

Masteravhandling for graden Master i Farmasi

Undersøkelse av
signaltransduksjonsmekanismer ved S100A4-
indusert aktivering av transkripsjonsfaktoren
NF- κ B

Ida Grotterød

2007

Internveileder: Thrina Loennechen

Eksternveiledere: seniorforsker Gunhild Mari Mælandsmo og
stipendiat Kjetil Boye

Rikshospitalet – Radiumhospitalet HF



Forord

Denne oppgaven ble utført ved Tumorbiologisk avdeling, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF i perioden oktober 2006 til mai 2007.

Takk til internveileder ved Universitetet i Tromsø, Thrina Loennechen, som lot meg få lov til å ta masteroppgaven min i en lab jeg var kjent fra før.

Jeg vil takke min hovedveileder ved Tumorbiologisk avdeling, seniorforsker Gunhild Mari Mælandsmo. Takk for at du gjorde det mulig for meg å skrive denne masteroppgaven under din veiledning, og som en del av S100A4-gruppa. Takk for gode innspill og hjelp under skriveprosessen. Du har vist meg tillitt og gitt meg inspirerende oppgaver helt siden jeg begynte som lærling på avdelingen i 1999 og stadig gitt meg nye utfordringer. På den måten har du bidratt til økt interesse for forskningen, og stadig bedre forståelse for feltet.

Biveileder og nærmeste samarbeidspartner har vært stipendiat Kjetil Boye. Ditt gode humør og stadige oppmuntringer har vært til uvurderlig hjelp. Til tross for din overgang til klinikken og utallige andre oppgaver, har du alltid hatt tid til å diskutere resultater og videre planer. Takk for at ingen spørsmål er for dumme, og for at du setter krav om at jeg må tenke selv. Under din veiledning har både sommerjobber og skriving av masteroppgave vært lærerike og inspirerende perioder.

En stor takk til alle på tumorbiologisk avdeling for et godt arbeidsmiljø både faglig og sosialt. En spesiell takk til alle på S100A4-gruppa, som foruten Gunhild M. Mælandsmo og Kjetil Boye består av Kristin Andersen, Gisle Berge, Ragnhild Birkelund, Kjersti Flatmark, Mads Haugen, Heidi Rasmussen og Tove Øyjord.

En takk til min kontorkamerat, Lina, for hjelp med PC-tekniske utfordringer, matforsyninger og mye latter. Til slutt, takk til Hilde, som har gjort det hyggelig å komme hjem etter lange dager.

Ida

Oslo, Mai 2007

Innholdsfortegnelse

<i>Forord</i>	2
<i>Innholdsfortegnelse</i>	3
<i>Sammendrag</i>	5
<i>Innledning</i>	6
Kreft	6
Metastaseprosessen	7
Essensielle trinn for metastasering	7
S100 proteiner	9
S100A4	9
Prognostisk betydning	11
Intracellulære funksjoner.....	11
Ekstracellulære funksjoner	12
NF-κB	14
NF- κ B familien	14
Signalveier.....	14
Bakgrunn for oppgaven	17
<i>Materialer og metoder</i>	19
Cellelinjer	19
Celledyrking	19
Rekombinant S100A4	19
Celleforsøk	20
NF- κ B aktivitetsassay	20
Behandling av celler med inhibitorer	21
Proteinisolering, Polyakrylamid Gel Elektroforese (PAGE) og Western analyser	23
RNA-isolering	24
Immunpresipitering	25
Kjemikalier og utstyr brukt til celledyrking, celleforsøk og Western analyser	26
<i>Resultater</i>	29
Ekstracellulært S100A4 stimulerer NF-κB aktivitet i enkelte humane kreftcellelinjer	29
S100A4-indusert ekspresjon av ephrin-A1 og optineurin er avhengig av aktivitet i den klassiske NF-κB signalveien.	30
Behandling av II-11b med hemmere av intracellulære signalveier	32
<i>Diskusjon</i>	39
Bruk av inhibitorer	40
S100A4-indusert aktivering av ephrin-A1 og optineurin er avhengig av transkripsjonsfaktoren NF-κB	40
Intracellulære signalveier involvert i S100A4-indusert aktivering av NF-κB	41
Effekt av serin/treonin kinase hemmere	42
Effekt av inhibering av G-protein koblede reseptorer	44
Tyrosin kinase inhibering	44

Effekt av hemmet fosfatidylinositol-3-kinase aktivitet.....	45
Inhibering av fosfolipase C aktivitet.....	45
Videre planer	46
Intracellulære signalveier nødvendig for S100A4 mediert aktivering av NF- κ B.....	46
Ephrin-A1 og optineurin.....	47
<i>Forkortelser</i>	48
<i>Referanser</i>	50
<i>Bilag</i>	56
Bilag 1 - Celledyrking	56
Bilag 2 - NF-κB aktivitetsassay	57
Bilag 3 - Proteinisolering	58
Bilag 4 - Estimering av proteinkonsentrasjon med BCATM Protein Assay Kit	59
Bilag 5 - Prosedyre for SDS-PAGE	60
Bilag 6 - Antistoff	64
Bilag 7 - Immunpresipitering (IP)	65
Bilag 8 - Prosedyre for RNA isolering	67
Bilag 9 - Real-Time RT-PCR	68

Sammendrag

S100A4 er et lite kalsiumbindende protein som tilhører S100-proteinfamilien. Proteinet er vist å ha en viktig rolle i metastaseprosessen, bl.a. ved å stimulere kreftcellenes motilitet og invasjonsevne. I de senere år har man blitt klar over at flere av de observerte biologiske effektene av S100A4 kan skyldes ekstracellulært protein.

Forskningsgruppen har i flere år studert betydningen av S100A4 i kreftutvikling og spredning. Ved transient transfeksjon med et reporterkonstrukt for transkripsjonsfaktoren NF- κ B er det vist at ekstracellulær S100A4 øker aktiviteten av NF- κ B i cellelinjen II-11b og at denne økningen skyldes økt aktivitet i den klassiske NF- κ B signalveien. NF- κ B spiller en sentral rolle i prosesser som inflammasjon, metastasering, apoptose og stimulering av proliferasjon, og sammenhengen mellom ekstracellulært S100A4 og aktivering av NF- κ B er således interessant å studere videre. I denne oppgaven er S100A4-indusert NF- κ B aktivering undersøkt i et utvalg humane kreftcellelinjer. Signifikant økning ble observert i fire av 15 undersøkte cellelinjer.

Ved hjelp av mikromatriseanalyser av S100A4-behandlede osteosarkomceller er ephrin-A1 og optineurin identifisert som S100A4-induserte gener. I denne oppgaven er osteosarkomcellelinjen II-11b behandlet med rekombinant S100A4 og hemmere av den klassiske NF- κ B signalveien. NF- κ B-avhengig induksjon av ephrin-A1 og optineurin er vist med Western blot analyser og real-time RT-PCR.

Videre er signaltransduksjonsmekanismer nødvendig for S100A4-indusert aktivering av NF- κ B undersøkt ved bruk av rekombinant protein og hemmere av ulike intracellulære signalveier. Hemmere av følgende signaltransduksjonsveier/molekyler er undersøkt: serin/treonin kinaser, protein kinase C, G-protein koblede reseptorer, protein tyrosin kinaser, fosfatidylinositol-3-kinaser og fosfolipase C. Inhibering av serin/treonin kinaser med H-7 viste tydelig inhiberende effekt på aktivitet i NF- κ B signalveien. Inhibering av protein tyrosin kinaser vha genistein viste en mulig inhiberende effekt på signalveien, men her er videre undersøkelser nødvendig for å trekke konklusjon.

Innledning

Kreft

Kreft er en av de vanligste dødsårsakene i den vestlige verden. Totalt sett har kreft lenge vært nummer to på statistikken over dødsårsaker i Norge. De siste årene har dødeligheten av hjerte- og karsykdommer falt sterkt for aldersgruppen under 80, og kreft er nå den hyppigste dødsårsaken i denne aldersgruppen. Kreftforekomsten i Norge har økt sterkt siden 1950-tallet. Denne økningen må sees i sammenheng med den økte levealderen og bedre diagnosemetoder for flere kreftformer [1, 2].

Kreft karakteriseres ved ukontrollert celledeling og potensiale for spredning til andre deler av kroppen (metastaser). Cellene i en kreftsvulst deler seg ikke nødvendigvis raskere enn normale celler, men forholdet mellom cellevekst og celledød er i ubalanse. Kreftceller oppstår ved mutasjoner i cellens genmateriale. Mutasjonene kan være både medfødt og ervervede, og sitter gjerne i tre ulike gentyper: protoonkogener, tumorsuppressorgener og stabilitetsgener. Protoonkogener koder for vekstfaktorer og reseptorer for disse, proteiner i den intracellulære signaloverføringen og nukleære proteiner involvert i kontroll av celledelingen. Mutasjoner i protoonkogener kan således føre til økt celledeling. Tumorsuppressorgener koder for proteiner som normalt hemmer celledeling. Ved mutasjoner i disse genene kan denne inhiberende effekten falle bort. Stabilitetsgener inkluderer reparasjonsgener og gener som kontrollerer mitogen rekombinasjon og kromosomal segresjon. Mutasjoner i slike gener kan øke faren for kreft ved at feil i genmaterialet oftere unnslipper reparasjonssystemet. Mutasjoner i tumorsuppressorgener er ofte ressesive, og ett normalt allel vil sørge for normal funksjon. Mutasjoner i protoonkogener er vanligvis dominante. Her vil mutasjoner i et av allelene føre til økt uttrykk av genproduktet og dermed endret funksjon [3].

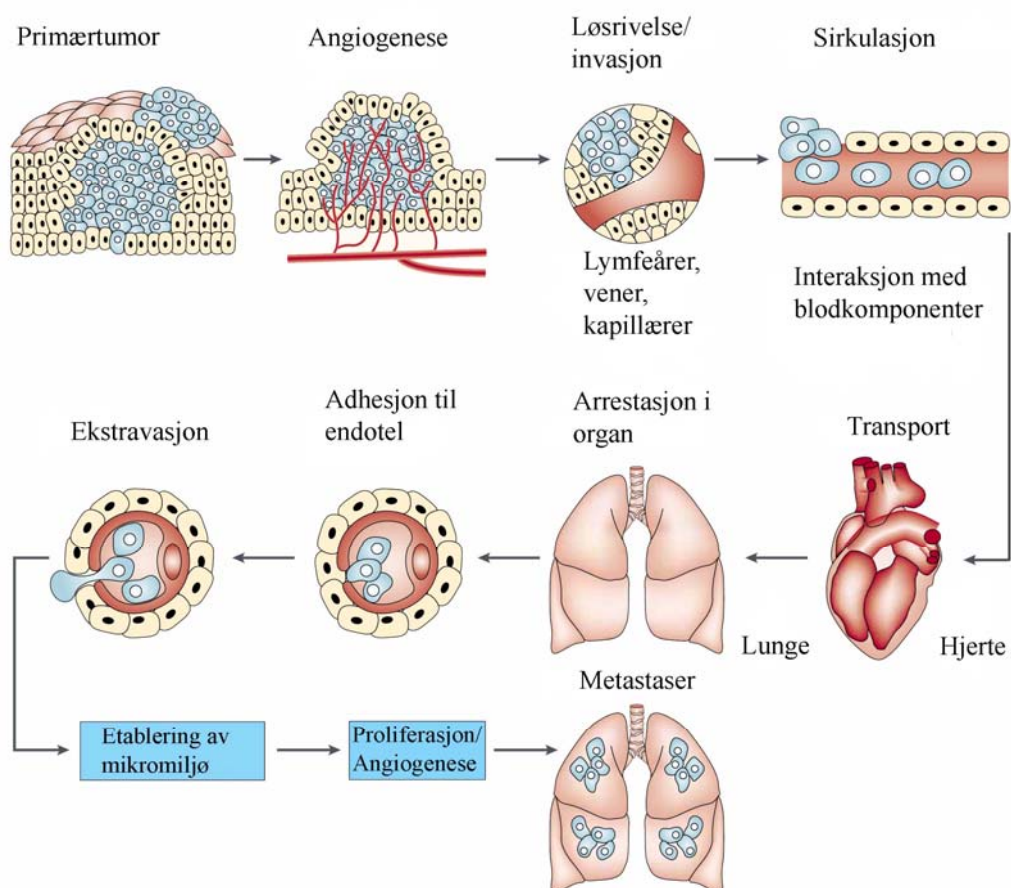
Celledeling kontrolleres normalt via flere mekanismer, og flere mutasjoner er nødvendig for at kreft skal oppstå. En tenker seg seks essensielle egenskaper celler må erverve for at en malign tumor skal dannes. Disse innebærer at cellene er selvforsynt med vekstsignaler og ikke lar seg påvirke av veksthemmende signaler. Videre må de overse signaler om å gå i apoptose (programmert celledød) og ha ubegrenset replikerende potensiale. En tumor er avhengig av tilførsel av oksygen og næringsstoffer. For å kunne vokse utover diffusjonsgrensen fra eksisterende blodårer (ca 2 mm), må cellene i en tumor ha evne til å indusere angiogenese (nydanning av blodårer), samt evne til vevsinvasjon [4].

Metastaseprosessen

”To be, or not to be”

Metastaser er hovedårsaken til at kreftpasienter dør av sin sykdom, og kreftcellenes evne til å metastasere gjør dem vanskelige å utrydde. Hele 90 % av de som dør av sin kreftsykdom dør som følge av metastaser [4]. I høyerestående organismer sørger homøostatiske mekanismer normalt for at ulike vev beholder sin integritet. For å metastasere må kreftceller omgå eller ødelegge flere av disse kontrollmekanismene. Metastaseprosessen er en kompleks prosess i flere trinn, og bare enkelte av kreftcellene har egenskaper som gjør dem i stand til å passere alle disse.

Essensielle trinn for metastasering



Figur 1: Hovedtrinnene i metastaseprosessen. De ulike trinnene er forklart i teksten. Figuren er hentet fra Fidler, Nat Rev Cancer [5].

For å metastasere må kreftcellene i en primærtumor løsrive seg fra sine naboceller og deretter trenge gjennom basalmembranen. Videre må kreftcellene være i stand til å danne midlertidige bindinger ved migrering gjennom nærliggende strukturer. Adhesjonsmolekyler som cadheriner, selectiner og medlemmer av immunoglobulinfamilien bidrar til å opprettholde celle-celle kontakt, og nedregulering av disse proteinene kan føre til at kreftcellene lettere frigjøres fra sine naboceller. Invasjon er en aktiv prosess som involverer translokasjon av neoplastiske celler over vevsbarrierer som basalmembraner og interstitielt bindevev, og er en forutsetning for at kreftceller skal nå den systemiske sirkulasjonen. Degradering av ECM og basalmembranen er nødvendig for invasjon, og proteolytiske enzymer som matriks metalloproteinaser (MMPer) er sentrale i denne prosessen [4].

En tumor kan frigi store mengder kreftceller til blodsirkulasjonen, men bare en liten andel av disse er i stand til å danne metastaser. I blodsirkulasjonen utsettes tumorcellene for påkjenninger som mekanisk stress og angrep fra immunforsvaret. Videre må kreftcellene være i stand til å ekstravasere (migrere fra blodsirkulasjonen inn i omliggende vev) og overleve og proliferere i det nye miljøet. Det siste trinnet, invasjon og videre vekst i det nye miljøet, er sannsynligvis det minst effektive trinnet i metastaseprosessen. Studier har vist at kun 0,01 % av frigitte tumorceller overlever i sirkulasjonen og har evne til å indusere sekundær tumorvekst [6].

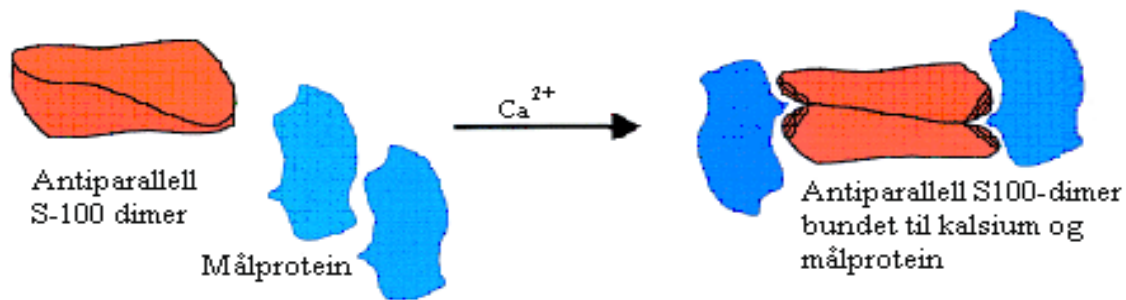
Som en følge av metastaseprosessen sentrale rolle har kreftforskere i en årrekke forsøkt å identifisere involverte gener. Eksempler på genprodukter som fremmer metastasering er proteaser, f.eks MMPer, og ulike angiogenetiske faktorer slik som FGF og VEGF. Et protein som i senere tid er vist stor interesse pga sin betydning i metastaseprosessen er S100A4, et lite protein tilhørende S100 proteinfamilien. I den følgende del beskrives S100 proteinfamilien, S100A4 og mulige funksjoner av S100A4 i metastaseprosessen.

S100 proteiner

Flere S100 proteiner er vist å spille en rolle i tumorprogresjon og tumorsuppresjon. Proteinene er funnet involvert i bl.a. immunrespons, differensiering, proliferasjon og cytoskjelett dynamikk, prosesser som alle kan ha betydning for kreftutvikling [7]. De første S100 proteinene (S100B og S100A1) ble isolert fra nervevev og fikk navnet S100 fordi de lot seg løse i 100 % mettet ammoniumsulfat ved nøytral pH [8]. Proteinene ble opprinnelig regnet for å være spesifikt uttrykt i celler av neuroektodermal opprinnelse, og blir fortsatt benyttet som markør for slike celler (gliaceller, Schwannske celler og melanocytter) innen kreftdiagnostikk. Endringer i uttrykk av S100 proteiner som årsak til kreftutvikling ble imidlertid først viet oppmerksomhet da man oppdaget at det ved tumorutvikling oppstod flere rearrangeringer i genmaterialet i en evolusjonært konserverert ansamling av S100 gener (kromosom 1q21) [9]. I dag inkluderer S100 proteinfamilien minst 20 sure, kalsiumbindende proteiner med en vevs- og celledisposisjon [10]. Proteinene er små (9-13 kDa) og innehar to karakteristiske kalsiumbindende EF-hånd motiver. Intracellulært danner de fleste S100 proteinene antiparallele homo- og heterodimerer, i tillegg er multimere former assosiert med ekstracellulær funksjon rapportert for enkelte av proteinene [7].

S100A4

Proteinet S100A4, også kjent som mts1, pEL98, 18A2, p9Ka, CAPL, calvasculin og Fsp1 (fibroblast-spesifikt protein), er et 10,5 kDa stort protein som tilhører S100-proteinfamilien [11]. Som de fleste andre S100-proteinene danner S100A4 antiparallele homodimerer, stabilisert av ikke-kovalente bindinger. Hver subenhet har to kalsiumbindende EF-hender, en typisk EF-hånd og en pseudo-EF-hånd, som binder kalsium med lavere affinitet. S100-proteinene gjennomgår en konformasjonsendring ved binding til kalsium, og denne konformasjonsendringen er nødvendig for interaksjon med andre proteiner og dermed biologisk funksjon [12]. Ingen av S100-proteinene har kjent enzymatisk aktivitet, og interaksjoner med andre intra- og ekstracellulære proteiner er dermed nødvendig for biologisk funksjon [11].



Figur 2: Binding av kalsium til S100A4 homodimerer inducerer en konformasjonsendring som er nødvendig for binding til målproteiner og utøvelse av biologisk funksjon.

S100A4 uttrykkes i en rekke normale celletyper. Hos mennesker er proteinet funnet uttrykt i flere celletyper i immunsystemet, bl.a. monocytter, makrofager, polymorfonukleære granulocytter, nøytrofile granulocytter [13] og T-lymfocytter [14]. Videre er proteinet funnet i erytrocytter [15], fibroblaster [16] og endotelceller [17, 18]. Proteinets funnet lokalisert både ekstracellulært, i cytoplasma og i cellekjernen, noe som kan tyde på at S100A4 har flere ulike funksjoner [11, 12, 19, 20]. Imidlertid er proteinets normale funksjon i all hovedsak ukjent. S100A4-negative mus er vist å være levedyktige og å utvikle seg normalt, men ved høyere alder ses en økt insidens av ulike svulster. Dette kan tyde på at S100A4 har en funksjon i tumorsuppresjon [21].

Sammenhengen mellom ekspresjon av S100A4 og kreftcellers metastaserende potensiale ble først beskrevet av Ebraldze et al [22] som viste at uttrykk av S100A4 mRNA i brystkreftcellelinjer korrelerte med deres evne til metastasering. I dyremodeller er det vist at S100A4-negative, ikke-metastaserende cellelinjer fra bryst- og blærekreft ble metastatiske etter transfeksjon med S100A4 [23-25]. Videre resulterte inhibering av S100A4-ekspresjon ved transfeksjon med anti-S100A4 ribozym eller antisense til redusert metastasefrekvens sammenlignet med S100A4-positive celler [26, 27]. Ytterligere bevis for sammenhengen mellom S100A4 og økt metastasering kom med mus transgene for S100A4. Disse musene var fenotypisk normale, men fremviste signifikant økning i antall metastaser når de ble krysset med mus som spontant utviklet brystkreft [28]. Dette kan tyde på at S100A4 ikke har tumorogene egenskaper, men fremmer tumorprogresjon og metastasering i et tumorigent miljø.

Stromaceller som uttrykker S100A4 er vist å fremme metastasering, sannsynligvis ved parakrin effekt av secernert S100A4. I dyremodeller viste S100A4-negative tumorceller injisert sammen med rekombinant S100A4 en økt metastaserende evne sammenlignet med

tumorceller ko-injisert med kontrollproteiner eller tumorceller alene [29]. Videre resulterte injeksjon av metastaserende brystkreftceller med høyt nivå av S100A4 i S100A4-negative mus, i en merkbar reduksjon av både tumorinsidens og antall dyr med metastaser sammenlignet med S100A4-positive mus [30].

Prognostisk betydning

På bakgrunn av den sentrale rollen S100A4 er vist å ha i metastaseprosessen, kan man tenke seg proteinet brukt som en prognostisk markør hos kreftpasienter. Flere studier har undersøkt korrelasjon mellom S100A4-uttrykk og overlevelse. De to største studiene er gjort på pasienter med bryst- og kolorektalkreft. I 2000 undersøkte Rudland et al S100A4-uttrykk i primærtumorer fra 349 brystkreftpasienter. I studien ble det funnet en sterk korrelasjon mellom S100A4-uttrykk og pasientenes prognose. Etter 19 år var 80 % av pasientene med S100A4-negative svulster i live, mens kun 11 % av pasientene med S100A4-positive svulster var i live. Når S100A4-uttrykk ble sammenlignet med etablerte markører for sykdomsprogresjon ble S100A4-uttrykk funnet å være den mest signifikante markøren for overlevelse [31]. Den andre store studien er gjort på 709 pasienter med kolorektalkreft. Også her ble det funnet en signifikant korrelasjon mellom S100A4-uttrykk og pasientoverlevelse [32].

I tillegg til disse studiene der et stort antall pasienter er inkludert, er det gjennomført er rekke mindre studier der økt uttrykk av S100A4 er vist å gi en mer aggressiv metastaserende fenotype og korrelere med dårlig prognose. Dette gjelder bl.a. malignt melanom [33], kreft i bukspyttkjertelen [34], blærekreft [35, 36], ikke-småcellet lungekreft [37, 38], ovarialkreft [20] og kreft i galleblæren [39].

Intracellulære funksjoner

For invasiv vekst og spredning er kreftceller avhengig av å løsne fra sine naboceller og migrere gjennom ekstracellulær matriks. S100A4 er vist å fremme både motilitet og invasjon, sannsynligvis ved flere ulike mekanismer [11, 12, 40]. S100A4 kan interagere med flere ulike cytoskjelettproteiner bl.a. aktin, tropomyosin og myosin, og dermed indusere strukturelle endringer i tumorcellers cytoskjelett. Overuttrykk av S100A4 er også vist å inhibere uttrykk av adhesjonsmolekylet E-cadherin [41]. Høy ekspresjon av S100A4 sammen med lavt uttrykk

av E-cadherin kan således medføre redusert celle-celle adhesjon, noe som igjen kan fremme invasjon og metastasering [42].

MMPer er enzymer som bidrar til nedbrytning av ekstracellulær matriks og basalmembraner, og er ofte assosiert med økte invasive egenskaper hos kreftceller. Nedregulering av S100A4 i osteosarkomcellerlinjer er vist å redusere aktiviteten av proteasene MMP-2 og MT1-MMP [43, 44], hvilket kan forklare disse cellenes reduserte invasive egenskaper.

S100A4 er også vist å interagere med tumorsuppressorproteinet p53. Grigorian et al observerte i 2001 økt celledød i kreftceller som uttrykte villtype p53 og S100A4, og hevdet at interaksjon mellom S100A4 og p53 førte til økt apoptose [45]. Dette vil således kunne føre til en seleksjon av p53-negative celler i S100A4-positive svulster, og dermed bidra til en mer aggressiv fenotype. Som tidligere nevnt ble det observert økt forekomst av spontane svulster hos S100A4-negative mus ved økt alder. En mulig forklaring på dette er at manglende interaksjon mellom S100A4 og p53 kan lede til endret p53 funksjon, og dermed økt mutasjonsforekomst [21].

Ekstracellulære funksjoner

S100A4 kan skilles ut fra både tumorceller og ulike normalceller [46, 47]. Ekstracellulært S100A4 er vist å ha en rekke biologiske funksjoner, som f.eks stimulering av angiogenese [18, 46], regulering av celledød [48] og stimulering av motilitet og invasjon [49]. I cellekulturer av neuroner fra hippocampus er det vist at ekstracellulært S100A4 stimulerer neurittutvekst, og at kun den multimere formen av proteinet gir denne effekten [50]. Flere av de biologiske effektene av ekstracellulært S100A4 er vist å skyldes multimere former [29, 50].

I 2001 ble det vist at ekstracellulært S100A4 kunne stimulere angiogenese in vivo og endotelcellemotilitet in vitro [46]. Senere er det gjort flere studier som underbygger S100A4s betydning for nydanning av vaskulatur [46, 51]. S100A4-mediert stimulering av angiogenese er assosiert med proteinets evne til å indusere cellemotilitet, samt oppregulering av MMPer og nedregulering av deres inhibitorer (TIMPer) [11].

Tilsetning av rekombinant S100A4 til cellekulturer er vist å ha både pro- og antiapoptotiske effekter. I nevroner behandlet med ekstracellulært S100A4 observeres mindre celledød ved tilsetning av pro-apoptotiske agens [48]. Den beskyttende effekten av S100A4 kan være viktig for metastaserende cellers evne til å overleve i blodsirkulasjonen og i nye mikromiljø. Det er imidlertid også vist at ekstracellulær S100A4 sensitiserer osteosarkomceller for IFN- γ -indusert apoptose [52]. Ekstracellulært S100A4 er vist å stabilisere p53 og gi endret transkripsjon av p53-responsive gener. Eksempelvis ble det proapoptotiske genet bax nedregulert ved behandling med S100A4, noe som kan ha betydning for tumorcellenes overlevelse [29].

Det er sannsynlig at enkelte biologiske effekter av ekstracellulært S100A4 medieres via binding til membranreseptorer og aktivering av intracellulære signalveier. Flere S100 proteiner er vist å binde reseptoren RAGE (receptor for advanced glycation end products) [53-55] og RAGE er foreslått som en mulig reseptor også for S100A4. Ekstracellulære effekter av S100A4 er vist å være både RAGE-avhengige og -uavhengige [56, 57]. Det er bl.a vist at ekstracellulært S100A4 induserer cellemotilitet og vekst av kapillærlignende strukturer i cellelinjer som ikke uttrykker RAGE [51], og S100A4-mediert neurittutvekst ble nylig vist å være RAGE-uavhengig [57]. Disse resultatene tyder på at S100A4 avhenger av interaksjon med mer enn en reseptor for å utøve sine biologiske funksjoner. Nylig ble det også vist at ekstracellulært S100A4 kan tas opp ved endocytose i flere kreftcellelinjer, og dette kan tenkes å være en alternativ mekanisme involvert i enkelte av S100A4s ekstracellulære funksjoner [58].

Signaltransduksjonsmekanismene involvert i S100A4-medierte effekter er dårlig karakterisert. Et mulig unntak er neurittutvekst der det er vist at S100A4 induserer en kaskade som involverer aktivering av G-proteiner, fosfolipase C og protein kinase C, økning av intracellulært kalsium og aktivering av ekstracellulær signal-regulert kinase 1 og 2 (ERK 1/2) [50, 57]. I andre celledystemer er ekstracellulært S100A4 vist å stimulere aktivitet av transkripsjonsfaktoren NF- κ B [52, 59], men den funksjonelle betydningen av dette er foreløpig ikke kartlagt.

NF-κB

Transkripsjonsfaktoren Nuclear Factor κB (NF-κB) ble oppdaget for 20 år siden, og fikk navnet NF-κB på grunn av binding til den transkripsjonelle enhanceren til immunoglobulin κ lett kjede i B-celler. NF-κB regulerer mange fysiologiske prosesser, blant annet medfødt og ervervet immunrespons, celledød, inflammasjon og utvikling og progresjon av kreft. Over 200 fysiologiske stimuli er vist å aktivere NF-κB. Disse inkluderer bl.a. bakterier, virus, cytokiner, vekstfaktorer, ioniserende og ultrafiolett stråling og produkter skilt ut fra nekrotiske celler [60-62].

NF-κB familien

Hos mennesker er det identifisert fem medlemmer av NF-κB familien, p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50/p105 og p52/p100. NF-κB transkripsjonsfaktorer dannes ved homo- eller heterodimerisering av disse. Alle medlemmene av NF-κB familien inneholder et N-terminalt domene kalt rel-homologidomenet (RHD). Dette området binder DNA og er avgjørende for dimerisering. p65, c-Rel og RelB inneholder i tillegg et transkripsjonsaktiverende domene, og er dermed i stand til å aktivere transkripsjon ved binding til DNA. Tross strukturelle likheter og evnen til å binde relaterte DNA-sekvenser har genetiske studier vist at de ulike NF-κB subenhetene har distinkte og ikke-overlappende egenskaper [62].

Signalveier

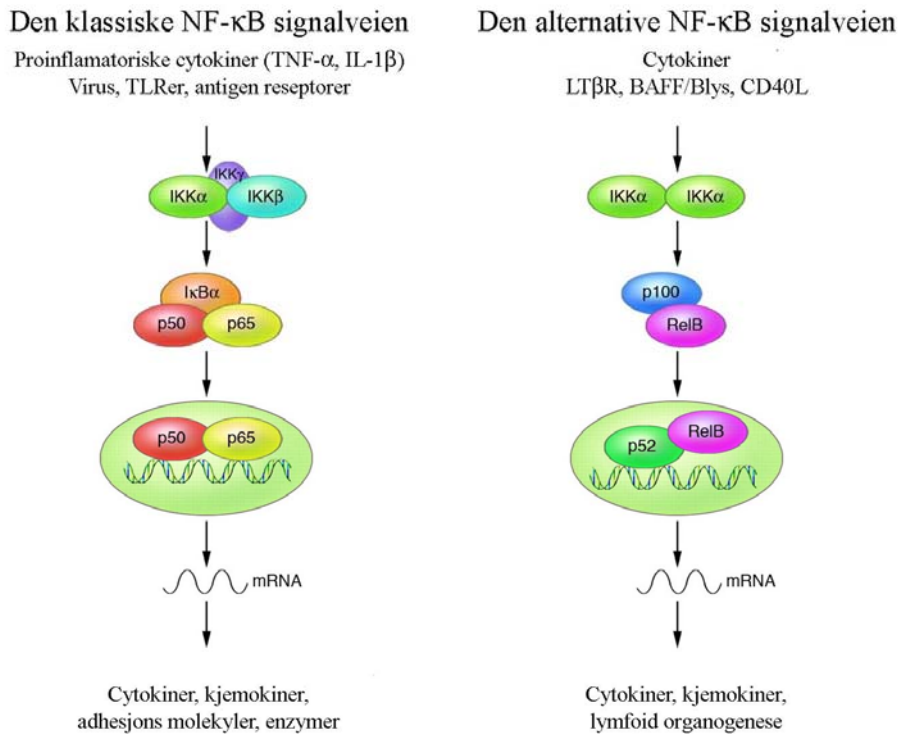
NF-κB kan aktiveres via flere signalveier. Hovedsaklig er signaleringen kontrollert av inhibitorer av NF-κB (IκBer) og inhibitor av NF-κB kinaser (IKKer) gjennom to signalveier, den klassiske og den alternative signalveien (også kalt den kanoniske og den ikke-kanoniske signalveien).

NF-κB dimerer holdes normalt i cytosol ved binding til inhibitorer kalt inhibitorer av NF-κB (IκBer). Hos mennesker er det tre ulike IκBer, IκBα, IκBβ og IκBε. Disse fungerer ved å maskere et kjernelokaliseringssignal i rel-homologidomenet. For IκBα er denne maskeringen ikke fullstendig, og IκBα-NF-κB komplekset transporteres frem og tilbake mellom kjernen og cytoplasma. Transport ut av kjernen medieres av et kjerneeksporteringssignal (NES), som sørger for at komplekset raskt transporteres tilbake til cytoplasma [62].

p50 og p52 dannes ved proteolytisk nedbrytning av proteinene p105 og p100, som fungerer som I κ B-lignende proteiner og retineres dermed i cytoplasma. Prosessering av p105 og p100 kan skje gjennom flere ulike signalveier og er nødvendig for at p50 og p52 kan fungere som transkripsjonsfaktorer i kjernen [62].

I den klassiske NF- κ B signalveien vil stimulering av celler med ulike agens føre til aktivering/fosforylering av inhibitor av NF- κ B kinase komplekser, IKKer. IKK komplekset består av to kinaser, IKK α og IKK β , samt den katalytiske subenheten IKK γ , også kalt NEMO. Aktivert/fosforylert IKK β vil deretter fosforylere I κ B proteiner og dermed merke dem for polyubiquitinerings og påfølgende proteasom-mediert degradering. NF- κ B dimerer kan således frigjøres, translokere til kjernen og dermed regulere transkripsjon (figur 3) [62, 63].

Den alternative signalveien fører til spesifikk aktivering av p52:RelB heterodimerer. Før cellestimulering holdes p100:RelB dimerer i cytoplasma. Ved aktivering av IKK α -homodimerer fosforyleres p100 og merkes dermed for proteolytisk nedbrytning til p52. p52:RelB dimerer kan deretter translokere til kjernen der de virker som transkripsjonsfaktorer (figur 3) [62].



Figur 3: Skisse av den klassiske og den alternative NF-κB signalveien. Eksempel på stimuli som aktiverer de ulike signalveiene er angitt.

IKKα og IKKβ aktiveres ved fosforylering av spesifikke seriner, men de molekylære mekanismer og signalveier ansvarlig for denne fosforyleringen, er ikke fullstendig klarlagt. Flere ulike mekanismer er vist å kunne bidra, bl.a. aktivering av oppstrøms kinaser, ubiquitinering og autofosforylering [64].

I og med at NF-κB aktivering spiller en sentral rolle i flere viktige biologiske prosesser, vil økt kunnskap om NF-κB signalveien og dens regulering være av stor betydning. Det er også overveiende sannsynlig at NF-κB signalveien i fremtiden vil være et viktig terapeutisk angrepspunkt ved flere ulike sykdommer.

Bakgrunn for oppgaven

Under arbeidet med denne oppgaven har jeg jobbet med stipendiat Kjetil Boye på et prosjekt jeg også var involvert i da jeg hadde sommerjobb ved Avdeling for tumorbiologi, Rikshospitalet – Radiumhospitalet HF, sommeren 2006. Prosjektet dreier seg om analyser av signaltransduksjonsmekanismer involvert i S100A4-indusert aktivering av transkripsjonsfaktoren NF- κ B og identifisering av målgener. Arbeidet har resultert i et manuskript med tittelen “Activation of NF- κ B by extracellular S100A4; analysis of signal transduction mechanisms and identification of target genes”, som er innsendt til vurdering i tidsskriftet *Molecular Cancer Research* [65].

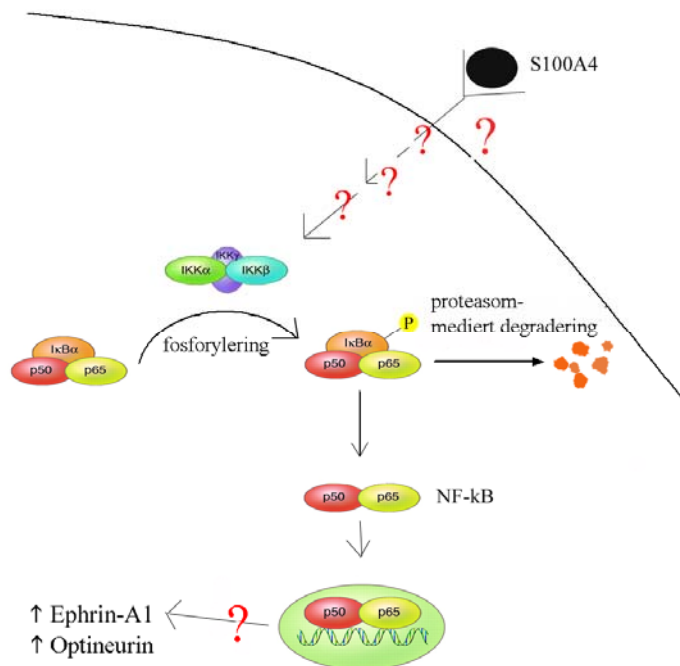
Forskningsgruppen har i flere år studert betydningen av proteinet S100A4 i kreftutvikling og spredning, og har vist at ribozym-mediert nedregulering av S100A4 kan resultere i redusert metastasepotensiale [26]. I disse studiene ble den humane osteosarkomcellelinjen OHS benyttet. Celler med redusert ekspresjon av S100A4 fikk navnet II-11b, og i dette cellesystemet er redusert metastasepotensial vist å være knyttet til redusert MT1-MMP-mediert aktivering av proteasen MMP2 [43]. Tidligere har gruppen også vist at ekstracellulær S100A4 aktiverer NF- κ B i det samme cellesystemet [52]. NF- κ B spiller en sentral rolle i prosesser som inflammasjon, metastasering, apoptose og stimulering av proliferasjon, og sammenhengen mellom ekstracellulær S100A4 og aktivering av NF- κ B var således interessant å studere videre.

I arbeidet med nevnte artikkel ble S100A4-indusert aktivering av NF- κ B kartlagt i et utvalg humane cellelinjer. Dette inngår som første del av masteroppgaven. Det videre arbeidet med kartlegging av hvordan S100A4 induserer aktivering av NF- κ B, og identifisering av NF- κ B-aktiverede målgener er hovedsaklig gjort i cellelinjen II-11b. I visse forsøk er modercellelinjen OHS inkludert for kontrollformål.

Ved hjelp av mikromatriseanalyser av ubehandlede og S100A4-behandlede celler (OHS og II-11b) ble det funnet en rekke gener som signifikant lot seg regulere ved tilsetning av S100A4. Blant disse er ephrin-A1 (et membranprotein som bl.a. er involvert i cellemotilitet og metastasering) og optineurin (et protein med hovedsaklig ukjent funksjon). S100A4-indusert aktivering av ephrin-A1 og optineurin ble validert ved flere ulike teknikker. Som andre del av denne masteroppgaven ble det kjørt forsøk for å undersøke om S100A4-indusert ekspresjon

av ephrin-A1 og optineurin var avhengig av NF- κ B. Dette ble gjort ved å behandle II-11b celler med hemmere av NF- κ B signalveien.

Når celler behandles med ekstracellulær S100A4 kan en tenke seg at proteinet bindes til en reseptor på plasmamembranen og at det induseres et signal som transporteres innover i cellen. Som beskrevet tidligere i innledningen er identiteten til en potensiell S100A4 reseptor, eller signalene som transporteres innover i cellen ikke kartlagt. Det vi visste før arbeidet med denne oppgaven startet var at S100A4 kunne forårsake fosforylering av I κ B α , og dermed videre aktivering av NF- κ B via den klassiske signalveien (figur 4). I den siste delen av oppgaven har vi studert signalveier nødvendig for S100A4-indusert aktivering av NF- κ B. Vi har benyttet hemmere av andre intracellulære signaltransduksjonsmekanismer og har undersøkt om G-protein koblede reseptorer, protein kinase C, fosfolipase C, fosfatidylinositol-3-kinase, tyrosin kinaser og/eller serin/treonin kinaser er involvert i signaloverføringen.



Figur 4: Spørsmålsteget i figuren angir hovedfokus i denne oppgaven: undersøke om NF- κ B aktivitet var nødvendig for S100A4-indusert ekspresjon av ephrin-A1/optineurin og studere signalveier som forårsaker S100A4-indusert aktivering av IKK-komplekset.

Materialer og metoder

Cellelinjer

S100A4-indusert aktivering av transkripsjonsfaktoren NF- κ B ble undersøkt i et utvalg humane kreftcellelinjer. Fire osteosarkomcellelinjer (OHS, II-11b, Saos-2 og U2OS), tre brystkreftcellelinjer (PM-1, MA-11 og SK-BR-3), fire cellelinjer fra kolorektalkreft (HCT 116, HCT 116 p53 -/-, SW620 og WiDr), tre cellelinjer fra malignt melanom (LOX, FEMX og MeWo) samt HeLa, en cellelinje fra livmorhalskreft er undersøkt. I det videre arbeidet med kartlegging av mekanismer for S100A4-indusert NF- κ B aktivering og induksjon av nedstrøms gener, ble den humane osteosarkomcellelinjen II-11b benyttet [26].

Celledyrking

Cellene ble dyrket i dyrkingsmedium, RPMI-1640 med 10 % kalveserum (FBS), 1 mM HEPES og 2 mM Glutamax, ved 37 °C (bilag 1). Hver tredje til fjerde dag ble cellene splittet (løsnet og sådd tynnere ut igjen). Ved utsåing til forsøk (med unntak av transfeksjonsforsøkene) ble cellene løsnet med Trypsin (Trypsin-EDTA hhv 500mg/l og 200mg/l), resuspendert i dyrkingsmedium og telt i Bürkerkammer. Cellene ble deretter spunnet ned ved 5000 rpm i 5 min og resuspendert i dyrkingsmedium. I celforsøk til proteinisolering ble $1,5 \times 10^6$ celler sådd ut per flaske (dyrkingsareal 25 cm²). For RNA-isolering ble det brukt 6-brønns brett (dyrkingsareal 9,6 cm²) og 6×10^5 celler ble sådd ut per brønn. Til forsøk i 6-brønns brett ble det brukt dyrkingsmedium som angitt over tilsatt 50 µg/ml penicillin og 50 U/ml streptomycin. Dyrkingsbrett ble inkubert i CO₂-inkubator med vannbad i bunnen ved 37 °C. Flasker ble inkubert i CO₂-fri inkubator ved 37 °C.

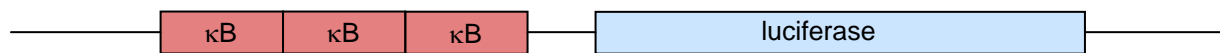
Rekombinant S100A4

S100A4-proteinet er et histidin-merket museprotein produsert i *E. coli* ved transfeksjon med vektoren pQE30 inneholdende sekvens for S100A4. Proteinet er rensert på nikkel-kolonne og ved dialysering mot PBS. Proteinets renhet er undersøkt ved sølvfarging av en SDS-polyakrylamidgel og identiteten til proteinet er verifisert ved Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight (MALDI-TOF). Proteinet er fordelt i alikvoter og lagret ved -70 °C.

Celleforsøk

NF- κ B aktivitetsassay

For måling av NF- κ B aktivitet i humane kreftceller ble celler transfektert med et reporterplasmid. Konstruktet inneholder tre NF- κ B responselementer (sekvenser identiske med κ B enhanceren til Ig κ lett kjede) som styrer uttrykk av enzymet luciferase [66]. Luciferaseaktivitet kan dermed benyttes som et indirekte mål på NF- κ B aktivitet i de transfekterte cellene.



Figur 5: Skisse av reporterplasmidet som inneholder tre NF- κ B responselementer som styrer luciferaseuttrykk.

2×10^6 celler ble transfektert med $10 \mu\text{g}$ NF- κ B reporterplasmid ved elektroporering ved 240V i 26 ms (Electro square porator ECM 830, BTX, Genetronics Inc, Genetronics, SanDiego, USA) i en 4 mm elektroporeringskvyette (Electroporation cuvettes plusTM, BTX, MA, USA). De elektrobehandlede cellene ble tilsatt dyrkingsmedium, sådd ut i 24-brønns brett , 2×10^5 celler ($400 \mu\text{l}$) per brønn (dyrkingsareal $1,9 \text{ cm}^2$) og inkubert over natt. Påfølgende dag ble mediet byttet til dyrkingsmedium med eller uten $20 \mu\text{g/ml}$ rekombinant S100A4. Etter 24 timers inkubering ble cellene høstet og luciferaseaktivitet målt som angitt i vedlagt protokoll (bilag 2). Tallmaterialet fra målingene ble bearbeidet i programvaren Excel og NF- κ B aktivitet uttrykt som antall ganger induksjon i forhold til nivået i ubehandlede celler. Alle forsøk ble repetert minst tre ganger, og i hvert forsøk er det tre paralleller av hver prøve.

Behandling av celler med inhibitorer

II-11b celler ble behandlet med 20 µg/ml rekombinant S100A4 og hemmere av NF-κB signalveien (bortezomib og Bay 11-7082), samt hemmere av andre intracellulære signalveier (H-7, staurosporin, U-73122, compound 48/80, genistein, suramin, GF109203X og LY294002). De benyttede inhibitorer og deres ”angrepspunkt i cellen” er vist i tabell 1. Brukte konsentrasjoner er valgt på grunnlag av IC₅₀/K_i-verdier og konsentrasjoner funnet brukt i tilsvarende forsøk i tilgjengelig litteratur (tabell 2). Konsentrasjon av S100A4 er valgt på grunnlag av tidligere dose-respons forsøk i II-11b celler transfektert med NF-κB reporterplasmid [65].

Tabell 1: Brukte inhibitorer, inhiberingsmål og K_i/IC₅₀

Inhibitor	Hemmer	K _i */IC ₅₀	Løst i [§]	Ref [%]
Bortezomib (Velcade)	Proteasom-mediert protein nedbrytning		0,9 % NaCl	[67]
Bay 11-7082	Cytokin-indusert IκBα-fosforylering		DMSO	[68]
H-7	Serin/treonin kinaser	PKA: K _i = 3,0 µM PKC: K _i = 6,0 µM PKG: K _i = 8,5 µM Myosin lett-kjede kinase: K _i = 97 µM	H ₂ O	[69]
Staurosporin	Protein kinaser	PKA: IC ₅₀ = 7 nM PKC: IC ₅₀ = 700 pM PKG: IC ₅₀ = 8,5 nM CaM kinase: IC ₅₀ = 20 nM Myosin lett-kjede kinase: IC ₅₀ = 1,3 nM	DMSO	[70]
GF109203X	Protein kinaser	PKC (gr. A): IC ₅₀ = 8-20 nM PKA: IC ₅₀ = 2000 nM PhK: IC ₅₀ = 700 nM	DMSO	[71]
Suramin	G-protein koblede reseptorer		H ₂ O	[72]
Genistein	Protein tyrosin kinaser		DMSO	[73]
LY294002	Fosfatidylinositol-3-kinase	IC ₅₀ : 1,4 µM	DMSO	[74]
U-73122	Fosfolipase C	IC ₅₀ : 1,0-2,1 µM	Etanol	[75]
Compound 48/80	Fosfolipase C		H ₂ O	[76]

* K_i/IC₅₀-verdi oppgitt i produktdatablad

§ Løsningsmiddel

% Referense til produktdatablad

Tabell 2: Konsentrasjoner av inhibitorer benyttet i oppgave og i gjennomgått litteratur.

Inhibitor	Kons funnet brukt	Ref.	Konsentrasjoner benyttet i oppgaven
Bortezomib (Velcade)		[77]	5 og 15 nM
Bay 11-7082	2,5, 5 og 25 μ M	[78, 79]	2,5, 5 og 10 μ M
H-7	2,5 μ M – 30 μ M	[80, 81]	5, 10, 15 og 30 μ M
Staurosporin	0,1 nM – 100 nM	[82, 83]	2, 10, 30 og 100 nM
U-73122	0,5 μ M – 10 μ M	[50, 84, 85]	1 og 6 μ M
Compound 48/80		[86, 87]	12,5, 25 og 50 μ M
Genistein	10 og 100 μ M	[57, 85]	10 og 60 μ M
Suramin	100 μ M	[57]	100 og 600 μ M
GF109203X	0-10 μ M	[88, 89]	2 og 12 μ M
LY294002	0,5 og 50 μ M	[85]	50 μ M

Celler ble sådd ut og inkubert over natt. Påfølgende dag ble mediet sugd av og nytt dyrkingsmedium med eller uten inhibitor ble tilsatt. Etter en times inkubering ble rekombinant S100A4 tilsatt. Tid før høsting varierte avhengig av om RNA eller protein skulle isoleres, og hvilket protein som senere skulle analyseres (presiseres senere i avsnittet).

Ved høsting til protein ble mediet sugd av, cellene vasket i 5 ml iskald PBS, før skraping i 5 nye ml iskald PBS. Cellene ble sentrifugert (5000 rpm, 5 min) og tørr pellet frosset ved -70 °C for senere proteinisolering og analyse av aktuelle proteiner (bilag 5). For høsting av celler til RNA-isolering ble cellemediet sugd av, cellene vasket med iskald PBS og lysert med Trizol (500 μ l per brønn i 6-brønns brett). Trizollysatsatet ble frosset ved -70 °C for senere RNA-isolering (bilag 8).

For å undersøke om S100A4-indusert ekspresjon av ephrin-A1 og optineurin er avhengig av NF- κ B ble II-11b celler behandlet med hemmere av den klassiske NF- κ B signalveien, bortezomib og Bay 11-7082. Varighet av behandling ble valgt på grunnlag av tidligere tid-respons forsøk i II-11b celler der S100A4-indusert ekspresjon av ephrin-A1 og optineurin er undersøkt [65]. Celler til proteinisolering ble høstet 24 timer etter tilsetning av rekombinant S100A4, mens celler høstet til RNA er høstet 4 timer etter tilsetning av rS100A4.

Proteinnivåer av fosforylert I κ B α er brukt som mål på aktivitet i den klassiske NF- κ B signalveien. For undersøkelse av signaltransduksjonsmekanismer nødvendig for NF- κ B aktivering ble cellene behandlet i 1 time med rekombinant S100A4 i serumfritt medium.

Varighet av behandling med rekombinant S100A4 er valgt på grunnlag av tidligere tidsforsøk med S100A4-behandlede II-11b celler og detektering av fosforylert I κ B α [65].

I alle forsøk ble negativ og positiv kontroll inkludert, henholdsvis celler uten noen form for behandling og celler kun behandlet med rekombinant S100A4. I forsøk der hemmere er løst i DMSO eller etanol er det også inkludert kontroll der celler er behandlet med løsningsmiddelet i tilsvarende konsentrasjoner.

Proteinisolering, Polyakrylamid Gel Elektroforese (PAGE) og Western analyser

For proteinisolering med påfølgende detektering av fosforylert I κ B α ble det brukt lyseringsbuffer med protease- og fosfatasehemmere, ellers er det brukt lyseringsbuffer med proteasehemmere (bilag 3). Proteinkonsentrasjon ble målt ved bruk av BCATM Protein Assay Kit (bilag 4) og lik proteinmengde fra hver prøve ble applisert på en 12 % SDS-PAGE-gel (best separering i området 15-50 kDa). Etter separering på gel og overføring til Immobilon-P PVDF membran (0,45 μ m porestørrelse) (Millipore, Bedford, MA, USA), ble membranene immunfarget med antistoff etter vedlagt prosedyre. Prosedyrer for SDS-PAGE og immunblotting finnes i bilag 5. Betingelsene for de enkelte antistoffene er listet i tabell i bilag 6.

Protein fra celleforsøk med Bay 11-7082 og bortezomib, hemmere av den klassiske NF- κ B signalveien, ble etter overføring til membran immunfarget med antistoff mot ephrin-A1 og α -tubulin. Proteinlysate fra forsøk med Bay 11-7082 ble også immunfarget med antistoff mot fosforylert-I κ B α . Proteinlysate fra forsøk med hemmere av andre intracellulære signalveier ble immunfarget med antistoff mot fosforylert I κ B α . Som kontroll på mengde protein applisert ble det immunfarget med α -tubulin. Immunfargede membraner ble behandlet med ECL-reagens (bilag 5). Signalet som produseres er et mål for mengde målprotein på membranen. Filmene ble vurdert visuelt, scannet og figurer laget i programvaren Adobe Photoshop. I tillegg er signalene på enkelte av filmene kvantifisert ved densitometrisk scanning for å få et kvantitativt mål på effekt.

Forsøkene med bortezomib er utført i tre biologiske paralleller, alle analysert ved Western immunoblot. Forsøkene med Bay 11-7082 er utført i fire biologiske paralleller, disse er

analysert to ganger på proteinnivå (Western immunoblot), samt to ganger på RNA-nivå ved at det ble gjort en kvantitativ PCR analyse (se nedenfor). Forsøk med hemmere av andre intracellulære signalveier er kjørt i to biologiske paralleller, begge analysert ved immunfarging med fosforylert IκBα.

RNA-isolering

RNA ble isolert etter vedlagt prosedyre (bilag 8), RNA konsentrasjoner ble målt på GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Sydney, Australia), og cDNA syntese kjørt med 1 µg total-RNA (iCycler, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Ekspresjon av ephrin-A1 og optineurin ble deretter analysert ved real-time RT-PCR (iCycler, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). cDNA-syntese og real-time RT-PCR ble utført i samarbeid med Tove Øyjord, Avdelingsingeniør, Avdeling for tumorbiologi. Nøyaktig beskrivelse av dette er ikke inkludert i oppgaven.

Prinsippet for PCR er at det benyttes to primere for hvert transkript som skal analyseres. Med RNA som utgangspunkt må det kjøres en revers-transkriptase reaksjon for å lage en DNA-tråd (cDNA) før PCR reaksjonen igangsettes. iScript revers-transkriptase (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) ble benyttet og reaksjonen startet fra en oligo-dT primer som hybridiserte til polyA-halen i mRNA. PCR reaksjonen starter med oppvarming til 95 °C, dette denaturerer DNA slik at det dannes enkeltråder. Primerne binder seg (annealer) til sin komplementære sekvens i DNA når temperaturen senkes til ca 50 °C. Ved å øke temperaturen til rundt 70 °C vil enzymet Taq polymerase (iTaq™ DNA-polymerase, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) ta utgangspunkt i den hybridiserte primersekvensen og syntetisere ny DNA ut fra denne. Ved at det kjøres mange syklus der temperaturen endres fra ca 50 °C (annealing) til 72 °C (syntese) og videre til 95 °C der DNA trådene denatureres, kan det produseres store mengder av et DNA fragment. For kontrollformål ble et transkript YARS, en tRNA syntetase som skal uttrykkes like mye i alle celler, analysert samtidig. Sekvens for PCR-primere og oppsett for real-time-PCR er angitt i bilag 9.

Immunpresipitering

IKK komplekset ble forsøkt immunpresipitert for å analysere hvorvidt IKK β var fosforylert. Immunpresipitatet ble kjørt på SDS-PAGE, og etter overføring til membran immunfarget med antistoff mot IKK β for å se om IKK-komplekset var presipitert. Vi var ikke i stand til å få større mengde protein på gel etter immunpresipitering enn når totalt cellelysat ble satt direkte på gel. Mengde antistoff, protein og sepharose-kuler ble forsøkt variert for å trekke ut mer protein. Kulemengden hadde ingen betydning (overskudd i utgangspunktet), men økte mengder protein og antistoff ga bedre utbytte. To ulike buffere for eluering av immunpresipitatet ble også benyttet (bilag 7)

Etter at tilfredsstillende utbytte var oppnådd forsøkte vi å farge membranen med antistoff mot fosforylert IKK α/β . Proteinlysat fra SW480 og TNF α -behandlede II-11b celler ble benyttet som positive kontroller. Dessverre fikk vi mye uspesifikk binding i området for IKK (IKK α : 85 kDa, IKK β : 87 kDa) både for totalt cellelysat og immunpresipitat. Overraskende var det mer uspesifikk binding ved farging av immunpresipitatene enn ved farging av immunblott fra totalt cellelysat. Videre forsøk på optimalisering av prosedyren ble ikke prioritert. Fullstendig prosedyre for immunpresipitering finnes i bilag 7.

Kjemikalier og utstyr brukt til celledyrking, celleforsøk og Western analyser

Tabell 3: Celledyrking

Kjemikalie/utstyr	Firma
Electroporation cuvettes plus™	BTX, MA, USA
Føtalt bovint serum (kalveserum), FBS	Biochrome KG, Berlin, Tyskland
Glutamax	GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Storbritania
Hepes, 1M	GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Storbritania
Luciferase assay reagent, E1484	Promega, Madison, WI, USA
PBS	Bio-Whittaker, Verviers, Belgia
Penicillin/streptomycin	GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Storbritania
Reporter lysis buffer, 5x, E397A	Promega, Madison, WI, USA
RPMI 1640 uten L-glutamin (BE12-167F)	Bio-Whittaker, Verviers, Belgia
TNF α , Rekombinant Human TNF α /TNFSF1A, 210-TA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Trypsin (Trypsin-EDTA hhv 500 mg/l og 200 mg/l)	BioWhittaker, Verviers, Belgia
U73122 (662035)	Calbiochem, Darmstadt, Tyskland
Bay 11-7082 (B5556)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Velcade (bortezomib)	Levert fra Ullevål universitetssykehus, Oslo, Norge
Compound 48/80 (C2313)	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Genistein (345834)	Calbiochem, Darmstadt, Tyskland
GF109203X (G 2911)	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
H-7, Dihydroklorid (371955)	Calbiochem, Darmstadt, Tyskland
LY294002 (#9901)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Staurosporin (569397)	Calbiochem, Darmstadt, Tyskland
Suramin, natrium Salt (574625)	Calbiochem, Darmstadt, Tyskland

Tabell 4: Løsninger og kjemikalier til SDS-PAGE, Western immunblotting og IP

Kjemikalie/ utstyr	Firma
Aceton, 1.00014.2500	Merck, Darmstadt, Tyskland
Akrylamid, 30% (#1610156)	Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA
Aprotinin (A4529)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
APS	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
BCA™ Protein Assay Kit (#23225)	Pierce, Rockford, IL, USA
Bromfenolblått, 540L307222	Merck, Darmstadt, Tyskland
β-glyserolfosfat, G-9891	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Blot Qualified BSA (W384A),	Promega, Madison, WI, USA
β-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DTT	GibcoBRL, Paisley, Skottland
ECL: Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate (#34076)	Pierce, Rockford, IL, USA
Eddiksyre, 1.00063.2500	Merck, Darmstadt, Tyskland
Glycin (K36026501 626)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Glyserol (G7893)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Immobilon-P PVDF membran (0,45µm)	Millipore, Bedford, MA, USA
Isopropanol	Arcus Kjemi AS, Vestby, Norge
Leupeptin Hemisulfat (L2884)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol, 101586B	Anala R, BDH, Poole, England
Natriumklorid (K35518404 601)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natrium ortovanadat, S-6508	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Naphtol Blue Black, N-3005	Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA
Natriumflorid (S1504)	Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA
Nonidet P40, 19628	USB, Cleveland, Ohio, USA
Pepstatin A (P 4265)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMSF, Fenylmetylsulfonyl fluorid (P7626)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (#161-0374)	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Protein A sepharose kuler, 17-0974-01	Amersha Biosciences AB, Uppsala, Sverige
SDS, natrium dodecylsulfat (L824960 341)	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
SDS-solution 20 % (161-0418)	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Skummetmelkpulver, Art no: 3811	Tine BA, Oslo, Norge
Spin-X-rør, 0,22 µM, 8161	Corning Incorporation, NY, USA
TEMED (PlusOne)	GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA
Tris (hydroksymetyl)-aminometan (8382X012 621)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tween 20 (54530284 610)	Merck, Darmstadt, Tyskland
X-omat UV film	Kodak, Oslo, Norge
X-omat UV kassetter	Kodak, Oslo, Norge
Monoklonalt anti-α-Tubulin (CP06)	Calbiochem, Darmstadt, Tyskland
Polyklonalt anti-ephrin-A1	Santa-Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, USA

Kjemikalie/utstyr	Firma
Polyklonalt anti-fosfo-IKK α / β (ser176/180) (#2687)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Polyklonalt anti-fosfo-I κ B α (ser 32/36) (5A5) (#9246)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Polyklonalt anti-IKK α (#2682)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Polyklonalt anti-IKK β (#2678)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Polyklonalt geit anti-kanin immunoglobulins HRP-merket (P0448)	DAKO, Glostrup, Danmark
Polyklonalt kanin anti-mus immunoglobulin HRP-merket (P0260)	DAKO, Glostrup, Danmark

Tabell 5: RNA isolering

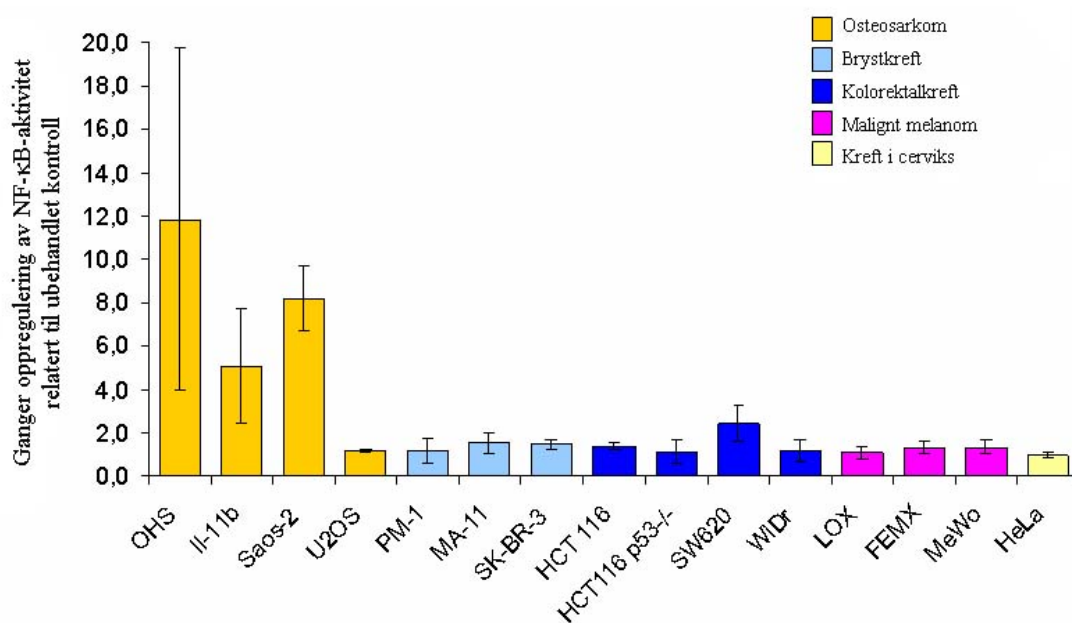
Kjemikalie/utstyr	Firma
Trizol TM	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Kloroform, 1.02445.2500	Merck, Darmstadt, Tyskland
Isopropanol	Arcus Kjemi AS, Vestby, Norge
Etanol	Arcus Kjemi AS, Vestby, Norge

Resultater

Ekstracellulært S100A4 stimulerer NF-κB aktivitet i enkelte humane kreftcellerlinjer

Forskningsgruppen har tidligere vist at ekstracellulært S100A4 aktiverer transkripsjonsfaktoren NF-κB i osteosarkomcellerlinjen II-11b [52]. Det er arbeidet videre med denne sammenhengen og senere vist en doseavhengig stimulering av NF-κB aktivitet ved tilsetning av rekombinant S100A4 til disse cellenes dyrkingsmedium.

I innledende forsøk ble S100A4-indusert aktivering av NF-κB undersøkt i et utvalg humane kreftcellerlinjer. Figur 6 viser gjennomsnittlig antall ganger økning av NF-κB aktivitet i celler transfektert med NF-κB reporterplasmid og deretter behandlet med rekombinant S100A4. I fire av de 15 undersøkte kreftcellerlinjene sees en signifikant økning i NF-κB aktivitet. I cellerlinjen SW620 ble det observert en moderat økning i NF-κB aktivitet, mens de tre osteosarkomcellerlinjene OHS, II-11b og Saos-2 viste en betydelig S100A4-indusert stimulering av NF-κB aktivitet.



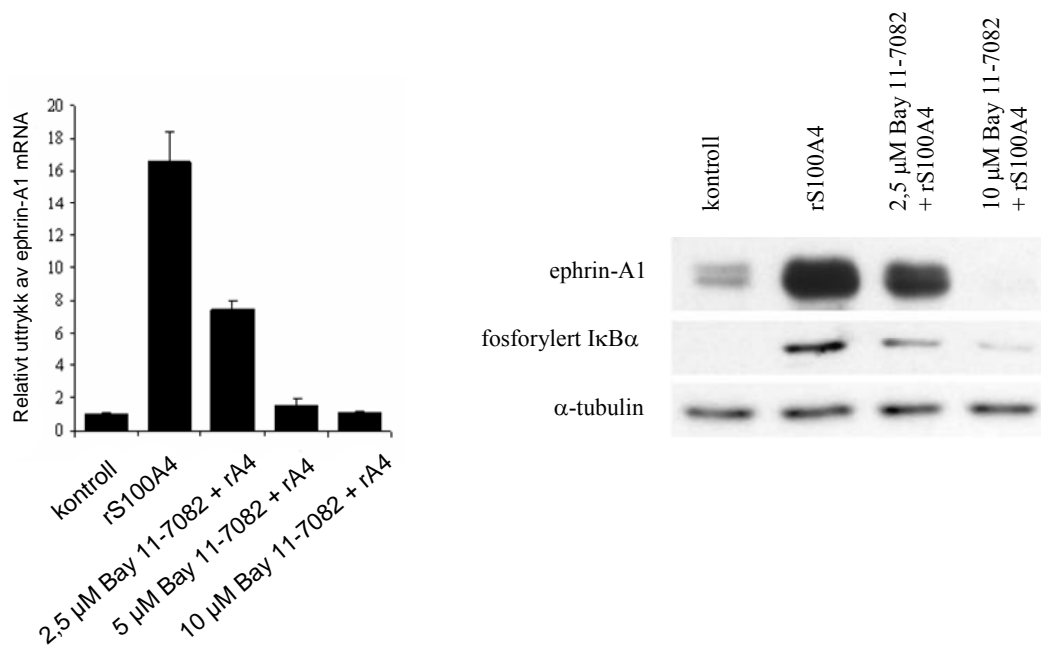
Figur 6: Figuren viser antall ganger økning i NF-κB aktivitet ved tilsetning av rekombinant S100A4 (20 µg/ml) til de angitte cellerlinjenes dyrkingsmedium. Cellene er transfektert med et reporterplasmid og luciferaseaktivitet analysert som et indirekte mål på NF-κB aktivitet. Standardavvik er beregnet for hver av cellerlinjene og er angitt på figuren.

II-11b celler er benyttet i de følgende forsøkene fordi denne cellelinjen uttrykker forholdsvis lave nivåer endogent S100A4. Det er da enklere å ha kontroll med den totale mengden S100A4 som finnes i dyrkingsmediet (summen av det som secernerer fra cellene og det som tilsettes i form av rekombinant protein).

S100A4-indusert ekspresjon av ephrin-A1 og optineurin er avhengig av aktivitet i den klassiske NF- κ B signalveien.

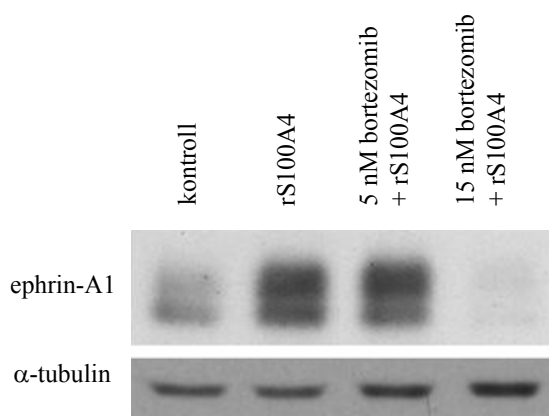
Mikromatriseanalyser identifiserte 136 gener som signifikant reguleres ved tilsetning av rekombinant S100A4 til II-11b celler. Ephrin-A1 og optineurin ble valgt som kandidatgener. I denne oppgaven er det undersøkt om S100A4-mediert induksjon av ephrin-A1 og optineurin i II-11b celler er avhengig av NF- κ B.

Figur 7A og 7B viser hhv mRNA- og proteinnivåer av ephrin-A1 i negativ og positiv kontroll og celler behandlet med rS100A4 (20 μ g/ml) og Bay 11-7082 i de angitte konsentrasjonene. Figurene viser en doseavhengig inhibering av S100A4-indusert ephrin-A1 ekspresjon ved behandling med Bay 11-7082. Ved behandling med 10 μ M Bay 11-7082 uttrykkes mindre ephrin-A1 enn det som observeres i ubehandlede celler. Dette tyder på at både basal og S100A4-indusert ephrin-A1 ekspresjon er avhengig av NF- κ B aktivitet. Bay 11-7082 hemmer IKK-aktivitet og dermed fosforylering av I κ B α . For å analysere om inhibering av ephrin-A1 ekspresjon korrelerer med hemming av I κ B α fosforylering ble de samme proteinlysatenes immunfarget med antistoff mot fosforylert I κ B α . Nivåene av fosforylert I κ B α . (figur 7B) viser at aktiviteten i den klassiske NF- κ B signalveien reduseres med økende konsentrasjoner Bay 11-7082, og at dette samsvarer med hemming av ephrin-A1.



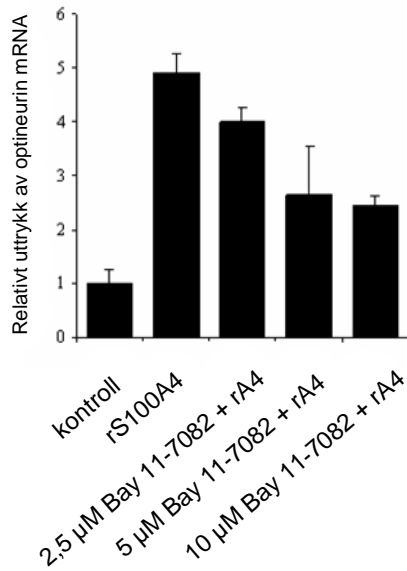
Figur 7: A, mRNA-nivåer av ephrin-A1 i II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 µg/ml) og IKK-inhibitoren Bay 11-7082. mRNA-nivåene er analysert ved real-time RT-PCR og er oppgitt som relativt uttrykk i forhold til negativ kontroll. B, Western blot av proteinlysat fra celler behandlet med rS100A4 (20 µg/ml) og Bay 11-7082, immunfarget med anti-ephrin-A1, anti-fosforylert IκBα og anti-α-tubulin (loadingkontroll).

I II-11b celler behandlet med bortezomib, en inhibitor av proteasom-mediert proteindegradering og dermed også nedbrytning av IκBα, ble det også observert en doseavhengig inhibering av S100A4-indusert ephrin-A1 ekspresjon (figur 8). Ved behandlingsskonsentrasjoner på 15 nM er ephrin-A1 nivåene lavere enn i de ubehandlede cellene.



Figur 8: Immunblott av proteinlysat fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 µg/ml) og bortezomib i de angitte konsentrasjoner. Figuren viser nivåer av ephrin-A1 og α-tubulin (loadingkontroll).

Figur 9 viser mRNA-nivåer av optineurin i ubehandlede II-11b celler og induisert ekspresjon ved behandling med rekombinant S100A4 (20 µg/ml). Videre ses en doseavhengig reduksjon i optineurinnivåer ved behandling av II-11b celler med rS100A4 og Bay 11-7082 i økende konsentrasjoner.



Figur 9: mRNA-nivåer av optineurin i ubehandlede II-11b celler, celler behandlet med rS100A4 (20 µg/ml) og celler behandlet med rS100A4 (20 µg/ml) og Bay 11-7082 i de oppgitte konsentrasjonene. mRNA nivåene er analysert vha real-time RT-PCR og uttrykt som relativ ekspresjon i forhold til ubehandlede celler.

Totalt sett viser disse forsøkene tydelig at S100A4-indusert ekspresjon av ephrin-A1 og optineurin er avhengig av aktivering av den klassiske NF-κB signalveien.

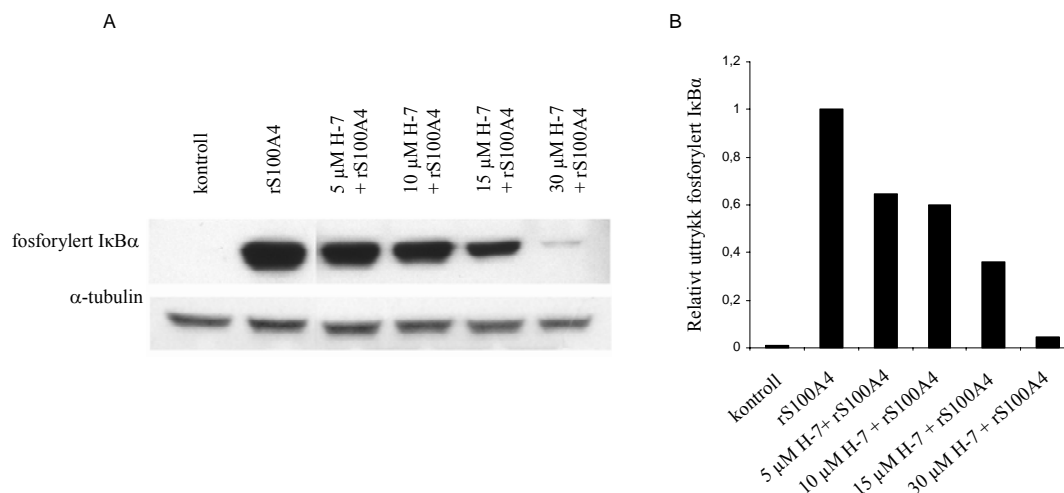
Behandling av II-11b med hemmere av intracellulære signalveier

NF-κB aktiveres hovedsaklig via to signalveier. Den klassiske signalveien karakteriseres ved fosforylering og påfølgende proteasom-mediert degradering av IκBα, mens den alternative signalveien fører til prosessering av p100 til p52. Før arbeidet med denne oppgaven begynte var det vist at ekstracellulært S100A4 resulterte i økt fosforylering av IκBα. Aktivitet i den alternative signalveien var blitt avkrefet ved at ingen prosessering av p100 til p52 ble observert. Betydningen av den klassiske signalveien ble videre verifisert ved overuttrykk av en dominant negativ variant av IκBα, som ikke kan fosforyleres og degraderes. Overuttrykk av denne varianten ga en nesten fullstendig inhibering av S100A4-indusert NF-κB aktivering,

og vi har derfor konkludert med at S100A4 aktiverer den klassiske delen av signalveien [65]. Hvordan S100A4-induserte signaler formidles fra plasmamembranen og resulterer i aktivering av IKK-komplekset er uklart. For å finne eventuelle signaltransduksjonsmekanismer nødvendig for overføring av disse signalene ble II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 µg/ml) og hemmere av ulike signaltransduksjonsveier. For å måle effekten av de ulike hemmerne ble Western blot og analyser av mengde fosforylert IκBα benyttet.

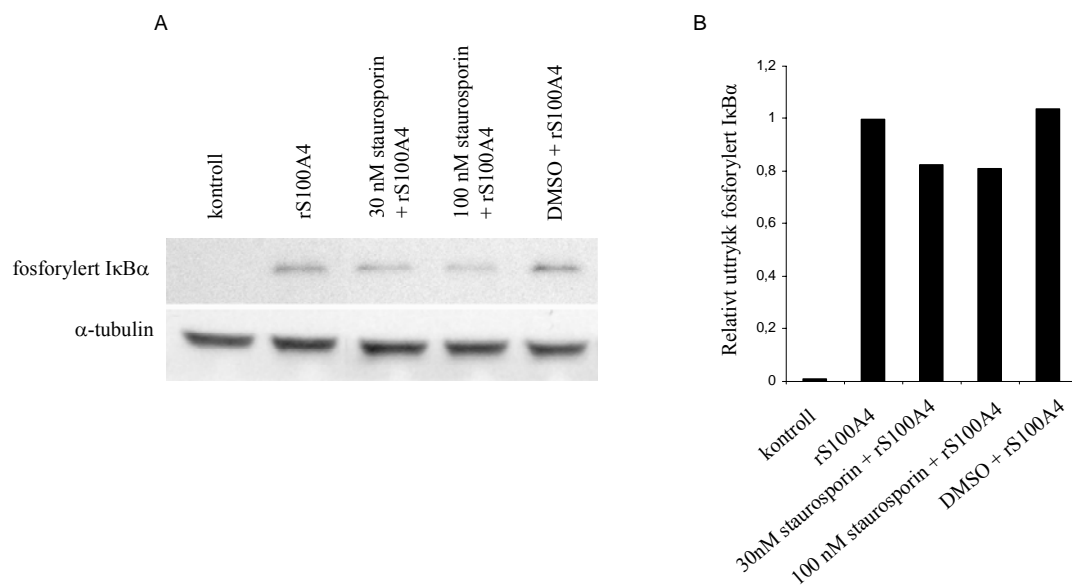
I forsøk der inhibitoren ble løst i DMSO eller etanol ble kontroll for dette inkludert. Verken DMSO eller etanol hadde tydelig inhiberende effekt på nivåer av fosforylert IκBα ved Western blot av proteinlysat fra II-11b celler. Ved densitometrisk måling av filmer fra forsøkene vises likevel en generell reduksjon i NF-κB aktivitet når DMSO eller etanol er tilsatt dyrkingsmediet (Figur 12, 14 og 15). I forsøk med inhibitorer løst i DMSO eller etanol er alle prøvene behandlet med inhibitor tilsatt samme mengde løsningsmiddel.

S100A4-indusert aktivering av NF-κB lot seg inhibere ved tilsetning av serin/treonin kinase hemmeren H-7 (figur 10). De to første sporene i figur 10 A viser negativ og positiv kontroll. Allerede i konsentrasjoner på 5 µM ses reduserte nivåer av fosforylert IκBα sammenlignet med positiv kontroll. Videre ses en doseavhengig inhibering av IκBα fosforylering med økende konsentrasjoner av H-7.



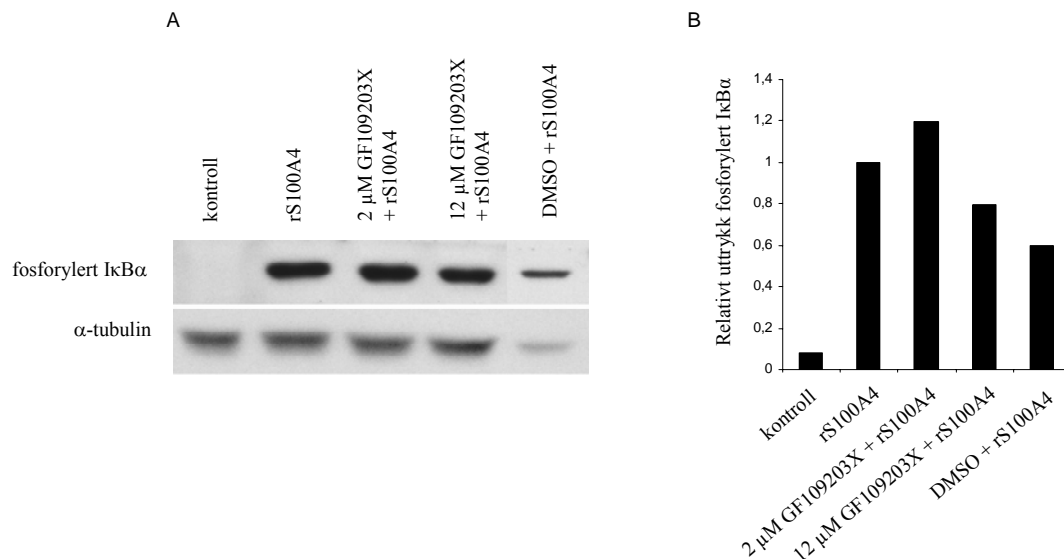
Figur 10: A, Immunblott av proteinlysat fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 µg/ml) og serin/treonin kinase hemmeren H-7 i de oppgitte konsentrasjonene. Figuren viser proteinuttrykk av fosforylert IκBα. α-tubulin er brukt som loadingkontroll. B, Grafisk fremstilling av verdier fra densitometrisk scanning oppgitt relativt til S100A4 behandlede celler.

Noe overraskende viste den relativt generelle protein kinase inhibitoren staurosporin ingen effekt på aktivitet i den klassiske NF- κ B signalveien (figur 11). Denne forbindelsen hemmer bl.a. PKA, PKC og PKG. Selv i konsentrasjoner godt over K_i -verdi (5,8 μ M for PKG) ses ingen overbevisende reduksjon i nivåer av fosforylert I κ B α . Ved densitometrisk måling (figur 11B) ses en liten nedgang i nivåer av fosforyert I κ B α , men dette er innenfor variasjonsområdet for de to biologiske parallellene som ble gjennomført.



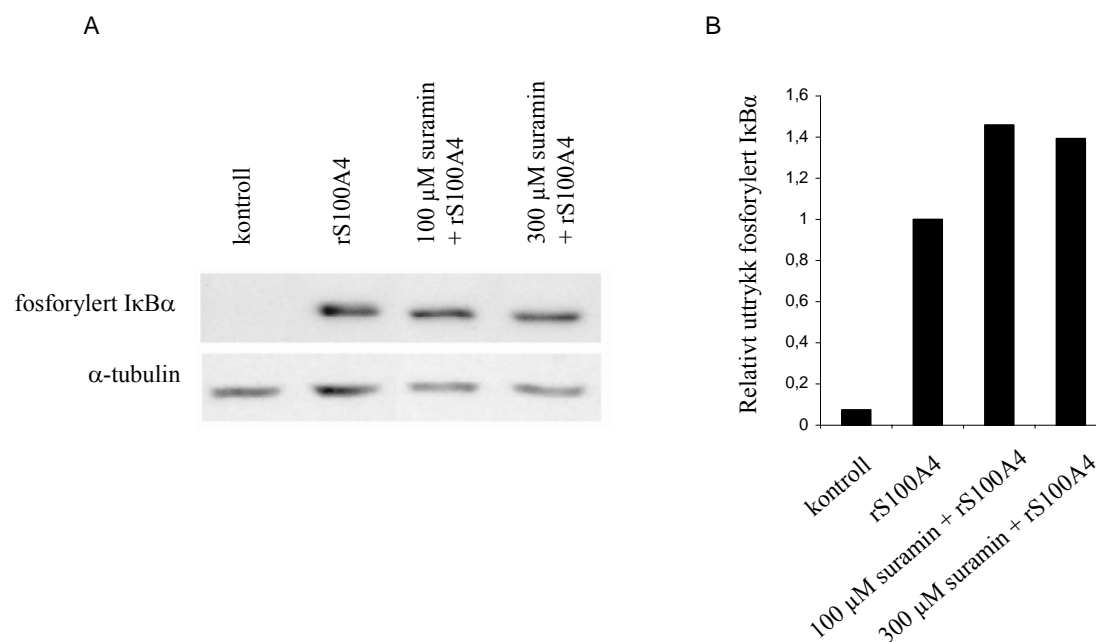
Figur 11: A, Immunblott av proteinlysat fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 μ g/ml) og protein kinase hemmeren staurosporin i de oppgitte konsentrasjonene. Figuren viser proteinnivåer av fosforylert I κ B α . α -tubulin er brukt som loadingkontroll. B, Filmene er scannet og verdier fra densitometriske målinger er sammenlignet med S100A4 behandlede celler og fremstilt grafisk.

Figur 12 viser resultater fra forsøk med GF109203X, en hemmer av protein kinase C. Det ses ingen endring i nivåene av fosforylert I κ B α , og det er således ingen effekt av GF109203X på aktivitet i den klassiske NF- κ B signalveien. At PKC ikke er involvert i S100A4-mediert aktivering støttes av den mangelfulle effekten av staurosporin, som også er en potent PKC hemmer (figur 11). I figur 12B er det relative uttrykket av fosforylert I κ B α tallfestet. Det ses en liten nedgang i nivåer av fosforylert I κ B α i prøver behandlet med inhibitor, men denne reduksjonen er ikke større enn den som sees for DMSO kontrollen.



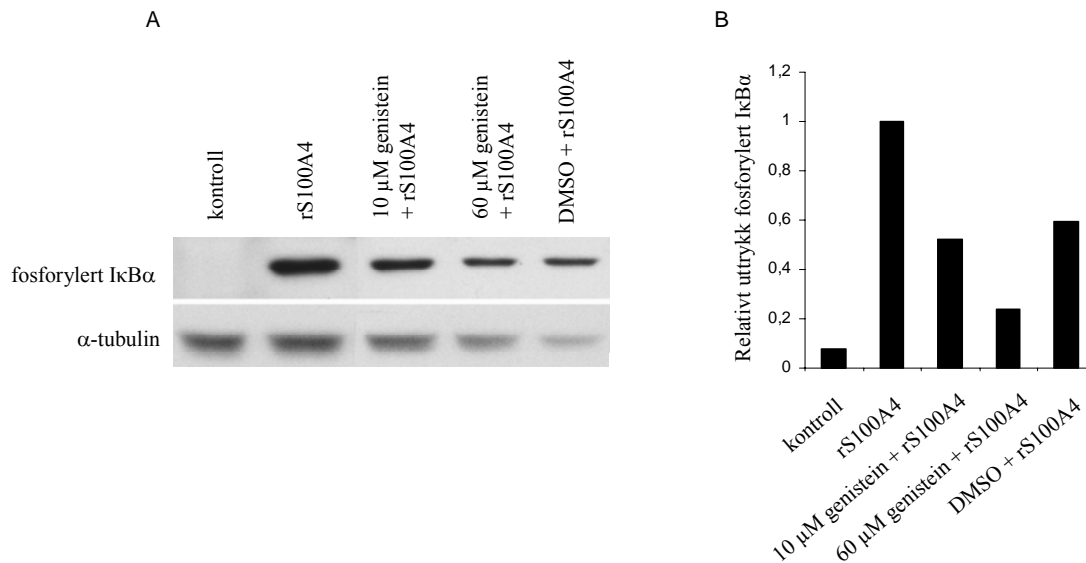
Figur 12: A, Immunblott av proteinlysat fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 μg/ml) og GF109203X i de oppgitte konsentrasjonene. Figuren viser fosforylert IκBα. α-tubulin er brukt som loadingkontroll. B, Filmene er scannet og verdier fra densitometriske målinger er sammenlignet med S100A4 behandlede celler og fremstilt grafiks

Figur 13A viser Western blot av II-11b celler behandlet med rekombinant S100A4 og suramin, en inhibitor av G-protein koblede signalveier. Med de anvendte konsentrasjonene gir denne hemmeren ingen inhiberende effekt på S100A4-indusert fosforylering av IκBα.



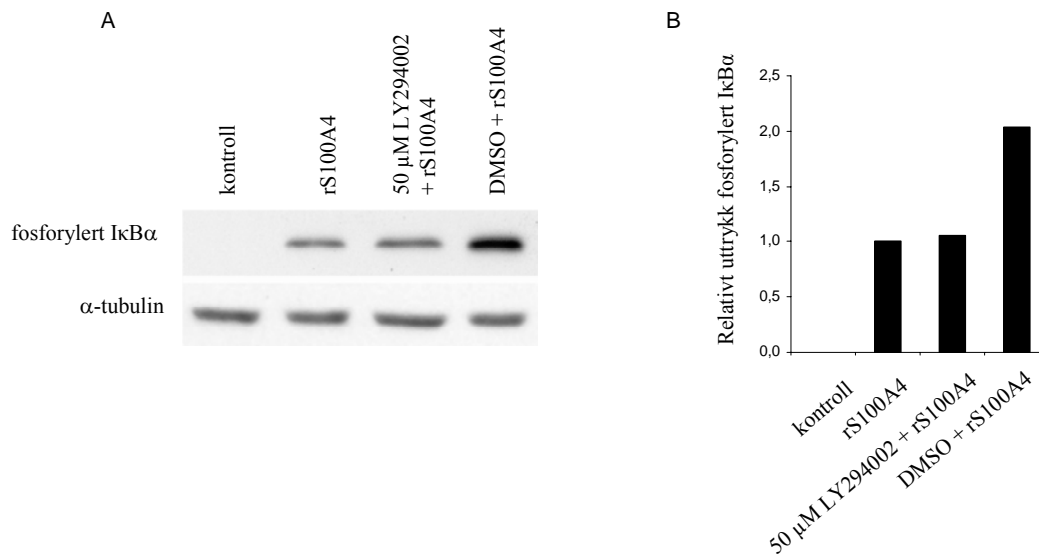
Figur 13: A, Immunblott av cellelysat fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 μg/ml) og oppgitte konsentrasjoner av suramin (inhibitor av G-protein signalveier). B, Verdier fra densitometrisk scanning relativt til S100A4 behandlede celler.

En mulig inhiberende effekt ble observert med protein tyrosin kinase hemmeren genistein (figur 14A). Resultatet fra densitometrisk scanning bekrefter reduksjon i nivåer av fosforylert I κ B α (figur 14B). Imidlertid viste den biologiske parallellen en økning av fosforylert I κ B α i behandlede prøver (resultater ikke vist), og vi har derfor konkludert med at genistein mest sannsynlig ikke inhiberer S100A4-indusert NF- κ B aktivering, men ytterligere forsøk bør gjennomføres før en med sikkerhet kan trekke en slik konklusjon.



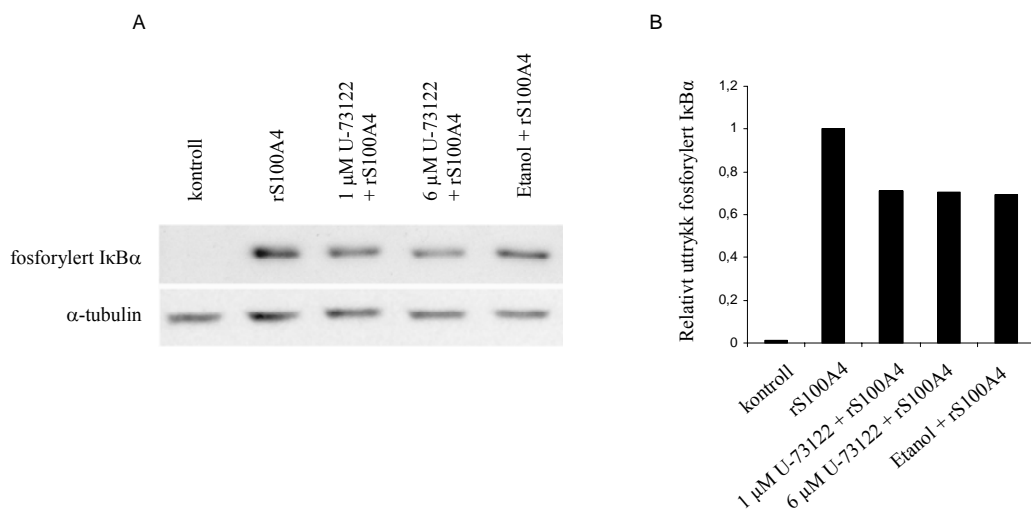
Figur 14: A, Immunblott av cellelysate fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 μ g/ml) og oppgitte konsentrasjoner av protein tyrosin kinase inhibatoren genistein. B, Verdier fra densitometrisk scanning relativt til S100A4 behandlede celler.

Figur 15 viser at fosfatidylinositol-3-kinase (PI $_3$ -kinase) inhibatoren LY294002 i den anvendte konsentrasjonen ikke har effekt på S100A4-indusert aktivering av NF- κ B. Kun en konsentrasjon er vist fordi inhibatoren var toksisk og medførte markant celledød i de øvrige konsentrasjonene. Den brukte behandlingkonsentrasjonen ligger godt over oppgitt IC $_{50}$ for PI $_3$ -kinase (1,4 μ M), det er derfor ikke gjort ytterligere forsøk med flere konsentrasjoner. Effekten av løsemiddelkontroll alene, DMSO, varierte noe i forsøkene der de ulike hemmerne ble benyttet. I figur 15 kan det se ut som uttrykket av fosforylert I κ B α øker, i figur 14 vises det motsatte, og i figur 11 sees ingen effekt av DMSO. Årsaken til dette er uklar, og konsekvensen er at mange forsøk må gjennomføres før sikre konklusjoner kan trekkes.

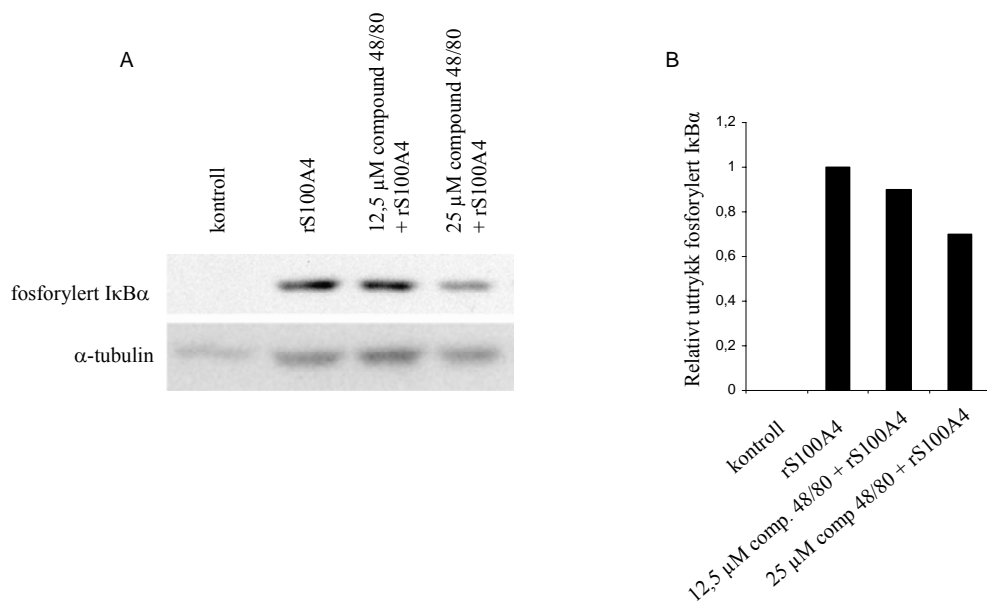


Figur 15, Immunblott av cellelysat fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 μ g/ml) og oppgitte konsentrasjoner av LY294002 (inhibitor av fosfatidylinositol-3-kinaser). B, verdier fra densitometrisk scanning oppgitt relativt til S100A4 behandlede celler.

I figur 16 og 17 vises resultater fra forsøk med fosfolipase C hemmerne U-73122 og compound 48/80. I de anvendte konsentrasjonene viste ingen av hemmerne tydelig inhiberende effekt på S100A4-indusert fosforylering av I κ B α . Vi konkluderte derfor med at fosfolipase C ikke er involvert i signaloverføringen. For compound 48/80 var det vanskelig å finne konsentrasjoner som ikke ga toksiske effekter i cellekultur. De anvendte konsentrasjonene ligger derfor under det som er oppgitt i litteraturen for øvrig.



Figur 16, Immunblott av cellelysat fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 μg/ml) og oppgitte konsentrasjoner av fosfolipase C inhibitoren U-73122. B, Verdier fra densitometrisk scanning er angitt relativt til S100A4 behandlede celler.



Figur 17, Immunblott av cellelysat fra II-11b celler behandlet med rS100A4 (20 μg/ml) og oppgitte konsentrasjoner av compound 48/80, en inhibitor av fosfolipase C. B Verdier fra densitometrisk scanning er angitt relativt til S100A4 behandlede celler.

Vår konklusjon på forsøkene som er utført med de ulike hemmerne av intracellulære signalveier er at serin/treonin kinase inhibitoren H-7 har en tydelig effekt på S100A4-indusert IκBα fosforylering, mens de øvrige hemmerne mest sannsynlig ikke påvirker aktiveringen. Genistein og compound 48/80 har vist hemmende effekt på S100A4-mediert IκBα fosforylering i enkeltforsøk, før sikre konklusjon kan trekkes er ytterligere forsøk nødvendig.

Diskusjon

I senere år har flere studier vist at ekstracellulær S100A4 aktiverer transkripsjonsfaktoren NF- κ B [51, 52, 56, 90]. I denne oppgaven, og arbeidet som lå til grunn for den, er mekanismen for S100A4-indusert NF- κ B aktivering undersøkt ved å tilsette rekombinant S100A4 til cellekulturers dyrkingsmedium for å simulere effekt av secernert protein. For å vise at den observerte induksjonen av NF- κ B ikke skyldes forurensninger i proteinpreparatene eller andre artefakter er det gjort flere kontrollforsøk. Inkubasjon av II-11b celler med et rekombinant his-merket protein produsert på samme måte som S100A4 og med tilsvarende molekylvekt, viste ingen effekt på NF- κ B-aktivitet. Videre er det vist at endotoksin forurensninger fra produksjonen av S100A4 i *E.coli* ikke er årsak til aktiveringen av NF- κ B. På grunn av den store sekvenslikheten mellom S100 proteinene er det også gjort forsøk med S100A2, S100A10 og S100A13 for å se om NF- κ B induksjon er en generell egenskap hos proteinfamilien, men ingen av de andre S100 proteinene induserte NF- κ B aktivitet. Det er således konkludert med at ikke alle S100-proteiner har evne til å inducere aktivitet av denne transkripsjonsfaktoren.

I arbeidet med denne oppgaven er S100A4-indusert NF- κ B aktivering kartlagt i et utvalg humane cellelinjer. I fire av de 15 undersøkte kreftcellelinjene ble S100A4-indusert NF- κ B aktivering observert. Forskjellig uttrykk av en eventuell reseptor for S100A4 kan være en mulig forklaring på at ikke alle cellelinjene responderer. S100A1, S100B, S100A12 og S100P er vist å interagere med RAGE [53-55], mens S100A4-induserte effekter er vist å være både RAGE-avhengige og RAGE-uavhengige. Sannsynligvis medierer S100A4 sine effekter via flere reseptorer. Det er også mulig at noen av de observerte effektene av ekstracellulært protein skyldes internalisert protein. I de brukte cellelinjene er det tidligere undersøkt og funnet uttrykk av RAGE mRNA, men den S100A4-induserte NF- κ B aktiveringen lot seg ikke blokkere ved bruk av antistoff mot RAGE. Vi konkluderte derfor med at vi i våre cellesystemer inducerer S100A4 effekter som er uavhengig av RAGE. Flere andre biologiske forskjeller kan være mulige forklaringer på hvorfor de undersøkte cellelinjene responderer forskjellig med tanke på S100A4-indusert NF- κ B aktivering. Ulik evne til å aktivere intracellulære signalveier nødvendig for fosforyleringen av I κ B α og dermed aktivering av NF- κ B er en mulighet. En annen er at cellene uttrykker store mengder andre S100-proteiner som kan utføre den samme oppgaven og at tilsetning av S100A4 dermed er overflødig. Hvis

en forutsetter at proteinet må tas opp i cellene for at NF- κ B skal induseres, kan ulik evne til å internalisere S100A4 være årsak til den varierende effekten.

Bruk av inhibitorer

Vi har benyttet hemmere av intracellulære signalveier for å avgjøre om observert S100A4-indusert ekspresjon av ephrin-A1 er avhengig av NF- κ B, og for å finne signaltransduksjonsmekanismer nødvendig for S100A4-indusert aktivering av NF- κ B. Bruk av inhibitorer vil alltid innebære en risiko for positive funn som følge av uspesifikk inhibering. Positive funn bør derfor tolkes med forsiktighet, og valideres ved bruk av andre teknikker, f.eks ved funksjonelle analysemetoder der proteiner overuttrykkes eller nedreguleres ved hjelp av transfeksjoner. Videre finnes det flere subgrupper av de ulike reseptorene og enzymene, og det er dermed ikke sikkert at en inhibitor hemmer alle undergruppene av målproteinene. En signalvei kan dermed være involvert selv om den brukte inhibatoren ikke gir effekt. En kompliserende faktor kan også være at hemmerne i seg selv er toksiske for cellekulturen. De anvendte forbindelsene virker på svært sentrale signaltransduksjonsmekanismer i cellene og en kan derfor lett forestille seg at inhibering av disse kan forårsake veksthemming og celledød. Observert effekt på proteinet en ønsker å undersøke kan dermed være en sekundær effekt og ikke direkte induert av hemmeren.

S100A4-indusert aktivering av ephrin-A1 og optineurin er avhengig av transkripsjonsfaktoren NF- κ B

S100A4-indusert aktivering av ephrin-A1 og optineurin er tidligere validert ved hjelp av real-time RT-PCR (ephrin-A1 og optineurin) og Western immunblot (ephrin-A1). Det er vist at S100A4-indusert ephrin-A1 er funksjonelt aktivt ved at det er observert økt binding av ephrin-A1 reseptoren EphA2 til II-11b celler behandlet med rekombinant S100A4.

Ephrin-A1 er et membranprotein involvert i cellemotilitet [91] og tumor angiogenese [92, 93]. Oppregulering av ephrin-A1 korrelerer med invasivitet og metastasepotensiale i brystkreftmodeller i mus. Nedregulering av ephrin-A1 i disse svulstene inhiberer endotelcellemigrasjon og reduserer tettheten av kapillærer og antall lungemetastaser. Disse funnene indikerer at ephrin-A1 kan være involvert i S100A4-mediert stimulering av tumorcellenes metastaseevne. En slik sammenheng mellom S100A4 og ephrin-A1 er tidligere

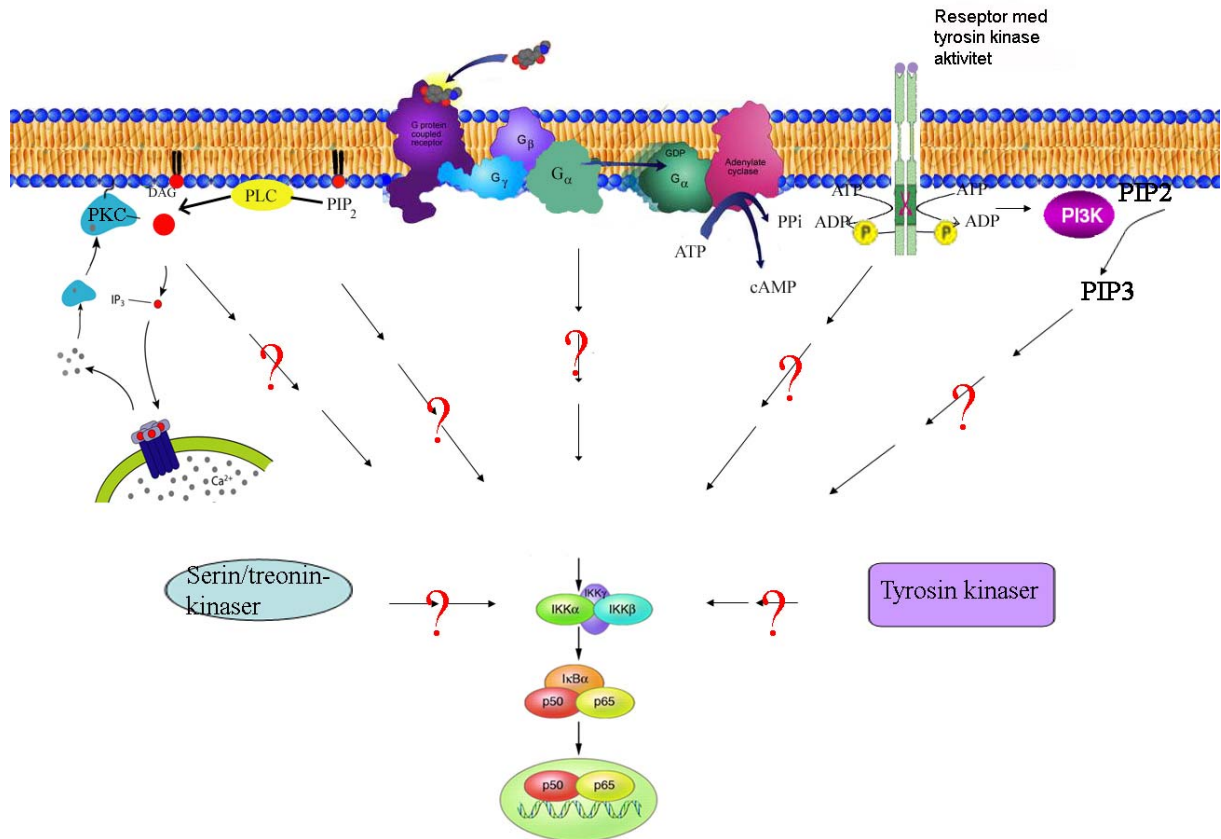
ikke rapportert, og er et svært interessant funn som vil bli undersøkt nærmere i ulike celledsystemer.

Optineurin er et protein med hovedsakelig ukjent funksjon. Mutasjoner i det humane genet er assosiert med utvikling av glaukom, derav navnet optineurin, "optic neuropathy inducing protein" [94]. Optineurin viser sterk sekvenslikhet med IKK γ og kan således være involvert i regulering av NF- κ B signalveien [95]. Ekspresjon av optineurin kan induseres av cytokinet TNF- α , og overuttrykk av optineurin er vist å beskytte mot TNF- α -indusert apoptose [96].

I oppgaven er det vist at S100A4-indusert ekspresjon av ephrin-A1 og optineurin er avhengig av transkripsjonsfaktoren NF- κ B. To ulike inhibitorer av NF- κ B signalveien er benyttet, dette for å redusere risikoen for at positive funn skyldes uspesifikk hemming. For ephrin-A1 er effekten vist både ved å analysere RNA- og proteinnivået i de behandlede cellene. Det finnes kun ett kommersielt tilgjengelig antistoff mot optineurin. Dette har vi ikke fått til å fungere, og ekspresjon av optineurin er derfor bare vist på RNA-nivå. Cytokin-indusert ekspresjon av ephrin-A1 er tidligere vist å være både NF- κ B avhengig og uavhengig [97, 98], mens betydningen av NF- κ B i regulering av optineurin ikke har vært undersøkt. TNF- α er en av de mest sentrale aktivatorene av NF- κ B, og er også vist å inducere ekspresjon av optineurin. Det er således ikke overraskende at S100A4-mediert oppregulering av optineurin er avhengig av NF- κ B aktivering.

Intracellulære signalveier involvert i S100A4-indusert aktivering av NF- κ B

At ekstracellulær S100A4 kan aktivere NF- κ B i ulike celledsystemer er overbevisende dokumentert i litteraturen, men det finnes få studier der det foreslås mekanismer for hvordan denne aktiveringen kan finne sted. Vi har valgt å benytte et utvalg av hemmere som spesifikt inhiberer sentrale kinasefamilier eller signalveier, og på den måten undersøke om den aktuelle signalveien er involvert i S100A4-mediert aktivering av NF- κ B. Signalveiene vi har undersøkt er angitt i figur 18.



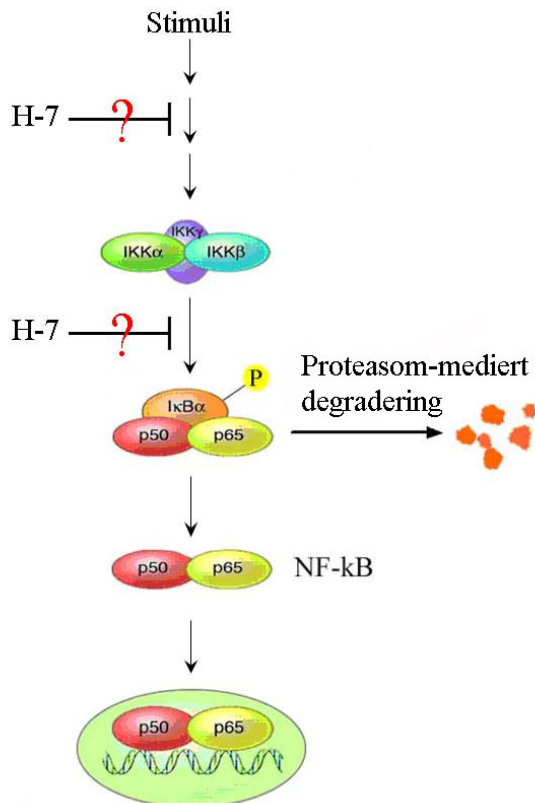
Figur 18: Oversikt over intracellulære signalveier som har vært angrepspunkt for de benyttede inhibitorene.

Effekt av serin/treonin kinase hemmere

Serin/treonin kinase hemmeren H-7 ble funnet å inhibere S100A4-indusert aktivering av NF- κ B. Denne inhibitoren oppgis å hemme PKA, PKC, PKG og myosin lett-kjede kinaser. Aktivering av NF- κ B ved ulike stimuli er rapportert å være både sensitiv for og resistent til behandling med H-7 [99, 100]. Staurosporin er en annen inhibitor av protein kinaser som inhiberer bl.a. PKA, PKG, PKC, myosin lett-kjede kinase og CaM kinase, og anses som en mindre selektiv inhibitor enn H-7. Vi forventet derfor å få lignende resultat med denne hemmeren, men selv med konsentrasjoner godt over det som er funnet brukt av andre, viste staurosporin ingen effekt på S100A4-indusert aktivering av NF- κ B. Også en tredje inhibitor av PKC ble testet ut, GF109203X. Molekylet er strukturelt relatert til staurosporin, men skal være mer selektiv ovenfor PKC. At NF- κ B induksjon ikke lot seg inhibere med GF109203X, når staurosporin ikke ga effekt, er dermed ikke uventet. Vi har således konkludert med at den observerte effekten av H-7 sannsynligvis skyldes hemming av serin/treonin kinaser som ikke lar seg inhibere av staurosporin og GF109203X.

Tabell 6: Oversikt over kinaser som inhiberes av de ulike protein kinase inhibitorene

	PKA	PKC	PKG	CaM-kinase	Myosin lett-kjede kinase
H-7	X	X	X		
Staurosporin	X	X	X	X	X
GF109203X		X			



Figur 19: Den klassiske NF-κB signalveien med mulige angrepspunkt for H-7.

H-7 inhiberer serin/treonin kinaser, og siden NF-κB signalveien inneholder flere slike kinaser er det interessant å finne ut på hvilket trinn i signalveien hemmeren virker. Vi vet at i II-11b celler behandlet med rekombinant S100A4 ses økte nivåer av fosforylert IκBα. Når cellene i tillegg behandles med H-7 ses en doseavhengig inhibering av denne fosforyleringen og et alternativ er at fosforylering, og dermed degradering, av IκBα inhiberes. For å undersøke denne muligheten forsøkte vi å immunpresipitere IKK komplekset med antistoff mot IKKα for å se om dette komplekset var fosforylert. Fosforylert kompleks ville tydet på at signalveien oppstrøms IKK var aktiv og at H-7 hemmet fosforylering av IκBα. Dersom komplekset ikke var fosforylert ville dette vist at H-7 hemmet oppstrøms IKK. Det lot seg

dessverre ikke gjøre å få rent nok immunpresipitat til at fosfobåndet av IKK kunne visualiseres. Det ble også prøvd å sette cellelysats direkte på gel for å farge med antistoff mot fosforylert- $IKK\alpha/\beta$, men heller ikke dette førte frem.

Effekt av inhibering av G-protein koblede reseptorer

Mange studier tyder på at stimulering av G-proteiner er involvert i aktivering av NF- κ B. I nevroner er S100A4-indusert kalsiumrespons og neurittutvekst vist å kunne inhiberes ved behandling med suramin, og en spesifikk inhibitor av G_q -assosiert signaloverføring, GP-2A [57]. Vi har brukt suramin for å hemme G-protein koblede signaveier uten at noen effekt ble observert på S100A4-indusert fosforylering av $I\kappa B\alpha$. Forbindelsen oppgis å virke ved å koble G-proteiner fra sine reseptorer, sannsynligvis ved å blokkere det intracellulære reseptordomenet [72]. Det finnes over 1000 ulike G-protein reseptorer [101] fordelt på tre til fire hovedgrupper. Det er dermed lite sannsynlig at suramin kan hemme aktivering av alle typer G-protein reseptorer. Selv om det ikke ble observert noen effekt av denne inhibitoren kan det derfor ikke fullstendig utelukkes at G-protein koblede reseptorer er involvert i S100A4-indusert aktivering av NF- κ B.

Tyrosin kinase inhibering

Genistein inhiberer protein-tyrosin kinaser. S100A4-indusert neurittutvekst er vist å være upåvirket av behandling med genistein. Figuren vist i oppgaven indikerer en mulig effekt av genistein på S100A4-indusert aktivering av NF- κ B (fig 14). Fargingen med α -tubulin indikerer redusert proteinmengde i sporene med genisteinbehandlede celler, men også grafen fra densitometrisk måling av filmen viser redusert nivå av fosforylert $I\kappa B\alpha$ i genisteinbehandlede celler. I den biologiske parallellen av dette forsøket observerte vi ingen effekt av genistein, og vi konkluderte derfor med at inhibitoren sannsynligvis ikke har effekt på S100A4-indusert fosforylering av $I\kappa B\alpha$. Som nevnt tidligere er ytterligere forsøk nødvendig før en med sikkerhet kan trekke en slik konklusjon.

Effekt av hemmet fosfatidylinositol-3-kinase aktivitet

Fosfatidylinositol-3-fosfat kinaser (PI₃ kinaser) fosforerer membranbundet fosfatidylinositol og spiller en viktig rolle i regulering av prosesser som celledeling og apoptose. Kinasene er vist å ha både serin-kinase og fosfatidylinositid-kinase aktivitet [102]. LY294002 oppgis å være en selektiv inhibitor av PI₃-kinaser. I konsentrasjoner på 50 µM hemmes aktivitet av PI₃-kinase (IC₅₀: 1,4 µM), uten at andre kinaser som PKC, MAP-kinase, PI₄-kinase eller c-Src inhiberes. I denne oppgaven er det vist at LY294002 i konsentrasjoner på 50 µM ikke har effekt på S100A4-indusert aktivering av NF-κB. Ved høyere konsentrasjoner (150 µM) induserte inhibitoren toksiske effekter i II-11b celler og effekten her er derfor ikke av interesse. Den brukte konsentrasjonen ligger også godt over IC₅₀ slik at en eventuell effekt burde vært observert ved denne konsentrasjonen.

Inhibering av fosfolipase C aktivitet

Compound 48/80 og U-73122 inhiberer fosfolipase C. Fosfolipase C spiller en viktig rolle i en rekke signaltransduksjonsprosesser. Hovedfunksjonen av PLC er hydrolysering av fosfatidylinositoldifosfat til diacylglycerol (DAG) og inositoltrifosfat (IP₃). DAG aktiverer bl.a PKC, mens IP₃ fører til frigjøring av kalsium fra intracellulære lagre. I neuroner er økt intracellulært kalsium vist å være nødvendig for S100A4-indusert neurittutvekst og PLC aktivitet er nødvendig for denne økning i kalsiumnivå. Figur 17 viser resultater fra celleforsøk med compound 48/80. Det var vanskelig å finne konsentrasjoner av denne inhibitoren som ikke ga toksiske effekter. Om det svakere fosfobåndet ved behandling med 25µM skyldes inhibering av fosfolipase C er derfor usikkert. Den andre PLC inhibitoren, U-73122 viste ingen effekt på S100A4-indusert fosforering. Videre aktiveres PLC ofte av G-proteiner og reseptor tyrosin kinaser [103]. Dette tatt i betraktning konkluderte vi med at PLC sannsynligvis ikke er involvert i S100A4-indusert aktivering av NF-κB.

Den eneste inhibitoren som signifikant påvirket fosforyleringsstatus av I κ B α i S100A4 behandlede II-11b celler var serin/treonin kinase hemmeren H-7. Vi konkluderer med at det er grunn til å tro at denne kinasefamilien er involvert i overføringen av S100A4-induserte signaler som nedstrøms aktiverer IKK komplekset, og som videre forårsaker aktivering av transkripsjonsfaktoren NF- κ B. På grunnlag av de gjennomførte forsøkene er det ikke mulig med sikkerhet å utelukke at de andre signalmekanismene er involvert, men våre data tyder på at dette er lite sannsynlig. Variasjonen i de gjennomførte forsøkene er imidlertid betydelig slik at det er nødvendig å gjøre flere parallelle forsøk, eller å undersøke effekten av andre inhibitorer som viker på samme signalmekanisme, for å trekke sikre konklusjoner. Det er spesielt aktuelt å undersøke effekten av tyrosin kinaser og fosfolipase C nøyere da henholdsvis genistein og compound 48/80 har vist hemmende effekt på S100A4-mediert I κ Ba fosforylering i enkeltforsøk.

Videre planer

Intracellulære signalveier nødvendig for S100A4 mediert aktivering av NF- κ B

Effekt av H-7 er vist ved immunfarging av proteinlysater fra behandlede II-11b celler, der nivået av fosforylert I κ B α er et indirekte mål på aktivitet i NF- κ B signalveien. Det vil være av interesse å teste ut inhibitoren i NF- κ B aktivitetsassayet omtalt tidligere i oppgaven.

Behandling med genistein og compound 48/80 viste en mulig inhiberende effekt i NF- κ B signalveien. Hvis dette viser seg å være tilfellet ved gjentatte forsøk vil det også være av interesse å undersøke effekten av disse hemmerne i NF- κ B aktivitetsassayet.

For å finne ut om H-7 hemmet IKK og dermed fosforyleringen av I κ B α ble det forsøkt å immunpresipitere med antistoff mot IKK α , og farge membran med antistoff mot fosforylert IKK α/β , uten at dette førte frem. For å få til immunpresipiteringen kan det være aktuelt å prøve andre antistoff enten til immunpresipitering og/eller til farging av membran. Det kan også brukes tid på optimalisering av prosedyre for immunpresipitering for å få et renere immunpresipitat, f.eks ved å velge lyseringsbuffer med varierende stringens. Endel uttestingsarbeid har allerede blitt gjort, men det var begrenset hvor mye tid som var til rådighet for denne delen av oppgaven slik at det gjenstår endel arbeid før prosedyren er optimalisert.

Ephrin-A1 og optineurin

Vi har i denne oppgaven vist at S100A4 induisert aktivering av Ephrin-A1 og optineurin er avhengig av transkripsjonsfaktoren NF- κ B. Ephrin-A1 er som tidligere nevnt involvert i cellemotilitet og angiogenese. Det planlegges derfor å gjøre funksjonelle studier der vi vil studere motiliteten av celler behandlet med S100A4, og videre se om evnen til bevegelse reduseres ved å blokkere uttrykket av ephrin-A1. Slike motilitetsstudier kan gjøres ved hjelp av såkalte Boydenkammer der cellene vokser på en membran og deres evne til å vandre gjennom denne er et mål for motiliteten. Et alternativt assay er å lage en stripe i en forholdsvis tett cellekultur, og undersøke cellenes evne til å vandre inn i det cellefrie området. Det vil være interessant å gjennomføre slike motilitetsforsøk både på kreftceller og endotelceller, og også en kombinasjon der disse celletypene vokser i kokultur. Økt migrasjon av tumorceller vil ha betydning for invasivitet og metastasering, endotelcellemigrasjon vil kunne spille en rolle for tumorangiogenese. Hvis vi i funksjonelle forsøk *in vitro* bekrefter at S100A4 inducerer ephrin-A1 og dette videre øker motilitet enten av kreftceller eller endotelceller, er det aktuelt å hemme ephrin-A1 uttrykket (ved at ekstracellulært S100A4 bindes opp for eksempel ved bruk av antistoff) og undersøke om dette vil redusere cellene metastasepotensial *in vivo*.

Forkortelser

APS	Ammonium persulfat
BAFF	B cell-activating factor belonging to the TNF family
BCA	Bicinchoninic acid
BFB	Bromfenolblått
Blys	B cell-activating factor
BSA	Bovint serum albumin
BSN-buffer	Bjerrum-Schäfer-Nilsen buffer
CaM-kinase	Ca ²⁺ /calmodulin-avhengig protein kinase
CD40L	Cluster of differentiation 40L
cDNA	Complementary DNA (Komplementært DNA)
c-SRC	Cellulær variant av viral SRC, ”en ”nonreceptor” tyrosin kinase
DAG	Diacyl Glycerol
DMSO	Dimetylsulfoksid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced electrochemiluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EphA2	Ephrin receptor A2
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
FBS	Føtalt bovint serum, Kalveserum
FGF	Fibroblast growth factors
FSP 1	Fibroblastspecifikt Protein-1
HRP	Horseradish peroxidase
IC ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % inhibering
IFN- γ	Interferon-gamma
I κ B	Inhibitor av NF- κ B
I κ B α	Inhibitor av NF- κ B α
IKK	Inhibitor av NF- κ B kinase
IL	Interleukin
IP	Immunpresipitering
IP ₃	inositol-3-fosfat
kDa	Kilodalton
Ki	Inhiberende konsentrasjon
LAR	Luciferase Assay Reagent
LT β R	Lymphotoxin beta receptor
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight
MMP	Matriks metalloproteinase
MT1-MMP	Membranbundet matriks metalloproteinase
Mts 1	metastatic cell protein 1
NEMO	NF- κ B essensiell modulator
NES	Nuclear export signal (kjerne eksporteringsignal)
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
PAGE	Polyakrylamid gel-elektroforese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (kjedereaksjon)

PhK	Phosphorylase kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PKG	Protein kinase G
PLC	Phospholipase C (Fosfolipase C)
PMSF	Phenylmethylysulphonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RHD	Rel-homologidomene
RLB	Reporter Lysis Buffer
rpm	Revolutions per minute
rA4	Rekombinant S100A4
rS100A4	Rekombinant S100A4
RT-PCR	revers transkriptase PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBST	Trin bufret saltvann med tween
TEMED	Tetrametyletyldiamin
TLR	Toll-Like Receptor
TNF-a	Tumor necrosis factor-alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
YARS	Tyrosyl-tRNA syntetase

Referanser

1. Folkehelseinstituttet, *Fakta om kreft*. [cited; Available from: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5648&MainArea_5661=5648:0:15,2917:1:0:0::0:0&MainLeft_5648=5544:58461::1:5647:28::0:0
2. Folkehelseinstituttet, *Kreftdødelighet i Norge*. [cited; Available from: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainArea_5661&MainArea_5661=5631:0:15,3410:1:0:0::0:0
3. Sjøberg, *Molekylær genetikk*. 3. utgave, 2002.
4. Gupta, G.P. and J. Massague, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. **127**(4): p. 679-95.
5. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
6. Liotta, L.A., *Cancer cell invasion and metastasis*. Sci Am, 1992. **266**(2): p. 54-9, 62-3.
7. Emberley, E.D., L.C. Murphy and P.H. Watson, *S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(4): p. 508-15.
8. Moore, B.W., *A soluble protein characteristic of the nervous system*. Biochem Biophys Res Commun, 1965. **19**(6): p. 739-44.
9. Heizmann, C.W., G. Fritz and B.W. Schafer, *S100 proteins: structure, functions and pathology*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1356-68.
10. Marenholz, I., R.C. Lovering and C.W. Heizmann, *An update of the S100 nomenclature*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(11): p. 1282-3.
11. Helfman, D.M., E.J. Kim, E. Lukanidin, et al., *The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis*. Br J Cancer, 2005. **92**(11): p. 1955-8.
12. Garrett, S.C., K.M. Varney, D.J. Weber, et al., *S100A4, a mediator of metastasis*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 677-80.
13. Takenaga, K., Y. Nakamura and S. Sakiyama, *Expression of a calcium binding protein pEL98 (mts1) during differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **202**(1): p. 94-101.
14. Taylor, S., S. Herrington, W. Prime, et al., *S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes*. Br J Cancer, 2002. **86**(3): p. 409-16.
15. Flatmark, K., G.M. Maelandsmo, S.O. Mikalsen, et al., *Immunofluorometric assay for the metastasis-related protein S100A4: release of S100A4 from normal blood cells prohibits the use of S100A4 as a tumor marker in plasma and serum*. Tumour Biol, 2004. **25**(1-2): p. 31-40.
16. Strutz, F., H. Okada, C.W. Lo, et al., *Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1*. J Cell Biol, 1995. **130**(2): p. 393-405.
17. Hsieh, H.L., B.W. Schafer, J.A. Cox, et al., *S100A13 and S100A6 exhibit distinct translocation pathways in endothelial cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 15): p. 3149-58.
18. Semov, A., M.J. Moreno, A. Onichtchenko, et al., *Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20833-41.
19. Flatmark, K., K.B. Pedersen, J.M. Nesland, et al., *Nuclear localization of the metastasis-related protein S100A4 correlates with tumour stage in colorectal cancer*. J Pathol, 2003. **200**(5): p. 589-95.

20. Kikuchi, N., A. Horiuchi, R. Osada, et al., *Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression*. *Cancer Sci*, 2006. **97**(10): p. 1061-9.
21. C, E.L.N., B. Grum-Schwensen, A. Mansouri, et al., *Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene*. *Oncogene*, 2004. **23**(20): p. 3670-80.
22. Ebralidze, A., E. Tulchinsky, M. Grigorian, et al., *Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family*. *Genes Dev*, 1989. **3**(7): p. 1086-93.
23. Davies, B.R., M.P. Davies, F.E. Gibbs, et al., *Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1*. *Oncogene*, 1993. **8**(4): p. 999-1008.
24. Grigorian, M., N. Ambartsumian, A.E. Lykkesfeldt, et al., *Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 1996. **67**(6): p. 831-41.
25. Levett, D., P.A. Flecknell, P.S. Rudland, et al., *Transfection of S100A4 produces metastatic variants of an orthotopic model of bladder cancer*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(2): p. 693-700.
26. Maelandsmo, G.M., E. Hovig, M. Skrede, et al., *Reversal of the in vivo metastatic phenotype of human tumor cells by an anti-CAPL (mts1) ribozyme*. *Cancer Res*, 1996. **56**(23): p. 5490-8.
27. Takenaga, K., Y. Nakamura and S. Sakiyama, *Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells*. *Oncogene*, 1997. **14**(3): p. 331-7.
28. Davies, M.P., P.S. Rudland, L. Robertson, et al., *Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours*. *Oncogene*, 1996. **13**(8): p. 1631-7.
29. Schmidt-Hansen, B., J. Klingelhofer, B. Grum-Schwensen, et al., *Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24498-504.
30. Grum-Schwensen, B., J. Klingelhofer, C.H. Berg, et al., *Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3772-80.
31. Rudland, P.S., A. Platt-Higgins, C. Renshaw, et al., *Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(6): p. 1595-603.
32. Gongoll, S., G. Peters, M. Mengel, et al., *Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(5): p. 1478-84.
33. Andersen, K., J.M. Nesland, R. Holm, et al., *Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma*. *Mod Pathol*, 2004. **17**(8): p. 990-7.
34. Oida, Y., H. Yamazaki, K. Tobita, et al., *Increased S100A4 expression combined with decreased E-cadherin expression predicts a poor outcome of patients with pancreatic cancer*. *Oncol Rep*, 2006. **16**(3): p. 457-63.
35. Davies, B.R., M. O'Donnell, G.C. Durkan, et al., *Expression of S100A4 protein is associated with metastasis and reduced survival in human bladder cancer*. *J Pathol*, 2002. **196**(3): p. 292-9.

36. Agerbaek, M., J. Alsner, N. Marcussen, et al., *Focal S100A4 protein expression is an independent predictor of development of metastatic disease in cystectomized bladder cancer patients*. Eur Urol, 2006. **50**(4): p. 777-85.
37. Matsubara, D., T. Niki, S. Ishikawa, et al., *Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes*. Cancer Sci, 2005. **96**(12): p. 844-57.
38. Kimura, K., Y. Endo, Y. Yonemura, et al., *Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer*. Int J Oncol, 2000. **16**(6): p. 1125-31.
39. Nakamura, T., T. Ajiki, S. Murao, et al., *Prognostic significance of S100A4 expression in gallbladder cancer*. Int J Oncol, 2002. **20**(5): p. 937-41.
40. Mazzucchelli, L., *Protein S100A4: too long overlooked by pathologists?* Am J Pathol, 2002. **160**(1): p. 7-13.
41. Kohya, N., Y. Kitajima, W. Jiao, et al., *Effects of E-cadherin transfection on gene expression of a gallbladder carcinoma cell line: repression of MTS1/S100A4 gene expression*. Int J Cancer, 2003. **104**(1): p. 44-53.
42. Keirsebilck, A., S. Bonne, E. Bruyneel, et al., *E-cadherin and metastasin (mts-1/S100A4) expression levels are inversely regulated in two tumor cell families*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4587-91.
43. Bjornland, K., J.O. Winberg, O.T. Odegaard, et al., *S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme*. Cancer Res, 1999. **59**(18): p. 4702-8.
44. Mathisen, B., R.I. Lindstad, J. Hansen, et al., *S100A4 regulates membrane induced activation of matrix metalloproteinase-2 in osteosarcoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2003. **20**(8): p. 701-11.
45. Grigorian, M., S. Andresen, E. Tulchinsky, et al., *Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22699-708.
46. Ambartsumian, N., J. Klingelhofer, M. Grigorian, et al., *The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor*. Oncogene, 2001. **20**(34): p. 4685-95.
47. Watanabe, Y., N. Usuda, S. Tsugane, et al., *Calvasculin, an encoded protein from mRNA termed pEL-98, 18A2, 42A, or p9Ka, is secreted by smooth muscle cells in culture and exhibits Ca(2+)-dependent binding to 36-kDa microfibril-associated glycoprotein*. J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17136-40.
48. Pedersen, M.V., L.B. Kohler, M. Grigorian, et al., *The Mts1/S100A4 protein is a neuroprotectant*. J Neurosci Res, 2004. **77**(6): p. 777-86.
49. Belot, N., R. Pochet, C.W. Heizmann, et al., *Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1600**(1-2): p. 74-83.
50. Novitskaya, V., M. Grigorian, M. Kriajevska, et al., *Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41278-86.
51. Schmidt-Hansen, B., D. Ornas, M. Grigorian, et al., *Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity*. Oncogene, 2004. **23**(32): p. 5487-95.
52. Pedersen, K.B., K. Andersen, O. Fodstad, et al., *Sensitization of interferon-gamma induced apoptosis in human osteosarcoma cells by extracellular S100A4*. BMC Cancer, 2004. **4**: p. 52.

53. Huttunen, H.J., J. Kuja-Panula, G. Sorci, et al., *Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40096-105.
54. Arumugam, T., D.M. Simeone, A.M. Schmidt, et al., *S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE)*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5059-65.
55. Hofmann, M.A., S. Drury, C. Fu, et al., *RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides*. Cell, 1999. **97**(7): p. 889-901.
56. Yammani, R.R., C.S. Carlson, A.R. Bresnick, et al., *Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 2901-11.
57. Kiryushko, D., V. Novitskaya, V. Soroka, et al., *Molecular mechanisms of Ca(2+) signaling in neurons induced by the S100A4 protein*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(9): p. 3625-38.
58. Andersen, K., G. Berge, S. Sjoli, et al., *Extracellular S100A4 is internalized in cancer cells through a dynamin dependent mechanism*. AACR annual meeting 2007, poster, 2007.
59. Hsieh, H.-L., B.W. Schafer, B. Weigle, et al., *S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **316**(3): p. 949-959.
60. Tergaonkar, V., *NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(10): p. 1647-53.
61. Hoffmann, A., G. Natoli and G. Ghosh, *Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6706-16.
62. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49-62.
63. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
64. Scheidereit, C., *IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6685-705.
65. Boye, K., I. Grotterød, H.-C. Aasheim, et al., *Activation of NF-kB by extracellular S100A4; analysis of signal transduction mechanisms and identification of target genes, submitted*. Molecular Cancer Research, 2007.
66. Carlsen, H., J.O. Moskaug, S.H. Fromm, et al., *In vivo imaging of NF-kappa B activity*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1441-6.
67. *Felleskatalogen, pasientutgave*. [cited; Available from: <http://www.felleskatalogen.no/pasientutgave>.
68. *Sigma-Aldrich, Bay 11-7082*. [cited; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/B5556>.
69. *Calbiochem, H-7*. [cited; Available from: <http://www.merckbiosciences.co.uk/Products/ProductDisplay.asp?catno=371955&>.
70. *Calbiochem, Staurosporin*. [cited; Available from: <http://www.merckbiosciences.co.uk/product/569397>.
71. *Sigma-Aldrich, GF 109203X*. [cited; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/G2911>.
72. *Calbiochem, Suramin*. [cited; Available from: <http://www.merckbiosciences.co.uk/product/574625>.

73. Calbiochem, *Genistein*. [cited; Available from: <http://www.merckbiosciences.co.uk/product/345834>.
74. Cell Signaling Technology, *LY294002*. [cited; Available from: <http://www.cellsignal.com/products/9901.html>.
75. Calbiochem, *U-73122*.
76. Sigma-Aldrich, *Compound 48/80*.
77. *Velcade.info (bortezomib)*. [cited; Available from: <http://www.velcade.info/>.
78. Dieguez-Acuna, F.J., W.W. Polk, M.E. Ellis, et al., *Nuclear factor kappaB activity determines the sensitivity of kidney epithelial cells to apoptosis: implications for mercury-induced renal failure*. *Toxicol Sci*, 2004. **82**(1): p. 114-23.
79. Ki Won Lee, M.-S.K.N.J.K.D.-H.K.Y.-J.S.H.J.L.A.M., *H-Ras selectively up-regulates MMP-9 and COX-2 through activation of ERK1/2 and NF-?B: An implication for invasive phenotype in rat liver epithelial cells*. 2006. p. 1767-1775.
80. Chen, Y., S. Morimoto, S. Kitano, et al., *Lysophosphatidylcholine causes Ca²⁺ influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells*. *Atherosclerosis*, 1995. **112**(1): p. 69-76.
81. Ikeda, Y., N. Nishiyama, H. Saito, et al., *GABAA receptor stimulation promotes survival of embryonic rat striatal neurons in culture*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1997. **98**(2): p. 253-8.
82. Lin, M.T., *Establishment of an immortalized porcine granulosa cell line (PGV) and the study on the potential mechanisms of PGV cell proliferation*. *Keio J Med*, 2005. **54**(1): p. 29-38.
83. Woclawek-Potocka, I., T.J. Acosta, A. Korzekwa, et al., *Phytoestrogens modulate prostaglandin production in bovine endometrium: cell type specificity and intracellular mechanisms*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005. **230**(5): p. 326-33.
84. Li, J., S. Lee, S.Y. Choi, et al., *Effects of pilocarpine on the secretory acinar cells in human submandibular glands*. *Life Sci*, 2006. **79**(26): p. 2441-7.
85. Liou, J.C., S.Y. Ho, M.R. Shen, et al., *A rapid, nongenomic pathway facilitates the synaptic transmission induced by retinoic acid at the developing synapse*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 20): p. 4721-30.
86. Miao, J.Y., K. Kaji, H. Hayashi, et al., *Inhibitors of phospholipase promote apoptosis of human endothelial cells*. *J Biochem (Tokyo)*, 1997. **121**(3): p. 612-8.
87. Zankov, D.P., M. Omatsu-Kanbe, T. Isono, et al., *Angiotensin II potentiates the slow component of delayed rectifier K⁺ current via the AT1 receptor in guinea pig atrial myocytes*. *Circulation*, 2006. **113**(10): p. 1278-86.
88. Husoy, T., V. Cruciani, T. Sanner, et al., *Phosphorylation of connexin43 and inhibition of gap junctional communication in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-exposed R6 fibroblasts: minor role of protein kinase C beta I and mu*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(2): p. 221-31.
89. Rivedal, E. and H. Opsahl, *Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(9): p. 1543-50.
90. Hsieh, H.L., B.W. Schafer, B. Weigle, et al., *S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **316**(3): p. 949-59.
91. Aasheim, H.C., E. Munthe, S. Funderud, et al., *A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes*. *Blood*, 2000. **95**(1): p. 221-30.
92. Brantley, D.M., N. Cheng, E.J. Thompson, et al., *Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo*. *Oncogene*, 2002. **21**(46): p. 7011-26.

93. Pandey, A., H. Shao, R.M. Marks, et al., *Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis*. Science, 1995. **268**(5210): p. 567-9.
94. Rezaie, T., A. Child, R. Hitchings, et al., *Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1077-9.
95. Schwamborn, K., R. Weil, G. Courtois, et al., *Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22780-9.
96. Li, Y., J. Kang and M.S. Horwitz, *Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1601-10.
97. Cheng, N. and J. Chen, *Tumor necrosis factor-alpha induction of endothelial ephrin A1 expression is mediated by a p38 MAPK- and SAPK/JNK-dependent but nuclear factor-kappa B-independent mechanism*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13771-7.
98. Deregowski, V., S. Delhalle, V. Benoit, et al., *Identification of cytokine-induced nuclear factor-kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 873-81.
99. Sodhi, A. and R.A. Singh, *Mechanism of NF-kappa B translocation in macrophages treated in vitro with cisplatin*. Immunol Lett, 1998. **63**(1): p. 9-17.
100. Wang, Y., D. Peng, W. Huang, et al., *Mechanism of altered TNF-alpha expression by macrophage and the modulatory effect of Panax notoginseng saponins in scald mice*. Burns, 2006. **32**(7): p. 846-52.
101. Wettschureck, N. and S. Offermanns, *Mammalian G proteins and their cell type specific functions*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1159-204.
102. Krasilnikov, M.A., *Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation*. Biochemistry (Mosc), 2000. **65**(1): p. 59-67.
103. H. P. Rang, M.M.D., J. M. Ritter, P. K. Moore, *Pharmacology*. 5. utgave 2003.

Bilag

Bilag 1 - Celledyrking

Følgende dyrkingsmedium ble benyttet:

Dyrkingsmedium

RPMI-1640
2 mM Glutamax
1 mM Hepes
10 % kalveserum

Dyrkingsmedium uten kalveserum

RPMI-1640
2 mM Glutamax
1 mM Hepes

Dyrkingsmedium med P/S

RPMI 1640
2 mM Glutamax
1 mM Hepes
10 % kalveserum
50 µg/ml penicillin
50 U/ml streptomycin

Bilag 2 - NF- κ B aktivitetsassay

For måling av NF- κ B aktivitet i celler transfektert med reporterplasmid ble kittet Luciferase Assay System benyttet (Promega, Madison, WI, USA).

1. 5 x RLB (Reporter Lysis Buffer, Promega, Madison, WI, USA) fortynnes med sterilt vann.
2. Dyrkingsmedium pipetteres av og brønnene vaskes forsiktig med PBS.
3. Cellene skrapes løs i 50 μ l 1 x RLB.
4. Lysatet overføres til eppendorfrør og fryses ved -70 °C. Dette er nødvendig for cellelysering og prøvene kan hvis ønskelig tines igjen med det samme.
5. Prøvene tines og 30 μ l av hver pipetteres over i 96-brønns Brett (Isoplate 1450-581, Wallac, Turku, Finland) med en blank brønn mellom hver prøve.
6. LAR (Luciferase Assay Reagent, Promega, Madison, WI, USA) tines og varmes opp til romtemperatur.
7. Luminescens måles på Victor 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, MA, USA). 50 μ l LAR tilsettes rett før måling og maks 12 prøver måles av gangen for å hindre at luminescensen forsvinner. Ved NF- κ B aktivitet vil det i de transfekterte cellene produseres luciferase. LAR inneholder bl.a luciferin. Når LAR tilsettes prøvene vil luciferase fra cellene oksiderer luciferin til oxyluciferin i en reaksjon som sender ut lys. Mengde lys som produseres kan dermed brukes som et indirekte mål på NF- κ B aktivitet.

Bilag 3 - Proteinisolering

1. Lyseringsbuffer med protease- og fosfatasehemmere tilsettes cellepellet umiddelbart etter at denne tas ut fra -70 °C fryser. Volum av lyseringsbuffer avhenger av størrelsen på pellet og hva lysatet skal brukes til.
Tommelfingerregel: 100 µl til $1-2 \times 10^6$ celler.
2. Prøvene inkuberes 30 min på is, vortexes hvert 10 minutt.
3. Sonikeres (Ultrasonic Homogenizer, 4710 series, Cole-Parmer Instrument Co, IL, USA) ved å dyppe sonden 3 ganger i lysatet. Sonden vaskes mellom hver prøve med dH₂O og tørkes av.
4. Lysat inkuberes 30 min på is.
5. Celledbris spinnes ned, 15 min ved 13000 rpm i bordsentrifuge, + 4 °C.
6. Supernatant pipetteres av og overføres til nytt rør.
7. Lysatet fryses ved -70 °C, eller proteinkonsentrasjon måles med det samme, og prøvene appliseres på gel.

1 x protein lysisbuffer

150 mM NaCl
50 mM Tris pH 7,5
0,1 % NP-40

For hemming av proteaser tilsettes følgende forbindelser:

0,01 µg/µl Pepstatin
0,01 µg/µl Leupeptin
0,01 µg/µl Aprotinin
100 nM PMSF

For hemming av fosfataser tilsettes ytterligere:

5 mM NaF
20 mM β-glycerofosfat
0,5 mM NaOrtovanadat

Protease- og fosfatasehemmere tilsettes rett før bruk.

Bilag 4 - Estimering av proteinkonsentrasjon med BCATM Protein Assay Kit

1. Standardkurve lages med BSA (Bovint serum albumin), i konsentrasjonene 1500, 1000, 750, 500, 250 og 125 µg/ml.
2. Lysater fortynnes 1:10 (forventet kons 1,5 µg/µl til 15 µg/µl).
3. 25 µl av hver standard i dubletter, 25 µl blank i dublett og 25 µl av hver prøve i tripletter pipetteres i 96-brønns brett.
4. BCA Reagens A blandes med Reagens B i forholdet 50:1, 200 µl av denne blandingen tilsettes deretter til hver brønn. Reagens A inneholder bl.a bicinchoninic syre (BCA) i 0,1M NaOH. Reagens B inneholder CuSO₄ og målemetoden benytter seg av at proteiner i basisk miljø reduserer Cu²⁺ til Cu⁺. Et lilla reaksjonsprodukt dannes ved at to BCA molekyler chelaterer Cu-ionet.
5. Platen inkuberes 30 min ved 37 °C.
6. Platen måles ved A540 på Victor 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, MA, USA). Det lilla reaksjonsproduktet har en sterk absorbans på 562 nM. Fargeintensiteten varierer med proteinkonsentrasjon, og mengde protein i hver prøve kan dermed bestemmes ved å relatere absorbansverdiene til absorbansverdier for prøvene i standardkurven.
7. Absorbansverdiene overføres til et Excelskjema hvor standardkurven tegnes og proteinkonsentrasjonen i prøvene estimeres ved å sammenligne med standardkurven.

Bilag 5 - Prosedyre for SDS-PAGE

Støping av gel

1. Støpeformen settes sammen.
2. Komponentene til separerende gel blandes. TEMED tilsettes til slutt.
3. Løsningen helles i støpeformen. Stopper ca 2 cm fra toppkanten.
4. Isopropanol tilsettes forsiktig over gelløsningen for å få en rett overflate.
5. Konsentrerende gel støpes når separerende gel er stivnet, ca 30 min.
Komponentene til konsentrerende gel blandes godt, og TEMED tilsettes gelløsningen til slutt. Isopropanol helles av og det vaskes med dH₂O før gelløsningen helles i støpeformen.
6. Eventuelle luftbobler fjernes og kam for å lage brønner settes ned i løsningen.
7. Gelen settes til polymerisering, 15-30 min.
8. Brønnene vaskes med 1 x kjørebuffer.
9. Gelen settes over i gelkjøringskar, og kjørebuffer helles i karet.
10. Prøvene appliseres.

Preparering og applisering av prøver.

1. Lik mengde protein (bestemt ut fra proteinkonsentrasjonsmålingene) appliseres av hver prøve. Volum justeres med 1 x lyseringsbuffer slik at alle prøvene får samme volum (16-20 µl).
2. 3-4 µl 6 x loadingbuffer tilsettes prøvene i avtrekk.
3. Prøvene denatureres ved 95 °C i 5 minutter, for deretter å avkjøles på is.
4. Prøvene spinnes raskt ned i bordsentrifuge.
5. Prøvene appliseres på gel. Tomme spor fylles opp med 1 x lyseringsbuffer tilsatt 6 x loadingbuffer. Molekylvektstandard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) tilsettes i spor 1.
6. Gelen kjøres på 30 mV til fronten av bromfenolblått (BFB) er kommet helt ned.
Både ladning og størrelse vil påvirke et proteins vandring gjennom en gel. I SDS-PAGE tilsettes detergenten SDS (Stoff med en hydrofil og en hydrofob del). SDS molekylenes hydrofobe del binder proteinenes hydrofobe grupper og bidrar til at proteinene denatureres. Den hydrofile delen av SDS, som har en negativ ladning vender ut. Dermed vil antall negative ladninger være proporsjonal med proteinets størrelse. I det elektriske feltet i gelen vil proteinene separeres etter størrelse i sin vandring mot den positive polen.

12 % SDS-polyakrylamid separerende gel

Acrylamid (30 %)	2,0 ml
Tris pH 8,8 (1 M)	1,9 ml
SDS (10 %)	50 µl
APS (20 %)	25 µl
TEMED	2,0 µl
H ₂ O	1,1 ml

Konsentrerende gel

Acrylamid (30 %)	0,67 ml
Tris pH 6,8 (1 M)	0,5 ml
SDS (10 %)	40 µl
APS (10 %)	40 µl
TEMED	4 µl
H ₂ O	2,7 ml

6 x loading buffer:

15 % SDS
50 % Glyserol
300 mM Tris pH 6,8
25 % β-merkaptoetanol
Bromfenolblått
H₂O

Kjørebuffer for SDS-PAGE

0,025 M Tris pH 6,8
0,2 M Glycin
0,1 % SDS (20 %)

Blotting og immunfarging

1. Støpeformen demonteres og gelen ekvibreres 10 min i Bjerrum-Schäfer-Nilsen buffer (BSN-buffer).
2. Immobilon-P PVDF membran klippes til, fuktes med metanol og skylles med dH₂O.
3. Whatmanpapir og ”pads” bestående av et porøst cellostoffs-lignende materiale med stor sugsevne fuktes i BSN-buffer.
4. Gel, PVDF membran, Whatmanpapir og ”pads” legges i blotteoppsats i følgende rekkefølge: svart side ned, pad, Whatmanpapir, gel, PVDF membran, Whatmanpapir, pad, blank side. Luftbobler fjernes ved å rulle en 5 ml pipette over filter og Whatmanpapir.
5. Blotteoppsats settes i blottekar med isblokk og magnet, og karet fylles opp med BSN-buffer.
6. Blottes ved 30 V, +4 °C over natt på magnetrører. Proteinene vil overføres fra gelen til membranen i et slikt elektrisk felt.
7. Blotteoppsatsen demonteres og PVDF membran farges 5 min med fargeløsning.
8. Avfarges 2 x 10 min med avfargingsløsning. Øverste venstre hjørne klippes av membranen for at denne skal kunne orienteres. Farget membran avbildes ved kopiering i en vanlig kopimaskin.
9. Membran skylles med dH₂O og blokkes 1 time med en blanding av tørrmelk resuspendert i Tris-bufret saltvann med ulik mengde Tween (TBST) (betingelser for brukte antistoff finnes til sist i avsnittet). Tørrmelk skal hindre eventuell uspesifikk binding av antistoffet til filteret.
10. Membran inkuberes med primærantistoff løst i TBST/tørrmelk i 1 time ved romtemperatur eller ved + 4 °C over natt, avhengig av antistoff (bilag 6).
11. Membran vaskes 3 x 10 minutter i TBST før inkubering med sekundærantistoff, løst i TBST/tørrmelk, i 1 time ved romtemperatur.
12. Membran vaskes 3 x 10 minutter i TBST.
13. Reagenser til ECL blandes 1:1 og dryppes over membranen.
14. Inkuberes 5 minutter.
15. ECL løsning helles av og membranen legges i en plastlomme i en eksponeringskassett for røntgenfilmer. Sekundærantistoffene som brukes i immunfarging er konjugert med HRP (Horseradish peroxidase). Dette enzymen oksiderer Luminol i ECL løsningen. Reaksjonen resulterer i et eksitert produkt som sender ut lys (foton) når det går til en lavere energitilstand.

16. Kassetten tas med på mørkerom og en røntgenfilm, X-omat UV film (Kodak, Oslo, Norge) legges over membranen i kassetten. Luminiscensen som ECL kittet lager vil svartre røntgenfilmen. Eksponeringstid varierer avhengig av intensiteten av signalet som igjen vil variere med mengde protein på membranen og med antistoffenes kvalitet/ optimalisering av fargingsprosedyrer. Filmene fremkalles med Curix 60 (AGFA, Berlin, FRG). For å få et objektivt mål for svarting av filmen blir disse scannet (CanoScan 9900, Canon) og behandlet i dataprogrammet ImageQuant. Uttrykket av et gitt protein estimeres ut fra svarting av film i det gitte området, minus en bakgrunnsverdi. De scannede gelbildene overføres til Photoshop elements der det lages figurer for dokumentasjon av data.

Bjerrum-Schäfer-Nilsen buffer (BSN-buffer):

0,05 M Tris

0,04 M Glycin

Fargeløsning

1 g Naphtol Blue Black

450 ml Metanol

100 ml Eddiksyre

450 ml ddH₂O

Avfargingsløsning:

900 ml Metanol

20 ml Eddiksyre

80 ml ddH₂O

TBST-buffer til immunfarging med α -tubulin

0,02 M Tris pH 7,5

0,5 M NaCl

0,25 % Tween 20

TBST-buffer til immunfarging med fosforylert I κ B α

0,02 M Tris pH 7,5

0,15 M NaCl

0,05 % Tween 20

**TBST-buffer til farging med ephrin-A1, IKK β
og fosforylert IKK α / β**

0,02 M Tris pH 7,5

0,15 M NaCl

0,1 % Tween 20

Bilag 6 - Antistoff

Tabell b1: Inkuberingsbetingelser for benyttede antistoffer

Antistoff	MW (kDa)	Blokkering/ Ab-inkubering i TBST med	Inkubering primær- antistoff (tid)	Fortynning av antistoff	Sekundærantistoff
α-tubulin	57	10/5 % TM	1 t	3:1000	HRP merket kanin anti-mus Ig
Fosforylert IκBα	41	5/5 % TM	o.n	1:2000	HRP merket kanin anti-mus Ig
Ephrin-A1	25	10/5 % TM	1 t	1:200	HRP merket geit anti-kanin Ig
IKKβ	87	5 % TM/ 5 % BSA	o.n	1:1000	HRP merket geit anti-kanin Ig
IKKα/β-P	85/87	5 % TM/ 5 % BSA	o.n	1:1000	HRP merket geit anti-kanin Ig

TM = tørrmelk

BSA = bovint serum albumin

Bilag 7 - Immunpresipitering (IP)

Vasking av kuler til IP

1. Passende volum Protein A sepharose kuler (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweeden) overføres til et eppendorfrør og spinnes ned.
2. Væskevolumet som pipetteres av måles, og kulene vaskes 3 ganger med 1 x proteinlyseringsbuffer.
3. Etter siste vask tilsettes samme volum proteinlyseringsbuffer som ble tatt av ved første vask.

Immunpresipitering

1. Ca 150 µg proteinlysat fortynnes til 500 µl med proteinlyseringsbuffer med protease- og fosfatasehemmere.
2. Antistoff (polyklonalt anti-IKK α) tilsettes slik at det fortynnes i 1:500 og det inkuberes to timer eller over natt på rulle ved 4 °C. Antistoffet skal da kunne binde IKK α i proteinlysatet.
3. Dagen etter tilsettes 35 µl vaskede protein A kuler før ny inkubering, minimum 45 min på rulle ved 4 °C. Protein A på kulene vil binde Fc-del på antistoffet slik at det i hvert tilfelle dannes et kompleks av IKK α og protein A kuler.
4. Kulene spinnes ned ved 13000 rpm i bordsentrifuge, ca 30 sek.
5. Supernatanten fjernes (fra denne kan det eventuelt immunpresipiteres med annet antistoff) og kulene vaskes 3 x med proteinlyseringsbuffer. Med vaskingen fjernes proteiner som ikke er bundet til antistoff på protein A kulene.
6. Pellet etter siste vask overføres til 0,22 µM Spin-X-rør, (Costar 8161, Corning Incorporation, NY, USA) med 250 µl proteinlyseringsbuffer. Det vaskes etter med 100 µl buffer for å få med alle kulene.
7. Sentrifugerer ved 8000 rpm i 3 min før filterkoppen overføres til 2,5 ml eppendorfrør.
8. Forsterket "sample buffer" varmes til 95 °C og 40 µl tilsettes hver filterkopp. For å få kulene resuspendert i bufferen ristes det forsiktig på røret før det settes på varmeblokk, 95 °C i 1 minutt.
9. Etter oppvarmingen ristes det igjen forsiktig på røret og sentrifuges ved 13000 rpm i 5 min. Filterkoppen kastes mens "flow-through" settes på SDS-PAGE eller fryses inntil elektroforesen skal utføres.

Forsterket sample buffer

100 mM Tris-HCl pH 6,8,
15 % glyserol
1 % SDS
5 % β -merkaptoetanol
0,01 % bromfenolblått
10 mg DDT og 20 mg SDS tilsettes

3 x SDS sample buffer

187,5 mM Tris-HCl, pH 6.8
30 % Glyserol
6 % w/v SDS
0,03 % Bromfenolblått
150 mM DTT

DTT tilsettes rett før bruk av bufferen

Variasjoner av inkuberingsbetingelser

- PBS med protease- og fosfatasehemmere.
- PBS med PMSF.
- Proteinlyseringsbuffer med protease- og fosfatasehemmere.
- Proteinlyseringsbuffer med PMSF.
(konsentrasjoner protease- og fosfatasehemmere som oppgitt for proteinlyseringsbuffer, bilag 3).
- Kulemengde: 35 μ l, 50 μ l.
- Mengde protein: 150 μ g, 300 μ g eller 400 μ g.
- Mengde antistoff: 1:500 eller 2:500.
- Inkuberingstid: 2 timer eller over natt.

Bilag 8 - Prosedyre for RNA isolering

1. Celler lyses i Trizol (mengde avhenger av antall celler). Trizol med lyserte celler kan fryses ved $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ til man ønsker å isolere RNA.
2. Prøvene inkuberes 5 minutter ved romtemperatur og vortexes.
3. Det tilsettes deretter 0,2 ml kloroform per ml Trizol.
4. Prøvene vortexes før de sentrifuges i bordsentrifuge, 13000 rpm, 15 min ved $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Vannfasen pipetteres forsiktig over i et nytt rør.
6. RNA felles ved tilsetning av isopropanol, 0,5 ml per ml Trizol.
7. Felles over natt ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
8. RNA spinnes ned ved sentrifugering i bordsentrifuge, 13000 rpm, 15-20 min ved $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
9. Supernatant pipetteres av og RNA vaskes i 75 % etanol (minst 1 ml etanol per ml Trizol). Vortexes og sentrifugeres ved 13000 rpm i 10 min, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
10. Supernatanten pipetteres av.
11. Rørene spinnes raskt en gang til for å få ned væske langs kantene av røret.
12. Etanol pipetteres av på nytt, og prøvene inkuberes noen få min ved romtemperatur for fordampning av etanolrester.
13. RNA pelletene løses i 30-100 μl sterilt vann.
14. Rørene inkuberes deretter noen timer på is før måling av RNA konsentrasjon. Dette gjøres ved at 1 μl av RNA-prøven blandes med 69 μl dH_2O og at absorbansen ved OD_{260} , målt mot en blindprøve, avleses i et spektrofotometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech, Sydney, Australia). Omregningsfaktoren er at $1\text{ OD}_{260} = 40\text{ }\mu\text{g/ml RNA}$.
15. Prøvene lagres ved $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Bilag 9 - Real-Time RT-PCR

Benyttede primersekvenser:

ephrin-A1 forward: 5'-CAGCGCTTCACACCTTTCAC-3'

ephrin-A1 reverse: 5'-GCTGGTGGATGGGTTTGG-3'

optineurin forward: 5'-AGGAAGAGGACCTGGAAACCA-3'

optineurin reverse: 5'-TTTCTCTCTCGCTGCTCTTCA-3'.

Programmet for PCR-kjøring

1: 95 °C, 3 min.

2: 95 °C, 10 sek, 60 °C, 35 sek - punkt 2 kjøres 50 ganger.

3: 95 °C, 20 sek

4: 55 °C, 1 min

5: 80 sykluser hvor temperaturen stiger med 0,5 °C for hver syklus.

6: 4 °C og hold.