

ROLLEN TIL UROKINASE PLASMINOGEN  
AKTIVATOR RESEPTOREN (uPAR) FOR UTTRYKK  
AV MOLEKYLER INVOLVERT I CELLE ADHESJON,  
MIGRASJON OG INVASJON.

Av: Stine Haustreis  
Mai 2010



Veiledere:  
Førsteamanuensis Gunbjørg Svineng, IMB  
Førsteamanuensis Elisabeth Sundkvist, IFA

FORKORTELSER .....	3
Forord .....	4
SAMMENDRAG .....	6
1 INTRODUKSJON .....	7
1.1 ORALKREFT: .....	7
Epidemiologi: .....	7
Risikofaktorer i oralkreft .....	8
1.2 Ekstrasellulær matriks (ECM) .....	11
Komponenter i ECM: .....	11
1.3 Invasiv vekst og metastasering i oralkreft: .....	13
1.4 Urokinase plasminogen activator(uPA) .....	15
1.5 urokinase plasminogen aktivator reseptor (uPAR) .....	16
uPAR ligander: .....	17
1.6 uPAR og uPA i plasminogensystemet .....	17
1.7 uPAR og intracellulær signalering .....	19
1.8 uPAR i oralkreft: .....	21
1.9 Epithelial-mesenchymal transition (EMT) og E-cadherin .....	22
1.10 FORMÅLET .....	22
2. MATERIALER OG METODER .....	23
2.1 Materialer .....	23
2.2 METODER .....	28
2.2.1 DYRKING AV CELLER .....	28
2.2.2 WESTERNBLOTT .....	29
2.2.3 RNA ISOLERING .....	34
2.2.4 Kvantitering av RNA .....	36
2.2.5 Konvertering av mRNA til cDNA .....	38
2.2.6 Kvantitativ Real time PCR (RT- qPCR) .....	40
3. Resultat .....	45
3.1 Verifisering av uPAR på Westernblott .....	45
3.2 Isolering og Kvantitering av RNA .....	47
3.3 Analyser av uttrykket av utvalgte gener i AT-84 klonene ved RT-qPCR .....	49
3.3.1 Enkeltgener på RT-qPCR .....	49
3.4. WESTERNBLOTT PÅ E-CADHERIN .....	57
3.5 RT <sup>2</sup> Profiler .....	58
4. Diskusjon .....	62
4.1 verifisering av uPAR på westernblott .....	62
4.2 uPAR og Aktivering av plasminogensystemet .....	63
4.3 E-cadherin og EMT .....	64
4.4 uPAR og RT <sup>2</sup> profiler .....	65
5 Konklusjon .....	66
6. Referanser .....	67
7 Appendiks .....	70
7.2 RT <sup>2</sup> profiler .....	72

## **FORKORTELSER**

uPAR: Urokinase plasminogen activator

HPV: Human papillomavirus (HPV)

ECM: Ekstracellulær matriks.

MAPK: RAS-mitogen-activated protein kinase

FAK: Focal adhesion kinase

GPCR: G protein koblede reseptor

Lys: Lysine

Ile: Isoleucine

GFD: growth factor domene

MMP: matrix metalloproteinaser.

HIF- 1 $\alpha$ : Hypoxia inducible Factor – 1 $\alpha$ .

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VN: vitronectin

EMT: Epithelial-mesenchymal transition

Tyr: Tyrosin

kDa: kilodalton

tPA: tissue plasminogen activator

PBS: Phosphate buffered saline

## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved universitet i Tromsø i perioden oktober 2009 til mai 2010. Det praktiske arbeidet i oppgaven ble utført ved Tumorbiologisk forskningsgruppe under førsteammunensis Gunbjørg Svineng som hovedveileder. Førsteammunensis Elisabet sundkvist ved avdeling for farmakologi instistutt for Tromsø har vært intern veileder.

Først og fremst vil jeg takke Gunbjørg Svineng for god veiledning både gjennom det praktiske arbeidet på lab og under skriveprosessen. Du har vært støttende og oppmuntrende hele veien, og forståelsesfull. Tusen takk for god veiledning og støtte. Jeg vil også takke Elisabeth Sundkvist for god veiledning under skriveprosessen.

Jeg vil også takke stipendiat Synnøve Magnussen som har hjulpet meg mye på lab og svart på mange spørsmål.

I will also like to thank Chandra, it's been a pleasure to work with you and thank you for being patient.

Takk til alle på på tumor biologisk avdeling for og ha tatt godt i mot meg.

Til slutt vil jeg takke Stine og André for noen herlige timer på lesesalen. Har hatt mange gode latter. Jeg vil spesielt takke Stine for mange gode samtaler, der jeg har fått ut mye frustrasjon til tider.

Til slutt vil jeg takke familien som har hørt på mye skolesnakk og frustrasjoner alle disse fem årene.

Tromsø Mai 2010  
Stine-Mari Haustreis



## SAMMENDRAG

Urokinase-type-plasminogen activator reseptor (uPAR) er funnet overuttrykt i organer som har omfattende remodulering av vevet. uPAR har flere ligander, blant annet serine proteasen urokinase plasminogen aktivator uPA, ekstracellulær matrix proteine vitronectin og integriner. uPA aktiveres ved binding til uPAR. Aktiv uPA aktiverer ved binding til uPAR og kan deretter aktivere plasmin som kan degradere en rekke eCM molekyler direkte og indirekte ved å binde ECM komponenter og indirekte ved å aktivere MMPer. uPAR fungerer ikke bare som en reseptor for proteaser. Ved å binde integriner påvirker den også cellers migrasjon, adhesjon, differensiering og proliferasjon gjennom intracellulær signalering. Fordi uPAR har disse egenskapene er den vist å være en viktig komponent ved invasiv kreft og metastasering i en rekke kreftformer.

I denne oppgaven var målet å studere om overuttrykk av uPAR i oralekreftceller påvirket uttrykket i utvalgte gener og proteiner som er involvert i celle adhesjon, migrasjon og invasjon. Det ble først verifisert at klonene AT-84-EV1, AT84-EV3, AT-84-EV4, AT-84-uPARmedium og AT-84 uPARhøy har ulik mengde uPAR på proteinnivå ved Western blotting og på RNA nivå ved RT-qPCR. Deretter ble RT-qPCR brukt for å avdekke om overuttrykk av uPAR i klonene hadde påvirket uttrykket av et utvalg av gener. I tillegg ble det gjort en screen ved bruk av en RT-qPCR basert metode kalt RT<sup>2</sup>-profiler der mRNA nivået til 84 gener knyttet til kreft ble analysert.

Resultatet viser at overuttrykk av uPAR og E-cadherin resulterte i en nedregulering av MMP-9, mens nivåene av uPA, PAI-1, S100A4 og MMP-2 ikke så ut til å være endret. Nedreguleringen av E-cadherin ble også verifisert på proteinnivå ved Westernblot. I tillegg ble det funnet at overuttrykk av uPAR førte til en .

# 1 INTRODUKSJON

## 1.1 ORALKREFT:

Plateepitelkarsinom er en ondartet kreftform som utvikles fra plateepitelceller i slimhinner eller hud. Plateepitelkarsinom kan forekomme i en rekke ulike organer slik som munnhule, spiserør, hud, lunger og livmor. 90 % av de orale krefttilfellene er forårsaket av plateepitelkarsinom [1]. I tillegg forekommer det sjeldent lymfom og melanoma [2, 3].

### Epidemiologi:

Oralkreft og kreft i pharynx er til sammen den 6. mest vanlige kreftformen i verden, og begge er et voksende problem i mange land. Globalt er innsidens på oralkreft rundt 300 000 nye tilfeller per år. Høyest innsidens finner man blant annet i deler av Nord Frankrike, øst Europa og deler av sør Amerika og sør-øst Asia. I Norge har man registrert ca 450 nye tilfeller per år av oralkreft i 2009. Kreftstatistikken viser at oralkreft er vanligere hos menn enn hos kvinner i de fleste land i verden [1, 4]. Risikoen for å utvikle oralkreft økes med alderen. Omtrent 6 % av tilfellene er personer med en alder under 45 år. Man tror noe av forklaringen kan være en sammenheng mellom daglig forbruket av røyk og alkohol over tid [5].

Oral plateepitelkarsinom kan utvikle seg i flere områder av munnhulen (Figur 1.1), men noen lokalisasjoner er vanligere enn andre. I den vestlige verden finner man 50 % av oralt plateepitelkarsinom i munngulv og tunge. Oralt plateepitelkarsinom/oralkreft karakteriseres ved hvite og røde åpne sår og rifter, hevelse og nummenhet. Smerte er det vanligste symptomet i oralkreft, men oppstår vanligvis ikke før sår og rifter er blitt store. På grunn av få symptomer er det sjeldent at oralkreft oppdages i et tidlig stadium [6].

For oralkreft er overlevelse etter 5 år omtrent 50 %. Unntaket er kreft i leppene, der 90 % av pasientene overlever 5 år.

Generelt er prognosen for oralkreft avhengig av alvorlighetsgraden av sykdommen som bestemmes av størrelsen på tumoren, eventuelle metastaser til lokale lymfekjertler og fjern metastaser

### **Risikofaktorer i oralkreft:**

Oralt plateepitelkarsinom oppstår i orale keratinocytter, forårsaket av DNA mutasjoner. Mutasjonene kan både være spontan eller forårsaket av kjemiske, fysiske eller mikrobielle mutagene faktorer. [7] Mutasjonene i genomet kan føre til at en normal keratinocyt utvikles til en pre-malign og videre til en potensielt malign keratinocyt. Til slutt vil man få utviklet kreft med lokal invasjon og mulige metastaser til lymfekjertler, bein, hjerne, lever og andre organer [7].

De forskjellige risikofaktorene ser ut til virke ved å øke mutasjonsraten i oralt plateepitel [8]. Det er spesielt livsstilsfaktorer som tobakk og alkohol som har vist seg å være av de viktigste årsakene i oralkreft.

Det finnes flere tobakkstyper: røyk, skrå og snus. Den viktigste faktoren som har størst sjanse for å gi oralkreft er røyk. Man tror at det er en sammenheng mellom varigheten av røykingen det vil si antall røyk/dag og utvikling av oralkreft [5, 8].

Snusforbruket er økende i mange land og gir økt risiko for oralkreft. Risikoen har vist seg å være lavere for snus enn sigarettøyk, men er høyere enn for de som ikke bruker tobakk [8, 9].

Alkohol er også assosiert med økt risiko for oralkreft, men også her kan det tyde på at det er doseavhengig [10]. I tillegg til tobakk og alkohol er det også andre risikofaktorer som har vist seg å ha betydning for oralkreft. Blant annet betelnøtt, også kalt areca. Betelnøtt inneholder alkaloider, der det dominante alkaloidet er arecoline, som er en naturlig kolinerg agonist i likhet med nikotin. Alkaloidene interagerer med muscarin reseptorene og påvirker nervesystemets funksjoner via acetylcholine som fører til flere effekter som for eksempel stimulering av spytt, lacrimal(tåre), gastriske og intestinale kjertler og mukosale celler av luftveiene [10].

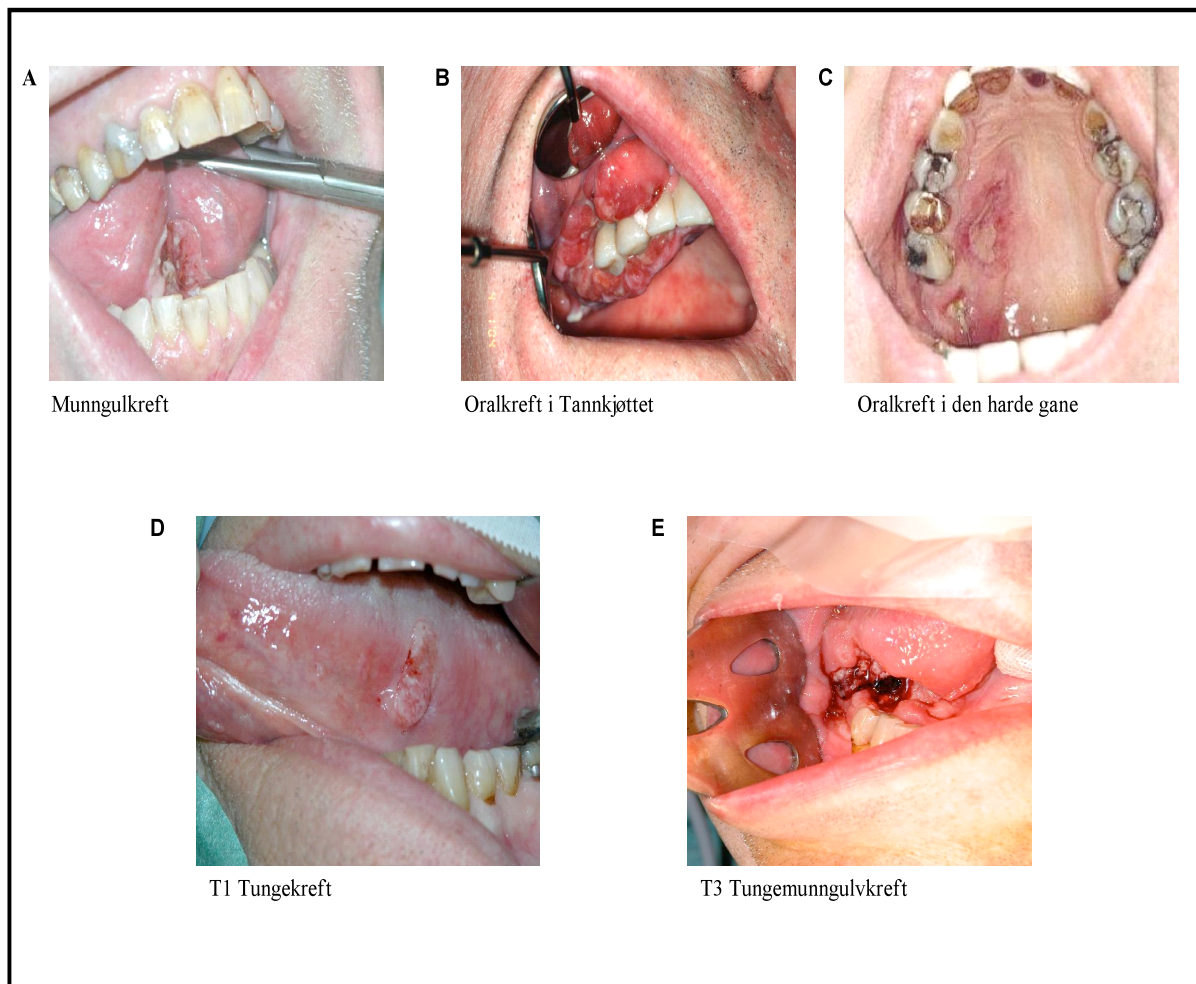


Betel nøtter er blitt klassifisert som et oralt karsinogen av IARC (International Agency for reasearch on Cancer) og betel brukes i mange land, blant annet India, Nepal, Sri Lanka og Nord Amerika [7, 8]

I tillegg til betel er også tygging av khat assosiert med oralkreft. Khattygging er vanlig i sør-vest Asia, øst Afrika, Yemen og Etiopia. Khat er en plante som inneholder efedrinlignende forbindelser som gir sympatomimetiske og psykotrofiske effekter. Den mest aktive kjemiske ingrediensen er cathinone som har lignende virkning som amfetamin og stimulerer til frigjøring av neurotransmittorer i nervesystemet [11]. Khat tygges vanligvis fersk for å oppnå en høyere stimulerende effekt og involverer lagring av en mengde av tygde blader i kinnet vanligvis i perioder på 10 timer, mens nye doser tilføres etter 2-3 timer. Kinnet, tannkjøttet og tunga er de stedene som kommer i direkte kontakt med khat. Studier har vist at oralkreft utvikles på steder hvor disse tygde bladene oppbevares og kommet i kontakt med slimhinnen [11, 12]. Det er uansett få artikler som har bekreftet en sammenheng mellom khat og oralkreft, og det er derfor et felt det bør forskes videre på [11, 12].

Virus har også vist seg å ha betydning for utvikling av oral plateepitelkarsinom, da spesielt Human papillomavirus (HPV). HPV viruset kommer seg i gjennom sprekker og sår i epiteloverflaten og infiserer basallaget av epitelcellene og oppholder seg deretter så i kjernen av de infiserte cellene der HPV-DNA replikeres og viruset formere seg. I hud og øvre luftveier er symptomer på infeksjonen ofte presentert som vorter eller benigne tumorer [13]. HPV kan karakteriseres inn i to kreftfremkallende grupper. HPV-6 og -11 tilhører gruppen med lav-risiko og er mest assosiert med genitale vorter. HPV-16 og -18 tilhører gruppen som predominerer i invasiv angiogenital krefttyper. HPV-16 er den subtypen som er mest assosiert med oralkreft. Plateepitelkarsinom forårsaket av HPV forekommer oftest i tunge og mandler [14]. Til forskjell fra de andre risikofaktorene for å utvikle oralt plateepitelkarsinom som røyk og alkohol, er risikofaktoren for HPV-assosiert oralt plateepitelkarsinom relatert til seksuell historikk. Risikoen for å utvikle oralt plateepitelkarsinom forårsaket av HPV øker med antall partnere og er assosisert med både med oral og vaginalt [13].

HPV positive krefttyper ser ut til å ha bedre prognose enn HPV- negative. Årsaken er fortsatt uklar, men studier har vist at personer med HPV positive tumorer responderer bedre på strålebehandling. I tillegg er ikke pasienter med HPV-.kreft assosiert med de vanlige risikofaktorene som røyk og alkohol og har derfor redusert risiko for å utvikle sekundær primære tumorer[13].



**Figur 1.1** A-E viser ulike lokalisasjoner av oralkreft. Bildene er skaffet av Olav Jetlund, Rikshospitalet og Oddveig Rikardsen universitetssykehusets sykehus i Tromsø med tillatelse

## 1.2 Ekstracellulær matriks (ECM)

Ekstracellulær matriks er et nettverk av proteiner og polysakkarider i vevet rundt cellene. ECM er dynamisk og remoduleres konstant og inkluderer Interstitial matriks og basalmembraner.

Interstitial matriks finner man i rommene mellom celler i sammensatt vev og mellom epitel, vaskulær og glatt muskulatur. Den syntetiseres av mesenchymale celler som fibroblaster og består hovedsakelig av kollagener, proteoglycaner og glycoproteiner. Basalmembraner skiller underliggende vev fra epitelceller, endotelceller og glatt muskulatur. Disse cellene bindes direkte til basalmembranen og syntetiseres sammen med de mesenchymale cellene de komponentene membranen består av og som hovedsakelig er kollagen IV og adhesive glykoproteiner[15].

### **Komponenter i ECM:**

Det er tre grunnleggende komponenter i ECM. Fibrøse proteiner som tilfører strekkbarhet til vevet, hydrofile geler som tilfører elastisitet og smøring, og adhesive glycoproteiner som knytter matriksmolekylene til hverandre og til omkringliggende celler.

**Kollagen:** Kollagen er fibrøse proteiner som tilfører strekkbarhet i vevet. Disse proteinene består av tre separate peptidkjeder tvunnet sammen til en trippel helix. Det finnes 18 forskjellige kollagentyper. Kollagen I, III og V finnes i interstitial matrix og danner fibriller ved kryssbinding av trippelhelix. Kollagen IV danner fibriller og er en komponent i basalmembranen.

**Elastin:** Gir i motsetning til kollagen vevet mulighet til å trekke seg tilbake og returnerer til sin grunnleggende struktur etter fysisk påkjenning.

**Proteoglycaner:** Disse molekylene lager hydrofile geler som tilfører vevet elastisitet og smøring. De består av lange polysakkarider kalt glycosaminoglycaner. Proteoglykaner fungerer også som reservoarer for vekstfaktorer i ECM, som frigjøres ved nedbrytning av ECM. Proteoglykaner kan også være cellemembran proteiner og modulerer cellevekst og differensiering.

**Adhesive glykoproteiner og integriner:** Glykoproteinenes rolle er å feste ECM-komponenter sammen, i tillegg til å feste ECM til celler via overflate integriner. De adhesive glycoproteinene inkluderer fibronectin og laminin. Fibronectin syntetiseres av fibroblaster, monocytter og endotelceller. Den har spesifikke domener som kan kryssbinde ECM-komponenter som kollagen, fibrin, og proteoglycaner. Laminin er det vanligste glykoproteinet i basalmembranen og medierer binding mellom celler og ECM. Integriner på celleoverflaten binder tripeptidet arginine-glycine-aspartic acid (RGD) fibronectin og tilsvarende sekvenser på laminin [15].

**Vitronectin(VN):** Vitronectin er et adhesivt ECM glykoprotein, som normalt syntetiseres i leveren og sirkulerer i blodet. I tillegg er VN funnet uttrykt i flere vev, spesielt ved heling av sår [16]. Vitronectin intereagerer med forskjellige reseptorsystemer, som urokinase reseptor og integriner. VN og integriner som binder vitronectin er funnet i vev med inflammasjon og angiogenese. Vitronectin sirkulerer i blodet som en monomer, men omdannes til en multimer om den frigjøres i et vev med andre ECM komponenter. Vitronectin er blant annet funnet i løst sammensatt vev i organer som blodkar, lymfekjertler og i stroma av lymfatisk vev. Vitronectin er vist å være delaktig i ulike fysiologiske og patologiske prosesser som hemostase, angiogenese, reumatoid artritt og tumor celle invasjon [17].

Mange fysiologiske prosesser er avhengig av kontrollert degradering av ekstracellulær matrix, blant annet under sår healing og vevsremodulering i embryogenese. Ukontrollert degradering av ekstracellulær matrix bidrar til den patologiske effekten av degenerert vev, som f.eks ved emfysem, artritt, tumor celle invasjon og metastasering [15].

### **Matrix metalloproteinaser (MMP)**

MMPer er proteaser som degraderer ECM komponenter som fibronectin, tenascin, laminin, collagener og proteoglykaner. MT1-MMP er en av seks MMP-typer som er membranbundet, og kan kløyve celleadhesjonsmolekyler som cadheriner og integriner, reseptorer for vekstfaktorer og kjemokiner. De kan også kløyve inaktive pro-enzymmer som MMP-2 til aktive enzymmer. De andre gruppene av MMPene er ikke membranbundet

og fungerer som enzymer i rommene mellom cellene. MMPene skilles ut som inaktive pro-enzymmer som aktiveres ved at pro-domenet kuttes av. Vevs inhibitorer av metalloproteinases (TIMPs) binder direkte på det aktive setet av MMPene, og inhiberer deres aktivitet. Vekstfaktorer, cytokiner og ECM kontrollerer produksjon og aktivering av MMPer, og begrenser dermed aktiviteten til MMPene. Tumorceller uttrykker en rekke MMPer som gjør det mulig for tumorceller å bryte gjennom basalmembraner og invadere vev. MMP-9 uttrykkes av makrofager, neutrofiler og fibroblaster i den invasive fronten av tumorene. MMP-9 uttrykket i disse frontene korrelerer positivt med primærtumorens mulighet til å metastasere. Dette tyder på at MMPene kan påvirke flere trinn av invasjon-metastase kaskaden, som lokal invasjon av primær tumor i stroma, intravasjon, og ekstravasjon[18, 19].

### ***1.3 Invasiv vekst og metastasering i oralkreft:***

Livstruende kreft oppstår vanligvis i epitelvev. Denne kreftypen kalles karsinoma. Karsinoma begynner på epitelsiden av basalmembranen og er benign så lenge cellene som dannes forblir på epitelsiden. Ettersom karsinoma vokser vil den til slutt kunne bryte ned epitellaget, basalmembranen og ECM og kreftcellene kan da invadere nærliggende stroma, som er vevet rundt tumorcellene. En prosess kalt invasjon. Når tumoren får en viss størrelse vil karsinomacellene ofte stimulere angionese, som er dannelse av nye blodkar, ved å aktivere og sende ut angiogenetiske faktorer. Tilgang til kapillærer gir tumorcellene bedre tilgang til næringstoffene og oksygenet som er i blodet. I tillegg kan de invasive kreftcellene bevege seg igjennom karveggen og inn til lumen av blod og lymfekar. Deretter kan individuelle celler transporteres med blodet eller lymfe til andre områder i kroppen. Dette trinnet kalles extravasation. Kreftcellene kan ekstravasere ved å proliferere i lumen og danne en liten tumor som vokser og ødelegger nærliggende karvegger. Kreftcellene entrer til slutt parenkyma. Der vil de begynne å kolonisere og forme nye tumorer[18].

For at tumorinvasjon skal skje er det viktig at cellene kan bevege seg og at det er en koordinert balanse mellom celleadhesjonsreseptorer og ECM [20].

Oralt plateepitelkarsinom er som tidligere nevnt den vanligste tumorformen i oralkreft. Karsinoma er karakterisert ved invasjon av malignante celler inn til underliggende sammensatte vev og migrasjon av malignante celler som danner fjerne metastaser [21]. På grunn av lymfatisk drenering fra munnhulen og spredning til regionale lymfekjertler er oralt plateepitelkarsinom i høy grad en invasiv og metastatisk kreft. Omtrent 30 % av pasientene med munnhulekreft har utviklet metastaser til lymfekjertelene.

Plateepitelkarsinom i tunga er en av de mest prevalente tumorene i oralkreft og metastasering til lymfeknuter i hals ser ut til å skje oftere fra oralt plateepitelkarsinom enn fra andre primære tumorer i munnhule [22, 23]. Omtrent 40 % av pasientene med tungekraft har metastaser til hals som også er en av de viktigste prognostiske faktorene i oral tungekarsinom [23].

Til tross for at man vet lite om signalveiene som er involvert i invasiv vekst av oralt plateepitelkarsinom viser studier at både ECM og adhesjonsmolekyler er involvert i invasiv oralkreft [20, 21]. ECM remodeleres som nevnt tidligere hele tiden. Nedbrytning av ECM skjer blant annet ved proteaser som matriks metalloproteinaser og serine proteaser, som uPA og plasmin. Forhøyede verdier av MMP er funnet oppdaget i mange maligne tumorer, inkludert oralt plateepitelkarsinom [21]. Nye ECM molekyler produseres av cellene lokalt og spesielt fibroblaster produserer store mengder ECM molekyler. Tumorceller og stromale celler som fibroblaster kan påvirke hverandre slik at den nye ECMen fremmer migrasjon og invasjon [24]

Celleadhesjonsmolekyler uttrykkes på alle cellers overflater, hvor de binder ECM molekyler. De fungerer som signaleringsmolekyler og regulerer prosesser som celledeling, migrasjon, proliferasjon og differensiering. Det finnes flere typer adhesjonsmolekyler. Blant annet integriner og cadheriner som begge er assosiert med invasiv oralkreft [21].

I tillegg til ECM og adhesjonsmolekyler har også angiogenese, som er dannelse av nye blodkar, en viktig rolle i tumor vekst og metastasering. Angiogenese indueres ved hypoxia og proteinet Hypoxia Inducible Factor - 1 $\alpha$  (HIF - 1 $\alpha$ ). HIF - 1 $\alpha$  aktiverer transkripsjon av gener som fremmer angiogenesen for eksempel vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF er proteiner som tiltrekker seg endotelceller og stimulerer vekst av nye

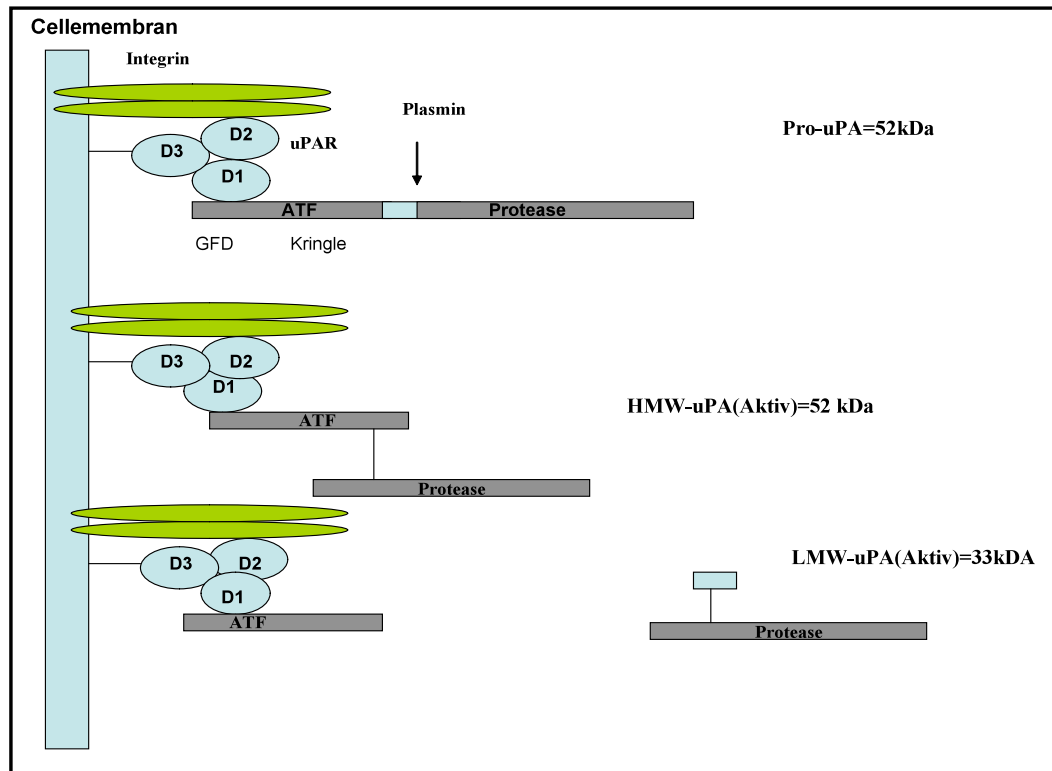
blodkar. De nye blodkarene supplerer tumoren med næringstoffer og oksygen i tillegg til at de også danner en utvei for celler til å metastasere[25].

Studier har vist at det kan være en sammenheng mellom uttrykk av VEGF og tumor differensiering ved at uttrykke av VEGF ser ut til å være redusert i dårlig differensiert plateepitelkarsinom [26].

### **1.4 Urokinase plasminogen activator(uPA)**

uPA er en 53 kDa en serine protease også kalt urokinase. I sin inaktive zymogene form kalles uPA for pro-uPA og består da av en protein kjede. Pro-uPA aktiveres til uPA ved proteolyse av Lys<sup>158</sup>-Ile<sup>159</sup> peptidbindingen (Figur 1.1). Det vil da dannes to proteinkjeder. Reaksjonen katalyseres hovedsakelig av plasmin [27, 28].

uPA – molekylet kan deles inn i tre forskjellige regioner: Et amino-terminalt vekst faktor domene (GFD), kringledomene og et carboxy-terminalt catalytisk domene. GFD og kringledomene utgjør ATF (amino- terminal fragmentet), mens det siste er kjent som lav molekylært uPA. GFD domene medierer binding av uPA til uPAR [29].



**Figur 1.1** Aktivering av uPA ved binding til uPAR. uPAR har flere bindingssteder. ATF domene i uPA vil binde D<sub>1</sub> domene i uPAR og dermed aktiveres. Integrinene har vist seg å binde i D<sub>3</sub> og D<sub>2</sub> domene i uPAR som fører til signalering

### 1.5 urokinase plasminogen aktivator reseptor (uPAR)

uPAR også kalt CD87 ble først oppdaget i 1985 [27]. Den er uttrykt moderat i forskjellige vev, blant annet lunger, nyrer, hjerte, lever. Det har blitt observert overuttrykt av uPAR i organer der det foregår omfattende remodulering av vevet. Hovedsakelig uttrykkes uPAR av makrofager, nøytrofiler, endotelceller og keratinocytter. Ved aktivering av nøytrofiler, monocytter og T-celler er det også vist at uttrykket av uPAR kan økes i blodet [30].

I tumorer er det vist at uPAR uttrykkes av både tumorcellene selv og stromale celler som endotelceller, fibroblaster, nøytrofiler og makrofager [31].

uPAR er 50-55 kDa og er festet til cellemembranen via glycosyl phosphatidylinositol (GPI-anker) gruppe. I tillegg har uPAR fem potensielle seter for N- linkede karbohydrater [27, 32]. Man vet lite om funksjonen til glykosyleringene, men de kan



blant annet øke affiniteten til uPAR for uPA og øke løsligheten til uPAR når den skilles ut. Glykosyleringen av uPAR er forskjellig mellom celletyper og kan endres i respons på aktivering av signaleringsveier [33].

uPAR består av tre domener D1, D2 og D3 [27]. Domenene er viktig i forhold til binding til andre cellulære komponenter som uPA, integriner og vitronectin.

### **uPAR ligander:**

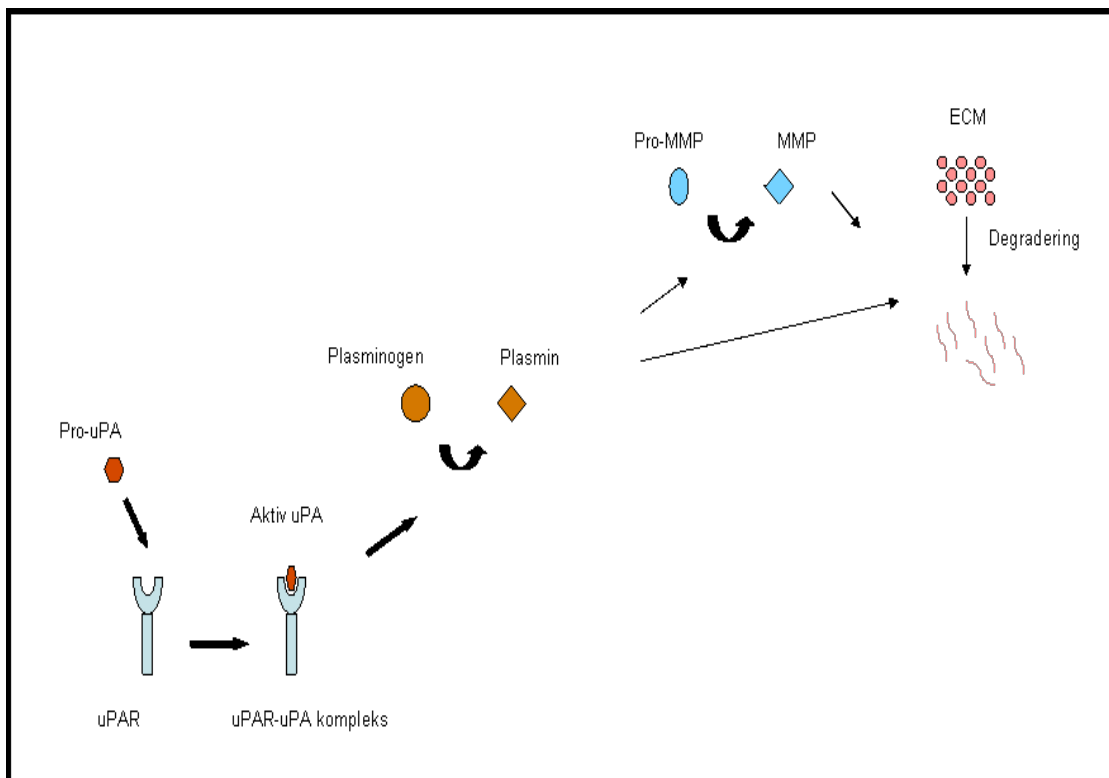
uPA og ekstracellulær matrix molekylet vitronectin (VN) er ligander for uPAR.

Vitronectin og uPA har forskjellige bindingssetet på uPAR og uPAR kan dermed binde begge ligandene samtidig, noe som fører til regulering av proteolyse, celleadhesjon og signalering. uPARs affiniteten for vitronectin økes ofte ved samtidig binding av uPA [17]. Integrinerer er også ligander for uPAR og deres rolle vil beskrives nærmere under punkt 1.8 uPAR og signalering.

## **1.6 uPAR og uPA i plasminogensystemet**

Sammen med uPA, er uPAR involvert i regulering av extracellulær proteolyse ved at den aktiverer plasminogen til plasmin (figur 1. 2). uPA aktiveres ved at Pro-uPA binder til uPAR. Det primære bindingssetet i uPA for uPAR er funnet i veksfaktor GFD og binder hovedsakelig domene D1 i uPAR. Glykosyleringen av Asn<sup>52</sup> i uPAR ser ut til å ha moderat påvirkning på affiniteten av uPA- uPAR interaksjonen [23]. Aktiv uPA katalyserer omdannelsen av inaktiv plasminogen til aktiv plasmin. Plasmin er også en serine protease, men har i motsetning til uPA flere substrater. uPA kan direkte degradere ECM-komponenten fibronectin, mens plasmin kan direkte degradere ECM komponenter som laminin og fibronectin i tillegg til at den kan aktivere pro- formen av for eksempel MMP-3, MMP-9, MMP-12 og MMP-13. MMP-3 også kalt stromelysin-1 har kapasitet til å bryte ned proteoglykaner, laminin, fibronectin, men ikke fibrilliar kollagen. MMP9 degraderer kollagen IV, mens MMP-12 og MMP-13 bryter ned elastin og fibrilliær kollagen. Dannelsen av de aktive MMPene fører til videre remodulering av ECM. Plasmin kan også katalysere omdannelsen av Pro-uPA til aktiv uPA som igjen fører til mer plasmin aktivering i en positiv-feedback mekanisme [34, 35].

I tillegg til uPA er det også en annen plasminogen aktivator nemlig tissue plasminogen activator tPA. uPA og tPA er lik i struktur, men kodes av ulike gener. De er også forskjellig i distribusjon og biologiske funksjon. uPA generer degradereing av matrix ved aktivering av plasmin, som nevnt ovenfor, mens tPA generer plasmin for trombolysse og fibrinolyse [36].



**Figur 1.2 uPAR som protease reseptor:** Figuren viser uPAR som protease reseptor ved at inaktiv Pro - uPA binder uPAR og aktiveres til uPA. Aktiv uPA kløyver plasminogen og aktiverer plasmin. Plasmin kan da direkte eller indirekte degradere ECM. Indirekte degradering skjer ved aktivering av Matrix Metallproteinaser. Inspirert av figur 2 i kilde [28]

**Inhibitorer av plasminogensystemet:**

Plasminogen inhibitorene tilhører gruppen serine protease inhibitorer som inhiberer uPA og tPA. Det er to undergrupper PAI-1 og PAI-2.

PAI-1 er et glykoprotein på 43kDa og den viktigste inhibitoren av uPA/ uPAR. Den binder til uPA og danner et kompleks av uPAR-uPA-PAI - 1 og low density lipoprotein receptor family (LRP -1). komplekset uPA-PAI -1 komplekset degraderes i lysosomer, mens uPAR resirkuleres tilbake til celleoverflaten [37].

PAI-2 eksisterer i to former, en 47 kDa intracellulær ikke-glykosylert form og et 60kDa ekstracellulær glykosylert form. PAI-2 inhiberer uPA-uPAR mindre effektivt enn PAI - 1 [34].

**1.7 uPAR og intracellulær signalering**

uPAR fungerer ikke bare som en reseptor for proteaser, men påvirker også cellers migrasjon, adhesjon, differensiering og proliferasjon gjennom intracellulær signalering. uPAR er som nevnt tidligere en GPI ankret reseptor, og mangler derfor transmembran og intracellulære domener og har derfor ingen mulighet til å overføre intracellulære signaler alene [38]. Flere transmembran proteiner har blitt identifisert som mediatorer av uPAR signaler og integriner har vist seg å være en av de viktigste transmembran reseptorene assosiert med uPAR signalering.

Integriner er transmembranreseptorer for ECM proteiner og binder matrix proteiner som kollagen, fibronectin, lamininer og vitronectin.

Et integrin molekyl består av to ikke kovalente glykoprotein subenheter  $\alpha$  og  $\beta$ . De er transmembrane og har en kort intracellulær C-terminal "hale" og et stort ekstracellulært N-terminal domene. Den intracellulære C-terminalen binder til proteiner som danner forbindelse til cellens cytoskjelett og signalleringsmolekyler. Den ekstracellulære N-terminalen binder spesifikke aminosyresekvenser i ekstracellulære matrix proteiner. På grunn av disse egenskapene kan integriner overføre signaler både inn til og ut fra cella [25].

Integriners affinitet for ligander er kontrollert av intracellulær proteinbinding til  $\beta$ -cytoplasmic domene som induserer konformasjons endring, som igjen aktiverer ligand

binding av de ekstracellulære domenene [33]. I tillegg har det vist seg at G protein koblet reseptor (GPCR), FPRL-1, og caveolin[28] også kan binde uPAR

Signalering gjennom uPAR aktiverer blant annet intracellulære signalerings reaksjonsveier som RAS-mitogen-activated protein kinase (MAPK), Tyrosin kinasene focal adhesjon kinase (FAK) og Src og Rho familiens små GTPase Rac[33].

Aktiveringen av de forskjellige signaleringsveiene fører til migrasjon, adhesjon, differensiering og proliferasjon av celler.

uPAR danner komplekser med integriner. uPAR –  $\beta_1$  integrin interaksjoner er assosiert med aktivering ved Tyr fosforylering av FAK, som igjen fører til aktivering av Ras-ERK. Src vil også kunne danne kompleks med uPAR- $\beta_1$  integrin kompleks, og er aktivert av uPAR signalering gjennom både  $\alpha_5\beta_1$  og  $\alpha_3\beta_1$  integrin komplekser. uPAR- $\beta_1$  integrin signalering til ERK og Src øker uttrykket av uPA og MMPer gjennom AP1 transkripsjonsfaktor, og man tror derfor at signalering gjennom  $\beta_1$ -integriner kan bidra til økt invasering av kreft ved å øke pericellular proteolyse. uPAR -  $\beta_3$  integriner er assosiert med Rac som er assosiert med signalering for cellemigrasjon. Man tror at D3 regionene binder  $\alpha_3\beta_1$  og  $\alpha_5\beta_1$  integriner, mens D2 domene kan bli involvert i uPAR binding av  $\alpha\beta_3$  integriner [33].

I tillegg til at uPA har proteolytiske egenskaper kan også binding av uPA til uPAR stimulere cellulær signalering og forfremme cellemigrasjon i kreftceller. uPA bundet til uPAR kan forfremme uPA/uPAR binding til  $\alpha_5\beta_1$  integrin og regulere celle adhesjon, intracellulær signalering og cellemigrasjon. Samtidig binding av uPA til uPAR/ $\alpha_5\beta_1$  har også vist at man kan få økt uPA mediert plasminogen aktivering i tillegg til regulering av celleadhesjon og migrasjon.

Det er derfor blitt foreslått at uPA uavhengig av dens katalytiske aktivitet kan øke uPAR/integrin assosiasjon ved forandring i uPAR konformasjon eller ved å forme trimolekular komplekser med uPAR og integriner og dermed fremme celle adhesjon og migrasjon[38].

Binding av Vitronectin til uPAR gir også signalering

uPAR og vitronectin interaksjon er nødvendig for at uPAR skal ha mulighet til å modulere forandringer som for eksempel i migrasjon og signal overførelse[39]. Integriner er ofte involvert i uPAR signalering, men binding av Vn til uPAR har vist seg å være uavhengig av integriner ved at behandling med integrin blokkerende antistoffer mislyktes i å inhibere uPAR mediert celleadhesjon til vitronectin [17].

### **1.8 uPAR i oralkreft:**

Studier viser at det er en korrelasjon mellom uPAR og metastasering i oralkreft. Det er blant annet vist at uPAR kan ha betydning i tungekreft. Det er vist at uPAR uttrykkes i celler som hadde metastaser av tunge karsinoma. En annen studie viste at ved å inhibere uPAR i malignante celler med oralkreft (OSC-19) med antisense oligonucleotider resulterte i nedgang i mRNA uttrykket av uPAR og videre inhiberte progresjon av OSC-19 celler i eksperimentelle modeller [40, 41].

Flere ekstracellulære proteolytiske systemer har vist seg å være involvert i oralt plateepitelkarsinom, blant annet systemet for aktivering av plasminogen. Som nevnt tidligere vil aktiv uPA bundet til uPAR aktivere plasmin, som igjen kan føre til degradering av ECM. Det har blitt vist at konsentrasjonen av komponenter i plasminogensystemet (uPA, uPAR, PAI -1 og PAI-2) hadde signifikant høyere konsentrasjoner i plateepitelkarsinom i forhold til normal vev i oral plateepitelkarsinom korrelasjon [36, 42]. Som nevnt tidligere kan uPAR også binde integriner som fører til signalering Det er vist korrelasjon mellom uPAR og  $\alpha_3\beta_1$  i Oralkreft. Økt uPAR uttrykk gir  $\alpha_3\beta_1$  integrin assosiasjon som gir økt mitogen-aktivert protein kinase signalering og transkripsjon aktivering, som igjen fører til en mer aggressiv tunge tumor [43].

### **1.9 Epithelial-mesenchymal transition (EMT) og E-cadherin**

Epithelial mesenchymal transition (EMT) innebærer at epitelceller forandrer deres karakteristikk, går fra hverandre og migrerer fra epitelaget som separate celler. Dette skjer ved at epitelceller stanser uttrykket av epitel-protein markører og uttrykker mesenchymale markører i stede. Samtidig vil de miste sin epitel- morfologi og bli mer fibroblast lignende. EMT er blant annet nødvendig for rekonstruksjon av epitelag etter sårdannelse, men har også blitt sett i ”kanten” på karsinom som invaderer nærliggende vev og blir derfor sett på som et av de første trinnene som fører til invasiv kreft og metastasering.

I tillegg til forandringen i epitelcellenes karakteristikk er det også endringer i genuttrykk. Det har blant annet blitt oppdaget at uttrykket av E-cadherin blir hemmet under EMT. Epitelceller som har gjennomgått EMT begynner ofte å lage fibronectin og samtidig uttrykke N-cadherin, som er en fibroblast markør, i stede for E-cadherin[18].

E-Cadherin er et transmembran glykoprotein og etablerer interaksjoner med andre nærliggende E-cadherin molekyler, og danner dermed celle-celle adherende bindinger mellom epitelceller. E-cadherins cytoplasmiske domene assosierer med flere proteiner inkludert cateniner som linker E-cadherin til actin cytoskjelettet. E-cadherin har blitt assosiert med det første trinnet i metastasering av kreftceller der uttrykket av E-cadherin har vist å være nedregulert som igjen har ført til ødeleggelse av celle-celle junction og tap av epitelcellenes struktur. Nedregulering av E-cadherine kan skyldes mutasjon i E-cadherin genet eller hypermetylering av E-cadherin promotor[44]. Det er funnet at multiple transkripsjonelle pathways er aktivert ved nedregulering av E-cadherin

### **1.10 FORMÅLET**

I denne oppgaven skulle man se om ulike nivåer av uPAR påvirket uttrykket av utvalgte gener og proteiner som er involvert i celleadhesjon, migrasjon og invasjon. Cellene som ble analysert var kloner av den orale plateepitelkarsinom cellelinjen AT-84 der to av klonene overuttrykker uPAR, mens de andre klonene er transfektert med tom vektor og fungerer som kontroll kloner.

## 2. MATERIALER OG METODER

I material og metodedelen blir først utstyret brukt i oppgaven listet opp. Deretter følger en oversikt over de materialene og bufferne som har blitt anvendt. Selve metodedelen kommer til slutt. Enkelte utstyr og materialer som glasstav, gelkniv, membran og diverse rør er beskrevet i selve metodedelen.

### 2.1 Materialer

**Tabell 2.1: Maskiner**

<b>MASKINER</b>	<b>BESKRIVELSE</b>	<b>FABRIKANT</b>
Beckman coulter 21 coulter particle counter	teller celle	Beckman
Invitrogen X-cell surelock	Elektroforese i westernblott	Invitrogen
Xcell II Blot Module	Blotting under westernblott	Invitrogen
geneAMP PCR system 9700	cDNA	Applied biosystem
QPCR MX300P	qPCR	stratagene
FujiFILM intellegent Drak BOX	Bilde av westernblott	Fujifilm
Nanodrop ND 1000 UV/VIS spektrofotometer	Konsentrasjon av isolert RNA	Nanodrop Thecnologies
Experion Automated Electroohoresis station	Kvantitasjon av RNA	BIORAD
HERAcell 240 inkubator	Dyrke cellekultur	Thermo scientific

**Tabell 2.2: Sentrifuger**

<b>Sentrifuger</b>	<b>Beskrivelse</b>	<b>FABRIKANT</b>
Spectrafuge Mini Centrifuge	diverse	Labnet
Econospinn centrifuge 5418	Cellepellet RNA isolering	Medinor Eppendrof
Kubota 8100	sentrifugere RT profiler	Medinor produkter

**Tabell 2.3 Cellekloner brukt i oppgavne**

Cellelinjer	Vektor
AT- 84-uPARhøy	pDest/To/PGK-Puro/uPAR
AT- 84-uPARmedium	PDest/To/PGK-Puro/uPAR
AT-84-EV1	pDest/To/PGK-Puro
AT-84-EV3	PDest/To/PGK-Puro
AT-84 EV4	Pdest/To/PGK-Puro

**Tabell 2.4: Kit brukt i oppgaven**

Kitt	cat.no	Bruksområde	leverandør
RNeasy r Plus mini kit	74134	RNA isolering	Qiagen
Quantitect Reverse transkripsjon kit	205313	cDNA	Qiagen
Real-time SYBR green/ROX PCR mastermix	PA-012-24	QPCR	SABiosciences
XCell surelock Mini cell system med XCell II Blot Module Kit	EI0002	Westernblott	Invitrogen
PAMM-033A Mouce cancer pathwayFinder		RT profiler på RT -qPCR	SABiosciences

**Tabell 2.5: primere brukt i RT-qPCR**

Gen symbol	Forward primer (5'-3') Revers Primer (3'-5')	Amplicon lengde	leveransdør
mS100A4	ACAAGTTCAAGCTGAACAAGACAGA GTCCTTTTCCCCAGGAAGCTA	76	Eurogentec
Mmp 2	TCTGTCCCGAGACCGCTATG CTTGTTGCCAGGAAAGTGAAG	86	Eurogentec
Mmp9	TTCCCCAAAGACCTGAAAACC GCCCCGGGTGTAACCATAGC	83	Eurogentec
gapdh	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	77	Eurogentec

Primerene er designet ved å bruke primer Express v.2.0 (applied Biosystem, Foster city, CA) og syntetisert av Eurogentec.



**Tabell 2.6: Primere brukt i RT-qPCR designet av Qiagen.**

gen symbol	Assay navn	cat.NO	Amplicon lengde	leverandør
<i>PLAUR</i> (upar)	Mm_plaur_1_SG quantitect ptimer assay	QTt00102984	82bP	Qiagen
<i>PLAU</i> (uPA)	Mm_Plau_1_SG Quantitect primer assay	QT00103159	96bP	Qiagen
serpine 1	Mm Serpine1 1SG	QT00154756	74bP	Qiagen
E-cadherin	Mm_cdh 1 SG	QT00121163	112bP	Qiagen
TRFC	Mm Tfrc 1 SG	QT00122745	106bP	Qiagen
$\beta$ -Aktin	Mm Actb 1 SG	QT00095242	149bP	Qiagen

**Tabell 2.6 Gel brukt i westernblott**

Gel	Cat No	Leverandør
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel 1,0 x 12 well	NP0322BOX	Invitrogen

**Tabell 2.7: Primære antistoff brukt i westernblott**

primære antistoff	cat.nr	spieces	Antigen	størrelse	produsent
geit Anti-mus UPAR antibody	AF 534	goat	Recomb. Mouse uPAR	55 kDA	RD system
Renset muse Anti - E- cadherin	61081	mouse	C-term H aa 735- 883	120kDA	BD bioscience
Monoclonal anti- $\beta$ -Actin peroxidase antibody	A3854	mouse	N-term 14 aa	42kDA	sigma aldrich

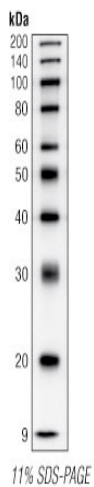
Tabell 2.8: Sekundære antistoff

Sekundære antistoff	cat.nr	Konjugert med	Produsent
Monoclonal Anti-goat/sheep IgG	A9452	Horseradish Peroxidase	sigma Aldrich
Anti igG FC	A2554	Horseradish Peroxidase	Sigma Aldrich
Anti-biotin, HRP-linked Antibody	#7727	Horseradish Peroxidase	cell signaling

Figur 2.1 Ladder brukt i westernblott

### Molekylvektstandard

Biotinylated Protein ladder #7727(Cellsignal)



### Ladder mix

8  $\mu$ l LDS sample buffer (Invitrogen)

7  $\mu$ l biotinylated protein proteinladder (cellsignal)

7  $\mu$ l Prestain Proteinmarker Broad range ( New England Biolabs)

## BUFFERE BRUKT I WESTERNBLOTT

**1xNUPAGE runningbuffer**

30mL(20xMES SDS)

570 mL milli-Q-vann600 ml totalt**1x Blottingbuffer**

5,8 g Tris

29 g Glycin

800 milliQ-vann

1ml Tween-20**1xTBST**

30 mL 10mM NaCl

20 mL 1M Tris pH 7,4

Ad 1 liter med milliQ-vann

1ml Tween -20**1x Bløkkebuffer 5 %**

100 ml TBST

5g fatfree milk Powde

## **2.2 METODER**

### **2.2.1 DYRKING AV CELLER**

Det ble dyrket kloner fra cellelinjen AT-84, som stammer fra et spotant oppstått oralt plateepitel karsinoma fra cH3 mus. Cellene ble dyrket i RPMI 1640 medium med 10 % fetal kalveserum i T 75 flakser. Dyrkningen har vært ved 37<sup>0</sup>C i 5 % CO<sub>2</sub> i HERAcell 240 inkubator.

uPAR fra mus ble klonet fra makrofag musecellelinjen J744 til AT -84. Vektoren pDest/TO/PGK-puro/uPAR-mouse ble brukt til å kloner inn uPAR genet i AT -84 cellene. Avhengig av hvor vektoren setter seg i plasmidet dannes kloner med forskjellig uttrykk av uPAR. Klonene ble definert som AT-84-uPARhøy, AT-84-uPARmedium der uPAR høy har det høyeste uttrykket. For kontroller ble det klonet tom vektorer.

#### **Splitting av celler:**

For å opprettholde god vekst i cellekulturen ble cellene splittet når kulturen var 80-90% konfluent. Mediet ble først fjernet fra T75 flaskene ved hjelp av vakumsug, og rester av mediumet fjernet ved at cellene ble vasket med Phosphate buffered saline (PBS). Dette for å fjerne mulige trypsin inhibitorer før trypsin behandling. Ekstracellulær matrix (ECM) proteiner fra mediet vil kunne binde plasten og cellene binder så til disse proteinene. Trypsinet kløyver blant annet ECM proteinene slik at cellene løsner fra plasten. Det er viktig at trypsin behandlingen ikke pågår for lenge fordi den også kan kløyve proteiner på cellens overflate.

Etter at alle cellene har løsnet ble medium med serum tilsatt slik at trypsinet blir inhibert. Deretter ble det tatt ut antall ml fra blandingen tilsvarende den fortynningen man skulle ha for den aktuelle cellelinje.

Totalt 15 ml medium ble så tilsatt for videre vekst i T75 flasker.

Prosedyre for splitting av celler:

- 1) RPMI 1640 medium, trypsin - EDTA og PBS ble forvarmet til 37<sup>0</sup>C.
- 2) Mediumet i flaskene ble fjernet med vakum sug.
- 3) Vasket deretter med 2 x 7 ml PBS.
- 4) Tilsatte så 1 ml trypsin til hver flaske og lot det virke i noen minutter til cellene hadde løsnet.
- 5) Mediet ble så tilsatt cellene og resuspendert godt For at alle cellene skulle være i løsningen ble flasken skylt godt med blandingen av medium og trypsin.
- 6) Deler av cellesuspensjonen ble overført til nye T75 flasker og RPMI 1640 ble tilsatt til totalt 15 ml medie.
- 7) cellene ble deretter dyrket videre ved 37<sup>0</sup>C og 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.2.2 WESTERNBLOTT

Westernblott også kalt immunoblotting er en mye brukt metode for å identifisere og kvantitere spesifikke proteiner. Proteinene blir først separert med hensyn på størrelse ved at de kjøres gjennom en sodium dodecyl sulfat (SDS) polyacrylamide gel. På forhånd er cellene blitt lysert i NuPAGE LDS sample buffer fra Invitrogen, som blant annet inneholder SDS. SDS binder til og legger seg som en film rundt polypeptidkjedene og gjør at polypeptidkjedenes foldede struktur blir åpnet til en mer lineær struktur. Lyseringsbufferen holder en stabil pH på 7, 4 dette for å unngå at proteinene blir ødelagt ved endring i pH. Glycerol er tilsatt for å øke tettheten av prøven, slik at prøven synker til bunnen av brønnen etter appliseringen. For å gjøre det mulig å se migreringen av proteiner på gelen blir bromphenol blått tilsatt lyseringsbufferen. SDS er negativt ladet og det vil derfor dannes en negativ ladning rundt polypeptidkjedene. På grunn av den negative ladningen vil ikke molekylene gå tilbake til sin foldede struktur. Proteinene sies å migrere kun basert på størrelse. Jo større de er jo mer vil polyakrylamidgelen, som er et tett nettverk av hydrokarboner krysslinke med metylgrupper og hindre proteinene i å vandre gjennom gelen. Små proteiner vil dermed migrere raskere gjennom porene i polyacrylamidgelen enn større proteiner. Etter gelelektroforesen blottes proteinene over på en polyvinyl fluorid (PVDF) membran ved hjelp av et elektrisk felt. Før proteinene blir blottet over på membranen aktiveres membranen i metanol og deretter vasket i milli-

Q vann. Membranen blir så lagt i overføringsbuffer i fem minutter. Proteinene fester seg så på membranen ved hjelp av både hydrofobiske interaksjoner og ladningsinteraksjonen. Membranen blokkeres så med melkeproteinr, for å unngå uspesifikk binding av antistoff. Primært antistoff fortynnes i blokkingsbuffer for å forsterke den spesifikke bindingen til antigenet. Det primære antistoffet vil så binde det spesifikke proteinet. Inkuberingen skjer ved 4<sup>0</sup>C over natt.

Membranen ble så vasket med TBST(Tris buffred saline tilsatt Tween 20). Sekundær antistoffet som er konjugert med horseradish peroxidase (HRP) fortynnes i blokkingsbuffer og kryssreagere deretter med det primære antistoffet.

Membranen blir så vasket med TBST igjen og båndene detektert med kjemiluminiscence. Som et mål på mengden applisert prøve, ble mengde  $\beta$ -aktin kvantitert.

### **Cellelysat til westernblott**

Det ble laget cellelysat for westernblottet. På forhånd ble det bestemt at det skulle være 10 000 celler/ $\mu$ l. Lysatene ble laget ved at det i et 6-brønners brett ble sådd ut en million i hver brønn på 9,6cm<sup>2</sup>. Både uPAR og E-cadherin er ekstracellulære proteiner som potensielt kan kuttes av trypsin eller andre proteaser som aktiveres av trypsin under trypsineringen av cellene. For at cellene skulle ha mulighet til å gjenopprette mengden protein på celleoverflaten ble cellene inkubert i 5 timer før tilsetning av NuPAGE LDS sample buffer fra Invitrogen.

Prosedyre:

- 1) Cellene ble først løst ved trypsinbehandling se punkt 2.1
- 2) 5 ml av fra hver cellesuspensjon ble overført til et 15 ml rør
- 3) 300  $\mu$ l ble tatt ut fra hver av de 5 ml med cellesuspensjon og blandet sammen med 8 ml coulter isoton II diluent tellevæske.
- 4) Deretter ble antall celler beregnet i de 5 ml ved å bruke Beckman coulter 21 partikkel teller og deretter formelen  $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$ .
- 5) I et 6 brønners brett ble det sådd ut en million celle i hver brønn på 9,6cm<sup>2</sup>. To og inkubert i 5 timer i inkubator ved 37<sup>0</sup>C og 5 % CO<sub>2</sub>.

- 6) Mediet ble sugd av. For å få en konsentrasjon på 10 000 celle/ $\mu\text{l}$  ble det tilsatt 100  $\mu\text{l}$  SDS-lyseringsbuffer i hver brønn. Det ble deretter brukt celleskrape for å løse cellene fra platen.
- 7) Lysatet ble deretter overført til et 1,5 ml mikrosentrifugerør.
- 8) For denaturering av proteinene ble lysatet varmet på 70<sup>0</sup>C i ca 10 minutter og deretter fryst ned på - 20<sup>0</sup>C for oppbevaring til senere bruk.

### **SDS – PAGE gel elektroforese**

#### **Forberedelse av lysat**

- 1) Cellelysate ble først homogenisert ved hjelp av Omncan 1 mL insulinsprøyte fra Braun. Det genomiske DNAet blir da destruert og viskositeten går ned.
- 2) Til hver applisering ble 14  $\mu\text{l}$  lysat overført til nye rør. Prøvene som skulle analyseres for E-cadherin ble redusert ved å tilsette 2  $\mu\text{l}$  0,1 M dithiothreitol(DTT). DTT reduserer proteinenes disulfidbindinger og proteinets native form ødelegges. Antistoffet for uPAR gjenkjente kun den native formen av proteinet. Her ble DTT utelatt.
- 3) Molekylvektstandard ble så tilberedt ved at
  - 8  $\mu\text{l}$  NuPAGE LDS sample Buffer fra Invitrogen
  - 7  $\mu\text{l}$  Biotinylated proteinladder
  - 7  $\mu\text{l}$  Prestain proteinmarker Broad Range ble blandet sammen i et mikrosentrifugerør.
- 4) Ladder og prøver ble på nytt denaturert ved oppvarming til 100<sup>0</sup>C. 2 minutter for ladder og 5 minutter for cellelysate.
- 5) Prøvene ble deretter spunnet ned ved hjelp av sentrifugering på Spectrafuge Mini centrifuge ved 2000 x g

**Tilberedning av gel kassett: NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel 1,0 x 12 well**

- 6) Kammen som sitter ned i brønnene ble fjernet. Brønnene ble så vasket med NuPAGE running buffer.
- 7) Deretter ble den hvite tapen fjernet fra gel kassetten, og gel kassetten overført til Invitrogen X-surelock for elektroforese.

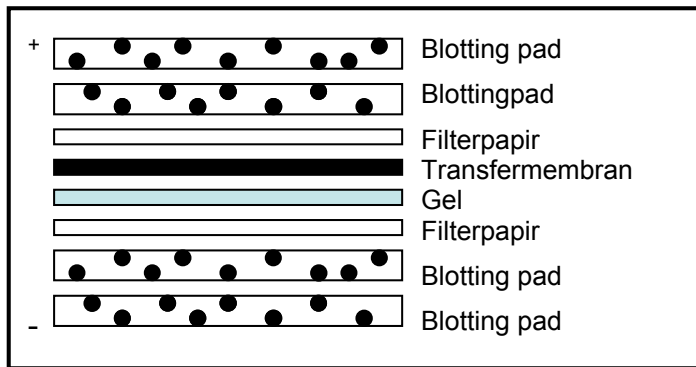
**Elektroforese**

- 8) Det innerste kammeret ble fylt med NuPAGE MES SDS running buffer fra Invitrogen. Det ytre kammeret ble deretter fylt med den resterende mengden runningbuffer.
- 9) 10 µl Prøvene ble så applisert per brønn.
- 10) Ut fra erfaringer på lab ble valgt program for elektroforesen 40 minutter på 200V.

**Blotting**

- 11) En PVDF membran, ti pads og to filterpapir ble klippet i samme størrelse som gelen. Filteret og padsen ble lagt i blottingbuffer
- 12) PVDF membranen ble aktivert ved at den ble vasket i
  - 5 sek i metanol
  - 10 sek i milliQ- vann
  - > 5 minutter i blottingbuffer.
- 13) Etter elektroforesen, ble gelkassetten åpnet ved hjelp av gel-kniv. Gelen ble overført på den største kassettplaten, og brønnen fjernet. Det første filterpapiret ble så plassert på gelen, og gelen overført til filteret. Den nederste delen av gelen ble så fjernet.
- 14) PVDF membranen ble så plassert på gelen, og deretter ble det andre filterpapir plassert på membranen. Luftbobler ble fjernet ved at en glasstav forsiktig ble rullet over membranen noen ganger.
- 15) Padsen og filterpapiret med gel og membran ble satt riktig sammen i katodekjernen for blotting. Se figur 1





**Figur 2.1:** Skjematisk oppvisning av Blotteoppsett inspirert av Invitrogen

- 16) Det indre kammeret ble fylt med blottebuffer, og det ytre kammeret med kaldt vann for avkjøling. Blottet deretter ved 25 V i 1 ½ time.
- 17) Etter blottingen ble membranen overført til et 50 ml rør og vasket med 5 ml TBST i ca 5 min.
- 18) Membranen ble inkubert i 5 ml blokkebuffer i 1 time ved romtemperatur.
- 19) Primært antistoff for uPAR ble deretter fortynnet 1:1000 og for E-cadherin 1:2500 i 5 ml blokkingbuffer.
- 20) Neste dag ble membranen vasket i 3x5 min med 5 ml TBST.
- 21) Deretter ble det tilsatt sekundært antistoff. Sekundært antistoffene ble for uPAR fortynnet 1:10 000 og for E-cadherine 1:1000 i 5 ml blokkebuffer. I tillegg ble det tilsatt Antibiotin fortynnet 1:500 i 5 ml blokkingbuffer sammen med de sekundære antistoffene.
- 22) Det ble så utført ny vasking med 5 ml TBST i 3x5 min
- 23) Westernblotting Luminol Reagent ECL – chemiluminiscence væske; 1,5 ml av hver av løsningene A og B ble blandet sammen og inkubert på membranen i ca 1 min.
- 24) Membranen ble så forseglet i en plastlomme og tatt bilde av ved hjelp av FujiFILM intelligent Drak BOX.

### Kvantitering av mengde protein i cellelysat og applisering

$\beta$ -Aktin ble brukt til å sjekke om applisering på gel og antall celle i hvert cellelysat var tilsvarende lik mengden protein.

- 1) Membranen ble strippet ved at det først ble blandet sammen 1 ml Re-Blot plus strong solution og 18 ml milliQ-vann.
- 2) Membranen ble deretter overførte til blandingen i punkt 1. Dette stod på rotering i ca 20 min for å fjerne antistoffene fra membranen.
- 3) Deretter ble membranen overført til 50 ml rør og tilsatt 5 ml blokkingsbuffer. Dette roterte i 30 minutter i romtemperatur.
- 4) Monoclonal Anti - $\beta$ -Actin peroxidase ble fortynnet 1:10 000 i og Anti Biotin antibody 1: 500 i 5 ml blokkingsbuffer og inkubert for 1 time i romtemperatur. Vasket deretter med 5 ml TBST i 3 x 5 minutter.
- 5) Westerblotting Luminol reagent ECL- Chemiluminiscence væske; 1,5 ml av hver av løsningene A og B ble blandet sammen og inkubert på membranen i omtrent 1 min.
- 6) Membranen ble så forseglet i en plastlomme og tatt bilde av ved hjelp av Luminescent image analyzer, LAS 3000, fra Fujifilm.

### 2.2.3 RNA ISOLERING

Det ble brukt RNeasy plus mini kit fra Qiagen til å isolere total RNA fra celler. For optimal RNA isolering er lysing av celler viktig samt at løsningen er homogen. RNA pelleten ble først lysert ved at det ble tilsatt RLT-lyseringsbuffer fra kitt pluss Dithioeritol (DTT). Lyseringsbufferen vil ødelegge cellemembranen slik at RNAet frigjøres fra cella og DTT redusere disulfidbindingene. I tillegg vil guanidine thiocyanatet i lyseringsbufferen inaktivere RNaser, som hinderer degradering av RNA.

Lysatet ble deretter homogenisert via QIAshredder spinn kolonne. Under homogeniseringen nedbrytes genomisk DNA og andre cellulære komponenter med høy molekyl vekt ved separasjon i kolonnen. Dette vil redusere viskositeten på lysatet. Etter homogeniseringen ble det tilsatt 70 % etanol til og lysatet deretter overført til en RNeasy spinn kolonne. Etanolen ble tilsatt for å øke bindingen til RNeasy kolonnens

membran. Forskjellige buffere ble så tilsatt kolonnen for å vaske bort og fjerne eventuelle kontamineringer som genomisk DNA, lipider og proteiner.

### Tilberedning av cellepellet

Erfaringer gjort i forskningsgruppa har vist at en konsentrasjon på 2 millioner celler gav ønsket RNA konsentrasjon og renhet.

Prosedyre:

- 1) cellene ble først løsnet ved trypsinbehandling se punkt 2.1
- 1) 5 ml fra hver cellesuspensjon ble overført til fem forskjellige 15 ml rør
- 2) antall celle/0,5 ml i 5 ml cellesuspensjon ble telt via Beckman coulter 21  
deretter ble antall celler i 5 ml løsning beregnet ved formelen  $C_1 \times C_2 = V_1 \times V_2$ .
- 3) Celleløsningen i de 15 ml rørene ble sentrifugert i Econspinn sentrifuge på 200 x g i 5 minutter slik at det ble dannet en fast cellepellet i bunnen av røret.
- 4) Mediumet ble så fjernet og PBS ble tilsatt til en cellekonsentrasjon på  $2 \times 10^6$  celler/ml. En cellepellet på 2 millioner celler ble deretter laget ved at 1 ml ble overført til 1,5 ml mikrosentrifugerør og sentrifugert på 200 x g i 5 minutter.
- 5) PBS ble så sugd av med vakum, slik at bare pelleten var igjen.
- 6) Deretter ble det tilsatt 350µl Buffer RLT Plus for å løse opp cellene og frigjøre RNAet. Blandet til det ble en seig løsning.
- 7) Lysatet ble deretter oppbevart på  $-70^{\circ}\text{C}$ , for senere isolering av RNAet.

### Isolering av RNA

Isolering av RNA ble gjort i henhold til protokoll for RNeasy Plus mini kit fra Qiagen.

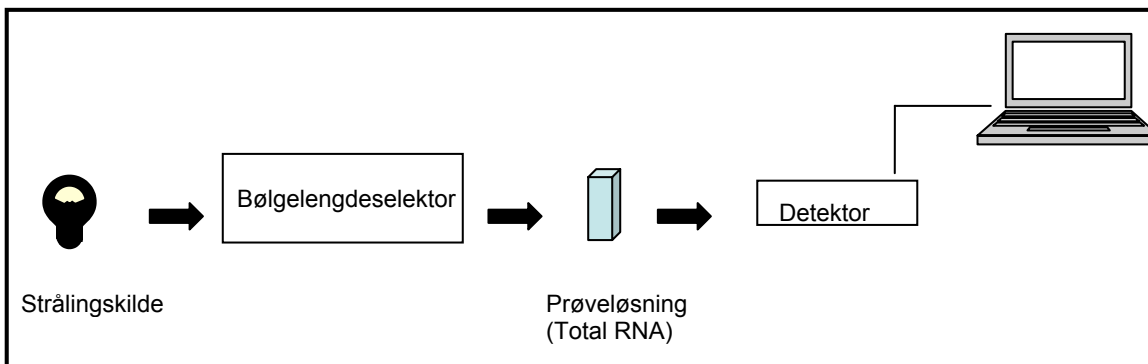
## 2.2.4 Kvantitering av RNA

Det har blitt brukt to metoder for å sjekke kvaliteten på det isolerte RNAet. I den første metoden ble konsentrasjon og renheten av RNAet bestemt ved å bruke spektrofotometri i en Nanodrop. I den andre metoden ble integriteten til RNAet analysert ved elektroforese.

### Nanodrop spektrofotometer:

#### Spektrofotometer:

Et vanlig spektrofotometer består i hovedsak av en strålingskilde, en bølglengdeselektor, en prøveholder og en detektor. Strålekilden sender ut UV-stråling som først passerer en bølglengdeselektor. Bølglengdeselektoren velger ut et område med en bølglengde som man ønsker å undersøke prøven med. Detektoren måler intensiteten av strålingen som passerer igjennom prøveløsningen. Intensiteten ( $I$ ) av denne strålingen sammenlignes med intensiteten ut fra strålingskilden ( $I_0$ ) som benyttes i spektrofotometeret og konverteres av et elektronisk system til absorbanseheter ( $\log I_0/I$ ) som vises på instrumentet.



Figur: Figuren viser en skjematisk fremstilling av et spektrofotometer. Tegningen er inspirert av boka Legemiddelanalyse kilde[45].

**Nanodrop:**

3 µl fra det isolerte RNAet ble tatt ut og brukt videre til kvantitering på Nanodrop. Nullstilte først Nanodropen ved å bruke RNase fritt vann som blank. Deretter ble 1-2 µl total RNA pipettert direkte på pedestalen. Måleinstrumentet ble lukket og overflatespenningen i væsken sørger for at en kolonne dannes mellom to optiske fibre. Kolonnen danner et måleområde.

RNA har maksimum absorbans ved 260nm og proteiner på 280 nm. Forholdet mellom absorbansen ved 260 nm og 280 nm viser renheten av RNAet. Rent RNA har A260/A280 på rundt 2. Noen ganger kan det registreres en topp ved 230nm, som kan være kontaminering av salt som guanidinium isothiocyanate fra lysesbuffer og fenol fra medie. Derfor bør man ta hensyn til OD A260/230 nm i tillegg til OD A260/280 nm. A260/230 nm bør også ligge rundt 2.

**Elektroforese:**

Det ble laget en konsentrasjon på 300ng/µl av RNAet.

Integriteten av RNAet ble analysert ved å bruke Experion Automated Electrophoresis station utført av Mikromartiseplattform, IKM, UIT.

Ved bruk av Experion blir en liten mengde RNA-prøve separert via elektroforese på en Microfluidic chip. Under elektroforesen vil et fluoriserende fargestoff binde til RNAet, fluorescensen detekteres og deretter overføres til en programvare. Resultatene vil bli presentert som bånd på gel og i electropherogram ( Norsk ord her) som viser to toppe av 28S og 18S ribosomalt RNA (rRNA)

Integriteten av RNAet kan bli fastsatt/evaluert ved at arealet av toppene 18S og 28S ribosomalt RNA på electropherogrammet sammenlignes.

Både en forlenget terskel baseline og et nedsatt 28S:18S forhold indikerer degradering av RNA.

### 2.2.5 Konvertering av mRNA til cDNA

For å kunne kjøre en kvantitativ RT- qPCR, må RNAet konverteres til cDNA.

cDNA ble laget ved å bruke Quantitect Reverse transcription kit fra Qiagen.

I det første trinnet vil rensset RNA inkuberes i gDNA wipeoutbuffer ved 42<sup>0</sup>C i 2 minutter.

Kontaminering med genomisk DNA vil da bli eliminert.

Etter at genomisk DNA er fjernet utføres revers transkripsjon. Dette ved at en mastermix av Quantiscript revers transkriptase mix, Quantiscript RT buffer og RT primer mix ble blandet og tilsatt RNAet. Polymerase chain Reaction(PCR)maskin ble benyttet i dette steget.

Quantiscript Revers transkriptase inneholder både revers transkriptase og en RNase inhibitor.

Revers transkriptase har høy affinitet for RNAet og transkribere cDNA fra RNA templatet.

RNase inhibitoren inhiberer RNasene A, B og C.

Quantiscript RT buffer inneholder dNTPs(Deoxyribonucleotider).

RT primer mix inneholder både oligo – dT primere og random primere som vanligvis er hexamerer. Oligo-dT primer binder RNAets poly (A)<sup>+</sup>-kjede. Siden det kun er mRNA som har poly(A)<sup>+</sup> kjeder vil Oligo-dT primerene bare detektere mRNA. Random hexamerer er nucleotider satt sammen i tilfeldige kombinasjoner og vil kunne binde på hele RNAet og sørger derfor for fullstendig cDNA syntese.

I det første trinnet inkuberes RNAet ved 42<sup>0</sup>C i 15 minutter i en PCR maskin for å aktivere revers transkriptase.

I det andre trinnet inkuberes RNAet på 95<sup>0</sup>C i 3 minutter for å inaktivere revers transkriptasen.

**Prosedyre:**

Input av RNA ble satt til 1000 ng og sluttkonsentrasjonen av cDNAet til 50ng/ $\mu$ l.

## 1) Eliminering av genomisk DNA

Tabell 2.1 Eliminering av genomisk DNA

gDNA wipeoutbuffer, 7X	2 $\mu$ l
Templat RNA	1000ng
RNase fritt vann	til total 14 $\mu$ l
Totalt	14 $\mu$ l

Komponentene ble blandet i et lite PCR rør.

Blandingen ble inkubert i 2 minutter på 42<sup>0</sup>C i polymerase chain rekasjon(PCR) maksinen og avkjølt på 4<sup>0</sup>C i 2 minutter. Rørene ble så plassert på is

## 2) Revers Transkripsjon

Tabell 2.2 revers transkripsjon komponenter

Quantiscript revers transkriptase	1 $\mu$ l
quantiscript RT buffer, 5X	4 $\mu$ l
RT Primer Mix	1 $\mu$ l

Det ble laget en mastermiks av komponentene ovenfor i et eppendorfør. De ble blandet godt ved hjelp av pipettering og ble deretter spunnet ned i en mini sentrifuge på 2000 x g.

6  $\mu$ l av revers transkripsjons mastermiks ble tilsatt de 14 $\mu$ l i trinn 1 slik at det ble 20  $\mu$ l i hvert rør.

Tabell 2.3: Revers Transkriptase reaksjon

Revers transkriptase mastermiks	6 $\mu$ l
+ RNA templat	14 $\mu$ l

---

Total	20 $\mu$ l
-------	------------

- 3) Reaksjonskomponentene ble deretter inkubert i:
  - 15 minutter på 42<sup>0</sup>C
  - 3 minutter på 95<sup>0</sup>C
  - Noen minutter på 4<sup>0</sup>C for avkjøling
- 4) cDNAet ble oppbevart ved -20<sup>0</sup>C inntil videre bruk.

### 2.2.6 Kvantitativ Real time PCR (RT- qPCR)

Det ble både kjørt enkelt qPCR og qPCR på RT<sup>2</sup>-Profiler.

RT-qPCR også kalt realtime PCR er en metode for kvantitering av DNA amplifikasjon, der fluoriserende fargestoffer brukes for å kvantitere mengden PCR produktet etter hver PCR syklus. Konsentrasjonsforandringer av DNAet måles ved å bruke fluoresens molekyler som binder til DNAet. Her ble SYBR Green brukt. SYBR Green har lav fluorescens når den er ubundet i løsning. Under DNA amplifikasjon vil SYBR Green binde dobbeltrådig DNA og fluoriseringen fra SYBR Green vil da øke. For å eksitere fluorophorene blir halogen brukt. Halogen sender ut et bredt spekter av synlig lys og filter brukes for å velge ut en tilpasset bølgelengde av lys for eksitasjon og kvantitering av fluoresence.

Fluoriseringen fra fargestoffene samles fra hver reaksjonstube og omformes til et elektrisk signal av detektorer.

For å normalisere for variasjon i fluorescens signal ble ROX, et passiv referanse fargestoff (annet or her?), brukt. ROX fluoriserer upåvirket av reaksjonen

Kontroller:

No template controll (NTC) ble satt opp i hver RT - qPCR reaksjon for å monitorere for mulig kontaminering og primer-dimer formering.

NTC inneholder alle reaksjonskomponentene for utenom cDNA-templatet. Det skal derfor ikke amplifiseres noe PCR produkt.



Smeltekurve:

Smeltekurve brukes for å sjekke spesifisiteten til primeren i tillegg til å sjekke for flere toppe som kan indikere eventuell forurensning og primer dimere. Smeltekurven ble kjørt i slutten av hver qPCR reaksjon. SYBR Green er uspesifikk og vil dermed kunne binde hvilke som helst dobbeltrådig produkt. De fleste RT-qPCR produkt har en smeltekurve rundt 80-90<sup>0</sup>C avhengig av størrelse og sekvens på qPCR - produktet. Er det bare qPCR – produktet av interesse som er tilstede vil en topp vises rundt 80 – 90<sup>0</sup>C. Er det flere toppe indikerer dette at også andre produkt er til stede.

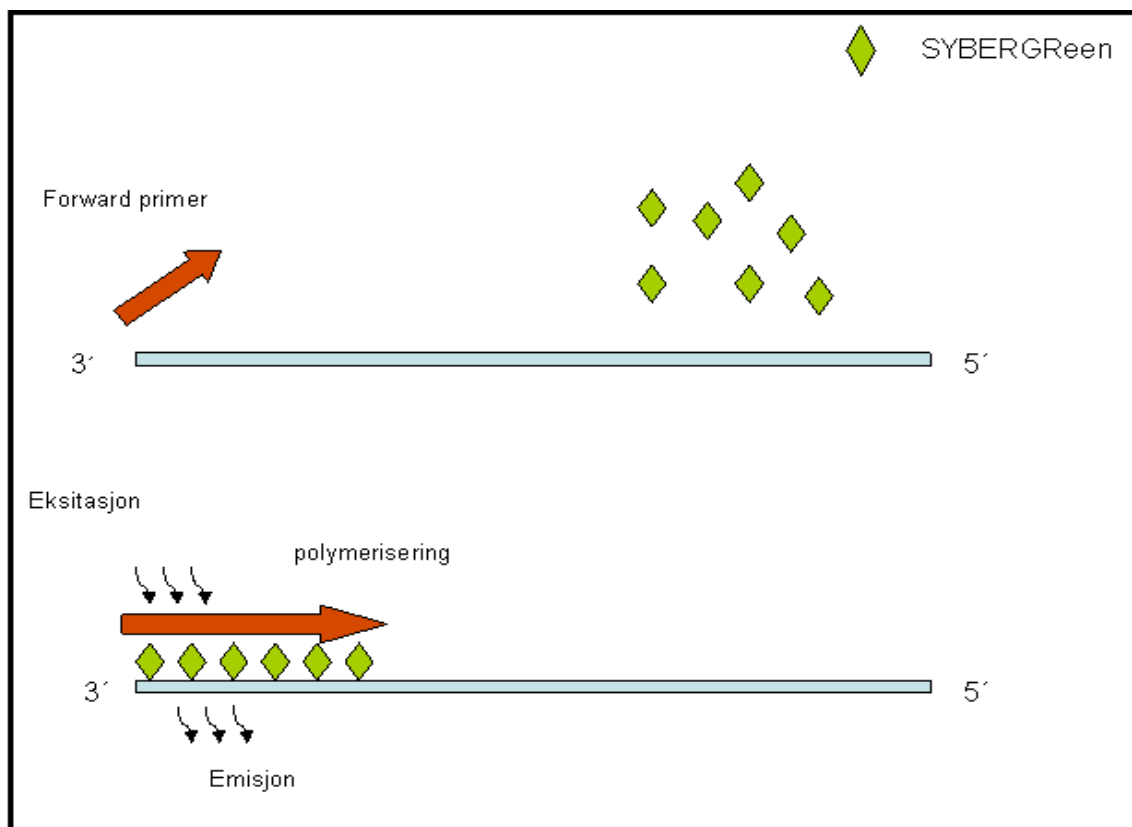


Figure 3: SYBR Green: SYBR Green molekyler vil være ubundet når DNAet denatureres. Under amplifikasjon av DNAet, vil SYBRgreen binde dobbeltrådig DNA og dermed fluorisere. Inspirert av Principles of RT-qPCR[46].

**RT<sup>2</sup>- Profiler PCR Array system**

RT<sup>2</sup>- profiler brukes for å analysere uttrykk av gener som er relevant for en spesifikk pathway ved å bruke SYBR Green basert RT- qPCR. Det er 84 relevante gener på hver RT<sup>2</sup>-profiler som er spesifikk for den reaksjonsveien(annet ord her)som skal sjekkes.

I denne oppgaven ble det valgt å teste genuttrykket på RT<sup>2</sup> profiler PCR Array Mouse Cancer PathwayFinder PAMM-033A.

**PROSEDYRE ENKELT KJØRING AV QPCR:**

- 1) cDNAet på 50ng/μl ble fortynnet til 10ng/μl ved tilsetningen av RNase fritt vann.
- 2) Deretter ble amplifikasjonsreaksjonen mikset.

**Tabell 2.4 Amplifikasjons Reaksjon**

komponenter	mengde
SYBER Green	12,5 μl
Rnase fritt vann	10,5μl
Revers og Forward primer	1 μl
Templat DNA	1μl
Total Reaksjon	25μl

SYBER Green, Rnase fritt vann og Primer ble først laget som en mastermiks med et beregnet overskudd på 15%.

24 μl mastermiks ble tilsatt i hvert rør.

1 µl av Templat DNA ble så tilsatt de 24 µl slik at det ble 25 µl i hvert rør. Komponentene ble blandet godt og deretter sentrifugert i noen sekunder på Spectrafuge Mini Centrifuge. Det ble sjekket for bobler i rørene før man kjørte qPCR på dem.

**Tabell 2.5 syklus på enkeltkjøring RT-qPCR**

segment	temperatur	tid		sykluser
1	95 C	10 min	initial denaturering	1
2	95 C 55 C 72 C	30 sek 1 min 30 sek	denaturering Annealing Extension	40
3	95 C 55 C 95 C	1 min 30 sek 30 sek	smelte kurve	1

#### PROSEDYRE PÅ RT<sup>2</sup> PROFILER

- 1) cDNAet på 1000 ng/µl ble fortynnet til 10ng/µl ved å tilsette 91 µl Rnase fritt vann.
- 2) Amplifikasjons reaksjonen ble så satt opp

**Tabell 2.6 Amplifikasjons reaksjon**

komponenter	Mengde for 96 brønn
2x SABiosciences RT QPCR mastermix	1350 µl
First strand CDNA syntese	102 µl
Rnase fritt H	1248 µl
Totalt volum	2700 µl

Komponentene ble blandet i et 15 ml rør, og deretter overført til celle kultur skål på 60x15mm fra BD Falcon.

25 µl ble tilsatt i hvert rør på platen. For å fjerne eventuelle bobler ble platene sentrifugert på 10 RPM i omtrent 1 min.

Platen ble så kjørt på QPCR maskinen, og et program

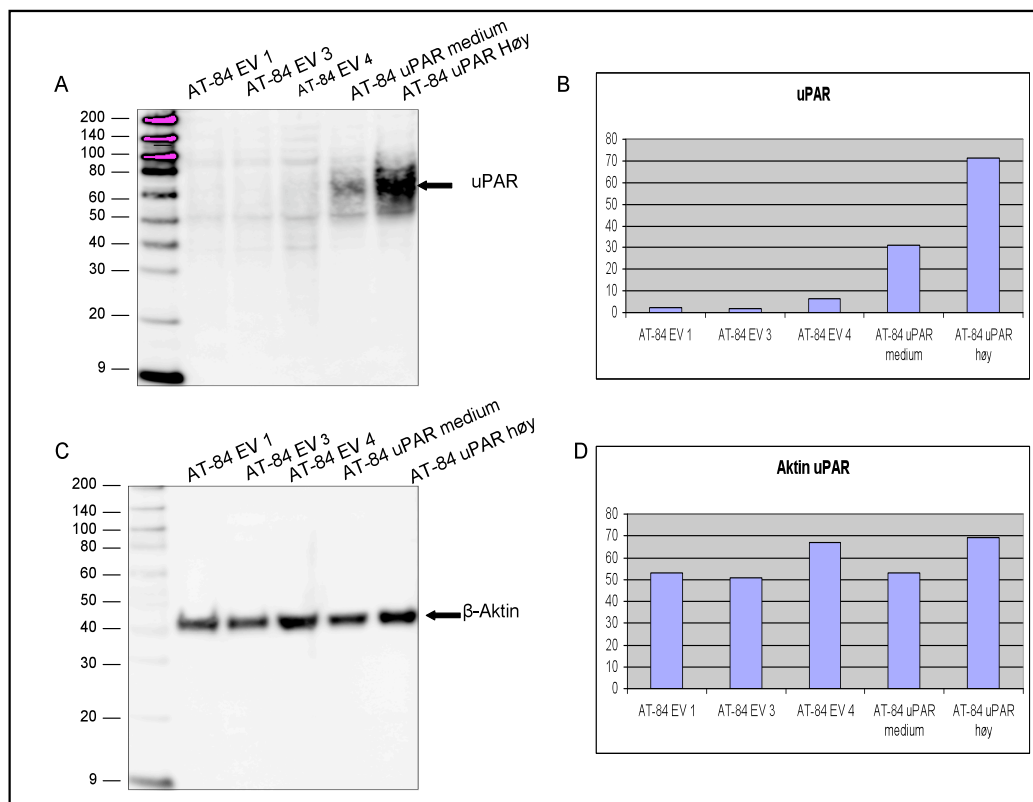
**QPCR oppsett**

<b>segment</b>	<b>temperatur</b>	<b>tid</b>		<b>sykluser</b>
1	95 C	10 min	Initial denaturering	1
2	95 C	15 sek	denaturering	40
	60 C	1 min	Annealing/ Extension	
3	95 C 55 C 95 C	1 min 30 sek 30 sek	smeltekurve	1

### 3. Resultat

#### 3.1 Verifisering av uPAR på Westernblott

I denne oppgaven ble det brukt fem kloner av AT-84 transfektert med tom vektor kontroll pDest/To/PGK-puro og en vektor med cDNA for muse (pDest/To/PGK-puro/uPAR) Westernblott ble brukt for å verifisere at klonene AT-84 EV1, AT84-EV3, AT-84-EV4, AT-84 uPARmedium og AT-84 uPARhøy har forskjellig uttrykk av uPAR på proteinnivå (figur 3.1)



**Figur 3.1** Nivåer av uPAR i AT-84 kloner: A) Westernblott av klonene AT-84-EV1, AT-84-EV3, AT-84-EV4, AT-84-uPARmedium og AT-84 uPARhøy. Cellelysate med 10 000 celler/ $\mu$ l (10  $\mu$ l i hver brønn) ble separert via elektroforese på NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel 1,0x12 brønner og deretter blottet over på en PVDF membran under ikke-reduerte betingelser. Primær antistoff geit anti mouse uPAR fortynnet 1:1000 i 5 ml blokkebuffer ble tilsatt og inkubert over natt. Sekundært antistoff Anti-geit/sau IgG konjugert med HRP fortynnet 1:10 000 i 5 ml blokkingsbuffer ble deretter tilsatt og inkubert i 1 time. Båndene ble detektert ved luminiscence.

**B)** Kvantitering av uPAR uttrykket i (A) ved Multi Gauge -ver 3.0- **C)** Mengden  $\beta$ -actin i cellelysatsene analysert ved westernblott. Membranen i A ble strippet ved hjelp av Re-Blot strong solution og deretter tilsatt Monoclonal anti -  $\beta$ -Actin peroxidase fortynnet 1:10 000 i 5 ml Blokkingsbuffer. Båndene ble detektert via luminiscence. **D)** Kvantitering av  $\beta$ -actin i C ved Multi Gauge -ver3.0-.

I figur 3.1 A og B viser tydelige forskjeller i klonenes uttrykk av uPAR. uPAR har en molekylvekt på 50 kDa og de sterke båndet som ligger mellom 50-60 kDa korresponderer mest sannsynlig til uPAR. Bredden på båndene skyldes at uPAR har mellom 1- 5 sukkerkjeder bunnet til seg. Resultatet viser at uPAR høy har det høyeste uttrykket og at AT-84- uPAR medium har litt mindre uttrykk sammenlignet med AT-84- uPAR høy. Klonene med tom vektor AT-84-EV1, AT-84-EV 3 og AT-84-EV-4 har svake uPAR bånd, så svakt slik at man nesten ikke kan si at det er noe der. Dette viser at AT-84 har lavt endogent uttrykk av uPAR. For å sjekke om lik mengde prøve ble applisert på gelen ble samme blottet analysert for mengden  $\beta$ -actin.

Som figur 3.1 C og D viser er mengden applisert prøve mellom klonene ganske jevn

### 3.2 Isolering og Kvantitering av RNA

Totalt RNA ble isolert fra hver av AT-84 klonene tre ganger. RNA 1 og 2 er isolert fra celler med samme passasjennummer, mens RNA 3 er isolert fra cellene i en annen passasje. Alle tre er isolert på forskjellige tidspunkt. Nanodrop ND 1000 UV/VIS spektrofotometer ble brukt for å måle konsentrasjonen og sjekke renheten av det isolerte RNAet.

#### 1) Konsentrasjon og renhet av isolert RNA

**Tabell 3.1** Konsentrasjon og renhet av RNA 1 isolert fra AT-84 klonene.

RNA 1	konsentrasjoner (ng/µl)	RATIO 260nm/280nm	RATIO 260nm/230nm
AT-84 EV 1	412,7	2,04	2,69
AT-84 EV 3	617,1	2,14	2,69
AT-84 EV 4	495,9	2,17	2,67
AT84uPAR medium	407,4	2,05	2,68
AT84 uPAR høy	367,5	2,05	2,72

**Tabell 3.2** Konsentrasjon og renhet av RNA 2 isolert fra AT-84 klonene

RNA 2	konsentrasjoner (ng/µl)	RATIO 260nm/280nm	RATIO 260nm/230nm
AT-84 EV 1	345,8	2,08	2,72
AT-84 EV 3	306,8	2,07	2,62
AT-84 EV 4	476,2	2,14	2,57
AT-84uPAR medium	355,8	2,07	2,67
AT-84 uPAR høy	458,8	2,06	2,12

**Tabell 3.3** Konsentrasjon og renhet av RNA 3 isolert fra AT-84 klonene

RNA 3	konsentrasjoner (ng/µl)	RATIO 260nm/280nm	RATIO 260nm/230nm
AT-84 EV 1	616,66	2,09	2,35
AT-84 EV 3	482,97	2,1	2,33
AT-84 EV 4	480,77	2,08	2,25
AT-84uPAR medium	528,41	2,09	2,3
AT-84 uPAR høy	483,15	2,04	2,29

RNA har maksimum absorpsjon av nukleinsyre på 260nm, mens proteiner har en maksimum absorpsjon på 280nm. Forholdet OD 260/280 sier noe om renheten til RNAet. En ratio på 2.0 indikerer rent RNA. Er verdien lavere kan det indikere at proteiner eller andre kontaminater som absorberes ved 280 nm er tilstede. En topp ved 230 nm kan indikere salt fra lysisbuffer brukt i isolering. Ratio 260/230 indikerer rent RNA ved 1.8-2.2. Hvis ratio er mindre kan det indikere at kontaminater er til stede. Det er derfor viktig at forholdet 260/230 tas i betraktning i tillegg til forholdet 260/280. Som tabellene viser har alle klonene i de isolerte RNAene verdier på over 2 og indikerer derfor at RNAet er rent. Konsentrasjonen beregnes ut fra Beer- lamberts ligningen

$$C=(A \times e)/ b$$

Der C= nukleinsyrekonsentrasjon i ng/ $\mu$ l, A er absorbansen og e er bølglengde ekstinksjon koeffisienten i ng-cm/ $\mu$ l, som for RNA er 40ng-cm/ml og b er path bølglengde i cm

I tillegg til konsentrasjon og renhet ble også integriteten av RNAet analysert ved elektroforese i Experion Automated Electrophoresis station. For oversikt over resultatene se appendiks 7.1. Figur 7.1.1 til 7.1.10 viser oversikten over separering av RNA ved elektroforese.



### 3.3 Analyser av uttrykket av utvalgte gener i AT-84 klonene ved RT-qPCR.

#### 3.3.1 Enkeltgener på RT-qPCR

Det ble først verifisert at AT-84 klonene har ulik mengde uPAR på RNA nivå. Deretter ble RNA analysert ved RT-qPCR for å avdekke om endringer av uPAR uttrykket har påvirket uttrykket av andre gener. Genene som ble testet var:

- uPAR (*Plaur*)
- uPA (*Plau*)
- PAI – 1 (*Serpine-1*)
- S100A4
- MMP 9
- MMP 2
- E- cadherin (*Cadh -1*)

Referansegenene som ble brukt var:

- $\beta$ -Actin
- TRFC
- Gapdh

RNA 1, RNA 2 og RNA 3 ble brukt som paralleller. Som nevnt tidligere så er RNA 3 isolert fra et annet passasjenummer enn RNA 1 og 2. Celler med forskjellig passasjenummer kan ha blitt behandlet ulikt, ved at noen kanskje har stått lengre konfluent, som igjen kan føre til at cellene kan påvirkes. RNA isolert fra forskjellige passasjenummer kan derfor indikere om slike forskjeller har betydning.

For å analysere resultatene ble  $\Delta\Delta C_t$  beregnet. AT-84- EV1, EV3 og EV 4 er kontroller.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{målgenet}) - \Delta C_t(\text{kontroll}).$$

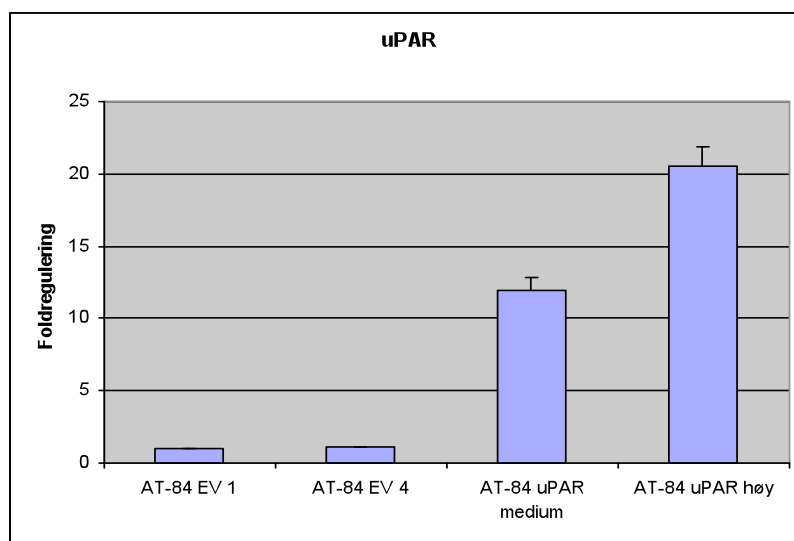
Deretter ble ”Fold endring” beregnet for hvert gen i hver cellelinje.

$$\text{Fold endring: } 2^{(\Delta\Delta C_t)}.$$

Det ble deretter beregnet et gjennomsnitt av fold endring til RNAene slik at det ble en ”fold change” verdi for hver cellelinje.

For å beregne Fold regulation ble en av kontrollene satt til 1, og de andre klonenes fold change verdi sammenlignet med denne verdien.

Det ble først verifisert at AT-84 klonene har ulik mengde mRNA for uPAR . Resultatet i Figur 3.3.1 viser fold endringen av mRNA for uPAR sammenlignet med nivået i EV 1. Resultatet viser at AT-84-uPARhøy har en oppregulering 20 ganger høyere sammenlignet med AT-84-EV1 og AT-84-uPARmedium har en oppregulering på omtrent 10 ganger høyere enn AT-84-EV1, og viser det forventede resultatet AT-84- uPARhøy har det høyeste uttrykket og AT-84-uPARmedium har litt lavere. Det samme resultatet vises på protein nivå ved westernblott i figur 3.1



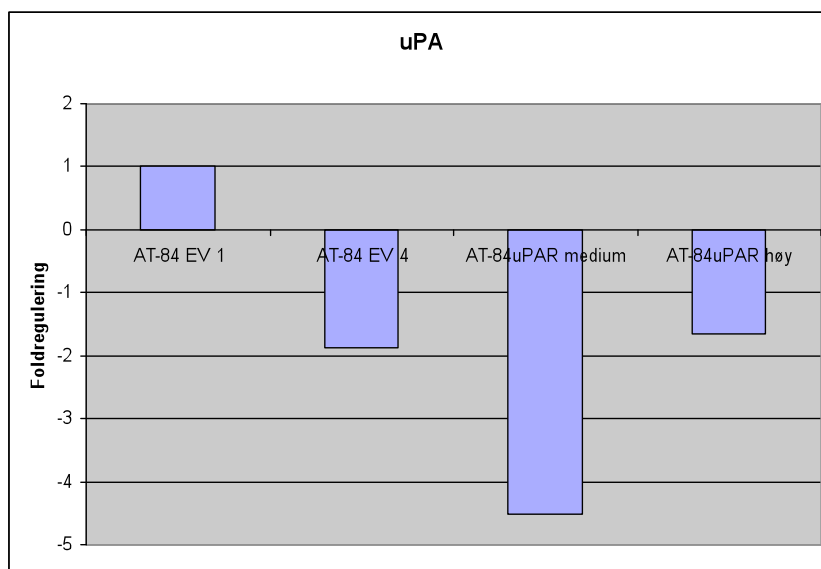
**Figure 3.3: uPAR nivået i AT-84 klonene analysert ved RT-qPCR.**

Det ble brukt tre RNA isolert på forskjellige tidspunkt og med forskjellig passasjennummer som paralleller. Utrykket av uPAR ble normalisert mot gjennomsnittet av referansegeneene Gapdh, TRFC, og  $\beta$ -Actin. Det ble deretter beregnet et gjennomsnitt av de tre RNAene slik at det ble en fold change verdi for hver cellelinje. foldregulering mellom klonene ble deretter beregnet. I figuren er kontrollen AT-84 EV 1 satt til 1, og de andre Klonene sammenlignet med EV 1. For å se på variasjonen mellom de tre RNAene ble det beregnet SEM.

SEM for AT-84-EV1 på 0,04 og AT-84 EV4 0,05.

For å teste om overuttrykk av uPAR fører til endring i uttrykket av enkelte utvalgte gener (uPA, PAI-1, Mmp 9, Mmp 2 og S100A4) ble mRNA nivåene til disse analysert ved RT-qPCR.

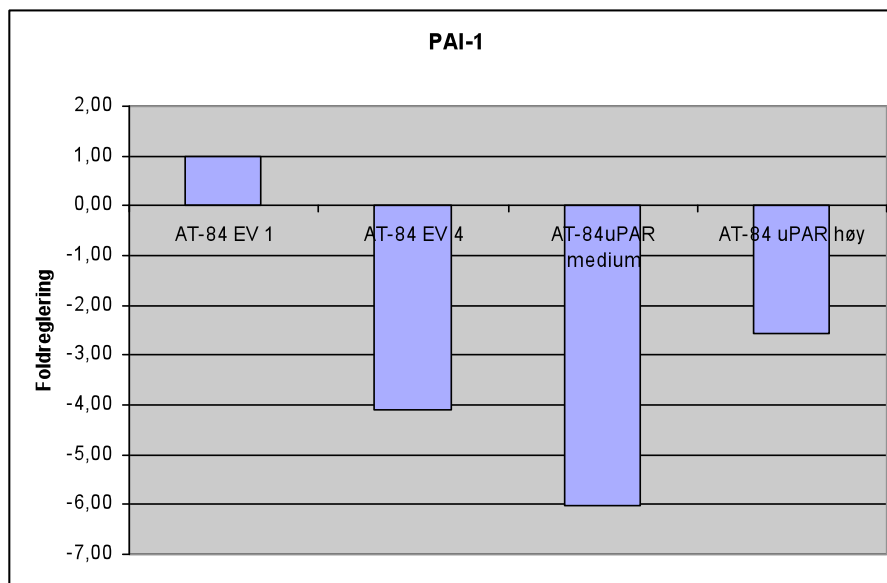
Det er vist at uPA nivåene ofte er oppregulert i de samme kreftcellene som har høye nivåer av uPAR (Ref). Resultatet av RT-qPCR analysen viste imidlertid at overuttrykket av uPAR i AT-84 cellene ikke førte til en oppregulering av uPA (Figur 3.3). Derimot var uPA nedregulert to ganger i AT-84-uPAR høy og fire ganger i AT-84-uPAR medium sammenlignet med AT-84-EV 1. SEM?



**Figure 3.3: uPA nivået i AT-84 klonene analysert ved RT-qPCR.**

Det ble brukt tre RNA isolert på forskjellige tidspunkt og med forskjellig passasjennummer som paralleller. Utrykket av uPA ble normalisert mot gjennomsnittet av referansegenene Gapdh, TRFC, og  $\beta$ -Actin. Det ble deretter beregnet et gjennomsnitt av de tre RNAene slik at det ble en fold change verdi for hver cellelinje. foldregulering mellom klonene ble deretter beregnet. I figuren er kontrollen AT-84 EV 1 satt til 1, og de andre klonene sammenlignet med EV 1.

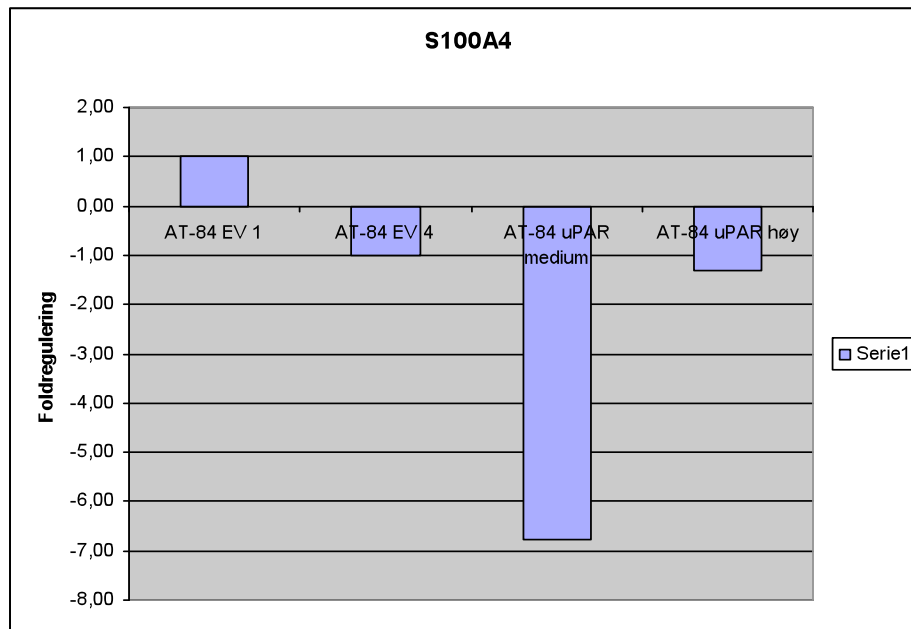
PAI-1 er en inhibitor av aktiveringen av uPA og det ble derfor testet om uttrykket av PAI-1 også var endret som følge av uPAR overuttrykket. Resultatet viste at uttrykket av PAI-1 var 2 ganger nedregulert i AT-84-uPAR høy og seks ganger nedregulert i AT-84-uPAR medium sammenlignet med AT-84-EV 1 (Figure 3.4). SEM?



**Figure 3.4: Nivået av PAI – 1 i AT-84 klonene analysert ved RT-qPCR.**

Det ble brukt to RNA isolert på forskjellige tidspunkt. PAI-1 uttrykket ble normalisert mot gjennomsnittet av referansegenene Gapdh, TRFC, og  $\beta$ -Actin. Det ble deretter beregnet et gjennomsnitt av de to RNAene slik at det ble en fold change verdi for hver cellelinje. Foldregulering mellom klonene ble deretter beregnet. I figuren er kontrollen AT-84 EV 1 satt til 1, og de andre klonene sammenlignet med EV 1. Uttrykket av PAI-1 er da nedregulert omtrent 2 ganger i AT-84 uPAR høy i forhold til At-84 EV 1. Det ble også beregnet en SEM, men verdiene er for små til å vises på figuren.

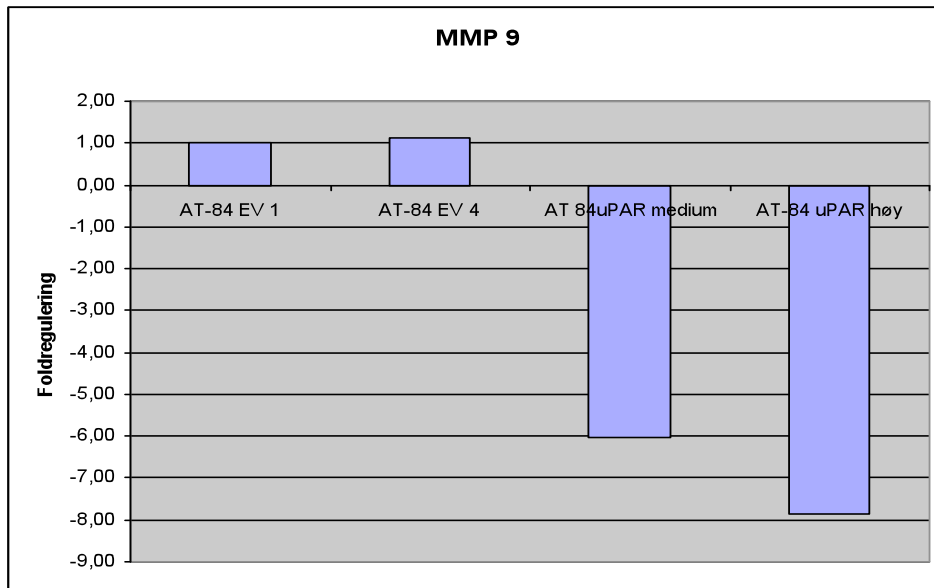
S100A4 er et protein som er funnet å kunne påvirke uttrykket av utvalgte MMPer (Ref). Det er også publikasjoner som foreslår at uttrykket av S100A4 og uPAR kan være koblet (Ref). Det ble derfor testet om overuttrykket av uPAR førte til endringer av S100A4 uttrykket. Resultatet viste at uttrykket av S100A4 ble nedregulert 1 gang i AT-84 uPARhøy, mens uttrykket i AT-84-uPARmedium var nedregulert seks ganger sammenlignet med AT-84 EV1(Figur 3.5).



**Figure 3.5: Nivået av S100A4 i AT-84 klonene ble analysert ved bruk av RT-qPCR.**

Det ble brukt to RNA isolert på forskjellige tidspunkt. S100A4 ble normalisert mot gjennomsnittet av referansegeneene Gapdh, TRFC, og  $\beta$ -Actin. Det ble deretter beregnet et gjennomsnitt av de to RNAene slik at det ble en fold change verdi for hver cellelinje. Foldregulering mellom klonene ble deretter beregnet. I figuren er kontrollen AT-84 EV 1 satt til 1, og de andre klonene sammenlignet med EV 1. Uttrykket av S100A4 er da nedregulert i AT-84 uPAR høy i forhold til AT-84 EV 1. Beregnet SEM

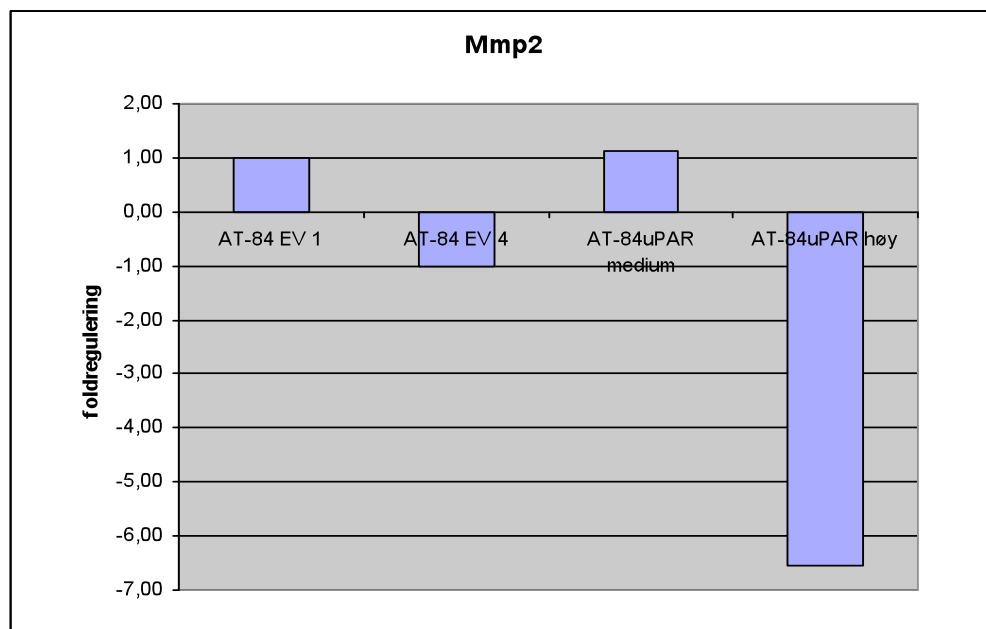
Det ble også testet om overuttrykket av uPAR ført til endring av MMP-9 og MMP-2 nivåene. Resultatet viser at uttrykket av MMP-9 i uPAR medium er nedregulert 6 ganger, mens det er omtrent 7 ganger nedregulert i AT-84-uPAR høy sammenlignet med AT-84-EV1 (figur 3.6).



**Figure 3..6 Nivået av Mmp 9 i AT-84 klonene analysert ved RT-qPCR.**

Det ble brukt to RNA isolert på forskjellige tidspunkt. MMP-9 ble normalisert mot gjennomsnittet av referansegeneene Gapdh, TRFC, og  $\beta$ -Actin. Det ble deretter beregnet et gjennomsnitt av de to RNAene slik at det ble en fold change verdi for hver cellelinje. Foldregulering mellom klonene ble deretter beregnet. I figuren er kontrollen AT-84 EV 1 satt til 1, og de andre Klonene sammenlignet med EV 1. Utrykket av MMP 9 er da nedregulert i AT-84 uPAR høy i forhold til At-84 EV 1. Det ble også beregnet en SEM, men

uttrykket av MMP-2 i AT-84-uPAR høy er nedregulert seks ganger sammenlignet med AT-84-EV1. I motsetning til MMP-9 ble uttrykket av MMP-2 oppregulert 1 gang i AT-84 uPAR medium sammenlignet med AT-84-EV 1(figur 3.7).



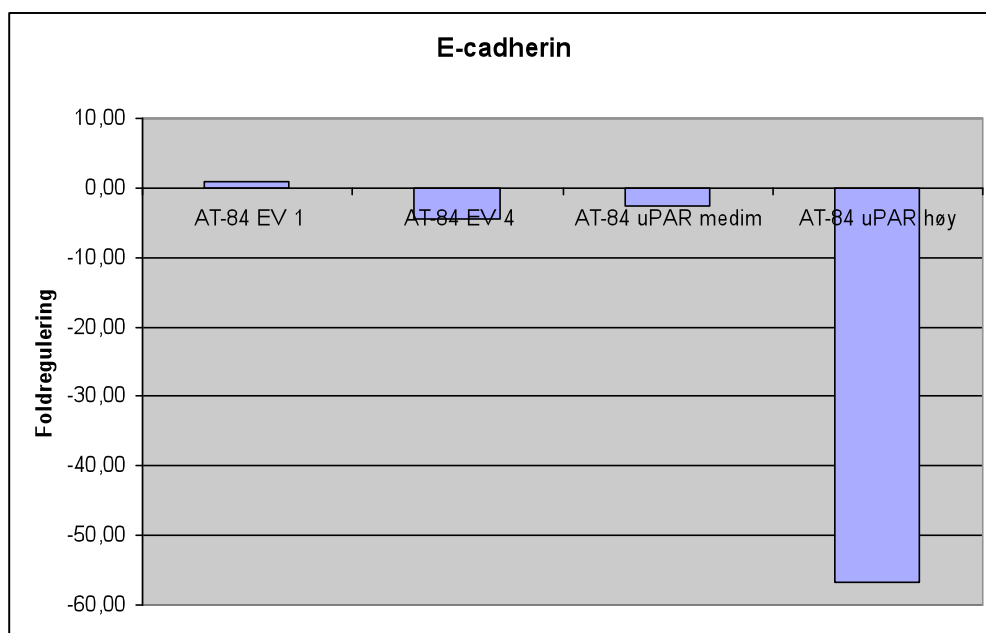
**Figure 3.7 Nivået av MMP 2 i AT-84 klonene ble analysert ved bruk av RT-qPCR.**

Det ble brukt to RNA isolert på forskjellige tidspunkt. Klonene ble normalisert mot gjennomsnittet av referansegeneene Gapdh, TRFC, og  $\beta$ -Actin. Det ble deretter beregnet et gjennomsnitt av de to RNAene slik at det ble en fold change verdi for hver cellelinje. Foldregulering mellom klonene ble deretter beregnet.

I figuren er kontrollen AT-84 EV 1 satt til 1, og de andre Klonene sammenlignet med EV 1. Utrykket av Mmp 2 er da nedregulert i AT-84 uPAR høy i forhold til At-84 EV 1. Sem beregnet

E-cadherin nivåene ble analysert fordi tidligere studier har vist at høye nivåer av uPAR er assosiert med redusert uttrykk av E-cadherin (Ref). Mengden E-cadherin er også en markør for graden av EMT som er prosessen der epitelceller mister deres epitel morfologi og går over til å bli mer mesenchymallignende celler. Denne prosessen er blant annet viktig for tumor invasjon. E-cadherin er et celle-celle adhesjonsmolekyl og binder epitelceller til hverandre. Det vil derfor være mindre E-cadherin i de cellene som har gjennomgått mest EMT. For å teste om overuttrykk av uPAR i AT-84 har endret E-cadherin uttrykk ble E-cadherin analysert på RT-qPCR

Resultatet viser at AT-84-uPARhøy og AT-84-uPARmedium har nedregulert uttrykk av E-cadherin sammenlignet med EV1 (Figur 3.8)



**Figure 3.8: Nivået av E-cadherin i AT-84 klonene analysert ved RT-qPCR.**

Det ble brukt to RNA isolert på forskjellige tidspunkt. Klonene ble normalisert mot gjennomsnittet av referansegeneene Gapdh, TRFC, og  $\beta$ -Actin. Det ble deretter beregnet et gjennomsnitt av de to RNAene slik at det ble en fold change verdi for hver cellelinje. Foldregulering mellom klonene ble deretter beregnet.

I figuren er kontrollen AT-84 EV 1 satt til 1, og de andre klonene sammenlignet med EV 1. Utrykket av E-cadherin er da nedregulert i AT-84 uPAR høy i forhold til At-84 EV 1. Det ble også beregnet en SEM.



### 3.4. WESTERNBLOTT PÅ E-CADHERIN

For å bekrefte at klonene med høyt uttrykk av uPAR har nedregulert E-cadherin proteinnivå sammenlignet med kontrollene ble E-cadherin analyser med westerblott

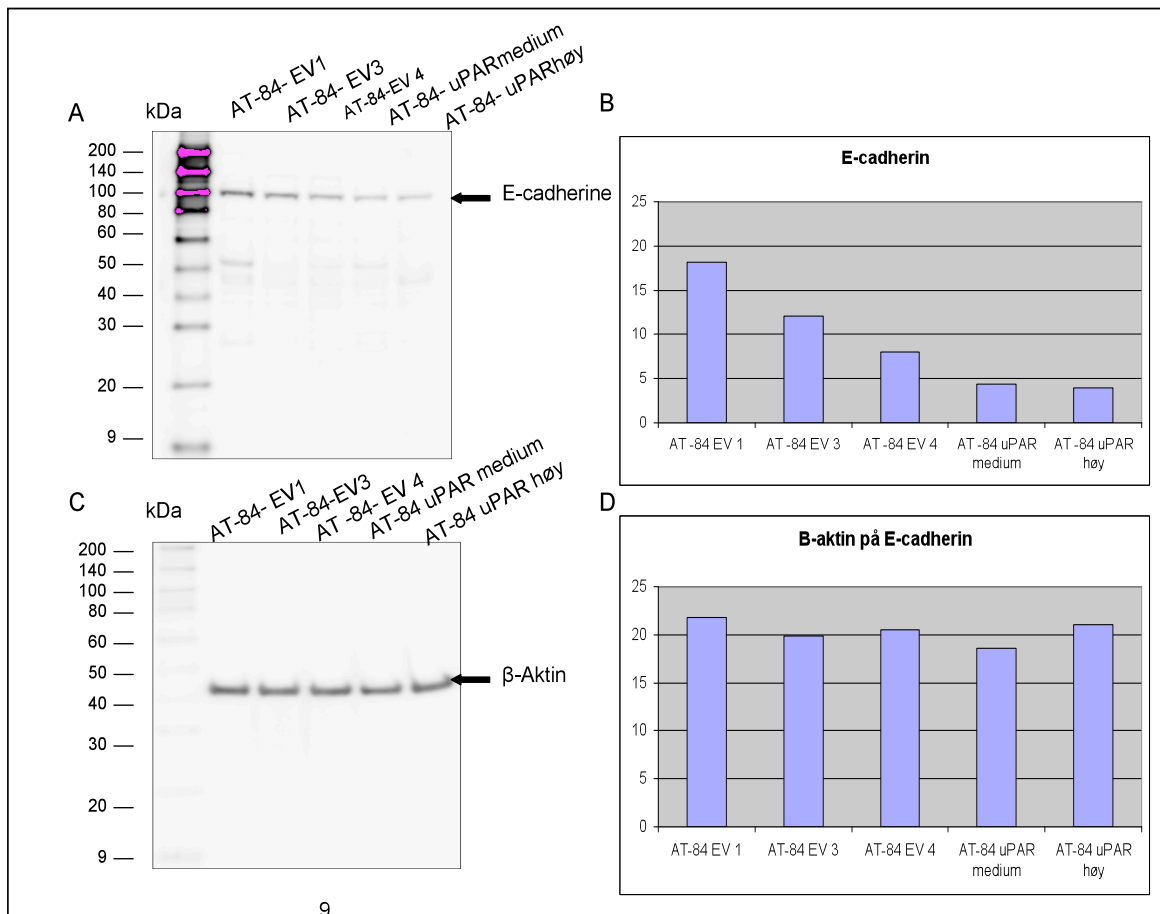


Figure 3.9: Analyse av E-cadherinnivåene i AT-84 klonene A) Westernblott av klonene AT-84-EV1, AT-84-EV 3, AT-84-EV4, AT-84-uPARmedium og AT-84-uPARhøy. Cellelysate med 10 000 celle/ $\mu$ l (10 $\mu$ l i hver brønn) ble separert ved elektroforese på NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel 1,0x12 brønner og deretter blottet over på en PVDF membran under reduserte betingelser. Det ble tilsatt Primært antistoff mus Anti-E-cadherin fortynnet 1:2500 i 5 ml blokkingsbuffer og inkubert over natt. Sekundært antistoff Anti mus IgG konjugert med HRP fortynnet 1:1000 i 5 ml blokkingsbuffer ble deretter tilsatt og inkubert i 1 time B) Kvantitering av E-cadherin uttrykket i (A) ved Multi Gauge –Ver3.0-. C) Mengden  $\beta$ -actin i cellelysaten analysert ved westernblott. Membranen i A ble strippet ved hjelp av Re-Blot strong solution og deretter tilsatt Monoklonal anti  $\beta$ -Actin peroxidase fortynnet 1:10 000 i 5 ml Blokkingsbuffer. Båndene ble detektert via luminiscence. D) Kvantitering av  $\beta$ -actin ved Multi Gauge –Ver 3.0-.

I figur 3.4 A og B viser tydelige forskjeller i klonenes uttrykk av E-cadherin. E-cadherin har en molekylvekt på 120 kDa og de sterke båndet som ligger på omtrent 100 kDa korresponderer mest sannsynlig til E-cadherine. Man ser ut fra A og B at E-cadherine uttrykkes mer i AT-84-EV1, AT-84-EV3 og AT-84-EV 4 sammenlignet med AT-84 - uPARmedium og AT-84-uPARhøy. Westernblottet viser det samme på proteinnivå som RT-qPCR gjør på mRNA nivå. Klonene med overuttrykk av uPAR har et lavere uttrykk av E-cadherine sammenlignet med kontrollene.

### **3.5 RT<sup>2</sup> Profiler**

For å finne ytterligere gener som var påvirket av overuttrykket av uPAR, så ble det gjort en screen ved bruk av en RT-qPCR basert metode kalt RT<sup>2</sup>-profiler der mRNA nivået til 84 gener knyttet til kreft ble analysert på PAMM 033A mus Cancer Pathway fra SABioscience.

Alle tre RNA isoleringene (RNA1, RNA2 og RNA3) fra AT-84-EV1, AT 84-EV4 AT-84uPARmedium og AT-84uPAR høy ble analysert. Som et mål på hvor stor innvirkning transfeksjonen og seleksjonen av kloner hadde på uttrykket av genene, ble AT-84 EV 1 og AT-84 EV 4 sammenlignet (Tabell 3.4). Gener med mer enn tre verdier i forskjell på fold endring sammenlignet med EV 1 og EV 4 er listet opp i tabell 3.5 og 3.6 i appendiks er det oversikt over alle genene som ble analysert på RT<sup>2</sup> (Tabell 7.4-7.9).

For å beregne fold endring på alle de 84 genene ble programmet, RT<sup>2</sup> profiler PCR array data analysis, på nettsiden til SABiosciences brukt.

<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>

Av alle 84 genene ble det valgt ut de genene som hadde en fold endring på over tre ct verdier.

For å se om det kunne beregnes et gjennomsnitt av kontrollene, ble fold endringen mellom kontrollene fastsatt. Resultatet viser at det er store forskjeller mellom kontrollene AT-84-EV1 og AT-84-EV4 (Tabell 3.4)) og resulterte i at kontrollene ikke ble beregnet sammen.

**Tabell 3.4:** Liste over gener med mer enn 3 fold endring i uttrykket mellom AT-84 EV 1 og AT-84 EV 4, der EV 1 er satt som kontroll gruppe.

Gener	EV 4 RNA 1	EV 4 RNA 2	EV 4 RNA 3
Angpt1	1,3632	1,7484	23,9674
Bcl2	1,2201	3,2065	1,3177
casp 8	-3,3589	-1,0345	-11,0579
Cflar	-1,8895	-2,7302	3,4176
Col18a1	-3,4895	-3,7038	-4,0334
Ctnnb	-3,9531	-2,172	-87,5479
Fas	5,1946	2,9506	6,7179
Fos	-3,134	2,8799	1,5616
Hgf	4,5378	1,425	2,7568
Ifnb1	7,1701	5,8401	1,4825
Itgb3	-5,7877	-14,3105	-13,1501
Mcam	-5,2707	-1,8138	1,87
Met	-12,3634	-2,7683	-87,245
Myc	-1,2596	2,5509	-3,9395
Pdgfb	-1,1119	-1,0345	-11,4876
Pten	1,387	-1,3095	3,9945
Serpine	-5,7279	-3,6655	2,9856
Tert	9,7676	-2,4691	-6,8069
Vegfa	-2,7473	-3,9422	-1,1227

Gener med opp og nedregulering på mer enn tre Ct verdier som RNA 1, 2 og 3 hadde til felles ble valgt ut for hver kontroll og sammenlignet. Tabell 3.5 viser opp og nedregulering av de utvalgte genene sammenlignet med EV 1 for alle de tre RNAene, og tabell 3.6 viser opp og nedregulering av utvalgte gener sammenlignet med EV 4 for alle de tre RNAene. Som tabellene viser er det stor individuelle forskjeller for opp og nedregulering av genene mellom de tre RNAene.

**Tabell 3.5:** Fold endring av utvalgte gener i AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy sammenlignet med EV<sub>1</sub>.

Gener	AT-84 uPAR medium			AT-84 uPAR Høy		
	RNA 1	RNA 2	RNA 3	RNA 1	RNA 2	RNA 3
Angpt1	-1,27	-4,54	5,51	-4,21	-8,92	-1,16
Brac 1	-1,77	-2,24	2,11	-4,39	-4,16	1,24
BCI2l1	-1,97	-1,33	1,02	-3,24	-6,20	-2,80
Brac 1	-1,77	-2,24	2,11	-4,39	-4,16	1,24
Casp 8	-3,16	-1,09	-12,66	-3,32	-1,03	-12,56
cdh1	-1,94	1,23	1,66	-18,90	-4,32	-6,64
Col18a1	-17,51	-9,07	-4,75	-1,83	-2,46	-1,95
Chek2	-1,42	-1,75	-2,79	-1,74	-4,66	-3,44
Ctnnb1	-2,52	-1,57	-10,32	-1,23	-13,61	-86,30
Fos	-2,36	1,32	-4,65	-3,01	-1,43	-9,96
Itgb3	-13,09	-15,10	-15,06	-8,63	-14,23	-14,94
Mcam	-2,35	-1,89	2,75	-5,78	-3,76	-2,59
Mdm2	-2,34	-1,54	1,63	-9,03	-5,07	1,04
Met	-5,28	-4,84	-65,91	-4,84	-9,29	-99,13
Mmp9	-3,78	-2,12	-5,99	-2,44	-2,07	-3,61
Plaur	3,43	3,08	2,64	5,74	4,70	4,43
Pten	1,82	-5,05	4,26	2,11	-2,09	-2,22
Serpine 1	-4,79	-2,69	-1,42	-8,43	-3,65	-1,41
Tert	-1,67	-3,02	-4,77	-1,21	1,82	-30,09
Plau	-2,28	-1,93	1,10	5,74	-2,07	1,35
Mmp2	-1,06	-1,56	-1,09	-1,48	-1,40	-2,40
S100A4	-2,11	-1,03	-3,20	-1,15	1,53	-1,33

**Tabell 3.6:** Fold endring av utvalgte gener i AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy sammenlignet med EV 4

Gener	AT-84 uPAR medium			AT-84 uPAR høy		
	RNA 1	RNA 2	RNA 3	RNA 1	RNA 2	RNA 3
Angpt1	-1,63	-7,41	-3,91	-5,42	-14,56	-25,02
Bcl2l1	1,11	1,29	-1,60	-1,49	-3,63	-4,59
cdh1	-1,05	2,28	1,12	-10,22	-2,34	-9,85
Chek2	1,90	3,56	-3,30	1,59	1,34	-4,06
ctn nb1	1,66	1,49	9,44	3,40	-5,85	1,13
Fas	-5,13	-1,96	-1,90	-5,38	-2,84	-8,52
Figf	1,07	-1,47	-1,85	-1,23	-5,44	-2,13
Fos	1,41	-2,03	-6,53	1,10	-3,83	-13,98
lfnb	-7,08	-5,95	-1,89	-6,61	-4,50	-1,88
Mmp 9	-2,84	-4,92	-4,82	-1,83	-5,66	-3,41
Plaur	4,20	5,82	2,98	7,02	8,88	4,99
Pten	1,39	-3,60	1,19	1,61	-1,49	-7,97
Tert	6,20	-1,14	1,59	8,58	4,81	-3,97
Mmp2	-1,01	-1,48	1,30	-1,41	-1,33	-1,68
Plau	-1,08	-1,28	1,65	2,70	-1,37	-1,36
serpine 1	1,27	1,46	-3,81	-1,39	1,08	-3,78
S100A4	-1,58	-2,12	-2,77	1,16	-1,35	-1,15

Genene som ble kjørt enkeltvis på RT-qPCR uPAR, uPA, PAI-1, S100A4, MMP-9, MMP-2 og E-cadherin er også i finne på RT<sup>2</sup> profiler. Resultatet fra platen er i samsvar med resultatene der genene ble kjørt enkeltvis. Uttrykket av uPAR (*plaur*) er høyere i klonen uPAR AT-84-uPARhøy og litt mindre i AT-84-uPARmedium. Begge er oppregulert sammenlignet med kontrollene AT-84-EV1 og AT-84-EV4. Uttrykket av uPA (*plau*) er nedregulert både i AT-84 uPAR medium, og AT-84 uPAR høy i forhold til kontrollvektor på platen og enkeltkjøringen på RT-qPCR. PAI-1 (*Serpine-1*) er også å finne på platen der det er nedregulering av uttrykket både i AT-84-uPARmedium og AT-84 uPARhøy. S100A4 er også nedregulert i AT-84-uPAR klonene i likhet med enkeltkjøringen. MMPene viser også samsvar mellom genuttrykk på RT<sup>2</sup>-profiler og enkeltkjøring på qPCR.

## 4. Diskusjon

### **4.1 verifisering av uPAR på westernblott**

Vektoren pDest/TO/PGK-puro/uPAR ble brukt til å klonere inn muse uPAR genet i AT-84 cellene. Avhengig av hvor vektoren setter seg i genomet kan man få forskjellig uttrykk av uPAR. Ved å analysere både mRNA og proteinnivåene av uPAR i de selekterte klonene ble det vist at klonene hadde forskjellig uttrykk av uPAR. Den ene klonen uttrykker høye nivåer av uPAR, AT-84 uPAR høy, noe som kan skyldes at vektoren har satt seg en plass i genomet som er åpent og der promotoren i vektoren er aktiv og gjør at uPAR uttrykkes hele tiden. Som RT-qPCR og westernblottet viser har det også blitt dannet en klon som uttrykker middels nivåer av uPAR (AT-84 uPAR medium). Dette tyder på at vektoren har satt seg en plass hvor en promotor ikke er like aktiv som den i uPAR høy. Som kontroll ble kloner av celler som hadde blitt transfektert med tom vektor isolert og disse hadde veldig lave nivåer av endogent uPAR.

uPAR er modifisert av N-linkede glykosyleringer i alle tre domenene. Glykosyleringen av uPAR varierer, noe som vises på westernblottet av uPAR ved at båndet som representerer uPAR er mye bredere enn f.eks båndet til  $\beta$ -actin. Dette er karakteristisk for uPAR og skyldes den ulike graden av glykosyleringen.

$\beta$ -actin ble brukt som et mål på mengden applisert prøve. Både gelen og densometriet viser at det er jevn applisering

## **4.2 uPAR og Aktivering av plasminogensystemet.**

Urokinase plasminogen activator systemet har vist seg å ha en viktig rolle i flere forskjellige prosesser blant annet tumorvekst og metastasering. Systemet består av serine proteasene uPA, uPAR og serine proteaseinhibitorene PAI-1 og PAI-2. uPA aktiveres ved å binde uPAR og aktiv uPA kløyver plasminogen til plasmin. Plasmin kan degradere ECM direkte ved binding til ECM komponenter og indirekte ved å aktivere MMP som igjen degraderer ECM ved å binde ECM komponenter. For å analysere om overuttrykk av uPAR har påvirket uttrykket av gener i plasminogensystemet ble uttrykket av uPA, PAI-1, MMP-2 og MMP-9 analysert ved RT-qPCR.

Studier har vist en korrelasjon mellom mengdene til komponentene uPA, uPAR og PAI-1 i oralt plateepitelkarsinom [36] og mellom uPA og PAI-1 [47]. uPA aktiveres ved å binde uPAR. På grunnlag av dette ble det antatt at både uttrykket av uPA og PAI-1 var oppregulert i klonene AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy sammenlignet med kontrollene. I motsetningen til studiene er det funnet nedregulering av uPA og PAI-1 i AT-84 klonene med overuttrykt uPAR sammenlignet med kontrollen EV 1. Det er korrelasjon mellom uPA og PAI-1. Siden uPA ser ut til å være nedregulert er det også naturlig at inhibitoren av uPA er nedregulert.

S100A4 er et kalsiumbindende protein assosiert med invasjon og metastasering av kreftceller, og er blitt rapportert til å være overuttrykt i ulike kreft typer deriblant plateepitelkarsinom. S100A4 er vist å være involvert i reguleringen av MMPer. En studie har vist korrelasjon mellom S100A4 og MMP-9, der overuttrykk av S100A4 genet signifikant økte MMP-9 uttrykket [48]. I tillegg ble det også vist at uttrykket av S100A4 påvirket uttrykket av uPAR. En nedregulering av S100A4 gav også nedregulering av uPAR. Derfor ble det testet om endringen av uPAR uttrykket påvirket uttrykket av S100A4. Det ble funnet nedregulering av S100A4 i klonene overuttrykt med uPAR, AT-84uPARmedium og AT-84-uPARhøy sammenlignet med kontrollen EV 1, og viser dermed at det ikke er noen korrelasjon mellom uttrykket av uPAR og uttrykket av S100A4, som tidligere vist.

aktiv uPA kløyver plasminogen til aktiv plasmin, som igjen kan aktivere MMPer ved å kløyve pro-MMP til aktiv MMP. Plasmin ser ut til å hovedsakelig aktivere MMP-1, MMP-3 og til en viss grad MMP-9. Det er også bevis for at uPA og plasmin kan aktivere pro-MMP-2. Til sammen kan økt MMP uttrykk føre til tumor invasjon og metastasering [49]. Det er også vist korrelasjon mellom uPAR-uPA og MMP-2 uttrykket i bukspyttkjertelkreft. Utrykket av uPA var økt i metastaserende kreft i bukspyttkjertelen samtidig som det var overuttrykk av den aktive formen av MMP-2 [49]. Det er også funnet samsvar mellom nedregulering av uPAR uttrykket og samtidig reduksjon av MMP-2 og MMP-9 i oralt plateepitelkarsinom [50].

Tidligere studier viser at overuttrykk av uPAR fører til aktivering av MMPer. Derfor var forventet at uttrykk av MMP-9 og MMP-2 i klonene med overuttrykk av uPAR skulle være oppregulert. I midlertidig viste resultatet en nedregulering av både MMP-2 og MMP-9 sammenlignet med begge kontrollene AT-84-EV4 og AT-84-EV1

I motsetninger til de tidligere studiene ble det ikke funnet noen korrelasjon mellom overuttrykk av uPAR og PAI-1, uPA, S100A4 og MMP2, men klonene med overuttrykk av uPAR viste en nedregulering av MMP-9

### **4.3 E-cadherin og EMT**

EMT beskriver prosessen der epitelceller gradvis mister deres epitel karakteristikk og går over til en mesenchymal-lignende form. Prosessen er blant annet viktig for metastasering. E-cadherin er et celle-celle adhesjonsmolekyl som fester epitelceller til hverandre på epiteloverfalten og har vist seg å være nedregulert under EMT. For å sjekke om uttrykket i klonene med høyt uttrykk av uPAR hadde nedregulert E-cadherin nivå ble det brukt westernblott på proteinnivå og RT-qPCR på mRNA nivå. Det har tidligere blitt vist at overuttrykk av uPAR i celler har nedregulert uttrykk av E-cadherin og at uPAR dermed fremmer EMT[44]. (uPA) Som tidligere studier og har vist var uttrykket av E-cadherin i klonene med overuttrykk av uPAR nedregulert sammenlignet med kontrollvektorene AT-84-EV1 og AT-84-EV4. Dette kan indikere at klonene som overuttrykker uPAR mer mesenchymale fenotyper.



## **4.4 uPAR og RT<sup>2</sup> profiler.**

### **4.4.1 Metode og valg av kloner**

Som man ser ut fra resultatene er det store variasjoner mellom Kontrollene AT-84 EV 1 og AT-84 EV4, i tillegg til at det er variasjoner mellom de tre RNAene. For at metoden skulle vært optimal burde det vært flere kloner slik at man hadde fått flere paralleller, som igjen hadde gitt et sikrere resultat ved at flere kloner kunne blitt sammenlignet.

### **4.4.2 RT<sup>2</sup>- Profiler viser sammenheng med enkeltkjøring av qPCR.**

Som vist i resultatdelen er det sammenheng mellom uttrykk av gener kjørt på enkelt RT-qPCR og de samme genene kjørt på RT<sup>2</sup>-profiler. Dette styrker resultatet for de genene

Genene som tabell 3.5 og 3.6 har til felles ble valgt ut og undersøkt for en eventuell korrelasjon med uPAR eller oralkreft.

Angiopoietin 1(Ang-1) er nedregulert sammenlignet med både AT-84-EV1 og AT-84-EV4. Angiopoietin-1 binder Tie2 reseptor og har en viktig rolle i vaskulær utvikling. Det har blitt vist at det Ang-1 er blitt assosiert med tilbakevendende oralt plateepitelkarsinom, der forhøyede verdier av Ang-1 assosiert med aggressive tumorer.

Et annet gen som er viste endringer i uttrykt med mer enn tre ct-verdier sammenlignet med både AT-84-EV1 og AT-84-EV4 er Ctnnb1 (catenin  $\beta_1$ ).  $\beta$ -cateniner er multifunksjonelt og binder blant annet E-cadherin til aktin cytoskjelettet [55]. Blant annet i chaderin-mediert epitel celle-celle adhesjoner og i celsignalering Cateninener binder E-cadherin til aktin cytoskjelettet. Det har blitt vist at det er korrelasjon mellom uPA og uPAR og Wnt/ $\beta$ -catenin signalering i tykktarmskreft. Nedregulering av  $\beta$ -catenin økte uttrykket av uPA og uPAR og PAI-1[56]. På platen viser resultatet er uttrykket av Ctnnb1 nedregulert sammenlignet med AT-84- EV1 og oppregulert sammenlignet med AT-84-EV 4.

Integriner er som nevnt i introduksjonene et av de viktigste adhesjonsmolekylene for uPAR signalering. Binding til både  $\beta_1$  og  $\beta_3$  integriner har aktivert signaleringsveier som gir celleadhesjon, migrasjon og invasjon. Resultatet her viser at Integrin  $\beta_3$  (Itgb3) er nedregulert i både uPARmedium og uPARhøy i forhold til kontroll AT-84-EV1, men viser ingen opp eller nedregulering sammenlignet med AT-84-EV4 og er derfor ikke å finne i tabell 3.6. Resultatet på platen viste ingen korrelasjon mellom integrinene og uPAR.

Siden det er så store forskjeller mellom kontrollene er det vanskelig å si noe ut fra genes regulering og viser igjen at flere parallelle kloner ville styrket metoden.

## 5 Konklusjon

Overuttrykk av uPAR i den orale plateepitelkarsinom cellelinjen AT-84 gav en nedregulering av MMP-9 og E-cadherine uttrykket, men uttrykket av PAI-1, S100A4, MMP-2 og uPA ble ikke endret. En screening av 84 kreftrelaterte gener viste at mange av genene var mer påvirket av klonene og til og med ulike RNA prøver til at det mulig å identifisere andre endringer. Det er derfor nødvendig å analysere et større antall kloner for å få statistisk signifikant svar på hvilke gener som er endret i celler med overuttrykk av uPAR

## 6. Referanser

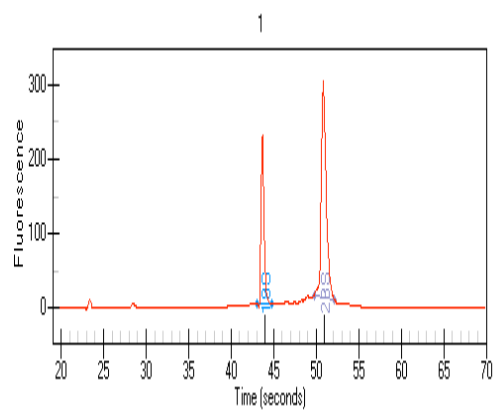
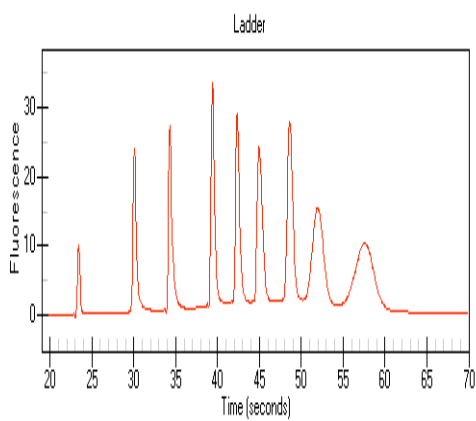
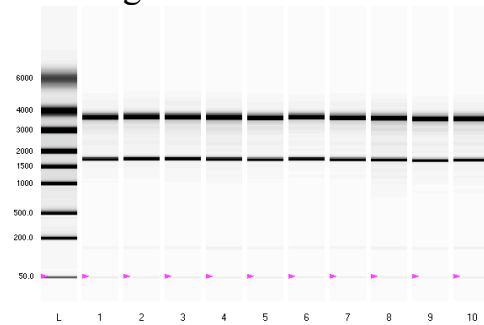
1. Hadler-Olsen, E.S., *Oral and skin squamous cell carcinomas: role of the microenvironment in tumor progression*, University of Tromsø, Faculty of Health Sciences, Institute of Medical Biology, The Tumor Biology Research Group: [Tromsø]. p. 1 b. (flere pag.).
2. Kirsch, C., *Oral cavity cancer*. Top Magn Reson Imaging, 2007. **18**(4): p. 269-80.
3. Stambuk, H.E., et al., *Oral cavity and oropharynx tumors*. Radiol Clin North Am, 2007. **45**(1): p. 1-20.
4. *Krefregisteret Norge cancer in Norway cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway*. 2008.
5. Hirota, S.K., et al., *Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2008. **13**(4): p. E227-31.
6. Bagan, J., G. Sarrion, and Y. Jimenez, *Oral cancer: Clinical features*. Oral Oncol.
7. Scully, C. and J. Bagan, *Oral squamous cell carcinoma overview*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 301-8.
8. Scully, C. and J. Bagan, *Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications*. Oral Dis, 2009. **15**(6): p. 388-99.
9. Boffetta, P., et al., *Smokeless tobacco and cancer*. Lancet Oncol, 2008. **9**(7): p. 667-75.
10. Petti, S., *Lifestyle risk factors for oral cancer*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 340-50.
11. Fasanmade, A., E. Kwok, and L. Newman, *Oral squamous cell carcinoma associated with khat chewing*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. **104**(1): p. e53-5.
12. Sawair, F.A., et al., *High relative frequency of oral squamous cell carcinoma in Yemen: qat and tobacco chewing as its aetiological background*. Int J Environ Health Res, 2007. **17**(3): p. 185-95.
13. Hennessey, P.T., W.H. Westra, and J.A. Califano, *Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications*. J Dent Res, 2009. **88**(4): p. 300-6.
14. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. Lancet Oncol.
15. Vinay Kumar, R.s.C., Stanley I. Robbins, *Basic Pathology*. 2003.
16. Schoppet, M., et al., *Molecular interactions and functional interference between vitronectin and transforming growth factor-beta*. Lab Invest, 2002. **82**(1): p. 37-46.
17. Madsen, C.D. and N. Sidenius, *The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(8-9): p. 617-29.
18. A. Weinberg, R., *The Biology of cancer*. 2007.
19. Pollard, T.D. and W.C. Earnshaw, *Cell biology*. 2002, Philadelphia: Saunders. XIV, 805 s.

20. Ziober, A.F., E.M. Falls, and B.L. Ziober, *The extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma: friend or foe?* Head Neck, 2006. **28**(8): p. 740-9.
21. Lyons, A.J. and J. Jones, *Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma.* Int J Oral Maxillofac Surg, 2007. **36**(8): p. 671-9.
22. Sano, D. and J.N. Myers, *Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue.* Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 645-62.
23. Jung, J., et al., *Significant invasion depth of early oral tongue cancer originated from the lateral border to predict regional metastases and prognosis.* Int J Oral Maxillofac Surg, 2009. **38**(6): p. 653-60.
24. De Wever, O. and M. Mareel, *Role of tissue stroma in cancer cell invasion.* J Pathol, 2003. **200**(4): p. 429-47.
25. Alberts, B., *Molecular biology of the cell: reference edition.* 2008, New York: Garland Science. XXXIII, 1601 s.
26. Margaritescu, C., et al., *VEGF and VEGFRs expression in oral squamous cell carcinoma.* Rom J Morphol Embryol, 2009. **50**(4): p. 527-48.
27. Ploug, M., *Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor.* Curr Pharm Des, 2003. **9**(19): p. 1499-528.
28. Blasi, F. and P. Carmeliet, *uPAR: a versatile signalling orchestrator.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 932-43.
29. Vincenza Carriero, M., et al., *Structure, function and antagonists of urokinase-type plasminogen activator.* Front Biosci, 2009. **14**: p. 3782-94.
30. Blasi, F. and N. Sidenius, *The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling.* FEBS Lett. **584**(9): p. 1923-30.
31. Mazar, A.P., *Urokinase plasminogen activator receptor choreographs multiple ligand interactions: implications for tumor progression and therapy.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(18): p. 5649-55.
32. Jacobsen, B. and M. Ploug, *The urokinase receptor and its structural homologue C4.4A in human cancer: expression, prognosis and pharmacological inhibition.* Curr Med Chem, 2008. **15**(25): p. 2559-73.
33. Smith, H.W. and C.J. Marshall, *Regulation of cell signalling by uPAR.* Nat Rev Mol Cell Biol. **11**(1): p. 23-36.
34. Duffy, M.J., *The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy.* Curr Pharm Des, 2004. **10**(1): p. 39-49.
35. Syrovets, T. and T. Simmet, *Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin.* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(7-8): p. 873-85.
36. Baker, E.A., et al., *Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma.* Br J Oral Maxillofac Surg, 2007. **45**(8): p. 623-7.
37. Dass, K., et al., *Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers.* Cancer Treat Rev, 2008. **34**(2): p. 122-36.
38. Tang, C.H. and Y. Wei, *The urokinase receptor and integrins in cancer progression.* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(12): p. 1916-32.
39. Madsen, C.D., et al., *uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key.* J Cell Biol, 2007. **177**(5): p. 927-39.

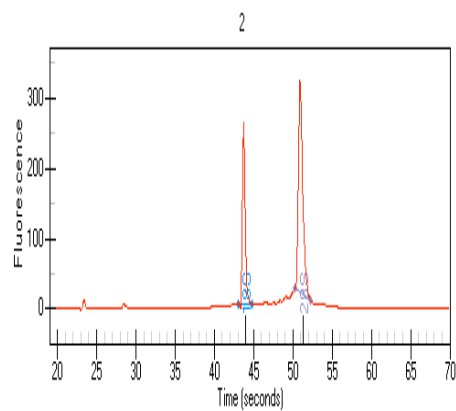
40. Wang, J., et al., *Expression of urokinase-type plasminogen activator receptor is correlated with metastases of lingual squamous cell carcinoma*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2006. **44**(6): p. 515-9.
41. Nozaki, S., et al., *Inhibition of invasion and metastasis in oral cancer by targeting urokinase-type plasminogen activator receptor*. Oral Oncol, 2005. **41**(10): p. 971-7.
42. Curino, A., et al., *Detection of plasminogen activators in oral cancer by laser capture microdissection combined with zymography*. Oral Oncol, 2004. **40**(10): p. 1026-32.
43. Ghosh, S., et al., *Urinary-type plasminogen activator receptor/alpha 3 beta 1 integrin signaling, altered gene expression, and oral tumor progression*. Mol Cancer Res. **8**(2): p. 145-58.
44. Jo, M., et al., *Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell signaling*. J Biol Chem, 2009. **284**(34): p. 22825-33.
45. E.Rasmussen, S.P.-B.K., *Legemiddelanalyse*. 2004.
46. Finnzymes, *Principles of qPCR*. 2009.
47. Hundsdorfer, B., et al., *Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value*. J Craniomaxillofac Surg, 2005. **33**(3): p. 191-6.
48. Saleem, M., et al., *S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(40): p. 14825-30.
49. He, Y., et al., *Interaction between cancer cells and stromal fibroblasts is required for activation of the uPAR-uPA-MMP-2 cascade in pancreatic cancer metastasis*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(11): p. 3115-24.
50. Zhou, H., et al., *RNAi targeting urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits metastasis and progression of oral squamous cell carcinoma in vivo*. Int J Cancer, 2009. **125**(2): p. 453-62.
51. Wang, X., et al., *The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009. **107**(4): p. 547-54.
52. Hawighorst, T., et al., *Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth*. Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1381-92.
53. Chien, C.Y., et al., *Angiopoietin-1 and -2 expression in recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity*. J Surg Oncol, 2008. **97**(3): p. 273-7.
54. Tait, C.R. and P.F. Jones, *Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch*. J Pathol, 2004. **204**(1): p. 1-10.
55. Onder, T.T., et al., *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3645-54.
56. Moreau, M., S. Mourah, and C. Dosquet, *beta-catenin and NF-kappaB cooperate to regulate the uPA/uPAR system in cancer cells*. Int J Cancer.

## 7 Appendiks

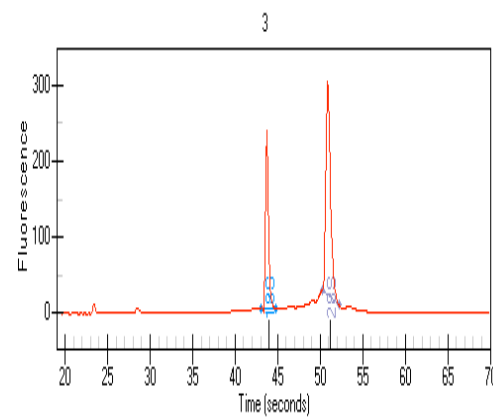
### 7.1 Integritet av RNA



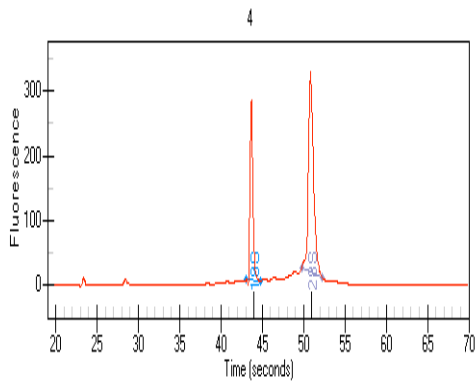
Figur 7.1.1: viser integriteten til AT-84 uPAR høy RNA 1



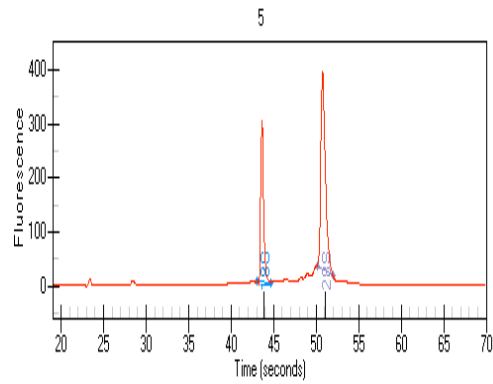
Figuren 7.1.2: visert integriteten av AT-84 uPAR Medium RNA 1



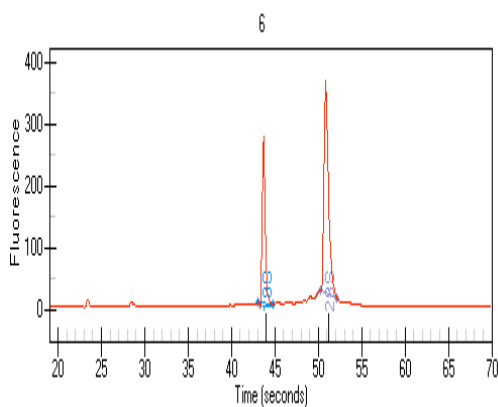
Figur 7.1. 3: Viser integriteten av AT-84 EV1RNA 1



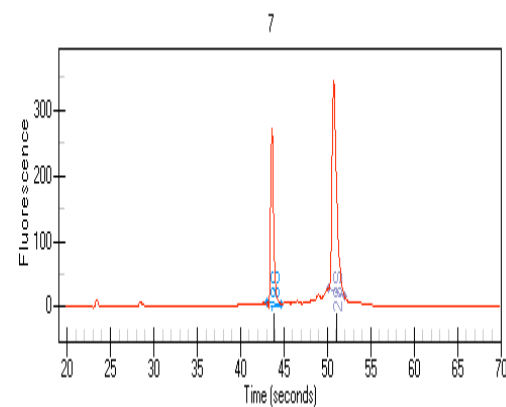
Figur 7.1. 4: Viser integriteten av AT-84 EV3 RNA 1



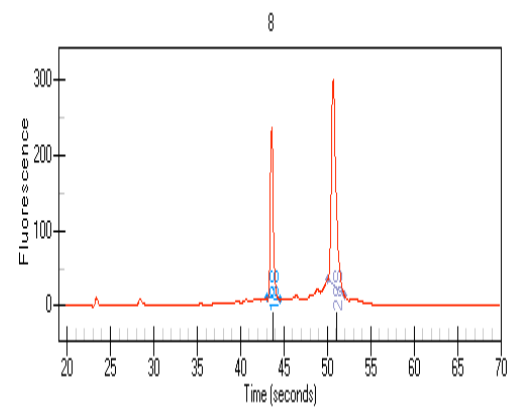
Figur 7.1.5: Viser integriteten av AT-84 EV 4 RNA 1



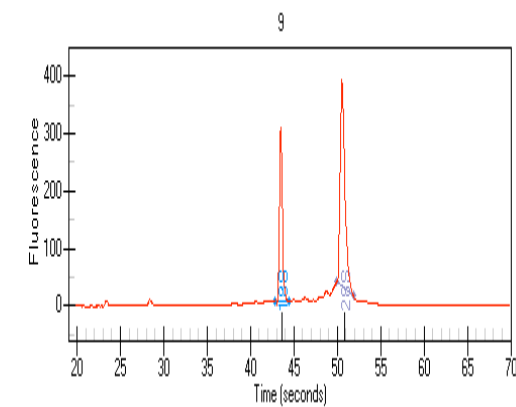
Figur 7.1.6: viser integriteten av AT-84 uPAR høy RNA 2



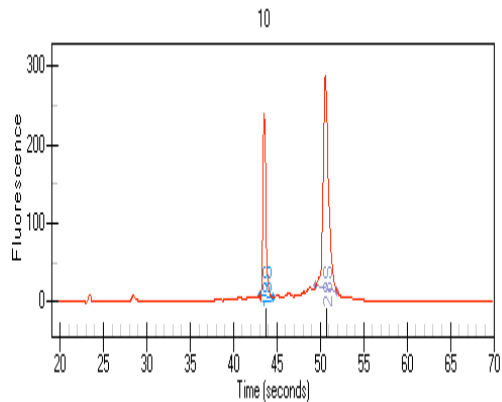
Figur 7.1.7: Viser integriteten av AT-84 uPAR medium RNA 2



Figur 7.1.8: viser integriteten av AT-84 EV 1 RNA 2



Figur 7.1.9: Viser integriteten av AT-84 EV 3 RNA 2



Figur 7.1.10: viser integriteten av AT-84 EV4 RNA 2.

## 7.2 RT<sup>2</sup> profiler

Tabellene nedenfor viser oversikten over gene RT<sup>2</sup> profiler mouse cancer Pathway (PAMM 033) fra SABioceance som ble kjørt på RT-qPCR og endringen i genuttrykket av klonene AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy normalisert mot kontrollene AT-84 EV 1 og AT-84 EV 4.

**Tabell 7.1** Sammenligning mellom tom vektore AT-84-EV1 Og AT-84-EV 4 RNA 1

		Opp og ned regulering sammenlignet til control group EV 1 RNA 1
		EV 4
A01	Akt1	1,0014
A02	Akt2	-1,0161
A03	Angpt1	1,3632
A04	Apaf1	-1,4825
A05	Atm	-1,5508



A06	Bad	-1,1551
A07	Bax	-1,0777
A08	Bcl2	1,2201
A09	Bcl2l1	-2,0534
A10	Birc5	1,0049
A11	Brca1	-1,7569
A12	Casp8	-3,3589
B01	Ccnd1	-1,8
B02	Ccne1	-1,0231
B03	Cdc25a	1,0049
B04	Cdh1	-1,7447
B05	Cdk2	-1,2995
B06	Cdk4	-1,0267
B07	Cdkn1a	-1,7447
B08	Cdkn2a	-1,0231
B09	Cflar	-1,8895
B10	Chek2	-2,6081
B11	Col18a1	-3,4895
B12	Ctnnb1	-3,9531
C01	E2f1	1,0331
C02	Egfr	1,1543
C03	Ets2	-1,1958
C04	Fas	5,1946
C05	Fgf1	1,8687
C06	Fgfr2	-1,1119
C07	Figf	-1,0966
C08	Fos	-3,134
C09	Grb2	-1,4671
C10	Hgf	4,5378
C11	Ifnb1	7,1701
C12	Igf1	-1,1119
D01	Itga2	-1,8506
D02	Itga3	-1,6853
D03	Itga4	-1,1119
D04	Itgav	1,0996
D05	Itgb1	-1,1196
D06	Itgb3	-5,7877
D07	Jun	-1,3547
D08	Kiss1	-1,1119
D09	Map2k1	-1,4172
D10	Mcam	-5,2707
D11	Mdm2	-4,952
D12	Met	-12,3634
E01	Mmp2	1,0084
E02	Mmp9	-1,2596
E03	Mta1	-1,5454
E04	Mta2	-1,089
E05	Muc1	-1,6055

E06	Myc	-1,2596
E07	Ncam1	-1,0852
E08	Nfkb1	-1,1196
E09	Nfkbia	1,5284
E10	Nme4	-1,7752
E11	Pdgfa	-1,5562
E12	Pdgfb	-1,1119
F01	Pik3r1	1,774
F02	Plau	-1,9972
F03	Plaur	-1,1551
F04	Pten	1,387
F05	Raf1	-1,0374
F06	Rb1	-1,0815
F07	S100a4	-1,2596
F08	Serpinb2	-1,1119
F09	Serpine1	-5,7279
F10	Syk	-1,1119
F11	Tek	-1,1119
F12	Tert	-9,7676
G01	Tgfb1	-1,3689
G02	Tgfr1	1,3538
G03	Thbs1	1,6783
G04	Timp1	-1,2728
G05	Tnf	1,1909
G06	Tnfrsf10b	-1,3689
G07	Tnfrsf1a	-1,3976
G08	Trp53	-1,35
G09	Twist1	1,1423
G10	Vegfa	-2,7473
G11	Vegfb	-1,7938
G12	Vegfc	-1,1119
H01	Gusb	-1,2596
H02	Hprt1	-1,1042
H03	Hsp90ab1	-1,0777
H04	Gapdh	1,5823
H05	Actb	-1,0556
H06	MGDC	-1,1119
H07	RTC	-1,1119
H08	RTC	-1,1119
H09	RTC	-1,1119
H10	PPC	-7,2501
H11	PPC	-4,5726
H12	PPC	-6,3997

**Tabell 7.2** Sammenligning mellom tom vektorer AT-84-EV1  
Og AT-84-EV 4 RNA 2

	Symbol	Opp og nedregulering sammenlignet med to control group EV 1 EV 4 RNA 2
A01	Akt1	-1,031
A02	Akt2	-1,3698
A03	Angpt1	1,7484
A04	Apaf1	-1,8327
A05	Atm	-1,168
A06	Bad	1,3957
A07	Bax	-1,1559
A08	Bcl2	3,2065
A09	Bcl2l1	-1,5955
A10	Birc5	-1,086
A11	Brca1	-2,5651
A12	Casp8	-1,0345
B01	Ccnd1	-1,8455
B02	Ccne1	-1,071
B03	Cdc25a	-1,1843
B04	Cdh1	-1,7219
B05	Cdk2	-1,2693
B06	Cdk4	-1,6122
B07	Cdkn1a	1,5011
B08	Cdkn2a	1,0688
B09	Cflar	-2,7302
B10	Chk2	-5,832
B11	Col18a1	-3,7038
B12	Ctnnb1	-2,172
C01	E2f1	1,0762
C02	Egfr	-1,0168
C03	Ets2	-1,8974
C04	Fas	2,9506
C05	Fgf1	-1,0345
C06	Fgfr2	-1,0345
C07	Figf	1,2535
C08	Fos	2,8799
C09	Grb2	-1,2134
C10	Hgf	1,425
C11	Ifnb1	5,8401

C12	Igf1	-1,0345
D01	Itga2	-1,59
D02	Itga3	-1,5572
D03	Itga4	-1,0345
D04	Itgav	1,2363
D05	Itgb1	-1,1243
D06	Itgb3	-14,3105
D07	Jun	-1,5519
D08	Kiss1	1,4201
D09	Map2k1	-1,1802
D10	Mcam	-1,8138
D11	Mdm2	-6,8638
D12	Met	-2,7683
E01	Mmp2	1,0182
E02	Mmp9	2,4897
E03	Mta1	-1,6923
E04	Mta2	-1,049
E05	Muc1	-1,3463
E06	Myc	2,5509
E07	Ncam1	-1,1925
E08	Nfkb1	-1,0381
E09	Nfkbia	-2,4691
E10	Nme4	-1,9779
E11	Pdgfa	-2,3118
E12	Pdgfb	-1,0345
F01	Pik3r1	1,1455
F02	Plau	-1,4083
F03	Plaur	-1,7642
F04	Pten	-1,3095
F05	Raf1	-1,1321
F06	Rb1	2,8304
F07	S100a4	2,2053
F08	Serpib2	-1,0345
F09	Serpine1	-3,6655
F10	Syk	-1,0345
F11	Tek	-1,0345
F12	Tert	-2,4691
G01	Tgfb1	-1,629
G02	Tgfb1	1,1297
G03	Thbs1	3,0022
G04	Timp1	-1,5094
G05	Tnf	1,2449
G06	Tnfrsf10b	1,6313
G07	Tnfrsf1a	-1,4429
G08	Trp53	-1,049
G09	Twist1	1,3813
G10	Vegfa	-3,9422
G11	Vegfb	-2,6372

G12	Vegfc	-1,0345
H01	Gusb	-1,314
H02	Hprt1	-1,1127
H03	Hsp90ab1	1,5594
H04	Gapdh	1,0762
H05	Actb	-1,1479
H06	MGDC	-1,0345
H07	RTC	-1,0345
H08	RTC	-1,0345
H09	RTC	-1,0345
H10	PPC	-6,607
H11	PPC	-5,6923
H12	PPC	-8,421

**Tabell 7.3** Sammenligning mellom tom vektorer AT-84-EV1  
Og AT-84-EV 4 RNA 2

	Symbol	Opp og nedregulering sammenlignet med to control group EV 1 EV 4 RNA 3
A01	Akt1	-1,1663
A02	Akt2	-1,0807
A03	Angpt1	23,9674
A04	Apaf1	-1,0014
A05	Atm	-1,1867
A06	Bad	-1,0189
A07	Bax	-1,2159
A08	Bcl2	1,3177
A09	Bcl2l1	1,8251
A10	Birc5	1,041
A11	Brca1	1,0592
A12	Casp8	-11,0579
B01	Ccnd1	-1,3775
B02	Ccne1	-1,1826
B03	Cdc25a	-1,0475
B04	Cdh1	1,6506
B05	Cdk2	2,2161
B06	Cdk4	1,0703
B07	Cdkn1a	-1,4015
B08	Cdkn2a	1,0777
B09	Cflar	3,4176
B10	Chk2	1,3131
B11	Col18a1	-4,0334
B12	Ctnnb1	-87,5479
C01	E2f1	-1,0475

C02	Egfr	1,2337
C03	Ets2	-1,451
C04	Fas	6,7179
C05	Fgf1	-1,3632
C06	Fgfr2	-1,2414
C07	Figf	1,2167
C08	Fos	1,5616
C09	Grb2	1,8125
C10	Hgf	2,7568
C11	Ifnb1	1,4825
C12	Igf1	-1,2414
D01	Itga2	-1,0658
D02	Itga3	-1,4211
D03	Itga4	-1,2414
D04	Itgav	1,8961
D05	Itgb1	1,0091
D06	Itgb3	-13,1501
D07	Jun	-1,0084
D08	Kiss1	-2,0662
D09	Map2k1	1,5401
D10	Mcam	1,87
D11	Mdm2	-1,2414
D12	Met	-87,245
E01	Mmp2	-1,2808
E02	Mmp9	1,0519
E03	Mta1	2,5368
E04	Mta2	1,1235
E05	Muc1	-1,8947
E06	Myc	3,9395
E07	Ncam1	1,0021
E08	Nfkb1	1,0056
E09	Nfkbia	2,6537
E10	Nme4	-1,6783
E11	Pdgfa	1,0966
E12	Pdgfb	-11,4876
F01	Pik3r1	1,4469
F02	Plau	2,0321
F03	Plaur	-1,0119
F04	Pten	3,9945
F05	Raf1	1,8442
F06	Rb1	1,8188
F07	S100a4	-1,0367
F08	Serpib2	-1,2414
F09	Serpine1	2,9856
F10	Syk	-1,2414
F11	Tek	-1,2414
F12	Tert	-6,8069
G01	Tgfb1	-1,1111

G02	Tgfb1	2,5722
G03	Thbs1	1,8961
G04	Timp1	1,0446
G05	Tnf	1,0161
G06	Tnfrsf10b	1,4621
G07	Tnfrsf1a	1,074
G08	Trp53	-1,2243
G09	Twist1	1,2
G10	Vegfa	-1,1227
G11	Vegfb	2,2626
G12	Vegfc	-1,2414
H01	Gusb	-1,5337
H02	Hprt1	-1,0658
H03	Hsp90ab1	1,6795
H04	Gapdh	1,0091
H05	Actb	-1,0367
H06	MGDC	-1,2414
H07	RTC	-1,2414
H08	RTC	-1,2414
H09	RTC	-1,2414
H10	PPC	1,0267
H11	PPC	-2,3408
H12	PPC	-563,0035

Tabell 7.4: Opp og nedregulering av At-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy i RNA 1 sammenlignet med kontrollgruppen AT-84 EV 1 i RNA 1.

Well	Symbol	Opp og nedregulering sammenlignet med kontroll gruppen EV 1 RNA 1	
		AT-84 uPAR medium	AT-84 uPAR høy
A01	Akt1	-1,057	1,0461
A02	Akt2	-1,0607	1,2016
A03	Angpt1	-1,2702	-4,2134
A04	Apaf1	1,2184	1,2614
A05	Atm	-1,1212	-1,5529
A06	Bad	-1,0534	-1,3287
A07	Bax	-1,0943	-1,0681
A08	Bcl2	1,1567	-1,1769
A09	Bcl2l1	-1,9656	-3,2378
A10	Birc5	-1,0105	-1,3333
A11	Brca1	-1,7654	-4,3924
A12	Casp8	-3,1602	-3,3173

B01	Ccnd1	-1,4897	-1,6472
B02	Ccne1	-1,7901	-1,1892
B03	Cdc25a	1,0175	-1,1057
B04	Cdh1	-1,9386	-18,8959
B05	Cdk2	1,2879	-1,2968
B06	Cdk4	1,2016	-1,0644
B07	Cdkn1a	-2,2038	-1,1096
B08	Cdkn2a	1,0792	-1,057
B09	Cflar	1,021	-1,4191
B10	Chek2	-1,454	-1,7411
B11	Col18a1	-17,5087	-1,834
B12	Ctnnb1	-2,5228	-1,2311
C01	E2f1	1,2142	-1,0353
C02	Egfr	-1,1487	1,1851
C03	Ets2	-1,521	-1,5801
C04	Fas	-1,0461	-1,0981
C05	Fgf1	-1,0461	-1,0981
C06	Fgfr2	-1,0461	-1,0981
C07	Figf	-1,083	-1,429
C08	Fos	-2,362	-3,0105
C09	Grb2	-1,057	-1,5746
C10	Hgf	2,639	3,7842
C11	Ifnb1	-1,0461	1,0246
C12	Igf1	-1,0461	-1,0981
D01	Itga2	-2,7606	1,9119
D02	Itga3	-1,9453	-1,3287
D03	Itga4	-1,0461	-1,0981
D04	Itgav	-1,1019	-1,0317
D05	Itgb1	1,0317	-1,0755
D06	Itgb3	-13,0864	-8,6338
D07	Jun	-1,1212	-1,021
D08	Kiss1	-1,0461	-1,0981
D09	Map2k1	-1,3426	-1,6935
D10	Mcam	-2,3538	-5,7757
D11	Mdm2	-2,3376	-9,0317
D12	Met	-5,278	-4,84
E01	Mmp2	-1,0607	-1,4845
E02	Mmp9	-3,7842	-2,4368
E03	Mta1	-1,3803	1,1134
E04	Mta2	-1,1096	-1,1057
E05	Muc1	-2,3784	-2,2736
E06	Myc	-2,4967	-2,6945
E07	Ncam1	-1,0981	1,1173
E08	Nfkb1	-1,4241	-1,3104
E09	Nfkbia	-1,3379	-2,5403
E10	Nme4	-1,7963	-2,0705
E11	Pdgfa	-1,2834	-2,1361
E12	Pdgfb	-1,0461	-1,0981



F01	Pik3r1	-1,1019	1,2226
F02	Plau	-2,2815	1,2746
F03	Plaur	3,4343	5,7358
F04	Pten	1,8213	2,114
F05	Raf1	-1,2746	-1,0981
F06	Rb1	1,2702	-1,2397
F07	S100a4	-2,1067	-1,1527
F08	Serpib2	-1,0461	-1,0981
F09	Serpine1	-4,7899	-8,4269
F10	Syk	-1,0461	-1,0981
F11	Tek	-1,0461	-1,0981
F12	Tert	-1,6702	-1,2058
G01	Tgfb1	1,007	1,3803
G02	Tgfb1	1,4897	1,2879
G03	Thbs1	1,279	-2,2894
G04	Timp1	1,1212	1,0681
G05	Tnf	-2,858	-1,6472
G06	Tnfrsf10b	-1,1447	-1,2879
G07	Tnfrsf1a	-1,4897	-1,3996
G08	Trp53	-1,2746	-1,2968
G09	Twist1	-1,2142	-1,3104
G10	Vegfa	-3,0951	-4,5159
G11	Vegfb	-1,6358	-2,0209
G12	Vegfc	-1,0461	-1,0981
H01	Gusb	-7,7812	-1,1851
H02	Hprt1	-1,1567	-1,1173
H03	Hsp90ab1	-1,1057	-1,257
H04	Gapdh	1,3013	1,1527
H05	Actb	-1,0175	1,2184
H06	MGDC	-1,0461	-1,0981
H07	RTC	-1,0461	-1,0981
H08	RTC	-1,0461	-1,0981
H09	RTC	-1,0461	-1,0981
H10	PPC	-1,9725	-4,724
H11	PPC	-4,6428	-6,4308
H12	PPC	-1,2142	-1,676

Tabell 7.5: Opp og nedregulering av AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy i RNA 1 sammenlignet med kontrollgruppen AT-84 EV 4 i RNA 1

Well	Symbol	Opp og nedregulering sammenlignet med kontrollgruppen EV 4 RNA 1	
		AT-84 uPAR medium	AT-84 uPAR høy
A01	Akt1	1,0009	1,1067
A02	Akt2	1,0148	1,2935
A03	Angpt1	-1,6344	-5,4217
A04	Apaf1	1,9135	1,981
A05	Atm	1,4654	1,0579
A06	Bad	1,1617	-1,0858
A07	Bax	1,0434	1,069
A08	Bcl2	1,0043	-1,3554
A09	Bcl2l1	1,1067	-1,4884
A10	Birc5	1,0434	-1,2647
A11	Brca1	1,0543	-2,3599
A12	Casp8	1,126	1,0727
B01	Ccnd1	1,2801	1,1577
B02	Ccne1	-1,6515	-1,0971
B03	Cdc25a	1,0727	-1,0488
B04	Cdh1	-1,0488	-10,223
B05	Cdk2	1,7731	1,0616
B06	Cdk4	1,307	1,0219
B07	Cdkn1a	-1,1923	1,6658
B08	Cdkn2a	1,1698	1,0254
B09	Cflar	2,0438	1,4105
B10	Chk2	1,9003	1,5869
B11	Col18a1	-4,7363	2,0157
B12	Ctnnb1	1,6601	3,4017
C01	E2f1	1,2451	-1,0096
C02	Egfr	-1,2516	1,0877
C03	Ets2	-1,2006	-1,2472
C04	Fas	-5,1293	-5,3843
C05	Fgf1	-1,8452	-1,9369
C06	Fgfr2	1,126	1,0727
C07	Figf	1,0727	-1,2301
C08	Fos	1,4057	1,1029
C09	Grb2	1,4704	-1,0131
C10	Hgf	-1,6231	-1,1319
C11	Ifnb1	-7,08	-6,6059

C12	Igf1	1,126	1,0727
D01	Itga2	-1,4081	3,7483
D02	Itga3	-1,0896	1,3437
D03	Itga4	1,126	1,0727
D04	Itgav	-1,1437	-1,0708
D05	Itgb1	1,2237	1,1029
D06	Itgb3	-2,1343	-1,4081
D07	Jun	1,2801	1,4057
D08	Kiss1	1,126	1,0727
D09	Map2k1	1,1183	-1,128
D10	Mcam	2,3722	-1,0344
D11	Mdm2	2,2443	-1,7216
D12	Met	2,4816	2,7062
E01	Mmp2	-1,0096	-1,413
E02	Mmp9	-2,8358	-1,8261
E03	Mta1	1,1861	1,8229
E04	Mta2	1,0398	1,0434
E05	Muc1	-1,3984	-1,3368
E06	Myc	-1,8709	-2,0192
E07	Ncam1	1,047	1,2845
E08	Nfkb1	-1,2006	-1,1048
E09	Nfkbia	-1,9302	-3,6648
E10	Nme4	1,047	-1,101
E11	Pdgfa	1,2845	-1,2957
E12	Pdgfb	1,126	1,0727
F01	Pik3r1	-1,8452	-1,3696
F02	Plau	-1,0783	2,6968
F03	Plaur	4,2025	7,0189
F04	Pten	1,3911	1,6147
F05	Raf1	-1,1597	1,0009
F06	Rb1	1,4552	-1,082
F07	S100a4	-1,5787	1,1577
F08	Serpib2	1,126	1,0727
F09	Serpine1	1,2669	-1,3887
F10	Syk	1,126	1,0727
F11	Tek	1,126	1,0727
F12	Tert	6,1956	8,5816
G01	Tgfb1	1,4603	2,0017
G02	Tgfbr1	1,1657	1,0078
G03	Thbs1	-1,2386	-3,6269
G04	Timp1	1,5118	1,4402
G05	Tnf	-3,2126	-1,8516
G06	Tnfrsf10b	1,2669	1,126
G07	Tnfrsf1a	-1,0061	1,0579
G08	Trp53	1,1221	1,1029
G09	Twist1	-1,3093	-1,413
G10	Vegfa	-1,0634	-1,5516
G11	Vegfb	1,1617	-1,0634

G12	Vegfc	1,126	1,0727
H01	Gusb	-5,831	1,126
H02	Hprt1	1,0113	1,047
H03	Hsp90ab1	1,0326	-1,101
H04	Gapdh	-1,1477	-1,2957
H05	Actb	1,099	1,3625
H06	MGDC	1,126	1,0727
H07	RTC	1,126	1,0727
H08	RTC	1,126	1,0727
H09	RTC	1,126	1,0727
H10	PPC	3,894	1,6259
H11	PPC	1,0434	-1,3275
H12	PPC	5,5838	4,0453

Tabell 7.6 Opp og nedregulering av AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy i RNA 2 sammenlignet med kontrollgruppe AT-84 EV 1 RNA 2

	Symbol	Opp og nedregulering sammenlignet med kontrollgruppen EV 1 RNA 2	
		AT-84 uPAR medium	AT-84 uPAR høy
A01	Akt1	-1,2279	-2,4389
A02	Akt2	-1,4858	-1,5118
A03	Angpt1	-4,5355	-8,9151
A04	Apaf1	1,2386	-1,3672
A05	Atm	1,4781	-2,3234
A06	Bad	1,3601	1,3791
A07	Bax	-1,1944	-1,1457
A08	Bcl2	-1,1067	1,692
A09	Bcl2l1	-1,3252	-6,1956
A10	Birc5	-1,0078	-1,2713
A11	Brca1	-2,2365	-4,159

A12	Casp8	-1,0915	-1,029
B01	Ccnd1	-2,1306	-8,4342
B02	Ccne1	-1,6259	-1,1299
B03	Cdc25a	-1,3298	-1,3437
B04	Cdh1	1,2343	-4,3207
B05	Cdk2	-1,1985	-2,0017
B06	Cdk4	-1,0506	-1,6543
B07	Cdkn1a	2,2095	1,4578
B08	Cdkn2a	1,082	-1,099
B09	Cflar	1,0488	-4,159
B10	Chek2	-1,7547	-4,663
B11	Col18a1	-9,0709	-2,4559
B12	Ctnnb1	-1,5651	-13,6067
C01	E2f1	1,0561	-1,1457
C02	Egfr	-1,7916	-1,3911
C03	Ets2	-2,1981	-3,0978
C04	Fas	1,4032	-1,029
C05	Fgf1	-1,0915	-1,029
C06	Fgfr2	-1,0915	-1,029
C07	Figf	-1,2581	-4,6468
C08	Fos	1,3229	-1,4253
C09	Grb2	1,473	-1,5223
C10	Hgf	-1,0915	1,1358
C11	lfnb1	-1,0915	1,2131
C12	Igf1	-1,0915	-1,029
D01	Itga2	-1,6774	-1,047
D02	Itga3	-1,9403	-1,1577
D03	Itga4	-1,0915	-1,029
D04	Itgav	1,2472	1,2957
D05	Itgb1	1,0272	1,0061
D06	Itgb3	-15,0976	-14,2338
D07	Jun	-1,1698	-2,0652
D08	Kiss1	-1,0915	-1,029
D09	Map2k1	-1,3207	-1,5705
D10	Mcam	-1,8938	-3,7613
D11	Mdm2	-1,5435	-5,0674
D12	Met	-4,8442	-9,2937
E01	Mmp2	-1,5597	-1,4008
E02	Mmp9	-2,1159	-2,0723
E03	Mta1	-2,0297	-8,2606
E04	Mta2	-1,1378	-1,2322
E05	Muc1	-3,2182	-1,5435
E06	Myc	1,0634	1,7276
E07	Ncam1	-1,099	-1,211
E08	Nfkb1	-1,491	1,1125
E09	Nfkbia	-1,2581	-5,085
E10	Nme4	-2,1159	-2,3559
E11	Pdgfa	-1,4858	-1,8041

E12	Pdgfb	-1,0915	-1,029
F01	Pik3r1	-2,1603	-1,7186
F02	Plau	-1,9335	-2,0723
F03	Plaur	3,0818	4,7035
F04	Pten	-5,0499	-2,0867
F05	Raf1	-1,6833	-1,1221
F06	Rb1	6,0997	2,5469
F07	S100a4	-1,029	1,5302
F08	Serpinb2	-1,0915	-1,029
F09	Serpine1	-2,6875	-3,6458
F10	Syk	-1,0915	-1,029
F11	Tek	-1,0915	-1,029
F12	Tert	-3,0236	1,8198
G01	Tgfb1	-1,5382	-1,9335
G02	Tgfbr1	1,3321	1,0344
G03	Thbs1	2,3599	1,1637
G04	Timp1	-1,0113	-1,4402
G05	Tnf	-3,1739	-1,1617
G06	Tnfrsf10b	1,0026	-3,6458
G07	Tnfrsf1a	-1,8356	-2,2914
G08	Trp53	-1,2669	-1,0184
G09	Twist1	-1,1657	-1,126
G10	Vegfa	-2,6968	-2,763
G11	Vegfb	-1,2713	-1,8103
G12	Vegfc	-1,0915	19,4777
H01	Gusb	-1,6316	-1,4858
H02	Hprt1	-1,1537	-1,0078
H03	Hsp90ab1	1,3275	1,3649
H04	Gapdh	-1,0148	1,0308
H05	Actb	-1,1339	-1,396
H06	MGDC	-1,0915	-1,029
H07	RTC	-1,0915	-1,029
H08	RTC	-1,0915	-1,029
H09	RTC	-1,0915	-1,029
H10	PPC	1,897	-2,1013
H11	PPC	-2,2599	-7,575
H12	PPC	-17,6458	21,7622

Tabell 7.7: Opp og nedregulering av AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy i RNA 2 sammenlignet med kontrollgruppen AT-84 EV 4 i RNA 2.

Brønn	Symbol	Opp og nedregulering sammenlignet med kontrollgruppen EV 4 RNA 2	
		AT-84 uPAR medium	AT-84 uPAR høy
A01	Akt1	-1,1125	-2,2095
A02	Akt2	-1,0131	-1,0308
A03	Angpt1	-7,4063	-14,5581
A04	Apaf1	2,4305	1,4352
A05	Atm	1,8484	-1,858
A06	Bad	1,0434	1,0579
A07	Bax	1,0362	1,0802
A08	Bcl2	-3,3144	-1,77
A09	Bcl2l1	1,289	-3,6269
A10	Birc5	1,1537	-1,0933
A11	Brca1	1,2279	-1,5144
A12	Casp8	1,0148	1,0764
B01	Ccnd1	-1,0783	-4,2686
B02	Ccne1	-1,4179	1,0148
B03	Cdc25a	-1,0488	-1,0598
B04	Cdh1	2,2756	-2,3436
B05	Cdk2	1,1339	-1,473
B06	Cdk4	1,6429	1,0434
B07	Cdkn1a	1,576	1,0398
B08	Cdkn2a	1,0839	-1,0971
B09	Cflar	3,0658	-1,4228
B10	Chek2	3,5585	1,3391
B11	Col18a1	-2,2875	1,6147
B12	Ctnnb1	1,4858	-5,8513
C01	E2f1	1,0506	-1,1517
C02	Egfr	-1,6458	-1,2779
C03	Ets2	-1,082	-1,5249
C04	Fas	-1,9639	-2,8358

C05	Fgf1	1,0148	1,0764
C06	Fgfr2	1,0148	1,0764
C07	Figf	-1,473	-5,4405
C08	Fos	-2,0332	-3,8337
C09	Grb2	1,9135	-1,1718
C10	Hgf	-1,4527	-1,1718
C11	Ifnb1	-5,9535	-4,4963
C12	Igf1	1,0148	1,0764
D01	Itga2	1,0148	1,6259
D02	Itga3	-1,1637	1,4402
D03	Itga4	1,0148	1,0764
D04	Itgav	1,0802	1,1221
D05	Itgb1	1,2365	1,211
D06	Itgb3	1,0148	1,0764
D07	Jun	1,4204	-1,2429
D08	Kiss1	-1,4477	-1,3649
D09	Map2k1	-1,0452	-1,2429
D10	Mcam	1,0254	-1,9369
D11	Mdm2	4,761	1,4502
D12	Met	-1,6344	-3,1356
E01	Mmp2	-1,4832	-1,3321
E02	Mmp9	-4,9203	-4,8191
E03	Mta1	-1,1202	-4,5591
E04	Mta2	-1,0131	-1,0971
E05	Muc1	-2,2326	-1,0708
E06	Myc	-2,2404	-1,3791
E07	Ncam1	1,1617	1,0543
E08	Nfkb1	-1,3414	1,2365
E09	Nfkbia	2,1013	-1,9235
E10	Nme4	1,0009	-1,1125
E11	Pdgfa	1,6658	1,372
E12	Pdgfb	1,0148	1,0764
F01	Pik3r1	-2,3114	-1,8388
F02	Plau	-1,2823	-1,3744
F03	Plaur	5,8209	8,8843
F04	Pten	-3,6019	-1,4884
F05	Raf1	-1,3887	1,0802
F06	Rb1	2,3074	-1,038
F07	S100a4	-2,1195	-1,3461
F08	Serpib2	1,0148	1,0764
F09	Serpine1	1,4603	1,0764
F10	Syk	1,0148	1,0764
F11	Tek	1,0148	1,0764
F12	Tert	-1,1437	4,8107
G01	Tgfb1	1,1339	-1,1086
G02	Tgfbr1	1,2625	-1,0201
G03	Thbs1	-1,1882	-2,4095
G04	Timp1	1,598	1,1221



G05	Tnf	-3,6903	-1,3507
G06	Tnfrsf10b	-1,5197	-5,5549
G07	Tnfrsf1a	-1,1882	-1,4832
G08	Trp53	-1,128	1,1029
G09	Twist1	-1,5039	-1,4527
G10	Vegfa	1,5651	1,5276
G11	Vegfb	2,2211	1,5597
G12	Vegfc	1,0148	21,5744
H01	Gusb	-1,1597	-1,0561
H02	Hprt1	1,0326	1,182
H03	Hsp90ab1	-1,0971	-1,0671
H04	Gapdh	-1,0201	1,0254
H05	Actb	1,0839	-1,1358
H06	MGDC	1,0148	1,0764
H07	RTC	1,0148	1,0764
H08	RTC	1,0148	1,0764
H09	RTC	1,0148	1,0764
H10	PPC	13,4194	3,3665
H11	PPC	2,6968	-1,2429
H12	PPC	-1,9571	196,2094

Tabell 7.8: Opp og nedregulering av AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy i RNA 3 sammenlignet med kontrollgruppen AT-84 EV 1 RNA 3

Brønn	Symbol	Opp og nedregulering sammenlignet med kontrollgruppen EV 1 RNA 3	
		AT-84 uPAR medium	AT-84 uPAR høy
A01	Akt1	-1,2768	-1,1698
A02	Akt2	-1,633	-1,2195
A03	Angpt1	5,5117	-1,1617
A04	Apaf1	1,359	-1,4704
A05	Atm	-1,2724	-5,0324
A06	Bad	-1,268	-2,4389
A07	Bax	-1,6731	-1,4961
A08	Bcl2	-1,5773	-1,4253
A09	Bcl2l1	1,0228	-2,8016
A10	Birc5	1,1231	-1,1105
A11	Brca1	2,1104	1,2429
A12	Casp8	-12,6626	-12,5642
B01	Ccnd1	1,1587	-1,396
B02	Ccne1	-1,6906	-1,1029
B03	Cdc25a	1,0699	1,0896
B04	Cdh1	1,6558	-6,6403
B05	Cdk2	4,4924	-2,4559

B06	Cdk4	1,2333	-1,2801
B07	Cdkn1a	-2,8629	-1,8677
B08	Cdkn2a	-1,4364	-1,5329
B09	Cflar	1,8564	1,3047
B10	Chek2	-2,7943	-3,4372
B11	Col18a1	-4,7486	-1,9538
B12	Ctnnb1	-10,3209	-86,2977
C01	E2f1	-1,2037	-1,3911
C02	Egfr	-2,5097	-1,9003
C03	Ets2	-1,7746	-1,7246
C04	Fas	3,1766	-1,4105
C05	Fgf1	-2,3497	-2,3315
C06	Fgfr2	-1,4216	-1,4105
C07	Figf	-1,6906	-1,947
C08	Fos	-4,6509	-9,9607
C09	Grb2	1,3637	-1,372
C10	Hgf	-1,4216	1,0671
C11	Ifnb1	-1,4216	-1,4105
C12	Igf1	-1,4216	-1,4105
D01	Itga2	-1,0589	2,1269
D02	Itga3	-1,7381	-1,1497
D03	Itga4	-1,4216	-1,4105
D04	Itgav	1,8119	1,6979
D05	Itgb1	1,2121	1,0272
D06	Itgb3	-15,0584	-14,9415
D07	Jun	-1,3356	-1,2322
D08	Kiss1	-2,3661	-2,3477
D09	Map2k1	1,5131	-1,1902
D10	Mcam	2,7463	-2,5869
D11	Mdm2	1,6273	1,038
D12	Met	-65,9134	-99,13
E01	Mmp2	-1,0924	-2,397
E02	Mmp9	-5,9898	-3,6081
E03	Mta1	1,9352	-1,0952
E04	Mta2	1,359	-1,2581
E05	Muc1	-2,6344	-2,3559
E06	Myc	-1,0122	-1,6147
E07	Ncam1	-1,1231	-1,0398
E08	Nfkb1	-1,1507	-1,0653
E09	Nfkbia	-1,2079	-2,2288
E10	Nme4	-1,6386	-1,9879
E11	Pdgfa	3,5988	1,1517
E12	Pdgfb	-13,1546	-13,0525
F01	Pik3r1	-2,2	-1,6035
F02	Plau	1,1038	1,3461
F03	Plaur	2,6436	4,4344
F04	Pten	4,2649	-2,2211
F05	Raf1	2,0035	-1,0802

F06	Rb1	-2,4495	1,1048
F07	S100a4	-3,1987	-1,3252
F08	Serpib2	-1,4216	-1,4105
F09	Serpine1	-1,4216	-1,4105
F10	Syk	-1,4216	-1,4105
F11	Tek	-1,4216	-1,4105
F12	Tert	-4,7651	-30,0908
G01	Tgfb1	-1,8628	-1,4352
G02	Tgfbr1	2,5535	1,7396
G03	Thbs1	1,4118	-1,2845
G04	Timp1	1,1507	-1,099
G05	Tnf	-1,9086	-1,8938
G06	Tnfrsf10b	-2,1848	-1,2845
G07	Tnfrsf1a	-1,3402	-1,5066
G08	Trp53	-1,2248	-1,307
G09	Twist1	-1,3637	-1,3025
G10	Vegfa	1,1348	-1,7854
G11	Vegfb	2,3014	2,6367
G12	Vegfc	-1,4216	-1,4105
H01	Gusb	-1,7563	-2,0367
H02	Hprt1	1,0443	-1,1861
H03	Hsp90ab1	1,7321	1,4179
H04	Gapdh	-1,2946	-1,099
H05	Actb	-1,3972	-1,0877
H06	MGDC	-1,4216	-1,4105
H07	RTC	-1,4216	-1,4105
H08	RTC	-1,4216	-1,4105
H09	RTC	-1,4216	-1,4105
H10	PPC	1,7685	-2,6597
H11	PPC	1,3496	-1,2935
H12	PPC	-292,542	-644,1487

Tabell 7.9: Opp og nedregulering av AT-84 uPAR medium og AT-84 uPAR høy i RNA 3 sammenlignet med kontrollgruppe AT-84 EV 4 i RNA 3

Brønn	Symbol	Opp og nedregulering sammenlignet med kontroll gruppen EV 4 RNA 3	
		AT-84 uPAR meidum	AT-84 uPAR høy
A01	Akt1	1,0166	1,1096
A02	Akt2	-1,3578	-1,014
A03	Angpt1	-3,9075	-25,0198
A04	Apaf1	1,5144	-1,3195

A05	Atm	1,038	-3,8106
A06	Bad	-1,1183	-2,151
A07	Bax	-1,2365	-1,1057
A08	Bcl2	-1,8677	-1,6876
A09	Bcl2l1	-1,6035	-4,5948
A10	Birc5	1,2006	-1,0389
A11	Brca1	2,2172	1,3059
A12	Casp8	-1,029	-1,021
B01	Ccnd1	1,7761	1,0981
B02	Ccne1	-1,2845	1,1933
B03	Cdc25a	1,2472	1,2702
B04	Cdh1	1,1163	-9,8492
B05	Cdk2	2,256	-4,8906
B06	Cdk4	1,2823	-1,2311
B07	Cdkn1a	-1,8356	-1,1975
B08	Cdkn2a	-1,3911	-1,4845
B09	Cflar	-1,6543	-2,3538
B10	Chek2	-3,2972	-4,0558
B11	Col18a1	-1,0579	2,2974
B12	Ctnnb1	9,4398	1,129
C01	E2f1	-1,0326	-1,1933
C02	Egfr	-2,7822	-2,1067
C03	Ets2	-1,099	-1,0681
C04	Fas	-1,9003	-8,515
C05	Fgf1	-1,5489	-1,5369
C06	Fgfr2	-1,029	-1,021
C07	Figf	-1,8484	-2,1287
C08	Fos	-6,5262	-13,9772
C09	Grb2	-1,1944	-2,2346
C10	Hgf	-3,5216	-2,3214
C11	lfnb1	-1,8938	-1,879
C12	lgf1	-1,029	-1,021
D01	ltga2	1,1202	2,5228
D02	ltga3	-1,099	1,3755
D03	ltga4	-1,029	-1,021
D04	ltgav	1,0634	-1,0035
D05	ltgb1	1,3368	1,1329
D06	ltgb3	-1,029	-1,021
D07	Jun	-1,1902	-1,0981
D08	Kiss1	-1,029	-1,021
D09	Map2k1	1,0933	-1,6472
D10	Mcam	1,6344	-4,3469
D11	Mdm2	2,2482	1,434
D12	Met	1,473	-1,021
E01	Mmp2	1,3047	-1,6818
E02	Mmp9	-5,6618	-3,4105
E03	Mta1	-1,1779	-2,4967
E04	Mta2	1,3461	-1,2702

E05	Muc1	-1,2494	-1,1173
E06	Myc	-3,5832	-5,716
E07	Ncam1	-1,0113	1,0681
E08	Nfkb1	-1,0398	1,0389
E09	Nfkb1a	-2,8804	-5,3147
E10	Nme4	1,1398	-1,0644
E11	Pdgfa	3,6522	1,1688
E12	Pdgfb	-1,029	-1,021
F01	Pik3r1	-2,8605	-2,0849
F02	Plau	-1,6543	-1,3566
F03	Plaur	2,9768	4,9933
F04	Pten	1,1882	-7,9723
F05	Raf1	1,2089	-1,7901
F06	Rb1	-4,0035	-1,4794
F07	S100a4	-2,7726	-1,1487
F08	Serp1b2	-1,029	-1,021
F09	Serp1e1	-3,8139	-3,7842
F10	Syk	-1,029	-1,021
F11	Tek	-1,029	-1,021
F12	Tert	1,5897	-3,9724
G01	Tgfb1	-1,5066	-1,1607
G02	Tgfb1r1	1,1048	-1,3287
G03	Thbs1	-1,2069	-2,1886
G04	Timp1	1,2258	-1,0317
G05	Tnf	-1,7426	-1,7291
G06	Tnfrsf10b	-2,8704	-1,6876
G07	Tnfrsf1a	-1,2935	-1,454
G08	Trp53	1,1125	1,0425
G09	Twist1	-1,4704	-1,4044
G10	Vegfa	1,4179	-1,429
G11	Vegfb	1,1319	1,2968
G12	Vegfc	-1,029	-1,021
H01	Gusb	-1,029	-1,1933
H02	Hprt1	1,2386	1
H03	Hsp90ab1	1,1477	-1,0644
H04	Gapdh	-1,1739	1,0035
H05	Actb	-1,211	1,0607
H06	MGDC	-1,029	-1,021
H07	RTC	-1,029	-1,021
H08	RTC	-1,029	-1,021
H09	RTC	-1,029	-1,021
H10	PPC	1,9169	-2,4538
H11	PPC	3,5155	2,0139
H12	PPC	2,1417	-1,0281