

Masteravhandling for graden Master i Farmasi

Betydningen av uPAR på cellers evne til migrasjon og invasjon

Ninja Elise A. Seippel

Mai 2009



**Institutt for farmasi
Det medisinske fakultet
Universitetet i Tromsø**

Veiledere:

**Førsteamanuensis Gunbjørg Svineng
Førsteamanuensis Elisabeth Sundkvist**

Forord

Denne masteroppgaven har blitt utført ved universitetet i Tromsø i perioden fra oktober 2008 til mai 2009. Det praktiske arbeidet med oppgaven har blitt utført ved avdeling for medisinsk biokjemi ved institutt for medisinsk biologi under hovedveiledning av førsteamanuensis Gunbjørg Svineng. Førsteamanuensis Elisabeth Sundkvist ved avdeling for farmakologi, institutt for farmasi har vært biveileder for oppgaven.

Jeg vil aller først få gi en stor takk til Gunbjørg Svineng for god veiledning, oppfølging og støtte hele veien. Jeg vil takke Elisabeth Sundkvist for å ha gitt meg muligheten til å ta min masteroppgave ved avdeling for medisinsk biokjemi.

En stor takk vil jeg også gi til stipendiat Synnøve Magnussen som har hjulpet meg med alt det praktiske på laboratoriet og som har alltid har vært tilgjengelig og villig til å svare på mine spørsmål. Jeg vil takke alle ved avdeling for medisinsk biokjemi for at dere har tatt meg så godt i mot. Jeg har satt stor pris på å få være en del av denne avdelingen i denne perioden.

Jeg vil gjerne også takke mine tre gode kontorvenninner Susanne, Bente og Karina som jeg har delt både oppturer og nedturer med. Denne tiden ville helt klart ikke vært den samme uten dere.

Takk til familien min for støtte og oppmuntring. Spesielt takk til mamma og pappa for mange gode samtaler som har hjulpet meg til å holde motet oppe gjennom hele denne perioden.

Tromsø, mai 2009

Ninja E. A. Seippel

Forkortelser

BSA	Bovint Serum Albumin
bp	Basepar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ELM	Ekstracellulær Matriks
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EGFP	Green Fluorescence Protein
FAK	Focal adhesions kinase
FBS	Føtalt Bovint Serum
GPI	Glykosyl Fosfatidylinositol
HRP	Horse Radish Peroxidase
Kb	Kilo baser
kDa	Kilo dalton
LB- medium	Luria- Bertani medium
LPS	Lipopolysakkarid
MMP	Matriks Metalloprotease
PAGE	Polyakrylamid gelelektroforese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PAI	Plasminogen Aktivator inhibitor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyvinylidene Difluorid
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
TBE	Tris Borate EDTA
TBST	Tris Bufret Saltvann med Tween
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteaser
tPA	Vevstype Plasminogen Aktivator
uPA	urokinase Plasminogen Aktivator
uPAR	urokinase Plasminogen Aktivator Reseptor

Sammendrag

For at en kreftsvulst skal kunne spre seg må kreftcellene ha evnen til å bryte ned den ekstracellulære matriksen (ECM) som holder dem på plass. De må også kunne bevege seg ut fra svulsten og over i lymfesystemet eller blod for å transporteres til et nytt organ. Plasminogen aktivator systemet er en samling av proteiner som aktiverer hverandre og hvor disse aktiveringene fører til nedbrytning av ECM. Det systemet er derfor med på å bidra til at kreftsvulster kan spre seg til nye vev. Urokinase plasminogen aktivator reseptoren (uPAR) er en del av dette system og er vist å være overuttrykt på overflaten til flere typer kreftceller. Det er derfor trolig at det er en sammenheng mellom overuttrykk av uPAR i kreftceller og deres evne til å spre seg. Det er også vist at uPAR kan interagere med transmembranreseptorer i integrinfamilien og at denne interaksjonen også øker evnen cellen har til å bevege seg gjennom ECM.

I denne oppgaven skulle man teste ut uPAR sin påvirkning på kreftcellers evne til å bevege seg og til å bryte ned ECM. cDNAet til uPAR ble klonet og sekvensene til dette cDNAet ble bekreftet av restriksjonskutting og DNA-sekvensering. Deretter ble cDNA som kodet for uPAR forsøkt stabilt uttrykt i to forskjellige humane kreftcellelinjer slik at man kunne teste de migratoriske og invasive egenskapene deres. Det ble også gjort migrasjons- og invasjonanalyser på celler fra mus som hadde uttrykk av humant uPAR og hvor den ene subenheten ($\beta 1$) av integrinene var slått ut. Ved denne testingen ville man også kunne si noe om interaksjonen mellom uPAR og integriner. Nivået av uPAR i alle cellelinjene ble bestemt ved hjelp av Western blot.

Av ulike årsaker lyktes det ikke å få dannet stabile kloner av uPAR i verken UT-SCC-12A eller U2OSTA. De migratoriske og invasive egenskapene til musecellene GD25, GD25-uPAR, GD25 $\beta 1$ og GD25 $\beta 1$ - uPAR ble testet ved hjelp av Wound Healing assay og invasjonassay. Ut fra disse testene var det vanskelig å trekke en bestemt konklusjon om uPAR hadde påvirkning på de migratoriske og invasive egenskapene til disse cellene.

Innhold

Forord	2
Forkortelser	3
Sammendrag	4
Innhold	5
1 Innledning	7
1.1 Kreft	7
1.1.1 Ekstracellulær matriks, integriner og proteaser er viktig for metastasering av kreft.	7
1.2 Ekstracellulær matriks	8
1.2.1 Bestanddelene i ECM	8
1.2.2 Basalmembranen	11
1.3 Integriner	12
1.3.1 Integriner i forhold til adhesjon og migrasjon av celler	12
1.4 Invasjon og Metastasering	13
1.4.1 Metastaseprosessen	13
1.4.2 Nedbrytning av ECM	14
1.5 Angiogenese	15
1.5.1 Angiogenetiske og anti-angiogenetiske faktorer	15
1.6 Plasminogen aktivator systemet	16
1.6.1 uPAR	17
1.7 Modifiserte GD25 celler	19
1.8 Formålet med oppgaven	19
2 Materiale	20
2.1 Reagenser brukt i forsøkene	20
2.2 Buffere og geler	22
2.3 Laddere og primere	24
2.4 Medium og løsninger brukt til celledyrking og celleforsøk	25
2.5 Analyseverktøy	26
3 Metode	27
3.1 DNA kloning	27
3.1.1 LR Clonase	29
3.1.2 Transformasjon	29
3.2 Rensing av plasmid fra bakterie	30
3.2.1 Miniprep	30
3.2.2 Endotoksinfri midiprep	32
3.2.3 Måling av utbytte av plasmidrensing	33

3.3 Kutting med restriksjonsenzymmer.....	34
3.4 Agarose gelelektroforese.....	35
3.5 DNA Sekvensering.....	35
3.6 Celledyrkning og celleforsøk	37
3.6.1 Splitting av celler	37
3.6.2 Telling av og utsåing av celler	38
3.6.3 Tillagning av cellelysat for Western blotting.....	38
3.6.4 Tillagning av frysestock av celler	39
3.7 Transfeksjon.....	39
3.7.1 Lipofectamine™ 2000.....	39
3.7.2 Lipofectamine™ LTX og Plus reagens.....	39
3.7.3 Seleksjon av transfekterte celler.....	40
3.8 SDS-PAGE og Western blot	41
3.9 Migrasjons- og invasjonforsøk	43
3.9.1 Wound Healing assay.....	43
3.9.2 Invasjonsassay	43
4 Resultater	45
4.1 Kloning av cDNA for humant uPAR	45
4.2 Restriksjonskutting og agarose gelelektroforese.....	47
4.3 Sekvensering av entryvektorene og ekspresjonsvektorene.....	48
4.4 Transfeksjon og seleksjon	49
4.4.1 Stabil transfeksjon av UT-SCC-12A.....	49
4.4.2 Stabil transfeksjon av U2OSTA.....	51
4.5 Deteksjon av uPAR med Western blot av stabile kloner av U2OSTA	53
4.6 Analyser av GD25 celler	54
4.6.1 Western blot- analyse av uPAR-uttrykket i GD25-cellene.....	54
4.6.2 Wound healing assay av GD25- cellene	56
4.6.3 Invasjonsassay.....	58
5 Diskusjon.....	59
5.1 Uttrykk av uPAR i UT-SCC-12A og U2OSTA.....	59
5.1.1 Transfeksjon av UT-SCC-12A.....	59
5.1.2 Overuttrykk av uPAR i U2OSTA	59
5.2 Analyser av GD25-celler.....	60
5.2.1 Testing av migratoriske egenskaper med Wound Healing assay.....	60
5.2.2 Testing av invasive egenskaper med invasjonassay	62
5.2.3 Eventuell videre testing av GD25-cellene.....	62
6 Konklusjon.....	63
7 Referanser	64

1 Innledning

1.1 Kreft

Kreft er den største dødsårsaken på verdensbasis. 7,4 millioner dødsfall i 2004 skyldtes en eller annen form for kreft. Det er forventet at dette tallet vil øke med årene og at nærmere 12 millioner dødsfall i 2030 vil skyldes kreft [1].

En normal celle utvikles til en kreftcelle på grunn av en akkumulering av mutasjoner i DNAet. Det som skiller en kreftcelle fra en normal celle er ukontrollert vekst som fører til dannelsen av en tumor. To typer genetiske endringer kan skje som gjør at kreftceller dannes: aktivering av proto-onkogener til onkogener og inaktivering av tumorsupressorgener. Proto-onkogener er gener som normalt kontrollerer celledeling, apoptose og differensiering av celler mens tumorsupressorgener normalt hindrer dannelse av mutasjoner som kan føre til kreft [2]. En tumor består vanligvis av både kreftceller, normale celler, bindevev, blodkar og inflammatoriske celler. En tumor er benign (godartet) hvis den forblir lokalisert til et sted mens den er malign (ondartet) hvis de invaderer omkringliggende vev og sprer seg. Maligne tumorer kjennetegnes av mangel på differensiering og dermed tap av normal funksjon av cellene [3]. Metastaser er kreftsvulster som har blitt dannet fra celler som har frigjort seg fra den opprinnelige tumoren og nådd et nytt organ. Metastaser er hovedårsaken til dødelighet av kreft og til at kreft er vanskelig å behandle [2].

1.1.1 Ekstracellulær matriks, integriner og proteaser er viktig for metastasering av kreft.

For at en kreftsvulst skal kunne spre seg fra et organ til et annet må kreftcellene vandre dit via bindevevet. Det betyr at de må bryte seg gjennom den substansen som bindevevet hovedsaklig består av, nemlig ekstracellulær matriks (ECM). Proteaser er en gruppe enzymer som er med på å bryte ned proteinene som ECM består av og hjelper dermed kreftcellene til å migrere gjennom bindevevet. For at kreftceller skal kunne migrere må de aktivere reseptorer på overflaten som binder ECM- molekyler. Den viktigste gruppen av slike overflatereseptorer er integriner [4, 5].

1.2 Ekstracellulær matriks

Vev består ikke kun av celler. Alle celler er omgitt av og festet til ECM som består av makromolekyler som produseres og utskilles av cellene selv. Bindevevet, også kalt stroma, som knytter sammen, forankrer, støtter og beskytter de forskjellige delene av kroppen, består til en stor del ECM molekyler og et mindre antall celler blant annet fibroblaster, mastceller, makrofager, plasmaceller og fettceller. Bindevevet skilles fra epitelcellene av basal membranen som består av spesifikke ECM- molekyler. ECM er med på å regulere overlevelse, utvikling, migrasjon, profilering, form og funksjon til cellene den har kontakt med [6-8].

1.2.1 Bestanddelene i ECM

ECM består av to hovedklasser av ekstracellulære makromolekyler:

- 1) Proteoglykaner som er proteiner som har polysakkaridkjede (glykosaminoglykaner) kovalent bundet til seg.
- 2) Fibrøse proteiner som kollagen, laminin, elastin, fibronectin og vitronectin [6].

Glykosaminoglykaner

Glykosaminoglykaner er polysakkaridkjeder hvor annethvert suktermolekyl er et aminosukker og de har som oftest en sulfatgruppe festet til seg. På grunn av sulfatgruppene og karboksylgruppene, er glykosaminoglykanene sterkt negativt ladet og vil derfor tiltrekke seg kationer. I tillegg er de sterkt polare molekyler og vil derfor tiltrekke seg vann. Dermed danner glykosaminoglykanene en vandig gel. Denne gelen fyller det ekstracellulære rommet og gir mekanisk støtte til vevet [6].

Hyaluronan er det eneste glykosaminoglykanet i ECM som ikke er en del av et proteoglykan. Hyaluronan har smørende egenskaper og det finnes mye av det i ECM i vev der celler prolifererer og migrerer aktivt. Hyaluronan binder til celler blant annet via overflateproteinet CD44. I noen kreftformer uttrykkes det en annen form av CD44, hvilket antyder at interaksjonen mellom hyaluronan og CD44 kan være involvert i regulering av cellenes invasivitet [9].

Proteoglykaner

Proteoglykanene danner en vandig, gellignende grunnsubstans som de fibrøse proteinene er festet til. Proteoglykanene skiller seg fra andre glykoproteiner ved at de har glykosaminoglykansidekjeder i stedet for oligosakkarider som er vanlig for glykoproteiner. Proteoglykanene har som oftest lange (over 80 sukkerenheter) uforgrenede sidekjeder. Det finnes flere typer proteoglykaner som har forskjellige egenskaper. Glykosaminoglykansidekjedene danner geler med varierende porestørrelse og virker derfor som en sikt som regulerer passasje av molekyler og celler. Proteoglykaner kan binde signalmolekyler, som for eksempel vekstfaktorer som skilles ut av cellen. Denne bindingen kan enten inhibere eller øke aktiviteten til disse signalmolekylene. Proteoglykanene kan også bind og regulere aktiviteten til proteiner som proteaser og protease inhibitorer [6].

Noen av proteoglykanene er integrerte deler av plasmamembranen med proteindelen forankret i lipidbilaget eller festet i lipidbilaget ved et glykosylfosfatidylinositol (GPI) anker. Noen av disse proteoglykanene virker som koreseptorer til overflatereseptorer som for eksempel integriner, og bidrar til å binde cellen til ECM [6].

Kollagen

Kollagen gir styrke til bindevevet. Det finnes mer en 20 forskjellige typer kollagener [5]. Hver kollagenfiber er dannet av mange fibriler som igjen består av mange kollagenmolekyler av type I, II, III, IV og X [5, 9]. Hvert kollagenmolekyl består av tre polypeptidkjeder kalt α -kjeder. Disse er tvinnet sammen til en trippelheliks. Kollagen inneholder mye av aminosyrene prolin og glysin som er viktige for dannelse av trippelheliksen [6, 9]. Kollagentype IV, VIII og X danner nettverk, som finnes blant annet i basalmembranen. Kollagentype VI, IX, XII og XIV utgjør de fibrilassosierte kollagenene som ligger på overflaten av kollagenfibrilene. Disse knytter fibrilene til hverandre og til andre komponenter av ECM [5, 6].

Elastin

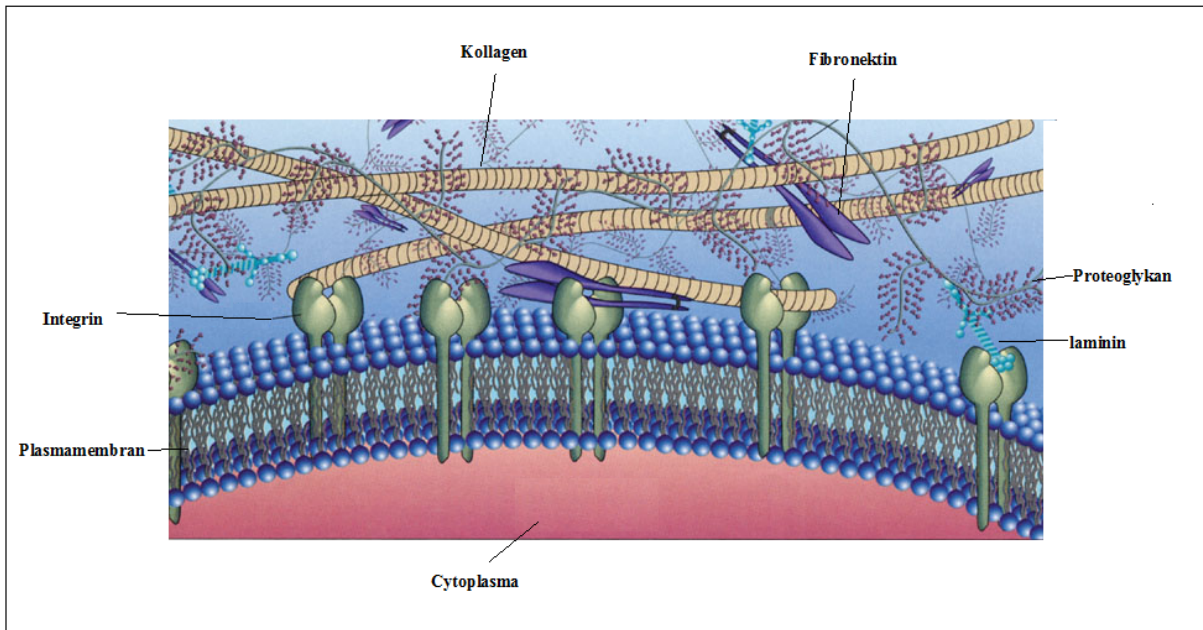
Elastisiteten av ECM gis av strekkbare, elastiske fibre. Disse består hovedsakelig av elastin [6, 9]. Dette er et hydrofobt protein som består av to typer korte segmenter som alternerer. Det ene segmentet er et hydrofobt segment som står for de elastiske egenskapene til molekylet. Det andre segmentet er en α - heliks som har høyt innhold av lysin og alanin [6]. Elastinmolekyler er kryssbundet til hverandre ved kovalente bindinger mellom lysinenhetene i dette segmentet. Elastisiteten gis av at de kryssbundete elastinmolekylene kan innta forskjellige konformasjoner [6, 9]. De elastiske fibrene består i tillegg til elastin av glykoproteiner som ligger i et lag av mikrofibriler utenpå elastinproteinene [6].

Fibronektin

Fibronektin er et glykoprotein sammensatt av to store subenheter som er bundet sammen med en disulfidbinding. Glykoproteinet har flere domener som alle har spesifikke bindingssteder for andre ECM-molekyler som kollagen og for reseptorer som integriner på overflaten av cellene. Fibronektin danner fibriler ved hjelp av fibronektinbindende integriner på overflaten av cellen. Denne prosessen stimuleres når integriner samtidig binder intracellulære aktinfilamenter. Aktin og myosin- cytoskjelettet vil via integrinene dra i fibronektin i matrisen og danne spenning slik at fibronektinfibrilene blir utstrakt og eksponerer bindingssteder som nye fibronektinfibriler og flere integrinmolekyler kan binde til [6, 9].

Laminin

Sammen med type IV kollagen, proteoglykanet perlecan, og nidogen består basalmembranen hovedsakelig av en gruppe adhesive glykoproteiner kalt lamininer. Alle lamininer har strukturelle fellestrekk. De har alle flere bindingssteder for nidogen som igjen kobler laminin til type IV kollagen [5]. I tillegg finnes det et bindingssete for perlecan og to eller flere til reseptorproteiner som for eksempel integriner på overflaten av cellen. Lamininene består alle av tre lange polypeptidkjeder (α , β og γ). Disse kjedene finnes i flere isoformer som kan assosiere i forskjellige strukturer [5, 6]. Laminin er vist å fremme celleadhesjon, migrasjon, proteaseaktivitet, proliferasjon, tumorvekst, angiogenese og metastase [10].



Figur 1. Oppbygning av ECM. Integriner i plasmamembranen fester cellen til ECM- komponentene laminin, fibronektin, proteoglykan og kollagen. Figuren er modifisering av første figur i referanse [11].

Vitronektin

Vitronektin er et plasmaglykoprotein som deltar i reguleringen av fibrinolyse og koagulering. I tillegg til å finnes i plasma, kan vitronektin inkorporeres i ECM. Økte mengder vitronektin finnes i fibrotisk vev og flere typer svulster. Vitronektin er også med på å regulere celleadhesjon og proteolyse av ECM- komponenter [12, 13]. Vitronektin kan også binde til og aktivere flere integriner og deres koreseptorer som for eksempel uPAR. Denne interaksjonen bidrar til økt celleadhesjon og migrasjon [12].

1.2.2 Basalmembranen

Basalmembranen, også kalt basal lamina, er et fleksibelt, tynt, spesialisert lag av ECM som skiller epitelcellene i et vev fra bindevevet [6]. Basalmembranen er alltid i kontakt med celler og basalmembranekomponentene syntetiseres av disse cellene. Basalmembranens funksjon er å støtte, dele vev i adskilte kompartement og å regulere cellulære mekanismer [6, 14].

1.3 Integriner

Integriner er en familie transmembranproteiner som forankrer cellene til ECM ved å binde til ECM- komponenter. Enkelte integriner kan binde til plasmamembranreseptorer på andre celler som for eksempel på endotelceller. De fleste integrinene er bundet til aktinfilamenter i cytoskjelettet inne i cellen. Dermed dannes en sammenhengende proteinforbindelse mellom ECM og de intracellulære aktinfilamentene [7, 15]. Alle integriner består av en α - og en β -subenhet. Det finnes flere typer av både α -subenheter og β -subenheter og tilsammen danner disse 24 forskjellige integriner [5, 15, 16].

1.3.1 Integriner i forhold til adhesjon og migrasjon av celler

Adhesjon mellom celler og ECM er essensielt for cellemigrasjon, invasjon og morfogenese [17].

Integriner som inneholder $\beta 1$ -subenheten kan via dets ekstracellulære domene gjenkjenne og binde ECM- proteiner som fibronectin, kollagen og laminin [5, 18]. Disse interaksjonene kan påvirke genuttrykk, migrasjon og differensiering. Det cytoplasmiske domenet til $\beta 1$ -subenheten kan binde til komponenter av cytoskjelettet som talin og α -aktinin og danner derfor en forbindelse mellom inn- og utsiden av cellen [18]. Ved binding av talin til $\beta 1$ -subenheten, vil den separeres fra det cytoplasmiske domene til α -subenheten som igjen gjør at det ekstracellulære domene brettes ut og gjør at det ligandbindende setet blir tilgjengelig. Bindingsaffiniteten til integrinet endres dermed og dette påvirker cellens adhesjon til ECM [15, 16, 19].

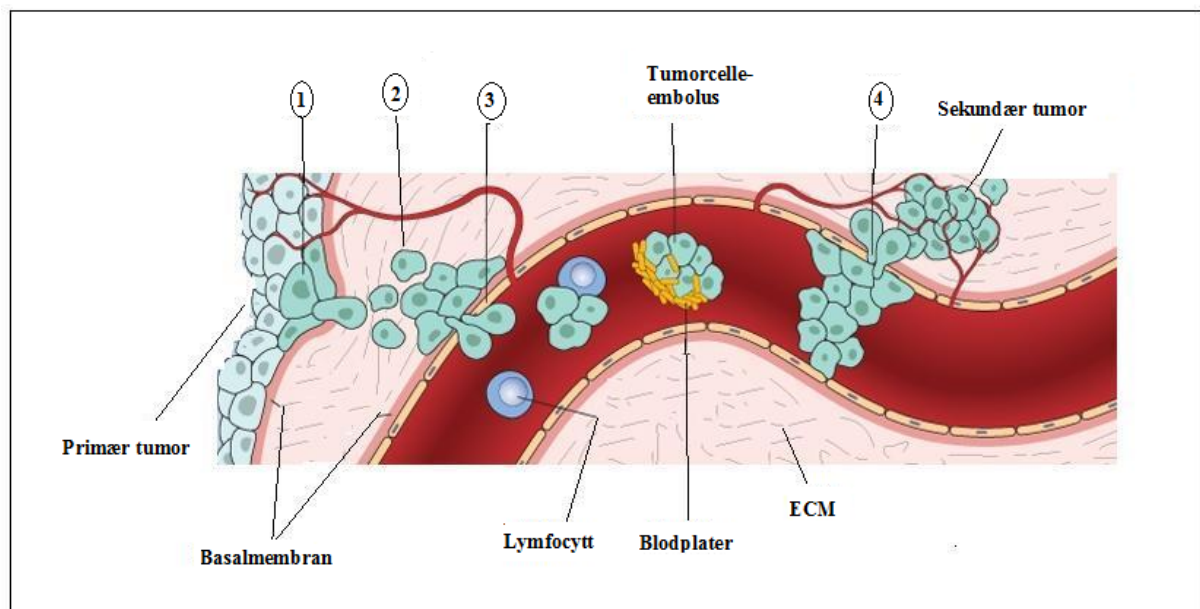
Aktinfilamentene i cytoskjelettet bestemmer formen på celleoverflaten og er nødvendig for at cellen skal kunne bevege på seg. For at cellene skal kunne bevege seg framover, må det dannes framposninger på cellen, som dannes ved aktinpolymerisering som gjør at plasmamembranen presses utover. Festepunktene mellom aktinfilamentene og ECM, hvor integriner virker som mellomledd, kalles fokale kontakter. Integrinene samles i klynger ved de fokale kontaktene, hvilket aktiverer tyrosin kinasen Focal adhesions kinase (FAK). Aktivering av FAK fører til fosforylering av flere mål. Disse fosforyleringene er med på å regulere overlevelse, vekst, profilering, morfologi, bevegelse og differensiering av celler [20].

1.4 Invasjon og Metastasering

1.4.1 Metastaseprosessen.

Metastaseprosessen består av flere trinn og kan deles inn i to faser: Invasjon av ECM og spredning gjennom blodkar og etablering av en sekundær tumor i det nye vevet (figur 2). Krefcellene må først bryte seg gjennom basalmembranen, så det interstitielle bindevevet og deretter den vaskulære basalmembranen [21]. Basalmembranen utgjør en stor barriere for epiteliale krefceller. Invasjon krever celleadhesjon, migrasjon og proteaseaktivitet. Ved degradering av basalmembranen frigjøres aktive molekyler som vekstfaktorer og cytokiner fra matriksen og disse vil fremme vekst og spredning av tumoren [10].

Krefcellene invaderer blodkarene og går inn i sirkulasjonen. For å oppnå dette må cellene migrere gjennom enten vaskulært endotel eller lymfekar [17, 21]. I blodet vil krefcellene enten danne aggregater med blodplater eller sirkulere fritt. Etter sirkulasjon gjennom blodkar må krefcellene igjen vandre gjennom basalmembranen og ECM hvor en sekundær tumor etableres [21].



Figur 2. Illustrasjon av hovedtrinnene i metastaseringsprosessen. 1. Adhesjon til og invasjon av basalmembranen. 2. Passasje gjennom ECM. 3. Cellene invaderer blodkarene og går inn i sirkulasjonen. 4. Adhesjon til basalmembranen, cellene fjernes fra blodsirkulasjonen og etablerer en sekundær svulst i et annet vev enn den primære tumoren. Figuren er en modifisering av figur 6-26 i referanse [21].

1.4.2 Nedbrytning av ECM

ECM-komponenter degraderes av ekstracellulære proteolytiske enzymer (proteaser) som utskilles av cellene i nærheten. De fleste av disse enzymene hører enten til gruppen matriks metalloproteaser (MMP) som trenger Ca^{2+} eller Zn^{2+} for å være aktive eller serinproteaser som har aminosyren serin i sine aktive seter. MMPene og serinproteasene samarbeider om å bryte ned ECM-komponenter som laminin, fibronektin og kollagen.

Proteasene hjelper kreftcellene til å migrere gjennom ECM på tre forskjellige måter:

- 1) De bryter ned komponenter av matriksen slik at det blir klargjort et område som cellen kan vandre gjennom.
- 2) Bindings seter på ECM-proteinene som kommer fram når de kløyves kan fremme cellebinding, migrasjon eller løsriving av cellen.
- 3) Ekstracellulære signalproteiner, som stimulerer cellemigrasjon, frigjøres ved proteolytisk nedbrytning av ECM.

Aktiviteten til proteasene kan kontrolleres på flere måter:

- Lokal aktivering: Mange proteaser som for eksempel plasminogen utskilles fra cellen i inaktiv form og aktiveres lokalt når de trengs.
- Binding til overflatereseptorer: Mange celler har overflatereseptorer som binder proteaser.
- Utskillelse av inhibitorer: Inhibitorer av proteasene som TIMP som hemmer MMP og serpiner som hemmer serinproteasene skilles ut av cellene for å beskytte matriksen rundt mot degradering. Inhibitorene vil også være med på å beskytte overflateproteiner som er involvert i celledhesjon og migrasjon.

Til sammen utgjør dette et komplekst system for nedbrytning av ECM som kontrollerer på mange nivåer [6].

1.5 Angiogenese

Angiogenese er dannelse av nye blodkar fra blodkar som allerede eksisterer [22]. En tumor kan ikke bli større en 1-2 mm i diameter hvis den ikke danner nye blodårer fordi vekst av svulsten krever tilførsel av oksygen og fjerning av avfallsstoffer. Angiogenese er også nødvendig for at kreftcellene skal kunne metastasere. Kreftceller kan stimulere til dannelse av nye blodkar fra eksisterende kapilærer [21]. I det tidlige stadiet av angiogenese brytes endotelbasalmembranen og ECM rundt den ned og endotelcellene beveger seg gjennom bindevevet mot faktorer som stimulerer angiogenese. Disse endotelcellene proliferer og fester seg til hverandre og danner dermed grunnlag for nye blodårer [17].

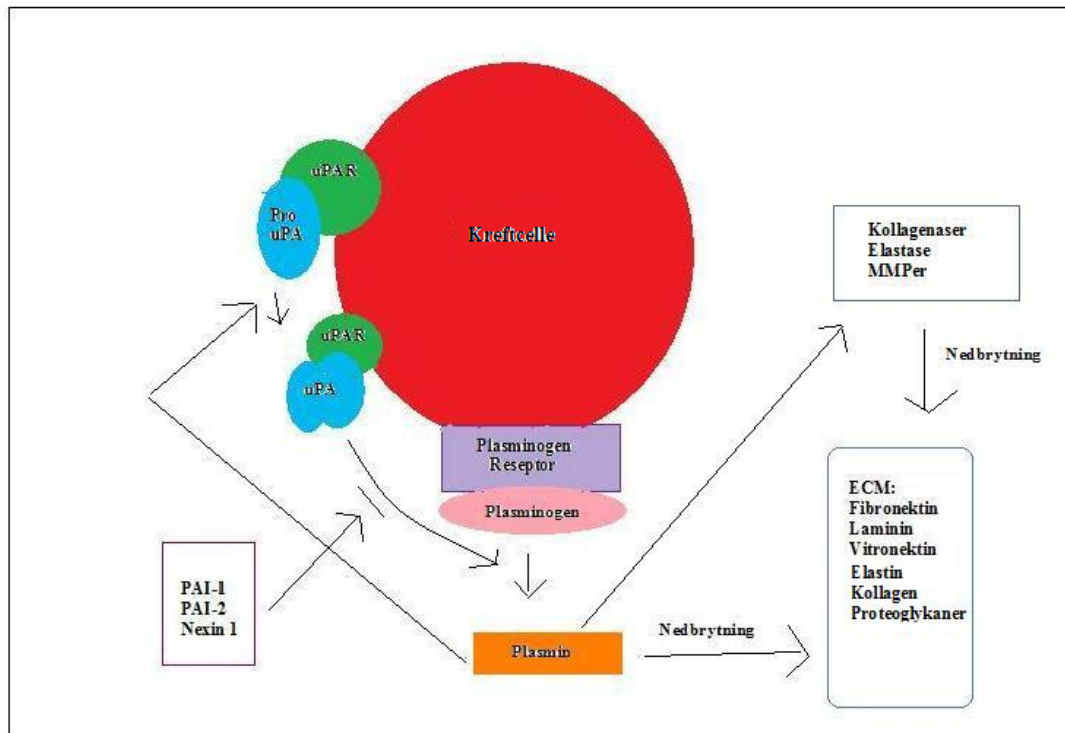
1.5.1 Angiogenetiske og anti-angiogenetiske faktorer

I begynnelsen av tumorvekst induseres ikke angiogenese. Tumorer kan ligge stille uten å vokse i flere år. Dannelse av nye blodårer, er avhengig av en ”angiogenetisk bryter” som kontrolleres av en balanse mellom angiogenetiske og anti-angiogenetiske faktorer. Disse produseres av tumorcellene selv, inflammatoriske celler som makrofager eller bindevevsceller [21]. Faktorer som fremmer angiogenese aktiverer endotelceller ved å indusere en kaskade av hendelser som fører til modulering av endotelcelleprolifisering, migrering, overlevelse, ekstracellulær proteolyse og differensiering. Angiogenetiske faktorer binder til og aktiverer tyrosin kinase reseptorer på overflaten av endotelcellene. Vaskulært endotel vekstfaktorer (VEGF) er en familie med fire angiogenetiske vekstfaktorer. En annen gruppe angiogenetiske faktorer er ”basic fibroblast growth factor” (FGF1 og FGF2). Det er vist at FGF2 oppregulerer uttrykket av VEGF og VEGF reseptor-2. Angiopoietiner er angiogenetiske faktorer som er nødvendig for stabilisering av nydannede blodårer. Anti-angiogenetiske faktorer tilhører forskjellige klasser av molekyler og virker ved forskjellige mekanismer. Noen av dem inhiberer spesifikt endotelceller, mens andre inhiberer flere typer celler. Nedbrytning av ECM, ved hjelp av proteolyse av proteinene den består av, er et viktig for at angiogenese skal skje. Derfor kan inhibitorer av proteolytiske enzymer som for eksempel TIMP ha antiangiogenetisk effekt. TIMP vil i tillegg direkte inhibere endotelcelleproliferasjon. Primære tumorer kan danne proteolytiske enzymer som kløyver plasminogen og kollagen XVIII og dermed dannes produktene angiostatin og endostatin som hemmer angiogenese hos sekundære tumorer eller metastaser. Fragmenter av fibronektin som dannes under proteolysen virker også inhiberende på angiogenesen [22].

1.6 Plasminogen aktivator systemet

Dette systemet består av uPA, uPAR, vevstype plasminogen aktivator (tPA), plasminogen og dens reseptorer og de tre inhibitorene plasminogen aktivator inhibitor 1 (PAI-1) og 2 (PAI-2) og nexin 1 (figur 3) [23]. Plasmin er en serinprotease som degraderer komponenter av ECM og som dannes når inaktive plasminogen aktiveres av uPA. uPA skilles ut fra cellen i form av det inaktive enkjedete proteinet pro-uPA som binder til uPAR på overflaten av cellen og deretter kløyves av blant annet plasmin til aktive tokjedete uPA. Etter aktivering vil plasmin bryte ned ECM-komponenter som fibronektin, vitronektin, laminin men ikke kollagen og elastin. Plasmin kan i stedet aktivere kollagenaser, elastase og MMPer som kan bryte ned kollagener, elastin, fibronektin, laminin og proteoglykaner [17, 24, 25]. Plasminogen binder til tre klasser av reseptorer på overflaten av cellen. Plasmin kan ikke inaktiveres så lenge den er bundet til reseptorer på celleoverflaten [26].

uPA og tPA har lignende funksjoner. Forskjellen på dem er at tPA er involvert i intravaskulær trombolyse og uPA er involvert i pericellulær proteolyse ved migrasjon, sårheling og remodellering av vev. uPA kan også være aktiv uten å være bundet til uPAR, men binding til uPAR øker aktiviteten til uPA flere hundre ganger og derfor skjer aktiveringen av plasmin hovedsakelig nær celleoverflaten. I og med at pro-uPA aktiveres til uPA av plasmin, eksisterer det en "feedback"-mekanisme i plasminogen aktivator systemet. Dette gjør at dannelse av plasmin fra plasminogen vil kunne stimulere til videre aktivering av plasminogen aktivator systemet og videre nedbrytning av ECM [27, 28]. Aktiveringen av plasminogen til plasmin kan hemmes av PAI-1, PAI-2 og nexin 1 [12, 24]. PAI-1 binder til det aktive uPA-uPAR komplekset og gjør at det tas opp av cellen ved endocytose. uPA-PAI-1-komplekset vil degraderes inne i endocytosevesiklene, mens uPAR fraktes tilbake til celleoverflaten. Siden PAI-1 er en hemmer av plasminogen aktivator systemet, ville det være sannsynlig at den virker hemmende på metastasering. Likevel er det sett en sammenheng mellom PAI-1 og tumorinvasjon og angiogenese. PAI-1 kan utskilles av tumorer og stimulere til angiogenese og aktivere celledesignaler som øker celleadhesjon og migrasjon. Det er vist at fysiologiske nivåer av PAI-1 stimulerer til angiogenese mens forhøyede nivåer hemmer angiogenese. Plasminogen aktivator systemet er også involvert i VEGF-indusert angiogenese [27, 29]. PAI-2 er en svakere inhibitor enn PAI-1 [26] men er vist å virke hemmende på metastasering ved å hemme uPA aktivitet [27].



Figur 3. Skisse av Plasminogen aktivator systemet. Pro-uPA binder til uPAR på overflaten av kreftcellen og aktiveres til uPA som fører til binding av plasminogen til plasminogenreseptoren og aktivering til plasmin. Dette trinnet kan hemmes av PAI-1, PAI-2 og Nexin 1. Plasmin kan virke tilbake på pro-uPA slik at den aktiveres til uPA. Plasmin vil både selv bryte ned komponenter av ECM og aktivere andre proteaser som bryter ned ECM-komponentene. Figuren er en modifisering av figur 1 i referanse [24].

1.6.1 uPAR

uPAR er vist å være viktig for mediering av proteolyse og dermed for metastasering. uPAR uttrykkes i monocytter, granulocytter, endotelceller, B-lymfocytter, aktiverte T-celler, neutrofile, fibroblaster og epitelceller. uPAR oppreguleres ved flere sykdomstilstander og det er ofte et overuttrykk av uPAR i kreftceller. uPAR som uttrykkes i en tumor er som oftest begrenset til overflaten av de cellene som ligger i kontaktflaten til bindevevet [12, 24, 28].

uPAR er et GPI-ankret protein som ikke bare er bundet til overflaten av cellen men eksisterer også i en løselig form, suPAR. uPAR er et glykoprotein som er bygd opp av tre relativt like domener DI, DII og DIII. DI inneholder det ligandbindende setet og er ansvarlig for binding av vitronektin, men tilstedeværelse av alle tre domenene er likevel nødvendig for både binding til vitronektin og for at aktivering av uPA skal skje. DII og DIII har ingen uPA-bindende seter, men DIII bidrar til å binde uPAR til plasmamembranen fordi det er i dette domenet GPI-ankeret er festet. Bindingen mellom DI og DII i uPAR er sensitiv ovenfor

proteolyse av flere proteaser og kløyving av denne bindingen inaktiverer reseptoren. uPA og plasmin kan også kløyve denne bindingen og kan derfor selv nedregulere dannelsen av plasmin [23-26, 28].

uPAR og integriner

uPAR sin evne til å regulere invasjon og metastase kommer ikke bare av dens proteolytiske funksjon. uPAR kan regulere aktivering av enkelte integriner og påvirker derfor både deres adhesjons- og signalegenskaper [12, 30]. Det er vist at ligandbinding til uPAR, kan endre cellesignaler som fører til reorganisering av cytoskjelettet. I og med at uPAR ikke har noen intracellulære eller transmembrandomener skjer denne intracellulære signaltransduksjonen gjennom interaksjoner mellom uPAR og membranproteiner som integriner, kjemokinreseptorer og epidermal growth factor (EGF). Ved binding til integriner kan uPAR også endre integrinenes funksjon med hensyn på binding til ECM, adhesjon og migrasjon. Ved tumorvekst vil endring av integrinenes uttrykk og funksjon påvirke cellens interaksjoner med miljøet rundt og gjøre at den får større invasive og migratoriske egenskaper. Disse endringene oppstår fordi integrinene aktiverer signalveier som er nødvendig for tumorinvasjon og metastase blant annet ved hjelp av assosiering med uPAR. Det er sett at uPAR kan assosiere med flere av β - subenhetene til integrinene, men det er også mulig at uPAR binder til α - subenhetene [31]. Det er vist at komplekser av uPAR og integrin β 1-subenheten øker cellens adhesjon til vitronektin og fibronektin i ECM [26]. Regulering av integrinmediert cellerespons ved interaksjon med uPAR er sett i mange former for kreftceller [31].

uPAR og vitronektin

uPAR på overflaten av cellen kan også binde direkte til vitronektin i ECM og gjennom denne interaksjonen øke cellenes adhesjon til ECM. uPARs affinitet for vitronektin øker ved binding av uPA. Celler som uttrykker lave nivåer av uPAR festes dårlig til vitronektin med mindre uPA er bundet til reseptoren mens celler med et høyt nivå av uPAR vil feste seg til vitronektin uavhengig av binding av uPA til uPAR. [12, 32]. GTPasen Rac er viktig for regulering av aktin filamentene i cytoskjelettet og dannelsen av framposningene på cellen som trengs for at den skal beveges seg framover. Det er vist at interaksjonen mellom vitronektin og uPAR kan inducere dannelsen av disse framposningene på cellen og denne induksjonen er avhengig av Rac [32]. Interaksjon mellom uPAR og både vitronektin og fibronektin initierer en kaskade

av signaler som involverer faktorer som fører til oppregulering av angiogenetiske faktorer som VEGF, FGF og EGF og vil derfor stimulere til angiogenese [33].

Vitronektin kan også virke inhiberende på plasminogen aktivator systemet ved å danne komplekser med PAI-1 [13, 26]. Interaksjoner mellom disse to påvirker struktur og funksjon av både vitronektin og PAI-1. Binding til vitronektin gjør at PAI-1 stabiliseres i sin aktive konformasjon slik at proteolyse av ECM-komponenter inhiberes. Binding til PAI-1 vil også hindre vitronektin i å binde til integriner, uPAR og andre celler [13].

1.7 Modifiserte GD25 celler.

I denne oppgaven er det brukt en cellelinje som har fått navnet GD25. Denne cellelinjen er derivert fra cellelinjen G201 som er embryonal stamcelle fra mus hvor begge allelene for integrin β 1-subenheten har blitt mutert slik at β 1-subenheten ikke blir dannet i disse cellene ("knock out") [18, 34]. Det er blitt vist at denne mutasjonen reduserer cellenes adhesjon og migrasjon og påvirker dens morfologi. Celler hvor uttrykket av β 1-subenheten har blitt slått av, vil ikke feste seg til kollagen, fibronektin eller laminin [18]. GD25-cellene har senere blitt transfektert med cDNA som koder for integrin β 1-subenheten og disse cellene er blitt kalt GD25 β 1 celler [34]. Disse to cellelinjene har deretter blitt transfektert med cDNA for humant uPAR og disse cellelinjene er blitt kalt GD25-uPAR og GD25 β 1-uPAR. Disse fire cellelinjene ble i denne oppgaven brukt til å analysere hvilken funksjon uttrykk av uPAR og tilstedeværelse av integrin β 1-subenheten hadde på cellers evne til migrasjon og invasjon.

1.8 Formålet med oppgaven

I denne oppgaven skulle cDNA for uPAR kloneres og deretter stabilt overuttrykkes i humane kreftcellelinjer. Både disse cellene og celler fra mus som uttrykte humant og/eller mus uPAR med eller uten integrin β 1-subenheten skulle analyseres med hensyn på migratoriske og invasive egenskaper. Det ble jobbet ut i fra teorien om at uPAR gjør at cellene migrerer raskere og blir mer invasive. Det skulle også sees på om integriner og uPAR sammen kan påvirke de migratoriske og invasive egenskapene til cellene.

2 Materiale

2.1 Reagenser brukt i forsøkene

Tabell 1. Reagenser som ble brukt i metode 3.1.1

Reagens	Katalognummer	Produsent
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	11791-100	Invitrogen

Tabell 2. Reagenser som ble brukt i metode 3.1.2

Reagens	Spesifikasjoner
<i>E. coli</i> DH5α	Kompetente bakterier
SOC-medium	
LB-medium med ampicillin	100 µg/ml ampicillin
LA-plater med ampicillin	100 µg/ml ampicillin

Tabell 3. Reagenser som ble brukt i metode 3.2.1

Reagens	Produktnummer	Produsent
E.Z.N. A Plasmid mini kit II	D6945-02	Omega Bio-Tek

Tabell 4. Reagenser som ble brukt i metode 3.2.2

Reagens	Produktnummer	Produsent
E.Z.N.A Endo-free® plasmid midi kit	D6915-01	Omega Bio-Tek

Tabell 5. Reagenser som ble brukt i metode 3.3

Reagens	Spesifikasjoner	Produsent
BSA	10 mg/ml	New England Biolabs
1 x NEB reaksjonsbuffer 3	100mM NaCl, 50 med mer Tris-HCL, 10mM MgCl ₂ , 1 mM DTT (pH=7,9)	New England Biolabs
NcoI	10 000 enheter per ml	New England Biolabs

Tabell 6. Reagenser brukt i metode 3.4

Reagens	Produkt- /katalognummer	Produsent
Etidiumbromidløsning 10 mg/ml	15585	Invitrogen
1 Kb DNA ladder plus	SM1332	Fermentas
Loading dye	R0661	Fermentas

Tabell 7. Reagenser som ble brukt i metode 3.5

Reagens	Produktnummer	Spesifikasjoner	Produsent
ABI PRISM® Big Dye® Terminator V.3.1 Sequencing kit	4336919	Big Dye 3.1 enzym, 5 X sekvenseringsbuffer	Applied Biosystems

Tabell 8. Reagenser som ble brukt i metode 3.6.1

Reagens	Spesifikasjoner	Produkt- /katalognummer	Produsent
DMEM medium	Med glukose 4,5 g/L og l-glutamin	E15-810	PAA
Biowhittaker® Trypsin EDTA	200 mg/L EDTA 170 0000 Enheter Trypsin per liter	BE17-16IE	Lonza

Tabell 9. Reagenser brukt i metode 3.7.1

Reagens	Produkt- /katalognummer	Produsent
Lipofectamine 2000	11668-027	Invitrogen
Serumfritt DMEM	E15-810	PAA

Tabell 10. Reagenser brukt i metode 3.7.2

Reagens	Produkt- /katalognummer	Produsent
Lipofectamine LTX	15338-100	Invitrogen
Plus reagens	15338-100	Invitrogen
Serumfritt DMEM	E15-810	PAA

Tabell 11. Reagenser som ble brukt i metode 3.8

Reagens	Produkt-/katalognummer	Produsent
Prestain Protein Marker	P7707S	New England Biolabs
NuPage LDS Sample buffer (4x)	NP0007	Invitrogen
Biotin ladder	7727	Cell signaling technology
20 x MES SDS	NP0002	Invitrogen
Nupage® 4-12 % Bis-Tris Gel	NP0332	Invitrogen
Immobilon Transfer (PVDF) membran	IPVH00010	Millipore
Kanin anti-human uPAR	399R	American Diagnostica.Inc
Geit anti-mus uPAR	AF534	R&D systems
HRP-Esel anti- geit IgG	SC-2020	Santa Cruz biotechnology
HRP-Geit anti- kanin IgG	4050-05	Southern Biotech
HRP-Anti-biotin antistoff	7075	Cell Signaling technology
Western blotting luminol reagent	SC-2048	Santa Cruz Biotechnology

Tabell 12. Fargestoffet som ble brukt i metode 3.9.2

Reagens	Katalognummer	Produsent
BD DilC ₁₂ Fluorescent Dye	354218	BD Biosciences

2.2 Buffere og geler

Tabell 13. Innholdet i bufferen som ble brukt i metode 3.1.1

1x TE buffer pH 8
10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA

Tabell 14. Innholdet i bufferen som ble brukt i metode 3.4.

1 x TBE buffer
89 mM Tris- base, 89 mM borsyre, 2 mM EDTA

Tabell 15. Agarosegelen som ble brukt i metode 3.4

1,5 % Agarosegel	
1xTBE buffer	50 ml
Agarose	0,75 g
Etidiumbromid 10 mg/ml	3,5 µl

Tabell 16. Innholdet i PBS som ble brukt til vasking av celler ved splitting (metode 3.6.1)

1 x PBS pH 7.4
140 mM NaCl, 10 med mer fosfatbuffer, 3 mM KCl

Tabell 17. Nupage Runningbuffer som ble brukt i metode 3.8

600 ml 1 x Runningbuffer	
20 x MES SDS	30 ml
MilliQ vann	570 ml

Tabell 18. Blottebufferen som ble brukt i metode 3.8

1 L Blottebuffer	
Glycine	29 g
Tris base	5,8 g
MilliQ vann	800 ml
Metanol	200 ml

Tabell 19. Vaskebufferen som ble brukt i metode 3.8

1 L 1xTBST	
5 M NaCl	30 ml
1 M Tris pH 7,4	20 ml
MilliQ vann	950 ml
Tween 20	1 ml

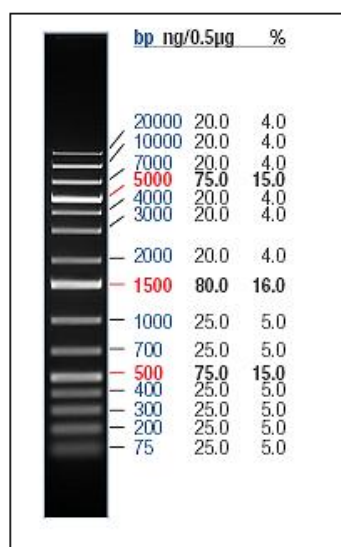
Tabell 20. Blokkebufferen som ble brukt i metode 3.8

5 % Blokke buffer	
Nestlé® Molico instant skummetmelkpulver	7,5 g
1xTBST	150 ml

2.3 Laddere og primere

Tabell 21. Primerene som ble brukt i metode 3.5

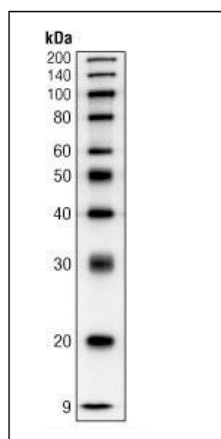
Primer	Gjenkjenningsekvens	Produsent
M13 forward primer	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	Thermo Electron Corporation
M13 reverse primer	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	Thermo Electron Corporation
CMV forward primer	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'	Thermo Electron Corporation
BGH reverse primer	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	Thermo Electron Corporation
EGFP forward primer	5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'	Operon
Cherry forward	5'-AACATCAAGTTGGACATC-3'	Operon



Figur 4. Generuler 1 kb DNA ladder plus. Ladderens som ble brukt i metode 3.4

Tabell 22. Miksen av laddere som ble brukt i metode 3.8

20 µl Ladder	
Prestain Protein Marker	7 µl
Biotin ladder	6 µl
Nupage LDS Sample buffer (4x)	7 µl



Figur 5. Biotinladder som blir brukt i metode 3.8

2.4 Medium og løsninger brukt til celledyrking og celleforsøk

Tabell 23. Mediet som ble brukt til dyrking av cellene i denne oppgaven

DMEM med Streptomycin- penicillin og 10 % FBS	
DMEM med glukose 4,5 g/L og l-glutamin	500 ml
Føtalt bovint serum (FBS)	50 ml
Penicillin 10 000 enheter/ml	5 ml
Streptomycin 10 000 enheter/ml	

Tabell 24. Seleksjonsmedium brukt i metode 3.7.3

Puromycinmedium 2 µg/ml	
Puromycin i vann 1 mg/ ml	320 µl
DMEM høy glukose med serum	160 ml

Tabell 25. Seleksjonsmedium brukt i metode 3.7.3

Puromycinmedium 500 ng/ml	
Puromycin i vann 1 mg/ ml	80 µl
DMEM høy glukose med serum	160 ml

Tabell 26. Frysemedium som ble brukt i metode 3.6.4

Frysemedium med 10 % DMSO	
FBS	18 ml
DMSO	2 ml

2.5 Analyseverktøy

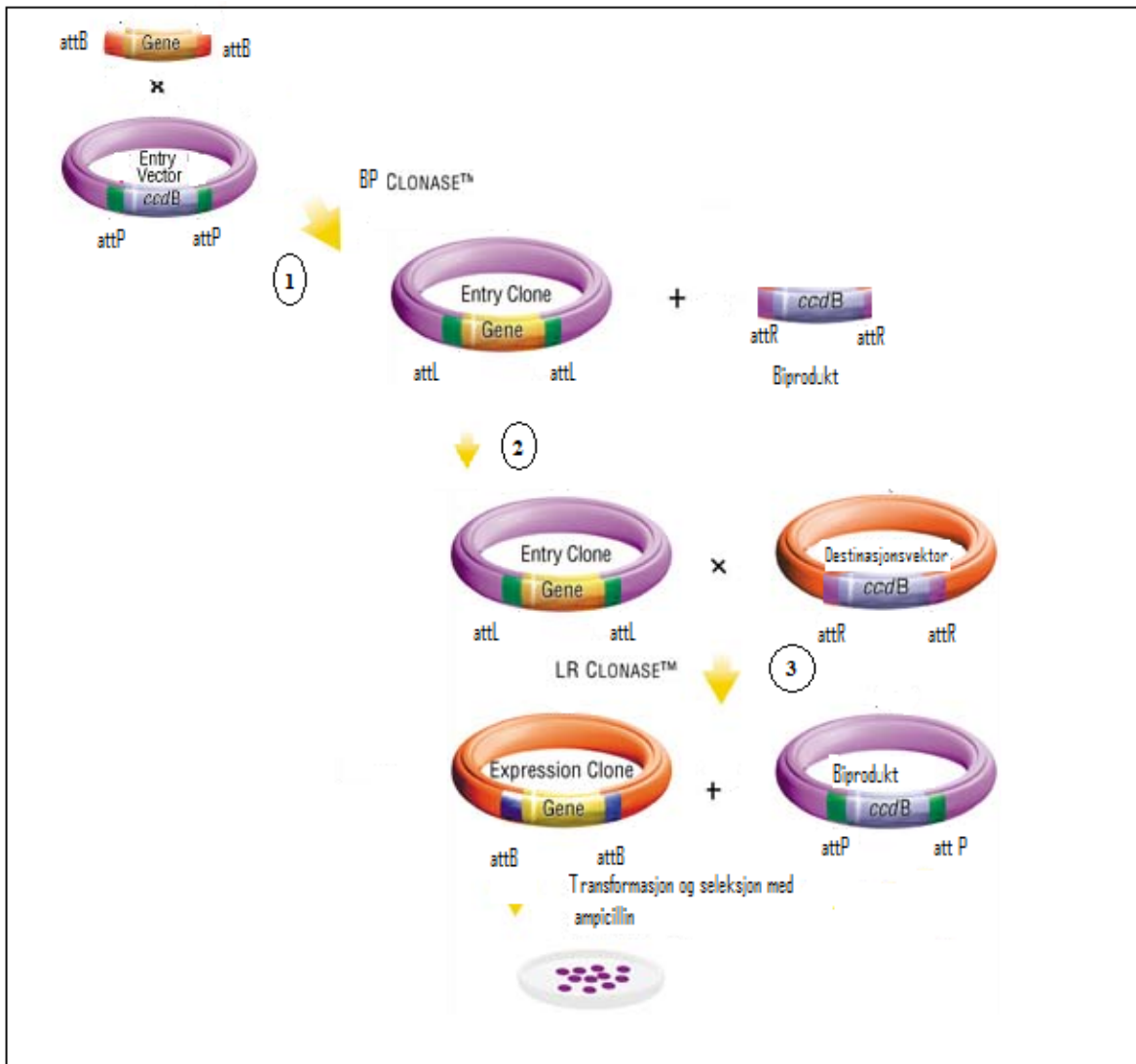
Tabell 27. Analyseverktøyene som ble brukt i denne oppgaven.

Analyseverktøy	Bruksområde	Produsent
ND-1000 full-spectrum UV/VIS spektrofotometer	Måling av DNA-konsentrasjoner	Nanodrop
Gel Doc 2000	Fotografering av geler	Bio-Rad
Luminescent image analyser LAS 3000	Framkalling av Western blot.	Fujifilm
BD Biocoat™ tumor invasion system	Invasjonsassay	BD Biosciences
Z1 Coulter® Particle Counter	Telling av celler	Beckman Coulter™
Leica DM IRB	Mikroskopering	Leica
Avanti® J-26 XP Sentrifuge	Kjølesentrifugering	Beckman Coulter™
Biofuge 13	Sentrifugering	Heraeussepatech
Power Ease 500	SDS gelelektroforese og Western blot	Invitrogen
Elelectrophoresis power supply EPS 3500xc	Agarose gelelektroforese	Pharmacia
Spectra Max Gemini EM	Måling av fluoressens	Molecular Devices

3 Metode

3.1 DNA kloning

I DNA kloning, settes det genet som man ønsker å uttrykke inn i en vektor/plasmid slik at man får dannet rekombinant DNA. I denne oppgaven ble det brukt Gateway® teknologi til å gjøre dette. I dette systemet skjer rekombinasjon av DNA ved hjelp av bruk av spesifikke gjenkjenningssteder i DNAet kalt "att" seter. Genet som skal klones inn i Gateway® systemet kan dannes ved at man lager et PCR- produkt med terminale attB seter (se figur 6) ved hjelp av primere som gjenkjenner attB sekvensen. I første trinnet blir genet som man ønsker å klonere satt inn i et plasmid, kalt entryvektor. Dette gjøres ved hjelp av enzymet BP™ Clonase som kutter i attP setene i entryvektoren og attB setene i PCR produktet. Enzymene vil deretter sette PCR- produktet inn i entryvektoren ved å sette sammen attB og attP setene. De nye setene som ligger på hver sin side av genet i entryvektoren blir kalt attL seter. Deretter byttes genet som er satt inn i entryvektoren ut med genet ccdB mellom to attR seter i en destinasjonsvektor slik at man får dannet en ekspresjonsvektor med det genet man ønsker å uttrykke. LR™ Clonase enzymer katalyserer denne siste rekombinasjonsreaksjonen [35]. Ekspresjonsvektoren med det ønskede genet transformeres inn i kompetente bakterier som sås ut på en LA- plate med passende antibiotika for seleksjon av de bakteriene som har tatt opp ekspresjonsvektoren.



Figur 6. Prinsippene i Gateway® kloning. 1. cDNAet til det produktet som skal klones settes inn i entryvektoren ved hjelp av enzymsystemet BP Clonase™, att setene i entryvektoren endres og navnet på dem skiftes derfor fra attP til attL. 2. Entryklonen som ble dannet i første trinnet kombineres med en destinasjonsvektor med *ccdB* genet mellom to attR seter. 3. Ved hjelp av LR Clonase™ -enzymsystemet dannes en ekspresjonsklone hvor cDNAet til det ønskede produktet er blitt flyttet over til destinasjonsvektoren og ligger mellom to attB seter som blir kalt attB seter. Det dannes også et biprodukt av denne reaksjonen hvor *ccdB* genet sitter mellom to attP seter i entryvektoren. Figuren er modifisering av figurene i referanse [36].

3.1.1 LR Clonase

Da denne oppgaven startet var allerede cDNAet som koder for uPAR blitt dannet ved hjelp av PCR og satt det i entryvektoren pDONR 221 ved hjelp av BPTM Clonase. Derfor ble første trinn i kloningen å få overført cDNAet til en destinasjonsvektor ved hjelp av LRTM Clonase-enzymmiksen. ccdB genet som man bytter ut den ønskede DNA sekvensen med i destinasjonsvektoren er et såkalt "toxic gene". Det vil si at bakterier som i transformasjon tar opp biproduktet av LRTM Clonase reaksjonen (se figur 6) med dette genet, vil produsere stoffer som er toksiske for bakteriene og disse bakteriene vil ikke overleve.

Prosedyre:

Følgende ble blandet i et 1,5 ml eppendorfrør:

150 ng entryvektor

150 ng destinasjonsvektor

TE buffer

2 µl LR Clonase enzymmiks

10 µl totalt

Rørene med reaksjonsblandingen ble inkubert ved romtemperatur i en time.

3.1.2 Transformasjon

Denne metoden ble brukt for å få kompetente bakterier til å ta opp ekspresjonsvektorene som inneholder cDNAet som koder for uPAR. Disse vektorene inneholder et "Ori of replication" som gjør at bakterienes DNA polymerase også vil kunne binde vektoren og replikere DNAet selv om det ikke er en del av det bakterielle kromosomet. Om noen av bakteriene ikke har tatt opp det ønskede plasmidet, vil disse kunne selekteres bort. Ekspresjonsvektoren med cDNAet som ønskes uttrykt inneholder også genet "amp" som koder for proteiner som gjør bakteriene resistente mot ampicillin. Ved å så ut bakteriene på en LA- plate som inneholder ampicillin, vil bare bakteriene som har tatt opp ekspresjonsvektoren kunne vokse.

Prosedyre:

- Kompetente *E.coli* DH5a bakterier ble tint på is fra -70 °C.
- Ligeringsmiksen fra LR™ Clonase- reaksjonen, ble fortynnet 5 ganger, det vil si at 10 µl ligeringsmiks ble tilsatt 40 µl vann.
- 50 µl bakterie og 5 µl fortynnet ligeringsmiks ble blandet i et 2059 Falconrør.
- Rørene stod på is i en halv time.
- Rørene ble gitt et varmesjokk for at bakteriene skal kunne ta opp plasmidet ved å bli satt på vannbad med 42 °C i 90 sekunder.
- Rørene ble satt på is i et par minutter.
- Det ble tilsatt 800 µl SOC medium til hvert rør og de ble inkubert ved 37 °C og risting i 45 minutter for at bakteriene skulle produsere proteinet som gir ampicillinresistensen.
- 200 µl bakteriekultur ble tatt ut av hvert rør og sådd ut på hver sin LA- plate med ampicillin.
- Platene ble snudd opp ned og satt til inkubasjon ved 37 °C over natten.

3.2 Rensing av plasmid fra bakterie

Disse metodene ble brukt for å isolere ekspresjonsvektoren som var blitt transformert inn i bakteriene. Dette ble gjort ved hjelp av to forskjellige metoder: miniprep og endotoksinfri midiprep. Forskjellen på de to metodene er at endotoksinfri midiprep gjøres i større skala og at her blir endotoksiner fjernet fra løsningen i tillegg til at plasmidet renses. Dette er begge metoder hvor alle reagensene og kolonnene som trengs finnes i egne kit (se tabell 3 og 4 under avsnitt 2.1)

3.2.1 Miniprep

Når kolonier av de transformerte bakteriene var blitt dannet på LA- platen, ble det plukket 4 stykker med en pipettespiss som så ble overført til et falconrør med 3 ml LB- medium med 100 µg/ml ampicillin. Rørene ble satt på inkubasjon med 37 °C og risting i ca. 12 timer.

Protokollen for E.Z.N.A Plasmid mini kit II ble fulgt og følgende ble gjort:

- Ca 1,5 ml bakteriekultur ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør som ble sentrifugert på 5000 x g i 10 minutter.
- Supernatanten ble fjernet og nye 1,5 ml av samme bakteriekultur ble tilsatt og røret ble sentrifugert på samme måte som over. Supernatanten ble fjernet.
- Pelleten med bakterie ble resuspendert ved at 500 µl løsning I med Rnase A ble tilsatt og røret ble vortexet til pelleten var løst opp.
- Suspensjonene ble tilsatt 500 µl løsning II. Røret ble snudd opp og ned flere ganger for å få blandet løsningen. Dette gjorde at bakteriecellene lyserte.
- Det ble tilsatt 700 µl av løsning III og røret ble snudd opp og ned flere ganger med en gang etterpå til et hvitt bunnfall ble dannet. Dette tydet på at proteiner og membraner ble felt ut.
- Røret ble sentrifugert på over 13000 x g i ti minutter ved romtemperatur og en hvit pellet ble dannet. Supernatanten inneholdt genomisk DNA og plasmid.
- Det ble tilsatt 100 µl "Equilibration Buffer" til HiBind DNA-kolonnen som stod i et oppsamlingsrør. Røret med kolonnen ble sentrifugert i 20 sekunder ved over i 13000 x g.
- Supernatanten med DNAet ble overført til HiBind DNA- kolonnen som ble sentrifugert ved 13000 x g i ett minutt i to omganger. Dette gjorde at plasmidet bandt til kolonnen.
- 500 µl buffer HB ble tilført kolonnen som ble sentrifugert på over 13000 x g i ett minutt.
- 700 µl DNA vaskebuffer ble tilført kolonnen som ble sentrifugert på over 13000 x g i ett minutt.
- Kolonnen ble sentrifugert alene i to minutter på over 13000 x g for at den skulle tørke.
- Kolonnen ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør, tilsatt 80 µl elueringsbuffer og sentrifugert på over 13000 x g i ett minutt.
- Eluatet inneholdt nå isolert og rensert plasmid. Renheten og konsentrasjonen ble bestemt ved å måle absorbans ved OD260 og 280.

3.2.2 Endotoksinfri midiprep

For denne metoden trengtes det større mengder bakteriekultur. Koloniene som ble plukket fra LA- platen med de transformerte bakteriene ble derfor inkubert i 50 ml LB- medium med 100 µg/ml ampicillin.

Protokollen for E.Z.N.A Endo-free® plasmid midi kit ble fulgt og følgende ble gjort:

- Bakteriekulturen ble overført til sentrifugerør og sentrifugert ved 5000 x g i 10 minutter ved romtemperatur i to omganger
- Supernatanten ble fjernet og bakteriepelleten ble løst opp igjen ved at det ble tilsatt 2,5 ml løsning I med RNase A og dette ble blandet godt.
- Det ble tilsatt 2,5 ml av løsning II og rørene ble snudd opp og ned flere ganger for å lysere bakteriene.
- Det ble tilsatt kald buffer N3 som ble blandet inn i løsningen til membraner og proteiner felte ut i form av et hvitt bunnfall.
- Dette ble overført til en filtersprøyte. Gjennom denne ble den klare løsningen presset ut i et 15 ml eppendorfrør og det hvite bunnfallet ble liggende igjen i filteret. Den klare løsningen inneholdt genomisk DNA og plasmid.
- 600 µl kald ETR løsning ble tilsatt den klare løsningen og røret ble inkubert på is i 10 minutter mens det ble snudd opp og ned med jevne mellomrom.
- Røret ble inkubert på 42 °C i 5 minutter og sentrifugert ved 5000 x g i 5 minutter ved romtemperatur.
- Det var blitt dannet et blått lag av ETR løsning på bunnen av rørene. Det øverste laget ble overført til et nytt 15 ml rør og tatt vare på. Endotoksiner var dermed blitt fjernet fra løsningen.
- Det ble tilsatt 3 ml 96 % etanol, løsningene ble blandet og inkubert i 2 minutter ved romtemperatur.
- Hibind® DNA- kolonnen ble plassert i et 15 ml oppsamlingsrør, påført 1 ml ”Equilibration Buffer” og satt til inkubasjon ved romtemperatur i 5 minutter
- Kolonnene ble sentrifugert ved over 3000 x g i 3 minutter
- Løsningen med DNAet ble tilsatt kolonnen som ble sentrifugert ved 5000 x g i 3 minutter. Væsken som gikk igjennom kolonnen ble fjernet.

- Det ble tilsatt 3 ml buffer HB, sentrifugert som i forrige trinn og væsken som gikk gjennom kolonnen ble fjernet.
- Det ble tilsatt 3,5 ml DNA vaskebuffer, sentrifugert som i forrige trinn og væsken som gikk gjennom kolonnen ble fjernet.
- Trinnet over ble gjentatt.
- For at kolonnene skulle tørke ble de sentrifugert ved 8000 x g i 15 minutter.
- Kolonnene ble plassert i nye 15 ml eppendorfrør, tilsatt 1 ml Endotoksinfri elueringsbuffer og sentrifugert ved 8000 x g i 5 minutter.
- Kolonnen ble plassert i et nytt 15 ml sentrifugerør og trinnet over ble gjentatt, slik at man endte opp med to DNA- løsninger, en med høy og en med lavere konsentrasjon av DNA.
- Eluatene inneholdt nå isolert og rensset plasmid. Renheten og konsentrasjonen ble bestemt ved å måle absorbans ved OD260 og 280.

3.2.3 Måling av utbytte av plasmidrensing.

Konsentrasjon og renhet av DNA-løsningene ble bestemt med Nanodrop® ND-1000 spektrofotometer. I spektrofotometrisk måling vil stråling med en bestemt bølgelengde sendes mot en løsning med en analytt. Noe av strålingen vil absorberes av stoffet i prøven, mens resten vil gå rett gjennom prøven. For å kunne si noe om hvor mye lys som absorberes av stoffet i prøven må det sammenlignes med en referanseprøve. Intensiteten av strålingen gjennom prøven og av referansen brukes til å regne ut absorbansen til prøven (dette gjør spektrofotometeret selv) ved følgende likning:

$$\text{Absorbans} = -\log \left(\frac{\text{Intensitet}_{\text{prøve}}}{\text{Intensitet}_{\text{referanse}}} \right)$$

Sammenhengen mellom absorbans og konsentrasjon gis av Beers lov: $A = E \times b \times c$.

Hvor A er absorbans, E er den bølgelengdeavhengige molare absorbiteten (en konstant for det stoffet som skal måles), b er lengden av strålingsveien gjennom prøven og c er konsentrasjonen av analytten. Denne loven uttrykker dermed at absorbansen er proporsjonal med konsentrasjonen av analytt i prøven dersom lengden på strålingsveien holdes konstant [37, 38].

For nukleinsyrer må likningen modifiseres: $c = (A \times e)/b$, hvor c er nukleinsyre konsentrasjonen i ng/ µl, A er absorbansen i AU, e er den bølgelengdeavhengige

ekstinksjonskoeffesienten i ng- cm/ μ l og b er lengden av strålingsveien i cm. Dobbeltrådet DNA har vanligvis en ekstinksjonskoeffesient på 50 ng-cm/ ml. Nanodrop® bruker 0,2 mm strålingsvei [38].

Ved måling av nukleinsyrer, får man i tillegg til konsentrasjon oppgitt parameteren OD260/280 som er ratioen av prøvens absorbans ved 260 og 280 nm. Dette er et mål for renheten til DNAet i prøven. Denne verdien skal ideelt ligge mellom 1,8 og 2,0. Ved 260 nm vil DNA absorbere strålingen mens ved 280 nm vil proteiner absorbere strålingen. Det vil si at om det hadde vært mye proteiner til stede i prøven ville verdien være lav fordi absorbansen ved 280 nm ville være høy i forhold til absorbansen ved 260 nm [38].

Prosedyre:

Siden det var DNA som skulle måles, ble nukleinsyrefunksjonen i programmet på PC-en brukt. Det ble satt på 2 μ l av hver prøve på spektrofotometeret. Først ble vann satt på som referanse og det ble trykket på "Blank" i displayet. Deretter ble prøvene satt på, det ble trykket på "measure" og konsentrasjonen av DNA og OD260/280 ble vist.

3.3 Kutting med restriksjonsenzymmer

Restriksjonsenzymmer er enzymer som kutter dobbeltrådet DNA på helt spesifikke steder. Disse enzymene gjenkjenner en spesifikk DNA sekvens, som vanligvis er fire eller seks nukleotider lang. Når restriksjonsenzymet kløyver DNAet dannes restriksjonsfragmenter av ulike størrelser [39]. Når man vet størrelsen på fragmentene som dannes når man kutter opp en vektor med et spesifikt restriksjonsenzym, kan man utnytte dette til å identifisere vektoren.

For restriksjonskutting av en vektor, ble følgende blandet i et 1,5 ml eppendorfrør:

μ l DNA (400 ng)
2 μ l 1 x NEB reaksjonsbuffer 3
2,5 μ l BSA 10 mg/ml
0,75 μ l restriksjonsenzym (10 000 enheter/ml)
 μ l H₂O
20 μ l Totalt

Innholdet i rørene ble blandet og inkubert på vannbad ved 37 °C i cirka en time.

3.4 Agarose gelelektroforese

Denne metoden ble brukt til å separere DNA- fragmentene som ble dannet under restriksjonskuttingen (metode 3.3). Blandingen av DNA- fragmenter settes på en agarosegel som påføres et elektrisk felt. Her utnyttes det at DNA er negativt ladet på grunn av fosfatgruppene. I gelen med det elektriske feltet vil DNA- fragmentene derfor bevege seg mot den positive polen. Hvor langt fragmentene vandrer er avhengig av størrelsen. De mindre fragmentene vil vandre lengre enn de større fordi de har lettere for å bevege seg gjennom gelen [39]. Etidiumbromid tilsettes gelen for å kunne visualisere DNA- fragmentene. Etidiumbromid vil legge seg mellom basene i DNAet og vil lyse når det utsettes for ultrafiolett lys. For å kunne si noe om størrelsen på fragmentene som vises i gelen, setter man også på en blanding av DNA- fragmenter med kjent størrelse (ladder).

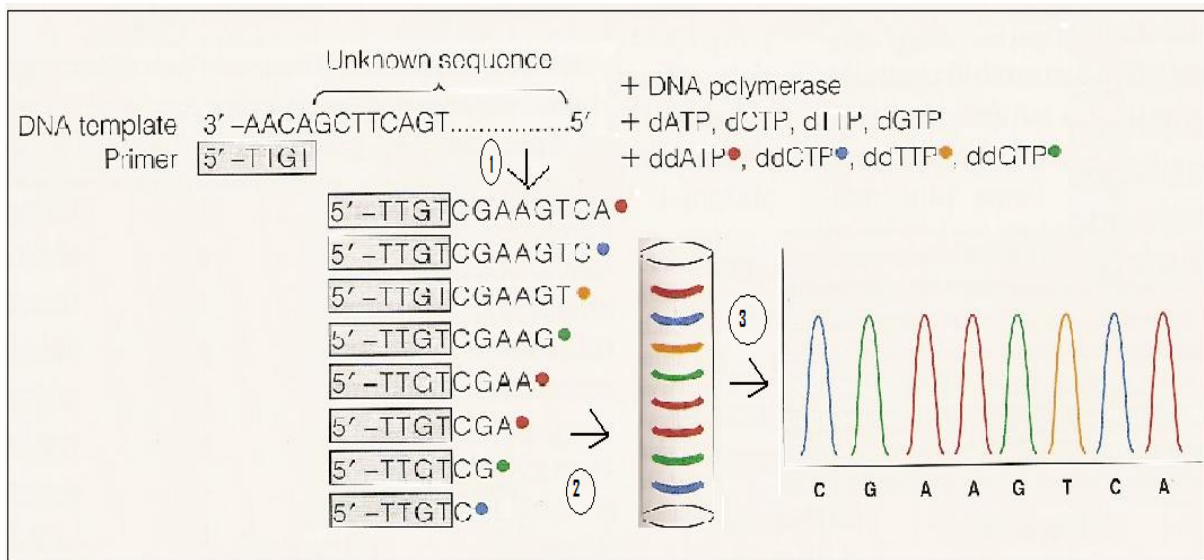
Hvor konsentrert agarosegelen som brukes er, er avhengig av størrelsen på DNA- fragmentene man ønsker å separere. Her ble det brukt 1,5 % gel fordi de forventede fragmentene lå på mellom 200-3000 basepar. Agaroseløsningen (Se tabell 15) ble laget ved oppvarming, tilsatt etidiumbromid og overført til elektroforesekaret. Det ble satt en kam i brønnen slik at det skulle dannes brønner i gelen. Etter ca. 20 minutter hadde gelen stivnet. Løsningene med de oppkuttete plasmidene (se metode 3.2) ble tilsatt 3,3 µl loading dye (1/6 av prøven). Ladder og prøvene med DNA fragmenter ble satt i brønnene på gelen. Gelen ble satt på et elektrisk felt på 200 V og stod i ca. en halv time til prøvene hadde vandret noe over halvveis på gelen. Det ble tatt bilde av gelen med UV- lys med Bio-Rad Gel Doc 2000 slik at man kunne se DNA fragmentene.

3.5 DNA Sekvensering

Denne metoden ble brukt for å verifisere at det entryvektorene og ekspressjonsvektorene inneholdt den korrekte DNA- sekvensen (uPAR).

Prinsippet for DNA sekvensering er at et entrådet DNA- segment fungerer som templat for syntese av en ny komplementær DNA- tråd. I tillegg til DNAet som ønskes sekvensert, inneholder reaksjonsmiksen DNA polymerase, primere og en buffer med nukleotider. En primer er et kort enkelttrådig DNA- fragment som er komplementær til en av DNA trådene som skal sekvenseres. De to DNA- trådene i det dobbeltrådet DNAet skilles fra hverandre

ved oppvarming av reaksjonsmiksen til ca. 96 °C. DNA polymerase vil feste nukleotider til primeren og gir en DNA tråd som er komplementær til det entrådete DNAet (figur 7). For at DNA- syntesen skal foregå må deoksynukleotidene dATP, dTTP, dCTP og, dGTP være tilstede. I tillegg inneholder reaksjonsmiksen dideoksynukleotidene ddATP, ddCTP, ddGTP og ddTTP som alle er merket med hver sin fluorescerende farge. Når et dideoksynukleotid inkorporeres i DNA- tråden i stedet for et deoksynukleotid, vil syntesen stoppe fordi dette nukleotidet ikke inneholder en 3'OH-gruppe som et nytt nukleotid kan binde til. De ufullstendige DNA- segmentene som dermed dannes, vil alle ha et farget nukleotid i enden som korresponderer til det sist inkorporerte nukleotidet. Disse segmentene separeres på en polyakrylamidgel ved gelelektroforese. De fargede fragmentene detekteres ettersom de passerer gjennom en detektor, slik at sekvensen kan leses av [40].



Figur 7. Trinnene i DNA sekvensering. 1. Primer, ukjent DNA sekvens og buffer med DNA polymerase og nukleotider blandes og reagerer slik at det dannes DNA-fragmenter av ulike størrelser merket med en farge i enden hvor hvilken farge de har er avhengig av hvilket nukleotid fragmentet slutter med. 2. Disse fragmentene separeres ved hjelp av gelelektroforese. 3. Rekkefølgen av fragmentene detekteres og settes opp som vist i trinn 3 i figuren. Figuren er en modifisering av figur 16-14 i referanse [40].

Prosedyre:

Mastermiks ble laget:

4 µl 5x sekvenseringsbuffer

2 µl 3.1 Big Dye enzym

12,5 µl H₂O

18,5 µl Totalt

Reaksjonsblandingen ble laget i et 0,2 ml PCR-rør av 1µl DNA (200-300 ng/µl), 0,5 µl 10 µM primer og 18,5 µl mastermiks. Rørene ble plassert i PCR- maskinen og følgende sekvenseringsprogram ble benyttet:

<u>Denaturering 96°C</u>	<u>1 min</u>	
Denaturering 96°C	10 sek	
Annealing 50°C	5 sek	x 25
<u>Polymerisering 60°C</u>	<u>4 min</u>	
Terminering 4°C	∞	

Om sekvensen av DNAet som ble sekvensert var den man ønsket å få ble bestemt ved søk i databasen på ”National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Her ble funksjonen ”Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)” brukt. Videre ble ”nucleotid blast”-programmet brukt. Denne databasen inneholder sekvenser både for genomisk DNA og cDNA. Resultatene fra disse søkene ble presentert etter hvilket produkt det er mest sannsynlig at den analyserte sekvensen kodet for.

3.6 Celledyrkning og celleforsøk

3.6.1 Splitting av celler

Når cellene var ca. 80 % konfluente ble de splittet.

- Mediet ble sugd av og PBS ble tilsatt for å fjerne rester av serum. Det ble tilsatt 5 ml til T75- flasker og 3 ml til T25- flasker.
- PBS ble sugd av og trypsin tilsatt for at ECM- molekylar og bindinger mellom cellene og ECM skulle kløyves. Det ble tilsatt 1 ml trypsin til T25- flasker og 2 ml til T75- flasker.
- Flasken ble satt i varmeskap i noen minutter til cellene hadde løsnet fra plastikken i bunnen av flasken.
- Cellene ble resuspendert i nytt medium. Det ble brukt 2 ml til T25- flasker og 3 ml til T 75- flasker. Av dette ble det tatt ut 0,6 ml (T25- flaske) eller 1ml (T75- flaske) celledøsning som ble overført til den nye flasken .
- Det ble tilsatt medium til den nye flasken. For T25- flasker skulle det være totalt 5 ml og for T75- flasker skulle det være totalt 15 ml.

3.6.2 Telling av og utsåing av celler

Cellene ble trypsinert som beskrevet under avsnitt 3.6.1. Celleløsningen ble overført til et 15 ml eppendorfrør. 300 µl av celleløsningen ble tilsatt 8 ml isoton løsning. Fra denne løsningen ble cellene talt. Z1 Coulter® Particle Counter teller antall celler per 0,5 ml løsning. Det ble målt to ganger og de to antallene ble summert og denne summen tilsvarte antall celler i 1 ml av løsningen. For å finne konsentrasjonen av celler i den opprinnelige løsningen ble følgende likning brukt: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$. Man skulle finne C_1 og V_1 var volumet av den opprinnelige celleløsningen dvs. 0,3 ml. C_2 var den målte cellekonsentrasjonen i den fortyndede løsningen og V_2 var volumet av denne løsningen dvs. 8,3 ml.

Når konsentrasjonen i celleløsning var blitt regnet ut kunne man vite akkurat hvor stor mengde av denne løsningen man skulle tilføre den brønnen eller skåla man skulle så cellene ut i for å få det ønskede antall celler.

3.6.3 Tillagning av cellelysat for Western blotting.

Cellelysatene ble laget med en konsentrasjon på 10 000 celler per µl. Tre eller fem millioner celler ble sådd ut i en 60 mm skål. Cellene stod i varmeskap i ca. fire timer til cellene hadde festet seg til plastikken. Mediet ble sugd av og det ble tilsatt 300 eller 500 µl NuPAGE LDS Sample buffer (4x) (blandet 1:1 med vann) avhengig av om det var tre eller fem millioner celler som var sådd ut i skålen. Hele bunnen av skålen ble skrapt med celleskrape og cellelysatet ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør. Det seige cellelysatet ble sonikert i 3-5 sekunder for å bryte opp alt genomisk DNA. Dermed fikk lysatet en mer flytende konsistens som lettere kunne settes på SDS- PAGE- gelen (se metode 3.8)

3.6.4 Tillaging av frysestock av celler

Prosedyre:

- Cellene i en T75- flaske ble trypsinert som i metode 3.6.1
- Celleløsningene ble fordelt likt på fire 15 ml sentrifugerør.
- Rørene ble sentrifugert i 5 minutter og mediet ble sugd av.
- Pelleten ble løsnet fra bunnen ved å knipse på rørene.
- 1 ml frysemedium (10 % DMSO og 90 % FBS) ble tilsatt til hvert rør og løsningen ble overført til 2 ml cryorør.
- Rørene ble satt i isopor på -70 °C og overført til nitrogentanken neste dag.

3.7 Transfeksjon

Denne metoden ble brukt for å få stabilt overuttrykk av humant uPAR i en cellelinje. Ekspresjonsvektorene som var blitt dannet ved rekombinasjon, ble transfektert inn i de ønskede cellelinjene ved hjelp av to forskjellige metoder. I begge disse metodene blandes DNAet med et kationisk lipid slik at liposomer dannes. Liposomene som bærer DNAet vil fusjonere med cellemembranen og frigjøre DNAet inne i cellen.

3.7.1 Lipofectamine™ 2000

Protokollen for Lipofectamine™ 2000 fra Invitrogen ble fulgt og følgende ble gjort:

300 000 celler ble sådd ut i hver sin brønn i et seksbrønners brett. Dagen etter ble løsning med ekspresjonsvektor tilsvarende 2 µg DNA blandet med serumfritt DMEM slik at man tilsammen fikk 250 µl. I et annet rør ble 10µl Lipofectamine™ 2000 blandet med 240 µl serumfritt medium. Dette røret stod ved romtemperatur i fem minutter før innholdet ble overført til røret med DNA og serumfritt medium for at komplekser skulle dannes. Dette stod i tjue minutter ved romtemperatur før det ble pipettert ut over i hver sin brønn med celler og serumfritt medium (3ml). Brettet ble satt ca. fire timer i inkubatorkapet før man skiftet tilbake til medium med serum.

3.7.2 Lipofectamine™ LTX og Plus reagens

Dagen før transfeksjon ble 300 000 celler sådd ut i hver sin brønn i et 6-brønners brett. I følge protokollen for Lipofectamine™ LTX og Plus reagens skulle man bruke mellom 1,25 og 3,75 µg DNA avhengig av hvilken cellelinje som skulle transfekteres. Løsningen med

DNA ble fortynnet opp til 500 μ l med serumfritt medium. Mellom 6,25 og 7,5 μ l Plus reagens ble tilsatt til det fortyndede DNAet. Dette ble inkubert ved romtemperatur i fem minutter. 1,87-22,5 μ l Lipofectamine™ LTX ble deretter tilsatt. Dette ble inkubert ved romtemperatur i 30 minutter slik at komplekser ble dannet. Det ble skiftet til serumfritt medium i brønnene med celler. Det serumfrie mediet med lipid-DNA kompleksene ble overført til hver sin brønn med celler. Etter fire timer med inkubasjon i inkubatorskap, ble det skiftet tilbake til medium med serum.

3.7.3 Seleksjon av transfekterte celler

Etter at de transfekterte cellene hadde stått i to dager, kunne seleksjonen av de cellene som hadde tatt opp ekspresjonsvektorene begynne. Denne seleksjonen skulle gjøres med puromycinmedium siden alle vektorene inneholdt genet ”puro” som koder for proteiner som produserer puromycinresistens. Ved å bruke 96- brønnersbrett hvor man sår ut få celler i hver brønn, vil muligheten for å få enkeltkolonier i hver brønn øke. Isolering av enkeltkolonier er ønskelig fordi cellene i samme koloni vil ha integrert DNAet på samme stedet i genomet og dermed har de samme egenskapene.

Prosedyre:

- To dager etter at cellene var blitt transfektert ble mediet sugd av brønnene og cellene ble vasket med PBS.
- Det ble satt til 500 μ l trypsin og brettet ble satt i inkubatorskapet i noen minutter.
- Det ble satt til 500 μ l medium med serum og dette ble overført til hvert sitt reservoar med 10 ml puromycinmedium.
- Seleksjonsmediet med cellene ble overført til et 96- brønnersbrett ved hjelp av multipipette. Halvparten av brønnene i hvert brett ble tilsatt 75 μ l medium og den andre halvparten av brønnene ble tilsatt 150 μ l.
- Seleksjonsmediet ble skiftet hver tredje dag.
- Seleksjonen foregikk i ca. to uker. I løpet av disse ukene ble brønnene sjekket for levende celler ved hjelp av mikroskopering.
- De brønnene som bare hadde en koloni av levende celler ble trypsinert og cellene ble overført til en brønn i et 24-brønners brett.
- Når cellene var blitt tette ble de overført til en T25 flaske for at de kunne dele seg til å bli enda flere slik at de senere kunne karakteriseres.

3.8 SDS-PAGE og Western blot

Western blot er en metode for påvisning av proteiner. Lysat av celler kjøres på en polyakrylamidgel hvor proteiner separeres ved gelelektroforese (PAGE). Proteinene i cellelysatene har en negativ ladning fordi at lysatene tilsettes SDS⁻ som vil binde til proteinene. Proteinene vil derfor vandre mot den positive polen. Små proteiner vil vandre lenger enn store proteiner fordi polyakrylamidgelen virker som et nettverk som hindrer bevegelsen av store molekyler i større grad enn små molekyler [41]. Proteinene overføres fra gelen til en PVDF- membran ved Western blotting. Denne membranen inkuberes med et antistoff mot det proteinet man ønsker å identifisere og som vil binde til dette proteinet. Deretter tilsettes et sekundært antistoff dvs. et antistoff som gjenkjenner det primære antistoffet og binder seg til det. Det sekundære antistoffet har bundet til seg et HRP- molekyl som enzymatisk kan omdanne luminol- substrat til lys. På den måten vil man kunne visualisere det proteinet man ønsker å identifisere. Man kan også ved hjelp av denne metoden få et inntrykk av om cellene inneholder mye eller lite av det proteinet man ønsker å identifisere. Dette gjøres ved å se på intensiteten av båndene som dannes på membranen.

Prosedyre:

Protokollen for Xcell Surelock™- systemet for SDS-PAGE ble brukt og følgende ble gjort:

- Cellelysatene og ladderer ble varmet opp på ca. 100 °C vannbad i ca. 10 minutter.
- Kammen på gelen ble fjernet og brønnene ble vasket med litt runningbuffer.
- Gelen ble satt med i Xcell Surelock™ systemet med brønnene innover.
- Det indre kammeret ble fylt fullt med runningbuffer og resten av bufferen ble fylt i det ytre kammeret.
- 15 µl (150 000 celler) av hver av prøve ble satt på i hver sin brønn og gelen ble satt på programmet NuPAGE- gel med 200 V i 35 minutter.
- For at PVDF- membranen skulle aktiveres til å kunne binde proteiner måtte den fuktes på følgende måte:
 - Ca. 3 sekunder i metanol
 - Ca. 10 sekunder i vann
 - Mer enn fem minutter i blottebuffer

- Det ble klippet ut seks filter i samme størrelse som membranen og disse ble fuktet i blottebuffer.
- Seks svamper i samme størrelse som membranen og filteret ble fuktet med blottebuffer.
- Gel "kassetten" ble brutt opp med en kniv og brønnene på gelen ble fjernet.
- Gelen ble liggende på den største platen og et filter ble lagt oppå.
- Gelen ble snudd, platen tatt av og den nederste delen av gelen ble fjernet.
- Membranen ble lagt oppå gelen og et filter ble lagt oppå den.
- I blottekammeret ble det lagt tre svamper, to filterpapir og deretter gelen og membranen.
- De siste fuktete filtrene og svampene ble lagt på toppen.
- Det innerste kammeret ble fylt fullt med blottebuffer og det ytterste kammeret ble fylt med milliQ vann for kjøling.
- Det ble blottet med Nupage blot i en time.
- De separerte proteinene hadde nå blitt overført til PVDF- membranen som ble lagt inntil veggen på et 50 ml eppendorfrør med den delen som hadde ligget nærmest gelen, innover.
- Membranen ble vasket med 5 ml TBST i 5 minutter.
- TBST ble helt ut og 5 ml blokkebuffer ble tilsatt røret. Membranen ble inkubert med blokkebuffer i en time.
- Primært antistoff ble tilsatt blokkebufferen i fortynningen som var angitt i produktbladet og røret ble satt til inkubasjon ved 4 °C over natten
- Neste dag ble membranen vasket med 5 ml TBST i fem minutter tre ganger.
- Sekundært antistoffet ble tilsatt i riktig fortynning i 5 ml blokkebuffer og membranen ble inkubert i en time.
- Membranen ble vasket med 5 ml TBST i fem minutter tre ganger.
- Membranen ble lagt på plastikk og påført 3 ml "Western blotting luminol reagent" som var blitt blandet av to løsninger i forholdet 1:1.
- Det ble tatt bilde av membranen med Luminescent Image Analyzer LAS 3000.

3.9 Migrasjons- og invasjonforsøk

3.9.1 Wound Healing assay

Denne metoden ble brukt for å observere hvordan de forskjellige cellelinjene migrerte. Det ble sådd ut $0,6-0,8 \times 10^6$ celler av hver cellelinje en brønn i et seks-brønnersbrett. Når det ble observert at cellene var helt tette, ble det med en pipettespiss skrapet en rett strek i bunnen av brønnen. Dette gjorde at det gikk en rett cellefri linje midt inne i det tette laget av celler. Det ble tatt bilde av denne linjen og cellene rundt rett etter skraping. Deretter ble det tatt bilde av denne linjen på samme sted (merket med tusj) med 24 timers mellomrom. Det ble målt hvor mye av det cellefrie området som var blitt tettet igjen av celler fra dag til dag og deretter ble det sammenlignet hvor fort de forskjellige cellelinjene tettet igjen det cellefrie området.

Bredden på de cellefrie områdene ble målt med programmet Leica IM 150 Image Reader som det ble tatt bilde med. Det ble kalibrert for at bildene var tatt med 5x objektiv. Funksjonen "measurement" ble brukt. Det ble satt opp en linje i begge kantene av den cellefrie linjen og programmet målte avstanden mellom disse linjene.

3.9.2 Invasjonsassay

Denne metoden ble brukt for å måle cellenes invasive egenskaper. BD Biocoat™ Tumor invasion System som ble brukt i denne metoden består av et 24-brønnersbrett hvor det i hver brønn ligger en plate med en membran med porer på 8 μm . Oppå denne membranen ligger et lag med BD Matrigel™ Matriks. Matrigelen består av 56 % laminin, 31 % kollagen IV og 8 % nidogen og den virker derfor som en basalmembran og vil være en barriere for ikke-invasive celler. Dermed vil ikke disse cellene kunne vandre gjennom matrigelen, mens invasive celler vil kunne løsne fra og migrere gjennom den. Cellene merkes med en fluorescerende farge og dermed kan de cellene som har vandret gjennom membran detekteres ved å måle intensiteten av fluorescens på undersiden membranen. Membranen blokker lys på mellom 490-700 nm og celler som ikke har passert membranen vil derfor ikke detekteres.

Prosedyre:

- Når cellene var minst 80 % konfluente, ble det skiftet til serumfritt medium med 0,1 % BSA.
- BD Matrigel™ Matriksen ble rehydrert ved å tilsette 500 µl varm 1 x PBS (37 °C) til hver brønn. Brettet med brønnene ble satt i inkubatorskap i to timer.
- Etter 5 timer ble mediet fjernet og cellene ble merket med fluorescerende farge ved at 7 ml serumfritt medium med 10 µg/ml BD DilC₁₂ ble tilsatt.
- Etter en times inkubasjon ble cellene trypsinert og talt (se metode 3.6.1 og 3.6.2), deretter ble 500 µl med 1×10^5 celler per ml celleløsning overført til hver sin brønn i BD Biocoat™ Tumor Invasion System etter at PBS var fjernet. Det tilsatt 500 µl medium med serum under membranen med matrigelen i hver brønn. Cellene ble inkubert i varmeskap til neste dag.
- Fluorescens på undersiden av matriksen i brønnene ble målt ved bruk av Spectra Max Gemini EM.
- Først ble det målt med mediet tilstede på undersiden av matrigelen, deretter ble mediet fjernet, 1 x PBS ble tilsatt og det ble målt på nytt.

4 Resultater

4.1 Kloning av cDNA for humant uPAR

Ekspresjonsvektorer ble forsøkt dannet ved overføring av cDNAet for humant uPAR fra entryvektoren pDONR221-tag-uPAR til destinasjonsvektorene som hadde cDNA som kodet for "tag"-protein. Dette er proteiner som fluorescerer når de utsettes for lys med en viss bølgelengde. De to "taggene" som ble brukt her var Cherry og EGFP. Entryvektoren pDONR221-kozak-uPAR ble brukt til å klonere cDNAet for uPAR over til destinasjonsvektorer uten "tag". Disse entryvektorene har en kozak-sekvens som er viktig for gjenkjenning av startkodonet AUG ved translasjon av mRNAet. Destinasjonsvektorene med tag har kozak-sekvensen oppstrøms for starten av tag'en. Tabell 28 viser de seks ekspresjonsvektorene med cDNAet som kodet for uPAR som ble forsøkt dannet ved Gateway® kloning

Tabell 28. Entryvektorene og destinasjonsvektorene som ble brukt og de ekspresjonsvektorene som ble forsøkt laget av dem.

Entryvektor	Destinasjonsvektor	Ekspresjonsvektor
pDONR221- tag- uPAR	pDEST/FRT/TO/EGFP	pDEST/FRT/TO/EGFP- uPAR
pDONR221- tag- uPAR	pDEST/TO/Cherry-puro	pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR
pDONR221- tag- uPAR	pDEST/TO/EGFP/pgk-puro	pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR
pDONR221- tag- uPAR	pDEST/TET/EGFP	pDEST/TET/EGFP- uPAR
pDONR221- kozak- uPAR	pDEST/TO/pgk-puro	pDEST/TO/pgk-puro-uPAR
pDONR221- kozak- uPAR	pDEST/FRT/TO	pDEST/FRT/TO-uPAR

FRT står for Flp Recombination Target site. Vektorer som inneholder dette setet, kan transfekteres inn i celler som har FRT- setet inkorporert i genomet sitt. Ved å transfektere disse vektorene inn i disse cellene sammen med et plasmid (pOG44) som koder for Flp rekombinase, vil FRT setet i vektoren kunne settes inn i FRT setet i genomet i cellene. Dermed vil cDNA som koder for humane uPAR inkorporeres på samme sted i genomet i alle cellene. Disse cellene trenger derfor ikke å selekteres i 96-brønners brett for å isolere enkeltkolonier. Fordi man bare fikk dannet et plasmid med FRT- sete (se tabell 29), valgte man å ikke gå videre med å transfektere dette plasmidet inn i en cellelinje (SCC-FRT₇) med FRT- sete.

Vektorene som har betegnelsene TO og TET i seg, kan transfekteres inn i celler som har et induserbart system som gjør at uttrykket av vektorene kan reguleres ved å tilsette tetracyclin.

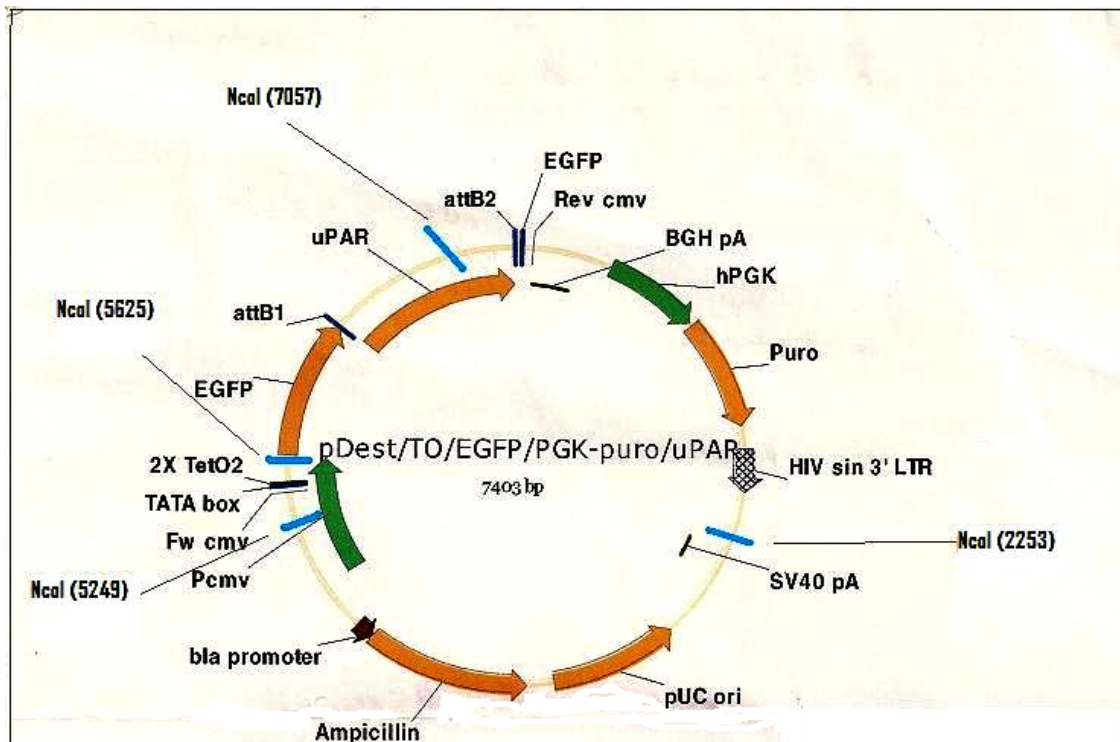
Tre av ekspresjonsvektorene ble bekreftet å ha riktig sekvens både ved restriksjonskutting og DNA- sekvensering (se avsnitt 4.2 og 4.3). Tabell 29 viser utbytte og renhet av de tre ekspresjonsvektorene etter amplifisering og rensing fra *E.coli* DH5 α .

Tabell 29. Utbytte og renhet av DNA etter plasmidrensing målt med Nanodrop.

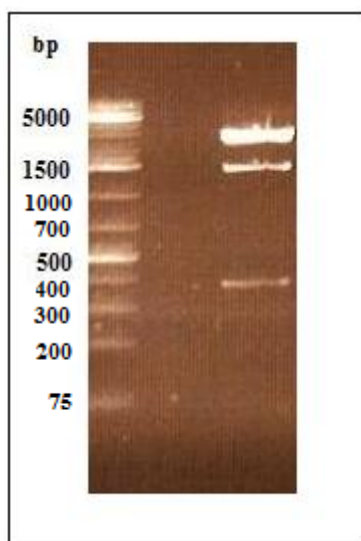
Ekspresjonsvektor	Konsentrasjon	OD 260/280
pDEST/FRT/TO/EGFP- uPAR	228,2 ng/ μ l	1,92
pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR	396,5 ng/ μ l	1,92
pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR	257,6 ng/ μ l	1,94

pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR var blitt rensset med miniprep og pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR og pDEST/FRT/TO/EGFP-uPAR med endotoksinfri midiprep. Det ble også gjort endotoksinfri midiprep på pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR. Grunnen til at ikke produktet etter denne endotoksinfrie midiprepen ble brukt, var at utbyttet og renheten var alt for lav. Derfor ble produktet fra miniprepen brukt videre selv om det optimale hadde vært å bruke et plasmid som var garantert endotoksinfritt. Endotoksiner er lipopolysakkarider (LPS) som ligger i den ytre membran til gram negative bakterier som *E. coli*. Bakteriene produserer små mengder LPS under vekst og store mengder når de dør. Når bakteriecellene lyses under plasmidrensingen, avgis endotoksinene til lysatet. I den endotoksinfrie midiprepen, vil ETR-løsningen hindre at endotoksinmolekylene binder HiBind® matriksen sammen med det plasmidet. Om det er endotoksiner tilstede når DNAet transfekteres inn i celler, kan dette redusere transfeksjonseffektiviteten og overlevelsen for celler som er følsomme ovenfor endotoksiner [42].

4.2 Restriksjonskutting og agarose gelelektroforese



Figur 8. Oppbygningen av ekspresjonsvektoren pDEST/TO/EGFP/PGK-puro-uPAR. Kuttasetene til *NcoI* er vist med lyseblå streker. I parentes vises hvor mange basepar fra startkodonet kuttasetet ligger. Oransje piler indikerer lokalisering og orientering av cDNA- sekvensene til EGFP, uPAR, puromycinresistens og ampicillinresistens. Grønne piler indikerer promotoren til henholdsvis EGFP- uPAR og puromycinresistensgenet.



Figur 9. Restriksjonskutting av pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR med *NcoI*. 400 ng av ekspresjonsvektoren ble kuttet med *NcoI* i en time og deretter separert ved elektroforese i 1,5 % agarose. Forventet størrelse på båndene var 2599 bp, 2996 bp, 1432 bp og 376 bp.

Etter kutting av pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR med restriksjonsenzymet NcoI, var det forventet dannelse av fire fragmenter med størrelsene 2599 bp, 2996 bp, 1432 bp og 376 bp (se figur 8). I figur 9 kan det se ut som det bare er tre bånd på agarosegelen. Grunnen til dette er antageligvis at de to fragmentene på 2599 bp og 2996 bp ligger så nærme hverandre at det ser ut som et bånd. Sees dette som to bånd så stemmer det med de forventede størrelsene. Det ble også gjort en restriksjonkutting for pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR med NcoI men da man ikke hadde oppbygning en av denne vektoren, visste man ikke størrelsen på fragmentene som blir dannet ved denne kuttingen. Likevel vil ikke oppbygningen for denne vektoren være så forskjellig fra pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR. Siden fragmentene som ble dannet under restriksjonskuttingen for pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR ikke var så forskjellige fra de for pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR, kunne man anta at dette var riktig resultat.

4.3 Sekvensering av entryvektorene og ekspresjonsvektorene.

Før entryvektorene ble brukt for å klonere cDNAet som koder for uPAR inn i destinasjonsvektorene, ble de sekvensert for å verifisere at de inneholdt det riktige cDNAet og at dette var uten mutasjoner. Tabell 30 viser hvilke primere som ble brukt for å sekvensere entryvektorene, mens tabell 31 viser hvilke primere som ble brukt for å sekvensere de tre ekspresjonsvektorene. Primerene som ble brukt for å analysere sekvensene skulle sikre at man fikk med den delen av plasmidet som inneholdt cDNAet for uPAR og eventuelle "tagger". Dette ble gjort ved at gjenkjenningssekvensene til primerene lå litt utenfor 5'-enden eller 3'-enden til cDNAet. Det ble brukt to primere til å sekvensere hvert plasmid: en som gjenkjente 5'-enden og en som gjenkjente 3'-enden av cDNAet.

Tabell 30. Entryvektorene som ble brukt og primerene som ble brukt til å sekvensere dem.

Entryvektor	Primer
pDONR221- tag- uPAR	M13 forward
pDONR221- tag- uPAR	M13 reverse
pDONR221- kozak- uPAR	M13 forward
pDONR221- kozak- uPAR	M13 reverse

Tabell 31. Ekspresjonsvektorene som viste seg å ha riktig sekvens og primerene de ble sekvensert med.

Ekspresjonsvektor	Primer
pDEST/FRT/TO/EGFP- uPAR	EGFP forward
pDEST/FRT/TO/EGFP- uPAR	BGH reverse
pDEST/TO/Cherry-puro- uPAR	Cherry forward
pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR	BGH reverse
pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR	EGFP forward
pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR	BGH reverse

Alle sekvenseringene i tabell 30 og 31 ble analysert (se avsnitt 3.1) og funnet å inneholde korrekt sekvens for uPAR og eventuelle tagger.

4.4 Transfeksjon og seleksjon

Det ble valgt å gå videre med ekspresjonsvektorene pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR og pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR til transfeksjon. Disse kodet begge for puromycinresistens og derfor kunne man bruke medium med puromycin til å selektere ut celler transfektert med disse ekspresjonsvektorene og som hadde integrert cDNAet til uPAR i sitt genom.

4.4.1 Stabil transfeksjon av UT-SCC-12A.

UT-SCC-12A er "squamous cell carcinoma"- celler isolert fra en primær tumor fra huden på nesen til på en 81 år gammel kvinne. Tumoren sin TNM-satus var T₂N₀M. Tumoren var altså av grad 2, hadde ingen metasaser til lymfeknutene (N) og ingen fjerne metastaser (M). Disse cellene var en gave fra Reidar Grenman i Turku, Finland.

Denne cellelinjen var ikke blitt transfektert før og man visste derfor ikke hvilke konsentrasjoner av transfeksjonsreagensene som var optimale. Det ble forsøkt å bruke Lipofectamine™ LTX og Plus reagens. For å finne ut hvilken mengde DNA, Lipofectamine™ LTX og Plus reagens som skulle tilsettes, måtte metoden optimaliseres for å finne høyest mulig transfeksjonseffektivitet for denne cellelinjen. pDEST/FRT/TO/EGFP ble transfektert i UT-SCC-12A- celler som var sådd ut i et 12-brønners brett (en million celler i hver brønn). I hver brønn ble plasmidet tilsatt med forskjellige mengder av DNA,

Lipofectamine™ LTX og Plus reagens. Dagen etter ble cellene observert i fluorescencemikroskop (EGFP ville lyse grønt, se avsnitt 4.4.2). Den brønnen som ble observert til å ha flest grønne celler i forhold til det totale antall celler i brønnen, ble ansett til å ha best transfeksjonseffektivitet. De forskjellige konsentrasjonene av DNA, Lipofectamine™ LTX og Plus reagens som ble brukt er oppført i tabell 32.

Tabell 32. Konsentrasjonene av transfeksjonsreagenser og DNA som ble tilsatt i de forskjellige brønnene for å teste hvilke forhold som ga best transfeksjonseffektivitet (i et 12-brønners brett).

ng DNA	µl Plus reagens	µl Lipofectamine™ LTX
500	0,50	0,75
500	0,50	1,50
500	0,75	2,25
500	1,00	3,00
1000	1,25	3,75
1000	1,50	4,50
1000	1,75	5,25
1000	2,00	6,00
1500	2,25	6,75
1500	2,50	7,50
1500	2,75	8,25
1500	3,00	9,00

Etter vurdering av antallet fluorescerende celler i forhold til det totale antall celler i brønnen, ble det funnet at 1500 ng DNA, 2,50 µl Plus reagens og 7,50 µl Lipofectamine™ LTX (uthevet) var den kombinasjonen som ga best transfeksjonseffektivitet. Disse konsentrasjonene ble derfor brukt i påfølgende transfeksjoner av UT-SCC-12A. I og med at cellene skulle transfekteres i 6- brønner brett, måtte disse verdiene ganges opp med 2,5 (i følge Invitrogen sin prosedyre for transfeksjon med Lipofectamine™ LTX og Plus reagens).

Før de transfekterte cellene skulle selekteres ut, trengte man å vite hvilken puromycinkonsentrasjon som var nødvendig for å drepe cellene. UT-SCC-12A cellenes sensitivitet for puromycin ble testet ved å så ut 300 000 celler i hver sin brønn i et 6- brønners brett og inkubere dem i medium med forskjellige konsentrasjoner av puromycin.

Konsentrasjonene som ble brukt var: 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 700 ng/ml og 1 µg/ml. Den siste brønnen ble tilført medium uten puromycin, som en negativ kontroll.

Følgende plasmider ble forsøkt stabilt transfektert inn i UT-SCC-12A med 18,75 µl Lipofectamine™ LTX og 6,25 µl Plus reagens og 3750 ng plasmid (se metode 3.7.2):

- pDEST/TO/Cherry-puro
- pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR
- pDEST/TO/EGFP/PGK-puro
- pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR

Cellene som ble transfektert med plasmidene som kun kodet for ”taggene” skulle brukes til å sammenligne med de cellene som var blitt transfektert med uPAR. Det ble gjort to transfeksjonsforsøk hvor man ikke fant noen levende celler i noen av brønnene etter seleksjon med 500 ng/ml puromycin (se metode 3.7.3). Det ble på grunn av tidsaspektet bestemt å ikke gå videre med transfeksjon av denne cellelinjen.

4.4.2 Stabil transfeksjon av U2OSTA.

U2OSTA er en human osteosarkomcellelinje (U2OS) med en stabilt integrert tetracyclinregulert transkripsjonsaktivator (TetR) og neomycin resistens [43, 44]. Det betyr at disse cellene kan transfekteres med ekspresjonsvektorer som har betegnelsen TET. Det betyr at uttrykket av disse vektoren i U2OSTA ville kunne reguleres med doxycylin. I og med at man ikke fikk dannet noen slike ekspresjonsvektorer, kunne man ikke utnytte at disse cellene hadde uttrykk av dette induserbare systemet.

De samme ekspresjonsvektorene som var blitt prøvd stabilt transfektert inn i UT-SCC-12A ble transfektert inn i cellelinjen U2OSTA (Se avsnitt 4.4.1). Her ble Lipofectamine 2000 brukt som transfeksjonsreagens. Denne cellelinjen var blitt transfektert før og man visste derfor hvilke konsentrasjoner av Lipofectamine™ 2000, DNA og puromycin som ga god transfeksjons- og seleksjonseffektivitet. Det ble brukt 10 µl Lipofectamine™ 2000, 2 µg DNA og 2 µg/ml puromycin.

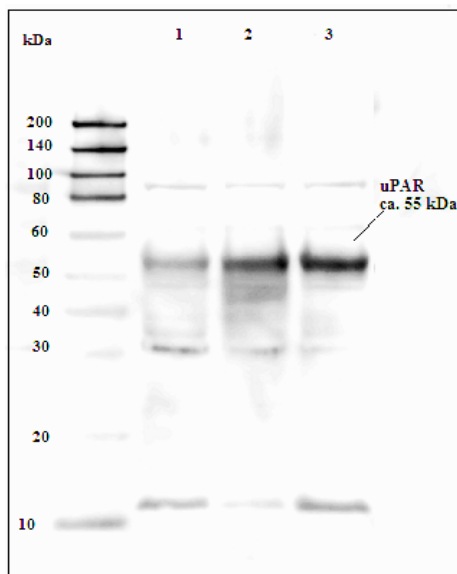
Etter to uker med seleksjon med 2 µg/ml puromycin var det mange av brønnene i 96-bønnersbrettet som hadde en eller flere kolonier av levende celler. Fra 12 av brønnene med bare en koloni ble det fra brettene med U2OSTA-EGFP-uPAR og U2OSTA-Cherry-uPAR overført celler til 24-brønners brett. I 96-brønnersbrettene med U2OSTA-cellene som var blitt transfektert med pDEST/TO/Cherry-puro og pDEST/TO/EGFP/pgk-puro, fantes det ingen levende celler. Ideelt sett burde man hatt stabile transfektanter av U2OSTA med bare Cherry og med bare EGFP slik at sammenlikning med celler som hadde Cherry-uPAR og EGFP-uPAR ble mer korrekt, men på grunn av tidsaspektet ble det bestemt å ikke gjenta disse transfeksjonene.

Når de transfekterte cellene overlevde seleksjonen var det et tegn på at de hadde tatt opp ekspressjonsvektorene pDEST/TO/Cherry-puro-uPAR og pDEST/TO/EGFP/pgk-puro-uPAR som begge hadde puro-genet som kodet for puromycinresistens. En annen måte å se om vektorene var tatt opp i cellene på var å se på dem i fluorescensmikroskop. Cherry-molekylet som var festet til uPAR er et protein som fluorescerer og lyser rødt når det eksiteres av lys med en bølgelengde på 587 nm [45]. U2OSTA-Cherry-uPAR ble derfor observert i fluorescensmikroskop med UV-lys med en bølgelengde på 587 nm. Cellene i alle koloniene man så i mikroskopet var røde. EGFP-proteinet vil emitere grønt lys når det eksiteres av lys med en bølgelengde på 488 nm [45, 46]. U2OSTA-EGFP-uPAR ble derfor observert i fluorescensmikroskopet med lys med en bølgelengde på 488 nm. Cellene var likevel ikke grønne i dette lyset. Dette indikerte at Cherry-uPAR var blitt vellykket transfektert inn i cellen, mens EGFP-uPAR sannsynligvis ikke var det.

4.5 Deteksjon av uPAR med Western blot av stabile kloner av U2OSTA

For å vise at fusjonsproteinet Cherry- uPAR var blitt uttrykt i U2OSTA ble det laget cellelysats som ble analysert ved Western blotting. Dette var for å se nivåene av uPAR og størrelsen på proteinet.

Figur 10 viser resultatene av Western blot som er gjort for U2OSTA, U2OSTA- EGFP- uPAR og U2OSTA- Cherry- uPAR.



Figur 10. Western blot av U2OSTA- EGFP- uPAR, U2OSTA- Cherry- uPAR og U2OSTA blottet med antistoff mot humant uPAR. Cellelysater med 150 000 celler (15 μ l) av U2OSTA- EGFP- uPAR (1) , U2OSTA- Cherry- uPAR (2) og U2OSTA (3) ble separert ved SDS-PAGE og blottet til en PDVF-membran under ikke- reduserende betingelser. uPAR ble detektert ved inkubasjon med kanin anti-humant uPAR- antistoff.

Bånd på ca. 55 kDa i figur 10 korresponderer til den forventede størrelsen av endogent uPAR. I U2OSTA- EGFP- uPAR og U2OSTA- Cherry- uPAR, ville den andelen uPAR som var blitt transfektert inn i cellene (og ikke allerede var i cellene) være fusjonert til henholdsvis EGFP og Cherry. EGFP og Cherry har begge en molekylvekt på ca. 40 kDa. Derfor skulle cellene som var blitt transfektert teoretisk sett ha hatt et bånd ved ca 95 kDa (40 + 55). I Figur 10 kan man se et svakt bånd på ca. 90 kDa for alle tre prøvene. Om dette båndet skulle representert fusjonsproteinene, ville det bare vært U2OSTA- EGFP- uPAR og U2OSTA- Cherry- uPAR som hadde dette båndet. I og med at alle tre prøvene har dette båndet er dette antageligvis bare et uspesifikt bånd, og kan være helt andre proteiner som tilfeldigvis har et domene som ligner på deler av uPAR

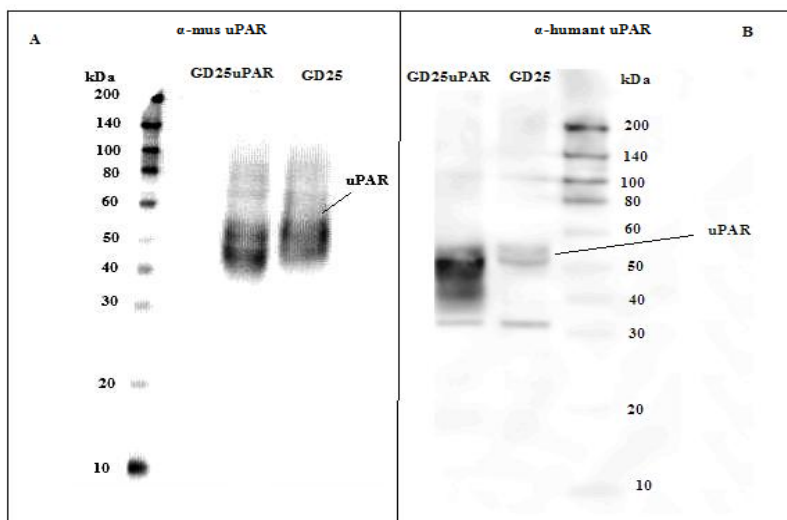
For U2OSTA- EGFP- uPAR er båndet på ca. 55 kDa svakere enn for begge de to andre cellelinjene. Dette viser at uPAR ikke er overuttrykt i cellelinjen selv om cellene hadde overlevd puromycinsелеksjonen. Det har sannsynligvis ikke skjedd noen endring av det endogene nivået av uPAR i noen av to transfekterte cellelinjene. Grunnen til lavere nivåer av uPAR for U2OSTA- EGFP- uPAR og U2OSTA kan være applisering av mindre mengde totalprotein i brønnene ved SDS-PAGE.

4.6 Analyser av GD25 celler

Fordi forsøkene med å etablere humane cellelinjer med overuttrykk av humant uPAR ikke lyktes, så ble det gjort tester på modifiserte GD25- celler i stedet (se avsnitt 1.8). Dette ble gjort for å se om økt uttrykk av uPAR, tilstedeværelsen av integrin β 1- subenheten eller en kombinasjonen av disse to påvirket migrasjons- og invasjonsegenskapene til cellene.

4.6.1 Western blot- analyse av uPAR-uttrykket i GD25-celle.

Figur 11 viser resultatet av Western blot som er gjort for GD25 og GD25- uPAR med antistoff mot muse- uPAR og humant uPAR.



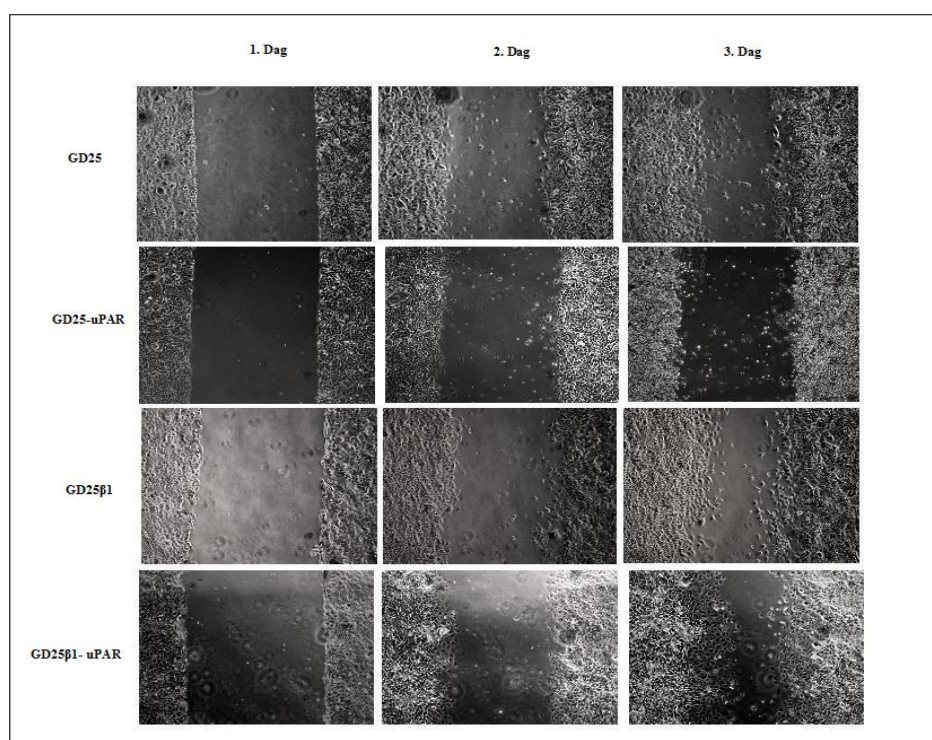
Figur 11. Western blot av GD25- uPAR og GD25. Cellelysater med 150 000 celler (15 μ l) av GD25- uPAR og GD25 ble separert ved SDS-PAGE og blottet til en PDVF-membran ved ikke- reduserende betingelser. Muse uPAR ble detektert ved inkubasjon med geit anti-mus uPAR antistoff (A). Humant uPAR ble detektert ved inkubasjon med kanin anti- humant uPAR (B).

I figur 11A ser man båndene for muse- uPAR som har en molekylvekt på ca. 55 kDa. Det primære antistoffet er mot muse- uPAR og binder derfor bare til cellenes endogene uPAR, ikke det humane uPAR som har blitt uttrykt i GD25-uPAR. Intensiteten på disse båndene bør derfor være omtrent like, hvilket de er. I figur 11B er membranen inkubert med kanin anti-humant uPAR- antistoffet og man forventet å se et bånd for cellelysateet fra GD25-UPAR på ca. 55 kDa og ikke for GD25. Siden det er blitt dannet bånd for begge cellelysateene, begge på rundt 55 kDa, kan det tyde på at antistoffet ikke er spesifikt nok til å binde bare humant uPAR men vil antageligvis binde til uPAR fra mus også. Likevel er båndet i GD25- uPAR mye sterkere enn båndet for GD25 noe som kan stemme med at GD25- uPAR har et overuttrykk av humant uPAR.

Grunnen til at båndene er såpass brede kan være at uPAR kan ha forskjellig grad av glykosylering noe som gir små forskjeller i molekylvekten som igjen gjør at de migrerer ulikt i gelen ved SDS- PAGE og derfor gir brede bånd ved Western blot.

4.6.2 Wound healing assay av GD25- cellene

For å analysere effekten av økte mengder uPAR på cellens evne til migrasjon, ble det utført Wound Healing assay på de fire cellelinjene GD25, GD25-uPAR, GD25 β 1 og GD25 β 1-uPAR.. Det ble gjort to paralleller for hver cellelinje og figur 12 viser en parallell for hver cellelinje. Bredden på de cellefrie områdene på bildene i figur 12 ble målt med Leica IM 150 Image Reader som forklart i under avsnitt 3.9.1. Disse verdiene vises i tabell 33.

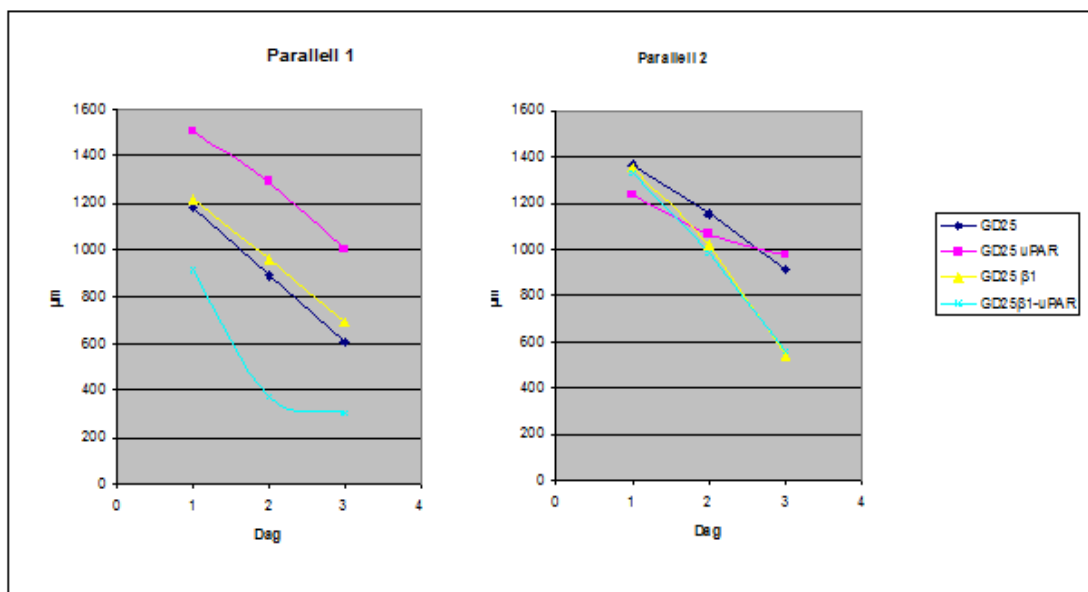


Figur 12. Wound healing assay av GD25, GD25- uPAR, GD25 β 1 og GD25 β 1- uPAR. Figuren viser bildet som er tatt rett etter at den cellefrie linjen har blitt dannet (1. dag) og bildene som har blir tatt av nøyaktig det samme området 24 timer etter (2.dag) og 48 timer (3. dag) etter skrapping av linjen.

Tabell 33. Bredden på de cellefrie områdene i figur 12.

Cellelinje	1.dag	2.dag	3. dag
GD25	1183 μ m	891 μ m	601 μ m
GD25- uPAR	1230 μ m	1063 μ m	978 μ m
GD25 β 1	1218 μ m	959 μ m	692 μ m
GD25 β 1- uPAR	1327 μ m	981 μ m	558 μ m

Reduksjonen i bredden på det cellefrie området fra dag til dag er grafisk framstilt i figur 13. En cellelinje som har en lengre og brattere graf vil ha migrert raskere enn en cellelinje med en kortere graf. Tabell 34 viser differansen i bredden på det cellefrie området fra første til tredje dag for hver av de fire cellelinjene. Verdiene i denne tabellen er derfor et mål på hvor raskt cellene har migrert. Jo høyere denne verdien er, jo raskere har cellene migrert og jo bedre migrasjonsegenskaper har cellene.



Figur 13. Grafisk framstilling av Wound Healing Assay for GD25- cellene. Grafene viser nedgangen i bredden på det cellefrie området fra dag til dag for de to parallellene som ble gjort.

Tabell 34. Avstanden GD25-cellene har migrert fra dag 1-3.

Cellelinje	1. parallell	2. parallell
GD25	577 µm	455 µm
GD25- uPAR	509 µm	259 µm
GD25 β1	526 µm	809 µm
GD25β1-uPAR	609 µm	769 µm

Fra tallene i tabell 34 kan man se at GD25β1-uPAR er den cellelinjen som har migrert raskest i løpet av tre dager for begge parallellene og at disse har migrert raskere enn GD25. For GD25- uPAR og GD25β1 er verdiene for de to parallellene såpass forskjellige at det er vanskelig å se noen tydelig tendens hos disse cellene og det er derfor vanskelig å sammenligne dem med de andre. Om man setter verdiene for hver parallell to opp mot hverandre slik det er gjort i figur 13, ser man på senkningen og lengden til grafen til GD25β1

og GD25 β 1-uPAR i parallell 2 at disse har migrert betraktelig raskere enne de to andre cellelinjene. Det er likevel vanskelig å si noe konkret om de migratoriske egenskapene til disse cellene ut i fra en parallell.

4.6.3 Invasjonsassay

Det ble testet om var noen forskjell i de invasive egenskapene til de fire cellelinjene med BD Biocoat™ Tumor Invasion System (se metode 3.9.2). Det ble kjørt to paralleller av hver av de fire cellelinjene. Tabell 35 viser fluorescensen som er målt når mediet fremdeles er tilstede på undersiden av Matrigelen, mens tabell 36 viser fluorescensen som er målt etter vasking med 1x PBS.

Tabell 35. Før vasking med 1 x PBS

Cellelinje	1. Parallell	2. Parallell	Gjennomsnitt
GD25	12,85	13,03	12,94
GD25- uPAR	12,38	12,07	12,23
GD25 β 1	12,16	12,33	12,25
GD25 β 1-uPAR	10,98	12,25	11,61

Tabell 36. Fluorescens etter vasking med 1x PBS

Cellelinje	1. Parallell	2. Parallell	Gjennomsnitt
GD25	4,86	5,32	5,09
GD25- uPAR	5,25	4,89	5,07
GD25 β 1	4,58	4,22	4,40
GD25 β 1-uPAR	4,88	4,33	4,61

De høye tallene i tabell 35 viser at mediet antageligvis gir en del autofluorescens. Både målingene før og etter vasking med PBS, viser liten forskjell i fluorescensen på de fire cellelinjene. Dette betyr at omtrent like mange celler av hver cellelinje har vandret gjennom Matrigelen.

5 Diskusjon

5.1 Uttrykk av uPAR i UT-SCC-12A og U2OSTA.

5.1.1 Transfeksjon av UT-SCC-12A

Ved testing av hvilken puromycinkonsentrasjon som ga best seleksjon av UT-SCC-12A ble det observert at alle cellene var i live i kontrollbrønnen og ved en puromycinkonsentrasjon på 100 ng/ml, mens omtrent halvparten av cellene var døde ved 300 ng/ml. Ved 500 ng/ml var alle cellene døde, derfor ble denne puromycinkonsentrasjonen brukt i seleksjon av stabile transfektanter av UT-SCC-12A. Denne testingen kunne vært gjort flere ganger for å finne den optimale puromycinkonsentrasjonen for seleksjon av disse cellene. Det kunne for eksempel blitt prøvd en konsentrasjon et sted mellom 300 og 500 ng/ml. Det burde også vært gjort flere tester for å finne ut hvilke konsentrasjoner av transfeksjonsreagensene og mengde av DNA som ga best transfeksjonseffektivitet. Tidsaspektet gjorde likevel at man ikke fikk anledning til dette og derfor ikke fikk en vellykket transfeksjon og overuttrykk av uPAR i UT-SCC-12A cellene.

5.1.2 Overuttrykk av uPAR i U2OSTA

Det var tydelig fra observasjon av cellene i fluorescensmikroskopet at U2OSTA- Cherry-uPAR hadde uttrykk av Cherry fordi cellene var jevnt over røde. I og med at Cherry var fusjonert til uPAR, hadde man forventet ved observasjon av de transfekterte cellene at de skulle være røde hovedsakelig på overflaten fordi det er her uPAR sitter. En mulig forklaring på dette kan være at uPAR-Cherry komplekset ikke har blitt fraktet til utsiden av cellen etter translasjon. En annen forklaring er at bindingen mellom Cherry og uPAR har blitt kløyyvet ved proteolyse før uPAR ble fraktet ut til overflaten av cellen og Cherry har blitt igjen intracellulært. Fraværet av et bånd på ca. 95 kDa ved Western blot av disse cellene viser at Cherry-uPAR ikke har blitt uttrykt. Fra observasjon av cellene i fluorescensmikroskop kunne det se ut som EGFP ikke var uttrykt i U2OSTA- EGFP- uPAR og det ble heller ikke funnet et bånd ved 95 kDa i denne cellelinjen. Selv om det så ut fra Western blot som at U2OSTA-Cherry- uPAR hadde et overuttrykk av uPAR, kunne størrelsen på båndet for U2OSTA-Cherry- uPAR skyldes at det var satt på forskjellig mengde prøve ved SDS-PAGE. Dette

burde vært testet ved å gjort en loading-kontroll ved å inkubere membranene med antistoff mot for eksempel β -aktin. Om båndene som da ble dannet hadde hatt lik intensitet ville det vært en indikasjon på at det var satt på omtrent like mange celler av hver prøve. Man kunne altså ikke være sikker på om hverken U2OSTA-EGFP-uPAR eller U2OSTA-Cherry-uPAR hadde overuttrykk av uPAR-fusjonsproteinene.

Det hadde videre vært nyttig å kunne gjøre flere tester for å finne ut hva som har gjort at man ikke har lyktes i å overuttrykke uPAR i denne cellelinje. Det hadde for eksempel vært en mulighet å prøve med en annen ekspresjonsvektor, for eksempel en som ikke hadde tag i tillegg til uPAR. Taggene kunne også være grunnen til at det ikke var mulig å uttrykke fusjonsproteinet. Noen proteiner blir gjenkjent som feil og degradert allerede i det endoplasmiske reticulum. På grunn av tidsaspektet ble det ikke forsøkt å lage flere ekspresjonsvektorer og ikke gjort noen flere transfeksjoner av disse cellene.

5.2 Analyser av GD25-celler

5.2.1 Testing av migratoriske egenskaper med Wound Healing assay

Bindingen mellom uPA og uPAR er meget spesifikk, slik at muse- uPA sannsynligvis ikke vil kunne binde til humant uPAR og motsatt [47]. Dette vil si at humant uPAR som overuttrykkes i museceller antageligvis ikke vil binde uPA som skilles ut av disse cellene og vil derfor ikke føre til økt aktivering av plasmin. Dermed vil det ikke oppstå en økning i den proteolytiske nedbrytningen av ECM- komponenter hverken av plasmin direkte eller av plasminaktiverte MMPer, kollagenaser eller elastaser. I og med at økning i proteolytisk aktivitet er en av faktorene som gjør at uPAR kan øke migrasjon av celler gjennom ECM, kan dette være grunnen til at cellene som uttrykte humant uPAR (GD25 uPAR) ikke i noen stor grad migrerte raskere enn de cellene som ikke uttrykte humant uPAR (GD25).

Selv om uPAR ikke vil øke de migratoriske egenskapene til cellene gjennom plasminogen aktivator systemet, er det mulig at den vil kunne gjøre det gjennom sine interaksjoner med integriner og sin binding til vitronektin. Man forventer raskere migrasjon hos GD25 β 1- uPAR sett ut i fra teorien om at interaksjoner mellom integriner og uPAR fører til økt uttrykk av

faktorer som øker de migratoriske og invasive egenskapene til cellene [31]. Man forventer også økt adhesjon av cellene til ECM-molekylen som skilles ut i og med komplekser av uPAR og $\beta 1$ -subenheten øker cellens adhesjon til fibronektin og vitronektin [26]. Fra tabell 34 ser man at begge parallellene for GD25 $\beta 1$ - uPAR har en høyere verdi parallellene for de tre andre cellelinjene. Dette kan tyde på at det humane uPAR i cellen vil binde til musecellens $\beta 1$ -subenhet og at denne interaksjonen gjør at disse cellene migrerer noe raskere enn de andre cellelinjene. I og med at $\beta 1$ - subenheten er den som står for integrinenes binding til komponenter av cytoskjelettet og derfor har stor betydning for bevegelse av cellen (se avsnitt 1.3), er det forventet at tilstedeværelse av denne subenheten ville gi en større grad av migratoriske egenskaper. Likevel ser man ikke noen større migratoriske egenskaper for GD25 $\beta 1$ i forhold til GD25.

Det er før blitt vist at celler som har ”knockout” av integrin $\beta 1$ - subenheten ikke vil feste seg til kollagen, fibronektin eller laminin [18]. Dette vil altså tilsi at GD25 $\beta 1$ og GD25 $\beta 1$ -uPAR burde festes bedre til ECM- komponentene som skilles ut av cellene enn GD25 og GD25-uPAR og vil derfor også kunne migrere bedre. Bindingene mellom ECM- molekylene og integrinene bør likevel ikke være for sterke da dette vil hindre migrasjon. Det er vanskelig å kunne se noen forskjell på cellelinjene siden det bare er gjort to paralleller av hver cellelinje. I tillegg er det en ganske stor forskjell i verdiene på de to parallellene for GD25- uPAR og GD25 $\beta 1$ (se tabell 34). Dette gjør at det blir vanskelig å sammenligne cellelinjene. Det burde derfor vært gjort flere paralleller av Wound Healing assay de fire cellelinjene. Andre forhold som kunne endres for optimalisering av metoden for disse cellene var for eksempel mediet som ble brukt. I og med at det var serum (FBS) i mediumet, vil det inneholde vitronektin og fibronektin som uPAR og β -subenheten i cellene vil kunne binde til og som vil kunne påvirke adhesjon og dermed migrasjon av cellene. Det kunne det vært prøvd å bruke serumfritt medium for å se om cellene migrerte annerledes når de bare bandt til det fibronektin og vitronektin som de skilte ut selv.

5.2.2 Testing av invasive egenskaper med invasjonsassay

Det var første gang denne testen ble gjort og derfor var man ikke sikker på hvilke betingelser som var optimale for å oppnå et best mulig resultat. Mediumet som lå under membranen med Matrigelen, virket som en attraktant for cellene som de skulle vandre mot. Det kan derfor hende at mediumet manglet faktorer som trakk cellene til seg slik at de lettere ville gå gjennom Matrigelen. Dermed kunne en mulighet være å prøve å bedre betingelsene for denne assayen ved å tilsette faktorer som kjemokiner eller vekstfaktorer til mediet under Matrigelen.

De samme problemstillingene med hensyn til mangel på spesifitet mellom humant uPAR og muse- uPA gjelder for denne assayen. Dette vil nok også kunne være årsaken til at man heller ikke så noen store forskjeller mellom cellelinjene når det gjaldt invasjon av matrigelen. Hvordan celler vandrer gjennom denne matrigelen vil være en god indikasjon på hvordan de vil invadere basalmembranen i og med at den er bygd opp av mye av de samme molekylene (kollagen IV, nidogen og laminin). Testing av cellers invasive egenskaper gir derfor en indikasjon på deres evne til å metastasere. Man vet at proteaser er viktig for nedbrytning av ECM og dermed også for metastasering. Man begynner også å se at uPAR har en fremtredende rolle i denne prosessen og det er derfor viktig å kunne gjøre videre testing på dette område for å få mer kunnskap om uPAR sin funksjon i spredningen av kreft.

5.2.3 Eventuell videre testing av GD25-cellene

I og med at man ikke så noen tydelig tendens til verken økt migrasjons- eller invasjonsegenskaper av celler som hadde uttrykk av humant uPAR kunne det vært nyttig å gjøre flere både migrasjons og invasjonstester på GD25-cellene. Det ville også vært nyttig å gjøre analyser for å undersøke om muse- uPA kunne binde til humant uPAR og aktiveres. Dette kan for eksempel gjøres ved å se på de proteolytiske egenskapene til cellene ved hjelp av zymografi. Ved zymografi vil man kunne kjøre medium fra disse cellene på en gel som inneholder plasminogen. Om det hadde vært høyere aktivitet av uPA i celler med humant uPAR, ville man kunne sett dette fordi at mer plasminogen ville vært brutt ned. På en gel med gelatin ville man kunne se om aktiviteten av MMP2 og MMP9 som aktiveres av plasmin var høyere for cellene med humant uPAR.

6 Konklusjon

uPAR var blitt prøvd stabilt uttrykt i to humane kreftcellelinjer. Ingen av transfeksjonene lyktes og derfor kunne man ikke gjøre videre testing av hvilken påvirkning et eventuelt overuttrykk av uPAR ville hatt på disse cellelinjene når det gjaldt migrasjons- og invasjonsegenskaper.

Celler fra mus med overuttrykk av uPAR og “knock out” av integrin β 1-subenheten, ble testet med hensyn på migrasjons- og invasjonsegenskaper. Fra disse testene kunne man ikke trekke noen spesifikk konklusjon om hvilken effekt uPAR, β 1-subenheten og en kombinasjon av disse to har på migrasjons- og invasjonsegenskapene til cellene.

7 Referanser

1. World Health Organization; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
2. Rang, H.P., et al., eds. *Pharmacology*. 5th ed. 2003, Churchill Livingstone. p. 693-698.
3. Kumar, V., et al., eds. *Robbins Basic Pathology*. 8th ed. 2007, Saunders Elsevier. p. 173-181.
4. Andreasen, P.A., et al., *The urokinase- type plasminogen activator system in cancer metastasis : A review*. International Journal of Cancer, 1997. **72**: p. 1-22.
5. Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure av composition of the extracellular matrix*. Journal of Pathology, 2003. **200**: p. 423-428.
6. Alberts, B., et al., eds. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. 2002, Garland Science. p.1090-1118.
7. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 2001: Gyldendal.
8. Pollard, T.D. and W.C. Earnshaw, *Cell Biology*. 1st ed. 2004: Saunders. p. 473-524.
9. Becker, W.M., L.J. Kleinsmith, and J. Hardin, *The World of the Cell*. 5th ed. 2003: Benjamin Cummings. p.290-302.
10. Engbring, J.A. and H.K. Kleinman, *The basement membrane matrix in malignancy*. Journal of Pathology, 2003. **200**: p. 465-470.
11. [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail4.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail4.htm).
12. Madsen, C.D. and N. Sidenius, *The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling*. European Journal of Cell Biology, 2008. **87**: p. 617-629.
13. Podor, T.J., et al., *Incorporation of Vitronectin into Fibrin Clots*. The Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(9): p. 7520-7528.
14. Kalluri, R., *Basement membranes: Structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nature, 2003. **3**: p. 422-433.
15. Wehrle-Haller, B. and B.A. Imhof, *Integrin-dependent pathologies*. Journal of Pathology, 2003. **200**: p. 481-487.
16. Danen, E.H.J. and A. Sonnenberg, *Integrins in regulation of tissue development and function*. Journal of Pathology, 2003. **200**: p. 471-480.
17. Webb, C. and G.F.V. Woude, *Genes that regulate metastasis and angiogenesis*. Journal of Neuro-Oncology, 2000. **50**: p. 71-87.
18. Fässler, R., et al., *Lack of $\beta 1$ - Integrin Gene in Embryonic Stem Cells Affects Morphology, Adhesion and Migration But Not Integration into the Inner Cell Mass of Blastocysts*. The Journal of Cell Biology, 1995. **128**(5): p. 979-988.
19. Nilsson, S., et al., *Threonine 788 in integrin subunit $\beta 1$ regulates integrin activation*. Experimental Cell Research, 2006. **312**: p. 844-853.
20. Alberts, B., et al., eds. *Molecular Biology of the Cell*. 2002, Garland Science. p.907-983.
21. Kumar, V., et al., eds. *Robbins. Basic Pathology*. 8th ed. 2007, Saunders Elsevier. p. 200-204.
22. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression*. Journal of Neuro-Oncology, 2001. **50**: p. 63-70.

23. de Bock, C.E. and Y. Wang, *Clinical Significance of Urokinase- Type Plasminogen Activator Receptor (uPAR) Expression in Cancer*. Medicinal Research reviews, 2003. **24**(1): p. 13-39.
24. Wang, Y., *The Role and Regulation of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Gene Expression in Cancer Invasion and Metastasis*. Medicinal Research Reviews, 2001. **21**(2): p. 146-170.
25. Pillay, V., C.R. Dass, and P.F.M. Choong, *The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer*. Trends in Biotechnology, 2006. **25**(1): p. 33-39.
26. Ragno, P., *The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006. **63**: p. 1028-1037.
27. Dass, K., et al., *Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers*. Cancer Treatment Reviews, 2008. **34**: p. 122-136.
28. Ploug, M., et al., *Structural analysis of the interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor: a potential target for anti- invasive cancer therapy*. Biochemical Society Transactions, 2002. **30**: p. 177-183.
29. Binder, B.R. and J. Mihaly, *The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer*. Immunology Letters, 2008. **118**: p. 116-124.
30. Qiu, D., et al., *Roles and regulation of membran-associated serine proteases*. Biochemical Society Transactions, 2007. **35**(3): p. 583-587.
31. Tang, C.-H. and Y. Wei, *The urokinase receptor and integrins in cancer progression*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**: p. 1916-1932.
32. Kjølner, L. and A. Hall, *Rac Mediates Cytoskeletal Rearrangements and Increased Cell motility Induced by Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor Binding to Vitronectin*. The Journal of Cell Biology, 2001. **152**(6): p. 1145-1157.
33. Lakka, S.S., C.S. Gondi, and J.S. Rao, *Proteases and Glioma Angiogenesis*. Brain Pathology, 2005. **15**: p. 327-341.
34. Wennerberg, K., et al., *β 1 Integrin-dependent and -independent Polymerization of Fibronectin*. The Journal of Cell Biology, 1996. **132**: p. 227-238.
35. Gateway® Technology. *A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems*, Invitrogen, Editor. 2003.
36. Gateway Cloning Technology. *Faster, Easier, More Accurate Cloning.*; Available from: <http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring2000/patton/gateway.htm>.
37. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004: Fagbokforlaget.
38. *Nanodrop ND-1000 full-spectrum UV/VIS spectrophotometer. User's manual*. 2005.
39. Becker, W.M., L.J. Kleinsmith, and J. Hardin, *The World of the Cell*. 5th ed. 2003: Benjamin Cummings. p. 492-493.
40. Becker, W.M., L.J. Kleinsmith, and J. Hardin, *The World of the Cell*. 5th ed. 2003: Benjamin Cummings. p.496-497.
41. Becker, W.M., L.J. Kleinsmith, and J. Hardin, *The World of the Cell*. 5th ed. 2003: Benjamin Cummings. p. 180-181.
42. *E.Z.N.A Endo-Free Plasmid Isolation System*, in OMEGA Bio-Tek. 2007.
43. Santoni-Rugiu, E., et al., *Involvement of Myc Activity in a G1/S- Promotin Mechanism Parallel to the pRb/E2F Pathway*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(10): p. 3497-3509.

44. Sjøttem, E., et al., *The ePHD protein SPBP ineracts with TopBP1 and together they co-operate to stimulate Ets1-mediated transcription*. *Nucleic Acids Research*, 2007. **35**.
45. Shaner, N.C., P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien, *A guide to choosing fluorescent proteins*. *Nature Methods*, 2005. **2**(12): p. 905-908.
46. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. *Annual Review of Biochemistry*, 1998. **67**: p. 509-544.
47. Mazar, A.P., *Urokinase Plasminogen Activator Receptor Choreographs Multiple Ligand Interactions: Implications for Tumor Progression and Therapy*. *Clinical Cancer Research*, 2008. **14**: p. 5649-5655.