

Masteravhandling for graden Master i Farmasi

**Påvising og karakterisering av PGE<sub>2</sub> reseptorar med omsyn  
på regulering av matriks metalloproteinasar  
frå osteosarkomcellelinjer**

av  
**Hildegunn Oma**  
2007



**Avdeling for farmakologi  
Instiutt for farmasi  
Det medisinske fakultet  
Univeristetet i Tromsø**

**Rettleiarar:  
Professor Thrina Loennechen  
Professor Jan-Olof Winberg  
Stipendiat Hilde Ljones**

## Forord

Masteroppgåva har funne stad ved Universitetet i Tromsø, frå oktober 2006 til mai 2007. Prosjektet er utført ved Institutt for farmasi, Avdeling for farmakologi under rettleiing av Thrina Loennechen, Hilde Ljones og Jan Olof Winberg.

Eg vil takke alle mine tre rettleiarar for god oppfølging, velvilje og fagleg rettleiing. Det har vore ei utfordrande og svært lærerik tid. Takk til overingeniør Hanne Kildalsen for laboratorieopplæring og mykje god hjelp. Eg vil òg takke Eli og resten av personalet ved avdeling for medisinsk biokjemi, for både rettleiing og assistanse i høve til laboratoriearbeidet. Takk til Baldur Sveinbjørnson for fleire gode råd.

Til slutt tusen takk til Ellen og Marianne for inspirasjon og støtte, Elin for korrekturlesing, og Kristian for tolmod og oppmuntring.

Tromsø, mai 2007

Hildegunn Oma

# Samandrag

Enkelte kroniske inflammatoriske sjukdommar er kjent å disponere for utvikling av kreft. Etersom fleire COX-2 hemmarar har synt kjemoterapeutisk effekt er det skapt stor interesse kring PGE<sub>2</sub> si generelle rolle, og relevans i høve til kreft. PGE<sub>2</sub> regulerer ei rekkje cellulære prosessar gjennom binding til fire prostaglandin E reseptorar (EP reseptorar). Matriks metalloproteinasear (MMPar) er ei gruppe enzym som er vist å vere involvert mellom anna ved tumorinvasjon, metastasering og angiogenese. Enzymet har skapt stor interesse innan kreftforskinga, ettersom mange kreftformer syner auka ekspresjon av MMPar. Det er i fleire studiar synt samanheng mellom COX-2 oppregulering og auka MMP uttrykk. Denne oppgåva byggjer på tidlegare masteroppgåver, som har vist induksjon av MMP-2 ekspresjon og aktivering frå pH $\beta$ -1 og II-11b celler etter stimulering med PGE<sub>2</sub>. Målet for denne oppgåva var å påvise, og karakterisere EP reseptorar med omsyn på MMP uttrykk og aktivering i osteosarkomcellelinjene pH $\beta$ -1 og II-11b, to cellelinjer med respektivt høgt og lågt nivå av det metastaseassosierte proteinet S100A4. Celler dyrka direkte på plast vart inkubert med tre ulike EP agonistar; butaprost, sulprostone og misoprostol, i tillegg til EP reseptor antagonist AH6809. Gelatin zymografi vart nytta for å identifisere MMP-2 uttrykk og aktivering. Kasein zymografi og Western blotting vart nytta for respektivt å kartlegge, og identifisere uttrykk og aktivering av MMP-1, MMP-7 og MMP-13. Det vart utført MTS test for alle celleforsøka, for å kontrollere om EP reseptor hemming og stimulering påverka celleviabilitet. Gelatin zymografi av kondisjonert medium frå celler inkubert med EP reseptor agonistar, eller antagonist viste ingen kvantifiserbare effektar på MMP-2 uttrykk eller aktivering. Verken kasein zymografi eller Western blotting var tilstrekkeleg sensitiv til å identifisere eventuell MMP ekspresjon utover MMP-2. Det vart ikkje identifisert trendar for auka celleviabilitet ved EP reseptor aktivering, men det vart synt ein svak reduksjon av celleviabilitet etter hemming av EP reseptorar.

# Forkortingar

BSA	Bovint serumalbumin
cAMP	Adenosin 3', 5'- syklisk monofosfat
COX-2	Cyclooxygenase-2
dbc AMP	dibutyryl syklisk AMP
DME	Dulbeccos modifiserte Eagle medium
DMF	Dimetyl formamid
DTT	Dithiothreitol
ECM	Ekstracellulær matriks
EP-reseptor	E- prostaglandin reseptor
ERK	Ekstracellulær signal regulert kinase
F12	Ham sin F12 næringsblanding
GAPDH	Glyceraldehyd-3- fosfat dehydrogenase
HRP	Horse radish peroxydase
IP3	Inositol trifosfat
kDa	Kilo dalton
LAF- benk	Laminar Air Flow benk
MMP	Matriks metalloproteinase
MT-MMP	Membranbunden Matriks metalloproteinase (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MTS-salt	
MQ vatn	Milli-Q vatn
NK-celler	Natural killer celler
NSAID's	Ikkje-steroidale antiinflammatoriske legemiddel
OHS	Osteosarkomcellelinje
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PKA	cAMP avhengig protein kinase A
RPMI-1640	Rosewell Park Memorial Institute medium
rpm	Rundar per minutt
SDS	Natrium dodekyl sulfat
TBS-T	Tris Bufra Saline med Tween
TGFβ	Transforming growht factor-β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase

# Innhald

Forord .....	2
Samandrag .....	3
Forkortingar .....	4
Innhald .....	5
<b>1 Innleiing.....</b>	<b>7</b>
1.1 Kreft .....	7
1.1.1 Invasjon og metastasering .....	8
1.1.2 Angiogenese .....	10
1.2 Inflammasjon og kreft .....	10
1.3 Prostaglandin .....	12
1.3.1 PGE <sub>2</sub> .....	13
1.3.2 EP-reseptorar .....	13
1.3.3 Samanheng mellom PGE <sub>2</sub> og kreft.....	14
1.4 Ekstracellulær matriks .....	17
1.4.1 ECM komponentar .....	18
1.4.2 Basalmembran .....	20
1.5 Matriks metalloproteinasar .....	21
1.5.1 Struktur og funksjon.....	21
1.5.2 Regulering av MMPar og TIMPar .....	24
1.5.3 MMPar i høve til kreft.....	27
1.6 S100A4.....	29
1.6.1 S100A4 og moglege mekanismar i høve til kreft.....	29
1.7 Osteosarkom.....	31
1.7.1 Beinmetabolisme .....	31
1.8 Problemstilling .....	32
<b>2 Material og metode.....</b>	<b>34</b>
2.1 Material .....	34
2.1.1 Kjemikal og substansar nytta ved celledyrking og forsøk .....	34
2.1.2 Løysingar ved celledyrking og celleforsøk .....	35
2.1.3 Bufferar til Western blotting og zymografi.....	36
2.1.4 Gelar til Western blotting og zymografi .....	37
2.1.5 Analyseverktøy.....	39

2.2	Celler og celledyrking .....	39
2.2.1	Dyrking av celler .....	39
2.2.2	Splitting av celler .....	40
2.2.3	Opptining av celler .....	40
2.3	Celleforsøk .....	40
2.3.1	Teljing av celler .....	41
2.3.2	Utsåing av celler .....	42
2.3.3	Hausting av medium til Zymografi og Western blotting .....	42
2.3.4	Hausting av celler til Western blotting .....	42
2.4	Western-blotting .....	43
2.5	Zymografi og analyse av gel .....	44
2.6	MTS for måling av celleviabilitet .....	45
<b>3</b>	<b>Resultat.....</b>	<b>46</b>
3.1	Kvalitativ påvising og kvantifisering av EP reseptorar.....	46
3.2	Effekt av EP reseptor aktivering og hemming på celleviabilitet.....	51
3.3	Uttrykk og aktivering av MMPar etter aktivering av EP reseptorar .....	55
3.4	Uttrykk og aktivering av MMPar etter hemming av EP reseptorar .....	58
<b>4</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>62</b>
4.1	Optimalisering av Westernmetode for påvising av EP reseptorar .....	62
4.2	Påvising av EP reseptorar.....	62
4.3	Kvantifisering av EP reseptorar .....	64
4.4	Uttrykk og aktivering av gelatinasar etter hemming og aktivering av EP reseptorar .....	65
4.5	Uttrykk av kollagenasar og matrilysin etter hemming og aktivering av EP reseptorar .....	68
4.6	Celleviabilitet etter aktivering og hemming av EP reseptorar .....	70
<b>5</b>	<b>Konklusjon og eventuelle framtidige prosjekt.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Referansar.....</b>	<b>73</b>

# 1 Innleiing

## 1.1 Kreft

I Noreg har utbreiinga av kreft auka med om lag 80 % frå midten av femtitalet til i dag [1]. Etter hjarte/kar lidningar er kreft no den nest største folkesjukdommen i den vestlege delen av verda [2], og insidensen vil truleg fortsetje å auke i åra som kjem. Sjukdommen råkar i hovudsak den eldre befolkninga. Sett i ljøs av at folk stadig lever lenger er det naturleg at utbreiinga òg har auka. Risikofaktorar for å utvikle kreft er mange; tobakk, dårleg kosthald og lite mosjon, samt infeksjonar og arv for å nemne nokre. Stadig betre diagnostiske metodar er medverkande til at fleire tilfeller vert oppdaga ved eit tidlegare tidspunkt, slik at fleire pasientar får kurativ eller livsforlengande behandling. Dette kan vere årsaka til den svake nedgangen i kreftdødsfall siste 25 åra [2]. Likevel døydde nær 16000 nordmenn av kreft i 2004, og vondarta svulstar var årsak til om lag ein fjerdedel av alle dødsfall same året [3].

Kreft famnar om ei rekkje sjukdommar som alle kan karakteriserast av ukontrollert cellevekst. Det er ikkje fyrst og fremst høg grad av celledeling som er typisk for kreftceller, men ei unik evne til å unngå normal regulering av celledelinga. Konvertering til kreftcelle kan oppstå dersom cella vert utsett for endringar i genmaterialet (mutasjonar). Slike mutasjonar kan vere nedarva eller oppstå ved eksponering av ulike miljøfaktorar, til dømes UV-stråling eller tobakksrøyk. Oftast er ein kombinasjon av fleire genetiske endringar naudsynt for å utvikle kreftceller. Dersom mutasjonen skjer på gen som normalt kontrollerer sentrale prosessar som celledeling, celledifferensiering og apoptose (proto-onkogen), eller gen som normalt verkar hemmande på karsinogene prosessar (tumor-supressor gen), vil det i stor grad disponere for utvikling av kreftceller. Det er karakteristisk for tumorceller at dei ved vidare deling dedifferensierar frå modercella, og taper sin originale funksjon. Prognosen viser seg å vere dårlegare ved høg grad av dedifferensiering. Etablering av ein primærtumor oppstår dersom tilhøva rundt kreftcellene gjev rom for det. Ein tumor består av kreftceller og stroma. Tumorstroma er igjen samansett av immunceller, fibroblastar, ekstracellulær matriks (ECM), og eit nett av blodårer. Desse faktorane vil kunne vere med å påverke vidare utvikling av tumoren. Tumoren kan utvikle seg til å vere godarta (benign) eller vondarta (malign). Ein benign tumor er kjenneteikna av å vere klart avgrensa frå anna omkringliggande vev, medan

maligne tumorar har evna til å invadere naboorgan, og spreie seg via blod eller lymfe til fjernliggande vev [4, 5].

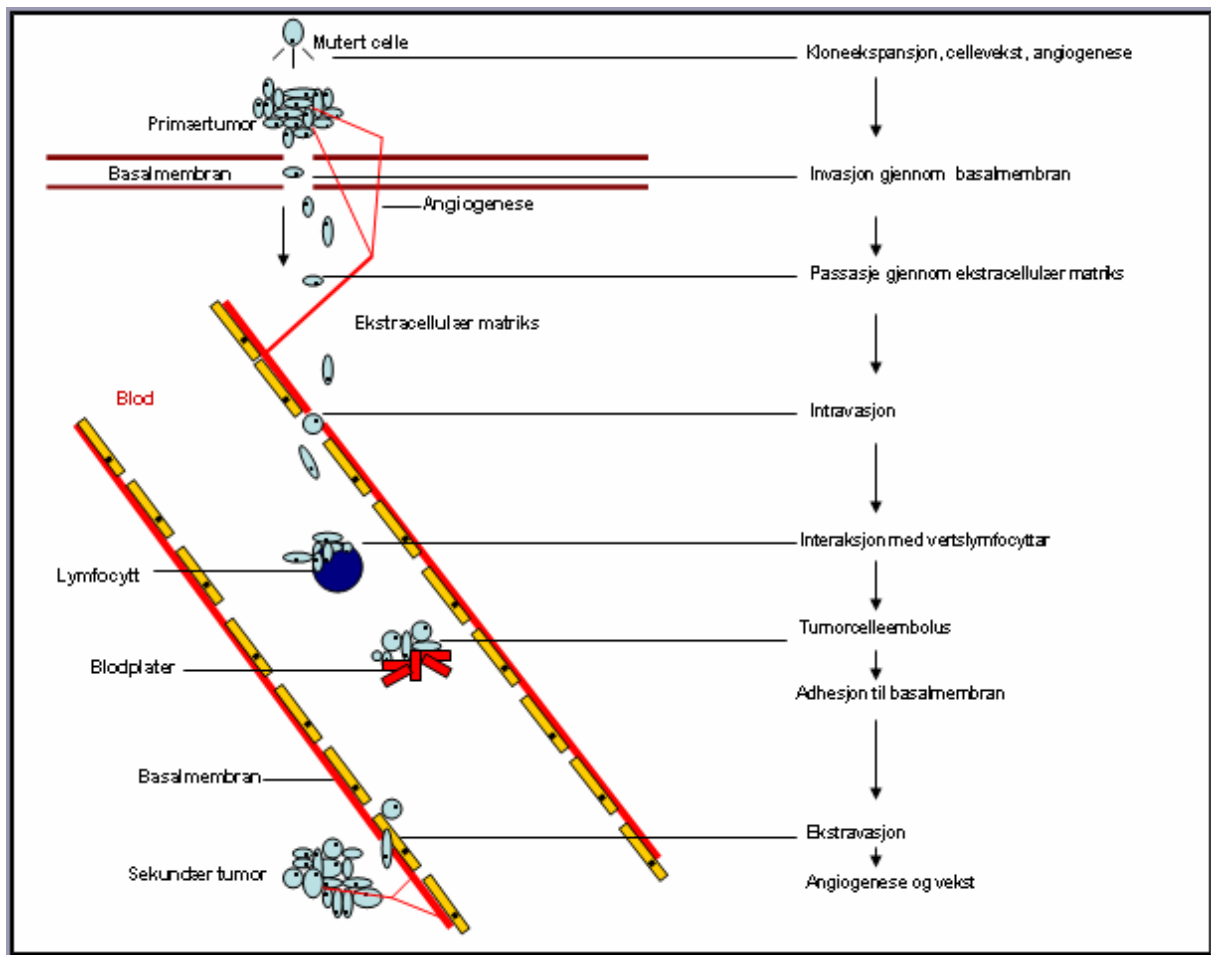
Celler er avhengig av vevsspesifikke signal og vekstfaktorar for å overleve. Apoptose (programmert celledød) er essensielt for å oppretthalde normal ballanse mellom proliferasjon og celledød. Mekanismen er òg vesentleg for å effektivt kunne hindre oppstoda av kreftceller [6]. For at kreftceller skal overleve på trass av genetisk ustabilitet, låg tilgong av oksygen og næringsstoff, lausriving frå ECM, samt angrep frå immunsystemet eller kjemoterapeutika, må cellene evne å unngå apoptose [7].

### 1.1.1 Invasjon og metastasering

Invasjon av nærliggande vev og danning av metastasar er hovudårsaka til både morbiditet og mortalitet hjå kreftpasientar, samt den største utfordringa i kreftterapien [8]. Ved etablering av sekundære tumorar vert sannsynet for langvarig overleving redusert frå 90- til om lag 5 %. Tidleg diagnose og behandling minskar sjansen for invasjon og metastasering, og aukar dermed moglegheita for kurering [9].

Den kritiske overgangen frå benign til malign tumorvekst ligg i kreftcellene sin evne til å bryte seg gjennom basalmembranen og invadere omkringliggande vev, samt evna til å nedregulere intercellulære adhesjonsmekanismer, og oppregulere cellemotiliteten [10]. Basalmembranen og ECM avgrensar primær tumoren i frå anna vev (avsnitt 1.4.2). Omforming av ECM er naudsynt for at lokal invasjon kan oppstå, men metastasering krev likevel meir enn kapasitet til å invadere. Tumorcellene må lausrive seg frå primærtumor og intravasere lymfe- eller blodbanen (figur 1.1). Dette skjer ved at tumorcellene innleiingsvis festar seg til endotelceller i områder der det er mogleg å traversere blodkarveggen. Blodkar rundt tumorar er generelt meir permeable enn normalt, og fremjar difor dette trinnet av prosessen [11]. Tumorcellene vert frakta via blod- eller lymfebanen rundt i kroppen. I kretslopet må tumorcellene overleve sirkulatorisk stress, samt angrep frå immune og ikkje-immune forsvarsmekanismer. Neste trinn i metastaseringsprosessen er ekstravasering frå blod- eller lymfebane over i nytt vev. Tumorcellene må på ny krysse basalmembranen og ECM før cellene kan slå seg ned, og danne grunnlag for vekst i nytt vev [8, 12]. Sekundærtumorar oppstår berre dersom kvart trinn i prosessen er komplett. Metastasering er difor ein svært ineffektiv prosess, der mindre enn 0,01 % av tumorcellene som når systemisk sirkulasjon dannar basis for sekundære tumorar [13].





**Figur 1.1 Skjematisk modell av tumorinvasjon.** Ei mutert celle gjev opphav til dysplasi og danning av primærtumor. Angiogenese aukar blodforsyninga til primærtumoren, og fremjar vidare vekst. Basalmembranen og ekstracellulær matriks avgrensar primærtumoren frå anna vev, men tumorcellene kan tileigne evne til å trengje gjennom denne barrieren. Etter passasje gjennom ekstracellulær matriks må tumorcellene intravasere blod- eller lymfebanen, for å kunne spreie seg til fjernliggande vev. I blod- eller lymfe bind tumorcellene til lymfocytar eller blodplater, og vert frakta med blod eller lymfe rundt i kroppen. Tumorcellene bind til sist til endotelceller for å ekstravasere frå blod- eller lymfebanen over i nytt vev. Under ekstravasjonen må tumorcellene trengje gjennom ein ny basalmembran, samt ekstracellulær matriks før cellene kan slå seg ned i nytt vev, og moglegvis gje opphav til ein sekundærtumor. Angiogenese er naudsynt for å sikre vekst av sekundær tumor. Figuren er ein modifikasjon av figur 6-29 i referanse [14].

Ikkje alle kreftceller gjev opphav til mikrometastasar og sekundære tumorar. Eit kriterium utover det som er nemnt i avsnittet over, er overleving på trass av apoptotisk stimuli. Dersom ei celle flyttar seg vekk frå sin fysiologiske posisjon vil cella normalt gjennomgå apoptose. Ei levercelle kan normalt ikkje etablere vekst i til dømes nyrer. For at tumorceller skal kunne danne metastasar må tumorcellene unngå slik normal regulering. Mutasjonar er ofte årsak til tap av denne type kontroll [4].

### 1.1.2 Angiogenese

Angiogenese er danning av nye blodkar ifrå allerede eksisterande årer. Prosessen er fundamental gjennom fosterutvikling, samt den kvinnelege reproduksjonssyklusen, og er normalt strengt kontrollert. I vakse vev vil berre 0,01 % av endotelcellene normalt gjennomgå celledeling. Det betyr at berre unntaksvis, til dømes ved sårlækning, vil prosessen vere aktiv [15, 16]. I tumorbiologien er angiogenese eit essensielt trinn. Det er klarlagt at nydanning av blodårer er heilt sentralt for at tumorar skal kunne overleve og ekspandere. Nydanning av blodårer rundt tumoren er eit kriterium for å fjerne avfallsprodukt, samt å tilføre tilstrekkeleg oksygen, næringsstoff og vekstfaktorar slik at tumormassen kan ekspandere [8, 12]. Utan nydanning av blodårer ville balansen mellom celleproliferasjon, og apoptose hindra tumorvekst utover nokre få kubikkmillimeter ( $10^5$ -  $10^6$  celler) [17]. Angiogenese påverkar ikkje i signifikant grad tumorcellene sin proliferasjonsrate, men reduserer raten av apoptose, og gjev ein netto auke i tumorvekst [16]. Angiogenese er òg avgjerande for om metastaserande celler kan spreie seg, då auka vaskularisering lettare gjev kreftcellene tilgang til systemisk sirkulasjon. Induksjon av angiogenese er vist å samsvare med tumoren sin grad av ivasivitet [18]. Ulike inflammasjonsmediatorar som til dømes prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), samt matriks metalloproteinasar (MMPar) er vist å fremje blodkardanninga [17]. MMP-2, MMP-9 og MT1-MMP er vist å vere av særns interesse [19].

### 1.2 Inflammasjon og kreft

Føremålet med inflammasjon er å gjenopprette normal funksjon etter irritasjon eller skade av vev. Akutt inflammasjon vert initiert ved at pro-inflammatoriske cytokin rekrutterer immunceller til skadestaden. Det er i fyrste rekke neutrofilar, og deretter makrofagar som infiltrerer og reparerer det inflammatoriske vevet. Akutt inflammasjon er normalt sjølvresignerande, ettersom produksjon av anti-inflammatoriske cytokin overtek for pro-inflammatoriske cytokin i helingsfasen. Kronisk inflammasjon vil i motsetting eksponere vevet for vedvarande immunstimuli, og vere karakterisert av konstant nedbryting og regenerering av vev [20, 21].

Immunsystemet spelar ei sentral rolle i tumorbiologien. I over hundre år har det vore kjent at tumorvev hyppig er infiltrert av immunceller. Det har sidan slutten av 1800-talet vore diskutert om kronisk inflammasjon vernar mot, eller disponerer for kreft. Den tyske legen, Rudolph Virchow, observerte allerede i 1858 at kreft ofte oppstod i inflammet vev.

Han foreslo dermed at kronisk inflammasjon kunne initiere cellulær proliferasjon og kreft.

I same tidsperiode foreslo andre forskarar at akutt inflammasjon medførte tilbakegang av tumorar, og dermed at akutt inflammasjon var ein sentral forsvarsmekanisme mot kreft. Rolla av inflammasjon i kreftsamanheng var lenge kontroversiell, men har i større grad vorte oppklara i seinare tid. Sjølv om mellom anna tumorspesifikke NK-celler<sup>1</sup> framleis er kjent å vere involvert i det kroppseigne forsvaret mot kreft, har ein primært gått vekk i frå at inflammasjon verkar kreftbeskyttande. Det er i dag kjent at ei rekkje autoimmune sjukdommar, samt kroniske infeksjonssjukdommar disponerer for spesifikke kreftformer (tabell 1) [5, 20, 22].

**Tabell 1.** Sjukdomstilstandar assosiert med kreft. Modifisering av tabell 1 i referanse [21].

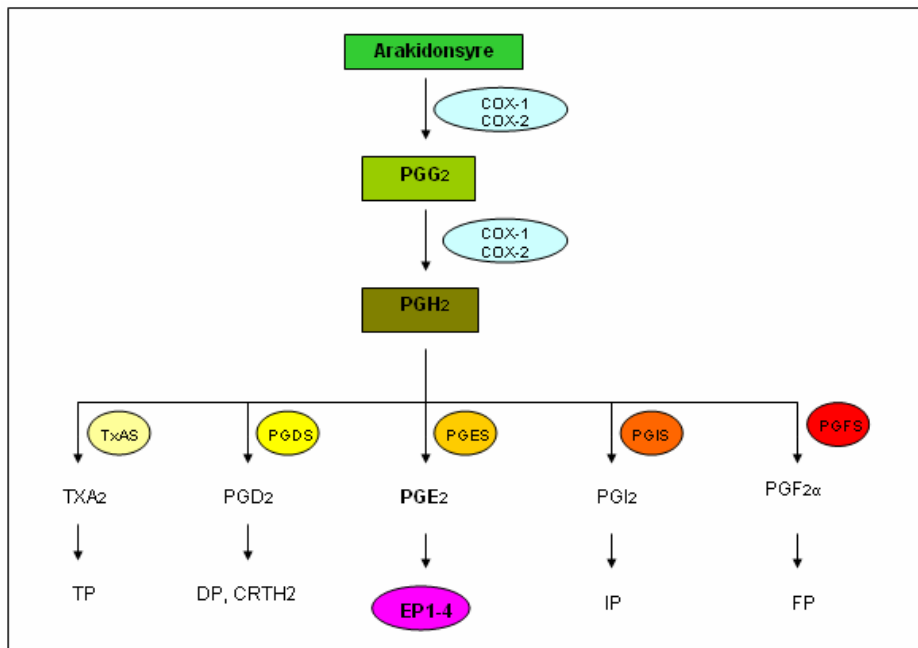
Kronisk inflammatoriske tilstandar assosiert med kreft.		
Sjukdomstilstand	Assosiert kreftform	Etiologi
Kronisk bronkitt	Lungekreft	Tobakksrøyk, asbest
Morbus Chron, Ulcerøs colitt	Kolonkreft	
Kronisk pankreatitt	Kreft i pankreas	Alkoholisme
Inflammasjon i hud (solforbrenning)	Melanom	UV-stråling
Infeksiøse sjukdommar assosiert med kreft.		
Sjukdomstilstand	Assosiert kreftform	Agens
Magesår	Gastrisk adenokarisinom	<i>Helicobacter pylori</i>
Hepatitt	Leverkreft	Hepatitt B og/eller C
Mononukleose	B-celle non-Hodgkin lymfom	Epstein-Barr virus
AIDS	B-celle non-Hodgkin lymfom, Kaposi sarkom	HIV

Vedvarande inflammasjon eksponerer vev for cytokin, vekstfaktorar, lipid mediatorar, hormon og akutfase protein. Slik eksponering kan affisere kontroll av cellulære prosessar som proliferasjon, apoptose og differensiering [6]. Fagocyterande immunceller fungerer normalt ved å fjerne gamle celler, cellerestar og mikroorganismar. Over tid kan fagocytar derimot forårsake DNA øydelegging (mutasjonar) ved å eksponere vevet for reaktive oksygen og nitrogen molekyl. Mutasjonar i tumor-supressor genet p53 er observert like hyppig ved kroniske inflammatoriske sjukdommar som i tumorar. Immunceller kan òg fremje vevsmodulering og angiogenese ved å produsere, eller indusere produksjon av proteasar av typen matriks metalloproteinasar. Stromaceller produserer MMPar etter stimulering frå kjemokin, og cytokin produsert av inflammasjonsceller [5, 21].

<sup>1</sup> NK (natural killer) celler er spesialiserte lymfocytar som er involvert i drap av virusinfiserte celler og tumorceller.

### 1.3 Prostaglandin

Prostanoid modulerer ei rekkje fysiologiske prosessar, eksempelvis i gastrointestinal-, urogenital- og immun-systemet, men spelar òg ei rolle ved patologiske prosessar som utvikling av kardiovaskulær sjukdom, inflammasjon og kreft. Til saman fins det tre ulike prostaglandin;  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ , og  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Dei er av ulik funksjon, men har til dels overlappende struktur. Termen prostanoid inkluderer i tillegg  $\text{PGI}_2$  og tromboksan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ). Alle prostanoida vert generert frå den 20-karbon lange umetta feittsyra arakidonsyre (figur 1.2). Syntesen skjer i fleire steg, men startar ved at fosfolipase- $\text{A}_2$  frigjer arakidonsyra frå cellemembranen. Syra vert vidare oksidert til prostaglandin  $\text{G}_2$  ( $\text{PGG}_2$ ) ved hjelp av cyclooxygenase (COX) enzymet [23]. Enzymet fins i 2 isoformar; COX-1 og COX-2. Fyrstnemnde er uttrykt konstitutivt i ei rekkje celler, medan COX-2 i enkelte celler er induisert under inflammasjon [24]. I neste trinn vert  $\text{PGG}_2$  redusert av same enzymet til den ustabile prostaglandin  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ). Hittil er syntesevegen lik for alle produkta. Vidare er  $\text{PGH}_2$  utgangspunkt for danning av fem særne prostanoide, der spesifikke enzym er ansvarlege for syntesen av det enkelte prostanoide. Cella sin uttrykingsprofil av dei enkelte enzyma er avgjerande for kva prostanoide som i hovudsak vert syntetisert. Prostaglandina handhev sin effekt lokalt, då halveringstida er svært kort i systemisk sirkulasjon [23].



**Figur 1.2 Synteseveg for prostanoid.**

Arakidonsyra vert ved hjelp av COX-1 eller -2 omgjort til  $\text{PGH}_2$ , som er utgangspunkt for danning av dei fem ulike prostanoide. Figuren syner enzyma som er ansvarleg for danning av dei respektive produkta, samt reseptorane som dei ulike prostanoide verkar gjennom. Skissa er ei forenkling av figur 1 i referanse [23].

### 1.3.1 PGE<sub>2</sub>

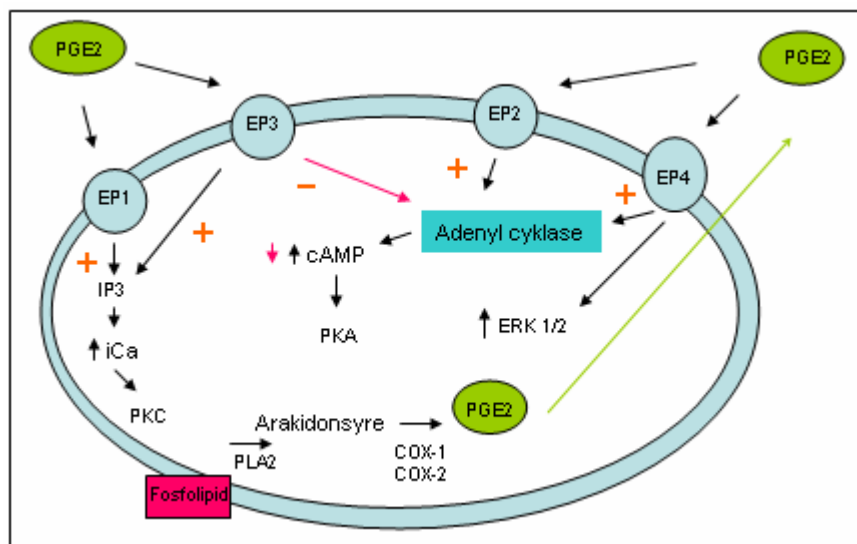
I mange fysiologiske høve er PGE<sub>2</sub> hovudproduktet i COX-syntesevegen. I ventrikkelen spelar PGE<sub>2</sub> ei essensiell rolle ved å verne tarmmukosa for surt miljø. Mediatoren er òg kritisk for å sikre normal nyrefunksjon ved å oppretthalde normal blodgjennomstrøyming gjennom nyrene, og sikre glomerulær filtrasjon. PGE<sub>2</sub> sin effekt på glatt muskulatur kan vere kompleks, då den kan verke både dilaterande og konstringerande avhengig av kva vev det gjeld [23].

Inflamasjon resulterer alltid i frigjeving av prostanoid, fyrst og fremst PGE<sub>2</sub>. Ved akutt inflammasjon skjer frigjevinga hovudsakleg frå lokalt vev, medan monocyttar og makrofagar òg bidreg med PGE<sub>2</sub> frigjeving ved kronisk inflammasjon. PGE<sub>2</sub> verkar i seg sjølv vasodilaterande, i tillegg til å potensere den vasodilaterande og smerteframkallande effekten av histamin og bradykinin. Samstundes bør det nemnast at PGE<sub>2</sub> viser ein antiinflammatorisk effekt ved å redusere frigjeving av lysosomale enzym frå immunceller, samt redusere generering av toksiske oksygenmetabolittar frå neutrofilar [25]. Forutan å vere involvert under akutt og kronisk inflammasjon, har PGE<sub>2</sub> gjennom fleire studiar vist å vere assosiert med utvikling og spreiding av kreft [26, 27]. Dei diverse rollene til PGE<sub>2</sub> skuldast dels at PGE<sub>2</sub> bind til fire ulike reseptorar, med ulik kopling til intracellulære signalvegar [23].

### 1.3.2 EP-reseptorar

PGE<sub>2</sub> verkar gjennom fire membranbundne E prostanoid reseptorar; EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> og EP<sub>4</sub>. Reseptorane høyrer inn under ein stor familie av transmembrane G-protein koplade reseptorar [28]. EP-reseptorane liknar til ein viss grad strukturelt, men er koplade ulikt til indre signalvegar, og induserer ulike intracellulære effektar (figur 1.3). EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub> bind til eit G<sub>s</sub>-protein som aktiverer adenyl cyklase, og gjev auka cAMP nivå. EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub> aktivering fremjar slik aktivering av cAMP avhengig protein kinase A (PKA). Gjennom binding til eit G<sub>i</sub>-protein verkar EP<sub>3</sub> hemmande på adenyl cyklase, samstundes som den stimulerer IP<sub>3</sub> (inositol trifosfat) signalvegen, og på denne måten gjev respektivt redusert intracellulært cAMP nivå og mobilisering av intracellulær Ca<sup>2+</sup>. Det fins òg isoformar av EP<sub>3</sub> som bind til G<sub>s</sub>-protein, og dermed stimulerer adenyl cyklase. Aktivering av EP<sub>1</sub> fører til auka intracellulær Ca<sup>2+</sup>-nivå via IP<sub>3</sub> generering. Mobilisering av intracellulært Ca<sup>2+</sup> er assosiert med aktivering av protein kinase C (PKC) [23, 29]. PGE<sub>2</sub> er svært potent i høve til å stimulere cAMP danning, men i

mindre grad kapabel til å auke intracellulære  $\text{Ca}^{2+}$ -nivå [30]. Dei nemnde intracellulære effektane er mellom anna assosiert med anti-apoptotisk og angiogenetisk respons [28]. Det er i tillegg funne  $\text{PGE}_2$  assosierte signalvegar som uavhengig av både adenyl cyclase, og intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  nivå kan vere av betydning for migrering og invasjon av kreftceller.  $\text{EP}_4$  er vist å aktivere ekstracellulære signal regulerede kinasar; ERK1 og ERK2 via PI3-kinase [31, 32].



**Figur 1.3 Stimulering av EP reseptorar.**  $\text{PGE}_2$  vert syntetisert frå arakidonsyre ved hjelp av COX enzyma og prostaglandin E synthase (PGES).  $\text{PGE}_2$  fremjar diverse intracellulære effektar gjennom stimulering av fire forskjellige EP reseptorar. Figuren er ein modifikasjon av figur 1 i referanse [31].

Tumorcellene kan sjølv regulere intracellulære prosessar som fører til proliferering eller metastasering via autokrin aktivering av EP-reseptorar. Dersom inflammasjon bidreg til karsinogenese spelar EP reseptorar på inflammasjonsceller truleg ei kritisk rolle. I andre høve kan EP reseptorar på premaligne celler, eller endotelceller vere kritiske haldepunkt for respektivt kreftutvikling og angiogenese [31].

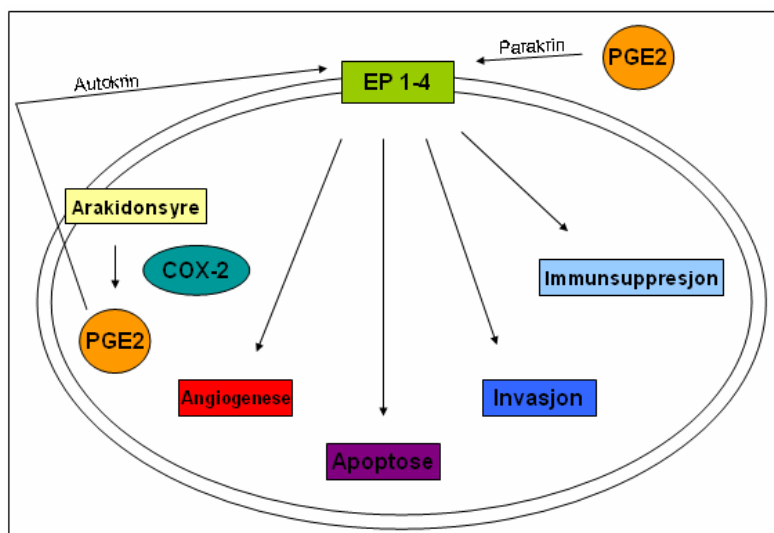
### 1.3.3 Samanheng mellom $\text{PGE}_2$ og kreft

Data tyder som nemnt tidlegare på at kroniske inflammasjonstilstandar aukar risikoen for å utvikle kreft. Pasientar med til dømes Morbus Chron og Ulcerøs colitt er vist å ha større insidens av kolorektal adenocarcinoma<sup>2</sup>, samanlikna med normalbefolkninga. Kronisk betennelse eksponerer vevet for ulike inflammasjonsmediatorar som cytokin, kjemokin, hormon og prostaglandin [6]. Truleg er fleire inflammasjonsmodulatorar involvert i mekanismar som fører til kreft, men den direkte samanhengen mellom eksponering av inflammsjonsceller og karsinogenese er ikkje fullstendig klarlagt. Epidemiologiske og kliniske studiar har indikert at langtidsbruk av aspirin, og andre ikkje-steroidale

<sup>2</sup> Adenokarsinom; vondarta svulst som stammar frå kjertelvev, men er assosiert med ei rekkje typar kreft.

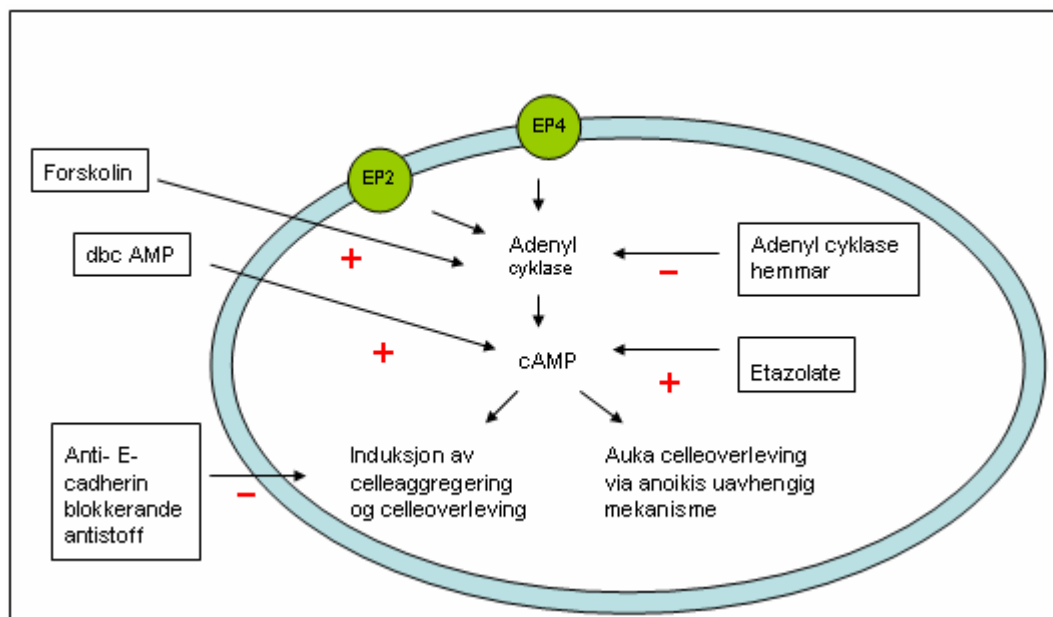
antiinflammatoriske legemiddel (NSAID) kan redusere insidensen av enkelte kreftformer, som til dømes kolorektal-, øsofegal-, bryst-, lunge- og blære-kreft [28]. Ut ifrå desse observasjonane er det tydeleg at prostaglandin kan vere involvert i enkelte prosessar som fører til kreft.

Oppregulering av COX-2 er vist i mange solide tumorar. Enzymet er synt å vere oppregulert i både tumorceller, stromaceller og i angiogenetiske endotelceller etter stimulering av ymse cytokin, vekstfaktorar og hormon [27]. Det er vist at høg COX-2 ekspresjon samsvarar med auka initiering og spreining av kreft. Både ikkje-selektive og selektive COX-2 hemmarar har gjennom forsøk på dyr vist kjemoterapeutisk effekt ved brystkreft. Ein førebyggande effekt, samt ein veksthemmande effekt på transplanterte tumorar er òg bekrefte [24, 31]. Det er òg utført epidemiologiske og kliniske studiar av den kreftførebyggande effekten av NSAID's og coxib. Resultata har tildels verka lovande, men sikkerheitsstudiar og optimalisering av behandlingsregima manglar [33, 34]. Bruk av coxib har diverre vist auka risiko for kardiovaskulære hendingar i form av auka risiko for trombose [35]. Det er ønskjeleg å finne legemiddel med den same kjemoterapeutiske effekten som coxib, men utan kardiovaskulære biverknadar. Det vil difor vere interessant å avdekke kva slags modulatorar i COX syntesevegen som er assosiert med den kjemoterapeutiske effekten til coxib. Det er i frå før vist ulike samanhengar mellom COX-2 aktivering og mekanismar assosiert med kreft. Fleire av mekanismane involverer adenyl cyklase og cAMP. PGE<sub>2</sub> er gjennom binding til EP reseptorar mellom anna vist å hindre apoptose og normal immunrespons, i tillegg til å fremje angiogenese og invasjon (figur 1.4) [28]. Kartlegging av relevante EP reseptorar involvert i tumormekanismar for den enkelte krefttype kan opne for nye og meir skreddarsydde behandlingsstrategiar. Spesifikk hemming av nøkkelreseptorar kan optimalisere effekt, samt eliminere biverknadar assosiert med COX-2 hemmarane [31].



**Figur 1.4 Kreftassosierte effektar av PGE<sub>2</sub>.** Både autokrin og parakrin PGE<sub>2</sub> stimulering er kjent å påverke kreftceller sin evne til å invadere og initiere angiogenese, samt unngå apoptose og normal immunrespons. Figuren er ei forenkling av figur 2 i referanse [28].

Forstyrning av apoptose er eit døme på korleis inflammasjon kan medverke til karsinogenese. Anoikis er definert som programmert celledød i epitelceller assosiert med tap av normal kontakt mellom epitelceller og deira naboceller, eller omkringliggende ECM. Resistens mot denne typen programmert celledød er rekna som eit nøkkeltrinn i kreftutviklinga, ettersom cellene kan overleve utan adhesjonssignal. I ein studie gjort på intestinale epitelceller er det vist at høge PGE<sub>2</sub> nivå hindrar anoikis (figur 1.5). PGE<sub>2</sub>, samt interleukin-1 (IL-1), genererer resistens mot anoikis ved å fremje celleaggregering. Mekanismen involverer adenyl cyclase og cAMP nedstrøms i EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub> signalvegen. Ein analog av cAMP er vist å fremje celleoverleving i fråskilte celler. Same resultat er òg observert etter stimulering av adenyl cyclase ved behandling med forskolin, og behandling med fosfodiesterasehemmararen etazolate. Farmasøytiske hemmararar av adenyl cyclase har støtta opp under teorien ved signifikant å hemme celleaggregering og redusere celleoverlevinga. Til sist er det vist at celle-celle kontakt er essensielt for å overleve anoikis, men at cAMP òg kan redde celler frå anoikis gjennom ein adhesjonsuavhengig mekanisme. Signalvegen kan difor vere essensielle òg i høve hemming av andre apoptotiske mekanismar [6].



**Figur 1.5 Mekanisme for auka celleoverleving etter stimulering av EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub>.** Forsking syner at stimulering av EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub> hindrar anoikis (programmert celledød). Effekten av stimulering med PGE<sub>2</sub> er lik effekten av forskolin<sup>a</sup>, etazolate<sup>b</sup> og dibutyryl cAMP (dbc AMP)<sup>c</sup>, og er assosiert med auka aktivering av adenyl cyclase, auka cAMP nivå og aktivering av protein kinase-A (PKA). Forskolin aktiverer adenyl cyclase og aukar cAMP nivået. På same måte medfører etazolate auka nivå av cAMP ved å hemme nedbryting av cAMP. Auka cAMP nivå framkallar cellulære effektar som induksjon av celleaggregering og auka celleoverleving. Inhibering av adenyl cyclase syner derimot å auke anoikis, og gje redusert celleoverleving. Hemming av adhesjonsmolekylet E-cadherin, ved bruk av antistoff mot E-cadherin, viser å redusere grad av celleaggregering og celleoverleving. cAMP viser i tillegg å kunne stimulere celleoverlevinga via mekanismar uavhengig av anoikis. a) Adenyl cyclase aktivator, b) fosfodiesterase hemmar, c) cAMP analog som verkar som cAMP.



## 1.4 Ekstracellulær matriks

Celler må generelt vere i kontakt med ekstracellulær matriks (ECM) for å vekse og proliferere, og i enkelte samanhengar òg for å overleve [36]. ECM består hovudsakleg av fire molekylære komponentar; kollagen, glykoprotein, proteoglykan og elastin. Komponentane dannar til saman eit strukturelt nettverk som bevarer integriteten av vev, fremjar binding mellom celler, og tilrettelegg for signaloverføring gjennom adhesjonsreseptorar på celleoverflata. ECM fungerer i tillegg som eit reservoar for cytokin og diverse vekstfaktorar. Den strukturelle oppbygginga varierer mellom forskjellige vev, samt mellom ulike lokalisasjonar i eitt og same vevet. Strukturen er ikkje statisk, men gjennomgår konstant remodulering i respons av cellulære signal frå omkringliggande vev. Remoduleringa involverer nedbryting ved hjelp av proteasar, hovudsakleg MMPar, med påfølgjande nydanning [37, 38]. Ny ECM er produsert og sekert lokalt slik at nettverket vert organisert i nær kontakt med dei produserande cellene. I bindevev skjer nydanninga hovudsakleg frå fibroblastar, medan chondroblastar og osteoblastar er ansvarlege for produksjonen i respektivt brusk og bein [36]. Graden av remodulering varierer frå å vere låg i vev med sein turnover, til svært høg ved tilstandar som inflammasjon, sårlækning og kreft. ECM fungerer ikkje berre som arkitektonisk støttestruktur for vev, men er multifunksjonelle molekyl rekna å spele ei aktiv, samt kompleks rolle i høve til patologiske tilstandar som til dømes kreft. ECM står i direkte kommunikasjon med omkringliggande celler, og deltek slik i regulering av celleproliferasjon, differensiering og motilitet. I tillegg er tumorceller i stand til å modulere strukturen og funksjonen av ECM. Samspelet mellom kreftceller og ECM er av stor innverknad på kreftprogresjonen. [37, 38].

### 1.4.1 ECM komponentar

To hovudklassar av makromolekyl inngår som byggesteinar i ECM; polysakkarid av typen glykosaminoglykan og fibrøse protein. Til den sistnemnde gruppa tilhøyrrer mellom anna kollagen, elastin, fibronektin og laminin. Variasjonar i måten molekyla er organisert, samt den relative mengda av dei ulike komponentane, gjev opphav til eit spekter av ulike former. Kvar enkelt form er tilpassa funksjonen i det aktuelle vevet [36].

#### Glykosaminoglykan

Glykosaminoglykana er polysakkaridkjeder danna av repeterande disakkarid, der det eine sukkermolekylet alltid er eit aminosukker, ofte bunde til ei sulfatgruppe. Strukturkarakteristikken tilseier at molekyla er negativt ladde, men for stive til å kveile seg saman. Den negative ladninga medfører at glykosaminoglykana trekkjer til seg kation, og blir osmotisk aktive slik at store mengder vatn blir tiltrekt. På denne måten dannar glykosaminoglykana ein gelliknande struktur. Mest alle glykosaminoglykana er kovalent bundne til protein i form av proteoglykan [36].

#### Proteoglykan.

Glykosaminoglykan bunde til eit kjernprotein dannar eit proteoglykan. Funksjonen til det enkelte proteoglykanet er bestemt av kjerneproteinet i kombinasjon med glykosaminoglykankjedene. I bindevev dannar proteoglykana ein gelliknande struktur der fibrøse protein er innkapsla. Strukturen gjev god mekanisk støtte, til dømes i ledd, samstundes som høg grad av hydrering tillet rask diffusjon av næringsstoff, metabolittar og hormon mellom blod og celler. I tillegg assosierer proteoglykana med kollagen, samt andre fibrøse protein, og dannar slik svært komplekse strukturar. Proteoglykan spelar ei sentral rolle i høve til kjemisk signaloverføring mellom celler. Ved å binde opp signalmolekyl kan proteoglykanstrukturen anten forsterke eller redusere signalaktiviteten [36]. Fleire av proteoglykana viser òg å vere involvert i prosessar som cellemigrering, prolifisering og differensiering under til dømes sårlækning og tumorvekst. Proteoglykan spelar ei nøkkelrolle under nedbryting av ECM ved å trekkje MMPar til celleoverflata [37].

#### Kollagen.

Kollagen utgjer ein klasse protein, av ulik struktur og arkitektur, og er ansvarleg for oppretthalding av strukturell integritet hjå menneske og dyr. Den karakteristiske

kollagenstrukturen består av tre kollagen polypeptidkjeder, som er kveila saman til ein superhelix. Meir enn 20 ulike kollagenstrukturar er karakteriserte, og nummererte med romartal. Enkelte kollagen dannar fibrillar for å gje styrke mot strekk i eksempelvis hud, senar og bein (kollagen I, II, III, V og XI), medan andre dannar nettverk (kollagen IV, VIII og X). Basalmembranen er eit klassisk døme på eit kollagennettverk, hovudsakleg danna av kollagen IV [36, 37].

### Elastin

Elastin inngår som hovudkomponent i nettverk av elastiske fibrar som sikrar elastisitet og smidigheit. I vev som hud og blodårer, der både styrke og elastisitet er eit kriterium for normal funksjon, representerer elastin hovudkomponenten av protein. Elastin har svært fleksible eigenskapar slik at fibrane kan strekkast, og foldast tilbake som eit gummiband. Kollagenfibrar er likevel innvovne mellom elastinfibrane for å hindre strekkskadar i vev. Proteinet er samansett av to typar korte segment som vekslar langs polypeptidkjeda [36].

### Fibronektin

Fibronektin er eit stort, multifuksjonelt glykoprotein, samansett av domene som kan binde til ei rekkje komponentar i ECM og på celleoverflata. Flerie isoformar av fibronektin er karakterisert, eksempelvis plasma fibronektin som er løyseleg i sirkulerande blod og involvert i blodkoagulasjonen. Resterande isoformar er uløyselege fibronektin-fibrillar som inngår i ECM eller på celleoverflata. Proteina er gjennom binding til integrin involvert i organisering av ECM, i tillegg til å danne binding mellom celler og ECM [36].

### Laminin

Laminin er eit stort og fleksibelt glykoprotein, representert av fleire isoformar som til saman dannar ein stor lamininfamilie. Proteina inngår fyrst og fremst i basalmembranar der dei dannar nettverk med kollagen IV. Laminin innverkar på naboceller gjennom binding til integrin, og påverkar celleadhesjon, migrering, og differensiering. Hovudoppgåva er å overføre signal mellom celler og ECM, primært basalmembranen. Som ein konsekvens av å modulere sentrale cellulære prosessar er laminin truleg involvert i patologiske prosessar, som tumor invasjon, metastasering og angiogenese [36, 37].

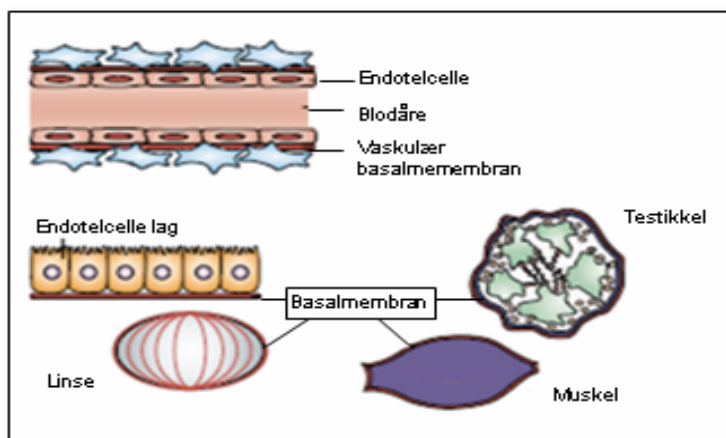
### Integrin

Integrin er ein reseptorfamilie med relevans i høve til patologiske tilstandar som inflammasjon og kreft. Proteina er integrert i celleoverflata og fungerer som adhesjons-

molekyl mellom celler og ECM. I tillegg utvekslar dei signal mellom dei respektive komponentane, og har slik innverknad på celleoverleving, proliferasjon, transkripsjon, struktur og motilitet. Mest alle celler er avhengige av integrinassosiert binding til ECM for å vekse og proliferere, i nokre tilfeller òg for å overleve [36, 37]. Lausriving frå integrinassosiert ECM-adhesjon fremjar normalt anoikis/apoptose dersom lausrivinga ikkje er etterfølgt av adhesjon til nytt vev. Tumorinvasjon er difor avhengig av signal som kan hindre anoikis [11]. Cadherinar er ei liknande gruppe reseptorar, ansvarleg for kommunikasjon og binding mellom naboceller [39].

### 1.4.2 Basalmembran

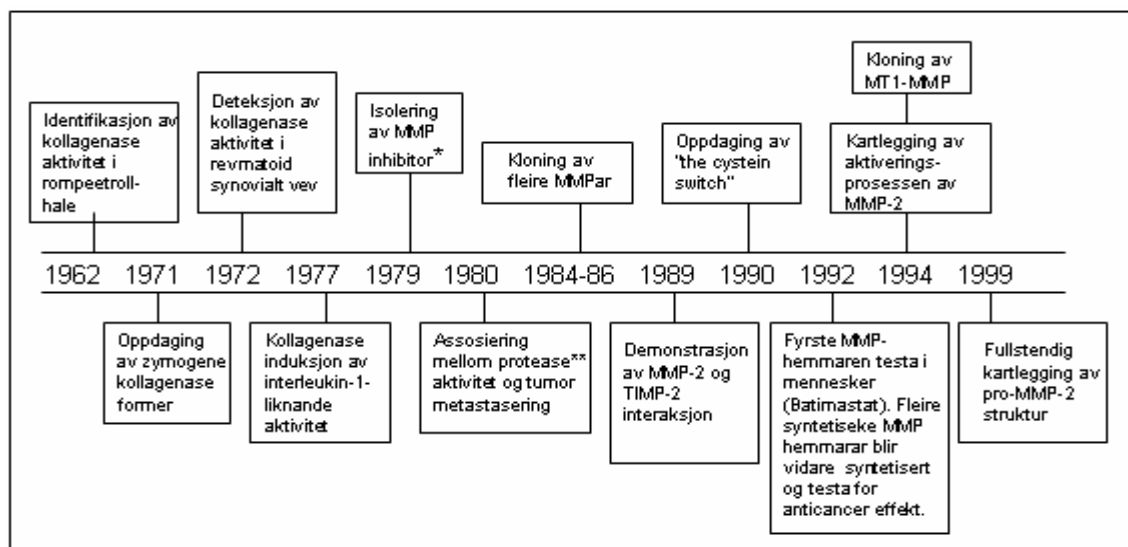
Basalmembranen er ein spesiell type ECM beståande av over 50 protein som saman danner ein lagvis struktur (figur 1.6). Kollagen IV og laminin utgjer hovuddelen av basalmembranen. Membranen er 50-100 nanometer tjukk, og alltid i kontakt med celler. Den fungerer ved å gje strukturell støtte, dele vev inn i bolkar, og regulere cellulære prosessar [40]. Basalmembranen skjel epitelceller frå stroma, og er dermed den fyrste barrieren mot tumorinvasjon [7]. Sjølv om strukturen rundt ulike vev tilsynelatande ser ut til å vere lik, er den molekylære oppbygginga av basalmembranen unik for kvart enkelt organ. Basalmembranen rundt tumorar er i mindre grad kryssbunden, og dermed i større grad utsett for proteolytisk degradering [40].



**Figur 1.6 Basalmembran.** Skjematisk oversikt av basalmembranar som avgrensar eit vilkårleg utval av organ i kroppen. Figuren er ein modifisering av figur 1a i referanse [40].

## 1.5 Matriks metalloproteinasar

Matriks metalloproteinasar (MMPar) er ei gruppe endogene proteinasar involvert i ei rekkje fysiologiske og patologiske prosessar. Enzyrna medverkar under modulering av vev gjennom fosterutviklinga, ved sårleging, samt kontrollerer aktivering av ei rekkje immunkomponentar [12]. Ein av dei fyrste linkane mellom MMPar og sjukdom vart dokumentert for reumatoid artritt, der MMPar i form av kollagenasar har vist å vere involvert i nedbryting av leddbrusk [41]. Rolla til MMPar i høve til kreft har vekt svært stor interesse siste tjue åra, då det ved nesten alle krefttypar er observert auka uttrykk og aktivering av denne enzymgruppa. Høge nivå samsvarar med auka invasjon og metastasering, samt redusert prognose for overleving [7]. Det er i seinare tid tileigna aukande klarleik rundt MMPar si rolle òg i initieringa av tumorceller, i høve vekst, migrering, angiogenese, invasjon og metastasering [42]. Figur 1.7 summerer nokre av dei viktigaste oppdagingane gjort rundt MMPar.



**Figur 1.7 Oppdagingar gjort rundt MMPar.** \*) MMP inhibitor seinare kjent som TIMP-1. \*\*) omtalt protease aktivitet er seinare kjent som MMP-2 aktivitet. Figuren er ein modifikasjon ei liknande tidslinje i referanse [41].

### 1.5.1 Struktur og funksjon

#### Klassifisering

Matriks metalloproteinasar utgjer ein av fem hovudklassar proteinasar, og består av meir enn 24 godt karakteriserte enzym (tabell 2) [42]. Resterande enzym klassifiserast som serin-, cystein-, aspartyl-, eller treonin-proteinasar [12]. MMPar vart tradisjonelt subklassifisert som gelatinasar, kollagenasar, stromelysin og matrilysin etter spesifisitet for spaltingssubstrat. Etersom svært mange MMP-substrat vart karakterisert vart det meir hensiktsmessig å

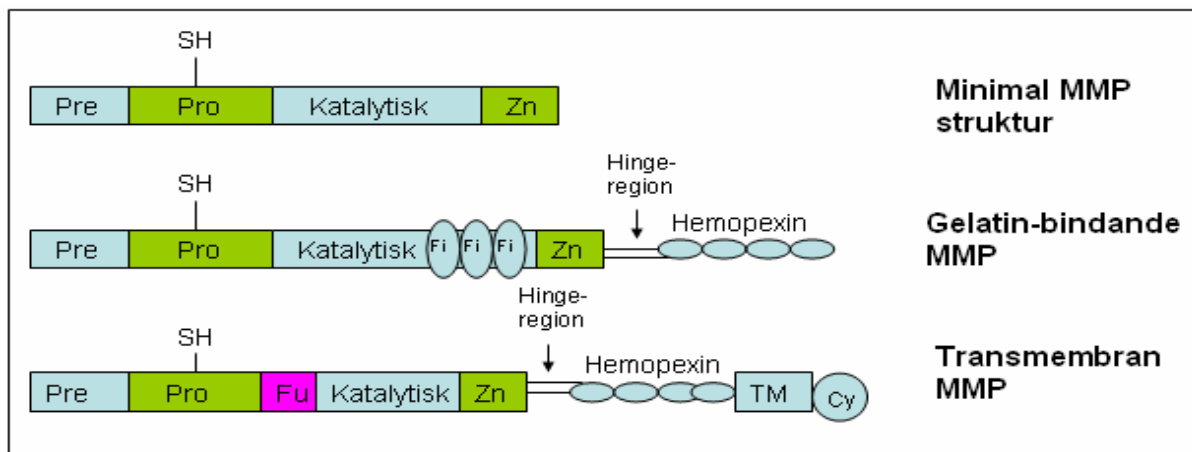
klassifisere MMPar etter struktur, og namngje dei med nummer. Åtte ulike strukturelle klassar av MMPar er no kjent, der fem vert skilt ut ekstracellulært, og resterande er membranbundne (MT-MMPar) [7].

**Tabell 2 Klassifisering av MMPar.** Tabellen inkluderer berre eit utval substrat, gjort på grunnlag av relevans for oppgåva. Tabellen er basert på tabellar i referanse [43, 44].

Klassar	MMP	Namn	ECM substrat	Andre substrat
<b>Kollagenasar</b>	MMP-1	Kollagenase-1	Kollagen (I, II, III, VII, VIII, X, XI) gelatin, laminin	Kasein, pro-MMP-1, pro-MMP-2, pro-MMP-9
	MMP-8	Kollagenase-2	Kollagen (I, II, III)	
	MMP-13	Kollagenase-3	Kollagen (I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV), gelatin, fibronektin	Kasein, pro-MMP-9
	MMP-18	Kollagenase-4	Kollagen I	
<b>Gelatinasar</b>	MMP-2	Gelatinase-A	Kollagen (I, II, III, IV, V, VII, X, XI), gelatin, elasin, fibronektin, laminin	Kasein, pro-MMP-2, pro-MMP-9, pro-MMP-13
	MMP-9	Gelatinase-B	Kollagen (IV, V, XI, XIV), gelatin, elastin, laminin	Kasein, frigjeving av VEGF (frå ukjent substrat)
<b>Stromelysin</b>	MMP-3	Stromelysin-1	Kollagen (III, IV, V, VII, IX, X, XI), gelatin, elastin, fibronektin, laminin	Kasein, pro-MMP-1, pro-MMP-3, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13, E-cadherin
	MMP-10	Stromelysin-2	Kollagen (III, IV, V), gelatin, fibronectin, elastin	Kasein, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9
	MMP-11	Stromelysin-3	Kollagen IV, fibronectin, laminin, gelatin	Kasein
<b>Matrilysin</b>	MMP-7	Matrilysin-1	Fibronectin, laminin, kollagen (I, IV), gelatin, elastin	Kasein, pro-MMP1, pro-MMP-2, pro-MMP-7, pro-MMP-9
	MMP-26	Matrilysin-2	Kollagen (IV), fibronectin, gelatin	pro-MMP-9, $\beta$ 4-integrin, E-cadherin
<b>MT-MMP</b>	MMP-14	MT1-MMP	Kollagen (I, II, III), gelatin, fibronectin, laminin	pro-MMP2, pro-MMP-13
	MMP-15	MT2-MMP	Fibronectin, laminin	pro-MMP-2
	MMP-16	MT3-MMP	Kollagen (III), gelatin, fibronectin, laminin	Kasein, pro-MMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	Gelatin	
	MMP-24	MT5-MMP	Fibronektin, gelatin, proteoglykan	Pro-MMP-2
	MMP-25	MT6-MMP	Kollagen (IV), gelatin, fibronektin, proteoglykan	Pro-MMP-2
<b>Andre</b>	MMP-12	Makrofag metalloelastase	Elastin, fibronectin, kollagen (I, IV, V), gelatin, laminin	Kasein
	MMP-19		Gelatin, kollagen IV, laminin, fibronektin	
	MMP-20	Enamelysin		
	MMP-21	XMMP	Gelatin	Kasein
	MMP-23		Gelatin, casein, fibronectin	
	MMP-27	CMMP	Gelatin	Kasein
MMP-28	Epilysin		Kasein	

## Struktur

Strukturelt er MMPar bygd opp av eit pre-, pro-, katalytisk-, og hemopexin-domene (figur 1.8). Predomenet dirigerer det inaktive zymogenet mot endoplasmatisk retikulum for exocytose, og vert normalt avkløyvd under utskillingsprosessen av enzymet. Prodomenet bevarer enzymet inaktivt gjennom binding til eit sinkatom i det katalytiske domenet. Aktivisering krev avspalting av prodoment, slik at sinkatomet og det katalytiske setet blir fritt til å utøve enzymatisk aktivitet. [7, 13]. Hemopexin-domenet er sentralt for substratgjenkjenning, i tillegg til å fremje binding til både TIMPar (tissue inhibitors of metalloproteinases) og celleoverflatemolekyl. Gelatinasar inneheld i tillegg kollagenbindande fibronectin (Fi) strukturar. Membranbundne MMPar kan inneha eit transmembran-domene som knyter enzymet fast til cellemembranen, eller vere ankra til cellemembranen gjennom eit GPI-anker (glykosylfosfatidylinositol anker). Siste typen membranbundne MMPar er festa til cellemembranen gjennom eit N-terminalt SA (signal anker)- domene [7].



**Figur 1.8 Skjematisk strukturoppbygging av MMPar.** Fem ulike MMP grupper vert sekretert ekstracellulært, medan tre grupper er bunde til cellemembranen. Det er berre skissert struktur for standard MMP, gelatin-bindande MMP og transmembran MMP (MT-MMP). Alle MMPar inneheld eit pre-, pro- og katalytisk domene, med ei sulfhydryl (SH) gruppe tilknytt pro-domenet. SH-gruppa er bundet til Zn-atomet tilhøyrande det katalytiske setet så lenge enzymet er inaktivt. Gelatin-bindande MMPar inneheld eit hemopexin domene som er involvert i substratgjenkjenning, i tillegg til kollagenbindande fibronectin (Fi) strukturar. Den nedste strukturen representerer ein MT-MMP festa til cellemembranen via eit transmembrandomene (TM), i tillegg til å inneha eit lite cytoplastisk (Cy) domene. Figuren er ein modifikasjon av på figur 1 referanse [7].

## Funksjon

MMPar er i stand til å kløyve omtrent alle komponentane som inngår i den ekstracellulære matriksen. Nedbryting av ECM har difor tradisjonelt vore rekna som hovudrolla til MMPane. Ettersom ei rekkje nye MMP-substrat har vorte karakteriserte, har det i seinare tid vorte observert utvida roller for enzymgruppa. Det er konstatert at MMPar er involvert i aktivisering

av andre ekstracellulære MMPar, samt utfører kløyving av vekstfaktorar, angiogenetiske faktorar, og faktorar som stimulerer cellulær migrasjon. Dei utrettar òg ei viktig rolle ved å frigje bioaktive molekyl frå celleoverflata, samt frigje faktorar innkapsla i ECM [7, 42]. Celle-celle-adhesjons-molekyl er substrat for MMPar, mellom anna for MT1-MMP. Kløyving av adhesjonsmolekyla E-cadherin og CD44 gjev cellene auka moglegheit til å frigjere seg frå kvarandre, og gjev auka invasiv kapasitet [7]. Mest all litteratur som beskriv MMP funksjon er basert på *in vitro* studiar. Resultat frå *in vivo* studiar indikerer likevel eit meir avgrensa substratspekter [12].

Opphavleg antok ein at primærtumoren sjølv produserte MMPar for å invasere og metastasere. Det er seinare vorte belyst at stromaceller produserer mange MMPar tilhøyrande tumormiljøet. Ved brystkreft er det vist at produksjon av MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-11, MMP-12 og MMP-13 kan lokaliserast til stromaceller, og ikkje til sjølve tumoren [42]. MMP-2 og MMP-9 er nesten alltid produsert av stromaceller [7], medan MT1-MMP vert syntetisert både av stroma- og tumorceller [10]. Dette tyder på at tumorcellene ved å kommunisere med cellene rundt kan stimulere produksjon av ei rekkje MMPar, som i tillegg til å opne for invasjon og metastasering, òg kan promotere tumorprogresjon ved ei rekkje andre mekanismar [42].

### 1.5.2 Regulering av MMPar og TIMPar

Regulering av MMP aktivitet skjer gjennom tre prinsipielle mekanismar; kontroll av transkripsjon, aktivering av pro-enzym, og hemming ved hjelp av endogene proteinasehemmarar [13].

#### Regulering av MMP transkripsjon i tumorvev

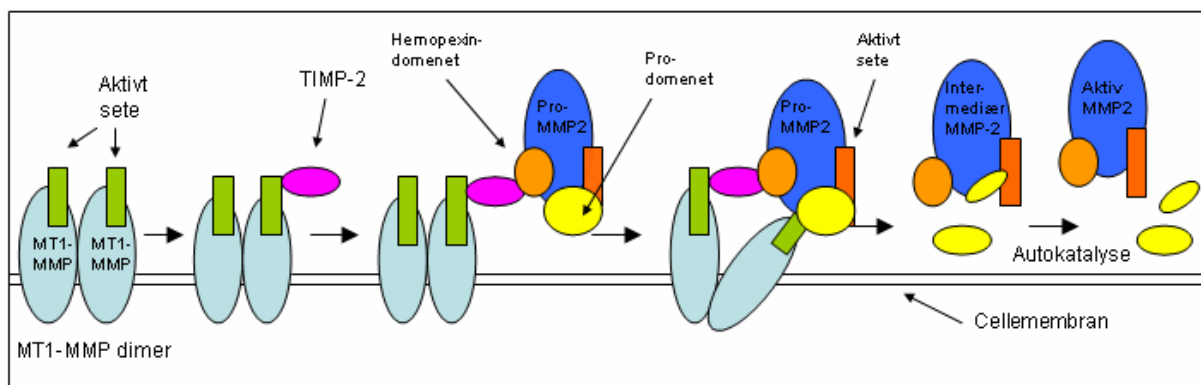
Oppreguleringa av MMPar i tumorvev skuldast normalt ikkje genforandringar, men endring av transkripsjon. Det er stadfesta polymorfisme i fleire MMP promoterar, som ved å påverke gentranskripsjonen disponerer for kreft [7]. Dei fleste MMPane er i liten grad uttrykt konstitutivt, men regulert ved transkripsjonsnivå etter stimulering av ulike hormon, cytokin og vekstfaktorar [45]. Eksempelvis MMP-1, MMP-3, MMP-7 og MMP-9 uttrykk vert regulert gjennom gentranskripsjon [13]. Stromaceller og inflammasjonceller rundt tumoren frigjer både cytokin og vekstfaktorar, og regulerer slik MMP transkripsjonen [26].



## Aktivering av pro-MMPar

Fleste MMPar er syntetisert som inaktive zymogen (pro-MMPar), og vert aktivert ekstracellulært av aktive MMPar eller serin-proteinasar som ved hjelp av proteolytisk kløyving fjernar prodomenet [7]. Spaltinga skjer gjennom bryting av bindinga mellom cystein-sulphydryl gruppa på prodomenet og sinkatomet i det katalytiske setet. Mekanismen er beskriven som "the cystein switch" [41]. MMP-11 og MMP-28, samt MT-MMPar kan aktiverast av intracellulære furin-liknande serinproteinasar før dei vert skilt ut ekstracellulært, eller eksportert til cellemembranen [7].

Enkelte MMPar er konstitutivt uttrykt i nokre normalceller. Tumorceller uttrykkjer derimot ofte MMPar som ikkje er observert i respektive celler ved normaltstand. Eksempelvis MMP-2 ekspresjon er hyppig oppregulert ved kreft. Aktiveringsprosessen av pro-MMP-2 er dermed eit nøkkeltrinn for å regulere MMP-2 aktivitet [13, 26]. Enzymet er aktivert på celleoverflata gjennom ein unik prosess, som involverer MT1-MMP, TIMP-2 og aktiv MMP-2. Prosessen er skissert og nærare forklart i figur 1.9. TIMP-2 er ein naturleg hemmar av både MT1-MMP og MMP-2. Ved låge konsentrasjonar viser TIMP-2 likevel å vere ein positiv modulator av MT1-MMP industert MMP-2 aktivering, men viser ved høge konsentrasjonar å hemme prosessen [46]. Hemming av MT1-MMP er effektivt i høve å redusere MMP-2 sin nedgraderingsaktivitet av basalmembrankomponentar, og dermed gunstig for å hindre sprenging av kreftceller [45].



**Figur 1.9 Aktivering av MMP-2 ved hjelp av MT1-MMP, TIMP-2 og aktiv MMP-2.** Aktivering av MMP-2 skjer i fleire trinn. Først blir ein MT1-MMP-dimer danna i cellemembranen. Deretter bind den N-terminale enden av TIMP-2 til det aktive setet til den eine MT1-MMPen. TIMP-2 fungerer som bindeledd mellom MT1-MMP-dimeren og pro-MMP-2. Etter binding av pro-MMP-2 står den ubundne MT1-MMPen fri til å kløyve vekk størsteparten av MMP-2-prodomet, som står i vegen for MMP-2 aktivitet. Ei intermediær MMP-2 form blir frigitt, og aktiveringa vert fullført når ein aktiv MMP-2 gjennom autokatalyse fjernar siste rest av prodomet. Figuren er basert på figur 4b i referanse [41].

## Hemming av MMPar

MMP aktiviteten er strengt kontrollert av endogene hemmarar. Dei mest studerte endogene MMP hemmarane er tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) -1, -2, -3 og -4.

Proteina er namngjevne etter rekkjefølgja dei vart oppdaga, liknar i struktur, men varierer i vevsspesifisitet og evne til å hemme ulike MMPar. Alle inhiberer reversibelt i eit støkiometrisk 1:1 forhold. [7, 47]. Det eksisterer ytterlegare endogene hemmarar av MMPar. Plasmaproteinet  $\alpha$ -macroglobulin kompleksbind ulike MMPar i vevsvæska, og hemmar aktivitet ved at komplekset irreversibelt fjernast ved endocytose etter binding til ein ”scavenger” reseptor<sup>3</sup>. Trombospondin-2 utfører hemming av MMP-2 ved ein liknande mekanisme, medan trombospondin-1 direkte hemmar aktivering av både pro-MMP-2 og pro-MMP-9 [7].

Det har lenge vore postulert at malignitet delvis skuldast ein ubalanse mellom MMPar og TIMPar. Nyare studiar gjev auka forståing rundt samspelet mellom MMPar og deira hemmarar, samt den direkte innverknaden av både MMPar og TIMPar i høve til malignitet [10]. TIMPar er multifunksjonelle protein ansvarleg for ei rekkje biologiske aktivitetar. I tillegg til MMP hemming regulerer dei proliferasjon og apoptose i fleire cellelinjer, og kan ved høvelege vilkår vere involvert i regulering av angiogenetisk og inflammatorisk respons [47]. Fleire kliniske studiar har indikert at høge nivå av TIMP-1 og -2 samsvarar med dårleg prognose. Dette kan indikere at balansen mellom MMPar og TIMPar rundt tumoren finn stad ved eit høgare konsentrasjonsnivå, men framleis favoriserer auka MMP uttrykk og aktivering. Samstundes viser *in vitro* forskning at TIMP-1 og -2 kan hemme apoptose av tumorceller, at TIMP-2 og -3 kan fremje vekst av tumorceller, og at TIMP-1 kan bidra til tumor angiogenese. Det er uklart om dei nemnde effektane skuldast proteasehemming, eller oppregulering av anti-apoptotiske og angiogenetiske vekstfaktorar, eller at TIMPar fungerer direkte som vekstfaktorar [7]. Bidraget av TIMPar i høve kreft har vore kontroversielt, og bruk av TIMPar generelt for å hemme MMP aktivitet er truleg ein ueigna strategi i kampen mot invasjon og metastasering [10].

---

<sup>3</sup> Ein scavenger reseptor deltek i oppryddingsarbeid etter øydelegging av celler eller vev. Scavenger reseptoren sit på makrofagar eller neutrofilar, og bind til avfallsproduktet slik at immuncellene kan fjerne avfallsproduktet ved hjelp av endocytose.

### 1.5.3 MMPar i høve til kreft

I over 30 år har MMPar vore sett på som lovande mål i kreftbehandlinga, både på grunnlag av evna til å nedgradere komponentar i ECM, samt massiv oppregulering av MMPar i tumorvev [48]. Farmasøytiske MMP-hemmarar har vorte prøvd ut klinisk, men gjeve skuffande resultat. Meir forskning er naudsynt for å forstå heile spekteret av funksjonar til desse proteina i dei ulike fasane av karsinogenesen, før ein effektivt kan modulere effektane. MMP aktivitet kan gjennom prosessering av ulike substrat ha både pro- og anti-karsinogen effekt, slik at uspesifikk hemming i visse høve vil kunne gje ufordelaktige effektar. Målet er å finne meir selektive hemmarar for MMPar med størst relevans for den enkelte krefttype [12]. Problemstillinga er likevel meir kompleks ettersom same proteinasen kan ha varierende eigenskapar i ulike trinn av karsinogenesen. Eksempelvis kan hemming av MMP-9 hindre initiering av metastasar, men idet sekundære tumorar fyrst er danna vil hemming av MMP-9 promotere angiogenese, og bidra til større og meir aggressiv vekst. Hypotesen om at tumorceller kan utvikle protease-uavhengig mekanismar for å trengje gjennom ECM har vore foreslått, og kan eventuelt delvis forklare manglande effekt av farmasøytiske MMP-hemmarar. Det er òg vert å nemne at dei kliniske studiane av MMP-hemmarane har vore av dårleg design, med manglande markørar for terapieffekt og uklare endepunkt. Det har i tillegg vore overvekt av svært aggressiv kreftsjukdom blant pasientgruppa som har vorte inkludert i fase 3 studiane. Det er tenkjeleg at MMP-hemmarane kan ha større terapieffekt tidlegare i sjukdomsprogresjonen [12].

Som nemnt tidlegare har ein tradisjonelt tenkt at MMPar ved å bryte ned strukturelle komponentar av ECM opnar for invasjon og migrering. Siste åra har ein tileigna meir kunnskap rundt MMPar sine mangfaldige roller, og studiar har vist at enzymba òg er involvert i tidlege trinn av kreftutviklinga.

#### MMPar i høve modulering av immunrespon

Eit kriterium for tumorvekst er overleving av immunologiske forsvarsmekanismar. MMPar er foreslått å vere involvert i ei rekkje mekanismar som gjev tumorcellene evne til å unngå immunologisk angrep. Fleire MMPar er vist å vere involvert i mekanismar som reduserer proliferasjon av antitumor T-lymfocytar, samt reduserer tumorcellene sin sensitivitet for NK-celler. MMPar har òg vist å kløyve ei rekkje kjemokin, som har vist både potensert og redusert kjemokin funksjon. Kjemokin fungerer normalt ved å tilkalle immunceller til inflammasjonsstaden, og er i tillegg foreslått å vere involvert under metastasering av brystkreft [38]. MMPar i miljøet kring tumoren er i stor grad ansvarleg for rekruttering av

immun- og inflammasjonsceller til tumormiljøet. Tumorcellene er kjent å manipulere inflammasjonscellene til å fremje utvikling og vekst av tumoren, mellom anna ved å stimulere frigjeving av vekstfaktorar, angiogenetiske vekstfaktorar og MMPar frå immun- og inflammasjonscellene [7, 12].

#### MMPar i høve celleproliferasjon

MMPar medfører delvis motstridande effektar med tanke på proliferasjon og apoptose. MMPar kan på den eine sida fremje kreftcelleproliferasjon ved å spalte og frigje forløparar av enkelte membranbundne vekstfaktorar som TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ). Samstundes kan MMPar gjennom nedbryting av ECM gjere innkapsla vekstfaktorar tilgjengelege. Det er i tillegg vist at MMPar, ved å endre ECM strukturar, kan regulere tumorcelleproliferasjon gjennom interaksjon med integrin. På den andre sida kan MMPar regulere celleproliferasjonen negativt ved å generere pro-apoptotiske molekyl, eller vekstfaktor-hemmande protein som Insulin-like Growth Factor Binding Protein [7, 12]

#### MMPar i høve angiogenese

Både endogene og syntetiske MMP-hemmarar syner netto negativ effekt på tumorangiogenese. Dette indikerer at MMPar er viktige positive modulatorar av angiogenesen [7]. Den generelle forståinga har vore at MMPar bidreg til angiogenese ved å bryte ned omkringliggende ECM, eit naudsynt trinn for å danne nye blodårer. Både MMP-2, MMP-9 og MMP-14 er vist å regulere angiogenesen direkte. MMP-9 er òg foreslått å vere sentral for frigjering av angiogenetiske vekstfaktorar innkapsla i ECM. Enkelte MMPar er assosiert med generering av endogene angiogenetiske hemmarar som angiostatin, endostatin og tumostatin. Forstyrning av anti-angiogenetiske effektar kan slik vere ein uheldig konsekvens av breispektra MMP-hemming [12, 18].

#### MMPar i høve invasjon og metastasering

Eit tidleg trinn i invasjonsprosessen er tumorcellemigrering. MMPar kan bidra til cellemigrering gjennom fleire mekanismar. Fyrst ved å fremje lausriving av tumorceller slik at dei kan migrere, og etterpå ved å opne veg for cellemigrering gjennom ECM. I tillegg kan MMPar frigje innkapsla signalmolekyl eller strukturar frå ECM, som gjennom interaksjon med til dømes integrin kan fremje cellemigrering [36]. MMPar er involvert både under intravasjons- og ekstravasjonsprosessen gjennom blod- og lymfebanen. Til og med for å sikre vekst av sekundære tumorar er det foreslått at MMPar spelar ei avgjerande rolle [7].

## 1.6 S100A4

S100A4 er medlem av ein større proteinfamilie som til saman inkluderer 21 lågmolekylære protein. S100 proteina er involvert i ei rekkje intracellulære prosessar. Det er mellom anna vist at proteina gjennom blokkering av kinasar hemmar fosforylering av ulike målprotein, som kan vere av betydning for funksjon av mellom anna cytoskjelettet og tumorsupressor gen *p53*. Enkelte av proteina er involvert i regulering av kalsium homeostasen, enzymaktivitet, cellevekst og celledifferensiering. Andre har vist kapasitet til å fremje invasjon og metastasering. S100A4 har vore gjenstand for mykje merksemd siste tida ettersom det er karakterisert som eit invasjons- og metastaseassosiert protein. Auka uttrykk av S100A4 samsvarar med forverra prognose i høve mange krefttypar. Stor interesse har vore retta rundt S100A4 sin moglege prognostiske verdi, men fleire studiar er naudsynte for å avklare den prognostiske signifikansen til dette proteinet [49, 50].

Studiar utført på rotter styrkjer prova for at S100A4 direkte er involvert i tumorprogresjon og metastasering [51]. Ei markant oppregulering av S100A4 er vist både på mRNA- og protein nivå i mus- og rotteceller transformert med ulike onkogen [49, 51]. Rotteforsøk syner at transfeksjon med animalt eller humant S100A4 kan indusere ein invasiv fenotype frå ikkje-metastaserande kreftceller. Anti-S100A4 ribozym viser i tillegg å oppheve høgmetastaserande kreftceller sin evne til å spreie seg. Proteiniet er åleine truleg ikkje nok til å initiere danning av tumorar, men kan indusere metastasering av tumorceller forårsaka av andre onkogen [49].

### 1.6.1 S100A4 og moglege mekanismar i høve til kreft

Det er funne høgare nivå av S100A4 i maligne tumorar samanlikna med benigne tumorar [46]. Proteiniet har ingen enzymatisk funksjon, men modulerer effektar ved å interagere med funksjonelle protein både intra- og ekstracellulært (figur 1.10).

#### Innverknad på celleproliferasjon og apoptose.

S100A4 er vist å interagere med tumor-supressor gen *p53*, og regulerer slik både celleproliferasjon og apoptose. Stimulering av apoptose under tidleg tumorutvikling er eit resultat av S100A4- *p53* interaksjonen. Interaksjonen framskandar i tillegg tap av normal *p53* funksjon, slik at seleksjon av aggressive celleklonar kan oppstå. Moglegvis vert kontrollfunksjonen til *p53* ved G<sub>1</sub>- S sjekkpunktet i cellyklus og hindra, slik at cellene vert stimulert til å entre S-fasen (DNA syntesefasen) [49].

### Innverknad på cellemotilitet.

Truleg forstyrerar S100A4 organiseringa av cytoskjelettet i metastaserande celler, ved å interagere med komponentar som ikkje-muskulær myosin og -tropomysin. Destabilisering av cytoskjelettet er eit essensielt trinn for å fremje cellemotilitet [49].

### Innverknad på celle-celle adhesjon.

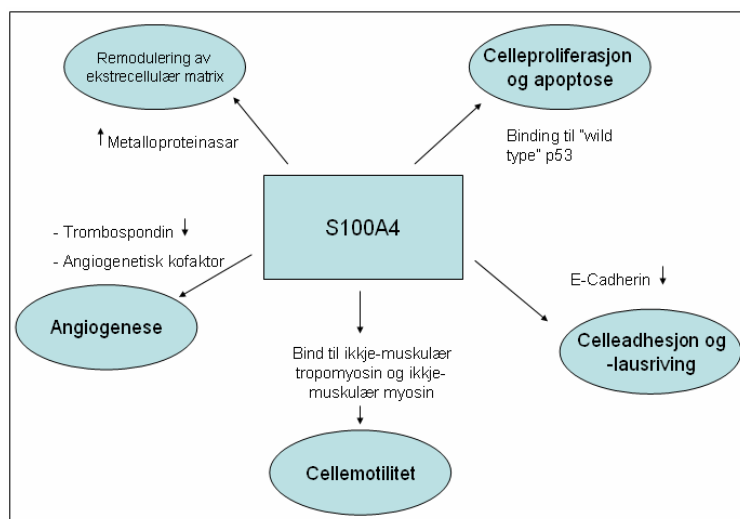
Lausriving av celle-celle adhesjon er eit anna naudsynt kriterium for invasjon og spreining av kreftceller. E-cadherin er ei gruppe transmembrane glykoprotein som medierer celle-celle adhesjon, og hindrar invasjon. Studiar refererer at tumorar som uttrykkjer S100A4 er meir invasive dels på grunn av nedregulering av E-cadherin [52].

### Innverknad på MMPar

S100A4 proteinet spelar òg ei mogleg rolle gjennom regulering av enkelte MMPar. Dysregulering av MMPar er essensielt for mellom anna migrering og invasjon av tumorceller. Studiar syner at nedregulering av S100A4 uttrykk fører til redusert mRNA nivå av MMP-2, MT1-MMP og TIMP-1, samt oppregulering av TIMP-2 i osteosarkomcellerlinjer. Dette medfører at cellene i mindre grad er kapable til å migrere gjennom Matrigel-dekka filter [45].

### Innverknad på angiogenese.

Nydanning av blodårer er eit anna essensielt trinn for tumorvekst. Forsøk syner at S100A4 i stor grad nedregulerer genet THBS1, som kodar for trombospondin-1 (TSP-1), ein viktig hemmar av angiogenesen. Nyare studiar indikerer at S100A4 moglegvis òg opptre direkte som ein angiogenetisk faktor [49]. S100A4 er i tillegg vist å aktivere transkripsjonen av MMP-11, MMP-13 og MMP-14 i endotelceller. Auka proteolytisk nedgradering av ECM kan slik fremje angiogenesen [50].



**Figur 1.10 S100A4 effektar i høve kreft.** S100A4 interagerer med ei rekkje ekstra- og intracellulære protein, og assosierast med ei rekkje mekanismar involvert ved kreft. Skissa er ein modifikasjon av figur 1 i referanse [49].

## 1.7 Osteosarkom

Osteosarkom er den mest vanlege forma for primær beinkreft. Krefftforma råkar i hovudsak ungdom, men har låg absolutt insidens samanlikna med andre krefttypar. Metastasering til lunger er hovudårsaka til død, men overlevingsraten er kraftig utbetra siste 20 åra etter bruk av aggressiv kjemoterapi. Likevel er det klar trong for meir skreddarsydde behandlingsstrategiar for denne pasientgruppa. Ein ønskjer å eliminere langtidsbiverknadane assosiert med kjemoterapi, samt auke behandlingsresponsen [45, 53].

### 1.7.1 Beinmetabolisme

Bein nedbryting og beindanning er dynamiske prosessar som skjer gjennom heile livet. Osteoklastar er ansvarlege for bein nedbryting ved å sekretere kollagenasar og andre proteinasar, medan osteoblastar står for syntese av nytt beinvev [54]. MMPar regulerer skjelleitmetabolismen gjennom proteolyse av gamal beinmatriks, fremjing av vaskulær invasjon, samt frigjering av vekstfaktorar. MMP-9 og MMP-13 er hovudansvarlege for dei proteaseavhengige trinna i bygging av lange skjelettbein [19]. Auka beinmetabolisme i form av nedbryting av gamal beinmatriks, og danning av neoplastisk beinmasse er karakteristisk ved osteosarkom. Begge prosessane krev proteolytisk aktivitet. Forstyrra MMP/TIMP balanse, med resulterande auka proteolytisk aktivitet, er truleg karakteristisk for denne krefftforma. Det er i likskap med andre krefttypar synt auka invasivitet for osteosarkom med høge nivå av MMP-2 og MMP-9. Hemmarar av MMPar har ved osteosarkom vist *in vitro* å redusere både invasjon gjennom basalmembranen, og metastasering til lunger. Spesifikk hemming av MMPar kan moglegvis potensere effekten av tradisjonell kjemoterapi [45].

## 1.8 Problemstilling

Kronisk inflammasjon, forårsaka av infeksjon eller autoimmune sjukdommar, er kjent å disponere for kreft. Det er antydning at heile 15 % av krefttilfella på verdsbasis er forårsaka av kroniske inflammasjonstilstandar, dette tilsvarar 1,2 millionar tilfeller årleg. Den sterkaste assosiasjonen er observert mellom kroniske inflammatoriske tarmsjukdommar og kolonkreft. Inflammasjonsceller fremjar prolifisering av muterte celler ved å frigje vekstfaktorar og anti-apoptotiske signal. Inflammasjonsprosessen er òg kjent for å stimulere angiogenese, samt å fremje modulering av ECM. Studiar av pasientar med langtidsbruk av NSAID synleggjer i stor grad betydinga av inflammasjon i høve kreftutvikling, då hemming av COX enzymet har vist å redusere risiko for kolonkreft med 40-50 %. I tillegg er det vist at NSAID reduserer risiko for kreft i lunger og øsofagus [21, 28]. Ut i frå observasjonar som dette er truleg produkt av COX enzymet involvert i mekanismar som disponerer for kreft. Induksjon av COX-2 er observert i ei rekkje humane tumorar, og samsvarar ofte med aggressiv vekst og dårleg prognose. I mange humane tumorar viser PGE<sub>2</sub> å vere hovudproduktet frå COX-2 syntesevegen. Forsking har i aukande grad indikert at PGE<sub>2</sub> promoterer tumorvekst gjennom aktivisering av EP reseptorar [31, 55]. PGE<sub>2</sub> har vist å fremje cellulær proliferasjon, stimulere invasjon og angiogenese, samt hemme normal immunrespons og apoptose [28]. Observasjonar som dette har skapt interesse for å finne aktuelle signalvegar for PGE<sub>2</sub>, for å identifisere nye angrepsmål for legemiddel.

MMP uttrykk er på same måte som COX-2 ofte oppregulert i tumorvev. Enzyrna er generelt assosiert med kreft ved å fremje invasjon, promotere angiogenese og hemme apoptose [55]. Det er i fleire studiar vist samanheng mellom COX-2 overuttrykking og auka ekspresjon og aktivisering av MMPar. Ein *in vitro* studie utført på humanceller av kolonkreft har vist samsvar mellom høge COX-2 nivå, og auka uttrykk av MT1-MMP og MMP-2. Cellene som vart transfekterte med ein COX-2 kodande vektor syntetiserte ti til tolv gongar høgare COX-2 mRNA nivå, og viste å vere seks gongar meir invasive samanlikna med kontrollceller [56]. Likeeins er det synt at PGE<sub>2</sub> fremjar invasjon av bukspyttkjertelkreft, ved å auke uttrykk av MMP-2 gjennom ein transkripsjonsbasert mekanisme [57]. Det er ved tidlegare masteroppgåver i Tromsø vist at PGE<sub>2</sub> stimulerer MMP-2 uttrykk og aktivisering i osteosarkomcellelinjene pHβ-1 og II-11b, to cellelinjer med respektivt høgt og lågt S100A4 nivå [58, 59]. Det er likevel ikkje utført mange nok parallellar til at resultata kan stadfestast.



Føremålet med denne oppgåva var å:

- Følgje opp tidlegare arbeid som har vist effekt av PGE<sub>2</sub> stimulering på MMP-2 uttrykk og aktivering i osteosarkomcellelinjene pHβ-1 og II-11b.
- Kvalitativt påvise EP reseptorar i respektive cellelinjer.
- Karakterisere EP reseptorane ved bruk av agonistar og antagonistar, for å undersøke om ein eller fleire av EP reseptorane er involvert ved PGE<sub>2</sub> stimulert MMP-2 uttrykk og aktivering.
- Undersøke om eventuelt PGE<sub>2</sub> stimulert regulering av MMP-2 aktivering skuldast regulering av MT1-MMP eller TIMP-2.
- Kartlegge og eventuelt identifisere MMP-1, MMP-7 og MMP-13 ekspresjon og aktivitet etter stimulering og hemming av EP reseptorar.
- Sjå eventuelle responsar i samanheng med cellene sitt S100A4-nivå.

## 2 Material og metode

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Kjemikal og substansar nytta ved celledyrking og forsøk

Tabell 3.

REAGENS	PRODUSENT
11-deoxy-16,16-dimethyl Prostaglandin E2	Cayman Chemical Company
Acrylamid/Bis 40 % (29:1)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
AH 6809	Cayman Chemical Company
Amino Acids (100X) Non Essential	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Ammoniumsulfat	Bio-Rad Laboratories, California USA
Anti-matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)	SIGMA, St. Louis, USA
Anti-matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), HINGE REGION	SIGMA, St. Louis, USA
Anti-matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), N-terminal of catalytic zinc site	SIGMA, St. Louis, USA
Brij 35 OPL 30 %	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
Bromfenolblått	Merck, Darmstadt, Tyskland
BSA (bovint serum albumin)	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
Butaprost (free acid)	Cayman Chemical Company
Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega Corporation, Madison, USA
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka Chemie GmbH, Sigma-Aldrich, UK
DME- F12 med antibiotika (Penicillin 100 IE/ml og Streptomycin 100 IE/ml)	Sigma Chemical CO. St. Louis, USA
DMF (dimetyl formamide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland
DTT	Sigma-Aldrich St. Lois, USA
Eddiksyre 100%	Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland
EP1 Receptor Polyclonal Antibody	Cayman Chemical Company, USA
EP2 Receptor Polyclonal Antibody	Cayman Chemical Company, USA
EP3 Receptor Polyclonal Antibody	Cayman Chemical Company, USA
EP4 Receptor (C-Term) Polyclonal Antibody	Cayman Chemical Company, USA
Føtalt bovint serum	Biochrom AG, Berlin
GAPDH Rabbit mAb	Cell Signaling Technology
Gelatin 300 Blood type A, fra grisehud	Sigma Chemical CO. St. Louis, USA
Geneticin disulfid salt	Sigma- Aldrich CO. St. Louis, USA
Glycin, proanalyse	Merck, Darmstadt, Tyskland
HEPES (4-[2-hydroksyetyl]-piperazin-1-etansulfonsyre)	AppliChem, Darmstadt, Tyskland
Kalsiumklorid-dihydrat	AppliChem, Darmstadt, Tyskland
L-glutamin, 200mM	Gibco BRL, Life techn., Paisley, Scotland
Magic Mark™ XP Western standard	Invitrogen
Matrix Metalloproeinase-13 (MMP-13)	SIGMA
Matrix Metalloproeinase-2 (MMP-2)	SIGMA

Metanol, analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Misoprostol (free acid)	Cayman Chemical Company
Pan-Acin Antibody	Cell Signaling Technology
Prestained Protein Marker, Broad Range	BioLabs
RMPI 1640 med antibiotika (Penicillin 100 IE/ml og Streptomycin 100 IE/ml)	Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA
SDS (natriumdodekylsulfat)	Sigma Chemical CO. St. Louis, USA
Semler Mjølke	Semper
$\beta$ -casein	Sigma- Aldrich CO. St. Louis, USA
Sulprostone	Cayman Chemical Company
TEMED	Promega Corporation, Madison, USA
Trisbase	AppliChem, Darmstadt, Tyskland
Triton x-100	VWR International Ltd. Poole, England
Trypsin	Gibco BRL, Life techn., Paisley, Scotland
tween 20	Sigma- Aldrich CO. St. Louis, USA
Visualizer™ Western Blot Detection Kit	Upstate cell signaling solution
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

## 2.1.2 Løysingar ved celledyrking og celleforsøk

Tabell 4.

<b>Medium med serum til pH<math>\beta</math>-1 og II-11b, 500 ml.</b>	
DME F12 m/antibiotika	437,5 ml
Kalveserum 10% FBS (fetalt bovint serum)	50,0 ml
Non essensielle aminosyrer	5,0 ml
L-Glutamin	5,0 ml
Geneticin	2,5 ml

Tabell 5.

<b>Medium uten serum til pH<math>\beta</math>-1 og II-11b, 500 ml.</b>	
DME F12 m/antibiotika	487,5 ml
Non essensielle aminosyrer	5,0 ml
L-Glutamin	5,0 ml
Geneticin	2,5 ml

Tabell 6.

<b>Medium med serum til U937, 500 ml</b>	
RMPI m/ antibiotika	445,0 ml
Kalveserum 10% FBS (fetalt bovint serum)	50,0 ml
L-Glutamin	5,0 ml

Tabell 7.

<b>10 ml Fryseløysing</b>	
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (kalsiumklorid dihydrat) Mw: 147,02 g	0,147 g
Hepes 1 M	10 ml

## 2.1.3 Bufferar til Western blotting og zymografi

Tabell 8. Elektroforesebuffer x 10 til Western/ zymografi

<b>Elektroforesebuffer x 10, pH 8,3 – 1000 ml</b>	
Tris base	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
MQ vatn	ad 1000 ml
pH justert til 8,3 med 18,5 % HCl	

Tabell 9. Gelloadingbuffer til Western/ zymografi

<b>Gelloadingbuffer</b>	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 g
Glycerol 100 %	3,5 ml
SDS 10 %	4,0 ml
Bromfenolblått 1 %	0,1 ml
MQ vatn	1,15 ml

Tabell 10. Blottebuffer til Western blotting

<b>Blottebuffer, 1000 ml</b>	
Trisbase (Mw: 121,1)	1,88 g
Glycin (Mw: 75,06)	23,25 g
dH <sub>2</sub> O	850 ml
Metanol	150 ml

Tabell 11. Vaskebuffer til Western blotting

<b>TBS-T, 1000 ml</b>	
5 M NaCl	30 ml
Trisbase, pH 8,0	10 ml
Tween 20	1 ml
dH <sub>2</sub> O	959 ml

Tabell 12. Blokkebuffer til Western blotting

<b>Blokkebuffer med 5 % mjelk, 100 ml</b>	
Tørrmjelk	5 g
TBS-T	100 ml

Tabell 13. Blokkebuffer til Western blotting

<b>Blokkebuffer med 5 % BSA, 100 ml</b>	
BSA	5 g
TBS-T	100 ml

Tabell 14. Basisbuffer til zymografi

<b>1000 ml Basisbuffer x 10, pH: 7,5</b>	
Trisbase Mw: 121,1g	60,4 g
dH <sub>2</sub> O	800-900 ml
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O Mw: 147,02 g	7,4 g
ZnCl <sub>2</sub> 10 mM Mw: 136,28 g	1,0 g
pH justerast til 7,5 med 18,5 % HCl	
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Tabell 15. Vaskebuffer til zymografi

<b>800 ml Vaskebuffer</b>	
Triton x 100	20 ml
Basisbuffer x 1	780 ml

Tabell 16. Assaybuffer til zymografi

<b>1000 ml Assaybuffer x 10</b>	
Trisbase Mw: 121,1 g	12,1 g
Tris HCl Mw: 157,6 g	63,0 g
NaCl Mw: 58,44 g	117 g
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O Mw: 147,02	9,8 g
Brij 35 OPL 30 %	6,7 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Tabell 17. Fargeløysing til zymografi

<b>400 ml Fargeløysing 0,2 %</b>	
Coomassie brilliant blue R-250	0,8 g
dH <sub>2</sub> O	160 ml
Metanol	240 ml

Tabell 18. Avfargingsvæske til zymografi

<b>800 ml Avfargingsvæske</b>	
Metanol	240 ml
Eddiksyre	80 ml
dH <sub>2</sub> O	480 ml

## 2.1.4 Gelar til Western blotting og zymografi

Tabell 19. Konsentrerende gel til Western blotting

<b>4 % Konsentrerende gel</b>	
Acrylamid Bis 40 %, 29:1	500 µl
0,5 M Trisbase (m/ 4% SDS), pH: 6,8	1,3 ml
dH <sub>2</sub> O	3,2 ml
10% ammoniumpersulfat	50 µl
TEMED	5 µl

Tabell 20. Separerende gel til Western blotting

<b>12 % Separerende gel</b>	
Acrylamid Bis 40 %, 29:1	3,3 ml
1,5 M Trisbase (m/ 4% SDS), pH: 8,8	2,5 ml
dH <sub>2</sub> O	4,2 ml
10% ammoniumpersulfat	100 µl
TEMED	10 µl

Tabell 21. Konsentrerende gel til zymografi

<b>2 stykk konsentrerende gelar, 4 %</b>	
0,5 M Trisbase m/ SDS, pH: 6,8	750 µl
dH <sub>2</sub> O	1850 µl
Acrylamid/Bis 40 % (29:1)	380 µl
Ammoniumpersulfat 10%	15µl
TEMED	3 µl

Tabell 22. Separerende gel til zymografi

<b>2 stykk separerende gelar, 9 %</b>	
1,5 M Trisbase m/ SDS, pH: 8,8	2500 µl
Gelatin 2 % eller β-kasein 2 %	500 µl
dH <sub>2</sub> O	4650 µl
Acrylamid/Bis 40 % (29:1)	2250 µl
Ammoniumpersulfat 10%	75 µl
TEMED	8 µl

Tabell 23. Trisbase (0,5 M) til gelstøping ved Western og zymografi

<b>0,5 M Trisbase pH: 6,8</b>	
Trisbase Mw: 121,1 g	6,05 g
dH <sub>2</sub> O	80- 90 ml
20 % SDS	2 ml
pH justerast til 6,8 med 18,5 % HCl	
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Tabell 24. Trisbase (1,5 M) til gelstøping ved Western og zymografi

<b>1,5 M Trisbase ph: 8,8</b>	
Trisbase Mw: 121.1 g	18,2 g
dH <sub>2</sub> O	80- 90 ml
20 % SDS	2 ml
pH justerast til 8,8 med 18,5 % HCl	
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

## 2.1.5 Analyseverktøy

Tabell 25. Analyseverktøy nytta ved celledyrking og celleforsøk, Western blotting og zymografi

ANALYSEVERKTØY	BRUKSOMRÅDE	PRODUSENT
Axiovert S100	Mikroskopering	Zeiss
Biofuge fresco	Kjølesentrifugering	Heraeus Instruments
EL X 808 Ultra Microplate Reader	MTS test	BIO-TEK Instruments INC
Function Line Labofuge 400	Sentrifugering	Heraeus Instruments
Gel Doc 2000	Redigering av gelbileter	Bio-Rad
Luminescent image analyzer LAS 3000	Framkalling av Westernblot	Fujifilm
General-purpose Analysis Software Multi Gauge	Kvantifisering av band ved Westernblott	Fujifilm
TV Zoomlens	Fotografering av gelar	Canon

## 2.2 Celler og celledyrking

Det vart køyrt forsøk med to ulike cellelinjer; pH $\beta$ -1 og II-11b. Cellelinjene stammar begge opphavleg frå den høgmetastaserande osteosarkomcellelinja OHS, og har som nemnt tidlegare respektivt høgt og lågt nivå av S100A4. II-11b cellelinja vart laga ved å transfektere ein vektor for eit ribozym som bryt ned S100A4 mRNA, slik at ein fekk ei mindre invasiv cellelinje. Ved å setje inn ein tom vektor i OHS cellene fekk ein pH $\beta$ -1 cellelinja. Vektoren er det einaste som skil pH $\beta$ -1 frå OHS cellene, nivået av S100A4 er like høgt, og cellene har opprettheldt den høgmetastaserande eigenskapen [60]. U937 celler vart nytta som positiv kontroll ved EP-reseptor karakterisering, ettersom EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub> mRNA tidlegare er påviste i denne cellelinja [61]. Cellelinja er etablert frå eit histiocytisk lymfom<sup>4</sup>.

### 2.2.1 Dyrking av celler

pH $\beta$ -1 og II-11b cellene vart dyrka i Dulbeccos modifiserte Eagle medium (DME) med Hams F12 næringsblanding, tilsett antibiotika, føtalt bovint serum (FBS), ikkje-essensielle aminosyrer, L-glutamin og geneticin (tabell 4). U937 cellene vart dyrka i RPMI-1640 medium tilsett antibiotika, føtalt bovint serum og L-glutamin (tabell 6). Cellene vart dyrka i dyrkingsflasker med filter; T25, T75 og T175, og inkubert i varmeskap med fuktig atmosfære og 5% CO<sub>2</sub>, ved 37° C. Alt arbeid føregjekk i LAF-benk, og utstyr som var i direkte kontakt med cellekulturane var anten sterilt eller autoklavert.

---

<sup>4</sup> Histiocytisk lymfom er makrofagar som har danna neoplastisk vekst i vev.

### 2.2.2 Splitting av celler

Cellene vart splitta kvar måndag, onsdag og fredag ved ca 90-95 % konfluens. Gamalt medium vart avsoge, og ved hjelp av trypsinering vart pH $\beta$ -1 og II-11b cellene løyste frå flaskeoverflata. Det vart tilsett 1-, 1,5- eller 2 ml 0.25 % trypsin avhengig av dyrkingsflaska sin storleik. Peptidasen fekk verke i om lag 1-2 minuttar, og celleflaskene vart dunka mot handflata for å løyse cellene. Det vart sjekka i mikroskop at cellene var løyst. Delar av cellesuspensjonen vart splitta over til ny dyrkingsflaske med serumhaldig medium, eller samla i ei større flaske. Mengde serumhaldig medium som vart tilsett var avhengig av dyrkingsflaska sin storleik. Cellene vart fordelt homogent i mediet, og inkubert ved same vilkår som nemnt over. Både trypsin og medium vart alltid førevarma til 37° C.

U937 cellene levde i suspensjon og vart splitta måndag, onsdag og fredag. Det vart ikkje utført optisk måling av celletettleik før splitting. Cellene vart spunne ned ved 1000 rpm i 3 minuttar, og resuspendert i 3 ml serumhaldig medium ved varsam pipettering. Halvparten av cellesuspensjonen vart overført til ny celledyrkingsflaske med 8,5 ml serumhaldig medium, eller samla i ei større dyrkingsflaske.

### 2.2.3 Opptining av celler

Ni milliliter serumhaldig medium vart overført til ei T-25 flaske og førevarma til 37 °C. Kryorøyr med celler vart henta opp frå nitrogentank. Cellene vart tina i handa, og direkte overført til celleflaska med temperert medium. Celleflaska vart sett til dyrking i varmeskap ved 37° C og 5 % CO<sub>2</sub>. Påfølgande dag vart cellene mikroskopert for å sjekke om cellene hadde festa seg til celleflaska, samt at cellene hadde starta å dele seg. Det vart skifta medium for å fjerne DMSO-restar etter nedfrysinga. Cellene vart vidare splitta då dei nådde 95 % konfluens.

## 2.3 Celleforsøk

I forsøka vart cellene inkubert med EP reseptor agonistane butaprost, sulprostone og misoprostol, samt antagonisten AH6809. Alle agonistane vart testa i eit breitt konsentrasjonsområde. K<sub>i</sub> verdi 28,8 og 0,163 ng/ml var utgangspunkt for konsentrasjonsspekteret som vart laga for respektivt butaprost og sulprostone. Verdien er berekna ut ifrå affinitetsstudiar basert på kompetitiv binding til den aktuelle reseptoren, og er den agonistkonsentrasjonen som fortregjer 50 % av radiomerka ligand frå



reseptorbindingssetet [62]. For misoprostol er det teke utgangspunkt i  $EC_{50}$  verdi,  $0,35 \mu\text{M}$ , definert som konsentrasjonen som hemmar 50 % av optimal superoksid generering frå humane neutrofilar. Verdien samsvarar truleg ikkje med konsentrasjonen som er naudsynt for å eventuelt generere resultat i våre forsøk, men det vart nytta konsentrasjonar over eit vidt spekter. Celler vart inkubert med sulprostone, misoprostol og butaprost ved konsentrasjonar 0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 gongar  $K_i$  eller  $EC_{50}$  verdien for den enkelte agonist. Celleforsøk med antagonisten AH6809 vart utført ved konsentrasjonar 0,01 – 0,1 – 1 – 10 gongar  $EC_{50}$  verdien for AH6809,  $15 \mu\text{g/ml}$ . Verdien er definert som den konsentrasjonen som hemmar 50 % av optimal  $PGD_2$  effekt på human blodplateaggregering, og er dermed relatert til binding av DP reseptoren. Sjølv om AH6809 har ulik affinitet for DP reseptoren som for  $EP_1$  og  $EP_2$ , var verdien likevel utgangspunkt for konsentrasjonsspektret som vart testa.

### 2.3.1 Teljing av celler

I førekant av kvart forsøk vart cellene talde for å lage ein cellesuspensjon med korrekt konsentrasjon til å så ut i brønnane. Cellene vart løyste frå flaska ved trypsinering. Ei misforståing medførte at det vart tilsett serumfritt medium i staden for serumhaldig medium, slik at trypsinen ikkje vart inaktivert, men trypsinen vart truleg likevel fjerna under vaskeprosessen. Cellene vart spunne ned ved 1000 rpm i 3 minuttar, og vaska 3 omgongar med serumfritt medium. Etter siste vaskerunde vart cellepelleten resuspendert i eit bestemt volum av serumfritt medium. Det vart teke ut celler til teljeprøve, som besto av  $50 \mu\text{l}$  cellesuspensjon og  $50 \mu\text{l}$  serumfritt medium. Suspensjonen vart blanda for å verte homogen, og fylt opp i eit Bürker-kammer. Avhengig av talet på A-ruter som måtte til for å telje om lag 200 celler, vart cellekonsentrasjonen i cellesuspensjonen berekna etter følgjande formel:

$$\text{Celler / ml i cellesuspensjonen} = \frac{\text{Talde celler} \times 20\,000}{\text{Talet av A-ruter}}$$

For å finne eit gjennomsnittleg tal av celler i kvar A-rute, vart totalt tal av talde celler dividert på talet av A-ruter. Ei A-rute rommar ein kvadratmillimeter cellesuspensjon, som tilsvarar  $0,1 \mu\text{l}$ . For å berekne konsentrasjonen av celler per milliliter cellesuspensjon ville ein normalt multiplisert med 10.000, men ettersom teljeprøven i forkant vart fortynta 1:1 vart det multiplisert med 20.000. Når konsentrasjonen var kjent, vart cellesuspensjonen fortynta eller oppkonsentrert for å få riktig cellekonsentrasjon til å så ut i brønnane.

### 2.3.2 Utsåing av celler

I forsøka vart cellene sådd ut direkte på plast i 6- eller 96 brønnars brett. Cellene vart sådd ut til konfluens, som tilsvarar ca.  $2,3 \times 10^5$  celler per kvadratmillimeter. Fortynningar av agonistane sulprostone, misoprostol og butaprost, samt antagonist AH6809 vart laga i serumfritt medium (tabell 26). Fortynningsrekkjene vart laga i dobbel konsentrasjon, og vart sett til brønnane halvt om halvt med celleduspensjon. Celleduspensjonen vart laga for å gje ein endeleg konsentrasjon i brønnane kring 700.000 celler per milliliter. Celler inkubert i serumfritt medium utan agonist eller antagonist tilstades vart nytta som negativ kontroll, medan celler inkubert med 10  $\mu\text{g/ml}$  PGE<sub>2</sub> vart nytta som positiv kontroll. Cellene vart inkuberte i 48 timar i varmeskap med fuktig atmosfære, og 5% CO<sub>2</sub> ved 37° C. For å verifisere forsøka vart kvart forsøk utført tre gongar med tre parallellar i kvart forsøk. Arbeidet føregjekk i LAF-benk, og alt utstyr som var i direkte kontakt med cellene var sterilt eller autoklavert.

Tabell 26. Oversikt av agonistar og antagonist nytta i celleforsøk.

Agonist/antagonist	EC50 / K <sub>i</sub> verdi	Testa konsentrasjonar
AH6809	14,9 $\mu\text{g/ml}$	0,15 -150 $\mu\text{g/ml}$
Butaprost (fri syre)	0,0288 $\mu\text{g/ml}^*$	0,0003-3 $\mu\text{g/ml}$
Misoprostol (fri syre)	0,13 $\mu\text{g/ml}$	0,001-10 $\mu\text{g/ml}$
Sulprostone	0,16 $\text{ng/ml}^*$	0,001-10 $\text{ng/ml}$

\*) den oppgitte verdien for butaprost og sulprostone er K<sub>i</sub>-verdi

### 2.3.3 Hausting av medium til Zymografi og Western blotting

For å spinne ned eventuelle lause celler i mediet vart det overført til Eppendorfrøyr, og sentrifugert 4 minuttar ved  $2 \times 1000$  rpm og 4° C i kjølesentrifuge. Etter sentrifugering vart eit bestemt volum av mediet overført til nye Eppendorfrøyr, og tilsett fryseløysing (1:10), jamfør tabell 7. Det vart køyrt forsøk direkte, eller prøvane vart oppbevart ved -20° C til det vart køyrt forsøk. Prøvar til zymografi vart laga ved tilsetting av gelloadingbuffer 1:1. Prøvar til Western blotting vart laga ved at mediet vart tilsett gelloadingbuffer med 20% dithiothreitol (DTT) 1:5, og kvar prøve vart varmebehandla ved 100° C i 3-5 minuttar.

### 2.3.4 Hausting av celler til Western blotting

Etter hausting av mediet vart cellene løyste i 40  $\mu\text{l}$  gelloadingbuffer med 20 % DTT, før dei vart skrapa laus frå brønnane og overført til Eppendorfrøyr. Prøvane vart oppbevarte på is før dei straks vart varmebehandla ved 100° C i 3-5 minuttar, og deretter sonikerte i ca. 3 minuttar.

## 2.4 Western-blotting

EP reseptor 1-4 vart påvist ved hjelp av Western blotting. MMP-1, MMP-7 og MMP-13 uttrykk vart freista påvist ved Western blotting.

12 % separerande gel vart laga og fylt i støyeform for 1,5 mm tjukke gelar. Isopropanol vart tilført på toppen av den separerande gelen for å gjere overflata jamn. Etter 20 minuttar vart isopropanolen heldt av, og ein 4 % konsentrerande gel vart støypt på toppen. Ein kam med 10 tenner vart sett ned i gelen for å lage brønner til prøvopåsetting. Etter ytterlegare 20 minuttar vart gelen sett i elektroforesestativ og kammen vart fjerna. 7 µl prøve vart tilsett i kvar brønn, og 1 µl av markøren Magic Mark vart nytta som chemiluminisens-standard. Det vart òg påsett 7 µl av standarden (prestained) som skulle indikere om elektroforesen og blottinga vart vellukka. Prestained vart kokt i 3 minuttar i likskap med resterande prøvar. Gelen vart køyrt i 2 timar ved 120 V, eller til banda var synlege i nedste kant av gelen. Proteina vart blotta over på nitrocellulose membran over natt ved 4° C og 30 V, eller 1 time i romtemperatur ved 100 V. Påfølgande dag vart membranen blokkert med 5 % tørrmjølk eller 5 % bovint serumalbumin (BSA) i TBS-T buffer (tris bufra salin med tween 20), anten 1 time i romtemperatur eller over natt ved 4° C. I neste omgang vart membranen inkubert med det aktuelle primærantistoffet, 1 time i romtemperatur eller ved 4° C over natt. Membranen vart vaska 6 gongar med 15 ml TBS-T i 5 minuttar, for så å bli inkubert 1 time med HRP konjugert anti-kanin sekundærantistoff. Membranen vart på nytt vaska 6 gongar med 15 ml TBS-T i 5 minuttar. Før framkalling av membranen vart den vaska 3 x 5 minuttar med MQ-vatn. Visualizer™ Western Blot Detection Kit vart tilført på proteinsida av membranen og reagerte med membranen i 3-4 minuttar for å framkalle chemiluminisensreaksjonen. Banda vart framkalla ved hjelp av LAS3000 maskinvare, og bileta vart lagra som tiff- og fujifilm filer. Membranen vart oppbevart i kjøleskap. For å korrigere for variabel prøvopåsetting vart membranane hybridisert med antistoff for dei normalt konstitutivt uttrykte proteina glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH) og pan-aktin. Standardiseringa vart utført etter same Western-metode som beskrive over. Det vart for enkelte forsøk utført kvantifisering av banda ved hjelp av Multi Gauge programvare .

Ved karakterisering av EP-reseptorar vart det nytta to ulike påvisningskitt; Western Blotting Luminol Reagent og Visualizer™ Western Blot Detection Kit. Ved overgang til det sistnemnde påvisingskittet med avgjerande større sensitivitet måtte antistoffkonsentrasjonane reduserast kraftig. Det vart vist ein svært raskt innsettande og kraftig chemileuminiserande reaksjon, som vart svekka etter kort tid.

## 2.5 Zymografi og analyse av gel

Gelatinase uttrykk og aktivering vart studert ved gelatin zymografi. Uttrykk og aktivitet av kasein degraderande MMPar vart forsøkt kartlagt ved hjelp av  $\beta$ -kasein zymografi. Det vart nytta to positive kontrollar; THP1 for MMP-9 og CM16 for MMP-2. I tillegg vart alle prøvane samanlikna med kondisjonert medium frå celler inkubert med 10  $\mu\text{g/ml}$   $\text{PGE}_2$ .

Separerande gel vart laga og fylt i støypeform for 0,75 mm tjukke gelar. Isopropanol vart tilført på toppen av den separerande gelen for å gjere overflata jamn. Etter 20 minuttar vart isopropanolen vaska vekk med  $\text{dH}_2\text{O}$ , og ein konsentrerande gel vart støypt på toppen. Ein kam med 15 tenner vart sett ned i den konsentrerande gelen for å lage brønningar til prøvepåsetting. Når gelen var stivna vart den montert i elektroforesestativ, og elektroforesebuffer vart påfylt. Ved kasein zymografi vart det køyrt 30 minuttars pre-elektroforese ved 100 V for at overskytande kasein skulle migrere ut av gelen. Prøvane vart laga av 5  $\mu\text{l}$  kondisjonert medium og 5  $\mu\text{l}$  loadingbuffer. Totalt 7  $\mu\text{l}$  prøve vart sett til kvar brønn. Etter prøvepåsetting vart gelen køyrt 30 minuttar ved 100 V. Deretter vart spenninga auka til 150 V, og gelen vart køyrt i ytterlegare 1 time eller til proteina hadde nådd botnen. Gelen vart overført til petrisskål og inkubert med 50 ml vaskebuffer ved svak risting i 15 minuttar, og deretter ytterlegare 30-40 minuttar med ny vaskebuffer. Gelen vart inkubert ved 37° C og svak risting over natt i 50 ml assaybuffer. Neste dag vart gelen inkubert 1 time med fargeløysing fortynna 1:1 med 20 % eddiksyre, for så å bli avfarga i to omgongar med 50 ml avfargingsvæske. Til sist vart det tilsett  $\text{dH}_2\text{O}$  for å hindre gelen i å tørke ut, og petrisskåla vart tildekkja med parafilm. Gelatinaseaktivitet vart visualisert som klare regionar i den mørkeblå gelen, medan MMPar vart observert som svært svake band ved kasein zymografi. TV Zoomlens vart nytta for å fotografere gelane. For å verifisere resultat vart det køyrt to parallellar, og kvart forsøk vart utført 3 gongar. Det vart ikkje utført kvantifisering av banda ettersom det ikkje vart avdekkja synlege intensitetsforskjellar.

## 2.6 MTS for måling av celleviabilitet

Parallelt med alle forsøk vart det køyrt MTS test for måling av celleviabilitet. Metoden er ein kvantitativ kolorimetrisk metode for å måle celleoverleving. Ved celleforsøk vart det sett til ei bestemt mengde fargelaust MTS-reagens til kvar brønn. Metabolsk aktive celler med produksjon av NADH, reduserer MTS-saltet til eit farga formazenprodukt. Det føreligg ein lineær samanheng mellom mengde formazen produsert og mengde viable celler. Ved å måle absorbansen av fargeproduktet ved 490 nm finn ein nivået av viable celler i dei respektive brønnane [63].

Ved kvart celleforsøk vart det sådd ut celler i eit ekstra brett for å utføre MTS-test. For celler inkubert 48 timar med EP reseptor agonistar eller antagonist vart det tilsett 20 µl MTS-reagens (CellTiter 96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> Solution Reagent) til kvar brønn, og brettet vart inkubert ytterlegare ein time i varmeskap. Ved hjelp av eit spektrofotometer vart absorbansen ved 490 nm målt og registrert.

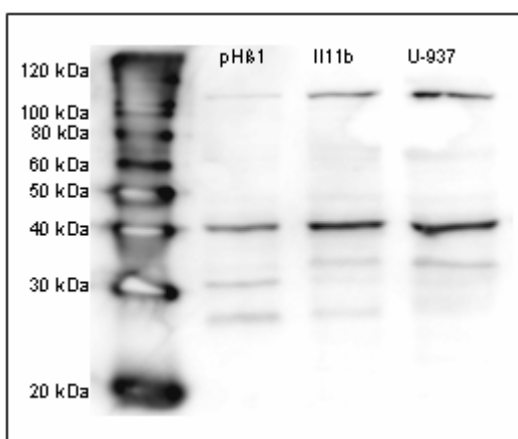
## 3 Resultat

### 3.1 Kvalitativ påvising og kvantifisering av EP reseptorar

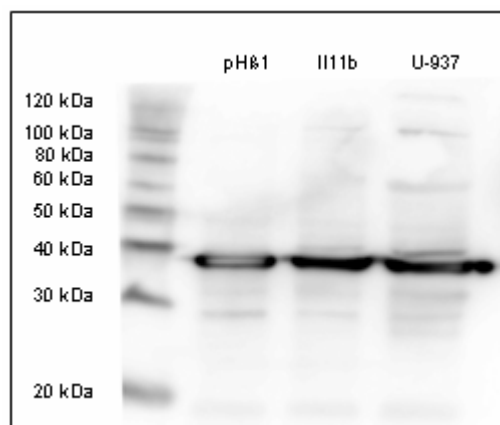
Cellelysat frå pH $\beta$ -1 og II-11b celler er undersøkt for EP reseptorar. U937 celler som tidlegare er vist å uttrykkje EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub> er nytta som positiv kontroll. Intensjonen er primært å kvalitativt påvise EP reseptorane i respektive cellelinjer, og til ein viss grad kvantifisere reseptormengdene. For å få eit fullgodt kvantitativt bilete av reseptormengdene må det utførast fleire parallellar.

#### Påvising og kvantifisering av EP<sub>1</sub> reseptor.

Figur 3.1a syner Western blott for påvising av EP<sub>1</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 og II-11b celler. EP<sub>1</sub> reseptoren, med molekylvekt 42 kDa, er representert av bandet ved ca. 40 kDa. Banda ved lågare molekylvekt er truleg spaltingsprodukt av EP<sub>1</sub> reseptoren, medan banda kring 100 kDa kan skuldast glykosylering av reseptoren. Figur 3.1b viser same blottet hybridisert med antistoff for det normalt konstitutivt uttrykte proteinet GAPDH. Blottet er òg hybridisert med antistoff for det konstitutivt uttrykte proteinet pan-aktin, men figuren er ikkje vist. Blotta indikerer eit høgare nivå av EP<sub>1</sub> reseptoren i II-11b samanlikna med pH $\beta$ -1 cellene.

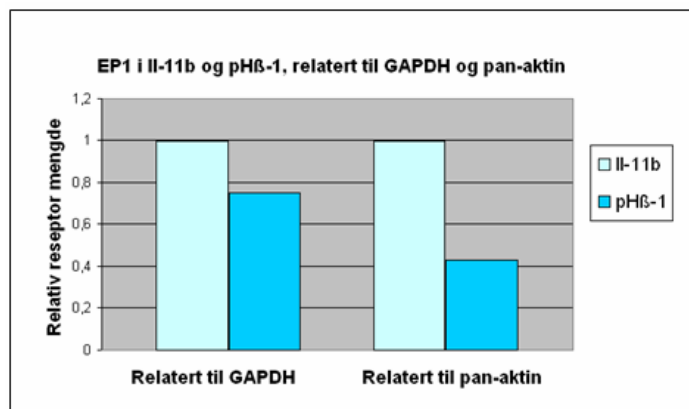


**Figur 3.1a** Western blott for påvising av EP<sub>1</sub>. Mw EP<sub>1</sub>: 42 kDa.



**Figur 3.1b** Same blottet som i 3.1a) hybridisert med antistoff for GAPDH. Mw GAPDH: 35 kDa.

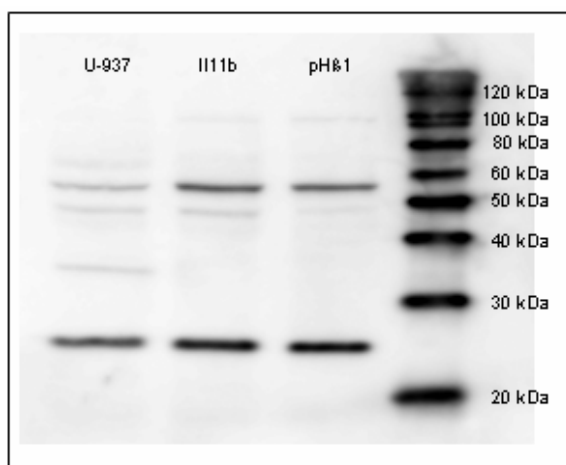
Figur 3.2 syner relativ mengde EP<sub>1</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 i høve til II-11b celler. Mengde EP<sub>1</sub> reseptor i dei respektive cellelinjene er relatert til dei konstitutivt uttrykte proteina GAPDH og pan-aktin. Reseptoren ser i størst grad ut til å vere uttrykt i II-11b cellene, men forskjellen er ikkje like stor ved relatering til GAPDH som til pan-aktin.



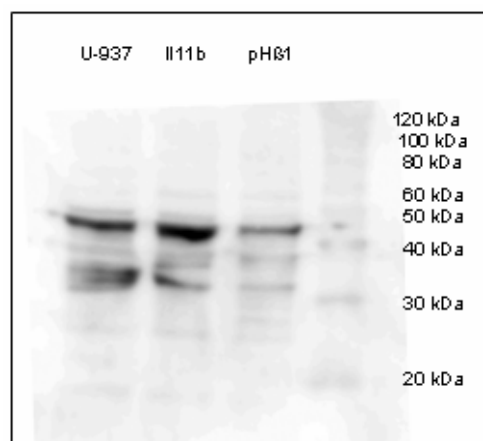
**Figur 3.2** Relativ EP<sub>1</sub> reseptormengde i pH $\beta$ -1 celler i høve til II-11b.

### Påvising og kvantifisering av EP<sub>2</sub> reseptor.

Figur 3.3a syner Western blott for påvising av EP<sub>2</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 og II-11b celler. EP<sub>2</sub> reseptoren, med molekylvekt 52 kDa, manifesterast på blottet med klare band kring 55 kDa. Antistoffet bind enda sterkare til ein komponent kring 25 kDa. Som nemnt under EP<sub>1</sub> karakteriseringa er dette truleg eit nedbrytingsprodukt av reseptoren som akkumulerast intracellulært. Figur 3.3b viser same blottet hybridisert med antistoff for det konstitutivt uttrykte proteinet pan-aktin. Blotta indikerer eit høgare nivå av EP<sub>2</sub> reseptoren i pH $\beta$ -1 samanlikna med II-11b cellene.

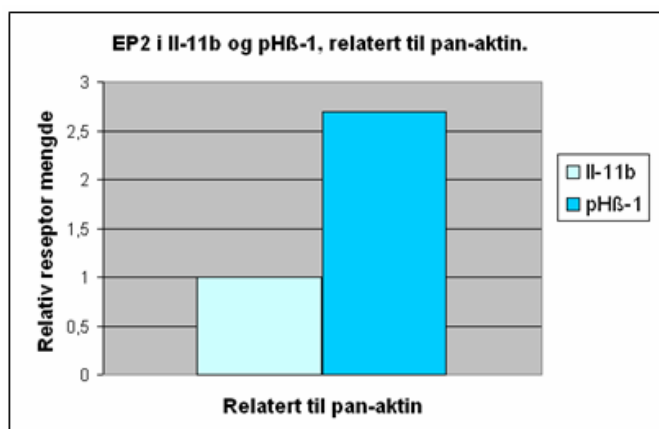


**Figur 3.3a** Western blott for påvising av EP<sub>2</sub> Mw EP<sub>2</sub>: 52 kDa.



**Figur 3.3b** Same blottet som i 3.3a) hybridisert med antistoff for pan-aktin. Mw pan-aktin: 45 kDa.

Figur 3.4 syner relativ mengde EP<sub>2</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 i høve til II-11b celler. Mengde EP<sub>2</sub> reseptor i dei respektive cellelinjene er relatert til pan-aktin, men ikkje GAPDH. Reseptoren ser i størst grad ut til å vere uttrykt i pH $\beta$ -1 cellene.

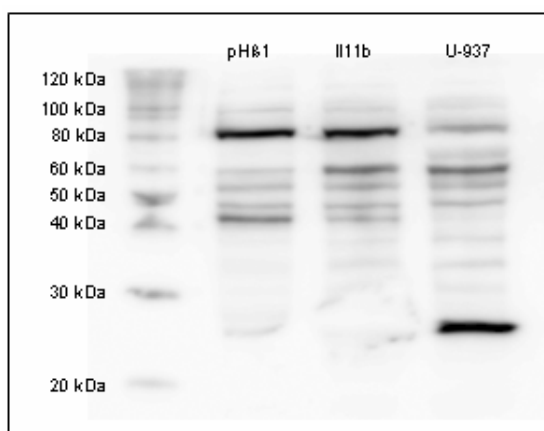


**Figur 3.4** Relativ EP<sub>2</sub> reseptormengde i pH $\beta$ -1 celler i høve til II-11b.

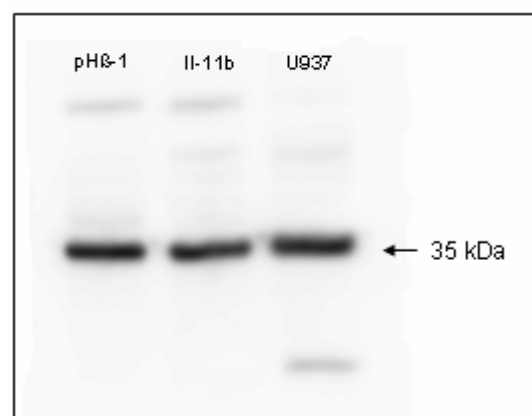


### Påvising og kvantifisering av EP<sub>3</sub> reseptor.

Figur 3.5a syner Western blott for påvising av EP<sub>3</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 og II-11b celler. Antistoffet viser å binde til ei rekkje komponentar. Det kan skuldast uspesifikk binding, binding til ulike nedbrytingsprodukt av reseptoren, eller reseptorglykosylering. EP<sub>3</sub> reseptoren, med molekylvekt 53 kDa, gjenspeglar seg truleg som eit dobbeltband mellom 50 og 60 kDa. Reseptorprofilen til pH $\beta$ -1 og II-11b er relativt lik, begge cellelinjene syner eit sterkt band kring 80 kDa, medan banda for sjølve EP<sub>3</sub> reseptoren er relativt svake. Figur 3.5b syner same blottet hybridisert med antistoff for det konstitutivt uttrykte proteinet GAPDH. Blottet er òg hybridisert med antistoff for pan-aktin, men figuren er ikkje vist. Blotta indikerer eit høgare nivå av EP<sub>3</sub> reseptoren i II-11b samanlikna med pH $\beta$ -1 cellene.

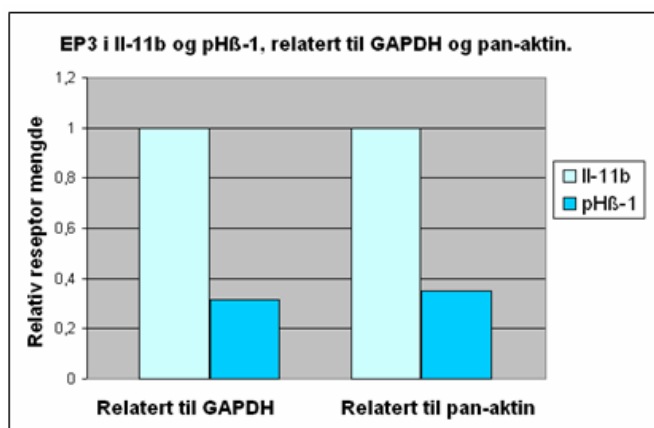


**Figur 3.5a** Western blott for påvising av EP<sub>3</sub>. Mw EP<sub>3</sub>: 53 kDa.



**Figur 3.5b** Same blottet som i 3.5a) hybridisert med antistoff for GAPDH. Mw GAPDH: 35 kDa

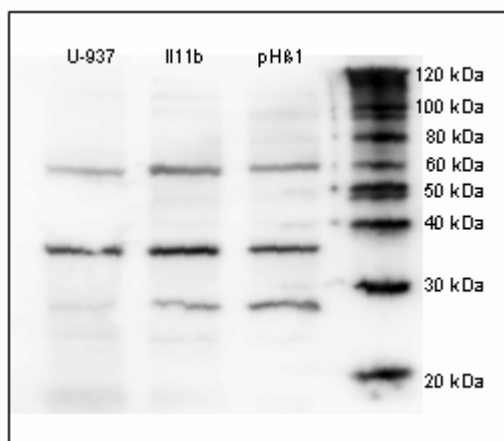
Figur 3.6 syner relativ mengde EP<sub>3</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 i høve til II-11b celler. Mengde EP<sub>3</sub> reseptor i dei respektive cellelinjene er relatert til GAPDH og pan-aktin. Reseptoren ser i størst grad ut til å vere uttrykt i II-11b cellene.



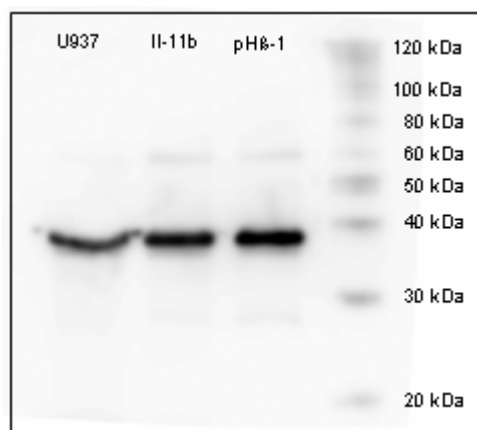
**Figur 3.6** Relativ EP<sub>3</sub> reseptormengde i pH $\beta$ -1 celler i høve II-11b.

### Påvising og kvantifisering av EP<sub>4</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 og II-11b celler.

Figur 3.7a syner Western blott for påvising av EP<sub>4</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 og II-11b celler. EP<sub>4</sub> reseptoren, med molekylvekt 65 kDa, er representert av bandet kring 60 kDa. Eit enda sterkare band er observert kring 35 kDa, men som nemnt er dette truleg eit nedbrytingsprodukt. Figur 3.7b syner same blottet hybridisert med antistoff for det normalt konstitutivt uttrykte proteinet GAPDH. Blottet er òg hybridisert med antistoff for pan-aktin, men figuren er ikkje vist. Blotta indikerer at EP<sub>4</sub> nivået er høgare i II-11b samanlikna med pH $\beta$ -1 cellene.

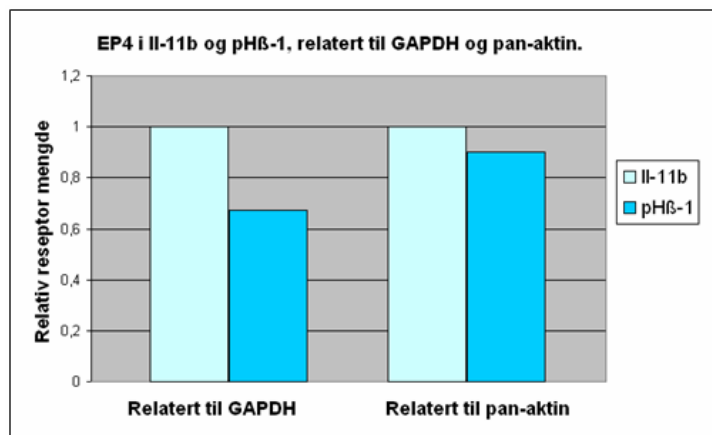


**Figur 3.7a** Western blott for påvising av EP<sub>4</sub>. Mw EP<sub>4</sub>: 65 kDa



**Figur 3.7b** Same blottet som i 3.7a) hybridisert med antistoff for GAPDH. Mw GAPDH: 35 kDa.

Figur 3.8 syner relativ mengde EP<sub>4</sub> reseptor i pH $\beta$ -1 i høve til II-11b celler. Mengde EP<sub>4</sub> reseptor i dei respektive cellelinjene er relatert til GAPDH og pan-aktin. Reseptoren ser i størst grad ut til å vere uttrykt i II-11b cellene, men relatering til pan-aktin viser ikkje like stor forskjell i uttrykkingsprofil for EP<sub>4</sub> reseptoren som relatering til GAPDH.



**Figur 3.8** Relativ EP<sub>4</sub> reseptormengde i pH $\beta$ -1 celler i høve II-11b.

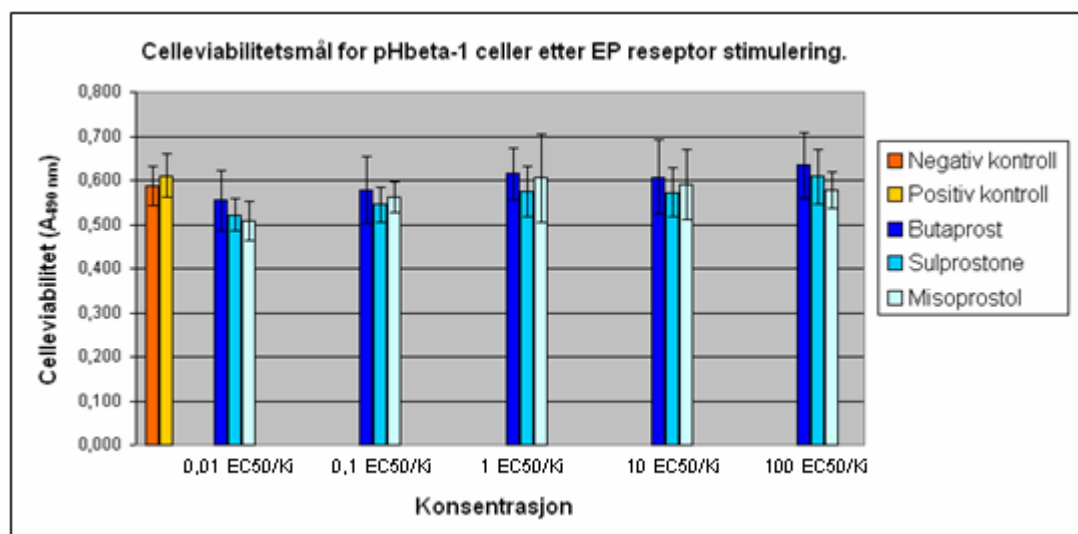
### 3.2 Effekt av EP reseptor aktivering og hemming på celleviabilitet

Celler er inkubert med EP reseptor agonistane; sulprostone, misoprostol og butaprost, samt EP reseptor antagonist; AH6809. Butaprost og sulprostone aktiverer primært EP<sub>2</sub> og EP<sub>3</sub>, respektivt, medan misoprostol aktiverer alle EP reseptorane med unntak av EP<sub>1</sub>. Antagonisten AH6809 inhiberer primært EP<sub>1</sub> og EP<sub>2</sub>. Det er utført MTS test for å kontrollere om EP reseptor agonistane eller antagonist har innverknad på celleviabilitet. Før hausting av det kondisjonerte mediet er brønnane mikroskoperte for å visuelt undersøke eventuelle effektar av agonistane/antagonisten på celleviabilitet.

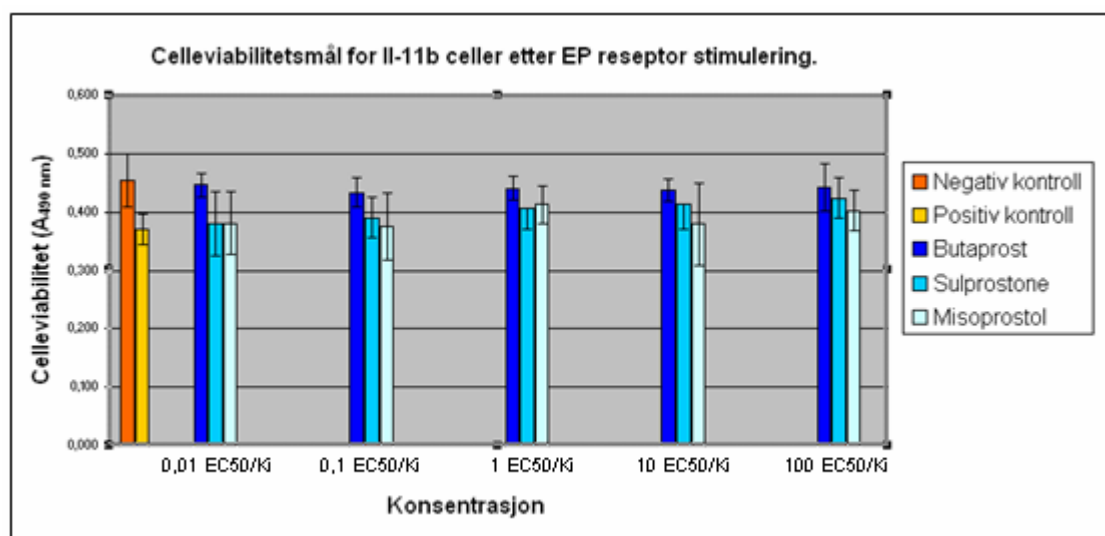
#### Celleviabilitet etter stimulering av EP reseptorar i pHβ-1 og II-11b celler.

Figur 3.9 viser effekten av EP reseptor aktivering på celleviabilitet for pHβ-1 og II-11b celler. Celleviabilitet i form av MTS test er presentert som funksjon av K<sub>i</sub> eller EC<sub>50</sub> verdi for den enkelte agonist. Ein ser ingen nemneverdige absorbansendringar etter inkubering med verken sulprostone, misoprosol eller butaprost, for verken pHβ-1 eller II-11b celler. Resultata indikerer at EP reseptor aktivering i svært liten grad har innverknad på celleviabilitet for respektive cellelinjer. Dette samsvarar med det visuelle inntrykket ein får ved mikroskopering av cellene etter 48 timars inkubering med respektive agonistar. Samanlikning av absorbansverdiar for kondisjonert medium frå celler stimulert med EP agonistar, og verdiar for positiv og negativ kontroll viser ingen konsistente forskjellar.

## A: pH $\beta$ -1



## B: II-11b



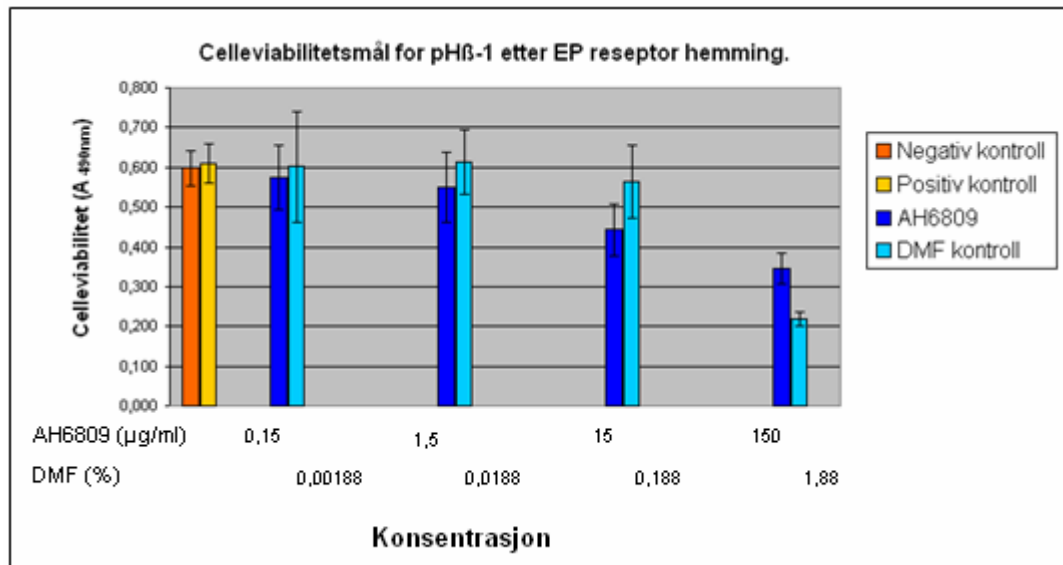
**Figur 3.9** Absorbans ( $\pm$  SD) som mål på celleviabilitet for pH $\beta$ -1 (A) og II-11b (B) celler inkubert med butaprost, sulprostone og misoprostol, samanlikna med positiv og negativ kontroll.

Konsentrasjonsrekkene for agonistane er laga med utgangspunkt i EC<sub>50</sub> eller K<sub>i</sub> verdi for respektiv agonist (avsnitt 2.3), og svarar til følgjande konsentrasjonar; butaprost: 3 - 0,3 - 0,03 - 0,003 - 0,0003  $\mu$ g/ml; sulprostone: 10 - 1 - 0,1 - 0,01 - 0,001 ng/ml; misoprostol: 10 - 1 - 0,1 - 0,01 - 0,001  $\mu$ g/ml. Negativ kontroll er celler som ikkje er stimulert med agonist, medan positiv kontroll er celler inkubert med 10  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>. Det er utført 3 forsøk med 3 parallelar i kvart forsøk for butaprost; sulprostone; og misoprostol: n=9. For negativ kontroll: n=27; positiv kontroll (10  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>): n=15.

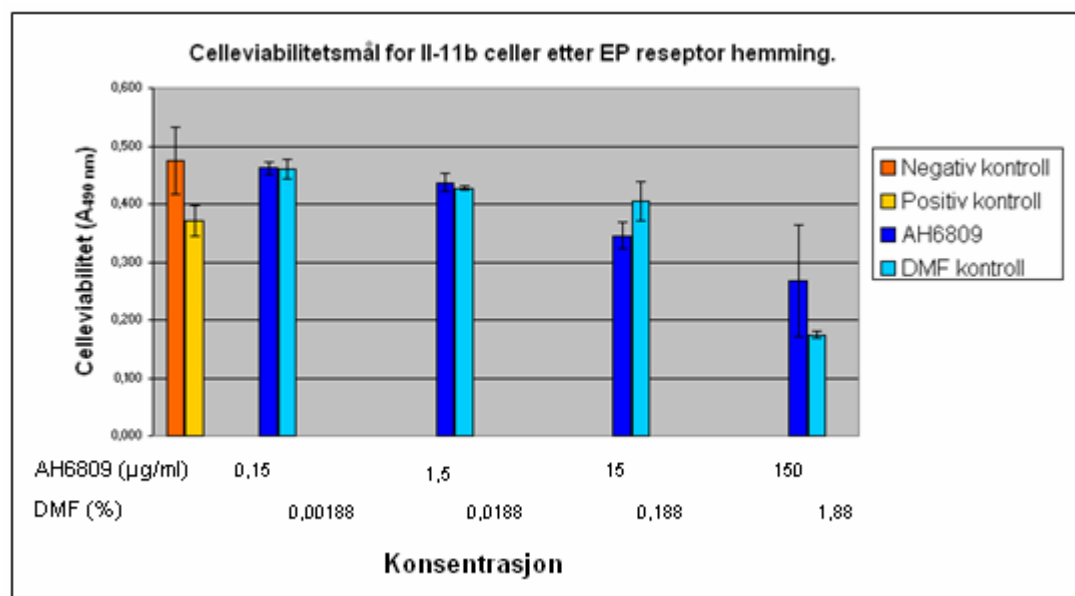
### Celleviabilitet etter hemming av EP reseptorar i pH $\beta$ -1 og II-11b celler.

Det er målt celleviabilitet for pH $\beta$ -1 og II-11b celler etter inkubering med antagonisten AH6809. Ettersom antagonisten er løyst i dimetylformamid (DMF), er det undersøkt om løsemiddelet har effekt på celleviabilitet. Figur 3.10 syner celleviabilitet i form av MTS test presentert som funksjon av EC<sub>50</sub> verdien for AH6809. Celleviabilitet for celler inkubert med antagonist er samanlikna med celleviabilitet for celler inkubert med tilsvarande konsentrasjonar DMF. Løsemiddelet har liten effekt på celleviabilitet ved konsentrasjonar 0,00188 - 0,188 %. Derimot syner aukande konsentrasjon av antagonisten å redusere celleviabiliteten i dette konsentrasjonsområdet. Den høgste konsentrasjonen av DMF (1,88 %) viser likevel å redusere celleviabiliteten i større grad enn AH6809 ved tilsvarande konsentrasjon. Denne observasjonen kan indikere at antagonisten faktisk reddar cellene frå celledød. Observasjonane som er gjort er samsvarande for både pH $\beta$ -1 og II-11b.

A: pH $\beta$ -1



B: II-11b



**Figur 3.10** Absorbans ( $\pm$  SD) som mål på celleviabilitet for pH $\beta$ -1 (A) og II-11b (B) celler inkubert med AH6809, samanlikna med kontrollar for DMF (løysemiddel), positiv og negativ kontroll.

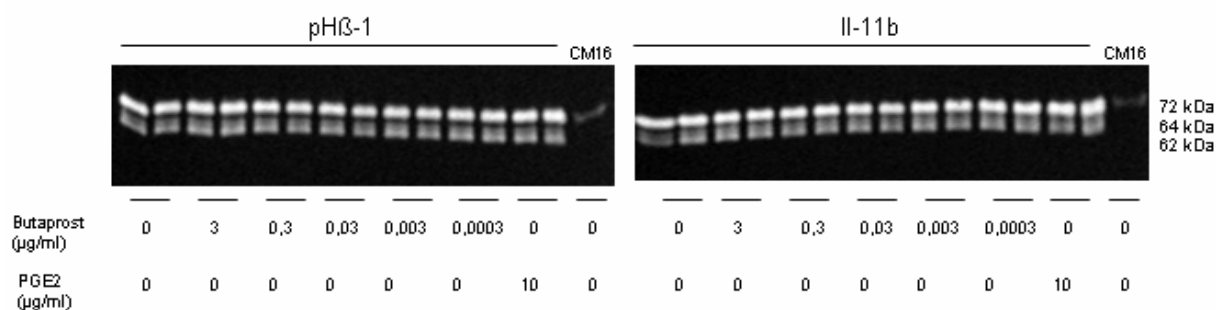
Negativ kontroll er celler som ikkje er inkubert med antagonist, medan positiv kontroll er celler inkubert med 10  $\mu$ g/ml PGE $_2$ . For AH6809 er det utført 3 forsøk med 3 parallellar i kvart forsøk, n=9. For DMF er det utført 2 forsøk med 3 parallellar i kvart forsøk, n=6. Positiv kontroll (10  $\mu$ g/ml PGE $_2$ ), n=15. Negativ kontroll, n=15.

### 3.3 Uttrykk og aktivering av MMPar etter aktivering av EP reseptorar

pH $\beta$ -1 og II-11b celler er inkubert med sulprostone, misoprostol og butaprost. Agonistane har ulik spesifisitet for EP reseptorane, og varierer i stimuleringspotens. Forsøka er utført ved tiarpotens konsentrasjonar hundre gongar under og over EC<sub>50</sub>/K<sub>i</sub> verdien for den enkelte agonist. Cellene er dyrka direkte på plast ved alle forsøka. Prøvane er samanlikna med ein negativ kontroll for celler dyrka i det same mediet utan agonist tilstades. PGE<sub>2</sub> konsentrasjonen som ved tidlegare forsøk har vist optimal effekt på MMP-2 uttrykk er nytta som positiv kontroll. Gelatin og  $\beta$ -kasein zymografi av kondisjonert medium er utført for alle forsøka. Det er observert band for pro- og aktiv MMP-2, ved respektivt 72 og 62 kDa. For enkelte forsøk er den intermediære forma av MMP-2 observert ved ca. 64 kDa. Om dette bandet er synleg er basert på kvar i aktiveringsprosessen enzymba er ved hausting av mediet (sjå figur 1.9 for aktivering av MMP-2), samt kor god separasjonen på gelen er. MMP-9 med molekylvekt 92 kDa er ikkje observert ved nokon av forsøka.

#### Effekt av agonisten butaprost på uttrykk og aktivering av MMP-2.

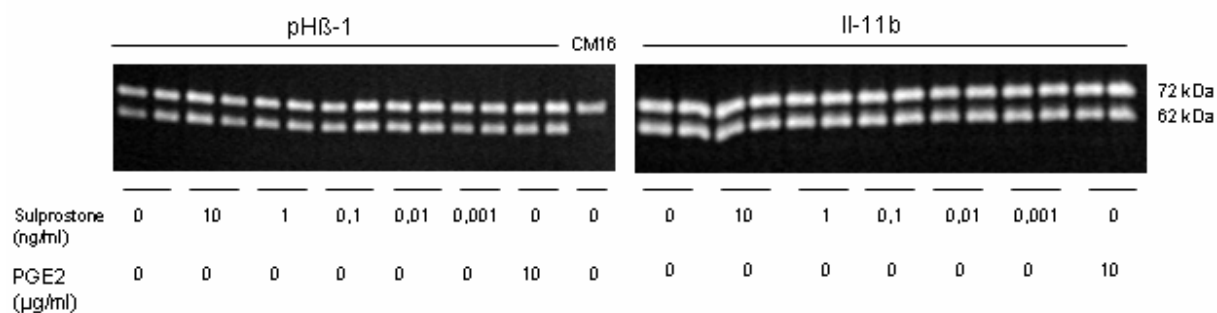
Figur 3.11 syner gelatin zymografi av kondisjonert medium frå pH $\beta$ -1 og II-11b celler inkubert med minkande konsentrasjonar butaprost, samanlikna med kontrollar utan stimulering. Butaprost er ein selektiv EP<sub>2</sub> agonist, men viser ingen effekt på uttrykk eller aktivering av MMP-2 frå verken pH $\beta$ -1 eller II-11b celler. Ein kan så vidt observere den intermediære forma av MMP-2 ved 64 kDa.



**Figur 3.11** Gelatin zymografi. MMP-2 (pro-: 72 kDa, intermediær-: 64 kDa, aktiv: 62 kDa) i pH $\beta$ -1 og II-11b inkubert med butaprost. Positiv kontroll: 10  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>. CM16: standard, pro-MMP-2; 72 kDa.

### Effekt av agonisten sulprostone på uttrykk og aktivering av MMP-2.

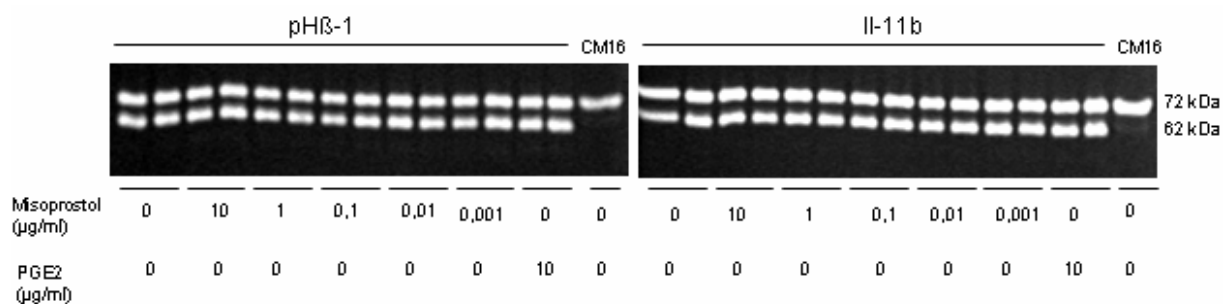
Figur 3.12 syner gelatin zymografi av kondisjonert medium frå pH $\beta$ -1 og II-11b celler inkubert med minkande konsentrasjonar sulprostone, samanlikna med kontrollar utan agonist til stades. Sulprostone bind primært til EP<sub>3</sub>, men har i tillegg låg affinitet for EP<sub>1</sub>. Sulprostone viser ingen effekt på MMP-2 uttrykk eller aktivering, verken frå pH $\beta$ -1 eller II-11b cellene. Den positive kontrollen med PGE<sub>2</sub> viser svakare band enn forventa.



**Figur 3.12** Gelatin zymografi. MMP-2 (pro-: 72 kDa, aktiv: 62 kDa) i pH $\beta$ -1 og II-11b inkubert med sulprostone. Positiv kontroll: 10  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>. CM16: standard, pro-MMP-2; 72 kDa.

### Effekt av agonisten misoprostol på uttrykk og aktivering av MMP-2.

Figur 3.13 syner gelatin zymografi av kondisjonert medium frå pH $\beta$ -1 og II-11b celler inkubert med minkande konsentrasjonar misoprostol, samanlikna med kontrollar utan stimulering. Misoprostol bind uselektivt til EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> og EP<sub>4</sub>, men syner ingen effekt på uttrykk eller aktivering av MMP-2 frå verken pH $\beta$ -1 eller II-11b celler. Den positive kontrollen viser svakare band enn forventa.

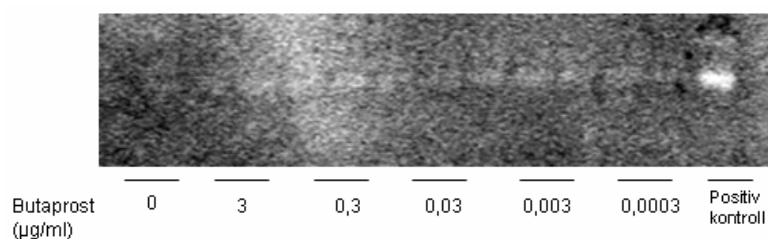


**Figur 3.13** Gelatin zymografi. MMP-2 (pro-: 72 kDa, aktiv: 62 kDa) i pH $\beta$ -1 og II-11b inkubert med misoprostol. 10  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub> er nytta som positiv kontroll. CM16: standard, pro-MMP-2; 72 kDa.



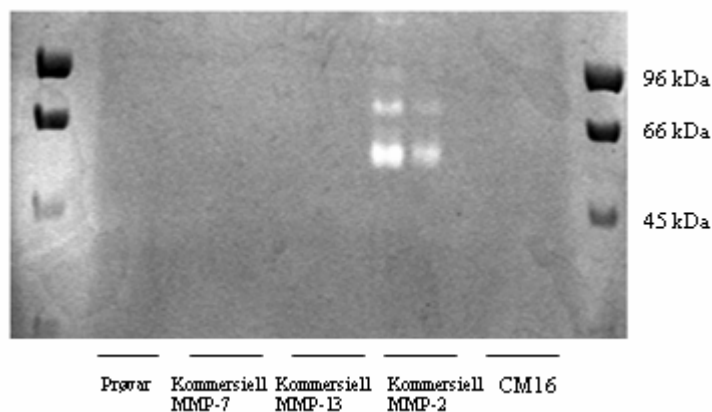
## Uttrykk av $\beta$ -kasein degraderende MMPar etter stimulering av EP reseptorar?

Det er utført  $\beta$ -kasein zymografi av kondisjonert medium frå celler inkubert med sulprostone, misoprostol og butaprost, for å kartlegge MMP uttrykk og aktivitet utover MMP-2. Figur 3.14 syner  $\beta$ -kasein zymografi av kondisjonert medium frå pH $\beta$ -1 celler inkubert med minkande konsentrasjonar butaprost, samanlikna med positiv og negativ kontroll.  $\beta$ -kasein zymografi syner ingen aktivitet utover MMP-2, og viser generelt svært svake band. Figuren eksemplifiserer resultatet av  $\beta$ -kasein zymografi, ettersom forsøk med kondisjonert medium frå celler inkubert med resterande EP agonistar syner svært liknande figurar. Kommersiell MMP-2 (50 ng) og MMP-13 (50 ng) er nytta som positiv kontroll, men MMP-13 er ikkje synleg på gelen (data ikkje vist).



**Figur 3.14**  $\beta$ -kasein zymografi av kondisjonert medium frå pH $\beta$ -1 celler inkubert med butaprost. Positiv kontroll: kommersiell MMP-2.

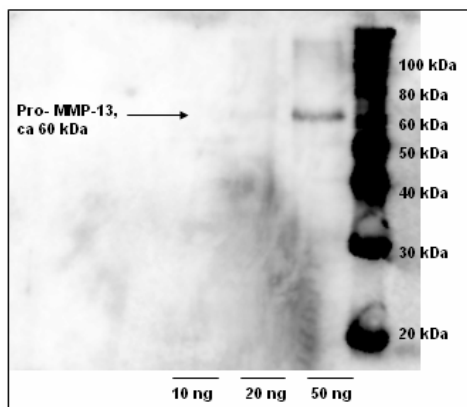
Figur 3.15 syner  $\beta$ -kasein zymografi for kommersiell MMP-2, MMP-7 og MMP-13 saman med prøvar og proteinstandard. Figuren stadfestar at dei observerte banda ved kasein zymografi representerer MMP-2. Den aktiverte forma av MMP-2 ligg like under 66 kDa som forventa, medan pro-forma ligg kring 70-80 kDa, òg om lag som forventa. Enzymmengdene av MMP-7 (23 ng) og MMP-13 (46 ng) er ikkje påviselege ved  $\beta$ -kasein zymografi.



**Figur 3.15**  $\beta$ -kasein zymografi for MMP-2, MMP-7, og MMP-13 (kommersiell enzym), CM16 (MMP-2 standard), samt prøvar av kondisjonert medium. Ein ordinær proteinstandard (low range) er synleg i kvar ende av gelen. Prøvepåsetting; MMP-2: 46 ng, MMP-7: 23 ng, MMP-13: 46 ng.

### Western blott for deteksjon av MMP-1, MMP-7 og MMP-13

Det er utført Western blotting av kondisjonert medium frå celler inkubert med EP agonistar for å detektere MMP-1, MMP-7 og MMP-13. Western er ikkje tilstrekkeleg sensitiv til å påvise dei låge nivåa av respektive MMPar som moglegvis er tilstades i det kondisjonerte mediet. Det er freista å finne minste detekterbare mengde av MMP-7 og MMP-13 for Western blotting. Figur 3.16 syner minste påviselege mengde MMP-13, som er identifisert ved hjelp av fortynningsrekkjer av kommersielt enzym. Blottet viser eit klart band ved 50 ng (3,3 ng/ $\mu$ l), medan berre eit svært svakt band er synleg ved 20 ng (1,3 ng/ $\mu$ l). Ein hadde tenkt at mengder i picogram regionen kunne påvisast. Ved forsøk på å identifisere minste detekterbare mengde MMP-7 for Western blotting, viste ein at grensa ligg over 50 nanogram (data ikkje vist).



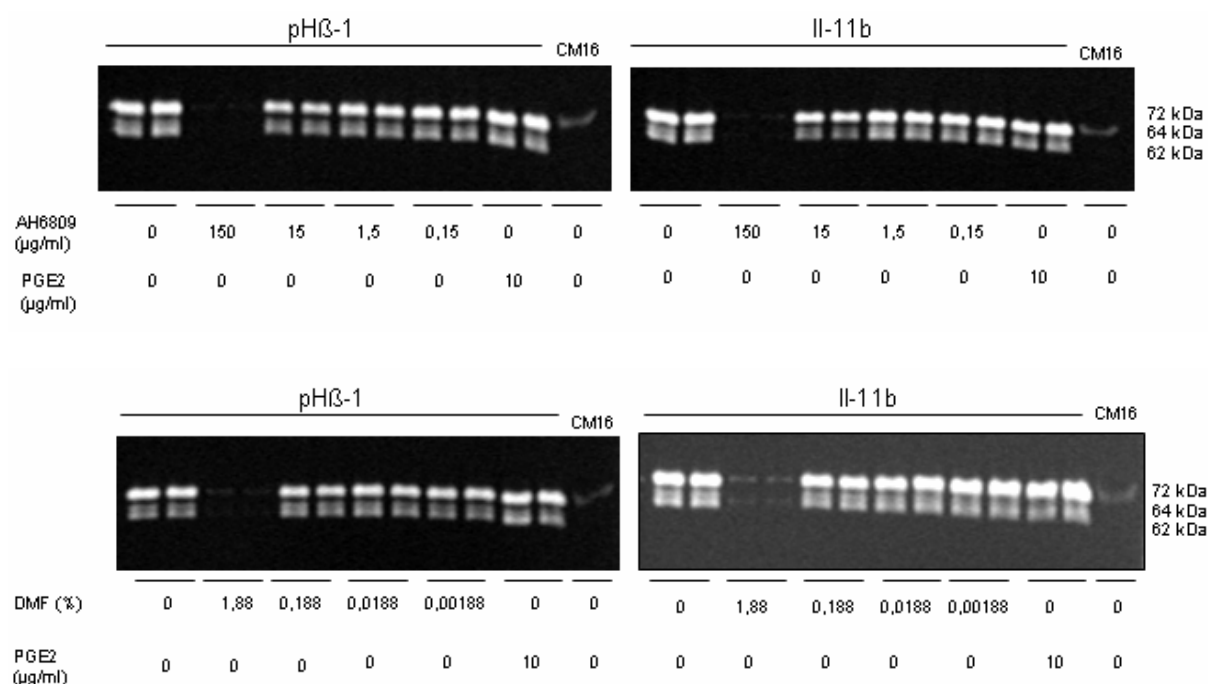
**Figur 3.16** Western blott for minste detekterbare mengde MMP-13. Minste klart påviselege mengde for pro-MMP-13 er 50 ng. Molekylvekt MMP-13; pro: 60 kDa, aktiv: 48 kDa.

### 3.4 Uttrykk og aktivering av MMPar etter hemming av EP reseptorar

pH $\beta$ -1 og II-11b celler er inkubert med EP reseptor hemmaren AH6809 ved tiarpotens konsentrasjonar hundre gongar under, og ti gongar over EC<sub>50</sub> verdien. Cellene er dyrka direkte på plast ved alle forsøka. Prøvane er samanlikna med kondisjonert medium frå celler dyrka i same medium utan hemmar tilstades. PGE<sub>2</sub> konsentrasjonen som ved tidlegare forsøk har vist optimal effekt på MMP-2 uttrykk er nytta som positiv kontroll.

## Effekt av antagonist AH6809 og løysemiddelet DMF på uttrykk og aktivering av MMP-2.

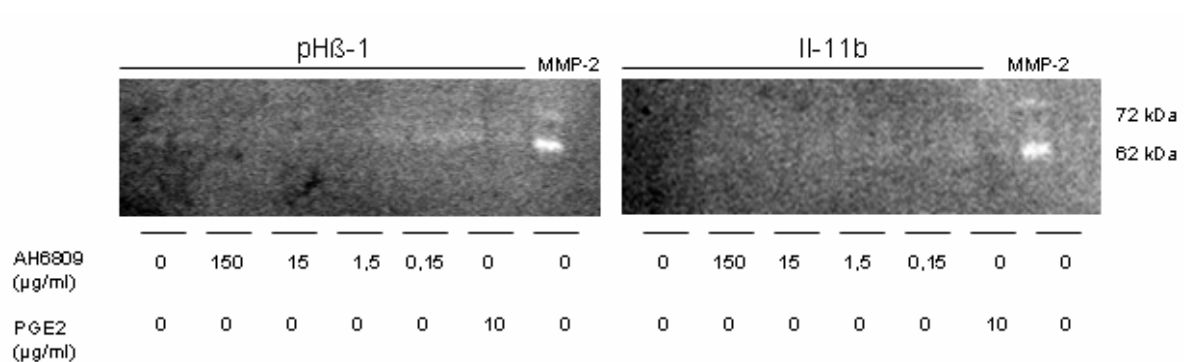
Figur 3.17 syner MMP-2 uttrykk og aktivering frå pH $\beta$ -1 og II-11b celler etter inkubering med antagonist AH6809, som inhiberer både EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> og EP<sub>3III</sub>. Det er observert ein svak reduksjon for både pro- og aktiv MMP-2 med aukande antagonist konsentrasjonar. Same trenden er synleg både for pH $\beta$ -1 og II-11b celler. Antagonisten er løyst i DMF. For å undersøke om løysemiddelet er ansvarleg for den observerte effekten, er det utført kontrollar for DMF i same konsentrasjonsområdet som cellene er eksponerte for i forsøka. II-11b viser ein svak nedgang for pro-MMP-2 med aukande eksponering av løysemiddel, medan ein ser berre mindre intensitetsforskjellar mellom banda for pH $\beta$ -1. Den høgste konsentrasjonen av løysemiddelet viser derimot ein stor reduksjon av pro- og aktiv MMP-2 frå både pH $\beta$ -1 og II-11b celler. Resultata samsvarar med det mønsteret ein ser ved måling av cellelevibilitet for respektive cellelinjer etter inkubering med antagonist og løysemiddel. Intensitetsforskjellane som ein ser ved zymografi skuldast truleg redusert cellelevibilitet ved aukande grad av eksponering med antagonist og/eller løysemiddel.



**Figur 3.17** Gelatin zymografi. MMP-2 (pro-: 72 kDa, intermediaer-: 64 kDa, aktiv: 62 kDa) i pH $\beta$ -1 og II-11b celler inkubert med antagonist AH6809 (øvtst) og løysemiddelet DMF (nedst). Positiv kontroll: 10  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>. CM16: standard, pro-MMP-2; 72 kDa.

Effekt av antagonist AH6809 på MMP uttrykk og aktivisering studert ved  $\beta$ -kasein zymografi.

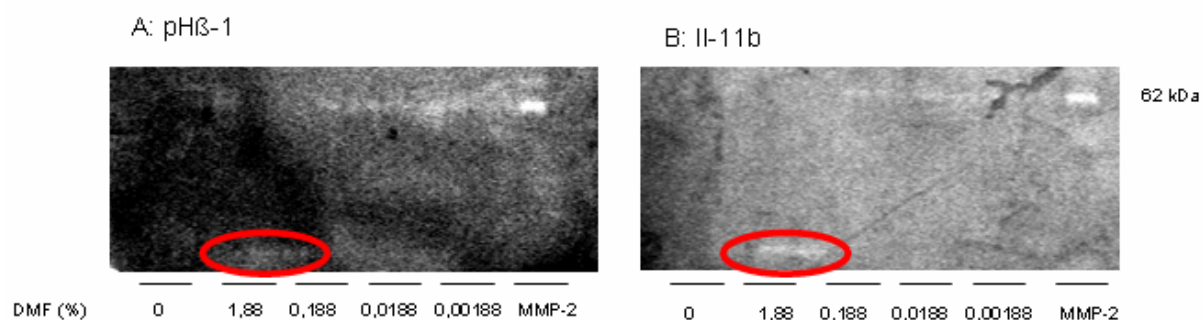
Figur 3.18 syner  $\beta$ -kasein zymografi av kondisjonert medium frå pH $\beta$ -1 og II-11b celler inkubert med antagonist AH6809. Det var venta å identifisere MMP uttrykk og aktivitet utover MMP-2, men  $\beta$ -kasein zymografi viser ingen ytterlegare band. Kasein zymografi er lite sensitiv, og viser generelt svært svake band. Banda for pro-MMP-2 er knapt synlege. Kommersiell MMP-2 (50 ng) og MMP-13 (50 ng) er nytta som positiv kontroll, men MMP-13 er ikkje synleg på gelen (data ikkje vist).



**Figur 3.18**  $\beta$ -kasein zymografi. MMP-2 (pro-: 72 kDa, aktiv: 62 kDa) i pH $\beta$ -1 og II-11b inkubert med AH6809. Positiv kontroll: 10  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>. MMP-2: kommersiell MMP-2.

### Effekt av løsemiddelet DMF på MMP uttrykk og aktivering studert ved $\beta$ -kasein zymografi.

Det er utført  $\beta$ -kasein zymografi av kondisjonert medium fra celler inkubert med tilsvarende DMF konsentrasjoner, som cellene er eksponert for ved inkubering med AH6809. Figur 3.19 syner MMP-2 uttrykk og aktivering fra pH $\beta$ -1 og II-11b celler etter inkubering med DMF. Banda er svært svake og relativt uklare. For den høyeste DMF konsentrasjonen syner gelen eit band ved svært låg molekylvekt. Bandet er ikkje synleg ved gelatin zymografi, men ettersom bandet er synleg ved kasein zymografi etter inkubering med både AH6809 og DMF, kan den ukjende effekten truleg tilskrivas løsemiddelet.



**Figur 3.19**  $\beta$ -kasein zymografi. MMP-2 (aktiv: 62 kDa) i pH $\beta$ -1 og II-11b inkubert med løsemiddelet DMF. MMP-2: kommersiell MMP-2.

## 4 Diskusjon

Det er i denne oppgåva påvist at cellelinjene pH $\beta$ -1 og II-11b uttrykkjer EP reseptorane EP1-4. Det er studert om hemming eller stimulering av EP reseptorar har effekt på celleviabilitet, eller på uttrykk og aktivering av MMP-1, MMP-2, MMP-7, og MMP-13 frå respektive cellelinjer.

### 4.1 Optimalisering av Westernmetode for påvising av EP reseptorar

Fleire trinn i protokollen for Western blotting måtte utbetrast for å kunne påvise EP reseptorane. Mengde protein sett på gelen synte seg å vere heilt avgjerande for vellukka Western blotting. Konsentrasjonane av alle primærantistoffa i kombinasjon med sekundærantistoffet måtte optimaliserast for å få klare, avgrensa band. Effekten av å endre blokkebuffer vart òg undersøkt med omsyn på å minimalisere bakgrunnsstøyen. Temperaturen og tidsaspektet for inkubering av blokkebuffer og primærantistoff vart freista optimalisert. Bruk av ulike deteksjonskitt viste å krevje individuell tilpassing av overnemnde metodeparameter.

### 4.2 Påvising av EP reseptorar

Prognosen ved osteosarkom har siste åra vorte betre på grunn av aggressiv bruk av kjemoterapi, men legemiddelresistens avgrensar til dels terapieffektiviteten. Det er difor klar trong for alternative strategiar for adjuvant behandling av pasientar med osteosarkom [64]. Overuttrykking av COX-2 er beskrive i ei rekkje tumorar, frå premaligne til avanserte fasar. Enzymet er òg vist å vere uttrykt i eit fleirtal av osteosarkom [55]. Bruk av NSAID og COX-2 hemmarar har synt antitumor effekt både *in vitro* og *in vivo* for fleire krefttypar [65]. PGE<sub>2</sub> er eit av hovudprodukta i COX syntesevegen, og har gjennom binding til EP reseptorar vist å aktivere intracellulære signalveggar som kontrollerer celle proliferasjon, migrering, apoptose og angiogenese [28, 31]. Det er difor retta interesse rundt ein eventuell terapeutisk verdi av hemming av EP reseptorar, men karakterisering av EP reseptorar i tumorceller er berre i startgropa, og rolla i høve malignitet er enda uviss. Tilgjengeleg kunnskap er nesten utelukkande basert på koloncancer studert gjennom forsøk på dyr. Reseptorane ser ut til å spele ei organspesifikk rolle, og viser ulike effektar ved studering av forskjellige tumortypar. I kreftbiologien er EP<sub>3</sub> likevel ofte assosiert med opponerande effektar mot resterande EP

reseptorar. Reseptoruttrykk i brystkreftvev har vist auka EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub> nivå, samt lågare ekspresjon av EP<sub>3</sub> samanlikna med normalt brystvev. Studiar som denne indikerer at EP<sub>3</sub> moglegvis har ein kreftbeskyttande effekt. Hemming av adenyl cyclase via EP<sub>3</sub> i normalt vev kan potensielt overdøve den tumorfremjande effekten av PGE<sub>2</sub>, modulert gjennom resterande EP reseptorar [24, 31]. Den presise betydinga av EP-reseptor aktivering i fysiologiske og patologiske samanhengar er avhengig av fleire faktorar. Cella sin uttrykingsprofil og kopling av reseptorar til indre signalveggar er avgjerande, i tillegg til konteksten rundt cella. Aktivering av ein gitt EP-reseptor kan resultere i variert respons i ulike celletypar og vev. Den presise rolla av kvar enkel EP reseptor i høve den enkelte krefttype må i større grad avklarast [23].

Det er ved tidlegare masteroppgåver i Tromsø vist at PGE<sub>2</sub> aukar både uttrykk og aktivering av MMP-2 [58, 59]. For å bekrefte tidlegare funn, samt karakterisere kven av EP reseptorane som i størst grad er involvert i den observerte effekten, var det essensielt å kvalitativt påvise EP reseptorane i dei to osteosarkomcellelinjene som det er utført forsøk med. Alle fire reseptorane vart påvist i både pHβ-1 og II-11b cellelinjene. Blotta viste i tillegg fleire uspesifikke band både ved høgare og lågare molekylvekt. Som nemnt under resultat kan dette skuldast respektivt glykosylering eller spalting av reseptoren. For tromboksan A<sub>2</sub> reseptoren er det vist at glykosylering kan auke molekylvekta til reseptoren med 20 kDa. Både for EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> og EP<sub>4</sub> er det påvist potensielle glykosyleringsseter i den ekstracellulære delen av reseptorane [29]. Det er òg tenkjeleg at reseptorane gjennom internaliseringsprosessen bind til større molekyl, for å bli dirigert til intracellulære komponentar anten for resirkulering, eller lysosomal degradering [66]. Ved lysering av celler vert det frigitt proteasar som mellom anna kan spalte membranbundne reseptorar. Det vart ved hausting av celler tilsett ein proteasehemmar for å utelukke spalting, men banda oppstod likevel. I forsøka vart det undersøkt reseptoruttrykk i heile cellelysate. Ettersom det er vanleg med intracellulære reseptorlager kan det òg finnast lager av nedbrytingsprodukt [31]. Reseptorane vert truleg brotne ned i fleire steg, og nedbrytingsprodukta kan difor gjenspegle seg i fleire band på blottet. Nedbrytingsprodukt med langvarig omsetjing skapar sterke band på grunn av akkumulering, og vise versa. Ved isolering av cellemembranar ville ein fått eit meir reelt bilete av kva reseptorar som sit i cellemembranen.

På grunn av ulik ”splicing” av den C-terminale enden av EP<sub>3</sub>, er denne reseptoren tidlegare identifisert som fleire isoformar. Minst åtte humane variantar er identifisert, medan enda fleire finst blant andre artar. Ei rekkje funksjonelle forskjellar har vore beskrive mellom dei ulike

isoformane, mellom anna ulik konstitutiv aktivitet, og ulik aktivering av intracellulære signalvegar [23, 67]. Medan EP<sub>3</sub> generelt er assosiert med intracellulær cAMP reduksjon er det observert motsatt effekt av enkelte EP<sub>3</sub> reseptor subtypar [31]. På tross av dokumenterte funksjonelle variasjonar mellom isoformane er det usikkert kor vidt dette er av fysiologisk betydning [23, 67]. Isoformane kan likevel forklare kvifor EP<sub>3</sub> blottet er representert med multiple band.

### 4.3 Kvantifisering av EP reseptorar

Aktivisering av dei fire EP reseptorane er assosiert med ulike intracellulære effektar. Medan aktivisering av EP<sub>2</sub> og EP<sub>4</sub> medfører auka cAMP nivå, fører EP<sub>1</sub> og EP<sub>3</sub> aktivisering til mobilisering av intracellulært kalsium. Aktivisering av EP<sub>3</sub> er i tillegg assosiert med hemming av adenyl cyklase, og dermed redusert cAMP nivå. Dominans av ein særskild EP reseptor kan difor vere avgjerande for kva verkemekanisme PGE<sub>2</sub> er assosiert med i den enkelte celletype [24]. Samstundes er EP reseptorane assosiert med forskjellige effektar ved ulike krefttypar [31]. Sjølv om våre forsøk primært var meint for kvalitativ påvising av EP reseptorar, var det òg ønskjeleg å kvantitativt undersøke uttrykkingsprofilen av EP reseptorar i pHβ-1 i høve til II-11b celler. For å stadfeste forskjellar i reseptorstatus som vart observert visuelt vart det utført kvantifisering av banda. EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub> og EP<sub>4</sub> reseptorane såg i mindre grad ut til å vere uttrykt i pHβ-1, samanlikna med II-11b celler. Standardisering mot dei vanlegvis konstitutivt uttrykte proteina, GAPDH og pan-aktin synte same tendensen, men i ulik grad. EP<sub>2</sub> reseptoren såg derimot ut til å vere mest uttrykt i pHβ-1 cellene når resultatet vart relatert til pan-aktin. Etersom S100A4 nivået er det einaste som skil cellelinjene frå einannan, kan det tenkjast at S100A4 har innverknad på uttrykkingsprofilen av EP reseptorar. Det er likevel viktig å påpeike at kvantifiseringsresultata berre indikerer ein tendens. For med sikkerheit å kunne kommentere forskjellar i reseptorstatus opp mot S100A4 nivå, samt opp mot fysiologiske eller patologiske effektar, må resultatata ytterlegare stadfestast med fleire parallellar.

Graden av forskjell i reseptoruttrykking ved relatering til GAPDH- og pan-aktin uttrykk varierte. Årsaka kan vere at ekspresjonen av GAPDH og pan-aktin ikkje er lik i dei to cellelinjene, sjølv om proteina vanlegvis er konstitutivt uttrykt. Overeksponering av banda kan òg vere årsak til sprikande resultat ved relasjon til GAPDH og pan-aktin. Høvet mellom reseptormengda i cellene er berre konstant dersom intensiteten av banda er lineær med mengde antistoffkompleks. Påvisingskittet var svært sensitivt og gav ein rask, men kortvarande chemiluminiserande reaksjon. Overeksponering skjedde difor relativt raskt. Ved



eventuell framtidig kvantifisering av reseptormengde må framkallingsprosessen ytterlegare standardiserast.

#### 4.4 Uttrykk og aktivering av gelatinasar etter hemming og aktivering av EP reseptorar

MMP-2 og MMP-9 ekspresjon er ofte oppregulert i tumorvev. Respektive enzym degraderer mellom anna type IV kollagen, ein av hovudkomponentane i basalmembranen, og er assosiert med auka evne til å metastasere, auka aggressivitet og dårleg prognose. Enzyma er assosiert med metastasering ved ei rekkje krefttypar, som mage-, lunge-, blære- og brystkreft [10, 12]. Høge nivå av MMP-2 i tumorbiopsiar, og serum frå kreftpasientar har vist å samsvare med dårleg prognose og overleving [10]. COX-2 overuttrykking med resulterande høge PGE<sub>2</sub> nivå er i fleire studiar vist å samsvare med auka MMP-2 uttrykk. Ein amerikansk studie har synt at eksogen PGE<sub>2</sub> i kombinasjon med leukotrien B<sub>4</sub><sup>5</sup> gjev auka uttrykk av både MMP-2 og MMP-9 frå T-celler. Den auka gelatinase aktiviteten har vist å fremje rekruttering av immunologiske T-celler over basalmembranen til inflammatorisk vev [68]. Ein annan studie har vist at PGE<sub>2</sub> gjennom ein autokrin/parakrin mekanisme stimulerer MMP-2 uttrykk frå humane lungekreftceller. Oppregulering av MMP-2 uttrykk vart vist å vere ein av fleire invasjonsmekanismar for den respektive cellelinja [27]. Ein *in vitro* studie av ulike osteosarkomcellelinjer har òg stadfesta samsvar mellom invasjonsevne og nivå av MMP-2 og MMP-9 [45].

Gjennom selektiv stimulering og hemming av EP reseptorar ønskte ein her å karakterisere reseptorane med omsyn på MMP-2 ekspresjon. Hypotesen var at MMP-2 ekspresjon er induisert gjennom auka cAMP nivå, og aktivering av PKA. Ein venta å sjå auka MMP-2 uttrykk frå cellene etter inkubering med butaprost, ettersom agonisten primært bind til EP<sub>2</sub> og aktiverer adenyl cyklase. Sulprostone har størst affinitet for EP<sub>3</sub>, og inhiberer dermed primært adenyl cyklase og danning av cAMP. Det var difor ikkje forventa å observere auka ekspresjon av MMP-2 frå celler inkubert med sulprostone. For å gje mest mogleg brei stimulering vart cellene òg inkubert med misoprostol, som aktiverer EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> og EP<sub>4</sub>. Det var uvisst kva effekt ein kunne forvente etter inkubering av denne agonisten.

---

<sup>5</sup> Leukotrien B<sub>4</sub> er eit signalstoff produsert av neutrofile leukocytter, som mellom anna stimulerer frigjeving og metabolisme av arakidonsyre.

Cellene uttrykkjer normalt ikkje MMP-9 utan stimulering, men det er ved tidlegare arbeid i Tromsø vist at både pH $\beta$ -1 og II-11b celler kan uttrykkje MMP-9. EP reseptor aktivering viste derimot ikkje å indusere MMP-9 ekspresjon. Noko overraskande vart det heller ikkje observert kvantifiserbare endringar av MMP-2 uttrykk eller aktivering, etter inkubering med nokon av agonistane. Forsøksresultata var uventa i høve til den effekten som tidlegare er observert for PGE<sub>2</sub> på MMP-2 uttrykk og aktivering. Ei tidlegare masteroppgåve har funne auka totalmengde, og relativ aktivering av MMP-2 ved PGE<sub>2</sub> stimulering både frå pH $\beta$ -1 og II-11b celler dyrka på plast, kollagen, laminin og fibronektin [58]. Ein hadde venta å sjå auka MMP-2 ekspresjon og aktivering ved EP reseptor aktivering, ettersom PGE<sub>2</sub> mest sannsynleg medierer sin effekt gjennom EP reseptorane som vart påvist i begge cellelinjene. Dersom den tidlegare observerte auken for MMP-2 ekspresjon er forårsaka av EP<sub>1</sub> aktivering, og mobilisering av intracellulært kalsium, vil effekten likevel vere lite synleg gjennom våre forsøk. Sjølv om sulprostone har svak affinitet for EP<sub>1</sub> er manglande aktivering av denne reseptoren ei svakheit for forsøka. Det kan òg tenkjast at stimuleringa ikkje har gjeve ein sterk nok aktivering av reseptorane til å gje utslag på MMP-2 ekspresjon eller aktivering. Sjølv om det er påvist uttrykk av reseptorane i respektive cellenlinjer fins det ingen garanti for at reseptorane er funksjonelle. For å illustrere problemstillinga vert det referert til ein studie utført på ulike brystkreftcellenlinjer. Studien demonstrerer at COX-2 oppregulering med resulterande høgt PGE<sub>2</sub> nivå er assosiert med auka migreringsfunksjon, for dei høgmetastaserande cellenlinjene. Signifikansen av cAMP/PKA signalvegen vart bekrefta for respektive cellenlinjer. For ei av brystkreftcellenlinjene (MCF-7) vart det likevel ikkje observert effekt av verken PGE<sub>2</sub>, eller EP reseptor inhibering i høve til migreringsfunksjon. MCF-7 cellene viste å uttrykkje mRNA for alle EP reseptorane, samstundes som eksogen PGE<sub>2</sub> viste å auke intracellulært cAMP nivå. Graden av cAMP auke var likevel ikkje tilstrekkeleg til å fremje respons i form av auka cellemigrering. Kostimulering med østradiol synte å potensere effekten av PGE<sub>2</sub>, og resulterte både i kraftig cAMP auke og auka cellemigrering [24]. Likeeins kan det tenkjast at EP stimulering åleine induserer ein for knapp auke av cAMP, eller intracellulært kalsium til å gje effekt på MMP-2 uttrykk og aktivering. Kostimulering kan vere naudsynt for å sjå effekt av EP stimulering i pH $\beta$ -1 og II-11b celler. Det er mellom anna vist at komponentar i ECM kan oppregulere gentranskripsjon gjennom binding til integrin på celleoverflata [37]. Ei tidlegare masteroppgåve ved Universitetet i Tromsø synte effekt av PGE<sub>2</sub> stimulering på MMP-2 uttrykk, frå både pH $\beta$ -1 og II-11b celler når cellene vart dyrka på kollagen-1, men ikkje ved dyrking på plast [59]. Moglegvis ville EP aktivering under andre dyrkingsvilkår gitt effekt på MMP-2 uttrykk og aktivering. Det kan òg tenkjast at PGE<sub>2</sub> sin tidlegare observerte effekt ikkje er signalisert gjennom EP reseptorar. Fleire studiar

som har synt samanheng mellom COX-2 oppregulering i tumorvev og auka MMP uttrykk, har ikkje klart å reprodusere effekten gjennom stimulering med eksogen PGE<sub>2</sub> [69, 70].

For å undersøke om MMP-2 uttrykk frå cellelinjene er avhengig av autokrin EP reseptor aktivering vart det utført eitt inhiberingsforsøk. Cellene vart inkubert med antagonisten AH6809, som primært inhiberer EP<sub>1</sub> og EP<sub>2</sub>, men har òg affinitet for EP<sub>3III</sub>. Forsøket viste ein svak nedgang for både totalmengde og aktiv MMP-2 med aukande grad av hemming. Det vart òg undersøkt om løysemiddelet DMF hadde effekt på ekspresjon og aktivering av MMP-2. Ved den høgste konsentrasjonen viste løysemiddelet i stor grad å redusere både pro- og aktiv MMP-2. Ved resterande konsentrasjonar vart det berre observert små intensitetsforskjellar mellom banda. Måling av celleviabilitet i form av MTS test synte eit tilsvarande mønster for reduksjon i celleviabilitet, som vi såg for reduksjon av pro- og aktiv MMP-2 etter eksponering med aukande konsentrasjonar av antagonist og løysemiddel. Dette indikerer at den svake nedgangen for pro- og aktiv MMP-2 skyldtest reduksjon av celleviabilitet, og ikkje ein direkte effekt på MMP-2 ekspresjon eller aktivering. Inhiberingsforsøket indikerer difor at cellene ikkje er avhengig av EP<sub>1</sub> og EP<sub>2</sub> reseptor aktivering for å uttrykke MMP-2.

Vi ønskte òg å studere om nivået av S100A4 er avgjerande for MMP-2 ekspresjon etter aktivering eller hemming av EP reseptorar. Ettersom verken pHβ-1 eller II-11b celler viste kvantifiserbare endringar for MMP-2 uttrykk eller aktivering i nokon av forsøka, er S100A4 truleg ikkje avgjerande i denne samanhengen.

Osteosarkomcellelinja som er opphavet til pHβ-1 og II-11b cellene er isolert frå eit samansett tumormiljø. Ved *in vitro* forsøk har tumorcellene mista den naturlege kontakten med omkringliggende stromaceller og ECM. Ved tumorinvasjon og metastasering eksisterer det normalt eit komplekst samspel mellom tumorceller og miljøet rundt. Komponentane utvekslar ulike cytokin, vekstfaktorar, og proteasar for å mellom anna fremje angiogenese og modulering av ECM [11]. Mange MMPar er hovudsakleg produsert av fibroblastar, inflammasjonsceller, og endotelceller etter stimulering frå tumorceller [71]. Overuttrykking av MMP-2 er assosiert med auka eigenproduksjon hjå tumorceller, men det er vist at enkelte tumorar er heilt avhengig av MMP-2 produksjon frå stromaceller og fibroblastar [26]. Det er vist at EP reseptorar på immunceller, endotelceller, og andre komponentar i stroma indirekte kan vere avgjerande for tumorprogresjonen ved å fremje eksempelvis angiogenese og metastasering [31]. Ein kan difor ikkje utelukke at EP reseptorar på stromaceller er involvert i regulering av MMP-2 uttrykk og aktivering i tilknytning til osteosarkom. Ein studie har vist at

aktivering av monocytter induserer uttrykk av MT1-MMP mRNA gjennom ein PGE<sub>2</sub> – cAMP avhengig mekanisme. MT1-MMP er ein viktig aktør for aktivering av MMP-2. MT1-MMP hjå monocytter kan fremje aktivering av MMP-2 produsert både av tumor- og stromaceller, og dermed vere eit kritisk haldepunkt for invasjon og metastasering [26]. Auka nivå av MT1-MMP på tumorceller er signifikant assosiert med dårleg prognose og overleving hjå pasientar med osteosarkom, og kan vere av prognostisk verdi hjå denne pasientgruppa [72]. TIMP-2 er identifisert som hemmar av både MMP-2 og MT1-MMP, men studiar har indikert at den overordna rolla likevel er medverking til MMP-2 aktivering. Ved låge nivå av TIMP-2 vil MMP-2 aktivering bli fremja, medan aktiveringa vert hemma ved høge nivå [7, 46].

Ved initiering av prosjektet forventa ein å sjå oppregulering av MMP-2 uttrykk, og eventuelt auka MMP-2 aktivering etter stimulering av EP reseptorar. Vi ønskte å studere om eventuelt auka aktivering skuldast oppregulering av MT1-MMP hjå tumorcellene, eller endring av TIMP-2 uttrykk. Ettersom forsøka våre ikkje viste effekt på MMP-2 aktivering, venta ein heller ikkje signifikante nivåforskjellar for verken MT1-MMP eller TIMP-2. Ekspresjonen av MT1-MMP eller TIMP-2 vart difor ikkje undersøkt.

#### 4.5 Uttrykk av kollagenasar og matrilysin etter hemming og aktivering av EP reseptorar

Ettersom MMP-1, MMP-7 og MMP-13 er vist å vere sentrale i høve til invasjon og metastasering for fleire krefttypar, ønskte vi å undersøke uttrykingsprofilen for respektive enzym frå pHβ-1 og II-11b celler etter aktivering og hemming av EP reseptorar. Hypotesen var at EP reseptor aktivering ville auke ekspresjon og aktivering av respektive MMPar.

Kollagenasar har kapasitet til å degradere ei rekkje komponentar i beinvev og ECM, og er ofte oppregulert ved kreft. Kollagenase-1 (MMP-1) er ein kritisk aktør i høve modulering av beinvev. Sekresjon av MMP-1 i respons av enkelte beinresorpsjonsfaktorar, som til dømes PGE<sub>2</sub> er vist *in vitro* for animalske og humane osteoblastceller. PGE<sub>2</sub> er i stor grad presentert i beinvev, og er vist å stimulere både beinresorpsjon og beindanning. Ein studie utført på osteoblastceller frå mus viste at PGE<sub>2</sub> stimulerer MMP-1 ekspresjon gjennom aktivering av MMP-1 transkripsjon. Mekanismen var assosiert med auka cAMP nivå, og aktivering av PKA. Aktiveringa synte å vere doseavhengig [73]. Det vart likevel ikkje påvist uttrykk av MMP-1 i våre forsøk, verken ved β-kasein zymografi eller Western blotting. Kasein

zymografi av kondisjonert medium frå celler dyrka på plast viste ingen band utover MMP-2 i nokon av forsøka. Dette var til dels overraskande ettersom kasein er substrat for ei rekkje MMPar.  $\beta$ -kasein er primært substrat for stromelysina; MMP-3, MMP-10, og MMP-11, men eignar seg òg for påvisning av MMP-1, MMP-7, MMP-12, og MMP-13. I tillegg kan gelatinase aktivitet identifiserast dersom enzyma er tilstades i høge konsentrasjonar, men kasein zymografi er generelt mindre sensitiv samanlikna med gelatin zymografi [43, 74]. Eventuelle nivå av MMPar i det kondisjonerte mediet var lågare enn den minste påviselege mengda for kasein zymografi.

Det vart freista å identifisere kollagenase-3 (MMP-13) i det kondisjonerte mediet ved Western blotting. MMP-13 er sentral i høve til beinmodulering og tumorinvasjon. Aktiviteten til MMP-13 er svært potent samanlikna med andre kollagenasar, men fysiologisk uttrykking er føreheldt beinmoduleringsprosessen. Kollagenasen er uttrykt ved ei rekkje kreftformer som brystkreft og chondrosarkom, samt i stromaceller ved fleire andre krefttypar [75]. Vår hypotese var at EP reseptor aktivering ville indusere ekspresjon av MMP-13. Ein dansk studie har synt at S100A4 kan indusere transkripsjon av MMP-13. Studien viste høgare nivå av både MMP-13 mRNA og protein frå endotelceller i mus, etter behandling med S100A4 [76]. For våre forsøk var det difor interessant å sjå om EP aktivering hadde ulik effekt på MMP-13 ekspresjon avhengig av S100A4 nivå. Western blotting var likevel ikkje sensitiv nok til å påvise eventuell MMP-13 ekspresjon. Ettersom det ikkje vart utført oppkonsentrering av mediet kan forsøka ikkje avkrefte ekspresjon av MMP-13. Ein kan heller ikkje avkrefte eventuell relevans av EP reseptorar, eller S100A4 i høve til MMP-13 ekspresjon frå pH $\beta$ -1 eller II-11b celler. Fortynningsrekkjer av kommersiell MMP-13 synte at minste detekterbare mengde ved Western blotting var 50 nanogram (1,33 ng/ml). Dersom MMP-13 var tilstades i det kondisjonerte mediet ved våre forsøk var nivået mindre enn 1,33 ng/ml.

Til sist vart det freista å identifisere uttrykk av matrilysin-1 (MMP-7) ved Western blotting. MMP-7 har kraftig proteolytisk aktivitet overfor eit breitt substratspekter, og er vist å vere sentral i høve til metastasering av kolonkreft og endometriekreft [74, 77]. Det vart ikkje påvist band for MMP-7 ved immunblotting av kondisjonert medium. Forsøk på å identifisere minste detekterbare mengde av MMP-7 for Western blotting lukkast ikkje, men grensa viste å ligge over den høgste testmengda på 50 nanogram.

Kondisjonert medium frå celler inkubert med antagonisten AH6809 og løysemiddelet DMF

viste ved  $\beta$ -kasein zymografi eit ekstra band, ved relativt låg molekylvekt. Bandet var best synleg for kondisjonert medium frå celler inkubert med 1,88 % DMF, og var ikkje synleg ved gelatin zymografi. Observasjonen var reproduserbar, og indikerer at løysemiddelet potensielt fremjar uttrykk av ein ukjent proteinase. Den uidentifiserte proteinasen har evne til å spalte kasein, men ikkje gelatin. Det er likevel vanskeleg å vurdere kva slags proteinase vi ser.

#### 4.6 Celleviabilitet etter aktivering og hemming av EP reseptorar

Ved MTS test vart det observert konsekvent lågare celleviabilitet for II-11b samanlikna med pH $\beta$ -1 cellene. Ettersom S100A4 nivået er det einaste som skil dei to cellelinjene frå einannan, kan det sjå ut som om S100A4 har positiv effekt på celleviabilitet. Etter EP reseptor stimulering vart det likevel ikkje observert effekt på verken celleviabilitet, eller MMP-2 ekspresjon i celler med verken høgt eller lågt S100A4 nivå.

Eit uavklara dilemma er om endringane i totalmengde og aktivert MMP-2, som tidlegare er observert for PGE<sub>2</sub> er ein direkte effekt, eller indirekte skuldast ein anti-apoptotisk respons av PGE<sub>2</sub> (som beskrive i avsnitt 1.3.3). For å undersøke den eigentlege effekten av EP reseptor aktivering vart det målt celleviabilitet ved kvart forsøk. Tidlegare arbeid ved Universitetet i Tromsø har vist at PGE<sub>2</sub> aukar celleviabiliteten for både pH $\beta$ -1 og II-11b celler. Ein ønskte med dette prosjektet å karakterisere kva slags EP reseptorar som primært er involvert i ein eventuell anti-apoptotisk effekt. Det vart likevel ikkje observert trendar for auka overleving med aukande grad av EP stimulering for respektive cellelinjer. Det visuelle inntrykket etter mikroskopering av brønnane samsvarte med MTS resultatata. I mange celletypar har PGE<sub>2</sub> vist å auke celleoverlevinga etter stimulus som normalt fører til apoptose. Ein amerikansk studie indikerer at EP<sub>4</sub> reseptor aktivering med resulterande aktivering av PI<sub>3</sub>Kinase/AKT signalvegen, som regulerer celleoverleving, er ansvarleg for PGE<sub>2</sub> sin anti-apoptotiske effekt i Jurkat celler. Den same anti-apoptotiske effekten vart ikkje reprodusert etter selektiv EP<sub>2</sub> aktivering. Dette indikerer i likskap med andre studiar at EP<sub>4</sub> reseptoren er kopla til signalvegane utover adenyl cyclase [78]. Ein fransk studie har òg synt samanheng mellom auka COX-2 aktivitet og høge PGE<sub>2</sub> nivå, i høve til anti-apoptotisk effekt i humane osteosarkomceller [79]. Ettersom EP aktivering ikkje viste effekt på celleviabilitet i våre forsøk kan det vere relevant å vurdere spesifisiteten til PGE<sub>2</sub> for EP reseptorane. Moglegvis kan PGE<sub>2</sub> binde til andre målprotein, og auke celleviabiliteten gjennom EP uavhengige signalvegane.

Ved hemming av EP reseptorar vart det observert redusert celleviabilitet for både pH $\beta$ -1 og II-11b celler. Ettersom antagonisten vart løyst i DMF vart det undersøkt om løysemiddelet åleine hadde innverknad på celleviabilitet. Det såg ut som at EP reseptor antagonist hadde ein svak negativ effekt på celleviabilitet ved konsentrasjonar frå 0,15 -15  $\mu$ g/ml. I dette konsentrasjonsområdet viste løysemiddelet i mindre grad innverknad på celleviabilitet. Forsøka indikerte at celleviabilitet for pH $\beta$ -1 og II-11b celler til ein viss grad er avhengig av endogen PGE<sub>2</sub> stimulering av EP reseptorar. For den høgste konsentrasjonen av løysemiddelet vart det observert kraftig reduksjon av celleviabilitet. Det vart ikkje observert like sterk reduksjon av celleviabilitet ved eksponering med tilsvarende konsentrasjon av antagonist. Tilsvarende høg konsentrasjon av antagonist såg derimot her ut til å redde cellene frå celledød. Observasjonane var samsvarande for både pH $\beta$ -1 og II-11b celler.

Ettersom PGE<sub>2</sub> har lik stimuleringspotens for alle EP reseptorane, samt tidlegare vist effekt både på MMP-2 ekspresjon og celleviabilitet, vart PGE<sub>2</sub> nytta som positiv kontroll både ved zymografi og MTS test [29]. Zymografi av kondisjonert medium frå celler inkubert med PGE<sub>2</sub> viste ikkje konsistent sterkare band i samanlikning med verken prøvar, eller negativ kontroll slik som forventa. Våre forsøk viste heller ikkje ein klar trend for auka celleviabilitet samanlikna med negativ kontroll, slik som tidlegare vist for PGE<sub>2</sub>. Det er uvisst om dette skuldast endring av kreftcellene sine føresetnadar, ettersom kreftceller endrar eigenskapar svært hyppig, eller om det er forsøksvilkåra som ikkje har vore reproduserbare.

Celleviabilitetsmål i form av MTS test er enkel i bruk fordi celleviabiliteten kan målast i nærver av cellemediet, men metoden er likevel implisert med ei viss usikkerheit. Ein studie indikerer at komponentar frå cellemediet kan påverke omdanninga av MTS reagens til farga farmazen produkt, og dermed affisere absorbansmålinga [80]. Ei rekkje kjemikal har vist både positiv og negativ influens på den respektive fargereaksjonen [81]. Det vart undersøkt om butaprost, sulprostone, misoprostol eller AH6809 i seg sjølv hadde effekt på fargereaksjonen, men ingen av stoffa viste innverknad på absorbansmålingane. Fråtrekk av bakgrunnsstøy forårsaka av agonist eller antagonist var difor ikkje naudsynt.

## 5 Konklusjon og eventuelle framtidige prosjekt

Det er i denne oppgåva påvist at osteosarkomcellelinjene pH $\beta$ -1 og II-11b uttrykkjer alle dei fire EP reseptorane. For å stadfeste kvantitative forskjellar i reseptorstatus mellom dei to cellelinjene må det utførast fleire parallellar. Fleire rapportar indikerer at enkelte kreftceller opplever auka sensitivitet for PGE<sub>2</sub> assosierte effektar, ved at PGE<sub>2</sub> direkte stimulerer EP reseptor uttrykking [27]. Det kan ved eventuelle framtidige prosjekt vere interessant å sjå innverknaden av EP stimulering i høve til EP reseptor uttrykking.

Det vart i denne oppgåva ikkje avdekka endringar av MMP-2 ekspresjon eller aktivering, etter hemming og stimulering av EP reseptorar i celler med verken høgt, eller lågt S100A4 nivå. Det kan tenkjast at cellene er avhengig av kostimulering for å svare på EP reseptor aktivering. Ved tidlegare forsøk er det synt ulik respons av PGE<sub>2</sub> med omsyn på MMP-2 uttrykk og aktivering avhengig av dyrkingsvilkår. For framtidige prosjekt kan det vere av interesse å studere effekten av EP reseptor hemming og stimulering ved dyrking på kollagen, laminin eller fibronektin. Det kan òg vere interessant å studere nivåendring av intracellulært kalsium og cAMP, som resultat av EP reseptor hemming og stimulering ved ulike dyrkingsvilkår.

$\beta$ -kasein zymografi og Western blotting var ikkje sensitiv nok til å identifisere eventuelle nivå av MMP-1, MMP-7 eller MMP-13. For eventuelle framtidige prosjekt kan det vere av interesse å måle nivået av respektive enzym etter oppkonsentrering av det kondisjonerte mediet.



## 6 Referansar

- [1] [http://www.kreftregisteret.no/forekomst\\_og\\_overlevelse\\_2004/kreft\\_i\\_norge\\_2004](http://www.kreftregisteret.no/forekomst_og_overlevelse_2004/kreft_i_norge_2004) web.pdf.
- [2] <http://www.ssb.no/emner/03/01/10/dodsarsak/>.
- [3] <http://www.ssb.no/emner/03/01/10/dodsarsak/tab-2006-06-01-01.html>.
- [4] H.P. Rang MMD, J.M. Ritter, P.K. Moore. *Pharmacology*. 2003:693-6.
- [5] van Kempen LCLCL, de Visser KEKE, Coussens LMLM. Inflammation, proteases and cancer. *European journal of cancer* 2006;42:728-34.
- [6] Joseph RRR, Yazer EE, Hanakawa YY, Stadnyk AAW. Prostaglandins and activation of AC/cAMP prevents anoikis in IEC-18. *Apoptosis* 2005;10:1221-33.
- [7] Egeblad MM, Werb ZZ. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews Cancer* 2002;2:161-74.
- [8] Fidler IJJ. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 2002;70:498-505.
- [9] Sierra AA. Metastases and their microenvironments: linking pathogenesis and therapy. *Drug resistance updates* 2005;8:247-57.
- [10] Yoshizaki TT, Sato HH, Furukawa MM. Recent advances in the regulation of matrix metalloproteinase 2 activation: from basic research to clinical implication (Review). *Oncology reports* 2002;9:607-11.
- [11] Liotta LLA, Kohn EEC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411:375-9.
- [12] Fingleton BB. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Frontiers in bioscience* 2006;11:479-91.
- [13] Stetler-Stevenson WWG. The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surgical oncology clinics of North America* 2001;10:383-92, x.
- [14] Kumar V. CR, and Robbins S. *Basic pathology*. 1997.
- [15] Plate KKH, Breier GG, Risau WW. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain pathology* 1994;4:207-18.
- [16] Webb CCP, Vande Woude GGF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *Journal of neuro-oncology* 2000;50:71-87.
- [17] Rüegg CC, Dormond OO, Mariotti AA. Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 2004;1654:51-67.
- [18] Cavallaro UU, Christofori GG. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *Journal of neuro-oncology* 2000;50:63-70.
- [19] Ortega NN, Behonick DD, Stickens DD, Werb ZZ. How proteases regulate bone morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;995:109-16.
- [20] Philip MM, Rowley DADA, Schreiber HH. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in cancer biology* 2004;14:433-9.
- [21] Coussens LMLM, Werb ZZ. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-7.
- [22] Kiessling RR, Wasserman KK, Horiguchi SS, Kono KK, Sjöberg JJ, Pisa PP, et al. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer immunology, immunotherapy* 1999;48:353-62.
- [23] Hata ANAN, Breyer RMRM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & therapeutics* 2004;103:147-66.
- [24] Timoshenko AVAV, Xu GG, Chakrabarti SS, Lala PKPK, Chakraborty CC. Role of

- prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Experimental cell research* 2003;289:265-74.
- [25] H.P. Rang MMD, J.M. Ritter, P.K. Moore. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, 2003. p. 232-5.
- [26] Shankavaram UUT, Lai WWC, Netzel-Arnett SS, Mangan PPR, Ardans JJA, Caterina NN, et al. Monocyte membrane type 1-matrix metalloproteinase. Prostaglandin-dependent regulation and role in metalloproteinase-2 activation. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:19027-32.
- [27] Dohadwala MM, Batra RKRK, Luo JJ, Lin YY, Krysan KK, Pold MM, et al. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:50828-33.
- [28] Wang DD, Dubois RRN. Prostaglandins and cancer. *Gut* 2006;55:115-22.
- [29] Narumiya SS, Sugimoto YY, Ushikubi FF. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological reviews* 1999;79:1193-226.
- [30] Clohisy JJC, Connolly TTJ, Bergman KKD, Quinn CCO, Partridge NNC. Prostanoid-induced expression of matrix metalloproteinase-1 messenger ribonucleic acid in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1994;135:1447-54.
- [31] Fulton AMAM, Ma XX, Kundu NN. Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer research* 2006;66:9794-7.
- [32] Pai RR, Soreghan BB, Szabo ILIL, Pavelka MM, Baatar DD, Tarnawski ASAS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nature medicine* 2002;8:289-93.
- [33] Rao CVCV, Reddy BSBS. NSAIDs and chemoprevention. *Current cancer drug targets* 2004;4:29-42.
- [34] Steinbach GG, Lynch PPM, Phillips RRK, Wallace MMH, Hawk EE, Gordon GGB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *The New England journal of medicine* 2000;342:1946-52.
- [35] Solomon SDS. Cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Current opinion in cardiology* 2006;21:613-7.
- [36] Alberts B. ea. *Molecular biology of the cell*, 2002.
- [37] Bosman FTFT, Stamenkovic II. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of pathology* 2003;200:423-8.
- [38] Stamenkovic II. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology* 2003;200:448-64.
- [39] Zigrino PP, Löffek SS, Mauch CC. Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* 2005;87:321-8.
- [40] Kalluri RR. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer* 2003;3:422-33.
- [41] Brinckerhoff CECE, Matrisian LMLM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature reviews Molecular cell biology* 2002;3:207-14.
- [42] Lynch CCCC, Matrisian LMLM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002;70:561-73.
- [43] Snoek-van Beurden PAPAM, Von den Hoff JWJW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005;38:73-83.
- [44] Visse RR, Nagase HH. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 2003;92:827-39.
- [45] Bjørnland KK, Flatmark KK, Pettersen SS, Aaasen AAOA, Fodstad OO, Maelandsmo GMGM. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *The Journal of surgical research* 2005;127:151-6.
- [46] Loennechen TT, Mathisen BB, Hansen JJ, Lindstad RIRI, El-Gewely SASA,

- Andersen KK, et al. Colchicine induces membrane-associated activation of matrix metalloproteinase-2 in osteosarcoma cells in an S100A4-independent manner. *Biochemical pharmacology* 2003;66:2341-53.
- [47] Rhee JSJ-S, Diaz RR, Korets LL, Hodgson JGJG, Coussens LMLM. TIMP-1 alters susceptibility to carcinogenesis. *Cancer research* 2004;64:952-61.
- [48] Coussens LMLM, Fingleton BB, Matrisian LMLM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002;295:2387-92.
- [49] Mazzucchelli LL. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *The American journal of pathology* 2002;160:7-13.
- [50] Helfman DDM, Kim EEJ, Lukanidin EE, Grigorian MM. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *The British journal of cancer* 2005;92:1955-8.
- [51] Garrett SCSC, Varney KMKM, Weber DJDJ, Bresnick ARAR. S100A4, a mediator of metastasis. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:677-80.
- [52] Kimura KK, Endo YY, Yonemura YY, Heizmann CCW, Schafer BBW, Watanabe YY, et al. Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *International journal of oncology* 2000;16:1125-31.
- [53] Klein MJMJ, Siegal GPGP. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *American journal of clinical pathology* 2006;125:555-81.
- [54] Herfindal ET, Gourley DR. *Textbook of Therapeutics. Drug and Disease Management*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins 2000.
- [55] Dickens DSDS, Cripe TPTP. Effect of combined cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase inhibition on human sarcoma xenografts. *Journal of pediatric hematology/oncology* 2003;25:709-14.
- [56] Tsujii MM, Kawano SS, DuBois RRN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:3336-40.
- [57] Ito HH, Duxbury MM, Benoit EE, Clancy TETE, Zinner MJMJ, Ashley SWSW, et al. Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2. *Cancer research* 2004;64:7439-46.
- [58] Nygårdsvoll M. *Samspillet mellom proteiner i ekstracellulær matriks og PGE2 i regulering av kreftcellers uttrykk av matriks metalloproteinaser og deres hemmere*. Univerisitetet i Tromsø, 2006.
- [59] Ljones H. *Samspillet mellom ekstracellulære matriks proteiner og signalmolekyler i reguleringen av kreftcellers uttrykk og aktivering av matriks metalloproteinaser*. Univerisitetet i Tromsø, 2005.
- [60] Maelandsmo GGM, Hovig EE, Skrede MM, Engebraaten OO, Flørenes VVA, Myklebost OO, et al. Reversal of the in vivo metastatic phenotype of human tumor cells by an anti-CAPL (mts1) ribozyme. *Cancer research* 1996;56:5490-8.
- [61] Blaschke VV, Jungermann KK, Püschel GGP. Exclusive expression of the Gs-linked prostaglandin E2 receptor subtype 4 mRNA in mononuclear Jurkat and KM-3 cells and coexpression of subtype 4 and 2 mRNA in U-937 cells. *FEBS letters* 1996;394:39-43.
- [62] Kiriya MM, Ushikubi FF, Kobayashi TT, Hirata MM, Sugimoto YY, Narumiya SS. Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *British journal of pharmacology* 1997;122:217-24.
- [63] Mosmann TT. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983;65:55-63.
- [64] Naruse TT, Nishida YY, Hosono KK, Ishiguro NN. Meloxicam inhibits osteosarcoma growth, invasiveness and metastasis by COX-2-dependent and independent routes.

- Carcinogenesis 2006;27:584-92.
- [65] Kashfi KK, Rigas BB. Is COX-2 a 'collateral' target in cancer prevention? *Biochemical society transactions* 2005;33:724-7.
- [66] Smyth EEM, Austin SSC, Reilly MMP, FitzGerald GGA. Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:32037-45.
- [67] Morath RR, Klein TT, Seyberth HHW, Nüsing RRM. Immunolocalization of the four prostaglandin E2 receptor proteins EP1, EP2, EP3, and EP4 in human kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999;10:1851-60.
- [68] Leppert DD, Hauser SSL, Kishiyama JIL, An SS, Zeng LL, Goetzl EEJ. Stimulation of matrix metalloproteinase-dependent migration of T cells by eicosanoids. *The FASEB journal* 1995;9:1473-81.
- [69] Takahashi YY, Kawahara FF, Noguchi MM, Miwa KK, Sato HH, Seiki MM, et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 in human breast cancer cells overexpressing cyclooxygenase-1 or -2. *FEBS letters* 1999;460:145-8.
- [70] Rozic JJG, Chakraborty CC, Lala PPK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *International journal of cancer* 2001;93:497-506.
- [71] Engbring JAJA, Kleinman HKHK. The basement membrane matrix in malignancy. *The Journal of pathology* 2003;200:465-70.
- [72] Uchibori MM, Nishida YY, Nagasaka TT, Yamada YY, Nakanishi KK, Ishiguro NN. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma. *International journal of oncology* 2006;28:33-42.
- [73] Kim CHC-H, Park YGY-G, Noh SHS-H, Kim YKY-K. PGE2 induces the gene expression of bone matrix metalloproteinase-1 in mouse osteoblasts by cAMP-PKA signaling pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2005;37:375-85.
- [74] Rath TT, Roderfeld MM, Graf JJ, Wagner SS, Vehr AKA-K, Dietrich CC, et al. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflammatory bowel diseases* 2006;12:1025-35.
- [75] Leeman MFMF, Curran SS, Murray GIGI. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Critical reviews in biochemistry & molecular biology* 2002;37:149-66.
- [76] Schmidt-Hansen BB, Ornås DD, Grigorian MM, Klingelhöfer JJ, Tulchinsky EE, Lukanidin EE, et al. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004;23:5487-95.
- [77] Shiomi TT, Okada YY. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer and metastasis reviews* 2003;22:145-52.
- [78] George RJRJ, Sturmoski MAMA, Anant SS, Houchen CWCW. EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2007;83:112-20.
- [79] Moalic SS, Liagre BB, Le Bail JJC, Beneytout JIL. Dose-dependent modulation of apoptosis and cyclooxygenase-2 expression in human 1547 osteosarcoma cells by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *International journal of oncology* 2001;18:533-40.
- [80] Huang KTKT, Chen YHYH, Walker AMAM. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *Biotechniques* 2004;37:406-2.
- [81] Malich GG, Markovic BB, Winder CC. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 1997;124:179-92.