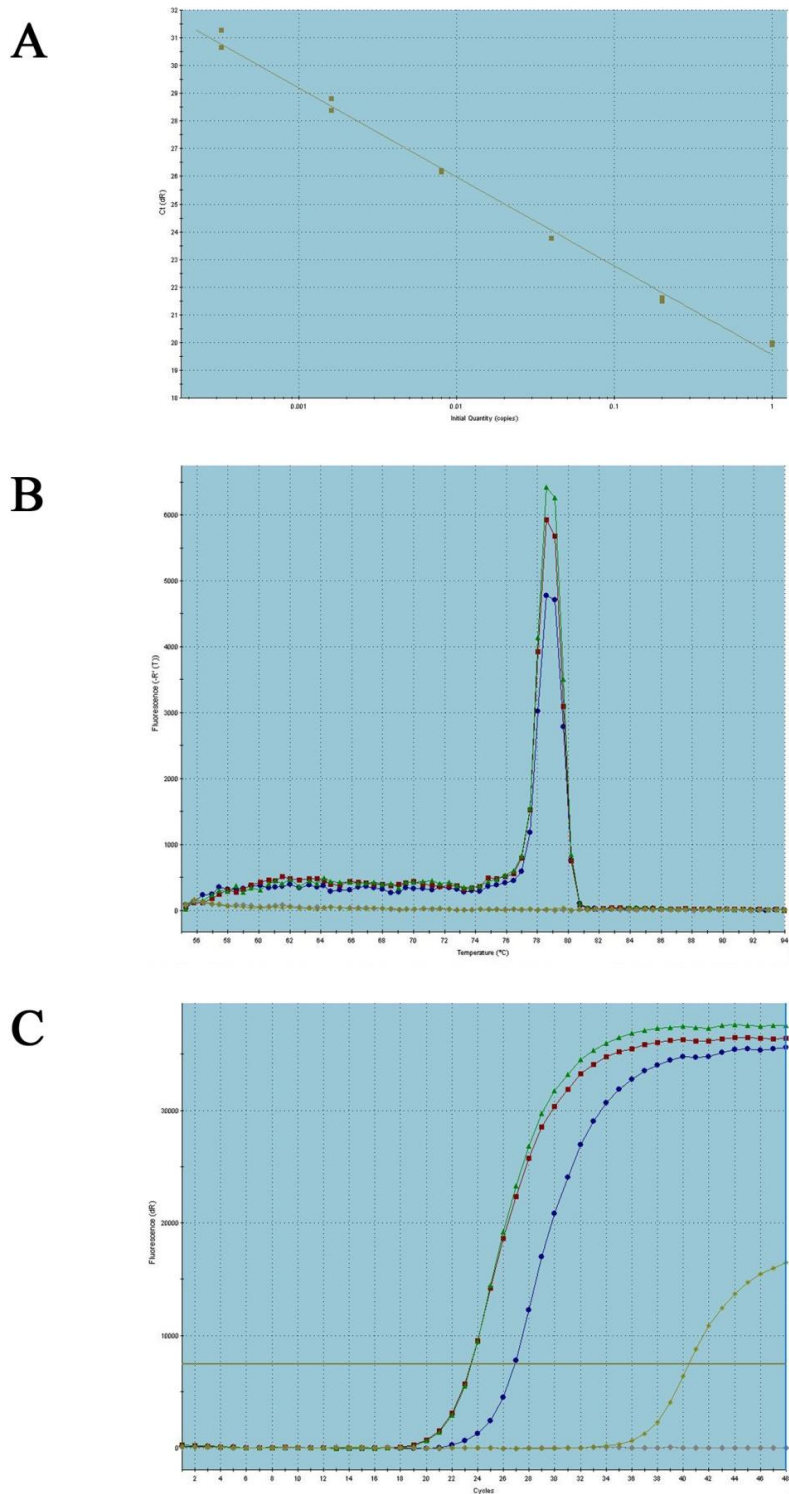
### 3.4 Q-PCR

RT-PCR resultatene ble brukt for å bestemme hvilke primersett som skulle testes videre med Q-PCR. Primersettene som ble valgt ut var MMP-2, -9 og -14, TIMP-3, S100A4 og uPA. MMP-2 og MMP-9 ble valgt fordi disse er tidligere vist å være regulert av PAX6 i andre cellelinjer og vev. MMP-14 ble valgt fordi vi ønsket å inkludere én av de andre MMPene. TIMP-3, S100A4 og uPA ble testet på Q-PCR etter lovende resultater med RT-PCR og fordi TIMP-3 og uPA er henholdsvis nedregulert og oppregulert av PAX6 i microarray gjort på Flpn-3T3 cellelinjen.

Det første man var nødt til å gjøre, var å optimalisere primersettene for Q-PCR.

For å kunne bruke primersettene i Q-PCR må man vite hvor effektive de er. Effektiviteten til primersettene ble bestemt ved å kjøre standardkurver på Q-PCR med seks fortynningsrekker der cDNA var fortynnet 1:5. Primersettene det ble laget standardkurver for var HPRT(n) og MMP-14. For de andre primersettene hadde andre på laboratoriet allerede laget standardkurver. Disse resultatene ble brukt i min oppgave da det ikke er grunn til å tro at effektiviteten til disse primersettene skulle endre seg signifikant når preparasjon av prøvene ble utført med samme metode. Effektiviteten til primerne skal ligge mellom 90-110 % for å kunne benyttes i Q-PCR. Alle primersettene var innen for disse grensene. Fordi det ikke er gjort tilstrekkelig mange forsøk til å kunne fastslå eksakt primereffektivitet bruker vi i denne oppgaven 100 % når vi regner ut resultatene for oppgaven.

Det ble kjørt smeltekurver for hvert primersett for å se om det var kun ett produkt, eller eventuelle isoformer og primerdimerer. Fordi Sybergreen detekterer fluorescens av alt dobbeltrådet DNA er denne kontrollen svært viktig.



**Figur 12: Kontroller gjort ved starten av Q-PCR:** (A) Standardkurve med seks 1:5 forfynninger ved optimalisering av HPRT primersettet. Grafen viser fluoresens mot antall sykluser. (B) Dissosiasjonskurven av HPRT primersettet etter endt smeltekurve gav kun en topp noe som betyr at vi har ett produkt. Grafen viser fluorescens mot temperatur. (C) Amplifisering av produkt med PAX6 primersettet. NORT kontrollen kommer opp 14 Ct verdier etter siste prøve, og vil dermed ikke forstyrre prøveresultatene i signifikant grad. Grafen viser fluoresens mot antall sykluser. Linjen som går tvers over figuren markerer threshold. Ct verdiene blir gitt ut av det punktet det fluorescenskurven krysser denne linjen.



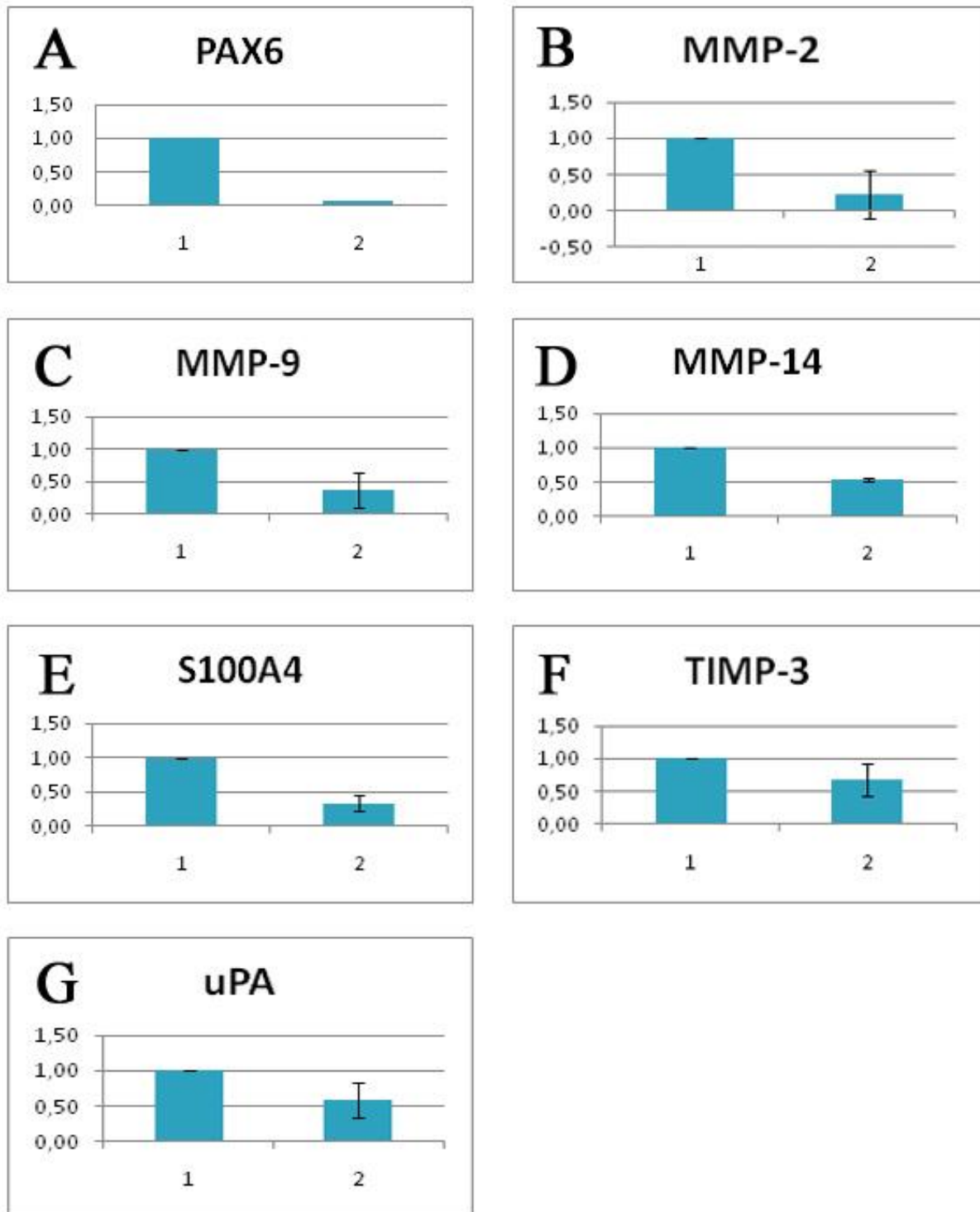
Alle prøver ble også vurdert mot de to kontrollene som var uten reverstranskriptase enzymet (NORT) og uten templat (NTC). Dersom NORT og NTC kontrollene var nærmere prøvene enn 10 Ct verdier ble resultatene vurdert som ikke valide fordi bidraget fra forurensningene ville ha påvirket prøvene signifikant. I figur 12C ser vi et eksempel på at NORT kontrollen har kommet opp mer enn 10Ct verdier etter de aktuelle prøvene og utgjør derfor ikke en signifikant forskjell for prøveresultatene.

Variasjonen mellom de to duplikatene skal være så like som mulig og bør ikke overstige 1 Ct verdi. Der dette har skjedd er det kommentert spesielt. Gjennomsnittsverdien for de to duplikatene ble brukt i beregningene av resultatene. Vi normaliserte prøvene etter HPRT nivået i cellene og sammenlignet deretter alle prøvene mot kontrollen som var enten scr siRNA eller pCi-neo behandlede celler. Forholdet mellom disse prøvene ble beregnet ved hjelp av en formel kalt delta delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) som er en viktig formel for beregninger av resultater fra Q-PCR (Livak and Schmittgen, 2001). Dersom det ikke er forskjell på de to prøvene vil forholdet mellom disse bli 1. I formelen representerer tallet 2 en dobling av produkt for hver syklus og dermed en primereffektivitet på 100 %.

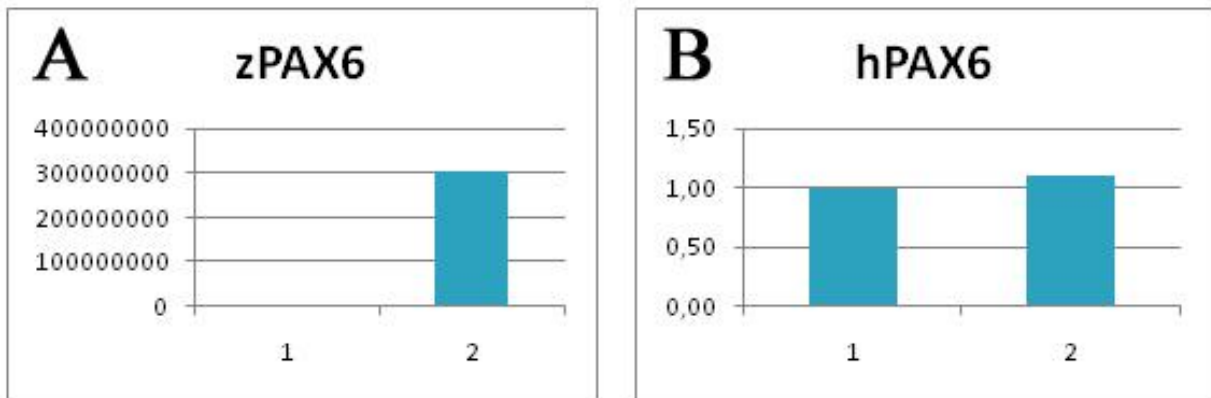
$$\frac{PAX6\ siRNA}{SCR\ siRNA} = \frac{2^{(Ct\ HPRT\ PAX\ 6\ siRNA - Ct\ pr\ øve\ PAX\ 6\ siRNA)}}{2^{(Ct\ HPRT\ SCR\ siRNA - Ct\ pr\ øve\ SCR\ siRNA)}} \quad \text{formel 1}$$

$$\frac{pCi-PAX6}{pCi-neo} = \frac{2^{(Ct\ HPRT\ pCi-PAX\ 6 - Ct\ pr\ øve\ pCi-PAX\ 6)}}{2^{(Ct\ HPRT\ pCi-neo - Ct\ pr\ øve\ pCi-neo)}} \quad \text{formel 2}$$

Etter optimaliseringen av primersettene ble det kjørt Q-PCR med cDNA fra to forskjellige passasje nummer med transfekterte PC3 celler og to forskjellige passasje nummer med transfekterte LNCaP celler.



**Figur 13: PAX6 genuttrykket i PC3 celler slås effektivt ned av PAX6 siRNA, og uttrykket av alle de testede genene blir også nedregulert:** (A) PAX6 uttrykket slått ned ved transfeksjon (B) MMP-2 uttrykket er redusert i celler uten PAX6 (C) MMP-9 uttrykket er redusert i celler uten PAX6 (D) MMP-14 uttrykket er redusert i celler uten PAX6 (E) S100A4 uttrykket er redusert i celler uten PAX6 (F) TIMP-3 uttrykket er redusert i celler uten PAX6 (G) uPA uttrykket er redusert i celler uten PAX6. Resultatene er et gjennomsnitt av 2 forsøk, og viser fold nedregulering. (1) Forholdet mellom celler transfektert med PAX6 siRNA og scr siRNA dersom det ikke hadde vært noen forskjell mellom prøvene er satt til 1. (2) Forholdet mellom PC3 celler transfektert med PAX6 siRNA og scr siRNA i våre prøver. Beregningene er gjort ved hjelp av formel 1.



**Figur 14: PAX6 genuttrykket i LNCaP celler transfektert inn i cellene med pCi-PAX6 plasmid:** (A) Sebrafisk PAX6 primersettet ble brukt for å vise nivået av PAX6 mRNA som stammer fra det transfekterte plasmidet. (B) endogent PAX6 ble påvist av PAX6 primere mot humant PAX6. Uttrykket er i liten grad påvirket av sebrafisk PAX6 plasmidet. (1) Forholdet mellom celler transfekterte celler dersom det ikke hadde vært noen forskjell mellom prøvene er satt til 1. (2) Forholdet mellom celler transfektert i våre prøver. Beregningene er gjort ved hjelp av formel 2.

Figur 13A viser at PAX6 uttrykket er slått kraftig ned i begge forsøkene. Når vi ser på resultatene fra de andre primersettene, ser vi at det er en generell tendens til at det er lavere uttrykk av genet i de cellene hvor PAX6 uttrykket er slått ut.

Ct-verdien til MMP-2 (figur 13B) kom generelt opp tidligst etter 32 sykluser og for halvparten av prøvene ble det ikke observert noen Ct-verdi. Dette kan skyldes at det er få molekyler av MMP-2 som gjør at det er tilfeldig om disse kommer med i reaksjonen eller ikke. Dette er noe av årsaken til det store standardavviket. Ct-verdien i disse prøvene hadde også avvik på mer enn 1 Ct-verdi mellom hvert duplikat. Flere prøver for MMP-2 burde derfor blitt kjørt med mindre fortykning av cDNAet. Likevel, dersom vi ser bort ifra dette ser vi en trend der mengden MMP-2 er redusert i cellene der PAX6 uttrykket er redusert.

For MMP-9 ble det i et av forsøkene observert at et sett duplikater varierte med 1,03 Ct-verdi, noe som også her kan forklare det store standardavviket. Vi valgte likevel å ta prøven med i beregningene. Uttrykket av MMP-9 er lavere i cellene transfektert med PAX6 siRNA.

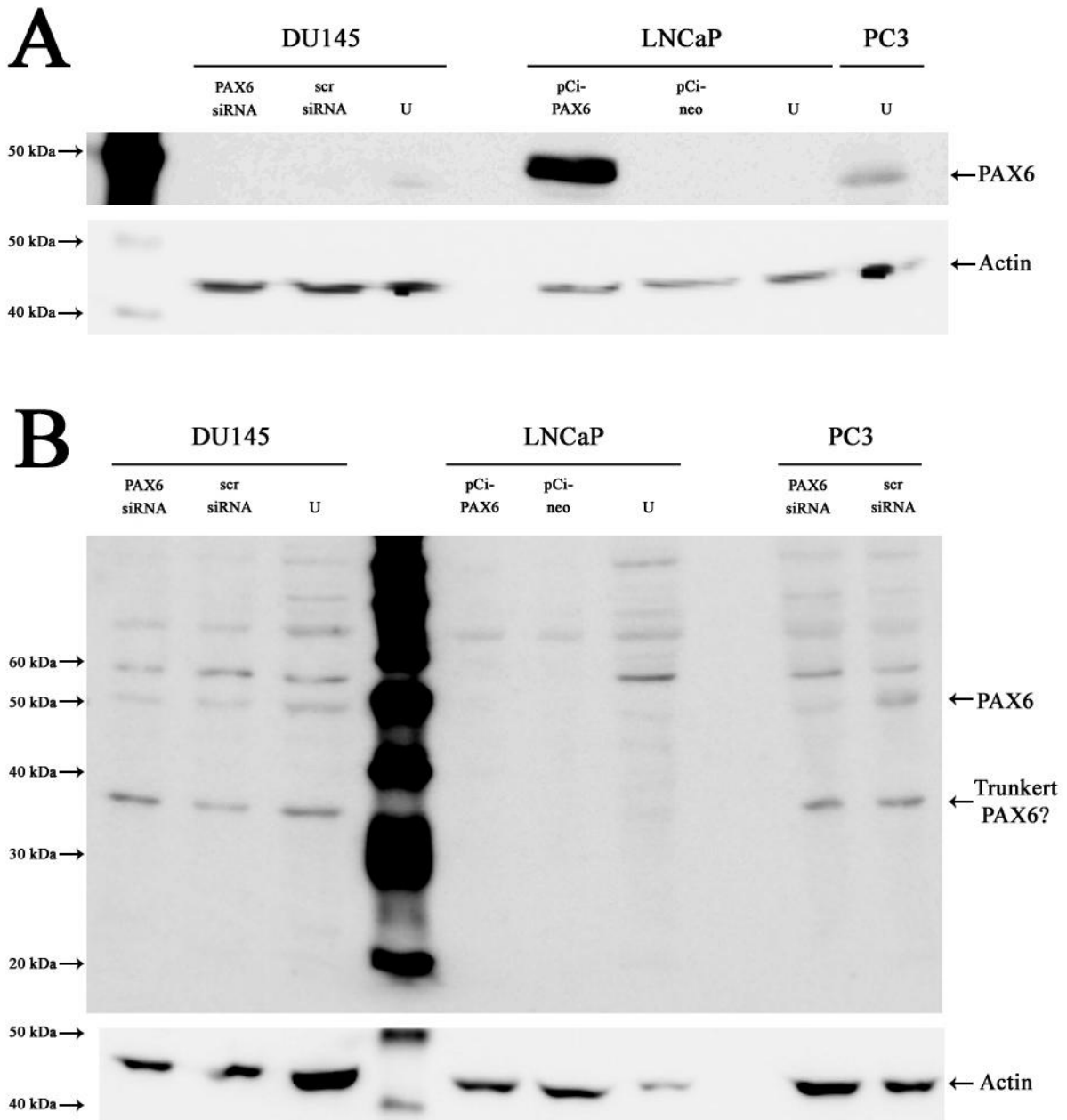
I figur 13F forventet vi å se en oppregulering av TIMP-3, men også her er det en trend som viser av uttrykket av TIMP-3 er redusert i cellene transfektert med PAX6 siRNA. I et av forsøkene var likevel forskjellen ikke så stor mellom PAX6 siRNA og src siRNA prøvene og dette har gitt det store standardavviket.

Da cDNA fra transfekterte LNCaP celler ble kjørt med Q-PCR, ble det sprikende resultater og NTC og NORT kontrollene hadde Ct verdier i samme område for mer eller mindre alle prøvene. For prøvene med zPax6 var det likevel mulig å se resultatene. I figur 13 kan man se at vi har klart å transfektere inn store mengder PAX6 ved hjelp av transfeksjon med plasmid DNA. Dette er genet for PAX6 fra sebrafisk og det gjør det mulig å detektere PAX6 mRNA transfektert fra plasmidet ved hjelp av primere for sebrafisk PAX6. Siden det er kjent at PAX6 kan autoregulere sitte eget uttrykk ville vi undersøke om det var mulig å se om PAX6 plasmidet aktiverte cellens eget uttrykk av PAX6. Det ble derfor også kjørt Q-PCR med human PAX6 primersett en gang. Dette gav ingen lovende resultater (kun 1,1 i fold økning) og det ser ikke ut til at PAX6 uttrykt med plasmidet aktiverer LNCaP cellens eget PAX6 uttrykk.

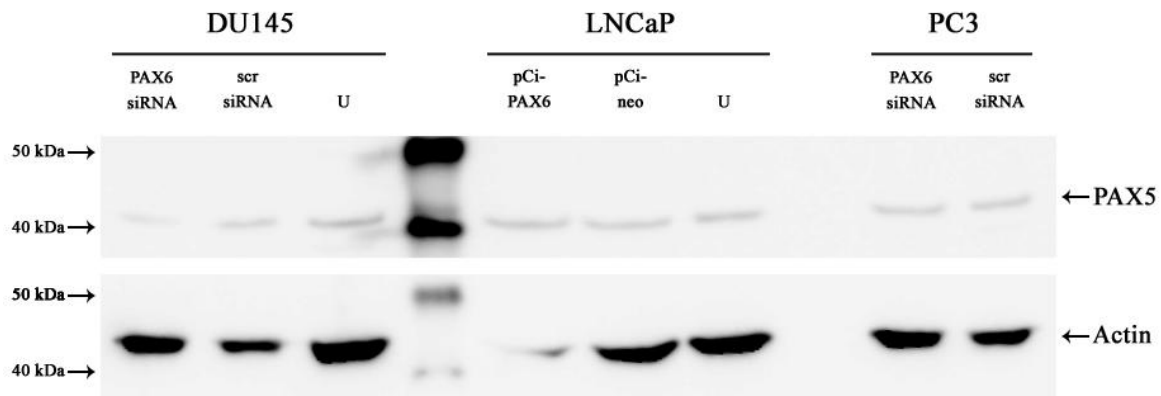
### **3.5 Western blott**

Resultatene fra RT-PCR og Q-PCR er på mRNA nivå. Vi ville se om disse resultatene også kunne observeres på proteinnivå. Det ble derfor kjørt Western blott. Alle Western blottene ble utført med to forskjellige passasjenummer, altså hvert blott ble utført minst to ganger for hvert antistoff. Det ble kjørt Western blott for PAX2 (PRB-276P, BioSite), MMP-2 (E3654, Panomics) og S100A4 (ab27957, abcam), men disse blottene gav ingen resultater.

I figur 15A ser vi uttrykket av PAX6 proteiner i de tre cellelinjene. Som forventet ser vi uttrykk av PAX6 i pCi-PAX6 transfekterte LNCaP cellene med et antistoff rettet mot C-terminalen til PAX6. Det er ikke uttrykk av PAX6 proteiner i de andre to LNCaP prøvene og dette er som forventet etter RT-PCR. For de utransfektete PC3 cellene ser vi også PAX6 protein og dette stemmer med det vi fant på mRNA nivå i denne cellelinjen. For DU145 var det vanskelig å få resultater. Det ble laget ni blott med transfektete og utransfektete DU145 proteinprøver, men uten at vi fant PAX6 proteinuttrykk. Blottet vist i figur 15A er det eneste der vi fikk en svak skygge der PAX6 skal være uttrykt. Ifølge RT-PCR resultatene skal DU145 uttrykke PAX6 genet. Vi forventet også et PAX6 bånd for DU145 celler transfektert



**Figur 15: Uttrykk av PAX6 protein i transfekterte DU145, LNCaP og PC3 celler:** (A) PAX6 antistoff rettet mot C-terminus av PAX6 proteinet. PAX6 proteiner (48 kDa) observeres for utransfekterte DU145 celler, pCi-PAX6 transfekterte LNCaP celler og utransfekterte PC3 celler. Mengden actin er tilnærmet den samme i alle prøvene og viser at vi har like mye proteiner i alle brønnene. (B) PAX6 antistoff rettet mot N-terminus (paired domenet) av PAX6 proteinet viser en trunkert utgave av PAX6 som inneholder paired domenet i alle DU145 og PC3 cellene. Hele PAX6 proteinet kan sees og observeres for alle DU145 cellene og de scr siRNA transfekterte PC3 cellene. Bildet av actin for denne membranen viser at det er tilnærmet lik mengde proteiner i alle prøvene, med unntak for utransfekterte LNCaP celler. Membranene er kuttet slik at alle bånd er vist på bildet. U=utransfektert.



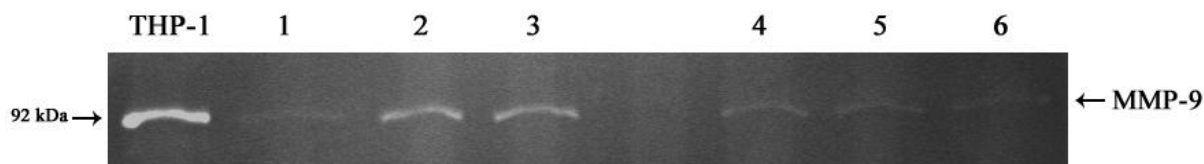
**Figur 16: Proteinuttrykk av PAX5 i transfekterte og utransfekterte DU145, LNCaP og PC3 celler vist med Western blott:** PAX5 proteiner er til stede i alle tre cellelinjene og viser ingen påvirkning av PAX6 uttrykk. Mengden actin i cellene ser ut til å være tilnærmet den samme med unntak for pCi-PAX6 transfekterte LNCaP celler. Det ser ut til at dette kan skyldes en boble i plasten da bildet ble tatt og ikke en reell forskjell i mengden proteiner. Membranene er kuttet slik at alle bånd er vist på bildet. U=utransfektert

med uspesifikt siRNA, men dette ble ikke observert. For å prøve å finne årsaken til dette ble det laget nye blott med et annet PAX6 antistoff rettet mot aminosyre 1-206 i N-terminus som er paired domenet (figur15 B). Produsenten oppgir et mønster for PAX6 som er likt det vi ser i DU145 og PC3 cellene. Det er mange uspesifikke bånd på membranen, men vi ser tydelige bånd rundt markøren på 50 kDa. PAX6 proteinet har en molekylvekt på 48 kDa og det er dette båndet vi ser. Vi observerer også bånd på noe over 30 kDa. Dette kan være en trunkert versjon av PAX6 proteinet som inneholder paired domenet.

PAX5 ble observert uttrykt med RT-PCR. På proteinnivå ble det observert PAX5 i alle tre cellelinjene og det ser ikke ut til at uttrykket er påvirket av transfeksjonen med PAX6 (Figur 16). Størrelsen på PAX5 proteinet er på 42 kDa og stemmer med båndene vi ser på membranen.

### 3.6 Zymografi

MMPene er enzymer som bryter ned ECM komponenter. Denne egenskapen trenger cellene for å kunne innvandre og migrere. Vi ønsket derfor å undersøke enzymaktiviteten i PC3 og LNCaP cellene. For å se på aktiviteten til MMP-2 og MMP-9 valgte vi å gjøre kjøre zymografi. Disse to MMPene er gelatinaser som har evnen til å bryte ned gelatin. Vi brukte derfor gelatin som substrat da vi kjørte zymografi.



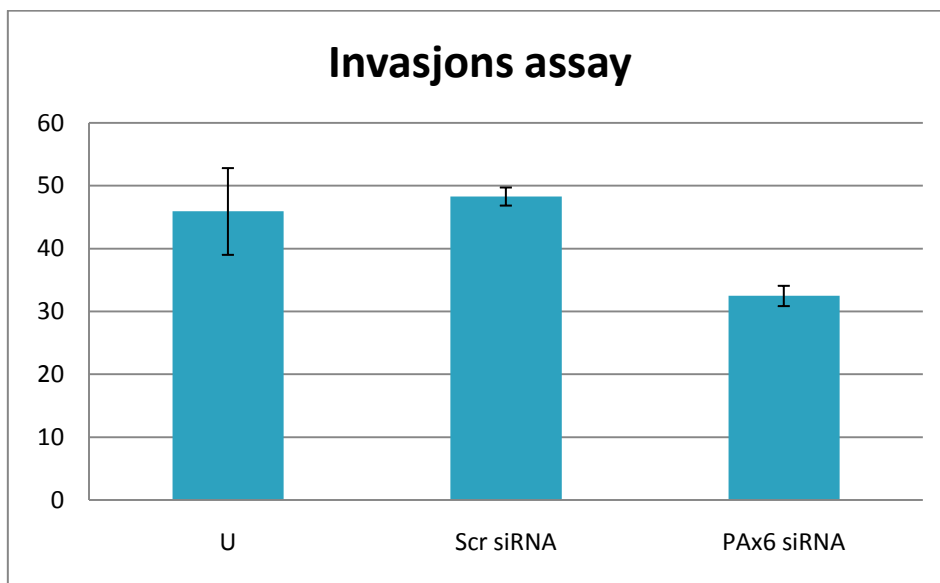
**Figur 17: Zymografi som vi ser viste MMP-9 aktiviteten i PC3 celler transfektert med PAX6 siRNA. Scrambled siRNA transfeksjon ble brukt som kontroll:** MMP-9 enzymaktivitet i transfekterte PC3 celler viser høyere uttrykt av MMP-9 i celler transfektert med PAX6 siRNA i forhold til celler transfektert med uspesifikt scr siRNA. THP-1 er en kontroll for MMP-9 enzymet. Prøve 1, 2 og 3 er celler transfektert med PAX6 siRNA. Prøve 4, 5 og 6 er transfektert med scr siRNA.

Det var i utgangspunktet planlagt å gjøre zymografi med både transfekterte PC3 og LNCaP celler, men fordi LNCaP cellene i så stor grad døde etter transfeksjon, og cellemediet ble fylt med celler, ville det blitt vanskelig å beregne celleantallet for å kunne sammenligne resultatene. Det ble derfor ikke utført zymografi med denne cellelinjen.

Det ble høstet enzymer fra transfekterte PC3 celler til zymografi én gang. Det ble gjort to forsøk med samme høsting av enzymene og resultatene viste det samme. Vi ser i figur 17 ved hjelp av kontrollen THP-1 at MMP-9 er aktiv i cellene. Det er høyere aktivitet av MMP-9 enzymet i cellene transfektert med PAX6 siRNA, mens det er lavere aktivitet i cellene som ble transfektert med uspesifikt siRNA. Dette er motsatt av det vi forventet. Mengde celler ble grovt estimert til å være ca dobbelt så mange i brønnene med PAX6 siRNA i forhold til brønnene med scr siRNA, resultatet kan derfor skyldes flere celler som produserer MMP-9. Det ble ikke observert aktivitet av MMP-2 på zymografi gelen. Forsøket bør gjentas.

### 3.7 Cellemigrasjonsassay

Vi ville se om PAX6 har innvirkning på cellens evne til å invadere nytt vev. Det ble derfor gjort et cellemigrasjonsassay. Forsøket ble utført 48 timer etter transfeksjon med PC3 celler transfektert med siRNA. Assayet viser at i brønnene der PAX6 uttrykket er slått ned har færre celler gått gjennom matrigelen enn i brønnene med PAX6 i cellene. I den ene brønnen med celler transfektert med PAX6 siRNA var det gått hull på matrigelen. Det ser ikke ut til at dette har påvirket resultatene fordi resultatene fra de to brønnene med celler transfektert med PAX6 siRNA svært like.



**Figur 18: Invasjonsassay av transfekterte PC3 celler viser at celler transfektert med PAX6 siRNA har mindre evne til å trenge gjennom membranen:** Diagrammet viser at uttransfektete celler, og celler transfektert med uspesifikt scr siRNA har større evnet til å trenge gjennom matrigelen enn cellene der PAX6 uttrykket var slått ned. Diagrammet viser relativt fluoresiserende enheter (RFU) i prøvene. U=uttransfektet.



## 4 Diskusjon

Resultatene i denne oppgaven er kort oppsummert i disse punktene:

- PAX6 og PAX6(5a) uttrykkes i PC3 cellene mens PAX6 uttrykket mangler i LNCaP cellene. DU145 cellene uttrykker PAX6 på mRNA nivå med primere rettet mot paired domenet, men man ser ikke uttrykk av fullengde PAX6 protein.
- PAX6 ser ut til å nedregulere MMP-9 uttrykket i PC3 cellene på mRNA nivå.
- MMP-1, -3, -9, -14, TIMP-1, S100A4 og uPA følger samme uttrykksmønster som PAX6 ved at de uttrykkes i DU145 og PC3 cellene mens de mangler eller har redusert uttrykk i LNCaP cellene. TIMP-3 har motsatt uttrykk av PAX6 og uttrykkes best i LNCaP cellene.
- Ved manipulering av PAX6 uttrykket i PC3 celler med PAX6 siRNA vises det en trend der MMP-2, -9 og -14, TIMP-3, S100A4 og uPA blir nedregulert.
- Ved nedregulering av PAX6 uttrykket ble PC3 cellene blir de mindre invasive.

Resultatene vil her bli diskutert videre.

Vi observerte uttrykk av PAX6 mRNA i to av cellelinjene, DU145 og PC3, mens den siste cellelinjen, LNCaP, mangler genuttrykk av PAX6. Dette ble vist ved hjelp av RT-PCR. RT-PCR resultatene viser at DU145 cellene kun uttrykker PAX6 isoformen, mens PC3 cellene uttrykker både PAX6 og PAX(5a) isoformene. Uttrykket i cellene og ratioen mellom disse to isoformene er studert i andre kreftcellelinjer tidligere. Der ble det vist at forholdet mellom PAX6 og PAX6(5a) holder seg stabilt med et høyere uttrykk av PAX6 enn PAX6(5a) også ved påvirkning av eksogent PAX6(5a). Dersom PAX6(5a) blir tilført cellen, aktiveres produksjonen av PAX6 slik at forholdet mellom disse ikke endres (Pinson et al., 2006). RT-PCR resultatene viser ved flere forsøk at PAX6 er sterkere uttrykt enn PAX6(5a) i PC3 cellene. Og dette bekrefter dermed våre resultater. Primersettet som ble bruk til RT-PCR gjenkjenner begge isoformene fordi bindingen av primerne skjer i ekson 5 og 6 og vil dermed ta opp begge isoformene med og uten ekson 5a dersom de er tilstede. For å detektere forskjellene måtte RT-PCR produktene separeres ved hjelp av gelelektroforese. Forholdet mellom disse to isoformene kan bare studeres på Q-PCR dersom det lages separate primersett som skiller disse to isoformene. Det ble ikke gjort i denne oppgaven. Uttrykk av PAX6 er

tidligere beskrevet i PC3 cellene og i den samme studien observerte de at DU145 cellene ikke uttrykker PAX6 (Muratovska et al., 2003). PAX6 uttrykk er ikke beskrevet i LNCaP cellene tidligere. En mulig forklaring på at Muratovska og kollegene ikke observerer uttrykk av PAX6 i DU145 cellene er at deres primersett er lokalisert i ekson 8 og 9 og vil dermed ikke detekterer paired domenet, som vårt primer sett er rettet mot. Muratovska og kollegene utførte ikke Western blott eller andre forsøk på proteinnivå i denne studien. I våre Western blott ble det brukt et antistoff rettet mot C-terminalen av PAX6 proteinet. Resultatene indikerer PAX6 proteinene på 48 kDa i PC3 cellene og LNCaP cellene transfektert med pCi-PAX6. PAX6 proteiner ble ikke observert for DU145 cellelinjene i åtte av ni forsøk med dette antistoffet. Western blottet i figur 15A er det eneste blottet der en skygge på rundt 48 kDa vises der PAX6 proteinet forventes. Det kan være PAX6 proteiner vi ser på blottet, men da forventer vi også å se PAX6 proteiner i brønnen med scambeld siRNA ettersom disse cellene ikke har slått ut PAX6 uttrykket. Vi antar derfor at denne skyggen ikke er PAX6, men noe uspesifikt. Et annet PAX6 antistoff rettet mot N-terminalen (paired domenet) ble derfor testet. Med dette antistoffet så man bånd for både PC3 og DU145 på 48 kDa som er PAX6 proteinet. Vi ser at for PC3 cellene transfektert med PAX siRNA er PAX6 uttrykket effektivt slått ned (figur 15B) og dette ser vi også på mRNA nivå (figur 13A), noe som sterkt indikerer at det er PAX6 uttrykket vi ser. Båndene på rundt 35 kDa kan være translasjon av et kortere PAX6 protein som inkluderer paired domenet. Disse båndene ser vi i DU145 og PC3 cellene. Dette forklarer RT-PCR resultatene våre og resultatene fra studien til Muratovska og kollegene som ikke observerte PAX6 uttrykk i DU145 cellelinjen. Hvorfor vi da observerer et sterkt bånd på 48 kDa for DU145 cellene med antistoffet rettet mot paired domenet er vanskelig å forklare. I følge teorien om at DU145 kun uttrykker deler av PAX6 proteinet som inneholder paired domene skulle vi ikke observert PAX6 proteiner ved 48 kDa for DU145 cellene.

Muligheten for at PAX6 RNAet ble brutt ned før proteinet blir dannet ble diskutert.

MicroRNA (miRNA) er en klasse små ikke-protein-kodende RNA på rundt 22 nukleotider som binder mRNA og hindrer translasjon (Faller and Guo, 2008). Det er predikert miRNA for PAX6 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) og PAX6 uttrykket i DU145 cellene kan derfor være regulert miRNA, men denne teorien ble ikke etterprøvd ettersom vi observerte PAX6 proteiner på Western blottene rettet mot paired domenet.

MMP-1, -3, -9, -14, TIMP-1, S100A4 og uPA følger samme uttrykksmønster som PAX6 ved at de uttrykkes i DU145 og PC3 cellene, mens de mangler eller har redusert uttrykk i LNCaP cellene. TIMP-3 har motsatt uttrykk av PAX6 og uttrykkes kun i LNCaP cellene. Det er tidligere vist at de to cellelinjene DU145 og PC3 har androgenuavhengige vekst, mens LNCaP er en androgenavhengig cellelinje (Bonaccorsi et al., 2006). En annen studie beskriver uttrykket av p53 i DU145 og PC3 cellelinjene. p53 er en viktig regulator av apoptose i cellene og mutasjoner i dette genet kan føre til kreft. PC3 cellene mangler p53 og DU145 har en mutert form av p53. LNCaP derimot har vill type av p53 genet (Muratovska et al., 2003). Ut fra disse to studiene kan vi forvente at PC3 og DU145 cellene har likere egenskaper og også høyere potensiale for invasjon enn LNCaP cellelinjen. Det er interessant å observere at det også er disse to cellelinjene som uttrykker PAX6.

De fleste av resultatene fra LNCaP cellene på Q-PCR ble forkastet på grunn av kontaminering med genomisk DNA, vist ved hjelp av kontroll med cDNA uten revers transkriptase enzymet (NORT). Behovet for NORT kontroll og en kontroll uten templat (NTC) ble her effektivt vist. Ideelt sett skulle vi i alle forsøkene ha brukt minst to normaliseringsgen på Q-PCR (Vandesompele et al., 2002). Dette ble vurdert, men da vi ikke hadde andre gen som vi visste ville fungere optimalt i disse cellelinjene, ble prøvene kjørt på Q-PCR med kun et normaliseringsgen.

PAX6 uttrykk er assosiert med mindre aggressive tumorer og nedregulering av MMP-2 uttrykket i cellelinjer fra glioblastoma. For våre tre cellelinjer ble det ikke observert forventet økning av MMP-2 på RT-PCR, svært lave nivåer ble detektert med Q-PCR og zymografi viste heller ikke aktivitet av MMP-2 i noen av cellelinjene. En publisert studie beskriver MMP-2 uttrykket i blant annet PC3 cellelinjen (Forbes et al., 2003). De observerte ikke uttrykk av MMP-2 verken på zymografi eller Western blott og bekrefter dermed våre resultater. Teorien vår gikk ut på at dersom vi slo ned PAX6 uttrykket ville uttrykket av MMP-2 øke ettersom det tidligere er vist at PAX6 hemmer uttrykket av MMP-2 i glioblastomaceller. Fordi cellene i så liten grad uttrykker MMP-2 ble det vanskelig å se om denne teorien stemte. Trenden vi ser på Q-PCR hvor det ser ut til at MMP-2 reguleres av PAX6 kan derfor i stor grad skyldes tilfeldigheter i form av at vi kun fikk MMP-2 molekyler med i noen prøver. For å se om trenden vi observerte stemmer med teorien, eller om den skyldes tilfeldighet, må det gjøres flere forsøk på Q-PCR med større mengde cDNA. I våre

prøver ble cDNAet fortynnet 1:5, men denne fortyningen av prøvene bør sløyfes ved fremtidige forsøk.

Forbes og kollegene undersøkte også uttrykket av MMP-1,- 3- 7 og 9. Deres resultater viser at heller ikke disse MMPene er uttrykt i PC3 cellelinjen. Resultatene i deres studie stemmer ikke overens med våre resultater. Vi observerer at alle disse MMPene er uttrykt i cellelinjene i større eller mindre grad. Vi studerte, i motsetning til dem, mRNA nivået i cellene og ikke proteinene. Det er derfor vanskelig å sammenligne resultatene direkte, men ettersom cellen uttrykker mRNA så forventer man også å kunne se uttrykk på proteinnivå, med mindre det skjer en endring av translasjonen. Vi kjørte også zymografi for transfekterte PC3 celler som viser at det er MMP-9 aktivitet i PC3 cellene. Det var derimot vanskelig å tolke zymografiresultatene fordi antallet celler i brønnene varierte. Det bør derfor gjøres flere zymografiforsøk med transfekterte PC3 celler. Prøver med primersett rettet mot MMP-9 og MMP-14 ble kjørt på Q-PCR og det ser ut som om disse to MMPene er regulert av PAX6. Tidligere har det blitt vist at MMP-9 er regulert av PAX6 ved sårheling i hornhinna (Ramaesh et al., 2006, Sivak et al., 2000), men dette er ikke vist for kreftceller. MMP-1 og MMP-3 viste også samme uttrykksmønster som PAX6 på RT-PCR, men dette ble ikke studert videre med transfekterte celler på Q-PCR. Det vil være spennende å se om også disse MMPene viser seg å være regulert av PAX6. Forsøkene med MMP-9 og MMP-14 ble kun utført to ganger på Q-PCR så det er for tidlig å si om det er en sammenheng, men trenden ser ut til å gå igjen og det er derfor verdt å følge opp dette videre.

TIMPgener er med på å regulere uttrykket av MMPer ved enten å hemme disse med tette ikke-kovalente bindinger med MMPene, eller ved at de regulerer selve aktiveringsprosessen. I normalt vev er det et balansert uttrykk mellom MMPer og TIMPer. Ved kreft er denne balansen forstyrret (Murphy and Nagase, 2008). Fordi man lenge har visst at høyt uttrykk av MMP er assosiert med høy forekomst av metastasering og dårlige prognoser har man sett på TIMPene som et mulig angrepspunkt i kreftbehandling. TIMP-3 regulerer uttrykket av MMPer og fordi uttrykket av TIMP-3 så ut til å være motsatt av PAX6 uttrykket på Flpn-3T3 microarrayet (egne resultater av Ingvild Mikkola, ikke publisert) var det interessant å studere dette videre. På RT-PCR var TIMP-3 uttrykt sterkt i LNCaP cellene, noe svakere i PC3 cellene og fraværende i DU145 cellene. Disse resultatene ble sett nærmere på ved hjelp av Q-PCR med transfekterte PC3 celler. Vi forventet et høyere uttrykk av TIMP-3 når PAX6

uttrykket ble redusert i PC3 cellene, men dette var ikke tilfellet. Vi observerte det motsatte. Det så ut til at uttrykket av TIMP-3 ble svakere når PAX6 uttrykket ble slått ned. Det er verd å merke seg det store standardavviket. I et av forsøkene var det svært liten forskjell mellom PAX6 siRNA og scr siRNA prøvene. Det vil derfor være inntresant å gjøre forsøket flere ganger for å se hvilke av resultatene som viser det riktige bildet av TIMP-3 uttrykket. Uttrykket av blant annet TIMP-3 ble studert av Cross og kollegene (Cross et al., 2005). I deres studie viser de at TIMP-3 er fraværene i DU145 og PC3 cellene, mens det er uttrykt små mengder TIMP-3 i LNCaP cellene. Disse resultatene bekrefter våre resultater i DU145 og LNCaP cellene, men vi observerte også et svakt uttrykk av TIMP-3 i PC3 cellene. At deres uttrykk av TIMP-3 var lavere enn i våre prøver kan skyldes at vi har høyere input av cDNA.

Urokinase plasminogen systemet er med i aktiveringen av MMPene og er også assosiert med dårlige prognoser ved kreft. Når uPA binder til uPAR aktiveres plasmin som deretter har muligheten til å aktivere en rekke MMPer. Plasmin aktiverer også uPA ved positiv feedback. I to studier av Festuccia og kollegene studerte de uPA og uPAR uttrykket i DU145, LNCaP og PC3 cellelinjene. De observerte høye uttrykk av uPA i DU145 og PC3 cellelinjene, mens LNCaP cellene manglet uttrykk av uPA. De beskrev også uttrykket av uPAR i alle tre cellelinjene (Festuccia et al., 1998a, Festuccia et al., 1998b). Dette bekrefter resultatene vi fikk på RT-PCR. På Q-PCR ble det vist en nedregulering av uPA uttrykket i de cellene der PAX6 uttrykket var slått ned med PAX6 siRNA i PC3 cellene. Det ser altså ut som om uPA kan være regulert av PAX6, noe som ikke er vist tidligere i andre studier. Forsøkene ble likevel bare utført to ganger på Q-PCR og bør derfor repeteres før vi kan si om dette stemmer.

PAX2 genet er en del av undergruppe II i PAX familien. PAX2 har alle de tre strukturelle domene til PAX genene, mens homeodomenet er trunkert og mangler dermed den DNA bindende heliksen. Det er tidligere publisert to studier av PAX2 uttrykk i DU145, LNCaP og PC3 ser viser at PAX2 er til stede i alle de tre cellelinjene (Khoubehi et al., 2001, Muratovska et al., 2003). I denne oppgaven så vi at PAX2 uttrykkes på mRNA nivå i alle de tre cellelinjene. Det ble forsøkt å teste proteinnivået i cellene ved hjelp av Western blott, men disse blottene gav ingen entydige resultater. Resultatene våre fra RT-PCR samsvarer med tidligere observasjoner på mRNA nivå. I artikkelen av Muratovska og kolleger (Muratovska et al., 2003) ble også uttrykket av PAX5 studert i PC3 og DU145 cellelinjene. De viste at på mRNA nivå er ikke PAX5 uttrykt i noe av cellelinjene. Dette strider mot våre resultater som

viser at PAX5 uttrykkes i alle tre cellelinjene både på mRNA og proteinnivå. Uttrykket var sterkere i DU145 cellene vist på RT-PCR, mens det var et noe svakere uttrykk i LNCaP og PC3 cellelinjene. Western blott viste at proteinene er til stede i alle cellelinjene. Mønsteret vi så for PAX2 og PAX5 på RT-PCR ligner. MMP-7 og MMP-13 ser også ut til å følge samme mønster som disse PAX genene. En mulig sammenheng bør undersøkes nærmere ved hjelp av transfeksjon for å kunne si om MMPene er tilfeldig uttrykt likt i disse cellene, eller om det er en sammenheng med PAX uttrykket.

S100A4 er tidligere assosiert med metastase og kreft. Det ble det vist at DU145 og PC3 cellene inneholder S100A4, mens LNCaP ikke uttrykker dette proteinet. Det er imidlertid gjort flere forsøk med disse tre cellelinjene tidligere. En studie viser at alle de tre cellelinjene inneholder S100A4 (Gupta et al., 2003), mens de i en annen studie viser til resultater som viser at S100A4 ikke er uttrykt i DU145 og LNCaP cellelinjene, men svakt uttrykt i PC3 cellelinjen (Rehman et al., 2007). Våre resultater bekreftes av disse studiene som begge viser uttrykk av S100A4 i PC3 cellelinjen, mens for de to andre cellelinjene er det publisert resultater som strider med hverandre. Vi ser at når PAX6 uttrykket slås ned med PAX6 siRNA reduseres mengden S100A4 i cellene. En sammenheng mellom PAX6 og S100A4 er ikke studert tidligere. Forsøkene bør repeteres for å kunne bekrefte om denne sammenhengen er reell. Det er ikke publisert mange artikler om S100A7A. Microarrayet på Flpn-3T3 cellene viste at S100A7A ble oppregulert av PAX6. Dette var det ikke mulig å studere videre i denne oppgaven, da primersettet viste seg ikke å være spesifikt nok til å brukes på Q-PCR. For å undersøke om S100A7A reguleres av PAX6 må det derfor designes nye primersett.

Vi har i denne oppgaven sett på PAX6 uttrykket og hvordan det påvirker andre gener som allerede er assosiert med evnen til å metastasere. Resultatene har til nå vist at dersom vi slår ut PAX6 vil uttrykket av MMP-9, MMP-14, TIMP-3, S100A4 og uPA bli redusert. Dersom dette stemmer vil vi forvente at celler som har PAX6 har større evne til å invadere nytt vev i og med at alle disse genene er vist å øke cellenes evne til å migrere. Vi utførte derfor et invasjonssassay. Resultatene viste at celler med PAX6 uttrykk hadde i større grad trengt gjennom matriksmembranen. Dette er det motsatte av det som har blitt beskrevet for glioblastomaceller tidligere. I glioblastomacellene nedregulerte PAX6 MMP-2 uttrykket og cellene ble mindre invasive. Resultatene vi ser her viser at PAX6 kan ha en funksjon i migrasjon av celler ved å påvirke andre gener som øker invasjonsegenskapene til cellene.

Dette er tidligere vist i forbindelse med uttrykk av MMP-9 i sårheling i hornhinna, (Ramaesh et al., 2006, Sivak et al., 2000), men det er ikke vist for kreftceller. Invasjonsassayet ble utført én gang med to paralleller. Dette er for lite til å kunne trekke en endelig konklusjon og forsøket bør derfor repeteres.





## 5 Konklusjon

Invasjon og spredning er de viktigste årsakene til død hos kreftpasienter. Kunnskap om hvilke mekanismer som er involvert i disse prosessene er derfor svært viktig for forståelsen av sykdommen og utviklingen av nye behandlingsmetoder. PAX6 er en transkripsjonsfaktor som er assosiert med prognosen av kreft. Mekanismene bak dette er enda uklare, men PAX6 er assosiert med uttrykk av MMP-9 migrasjon av celler i forbindelse med sårheling. En forbindelse mellom PAX6 og migrasjon i kreftceller er ikke tidligere studert, men i denne oppgaven er det vist en sammenheng mellom PAX6 og MMP-9, MMP-14, S100A4, TIMP-3 og uPA. Det ser også ut til at PAX6 kan ha en funksjon på migrasjon av kreftceller.



## 6 Referanser

- BECKER, W. M., HARDIN, J. & KLEINSMITH, L. J. (2003) *The world of the cell*, San Francisco, Benjamin Cummings.
- BONACCORSI, L., MARCHIANI, S., FERRUZZI, P., MURATORI, M., CRESCIOLI, C., FORTI, G., MAGGI, M. & BALDI, E. (2006) Non-genomic effects of the androgen receptor and Vitamin D agonist are involved in suppressing invasive phenotype of prostate cancer cells. *Steroids*, 71, 304-9.
- BROOKS, S. A., LOMAX-BROWNE, H. J., CARTER, T. M., KINCH, C. E. & HALL, D. M. (2009) Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem*.
- CHI, N. & EPSTEIN, J. A. (2002) Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet*, 18, 41-7.
- CROSS, N. A., CHANDRASEKHARAN, S., JOKONYA, N., FOWLES, A., HAMDY, F. C., BUTTLE, D. J. & EATON, C. L. (2005) The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican. *Prostate*, 63, 269-75.
- DAHL, E., KOSEKI, H. & BALLING, R. (1997) Pax genes and organogenesis. *Bioessays*, 19, 755-65.
- DASS, K., AHMAD, A., AZMI, A. S., SARKAR, S. H. & SARKAR, F. H. (2008) Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev*, 34, 122-36.
- FALLER, M. & GUO, F. (2008) MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta*, 1779, 663-7.
- FESTUCCIA, C., DOLO, V., GUERRA, F., VIOLINI, S., MUZI, P., PAVAN, A. & BOLOGNA, M. (1998a) Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis*, 16, 513-28.
- FESTUCCIA, C., GUERRA, F., D'ASCENZO, S., GIUNCIUGLIO, D., ALBINI, A. & BOLOGNA, M. (1998b) In vitro regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *Int J Cancer*, 75, 418-31.
- FORBES, K., WEBB, M. A. & SEHGAL, I. (2003) Growth factor regulation of secreted matrix metalloproteinase and plasminogen activators in prostate cancer cells, normal prostate fibroblasts and normal osteoblasts. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 6, 148-53.
- FREDDIE, B. (2008) Cancer in Norway: Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway.
- GARRETT, S. C., VARNEY, K. M., WEBER, D. J. & BRESNICK, A. R. (2006) S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem*, 281, 677-80.

- GUPTA, S., HUSSAIN, T., MACLENNAN, G. T., FU, P., PATEL, J. & MUKHTAR, H. (2003) Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 21, 106-12.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- KHOUBEHI, B., KESSLING, A. M., ADSHEAD, J. M., SMITH, G. L., SMITH, R. D. & OGDEN, C. W. (2001) Expression of the developmental and oncogenic PAX2 gene in human prostate cancer. *J Urol*, 165, 2115-20.
- KUMAR, V. & ROBBINS, S. L. (2007) *Robbins basic pathology*, Philadelphia, Saunders Elsevier.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*, 25, 402-8.
- MANTOVANI, A. (2009) Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*, 457, 36-7.
- MAYES, D. A., HU, Y., TENG, Y., SIEGEL, E., WU, X., PANDA, K., TAN, F., YUNG, W. K. & ZHOU, Y. H. (2006) PAX6 suppresses the invasiveness of glioblastoma cells and the expression of the matrix metalloproteinase-2 gene. *Cancer Res*, 66, 9809-17.
- MAZAR, A. P. (2008) Urokinase plasminogen activator receptor choreographs multiple ligand interactions: implications for tumor progression and therapy. *Clin Cancer Res*, 14, 5649-55.
- MAZZUCHELLI, L. (2002) Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol*, 160, 7-13.
- MURATOVSKA, A., ZHOU, C., HE, S., GOODYER, P. & ECCLES, M. R. (2003) Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene*, 22, 7989-97.
- MURPHY, G. & NAGASE, H. (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, 29, 290-308.
- NAGASE, H., VISSÉ, R. & MURPHY, G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69, 562-73.
- PINSON, J., SIMPSON, T. I., MASON, J. O. & PRICE, D. J. (2006) Positive autoregulation of the transcription factor Pax6 in response to increased levels of either of its major isoforms, Pax6 or Pax6(5a), in cultured cells. *BMC Dev Biol*, 6, 25.
- RAMAESH, T., RAMAESH, K., LEASK, R., SPRINGBETT, A., RILEY, S. C., DHILLON, B. & WEST, J. D. (2006) Increased apoptosis and abnormal wound-healing responses in the heterozygous Pax6<sup>+/-</sup> mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 1911-7.
- REHMAN, I., GOODARZI, A., CROSS, S. S., LEIBLICH, A., CATTO, J. W., PHILLIPS, J. T. & HAMDY, F. C. (2007) DNA methylation and immunohistochemical analysis of the S100A4 calcium binding protein in human prostate cancer. *Prostate*, 67, 341-7.

- ROBSON, E. J., HE, S. J. & ECCLES, M. R. (2006) A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer*, 6, 52-62.
- ROSENBERG, G. A. (2009) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol*, 8, 205-16.
- SIMPSON, T. I. & PRICE, D. J. (2002) Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays*, 24, 1041-51.
- SIVAK, J. M., MOHAN, R., RINEHART, W. B., XU, P. X., MAAS, R. L. & FINI, M. E. (2000) Pax-6 expression and activity are induced in the reepithelializing cornea and control activity of the transcriptional promoter for matrix metalloproteinase gelatinase B. *Dev Biol*, 222, 41-54.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3, RESEARCH0034.
- WANG, Q., FANG, W. H., KRUPINSKI, J., KUMAR, S., SLEVIN, M. & KUMAR, P. (2008) Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *J Cell Mol Med*, 12, 2281-94.
- WILSON, D. S., GUENTHER, B., DESPLAN, C. & KURIYAN, J. (1995) High resolution crystal structure of a paired (Pax) class cooperative homeodomain dimer on DNA. *Cell*, 82, 709-19.
- YAN, C. & BOYD, D. D. (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*, 211, 19-26.
- ZHOU, Y. H., WU, X., TAN, F., SHI, Y. X., GLASS, T., LIU, T. J., WATHEN, K., HESS, K. R., GUMIN, J., LANG, F. & YUNG, W. K. (2005) PAX6 suppresses growth of human glioblastoma cells. *J Neurooncol*, 71, 223-9.