

UNIVERSITETET I TROMSØ UIT

DET HELSEVITENSKAPELIGE FAKULTET
INSTITUTT FOR FARMASI
FORSKNINGSGRUPPEN I FARMAKOLOGI

MASTEROPPGAVE I FARMASI



Det metastaseassosierte proteinet S100A4 i orale plateepitelkarsinomcellerlinjer – kartlegging av effekter på proteolytiske enzymer viktige for invasjon og metastase

av

Trine Skretting
2012

Veileder

Hilde Ljones Wetting



Forord

Oppgaven ble utført ved Forskningsgruppen i farmakologi ved Institutt for Farmasi ved Universitetet i Tromsø, i perioden oktober 2011 til mai 2012. Veileder for oppgaven var Hilde Ljones Wetting, som jeg vil takke for særdeles god veiledning, både med det faglige og det praktiske. Jeg vil også takke Hanne og Bjarne for god hjelp og nyttige råd med arbeidet i laboratoriet, og Ole Morten Seternes for hjelp med rettleasing av oppgaven. Dessuten vil jeg rette en stor takk til Andreas for god støtte og oppmuntring under hele arbeidet med masteroppgaven.

Tromsø, mai 2012

Trine Skretting

Sammendrag

Oralkreft er en kreftform forbundet med dårlig prognose, som hovedsakelig skyldes hyppig forekomst av lokal invasjon og metastase til lymfeknuter. Behandlingen består i dag hovedsakelig av kirurgi og stråling, men på tross av stadig nye og bedre behandlingsformer er mortaliteten for pasienter med oralkreft uendret de siste 30 årene. Med den vedvarende høye dødsraten av oralkreft er det et tydelig behov for videre forskning med mål om å finne nye angrepspunkt for legemidler for å kunne bedre behandlingen og overlevelsesraten til disse pasientene. En av forutsetningene for å kunne utvikle nye legemidler og behandlingsformer er å øke kunnskapen om mekanismer og faktorer som er involvert i spredning og metastasering av kreftceller. I forskningsgruppen i Farmakologi studerer man hvordan proteinet S100A4 påvirker orale kreftcellelinjers evne til å invadere og metastasere. Motivasjonen for arbeidet er å kunne framskaffe ny kunnskap som kan bidra til at man i fremtiden kan utvikle legemidler som kan hemme S100A4 metastasefremmende effekter i oralkreft og andre krefttyper.

I forskningsgruppen har det tidligere blitt etablert orale plateepitelkarsinomcellelinjer hvor S100A4 uttrykket er stabilt slått ned ved hjelp av short hairpin RNA (shRNA). Målet med arbeidet i denne oppgaven var å benytte disse cellelinjene til å kartlegge effekter av S100A4 på uttrykket av ulike proteolytiske enzymer, som matriks metalloproteinaser (MMPer) og urokinase plasminogen aktivator (uPA) systemet – sentrale enzymer ved kreftprogresjon. I tillegg ble også andre målgener involvert i invasjon og metastase, som E-cadherin og vevs inhibitorer av metalloproteinaser (TIMPer) analysert. Uttrykket ble analysert på mRNA-nivå ved hjelp av revers transkriptase kvantitativ PCR (RT-qPCR) og positive funn ble forsøkt verifisert på proteinnivå ved hjelp av Western blot og substratzymografi (enzymaktivitet). I tillegg til å studere effekter av S100A4 knockdown ønsket vi også å kartlegge ekstracellulære effekter av proteinet på de samme målgenene. Rekombinant S100A4 (rS100A4) ble rensert fra *E.coli* celler ved hjelp av affinitetskromatografi og size exclusion kromatografi og effekter ble analysert på mRNA-nivå i celler stimulert med rS100A4 protein tilsatt i cellenes vekstmedium

Ved stabil nedregulering av S100A4-uttrykk fant vi redusert mRNA-nivå av MMP-9 i to orale plateepitelkarsinomcellelinjer fra tunge, og ved substratzymografi ble reduksjonen også verifisert på proteinnivå. Vi fant også redusert MMP-2 mRNA-nivå og en tendens til redusert uPA mRNA-nivå ved S100A4 knockdown. Forsøk med rS100A4 tilført vekstmediet viste et dose-responsforhold for MMP-9, MMP-7 og uPAR på mRNA-nivå. Oppsummert finner vi

effekt av både endogent og ekstracellulært S100A4 på visse proteolytiske enzymer forbundet med invasjon og metastase, og funnene indikerer at S100A4 kan være en viktig bidragsyter til den invasive karakteristikk forbundet med oralkreft.

Forkortelser

cDNA	Komplementært DNA
Ct	Threshold cycle
ECM	Ekstracellulær matriks
EMT	Epitelial-til-mesenkymal transisjon
EV	Empty vector
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HPRT-1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1
HPV	Human papilloma virus
IGF-BP	Insulin-like growth factor binding protein
MDM2	Double minute 2 protein
MetAP2	Methionine aminopeptidase type II
MFAP4	Microfibrillar-associated protein 4
MMP	Matriks metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
MT MMP	Membrantype matriks metalloproteinase
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NGAL	Nøytrofil gelatinase-assosiert lipokalin
NoRT	No reverse transcriptase control
NOV protein/CCN3	Nephroblastoma overexpressed protein
NS	Non-silencing
NTC	No template control
p53	Tumor suppressor protein 53
PAI	Plasminogen aktivator inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline

PDGF	Platelet-derived growth factor
PGLYRP1/Tag7	Peptidoglycan recognition protein 1
RAGE	Receptor for advanced endproducts
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-interferens
RPLP0	Ribosomal protein large
Rpm	Rounds per minute
rS100A4	Rekombinant S100A4
RT-qPCR	Revers transkriptase quantitaive polymerase chain reaction
SCC	Squamous cell carcinoma
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfat – polyakrylamid gelelektroforese
SEC	Size exclusion chromatography
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
Smad	Sma- and Mad-related proteins
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
tPA	Tissue plasminogen aktivator
uPA	Urokinase plasminogen aktivator
uPAR	Urokinase plasminogen aktivator reseptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	III
Forkortelser	V
Innholdsfortegnelse	VII
1. Innledning	1
1.1 Kreft	1
1.1.1 Tumor stroma	3
1.1.2 Invasjon og metastase	3
1.2 Oralkreft	6
1.3 Ekstracellulær matriks	7
1.4 Matriks metalloproteinaser (MMPer)	7
1.4.1 Vevs inhibitorer av metalloproteinaser (TIMPer)	11
1.5 Urokinase plasminogen aktivator (uPA) systemet	11
1.6 E-cadherin	12
1.7 S100 familien	13
1.7.1 Protein S100A4	13
1.8 RNA interferens (RNAi)	16
1.9 Formål med oppgaven	17
2. Materialer og metode	18
2.1 Celler og celledyrkning	18
2.1.1 Cellelinjer	18
2.1.2 Medium og celledyrking	18
2.1.3 Splitting av celler	18
2.2 Celletelling	19
2.3 Forsøk med S100A4 knockdown celler	20
2.3.1 Rensing av total-mRNA	20
2.3.2 Revers transkriptase kvanitativ PCR (RT-qPCR)	20
2.3.3 Validering av RT-qPCR-assay	23
2.4 Statistiske analyser	24
2.5 Substrat zymografi	24
2.5.1 Høsting av kondisjonert medium til substrat zymografi	24
2.5.2 MTS celle proliferasjons assay	24
2.5.3 Substrat zymografi prosedyre	25

2.6 Western blot	26
2.6.1 Høsting av proteinlysat til Western blot	26
2.6.2 Western blot prosedyre.....	26
2.7 Forsøk med rekombinant S100A4 (rS100A4)	28
2.8 Materialer	29
3. Resultater.....	32
3.1 Verifisering av S100A4 knockdown.....	33
3.2 Effekter av S100A4 knockdown på ulike målgen forbundet med invasjon og metastase	35
3.2.1 Effekt av S100A4 knockdown på MMP-9 uttrykk	35
3.2.2 Effekt av S100A4 knockdown på MMP-2 uttrykk	37
3.2.3 Effekt av S100A4 knockdown på MMP-1, MMP-3 og MMP-7 uttrykk.....	39
3.2.4 Effekt av S100A4 knockdown på MMP-13 og MMP-14 uttrykk	41
3.2.5 Effekt av S100A4 knockdown på TIMP-1 og TIMP-2 uttrykk.....	42
3.2.6 Effekt av S100A4 knockdown på uPA og uPAR uttrykk	43
3.2.7 Effekt av S100A4 knockdown på E-cadherin uttrykk	44
3.3 Celler stimulert med rekombinant S100A4 protein: Effekter på ulike målgen forbundet med invasjon og metastase.....	45
3.3.1 Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-9 uttrykk.....	45
3.3.2 Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-7 uttrykk.....	46
3.3.3 Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-1, MMP-2 og MMP-3 uttrykk	47
3.3.4 Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-13 og MMP-14 uttrykk.....	48
3.3.5 Effekt av rekombinant S100A4 på TIMP-1 og TIMP-2 uttrykk	49
3.3.6 Effekt av rekombinant S100A4 på uPA og uPAR uttrykk.....	50
3.3.7 Effekt av rekombinant S100A4 på E-cadherin uttrykk	51
3.3.8 Effekt av rekombinant S100A4 på S100A4 uttrykk	51
4. Diskusjon.....	52
4.1 Effekter av S100A4 på MMP-9 uttrykk	53
4.2 Effekter av S100A4 på MMP-2 uttrykk	56
4.3 Effekter av S100A4 på MMP-7 uttrykk	57
4.4 Effekter av S100A4 på MMP-1 og MMP-3 uttrykk	58
4.5 Effekter av S100A4 på MMP-13 og MMP-14 uttrykk	59
4.6 Effekter av S100A4 på TIMP-1 og TIMP-2 uttrykk.....	61
4.7 Effekter av S100A4 på uPA og uPAR uttrykk	62
4.8 Effekter av S100A4 på E-cadherin uttrykk.....	63
5. Konklusjon.....	65
6. Referanser	66

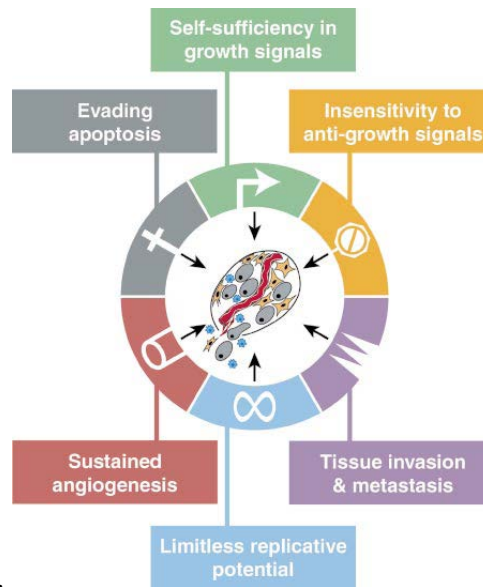
1. Innledning

1.1 Kreft

Tall fra Kreftregisteret i Norge viser at det i 2009 ble det rapportert 27 520 nye tilfeller av kreft i Norge, og ved utgangen av året var det nærmere 200 000 nordmenn i live som hadde kreft eller som tidligere hadde blitt diagnostisert med kreft. Kreft er en sykdom som rammer mange, og særlig de eldre [1]. Forekomsten av kreft kan se ut til å øke globalt [2], men dette må ses i sammenheng med en økning i forventet levealder i den vestlige delen av verden. Samtidig har det at de eldre rammes i størst grad en direkte sammenheng med selve patofysiologien til kreft.

Kreft er karakterisert av ukontrollert celledeling og evne til å spre seg til andre steder i kroppen, en prosess kalt metastase. Kroppen består av trillioner av celler som utgjør alle dens organsystem. Form, funksjon og levetid varierer mellom cellene, og kroppen har et nøye system som regulerer vekst og homeostase. Når det oppstår en svikt i dette kontrollsystemet, kan normale celler utvikle seg til kreftceller. Svikten vil ofte være relatert til mutasjoner i to typer gener som normalt regulerer celledeling, såkalte proto-onkogener og tumor-suppressor gener. Mutasjonene kan være forårsaket av kjemikalier eller stråling, spontane mutasjoner i DNA, feil i replikasjonszyklusen, eller de kan noen ganger være medfødte [3]. Desto eldre man blir, desto større sjanse er det for at mutasjoner kan akkumulere og gi opphav til en kreftcelle.

Hanahan og Weinberg publiserte i 2000 artikkelen «The Hallmarks of Cancer» [4] hvor de foreslo seks essensielle endringer som en celle må overkomme for å kunne utvikle seg til en malign tilstand (se Fig. 1). Disse endringene inkluderer at cellen er selvforsørgende av vekstfaktorer, ikke lengre er sensitiv for vekst-hemmende faktorer, har evne til å unngå programmert celledød (apoptose), har ubegrenset replikasjonespotensiale, kan danne nye blodkar (angiogenese) og har evne til å invadere nabovev og metastasere [4].



Figur 1: The Hallmarks of cancer foreslått av Hanahan og Weinberg i 2000. Gjengitt med tillatelse fra [4].

Mange av disse endringene er forbundet med endringer i nettopp proto-onkogener og tumor-suppressor gener [5]. Proto-onkogener koder for proteiner som er med på å regulere cellevekst og celledifferensiering. Endringer som følge av mutasjoner i disse genene med påfølgende økt proteinnivå eller syntese av unormale proteiner, vil kunne bidra i utviklingen av kreft. Tumor-suppressor gener er normalt med på å regulere cellyklusen, reparere skadet DNA, eller dersom sterkt skadet DNA, indusere apoptose. Endringer i disse genene kan føre til at en celle som normalt ville gått i apoptose, får proliferere videre. For at en celle skal kunne utvikle seg til en malign tilstand er det nødvendig med flere mutasjoner i flere typer gener [3].

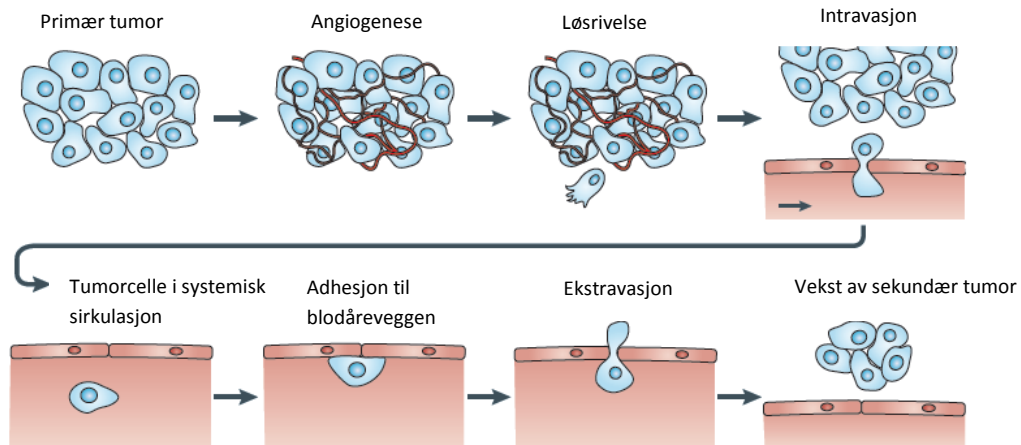
I en oppdatert artikkel av «The Hallmarks of Cancer» som kom i 2011 vektlegger Hanahan og Weinberg den økte interessen av tumor stroma sin rolle i tumordannelsen, hvor man i løpet av det siste tiåret har måttet erkjenne at tumoren er et komplekst «organ» som kommuniserer med sine omgivelser, og hvor mange av endringene, som blant annet evne til invasjon og metastase, kan være avhengig av tumor stroma-interaksjoner [5].

1.1.1 Tumor stroma

Vevet som utgjør en tumormasse består ikke bare av kreftceller, men også av ekstracellulær matriks (ECM) og en rekke andre ikke-neoplastiske celler [6]. Disse ikke-neoplastiske cellene inkluderer blant annet fibroblaster, myofibroblaster, endotelceller, pericytter, glatte muskelceller, adipocytter, makrofager, lymfocytter og mastceller. De kan utgjøre opptil 90 % av tumormassen, og sammen med ECM og tumorceller danner de tumor stroma [6, 7]. De ulike celletypene i tumor stroma rekrutteres og aktiveres av tumorcellene, for eksempel ved frigjøring av mitogene faktorer som «platlet-derived growth factor» (PDGF) [7]. Noen av de rekruterte celletypene endrer egenskaper som bidrar til å stimulere ytterligere tumorvekst, blant annet ved frigjøring av vekstfaktorer, og synes også å være essensielle for angiogenese og invasjon [6].

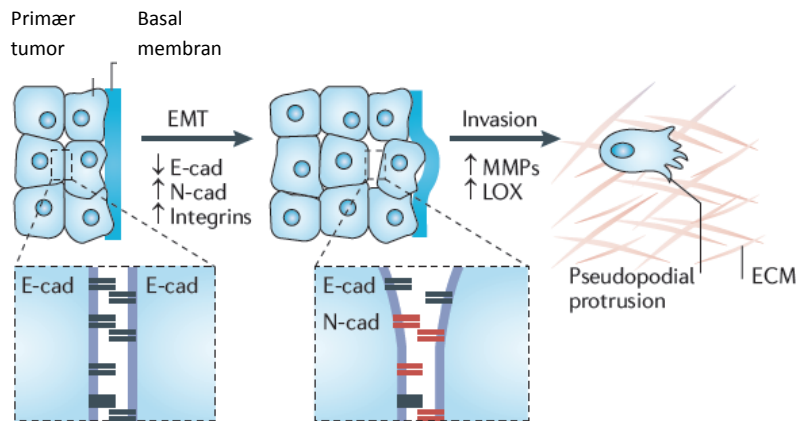
1.1.2 Invasjon og metastase

Maligne tumorer som metastaserer er ansvarlig for 90 % av alle dødsfall forårsaket av kreft [8]. For at en tumorcelle skal kunne metastasere må den først erverve seg noen egenskaper som tillater den å forlate tumorvevet og invadere nærliggende vev, for så å kunne spres til andre steder i kroppen via systemisk blodsirkulasjon eller lymfesystem [7]. Over 80 % av alle kreftceller har opphav fra epitelvev og kalles karsinom [7]. Epitelvevet består i de fleste tilfeller av et tynt lag epitelceller med et underliggende mer komplekst bindevev. Mellom de to finnes basalmembranen, en type spesialisert ekstracellulær matriks som blant annet fungerer som en beskyttende barriere. Karsinomet oppstår i epitellaget og anses benignt så lenge kreftcellene er lokalisert på denne siden av basalmembranen. Mange kreftceller erverver derimot egenskaper som tillater dem å trenge gjennom basalmembranen og invadere underliggende bindevev, og tumorcellene har gått over til en malign tilstand [7].



Figur 2: Alle trinnene i metastaseprosessen; dannelsen av et vaskulært nettverk (angiogenese) som forsyner tumoren med næringsstoffer, løsriving fra den opprinnelige primærtumoren, intravasjon til systemisk sirkulasjon, transport via blodbane eller lymfeårer til ny lokasjon i kroppen, hvor tumorcellen via ekstravasjon penetrerer åreveggen og, dersom forhold ligger til rette og cellen har alle egenskapene som tillater det, gir opphav til en ny sekundær tumor. Gjengitt med tillatelse fra [8].

I prinsippet er trinnene for invasjon og metastase de samme for alle typer tumorer (se Fig.2); dannelsen av et vaskulært nettverk til tumoren (angiogenese), løsriving fra den opprinnelige tumoren og påfølgende invasjon til nabovæv. De aller fleste celler er normalt sterkt bundet til hverandre ved hjelp av ulike adhesjonsstrukturer. Ettersom en tumor utvikler seg vil derimot tumorcellene erverve egenskaper som gjør at disse interaksjonene blir svekket, noe som muliggjør invasjon til nabovæv [9]. Epitelial-til-mesenkymal transisjon (EMT) er en prosess hvor epitelceller gjennomgår en endring som gir cellene en mesenkymal fenotype. Denne prosessen er viktig i embryogenesen, men man antar at den også er involvert i invasjon og metastase av tumorceller. Kritisk for EMT er tap av adhesjonsmolekylet E-cadherin (se Fig.3) som fører til redusert adhesjon mellom celler og endret morfologi fra en typisk kubeformet epitelcelle til en mesenkymal struktur. Mesenkymale egenskaper inkluderer blant annet økt mobilitet, evne til invasjon og økt resistens mot apoptose [10]. Samtidig med tap av E-cadherin, ses også økt nivå av N-cadherin, og som E-cadherin vil også N-cadherin binde til andre molekyler av samme type på nærliggende celler. Det kan imidlertid se ut til at bindingene mellom N-cadherin molekyler er mye svakere enn de mellom E-cadheriner, og dette kan forklare hvorfor dette skiftet blant annet bidrar til økt cellemotilitet [7].



Figur 3: Tap av E-cadherin bidrar til å indusere EMT, og er et viktig trinn i utviklingen av en metastaserende tumorcelle. Gjengitt med tillatelse fra [8].

For at en karsinomcelle skal kunne nå nærliggende vev må den først kunne trenge gjennom basalmembranen. Tumorcellene klarer dette ved å produsere og skille ut proteaser, hvor blant annet matriks metalloproteinaser (MMPer) har en svært viktig rolle [7]. MMPer skilles ut fra kreftceller, men også fra andre aktiverte celletyper i tumor stroma, som makrofager, fibroblaster, lymfocytter og nøytrofile celler [11]. Ved å bryte ned komponenter i ekstracellulær matriks danner MMPer rom for tumorcellene til å kunne bevege seg. Urokinase plasminogen aktivator (uPA) er en annen viktig protease som også deltar i nedbrytning av komponenter av basalmembranen og som sammen med MMPer bidrar til invasjon og metastase [3, 7].

Videre i metastaseprosessen vil invasive egenskaper tillate kreftcellene å trenge gjennom veggen av blodårer eller lymfeårer, en prosess kalt intravasjon (se Fig.2 ovenfor) [7, 8]. Cellene i en tumor er heterogene, og vil ha svært ulik evne til å overleve i blodbanen. Bare et lite antall celler fra den opprinnelige tumoren vil inneha alle de egenskapene som kreves for å gi opphav til en sekundær tumor, og retning av blodsirkulasjon ser ut til å være en avgjørende faktor for hvor det dannes metastaser [3, 7, 12]. Kreftcellen forlater blodbanen ved å penetrere blodåreveggen et annet sted i kroppen, en prosess kalt ekstravasjon. Ekstravasjon kan skje ved at kreftcellen umiddelbart klarer å penetrere blodåreveggen, eller at den begynner å proliferere i blodåreveggen og danner en liten tumor som vokser og til slutt vil penetrere veggen [7, 8]. I sin nye lokalisasjon må tumorcellen fortsette og replikere og ha evne til å initiere angiogenese for at en sekundær tumor skal oppstå [3].

1.2 Oralkreft

Oralkreft er på verdensbasis den 6. mest forekommende kreftformen og plateepitelkarsinom (eng; squamous cell carcinoma, SCC) utgjør over 95 % av alle tilfeller av oralkreft [13]. I Norge var det i 2009, 509 nye tilfeller av oralkreft [1].

Risikofaktorene for å utvikle oralt plateepitelkarsinom er for det meste relatert til livsstil, hvorav de to viktigste faktorene er tobakk og alkoholforbruk [14], og disse synes å ha en synergisk effekt [15]. Det eksisterer et sterkt dose-responsforhold mellom tobakksrøyking og oralkreft, og risikoen øker med en faktor på 20 hos storrøykere [14]. Noen steder i verden er det vanlig å tygge på betel blader, og dette er også en risikofaktor som er sterk forbundet med plateepitelkarsinom [14]. Det eksisterer dessuten en sterk forbindelse mellom oral infeksjon av human papilloma virus (HPV) og oralkreft. Forekomsten av tonsill- og tungekraft hos yngre synes å øke, og dette tror man kan være relatert til HPV infeksjon [16, 17].

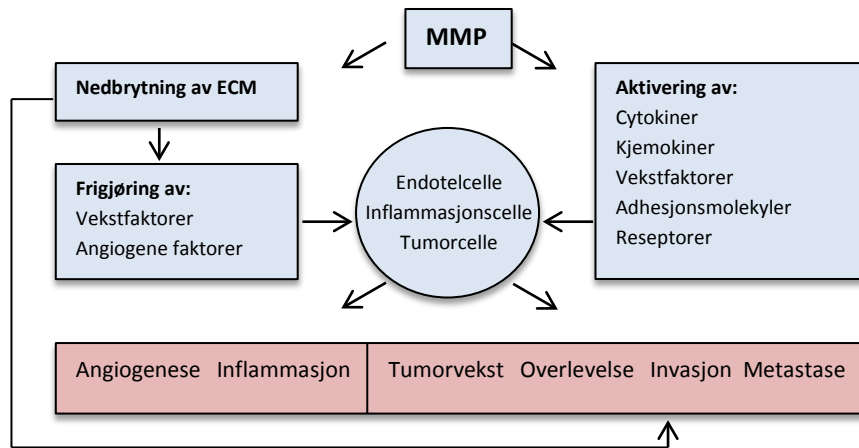
Kliniske tegn på oralt plateepitelkarsinom kan være rød eller hvit, eller en kombinasjon av rød og hvit lesjon i munnhulen, udefinerbar klump, eller smerte eller nummenhet i munnen [18]. Oralkreft er en aggressiv kreftform hvor svulstene ofte oppdages sent i sykdomsforløpet, og mange pasienter har allerede metastaser til lymfeknuter på halsen ved diagnosetidspunktet [19]. Dette gjenspeiles i en relativt dårlig prognose med en 5 års overlevelse på bare 50 %, en overlevelsesrate som heller ikke synes å ha økt de tre siste tiårene [20]. I dag består behandlingen hovedsakelig av kirurgi og strålebehandling [18], men den vedvarende høye mortaliteten av oralkreft indikerer et behov for videre forskning med mål om å finne nye og bedre behandlingsformer som kan bedre leveutsikten for disse pasientene.

1.3 Ekstracellulær matriks

Ekstracellulær matriks (ECM) er en kompleks sammensetning av hovedsakelig to klasser makromolekyler – proteoglykaner og fibrøse proteiner, hvorav de fibrøse proteinene inkluderer kollagen, elastin, fibronektin og laminin [21]. Egenskapene til ECM tar mange ulike former, og komposisjon og elastitet vil variere mye mellom de ulike vev [3]. ECM sørger for strukturell støtte for organ og vev, men har også flere andre funksjoner. Den påvirker form og bevegelse av celler, har en viktig rolle i celledeling og differensiering, og sørger for adhesjon og overføring av signaler mellom nærliggende celler [3, 22]. ECM fungerer også som et reservoar av løselige vekstfaktorer og cytokiner, og hvor biotilgjengeligheten av dem reguleres av remodulering av ECM [23]. Motilitet av celler og remodulering av vev er viktig både i normale fysiologiske prosesser, som vekst og utvikling, og patologiske prosesser som sårtilheling og kreft [22]. ECM er en svært dynamisk enhet og gjennomgår kontinuerlig remodulering som er essensiell for normal funksjon, og er regulert av blant annet matriks metalloproteinaser (MMPer) og vevs inhibitorer av metalloproteinaser (TIMPer) [21].

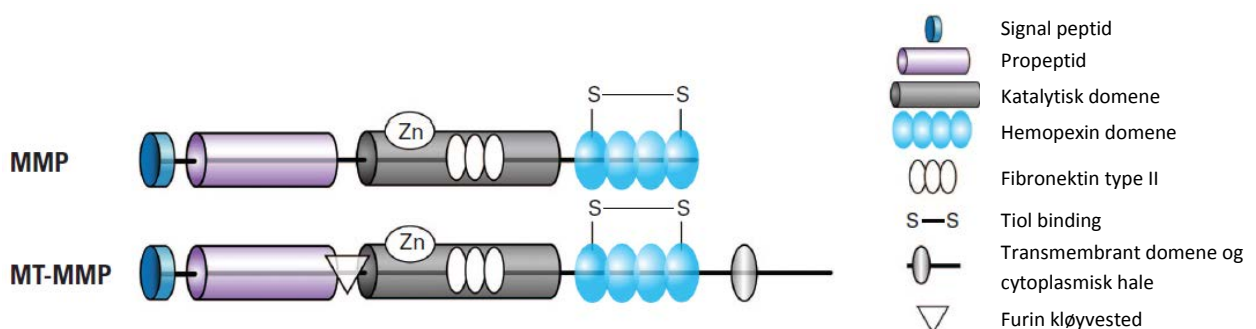
1.4 Matriks metalloproteinaser (MMPer)

Ekstracellulær matriks (ECM) er en fysisk barriere som kreftceller må overkomme for å kunne metastasere, og nedbrytning av ECM utføres av ekstracellulære matriks proteinaser som kan deles inn i tre grupper, bestående av metalloproteinaser, cystein proteinaser og serine proteinaser [24]. Matriks metalloproteinaser (MMPer) er Zn^{2+} -avhengige proteolytiske enzymer som bryter ned komponenter av ECM, og som med det gir plass for nye celler ved normal celledeling. MMPer har en viktig rolle i vedlikehold av normal vevsfunksjon, blant annet ved sårtilheling og angiogenese [7]. Økt uttrykk av MMPer har derimot vært forbundet med utviklingen av en rekke sykdommer, inkludert kroniske inflammasjonssykdommer og kreft [25]. Ved tumorvekst ser nedbrytningen av ECM ut til å fortsette kontinuerlig, og ikke i korte utbrudd som ved normal celledeling [7]. Foruten å bidra til invasjon og metastase, vil degradering av ECM av MMPer også frigjøre en rekke faktorer som ligg forankret i ECM (se Fig.4), som vekstfaktorer og angiogene faktorer, og i tillegg aktiverer de en rekke latente vekstfaktorer, cytokiner og kjemokiner og kløyver reseptorer på celleoverflaten. Via disse mekanismene har MMPer også en viktig rolle i regulering av signalveier som kontrollerer cellevekst, overlevelse, invasjon, inflammasjon og angiogenese [26].



Figur 4: MMPer bidrar til en rekke ulike prosesser som stimulerer tumorprogresjonen, både ved nedbrytning av ECM og ved frigjøring og aktivering av en rekke latente faktorer i ECM. Modifisert med tillatelse fra [26].

Det har blitt identifisert 23 ulike humane MMPer, som hovedsakelig deles inn i løselige MMPer og membranbundne MMPer (MT-MMPer). De løselige MMPene deles videre inn i klasser basert på deres substratspesifisitet (se tabell 1), blant annet kollagenaser, gelatinaser, stromelysiner og matrilysin [27]. Alle MMPene har en felles grunnleggende struktur (se Fig. 5) som består av et signalpeptid-domene, som guider enzymet til ru endoplasmisk retikulum under syntese, et propeptid-domene, som opprettholder latenstiden til enzymet inntil det fjernes eller forstyrres, et katalytisk domene, som inneholder Zn^{2+} -bindingsdomene og som er ansvarlig for enzymaktivitet, og et hemopexin-domene (foruten MMP-7, -23 og 26), som bestemmer substratspesifisitet til MMPene. Det eksisterer også en liten hinge-region som tillater hemopexin-domenet å presentere substratet for det aktive setet i det katalytiske domenet. Membranbundne MMPer inneholder i tillegg et transmembrant og et intracellulært domene [28].



Figur 5: Grunnleggende struktur av MMP og MT-MMP. Gjengitt med tillatelse fra [28].

MMPer skilles hovedsakelig ut som inaktive proenzym, hvor en interaksjon mellom en cysteinenhet i propeptid-domenet og Zn^{2+} -ionet i det katalytiske domenet blokkerer tilgang for substrat til det katalytiske setet. Enzymet aktiveres ved at denne interaksjonen brytes, og det katalytiske setet blir tilgjengelig. Dette skjer ved proteolytisk kløving av propeptid-domenet av andre endopeptidaser som furin, alternativt plasmin og andre serinproteaser, eller andre MMPer [27, 29].

Aktiviteten av MMPer reguleres på flere nivå, blant annet ved regulering av genuttrykk, omdanning fra proenzym til aktivt enzym og tilstedeværelsen av inhibitorer. Genuttrykket kontrolleres av en rekke vekstfaktorer og cytokiner, og kan for noen MMPer (MMP-1, -3 og -13) undertrykkes av for eksempel «transforming growth factor β » (TGF- β) og glukokortikoider [30]. Foruten løselige faktorer, kan MMP-uttrykket også reguleres ved celle-cellekontakt eller interaksjon mellom celler og komponenter i ECM. Den lokale balansen mellom MMPer og deres inhibitorer er også av betydning for hvorvidt MMPer får utøve sine effekter. Når man skal bedømme relevansen av økt uttrykk av MMPer i tumorvev er altså det helhetlige bildet viktig; om inhibitorer eller aktiverende enzymer er tilstede i det samme mikromiljøet. De viktigste inhibitorene av MMPer er vevs inhibitorer av metalloproteinaser (TIMPer). Selv om også kreftceller uttrykker MMPer og TIMPer, er det hovedsakelig andre typer celler i tumor stroma som skiller ut MMPer og TIMPer til det ekstracellulære rom [27, 29].

Det har blitt gjennomført flere kliniske studier med uselektive MMP-hemmere for behandling av kreft, men som ikke har vist seg å ha noen effekt på overlevelsesraten [31]. Dette skyldes høyst sannsynligvis at inhibering med uselektive MMP-hemmere også vil forstyrre en rekke normale fysiologiske funksjoner, og i senere tid er det i tillegg vist at MMPer kan ha anti-tumor effekter [32]. Dette gjenspeiler de komplekse og mangfoldige rollene av MMPer og understreker nødvendigheten av å kartlegge alle effekter av alle MMPer, både tumorfremmende og tumorhemmende. Dette for at man i fremtiden skal kunne utvikle selektive MMP-hemmere som kun virker på de tumorfremmende effektene av MMPer.

Tabell 1: Klassifisering av MMPer. Modifisert med tillatelse fra [27, 33].

Klassifisering	MMP	Alternative navn
Kollagenaser	MMP-1	Kollagenase-1 Interstitial kollagenase
	MMP-8	Kollagenase-2 Nøytrofil kollagenase
	MMP-13	Kollagenase-3
Gelatinaser	MMP-2	Gelatinase A 72-kDa type IV-kollagenase
	MMP-9	Gelatinase B 92-kDa type IV-kollagenase
Matrilysiner	MMP-7	Matrilysin Pump-1
	MMP-26	Matrilysin-2 Endometase
Stromelysiner	MMP-3	Stromelysin-1 Transin-1
	MMP-10	Stromelysin-2
Transmembrane MMPer	MMP-14	Membrantype-1 MMP
	MMP-15	Membrantype-2 MMP
	MMP-16	Membrantype-3 MMP
	MMP-19	
	MMP-24	Membrantype-5 MMP
Glykosylfosfatidylinositol- forankret MMPer	MMP-17	Membrantype-4 MMP
	MMP-25	Membrantype-6 MMP Leukolysin
Andre	MMP-11	Stromelysin-3
	MMP-12	Makrofag meallo-elastase
	MMP-20	Enamelysin
	MMP-21	
	MMP-23	Cystein array MMP Femalysin MMP-22
	MMP-27	
	MMP-28	Epilysin

1.4.1 Vevsinhibitorer av matriks metalloproteinaser (TIMPer)

Det finnes fire vevsinhibitorer av matriks metalloproteinaser (TIMPer), TIMP-1, -2, -3 og -4, som alle skilles ut ekstracellulært og hvor funksjonen er å regulere MMPenes proteolytiske aktivitet. Det er TIMPenes N-terminal som binder til det katalytiske domenet på MMPer og inhiberer dets aktivitet, mens C-terminalen blant annet interagerer med hemopexin domenet på proMMP-2 og -9 og stabiliserer proenzymet [34]. TIMP-2 er den eneste TIMPen som fungerer både som en MMP-hemmer og aktivator, da den sammen med MMP-14 danner et kompleks som aktiverer proMMP-2 [35]. De fire TIMPene kan inhibere alle MMPer, men med ulik effektivitet. For eksempel inhiberer TIMP-1 fortrinnsvis MMP-1, -3, -7 og -9, mens TIMP-2 er en mer effektiv hemmer av MMP-2 [34]. Studier har vist at TIMPer også har flere andre biologiske funksjoner, og synes blant annet å være involvert i celledifferensiering, vekst, migrering, invasjon, anti-angiogenese og pro-apoptose. Det kan tenkes at disse funksjonene delvis skyldes inhibering av MMPer, men mange av dem er vist å være uavhengige av TIMP-MMP interaksjonen [35].

1.5 Urokinase plasminogen aktivator (uPA) systemet

Urokinase plasminogen aktivator (uPA) systemet består av flere serin proteinaser som er involvert i nedbrytningen av basalmembranen og ekstracellulær matriks, og som med det bidrar til invasjon og metastase. uPA systemet består av urokinase plasminogen aktivator (uPA) og dens reseptor (uPAR), vevs-type plasminogen aktivator (tPA) og plasminogen aktivator inhibitor (PAI) [36]. uPA skilles ut fra bindevevsceller som et 53 kDa stort inaktivt proenzym, og aktiveres via kløyving etter binding til dens reseptor, uPAR. De fleste biologiske funksjoner til uPA antar man avhenger av dets binding til uPAR. Noen få studier har vist uPAR-uavhengig aktivitet av uPA, men aktiviteten av uPA øker flere hundre ganger ved binding til uPAR [7].

uPA og tPA aktiverer proenzymet plasminogen til plasmin, men i motsetning til uPA er ikke tPA forbundet med malign sykdom [37]. Aktivering av plasmin fører til nedbrytning av ECM og basalmembranen, i tillegg til aktivering av en rekke andre proteinaser, blant annet MMP-1, -2, -3, -9 og -14. Alternativt kan uPA også kløyve og aktivere noen MMPer direkte [7].

1.6 E-cadherin

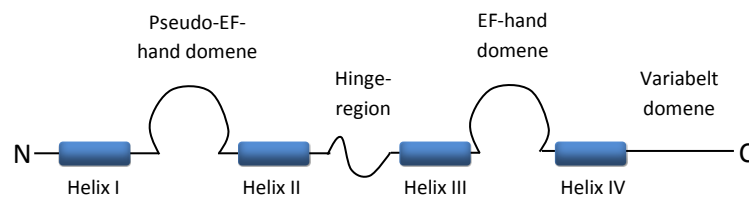
Cadheriner er transmembrane proteiner som ekstracellulært binder til en passende ligand på overflaten av en nabocelle, og de kan binde til like eller ulike adhesjonsproteiner. Ca^{2+} -binding fører til en konformasjonsendring av cadherin som tillater celle-celle adhesjon [3]. Cadheriner er navngitt etter vevet de først ble isolert fra, for eksempel E-, N- og R-cadherin fra henholdsvis epitel-, neural- og retinalvev. E-cadherin uttrykkes hovedsakelig i epitelvev og det ekstracellulære domenet av reseptoren er ansvarlig for adhesjon og kommunikasjon med nærliggende celler. Intracellulært, i cytosol, er cadheriner bundet til cytoskjelettet og er viktig for intracellulære prosesser som celledisjunksjon [38].

Et av trinnene i utviklingen mot en metastaserende tumor er tap av celle-celle adhesjoner [39], og tap av E-cadherin, som et av de viktigste celle-celle adhesjonsmolekylene, bekreftes gjennom flere studier, *in vitro* og *in vivo*, å ha en viktig rolle for metastase [40]. De fleste tumorer er karsinomer fra epitelvev, og karsinomer vil ofte miste E-cadherin, enten delvis eller fullstendig [40]. Tap av E-cadherin kan være forårsaket av genetiske eller epigenetiske mutasjoner, men skyldes oftere nedregulert genuttrykk mediert via flere typer transkripsjonsfaktorer målrettet mot E-cadherin promoteren [41].

1.7 S100 familien

Medlemmer av S100 familien har vist seg å ha både intracellulære og ekstracellulære roller involvert i reguleringen av ulike biologiske prosesser som proteinfosorylering, celleproliferasjon og motilitet, regulering av cellyklus, transkripsjon, differensiering og overlevelse [42]. S100 familien består av mer enn 25 ulike Ca^{2+} -bindende proteiner [43]. De er lavmolekylære proteiner av størrelsesorden 10-20 kDa, og eksisterer generelt som homo- eller heterodimerer. Oligomere former har også vært rapportert for noen S100 proteiner [44]. Navnet S100 kommer fra tidlige observasjoner av at proteinene var løselige (eng; soluble) i 100 % mettet ammoniumsulfat [45].

S100 familien er karakterisert av to Ca^{2+} -bindende EF-hand enheter (Fig. 6), et typisk EF-hand domene på 12 enheter og et pseudo-EF-hand domene på 14 enheter, separert av en hinge-region [46]. Ca^{2+} -binding fører til en konformasjonsendring av S100 proteinet. Det dannes et hydrofobt bindingssete, delvis formet av hinge-regionen [43], og dette gjør det mulig for S100 proteinene å interagere med målproteiner. De ulike S100 proteinene har ulike målprotein, og dette antar man henger sammen med ulik sekvens av hinge-regionen og C-terminalen [44]. Proteinene har selv ingen enzymatisk aktivitet, men utøver sin effekt ved å interagere med og modulere aktiviteten av andre proteiner [44, 47]. De er involvert i aktiveringen av spesifikke biokjemiske signalveier, og cellulære funksjoner som proliferasjon, overlevelse, differensiering og motilitet [43, 48].



Figur 6: S100 protein struktur, karakterisert av to EF-hand domener. Modifisert med tillatelse fra [49].

1.7.1 Protein S100A4

S100A4 er et av proteinene i S100 familien som har fått mye oppmerksomhet de siste tiårene på grunn av dets evne til å fremme invasjon og metastase. Proteinets molekylvekt ca. 11,5 kDa og er funnet lokalisert i cellekjernen, cytoplasma og det ekstracellulære rom [50]. Proteinets er kjent under mange navn, blant annet Mts-1, pEL-98, p9Ka, FSP-1, 18A2, 42A,

CAPL, metastasin og calvasculin. S100A4 ble for første gang koblet til kreftutvikling i 1989 av Ebralizde *et al* (1989), som fant økt nivå av S100A4 i metastaserende celler [51]. Siden er det også funnet økte nivåer i en rekke kreftformer, blant annet i galleblære, blære, øsofagus, bukspyttkjertel, prostata, bryst, tykktarm og ikke-småcellet lungekreft [52].

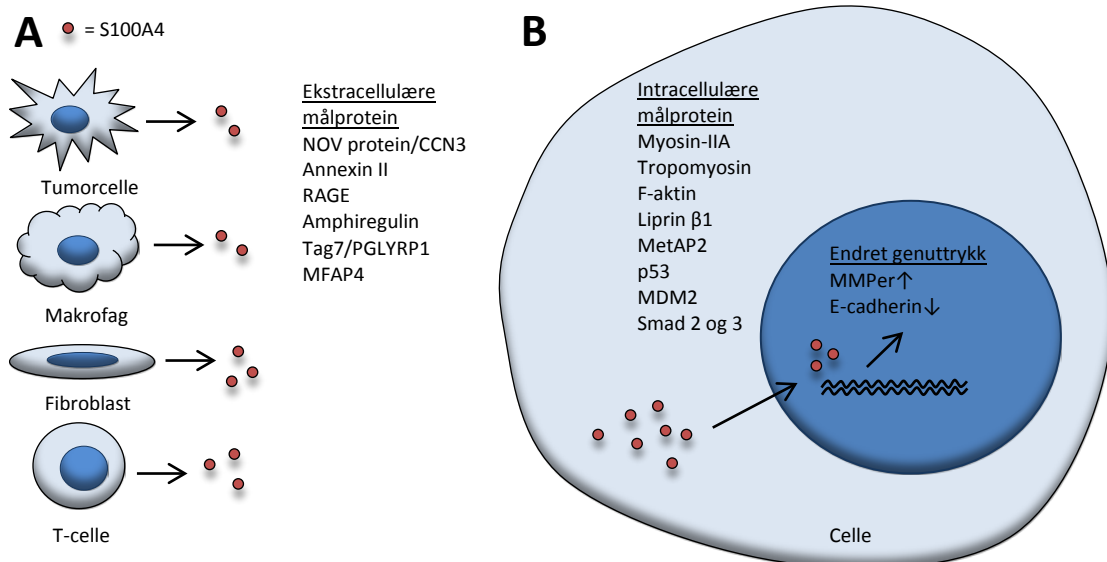
Flere studier har vist at økte nivåer av S100A4 er forbundet med aggressiviteten av tumoren og dens evne til å metastasere [53]. Studier utført viser at S100A4 ikke er kreftfremkallende i seg selv [54], men er en potensiell inducer av metastase. Transgene mus som overuttrykte S100A4 utviklet ikke tumorer av seg selv. Når disse musene ble krysset med MMTV-neu eller GRS/A-mus, som er karakterisert av brysttumorer som sjeldent metastaserer, førte derimot overuttrykk av S100A4 til svært aggressive primære tumorer og ga høy forekomst av metastase [54]. Motsatt har man også sett at S100A4 knockout-mus som ble injisert med svært metastaserende cellelinjer fra brysttumor, ikke ga metastase [55].

Det er flere studier som viser forskjell i overlevelsesrate avhengig av S100A4-uttrykk og S100A4 er blitt foreslått som en prognostisk markør. Rudland *et al.* (2000) var noen av de første til å bekrefte dette i en retrospektiv studie med 349 forsøkspersoner. Pasienter med invasiv brystkreft, av stadium I og II som kunne opereres, ble kontrollert for S100A4-uttrykk i tumorvev. Pasientene viste signifikant forskjell i overlevelsesrate hvor etter 19 år, 80 % av pasientene med S100A4-negative svulster var i live, mens bare 11 % av de med S100A4-positive svulster var i live [56].

De eksakte mekanismene for hvordan S100A4 stimulerer metastase er dårlig klarlagte. Studier har vist at S100A4 kan ha en potensiell rolle i angiogenese, cellemotilitet og invasjon, prosesser som alle bidrar til å fremme metastase av primærtumor. Som andre S100 proteiner har heller ikke S100A4 enzymatisk aktivitet, men interagerer med andre proteiner, både intracellulært og ekstracellulært (se Fig.6)[50, 57]. Intracellulært er det dokumentert flere målprotein for S100A4, blant annet flere komponenter av cytoskjelettet, som myosin-IIA, tropomyosin og F-aktin, som indikerer at S100A4 kan bidra til økt motilitet av celler [57]. Det er akkumulerende bevis for at S100A4 også har ekstracellulære effekter, og foruten å skilles ut av tumorceller, er det flere studier som viser at S100A4 også skilles ut av andre cellyper, som fibroblaster og makrofager [57]. Mekanisimen for hvordan S100A4 skilles ut av disse cellene er ukjent, og det er foreslått en atypisk prosess [52]. Den ekstracellulære effekten av S100A4 er trolig relatert til interaksjoner med en eller flere reseptorer på celleoverflaten, og

«receptor for advanced endproducts» (RAGE) er blitt foreslått å kunne mediere effekten av flere S100 proteiner, inkludert S100A4 [58].

Relatert til effekt av S100A4 på MMPer som blir undersøkt i denne oppgaven, er det flere studier at har vist at både intracellulært og ekstracellulært S100A4 synes å kunne påvirke uttrykk av disse proteolytiske enzymene [59-61].



Figur 7: Mulige (A) ekstracellulære og (B) intracellulære effekter av det metastaseassosierte proteinet S100A4. NOV protein/CCN3: nephroblastoma overexpressed protein, RAGE: receptor for advanced endproducts, Tag7/PGLYRP1: peptidglycan recognition protein1, MFAP4: microfibrillar-associated protein 4, MetAP2: methionine aminopeptidase type II, p53: tumor suppressor protein 53, MDM2: double minute 2 protein, Smad: Sma- and Mad-related proteins, MMPer: matriks metalloproteinaser. Modifisert med tillatelse fra figur 1 fra [50] og figur 4.1 og tabell 4.1 fra [57].

1.8 RNA interferens (RNAi)

RNA interferens (RNAi) er en mekanisme som regulerer genuttrykk, funnet i en rekke eukaryote organismer [62]. Det er en forsvarsmekanisme mot fremmed dobbeltrådet RNA, som fra virus. RNAi mekanismen vil slå ned uttrykket av de virale genene og med det begrense en viral infeksjon. Dette skjer ved at en ribonuklease, kjent som Dicer, kløyver dobbeltrådet RNA til korte fragmenter av størrelsesorden ~21-25 basepar, kalt siRNA (eng; small interfering RNA). siRNA kombineres så med en rekke proteiner, og danner et kompleks kjent som RISC (RNA-induced silencing complex). Etter inkorporering i RISC vil en av de to RNA trådene av siRNA brytes ned og etterlate en enkeltrådet RNA sekvens som veileder RISC komplekset til ønsket mRNA som så brytes ned av Slicer, en ribonukleasekomponent av RISC [3, 63].

Denne naturlig forekommende forsvarsmekanismen har vist seg å være et svært nyttig redskap i vitenskapen, ved at man kan slå ned genuttrykket av akkurat de genene man ønsker å studere. Det finnes i dag flere former som benyttes til RNAi, blant annet small interfering RNA (siRNA), som er syntetiserte duplekser av RNA i størrelsesorden 19-27 basepar, og short hairpin RNA (shRNA), som er av størrelsesorden omkring 65 basepar og inneholder komplementære sekvenser i 3'- og 5'-enden, som ved transkripsjon resulterer i at det dannes hårnålstruktur [64]. De leder begge til nedregulering av målgen, men i motsetning til siRNA som til slutt vil miste evnen til å nedregulere genuttrykk på grunn av fortykning ved celledeling, tilbyr short hairpin (shRNA) langvarig og stabil nedregulering av genuttrykket, da shRNA overføres til datterceller ved celledeling [65].

1.9 Formål med oppgaven

Det metastaseassosierte proteinet S100A4 er vist å aktivere og delta i signalveier, både intracellulært og ekstracellulært, og synes å bidra til en fenotype med økt motilitet og økt evne til invasjon og metastase [57]. Proteinets er også vist å kunne regulere uttrykket av en rekke proteaser involvert i remodulering og degradering av ekstracellulær matriks rundt tumor [59-61]. Med arbeidet i denne oppgaven ønsket vi å kartlegge effekter av S100A4 på proteolytiske enzymer i oralkreft, med mål om å bedre forståelsen av mekanismer involvert i invasjon og metastase. Dette for å fremskaffe ny kunnskap som kan bidra til at man i fremtiden kanskje kan utvikle legemidler som kan hemme de metastasefremmende effektene av S100A4 i oralkreft og andre krefttyper.

Ved å benytte to orale plateepitelkarsinomcellelinjer hvor uttrykket av S100A4 var stabilt slått ned ved hjelp av to ulike shRNA-konstrukt mot S100A4, ønsket vi å studere effekten av proteinet på ulike proteolytiske enzymer forbundet med invasjon og metastase. mRNA-nivået av de ulike målgenene i knockdowncellelinjene ble sammenlignet med mRNA-nivået i to kontrollcellelinjer med henholdsvis et non-silencing-konstrukt og en tom vektor. Eventuelle funn på mRNA-nivå ble også forsøkt verifisert på proteinnivå med zymografi. For å studere den ekstracellulære effekten av S100A4 ble det brukt mRNA høstet fra knockdowncellelinjer tilsatt rekombinant S100A4 (rS100A4) til vekstmediet i økende konsentrasjoner, og hvor mRNA-nivået ble sammenlignet med kontroll uten rS100A4.

Følgende målgen ble analysert i oppgaven:

- MMP-1
- MMP-2
- MMP-3
- MMP-7
- MMP-9
- MMP-13
- MMP-14
- TIMP-1
- TIMP-2
- uPA
- uPAR
- E-cadherin

2. Materialer og metode

2.1 Celler og celledyrking

2.1.1 Cellelinjer

Modercellelinjene UT-SCC-14 og UT-SCC-24A som var utgangspunkt for cellelinjene brukt i forsøkene er etablert ved Universitetet i Turku, Finland, fra to pasienter med plateepitelkarsinom i tunge. Cellelinjene benyttet i forsøkene er transfektert med to ulike shRNA konstrukt mot S100A4, shRNA S100A4-I og shRNA S100A4-II, et non-silencing shRNA konstrukt (NS), og en tom vektor (EV) (Origene, Rockville, MD). Dette ga fire cellelinjer, to kontrollcellelinjer og to knockdown-cellelinjer, for hver av de to modercellelinjene UT-SCC-14 og UT-SCC-24A.

Tabell 2: UT-SCC-14 og UT-SCC-24A cellelinjene brukt i forsøkene:

UT-SCC-14	Cellelinje
Kontroll	UT-SCC-14/NS
	UT-SCC-14/EV
S100A4 knockdown	UT-SCC-14/S100A4-I
	UT-SCC-14/S100A4-II
UT-SCC-24A	Cellelinje
Kontroll	UT-SCC-24A/NS
	UT-SCC-24A/EV
S100A4 knockdown	UT-SCC-24A/S100A4-I
	UT-SCC-24A/S100A4-II

2.1.2 Medium og celledyrking

Alle cellelinjene som ble brukt i forsøkene ble dyrket i Dulbeccos Modified Eagles medium, med 4500 mg glukose/L (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). Mediet ble også tilsatt ikke-essensielle aminosyrer (Sigma-Aldrich) i forholdet 1:100, 10 % føtalt bovint serum (FBS) (Biochrom, Berlin, Tyskland) og 0,5 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich). Cellene ble dyrket i dyrkningsflasker av størrelsesorden T25 (25cm²) til T150 (150cm²) og inkubert i varmeskap ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.1.3 Splitting av celler

For å kunne opprettholde eksponentiell vekst, ble cellene splittet ved ca. 80 % konfluens, vanligvis mandag, onsdag og fredag. Cellelinjene brukt i forsøkene fester seg til overflaten av

dyrkningsflasken, og til hverandre, såkalte «anchorage-dependent cells». Ved splitting av celler ble mediet i dyrkningsflasken sugd av, og cellene ble skylt med Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich), før det ble tilsatt 2-5 ml 0,25 % Trypsin (Sigma-Aldrich), avhengig av størrelsen på dyrkningsflasken. Trypsin er en serinprotease, og bryter peptidbindingene som fester cellene til overflaten og til hverandre. Trypsin fikk virke i 5-10 minutter i varmeskapet før det visuelt ble kontrollert av cellene var løsnet. For å inaktivere trypsin ble så serumholdig medium tilsatt i minst like stort volum som tilsatt mengde trypsin. Cellesuspensjonen ble homogenisert ved pipettering, og deler av den homogene cellesuspensjonen ble pipettert over til en ny dyrkningsflaske. Avhengig av størrelsen på dyrkningsflasken ble det tilsatt minimum 15 ml medium til en T75-flaske og 30 ml medium til en T150-flaske. Dyrkningsflasken ble så satt tilbake i varmeskap for videre inkubering. Medium, PBS og trypsin ble alltid forvarmet i varmeskap til 37°C før bruk.

2.2 Celletelling

Telling av celler ble gjort før hver høsting for å kunne beregne mengde cellesuspensjon som skulle til for å få rett antall celler til høstingen. Cellesuspensjonen ble laget ved trypsinering som forklart under prosedyren 2.1.3 Splitting av celler og overført til et sentrifugerør. Sentrifugerøret ble sentrifugert ved 1000 rpm i 3 minutter før supernatanten ble fjernet og cellepelletten ble resuspendert ved pipettering i et kjent volum medium. Selve tellingen ble utført ved hjelp av et Bürker tellekammer. Tellekammeret ble gjort klart ved å fukte kantene litt med vann og legge et dekkglass oppå. Femti mikroliter cellesuspensjon ble blandet med 50 µl medium i et eppendorfrør og den fortynnede cellesuspensjonen ble så påført tellekammeret. For å få et pålitelig tall ble det telt så mange A-ruter at celletallet tilsvarte minimum 100 celler. Tallet ble så brukt til å beregne antall celler per ml etter følgende ligning:

$$\frac{\text{Celletall} \times 20\,000}{\text{Antall A - ruter}} = \text{celler/ml}$$

For å få et så nøyaktig celletall som mulig ble det til noen av høstingene benyttet en Millipore celteller (Merck, Darmstadt, Tyskland). Særlig viktig er det med nøyaktig celletall når man jobber med små brønner og få celler, da variasjoner i celletall har større sannsynlighet for å kunne påvirke resultatet.

2.3 Forsøk med S100A4 knockdown celler

2.3.1 Rensing av total-RNA

Til forsøkene hvor vi skulle studere effekter av S100A4 knockdown, ble det sådd ut 750 000 celler per T25-flaske i serumholdig medium med 0,5 µg/ml puromycin. Etter 24 timer ble cellene høstet. Total-RNA ble rensset fra cellelinjene ved hjelp av RNeasy Plus Kit fra Qiagen (Hilden, Tyskland). Protokollen til kittet ble fulgt, og RNA ble eluert i 50 µl RNease-fritt vann. RNA-konsentrasjonen i prøven ble målt ved hjelp av NanoDrop spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). For RNA (nukleinsyrer) måler NanoDrop absorbans ved λ 260.

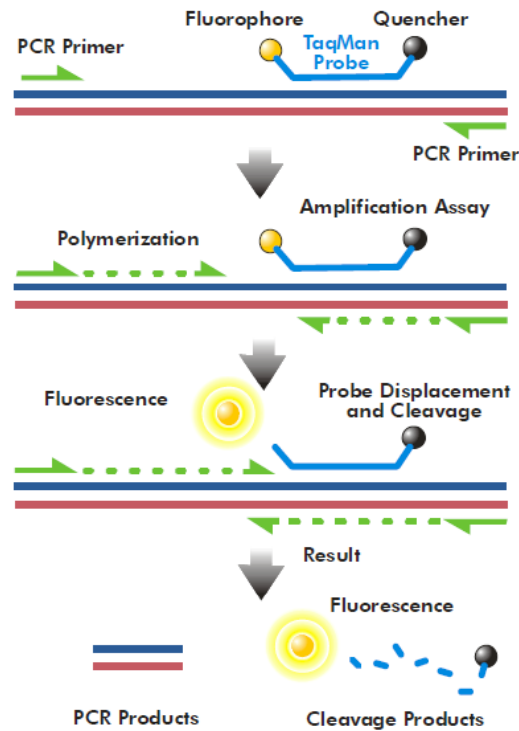
Det ble høstet RNA fra cellene på tre ulike datoer for å få biologiske replikater.

2.3.2 Revers transkriptase kvantitativ PCR (RT-qPCR)

For å kunne kvantifisere mRNA-nivået av målgenene ble det brukt revers transkriptase kvantitativ PCR (RT-qPCR). Først måtte mRNA omdannes til komplementært DNA (cDNA) ved hjelp av en revers transkriptase-reaksjon, og til dette ble Reverse Transcriptase Core Kit fra Eurogentec (Searing, Belgia) benyttet. Protokollen til kittet ble fulgt med random hexamers som primere og 200 ng RNA/10 µl cDNA-reaksjon. Det ble satt opp to parallelle RT-reaksjoner for hvert RNA. cDNA ble fortynnet 1:2,5 med RNase-fritt vann før bruk.

RT-qPCR er en metode hvor man kan måle amplifiseringen av PCR-produktet i «sanntid». Ved å bruke en probe med et fluoriserende molekyl, som for eksempel FAM, kan man detektere økning i fluorescenssignal for hver amplifiseringssyklus [66]. Stratagenes MX3000P instrument (Stratagene, La Jolla, CA) ble benyttet til målingene.

De ukjente prøvene ble tilsatt spesifikke primere for målgenet som binder til templatet (cDNA), en forward og en reverse, og en hydrolyse probe som er designet til å feste seg til en sekvens av målgenet rett nedstrøms for en av primerne. Binding av primeren til templatet initierer DNA replikasjon. Etersom DNA polymerase adderer nukleotider og når den bundne proben, vil det føre til at «quencheren» som hemmer fluorescenssignalet «brekker» og et fluorescenssignal frigis (se Fig.8) [66].



Figur 8: Virkemåte for en hydrolyseprobe [66].

SYBR Green er også en deteksjonsmetode for kvantifisering av mRNA-nivå. Når det forekommer fritt i løsning har SYBR Green lav fluorescens, men når bundet til dobbelttrådet DNA øker fluorescensintensiteten 1000 ganger, og fluorescenssignalet øker proporsjonalt med DNA konsentrasjonen. SYBR Green er i motsetning til en hydrolyseprobe ikke spesifikk for målgenet, og fluorescensintensiteten vil øke når bundet til ethvert dobbelttrådet DNA. Man er derfor avhengig av god spesifisitet av primerne ved bruk av SYBR Green [66].

Nivået av fluorescens som detekteres ved bruk av hydrolyseprobe eller SYBR Green er direkte relatert til mengde amplifisert PCR-produkt etter hver syklus. Den første syklusen hvor instrumentet kan skille mellom bakgrunnsstøyen og amplifikasjonen generert av fluorescens kalles Ct-verdien (eng; threshold cycle). Ct-verdien vil ha en direkte sammenheng med startkonsentrasjonen i prøven. Jo større mengde templat i prøven, desto lavere vil Ct-verdien bli [66]. Denne Ct-verdien ble benyttet til å beregne relativ mengde mRNA i prøvene ved hjelp av $\Delta\Delta\text{Ct}$ -metoden [67] etter formelen:

$$\frac{\text{Prøve A}}{\text{Prøve B}} = \frac{2^{Ct_{A_{index}} - Ct_{A_{target}}}}{2^{Ct_{B_{index}} - Ct_{B_{target}}}} = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$$

hvor $C_{t_{index}}$ er gjennomsnittet av C_t -verdiene for referansegenene og $C_{t_{target}}$ er C_t -verdien for målgnet. GAPDH, HPRT-1 og RPLP0 ble brukt som referansegen til kvantifisering av mRNA-nivå for målgene.

cDNA tilsvarende 20 ng RNA ble amplifisert i totalt 25 μ l PCR-miks. qPCR MasterMix Plus low ROX (Eurogentec) ble benyttet etter protokoll med 400 nM forward og reverse primer og 100 nM probe. Informasjon om primere og prober er angitt i tabell 3 og 4. PCR ble kjørt med følgende betingelser for assay med probe: 95 °C i 10 minutter, deretter 40 sykluser med 95°C i 30 sekunder, og 60 °C i ett minutt. For assay kjørt med SYBR-Green (Qiagen): 95 °C i 10 minutter, deretter 40 sykluser med 95°C i 30 sekunder, 60 °C i ett minutt og 72 °C.

Tabell 3: Primer- og probesekvenser for probebaserte assay:

Gen-symbol	Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3')	Probe (5'-3')	Lengde amplikon (bp)	RefSeq- nummer
GAPDH	CAACGGATTTGGTCGTATTGG GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTA A	AGCAGCCCTGGTG ACCAGGCG	72	NM_002046.3
HPRT-1	TCAGGCAGTATAATCCAAAGATGGT AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	CAAGCTTGCTGGTG AAAAGGACCCC	84	NM_000194
RPLP0	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT CCATCAGCACCACAGCCTTC	CCATCAGCACCAC AGCCTTC	149	NM_001002.3 NM_053275.3
S100A4	AGTTCAAGCTCAACAAGTCAGAACTAA TCATCTGTCCTTTTCCCCAAGA	CTGACCCGGGAGC TGCCCAG	79	NM_002961.2 NM_019554.2
MMP-1	TTGAAGCTGCTTACGAATTTGC GTCCCTGAACAGCCAGTACTT	CAGAGATGAAGTC CGGTTTTTCAAAGG GA	78	NM_002421
MMP-2	TGGGACAAGAACCAGATCACATA CGAGCAAAGGCATCATCCA	CATTGGCTACACAC CTGATCTGGACCC	83	NM_004530.4 NM_00112789 1.1
MMP-3	TTTAAAGGAAATCAATTCTGGGCTAT GAGGGAAACCTAGGGTGTGGAT	AGAGGAAATGAGG TACGAGCTGGATA CCCAAG	85	NM_002422.3
MMP-7	GGATGGTAGCAGTCTAGGGATTAACCT GGAATGTCCCATACCCAAAGAA	CCTGTATGCTGCAA CTCATGAACTTGGC	79	NM_002423.3
MMP-9	CCACCACAACATCACCTATTGG GAAGGCGCGGGCAA	CGCGGGCGGTGAT TGACGAC	85	NM_004994.2
MMP-13	TGGCATTGCTGACATCATGA GCCAGAGGGCCATAAA	CTCTTTTGGAAATTA AGGAGCATGGCGA CTT	76	NM_002427.2
MMP-14	GCCTGCGTCCATCAACACT ACACCCAATGCTTGTCTCCTTT	CCTACGAGAGGAA GGATGGCAAATTC G	77	NM_004995
TIMP-1	CCAGCGCCAGAGAGACA AGCAACAACAGGATGCCAGAA	CCATGGCCCCCTTT GAGCCC	73	NM_003254.2
TIMP-2	CACCCAGAAGAAGAGCCTGAA GGCAGCGCGTGATCTT	CACAGGTACCAGA TGGGCTGCGAGT	65	NM_003255.4

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, HPRT-1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1, RPLP0: ribosomal protein large, MMP: matriks metalloproteinase, TIMP: vevsinhibitor av matriks metalloproteinase

Tabell 4: Primersett til SYBR-Green-baserte assay:

Gensymbol	Assaynavn	Katalognummer	Lengde amplikon (bp)	RefSeq-nummer
uPA	Hs_PLAU_1_SG	QT00013426	116	NM_001145031 NM_002658
uPAR	Hs_PLAUR_1_SG	QT00076447	109	NM_001005376 NM_001005377 NM_002659
E-cadherin	Hs_CDH1_1_SG	QT00080143	84	NM_004360

uPA: urokinase plasminogen aktivator, uPAR: Urokinase plasminogen aktivator reseptor

2.3.3 Validering av RT-qPCR-assay

For å sikre effektiv og spesifikk kvantifisering av målgener må primerne som brukes valideres, og korrekte kontroller må inkluderes.

For å sjekke spesifisiteten til primersettene ble SYBR-Green benyttet. Dette er som nevnt en substans som fluoriserer når det binder til ethvert dobbeltrådet DNA, og i en PCR-reaksjon vil det genereres fluorescenssignal fra både spesifikke og uspesifikke produkter. Dersom man etter amplifisering kjører en smeltekurve (dissosiasjonskurve) vil spesifikke primere kun gi én topp i smeltekurven. Dersom man får flere topper i smeltekurven, kan dette være en indikasjon på at primerne amplifiserer uspesifikke produkter, amplifiserer seg selv (primer-dimer) eller at det er genomisk DNA i prøven. Dette er viktig å utelukke da det vil kunne gi misvisende resultater når vi analyserer våre målgen.

Det ble kjørt NoRT-kontroller (eng; no reverse transkriptase) for å kontrollere bidraget av genomisk DNA i prøvene, og i hvert run ble det også inkludert en NTC-kontroll (eng; no template control) for å utelukke kontaminering av mastermiks.

2.4 Statistiske analyser

mRNA-data er gjengitt i form av stolpediagram som gjennomsnittlig mRNA nivå \pm SEM, basert på relativ mengde mRNA beregnet ved hjelp av $\Delta\Delta C_t$ -metoden [67]. Tosidig Student's t-test for uavhengige utvalg med ulik varians ble benyttet for å finne ut om det var signifikante forskjeller i mRNA-nivå. P-verdi mindre enn 0,05 ble ansett som statistisk signifikant.

2.5 Substrat zymografi

2.5.1 Høsting av kondisjonert medium til substrat zymografi

Til substrat zymografi ble det sådd ut 30 000 celler per brønn i 96-brønners brett, eller 180 000 celler per brønn i 24-brønners brett. Cellene fikk stå over natt for å feste seg før det ble vasket 3 ganger med serumfritt medium og henholdsvis 100 μ l og 600 μ l serumfritt medium ble tilsatt per brønn. Cellene ble inkubert i varmeskap ved 37°C og 5 % CO₂. Førtiåtte timer etter at det ble byttet til serumfritt medium ble det kondisjonerte mediet høstet. Mediet ble sugd opp fra brønnene og sentrifugert ved 2000 rpm i 2 minutter. Ti prosent fryseløsning (0,1M CaCl₂ i 1 M HEPES, pH 7,5) ble tilsatt mediet før prøvene ble fryst ved -20°C.

2.5.2 MTS celle proliferasjons assay

MTS celle proliferasjons assay (Promega, Madison, WI) er et assay som måler celleviabilitet, og som ble benyttet for å kontrollere at celledetallet i brønnene var like for de ulike cellelinjene slik at resultatene fra zymografi kan sammenlignes.

MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) er en forbindelse som omdannes av dehydrogenase, et enzym som bare finnes i metaboliserende celler, til et løselig formazanprodukt. Absorbans av formazanproduktet vil kunne detekteres ved 490 nm, og ble målet direkte i brønnen 1-4 timer etter tilsatt MTS-reagens. Absorbansen vil være direkte proporsjonal med antall levende celler i brønnen.

2.5.3 Substrat zymografi prosedyre

Substrat zymografi er en av de mest brukte metodene for å detektere aktivitet av MMPer. Det baseres på at man inkorporer et kjent substrat for de aktuelle MMPene, for eksempel gelatin for MMP-2 og MMP-9, i en akrylamidgel og separerer enzymene i prøven ved hjelp av gelelektroforese. Etter en inkuberings-periode og påfølgende farging av gelen kan man så måle hvor mye av substratet som er degradert som et mål på mengde MMPer. Degradert substrat vil kunne detekteres som hvite soner mot en mørk bakgrunn [68, 69].

Det ble laget en separerende og en konsentrerende gel (se tabell 6). Først ble separerende gel støpt i støpeformen opp til ca. 1-2 cm fra toppen. Isopropanol ble fylt på toppen av den separerende gelen for å få en jevn overflate. Gelen fikk stå og stivne i 20 minutter før konsentrerende gel ble fylt helt opp til toppen av støpeformen. En kam med 15 tenner ble satt i den konsentrerende gelen som fikk får stå og stivne i 20 minutter. Til 15 µl av hver prøve ble det tilsatt 5 µl NuPage LDS Sample buffer 2x (4x fortynnet 1:1 med vann) (Invitrogen, Grand Island, NY), og 17 µl prøve med loadingbuffer ble påført brønnene i gelen. Gelen ble kjørt på is med elektroforesebuffer (se tabell 7), først ved 100 volt i 30 minutter, så 150 volt i 1 time. Etter elektroforese ble gelene vasket med 50 ml vaskebuffer (se tabell 7), først i 15-20 minutter ved svak risting, så enda en gang i 30-40 minutter. Deretter ble det tilført 50 ml assaybuffer (se tabell 7) og gelene ble inkubert over natten ved 37 °C og svak risting.

Neste dag ble gelene farget med 50 ml Coomassie Blue i 1 time ved svak risting, før de ble avfarget med 50 ml avfargingsvæske (se tabell 7), først i 15-20 minutter, så 30-40 minutter ved svak risting.

2.6 Western blot

2.6.1 Høsting av proteinlysate til Western blot

Effekt på mRNA-nivå er ikke nødvendigvis ensbetydende med at cellen vil translaterer RNA til ferdig protein. Eventuelle funn på mRNA-nivå ønsket vi videre å undersøke på proteinnivå både intracellulært fra proteinlysate, og ekstracellulært fra kondisjonert medium.

Til proteinlysate ble det sådd ut 1 000 000 celler per brønn i 6-brønners brett fra hver av cellelinjene. Etter 4-5 timer ble proteinlysate høstet ved at mediet ble sugd av, og 196 µl NuPage LDS Sample buffer 2x (4x fortynnet 1:1 med vann) (Invitrogen) og 4 µl 2,5 M DTT (Sigma-Aldrich) ble tilsatt hver av brønnene. Ved hjelp av en celledraper ble proteinlysate samlet sammen og videre overført til et eppendorfrør. Prøvene ble varmet i 10 minutter ved 70°C før de ble sonikert i 10-15 minutter.

2.6.2 Western blot prosedyre

Western blot er en metode for å identifisere proteiner i prøver, og det foregår i flere trinn. SDS-PAGE (eng: sodium dodecyl sulfat – polyakrylamid gelelektroforese) blir benyttet for å separere proteinene. Ved å tilsette av et sterkt reduksjonsmiddel (for eksempel SDS) fjernes sekundære og tertiære strukturer i proteinet, som for eksempel disulfid bånd, og vil gi denaturerte polypeptidkjeder som tillater separering av proteinene med hensyn til molekylvekt. Deretter overføres proteinene til en membran, en metode kalt blotting, før de uspesifikke bindingene blokkeres med blokkebuffer. Primærantistoff tilsettes og binder til det spesifikke proteinet man ønsker å analysere. Tilførsel av sekundærantistoff med et fluorescensmiddel binder til primærantistoffet og gjør at man ved analyse kan detektere det spesifikke proteinet på membranen.

Til forsøkene ble polyakrylamidgel (NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) med 1mm ganger 10 brønne benyttet. Tjuefem mikroliter proteinlysate ble påført per brønn. Som ladder ble det brukt 1 µl Magic-Marker (Invitrogen) og 4 µl SeeBlue Plus2 Prestained Standard (1x) (Invitrogen). Gelene ble kjørt i 40 minutter på 200 volt i NuPAGE MES SDS Running buffer (Invitrogen) for deretter å bli blottet over på en nitrocellulosemembran (Odyssey Nitrocellulose Membrane, Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE) ved 20 volt i 2 timer (for blottebuffer se tabell 9).

Membranen fikk ligge i 5-10 ml blokkebuffer (Blocking Buffer, Odyssey Li-Cor Bioscience), i 1 time ved romtemperatur. Membranen ble så lagt i 5 ml blokkebuffer tilsatt primærantistoff (Polyclonal Rabbit Anti-Human S100A4, DAKO, Glostrup, Danmark) i forholdet 1:250 og 5 μ l Tween® 20 Detergent (Calbiochem, USA), og inkubert over natten på kjølerom ved stadig rotasjon.

Neste dag ble membranen vasket 4 ganger 5 minutt med TBS (se tabell 9) før 1,5 μ l sekundærantistoff (Donkey anti-rabbit IRDye 800CW, Odyssey Li-Cor Bioscience) i 15 ml TBS ble tilsatt membranen og fikk virke i 45 minutter ved svak rotasjon. Deretter ble membranen igjen vasket 4 ganger 5 minutt med TBS. Membranen ble analysert med Odyssey Sa Infrared Imaging System, og tilhørende PC-program Odyssey Sa Software.

Loading kontroll ble utført med aktin. Membranen ble lagt i 5 μ l aktin antistoff (Anti-Actin Antibody Produced in rabbit, Sigma-Aldrich), 5 μ l Tween® 20 Detergent og 5 ml blokkebuffer, og fikk stå på svak rotasjon i 1 time ved romtemperatur. Deretter ble membranen vasket 4 ganger 5 minutt med TBS, før 1,5 μ l sekundært antistoff (Alexa Fluor 680 Goat anti-rabbit IgG2 mg/ml, Invitrogen, Eugene, OR) og 15 ml TBS ble tilsatt og membranen fikk stå i 45 minutter ved svak rotasjon. Til slutt ble membranen igjen vasket 4 ganger 5 minutt med TBS før analyse.

2.7 Forsøk med rekombinant S100A4 (rS100A4)

Ved å tilføre rekombinant S100A4 (rS100A4) til cellenes vekstmedium ønsket vi å studere effekten av ekstracellulært S100A4 på de samme målgenene som ved knockdown-forsøkene. Forskningsgruppen har tidligere fått rS100A4 protein fra Gunhild Mælandsmos gruppe ved Avdeling for tumorbiologi, Oslo Universitetssykehus. Til forsøkene i oppgaven ble rS100A4 imidlertid forsøkt syntetisert og rensset ved Institutt for Farmasi (IFA)/Norstruct. Til produksjonen ble det brukt en vektor laget i Mælandsmos forskningsgruppe. *E.coli*-celler ble transfektert med vektoren pQE-30 (Qiagen), som inneholdt sekvensen for humant S100A4, og påfølgende fikk vi syntese av et histidin-merket S100A4 protein. Cellene ble lysert, og proteinet ble rensset ved bruk av en HIS-tag affinitetskolonne (HisTrap, HP, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ), og deretter separert med hensyn til størrelse med size exclusion kromatografi (SEC) (Superdex 200 16/60, GE Healthcare Life Science), og eluert i PBS buffer (Sigma-Aldrich). For å kontrollere størrelsen av proteinet ble det kjørt gelelektroforese (NuPage 4-12 %, Invitrogen) som bekreftet tilstedeværelse av et protein med riktig størrelse. Innledende forsøk med rS100A4 viste imidlertid at proteinet ikke var aktivt, da vi ikke kunne observere effekt på MMP-9 mRNA-nivå som var observert ved bruk av tidligere batcher av proteinet fra Oslo. Proteinets rensset ved IFA ble også sendt til Mælandsmos gruppe i Oslo hvor det ble testet i et NF- κ B aktivitetssassay. Dette er en metode som kan måle aktivitet av S100A4, da S100A4 aktiverer transkripsjonsfaktoren NF- κ B, men heller ikke der fant de aktivitet av proteinet. På grunn av tidsbegrensninger ble det til forsøk med rS100A4 derfor benyttet mRNA som fra før var blitt høstet ved tre ulike anledninger fra celler stimulert med rS100A4 rensset i Oslo. mRNA var høstet fra de to knockdowncellelinjene, UT-SCC-14/S100A4-II og UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter tilsetning av henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 μ g/ml rS100A4 til cellenes vekstmedium. På samme måte som beskrevet ovenfor var mRNA rensset med RNeasy Plus Kit (Qiagen), og målgenene ble kvantifisert ved hjelp av RT-qPCR.

2.8 Materialer

Tabell 5: Materiale brukt til celledyrking.

Materiale	Produsent
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Non-Essensial Aminoacids	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Føtalt bovint serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Tyskland
Puromycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
0,25 % Trypsin	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO

Tabell 6: Separerende gel og konsentrerende gel til substrat zymografi.

Separerende gel (til 2 geler)	
1,5 M Tris(base) pH 8,8 m/SDS	2500 µl
Gelatin 2 %	500 µl
MQ-vann	4650 µl
Akrylamid/Bis 40 %	2250 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	75 µl
TEMED	8 µl
Konsentrerende gel (til 2 geler)	
0,5 M Tris(base) pH 6,8 m/SDS	750 µl
MQ-vann	1850 µl
Akrylamid/Bis 40 %	380 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	15 µl
TEMED	3 µl

Tabell 7: Løsninger og buffere brukt til substrat zymografi.

Løsninger og buffere	Sammensetning
Fryseløsning (0,1 M CaCl ₂ i 1 M Hepes)	0,147 g CaCl ₂ x 2H ₂ O 10 ml 1M HEPES
1M HEPES (pH 7,5)	23,831 g Hepes pH justeres til 7,5 med 5M NaOH ad dH ₂ O til 100 ml
Elektroforesebuffer x10 (pH 8,3)	30 g Tris(base) 144g glycine 10 g SDS 800 ml dH ₂ O pH justeres til 8,3 med 18,5 % HCl ad dH ₂ O til 1000 ml
Vaskebuffer	20 ml Triton 780 ml Basisbuffer x1
Basisbuffer x10	60,4 g Tris(base) 800-900 ml dH ₂ O 7,4 g CaCl ₂ x 2 dH ₂ O 1,0 ml ZnCl ₂ pH justeres til 7,5 med 18,5 % HCl ad dH ₂ O til 1000 ml
Assaybuffer x10	12,1 g Tris(base) 63 g Tris HCl 117 g NaCl 9,8 g CaCl ₂ x2H ₂ O 6,7 ml Brij35 30 % ad dH ₂ O til 1000 ml
Comassive blue	0,8 g (2,4 g) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich) 160 ml (480 ml) dH ₂ O 240 ml (720 ml) metanol
Avfargingsvæske	240 ml metanol 80 ml 20 % eddiksyre 480 ml dH ₂ O

Tabell 8: Materiale brukt til Western blot.

Materiale	Produsent
NuPage LDS Sample buffer x4	Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY
DTT	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gel 1,0 mm x10 well	Invitrogen, Carlsbad, CA
MagicMark XP Western Protein Standard (20-220 kDa)	Invitrogen, Carlsbad, CA
SeeBlue Plus2 Prestained Standard (1x)	Invitrogen, Carlsbad, CA
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Odyssey Nitrocellulose Membrane	Odyssey Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE
Blocking Buffer	Odyssey Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE
Polyclonal Rabbit Anti-Human S100A4	DAKO, Glostrup, Danmark
Tween 29 Detergent	Merck, Darmstadt, Tyskland
Donkey Anti-Rabbit IRDye 800CW	Odyssey Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE
Anti-Actin Antibody Produced in rabbit	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Alexa Fluor 680 Goat Anti-Rabbit IgG 2 mg/ml	Invitrogen, Eugene, OR

Tabell 9: Buffere brukt til Western blot.

Buffer	Sammensetning
Blottebuffer	29 g Trisbase 144 g Glycin 1 L Metanol ad dH ₂ O til 5 L
TBS x10	10 g KCl 400 g NaCl 200 ml TrisCl 1 M pH 7,5 ad dH ₂ O til 5 L

3. Resultater

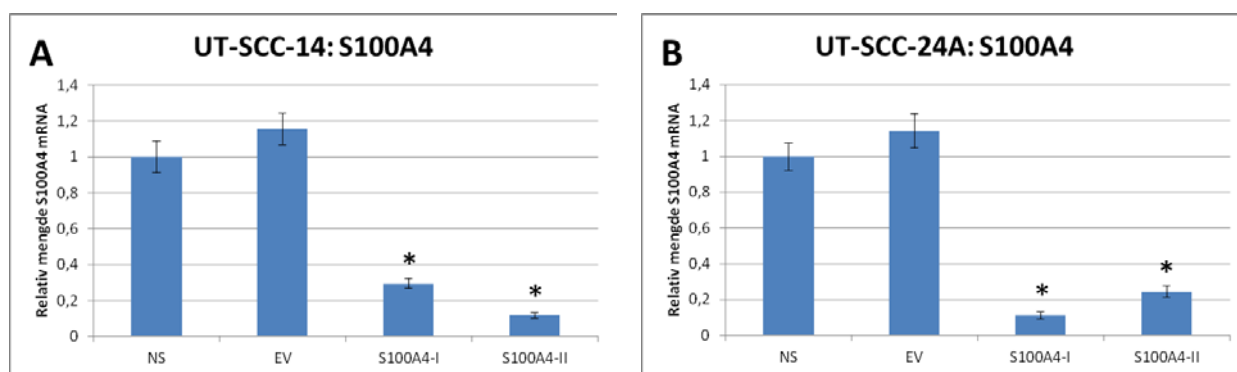
S100A4 er et protein som er funnet å være oppregulert i en rekke tumorvev og økt uttrykk er forbundet med invasjon og metastase og dårligere prognose for kreftpasienter [53]. Proteinet har selv ingen enzymatisk aktivitet, men utøver sin effekt ved å regulere og interagere med andre målproteiner. Mekanismene for proteinets metastasefremmende effekt er derimot dårlig kartlagte.

I Forskningsgruppen i farmakologi er det tidligere ved hjelp av shRNA etablert orale plateepitelcellelinjer med redusert uttrykk av S100A4 for å kunne studere ulike effekter av proteinet i oralkreft. To ulike cellelinjer etablert fra pasienter med tungekreft, UT-SCC-14 og UT-SCC-24A, er transfektert med to ulike shRNA konstrukt mot S100A4 (S100A4-I eller S100A4-II), et non-silencing shRNA konstrukt (NS) eller en tom vektor (EV). Disse cellelinjene ble benyttet i oppgaven for å studere endogene og ekstracellulære effekter av S100A4 på ulike målgene forbundet med invasjon og metastase.

3.1 Verifisering av S100A4 knockdown

Før vi kunne analysere effekter på andre målgen, måtte vi først verifisere nedregulering av S100A4 i cellelinjene transfektert med shRNA konstrukt mot S100A4, på mRNA-nivå med RT-qPCR og på proteinnivå med Western blot.

Verifisering av S100A4 knockdown på mRNA-nivå



Figur 9: Relativ mengde S100A4 mRNA i cellelinjer etablert fra (A) UT-SCC-14 og (B) UT-SCC-24A. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4. * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykket i NS kontroll.

Resultatene presentert i figur 9 viser signifikant nedregulering av S100A4 mRNA-nivå i knockdowncellelinjene S100A4-I og S100A4-II, både for UT-SCC-14 og UT-SCC-24A når sammenlignet med NS kontroll. For UT-SCC-14 er nedreguleringen på henholdsvis 71 % ($P < 0,01$) og 88 % ($P < 0,01$) for S100A4-I og S100A4-II. For UT-SCC-24A er det en signifikant nedregulering av S100A4 mRNA-nivå på henholdsvis 89 % ($P < 0,01$) og 76 % ($P < 0,01$) for S100A4-I og S100A4-II.

Verifisering av S100A4 knockdown på proteinnivå

Ved å analysere proteinlysat fra cellelinjene med Western blot ønsket vi å undersøke om S100A4 også var nedregulert på proteinnivå.



Figur 10: Representativt Western blot som viser S100A4 proteinnivå i knockdowncellelinjene versus kontrollcellelinjene. 1: UT-SCC-24A/S100A4-IA, 2: UT-SCC-24A/S100A4-IIA, 3: UT-SCC-24A/NS og 4: UT-SCC-24A/EV. Loading kontroll utføres med aktin (42 kDa).

Western blottet i figur 10 viser at S100A4-båndet ved 11,5 kDa er mye svakere i knockdowncellelinjene sammenlignet med kontrollcellelinjene og verifiserer nedregulering av S100A4 også på proteinnivå. Det ble kjørt tre Western-blot av proteinlysat høstet ved tre ulike tidspunkt, og analyse av membranene viste gjennomgående det samme. Loading kontroll ble utført med aktin (42 kDa), og bekrefter lik mengde påført proteinlysat for de fire cellelinjene.

Det ble også kjørt tre arkylamidgeler med proteinlysat fra UT-SCC-14 cellelinjene, men ved analyse av Western blot-membranene kunne vi ikke detektere bånd for S100A4 i noen av cellelinjene, selv med økt mengde proteinlysat påført gelen (data ikke vist). Manglende bånd for S100A4 kan tyde på at Western blot-metoden ikke er sensitiv nok til å kunne detektere proteinet i disse cellelinjene og indikerer et lavt proteinnivå av S100A4 i UT-SCC-14.

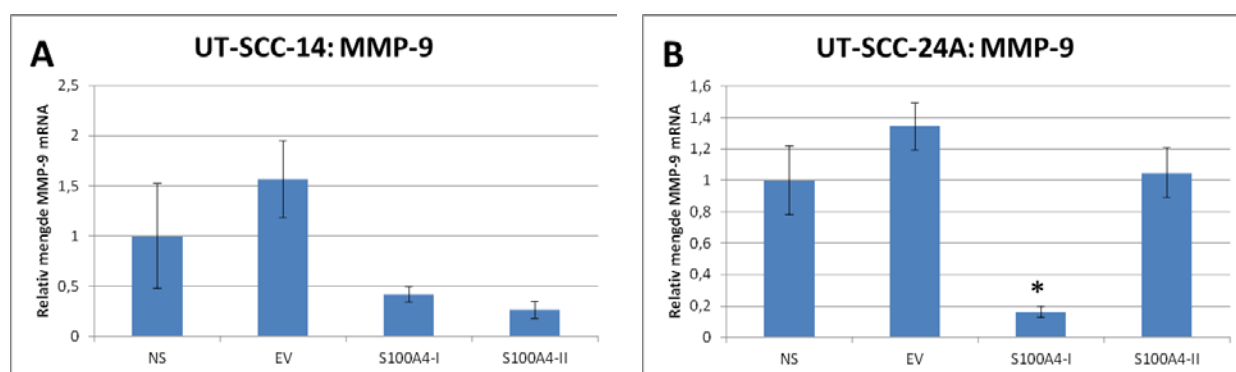
3.2 Effekter av S100A4 knockdown på ulike målgen forbundet med invasjon og metastase

En av de metastasefremmende effektene som er identifisert for S100A4 er dets evne til å påvirke uttrykket av ulike proteaser involvert i remodulering av ekstracellulær matriks. Cellelinjene med manipulert S100A4-uttrykk ble i denne første delen av oppgaven benyttet for å kartlegge endogene effekter av proteinet på uttrykk av en rekke ulike matriks metalloproteinaser, deres endogene hemmere TIMP-1 og TIMP-2, uPA og uPAR, og adhesjonsmolekylet E-cadherin i to orale plateepitelkarsinomcellelinjer. RT-qPCR ble brukt for å kvantifisere mRNA-nivået av de ulike målgenene, og eventuelle funn på mRNA-nivå ble forsøkt verifisert på proteinnivå.

3.2.1 Effekt av S100A4 knockdown på MMP-9 uttrykk

De to gelatinasene MMP-2 og MMP-9 har særlig fått mye oppmerksomhet på grunn av korrelasjon mellom økt uttrykk og tumorprogresjon i en rekke kreftformer [26]. Foruten å være viktig bidragsyter i nedbrytningen av ECM og basalmembranen er MMP-9 også identifisert å være involvert i en rekke ulike prosesser som bidrar til tumorprogresjon, blant annet regulering av angiogenesen [70], en prosess som er helt essensiell for at en tumor skal kunne vokse og forsynes av næring og oksygen.

Resultat for MMP-9 på mRNA-nivå

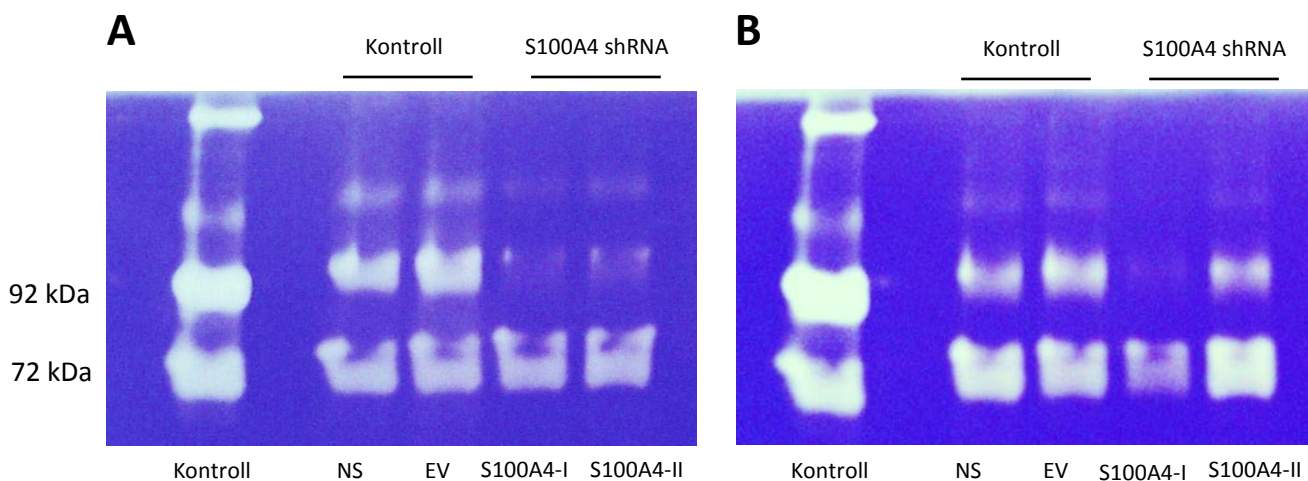


Figur 11: Relativ mengde MMP-9 mRNA i cellelinjer etablert fra (A) UT-SCC-14 og (B) UT-SCC-24A. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4. * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykket i NS kontroll.

Som figur 11 viser ser MMP-9 mRNA-nivået ut til å påvirkes av S100A4-uttrykket i cellene. Nedregulering av S100A4 fører til at MMP-9 mRNA-nivået ble mer enn halvert i UT-SCC-14, hvor det er henholdsvis 58 og 73 % redusert MMP-9 mRNA-nivå for S100A4-I og S100A4-II, sammenlignet med NS kontroll. Det er liten tvil om at nivået er lavere i knockdowncellelinjene, men på grunn av stort standardavvik for NS kontroll er nedreguleringen i UT-SCC-14 ikke statistisk signifikant. For UT-SCC-24A observerer vi bare redusert MMP-9 mRNA-nivå i knockdowncellelinjen S100A4-I, som har 84 % statistisk signifikant redusert mRNA-nivå sammenlignet med NS kontroll ($P < 0,05$), mens S100A4-II faktisk har litt økt mRNA-nivå sammenlignet med kontrollcellelinjen NS.

Resultat for MMP-9 på proteinnivå

Vi ønsket videre å undersøke proteinnivået av MMP-9 i cellene ved hjelp av gelatin zymografi.



Figur 12: Representative gelatin zymografi-geler som viser gelatinolytisk aktivitet i kondisjonert medium fra cellelinjer etablert fra (A) UT-SCC-14 og (B) UT-SCC-24A. MMP-2 (72 kDa) og MMP-9 (92 kDa). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4. Kontroll: Delvis rensset blanding av pro-MMP-9 monomer (92kDa) og homodimer (225 kDa) fra kondisjonert medium fra THP-1 celler, og pro-MMP-2 (72 kDa) fra kondisjonert medium fra humane fibroblaster fra hud.

Resultatene representert i figur 12A viser at MMP-9 båndet (92 kDa) på gelen nesten var helt fraværende i knockdowncellelinjene for UT-SCC-14, altså har vi nesten ingen enzymaktivitet av MMP-9 i det kondisjonerte mediet høstet fra disse cellelinjene. I zymografigelene fra UT-SCC-24A, en av dem gjengitt her i figur 12B, observerer vi bare et veldig svakt bånd for

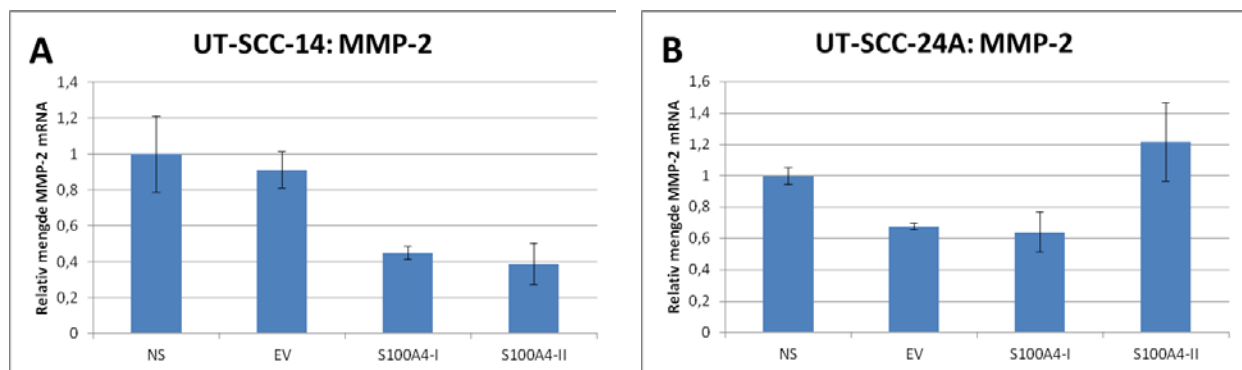
MMP-9 i knockdowncellelinjen S100A4-I, mens S100A4-II synes å ha mer tilstedeværelse av MMP-9 enzymaktivitet, noe som også samsvarer med funnene på mRNA-nivå.

På gelen kan det også ses et proteolytisk bånd med en molekylvekt som er noe høyere enn 92 kDa, hvor også dette båndet synes å være svakere i knockdowncellelinjene enn kontrollcellelinjene. Dessuten ser vi at det kondisjonerte mediet fra alle cellelinjene synes å ha en litt høyere molekylvekt av MMP-9 sammenlignet med kontroll.

3.2.2 Effekt av S100A4 knockdown på MMP-2 uttrykk

De to gelatinasene, MMP-2 og -9, har begge type-IV kollagen som et viktig substrat, en kollagentype som utgjør en stor bestanddel av både ECM og basalmembranen. Mye fokus har derfor blitt rettet mot disse MMPene på grunn av antagelser om at de bidrar til invasjon og metastase, men MMP-2 er også forbundet med en rekke andre mekanismer som kan fremme tumorprogresjon [26, 29]. På bakgrunn av dette syntes vi det var interessant å undersøke effekten av S100A4 på MMP-2 i våre orale plateepitelkarsinomcellelinjer.

Resultat for MMP-2 på mRNA-nivå



Figur 13: Relativ mengde MMP-2 mRNA i cellelinjer etablert fra (A) UT-SCC-14 og (B) UT-SCC-24A. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4.

Resultatene viser at S100A4 synes å påvirke uttrykket av MMP-2 i UT-SCC-14, hvor knockdowncellelinjene S100A4-I og -II har henholdsvis 55 og 61 % lavere MMP-2 mRNA-nivå enn NS kontroll, men dog ikke signifikant reduksjon (S100A4-I: $P = 0,10$, S100A4-II: $P = 0,41$). Vi observerer derimot ikke den samme nedreguleringen i knockdowncellelinjene fra

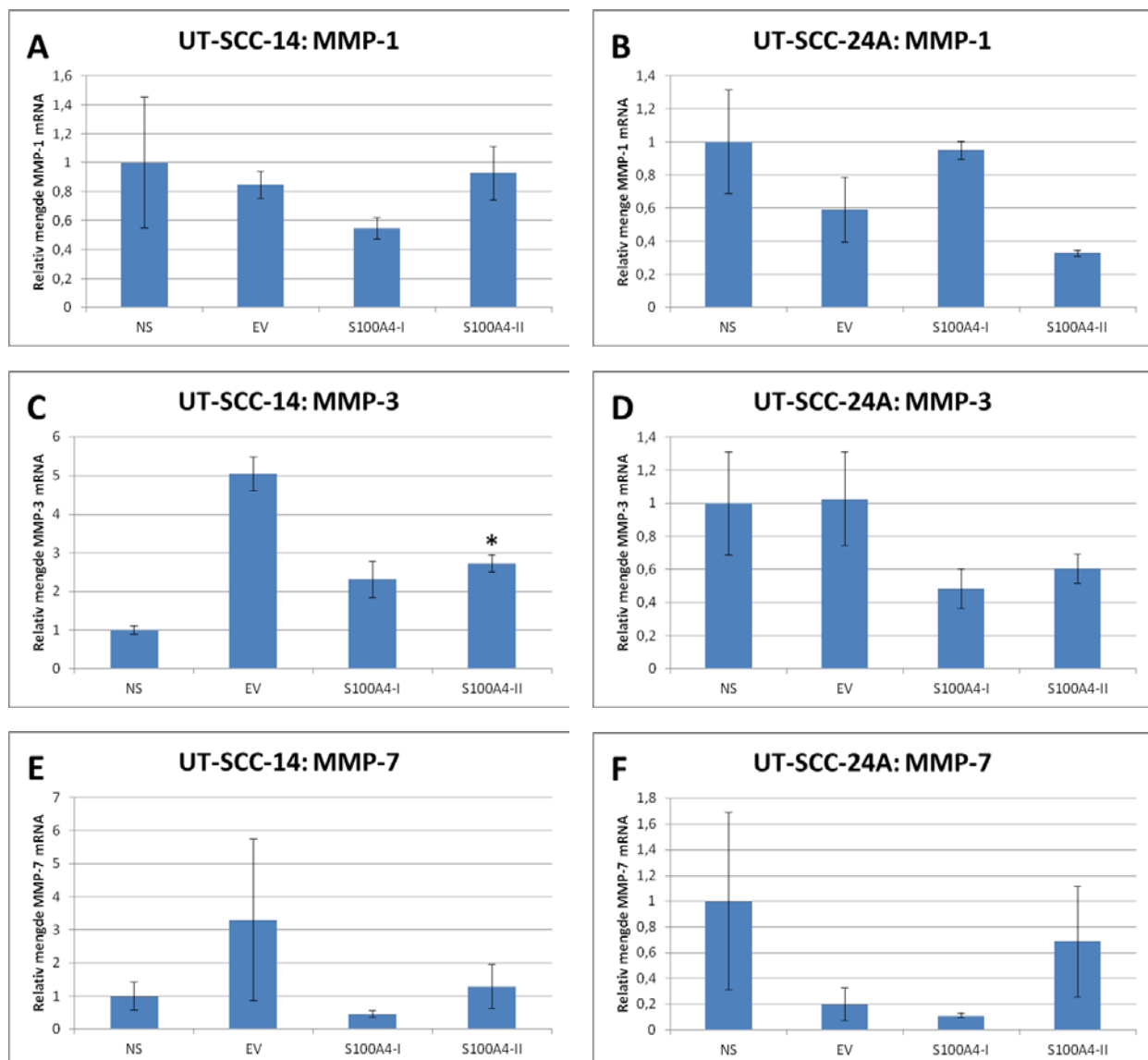
UT-SCC-24A, hvor S100A4-I synes å ha omtrent samme mRNA-nivå som EV kontroll, og hvor S100A4-II har høyere mRNA-nivå enn både EV og NS kontroll.

Resultat for MMP-2 på proteinnivå

På bakgrunn av resultatene på mRNA-nivå ønsket vi også å undersøke effekten av redusert S100A4-uttrykk på proteinnivå av MMP-2 ved bruk av gelatin zymografi. Som vist i figur 12A (se ovenfor) kan vi ikke detektere svakere bånd for MMP-2 (72 kDa) på zymografi-gelen i knockdowncellelinjene for UT-SCC-14, og dette samsvarer således ikke med funnene på mRNA-nivå. For UT-SCC24A (Fig. 12B) synes det derimot å være litt redusert MMP-2 aktivitet i kondisjonert medium fra S100A4-I, men den samme effekten synes ikke å være tilfelle for S100A4-II. Observasjonene fra UT-SCC-24A stemmer således med funnene på mRNA-nivå for MMP-2.

3.2.3 Effekt av S100A4 knockdown på MMP-1, MMP-3 og MMP-7 uttrykk

Vi ønsket også å undersøke effekter av S100A4 på et utvalg andre MMPer forbundet med tumorprogresjon. MMP-1, -3 og -7 er alle forbundet med frigjøring og aktivering av vekstfaktorer som blant annet stimulerer angiogenese og tumorvekst [71], mens MMP-3 og -7 også bidrar til å forstyrre adhesjon og kommunikasjon mellom celler [72]. MMPenes evne til å degradere komponenter av ECM og interagere med adhesjonsmolekyler utnyttes av tumorcellene for å fremme invasjon og metastase.

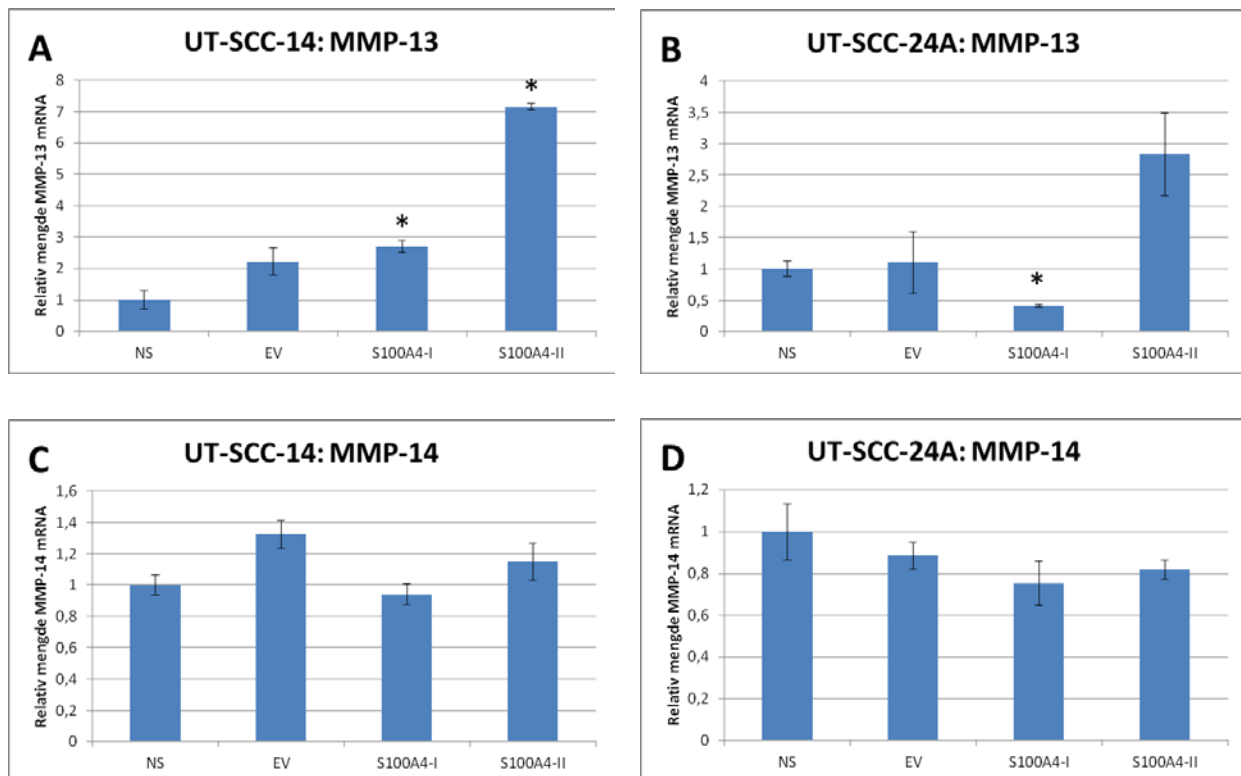


Figur 14: Relativ mengde MMP-1, MMP-3 og MMP-7 mRNA i celler etablert fra (A, C og E) UT-SCC-14 og (B, D og F) UT-SCC-24A. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4. * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykket i NS kontroll.

Kvantifisering av MMP-1 mRNA ved bruk av RT-qPCR viser at nivået varierer mellom cellelinjene, men det ser ikke ut til å være noen sammenheng mellom S100A4-nivå og MMP-1 nivå, hverken for UT-SCC-14 eller UT-SCC-24A (Fig. 14A og B). Analysene av MMP-3 og MMP-7 ga for både UT-SCC-14 og UT-SCC-24A gjennomgående høye Ct-verdier på RT-qPCR, noe som indikerer lave mRNA-nivå. Generelt anses Ct-verdier over 35 for å representere mRNA-nivå som er for lave til pålitelig å kunne kvantifiseres. Målingene for MMP-3 og MMP-7 ga Ct-verdier rett oppunder 35. Det var i tillegg sprikende resultater mellom parallellene, og vi konkluderer med at uttrykket av MMP-3 og MMP-7 i cellelinjene er for lavt til å pålitelig kunne kvantifiseres ved hjelp av RT-qPCR.

3.2.4 Effekt av S100A4 knockdown på MMP-13 og MMP-14 uttrykk

Både MMP-13 og MMP-14 er involvert i degradering av ECM [29], men MMP-14 har en dobbel rolle i nedbrytningen av ECM ved både å aktivere proMMP-2 og direkte kløyve substrater som kollagen I, II og III [73]. MMP-14 er identifisert som et nøkkelenzym i tumorcelle invasjon, og er funnet å være posisjonert ved invadopodia, en fremposing i cellemembranen med spesialisert evne til å bryte ned ECM [74].

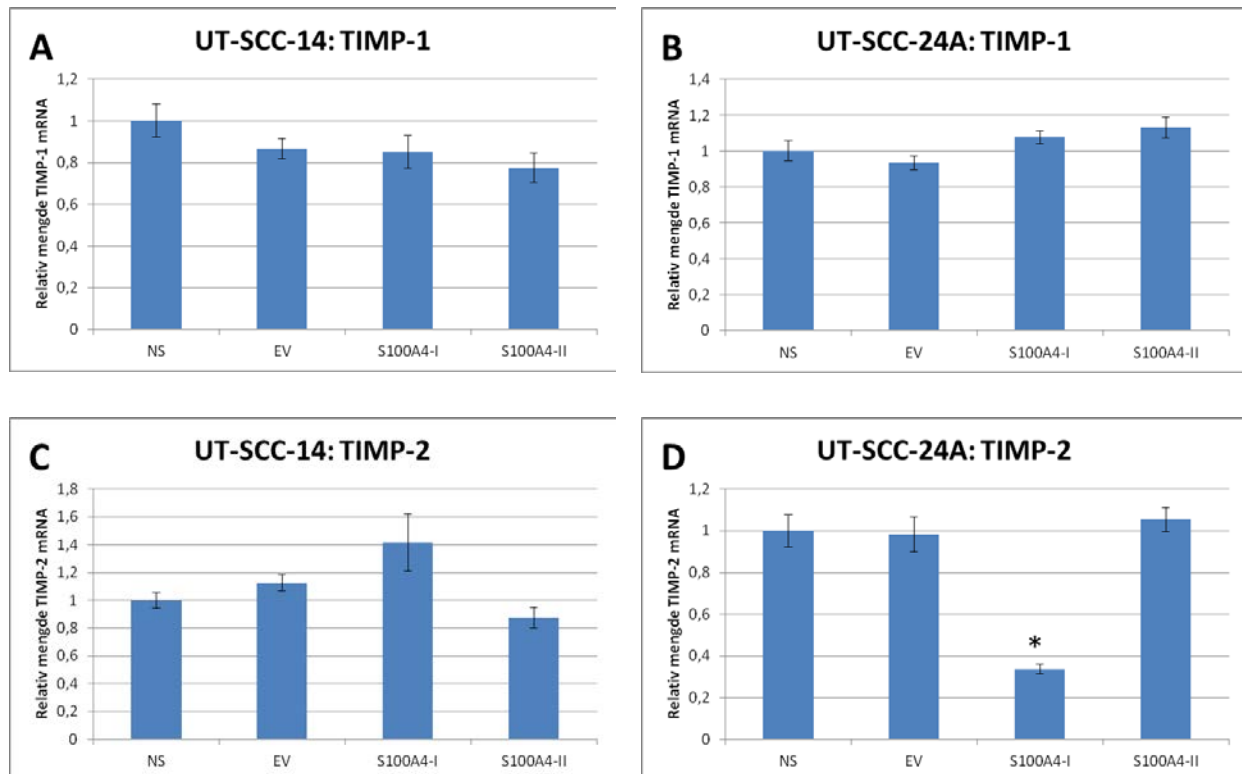


Figur 15: Relativ mengde MMP-13 og MMP-14 mRNA i cellelinjer etablert fra (A og C) UT-SCC-14 og (B og D) UT-SCC-24A. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4. * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykket i NS kontroll.

Som figur 15A viser synes mRNA-nivået for MMP-13 å stige i UT-SCC-14, men på grunn av svært høye Ct-målinger (> 35), konkluderer vi med at nivået også her er for lavt til å kunne kvantifiseres pålitelig. For UT-SCC-24A observerer vi signifikant redusert MMP-13 mRNA-nivå i den ene knockdowncellelinjen, mens uttrykket derimot er økt i den andre knockdowncellelinjen, og vi kan derfor ikke konkludere med hvilken effekt S100A4 synes å ha på uttrykket av MMP-13 i disse cellelinjene. Uttrykket av MMP-14 synes ikke å påvirkes i nevneverdig grad av S100A4-nivå, hverken for UT-SCC-14 eller UT-SCC-24A.

3.2.5 Effekt av S100A4 knockdown på TIMP-1 og TIMP-2 uttrykk

Vevs inhibitor av metalloproteinaser (TIMP) er de viktigste inhibitorene av MMPer, og det synes derfor naturlig at også de vil kunne påvirkes av et metastasefremmende protein som S100A4.

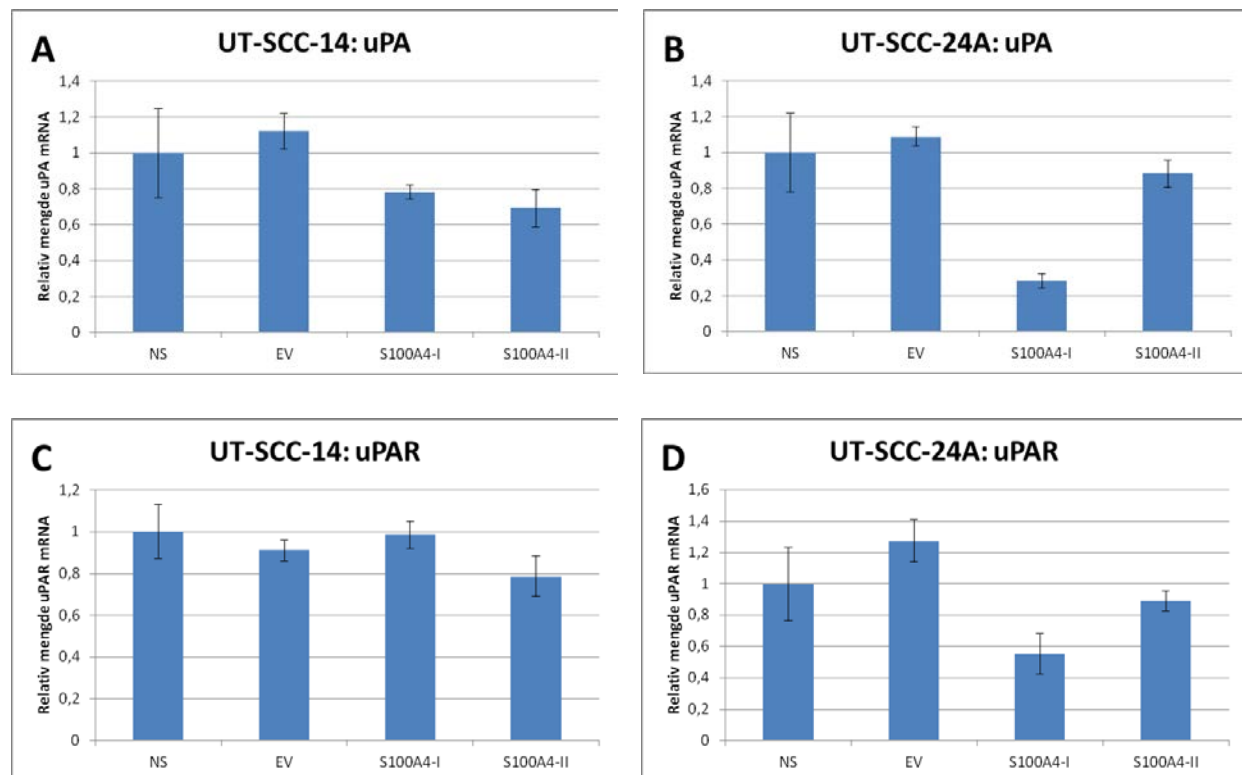


Figur 16: Relativ mengde TIMP-1 og TIMP-2 mRNA i cellelinjer etablert fra (A og C) UT-SCC-14 og (B og D) UT-SCC-24A. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4. * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykket i NS kontroll.

Figur 16 viser at det foruten observasjonen av signifikant redusert TIMP-2 mRNA-nivå i UT-SCC-24A/S100A4-I ($P < 0,001$), ikke ser ut til at S100A4 knockdown påvirker uttrykket av TIMP-1 eller TIMP-2 i cellelinjene UT-SCC-14 og UT-SCC-24A.

3.2.6 Effekt av S100A4 knockdown på uPA og uPAR uttrykk

Sammen med MMPer er serine proteinaser av urokinase plasminogen aktivator (uPA) systemet blant de viktigste enzymene som bidrar til nedbrytning og remodulering av ekstracellulær matriks. Siden det i litteraturen helt klart synes å være en effekt av S100A4 på MMPer ønsket vi også å undersøke om vi kunne observere samme effekten på komponenter av uPA systemet.



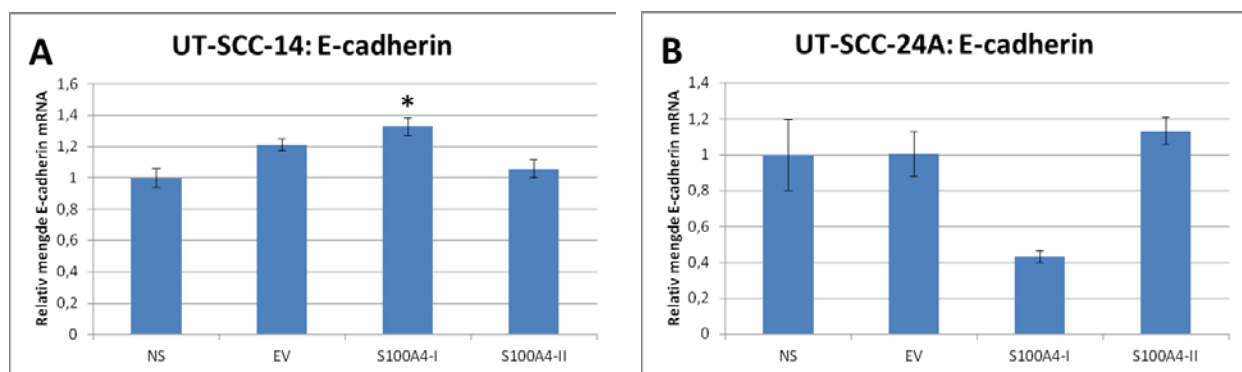
Figur 17: Relativ mengde uPA og uPAR mRNA i celler etablert fra (A og C) UT-SCC-14 og (B og D) UT-SCC-24A. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4.

Som figur 17A og B viser er det en tendens til noe lavere mRNA-nivå av uPA i knockdowncellerlinjene, både for UT-SCC-14 og UT-SCC-24A når sammenliknet med kontrollcellerlinjer. I UT-SCC-14 er det for uPA henholdsvis 22 og 31 % lavere mRNA-nivå for S100A4-I og S100A4-II, men nedreguleringen er ikke statistisk signifikante når sammenliknet med NS kontroll. I den ene knockdowncellerlinjen for UT-SCC-24A er det hele 72 % lavere mRNA-nivå av uPA når sammenliknet med NS kontroll, men $P > 0,05$. Det kan også se ut til en antydning av lavere uPAR mRNA-nivå i UT-SCC-24A, hvor det for S100A4-I er 45 % lavere mRNA-nivå sammenliknet med NS kontroll. Resultatene fra UT-SCC-14

samsvarer derimot ikke med observasjonene fra UT-SCC-24A, hvor uPAR uttrykket synes å være upåvirket av nedregulert S100A4-uttrykk.

3.2.7 Effekt av S100A4 knockdown på E-cadherin uttrykk

I utviklingen av en malign tumor er tap av E-cadherin, et celle-celle adhesjonsmolekyl, vist å ha en viktig rolle for tumorcellens evne til å kunne migrere og invadere nærliggende vev [41]. Med bakgrunn i dette, og det faktum at oralkreft er karakterisert av svært høy forekomst av metastaser, ønsket vi også å inkludere E-cadherin i våre analyser av S100A4 knockdown.



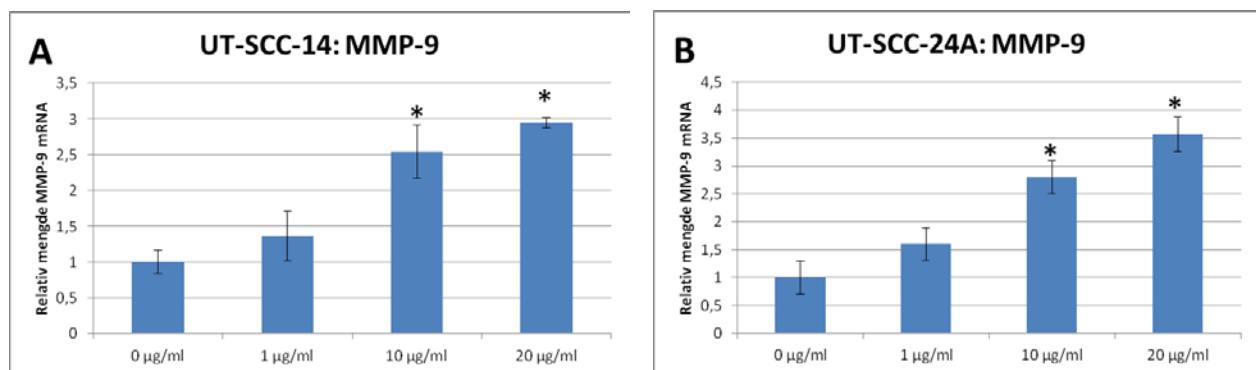
Figur 18: Relativ mengde E-cadherin mRNA i cellelinjer etablert fra (A) UT-SCC-14 og (B) UT-SCC-24A. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). NS: non-silencing kontroll, EV: tom vektor kontroll, S100A4-I og S100A4-II: celler transfektert med henholdsvis shRNA-konstrukt I eller II mot S100A4. * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykket i NS kontroll.

Figur 18 viser resultatene fra kvantifisering av E-cadherin mRNA i cellelinjene. For UT-SCC-14 er det en liten, men signifikant økning i mRNA-nivå i knockdowncellelinjen S100A4-I sammenlignet med NS kontroll (S100A4-I: $P = 0,02$). Vi har imidlertid to kontroller, og om vi sammenligner med EV kontroll er økningen ikke statistisk signifikant ($P = 0,16$). Dessuten ses det i samme knockdowncellelinje for UT-SCC-24A en reduksjon i mRNA-nivå på 57 %, dog ikke signifikant (S100A4: $P = 0,09$). Disse motstridende observasjonene fra samme cellelinje gjør at vi ikke kan si noe om hvilken effekt S100A4 knockdown synes å ha på E-cadherin i våre cellelinjer fra kreft i tunge.

3.3 Celler stimulert med rekombinant S100A4 protein: Effekter på ulike målgen forbundet med invasjon og metastase

S100A4 skilles via en ukjent mekanisme ut til det ekstracellulære rom både av tumorceller og flere andre celletyper, og er vist å regulere og interagere med en rekke ekstracellulære målprotein, hvorav flere av dem er kjent å ha ulike roller i tumorprogresjon [57]. Vi ønsket derfor også å undersøke ekstracellulære effekter av proteinet på de samme målgenene som analysert ovenfor. Til disse forsøkene skulle det benyttes rekombinant S100A4 (rS100A4) tilsatt vekstmediet for å stimulere cellene. Proteinet ble produsert i *E.coli* celler fra en vektor med sekvens for humant S100A4, og proteinet ble renset ved bruk av en affinitetskolonne og separert med hensyn til størrelse med size exclusion kromatografi. Gelelektroforese bekreftet tilstedeværelse av et protein av størrelsesorden ca. 12 kDa, men innledende forsøk med rS100A4 viste at proteinet ikke var aktivt, noe som også ble bekreftet av et NF- κ B aktivitetsassay. På grunn av tidsbegrensninger ble det derfor benyttet mRNA som tidligere var blitt høstet 24 timer etter stimulering med rS100A4 i ulike konsentrasjoner for knockdowncellelinjene UT-SCC-14/S100A4-II og UT-SCC-24A/S100A4-II (heretter bare referert til som UT-SCC-14 og UT-SCC-24A). mRNA-nivået for de ulike målgenene ble kvantifisert ved bruk av RT-qPCR.

3.3.1 Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-9 uttrykk



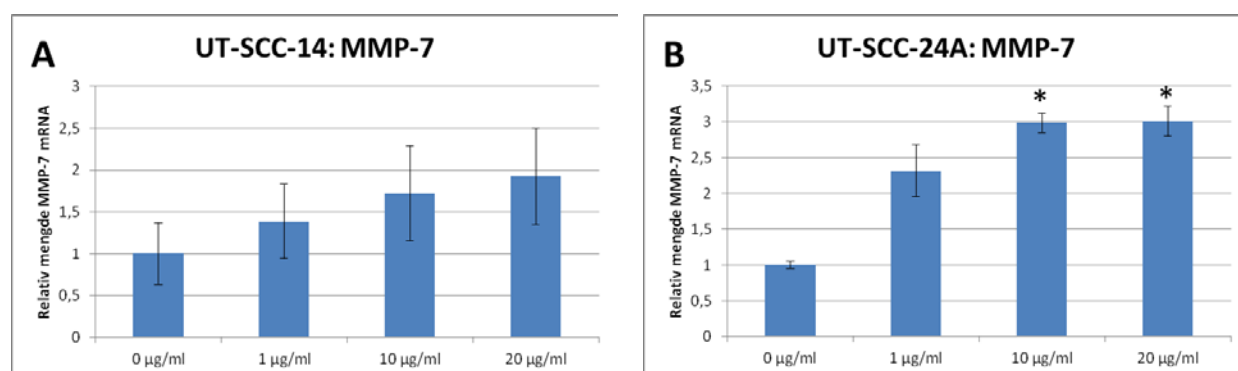
Figur 19: Relativ mengde MMP-9 mRNA i knockdowncellelinjen (A) UT-SCC-14/S100A4-II og (B) UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter stimulering med henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 µg/ml rS100A4 tilsatt vekstmediet. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykk i 0 µg/ml kontroll.

Figur 19 viser et klart dose-respons forhold av MMP-9 mRNA-nivå både i UT-SCC-14 og UT-SCC-24A, som følge av tilsatt rS100A4 i økende konsentrasjon til vekstmediet. Det ses en liten ikke-signifikant økning for 1 µg/ml, og en større signifikant økning for 10 og 20

$\mu\text{g/ml}$ rS100A4 i både UT-SCC-14 og UT-SCC-24A. mRNA-nivået dobles ikke som følge av doblet konsentrasjon fra 10 til 20 $\mu\text{g/ml}$, og effekten synes å flate ut her.

For UT-SCC-14 observerer vi en signifikant økning i mRNA-nivå ved tilsetning av 10 $\mu\text{g/ml}$ på 2,54 ganger sammenlignet med kontroll uten rS100A4 ($P = 0,04$), og ved doubling av konsentrasjonen til 20 $\mu\text{g/ml}$ øker mRNA-nivået med 2,94 ganger sammenlignet med kontroll ($P < 0,001$). Også i UT-SCC-24 er det signifikant økning ved både 10 og 20 $\mu\text{g/ml}$ rS100A4, på henholdsvis 2,80 og 3,75 ganger høyere mRNA-nivå sammenlignet med kontroll uten rS100A4 (10 $\mu\text{g/ml}$: $P = 0,01$ og 20 $\mu\text{g/ml}$: $P = 0,004$).

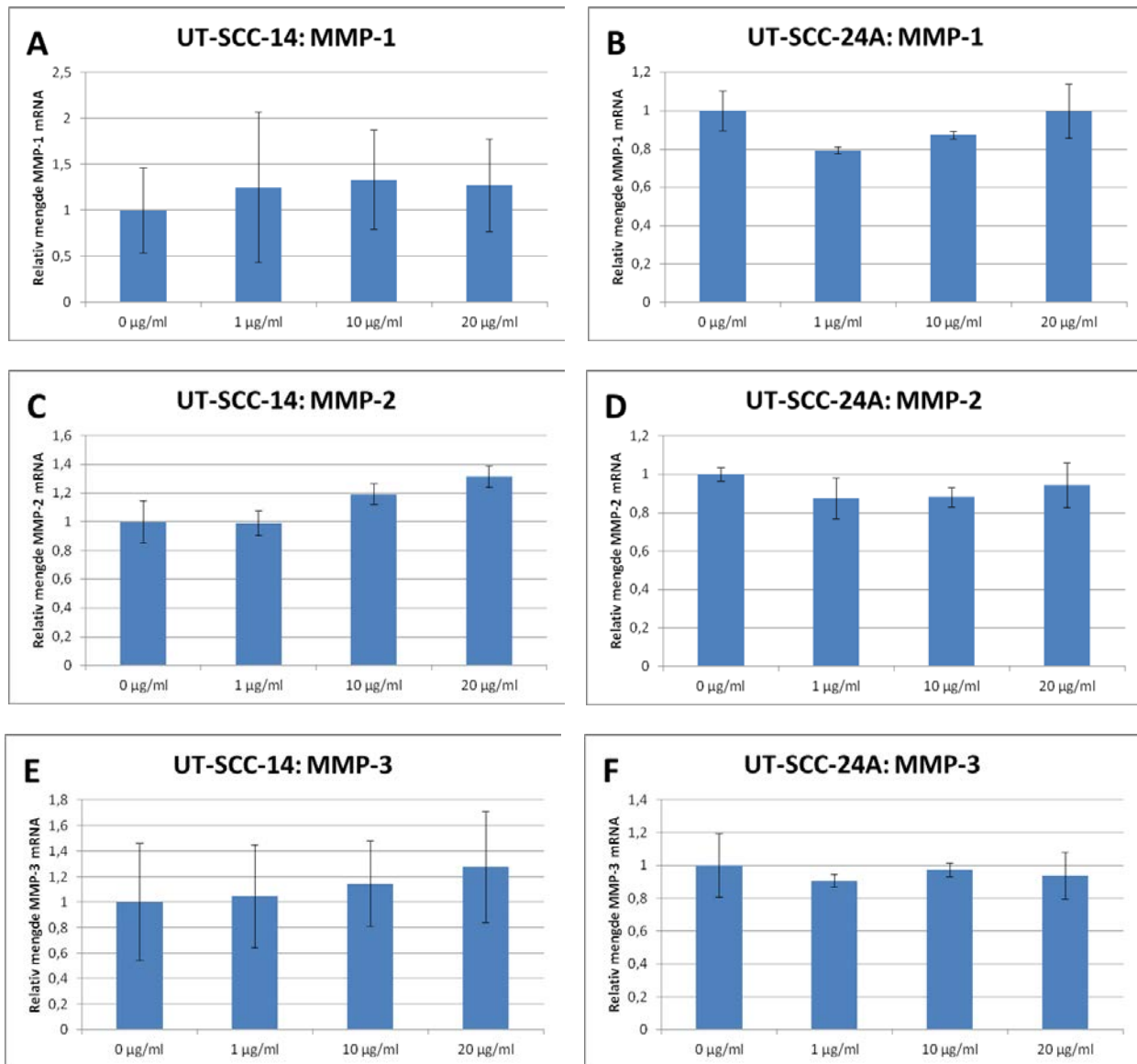
3.3.2 Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-7 uttrykk



Figur 20: Relativ mengde MMP-7 mRNA i knockdowncellelinjen (A) UT-SCC-14/S100A4-II og (B) UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter stimulering med henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 $\mu\text{g/ml}$ rS100A4 tilsatt vekstmediet. Gjennomsnitt \pm SEM (N=3). * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykk i 0 $\mu\text{g/ml}$ kontroll.

Det kan av figur 20 se ut til at også MMP-7 påvirkes av ekstracellulær tilstedeværelse av rS100A4 i begge cellelinjene, da det synes å være et dose-respons forhold mellom rS100A4 og MMP-7 mRNA-nivå. De store standardavvikene for målingene av UT-SCC-14 gjør det vanskelig å trekke noen slutninger og fører også til at vi her ikke får signifikante forskjeller, men det er tydelig en tendens til økt MMP-7 mRNA-nivå. For UT-SCC-24A ser vi at tilførsel av 1 $\mu\text{g/ml}$ rS100A4 øker mRNA-nivået av MMP-7 med 2,32 ganger sammenlignet med kontroll, men til forskjell fra 10 og 20 $\mu\text{g/ml}$ rS100A4 var denne økningen i mRNA-nivå ikke signifikant ($P = 0,06$). Ved 10 $\mu\text{g/ml}$ øker det relative mRNA-nivået med 2,98 ganger sammenlignet med kontroll ($P = 0,002$), og ved tilsetning av 20 $\mu\text{g/ml}$ rS100A4 ser vi en økning på 3,01 ganger ($P = 0,008$).

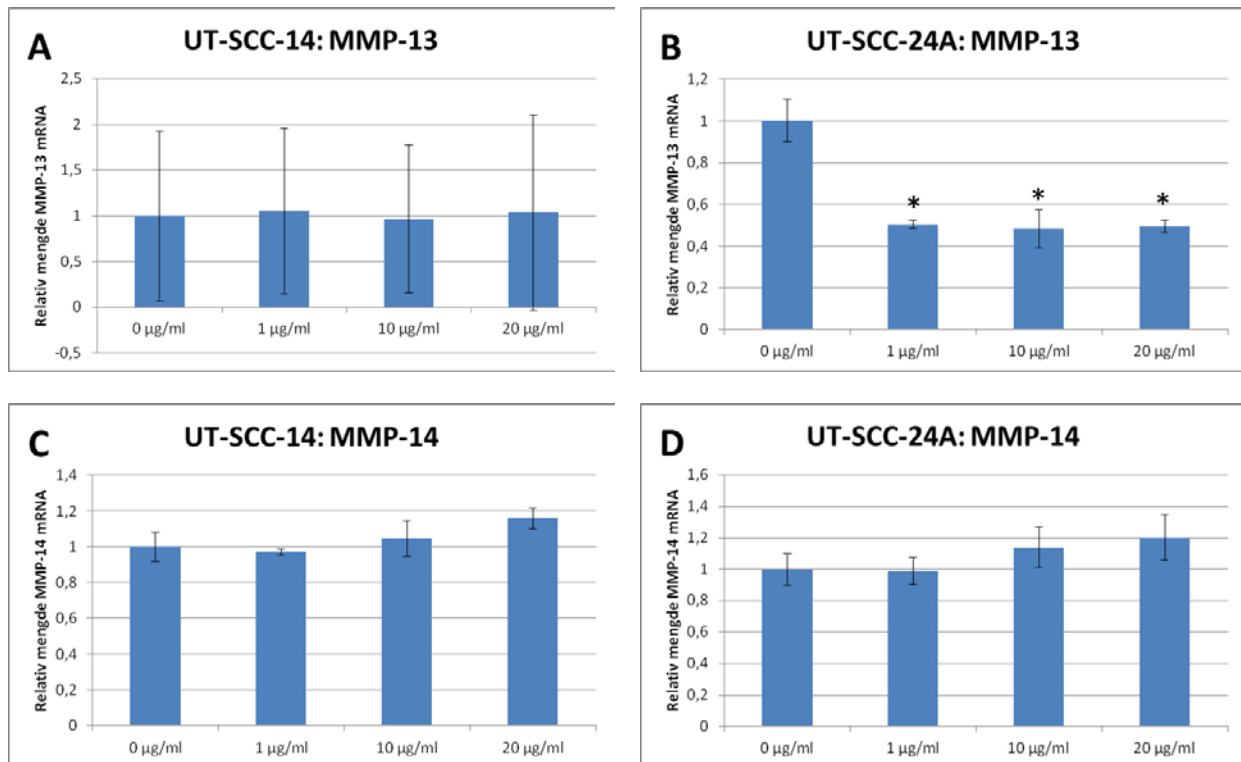
3.3.3 Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-1, MMP-2 og MMP-3 uttrykk



Figur 21: Relativ mengde MMP-1, MMP-2 og MMP-3 mRNA i knockdowncellelinjen (**A, C og E**) UT-SCC-14/S100A4-II og (**B, D og F**) UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter stimulering med henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 µg/ml rS100A4 tilsatt vekstmediet. Gjennomsnitt ± SEM (N=3).

Figur 21 viser at hverken MMP-1, MMP-2 eller MMP-3 synes å påvirkes av ekstracellulært rS100A4. Målingene av MMP-1 og MMP-3 i UT-SCC-14 ga store standardavvik, men synes ikke å være relatert til lave mRNA-konsentrasjoner da Ct-verdiene var < 31. De store standardavvikene gjør det vanskelig å tolke resultatene av MMP-1 og MMP-3 i UT-SCC-14, men målingene fra UT-SCC-24A synes heller ikke å vise noe som antyder en effekt av ekstracellulært rS100A4 på disse målgenene.

3.3.4 Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-13 og MMP-14 uttrykk

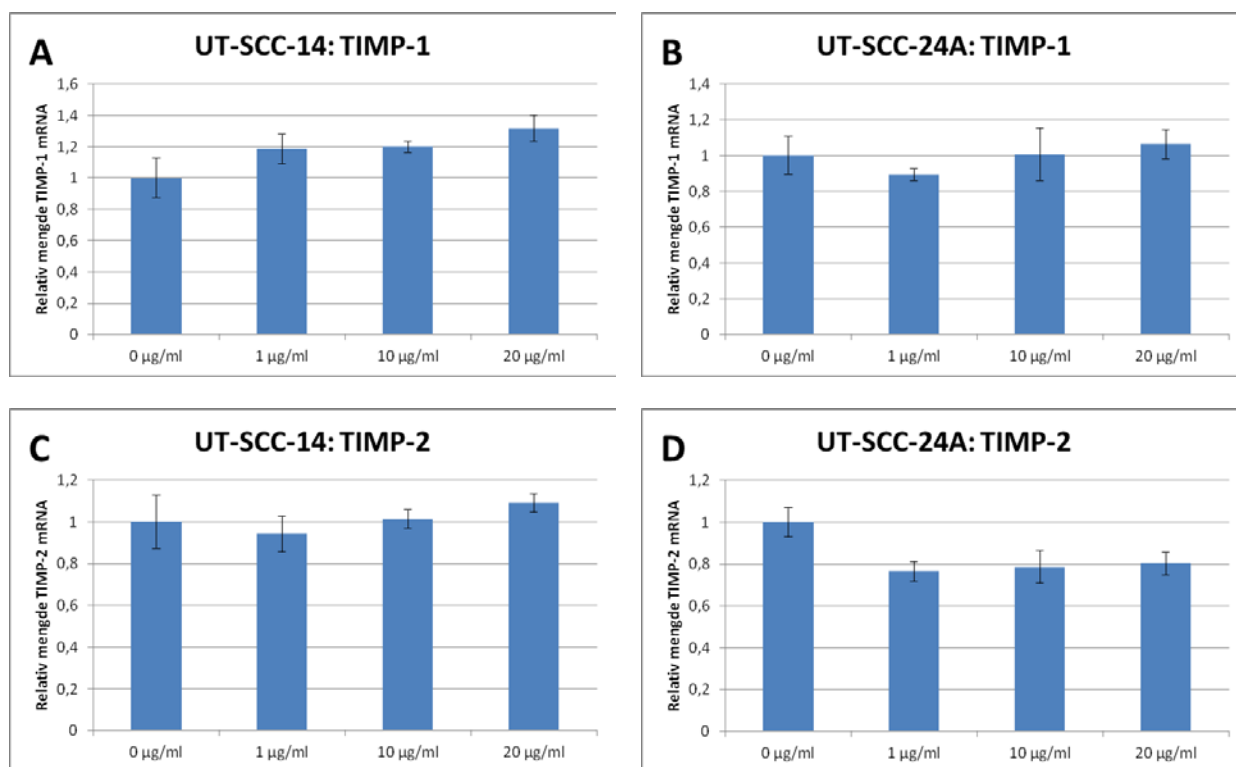


Figur 22: Relativ mengde MMP-13 og MMP-14 mRNA i knockdowncellelinjen (**A og C**) UT-SCC-14/S100A4-II og (**B og D**) UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter stimulering med henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 µg/ml rS100A4 tilsatt vekstmediet. Gjennomsnitt ± SEM (N=3). * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykk i 0 µg/ml kontroll.

Som figur 22A viser, har målingene av MMP-13 fra UT-SCC-14 alt for store standardavvik til å kunne tolke noe av resultatene. For UT-SCC-24A observerer vi signifikant redusert MMP-13 mRNA-nivå i alle de tre cellelinjene tilsatt rS100A4 sammenlignet med kontroll uten rS100A4, men nedreguleringen følger ikke et dose-responsforhold. Ved tilførsel av 1 µg/ml ser vi 50 % signifikant redusert mRNA-nivå ($P = 0,04$), ved 10 µg/ml 52 % signifikant reduksjon ($P = 0,02$) og ved 20 µg/ml 51 % signifikant reduksjon ($P = 0,03$). Siden vi ikke har data fra UT-SCC-14 å sammenligne med, er det vanskelig å si noe om nedreguleringen av MMP-13 uttrykk i UT-SCC-24A.

Figur 22C og D viser resultatene for kvantifisering av MMP-14 mRNA-nivå, men uttrykket av denne proteinasen synes ikke å påvirkes av ekstracellulært rS100A4.

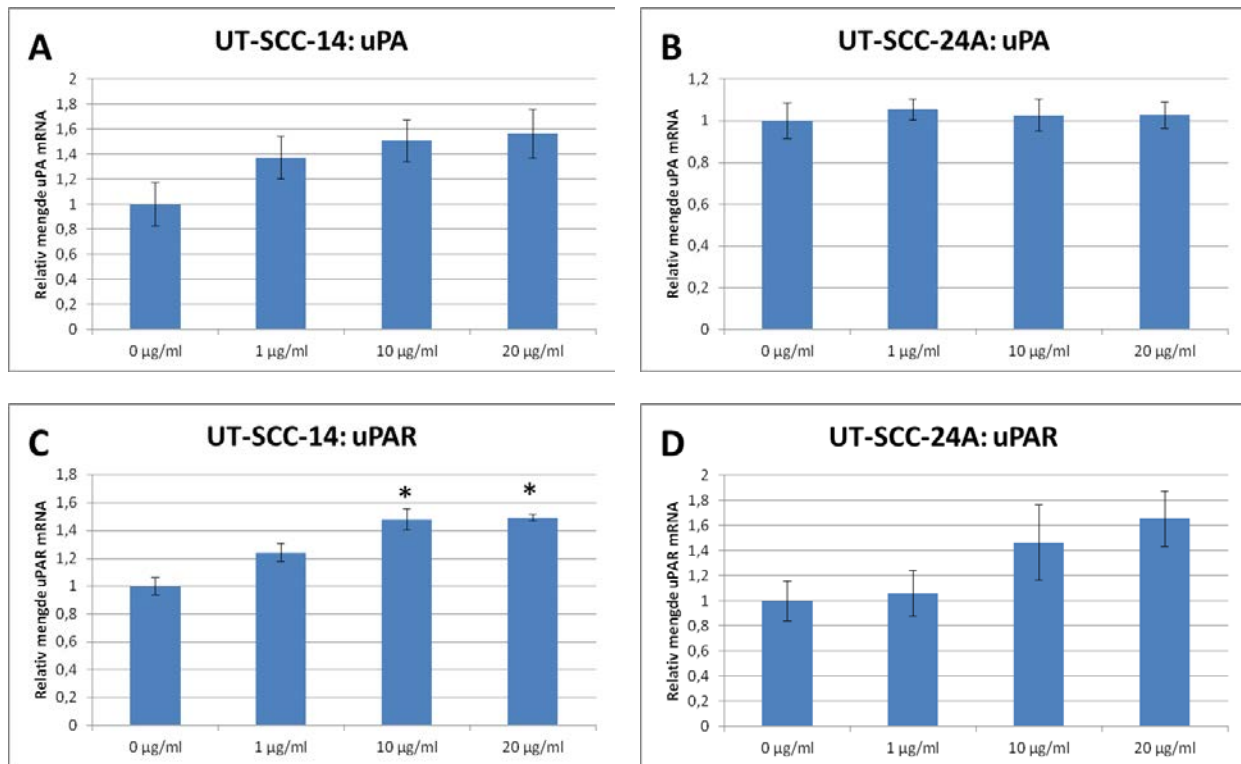
3.3.5 Effekt av rekombinant S100A4 på TIMP-1 og TIMP-2 uttrykk



Figur 23: Relativ mengde TIMP-1 og TIMP-2 mRNA i knockdowncellelinjen (**A og C**) UT-SCC-14/S100A4-II og (**B og D**) UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter stimulering med henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 µg/ml rS100A4 tilsatt vekstmediet. Gjennomsnitt ± SEM (N=3).

Figur 23 viser funn for TIMP-1 og TIMP-2 ved tilsatt ekstracellulært rS100A4. Det relative mRNA-nivået av TIMP-1 synes ikke å påvirkes av rS100A4 i de to orale plateepitelkarsinomcellelinjene. I UT-SCC-24 kan vi se en tendens til nedregulert TIMP-2 mRNA-nivå i alle cellelinjene tilsatt rS100A4, men nedreguleringen er ikke statistisk signifikant når sammenlignet med kontroll.

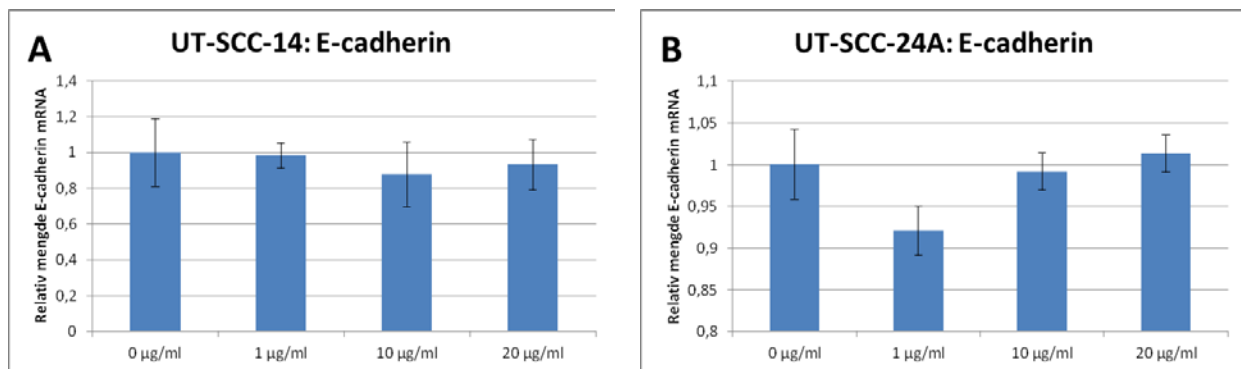
3.3.6 Effekt av rekombinant S100A4 på uPA og uPAR uttrykk



Figur 24: Relativ mengde uPA og uPAR mRNA i knockdowncellelinjen (**A og C**) UT-SCC-14/S100A4-II og (**B og D**) UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter stimulering med henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 µg/ml rS100A4 tilsatt vekstmediet. Gjennomsnitt ± SEM (N=3). * angir $P < 0,05$ når sammenlignet med uttrykk i 0 µg/ml kontroll.

Resultatene presentert i figur 24 viser at mRNA-nivået av uPA stiger noe i UT-SCC-14, men tilsvarende stigning observeres ikke for UT-SCC-24A. uPAR har en klar tendens til økt mRNA-nivå som følge av økende konsentrasjon rS100A4, og observeres både i UT-SCC-14 og UT-SCC-24A. For UT-SCC-14 er det en signifikant økning på 1,48 og 1,49 ganger for henholdsvis 10 og 20 µg/ml rS100A4 når sammenlignet med kontroll (10 µg/ml: $P = 0,01$ og 20 µg/ml: $P = 0,007$). Økt mRNA-nivå av uPAR i UT-SCC-24A er på 1,46 og 1,65 ganger for henholdsvis 10 og 20 µg/ml rS100A4, men økningen i denne cellelinjen er ikke statistisk signifikant.

3.3.7 Effekt av rekombinant S100A4 på E-cadherin uttrykk

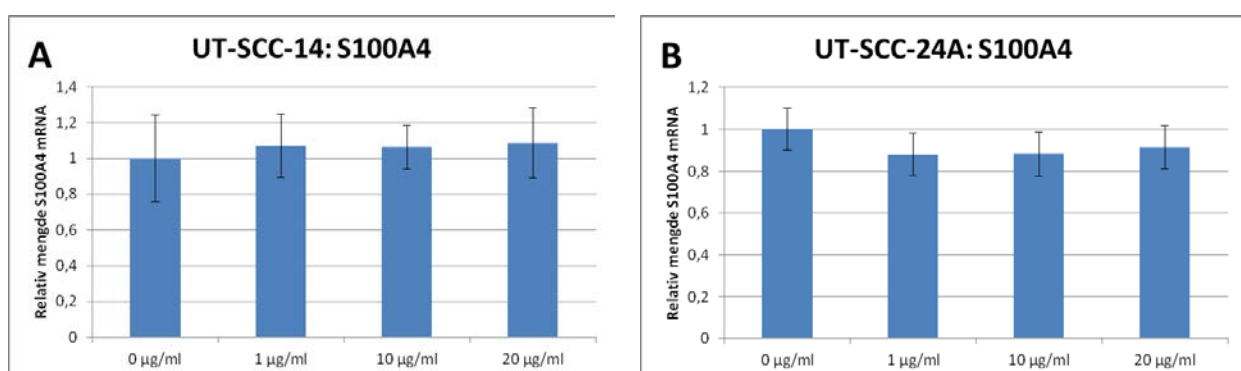


Figur 25: Relativ mengde E-cadherin mRNA i knockdowncellelinjen (A) UT-SCC-14/S100A4-II og (B) UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter stimulering med henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 µg/ml rS100A4 tilsatt vekstmediet. Gjennomsnitt ± SEM (N=3).

Som vi ser av figur 25 synes ikke uttrykket av E-cadherin i de to orale plateepitelkarsinomcellelinjene å være påvirket av ekstracellulært tilsatt rS100A4.

3.3.8 Effekt av rekombinant S100A4 på S100A4 uttrykk

Cellelinjene som ble tilsatt ekstracellulært rS100A4 til vekstmediet var S100A4 knockdowncellelinjer, og hadde dermed selv veldig lavt uttrykk av S100A4 mRNA og protein. Vi ønsket derfor å undersøke om tilførsel av rS100A4 kunne påvirke uttrykket av S100A4 i cellene, altså om det kunne være en parakrin eller autokrin effekt av proteinet.



Figur 26: Relativ mengde S100A4 mRNA i knockdowncellelinjen (A) UT-SCC-14/S100A4-II og (B) UT-SCC-24A/S100A4-II, 24 timer etter stimulering med henholdsvis 0, 1, 10 eller 20 µg/ml rS100A4 tilsatt vekstmediet. Gjennomsnitt ± SEM (N=3).

S100A4-uttrykket er ikke endret som følge av tilført rS100A4 til vekstmediet, hverken i UT-SCC-14 eller UT-SCC-24A.

4. Diskusjon

Oralkreft er en aggressiv kreftform med hyppig forekomst av lokal invasjon og metastaser til lymfeknuter, og er på grunn av det en av de vanskeligste kreftformene å behandle. På tross av økende kunnskap om mekanismer og faktorer involvert i tumorprogresjon og metastase, med påfølgende nye og bedre behandlingsregimer, er fortsatt overlevelsesraten for disse kreftpasientene uendret de siste tiårene [20]. Dette indikerer et behov for videre forskning på faktorer med prognostisk relevans med mål om å kunne utvikle legemidler og nye behandlingsformer som bedrer overlevelsesraten for pasienter med oralkreft.

Metastase er en omstendelig prosess hvor tumorcellene erverver seg egenskaper som tillater dem å vokse ukontrollert, invadere nærliggende vev, og via systemisk sirkulasjon eller lymfevev kunne spres til andre steder i kroppen [7]. En av de mange substansene som er identifisert å kunne bidra i denne prosessen er proteinet S100A4. Proteinene har vist seg å være overuttrykt i en rekke tumorvev, og det er i flere tilfeller vist en klar korrelasjon mellom økt S100A4 og invasjon og metastase [53]. Også ved oralkreft er S100A4 forbundet med tumorprogresjon [75, 76]. I en studie med pasienter med oralt plateepitelkarsinom ble observert oppregulert S100A4 hos 27 % av pasientene, og hvor det viste seg å være en signifikant sammenheng mellom S100A4 og invasjon og metastase til lymfeknuter [75].

Matriks metalloproteinaser har en nøkkelrolle i metastaseprosessen både ved å degradere ekstracellulær matriks (ECM) og basalmembranen, og ved å frigjøre og aktivere faktorer fra ECM, blant annet vekstfaktorer. Aktiverte vekstfaktorer kan i sin tur bidra til angiogenese, tumorvekst, migrasjon og invasjon [29]. Flere MMPer er identifisert som viktige biomarkører med potensiale til å kunne forutsi noe om overlevelsessevne for pasienter med oral plateepitelkarsinom [77]. Relatert til forsøkene i denne oppgaven med det metastaseassosierte proteinet S100A4, så har flere tidligere studier vist en korrelasjon mellom S100A4 og uttrykk av visse MMPer og deres endogene hemmere [59-61].

I denne oppgaven ønsket vi å undersøke effekter av det metastaseassosierte proteinet S100A4 på målgen forbundet med invasjon og metastase. Da proteinet som tidligere nevnt er vist å ha både intracellulære og ekstracellulære effekter ønsket vi å undersøke effekten på ulike proteolytiske enzymer ved å slå ned uttrykket av S100A4 i cellene, i tillegg til å undersøke effekten av tilsatt rekombinant S100A4 til vekstmediet til cellene.

Rekombinant S100A4 ble forsøkt syntetisert og rensert her på Insitutt for farmasi/Norstruct, men som tidligere nevnt viste det seg og ikke være aktivt. Hva som skyldes at vårt protein var inaktivt men ikke proteinet fra Mælandsmos forskningsgruppe kan være relatert til forskjeller i prosedyrene. De bruker en annen type kolonne og andre buffere i sine prosedyrer, og det kan være forskjeller i konsentrasjoner av stoffer, som for eksempel kalsium, i disse bufferene som påvirker konformasjonen til S100A4. At vi ikke fikk aktivt protein kan også skyldes en annen fordeling av monomer/dimere/multimere former av proteinet, da den metastasefremmende effekten av S100A4 i størst grad er forbundet med multimere former av proteinet [78].

4.1 Effekter av S100A4 på MMP-9 uttrykk

Gelatinasene MMP-2 og MMP-9 er kanskje noen av de MMPene som har fått størst oppmerksomhet med hensyn til tumorprogresjon, da økt uttrykk av disse enzymene er forbundet med aggressiv tumorvekst og dårlig prognose for mange ulike kreftformer [26]. MMP-9 er involvert i en rekke mekanismer som kan virke tumorfremmende, blant annet aktivering av flere vekstfaktorer som stimulerer tumorvekst, øker biotilgjengeligheten av vekstfaktoren vascular endothelial growth factor (VEGF) som induserer angiogenese av tumorvev [29], og er identifisert å være involvert i intravasjon prosessen [79]. Spesifikt for oralkreft er det i flere studier vist en sammenheng mellom metastase og uttrykk av både MMP-2 og MMP-9, hvor oppregulert nivå av disse synes å samsvare med metastase til lymfeknuter [80, 81].

Effekt av S100A4 knockdown på MMP-9 uttrykk

Vi fant i våre forsøk redusert mRNA-nivå for MMP-9 som følge av nedregulert S100A4 uttrykk, og dette ble bekreftet i begge de to cellelinjene fra oralt plateepitelkarsinom, UT-SCC-14 og UT-SCC-24A. Unntaket var i cellelinjen UT-SCC-24A/S100A4-II hvor nedregulert S100A4 ikke resulterte i lavere, men heller litt økt MMP-9 mRNA-nivå når sammenlignet med NS kontroll. Denne knockdowncellelinjen er tidligere testet for MMP-9 uttrykk ved Forskningsgruppen i farmakologi, og det ble da funnet signifikant redusert MMP-9 mRNA-nivå også i denne cellelinjen (Hilde Wetting, upublisert materiale). Sammenlignet med forrige måling hadde cellelinjen denne gangen et høyere passasjenummer ved høsting av mRNA, og det kan se ut til at cellene har endret egenskaper over tid i cellekultur, noe som har

ført til at MMP-9 nivået nå er økt igjen, noe som er et ganske vanlig fenomen ved celledyrking [82]. Det er mange ulike faktorer som påvirker MMP-9 nivå, og det kan se ut til at noen av disse er endret slik at MMP-9 nivået i cellene er økt igjen. For å være helt sikker på at S100A4 påvirker MMP-9 uttrykket i cellene, bør et lavere passasjennummer av cellene testes om igjen.

I kondisjonert medium fra UT-SCC-24A/S100A4-II var det heller ikke redusert enzymaktivitet av MMP-9, og bekreftet funnene på mRNA-nivå for denne cellelinjen. Forenelig med observasjonene av nedregulert MMP-9 mRNA-nivå i de andre knockdowncellelinjene for UT-SCC-14 og UT-SCC-24A, fant vi også redusert enzymaktivitet av MMP-9 i disse. På zymografigelene ses det også et bånd på gelen like ovenfor MMP-9 som mest sannsynlig er et kompleks av MMP-9 et annet protein, men vi kan ikke si hvilket. Nøytrofil gelatinase-assosiert lipokalin (NGAL; 25 kDa) er kjent for å danne kompleks med MMP-9 [83] og det kan hende at det er dette vi ser i det kondisjonerte mediet fra våre cellelinjer. Det samme båndet ses også i kontrollen, og denne er tidligere testet på Western blot med antistoff for NGAL, men dette var negativt. MMP-9 i det kondisjonerte mediet fra alle cellelinjene har også en noe høyere molekylvekt enn MMP-9 i kontrollen. Dette skyldes sannsynligvis forskjeller i glykosylering, da det er kjent at MMPer har en rekke bindingssteder for glykaner [84].

Våre funn fra orale plateepitelkarsinomcellelinjer om redusert MMP-9 mRNA-nivå og redusert enzymaktivitet som følge av S100A4 nedregulering, samsvarer med funn i prostatakreftcellelinjer, hvor også S100A4 nedregulering ga signifikant redusert MMP-9 mRNA-nivå, i tillegg til også her redusert MMP-9 enzymaktivitet [61].

Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-9 uttrykk

Ved tilførsel av rekombinant S100A4 (rS100A4) til vekstmediet observerte vi et tydelig dose-responsforhold mellom ekstracellulær tilstedeværelse av rS100A4 og MMP-9 uttrykk. Det var signifikant økt MMP-9 mRNA-nivå ved 10 og 20 µg/ml rS100A4 både i UT-SCC-14 og UT-SCC-24A, sammenlignet med celler uten tilsatt rS100A4. På grunn av begrenset tid med arbeidet til oppgaven har vi ikke fått undersøkt effekten av rS100A4 på proteinnivå, men er noe som bør bli undersøkt videre.

Vi observerte ved ekstracellulær tilførsel av rS100A4 til orale plateepitelcellelinjer et økt MMP-9 mRNA-nivå i S100A4 knockdowncellelinjer, mens Saleem *et al.* (2006) ved S100A4-overuttrykk fant økt MMP-9 mRNA- og proteinnivå i sine prostatakreftcellelinjer [61]. Våre funn sett i sammenheng med tidligere funn tyder helt klart på en effekt av S100A4 på MMP-9, både intracellulært og ekstracellulært. Som tidligere nevnt har S100A4 selv ingen enzymatisk aktivitet, og den intracellulære effekten vil være et resultat av interaksjoner med andre målprotein i cytoplasma, som i sin tur vil lede til endret uttrykk av andre målgen. Både kreftceller og andre celletyper i tumor stroma er dessuten kjent å skille ut S100A4 til det ekstracellulære rom [57], men mekanismen for hvordan S100A4 skilles ut er stort sett ukjent. S100A4 skilles ikke ut via de klassiske mekanismene, og det er foreslått at det kan skje via en atypisk og ukjent mekanisme [52]. Tumor stroma har en viktig rolle i tumorprogresjonen, blant annet ved å frigi en rekke faktorer som stimulerer tumorvekst og angiogenese. Frigjøring av S100A4 fra stromale celler kan være en annen viktig faktor som kan bidra til økt invasjon og metastase av tumorceller. Våre resultater indikerer at S100A4 frigitt fra både tumor og stromale celler kan øke de invasive og metastaserende egenskapene ved oralkreft blant annet ved å øke uttrykket av MMP-9.

Den ekstracellulære effekten av S100A4 er vist å være mediert via interaksjoner med reseptorer på celleoverflaten, hvor blant annet RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) er identifisert som en mulig reseptor for S100A4 [58]. Ved binding til overflatereseptoren er det foreslått at S100A4 vil trigge en intracellulær kaskadereaksjon som leder til den endelige effekten [53]. Det er i Forskningsgruppen i farmakologi ved IFA tidligere undersøkt om RAGE kan være forbundet med den observerte induksjonen av MMP-9 som følge av tilført rS100A4 til vekstmediet for de to cellelinjene UT-SCC-14 og UT-SCC-24A (Hilde Wetting, upublisert materiale). Resultatene viste at bare UT-SCC-14 uttrykte RAGE, og det ble konkludert med at det økte uttrykket av MMP-9 ikke synes å være mediert av denne reseptoren.

Det kan også tenkes at effekten av rS100A4 på MMP-9 er et resultat av at proteinet internaliseres og binder noe intracellulært. Motsatt kan det også være tilfelle at endogent S100A4 sekreseres fra cellene og virker via reseptorer på celleoverflaten. Dette vet man svært lite om i dag, og det er behov for en bedre forståelse av de eksakte mekanismene involvert i de invasive og metastasefremmende effektene forbundet med S100A4, for eksempel hvordan S100A4 regulerer uttrykket av MMPer.

4.2 Effekter av S100A4 på MMP-2 uttrykk

Den andre gelatinasen, MMP-2, er involvert i mange av de samme mekanismene som fremmer tumorprogresjon som for MMP-9. Blant annet vil også MMP-2 kunne frigjøre og aktivere vekstfaktorer [29] og synes å ha en essensiell rolle i cellesignalisering ved å kontrollere biotilgjengeligheten av molekyler som er involvert i cellevekst, migrering og angiogenese [26]. Som nevnt ovenfor er også nivå av MMP-2 observert å korrelere med metastase til lymfeknuter ved oralkreft [81], og det var således interessant å studere hvilken effekt S100A4 kunne ha på MMP-2 uttrykk.

Effekt av S100A4 knockdown på MMP-2 uttrykk

Ved S100A4 knockdown observerte vi et helt klart redusert MMP-2 mRNA-nivå i UT-SCC-14 knockdowncellelinjene sammenlignet med kontrollcellelinjer. Den samme nedreguleringen så vi derimot ikke for UT-SCC-24A, hvor den ene knockdowncellelinjen viste redusert og den andre viste økt mRNA-nivå sammenlignet med NS kontroll. Funnene samsvarte altså ikke mellom de to modercellelinjene og det kan kanskje tenkes at dette ikke er en «universell effekt» i orale plateepitelcellelinjer. De ulike funnene for MMP-2 kan være relatert til forskjeller i de to modercellelinjene som kommer fra to ulike pasienter med tungkreft. Eller det kan, som diskutert ovenfor, være relatert til endrede egenskaper av knockdowncellelinjen UT-SCC-24A/S100A4-II, da det var den samme cellelinjen vi også for MMP-9 så økt mRNA-nivå i. Effekten av S100A4 på MMP-2 uttrykk hadde vært interessant å studere videre, gjerne med flere høsterunder og flere målinger av mRNA-nivå for å utelukke mulige feilkilder relatert til høsting eller teknisk variasjon i rensing av mRNA, revers transkriptase reaksjonen og/eller RT-qPCR målingene.

Relatert til tidligere funn av S100A4 på MMP-2, observerte Bjørnland *et al.* (1999) statistisk signifikant redusert MMP-2 mRNA-nivå i sine humane osteosarkomcellelinjer med nedregulert S100A4 gnuttrykk [59], og dette styrker våre funn fra UT-SCC-14 og hypotesen om at MMP-2 kan tenkes å være regulert av det metastaseassosierte proteinet S100A4.

Analyser av kondisjonert medium fra UT-SCC-14 viste ikke redusert MMP-2 enzymaktivitet som følge av S100A4 knockdown. Derimot kunne vi for den ene knockdowncellelinjen i UT-SCC-24A observere et noe lavere nivå av MMP-2 proteinnivå. Funnene fra mRNA- og proteinnivå samsvarer ikke, og aktivt MMP-2 synes altså å være tilstede på tross av redusert

mRNA-nivå i UT-SCC-14. Det er heller ikke alltid ensbetydende at endringer i genuttrykk samsvarer med proteinnivå, og det kan være forårsaket av mange faktorer. Det kan være relatert til biologiske regulatoriske momenter, som for eksempel nedbrytningshastigheten til mRNA og proteinet, eller det kan skyldes tekniske variasjoner. Undersøkelser av mRNA-nivå er en nyttig måte til å forutsi effekter på proteinnivå, men optimalt bør man undersøke uttrykket av både mRNA og proteiner for å kunne si noe om den biologiske effekten.

Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-2 uttrykk

Ved tilførsel av rS100A4 til vekstmediet for knockdowncellerlinjer av UT-SCC-14 og UT-SCC-24A, fant vi ikke effekt på MMP-2 uttrykk.

4.3 Effekter av S100A4 på MMP-7 uttrykk

Som de fleste andre MMPer er også MMP-7 identifisert å være involvert i en rekke prosesser som kan fremme tumorprogresjon [85]. Blant annet kan MMP-7 aktivere alle typer insulin-like growth factor-binding protein (IGF-BP), som bidrar til å fremme tumorvekst [86]. MMP-7 har også vist evne til å aktivere pro-MMP-2 og pro-MMP-9, og dette kan være en viktig funksjon som fører til økt invasjon ved kreft [87, 88]. Dessuten synes MMP-7 å være involvert i såkalt «shedding» av molekyler fra celleoverflaten, blant annet av Fas-ligand [89] og E-cadherin [72], som leder til henholdsvis apoptose av nærliggende celler og tap av celle-celle interaksjoner, prosesser som virker tumorfremmende. Men som en rekke andre MMPer synes også MMP-7 å ha tumorhemmende effekter, blant annet ved å kløve plasminogen til angiostatin, en av de mest potente hemmerne av angiogenese [90].

Samsvaret mellom økt uttrykk av MMPer og tumorprogresjon har ført til flere kliniske studier med uselektive MMP-hemmere. De aller fleste studiene har derimot gitt skuffende resultater, og kan til dels forklares av nyere funn av anti-tumor effekter for flere av MMPene. Dette gjenspeiler MMPenes komplekse roller relatert til kreft og demonstrerer behovet for å kartlegge alle effekter av hver enkelt MMP, for i fremtiden å kunne utvikle selektive MMP-hemmere med effekter som kun virker tumorhemmende og som ikke bidrar til andre uønskede effekter. Det er også foreslått nye strategier av MMP-inhibering målrettet mot de endogene reguleringsmekanismene av MMPer; transkripsjon, aktivering og inhibering [91]. Sett i sammenheng med våre funn, hvor S100A4 viser seg å endre uttrykket av visse MMPer i orale

plateepitelcellelinjer, kan kanskje også S100A4 være et fremtidig legemiddelmål i behandlingen av oralkreft.

Effekt av S100A4 knockdown på MMP-7 uttrykk

Resultatene fra analysene av MMP-7 i S100A4 knockdowncellelinjer versus kontrollcellelinjer ga for høye Ct-verdier med RT-qPCR, altså var det for lavt mRNA-nivå til å pålitelig kunne kvantifisere dette målgenet.

Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-7 uttrykk

I forsøket med tilført rS100A4 til vekstmediet observerte vi et dose-responsforhold mellom MMP-7 mRNA-nivå og rS100A4 tilsatt i økende konsentrasjon til vekstmediet. Resultatene fra UT-SCC-14 har høye standardavvik og økningen er ikke signifikant, men man kan likevel observere en klar tendens til et dose-responsforhold. Så vidt vi vet, er det ikke tidligere blitt utført studier som undersøker effekten av S100A4 på MMP-7, og derav har vi heller ingenting å relatere funnene til. Funnene fra våre analyser indikerer at det kan være en ekstracellulær effekt av S100A4 på MMP-7 uttrykk i orale plateepitelcellelinjer.

4.4 Effekter av S100A4 på MMP-1 og MMP-3 uttrykk

MMPene er en stor gruppe enzymer som alle har ulik substratspesifisitet og bidrar slik til tumorprogresjon ved å kløye og aktivere en rekke ulike komponenter. Også MMP-1 og MMP-3 er forbundet med aktivering av flere vekstfaktorer, og som med det vil bidra til stimulering av tumorvekst [71]. MMP-3 er i tillegg sammen med MMP-7 vist å kløye ektodomenet av E-cadherin, og løselig E-cadherin hemmer funksjonen av E-cadherinreseptoren via en parakrin effekt, noe som synes å fremme invasive egenskaper for tumorcellen [72]. Kløving av E-cadherin av MMP-3 induserer også epitelial-til-mesenkymal transisjon (EMT) [92] som gir opphav til en fenotype forbundet med invasive egenskaper.

Relatert til cellelinjene brukt i denne oppgaven er økt nivå av MMP-1 og MMP-3, sammen med MMP-2, -9 og -14, observert å samsvare med grad av metastase og invasjon i biopsiprøver fra pasienter med oral plateepitelkarsinom [93]. Basert på dette, og litteraturen

som indikerer at også MMP-1 og MMP-3 synes å ha viktige roller i tumorprogresjon ønsket vi å undersøke effekten av S100A4 på uttrykket av også disse MMPene.

Effekt av S100A4 knockdown på MMP-1 og MMP-3

Oppsummert syntes hverken MMP-1 eller MMP-3 å påvirkes av S100A4 knockdown i våre orale plateepitelkarsinomcellerlinjer. Det som eventuelt kan bemerkes var observasjon av redusert genuttrykk av MMP-3 i knockdowncellerlinjene fra UT-SCC-24A, men denne reduksjonen var ikke signifikant, og store standardavvik for målingene av kontrollcellerlinjene NS og EV gjorde det vanskelig å trekke noen slutninger rundt dette. Vi kan heller ikke sammenligne med funn fra den andre cellerlinjen UT-SCC-14, da disse dataene hadde for lavt mRNA-nivå til å kunne kvantifiseres.

Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-1 og MMP-3

Målinger med RT-qPCR av mRNA-nivå av MMP-1 og MMP-3 ga for begge målgenene i UT-SCC-14 høye standardavvik, og gjorde det vanskelig å tolke noe av disse dataene. Resultatene fra UT-SCC-24A ga oss derimot heller ingen indikasjoner på at uttrykket av de to målgenene var endret som følge av tilsatt rS100A4 til vekstmediet.

4.5 Effekter av S100A4 på MMP-13 og MMP-14 uttrykk

Kollagenasen MMP-13 har en viktig rolle i utvikling og remodulering av beinstruktur, og har således vært forbundet med ulike sykdommer i bein, men enzymet er også assosiert med ulike kreftformer, og høyt uttrykk synes å være relatert til tumoraggressivitet [27]. MMP-14 tilhører gruppen membranbundne MMPer, og er også kjent under navnet MT1-MMP (membrantype-1 MMP). En av de proteolytiske funksjonene til MMP-14 som kanskje er best beskrevet er aktivering av proMMP-2, hvor MMP-14 sammen med TIMP-2 danner et kompleks, som fjerner pro-domenet fra MMP-2 [27]. Videre er MMP-14 funnet å være involvert i en rekke prosesser som leder til tumorprogresjon, blant annet frigjøring av vekstfaktorer [27], og er sammen med MMP-2 og MMP-9 en av nøkkelspillerne som bidrar til tumor angiogenese [29].

Som nevnt ovenfor, synes også økt nivå av MMP-14 i oralkreft å samsvare med invasive og metastaserende tumorer [93]. Relatert til S100A4 er både MMP-13 og MMP-14 i tidligere studier funnet å være påvirket av S100A4 i ulike humane og murine cellelinjer [59, 60, 94]. For MMP-14 er det som følge av tilsatt ekstracellulært S100A4 observert økt mRNA-nivå i murine endotelcellelinjer [60], samtidig som en annen studie fant redusert MMP-14 mRNA-nivå i osteosarkomcellelinjer som følge av nedregulert S100A4 uttrykk [59]. Basert på denne litteraturen syntes vi det var interessant å undersøke effekten av S100A4 knockdown og rS100A4 også på MMP-13 og MMP-14.

Effekt av S100A4 knockdown på MMP-13 og MMP-14 uttrykk

MMP-13 lot seg ikke kvantifisere pga. lavt mRNA-nivå i UT-SCC-14, men resultatene fra UT-SCC-24A antydte at MMP-13 ikke lot seg påvirke av S100A4-uttrykk. Heller ikke MMP-14 syntes å påvirkes av S100A4 knockdown i våre orale plateepitelkarsinomcellelinjer.

Effekt av rekombinant S100A4 på MMP-13 og MMP-14 uttrykk

Ved tilsatt rS100A4 til UT-SCC-24A fant vi signifikant redusert MMP-13 mRNA-nivå, både ved 1, 10 og 20 µg/ml rS100A4. Målingene av MMP-13 mRNA nivå i UT-SCC-14 hadde derimot så høye standardavvik at det ikke var mulig å tolke noe av disse, og vi kunne derfor ikke sammenligne MMP-13 uttrykket i de to cellelinjene. Uttrykket av MMP-14 endret seg hverken i UT-SCC-14 eller i UT-SCC-24A som følge av tilsatt rS100A4 i ulike konsentrasjoner.

Den tidligere litteraturen indikerer at det eksisterer en korrelasjon mellom S100A4 og uttrykk av MMP-13 og MMP14, men på tross av det finner vi ikke effekt på disse MMPene i våre cellelinjer. De tidligere observasjonene mht. effekt av S100A4 på MMP-13 og MMP-14 er gjort i andre celletyper, og dette kan tyde på at effekten av S100A4 variere mellom celletyper.

4.6 Effekter av S100A4 på TIMP-1 og TIMP-2 uttrykk

TIMPenes hovedsakelige funksjon er inhibering av MMPer [35], men de er multifunksjonelle proteiner og TIMP-2 er som beskrevet ovenfor også involvert i aktivering av MMP-2 [27]. TIMP-1 og TIMP-2 er også forbundet med flere andre biologiske funksjoner, som cellevekst og både apoptotisk og anti-apoptotisk aktivitet, funksjoner som ikke nødvendigvis er forbundet med deres interaksjoner med MMPer [35].

Ved nedregulert uttrykk av det metastaseassosierte proteinet S100A4 forventer man kanskje en effekt som reduserer tumorprogresjon, og det ville i så fall for MMP-hemmerene TIMP-1 og TIMP-2 bety økt uttrykk. Allikevel er det tidligere observert litt motstridene effekter av S100A4 på TIMP-1 og TIMP-2. Bjørnland *et al.* (1999) fant økt nivå av TIMP-2 på både mRNA- og proteinnivå som følge av nedregulert S100A4 uttrykk, og motsatt fant de redusert TIMP-1 på mRNA- og proteinnivå [59]. Dette er med på å understreke kunnskapen om at TIMP-1 og TIMP-2 har komplekse roller og at deres eneste funksjon ikke bare er inhibering av MMPer. Ved tumorprogresjon vil den avgjørende effekten på evne til invasjon og metastase uansett være den netto proteolytiske balansen mellom MMPer og TIMPer.

Effekt av S100A4 knockdown på TIMP-1 og TIMP-2 uttrykk

Genuttrykket av TIMP-1 synes ikke å endres hverken i UT-SCC-14 eller UT-SCC-24A som følge av S100A4 knockdown. For TIMP-2 i UT-SCC-24A så vi 66 % signifikant nedregulert mRNA-nivå i S100A4-I, men denne observasjonen ble bare gjort i én cellelinje, og bare for én av knockdowncellelinjene. Motsatt observert vi økt, men ikke-signifikant, mRNA-nivå av TIMP-2 i den andre knockdowncellelinjen for UT-SCC-24A, og følgelig er det vanskelig å konkludere med hvilken effekt S100A4 knockdown synes å ha på TIMP-2. Dette tilfellet viser hvor viktig det er å benytte mer enn bare én knockdowncellelinje, da en slik observasjon gjort i bare én cellelinje kan gitt falske og /eller misvisende resultater som kanskje skyldes helt andre faktorer enn de vi faktisk undersøker for. Like ens er det også viktig å benytte mer enn én kontrollcellelinje for å være sikker på hva man faktisk kontrollerer mot. Før man kan trekke noen sikre konklusjoner på genuttrykk bør den samme effekten observeres i begge knockdowncellelinjene, samtidig som uttrykket av kontrollcellelinjene bør samsvare seg i mellom.

Effekt av rekombinant S100A4 på TIMP-1 og TIMP-2 uttrykk

I våre analyser på mRNA-nivå fant vi ikke effekt av rS100A4 på uttrykket av TIMP-1 eller TIMP-2 i våre orale plateepitelkarsinom cellelinjer.

4.7 Effekter av S100A4 på uPA og uPAR uttrykk

Urokinase plasminogen (uPA) systemet er involvert i omdanningen fra plasminogen til plasmin, en serin protease som bidrar i flere patofysiologiske prosesser som krever remodulering av ECM og basalmembranen [95]. Som for MMPer trodde man tidligere at deres hovedfunksjon var begrenset til nedbrytning av ECM, men funn over de siste tiårene tyder på at også uPA systemet er involvert i en rekke andre prosesser i tumorutviklingen som tumorvekst, adhesjon, intravasjon, ekstravasjon og angiogenese [95]. Relatert til S100A4 er det tidligere funnet økt mRNA-nivå av uPA ved tilførsel av ekstracellulært S100A4 til murine endotelceller, hvor det samtidig ble observert redusert mRNA-nivå av plasminogen aktivator inhibitor (PAI-1) mRNA [60].

Effekt av S100A4 knockdown på uPA og uPAR uttrykk

For UT-SCC-14 fant vi noe redusert uttrykk av uPA i knockdowncellelinjene sammenlignet med kontrollcellelinjene, mens uttrykket av uPAR syntes å være uendret som følge av S100A4 knockdown. For UT-SCC-24A så vi derimot redusert mRNA-nivå av både uPA og uPAR i cellelinjene med nedregulert S100A4-uttrykk. Effekten av S100A4 knockdown synes å være størst på uttrykket av uPA, hvor tendensen bekreftes både i UT-SCC-14 og UT-SCC-24A. Som vi nokså gjennomgående ser fra alle resultatene, er det knockdowncellelinjen UT-SCC-24A/S100A4-IA som synes å påvirkes i størst grad av nedregulert S100A4. Dette kan kanskje skyldes god nedregulering av S100A4 i denne knockdowncellelinjen.

Effekt av rekombinant S100A4 på uPA og uPAR uttrykk

Ved tilført rS100A4 til vekstmediet observerte vi en tendens til økt mRNA-nivå av uPA i UT-SCC-14, men den samme tendens ble ikke observert for UT-SCC-24A. Som nevnt ovenfor er det tidligere funnet økt uttrykk av uPA ved tilført S100A4 til vekstmediet [60]. Dette

samsvarer med funnene vi gjør i cellelinjen UT-SCC-14, men siden UT-SCC-24A ikke viser den samme tendensen kan vi ikke si noen om denne effekten kan være allmenngyldig for orale plateepitelcellelinjer.

Det ble også observert et dose-respons forhold for uPAR i både UT-SCC-14 og UT-SCC-24A, med statistisk signifikant økning ved 10 og 20 µg/ml rS100A4 for UT-SCC-14. Tilsvarende økning så vi også for UT-SCC-24A, men her var den ikke statistisk signifikant. Som for andre målgen, observert vi også for uPAR en tendens til mettet effekt av S100A4 ved 10-20 µg/ml rS100A4. Siden uPAR er essensiell for aktivering av uPA, kan det tenkes at S100A4-indusert oppregulering av uPAR vil kunne bidra i metastaseprosessen ved å øke aktiviteten av uPA.

4.8 Effekter av S100A4 på E-cadherin uttrykk

E-cadherin er et viktig celle-celle adhesjonsmolekyl som er vist å være involvert i utviklingen av en malign tumor, og tumorprogresjon synes å samsvare med tap av E-cadherin [38]. Fravær av E-cadherin fører til at kommunikasjon og adhesjon mellom celler forstyrres og vil bidra til å indusere EMT [96]. Det er tidligere vist at S100A4 regulerer uttrykket av E-cadherin i orale plateepitelcellelinjer, hvor cellelinjer med S100A4 overuttrykk førte til nedregulert E-cadherin uttrykk [76]. Med bakgrunn i dette og det faktum at E-cadherin synes å ha en slik viktig rolle i invasjon og metastase ønsket vi å undersøke om uttrykket av E-cadherin også lot seg påvirke av S100A4 knockdown eller ekstracellulært S100A4 i våre cellelinjer.

Effekt av S100A4 knockdown på E-cadherin uttrykk

Ved nedregulert S100A4 uttrykk observert vi signifikant økt E-cadherin mRNA-nivå i UT-SCC-14/S100A4-I, og motsatt redusert mRNA-nivå i UT-SCC-24A/S100A4-I. mRNA-nivået av E-cadherin i den andre knockdowncellelinjen S100A4-II synes derimot ikke å la seg påvirke av S100A4-uttrykk hverken i UT-SCC-14 eller UT-SCC-24A. Med slike motstridende funn, er det umulig å si noe om hvilken effekt S100A4 knockdown har på E-cadherin.

Effekt av rekombinant S100A4 på E-cadherin uttrykk

Forsøk med tilsatt rS100A4 til vekstmediet viste ingen endringer i mRNA-nivå av E-cadherin sammenlignet med celler uten rS100A4.

5. Konklusjon

I denne oppgaven ble det som følge av stabilt nedregulert S100A4-uttrykk funnet redusert MMP-9 både på mRNA- og proteinnivå i to orale plateepitelkarsinomcellerlinjer. I tillegg ble det også observert redusert MMP-2 mRNA-nivå og en tendens til redusert uPA mRNA-nivå. Motsatt viste ekstracellulært tilsatt rS100A4 til vekstmediet for cellene et dose-responsforhold for uttrykk av MMP-9, MMP-7 og uPAR på mRNA-nivå.

Til forsøket med rS100A4 tilsatt vekstmediet var alle høstingene gjort 24 timer etter stimulering. Tiden det tar før man ser respons på mRNA-nivå vil sannsynligvis variere fra målgen til målgen og halveringstiden til de ulike mRNAene er sannsynligvis også forskjellige. Dette medfører at 24 timer ikke nødvendigvis er et optimalt tidspunkt å studere uttrykket av de ulike målgenene. Nye forsøk bør derfor gjøres for å finne «optimal stimuleringstid» for de ulike målgenene, for eksempel ved å høste mRNA etter ulik stimuleringstid for å få en tidskurve av effekten på målgenet. Dette ville kanskje gitt andre funn enn det vi fant i denne oppgaven med 24 timers stimulering.

Oralkreft er karakterisert av svært høy evne til å metastasere, og våre resultater indikerer at både endogent og ekstracellulært S100A4 kan være med på å indusere invasjon og metastase ved å endre uttrykket av visse proteolytiske enzymer i orale plateepitelkarsinomcellerlinjer. Dette kan indikere at S100A4 er en viktig bidragsyter til de aggressive og invasive egenskapene forbundet med oralkreft, og samsvarer således med tidligere studier hvor S100A4 er blitt forbundet med invasiv vekst og metastase [75]. Basert på dette bør videre forskning derfor undersøke relevansen av S100A4-uttrykk i pasienter med oralkreft.

I denne oppgaven har vi sett at S100A4 endrer uttrykket av ulike MMPer og uPAR, men både de intracellulære og ekstracellulære mekanismene for hvordan S100A4 regulerer uttrykket av disse er stort sett ukjente. Dette danner grunnlag for videre forskning av de eksakte mekanismene involvert, med mål om at man fremtiden kanskje kan utvikle legemidler som hemmer de metastaseassosierte egenskapene forbundet med S100A4.

6. Referanser

1. *Cancer in Norway 2009 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway*, Kreftregisteret i Norge.
2. Jemal, A.og F. Bray, *Global Cancer Statistics 2008*. 2011, CA Cancer J. Clin. s. 69-90.
3. Becker, W.M., L.J. Kleinsmith, og J. Hardin, *The World of the Cell*. 6 ed. 2006, San Francisco, US: Pearson Education, Benjamin Cummings.
4. Hanahan, D.og R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. Volum(1): s. 57-70.
5. Hanahan, D.og R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. Volum(5): s. 646-674.
6. Egeblad, M., E.S. Nakasone, og Z. Werb, *Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism*. Dev Cell, 2010. Volum(6): s. 884-901.
7. Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer*. 2007, NY, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
8. Wirtz, D., K. Konstantopoulos, og P.C. Searson, *The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis*. Nat Rev Cancer, 2011. Volum(7): s. 512-522.
9. Chaffer, C.L.og R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis*. Science, 2011. Volum(6024): s. 1559-1564.
10. Polyak, K.og R.A. Weinberg, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. Nat Rev Cancer, 2009. Volum(4): s. 265-273.
11. Egeblad, M.og Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. Volum(3): s. 161-174.
12. Talmadge, J.E.og I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. Volum(14): s. 5649-5669.
13. Furness, S., et al., *Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy*. Cochrane Database Syst Rev, 2010. Volum(9): s. CD006386.
14. Scully, C.og J. Bagan, *Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications*. Oral Dis, 2009. Volum(6): s. 388-399.
15. Hashibe, M., et al., *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. Volum(2): s. 541-550.
16. Hammarstedt, L., et al., *Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer*. Int J Cancer, 2006. Volum(11): s. 2620-2623.
17. Attner, P., et al., *The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer*. Int J Cancer, 2010. Volum(12): s. 2879-2884.
18. Scully, C.og J. Bagan, *Oral squamous cell carcinoma overview*. Oral Oncol, 2009. Volum(4-5): s. 301-308.
19. *Centers for Disease Control and Prevention. Preventing and controlling oral and pharyngeal cancer. Recommendations from a national strategic planning conference.*, MMWR, Editor. 1998. s. 1-12.
20. Kupferman, M.E.og J.N. Myers, *Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Clin North Am, 2006. Volum(2): s. 229-247.
21. Frantz, C., K.M. Stewart, og V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. Journal of Cell Science, 2010. Volum: s. 4195-4200.
22. Kim, S.H., J. Turnbull, og S. Guimond, *Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor*. J Endocrinol, 2011. Volum(2): s. 139-151.

23. Marastoni, S., et al., *Extracellular matrix: a matter of life and death*. Connect Tissue Res, 2008. Volum(3): s. 203-206.
24. Mekkawy, A.H., D.L. Morris, og M.H. Pourgholami, *Urokinase plasminogen activator system as a potential target for cancer therapy*. Future Oncol, 2009. Volum(9): s. 1487-1499.
25. Amalinei, C., et al., *Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions*. Rom J Morphol Embryol, 2010. Volum(2): s. 215-228.
26. Bauvois, B., *New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression*. Biochim Biophys Acta, 2012. Volum(1): s. 29-36.
27. Klein, T.og R. Bischoff, *Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases*. Amino Acids, 2011. Volum(2): s. 271-290.
28. Roy, R., J. Yang, og M.A. Moses, *Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer*. J Clin Oncol, 2009. Volum(31): s. 5287-5297.
29. Kessenbrock, K., V. Plaks, og Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. Volum(1): s. 52-67.
30. Vincenti, M.P., *The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression*. Methods Mol Biol, 2001. Volum: s. 121-148.
31. Coussens, L.M., B. Fingleton, og L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. Science, 2002. Volum(5564): s. 2387-2392.
32. Lopez-Otin, C.og L.M. Matrisian, *Emerging roles of proteases in tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2007. Volum(10): s. 800-808.
33. Murphy, G.og H. Nagase, *Progress in matrix metalloproteinase research*. Mol Aspects Med, 2008. Volum(5): s. 290-308.
34. Bourboulia, D.og W.G. Stetler-Stevenson, *Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion*. Semin Cancer Biol, 2010. Volum(3): s. 161-168.
35. Brew, K.og H. Nagase, *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity*. Biochim Biophys Acta, 2010. Volum(1): s. 55-71.
36. Dass, K., et al., *Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers*. Cancer Treat Rev, 2008. Volum(2): s. 122-136.
37. Dano, K., et al., *Plasminogen activation and cancer*. Thromb Haemost, 2005. Volum(4): s. 676-681.
38. Jeanes, A., C.J. Gottardi, og A.S. Yap, *Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?* Oncogene, 2008. Volum(55): s. 6920-6929.
39. Gupta, G.P.og J. Massague, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. Volum(4): s. 679-695.
40. Berx, G.og F. van Roy, *Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. Volum(6): s. a003129.
41. Yilmaz, M.og G. Christofori, *Mechanisms of motility in metastasizing cells*. Mol Cancer Res, 2010. Volum(5): s. 629-642.
42. Donato, R., *S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. Volum(7): s. 637-668.
43. Santamaria-Kisiel, L., A.C. Rintala-Dempsey, og G.S. Shaw, *Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family*. Biochem J, 2006. Volum(2): s. 201-214.
44. Donato, R., *Intracellular and extracellular roles of S100 proteins*. Microsc Res Tech, 2003. Volum(6): s. 540-551.
45. Moore, B.W., *A soluble protein characteristic of the nervous system*. Biochem Biophys Res Commun, 1965. Volum(6): s. 739-744.
46. Donato, R., *S-100 proteins*. Cell Calcium, 1986. Volum(3): s. 123-145.

47. Mazzucchelli, L., *Protein S100A4: too long overlooked by pathologists?* Am J Pathol, 2002. Volum(1): s. 7-13.
48. Fritz, G., et al., *Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity.* FEBS J, 2010. Volum(22): s. 4578-4590.
49. Eckert, R.L., et al., *S100 proteins in the epidermis.* J Invest Dermatol, 2004. Volum(1): s. 23-33.
50. Boye, K.og G.M. Maelandsmo, *S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles.* Am J Pathol, 2010. Volum(2): s. 528-535.
51. Ebraldize, A., et al., *Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family.* Genes Dev, 1989. Volum(7): s. 1086-1093.
52. Helfman, D.M., et al., *The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis.* Br J Cancer, 2005. Volum(11): s. 1955-1958.
53. Mishra, S.K., H.R. Siddique, og M. Saleem, *S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence.* Cancer Metastasis Rev, 2011. Volum.
54. Ambartsumian, N.S., et al., *Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene.* Oncogene, 1996. Volum(8): s. 1621-1630.
55. Grum-Schwensen, B., et al., *Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene.* Cancer Res, 2005. Volum(9): s. 3772-3780.
56. Rudland, P.S., et al., *Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer.* Cancer Res, 2000. Volum(6): s. 1595-1603.
57. Fatatis, A., *Signaling Pathways and Molecular Mediators in Metastasis.* 1 ed. 2012, Pennsylvania, USA: Springer Science. 385.
58. Leclerc, E., et al., *Binding of S100 proteins to RAGE: an update.* Biochim Biophys Acta, 2009. Volum(6): s. 993-1007.
59. Bjornland, K., et al., *S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme.* Cancer Res, 1999. Volum(18): s. 4702-4708.
60. Schmidt-Hansen, B., et al., *Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity.* Oncogene, 2004. Volum(32): s. 5487-5495.
61. Saleem, M., et al., *S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. Volum(40): s. 14825-14830.
62. Hammond, S.M., A.A. Caudy, og G.J. Hannon, *Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA.* Nat Rev Genet, 2001. Volum(2): s. 110-119.
63. Castanotto, D.og J.J. Rossi, *The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics.* Nature, 2009. Volum(7228): s. 426-433.
64. Campeau, E.og S. Gobeil, *RNA interference in mammals: behind the screen.* Brief Funct Genomics, 2011. Volum(4): s. 215-226.
65. Paddison, P.J., et al., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells.* Genes Dev, 2002. Volum(8): s. 948-958.
66. Stratagene, *Introduction to Quantitative PCR - Methods and Application Guide.* 2004.
67. Livak, K.J.og T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. Volum(4): s. 402-408.
68. Kupai, K., et al., *Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography.* J Pharmacol Toxicol Methods, 2010. Volum(2): s. 205-209.
69. Snoek-van Beurden, P.A.og J.W. Von den Hoff, *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors.* Biotechniques, 2005. Volum(1): s. 73-83.
70. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.* Nat Cell Biol, 2000. Volum(10): s. 737-744.

71. Gialeli, C., A.D. Theocharis, og N.K. Karamanos, *Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting*. FEBS J, 2011. Volum(1): s. 16-27.
72. Noe, V., et al., *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1*. J Cell Sci, 2001. Volum(Pt 1): s. 111-118.
73. Hua, H., et al., *Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm*. Cell Mol Life Sci, 2011. Volum(23): s. 3853-3868.
74. Poincloux, R., F. Lizarraga, og P. Chavrier, *Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia*. J Cell Sci, 2009. Volum(Pt 17): s. 3015-3024.
75. Moriyama-Kita, M., et al., *Correlation of S100A4 expression with invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2004. Volum(5): s. 496-500.
76. Moriyama-Kita, M., et al., *S100A4 regulates E-cadherin expression in oral squamous cell carcinoma*. Cancer Lett, 2005. Volum(2): s. 211-218.
77. Oliveira, L.R. og A. Ribeiro-Silva, *Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2011. Volum(3): s. 298-307.
78. Novitskaya, V., et al., *Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons*. J Biol Chem, 2000. Volum(52): s. 41278-41286.
79. Kim, J., et al., *Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay*. Cell, 1998. Volum(3): s. 353-362.
80. Hong, S.D., et al., *Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential*. Oral Oncol, 2000. Volum(2): s. 207-213.
81. Patel, B.P., et al., *Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer*. Head Neck, 2007. Volum(6): s. 564-572.
82. MacLeod, R.A., et al., *Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source*. Int J Cancer, 1999. Volum(4): s. 555-563.
83. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase*. J Biol Chem, 1993. Volum(14): s. 10425-10432.
84. Van den Steen, P.E., et al., *Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation*. Biochim Biophys Acta, 2001. Volum(2-3): s. 61-73.
85. li, M., et al., *Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. Volum(1): s. 20-27.
86. Nakamura, M., et al., *Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. Volum(3): s. 1011-1016.
87. Wang, F.Q., et al., *Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase*. Int J Cancer, 2005. Volum(1): s. 19-31.
88. Wang, F., S. Reierstad, og D.A. Fishman, *Matrilysin over-expression in MCF-7 cells enhances cellular invasiveness and pro-gelatinase activation*. Cancer Lett, 2006. Volum(2): s. 292-301.
89. Powell, W.C., et al., *The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis*. Curr Biol, 1999. Volum(24): s. 1441-1447.
90. Patterson, B.C. og Q.A. Sang, *Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9)*. J Biol Chem, 1997. Volum(46): s. 28823-28825.
91. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. Int J Dev Biol, 2004. Volum(5-6): s. 411-424.
92. Lochter, A., et al., *Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells*. J Cell Biol, 1997. Volum(7): s. 1861-1872.
93. Kurahara, S., et al., *Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis*. Head Neck, 1999. Volum(7): s. 627-638.

94. Senolt, L., et al., *S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases*. Ann Rheum Dis, 2006. Volum(12): s. 1645-1648.
95. Ulisse, S., et al., *The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 2009. Volum(1): s. 32-71.
96. Maretzky, T., et al., *ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. Volum(26): s. 9182-9187.