

# Legumain i samspillet mellom tykktarmkreftceller og makrofager

**Kjersti Bergh Ånonsen**



## **Mastergradsoppgave i farmasi**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Vår 2013

# Legumain i samspillet mellom tykktarmkreftceller og makrofager

**Kjersti Bergh Ånonsen**



**Mastergradsoppgave i farmasi**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Vår 2013

**Veiledere og medveiledere:**

Professor Rigmor Solberg  
Professor Harald Thidemann Johansen  
Stipendiat Robert Smith

© Kjersti Bergh Ånonsen

2013

Legumain i samspillet mellom tykktarmkreftceller og makrofager

Kjersti Bergh Ånonsen

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap på Farmasøytisk institutt under veiledning av professor Rigmor Solberg, professor Harald Thidemann Johansen og stipendiat Robert Smith.

Først av alt vil jeg rette en kjempestor takk til mine hovedveiledere Rigmor Solberg og Harald Thidemann Johansen for god veiledning, oppfølging, rådgivning og et stort engasjement gjennom hele masteroppgaven. Tusen takk til Robert Smith for gode innspill, for hjelp til tekniske problemer og for din tilgjengelighet underveis. I tillegg vil jeg rette en takk til avdelingsingeniør Hilde Nilsen for hyggelige samtaler og god opplæring i det praktiske laboratoriearbeidet, og ikke minst for å ha tatt hånd om cellene mine i mitt fravær.

Jeg ønsker å takke alle medstudenter i kull 2013 for fem fine år, og alle i 4.etasje på Farmasøytisk institutt. Disse årene hadde ikke vært de samme uten dere!

Takk til mamma og pappa som alltid har hatt troen på meg, og som har støttet meg gjennom disse fem årene. Sist, men ikke minst, vil jeg takke min kjære Anders for tålmodighet, latter og støtte gjennom hele året.

Blindern, mai 2013

Kjersti Bergh Anonsen

# Sammendrag

Legumain, en asparaginyll endopeptidase, er uttrykt i de fleste normale humane vev, men proteasen er overuttrykt i faste svulster, blant annet ved tykktarmkreft. Tumorassosierte makrofager (TAMs) overuttrykker legumain, og det er nylig vist at hemming av TAMs reduserer tumorvekst og angiogenese. Legumain finnes både intracellulært i lysosomene og bundet til integriner på celleoverflater, men kan også skilles ut fra celler som overuttrykker legumain. Endopeptidasen prosesserer og/eller aktiverer andre proteaser som bryter ned ekstracellulær matriks, som pro-MMP2 og cathepsiner. Disse proteasene er assosiert med økt celleмиграsjon og invasivitet, og høyt uttrykk av legumain er forbundet med dårlig prognose. Legumain i samspillet mellom makrofager og kreftceller ser derfor ut til å spille en viktig rolle i utviklingen av kreft. Dette samspillet er nylig vist for andre cysteinproteaser som cathepsin B og S ved brystkreft. I denne oppgaven undersøkes makrofager og tykktarmkreftceller hver for seg og i kokultur, med spesielt fokus på legumain. I tillegg studeres legumain og viabilitet av cellene etter påvirkning av paklitaksel, en cytotoksisk tubulinhemmer.

Humane HCT-116-tykktarmkreftceller og PMA-differensierte THP-1-makrofager ble hovedsakelig brukt som cellemodeller. Kondisjonert cellemedium ble samlet etter henholdsvis 4 dager for HCT-116, og etter 3-6 og 6-10 dager (etter PMA-behandling) for THP-1, og brukt som reagens i indirekte kokultur. Legumain ble analysert med enzymaktivitetsmålinger ved hjelp av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat, og celleviabilitet ble målt med MTS, både i indirekte og direkte kokulturer. Etter inkorporering av [<sup>3</sup>H]-tymidin ble celleмиграsjon studert ved brønninnlegg med og uten Matrigel og beregnet ved å telle radioaktivitet av merkede, migrerte celler i en scintillasjonsteller.

Resultatene viste en doseavhengig reduksjon i celleviabilitet av både tykktarmkreftceller og makrofager etter stimulering med paklitaksel (1-500 nM) når cellene ble behandlet hver for seg. Tilsvarende direkte kokulturinkubering førte derimot til økt celleviabilitet sammenliknet med ubehandlet kokultur. Videre var det en tendens til økt legumainaktivitet i tykktarmkreftceller som ble stimulert med kondisjonert medium fra makrofager, og redusert legumainaktivitet i makrofager dyrket i kondisjonert medium fra tykktarmkreftceller. Det ble

også observert en tendens til økt motilitet av tykktarmkreftceller i nærvær av makrofager, mens det ikke var forskjell i cellenes evne til invasjon gjennom Matrigel.

Resultatene indikerer at makrofager skiller ut faktorer som fører til økt legumainaktivitet og økt motilitet av tykktarmkreftceller. Disse observasjonene, samt økt celleviabilitet av kokulturen etter behandling med paklitaxel bekrefter et samspill mellom celletypene, men mekanismene som er involvert er ukjente og må undersøkes nærmere.

# Forkortelsesliste

ABC	«ATP-binding cassette»
AEP	Asparaginyln endopeptidase
ATCC	«American Type Culture Collection»
ATP	Adenosintrifosfat
BSL	«Biosafety level»
cDNA	«Complementary DNA»
CO <sub>2</sub>	Karbondioksid
DMEM	«Dulbecco's Modified Eagles Medium»
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DTT	Ditiotreitol
ECL	«Enhanced chemiluminescence»
ECM	Ekstracellulær matriks
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
FBS	«Fetal Bovine Serum»
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase
GDP	Guanosindifosfat
GTP	Guanosintrifosfat
HCT-116	«Human colorectal adenocarcinoma 116 cells»
HEK293	«Human embryonic kidney 293 cells»

HRP	«Horseradish»-peroksidase
IC <sub>50</sub>	«Half maximal inhibitory concentration»
IC <sub>80</sub>	«80 percent inhibitory concentration»
kDa	Kilodalton
MDR	«Multidrug resistance protein»
MHC	«Major histocompatibility complex»
MMP	Matriksmetalloproteinase
mRNA	«Messenger RNA»
MTS	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
NaCl	Natriumklorid
PBS	Fosfatbufret saltvann
PES	Fenazinetosulfat
P-gp	Permeabilitets-glykoprotein
PMA	«Phorbol 12-myristate 13-acetate»
Rpm	Runder per minutt
RPMI	«Roswell Park Memorial Institute medium»
SDS	Natriumdodesylsulfat
SEM	«Standard error of the mean»
TAMs	Tumorassosierte makrofager
VEGF	Vaskulær endotelial vekstfaktor



Z-Ala-Ala-Asn-AMC      Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-(4-metyl)-  
kumarylamid

# Innholdsfortegnelse

Forord .....	II
Sammendrag .....	III
Forkortelsesliste .....	V
Innholdsfortegnelse .....	VIII
1 Innledning.....	1
1.1 Kreft.....	1
1.1.1 Definisjon .....	1
1.2 Kolorektalkreft.....	2
1.2.1 Forekomst.....	2
1.2.2 Årsak .....	2
1.3 Paklitaksel.....	3
1.3.1 Bakgrunn .....	3
1.3.2 Mikrotubuli.....	3
1.3.3 Virkningsmekanismen til paklitaksel .....	4
1.3.4 Paklitaksel og p-glykoprotein.....	5
1.4 Zosuquidar (LY335979).....	6
1.5 Proteaser .....	7
1.6 Legumain .....	8
1.6.1 Autoaktivering av legumain .....	8
1.6.2 Påvirkningen fra legumain i utviklingen av tykktarmkreft .....	9
1.6.3 Tumorassosierte makrofager .....	11
2 Mål for oppgaven .....	12
3 Materialer og metoder .....	13
3.1 Kjemikalier og reagenser.....	13
3.2 Utstyr .....	15
3.3 Celledyrking .....	16
3.3.1 HCT-116-celler .....	16
3.3.2 THP-1-celler.....	16
3.3.3 RAW264,7-celler .....	16
3.3.4 HEK293-celler .....	16
3.3.5 M38L-celler.....	17

3.3.6	Tining og utsåing av celler .....	17
3.3.7	Splitting av celler .....	17
3.3.8	Telling av celler.....	18
3.3.9	Høsting av celler.....	18
3.4	Totalproteinmåling .....	19
3.5	Enzymaktivitetsmåling .....	19
3.6	Celleviabilitetsmåling (MTS).....	20
3.7	Immunoblotting (Westernblotting).....	21
3.8	Kokulturinkubasjon .....	22
3.8.1	Direkte kokultur .....	22
3.8.2	Indirekte kokultur.....	22
3.9	Statistiske analyser .....	23
4	Resultater.....	24
4.1	Paklitaxsel hemmer celleviabilitet av tykktarmkreftceller og makrofager, men ikke i direkte kokultur .....	24
4.2	Hemmer av p-gp påvirket ikke toksisk effekt av paklitaxsel i kreftceller og makrofager .....	25
4.3	Paklitaxsel hemmer intracellulær legumainaktivitet i tykktarmkreftceller, men ikke i makrofager .....	26
4.4	Paklitaxsel og zosuquidar påvirker ikke legumainaktivitet i makrofager .....	28
4.5	Kondisjonert cellemedium fra makrofager hemmer celleviabilitet av tykktarmkreftceller.....	29
4.6	Kondisjonert cellemedium fra makrofager ser ut til å øke legumainaktivitet i tykktarmkreftceller.....	30
4.7	Kondisjonert cellemedium fra tykktarmkreftceller ser ut til å redusere legumainaktivitet i makrofager .....	31
4.8	Legumainaktiviteten øker i kokulturer med makrofager og celler som overuttrykker legumain .....	32
4.9	Tendens til økt motilitet av tykktarmkreftceller i nærvær av makrofager.....	34
5	Diskusjon.....	36
5.1	Valg av cellemodeller.....	37
5.2	Betydningen av kokultur på celleviabilitet og legumainaktivitet.....	38
6	Konklusjon .....	44
	Litteraturliste .....	45
	Vedlegg .....	48

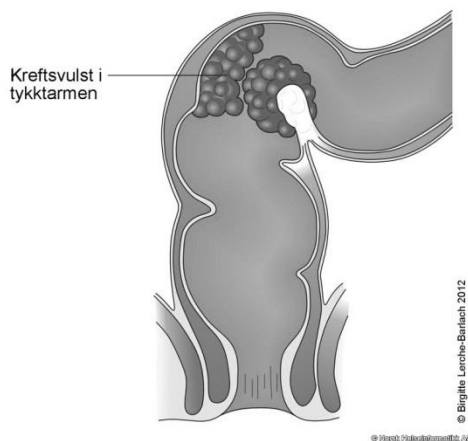
Poster..... 51

# 1 Innledning

## 1.1 Kreft

### 1.1.1 Definisjon

Kreft er ikke en egen sykdom i seg selv, men en fellesbetegnelse på en gruppe sykdommer. I menneskekroppen foregår det hele tiden vekst og fornyelse av ulike typer celler, og dette styres av gener som kontrollerer de ulike fasene i celledyklusen. Cellene produseres ved at de dobler sitt arvestoff og deler seg i to. Kroppens organer er bygd opp av forskjellige typer celler, og deres egenskaper avhenger av hva slags funksjon cellene har. Ved kreft har det skjedd en feil i den vanlige celledyklusen, og cellene deler seg ukontrollert. Dette resulterer i at cellene ikke utfører de oppgavene de skal, og det skjer etter hvert en opphopning av kreftceller (svulst) i det organet der den ukontrollerte celledelingen startet. Dannelse av svulst kan oppstå i hele kroppen, blant annet i tykktarmen (Fig. 1.1). Svulster kan spre seg dersom de klarer å løsrive seg fra stedet der de oppsto. De føres da med lymfe- og blodårer til andre deler av kroppen, og har den egenskapen at de kan trenge inn i andre vev som ikke egentlig er deres. Kreftcellene kan dermed danne nye svulster i det nye vevet, og disse svulstene kalles metastaser [1].



Figur 1.1 Kreftsvulst i tykktarmen [2].

## 1.2 Kolorektalkreft

### 1.2.1 Forekomst

Kolorektalkreft, som er kreftsvulst i tykk- eller endetarm, er den tredje mest vanlige kreftformen på verdensbasis, og står for en stor del av dødsfallene forårsaket av kreft [2, 3]. Det er den nest vanligste kreftformen hos menn (etter prostatakreft) og kvinner (etter brystkreft), og tusenvis av nye tilfeller registreres i Norge hvert år [4]. Fordelingen av antall nye tilfeller er tilnærmet lik mellom kvinner og menn, og i likhet med alle typer kreft kommer insidensen av sykdommen trolig bare til å øke i tiden fremover. Grunnen til dette er i hovedsak at levealderen stiger [4]. Jo tidligere kolorektalkreft blir oppdaget, desto større er mulighetene for overlevelse. Femårsoverlevelsen for både tykk- og endetarmskreft er rundt 60 % for menn og 65 % for kvinner. Sjansen for tilbakefall av sykdommen er størst innen de første to årene etter man er blitt erklært frisk, og etter fire år er kan man i de fleste tilfeller konkludere med at man er helt helbredet for sykdommen [2].

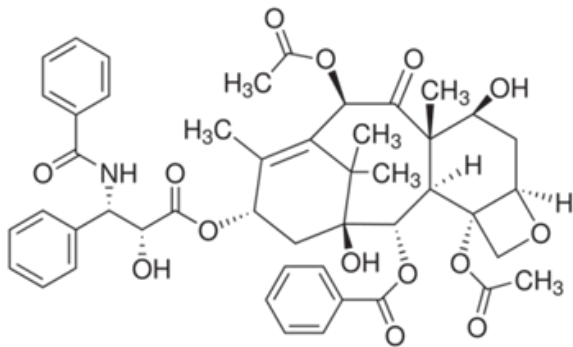
### 1.2.2 Årsak

Årsaken til tykktarmkreft er i de aller fleste tilfeller ukjent. Forskere har imidlertid funnet ut at 2-5 % av de som diagnostiseres med sykdommen har den arvelige formen Lynchs syndrom, eller familiær kreftsykdom, som det også kalles [2, 5]. Det samme gjelder forekomsten av tarmsykdommen adenomatøs polypose. Andre tarmsykdommer som Crohns sykdom og ulcerøs kolitt kan også være med på å gi økt risiko for kreft i tykktarmen [2]. I tillegg antas det at miljøfaktorer er av betydning, og at et sunt kosthold med høyt inntak av blant annet fiber kan virke beskyttende mot utvikling av sykdommen. Videre er det også kjent at bruk av «non-steroidal anti-inflammatorisk drugs» (NSAIDs) kan bidra til å redusere risikoen for tykktarmkreft [6]. Høyt alkoholinntak, fedme og røyking er andre risikofaktorer, men dette er foreløpig ikke vitenskapelig bevist [2, 3].

## 1.3 Paklitaksel

### 1.3.1 Bakgrunn

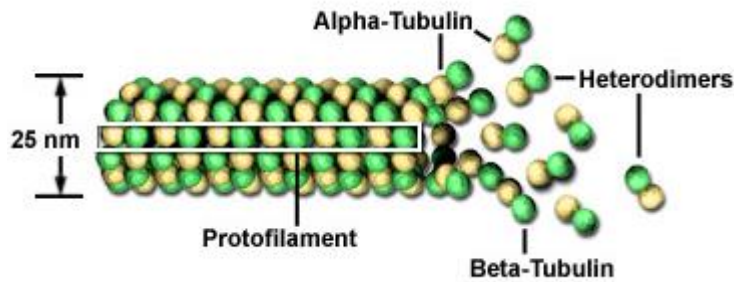
Paklitaksel (Fig. 1.2) er en såkalt tubulinhemmer, og hører inn under gruppen taxaner av cytostatika. Taxanene består av paklitaksel og docetaksel, og utgjør en av de viktigste gruppene av legemidler mot kreft. Virkningen av paklitaksel ble først registrert i et ekstrakt fra barken til den sjeldne barlindarten *Taxus brevifolia* i 1990-årene. Senere ble det klart at det var paklitaksel som var den aktive substansen i barken, og i dag syntetiseres paklitaksel semisyntetisk fra nålene til *Taxus baccata*. Denne tresorten er mye mer utbredt rundt i verden, også i Norge [7].



Figur 1.2 Kjemisk struktur av paklitaksel [8].

### 1.3.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli spiller en viktig rolle i blant annet celledeling. En forstyrrelse i funksjonen kan medføre endring av cellens utseende, eller mer alvorligere fenomener som apoptose [9]. Mikrotubuli (Fig. 1.3) består av lange og hule rør som er bygd opp av underenheter. Hver underenhet er en dimer bestående av proteinene  $\alpha$ - og  $\beta$ -tubulin, og disse er bundet tett sammen ved hjelp av ikke-kovalente bindinger. Dimerene ligger etter hverandre i lange tråder som kalles protofilamenter, og tretten protofilamenter danner sammen en mikrotubuli [10].



**Figur 1.3** Oppbygningen av mikrotubuli [11].

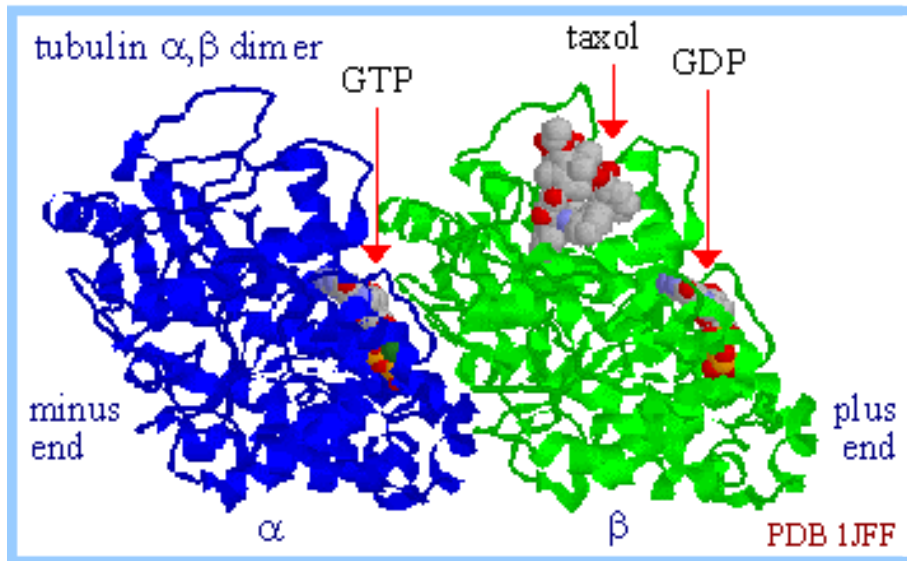
Endene av mikrotubuli veksler mellom å vokse og krympe, og dette fenomenet er kjent som «dynamisk ustabilitet». Dette kommer av kapasiteten tubulin har til å hydrolysere GTP. Hver frie tubulin-dimer inneholder et fastbundet GTP-molekyl som blir hydrolysert til GDP rett etter at en ny underenhet har festet seg på mikrotubuli som er i vekst. Dersom tubulin hydrolyserer GTP før en ny underenhet har rukket å feste seg, vil mikrotubuli krympe med stor hastighet [10].

Den dynamiske ustabiliteten er ekstremt viktig under mitosen, da dette fører til segregering av kromosomene før cellen deler seg [9]. Om en celle utsettes for et legemiddel som stabiliserer mikrotubuli vil den mitotiske spindelen etter hvert forsvinne, og cellen vil forbli i mitosen. Kromosomene vil dermed ikke deles i to grupper og det utløses en kaskade av hendelser som etter hvert resulterer i apoptose [10, 12]. Siden dynamikken i mikrotubuli spiller en så stor rolle i mitosen, er den et etablert legemiddelmål i bekjempelsen av kreft [9].

### 1.3.3 Virkningsmekanismen til paklitaksel

Paklitaksel brukes i behandlingen av brystkreft, eggstokkreft, lungekreft og ved mange andre former av sykdommen. Substansen virker ved å binde seg til den indre overflaten på mikrotubuli i en dyp hydrofob lomme på  $\beta$ -tubulin (Fig. 1.4). Når paklitaksel binder seg, skjer det en endring i strukturen som øker interaksjonen mellom tubulin-underenhetene. Denne forandringen fører til overstabilisering av mikrotubuli, cellyklusarrest i  $G_2/M$ -fasen og således hemming av mitosen [9, 13].



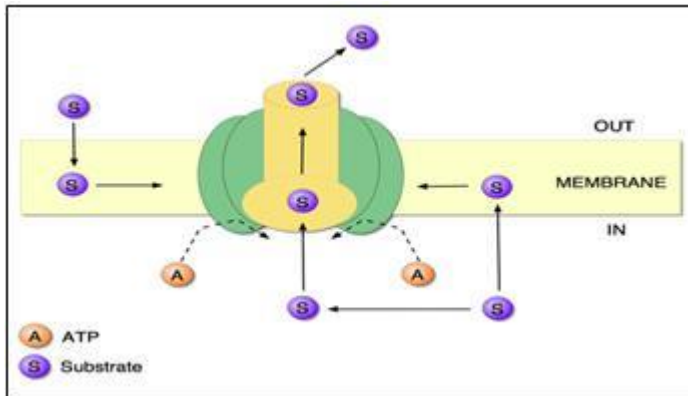


**Figur 1.4** Krystallstruktur av heterodimere av  $\alpha$ - og  $\beta$ -tubulin med bindingssetet for paklitaksel (taxol) på  $\beta$ -tubulin [14].

Paklitaksel potenserer også effekten av ioniserende stråling i kreftbehandlingen ved å forsinke cellenes passasje gjennom  $G_2/M$ -fasen. Denne fasen er den mest følsomme delen av cellyklus for stråling. I tillegg har også paklitaksel i lave doser vist å ha hemmende effekt på angiogenesen, noe som direkte påvirker blodforsyningen til kreftsvulstene [7].

### 1.3.4 Paklitaksel og p-glykoprotein

Permeabilitets-glykoprotein (p-gp/MDR1/ABCB1) finnes i cellemembranen til mange normale celler og i ulike vev. P-gp tilhører gruppen av ca. 50 humane ATP-bindende kassett-transportører (ABC-transportører), og fungerer som en multisubstratspumpe som er plassert i den delen av cellemembranen som vender ut mot omgivelsene (Fig. 1.5) [15]. Den normale fysiologiske funksjonen til proteinet er ikke helt klarlagt, men mange studier tyder på at hovedoppgaven er å beskytte organismen mot potensielt toksiske fremmedstoffer [16]. Proteinet er høyt uttrykt i tarmveggen, galleganger og i nyretubuli. Dette sier noe om hvilken viktig rolle proteinet har når det gjelder å begrense den systemiske eksponeringen av diverse fremmedstoffer, deriblant legemidler (substrat, S; Fig. 1.5). I tillegg er p-gp uttrykt i blod-hjerne-barrieren, blod-placenta-barrieren, blod-testis-barrieren, samt i forskjellige typer immunceller [15].



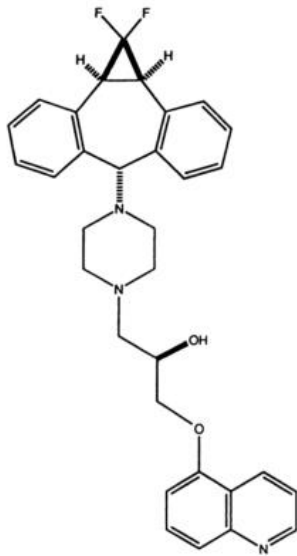
**Figur 1.5 Modell av p-glykoprotein [17].**

I 1976 ble det av de kanadiske forskerne Juliano og Ling oppdaget at denne pumpen var en viktig mekanisme bak multiresistens av cytostatika. Dette gjaldt primært svulster som stammet fra vev der p-gp i utgangspunktet var uttrykt naturlig [15]. P-gp fungerer som en pumpe som aktivt pumper legemidler ut av cellen, og hindrer legemidlet å virke der det skal [18].

Paklitaxel blir i stor grad transportert av p-gp, og den orale biotilgjengeligheten er derfor svært lav (ca. 6,5 %). Mange studier har vist at den orale tilgjengeligheten kan økes ved å kombinere paklitaxel med en hemmer av p-gp [18]. Utfordringen ligger imidlertid i å finne en substans som hemmer pumpen effektivt, uten å ha egne potensielt toksiske effekter [15].

## 1.4 Zosuquidar (LY335979)

Zosuquidar (LY335979) (Fig. 1.6) er en ekstremt potent hemmer av p-gp. *In vitro*-forsøk i cellelinjer har vist at kun 0,1  $\mu\text{M}$  av stoffet er nok til å reversere den multiresistente effekten mot cytostatika av p-gp. Det at zosuquidar virker ved så lave konsentrasjoner kommer ikke av at substansen hemmer proteinets ATP-ase-aktivitet, men at den hindrer legemidler i å binde seg til p-gp [19]. En annen god egenskap ved zosuquidar er at den i liten grad påvirker farmakokinetikken til forskjellige legemidler (deriblant paklitaxel) [20]. Studier viser at andre hemmere av p-glykoprotein, som for eksempel ciklosporin, blant annet endrer plasmakonsentrasjoner av diverse legemidler ved samtidig administrering. Doxorubicin er et slikt eksempel [19].



Figur 1.6 Molekylstruktur av zosuquidar (LY335979) [19].

## 1.5 Proteaser

Proteaser er enzymer som katalyserer nedbrytning og aktivering av proteiner gjennom hydrolyse av peptidbindinger. De deltar i intracellulære signalkaskader, og er dermed involvert i viktige fysiologiske prosesser som DNA-replikasjon og celleproliferasjon. Enzymene bruker forskjellige katalytiske mekanismer ved hydrolysering av substrater, og klassifiseres i ulike grupper på bakgrunn av dette. De deles inn i serin-, cystein-, treonin-, metallo-, glutamat- og aspartatproteaser, og spalter proteinene spesifikt enten fra N- eller C-terminal ende (henholdsvis aminopeptidaser og karboksypeptidaser), og/eller internt i molekylet (endopeptidaser) [21].

Cysteinproteaser utgjør en av de største proteasegruppene, og kan deles inn i omtrent 30 ulike familier basert på deres molekylstruktur. I tillegg deles cysteinproteasene inn i forskjellige klaner, avhengig av tertiær struktur [22]. Kun fire av familiene er påvist i pattedyr (papain-, calpain-, caspase- og legumainfamilien). Papain-familien (C1) er den største av disse fire, og inkluderer blant annet cathepsin B, H, L og S. Cathepsiner er primært lysosomale enzymer som er ansvarlige for proteolyse i det lysosomale/endosomale systemet, i tillegg til at de utøver noen av sine effekter ekstracellulært. Calpain- (C2) og caspase-familien (C14) består av peptidaser som står for proteolyse i cellens cytosol. Legumainfamilien (C13) ble i 1997 rapportert som den siste av de fire familiene som per i dag er påvist i mennesker [23].

## 1.6 Legumain

Legumain er en asparaginyl endopeptidase (AEP) og tilhører C13-familien i klan CD av cysteinproteasene [22]. Enzymet er homologt med en protease funnet i ikke-mammalske arter [24, 25]. Fra før var det kjent at legumain finnes i planter, og forskning viste at det hadde en protein-prosesserende funksjon, blant annet i forbindelse med spiring. I tillegg er det også påvist tilstedeværelse av legumain i parasitten *Schistosoma mansoni* [23].

Etter oppdagelsen av legumain i pattedyr ble det kjent at enzymet primært er lokalisert i lysosomene. Legumainaktivitet er påvist i flere mammalske vev, men aktiviteten er størst i nyrer, morkake, milt, lever og testikler. Dessuten er det også rapportert en oppregulering av legumain ekstracellulært i sammenheng med flere typer svulster [24].

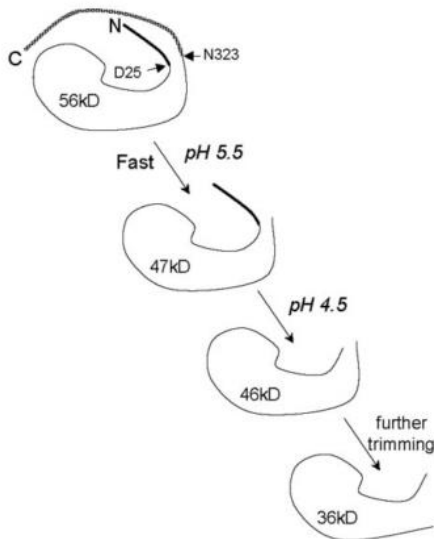
Legumain kløyver protein-substrater spesifikt på den C-terminale siden av aminosyren asparagin, og denne spesifikke egenskapen er sjelden blant enzymer. Senere har det vist seg at enzymet også kan kløyve bindinger etter aspartat-enheter, men dette er kun ved svært lave pH-verdier og forekommer mer sjeldent sammenliknet med kløyving etter asparagin [24, 26]. Forskning har vist at legumain kløyver etter aspartat-enheter når pH er rundt 3 [27].

Mange av enzymets funksjoner er foreløpig uklare, men det er blant annet vist at det er et viktig enzym i prosesseringen av ulike antigener, som tetanustoksin og klasse II MHC-toksiner [28, 29]. I tillegg har legumain vist seg å hemme osteoklaster, men den molekylære mekanismen bak dette er foreløpig ukjent [30]. Studier i mus indikerer at cathepsin B, H og L er substrater for legumain, og at mangel på LGMN-genet blant annet fører til forstørrede lysosomer i cellene i proksimale tubuli. Dette indikerer at proteiner som vanligvis degraderes i lysosomene hopper seg opp i fravær av legumain, og at enzymet har en viktig rolle i den lysosomale degraderingen i nyrene [26].

### 1.6.1 Autoaktivering av legumain

Mammalsk legumain har stabil aktivitet i pH-intervallet 4,2 - 5,5, men har samtidig vist å ha maksimal aktivitet ved pH 6,4 [23]. Før enzymet aktiveres, er det uttrykt som et inaktivt proenzym på 56 kDa. Når pH går under 5,5 vil C-terminalen spaltes ved asparagin<sup>323</sup>, og det blir dannet en intermediær form på 47 kDa (Fig.1.7). Denne formen er inaktiv, men en ytterligere reduksjon i pH vil føre til kløyving av N-terminalen ved aspartat<sup>25</sup>, og produsere en

aktiv intermediær form på 46 kDa. Det siste trinnet i konverteringen er ikke autokatalytisk, men avhenger av andre proteaser, og det er foreløpig usikkert hvilke proteaser som er innblandet. Disse proteasene «trimmer» imidlertid enzymet videre, hvilket resulterer i den modne formen av legumain på 36 kDa (Fig 1.7) [28].



**Figur 1.7 Cellulær prosessering av legumain.** Autokatalyse fører til at N- og C-terminalen på proenzymet (56 kDa) spaltes, og det dannes to intermediære former på henholdsvis 47 og 46 kDa. Videre prosessering ved hjelp av andre proteaser resulterer i den modne, aktive formen av legumain på 36 kDa [28].

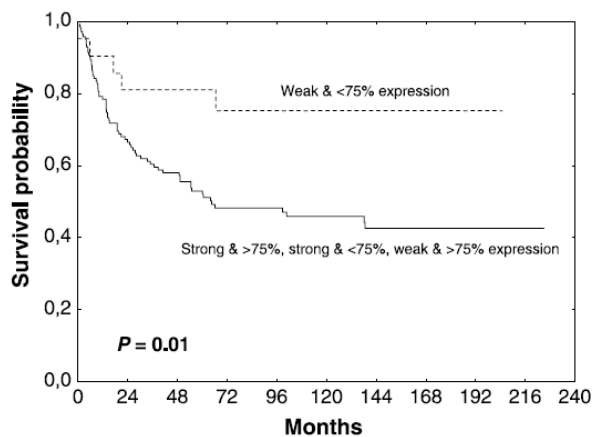
### 1.6.2 Påvirkningen fra legumain i utviklingen av tykktarmkreft

Som tidligere nevnt er det rapportert en oppregulering av legumain ekstracellulært i sammenheng med flere typer svulster, blant annet ved tykktarmkreft [24, 25]. Legumain finnes både intracellulært i lysosomene, og bundet til integriner ( $\beta 1$ ) på overflaten til tumorcellene [31]. Proteaser på celleoverflaten er ofte assosiert med invasive og metastatiske tumorceller. Celler som i stor grad uttrykker legumain har lettere for å migrere og invadere vevet rundt. Mekanismen bak dette er ikke helt klarlagt, men en hypotese er at legumain øker nedbrytningen av ekstracellulær matriks (ECM) gjennom å aktivere zymogener som pro-MMP2 (matriksmetalloproteinase-2) [32]. Et zymogen er et proenzym som er en inaktiv enzymforløper, og som konverteres til et aktivt enzym gjennom en biokjemisk forandring som for eksempel ved hydrolyse [21]. MMP2 er viktig i nedbrytningen av ECM, og er derfor en

viktig faktor for tumorcellene med tanke på utvikling av mer invasive og metastatiske egenskaper [32]. Studier viser også at legumain degraderer matriksproteinet fibronectin. Fibronectin er hovedproteinet i ECM, og gjør det mulig for celler å bevege seg gjennom matriksen. Gjennom degraderingen av fibronectin er legumain med på å regulere «gjennomstrømningen» av ECM [33, 34].

Selv om legumain hovedsakelig finnes i lysosomene, så har nye studier i enkelte kreftcellelinjer fra tykktarm vist at enzymet også finnes i cellekjernen. I cellelinjene HCT-116 (brukt i denne oppgaven) og SW-620 er det vist at henholdsvis 13 % og 17 % av total legumainaktivitet kommer fra cellekjernen [25]. Funksjonen som legumain har i kjernen er ennå ikke klarlagt, men studien viste at legumain blant annet prosesserer histon H3.1 *in vitro*. Cystatin E/M er den mest potente endogene hemmeren av legumain ( $K_i$ -verdi på 1,6 pM), og det er spesielt interessant at det er lavt uttrykk av hemmeren i kreftceller [25]. Cystatin E/M har vist seg å være nedregulert i metastaser fra blant annet brystkreft, og studier har indikert at årsaken til dette er at genet som koder for hemmeren (CST6) er «avslått» under progresjonen av forskjellige kreftformer. Økt ekspresjon av cystatin E/M i brystkreft reduserer vekst, migrasjon og Matrigel-invasjon *in vitro*, samt tumorvekst *in vivo* [35]. Dette gjør cystatin E/M til en potensiell tumorsuppressor [24].

Uttrykket av legumain oppreguleres ved tykktarmkreft, og studier indikerer at enzymet ikke bare er viktig for utvikling av kreftformen, men at det også spiller en stor rolle i den tidlige utviklingen av sykdommen [32]. Tilstedeværelsen av legumain ser nemlig ut til å være lik i primære- og metastaserende svulster, og bekrefter at enzymet spiller en stor rolle også i tidlig svulstutvikling. Dette gjør legumain til en potensiell prognostisk faktor i diagnostiseringen av kreftformen [32]. Videre er det kjent at celler som overuttrykker legumain ser ut til å kunne relateres til hyppigere forekomst av nekrose og apoptose. I kreftsammenheng er disse kjennetegnene forbundet med en mer malign kreftform, og dermed en betydelig dårligere prognose. Lavt uttrykk av legumain i tumorceller øker sannsynligheten for overlevelse av kreft (Fig. 1.8) [32].



**Figur 1.8** Overlevelse ved tykktarmkreft i sammenheng med immunhistokjemi og uttrykk av legumain [32].

### 1.6.3 Tumorassosierte makrofager

Makrofager har en stor rolle i det humane immunsystemet. De dannes fra monocytter når de rekrutteres av kjemoattraktanter til områder med endotelskade, og fungerer primært som «kroppens renholdsverk» ved at de fagocytterer bakterier og virus [36]. Det finnes imidlertid flere aktive former av makrofagene, og disse kan deles inn i gruppene M1 og M2. De klassiske makrofagene hører inn under M1-gruppen, og det er denne gruppen som deltar i bekjempelsen av blant annet virus og bakterier. Disse makrofagene er også med i bekjempelsen av kreftceller [37]. Makrofager av M2-fenotypen skiller seg fra M1-fenotypen ved at de faktisk promoterer proliferasjon, invasjon og metastase av tumorceller. Dette skjer som følge av at makrofagene skiller ut forskjellige cytokiner, vekstfaktorer og enzymer som promoterer nettopp dette [38]. Tumorassosierte makrofager (TAMs) hører inn under M2-gruppen [39].

I likhet med tumorceller overuttrykker TAMs legumain [37]. Samspillet mellom disse cellene ser derfor ut til å spille en viktig rolle i utviklingen av kreft, og dette er nylig vist for andre cysteinproteaser som cathepsin B og S ved brystkreft [40].

## 2 Mål for oppgaven

Målet for denne oppgaven er å studere et eventuelt samspill mellom makrofager og kreftceller i utviklingen av tykktarmkreft ved å:

- Studere effekten av paklitaksel på celleviabilitet i makrofager og tykktarmkreftceller hver for seg, og i direkte kokultur
- Undersøke hvordan legumainaktiviteten påvirkes av paklitaksel i makrofager og tykktarmkreftceller hver for seg, og i direkte kokultur
- Undersøke om kondisjonert medium fra henholdsvis makrofager og tykktarmkreftceller påvirker celleviabilitet eller legumainaktivitet av den andre celletypen
- Studere hvordan kokulturinkubering av tykktarmkreftceller og makrofager påvirker motiliteten og invasiviteten av kreftcellene



## 3 Materialer og metoder

### 3.1 Kjemikalier og reagenser

Kjemikalier	Leverandør
Aceton, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Merck, Dramstadt, Tyskland
Albuminstandard (23209)	Thermo Scientific, Rockford, USA
BD™ Matrigel (354234)	BD, Franklin Lakes, USA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, WI, USA
Dinatrium-EDTA (00064)	Ferak Berlin, Tyskland
DMEM (42430-025)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMSO, dimetylsulfoksid, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO (D22560)	Sigma-Aldrich™, St.Louis, MO, USA
DTT, ditiotreitoll	Sigma-Aldrich™
FBS gold, fetal bovine serum gold (A15-151)	PAA Laboratories
Fettfri tørrmelk	Normilk, Levanger, Norge
Geit anti-human polyklonal antistoff mot legumain (AF2199)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Geit anti-mus IgG (H+L)-HRP-konjugat	Bio-Rad Laboratories
Glukose-løsning (10 %) (G8644)	Sigma-Aldrich™
Hepes-buffer, 1M (HO887)	Sigma-Aldrich™
Kanin anti-geit immunoglobulin	Dako Cytomation, Glostrup, Danmark
Merkaptoetanol (200-464-6)	Sigma-Aldrich™
Metanol, CH <sub>3</sub> OH (1.06018.2500)	Merck
Mus anti-human monoklonalt antistoff mot GAPDH (glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase)	Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA

Natiumpyrovat-løsning (S11-003)	PAA Laboratories
Natriumklorid, NaCl	Merck
NuPAGE <sup>®</sup> Antioxidant	Life Technologies
NuPAGE <sup>®</sup> MOPS SDS Running buffer (20X) (NP0001)	Life Technologies
Paklitaksel (T7191)	Sigma-Aldrich <sup>™</sup>
Penicillin/Streptomycin (P11-010)	PAA Laboratories
Ponceau S Solution (P7170-1L)	Sigma-Aldrich <sup>™</sup>
Precision Plus Protein <sup>™</sup> Standards Dual Color (161-0374)	Bio-Rad Laboratories
Recombinant Human Legumain/Asparaginyl Endopeptidase (2199-CY)	R&D Systems
Restore <sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer (21059)	Thermo Scientific
RPMI 1640 (E15-840)	PAA Laboratories, Pasching, Østerrike
SuperSignal <sup>®</sup> WestDura Extended Duration Substrate (34075)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tris (base), (T1503)	Sigma-Aldrich <sup>™</sup>
Tris/glycin buffer (10x)	Life Technologies
Trypsin-EDTA 0,25 % (25200-056)	Life Technologies
Tryptanblått 0,4 %	Life Technologies
Tween <sup>®</sup> 20	Bio-Rad Laboratories
Tymidin (NET027Z)	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA
Z-Ala-Ala-Asn-AMC, legumainsubstrat	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK og Bachem, Bubendorf, Sveits

## 3.2 Utstyr

Utstyr	Leverandør
Class II type A2 LAF-benk	Esco, Singapore
Corning 25 cm <sup>2</sup> dyrkningsflaske (430639)	Corning Incorporated, NY, USA
Corning 75 cm <sup>2</sup> dyrkningsflaske (3275)	Corning Incorporated
Corning <sup>®</sup> Transwell <sup>®</sup> -brett (CLS3422)	Sigma-Aldrich <sup>™</sup> , St.Louis, MO, USA
Costar 6-brønnersbrett (3506)	Corning Incorporated
Costar 96-brønners mikrotiterplate, svart (3915)	Corning Incorporated
Countess <sup>™</sup> Automated Cell Counter	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, Storbritannia
ECL Semi-dry Blotters, blottemaskin	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Storbritannia
Heraeus Fresco 21 Centrifuge (75002426)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Holten Lamin Air LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Inkubatorskap (Galaxy 170S)	Eppendorf, CT, USA
Molecular Imager <sup>®</sup> ChemiDoc Lab <sup>™</sup> XRS+ (721BR03414)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Nunc 96-brønners mikrotiterplate (260836)	Nunc, Roskilde, Danmark
NUPAGE <sup>®</sup> (4-12 % Bis-Tris Gel)	Life Technologies
Olympus CKX41 lysmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
Pipette (10 ml) (4101)	Corning Incorporated
Pipette (25 ml) (4251)	Corning Incorporated
Pipette (5ml) (4051)	Corning Incorporated
Sentrifugerør (15 ml) (430791)	Corning Incorporated
Sentrifugerør (50 ml) (430921)	Corning Incorporated
The Belly Dancer	Stovall Life Science, Greensboro, NC, USA

Wallac 1420 Victor <sup>3</sup> Multilabel counter, mikropateleser	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Life Technologies

## 3.3 Celledyrking

### 3.3.1 HCT-116-celler

HCT-116-celler (American Type Culture Collection, ATCC; CCL-247) er en adherent tykktarmkreftcellelinje fra humant epitel. Cellelinjen tilhører «biosafety level» 1 (BSL-1).

### 3.3.2 THP-1-celler

THP-1-celler (ATCC; TIB-202) er en monocyttcellelinje isolert fra blodet til en ett år gammel gutt med akutt monocytisk leukemi. Den brukes ofte som en *in vitro*-modell for å studere blant annet differensiering og funksjon av makrofager. Cellene differensieres til makrofager etter behandling med forbolesteren «phorbol 12-myristate 13-acetate» (PMA), ved at stoffet induserer en såkalt «cellesyklus-arrest» [41]. THP-1-cellelinjen tilhører BSL-1.

### 3.3.3 RAW264,7-celler

RAW264,7-celler (se 4.8) (ATCC; TIB-71) er en adherent makrofagcellelinje fra mus. Cellelinjen er isolert fra svulster i mus som er indusert ved injeksjon av «Abelson murine leukemia virus» (A-MuLV). RAW264,7 tilhører BSL-2, men produserer ikke viruspartikler .

### 3.3.4 HEK293-celler

HEK293-celler (se 4.8) (ATCC; CRL-1573) er humane nyreceller isolert fra embryo. Cellelinjen inneholder deler av adenovirus 5-DNA, og tilhører BSL-2.

### 3.3.5 M38L-celler

M38L (se 4.8) er en stabil monoklonal HEK293-cellelinje som er transfektert med legumain-cDNA i en pcDNA3,1-vektor (pLGMN) [24], og som overuttrykker legumain. Cellelinjen tilhører BSL-2.

### 3.3.6 Tining og utsåing av celler

Før cellene ble tint og sådd ut, hadde de gjennomgått en langsom nedfrysningsprosess. DMSO (5 %) ble tilsatt for å begrense graden av celledskade som kan oppstå under prosessen, og cellene ble oppbevart i flytende nitrogen ved minus 196 °C [42]. Når cellene skulle tines, ble de tatt ut av nitrogentanken og tint raskt i 40-60 sekunder på vannbad ved 37 °C. Det var viktig at ampullen var under konstant bevegelse under hele tiningprosessen. Da det kun var en liten isklump igjen, ble det tinte cellematerialet overført til en celleflaske (10 ml) sammen med ferdig oppvarmet celledyrkningsmedium. Deretter ble cellene dyrket ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. For å fjerne rester av DMSO og for å sikre optimale vekstforhold, ble mediet skiftet hver dag de første dagene.

### 3.3.7 Splitting av celler

#### HCT-116, HEK293 og M38L

Cellene ble splittet når celletettheten var rundt 80-90 %. Dyrkingsmediet ble sugd av og kastet. Deretter ble cellene vasket med RPMI/DMEM uten tilsetninger for å fjerne serum, og 2 ml trypsin-EDTA tilsatt. Flasken ble satt inn i varmeskap i ett minutt ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> for at cellene skulle løsne fra flaskebunnen. For å hindre at cellene klumpet seg, ble det ristet minst mulig på flasken når den ble tatt ut fra varmeskapet. Cellene ble så studert i mikroskopet for å kontrollere at alle cellene hadde løsnet. Deretter ble trypsin-EDTA inaktivert ved at det ble tilsatt 10 ml serumholdig medium, og hele celleduspensjonen ble overført til et 50 ml-rør for sentrifugering i 5 minutter ved 800 rpm. Pelleten som ble dannet ble resuspendert i 10 ml medium og antall celler ble til slutt telt.

### **RAW264,7**

For å fjerne eventuelle løse celler ble dyrkningsmediet først sugd av og kastet. Deretter ble 10 ml nytt medium tilsatt, og cellene ble skrapet løs fra flaskebunnen ved hjelp av en celleskraper. Til slutt ble cellene overført til et 50-ml rør, og deretter telt.

### **THP-1**

THP-1-cellene ble splittet når konsentrasjonen i flasken nærmet seg  $1 \times 10^6$  celler/ml. Det ble telt og overført én million celler til en ny 75 cm<sup>2</sup> celleflaske. Cellene ble splittet en gang i uka, og mellom splittingen (omtrent hver tredje dag) ble det tilsatt 5 ml nytt medium for at gode næringsforhold skulle opprettholdes.

### **3.3.8 Telling av celler**

Ved telling av cellene ble 10 µl av cellesuspensjonen blandet med 10 µl tryptanblått. Deretter ble 10 µl av denne blandingen overført til et tellekammer og cellene telt ved bruk av en Countess celleteller. Et passende antall celler ble sådd ut i en ny 75 cm<sup>2</sup> celleflaske for videre dyrkning (moderflaske), og ønsket antall ble sådd ut til eventuelle forsøk. Splitteprosessen ble gjentatt ukentlig, og det ble skiftet medium en gang mellom hver splitting.

### **3.3.9 Høsting av celler**

Ved høsting av HCT-116 og THP-1-makrofager ble det kondisjonerte mediet sugd av og kastet. Deretter ble cellene vasket med 1 ml PBS-løsning (vedlegg). PBS ble tilsatt forsiktig langs veggen i brønnen for å unngå at cellene løsnet, og deretter sugd av og kastet. Så ble 500 µl lysisbuffer (vedlegg) tilsatt, og det ble kontrollert visuelt at cellene hadde løsnet. Videre ble lysatene overført til eppendorfrør og frosset ved minus 70 °C i 15 minutter før de ble tint opp igjen på varmeblokk ved 30 °C. Fryse-tiningsprosessen ble gjentatt tre ganger for å sikre at cellene ble ordentlig lysert. Etter det siste fryse-tiningstrinnet ble lysatene sentrifugert ved 10 000 G og 4 °C i 5 minutter. Supernatanten ble sugd av og overført til nye eppendorfrør, og prøvene ble oppbevart i fryseren frem til videre analyser.

### 3.4 Totalproteinmåling

Totalprotein i cellelysaten ble målt for å kunne korrigere enzymaktiviteten i forhold til proteinmengden. I tillegg var det nødvendig å vite hvor mye protein det var i lysaten til gelelektroforese og immunoblotting. Måling av totalprotein ble utført i henhold til metoden som er beskrevet av Bradford [43]. Metoden er enkel for måling av et stort antall prøver, og har også mulighet for å automatiseres. Den baserer seg på at det skjer en fargeendring og en påfølgende endring i absorpsjonsmaksimum fra 465 til 595 nm når fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 binder seg til protein. Fargestoffet er opprinnelig rødt, men konverteres til blått når det reagerer med proteinene i prøvene. «Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate» ble brukt som reagens, og dette inneholder Coomassie Brilliant Blue G-250. Forskjellige konsentrasjoner av albumin (0, 50, 100, 200, 300 og 400 µg/ml) ble brukt til standardkurve, og denne kurven ble brukt til beregning av proteinkonsentrasjonene i prøvene.

Det ble tilsatt 10 µl av både prøver og standard på en 96-brønners mikrotiterplate. Det ble kjørt to paralleller av hver standard og tre paralleller av hver prøve. Bio-Rad-løsningen ble fortynnet 1:5 i destillert vann, og 200 µl av fortynningen ble tilsatt både prøver og standarder. Etter nøyaktig 5 minutter ble absorbansen målt ved 595 nm i en mikroplateleser.

### 3.5 Enzymaktivitetsmåling

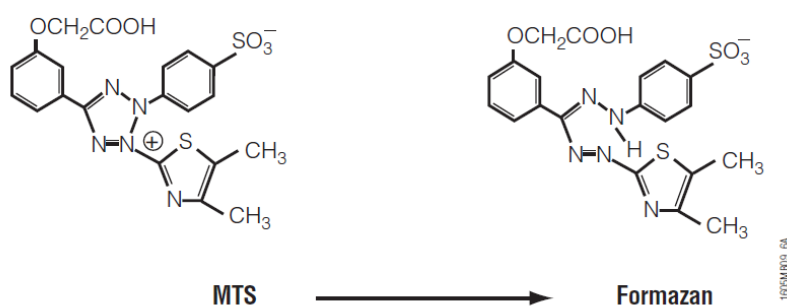
Metoden som ble brukt ved enzymaktivitetsmåling er hentet fra *Chen et al.* [23] og *Johansen et al.* [44] og baserer seg på at en prøve fortynnes i assay-buffer (vedlegg). Denne bufferen er tilsatt et reduksjonsmiddel slik at cysteinproteasene aktiveres. Videre tilsettes et peptidsubstrat som fluorescerer når det spaltes av legumain, og denne fluorescensen måles til slutt i en mikroplateleser.

DTT (ditiotreitoll) ble benyttet som reduksjonsmiddel [23, 45] og Z-Ala-Ala-Asn-AMC ble brukt som fluorescerende substrat. I tillegg ble lysisbuffer (vedlegg) benyttet som blindprøve. Prøvene (20 µl) og blindprøve (20 µl) ble tilsatt i en svart 96-brønners mikrotiterplate. Det ble tilsatt tre paralleller av både prøve og blindprøve. Mikrotiterplaten ble plassert i mikroplateleseren, og det ble automatisk tilsatt 100 µl assaybuffer med DTT i hver brønn. For å sikre at enzymet ble tilstrekkelig aktivert av reduksjonsmidlet, ble det ventet 10 minutter før målingen begynte. Substratløsningen ble tilsatt umiddelbart før målingen, og det ble målt

kinetikk 10 ganger i løpet av 30 minutter. Endringen i fluorescens pr. tidsenhet ( $\Delta F/s$ ) ble deretter automatisk kalkulert i mikroplateleseren.

### 3.6 Celleviabilitetsmåling (MTS)

Celleviabilitet ble målt ved hjelp av «CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay» og prosedyren ble utført nøyaktig etter produsentens anvisning. CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution-reagenset inneholder substansen [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karbonsymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium] (MTS-tetrazolium) i tillegg til den elektronkoblende substansen fenazinetosulfat (PES). MTS-tetrazolinum reduseres av de levende cellene og danner et farget formazan-produkt (Fig. 3.1). Dette produktet er løselig i celledyrkningsmediet, og andelen av produktet som blir dannet er proporsjonalt med antall levende celler i kulturen. Formazan-produktet har absorpsjons ved 490 nm.



**Figur 3.1** Omdannelse av MTS-tetrazolium til formazan [46].

Ved celleviabilitetsmåling ble det tilsatt 20  $\mu$ l MTS-reagens til alle brønnene i en 96-brønners mikrotiterplate. For å sikre at det skjedde en reaksjon mellom celler og reagens var det viktig å kontrollere at reagenset og cellene ble tilstrekkelig blandet. Blindprøve og prøver var tilsatt platen i 4 replikater. Blindprøven besto kun av rent celledyrkningsmedium og fungerte som en negativ kontroll. Mikrotiterplaten ble deretter inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>, og absorbansen ved 490 nm ble målt i en mikroplateleser etter henholdsvis 2, 3 og 4 timer for både HCT-116 og THP-1.



## 3.7 Immunoblotting (Westernblotting)

Immunoblotting er en analytisk og sensitiv metode som brukes til å detektere spesifikke proteiner i en biologisk prøve, for eksempel i serum og urin. Metoden ble i denne oppgaven brukt for å detektere legumain i lysater av celler som var blitt behandlet med ulike konsentrasjoner av paklitaksel.

Ved hjelp av totalproteinmåling (beskrevet i 3.4) ble det beregnet hvor mye protein som var i prøvene. Proteinkonsentrasjonen var relativt liten, og det ble foretatt en oppkonsentrering av proteinene i cellysater ved hjelp av acetonfelling (vedlegg) før immunoblottingen startet. Videre ble proteinene separert fra hverandre ved hjelp av natriumdodesylsulfat-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE). SDS er en effektiv detergent som denaturerer proteiner til ikke-foldede polypeptider, og sikrer at polypeptidene får en uniform negativ ladning slik at de kan separeres etter molekylvekt (kDa) i elektroforesen. Etter separering ble proteinene på SDS-gelen overført til en nitrocellulosemembran ved hjelp av blotting (elektrisk overføring), og membranen ble videre tilsatt Blotto-løsning (vedlegg). Ved å tilsette Blotto unngår man uspesifikk binding av antistoff til membranen. Primært antistoff (Tabell 3.1) ble deretter tilsatt for å kunne detektere legumain på membranen, og dette sto over natt på kjølerom og i konstant bevegelse. Neste dag ble membranen inkubert med sekundært antistoff (Tabell 3.1) i én time. Primærantistoffet er spesifikt for det proteinet som skal detekteres, og sekundærantistoffet binder seg spesifikt til det primære.

Det sekundære antistoffet er konjugert med enzymet «Horseradish Peroxidase» (HRP), og ved tilsetning av «SuperSignal<sup>®</sup> WestDura Extended Duration Substrate» vil det oppstå en kjemisk reaksjon som resulterer i dannelsen av et lysende kompleks, og lyset ble detektert ved hjelp av ChemiDoc Lab<sup>™</sup> XRS+.

For å kunne korrigere for loadingen av proteiner i hver prøve på gelen ble membranen reblottet med glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase (GAPDH). GAPDH fungerte som ”housekeeping”-kontroll, og intensiteten av legumainbåndene på immunoblottet ble visuelt studert relativt til denne kontrollen.

Tabell 3.1 Oversikt over brukte antistoffer

Protein	Primærantistoff	Fortynning	Sekundærantistoff	Fortynning
Legumain	Geit anti-human polyklonal antistoff mot legumain	1:1000	Kanin anti-geit immunoglobulin	1:5000
GAPDH	Mus anti-human monoklonalt antistoff mot GAPDH	1:10 000	Geit anti-mus IgG (H+L)-HRP-konjugat	1:1500

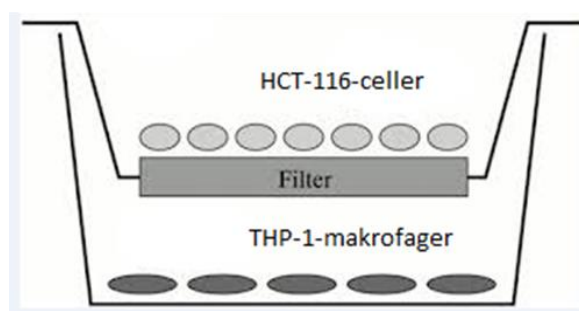
## 3.8 Kokulturinkubasjon

### 3.8.1 Direkte kokultur

I denne oppgaven ble cellemodellen der ulike celletyper ble sådd ut i samme brønn i direkte kontakt med hverandre betegnet som direkte kokultur (se resultater for nærmere beskrivelse).

### 3.8.2 Indirekte kokultur

Cellemodeller der de ulike celletypene ikke var i direkte kontakt ble betegnet som indirekte kokultur, og i denne oppgaven ble det brukt to forskjellige modeller for dette. I den ene modellen ble makrofager/tykktarmkreftceller dyrket i kondisjonert medium fra den andre celletypen (se resultater for nærmere beskrivelse), og i den andre modellen ble tykktarmkreftceller (HCT-116) dyrket i brønninnlegg over THP-1-makrofager (Fig. 3.2).



Figur 3.2 Oppsett for kokulturer med celler i indirekte kontakt ved bruk av brønninnlegg [47].

Cellemodellen der tykktarmkreftceller ble dyrket i brønninnlegg over makrofager ble brukt for å undersøke om THP-1-makrofager påvirket motiliteten og/eller invasiviteten av HCT-116-celler. Radioaktivitetsmerket [<sup>3</sup>H]-tymidin ble fortynnet i forholdet 1:20 i PBS-løsning, og 0,33 ml av denne fortynningen ble tilsatt en 25 cm<sup>2</sup> dyrkningsflaske hvor bunnen var 50-75 % dekket av HCT-116-celler. Deretter det tilsatt 3,33 ml RPMI-celledyrkningsmedium og de merkede cellene ble inkubert i 24 timer. THP-1-makrofager (1 x 10<sup>5</sup> /brønn) ble dyrket og PMA-differensiert i bunnen av brønnene i et 24-brønnersbrett. Dagen etter ble PMA vasket vekk og THP-1-makrofagene ble inkubert videre i 7 dager. På dag 7 startet koinkuberingsforsøket hvor HCT-116-celler ble introdusert til THP-1-makrofagene. Halvparten av brønninnleggene var dekket med Matrigel (50 µl /brønn). HCT-116-celler (2,5 x 10<sup>4</sup> /brønn) ble sådd ut i brønninnlegg med eller uten Matrigel for å måle henholdsvis migrasjon og invasjon. Brønninnleggene ble lagt over makrofagene og inkubert i 48 timer ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Deretter ble HCT-116-celler som hadde migrert/invadert gjennom filteret i brønninnlegget skrapet av med en bomullspinne. Til slutt ble HCT-116-celler over filteret skrapet av. Radioaktivitet ble telt i scintillasjonsteller, og antall prosentvis migrasjon og invasjon ble beregnet ved å telle radioaktiviteten under filteret og dele på total radioaktivitet (summen av radioaktivitet over og under filteret).

### 3.9 Statistiske analyser

Dataene i oppgaven er presentert som gjennomsnittsverdi ± standardfeil (SEM) eller relative gjennomsnitt ± standardfeil i forhold til kontroll. Gjennomsnittsverdiene er beregnet fra replikatene i forsøkene, og antall replikater varierer fra 2-4. Antall forsøk (n) varierer fra 1-5. Det er valgt et signifikansnivå på  $p \leq 0,05$  og to-utvalgs t-test er benyttet som statistisk modell. IC-verdier ble beregnet hjelp av fire-parametrisk metode i dataprogrammet GraphPad Prism 5. De andre statistiske analysene er også utført ved hjelp av dette programmet.

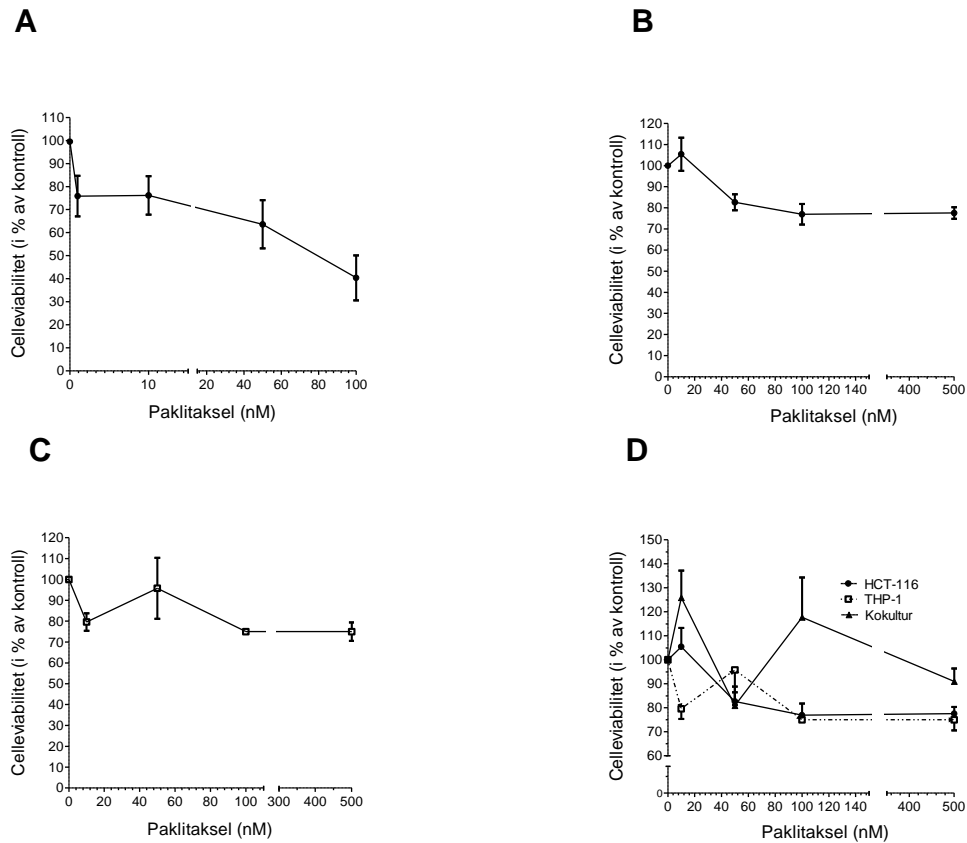
## 4 Resultater

### 4.1 Paklitaksel hemmer celleviabilitet av tykktarmkreftceller og makrofager, men ikke i direkte kokultur

HCT-116-celler og THP-1-makrofager (anvendt på dag 7 etter PMA-stimulering) ble inkubert alene og i direkte kokultur med økende konsentrasjoner av paklitaksel (1-500 nM). For å undersøke hvordan paklitaksel påvirket viabiliteten av cellene ble det utført MTS-celleviabilitetstest.

Resultatene viste at paklitaksel reduserte viabiliteten av HCT-116 etter både 48 (1-100 nM paklitaksel) og 24 timer (10-500 nM paklitaksel) (Fig. 4.1 A og B).  $IC_{50}$  sier noe om konsentrasjonen av paklitaksel som halverer celleviabiliteten, og denne ble etter 48 timer beregnet til å være ~65 nM (Fig. 4.1 A). Reduksjonen i celleviabilitet etter behandling med paklitaksel var imidlertid mindre etter 24 timer. Ved behandling med ~54 nM paklitaksel ble viabiliteten av HCT-116-cellene redusert med 20 % ( $IC_{80}$ ) (Fig. 4.1 B).

Celleviabiliteten av THP-1-makrofagene gikk ned med ca. 20 % etter behandling med 10 og 100 nM paklitaksel, og høyere konsentrasjon (500 nM) ga ikke økt celledød (Fig. 4.1 C). Med unntak av 50 og 500 nM, ga direkte kokulturinkubering av HCT-116-celler og THP-1-makrofager ingen reduksjon i celleviabilitet etter behandling med paklitaksel. Resultatene viste derimot at behandlingen (10 og 100 nM paklitaksel) ga økt celleviabilitet (>100 %) av cellene i kokultur, sammenliknet med ubehandlet kokultur (Fig. 4.1 D).

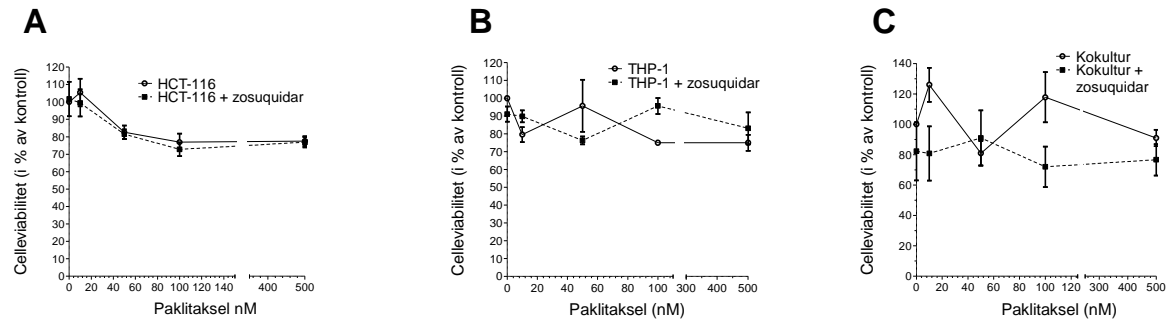


**Figur 4.1** Celleviabilitet av HCT-116-celler (A, B, D) og THP-1-makrofager (C, D) alene og i direkte kokultur etter behandling med paklitaksel. HCT-116-celler (A;  $1 \times 10^4$ /brønn, 48 timer, og B;  $2 \times 10^4$ /brønn, 24 timer) ble inkubert med økende konsentrasjoner av paklitaksel (1, 10, 50, 100 og 500 nM). THP-1- makrofager ( $2,5 \times 10^4$ /brønn) ble på dag 7 etter PMA-stimulering inkubert alene (C) eller i kokultur med HCT-116 (D) for 24 timer med paklitaksel. Absorbans ved 490 nm ble målt etter fire timers inkubering med MTS-reagens, og celleviabiliteten ble beregnet. Målingene er normalisert og presentert som prosent av kontroll  $\pm$  SEM (n = 3).

## 4.2 Hemmer av p-gp påvirket ikke toksisk effekt av paklitaksel i kreftceller og makrofager

Ettersom paklitaksel i stor grad blir transportert ut av cellen ved hjelp av p-glykoprotein (p-gp) [18], var det interessant å undersøke om celleviabiliteten ble påvirket ved samtidig tilsetning av zosuquidar (p-gp-hemmer) og paklitaksel i HCT-116-celler og THP-1-makrofager, både alene og i kokultur. Zosuquidar ( $1 \mu\text{M}$ ) ble tilsatt cellene sammen med økende konsentrasjoner av paklitaksel (10 – 500 nM) og inkubert i 24 timer. Deretter ble det foretatt MTS-celleviabilitetstest og resultatene ble sammenlignet med resultater i figur 4.1.

Ingen av celletypene viste noen signifikant endring i celleviabilitet ved samtidig tilsetning av paklitaksel og zosuquidar, sammenliknet med behandling med kun paklitaksel alene (Fig. 4.2 A og B). Tilsvarende ble det heller ikke observert noen signifikant forskjell når cellene var i direkte kokultur (Fig. 4.2 C).



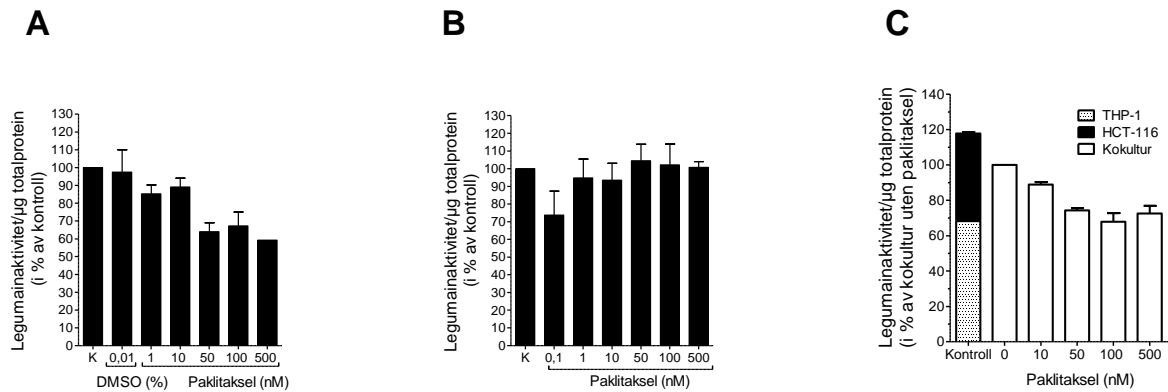
**Figur 4.2 Celleviabilitet av HCT-116-celler (A), THP-1-makrofager (B) og direkte kokultur (C) etter behandling med paklitaksel med og uten tilsetning av zosuquidar.** HCT-116-celler (A;  $1 \times 10^4$  /brønn) ble inkubert med økende konsentrasjoner av paklitaksel (10, 50, 100 og 500 nM) (data hentet fra figur 4.1) med og uten zosuquidar (1  $\mu$ M /brønn) i 24 timer. Tilsvarende ble THP-1-makrofager på dag 7 etter PMA-stimulering ( $2,5 \times 10^4$  /brønn) inkubert alene (B) eller i direkte kokultur med HCT-116 (C). Absorbans ved 490 nm ble målt etter fire timers inkubering med MTS-reagens, og celleviabiliteten ble beregnet. Målingene er normalisert og presentert som prosent av kontroll  $\pm$  SEM (n = 3).

### 4.3 Paklitaksel hemmer intracellulær legumainaktivitet i tykktarmkreftceller, men ikke i makrofager

HCT-116-celler og THP-1-makrofager (anvendt på dag 7 etter PMA-stimulering) ble inkubert både alene og i direkte kokultur i 24 timer sammen med økende konsentrasjoner av paklitaksel (0,1 – 500 nM). For å undersøke hvordan basalaktiviteten av legumain ble påvirket av paklitaksel ble enzymaktiviteten analysert i cellelysatenene.

Det ble observert en reduksjon i legumainaktivitet (dF/ sekund per  $\mu$ g totalprotein) i HCT-116 etter behandling med paklitaksel i forhold til kontroll (Fig. 4.3 A), men ikke i THP-1-makrofager (Fig. 4.3 B). Konsentrasjonen av paklitaksel som reduserte enzymaktiviteten med 40 % ( $IC_{60}$ ) i HCT-116 ble kalkulert til  $\sim$ 235 nM. Ved inkubering av de to celletypene i direkte kokultur ble det observert en nedgang i legumainaktivitet på ca. 20 % sammenliknet

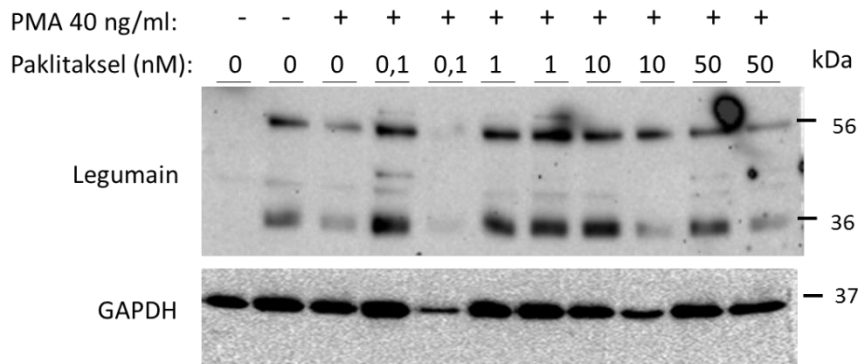
med kontroll (summen av aktiviteten i cellelinjene hver for seg). Etter behandling med henholdsvis 50, 100 og 500 nM paklitaksel gikk legumainaktiviteten ned med ca. 30 % sammenliknet med ubehandlet kokultur av cellene (0 nM paklitaksel) (Fig. 4.3 C).



**Figur 4.3 Legumainaktivitet i HCT-116-celler (A), THP-1-makrofager (B) og direkte kokultur (C) etter behandling med paklitaksel.** HCT-116-celler (A;  $2,5 \times 10^5$  /brønn) og THP-1-makrofager (B;  $5 \times 10^5$  /brønn, dag 7 etter PMA-stimulering) ble inkubert med økende konsentrasjoner av paklitaksel (0,1, 1, 10, 50, 100 og 500 nM) eller DMSO (0,01 %; 0-kontroll) både alene og i direkte kokultur (C;  $1,25 \times 10^5$  av hver cellype /brønn) i 24 timer. Legumainaktivitet (dF/ sekund per  $\mu\text{g}$  totalprotein) ble målt ved bruk av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat. Målinger er normalisert og presentert som prosent av kontroll  $\pm$  SEM (n = 3-5).

Av de samme cellelysatsene av THP-1-makrofager (Fig. 4.3 B) ble det utført immunblotting. Det ble tilsatt 10  $\mu\text{g}$  totalprotein i hver brønn på gelen. GAPDH ble brukt som en «housekeeping»-kontroll for å detektere hvor mye protein som faktisk ble applisert i hver brønn.

Immunblottet viste bånd for både proform (56 kDa) og aktiv form (36 kDa) av legumain i adherente celler, både i PMA- og paklitakselbehandlede celler (Fig. 4.4). Proteinbåndene ble ikke særlig endret med økende konsentrasjoner av paklitaksel i forhold til kontroll, og så visuelt ut til å bekrefte at paklitaksel i liten grad påvirket legumainaktiviteten i THP-1-makrofagene (Fig. 4.3 B). I ubehandlede monocytter (-/0) ble det i den ene parallellen ikke observert noen bånd for verken pro- eller aktiv form av legumain. Immunblottingen ble imidlertid kun utført én gang og viste ujevn (sammenliknet med «housekeeping»-kontroll) applisering av protein, slik at det ikke kan dras direkte konklusjon fra dette.



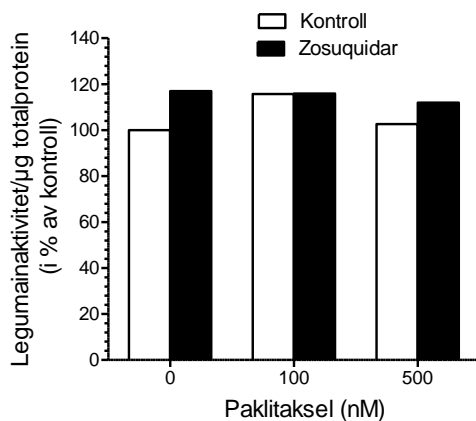
**Figur 4.4 Immunoblott av legumain i THP-1-makrofager behandlet med paklitaksel.** THP-1-makrofager ( $5 \times 10^5$  /brønn) ble på dag 7 etter PMA-stimulering inkubert med økende konsentrasjoner av paklitaksel (0,1, 1, 10 og 50 nM) i 24 timer. Ubehandlet kontroll (-/0) var native THP-1 celler. Cellelysaten ble oppkonsentrert ved acetonfelling og 10 µg totalprotein ble applisert per brønn ved gelelektroforese. Blottene ble analysert ved hjelp av spesifikke antistoffer mot legumain (øverst) og GAPDH («housekeeping»-kontroll, nederst).

## 4.4 Paklitaksel og zosuquidar påvirker ikke legumainaktivitet i makrofager

Det var interessant å undersøke om samtidig tilsetning av zosuquidar og paklitaksel påvirket legumainaktiviteten i makrofager. THP-1-makrofager (anvendt på dag 7 etter PMA-stimulering) ble inkubert med zosuquidar (1 µM) og paklitaksel (100 og 500 nM) i 24 timer, og legumainaktiviteten (dF/ sekund per µg totalprotein) ble målt ved bruk av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat.

Målingene viste ingen forskjell i legumainaktivitet etter behandling med paklitaksel og zosuquidar sammen (svarte kolonner), sammenliknet med behandling med paklitaksel alene (åpne kolonner, fig. 4.5).





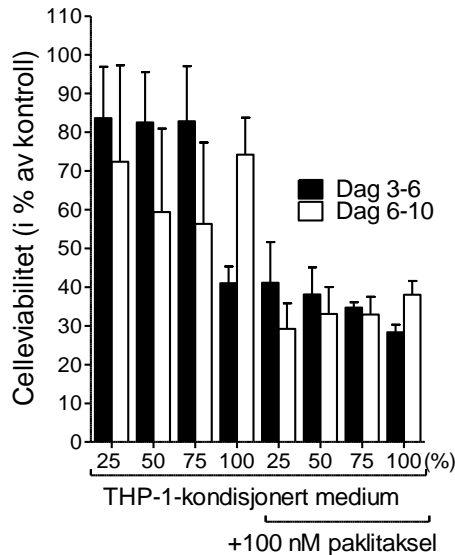
**Figur 4.5 Legumainaktivitet i THP-1-makrofager etter behandling med paklitaksel med eller uten tilsetning av zosuquidar.** THP-1-makrofager ( $5 \times 10^5$  /brønn) ble på dag 7 etter PMA-stimulering inkubert med paklitaksel (100 og 500 nM) med (svarte søyler) eller uten (åpne søyler) zosuquidar (1  $\mu$ M) i 24 timer. Legumainaktivitet (dF/ sekund per  $\mu$ g totalprotein) ble målt ved bruk av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat. Målingene er normalisert og presentert som prosent av kontroll (n = 1).

## 4.5 Kondisjonert cellemedium fra makrofager hemmer celleviabilitet av tykktarmkreftceller

For å undersøke om kondisjonert dyrkningsmedium fra THP-1-makrofager påvirker viabiliteten av HCT-116-celler, ble det utført en MTS-celleviabilitetstest. Kondisjonert medium fra THP-1 vil si medium som har vært i direkte kontakt med THP-1-makrofager over flere dager, og ble samlet etter dag 3-6 og dag 6-10 etter PMA-stimulering av cellene. HCT-116 ble deretter inkubert med ulike konsentrasjoner av det kondisjonerte mediet (25-100 %) i nytt medium med eller uten tilsetning av paklitaksel (100 nM) i 48 timer. Absorbans ved 490 nm ble målt etter inkubering med MTS-reagens, og celleviabiliteten ble beregnet.

Målingene etter fire timer viste at celleviabiliteten av HCT-116 ble redusert ved bruk av kondisjonert THP-1-medium, sammenliknet med 100 % ferskt RPMI-celledyrkningsmedium alene (Fig. 4.6). Det var imidlertid ingen signifikant forskjell i reduksjonen av viabiliteten ved bruk av det ene kondisjonerte mediet samlet fra dag 3-6, sammenliknet med mediet samlet fra dag 6-10 (Fig. 4.6).

Ved samtidig tilsetning av paklitaksel (100 nM) ble viabiliteten redusert med ca. 60 %, tilsvarende som ved paklitaksel alene i ferskt medium (Fig. 4.1 A).



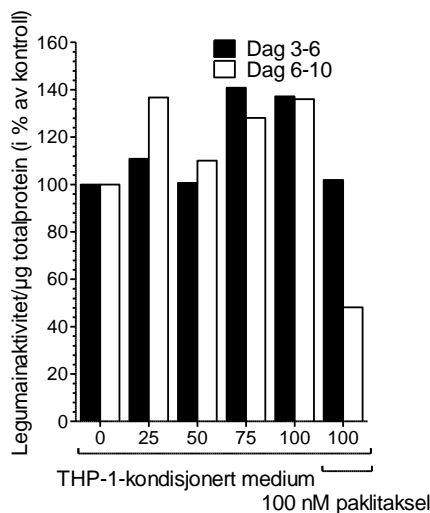
**Figur 4.6 Celleviabilitet av HCT-116-celler etter dyrkning i THP-1-kondisjonert medium med eller uten paklitaksel.** HCT-116-celler ( $2 \times 10^4$  /brønn) ble behandlet med 25-100 % kondisjonert medium fra THP-1-makrofager med eller uten paklitaksel (100 nM) i 48 timer. THP-1-kondisjonert medium ble samlet og brukt fra henholdsvis dag 3-6 (svarte søyler) og dag 6-10 (åpne søyler) etter PMA-differensiering av cellene. Absorbans ved 490 nm ble målt etter fire timers inkubering med MTS-reagens, og celleviabiliteten ble beregnet. Målingene ble normalisert mot HCT-116 i 100 % ferskt RPMI-celledyrkningsmedium og presentert som prosent  $\pm$  SEM (n = 2-3).

## 4.6 Kondisjonert cellemedium fra makrofager ser ut til å øke legumainaktivitet i tykktarmkreftceller

HCT-116-celler ble inkubert med økende konsentrasjoner (25-100 %) av THP-1-kondisjonert medium med eller uten paklitaksel (100 nM) i 24 timer. Det kondisjonerte mediet som ble brukt var likt som det som ble beskrevet i 4.5 (samlet etter henholdsvis dag 3-6 og 6-10 etter PMA-stimulering). Legumainaktiviteten i cellelysaten (dF/ sekund per  $\mu$ g totalprotein) ble deretter målt.

Målingene viste en tendens til økning i legumainaktivitet i HCT-116 ved inkubering med 75 % og 100 % THP-1-kondisjonert medium samlet fra både dag 3-6 og dag 6-10 (Fig. 4.7). Den samme tendensen ble observert med 25 % kondisjonert medium fra dag 6-10, men ikke med

mediet fra dag 3-6. Ved samtidig tilsetning av paklitaksel (100 nM) i 100 % kondisjonert medium, viste mediet fra dag 6-10 at legumainaktiviteten ble omtrent halvert. Det ble imidlertid ikke observert noen endring i legumainaktiviteten ved inkubering av paklitaksel (100 nM) med 100 % kondisjonert medium samlet fra dag 3-6 (Fig. 4.7). Forsøket ble kun utført én gang, og det kan derfor ikke trekkes sikre konklusjoner fra dette.

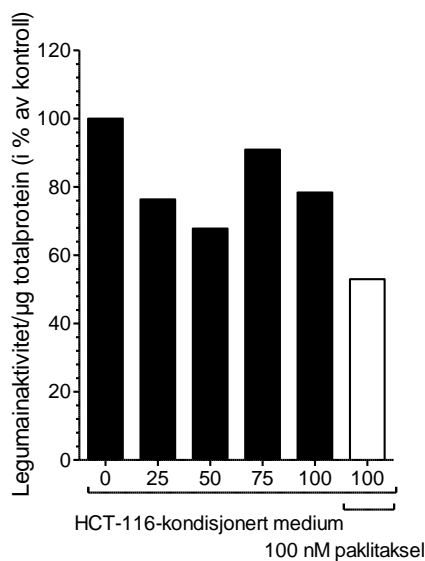


**Figur 4.7 Legumainaktivitet i HCT-116-celler etter dyrkning i THP-1-kondisjonert medium med eller uten paklitaksel.** HCT-116-celler ( $2,5 \times 10^4$ /brønn) ble behandlet med 25-100 % kondisjonert medium fra THP-1-makrofager med eller uten paklitaksel (100 nM) i 24 timer. THP-1-kondisjonert medium ble samlet og brukt fra henholdsvis dag 3-6 (svarte søyler) og 6-10 (åpne søyler) etter PMA-differensiering av cellene. Legumainaktivitet (dF/ sekund per  $\mu\text{g}$  totalprotein) ble målt ved bruk av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat. Målingene er normalisert mot HCT-116 i 100 % ferskt RPMI-celledyrkningsmedium og presentert som prosent av kontroll ( $n = 1$ ).

## 4.7 Kondisjonert cellemedium fra tykktarmkreftceller ser ut til å redusere legumainaktivitet i makrofager

THP-1-makrofager ble på dag 7 etter PMA-stimulering dyrket i 25-100 % HCT-116-kondisjonert medium med eller uten paklitaksel (100 nM) i 24 timer, og legumainaktivitet i cellelysaten ble deretter målt. Det HCT-116-kondisjonerte mediet var samlet etter 4 dagers dyrkning.

Det ble observert en tendens til nedgang i legumainaktivitet i THP-1-makrofager etter dyrkning i HCT-116-kondisjonert medium i 24 timer. Ved å tilsette 25 %, 50 % og 100 % HCT-116-kondisjonert medium ble det observert en nedgang på ca. 20-30 % i legumainaktivitet (Fig. 4.8). Nedgangen var derimot ikke like stor (ca. 10 %) da det ble tilsatt 75 % HCT-116-kondisjonert medium (Fig. 4.8). Ved samtidig tilsetning av paklitaksel (100 nM) i 100 % HCT-116-kondisjonert medium gikk legumainaktiviteten ytterligere ned med ca. 20 % sammenliknet med 100 % HCT-116-kondisjonert medium alene (Fig. 4.8).



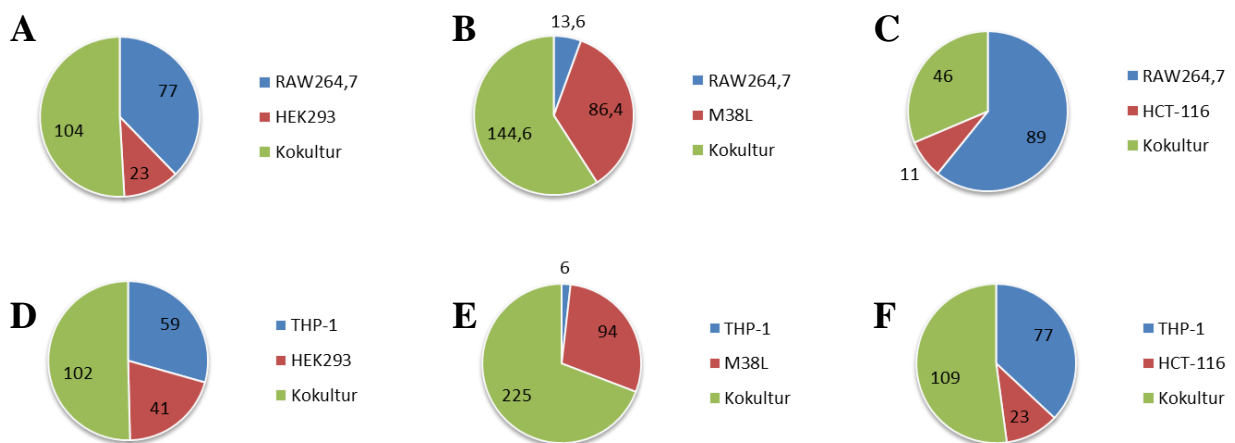
**Figur 4.8 Legumainaktivitet i THP-1-makrofager etter dyrking i HCT-116-kondisjonert medium med eller uten paklitaksel.** THP-1-makrofager ( $5 \times 10^5$  /brønn) ble på dag 7 etter PMA-stimulering dyrket i 25-100 % kondisjonert medium fra HCT-116 i 24 timer. HCT-116-kondisjonert medium ble samlet etter dyrking i 4 dager. Legumainaktiviteten (dF/ sekund per µg totalprotein) ble målt ved bruk av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat. Målingene er normalisert mot THP-1 dyrket i 100 % ferskt RPMI-celledyrkningsmedium og presentert som prosent av kontroll ( $n = 1$ ).

## 4.8 Legumainaktiviteten øker i kokulturer med makrofager og celler som overuttrykker legumain

Makrofager og ulike «kreftcellerlinjer» ble inkubert alene og i kokultur, og reguleringen av legumainaktiviteten ble undersøkt. Cellemodeller av «kreftcellerlinjer» som ble brukt var HCT-116 (tykktarmkreftceller), HEK 293 (humane nyreceller fra embryo) og M38L (monoklonal HEK293-cellelinje som overuttrykker legumain). Makrofagcellerlinjene som ble

brukt var THP-1-makrofager (dag 7 etter PMA-differensiering) og RAW264,7 (fra mus). De to celletypene i kokulturen ble sådd ut i samme tetthet og i samme brønn og var i direkte kontakt med hverandre og delte felles næringsmedium. Cellene ble inkubert i 72 timer og legumainaktiviteten (dF/ sekund per  $\mu\text{g}$  totalprotein) ble deretter målt (Fig. 4.9).

Resultatene viste at bare kokultur med makrofager og M38L-celler (overuttrykker legumain) ga en økning i legumainaktivitet i forhold til summen av aktiviteten i celletypene alene (100 %) (Fig. 4.9 B og E). Ved å inkubere THP-1-makrofager og M38L i kokultur økte aktiviteten med 125 % i forhold til summen av aktiviteten i celletypene alene (Fig. 4.9 E). Tilsvarende inkubering av RAW264,7 med M38L ga en økning i legumainaktivitet på 44,6 % (Fig. 4.9 B). Med de andre celletypene var det liten forskjell på aktiviteten i kokultur sammenliknet med summen av aktiviteten i celletypene alene, med unntak av koinkubering av RAW264,7 med HCT-116, hvor legumainaktiviteten var så lav som 46 % av kontroll (Fig. 4.9 C).



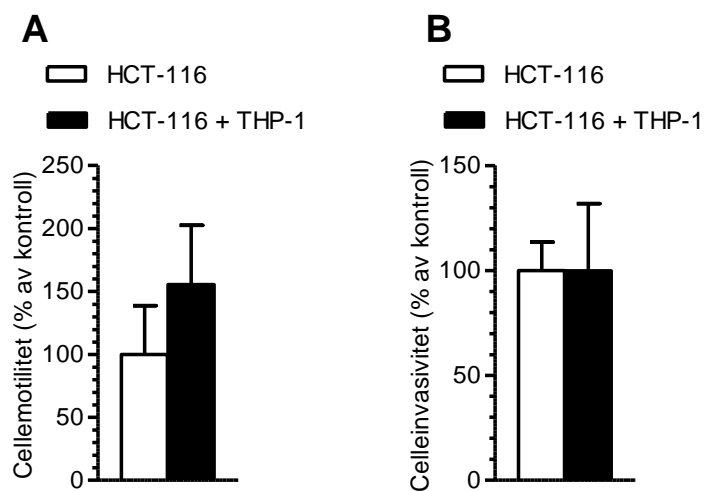
**Figur 4.9 Legumainaktivitet (%) i kokulturer av makrofager og “kreftceller”.** RAW264,7-celler og THP-1-makrofager (dag 7 etter PMA-stimulering), HEK293-, M38L- og HCT-116- celler ble inkubert alene og i kokultur ( $2,5 \times 10^5$  /brønn) i 72 timer. Legumainaktiviteten (dF/ sekund per  $\mu\text{g}$  totalprotein) ble målt ved et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat. Målingene er normalisert mot summen av celletypene i kokulturen hver for seg (100 %) og presentert som prosent av kontroll  $\pm$  SEM (n = 2-3). **A, B, C:** Kokulturer med RAW264,7-makrofager. **D, E, F:** Kokulturer med THP-1-makrofager.

## 4.9 Tendens til økt motilitet av tykktarmkreftceller i nærvær av makrofager

For å undersøke om THP-1-makrofager påvirket motiliteten og/eller invasiteten til HCT-116, ble det utført kokulturinkubering av de to celletypene i indirekte kontakt ved hjelp av brønninnlegg. THP-1 ble dyrket i bunnen av brønnene, og anvendt på dag 7 etter PMA-differensieringen. [<sup>3</sup>H]-tymidinmerkede HCT-116 ble sådd ut i brønninnlegg over THP-1. For å kunne si noe om invasiteten til cellene, ble halvparten av brønninnleggene dekket med Matrigel. Etter 24 timers inkubering ble radioaktivitet av de merkede cellene telt ved bruk av scintillasjonsteller.

Målingene viste at det etter 24 timer var en tendens til, men ikke signifikant økning av motiliteten til HCT-116 i indirekte kokultur med THP-1, sammenliknet med motiliteten i fravær av THP-1 (Fig. 4.10 A).

Det ble ikke vist noen forskjell i invasiteten til HCT-116 i indirekte kokultur med THP-1, sammenliknet med HCT-116 alene (Fig. 4.10 B).



**Figur 4.10 Motilitet og invasivitet av HCT-116-celler i indirekte kokultur med THP-1-makrofager.** THP-1-makrofager ( $1 \times 10^5$ /brønn) ble på dag 7 etter PMA-stimulering inkubert i kokultur med [<sup>3</sup>H]-tymidinmerkede HCT-116-celler ( $2,5 \times 10^4$  /brønn) i brønninnlegg. Etter 48 timers inkubering ble HCT-116-celler som hadde migrert gjennom filteret skrapet av og radioaktivitet telt i scintillasjonsteller. Målinger er normalisert og presentert som prosent av totalt antall celler  $\pm$  SEM (n = 3) **A:** Motilitet av HCT-116 alene og i kokultur. **B:** Invasivitet av HCT-116 alene og i kokultur.

## Resultater

---

(Utført i samarbeid med Robert Smith og Hilde Nilsen på grunn av personlig manglende strålevernskurs).

## 5 Diskusjon

Studier viser at legumain er høyt uttrykt i flere typer svulster, blant annet ved kolorektal-, prostata- og brystkreft [24, 25, 32]. Som følge av lokalt stress, ser transkripsjonen av genet som koder for legumain (LGMN) ut til å oppreguleres under utviklingen av selve svulsten [32, 48]. Celler som overuttrykker legumain assosieres med mer metasterende og invasive egenskaper, og høyt uttrykk av legumain er derfor forbundet med en dårligere prognose [32]. Nyere studier viser at disse egenskapene blant annet henger sammen med evnen legumain har til å aktivere pro-matriksmetalloproteinase-2 (pro-MMP2), og således føre til nedbrytningen av ekstracellulær matriks (ECM) [32, 49]. I tillegg kan legumain degradere matriksproteinet fibronektin, som er en viktig bestanddel av ECM [33].

I likhet med kreftceller overuttrykker tumorassosierte makrofager (TAMs) også legumain [37, 48]. TAMs hører inn under M2-typen av makrofager, og promoterer proliferasjon, invasjon og metastase av tumorceller gjennom utskillelsen av ulike vekstfaktorer og cytokiner [38, 50]. Forskning viser at TAMs rekrutteres til svulstområder av tumor-deriverte kjemoattraktanter. Vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) og kjemokiner i CC-familien er eksempler på slike attraktanter, og det foreligger positiv korrelasjon mellom nivåene av disse proteinene og antall TAMs som er tilstedeværende i humane svulster [51, 52]. Enkelte studier tyder på at denne akkumuleringen av TAMs øker i takt med svulstutviklingen, men dette er ikke vitenskapelig bevist og trenger ytterligere forskning [53].

Ettersom både tumorceller og TAMs overuttrykker legumain kan det tenkes at samspillet mellom disse cellene spiller en viktig rolle i utviklingen av kreft. Dette er nylig vist for andre cysteinproteaser som cathepsin B og S ved brystkreft [40]. Studien viste at makrofager som uttrykte disse cathepsinene hadde en beskyttende effekt på celledød av tumorceller ved behandling med paklitaksel. Denne effekten ble reversert ved tilsetning av en cathepsinhemmer (JPM-OEt), og bekreftet at det var cathepsinene som bidro til å beskytte mot celledød. I den samme studien ble det også testet om denne effekten var avhengig av direkte kontakt mellom tumorceller og makrofager, eller om indirekte kokultur av cellene var tilstrekkelig for å hindre celledød etter behandling med paklitaksel. Resultatene viste det sistnevnte, og effekten på celledød ved bruk av kondisjonert medium fra makrofager var lik som effekten av direkte kokulturinkubering av cellene [40].



Det var i denne oppgaven interessant å studere samspillet mellom makrofager og tykktarmkreftceller, med spesielt fokus på legumain. Det var ønskelig å undersøke om legumain hadde en liknende beskyttende rolle mot paklitaksel-indusert celledød i tykktarmkreftceller, slik som nylig er vist for cathepsin S og B ved brystkreft [40]. I tillegg var det interessant å finne ut om makrofager påvirket motiliteten og invasiviteten av celler fra tykktarmkreft når cellene var i indirekte kokultur. Bakgrunnen for dette er at makrofager overuttrykker legumain [37], og at celler med høyt uttrykk av legumain har letterere for å migrere og invadere vevet rundt svulsten [32].

### 5.1 Valg av cellemodeller

For å studere samspillet mellom kreftceller og makrofager *in vitro* ble HCT-116 og THP-1 valgt som cellelinjer. HCT-116 er en adherent tykktarmkreftcellelinje fra humant tarmepitel. Cellelinjen har et høyt uttrykk av den aktive formen av legumain (36 kDa) intracellulært, og skiller ut proformen (56 kDa) i kondisjonert medium. HCT-116 sekreterer i tillegg den endogene legumainhemmeren cystatin E/M, og studier viser at det også er tilstedeværelse av hemmeren intracellulært [25]. THP-1 er en monocytcellerlinje utvunnet fra perifert blod fra en pasient med akutt monocytisk leukemi. Cellelinjen differensieres til makrofager etter behandling med forbolesteren PMA (40 ng/ml) i 24 timer. PMA virker ved å aktivere proteinkinase C-medierte intracellulære signalveier, og fører således til hemming av celleproliferasjonen. Hemming av proliferasjonen fører videre til at THP-1 differensieres til funksjonelle makrofager [54]. THP-1-cellelinjen er tidligere ofte brukt som *in vitro*-modell for å studere differensiering og fysiologi i både monocytter og makrofager [41].

Både HCT-116 og THP-1 er cellelinjer fra samme art, og dette er en fordel når samspillet mellom cellelinjene skal studeres. Bruk av cellelinjer i forhold til primære cellekulturer er også en fordel, da cellelinjer er bedre egnet til langvarig dyrkning i kultur, noe som er svært gunstig i forsøkssammenheng. Cellelinjene i denne oppgaven ble brukt til forsøk innenfor maksimalt 25 passasjer.

THP-1-makrofager har et høyt uttrykk av legumain. I 1999 ble det for første gang vist at det er en oppregulering i genekspresjonen av legumain i monocyttderiverte makrofager (MDMs) [55]. Det er ikke målbare nivåer av legumain i native THP-1-monocytter. Studier i vårt laboratorium har imidlertid vist at behandling med PMA fører til 500 gangers økning i

ekspresjonen av legumain-mRNA i THP-1-makrofager sammenliknet med uddifferensierte THP-1-celler [56]. Den samme studien viste også at mesteparten av det som produseres av legumain i MDMs ble skilt ut i næringsmediet som proformen av legumain [56]. Dette er svært interessant i et eventuelt samspill mellom makrofager og kreftceller.

## 5.2 Betydningen av kokultur på celleviabilitet og legumainaktivitet

I celleviabilitetsforsøkene med HCT-116-tykktarmkreftceller og THP-1-makrofager viste resultatene at paklitaxsel førte til en reduksjon i celleviabilitet av begge celletypene da de ble behandlet hver for seg. I tykktarmkreftceller var det større reduksjon i celleviabilitet etter 48 timers inkubering sammenliknet med inkubering i 24 timer. Dette kan være en indikasjon på at maksimal effekt av paklitaxsel i tykktarmkreftceller oppnås ved lenger inkubering av cellene enn 24 timer. Studier som tidligere er gjort på sammenhengen mellom eksponeringstiden av paklitaxsel og celledød viser at det er stor variasjon i hvordan de enkelte cellelinjene påvirkes [57]. Paklitaxsel virker ved å stabilisere mikrotubuli og dermed hemme celledelingen [9, 13]. Det utløses videre en kaskade av fosforylerings- og caspaseavhengige hendelser som til slutt resulterer i apoptose [12, 14]. Denne toksiske virkningen av paklitaxsel er i stor grad avhengig av at cellene er i deling, og en hypotese er at andelen av celler som er i deling etter 48 timer er større enn andelen etter 24 timer. Dette kan være en forklaring på hvorfor den toksiske virkningen av paklitaxsel er større etter 48 timer. Reduksjonen i celleviabilitet av makrofager var relativ lik som for tykktarmkreftceller etter 24 timers inkubering med paklitaxsel (ca. 20 %). Etersom makrofager ikke har evnen til å dele seg, er det grunn til å tro at paklitaxsel i liten grad påvirker viabiliteten av disse cellene. Det at det likevel ble observert en reduksjon i celleviabilitet av makrofager stemmer ikke med denne hypotesen, og indikerer at stabilisering av mikrotubuli ikke bare fører til celledød når cellen er i deling. Mikrotubuli har også en essensiell rolle i å dirigere intracellulær vesikkeltransport [14], og en hypotese er blant annet at cellen dør når denne transporten hemmes.

Resultatene viste derimot at celleviabiliteten av tykktarmkreftceller og makrofager i kokultur økte etter behandling med paklitaxsel. Dette indikerer at det er et samspill mellom celletypene, og at dette samspillet hindrer effekten av paklitaxsel. Tilsvarende observasjoner er som nevnt publisert i studien av Shree *et al.* [40], der makrofager hadde en beskyttende effekt på virkningen av paklitaxsel i brystkreftceller. I studien ble det vist at paklitaxsel

induserte infiltrasjon av TAMs i svulster, og ved å tilsette en cathepsinhemmer ble det konkludert med at det var cathepsinene i makrofagene som bidro til den beskyttende effekten. En hypotese kan være at det samme skjer i samspillet mellom makrofager og tykktarmkreftceller. Det at celleviabiliteten faktisk ser ut til å øke i kokultur etter tilsetning av paklitaksel indikerer at makrofagene skiller ut vekstfaktorer som stimulerer celleproliferasjon av kreftcellene, samtidig som at makrofagene hindrer effekten av paklitaksel, men på hvilken måte er fortsatt ukjent. For å få en indikasjon på hvor stor rolle legumain spiller i samspillet mellom makrofager og tykktarmkreftceller, er det i ettertid grunn til å undersøke kokulturen med tilsetning av en hemmer av enzymet, som for eksempel cystatin E/M.

Ved å måle legumainaktivitet i tykktarmkreftceller eller makrofager etter behandling med økende konsentrasjoner med paklitaksel, ble det observert en nedgang i aktivitet i tykktarmkreftcellene, men ikke i makrofagene. Paklitaksel reduserer som nevnt celleviabiliteten av begge celletypene, og det er dermed også grunn til å tro at effekten på legumainaktiviteten er lik i begge celletyper. Dette var imidlertid ikke tilfelle i makrofagene, og en hypotese kan være at paklitaksel fører til økt migrering av makrofagene. For å få en indikasjon på om dette stemmer, burde det vært utført et migreringsforsøk med makrofager etter behandling med paklitaksel. En studie utført av Solberg *et al.* [56] viste at mesteparten av det som blir produsert av legumain i MDMs blir skilt ut som prolegumain. Legumain aktiveres i surt miljø, og dersom to celler ligger tett inntil hverandre kan det oppstå sure mikrodomener mellom overflatene av cellene, og dette kan resultere i aktivering av legumain ekstracellulært. Det er også vist at prolegumain kan internaliseres i celler, og en påfølgende aktivering av enzymet intracellulært kan også være med på å forklare den manglende korrelasjonen mellom nedgang i celleviabilitet og legumainaktivitet av/i makrofager etter behandling med paklitaksel.

Da de to celletypene ble dyrket i kokultur, ble det observert en nedgang i legumainaktivitet etter behandling med henholdsvis 50, 100 og 500 nM paklitaksel. Som tidligere nevnt viste tilsvarende forsøk at paklitaksel økte celleviabiliteten av makrofager og tykktarmkreftceller i kokultur, men det ble imidlertid ikke gjort de samme observasjonene i forhold til legumainaktivitet. I tillegg viste resultatene at aktiviteten av legumain gikk ned i kokultur uten tilsetning av paklitaksel, sammenliknet med summen av hver celletype alene. En studie utført av Edgington *et al.* [34] observerte en liten økning i legumainaktivitet ved kokulturinkubering av brystkreftcellelinjen 4T1 og primære makrofager sammenliknet med

summen av hver celletype alene. Tilsvarende kokultur av makrofager og HCT-116 fra tykktarmkreft (som er brukt i denne oppgaven) viste derimot ingen regulering av legumainaktivitet. I denne oppgaven ble det imidlertid brukt MDMs, og det kan se ut til at det er forskjell på primære og monocytt-deriverte makrofager i forhold til reguleringen av legumainaktivitet i kokultur med HCT-116. For å bekrefte funnene i studien utført av Edgington *et al.*, burde kokulturinkubasjonsforsøket med primære makrofager og HCT-116-celler vært gjentatt.

Paklitaxel er substrat for permeabilitets-glykoprotein (p-gp), og blir i stor grad transportert ut av cellene av pumpen. Det var derfor interessant å undersøke om celleviabiliteten og/eller legumainaktiviteten ble endret ved å kombinere paklitaxel med en hemmer av p-gp. Zosuquidar er en ekstremt potent hemmer av p-gp, og studier har vist at hemmeren er svært spesifikk. Det kan derfor tenkes at den kan ha en viktig rolle i bekjempelsen av cytostatikaresistens, og forbindelsen er foreløpig under utprøving i fase tre i kliniske studier [58, 59]. Zosuquidar hører inn under en ny gruppe av p-gp-hemmere, og sammenliknet med andre tradisjonelle hemmere med samme bruksindikasjon har zosuquidar derfor få tilleggseffekter. Det er nemlig vist at andre hemmere av p-gp (for eksempel kalsiumkanalblokkere) har en tendens til å endre farmakokinetikken av diverse cytostatika, og kan blant annet føre til høyere plasmakonsentrasjoner av forbindelsene *in vivo* [19, 60].

Forsøkene med tykktarmkreftceller eller makrofager viste ingen signifikante endringer i celleviabilitet ved samtidig tilsetning av paklitaxel og zosuquidar, sammenliknet med paklitaxel alene. Det ble heller ikke observert noen forskjell da celletypene ble behandlet med paklitaxel og zosuquidar i kokultur. Grunnen til dette kan være at den lave cytotoksiske effekten av paklitaxel i de behandlede cellene ikke kommer av at p-gp hindrer legemidlet i å virke der det skal, men at andre mekanismer er involvert. Dantzig *et al.* har studert varigheten av virkningen av zosuquidar på p-gp sammen med doxorubicin, og studien viste at 0,5  $\mu\text{M}$  zosuquidar økte virkningen av doxorubicin i tumorceller i opptil 24 timer [19]. Dette indikerer at både den valgte inkubasjonstiden (24 timer) og konsentrasjonen av zosuquidar (1  $\mu\text{M}$ ) skulle være passende for å hemme p-gp effektivt. I denne oppgaven ble det imidlertid brukt paklitaxel, og om dataene fra studien med doxorubicin kan sammenliknes med paklitaxel er for øvrig usikkert. Det kan derfor spekuleres i om konsentrasjonen som ble brukt av zosuquidar hadde innvirkning på resultatet, og om det burde blitt tilsatt gjentatte doser av

hemmeren gjennom hele inkubasjonstiden. I tillegg burde det vært undersøkt hvor mye p-gp som faktisk er uttrykt i HCT-116-celler og THP-1-makrofager.

Behandling av makrofager med paklitaxel og zosuquidar viste heller ingen forandring i legumainaktivitet sammenliknet med paklitaxel alene. Siden den samme tilsetningen ikke hadde noen effekt på celleviabiliteten i makrofager, er det naturlig å tenke at hemmeren heller ikke påvirker paklitaxel sin effekt på legumainaktiviteten i cellene. Forsøket ble imidlertid bare utført én gang, og det kan derfor ikke trekkes noen sikre konklusjoner fra dette.

Det var interessant å undersøke om mediet fra MDMs påvirket motiliteten og invasiviteten av tykktarmkreftceller, og om det var legumain som bidro til en eventuell forskjell. Det kunne imidlertid ikke konkluderes med at en eventuell forskjell i motilitet og/eller invasivitet i tykktarmkreftcellene var forårsaket av legumain, men resultatene ga en indikasjon på om det var faktorer i mediet som økte motiliteten og/eller invasiviteten i cellene. Det er kjent at MDMs skiller ut proformen av legumain i kulturmediet [56], og en hypotese er at kreftcellene er i stand til å ta opp sekretet prolegumain fra makrofagene og selv aktivere enzymet intracellulært til sin egen fordel. Dette er nylig vist i en studie i vårt laboratorium med HEK293-celler og publisert av Smith *et al.* [24]. I tillegg er det også vist at legumain kan ha en kjemotakseffekt på monocytter, og at den kjemoattraktante aktiviteten til legumain er like potent som for VEGF [61]. Videre ser det ut til at denne effekten er uavhengig av enzymets proteaseaktivitet, og indikerer at tilstedeværelsen av legumain kan være nok til å øke motiliteten og/eller invasiviteten av tykktarmkreftceller. Indirekte kokulturinkubasjon viste en tendens til økt motilitet av tykktarmkreftcellene sammen med makrofager, men ingen signifikant forskjell i forhold til motilitet av kreftcellene alene. Tilsvarende ble det heller ikke observert noen forskjell i invasiviteten av cellene i kokultur. Slike *in vitro*-modeller kan ikke helt gjenskape hva som faktisk skjer *in vivo*, og det kan derfor ikke utelukkes at makrofager påvirker motiliteten og/eller invasiviteten av tykktarmkreftceller *in vivo*. Det kan for eksempel være av betydning at det i denne *in vitro*-modellen ikke forelå direkte kontakt mellom celletypene, noe som definitivt vil være tilfelle *in vivo*. I tillegg er det vist at HCT-116 skiller ut cystatin E/M, og at det skjer en internalisering av hemmeren intracellulært [24, 25]. Cystatin E/M kan derfor hemme aktivt legumain både intracellulært og eventuelt ekstracellulært i sure mikrodomener.

Det var også ønskelig å undersøke om det ble noen endring i legumainaktivitet ved å dyrke makrofager og kreftceller i direkte kokultur hvor de ulike celletypene oppnår direkte

celle-celle-kontakt. Resultatene viste at legumainaktiviteten økte i kokulturer med makrofager og cellelinjen M38L. M38L er transfektert med legumain-cDNA i en pcDNA3,1-vektor (pLGMN) [24], og overuttrykker dermed legumain. Kokultur av THP-1-makrofager og M38L ga en økning i legumainaktivitet på 125 % sammenliknet med summen av aktiviteten i hver celletype alene. Tilsvarende økte aktiviteten av legumain med 44,6 % i kokultur av RAW264,7-makrofager og M38L. Økningen i legumainaktivitet i disse kokulturene indikerer at makrofager og/eller kreftceller tar opp prolegumain når tilstedeværelsen av det inaktive enzymet er stor, og aktiverer legumain intracellulært.

Det ble derimot observert en reduksjon i legumainaktivitet i direkte kokultur av HCT-116 og RAW264,7-makrofager, men ikke i kokultur av HCT-116 og THP-1-makrofager. Det at legumainaktiviteten påvirkes forskjellig i de ulike kokulturene, indikerer at de to ulike makrofagtypene påvirker legumainaktiviteten forskjellig sammen med HCT-116. Dette viser at samspillet mellom humane tykktarmkreftceller og makrofager fra henholdsvis mus (RAW264,7) og menneske (THP-1) er ulikt, og demonstrerer viktigheten i å sammenlikne cellelinjer fra samme art. *In vivo* vil imidlertid et eventuelt samspill være mellom primære makrofager og kreftceller, og ikke MDMs som er brukt i denne oppgaven. For å få en best mulig sammenlikning med *in vivo*, burde det også vært undersøkt om legumainaktiviteten i kokultur med HCT-116 påvirkes forskjellig ved kokulturinkubering med henholdsvis primære og monocyttderiverte makrofager.

HCT-116-cellene viste reduksjon i celleviabilitet etter dyrkning i 48 timer med THP-1-kondisjonert medium. Ved samtidig tilsetning av THP-1-kondisjonert medium og paklitaxel ble det observert en reduksjon på 60 %, tilsvarende som paklitaxel alene i ferskt medium. Studien publisert av Shree *et al.* [40] viste at den cathepsin-beskyttende effekten på celledød av tumorcellene etter behandling med paklitaxel ikke var avhengig av direkte kontakt mellom cellene, men at kondisjonert medium fra makrofager var nok til å oppnå samme effekt. Dette viste imidlertid ikke resultatene i denne oppgaven, og det kan spekuleres i om denne beskyttende effekten er begrenset til cathepsiner, og at legumain dermed ikke spiller en tilsvarende beskyttende rolle. THP-1-kondisjonert medium så ut til å øke legumainaktiviteten i tykktarmkreftceller, og dette stemmer med hypotesen om at kreftcellene internaliserer og aktiverer makrofag-sekretet proform av legumain intracellulært. I tillegg førte dyrkning av THP-1-makrofager i HCT-116-kondisjonert medium til en reduksjon i legumainaktivitet, og som tidligere nevnt kan dette være et resultat av at tykktarmkreftcellene sekreterer cystatin E/M

i mediet. Cystatin E/M kan internaliseres i makrofagene og hemme aktiveringen av prolegumain [24].

## 6 Konklusjon

Etter gjennomført studie kan det konkluderes med at:

- Paklitaxsel hemmer celleviabilitet av tykktarmkreftceller og makrofager, men ikke når cellelinjene er i direkte kokultur
- Paklitaxsel hemmer legumainaktivitet i tykktarmkreftceller, men ikke i makrofager. Kokulturinkubering av HCT-116-celler og THP-1-makrofager reduserer legumainaktivitet sammenliknet med summen av aktiviteten i cellelinjene hver for seg
- Kondisjonert medium fra makrofager ser ut til å hemme celleviabilitet av tykktarmkreftceller, men øke legumainaktivitet
- Kondisjonert medium fra tykktarmkreftceller ser ut til å redusere legumainaktivitet i makrofager
- Legumainaktiviteten øker i kokulturer med makrofager og celler som overuttrykker legumain (M38L)
- Det ser ut til å være en tendens til økt motilitet av tykktarmkreftceller i nærvær av makrofager



# Litteraturliste

1. Norsk-Elektronisk-Legehåndbok. *Hva er kreft?* 2009; Available from: <http://legehandboka.no/kreft/pasientinformasjon/om-kreft/kreft-1808.html>.
2. Norsk-Elektronisk-Legehåndbok. *Tykkarmkreft og endetarmskreft*. 2013; Available from: <http://legehandboka.no/mage-tarm/pasientinformasjon/tykkarm/tykkarms-og-endetarmskreft-2213.html>.
3. Weitz, J., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2005. **365**(9454): p. 153-65.
4. Helsedirektoratet, *Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av tykk- og endetarmskreft*, 2012.
5. Wang, Y., et al., *Lynch syndrome related endometrial cancer: clinical significance beyond the endometrium*. J Hematol Oncol, 2013. **6**(1): p. 22.
6. Ruder, E.H., et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort*. American Journal of Gastroenterology, 2011. **106**(7): p. 1340-1350.
7. Eikesdal, H. and T. Guren, *Cytostatikaboken*, U.i. Oslo, Editor 2009.
8. Sigma-Aldrich. *Paclitaxel*. 2013; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t7191?lang=en&region=NO>.
9. Singh, P., et al., *Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs*. IUBMB Life, 2008. **60**(6): p. 368-75.
10. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology*. 2. utgave ed. 2003: Garland Science. p. 579-585.
11. Molecular-Expression. *Microtubules*. 2004; Available from: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/microtubules/microtubules.html>.
12. Massarotti, A., et al., *Identification of novel antitubulin agents by using a virtual screening approach based on a 7-point pharmacophore model of the tubulin colchicine site*. Chem Biol Drug Des, 2011. **78**(6): p. 913-22.
13. Gligorov, J. and J.P. Lotz, *Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences*. Oncologist, 2004. **9 Suppl 2**: p. 3-8.
14. Alberts. *Microtubules*. Available from: <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/microtub.htm>.
15. Molden, E., *P-glykoprotein – en pumpe av betydning for legemiddelrespons*. Tidsskriftet for Den norske legeforening, 2004: p. Nr. 2.
16. Sparreboom, A., et al., *Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(5): p. 2031-2035.
17. Pharmainfo.net. *Novel Drug Delivery Approaches to bypass P- Glycoprotein Efflux Pump*. Available from: <http://www.pharmainfo.net/reviews/novel-drug-delivery-approaches-bypass-p-glycoprotein-efflux-pump>.
18. Hendriks, J.J.M.A., et al., *P-glycoprotein and cytochrome P450 3A act together in restricting the oral bioavailability of paclitaxel*. International Journal of Cancer, 2013. **132**(10): p. 2439-2447.
19. Dantzig, A.H., et al., *Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a potent cyclopropyldibenzosuberane modulator, LY335979*. Cancer Research, 1996. **56**(18): p. 4171-4179.
20. Dantzig, A.H., et al., *Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1999. **290**(2): p. 854-862.

21. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 785-99.
22. Rawlings, N.D., A.J. Barrett, and A. Bateman, *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D343-50.
23. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 8090-8.
24. Smith, R., et al., *Intra- and extracellular regulation of activity and processing of legumain by cystatin E/M*. Biochimie, 2012. **94**(12): p. 2590-9.
25. Haugen, M.H., et al., *Nuclear Legumain Activity in Colorectal Cancer*. PLoS ONE, 2013. **8**(1).
26. Shirahama-Noda, K., et al., *Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33194-9.
27. Halfon, S., et al., *Autocatalytic activation of human legumain at aspartic acid residues*. FEBS Letters, 1998. **438**(1-2): p. 114-118.
28. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(40): p. 38980-38990.
29. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 695-9.
30. Choi, S.J., et al., *Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27747-53.
31. Liu, C., et al., *Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2957-64.
32. Murthy, R.V., et al., *Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(6): p. 2293-2299.
33. Morita, Y., et al., *Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(7): p. 1417-24.
34. Edgington, L.E., et al., *Functional imaging of legumain in cancer using a new quenched activity-based probe*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(1): p. 174-182.
35. Briggs, J.J., et al., *Cystatin E/M suppresses legumain activity and invasion of human melanoma*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 17.
36. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 2001, Oslo: Gyldendal.
37. Luo, Y., et al., *Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(8): p. 2132-2141.
38. Kamoshida, G., et al., *Monocyte differentiation induced by co-culture with tumor cells involves RGD-dependent cell adhesion to extracellular matrix*. Cancer Letters, 2012. **315**(2): p. 145-152.
39. Wang, Y.C., et al., *Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses*. Cancer Research, 2010. **70**(12): p. 4840-4849.
40. Shree, T., et al., *Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer*. Genes and Development, 2011. **25**(23): p. 2465-2479.

41. Grodzki, A.C.G., C. Giulivi, and P.J. Lein, *Oxygen Tension Modulates Differentiation and Primary Macrophage Functions in the Human Monocytic THP-1 Cell Line*. PLoS ONE, 2013. **8**(1).
42. Solberg, S. and O.D. Laerum, [*Cryobiology-- freeze preservation and storage of living cells and tissues*]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2004. **124**(20): p. 2607-9.
43. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
44. Johansen, H.T., C.G. Knight, and A.J. Barrett, *Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 1999. **273**(2): p. 278-283.
45. Cleland, W.W., *Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups*. Biochemistry, 1964. **3**(4): p. 480-482.
46. Promega, *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*, 2009.
47. Scientific, F. Millipore Culture plate insert Organotypic. 2011; Available from: <http://www.fisher.co.uk/product/index.php/FDR-541-030L/Millipore/Culture%20plate%20insert/Organotypic>.
48. Wang, L., et al., *Legumain: A biomarker for diagnosis and prognosis of human ovarian cancer*. Journal of Cellular Biochemistry, 2012. **113**(8): p. 2679-2686.
49. Chen, J.M., et al., *Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase*. Biol Chem, 2001. **382**(5): p. 777-83.
50. Kang, J.C., et al., *Intratumoral macrophage counts correlate with tumor progression in colorectal cancer*. Journal of Surgical Oncology, 2010. **102**(3): p. 242-248.
51. Murdoch, C., A. Giannoudis, and C.E. Lewis, *Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2224-2234.
52. Lewis, C.E. and J.W. Pollard, *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. Cancer Research, 2006. **66**(2): p. 605-612.
53. Bailey, C., et al., *Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer*. Clinical and Experimental Metastasis, 2007. **24**(2): p. 121-130.
54. Schwende, H., et al., *Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(4): p. 555-61.
55. Hashimoto, S.I., et al., *Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells*. Blood, 1999. **94**(3): p. 845-852.
56. Solberg, R., et al., *Atorvastatin inhibits legumain activity and prolegumain secretion from macrophages*, 2013, University of Oslo (Manuskript under utarbeidelse).
57. Liebmann, J.E., et al., *Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines*. British Journal of Cancer, 1993. **68**(6): p. 1104-1109.
58. Health, U.S.N.I.o. *Clinical Trials*. 2013; Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00046930?term=zosuquidar+phase&rank=3>.
59. Perego, P., et al., *Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic*. Current Medicinal Chemistry, 2001. **8**(1): p. 39-50.
60. Orthmann, A., I. Fichtner, and R. Zeisig, *Improving the transport of chemotherapeutic drugs across the blood-brain barrier*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2011. **4**(4): p. 477-90.
61. Clerin, V., et al., *Expression of the cysteine protease legumain in vascular lesions and functional implications in atherogenesis*. Atherosclerosis, 2008. **201**(1): p. 53-66.

# Vedlegg

## CELLEDYRKNING

### RPMI-celledyrkningsmedium (500 ml)

417,5 ml RPMI

22,5 ml glukose (4,5g/l)

5 ml natriumpyrovat (1 mM)

1,7 µl merkaptoetanol (0,05 mM)

50 ml føtalt bovint serum (FBS)

5 ml penicillin (100 U/ml)/ streptomycin (100 µg/ml)

### DMEM-celledyrkningsmedium (500 ml)

435 ml DMEM

10 ml natriumbikarbonat (7,5 %)

50 ml føtalt bovint serum (FBS)

5 ml penicillin (10 000 U/ml)/ streptomycin (10 mg/ml)

### 1 x PBS (1 L)

0,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

6 g natriumcitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

8 g NaCl

Destillert vann til 1 liter

### Lysisbuffer (pH 5,8, 500 ml)

14,71 g natriumcitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,19 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

5 g (w/v) N-oktyl-β-D-glukopyranosid

Destillert vann til 500 ml

### **TOTALPROTEINMÅLING**

Fortynnet Bio-Rad-løsning (fargereagens) (1:5, 50 ml)

10 ml Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

40 ml dH<sub>2</sub>O

### **ENZYMAKTIVITETSMÅLING**

Legumainassaybuffer (pH 5,8, 1 L)

8,3 g sitronsyre (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)

21,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

0,37 g Na<sub>2</sub>EDTA

0,1 g CHAPS

Destillert vann til 1 liter

200 µl DTT (200 mM) tilsettes 40 ml legumainassaybuffer rett før bruk

Legumain substratløsning (34 µM, 14,5 ml)

200 µl Z-Ala-Ala-Asn-AMC (2,5 mM) (løst i DMSO)

14,5 ml legumainassaybuffer

### **IMMUNOBLOTTING (WESTERNBLOTTING)**

Blotto (100 ml)

5 g fettfri tørrmelk

10 ml T-TBS

Destillert vann til 100 ml

T-TBS (10 x) (pH 7,5, 2 L)

24,2 g Tris

146,8 g NaCl

10 ml Tween 20

Destillert vann til 2 liter

### **ACETONFELLINGSPROSEDYRE**

1. Beregn mengde cellelysat som inneholder 10  $\mu$ g totalprotein, og overfør mengden til nye merkede eppendorfrør
2. Tilsett fire ganger så stor mengde iskald aceton (100 %) og vortex
3. Inkuber i 1 time ved -20 °C i fryser
4. Sentrifuger i 20 minutter ved 15000 G og 4 °C, og sug forsiktig av supernatanten
5. Vask med 1 ml iskald aceton (100 %)
6. Sentrifuger i 10 minutter ved 15000 G og 4 °C, og sug supernatanten forsiktig av
7. Tørk proteinpelletten i ca. 20-30 minutter i romtemperatur (unngå overtørking)

Vant posterpris i basalfarmakologi på NSFTs vintermøte på Beitostølen 24.-27.januar 2013.



## Regulering av legumain i samspillet mellom makrofager og kreftceller

Kjersti Bergh Anonsen, Hilde Nilsen, Robert Smith, Harald Thidemann Johansen, Rigmor Solberg  
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, postboks 1068 Blindern, Oslo

### Problemstilling

Legumain, en asparaginylenoendopeptidase, er uttrykt i de fleste normale humane vev, men proteasen er overuttrykt i faste svulster, blant annet ved tykktarmskreft. Tumorassosierte makrofager (TAMs) overuttrykker legumain, og det er nylig vist at hemming av TAMs reduserer tumorvekst og angiogenese. Legumain finnes både intracellulært i lysosomene og bundet til integriner på celleoverflaten, men kan også skilles ut fra celler som overuttrykker legumain. En hypotese er at endopeptidase prosesserer og/eller aktiverer andre proteaser som bryter ned ekstracellulær matrix, som pro-MMP2 og cathepsiner. Disse proteasene er assosiert med økt celledifferensiering og invasivitet, og høyt uttrykk av legumain er forbundet med dårlig prognose. Samspillet mellom makrofager og kreftceller ser derfor ut til å spille en viktig rolle i utviklingen av kreft. I denne studien undersøkes makrofager og tykktarmskreftceller hver for seg og i kokultur, med spesielt fokus på legumain. I tillegg studeres legumain i cellene etter påvirkning av paklitaksel, en cytotoxiske tubulinhemmer.

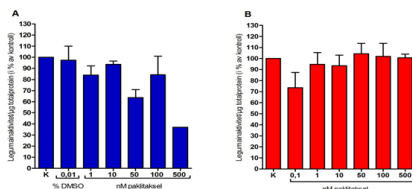
### Materialer og metoder

Humane HCT-116-tykktarmskreftceller (ATCC; CCL-247) og PMA-differensierte THP-1-makrofager (ATCC; TIB-202) ble brukt som celled modeller. Kondisjonert medium fra cellene ble samlet etter henholdsvis 4 dager for HCT-116, og etter 3-6 og 6-10 dager (etter PMA-behandling) for THP-1. Legumain ble analysert med enzymaktivitetsmålinger ved hjelp av et spesifikt fluoriserende substrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC), og immunoblotting. Celleviabilitet ble målt med MTS (tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt).

### Resultater

#### Paklitaksel hemmer legumainaktivitet i tykktarmskreftceller, men ikke i makrofager

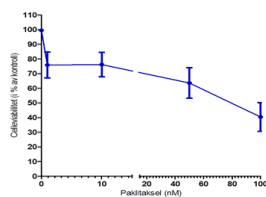
- Økende konsentrasjon av paklitaksel ga nedgang i legumainaktivitet i HCT-116-celler (Fig. 1A).
- Paklitakselkonsentrasjonen som halverte legumainaktiviteten ( $IC_{50}$ ) i HCT-116-celler var ~500 nM.
- Paklitaksel hadde ingen effekt på legumainaktivitet i THP-1-celler (Fig. 1B).



Figur 1. Effekt av paklitaksel (1-500 nM) på legumainaktivitet i HCT-116- (A) og THP-1- (B) celler. HCT-116-celler (250.000 celler/brønn) og PMA-differensierte THP-1-makrofager (500.000 celler/brønn, dyrket i 6 dager) ble behandlet med paklitaksel eller DMSO i 24 timer. Kontroll (K), ubehandlede celler. (n=1-3)

#### Celleviabiliteten av HCT-116 ble redusert etter behandling med paklitaksel

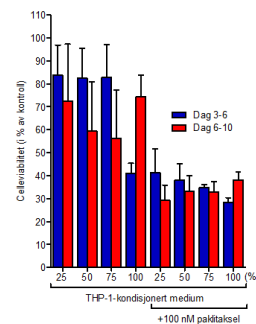
- Paklitaksel reduserte celleviabiliteten av HCT-116-celler etter behandling i 48 timer.
- Celledød (50 %) ble observert ved ca. 60 nM paklitaksel.



Figur 2. Effekt av paklitaksel på celleviabilitet av HCT-116-celler. HCT-116-celler (20.000 celler/brønn) ble behandlet med 1-100 nM paklitaksel i et 96-brønnersbrett i 48 timer. Celleviabiliteten (MTS) ble målt etter fire timers inkubering med MTS-reagens. (n=3)

#### Kondisjonert medium fra THP-1 +/- paklitaksel hemmer celleviabiliteten av HCT-116

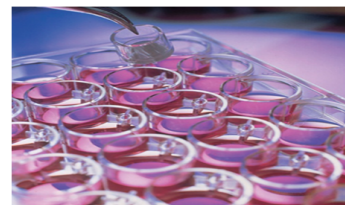
- Basalaktivitet av legumain i HCT-116-celler ble hemmet etter dyrkning i THP-1-kondisjonert medium.
- Det var liten forskjell på viabiliteten av HCT-116 ved bruk av THP-1-kondisjonert medium samlet fra dag 3-6 og 6-10 etter PMA-stimulering.
- Samtidig tilsetning av paklitaksel (100 nM) viste ca. 60 % reduksjon i celleviabilitet (Fig. 3), tilsvarende som paklitaksel alene (Fig. 2).



Figur 3. Celleviabilitet (MTS) av HCT-116-celler etter dyrkning i THP-1-kondisjonert medium. HCT-116-celler (20.000 celler/brønn) ble behandlet med 25-100 % kondisjonert medium fra THP-1-makrofager (dag 3-6 eller 6-10 etter PMA-differensiering) i 48 timer +/- paklitaksel (100 nM) (n=2-3).

### Videre planer

#### Kokulturer av celler med direkte og indirekte kontakt



Figur 4. Oppsett for kokulturer med celler i indirekte kontakt ved bruk av brønninnlegg.

#### Planlagte forsøk og analyser:

- Celleviabilitet (MTS) av THP-1-celler etter behandling paklitaksel med og uten HCT-116-kondisjonert medium (jfr. HCT-116, Fig. 2 og 3).
- Kokulturer av HCT-116-celler og THP-1-makrofager (og evt. andre typer kreftceller/makrofager):
  - Direkte kontakt (1:1).
  - Indirekte kontakt (med brønninnlegg; Fig. 4).

### Konklusjoner

- Paklitaksel hemmer legumainaktiviteten i tykktarmskreftceller, men ikke i makrofager (Fig. 1). Dette kan ha stor betydning for samspillet mellom cellene i en svulst og effekten av cytostatika.
- Celleviabiliteten av HCT-116 reduseres etter behandling med paklitaksel (Fig. 2). En eventuell sammenheng mellom redusert legumainaktivitet og celledød trenger ytterligere studier.
- Kondisjonert medium fra makrofager hemmer celleviabiliteten av tykktarmskreftceller (Fig. 3). Hva makrofager skiller ut og som fører til kreftcelleredd er ukjent og må studeres nærmere.