

# **Inflammasjonscytokinmediert MMP produksjon**

5. årsoppgave i Stadium IV – Medisindtudiet ved Universitetet i Tromsø

Lars Sveistrup Kull -01

Veiledere: Jan Olof Winberg og Lars Uhlin Hansen  
Veileder på lab: Eli Berg

Sted: Institutt for Medisinsk Biokjemi UiTø

## INNHALDSFORTEGNELSE

<b>Forside</b>	<b>s</b>	<b>1</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b>	<b>s</b>	<b>2</b>
<b>Oppsummering</b>	<b>s</b>	<b>4</b>
<b>Introduksjon</b>	<b>s</b>	<b>5</b>
<b>MMP struktur</b>	<b>s</b>	<b>5</b>
<b>MMP funksjon</b>	<b>s</b>	<b>5</b>
<b>Regulering</b>	<b>s</b>	<b>6</b>
<b>MMPer og sykdommer</b>	<b>s</b>	<b>6</b>
<b>Cytokiner</b>	<b>s</b>	<b>7</b>
<b>MMP-9/CSPG-komplekser</b>	<b>s</b>	<b>7</b>
<b>Målsetting</b>	<b>s</b>	<b>8</b>
<b>Materiale og metode</b>	<b>s</b>	<b>9</b>
<b>Løsninger og produkter brukt i celleeksperimentene</b>	<b>s</b>	<b>9</b>
<b>Celler</b>	<b>s</b>	<b>10</b>
<b>Celledyrking</b>	<b>s</b>	<b>10</b>
<b>Behandling av celler med cytokiner og PMA</b>	<b>s</b>	<b>10</b>
<b>Høsting av mediet</b>	<b>s</b>	<b>11</b>
<b>Gelzymografi</b>	<b>s</b>	<b>11</b>
<b>Rensing av CSPG fra dyrkningsmediet</b>	<b>s</b>	<b>12</b>
<b>Resultater</b>	<b>s</b>	<b>13</b>
<b>Cellemorfologi</b>	<b>s</b>	<b>13</b>
<b>Produksjon av MMP-9</b>	<b>s</b>	<b>13</b>
<b>MMP-9/CSPG-kompleks</b>	<b>s</b>	<b>14</b>

<b>Diskusjon</b>	<b>s</b>	<b>15</b>
<b>MMP-9 produksjon</b>	<b>s</b>	<b>15</b>
<b>MMP-9/CSPG-kompleks diskusjon</b>	<b>s</b>	<b>16</b>
<b>Cellemorfologi</b>	<b>s</b>	<b>16</b>
<b>Sammenligning med andre forsøk/arbeid</b>	<b>s</b>	<b>17</b>
<b>Figur 1</b>	<b>s</b>	<b>18</b>
<b>Figur 2</b>	<b>s</b>	<b>19</b>
<b>Figur 3</b>	<b>s</b>	<b>20</b>
<b>Figur 4</b>	<b>s</b>	<b>21</b>
<b>Figur 5</b>	<b>s</b>	<b>22</b>
<b>Figur 6</b>	<b>s</b>	<b>23</b>
<b>Tabell</b>	<b>s</b>	<b>24</b>
<b>Kilder</b>	<b>s</b>	<b>25</b>

## OPPSUMMERING

Matrix metalloproteinaser (MMP) er en egen gruppe proteolytiske enzymer. Hos mennesket finnes mer enn 25 forskjellige enzymer som tilhører denne gruppen. De er viktige i flere fysiologiske prosesser, blant annet remodulering av vevet. De har evne til å bryte ned alt ekstracellulært vev i kroppen (1). I tillegg er de involvert i patogenesen ved en rekke ulike sykdommer (2).

Tidligere studier har vist at den leukemiske cellelinjen THP-1 produserer MMP-9. Hvis cellene ble stimulert med phorbol myristate acetate (PMA), produserte de også en heterodimer hvor MMP-9 var bundet til et chondroitin sulfat proteoglykan (CSPG)(3). PMA er et kjemisk stoff som stimulerer celler blant annet via protein kinase C. Dette er en aktiveringsmekanisme som også benyttes av en rekke interleukiner. Et formål med denne 5. årsoppgaven var å undersøke MMP produksjonen i flere forskjellige leukemi/lymfom cellelinjer, deretter å finne ut hvordan ulike interleukiner påvirket produksjonen. ..

Produksjonen av MMP-9 i de leukemiske/lymfom cellelinjene K-562, U266, KMM-1 og NAMALVA ble undersøkt, både før og etter stimulering med IL-alfa, IL-beta, TNF-alfa og PMA . Metodene som ble brukt for å påvise MMP og MMP-)/CSPG kompleks var gelzymografi. Resultatene viste svak eller ingen MMP-9 produksjon hos de ustimulerte cellene, eller bånd tilsvarende MMP-2 produksjon. K-562 lot seg stimulere av IL-alfa, TNF-alfa og PMA til MMP-9 produksjon. U-266 lot seg stimulere av PMA til MMP-9 produksjon. KMM-1 lot seg stimulere av TNF-alfa til MMP-9 produksjon. Det ble ikke påvist produksjon av MMP-9/CSPG-komplekser i noen av cellerekken i forsøket.

## INTRODUKSJON

### MMP struktur

Matrix metalloproteinaser (MMPer) er en gruppe proteolytiske enzymer som kjennetegnes av at de har ett "prodomain/sete, ett aktivt sete og ett  $Zn^{2+}$  -bindingsområdet (se figur 1). Disse enzymene er oppbygget av flere domener (figur 1) der alle har et prodomene og et katalytisk domene som inneholder en katalytisk og en strukturell  $Zn^{2+}$ . Forskjellige MMPer har også litt forskjellig struktur. Membranbundete MMPer binder gjennom transmembran domener (4 MMPer) eller GPI ankerdomene (2 MMPer) (se figur 1). I tillegg består MMPer av signalpeptiddomene, propeptiddomene, katalytisk domene, "hinge" region og "hemopexin" domene. MMP-2 og MMP-9 har 3 repeterende fibronectin type II domener i det katalytiske domenet (1).

### MMP funksjon

MMPer produseres av ulike celler i kroppen, inkludert fibroblaster, keratinocytter, endotel, makrofager og eosinofile (1,3). MMPer bidrar i kroppens oppbygging og remodulering og kan bryte ned alle ekstracellulære proteiner (4,1). Dette er blant annet viktig under embryogenese, angiogenese, sårheling, inflammasjon og infeksjon (2). MMPer kan degradere forskjellige proteiner og har også en rolle i migrering og tilgjengeligheten til ekstracellulære proteiner i det de bryter ned ekstracellulær matriks som har vekstfaktorer bundet til seg. Disse ekstracellulær matriks bundne vekstfaktorene kan derfor bli frigjort og aktivert. (5) De fleste MMPer kan bryte ned collagener, gelatin, fibronectin, elastan og proteoglykaner (6,7). I tillegg kan MMPer aktivere vekstfaktorer (8).

## **Regulering**

MMPenes produksjon, aktivering og inaktivering er strengt regulert. Dette skjer på 2 nivåer: proteinnivå gjennom aktivering, inhibering av sekresjon, shedding og endocytose. Det andre nivået er genuttrykk.(3)

MMPer kan aktiveres av forskjellige agens som p-aminophenylmercuric acetat, SDS, urea, varme og proteaser, inkludert MMPer (3) . Generelt aktiveres løselige MMPer ekstracellulært og MT-MMPer intracellulært (9). Molekylene som påvirker MMPene finnes ekstracellulært, i celledmembranen og i cytoskjelettet. Disse molekylene kan påvirke hverandre og lage signalveier og frakte signaler utenfra og inn til genene(10). For eksempel i et sår i huden hvor basalmembranen blir ødelagt og keratinocytene eksponeres for kollagen i dermis, induseres MMP-1 produksjon i keratinocytene som er med i remodeleringen og oppbyggingen.(11,12). Inhibering av MMPer skjer gjennom forskjellige molekyler, for eksempel alfa2-makroglobulin og vevsinhibitorer av MMPer(TIMPS)(3)

## **MMPer og sykdommer.**

MMPer er involvert i patogenesen ved en rekke sykdommer. Det kan skje på forskjellige måter : for mye MMP kan forsterke tumorgenese, evnen til invasiv vekst(13) emfysem, hyperkeratose, acanthose(1,14) . For lite MMP kan være med i utviklingen av fibrose(15), unormal benutvikling, dvergvekst, artritt og craniofacial dysmorfisme(16). Siden både for mye og for lite MMP kan bidra til sykdomsutvikling viser det at MMPer krever en nøye regulering(2). MMPer er sannsynligvis også med i sykdomsprosessen i hudsykdommer som epidermolysis bullosa (14)scleroderma(17) og psoriasis(18). Samt andre sykdommer som periodontitt(1), atherosclerose(19), Alzheimer´s(20) og cancer(1). Det er kjent at flere cancertyper har større mengder MMPer enn det som er i friskt vev. Det er også en sammenheng mellom mengden MMP og hvor langt canceren har progrediert, og kan derfor

være en prognostisk markør(21) MMPer kan også bidra til metastase ved at deres proteolytiske egenskaper kan hjelpe tumormassen å bryte gjennom basalmembranen og inn i blod- og lymfekar (22).

## **Cytokiner**

Cytokiner er polypeptidkjeder som frigjøres fra de fleste av kroppens celler som svar på bestemt stimuli. Disse binder seg til spesifikke reseptorer, og virker på samme måte som hormoner på auto, para og endokrint nivå. Deres hovedfunksjon kan listes opp i :

Nøkkemediatorer i akutte og kroniske inflammasjoner. Nøkkemediatorer i immunrespons og som ansvarlig for mye av skadene forårsaket av autoimmune sykdommer. Hvis de mangler kan for eksempel immunsupresjon oppstå. I tillegg har de mange flere funksjoner. Blant annet tiltrekker de lymfocytter ved inflammasjonsreaksjoner. IL-1 produseres av mange celletyper blant annet monocytter og makrofager. De virker på CNS og forårsaker feber, søvnighet og svekket appetitt, i tillegg til benmarg, lymfocytter, lever, muskler og cytotoxisk effekt på tumor celler, betaceller og thyroideceller. TNF aktiverer T-lymfocytter, mediator i utvikling av septisk sjokk, dreper malignttumorvev, induserer akutt og senere kronisk inflammasjon. I denne oppgaven er det brukt IL-alfa, IL-beta, TNF-alfa og PMA. Disse er inflammatoriske/proinflammatoriske cytokiner, med unntak av PMA(phorbol myristate acetat) som er syntetisk og simulerer cytokinfunksjon (23).

## **MMP-9/CSPG-komplekser**

Det er vist at MMP-9 kan være bundet kovalent med disulfidbindinger til kjerneproteinet av CSPG og danne en MMP-9/CSPG heterodimer(3). CSPG består av proteoglycaner som er en separat klasse av glukokongjugater, karakterisert av en kjerneproteinsubenheter med sterkt

negativt ladet glycosaminoglycan(GAG) kjeder hvor chondroitinsulfat(CS) og heparin/heparansulfat er to hovedtyper(24). Det er vist at aktiverte makrofager sekreterer CSPG(25). Funksjonen til CSPG er ikke klart definert, men det er vist at CSPG binder andre sekretoriske produkter og makrofager og kan være ett bærermolekyl(26)

### **Målsetting**

Målsettingen med denne oppgaven er å undersøke om cellelinjene som ble brukt i dette forsøket produserte eller lot seg stimulere til MMP-9 produksjon og eventuelt MMP-9/CSPG-kompleks produksjon. Tidligere studier har vist at THP-1 celler som ligner cellene fra dette forsøket ble stimulert til produksjon av MMP-9/CSPG-kompleks etter PMA stimulering (3). Hypotesen det ble arbeidet ut fra på bakgrunn av tidligere studier(3) var at leukemi/lymfom cellelinjene brukt i dette forsøket lot seg stimulere av cytokiner til MMP og kompleksproduksjon.



## MATERIALE OG METODE

### Løsninger og produkter brukt i celleeksperimentene

Safranin O(no. S-2250), phorbol 12-myristat 13-aceetat(PMA), Triton X-100, gelatin er kjøpt fra Sigma. Q-Sepharose, Sephadex G-50 kjøpt fra Amersham Pharmacia Biotec.

Celledyrkning  
RPMI 1640 medium  
Kalveserum  
Celledyrkningsflasker : Nunc T-75

#### Avfargingsløsning

Metanol	120ml
Eddiksyre	40ml
H <sub>2</sub> O	240ml

#### Inkuberingsbuffer

Tris Base	12,1g
Tris HCL	63,0g
NaCl	117g
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	7,4g
Brij 35	0,2%
H <sub>2</sub> O	totalt 1 liter

#### Elektroforesebuffer

Tris base	30g
Glysin	144g
SDS	10g
H <sub>2</sub> O	totalt 1 liter

pH juster til 8,3 med HCL

#### Fargeløsning

Coomasie brillant blue	1g
Metanol	120ml
H <sub>2</sub> O	80ml

#### Vaskebuffer

Triton X-100	10ml
Vann	totalt 400ml løsning

#### Separerende gel

1,5M Tris, pH 8,8	1,12ml
2% Gelatin	0,225ml
H <sub>2</sub> O	1,974
40% Acrylamid	1,166ml
TEMED	7ml
10% Ammoniumpersulfat	15ml

#### Konsentrerende gel

0,5M Tris, pH 6,8	0,186 ml
H <sub>2</sub> O	1,145 ml
40% Acrylamid	0,155 ml
TEMED	4 ml
10 % Amoniumpersulfat	15ml

## Celler

Cellelinjene som ble brukt er dannet fra celler fra pasienter med lymfom/leukemi. Cellelinjen K-562 er fra en pasient med erytroleukemi, U266 og KMM-1 er fra pasienter med myelomatose og NAMALWA er fra pasient med Burkitts lymfom. Cellene er dels innkjøpt fra ATCC, dels gitt i gave fra forskere ved NIH, Bethesda, USA.

## Celledyrking

Cellene ble dyrket i RPMI 1640 medium med 10% kalveserum. I T-75 flasker ved 37 C, 95% luft og 5% CO<sub>2</sub> for å produsere tilstrekkelig mengde celler til å utføre forsøket, hvor hver serie med interleukinstimulering krevde om lag 20 millioner celler. Cellene blir splittet ved en konsentrasjon rund 70 celler per 0,1 mm<sup>2</sup>, vasket med PBS og sådd ut i nye flasker for å unngå celledød grunnet for høy cellekonsentrasjon i mediet.

## Behandling av celler med cytokiner og PMA

Etter celledyrkingen ble cellene vasket med PBS-buffer for å fjerne kalveserum. Dette fordi serumet kan inneholde blant annet MMPer som kan virke inn på resultatene ved zymografi. Cellene ble så inkubert i serumfritt RPMI 1640 medium under forholdene beskrevet under celledyrkingen med interleukinene i ulike konsentrasjoner.

Alle cellene ble stimulert med de samme interleukinene i de samme konsentrasjonene.

IL-alfa ble brukt i konsentrasjonene 1 pg/ml, 10 pg/ml, 0,1 µg/ml og 1 µg/ml.

IL-beta ble brukt i konsentrasjonene 1 pg/ml, 10 pg/ml, 0,1 µg/ml og 1 µg/ml

TNF-alfa ble brukt i konsentrasjonene 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml og 20 ng/ml.

PMA ble brukt i konsentrasjonene  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M og  $10^{-4}$  M.

Cellene ble mikroskopert med 40 X forstørrelse før og etter dyrking og inkubering for å se om cellene forandret utseende. Med tanke på form, størrelse, farge og om de fester seg til underlaget, hverandre eller flyter fritt i mediet.

### **Høsting av mediet**

Etter inkuberingen ble dyrkningsmediet sugd av brønnene som cellene ble inkubert i, sentrifugert og sugd av igjen. Det cellefrie dyrkningsmediet ble så overført til nye rør.. Cellene vil kunne påvirke resultatet i zymografien hvis de ikke fjernes.

### **Gel Zymografi**

SDS-PAGE ble utført med 7,5 cm X 8,5 cm X 0,75 mm gel. Med gelatin 0,2% i konsentrerende gel og 0,2% i separerende gel. (71 B)(se side 6). 6 µl prøve ble blandet med 2,5 µl sample buffer. 7 µl av denne løsningen ble tilsatt gelen. Gelen ble kjørt med likestrøm mellom 16 og 20 mA i zymografibuffer og med vannkjøling. Gelen ble vasket i vaskebuffer(se side 6) og inkubert i inkuberingsbuffer (se side 5) i 12 timer ved 37 °C. Gelene ble farget med Coomassie Blue løsning(se side 6) og avfarget med avfargingsløsning(se side 5)

Gelatinaseaktivitet vises som oppklaringer (ufargete områder) i form av bånd. Dette fordi enzymer som er aktivert bryter ned substrat (gelatin) i gelen som binder farge.

Hver gel hadde 1-2 standarder med medium fra THP-1 celler som hadde kjent innhold av MMP-9 og MMP-2. Dette for å ha en referanse å sammenligne båndene i zymografigelene med. Etter avfargingen scannes gelene og oppbevares i vann med eddiksyre.

### **Rensing av CSPG fra dyrkningsmediet**

For rensing av CSPG fra dyrkningsmedium ble det brukt Q-sepharose ionebytterkromatografi (som beskrevet i (5, 27)) Det brukes en gel som ekvilibrerer med buffer for å få rett pH(6,0). Bufferen består av 0,05 M natriumacetat(pH 6,0), og 6.0 M urea 0,35 M NaCl. Ved disse forholdene binder CSPG og MMP-9/CSPG-komplekset (sterkt negativt ladede molekyler), mens ubundet MMP-9 vaskes ut. Dyrkningsmediet tilsettes gelen og gelen vaskes på nytt med 20 ml av bufferen (se begynnelsen av avsnittet) for å vaske ut det fra cellemediet som ikke har festet seg. For å skille ut MMP-9/CSPG kompleks fra kolonnen vaskes så gelen med 1,5 M NaCl som vasker ut CSPG og MMP-9/CSPG-kompleks og samles opp i fraksjoner av ca 1 ml. Ved denne saltkonsentrasjonen løsner CSPG fra gelen . For å se om det er CSPG i materialet som har gått gjennom gelsøylen tilsettes safranin, som gir fargeomslag hvis CSPG er tilstede. Fraksjonene med fargeomslag renses så gjennom Sephadex G-50 søyler for å fjerne salt. I disse gelsøylene går store molekyler raskest gjennom, det vil si CSPG og MMP-9/CSPG kompleks som er store molekyler, kommer ut først. 1,0 ml prøve fra Q-sepharoserensingsmaterialet appliseres på gelen og elueres med 1,5 ml vann for at store molekyler inkludert CSPG-kompleks elueres ut og salt filtreres bort. Prøvematerialet konsentreres på speedvac. Det konsentrerte materialet kjøres så gjennom gelzymografi (som beskrevet over).

## RESULTATER

### Cellemorfologi

Cellene ble mikroskopert med 40 X forstørrelse før og etter dyrking og inkubering for å se om cellene forandrer utseende. Ingen av cellene var adherente til flaskene som ble brukt til dyrking. Morfologien var mer eller mindre uforandret etter dyrkingen, men hvis cellekonsentrasjonen ble for høy ble celledødligheten høy. Det viste seg ved mikroskopi hvor det var øket antall sprukne celler og løst cellemateriale. Cellene varierte i tillegg mer i størrelse og formen var mer ujevn og mindre rund. Når cellene ble dyrket i serum var de ikke adherent til underlaget. Da serum ble fjernet under stimuleringsforsøkene ble cellene adherente.

### Produksjon av MMP-9

Det var lite eller ingen detekterbar produksjon av MMP-9 eller andre MMPer på bakgrunn av gel-zymografi fra cellemediene hvor cellene ikke var blitt stimulert.

Som det fremgår av figur 2 og 3 og tabell, produserte K562 celler som var stimulert med PMA og TNF-alfa mer MMP-9 enn ustimulerte celler. PMA i konsentrasjon  $10^{-5}$  M ga mest MMP-9 produksjon. TNF-alfa i høyeste konsentrasjon brukt i forsøket (20 ng/ml) ga mest MMP-produksjon. Det ser derfor ut som MMP-9 produksjon er konsentrasjonsavhengig ved TNF-alfa og PMA stimulering hos K-562. Interleukin alfa og beta ga ingen påvisbar økning i MMP-9 produksjon i K-562 cellene i dette forsøket. Det kan allikevel ikke utelukkes at

Interleukin alfa og beta kan stimulere til MMP produksjon ved andre konsentrasjoner og andre inkuberingstider enn de brukt i dette arbeidet.

U266 lot seg også stimulere av PMA til økt MMP-9 produksjon, som det fremgår av figur 4 og tabell. PMA i konsentrasjonen  $10^{-7}$  M stimulerer til mest produksjon av MMP-9. Det ser ut til at PMA i konsentrasjonen  $10^{-7}$  M er et toppunkt med tanke på MMP-9 produksjon, hvor lavere og høyere konsentrasjoner av PMA ga mindre MMP-9 produksjon som det fremgår av figur 3. MMP-9 produksjonen hos U-266 ved PMA stimulering så derfor ut til å være konsentrasjonsavhengig. U266 lar seg ikke stimulere av interleukin alfa, beta eller TNF-alfa., som det fremkommer av tabellen.

KMM-1 lot seg simulere til MMP-9 produksjon av TNF-alfa og PMA som det fremgår av figur 5, 6 og tabell. Stimulert med PMA er  $10^{-5}$  M og  $10^{-6}$  M konsentrasjonene som gir mest MMP-produksjon. Stimulert med TNF-alfa er 0,1 ng/ml og 1 ng/ml konsentrasjonene som gir mest MMP-produksjon. Det ser derfor ut som MMP-9 produksjon er konsentrasjonsavhengig ved TNF-alfa og PMA stimulering hos KMM-1. Stimulert med IL-a og IL-b er det ingen (detekterbar)produksjon av MMP-9 som det fremkommer av tabell.

NAMALWA lot seg ikke stimulere i av TNF-a, IL-a, IL-b, eller PMA til (påvisbar) MMP-9 produksjon, som det fremkommer av tabell. Men det kan allikevel ikke utelukkes at cellene lar seg stimulere av disse interleukinene ved andre konsentrasjoner.

### **MMP-9/CSPG-kompleks**

Det var ingen detekterbar produksjon av MMP-9/CSPG-kompleks ved bruk av Q-sepharose ionebytterkromatografi og gel-zymografi.

## DISKUSJON

Hovedmålet med oppgaven har vært å finne ut om og i tilfelle hvilke MMPer cancercellelinjene U-266, K-562, NAMALWA og KMM-1 produserer under stimulering fra de inflammatoriske cytokinene IL-a, b, TNF-a og syntetiske PMA..

Økt sekresjon av MMPer er en viktig del i mange inflamatoriske prosesser. Det kan føre til forandring i vevstruktur. Og spesielt MMP-9 har vist seg å være sentral i ubalansen i reguleringen av ekstracellulær matrix som er assosiert med sykdommer som reumatoid arthritt, fibrose, lunge, hud og nyresykdommer(17)Inflammatoriske cytokiner viser seg å stimulere flere av cellerekkene som er undersøkt til MMP-9 produksjon i disse forsøkene.

### MMP-9 produksjon

Ingen av cellerekkene lot seg stimulere av IL-alfa og beta i de konsentrasjonene som ble brukt i denne oppgaven. Alle cellerekkene ble stimulert med cytokinene over en 72 timers periode. Vi ser at de fleste cellerekkene lot seg stimulere av enkelte cytokinene til MMP-produksjon. Og det viser seg at enkelte konsentrasjoner av cytokinene stimulert til mer MMP produksjon enn andre.

Cellelinjene brukt i forsøkene er lymfom/leukemicellelinjer. Med tanke at dette er fire forskjellige cellelinjer kunne man tenke seg at de fire cellelinjene reagerte forskjellig ut fra hvilken av cellelinjene de tilhørte. NAMALWA, U266 og KMM-1 er celler fra lymfom rekken. Man kunne derfor tenke seg at dette gjenspeilte seg i responsen på interleukinstimuleringen med tanke på MMP produksjon og kompleksproduksjon. Det viste seg at responsen til U266 og KMM-1 samsvarer på PMA stimulering(med MMP-9

produksjon), men at derimot bare KMM-1 lot seg stimulere av TNF-alfa (til MMP-9 produksjon). NAMALWA lot seg ikke stimulere av noen av interleukinene (til MMP produksjon). K-562 som tilhører erytroleukemilinjens og dermed skiller seg fra de andre cellelinjene i forsøket svarte på PMA og TNF-alfa. I dette forsøket reagerer erytroleukemilinjens på samme stimulering med cytokiner som lymfomcellelinjene. Ut fra resultatene (figur 1-6) og tabell ser man at det er PMA som stimulerer flest cellelinjer. PMA stimulerer alle cellene unntatt NAMALWA, som for øvrig ikke lar seg stimulere av noen av cytokinene brukt i forsøket.

Metoden for å påvise MMP-er brukt i dette arbeidet var gelzymografi. Den er best på gelatinaser, dvs MMP-9 og MMP-2. Det kan derfor ikke utelukke produksjon av andre MMP-er som denne testen ikke er like sensitiv for.

### **MMP-9/CSPG-kompleks diskusjon**

Det ble ikke påvist kompleks i cellemediene fra cellerekken. Det er tidligere påvist at THP-1 celler som ligner cellene brukt i forsøket produserer MMP-9/CSPG kompleks(5). Metodene som ble brukt var Q-sepharose anion-exchange chromatography og gelzymografi. Det kan allikevel ikke utelukkes at cellene ikke produserer MMP-9/CSPG-kompleks siden det var relativt små fraksjoner cellemedium som ble undersøkt. Det er så små mengder at det kan være vanskelig å detektere.

### **Celle morfologi**

Mikroskopi viste at cellene forandret seg lite morfologisk etter stimulering. Formen var mer eller mindre uforandret etter dyrking og innkubering med interleukiner. Ubehandlete celler viste seg å være morfologisk lik cellene som var stimulert med cytokiner. Noe som tyder på at

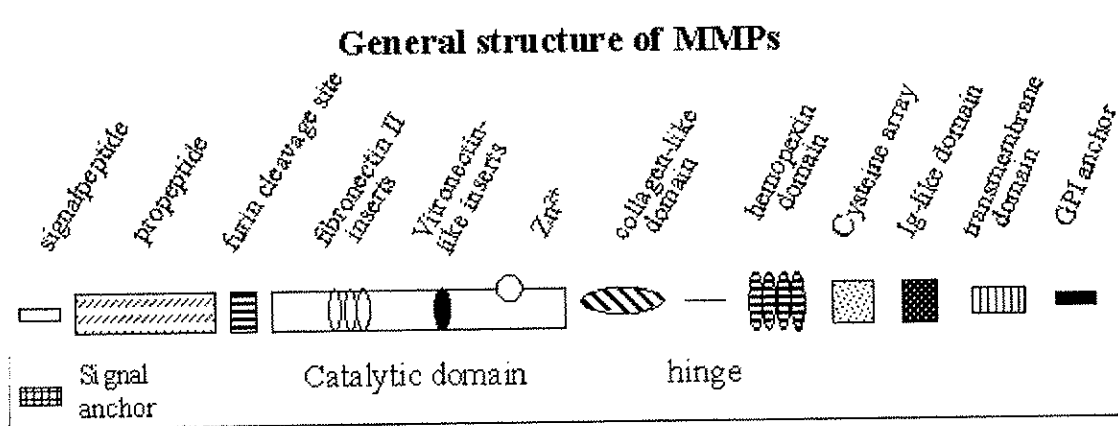


interleukinstimulering ikke fører til celleforandringer som påvirker morfologien som er synlig i mikroskop med 40 X forstørrelse. Det viser seg at ved for stor celletetthet øker celledødligheten.

### **Sammenligning med andre forsøk/arbeid**

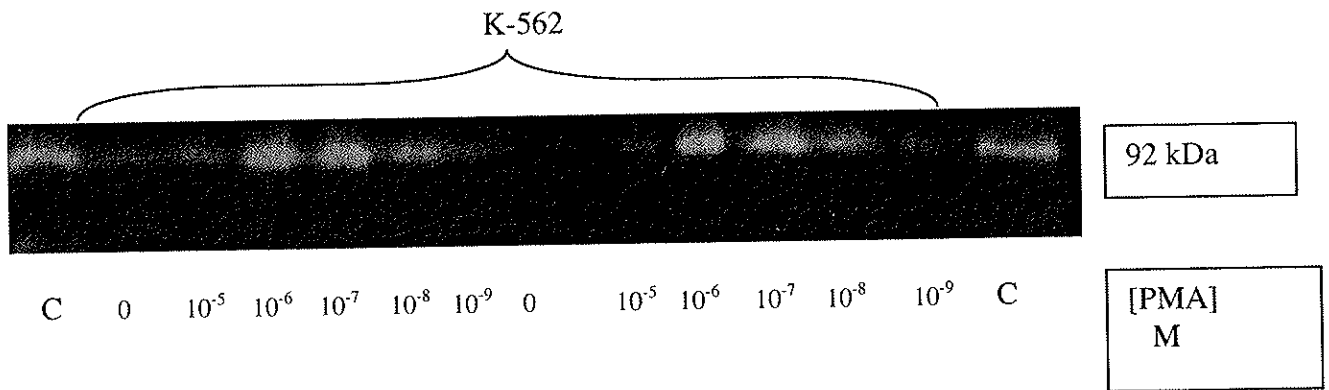
Det er vanskelig å finne resultater fra lignende forsøk med cellerekkene og interleukinene brukt i dette arbeidet å sammenligne resultatene med. Resultatene fra disse forsøkene er derfor ekstra interessante. Det vil muligens samtidig knyttes en større usikkerhet til resultatene siden det ikke er andre resultater å støtte seg til.

Mer kunnskap om MMPer og hva som stimulerer dere produksjon, inhibisjon og funksjon kan være med på å øke forståelsen av kroppsfunksjoner. Både vanlige fysiologiske som reproduksjon, vekst og utvikling. Og ved patologiske prosesser som patologisk benresorpsjon, inflammasjon, infeksjon og malignitet. Økt kunnskap her kan i beste fall hjelpe til å kurere patologiske tilstander og opprettholde normale fysiologiske kroppsfunksjoner. Her er også kunnskap om regulering av MMPer viktig, med tanke på aktivering og inhibering.(20) .Mye arbeid gjenstår på dette feltet, men samtidig gjøres det en stor forskningsinnsats på dette feltet internasjonalt innen flere fagområder.



Figur 1

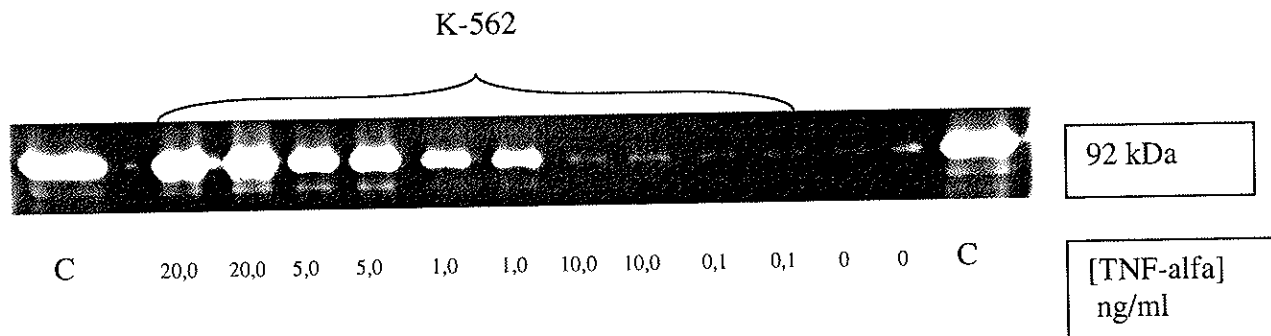
- Figuren viser generell tegning av domenestruktur i MMPer. Kopiert fra Berit Mathisens doktoravhandling (IMB UiTø september 2004)



Figur 2

**Gelatin SDS-PAGE-gelelektroforese**

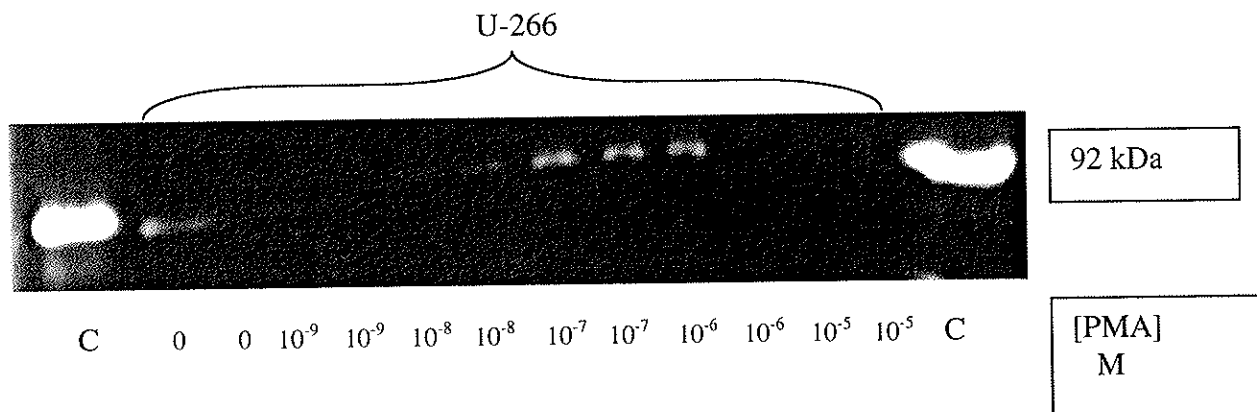
- C er standard = rensa MMP-9 med molekylvekt 92 kDa
- Dette er medium fra K-562 celler stimulert med ulike konsentrasjoner PMA. Prøven ble applisert på gelatin-SDS-PAGE-gel, som beskrevet i materiale og metode.
- 0 er kontroll, som er ustimulert prøve



Figur 3

### Gelatin SDS-PAGE-gelelektroforese

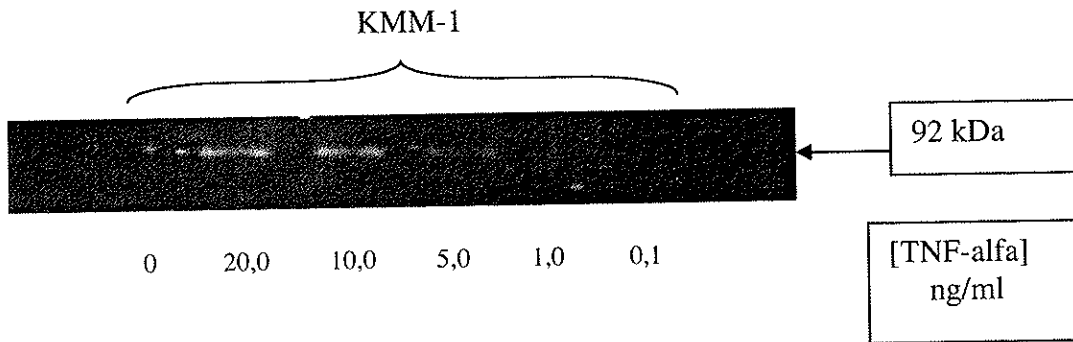
- C er standard = rensa MMP-9 med molekylvekt 92 kDa
- Dette er medium fra K-562 celler stimulert med ulike konsentrasjoner av TNF-alfa. Prøven ble applisert på gelatin-SDS-PAGE-gel, som beskrevet i materiale og metode.
- 0 er kontroll, som er ustimulert prøve



Figur 4

**Gelatin SDS-PAGE-gelelektroforese**

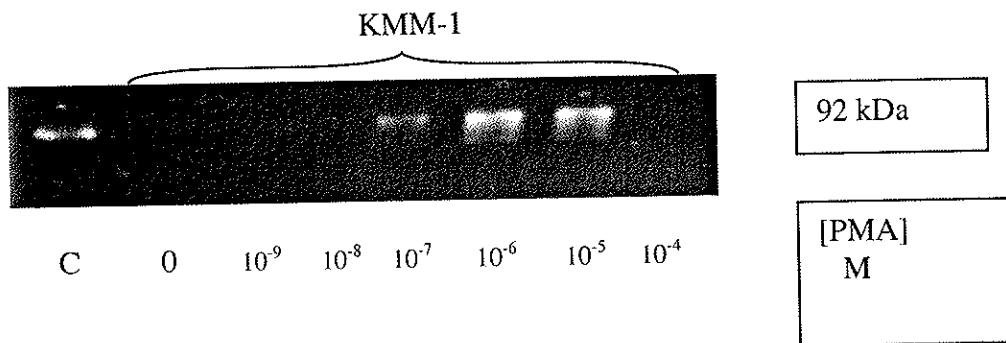
- C er standard = rensa MMP-9 med molekylvekt 92 kDa
- Dette er medium fra U-266 celler stimulert med ulike konsentrasjoner PMA. Prøven ble applisert på gelatin-SDS-PAGE-gel, som beskrevet i materiale og metode.
- 0 er kontroll, som er ustimulert prøve



Figur 5

### Gelatin SDS-PAGE-gelelektroforese

- Dette er medium fra KMM-1 celler stimulert med ulike konsentrasjoner av TNF-alfa. Prøven ble applisert på gelatin-SDS-PAGE-gel, som beskrevet i materiale og metode.
- Pilen viser posisjonen på standarden.
- 0 er kontroll, som er ustimulert prøve



Figur 6

### Gelatin SDS-PAGE-gelelektroforese

- C er standard = rensa MMP-9 med molekylvekt 92 kDa
- Dette er medium fra KMM-1 celler stimulert med ulike konsentrasjoner av TNF-alfa.
- Prøven ble applisert på gelatin-SDS-PAGE-gel, som beskrevet i materiale og metode.
- Pilen viser posisjonen på standarden.
- 0 er kontroll, som er ustimulert prøve

## TABELL : PRODUKSJON AV MMP-9

cellelinje	vekstfaktor			
	TNF-a	IL-b	IL-a	PMA
K-562 +	++	-	+	+
U-266 -	-	-	-	+
KMM-1	+	-	-	+
NAMALWA	-	-	-	-

++ betyr stor respons på vekstfaktor (med tanke på MMP produksjon)

+ betyr respons på vekstfaktor (med tanke på MMP produksjon)

- betyr ingen respons på vekstfaktor



## Kilder

1. Birkedal-Hansen H, Moore W et al. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1993; 4(2): 197-250
2. Van den Steen P, Dubois B et al. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9(MMP-9). *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 37: 375-536
3. Winberg J, Uhlin-Hansen L et al. Calcium-induced activation and truncation of promatrix metalloproteinase-9 linked to the core protein of chondroitin sulfate proteoglycans. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270: 3996-4007
4. Zecchin K, Periera M, Coletta R et al. Ovariectomy Reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. *Calcified Tissue international* 2004; 76(2): 136-145
5. van Hinsbergh V, Engelse M et al. Arteriosclerosis, Trombosis, and Vascular Biology. 2006; 26: 716
6. Labat-robot, Bihari-Varga M et al. Extracellular matrix. *FEBS Lett.* 1990; 268(2): 386-93
7. Wight T, Kinsella M et al. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr opin cell boil* 1992; 4(5): 793-801.
8. Imai K, Hiramatsu et al. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J.* 1997; 322: 809-814.
9. Sato H, Kinoshita T et al. Activation of a membrane type 1-matrix metalloproteinase(MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-2. *FEBS Letters* 1996; 393: 101-104
10. Yamada K, Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Current opinion in Cell Biology* 1995; 7: 681-9.
11. Sundbeck B, Pilcher B et al. Induction and Repression of Collagenase-1 by Keratinocytes Is controlled by Distinct Components of Different Extracellular Matrix Compartments. *J Clin Invest* 1993; 92: 2858-66
12. Saarialho-Kere, Kovacs S et al. Cell-Matrix Interactions Modulate Intestinal Collagenase Expression by Human Keratinocytes Actively Involved in Wound Healing. *J Biol. Chem.* 1997; 272: 22103-10.
13. Vijayababu M, Arunkumar A, Kanagaraj P et al. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostata cancer cells(PC3). *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 287: 109-116)

14. Kahari V, Saarialho-Kere U Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol* 1997; 6: 199-213
15. Soots A, Inkinen K, Krogerus L et al. Fibrosis and matrix metalloproteinases in rat renal allografts. *Transplant international* 2005; 18: 506-512
16. Holmbeck K, Bianco P et al. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999; 99: 81-92.
17. Murota H, Hamasaki Y et al. Disruption of tumor necrosis factor receptor p55 impairs collagen turnover in experimentally induced sclerodermic skin fibroblasts. *Arthritis rheum* 2003; 48(4): 1117-25.
18. Wysocki A, Staiano-Coico L et al. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993;101(1):64-8
19. Derosa G, D'Angelo A, Ciccarelli L et al. Matrix Metalloproteinase-2, -9, and tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Patients with Hypertension. *Endothelium* 2006; 13: 227-231
20. White A, Hoke D et al. Degradation of the Alzheimer Disease Amyloid beta-peptide by Metal dependent Upregulation of Metalloprotease Activity. *J. Biol. Chem* 2006; 26: 17670-17680.
21. Kahari V, Vihinen P et al. High Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-9 and Matrix Metalloproteinase-1 Are Associated with Rapid Progression in Patients with Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 5158-5166
22. McCawley L, Matrisian L. Matrix Metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Molecular Medicine Today* 2000; 6 (4): 149-156
23. Majno G, Joris I. Cells, Tissues, and disease, *Principles of General Pathology* ; 1996: 349-353
24. Kjellen L, Lindal U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem* 1992; 60: 443-475
25. Uhlin-Hansen, L, Kjellen T et al. Proteoglycan metabolism in normal and inflammatory human macrophages. *Blood* 1993; 82, 2880-2888
26. Kolset S, Mann D et al. Serglycin-binding proteins in activated macrophages and platelets. *J. Leukoc. Biol* ; 1996: 59; 545-554