

Masteroppgave i farmakologi

Regulering av signalmekanismer i celler
fra pankreaskreft: Samspill mellom
stellatceller og kreftceller

Smiljana Torbica Cizmovic



Farmakologisk Institutt, Det medisinske fakultet og Farmasøytisk
Institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Det matematisk-
naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Høst 2014

Regulering av signalmekanismer i celler fra pankreaskreft: Samspill mellom stellatceller og kreftceller

© Smiljana Torbica Cizmovic

2014

Regulering av signalmekanismer i celler fra pankreaskreft: Samspill mellom stellatceller og kreftceller

Smiljana Torbica Cizmovic

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Sammendrag

Bukspyttkjertelkreft er blant kreftformene med dårligst 5-års overlevelse. For å kunne forbedre diagnostikk og behandling er det svært viktig å få bedre forståelse for molekylære mekanismer som regulerer cellemigrasjon og metastasering. Samspillet mellom stroma og kreftceller spiller en viktig rolle i utvikling av bukspyttkjertelkreft. IL-1 α er en av faktorene kreftcellene produserer og som resulterer i endring av inflammasjons- og immunrespons via mekanismer som involverer stellatceller. Det er vist at TGF β kan nedregulere IL-1R1 i stellatcellene og det er mulig at Smad7 kan være med på å regulere dette. Målet med denne oppgaven var å undersøke om og hvordan IL-1 α og TGF β påvirker stellatcellenes evne til å støtte kreftcellenes migrasjon og om TGF β s virkingsmekanisme kunne utnyttes for å hemme IL-1 α -mediert samspill mellom kreft- og stellatceller.

Skrape-analyse ble benyttet som hovedmetode i denne oppgaven for å undersøke migrasjon av en kreftcellelinje fra pankreaskreft (BxPC3-celler). IL-1 α og TGF β , alene eller i kombinasjon, stimulerte ikke BxPC3-cellene til migrasjon. Antistoff mot IL-1 (IL-1RA) hadde heller ikke effekt, noe som tyder på at IL-1 α ikke hadde autokrin effekt. Kondisjonert medium fra stellatceller fra ulike pankreassvulster stimulerte kreftcellenes migrasjon i forskjellig grad. Etter behandling av ulike stellatceller med IL-1 α og TGF β alene eller i kombinasjon fikk vi ulike resultater. Noen stellatceller stimulerte kreftcellenes migrasjon etter behandling med IL-1 α betydelig mer enn andre. TGF β -behandling av stellatceller ga signifikant reduksjon av IL-1 α -indusert migrasjonseffekt og av ustimulert migrasjonseffekt for enkelte stellatceller. En av stellatcellelinjene med høyt uttrykk av Smad7 og IL-1R1 stimulerte BxPC3-migrasjon mer etter IL-1 α -behandling med hemmende effekt av TGF β . Når Smad7 ble nedregulert i disse cellene, ble også IL-1R1 nedregulert. Smad7-nedregulerte stellatceller ga betydelig svakere migrasjon av BxPC3-celler etter stimulering med IL-1 α sammenlignet med kontroll. Lignende resultater ble observert med 12 timers indirekte kokultur med BxPC3 cellene i stede for IL-1 α -behandling.

Disse resultatene viser at stellatcellene kan variere mye i hvor stor evne de har til å stimulere kreftcellenes migrasjon. Stellatcellene varierer også i hvordan de svarer på forskjellige stimuli. Stellatceller kan derfor ikke betraktes som en uniform celletype. Resultatene viser også at ved å nedregulere Smad7 i celler med høyt uttrykk, hemmes IL-1 α -mediert kommunikasjon mellom stellat- og kreftcellene, som resulterer i mindre migrasjon. Det tyder

på at Smad-7 nivåer i stellatcellene kan være med på å bestemme i hvilken grad kreftcellene migrerer. Videre forskning om Smad7s rolle i denne kommunikasjonen er ønskelig.

Abstract

Pancreatic cancer is among the cancers with poorest five year survival. It is important to get a better understanding of the molecular mechanisms that regulate cell migration and metastasis in order to improve diagnosis and treatment. Interaction between stroma and cancer cells plays important role in pancreatic cancer development. IL-1 α is one of the factors produced by cancer cells which results in changes in inflammatory and immune response through mechanisms which involve stellate cells. It is shown that TGF β can downregulate IL-1R1 in stellate cells and it is possible that Smad7 may be involved in regulating this. The aim of this study was to investigate if and how IL-1 α and TGF β affects the ability of the stellate cells to support cancer cell migration, and whether the mechanism of action of TGF β s might be used to inhibit IL-1 α -mediated interaction between cancer and stellate cells.

Scratch assay was used as the main method in this study in order to examine migration of pancreatic cancer cell line (BxPC3 cells). IL-1 α and TGF β , alone or in combination, did not stimulate migration of BxPC3 cells. Antibody against IL-1 (IL-1RA) had no effect, suggesting that IL-1 α had no autocrine effect. Conditioned medium from stellate cells from different pancreas tumors stimulated cancer cell migration to different degrees. After treatment of various stellate cells with IL-1 α and TGF β alone or in combination we got different results. Some stellate cells stimulated cancer cell migration after treatment with IL-1 α significantly more than others. TGF β treatment of stellate cells significantly reduced IL-1 α -induced migration effect and unstimulated migration effect for some stellate cells. One of stellate cell lines with high expression of Smad7 and IL-1R1 stimulated BxPC3 migration more after treatment with IL-1 α with inhibitory effect of TGF β . When Smad7 was down regulated in these cells, also IL-1R1 were down regulated. Stellate cells with down regulated Smad7 gave significantly lower migration of BxPC3 cells after stimulation with IL-1 α compared with control. Similar results were observed with 12-hours indirect co-culture with BxPC3 cells instead of IL-1 α treatment.

These results show that stellate cells can vary widely in their ability to stimulate cancer cell migration. Stellate cells also vary in how they respond to different stimuli. Stellate cells can therefore not be considered as a uniform cell type. The results also show that by down regulation of Smad7 in cells with high expression levels, was IL-1 α -mediated communication between stellate and cancer cells inhibited, what results in less migration. This suggests that

Smad7 levels in stellate cells can help to determine the extent to which cancer cells migrate. Further research the role of Smad7s in this communication is desired.

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Farmakologisk institutt ved Rikshospitalet i perioden januar 2014 til oktober 2014. Intern veileder har vært Hege Thoresen, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo. Ekstern veileder har vært Vegardv Tjomsland ved Rikshospitalet, Oslo.

Jeg vil gjerne takke mine veiledere for tålmodighet, forståelse og god hjelp både gjennom det praktiske og det faglige. Jeg vil også takke Eva Østby, Ingvild J. Brusevold og Monica Aasrum for opplæring og praktisk hjelp i labben.

Jeg ønsker også å takke medstudenter på studentrommet for mange samtaler og latter i pausene.

Sist men ikke minst, en stor takk rettes til Srdjan, resten av familie og venner som har vært så tålmodige og støttende. Nå som dette er over, skal jeg få mer tid til dere igjen.

Oslo, oktober 2014

Smiljana Torbica Cizmovic

Forkortelsesliste

AKT	Proteinkinase B
BFB	Bromfenolblott
BSA	Bovine serum albumin
CAF	Kreft-assosierte fibroblaster
COX-2	Cyklooksigenase-2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ECL	Enzym-konjugert ligand
ECM	Ekstracellulært matriks
EGFR	Epidermal vekstfaktor-reseptor
EMT	Epitelial-mesenkymal transisjon
ERK	Ekstracellulært signalregulert kinase
FBS	Fetalt bovint serum
FOLFIRINOX	5-fluorouracil, oxaliplatin, irinotectan og leukovorin
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase
GTP	Guanosin-trifosfat
HRP	Peroksidase fra pepperrot («Horseradish

	Peroxidase»)
IL-1R1	Interleukin 1-reseptor-1
IL-1RA	Interleukin 1-reseptor-antagonist
IL-1 α	Interleukin 1-alfa
I-Smad	Inhiberende Smad
JNK	c-Jun N-terminal kinaser
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MMP	Matriks-metaloproteinase
mTOR	Mechanistic target of Rapamycin
NaCl	Natrium-klorid
NF- κ B	Nukleær faktor kappaB
PanIN	Pankreatiske intraepitelneoplasier
PDAC	Pankreas duktalt adenokarsinom
PDGF	Platederivert vekstfaktor
PI3K	Fosfoinositid 3-kinase
PSC	Pankreas stellatcelle
RNA	Ribonukleinsyre
R-Smad	Reseptor-avhengig Smad
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SF	Serumfritt
TBS	Tris-bufret saltvann
TGF β	Transformerende vekstfaktor β
TRIS	Tris-hydroksymetyl aminometan
TTBS	TBS med Tween
T β R-I, -II, -III	TGF β -reseptor type I, II og III
VEGF	Vaskulær endotelial vekstfaktor
α -SMA	Alfa-glatt muskelaktin

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Kreft.....	1
1.2	Kreft i bukspyttkjertelen.....	2
1.2.1	Bukspyttkjertel.....	2
1.2.2	Kreft i bukspyttkjertelen.....	3
1.2.3	Behandling.....	6
1.3	Tumor-mikromiljø og dets rolle i kreftutvikling.....	8
1.4	IL-1 α , TGF β og deres samspill og rolle i kommunikasjon mellom stellatceller og kreftceller. Hvordan er Smad involvert i det?.....	10
1.5	Mål med studien.....	13
2	Materialer og metoder.....	15
2.1	Materialer.....	15
2.1.1	Kjemikalier.....	15
2.1.2	Antistoffer.....	15
2.1.3	Løsninger.....	16
2.2	Cellelinjer og generelt celloarbeid.....	18
2.2.1	Cellelinjer.....	18
2.2.2	Celledyrking.....	20
2.3	Transfeksjon av stellatceller ved bruk av Lipofectamine [®] 2000.....	22
2.4	Indirekte kokultur av ATA-celler med BxPC3-celler.....	24
2.5	Tillaging av supernatanter (kondisjonert medium).....	24
2.6	Skrape-analyse («Wound closure assay» eller «Scratch assay»).....	26
2.7	Western-blotting.....	28
2.7.1	Høsting av celler i 6- eller 12- brønners Brett til Western-blotting.....	29
2.7.2	Blotting og deteksjon av proteiner.....	29
2.8	Beregninger, grafer og statistikk.....	31
3	Resultater.....	32
3.1	Optimalisering av forhold for skrape-analyse.....	32
3.2	Effekter av IL-1 α og TGF β på migrasjon av BxPC3-celler.....	33
3.3	Effekt av IL-1R-antagonist på BxPC3-migrasjon.....	34
3.4	Effekter av kondisjonert medium fra ulike stellatcellelinjer på BxPC3-migrasjon... ..	36

3.5	Effekter av IL-1 α og TGF β på stellatcellenes evne til å stimulere migrasjon av BxPC3-celler	38
3.6	Effekten av preinkubering med TGF β på migrasjon av BxPC3-celler	40
3.7	Effekt av Smad7-nedregulering i stellatceller med høyt uttrykk av Smad7	41
3.7.1	Optimaliseringsforsøk	42
3.7.2	Effekter av Smad7-nedregulering i ATA-celler på BxPC3-migrasjon	42
3.7.3	Effekter av Smad7-nedregulering i ATA-cellene etter indirekte kokultur med BxPC3-celle.....	44
4	Diskusjon.....	46
4.1	Metodologiske aspekter	46
4.1.1	Skrape-analyse	46
4.1.2	Transfeksjon	47
4.2	Direkte effekter av IL-1 α og TGF β på BxPC3-migrasjon.....	48
4.3	Ulike stellatcellers evne til å stimulere migrasjon av BxPC3-celler	49
4.3.1	Effekt av ustimulerte stellatceller på BxPC3-migrasjon	49
4.3.2	Effekt av IL-1 α og TGF β -stimulering av stellatceller på BxPC3-migrasjon.....	49
4.4	Effekter av preinkubering av stellatceller med TGF β	52
4.5	Effekter av Smad7-nedregulering i ATA-cellene.....	53
4.6	KS2-cellelinje	55
5	Konklusjon	56
6	Veien videre	57
	Litteraturliste	58

1 Innledning

1.1 Kreft

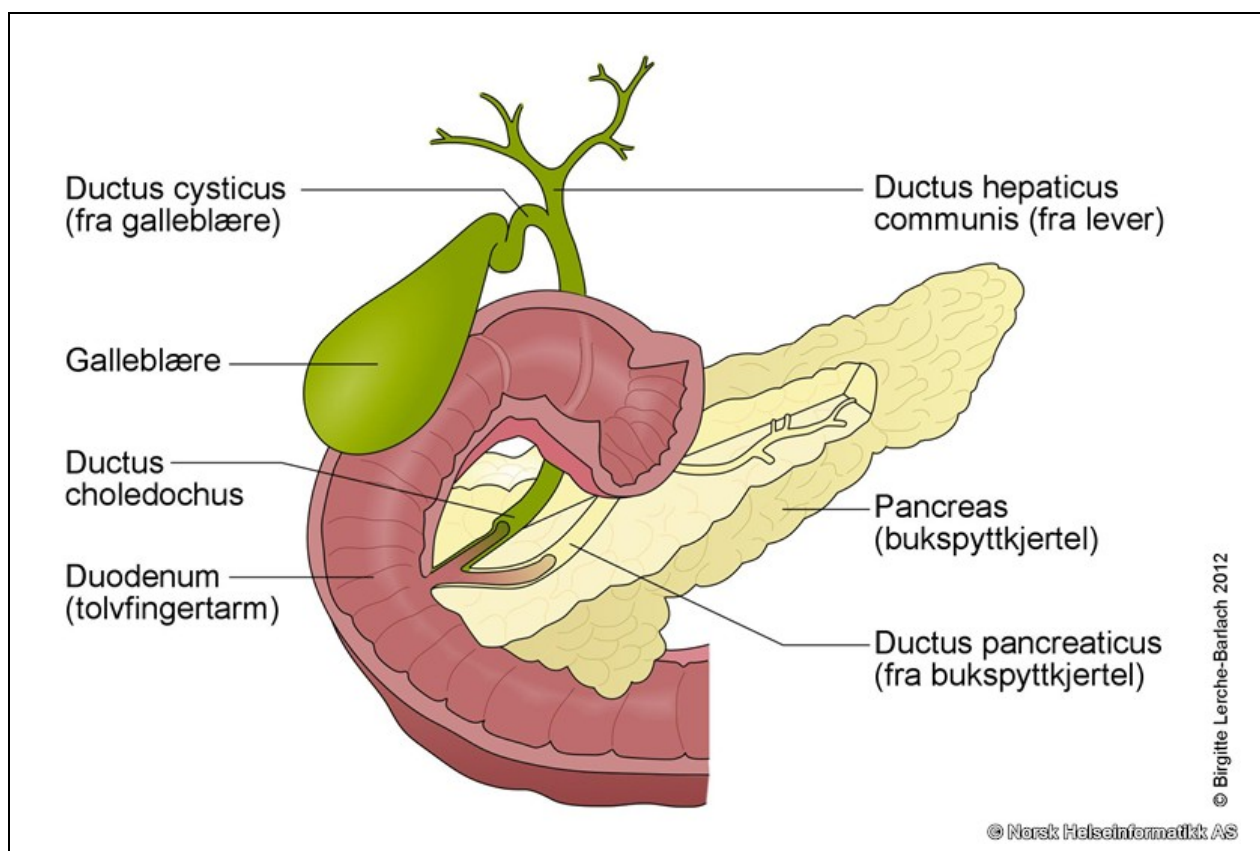
Kreft er en sykdom som blant annet karakteriseres av endringer i mekanismer som kontrollerer celleproliferasjon og differensiering. Dette fører til ukontrollert celledeling og spredning av unormale former av kroppens egne celler [1, 2]. Årsaken er genetiske mutasjoner som kan være arvelige eller ervervet, og som kan være forårsaket av eksponering for visse ytre faktorer (som stråling, virus eller kjemikalier). Det er to hovedkategorier av genetiske endringer som er ansvarlige for kreftutvikling, aktivering av proto-onkogener til onkogener, og inaktivering av tumorsuppressorgener. Proto-onkogener er gener som kontrollerer celledeling, apoptose og differensiering, mens tumorsuppressorgener hemmer celledeling og vekst. Tap av funksjon av tumorsuppressoregener kan være et kritisk steg i kreftutvikling [1, 3]. Endringer i genetisk materiale som fører til kreft er resultat av punktmutasjoner, genamplifikasjon eller kromosomal translokasjon [1].

Kreftdannelse (*carcinogenesis*) skjer gjennom tre steg: transformasjon (celler endrer fenotype til celler med ukontrollert cellevekst), proliferasjon (unormal celledeling som gjør at det dannes svulst av tumorceller) og metastasering (skyldes mutasjoner som muliggjør invasjon i andre vev og årer, spredning via blod- eller lymfesystemet og tumordannelse på et annet sted en primærtumor) [3]. Endringer i antiapoptotiske gener er en forutsetning for kreftutvikling. Resistens mot apoptose skyldes enten inaktivering av proapoptotiske faktorer eller aktivering av antiapoptotiske faktorer [1]. Redusert programmert celledød sammen med ukontrollert celledeling fører til akkumulering av celler i vevet og svulstutvikling [1, 4]. For at en svulst skal kunne vokse og bli større enn 1-2 mm i diameter må det dannes nye blodårer. Denne prosessen kalles angiogenese og stimuleres av vekstfaktorer som tumoren produserer [1].

1.2 Kreft i bukspyttkjertelen

1.2.1 Bukspyttkjertel

Bukspyttkjertelen (*pancreas*) er et ca 20 cm langt organ og veier ca 60 til 100 g. Pankreas er plassert bak magesekken, i øvre del av bukhulen (Figur 1.1). Organet består av hode (*caput*) på høyre side, en kropp (*corpus*) på midten og en hale (*cauda*) mot venstre [5].

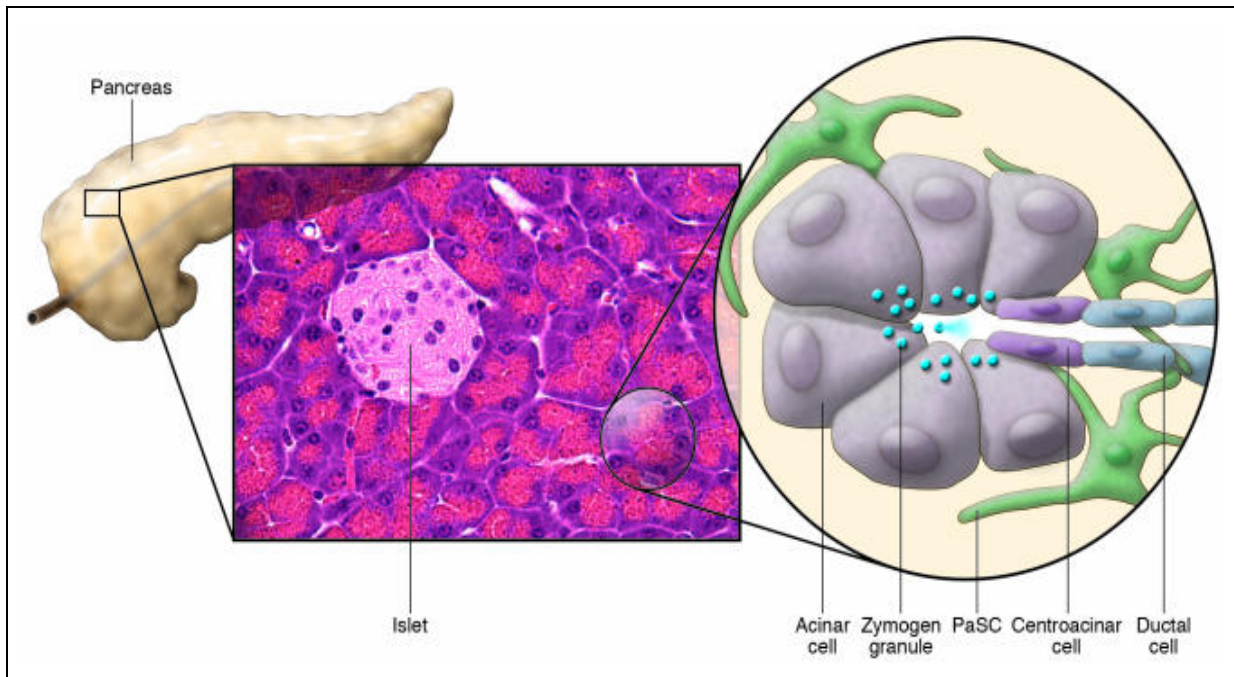


Figur 1.1. Bukspyttkjertelen

Kjertelen er plassert i bukhulen. Til høyre, inntil hodet av pankreas ligger tolvfangertarmen som en C-bue. Utførselsgangen leder fordøyelsessaft fra kjertelvevet til tolvfangertarmen. Pankreas' utførselsgang forenes med gallegangen før den når tolvfangertarm [5]. Figur er tatt fra <http://hni.no> [6]

Kjertelen består av endokrine og eksokrine deler (Figur 1.2). Den eksokrine delen utgjør 80-85% av bukspyttkjertelen og består av acinare og duktaleceller [5, 7]. Eksokrin pankreas produserer fordøyelsessaft som er en basisk væske med forskjellige enzymer og som spiller en viktig rolle i nøytralisering av syren fra magesekken og spalting av fett, proteiner og karbohydrater fra maten [5]. Acinare celler produserer fordøyelsesenzymer i både aktiv og

inaktiv form [7]. Fordøyelsessaft skilles ut i tolvfingertarmen via hoved utførselsgangen (*ductus pancreaticus*) som går sammen med galegangen. Endokrin pankreas produserer hormoner som insulin, glukagon og somatostatin. Cellene med endokrin funksjon er lokalisert i små øyer inne i det øvrige kjertelvevet, såkalte Langerhans' øyer (ca 1 million øyer). Langerhans' øyer utgjør 1-2% av pankreaskjertelen [5].



Figur 1.2. Skjematisk forestilling av pankreas. Pankreas kan deles i to deler, endokrin og eksokrin. Den eksokrine delen består av hovedsakelig acini, grupper av acinare celler som skiller enzymer ut i duktuli, mens den endokrine delen består av tusenviss av øyer. I normal bukspyttkjertel er hvilende stellatceller (PSC) til stede rundt acinareceller. Zymogene granula frigjør innhold med fordøyelsesenzymer i gangsystemet. Figuren er tatt fra referanse [8]

1.2.2 Kreft i bukspyttkjertelen

Bukspyttkjertelkreft er fjerde vanligste dødsårsak blant kreftpasienter i vestlige land [9] og har høyest mortalitet av alle kreftformer [5, 10]. I motsetning til kreftformer som brystkreft og kolonkreft, som har fått betydelig forbedret overlevelse i de siste tiårene, har bukspyttkjertelkreft fortsatt veldig dårlig prognose [11]. Det er et resultat av manglende effektive diagnostiske metoder i tidlig fase og uspesifikke symptomer som ofte forveksles

med andre sykdommer. Symptomer som smerter eller gulsott (ikterus) er allerede tegn på sen fase av sykdommen. Femårsoverlevelse av pankreaskreft er under 5 %, men kan øke til 11-25 % hvis pasientene kan opereres ved diagnosetidspunktet [10, 12, 13]. Kirurgisk reseksjon er eneste behandling som gir lengre overlevelse, men bare rundt 10-20 % av pasientene kan opereres [9]. En majoritet av pasientene som opereres vil utvikle metastaser i andre organer postoperativt. I Norge er det rundt 600 nye tilfeller av pankreaskreft hvert år og det er den kreftformen med dårligst 5-års overlevelse i Norge (Tabell 1.1) [14, 15].

Tabell 1.1. 5-års overlevelse ved noen kreftformer i Norge i perioden 2008-2012 [14]	
Bukspyttkjertelkreft (menn)	4,6 %
Bukspyttkjertelkreft (kvinner)	5,6 %
Spiserørskreft (kvinner)	12,1 %
Lungekreft (menn)	12,4 %
Spiserørskreft (menn)	13,7 %

Det er viktig å skille mellom duktalt adenokarsinom (PDAC) og andre krefttyper i pankreas som er mer sjeldne og ofte med bedre prognose. Det kan også utvikles nevroendokrine tumorer som for eksempel insulinomer som er tumorer i endokrine pankreas [15]. Av alle svulster i pankreas, utgjør PDAC 85-90% og betegnelsen bukspyttkjertelkreft refererer oftest til denne formen [16]. Omtrent 60% av pankreassvulstene opptrer i hodet av pankreas, 15% i kroppen og 5% i halen, mens 20% av tumorene omfatter hele kjertelen [5].

Bukspyttkjertelkreft er genetisk sykdom som skyldes mutasjoner i kreft-assosierte gener [5]. I 90% av tilfellene er endringene i epitelceller i gangsystemet i kjertelen. Det som skjer er utvikling fra ikke neoplastisk epitel til histologisk vel-definerte ikke-invasive lesjoner i små ganger (små *ductus* og *ductuli*) og videre til invasivt karsinom *in situ*. Forstadier kalles pankreatiske intraepitelneoplasier (PanINs) og er klassifisert fra PanIN-1A (flat mucinus-epitel) til PanIN-3 (*in situ*-karsinom) (Figur 1.3) [5, 15]. Genetiske forandringer som er mest vanlige i invasive adenokarsinomer i pankreas er punktmutasjoner som fører til aktivering av KRAS-onkogen, inaktivering av tumorsuppressorgener (TP53, SMAD4, BRCA2, m.m.), tap av deler av kromosomer, genamplifikasjoner og forkortelse av telomerer [5, 15, 17, 18].

Telomeraseendringer og KRAS-aktivering er tidlige hendelser, mens mutasjoner i tumorsuppressorgener skjer typisk sent i neoplasieutviklingen og i invasive karsinomer [17].

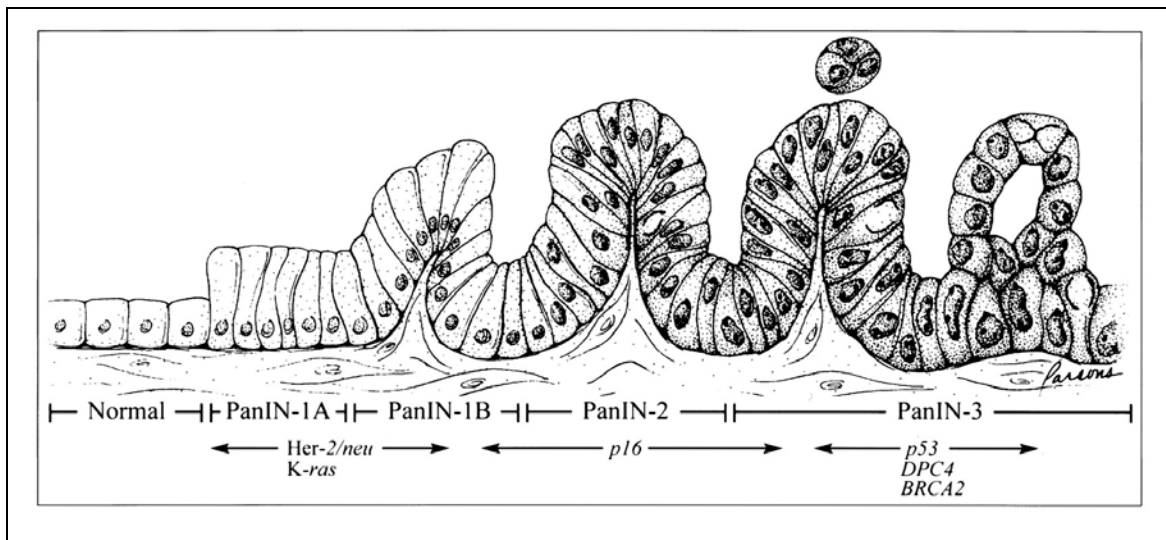


Figure 1.3. Utviklingsmodell for bukspyttkjertelkreft.

Duktalt adenokarsinom utvikles fra normalt duktalepitel til infiltrerende cancer (fra venstre til høyre) ved å gå gjennom PanIN-forstadier. Forkortelse av telomerer og mutasjoner i onkogen K-RAS skjer i tidlig fase. Endret uttrykk av tumorsuppressorgenerne p16, p53, SMAD4 og BRCA2 observeres i senere stadier. Figuren er tatt fra referanse [18].

Klinisk sett klassifiseres pasienter i fire grupper: resektable (kan opereres), grense-resektable, lokalavanserte svulster eller ikke-resektable (stadium III) og metastatisk kreft (stadium IV) [17].

Forløpet til bukspyttkjertelkreft er progressivt og vanligvis uten symptomer før kreften spred seg og påvirker andre organer. Et av de første symptomene som leder til diagnose er gulsott. Rundt 70% av tumorene er lokalisert i pankreas hodet og obstruerer gallegangen. Vanlige symptomer er også ryggsmertor og ufrivillig vekttopt, assosiert med depresjon, svakhet og generelt dårlig livskvalitet [19, 20]. Svulster som ikke er lokalisert i pankreas hodet, gir sjeldent gulsott og smerte før i sen fase. Akutt pankreatitt er noen ganger første tegn på kreftutvikling, og pasientene kan også utvikle diabetes [20].

Den viktigste miljøfaktoren som øker risiko for utvikling av bukspyttkjertelkreft er tobakksrøyking [20-23]. Røyking dobler risikoen og effekten er avhengig av hvor lenge og hvor mye en røyker [24]. Høyt inntak av fet mat, rødt kjøtt, karbohydrater og sukker øker risikoen, mens frukt og grønnsaker har beskyttende effekt [20, 22]. Flere epidemiologiske

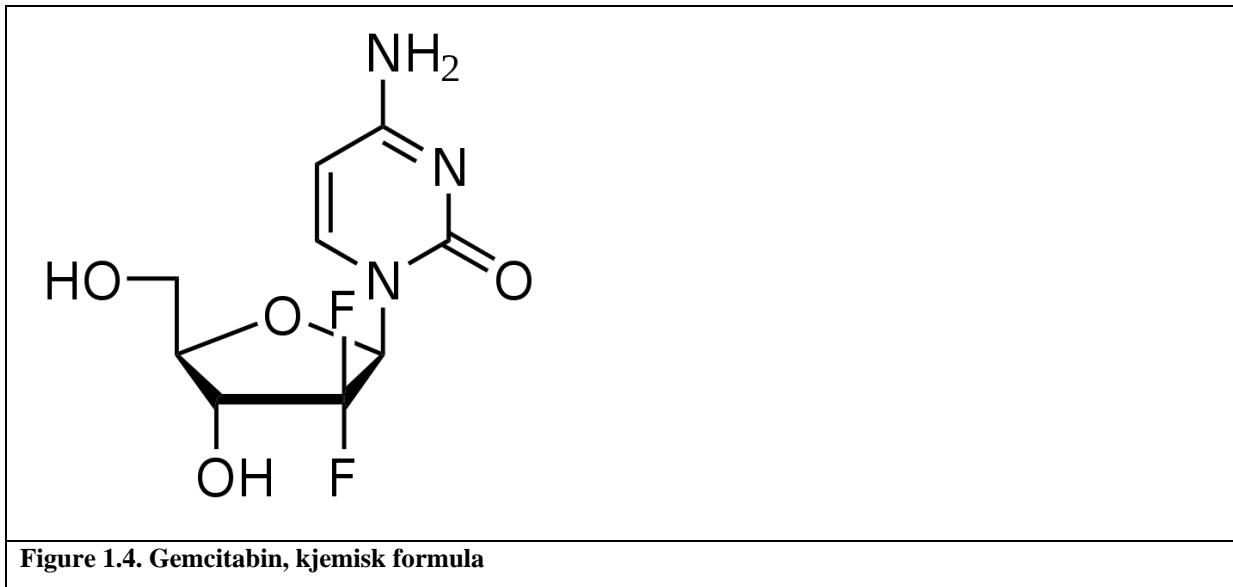
studier har sett korrelasjon mellom kronisk pankreatitt og pankreaskreft [22]. Hos pasienter med arvelig kronisk pankreatitt er samlet risiko rundt 40% [23]. Familiehistorie av bukspyttkjertelkreft øker risikoen- hvis førstegradsslektninger hadde pankreaskreft, er risikoen økt 2,5-5,3 ganger. Desto flere tilfeller blant familiemedlemmer, desto større er risikoen for å utvikle bukspyttkjertelkreft [24]. Diabetes er også forbundet med kreftutvikling. Data fra en rekke studier tyder på at diabetes og kronisk pankreatitt er sannsynlig å være i årsaksammenheng med bukspyttkjertelkreft, snarere enn å være konsekvenser av kreften [22]. Arvelige tilfeller av bukspyttkjertelkreft forklarer omtrent 5-10% av tilfellene [22]. Menn blir rammet oftere enn kvinner, og risikoen øker med økende alder [20, 23]. Bare 10% av pasientene er yngre en 50 år [23].

1.2.3 Behandling

Bukspyttkjertelkreft har en dyster prognose hvor eneste kurative behandlig er operasjon (Whipple reseksjon). Det er anbefalt å kombinere operasjon med kjemoterapi og/eller stråling for å forlenge overlevelsen [25]. Hos ikke-operable pasienter administreres kjemoterapi, men bare som palliativ behandling.

Gemcitabin (Figur 1.4) har vært førstevalg for behandling av bukspyttkjertelkreft i de siste 15 årene [25, 26]. Behandlingen forbedrer overlevelsen minimalt, men har også klinisk nytte ved smertelindring, bedre funksjon og mindre vektreduksjon [27].

Gemcitabin er en cellegift som er klassifisert som antimetabolitt, og i undergruppen pyrimidin-analoger. Gemcitabin er en analog av cytarabin (cytosinderivat) og inhiberer DNA-polymerase i sin trifosfat-form [1]. Dette resulterer i apoptose. Andre målenzym for gemcitabin er ribonukletidreduktase hvor difosfat-analogen av gemcitabin binder seg til enzymet og inaktiverer det irreversibelt. Da kan ikke cellene danne deoxyribonukleotider som er nødvendig for DNA-reparasjon og -replikasjon, noe som fører til induksjon av apoptose.



Det har vært lite framgang i behandling og overlevelse av pankreaskreft i de siste tiårene. Til tross for flere nye regimer og utvikling av målrettet behandlingsalternativer de siste årene, forblir pankreaskreft i høy grad resistent mot kjemoterapi [28]. En rekke angiogenesehemmere (anti-VEGF, tyrosinkinase-inhibitoren axitinib), MMP-inhibitorer (matriksmetaloproteinase-inhibitorer) og multikinaseinhibitorer som sorafenib er bare noen eksempler på stoffer som har blitt utprøvd i kombinasjon med gemcitabin, men med negativt utfall sammenlignet med gemcitabin alene [27]. Det er observert liten forbedring når EGFR-tyrosinkinase-inhibitor erlotinib ble administrert sammen med gemcitabin [29]. Det ble nylig bekreftet i fase III kliniske studier at kombinasjon av gemcitabin og nab-paclitaxel gir bedre resultater sammenlignet med gemcitabin alene. Kombinasjonen gir bedre overlevelse (1,8 måneder) og forbedrer residivfri overlevelse [27, 28, 30]. Disse lovende resultatene skyldes effektene av nab-paclitaxel som bidrar til bedre blodgjennomstrømming i tumoren, redusert stromal reaksjon og høyere vevskonsetrasjon av gemcitabin som da virker mer effektivt [30]. Et annet regime som ser lovende ut er FOLFIRINOX (5-fluorouracil, oxaliplatin, irinotectan og leucovorin). Fase III-studier har vist forbedret overlevelse med FOLFIRINOX (11,1 måneder) sammenlignet med gemcitabin alene (6,8 måneder) og nesten halvparten av pasientene var fortsatt i live etter ett år med responsrate på 31,6 % [27, 29].

Norske retningslinjer påpeker at pasienter som er radikalt operert og i god allmenntilstand bør vurderes for adjuvant behandling med fluorouracil og folinat i 6 måneder. Ved lokal sykdom kan palliativ stråling brukes. I tilfelle av metastatisk sykdom gis gemcitabin alene (Gemzar[®],

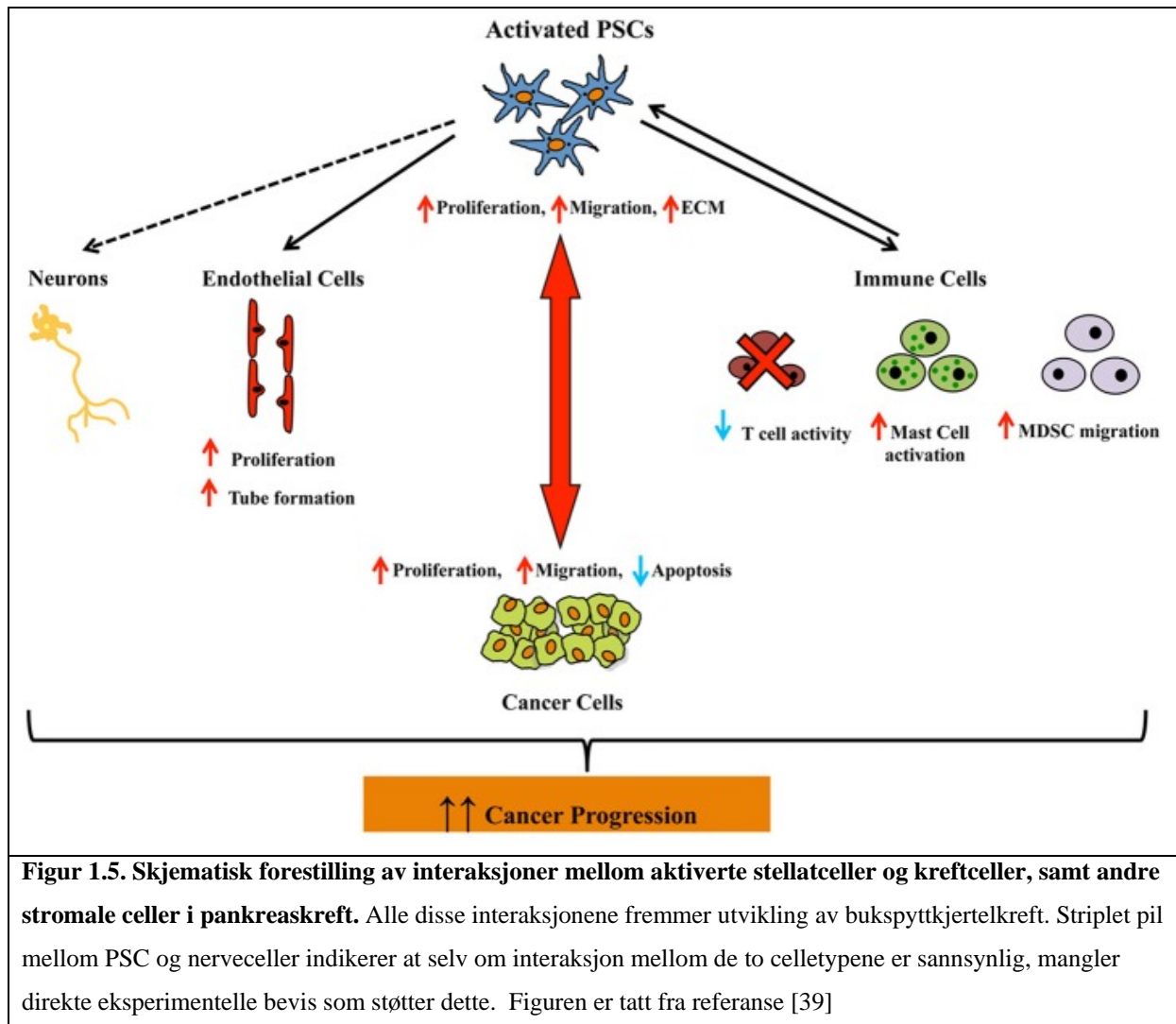
Gemcitabin). FOLFIRINOX kan være aktuelt hos pasienter i god allmenntilstand, men dette regimet innebærer mer toksiske effekter [31].

1.3 Tumor-mikromiljø og dets rolle i kreftutvikling

Svulster består ikke bare av neoplastiske celler, men også av tumor-assosierte stromale celler og ekstracellulær matriks (ECM) som sammen danner et tumor-mikromiljø [32]. Et invasivt karsinom innebærer utvikling av tumorstroma og økt lagring av ECM [33]. I de siste årene har interessen i forskermiljøet vært rettet mot fibrose/stroma, som er massiv i bukspyttkjertelkreft [34]. Aktivert stroma i bukspyttkjertelkreft består av stellatceller, immunceller, endoteliale celler, nerveceller og ECM [35], hvor pankreas stellatceller (PSC) dominerer og kan representere opptil 70 % av total tumormasse [36]. Studie med ortotopiske modeller gjennomført av *Vonlaufen et al.* viser betydelig interaksjon mellom kreftceller og PSC og antyder at kreftceller rekrutterer og utnytter stellatceller for å få bedre evne til metastasering og invasjon [37], og det samme er funnet i andre studier [38]. I ortotopiske modeller blir ønsket cellesuspensjon injisert direkte i målorgan for å studere tumorutvikling i selve organet og metastasering. Data fra slike studier er mye mer verdifulle enn fra studier hvor cellesuspensjon injiseres subkutant. Vonlaufens studie var den første som viste *in vivo* at tilstedeværelse av PSC støtter tumorvekst og metastaseutvikling [37]. Stellatceller stimulerer kreftceller til epitelial-mesenkymal transisjon (EMT) som er en av prosessene involvert i dannelsen av metastaser [13]. De interreagerer ikke bare med kreftceller, men også med andre stromale celler (nevroner, immun- og endotelceller) slik at kreftutvikling støttes (Figur 1.5) [39]. Dette viser hvordan fibrosen ikke bare er en passiv del av tumoren, men bidrar til dens utvikling og metastasering i stor grad.

Stellatceller omtales i litteraturen også som kreft-assosierte fibroblaster (KAF) [32, 33]. PSC er beskrevet som aktiverte myofibroblast-liknende celler [35] og er ansvarlige for fibrosen ved bukspyttkjertelkreft og pankreatitt [37]. I normal pankreas er disse cellene i hvilende tilstand og er lokaliserte rundt acinare celler i den eksokrine delen av kjertelen (Figur 1.2) [39]. Det som er karakteristisk for disse cellene er dråper med A-vitamin i cytoplasma [40]. Stellatcellene aktiveres ved skade eller inflammasjon, og de mister da A-vitaminlagrene og transformeres til myofibroblast-liknende celler som uttrykker α -SMA (α -glatt muskelaktin) og

produserer store mengder av ECM-proteiner (kollagen I og III, og fibronektin) [8, 37]. Autokrin produksjon av PDGF, TGF β , cytokiner (IL-1, IL-6) og COX-2 er kritisk for en stromal fenotype [32].



1.4 IL-1 α , TGF β og deres samspill og rolle i kommunikasjon mellom stellatceller og kreftceller. Hvordan er Smad involvert i det?

IL-1 α

IL-1 α er et viktig pro-inflammatorisk cytokin. Det fremmer inflammatoriske prosesser og endrer mange immune, degradative og vekst-fremmende prosesser. IL-1 α spiller også en viktig rolle i metastaseutvikling og dannelse av nye blodårer i tumoren (angiogenese) [41]. IL-1 α stimulerer celledifferensiering, adhesjon og proliferasjon [42] og produseres av kreftceller i blant annet bukspyttkjertelkreft. Høy produksjon av IL-1 α er karakteristisk for pankreaskreftceller med betydelig grad av levermetastaser (BxPC3, SW1990) i motsetning til de som danner levermetastaser i lavere grad (Capan-2, Panc-1) [41].

IL-1 α spiller viktig rolle i kommunikasjonen mellom stellatceller og kreftceller i pankreaskreft og den forårsaker massiv inflammasjon som er et av kjennetegn til pankreaskreft. Kreftcellene skiller ut IL-1 α som påvirker stellatcellene i stroma til å produsere store mengder av forskjellige inflammatoriske og immun-regulerende faktorer både *in vivo* og *in vitro* [11, 43]. Denne parakrine signaleringen starter ved at IL-1 α binder seg til IL-1R med påfølgende aktivering av p38 mitogen-aktivert proteinkinase (MAPK) som videre aktiverer flere forskjellige transkripsjonsfaktorer via Ras [44].

Inflammasjonen som oppstår fører til aktivering av enda flere kreft-assosierte fibroblaster som er ansvarlige for produksjon av ECM-proteiner og inflammatoriske faktorer, samt utvikling av stromal fenotype. Disse hendelsene støtter videre kreftutvikling.

Transformerende vekstfaktor- β (TGF β)

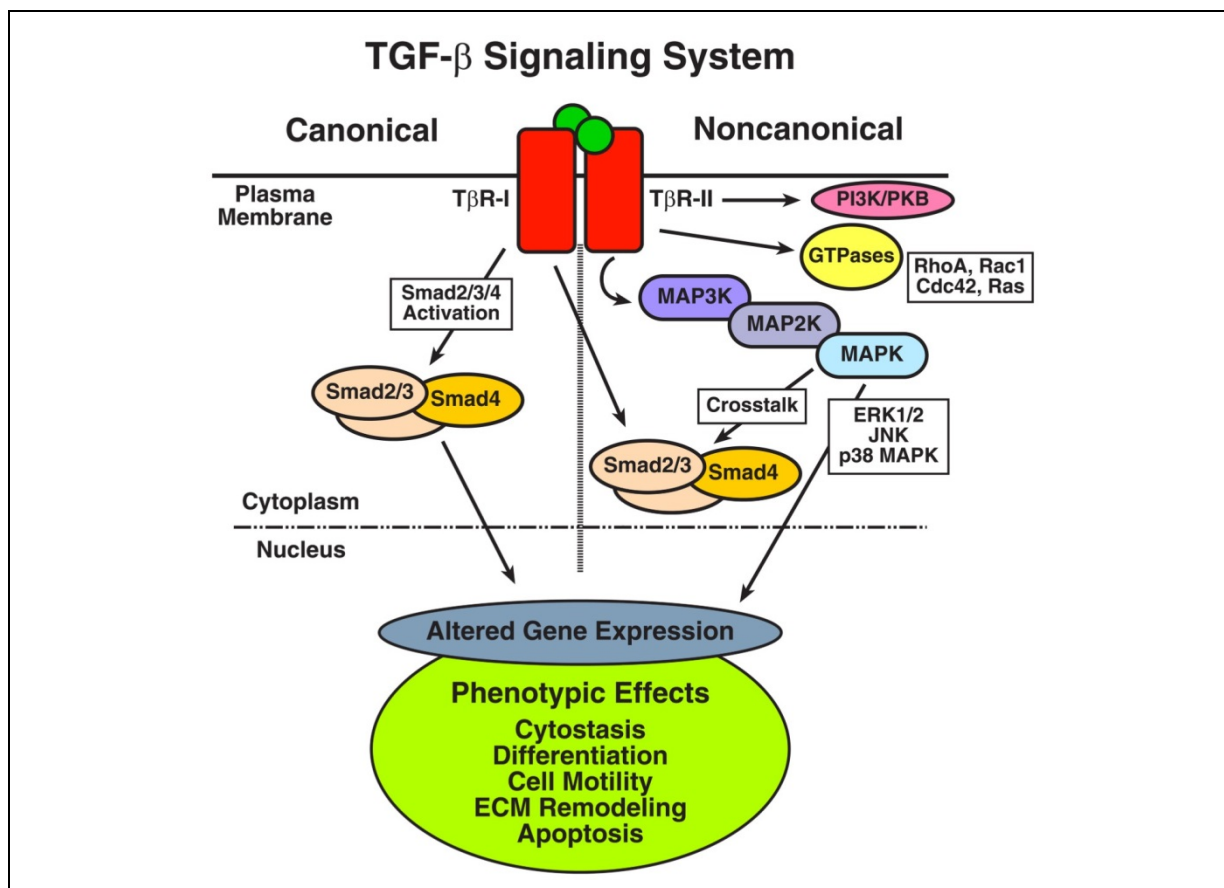
TGF β er et cytokin som har mange funksjoner, med effekt i blant annet differensiering og homeostase [45]. Det produseres av både kreftceller og aktiverte stellatceller i pankreaskreft [32]. TGF β er en potent tumorsuppressor i normale vev (hemmer ukontrollert proliferasjon av epitele, endotele og hematopoetiske celler) [45]. I tidlig fase av tumordannelse inhiberer TGF β proliferasjon og fremmer apoptose via fosforylerings-avhengige signalveier, men kreftcellene prøver å blokkere og/eller finne måter å forbigå disse prosessene [46]. Genetiske

og epigenetiske endringer, som skjer senere i forløpet av kreftutvikling konverterer TGF β til en letal tumorpromotor som støtter kreftutvikling, invasjon og metastasering i andre vev [45]. Dannelse av metastaser er en sammensatt prosess som i solide tumorer også inkluderer EMT (epitel-mesenkymal transisjon) [13, 46]. EMT er en fysiologisk prosess som tillater morfologiske og genetiske forandringer i kreftceller fra epitel til mesenkymal fenotype. Adherente epiteceller som er tett bundet til hverandre i et vel-organisert vev, blir til selvstendige fibroblastceller som har evne til å migrere og invadere ECM. Dette er grunnlaget for det høye metastatiske potensialet til bukspyttkjertelkreftceller [47]. Det er funnet at PSC trigger EMT i bukspyttkjertelkreftceller, men TGF β som er en typisk EMT-induser har allikevel ikke noen sentral rolle i denne prosessen siden EMT ikke kan hemmes med anti-TGF β -neutraliserende antistoff [13].

Hvordan TGF β blir til en tumorfremmede faktor og hvilke mekanismer som regulerer alle hendelser som er involvert, er ikke helt klarlagt. TGF β -signaleringen er ganske sammensatt og inkluderer mange aktører. TGF β kan oppnå sine effekter på to forskjellige måter: via kanonisk eller ikke-kanonisk signalering (Figur 1.6) [45].

Kanonisk signalering består hovedsakelig av tre TGF β -reseptorer, type I (T β R-I), type II (T β R-II) og type III (T β R-III), og tre latente transkripsjonsfaktorer, Smad2, 3 og 4. Transmembran-signaleringen starter ved at TGF β binder seg til T β R-III som presenterer den til T β R-II. Ligand-bundet T β R-II aktiveres og bindes til T β R-I. Både TGF β -reseptor type I og type II har intrinsisk Ser/Thr proteinkinase-aktivitet i intracellulære domener. Binding av TGF β til T β R-I og II fører til at T β R-II transfosforilerer T β R-I som stimulerer proteinkinaseaktivitet og T β R-I fosforilerer Smad2/3 (R-Smader), noe som endrer deres konformasjon. Dette muliggjør kompleksdannelse av Smad2/3 med Smad4 (co-Smad) og akkumulering av Smad-komplekset i cellekjernen, hvor komplekset interreagerer med forskjellige co-aktivatorer og hemmere av transkripsjon, og dermed styrer cellenes respons på TGF β [45].

TGF β kan også påvirke cellene via Smad-uavhengig vei, såkalt ikke-kanonisk signaleringen. Noen av effektormolekylene stimulert etter binding av TGF β til reseptorene i denne signaleringen er: (a) MAP-kinasene ERK1/ERK2, p38 MAPK og JNK, (b) vekst- og overlevelseskinasene PI3K, AKT og mTOR, og (c) små GTP-bindende proteiner [45].



Figur 1.6. Kanonisk og ikke-kanonisk TGF β -signalerings.

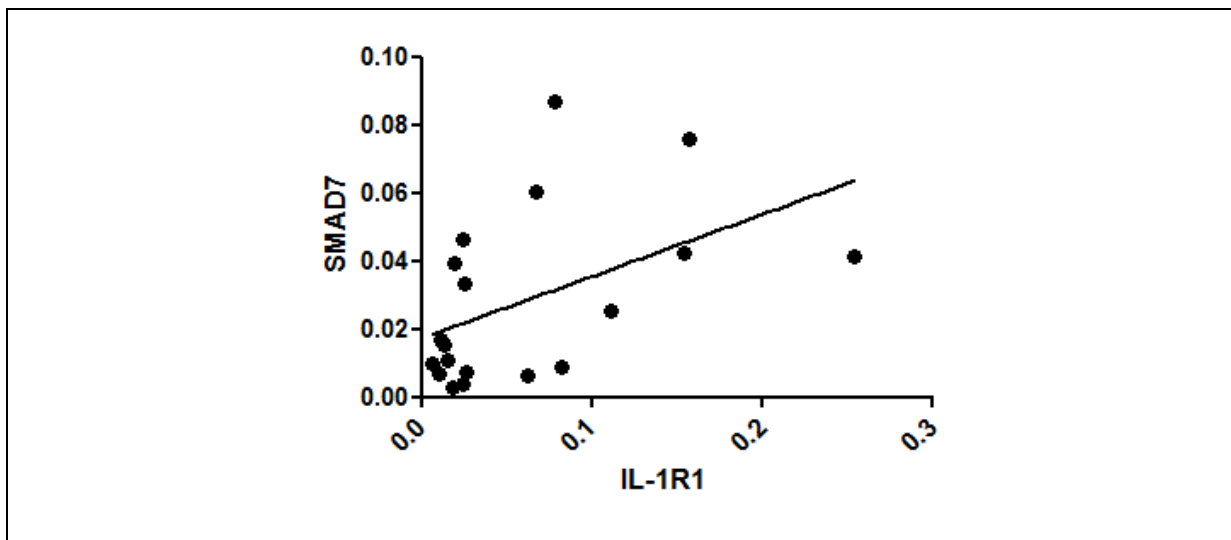
TGF β binder og aktiverer to transmembranelle Ser/Thr proteinkinase-reseptorer, TGF β -reseptor type I og type II (T β R-I og T β R-II). Det kreves aktivering av disse ligand-reseptor kompleksene for at T β R-II skal transfosforilere T β R-I, som skal da fosforilere og aktivere Smad 2/3. Når den er aktivert, danner Smad 2/3 komplekser med Smad4. Kompletet forflyttes til cellekjerne og medierer kanonisk TGF β signalering (venstre del av bildet). Ikke-kanonisk TGF β signaleringen foregår via TGF β -mediert stimulering av MAP-kinaser, små GTP-aser og PI3K/AKT, og inhibering av NF- κ B. Figuren er tatt fra referanse [45]

Som nevnt før er Smad 2, 3 og 4 hovedelementer i kanonisk TGF β signaleringen. Smad-familien består av flere medlemmer. Den deles i tre grupper: 1) reseptor-regulerte Smader, R-Smad (Smad1, 2, 3, 5 og 8); 2) Smader som medierer Smad-avhengig signalering, co-Smad (Smad4); og 3) inhiberende Smader, I-Smad (Smad6 og 7) [48]. I-Smader inhiberer aktivering av R-Smader og co-Smader og dermed spiller viktig rolle i blokkering av Smad-avhengig signaleringen. Smad7 er sterkere inhibitor en Smad6 [46]. Smad7 hemmer TGF β -signaleringen via flere mekanismer, inkludert binding til T β R-I reseptor-kompleks og kompetitiv inhibisjon av fosforylering av R-Smader, rekruttering av fosfataser som defosforylerer reseptorkomplekset, samt samarbeid med mange proteiner for å degradere

TβR-I [46, 49]. Smad7 har også inhiberende effekter i cellekjernen: hemmer dannelse av R-Smad/Smad4 komplekser, og inhiberer binding av disse kompleksene til DNA [48].

1.5 Mål med studien

IL-1α signalering er viktig i kommunikasjonen mellom stellat- og kreftceller. TGFβ kan nedregulere IL-1R1 i stellatceller [50]. Det er kjent at Smad7 er en naturlig inhibitor av TGFβ-signaleringen [46] og forskningsgruppen har data som kan tyde på at Smad7 kan være en av faktorene som påvirker nivåer av IL-1R1 (Figur 1.7, upubliserte data, Vegard Tjomsland).



Figur 1.7. Korrelasjon mellom PSCs uttrykk av Smad7 og IL-1R1 (RNA-nivåer).

Figuren viser at det er en svak korrelasjon mellom Smad7 og IL-1R1 uttrykk i stellat cellene ($p < 0,038$). Det er flere faktorer som påvirker IL-1R1, men Smad7 kan være en av dem (upubliserte data, Vegard Tjomsland).

Målet med denne oppgaven er å undersøke om og hvordan IL-1α og TGFβ påvirker stellatcellenes evne til å støtte kreftcellenes migrasjon og om TGFβs virkingsmekanisme kan utnyttes for å hemme IL-1α-mediert samspill mellom kreft- og stellatceller.

Delmål

1. Undersøke om TGF β og IL-1 α har direkte effekter på migrasjon av kreftceller, samt undersøke om IL-1 α har autokrin effekt på kreftcellenes migrasjon
2. Undersøke om og i hvilken grad stellatceller i seg selv stimulerer kreftceller til å migrere, samt om stimulering av stellatceller fra ulike tumorer med IL-1 α og TGF β alene og i kombinasjon påvirker stellatcellenes evne til å stimulere migrasjon av kreftceller.
3. Undersøke rollen til Smad7 i IL-1 α -signalering mellom tumor og stroma ved å nedregulere Smad7 i en stellatcellelinje med høyt uttrykk av Smad7.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier

- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) med 1g/l glukose, uten glutamin; Trypsin-EDTA-løsning (170,000 U/l trypsin, 200 mg/l EDTA) fra **Lonza (Verviers, Belgium)**
- Føtalt bovint serum (FBS), Fungizone, Glutamax, OptiMEM, Pen-Strep (10 000 enheter/ml penicillin og 10 000 µg/ml streptomycin), bovint serum albumin (BSA) fra **Gibco**
- Bromfenolblott (BFB), Glyserol, Ponceau S, Tris-base, β-Merkaptoetanol fra **Sigma**
- Fettfri tørrmelk var gave fra **Levanger meieri (Norge)**
- Glycine, SDS, TBS, Tween 20 fra **Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)**
- HCl, metanol (CH₃OH) fra **VWR (Randor, Pennsylvania)**
- Ikke-funksjonell siRNA, Smad7-siRNA fra **Dharmacon (Lafayette, CO, USA)**
- Lipofectamin[®] 2000 fra **Life technologies**
- LumiGLO[®] fra **KPL Protein research Products (Gaithersburg, MD)**
- Saltvann (0,9% NaCl), natriumklorid (NaCl) fra **Fresenius Kabi AG (Tyskland)**

2.1.2 Antistoffer

- Smad7 kanin polyklonalt antistoff fra **LSBio (Seattle, North America)**
- Smad7 mus monoklonalt antistoff fra **R&D Systems (Minneapolis, USA)**
- IL-1R1 kanin monoklonalt antistoff fra **Millipore (Darmstadt, Germany, Tyskland)**

- GAPDH kanin monoklonalt antistoff (2118) fra **Cell Signaling Technology**
- Geit anti-kanin antistoff HRP-konjugert, geit anti-mus antistoff HRP-konjugert fra **Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)**

2.1.3 Løsninger

- TGF β stock-løsning 20 μ g/ml fra **R&D Systems (Minneapolis, USA)**
- IL-1 α stock-løsning 10 μ g/ml fra **Biolegend (San Diego, CA)**
- IL-1RA (Anakinra[®]) stock-løsning 100 mg/ml var gave fra **Swedish Orphan Biovitrum AS**

Buffere og løsninger til Western blotting

Sample buffer

0,5 M TRIS/ HCl pH (6,7)	25 ml
Glyserol	20 ml
10 % SDS	40 ml

10 x SDS-PAGE Running buffer

TRIS	30 g
Glysin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Fortynnes 1+9 med H₂O før bruk. Oppbevares i kjøleskap.

1 x Running buffer

10 x Running Buffer	100 ml
---------------------	--------

H ₂ O	900 ml
------------------	--------

10 x Transfer buffer

TRIS	30 g
------	------

Glysin	144 g
--------	-------

H ₂ O	ad 1000 ml
------------------	------------

1 x Transfer buffer

10 x Transfer buffer	100 ml
----------------------	--------

Metanol	100 ml
---------	--------

H ₂ O	800 ml
------------------	--------

10 x TBS (pH 7,6)

TRIS	12,1 g
------	--------

NaCl	58,4 g
------	--------

H ₂ O	ad 1000 ml
------------------	------------

pH justeres med konsentrert HCl

TTBS

10 x TBS	100 ml
H ₂ O	900 ml
Tween 20	0,5 ml

Blokke-løsningen

Fettfri tørrmelk	5 g
TTBS	ad 100 g

2.2 Cellelinjer og generelt celloarbeid

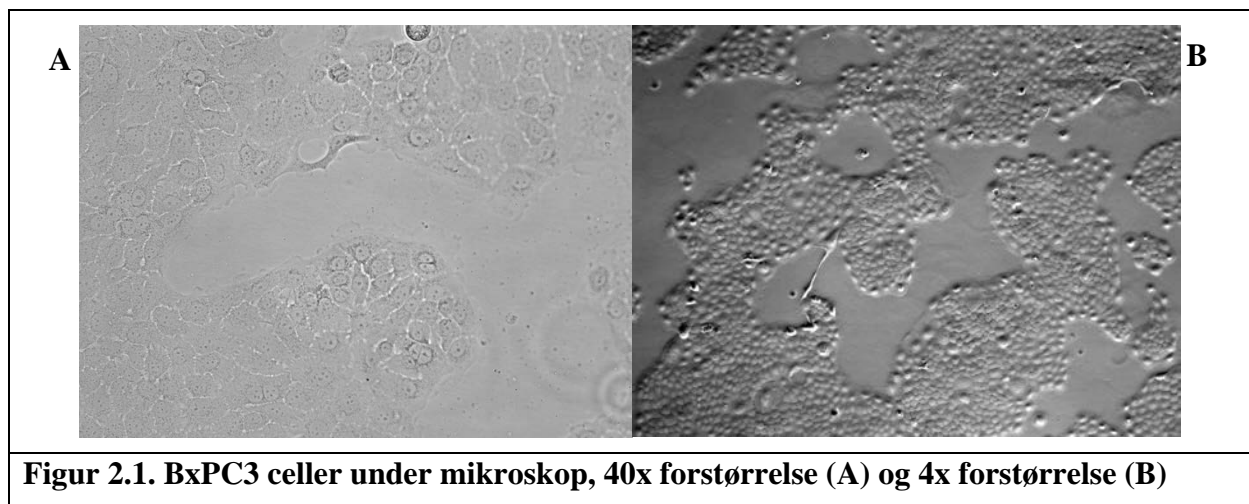
2.2.1 Cellelinjer

Det ble brukt to typer av celler i vårt prosjekt. Den ene typen er BxPC3, en kommersiell cellelinje fra bukspyttkjertelkreft. Den andre typen er primære stellatceller, fibroblastliknende celler som omtales i litteratur enten som pankreasstellatceller (PSC) eller som kreftassosierte fibroblaster («cancer associated fibroblasts», CAFs) [33], isolert fra ulike pankreaskreftsvulster..

BxPC3-celler

Dette er en kommersiell cellelinje innkjøpt fra ATCC (Manassas, VA, USA). Cellene er isolert fra et adenokarsinom i bukspyttkjertel, lokalisert i pankreas-kroppen [51, 52]. De viktigste egenskapene til BxPC3-cellene er oppført i Tabell 2.1 [53]. Det er vist i Figur 2.1 hvordan cellene ser under mikroskopet.

Tabell 2.1. Hoved egenskaper til BxPC3-cellene	
Kliniske data	Kvinne, 61 år, adenokarsinom i bukspyttkjertel
Morfologien	Epiteliale celler
Vekst egenskaper	Adherente
Evne til å indusere tumorvekst	Ja. Tumor utvikles innen 21 dag er i 5 av 5 nakne mus inokulert subkutant med BxPC3-celler



Figur 2.1. BxPC3 celler under mikroskop, 40x forstørrelse (A) og 4x forstørrelse (B)

Denne cellelinjen ble valgt fordi den ikke uttrykker Smad4 og dermed representerer omtrent 50% av all bukspyttkjertelskreft, hvor det er funnet at kromosom-region 18q21.1 som koder for Smad4, er tapt enten som følge av translokasjon eller homozygot tap av gen på begge allelene. Smad4 er tumorsuppressor som sammen med andre medlemmer av Smad-familien er involvert i TGF β -signalering [54-56]. *Hahn et al.* har vist at manglende uttrykk av Smad4 er korrelert med mer aggressive kreftformer og dårligere prognose [57]. Siden BxPC3-cellelinjen har Smad4-mutasjon, svarer den ikke på TGF β via Smad-signalering.

Etter innkjøp ble BxPC3-cellene dyrket og frosset ned i flytende nitrogen ved -196 °C. De ble brukt i opptil 25 passasjer etter opptining.

Stellatceller

Stellatceller var isolert fra biopsiprøver etter operasjon av bukspyttkjertelkreft. Prosjektet er godkjent av etisk komité (REK Sør-Øst, prosjekt nummer: 2010/694a). Biopsiene ble kuttet opp i små biter og deretter plasert i vevsskåler hvor cellene fikk vokse ut fra vevsbitene. Når cellene var kommet opp i tilstrekkelig antall ble cellene løsnet fra skålene med trypsin-EDTA og tilsatt et frysemedium som inneholder DMSO (10 %), FBS og cellekultur medium. Cellene ble frosset ned i frysekammere for jevn nedfrysning i -70 °C og deretter flyttet over til flytende nitrogen (-196 °C). Dette er standard metode for å bringe celler i dyptfrost tilstand og kalles for programmert nedfrysing [58]. Cellene ble tatt opp, tint og dyrket senere i eksperimentets forløp.

Celler isolert fra forskjellige prøver var merket ved bruk av instituttet sitt standard system, slik at personvern ble ivaretatt. Celler som ble brukt i våre forsøk hadde følgende betegnelser: ATA, TJS, KSB, GLP, KS2, TO, AL og AR.

2.2.2 Celledyrking

Medium og dyrkingsbetingelser

Cellene ble dyrket i DMEM tilsatt Pen-Strep (5 ml til 500 ml medium), Fungizone (Amfotericin B løsning 250 µg/ml; 5 ml til 500 ml medium), GlutaMax (5 ml til 500 ml medium) og 10 % FBS, ved 37 °C og 5 % CO₂ i luft. BxPC3-celler ble dyrket i 75 cm² Corning-flasker, mens stellatceller ble dyrket i 20 cm² Corning-skåler.

BxPC3-celler ble splittet ca. 2 ganger i uken i forholdet 1:2 til 1:4, mens stellatceller hadde annerledes vekstegenskaper. Noen stellatceller måtte splittes 1-2 ganger i uken (f.eks. ATA og TJS), mens andre kunne splittes først etter 2-3 uker (f.eks. AR). De ble splittet i forhold 1:2. Medium ble byttet mellom to påfølgende splittings hver 4.-5. dag.

Cellesplitting

Alle celler vi brukte var adherente, dvs. de hadde evne til å feste seg på dyrkningsoverflaten. Når cellene var 70-90% konfluente, ble de splittet i bestemt forhold avhengig av celletype.

Først ble medium sugd opp og cellene vasket 2 ganger med sterilt saltvann for å fjerne serumrester. Deretter ble det tilsatt 1 ml trypsin-EDTA 0,25 % til flaske eller skål og inkubert ved 37°C, 5 % CO₂ i 5-15 minutter avhengig av celletype. Den tiden trengtes for at cellene skulle løsne. Cellene ble så studert under mikroskopet for å undersøke om alle cellene hadde løsnet. Deretter ble det tilsatt ca. 9 ml serumholdig medium for å inaktivere trypsin-EDTA og splitting ble foretatt i ønsket ratio.

Telling av celler

Før cellene ble sådd ut for forsøk, ble antall celler telt ved hjelp av et Bürcher-kammer. Etter trypsinering av cellene og tilsetning av serumholdig medium, ble cellesuspensjonen overført til et rør og sentrifugert ved 1000 rpm i 5 minutter. Mediet ble fjernet og pelleten resuspendert i 3-5 ml medium. Deretter ble suspensjonen videre fortynnet 10 ganger (10 µl i 90 µl medium) og godt blandet. En dråpe ble avsatt under dekkglasset på Bürcher-kammeret og cellene ble telt i minst 3 store telleruter (tilsvarer 0,1 µl per tellerute). For å få totalt antall celler ble gjennomsnittet av de tre tellingene multiplisert med 3 eller 5 (antall ml cellesuspensjon), og videre multiplisert med 10 (fortynning), og 10⁴.

Etter telling ble det laget ønsket fortynning av cellesuspensjon og cellene ble sådd ut i 12- eller 6-brønners Costar- brett eller brønninnlegg for videre forsøk.

2.3 Transfeksjon av stellatceller ved bruk av Lipofectamine[®] 2000

Prinsipp for transfeksjon

Hensikten med transfeksjon er å utnytte siRNAs evne til å interferere med uttrykket av spesifikke gener som har komplementære gensekvenser. Det resulterer i mRNAs nedbrytning etter transkripsjon og fravær av translasjon og syntese av målproteinet.

Lipofektamin er en kationisk liposomformulering som har evne til å danne liposomer i vandige løsninger og fange transfeksjonsmaterialet, i dette tilfelle siRNA, i liposomer.

Liposomene bærer positiv ladning på overflaten og kan reagere med cellemembranen som har negativ ladning på utsiden. Resultat er fusjon mellom liposomer og cellemembranen og siRNA innføres i cellene. Videre må siRNA transporteres inn i kjernen for å kunne påvirke transkripsjon og proteinnivåer.

Vi brukte Smad7-siRNA for å nedregulere Smad7-nivåer i ATA-cellene som har høyt uttrykk av dette proteinet.

Dyrking av celler for forsøk

ATA-cellene ble trypsinert, samlet i et 50 ml rør og godt resuspendert før de ble sådd ut i 6 seks-brønners Brett. Det ble tilsatt 0,5 ml cellesuspensjon og 1,5 ml DMEM (med 10% FBS) pr brønn. Cellene ble deretter inkubert til 70-90% tetthet.

Transfeksjon med siRNA

Transfeksjonsløsning inneholdt like deler av fortynnet Lipofectamin[®] 2000 (8 µl Lipofectamin til 100 µl OptiMEM) og fortynnet siRNA (10 µl Smad7-siRNA/ 2 µl kontroll-siRNA til 100 µl OptiMEM) ved at siRNA-løsning ble tilsatt til Lipofectamin-rør og pipettert forsiktig 2-3 ganger opp og ned. Etter 5 minutters inkubering var løsningen klar til bruk.

Cellene ble vasket 2 ganger med sterilt saltvann, tilsatt 1,8 ml DMEM (med 1% FBS) og transfektert ved å tilsette 200 µl transfeksjonsløsning pr brønn ved forsiktig pipettering.

Deretter ble cellene inkubert i 3 dager før de ble vasket 2 ganger med 0,9 % NaCl. Deretter ble 2 ml SF per brønn tilsatt og cellene inkubert i nye 48 timer før stimulering.

Av totalt 6 brett per forsøk, ble to brett transfektert med kontroll-siRNA og to med Smad7-siRNA. Disse ble brukt for å lage kondisjonert medium for skraper-analyse. De resterende to av totalt seks brett ble tilsatt transfeksjonsløsning med kontroll-siRNA i 3 brønner og Smad7-siRNA i andre 3 brønner. Disse to kombinasjonsplatene ble brukt kun til å bestemme om Smad7 og IL-1R1 er nedregulert på proteinnivå ved Western-blotting ved starten av forsøket og etter tre og fem dager.

Stimulering av celler

Det ble tilsatt IL-1 α (endelig konsentrasjon i brønnen 1 ng/ml) i ett brett transfektert med Smad7-siRNA og i ett transfektert med kontroll-siRNA, mens det andre brettet var kontroll. Inkubasjonstiden var 3 dager.

Høsting av celler og supernatanter

Etter inkubasjon med IL-1 α ble supernatantene høstet slik at de ble samlet i 3 rør (15 ml) per brett. Cellene ble deretter vasket 2 ganger med sterilt saltvann. Det ble tilsatt lysesbuffer (150 μ l/brønn) til halvparten av brønnene. Deretter ble cellene overført til Eppendorf-rør og tilsatt 7,5 μ l 0,125 % BFB og 15 μ l mercaptoetanol med påfølgende koking i 5 minutter for Western-blotting. Den andre halvparten av brønnene ble lysert for RNA-forsøk.

For å teste effekten av Smad7-siRNA ble ett brett med ATA celler transfektert med både kontroll-siRNA og Smad7-siRNA. Disse cellene ble høstet og lysert for Western blott analyse etter at transfeksjonstiden var ferdig (72 timer), og etter videre 48 timer i SF medium, dvs. rett før stimuleringen ble foretatt.

Optimalisering av metoden

Det ble gjort forsøk med forskjellig seruminnhold i mediet (serumfritt vs. 1% serum), forskjellige transfeksjonstider (24, 48, 72 timer) og med forskjellige konsentrasjoner av lipofektamin (4 og 8 μ l) og Smad7-siRNA (20-100 nM) per 100 μ OptiMEM.

2.4 Indirekte kokultur av ATA-celler med BxPC3-celler

ATA-celler ble sådd ut i 12-brønners brett og dyrket i serumholdig medium (10% FBS) til konfluens. Deretter ble cellene vasket 2 ganger med NaCl 0,9% og tilsatt 0,9 ml medium med 1 % FBS og 100 μ l transfeksjonsløsning. To brett ble transfektert med kontroll-siRNA, mens andre to ble transfektert med Smad7-siRNA. Cellene ble transfektert i 3 dager og deretter vasket 2 ganger med saltvann og tilsatt serumfritt medium og inkubert i 2 dager til slik at cellene får tid til å skille ut TGF β som da kan nedregulere IL-1R1. På dag fire fra starten av transfeksjonen ble BxPC3-celler sådd ut i brønninnlegg i medium med 10 % FBS (250.000 celler per 0,5 ml/ innlegg) og inkubert over natt for å så bli vasket, tilsatt SF medium og innleggene plassert i ett kontroll-brett og ett brett med Smad7-siRNA. Det var ikke ønskelig å ha cellene for lenge i kokultur siden BxPC3-cellene produserer mye TGF β som potensielt kan motvirke effekten av IL-1 α produsert av BxPC3. Etter 12 timer ble innleggene fjernet og supernatant fra dem overført i tilsvarende brønn slik at faktorer som BxPC3-cellene skilte ut kunne påvirke ATA-cellene i de neste 60 timene av forsøket. Kondisjonert medium ble høstet og brukt som medium for kreftceller i skrape-analyse. Det ble gjort for å undersøke hvordan samspill mellom stellat- og kreftceller påvirker kreftcellenes migrasjon når det er normalt eller redusert uttrykk av Smad7 i stellatcellene.

2.5 Tillaging av supernatanter (kondisjonert medium)

Kondisjonert medium er i vår sammenheng serumfritt medium som inneholder faktorer stellatceller produserte i løpet av 4 dagers inkubering med eller uten tilsatt IL-1 α og TGF β , alene eller i kombinasjon. Mediene ble brukt i skrape-analyser for å studere hvordan forskjellige faktorer påvirker stellatcellenes evne til å stimulere migrasjon av kreftceller.

Kunnskapen om mekanismer og signalering brukt av stellatcellene i stimulering av kreftcellers migrasjon kan videre brukes til å utvikle nye behandlinger som fokuserer på å hemme kommunikasjonen mellom kreftceller og stroma.

Supernatanter var laget på følgende måte:

1. Stellatceller ble tatt opp fra flytende nitrogen, tint i vannbad (37 °C) og ble sådd ut i 20 cm² Costar-skåler. Det ble tilsatt 10 ml serumholdig DMEM (10 % fetalt bovint serum) som ble byttet dagen etter for å fjerne DMSO. Cellene ble dyrket videre ved 37 °C og 5 % CO₂ og splittet flere ganger før de ble sådd ut i 6-brønners brett.
2. Når antall celler var tilstrekkelig, ble cellene trypsinert og samlet i et 50 ml rør, resuspendert og sådd ut i plater. Det ble tilsatt 0,5 ml celledensjon og 1,5 ml serumholdig medium i hver brønn og cellene ble inkubert til konfluens. Hvis det tok lengre enn fem dager, ble medium byttet for å unngå mulige negative effekter av egenprodusert TGFβ.
3. Da cellene hadde vokst til konfluens, ble de vasket 2 ganger med saltvann og tilsatt 2 ml serumfritt medium og evt. ønsket cytokin. Det ble laget tre forskjellige «typer» av supernatanter:

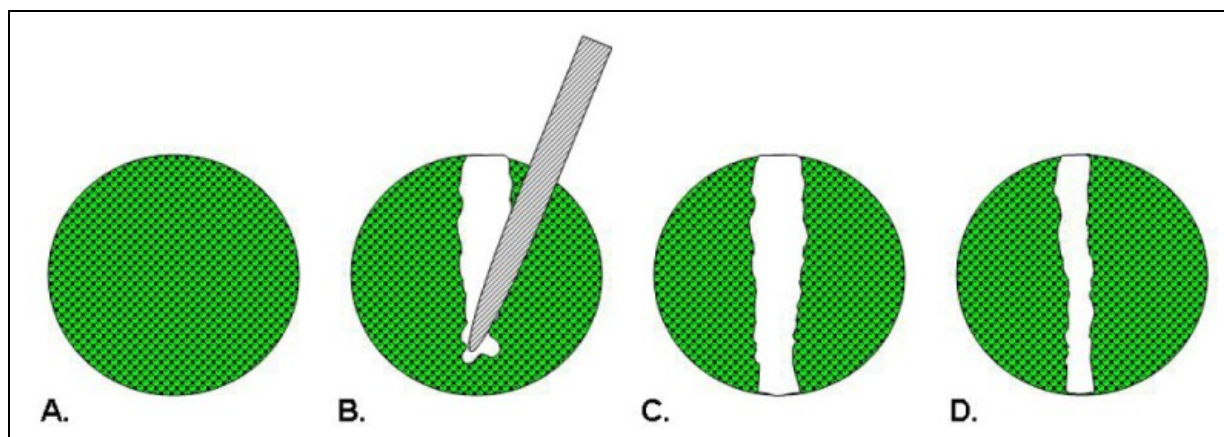
Kondisjonert medium fra stellatceller. Fire plater ble brukt til hvert forsøk. Det ble tilsatt 2 ml serumfritt medium til alle plater. En plate ble tilsatt kum serumfritt medium (kontroll), mens resten ble tilsatt i tillegg IL-1α (1 ng/ml), TGFβ (2 ng/ml) eller en kombinasjon av både IL-1α og TGFβ.

- a. *Preinkubering med TGF.* I noen forsøk ønsket vi å undersøke om tilsetning av TGFβ på forhånd kunne redusere svar på IL-1α ved å nedregulere IL-1R1. Da ble framgangsmåte litt annerledes. Det ble tilsatt 2 ml DMEM med 1 % FBS i hver brønn i stedet for serumfritt medium. Deretter ble alle plater untatt en tilsatt TGFβ. I en plate ble den endelige konsentrasjonen 15 pg/ml, mens i to andre ble den 4 ng/ml TGFβ. Etter ett døgn med inkubering ble cellene vasket med NaCl og tilsatt serumfritt medium. IL-1α (1 ng/ml) ble tilsatt i platen preinkubert med 15 pg/ml TGFβ og en plate preinkubert med 4 ng/ml TGFβ, mens i den siste preinkuberte platen ble det tilsatt både IL-1α og TGFβ (2 ng/ml). Platene ble inkubert i tre dager til.

- b. *Transfekterte ATA-celler.* Etter transfeksjon i 3 dager, ble det foretatt vask og bytting til serumfritt medium. Det var nødvendig å inkubere cellene i serumfritt medium i 48 timer før stimulering med IL-1 α , slik at de skulle hatt tid til å produsere TGF β som kan nedregulere IL-1R1. Deretter ble en plate med kontroll-siRNA og en plate med Smad7-siRNA tilsatt IL-1 α (endelig konsentrasjon 1 ng/ml) eller innlegg med BxPC3-celler og inkubert i 3 dager til før høsting av supernatanter. Innleggene med BxPC3-celler ble fjernet etter 12 timers inkubering og stellatcellene ble inkubert i ytterligere 60 timer (totalt 72 timer).
4. Supernatanter ble øverført i 15 ml rør (3 rør per plate) og fryset ned ved -20 °C etter inkuberingen var over.

2.6 Skrape-analyse («Wound closure assay» eller «Scratch assay»)

Denne metoden er en godt etablert og er en billig og enkel metode som brukes mye for å studere cellemigrasjon *in vitro*. Metoden er basert på observasjonen at hvis det lages «sår» i konfluent celledag, skal celler på kantene av såret migrere mot åpningen for å lukke såret, til de møtes med cellene fra motsatt kant [59]. Eksperiment utføres ved å så ut ønsket fortykning av celler i flerebrønns plater og la dem feste seg, spre seg og danne et konfluent lag. Deretter lages det sår ved bruk av pipettespiss, nål eller lignende, og tilsettes faktorer man er interessert i. Det tas bilder ved start av forsøket og med jevne mellomrom inntil 24 eller 48 timer etter start [59-62]. Figur 2.2 viser skjematisk hvordan forsøket utføres [60].

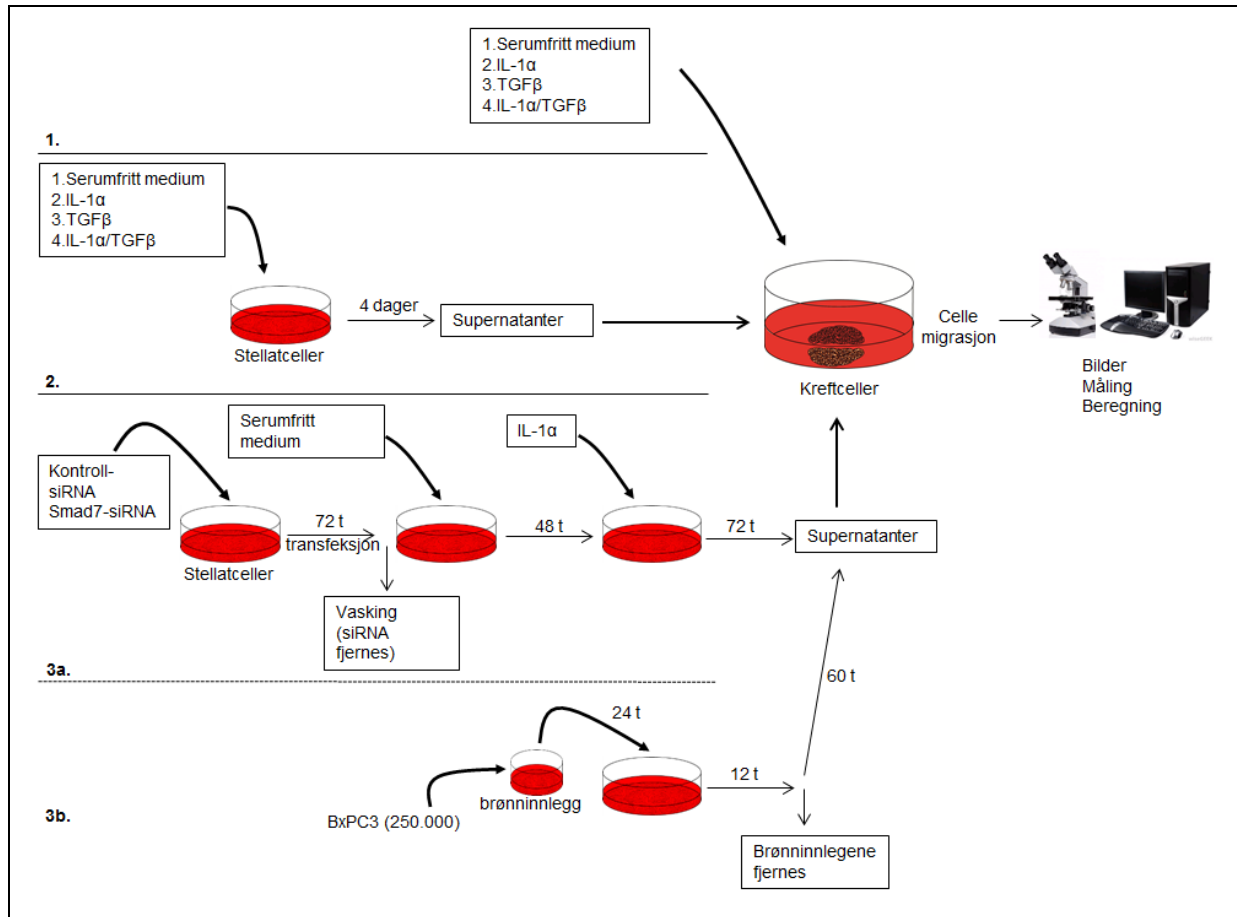


Figur 2.2. «Scratch-assay». Når cellene er konfluente (A), lages det sår med en spiss gjenstand (B) og sårets størrelse blir dokumentert med et digitalt kamera ved for eksempel tid 0 (C) og 24 timer (D). Bildene skal ligge til grunn for beregning av sårlukking (%). Figuren er tatt fra referanse [60].

Det ble gjort flere innledende forsøk for å optimalisere under hvilke forhold det er mest optimalt å utføre eksperimenter med BxPC3-celler (se resultater). I denne oppgaven var skrape-analyse på BxPC3-celler utført på følgende måte:

1. Etter trypsinering og celledelling ble det laget en fortykning på 2×10^6 celler pr 1 ml suspensjon (i DMEM med 10 % FBS).
2. 100 μ l med ønsket konsentrasjon ble plassert midt i brønnen på en 12-brønners plate.
3. Etter at cellene har festet seg (2,5-3 timer), ble det tilsatt 1 ml serumfritt medium i hver brønn og inkubert over natt.
4. På dag 2 ble det laget et sår midt i cellelaget med en 100 μ l pipettespiss, og så ble cellene vasket 2 ganger med sterilt saltvann
5. Deretter ble det tilsatt bare SF i kontrollbrønner og SF med ønsket faktor eller uforynnet kondisjonert medium fra stellatceller i andre brønner.
6. Forsøk ble utført i triplikater (eller i duplikater hvis ikke tilstrekkelig mengde med kondisjonert medium var tilgjengelig).
7. Bilde ble tatt rett etter tilsetning av ønsket medium, og deretter etter 12 eller 24 timer, med unntak av forsøk med KS2 supernatanter hvor det var behov for kortere tidsintervaller (0-8-16t)

Skrape-analyse ble brukt som hoved metode i flere forsøk som hadde litt forskjellig design avhengig av hva vi ønsket å undersøke (Figur 2.3).



Figur 2.3. Forskjellige forsøk hvor skrape-analyse ble brukt.

Først var kreftceller stimulert med enkelte cytokiner (1). Videre ble det tillaget supernatanter fra stellatceller ved bruk av samme cytokiner og de ble brukt som kondisjonert medium i skrape-analyse (2). Siste steg var å manipulere stellatcellene med siRNA og lage supernatanter ved å stimulere manipulererte cellene enten med IL-1α (3a) eller med BxPC3-cellene i indirekte kokultur (3b).

2.7 Western-blotting

Western-blotting er analytisk og sensitiv metode som er brukt for å påvise proteiner, samt vise fram forskjellige nivåer av samme protein i forskjellige prøver. Metoden er semikvantitativ. Vi brukte metoden for å bestemme nivåer av Smad7-protein og IL-1R1 i stellatceller før og etter manipulasjon.

ATA-cellene ble sådd ut i 6-brønnersplater i DMEM med 10 % FBS og dyrket til 70-90 % tetthet. Deretter ble de transfektert som beskrevet i avsnitt 2.3. Cellene ble høstet til Western-blotting før transfeksjon, etter 72 timers transfeksjon og etter ytterligere 48 timer.

2.7.1 Høsting av celler i 6- eller 12- brønners brett til Western-blotting

Før cellelysering ble mediet suget av og cellene vasket 2 ganger med saltvann. Etter dette ble cellene lysert ved tilsetning av 150 µl lyseringsbuffer (25 ml 0,5 M TRIS, 40 ml 10 % SDS, 20 ml glyserol). Lysatet ble overført i på forhånd merkede rør, tilsatt 7,5 µl BFB og 15 µl β-merkaptoetanol, og deretter kokt i 5 minutter. Lysatet ble lagret ved -20 °C inntil bruk.

Med stellatceller måtte vi avvike litt fra den generelle protokollen som brukes på instituttet fordi proteinkonsentrasjon ble for lav og var nesten ikke detekterbar ved Western blotting. Derfor brukte vi 6- brønners brett til stellat celler og prøver fra tre brønn ble samlet opp i en prøve, dvs. 150 µl lyseringsbuffer ble brukt for å lysere første brønn og deretter ble lysatet overført til neste brønn, og så til den neste, slik at vi oppkonsentrerte lysatet ca. 6 ganger.

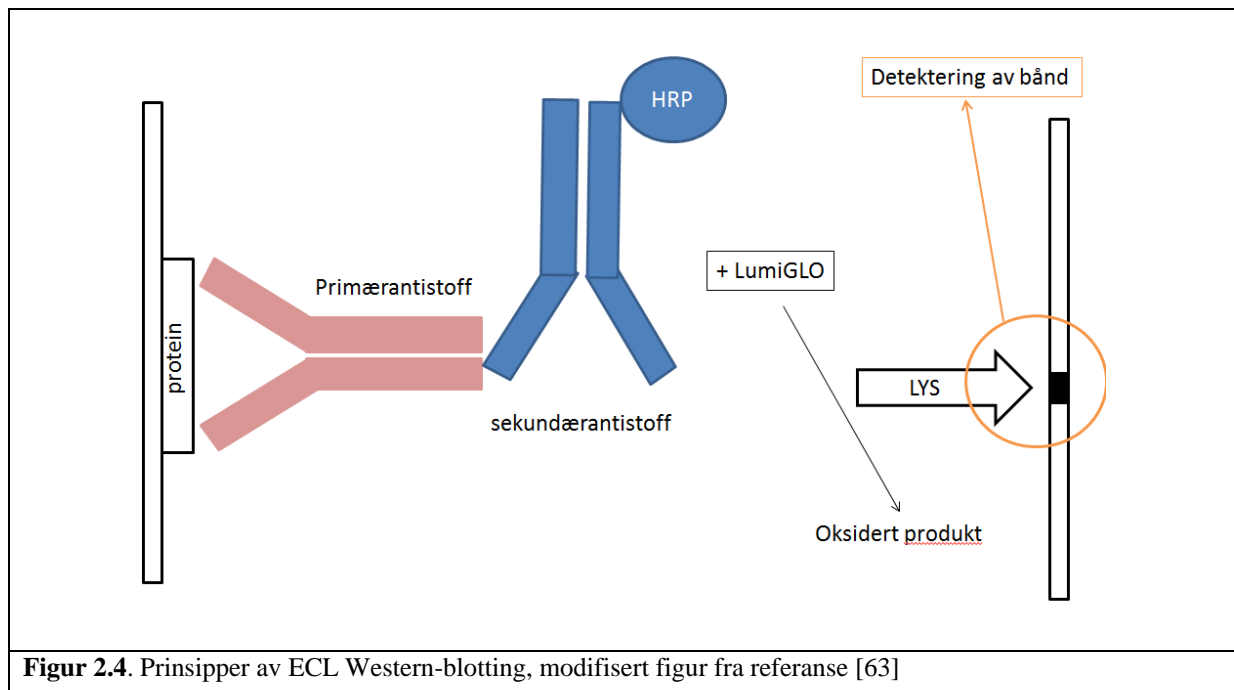
2.7.2 Blotting og deteksjon av proteiner

Proteiner ble separert ved hjelp av natriumdodesylsulfat-polyakrilamid gelelektroforese (SDS-PAGE). SDS er en detergent som holder proteiner denaturerte etter at de har blitt behandlet med reduksjonsmiddel (β-merkaptoetanol i vårt tilfelle) og påfører alle proteiner uniform negativ ladning, som gjør at de separeres etter molekylvekt (kDa) i elektroforesen. Vi brukte ferdigkjøpte geler (BioRad). Etter at proteinene ble separert, overførte vi dem til en nitrocellulosemembran ved bruk av BioRad Semi Dry modul som ble kjørt i 30 minutter ved 25V. Proteinoverføring ble kontrollert ved hjelp av Ponceau S og membranen ble videre vasket med vann og tilsatt blokkeløsning (TTBS med 5 % tørrmelk eller bovine serum albumin, BSA) for å unngå uspesifikk binding av antistoff til membranen. Tørrmelk ble brukt til GAPDH blotting, mens BSA ble brukt til Smad7 og IL-1R1. Membranen ble inkubert med blokkeringsløsningen på et vippebrett i romtemperatur i 1 time. Membranen var deretter inkubert med primært antistoff over natt på vippebrett (ca 4 °C). Neste dag ble membranen vasket med Wash Buffer 3 ganger i 5 minutter og inkubert med sekundært antistoff i 1 time på vippebrett og vasket. Da var membranen klar for behandling og visualisering med LumiGLO[®]. Bilder av blottet ble tatt ved bruk av programet Labworks [61].

Både primært og sekundært antistoff ble fortynnet i blokkeløsningen (TTBS med tørrmelk eller BSA, Tabell 2.2).

Tabel 2.2. Antistoffer				
Protein	Primærantistoff	Fortynning	Sekundærantistoff	Fortynning
Smad7	Kanin anti-human polykonalt antistoff mot Smad7	1:10 000	Geit anti-kanin immunoglobulin	1:10 000
Smad7	Mus anti-human/-mus/-rotte monoklonalt antistoff mot Smad7	1:10 000	Geit anti-mus immunoglobulin	1:10 000
IL-1R1	Kanin monoklonalt antistoff mot IL-1R1	1:10 000	Geit anti-kanin immunoglobulin	1:10 000
GADPH	Kanin monoklonalt antistoff mot GAPDH	1:10 000	Geit anti-kanin immunoglobulin	1:10 000

Primærantistoff er spesifikk for ønsket protein, mens sekundærantistoff bindes spesifikt til primærantistoff. Sekundærantistoffet er konjugert med Horseradish Peroxidase (HRP) og ved tilsetning av LumiGLO[®] oppstår det kjemisk reaksjon som resulterer i dannelsen av et lyssignal som da detekteres ved hjelp av Labworks. Prinsipp for Western-blotting med enzym-konjugert sekundærantistoff er vist i Figur 2.4.



Figur 2.4. Prinsipper av ECL Western-blotting, modifisert figur fra referanse [63]

2.8 Beregninger, grafer og statistikk

Alle resultater som ligger til grunn for grafer ble utført med 2 eller 3 paralleller. Alle forsøkene ble gjentatt minst 2 ganger. I hver parallell ble det utført to målinger og gjennomsnitt ble beregnet. Alle verdier ble normaliserte mot kontrollen eller i noen tilfeller mot supernatant fra ustimulerte stellat celler. Alle verdier ble eksportert til Excel etter målinger i ImageJ, hvor det ble gjort alle nødvendige beregninger. De normaliserte data ble brukt videre for å fremstille resultater grafisk.

Det ble brukt GrapPhad Prism5 for statistisk analyse og tegning av grafer. Resultatene ble testet for statistisk signifikans ved bruk av enveis-varianseanalyse (enveis ANOVA) med Bonferroni-korreksjon. Resultatene ble ansett som signifikante når p-verdien var < 0.05 . Resultatene ble presentert som gjennomsnitt \pm SEM.

3 Resultater

Desmoplastisk reaksjon er en av kjennetegnene til pankreaskreft. Den er definert som proliferasjon av fibrotisk vev med endret ECM som bidrar til tumor vekst og metastasering [64]. Siden kreftceller utnytter stellatceller for å kunne overleve, migrere og invadere andre organer [37, 38], kan kommunikasjonen mellom dem og signalveier som er involvert være nye angrepspunkter i bukspyttkjertelkreftsbehandling.

En av signalveiene som kunne vært «target» er kreft-celle-produsert-IL-1 α mediert kommunikasjonen mellom kreft- og stellatcellene. Kreftcellene produserer IL-1 α som har parakrin effekt på stellatcellene som da produserer faktorer som bidrar til kreftutvikling, vekst og metastasering [11, 44]. En av signalveiene som regulerer PSCs funksjon er TGF β /Smad [64] og det er vist at TGF β nedregulerer IL-1R1 i stellatcellene [50]. I denne oppgaven ble det undersøkt hvordan IL-1 α og TGF β påvirker stellatcellenes evne til å støtte kreftcellenes migrasjon og om TGF β s virkingsmekanisme kunne utnyttes for å hemme IL-1 α -mediert samspill mellom kreft- og stellatceller.

3.1 Optimalisering av forhold for skrape-analyse

Det ble utprøvd forskjellige celletettheter og inkubasjonstider for å finne optimale forhold for skrape-analyse. Vi fant ut at det er viktig å ha helt konfluent lag før forsøket startes for å unngå at kreftcellene beveger seg mot andre tomme rom enn såret laget med pipettespiss. Det ble funnet at ved bruk av mindre enn 150.000 celler pr brønn dannes det ikke konfluent cellelag når forsøket skal startes. I de første to forsøkene ble det brukt 150.000 celler pr brønn (1 dråpe på 100 μ l med angitt antall celler ble plassert i midten av hver brønn), mens det ble brukt 200.000 celler pr brønn i alle andre forsøk.

I denne forsøkestypen ble migrasjonen fulgt opp i jevne intervaller ved å ta bilder med digitalt kamera og ved bruk av programvare AnaliSys. Første sett av bilder ble tatt ved starten av forsøket (t0), og dette ble gjentatt etter 24 og 48 timer. Det viste seg at beste intervall for BxPC3 cellene var 24 timer, med et unntak når det ble brukt kondisjonert medium fra KS2-cellene som medium for skrape-analyse. Da var det nødvendig med kort observeringstid (8 timer). Når vi lot cellene gå i 48 timer, begynte de å trekke seg sammen og såret ble større.

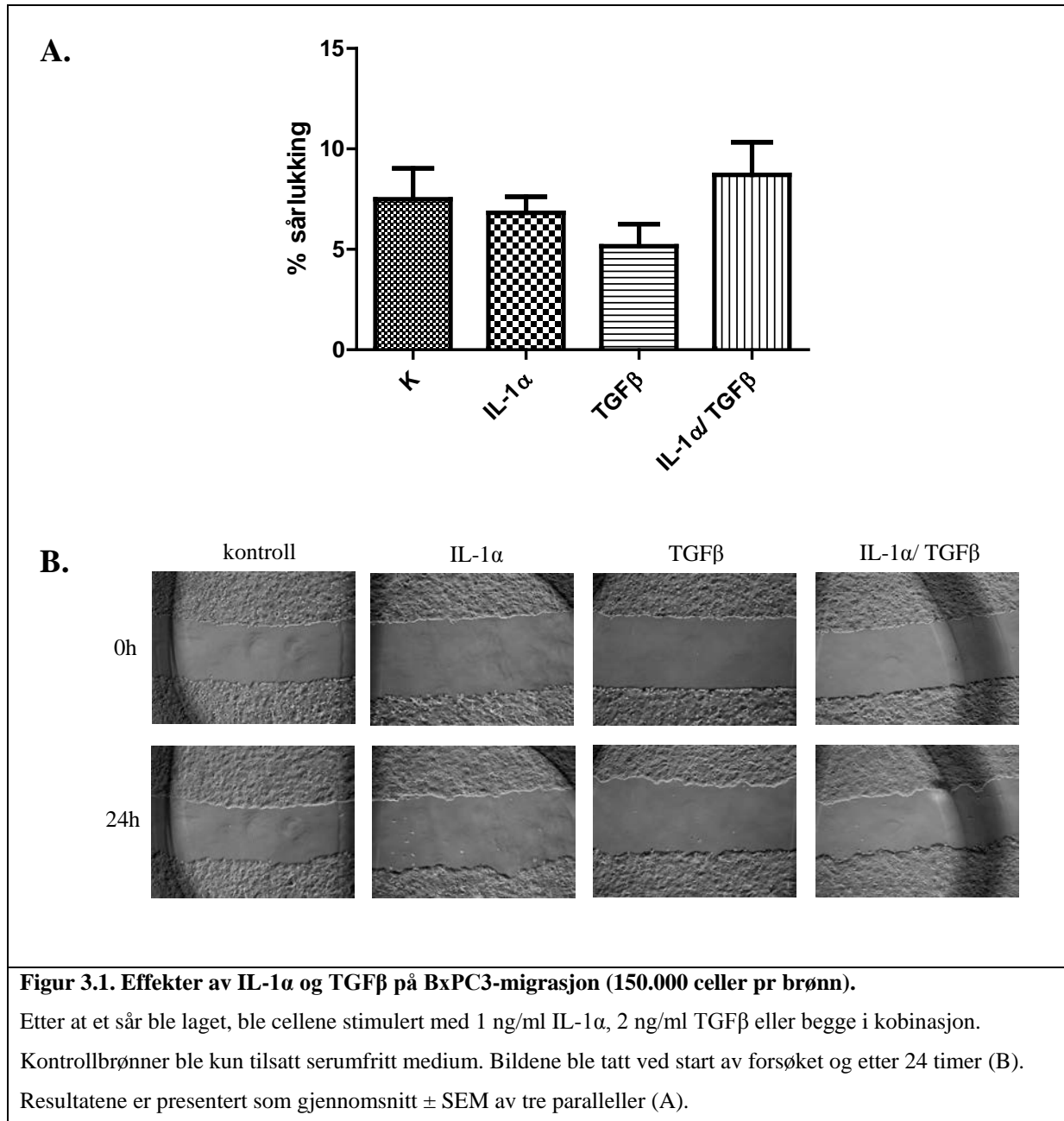
3.2 Effekter av IL-1 α og TGF β på migrasjon av BxPC3-celler

Dette forsøket ble gjort for å undersøke om IL-1 α og TGF β stimulerte migrasjon av BxPC3-cellene, alene eller i kombinasjon. Disse cytokinene er til stede i tumormikromiljøet og spiller en viktig rolle i samspill mellom kreft- og stromaceller [65].

Cellene ble sådd ut i 12-brønners brett slik at 100 μ l av celleduspensjon i serumholdig medium med ble tilsatt hver brønn (150.000- 200.000 celler/brønn). Etter 2,5-3 timer ble 1 ml serumfritt medium tilsatt hver brønn og inkubert over natt ved 37 °C og 5 % CO₂. Neste dag ble forsøket startet ved å lage sår i konfluent celledag med 100 μ l pipettespiss. Deretter ble cellene vasket to ganger med saltvann og tilsatt 1 ml serumfritt medium. IL-1 α stock løsning ble fortynnet 1:100 og så tilsatt 10 μ l pr brønn i 3 brønn alene og i 3 brønn sammen med TGF β slik at endelig konsentrasjon i brønn var 1 ng/ml. Samme ble gjort med TGF β og endelig konsentrasjon i brønn var 2 ng/ml. Kontrollen ble tilsatt kun 1 ml SF medium. Resultatene er vist i Figur 3.1.

Bildene ble tatt ved starten av forsøket og etter 24 timer. Sårstørrelse ble målt ved hjelp av programvare ImageJ og verdiene ble benyttet for beregning av % sårlukking.

Figur 3.1 viser ikke-signifikant effekt på migrasjon i alle gruppene sammenlignet med kontrollen. Dette forsøket viste at disse faktorene ikke hadde direkte effekter på migrasjon av kreftcellene.

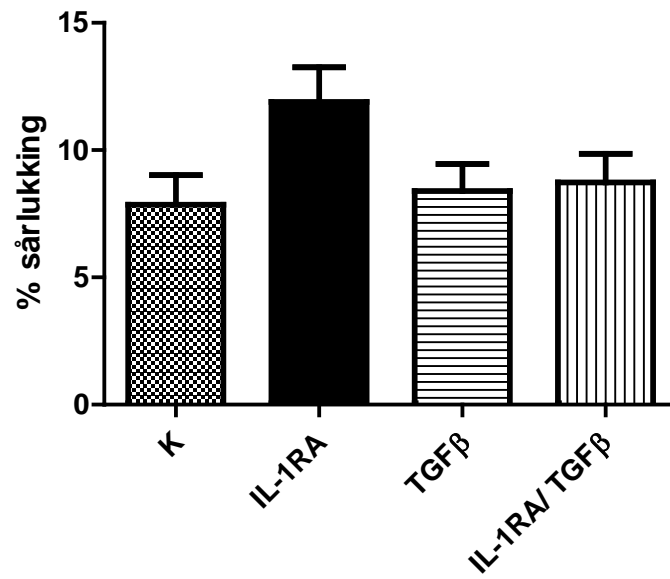


3.3 Effekt av IL-1R-antagonist på BxPC3-migrasjon

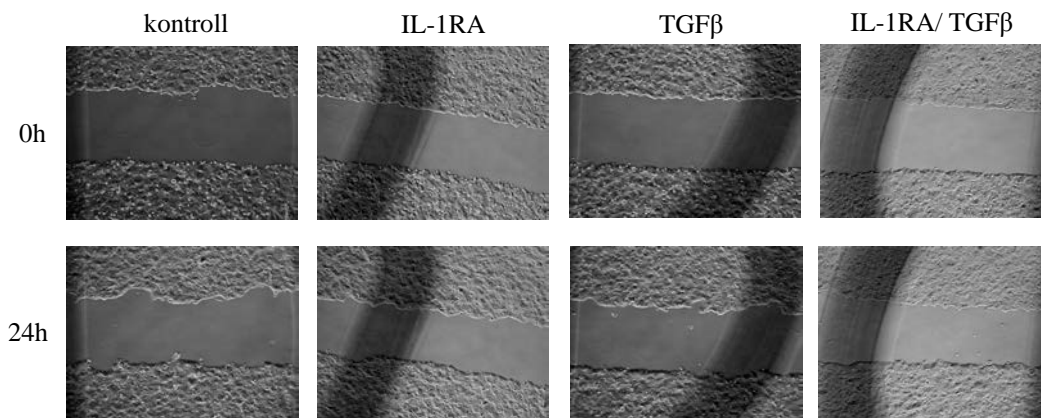
For å studere om IL-1α hadde autokrin effekt på BxPC3-migrasjon, ble cellene behandlet med IL-1RA (Anakinra) i endelig konsentrasjon i brønn 10 µg/ml, alene eller sammen med TGFβ. Kontrollen ble tilsatt kun serumfritt medium. Resultatene er presentert i Figur 3.2.

Figur 3.2 viser at effekter av IL-1RA og TGFβ alene eller i kombinasjon ikke var signifikante.

A.



B.



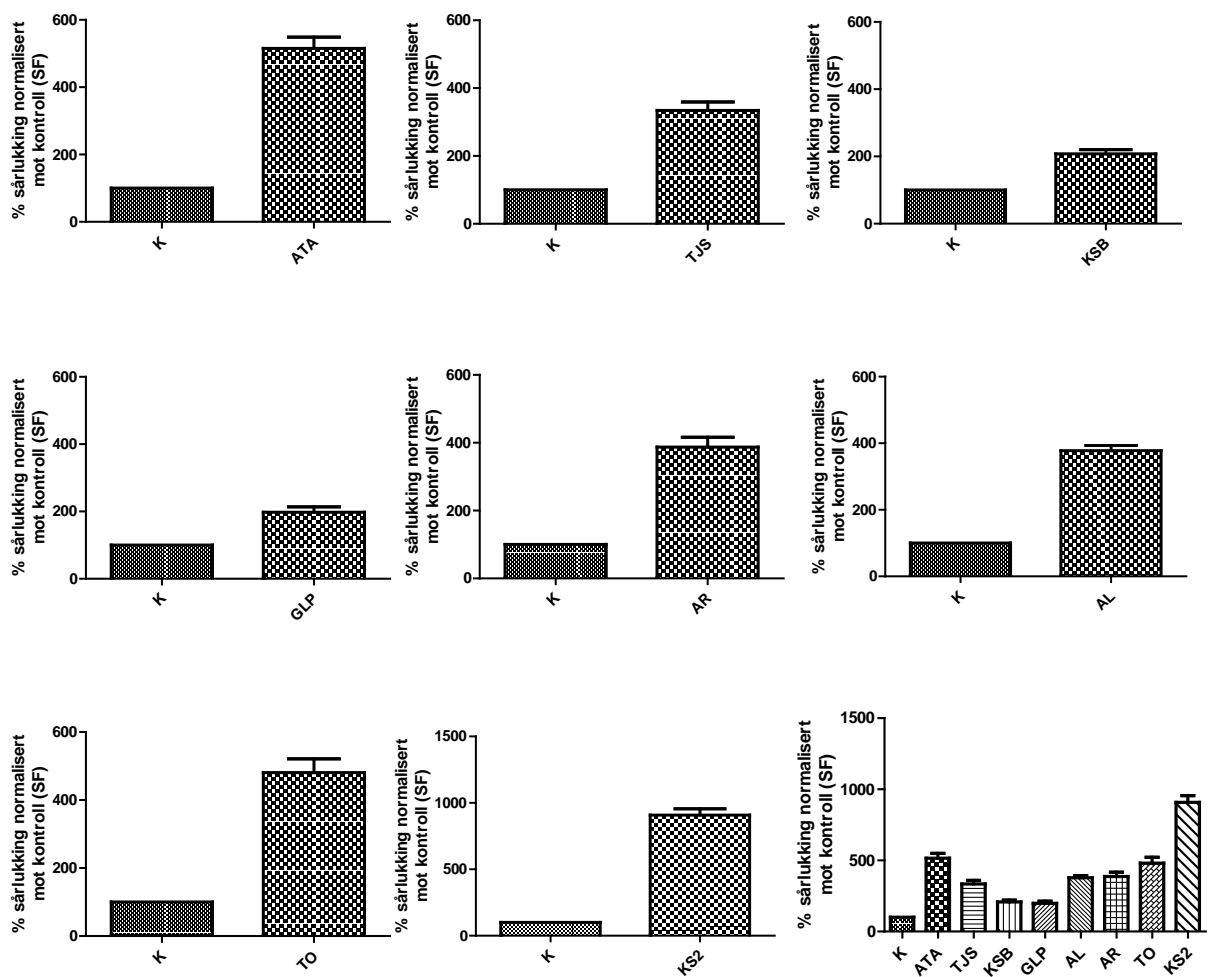
Figur 3.2. Effekt av IL-1RA og TGFβ på migrasjon av BxPC3-celler (150.000 celler pr brønn).

Etter at et sår ble laget, ble cellene stimulert med 10 µg/ml IL-1RA, 2 ng/ml TGFβ eller deres kombinasjon. Kontrollbrønner ble kun tilsatt serumfritt medium. Bildene ble tatt ved start av forsøket og etter 24 timer (B). Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM av tre paralleller (A).

3.4 Effekter av kondisjonert medium fra ulike stellatcellelinjer på BxPC3-migrasjon

Stellatcellene ble sådd ut i seks-brønners brett og dyrket til konfluens. Deretter ble de vasket med saltvann og medium byttet til serumfritt. Etter 4 dagers inkubering ble supernatantene høstet og brukt som medium for BxPC3-cellene i skrape-analyse for å undersøke om stellatceller uten at de er stimulert har evne til å støtte kreftcellenes migrasjon. Kontrollen var kun serumfritt medium.

Figur 3.3 viser at alle stellatcellelinjer stimulerte migrasjon av kreftcellene i større eller mindre grad. En cellelinje, KS2-cellene skilte seg ut med ekstremt stor evne til å stimulere cellemigrasjon. Forsøkene med supernatanter fra disse cellene ble observert i kun 8 timer.



Figur 3.3. Effekt av ustimulerte supernatanter fra forskjellige stellatcellelinjer (ATA, TJS, KSB, GLP, AR, AL, KS2) på migrasjon av kreftceller (BxPC3).

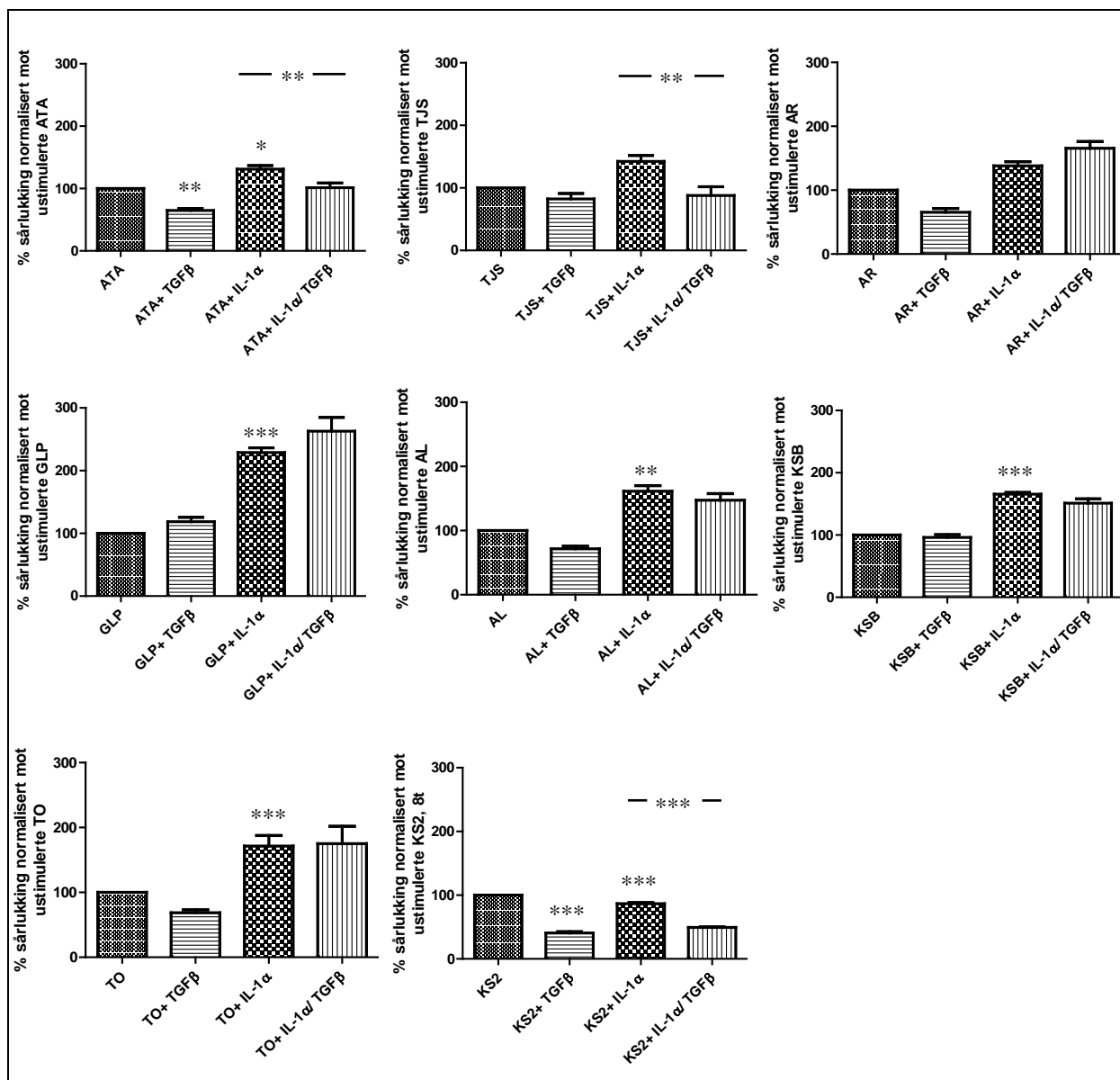
Stellatceller ble sådd ut i seks-brønners Brett og dyrket i serumholdig medium til konfluens. Deretter ble mediumet byttet til serumfritt og supernatanter ble høstet etter 4 dagers inkubering. Disse supernatantene ble tilsatt til BxPC3-celler (200.000 celler pr brønn) etter at det er laget sår i konfluent cellelag. Det ble brukt kun serumfritt medium som kontroll (K). Hvert forsøk ble utført i triplikater. Effekt av KS2-supernatanter ble observert etter kun 8 timer, mens oppfølgingsintervall for andre cellelinjer var 24 timer. Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM av minst seks paralleler, normalisert mot kontroll som var satt til 100 %.

3.5 Effekter av IL-1 α og TGF β på stellatcellenes evne til å stimulere migrasjon av BxPC3-celler

Stellatcellene ble behandlet som i foregående forsøk og ble tilsatt serumfritt medium og ønsket faktor (1 ng/ml IL-1 α og 2 ng/ml TGF β , alene eller i kombinasjon). Etter 4 dagers inkubering ble supernatantene høstet og brukt i stedet for medium på BxPC3 cellene i skrape-analyse. Dette ble gjort for å undersøke hvordan stimulering med IL-1 α og TGF β påvirker stellatcellenes evne til å stimulere migrasjon av BxPC3-celler. Kontrollen var serumfritt medium. Bilder ble tatt ved starten av forsøket og etter 24 timer (KS2-cellelinje kun 8 timer).

Figur 3.4 viser at noen av stellatcellene stimulerte kreftceller til signifikant mer migrasjon etter behandling med IL-1 α sammenlignet med effekt av ubehandlede PSC (ATA, KSB, GLP, AL), mens andre cellelinjer ikke gjorde det (TJS, TO, AR). KS2-cellene ga betydelig mindre migrasjon etter behandling med IL-1 α sammenlignet med effekt som ustimulerte KS2 hadde.

Figur 3.4 viser også i noen stellatcellelinjer at TGF β klarte å redusere i betydelig grad effekten som både ustimulerte stellatceller hadde på BxPC3 migrasjon (ATA, KS2) og effekten de hadde etter stimulering med IL-1 α (ATA, TJS, KS2).



Figur 3.4. Effekter av stimulering av stellatceller med IL-1α og TGFβ på cellemigrasjon (BxPC3).

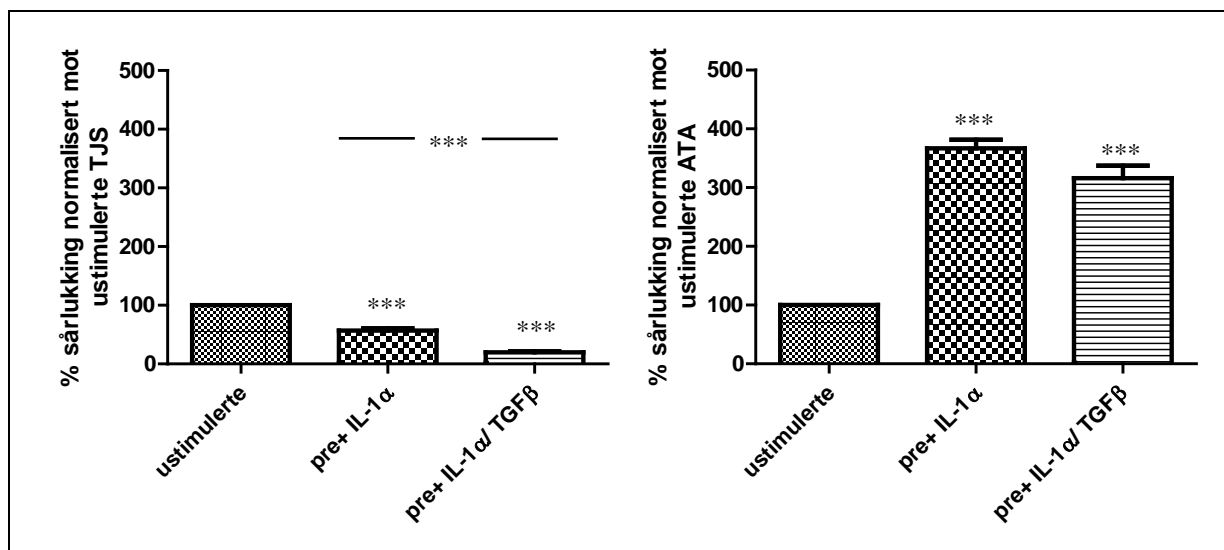
Forskjellige PSC ble dyrket i seks-brønners Brett til konfluens, vasket med saltvann og byttet medium til serumfritt med/uten tilsetning av IL-1α (1 ng/ml) og TGFβ (2 ng/ml), alene eller i kombinasjon. Supernatanter ble høstet etter fire dagers inkubering og brukt som medium for BxPC3-cellen i skrape-analyser (200.000 celler pr brønn). Resultatene ble normalisert mot effekter av ustimulert PSC som er satt til 100 % og presentert som gjennomsnitt ± SEM av minst seks paralleller. *, **, *** indikerer en signifikant forskjell fra kontroll eller sammenlignings gruppe (henholdsvis $p < 0,05$; $p < 0,005$; $p < 0,001$)

3.6 Effekten av preinkubering med TGF β på migrasjon av BxPC3-celler

TGF β er tidligere funnet involvert i nedregulering av IL-1R1 [50]. Det var av interesse å undersøke om preinkubering av stellatceller med TGF β kunne påvirke migrasjon av BxPC3-celler siden vi så at alle stellatceller stimulerte migrasjon av kreftceller.

Det ble brukt 2 forskjellige stellatcellelinjer, ATA og TJS. Cellene ble først preinkubert med 4 ng/ml TGF β i et døgn. Deretter ble de vasket to ganger med fysiologisk NaCl, tilsatt 1 ml serumfritt DMEM og behandlet videre med IL-1 α (1 ng/ml) alene eller i kombinasjon med TGF β (2 ng/ml). Etter 3 dagers inkubering ble supernatanter høstet og brukt som kondisjonert medium for BxPC3 i skrape-analyse. Som kontroll ble det brukt supernatant fra stellat celler uten noen stimulering (4 dagers inkubering i serumfritt medium).

Med to forskjellige stellatcellelinjer fikk vi to forskjellige resultater (Figur 3.5). I forsøket med TJS-supernatanter resulterte preinkubering med TGF β i betydelig lavere migrasjon, særlig når stellat cellene ble behandlet samtidig med IL-1 α og TGF β etter preinkubering. I motsetning til dette, ga preinkubering av ATA-cellene betydelig økning i cellemigrasjon etter stimulering med cytokiner og det ble ikke sett signifikant forskjell når de ble behandlet med bare IL-1 α og IL-1 α / TGF β etter preinkubering.



Figur 3.5. Migrasjonsnivåer når stellatceller først ble preinkubert med TGFβ i ett døgn og så stimulert med ønsket cytokin i tre dager til.

Stellatceller ble først behandlet med TGFβ (4 ng/ml) og etter 24 timer ble de vasket med saltvann og stimulert med enten bare IL-1α (1 ng/ml) eller en kombinasjon av IL-1α (1 ng/ml) og TGFβ (2 ng/ml) i 3 dager til.

Deretter ble supernatantene høstet og brukt i migrasjonsforsøk på BxPC3 celler (200.000 celler/100μl/brønn).

Ustimulerte stellatceller ble brukt som kontroller. Bildene ble tatt ved start av migrasjonsforsøkene og etter 24

timer. Verdiene ble normalisert mot ustimulerte stellatceller som ble satt til 100%. Resultatene er vist som gjennomsnitt ± SEM av seks paralleller med TJS-supernatanter og tre paralleller med ATA-supernatanter.

*** indikerer signifikant forskjell fra PSC eller mellom merkede grupper (p<0,001).

3.7 Effekt av Smad7-nedregulering i stellatceller med høyt uttrykk av Smad7

Det er kjent at Smad7 er naturlig inhibitor av TGFβ-signalerings [46] og forskningsgruppen har resultater som tyder på at Smad7 kan være en av faktorene som påvirker nivåer av IL-1R1 (Figur 1.7, upublisererte data, Vegard Tjomsland). Derfor ønsket vi å nedregulere Smad7 i stellatceller med høyt uttrykk av Smad7 og observere hvordan det påvirker deres evne til å støtte kreftcellenes migrasjon.

3.7.1 Optimaliseringsforsøk

Det ble først gjort optimaliseringsforsøk for å finne ut hvilke mengde av Smad7-siRNA som gir best resultat uten at cellene blir skadet eller endret.

Forsøkene ble gjort i seks-brønners brett. ATA-cellene ble sådd ut og dyrket i serumholdig medium til ca 70% konfluens. De ble inkubert med transfeksjonsløsning i 24, 48 og 72 timer. Det ble testet ut tre konsentrasjoner av Smad7-siRNA: 20, 50 og 100 nM. Som kontroll ble det brukt 20 nM kontroll-siRNA. Effekten ble observert ved å måle Smad7 og IL-1R1 på RNA-nivå (gjort av medarbeidere i gruppen). Cellene ble observert under mikroskopet for å vurdere hvordan de tålte siRNA konsentrasjonen som ble brukt og eksponeringstid.

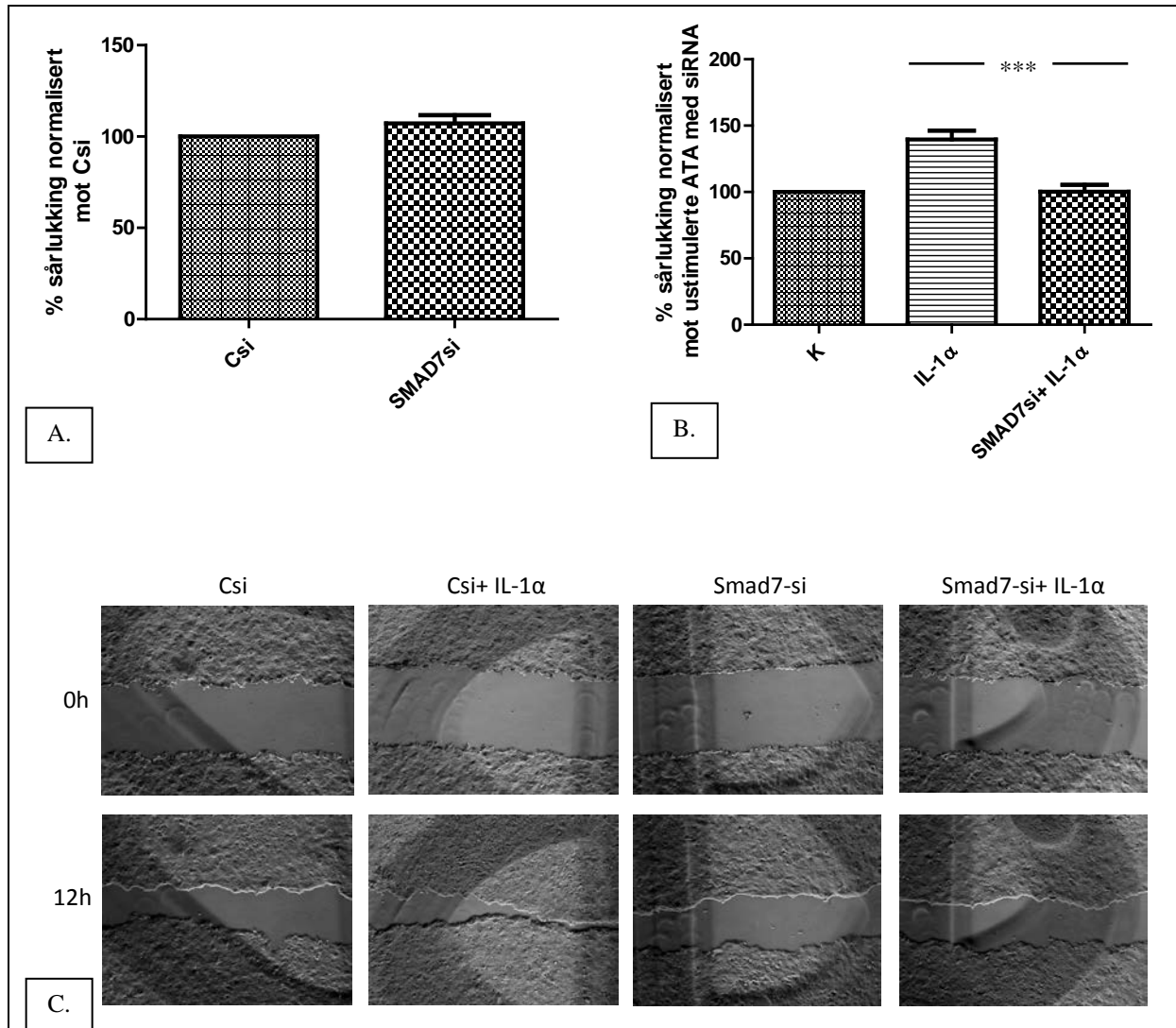
Vi konkluderte med at best effekt ble oppnådd med bruk av medium med 1 % serum, 100 nM Smad7-siRNA og med inkubasjonstid på 72 timer.

3.7.2 Effekter av Smad7-nedregulering i ATA-celler på BxPC3-migrasjon

Da ATA-cellene ble konfluente, ble de transfektert med enten 100 nM Smad7-siRNA eller 20 nM kontroll-siRNA i 72 timer. Etter det ble cellene vasket, medium byttet til serumfritt, inkubert i 48 timer, og så ble halvparten av brønnene tilsatt 1 ng/ml IL-1 α og inkubert i 72 timer til før supernatantene ble høstet. Kondisjonert medium laget på den måten ble videre brukt i skrape-analyser på BxPC3 cellene for å undersøke om nedregulering av Smad7 endrer IL-1R1 uttryket i ATA-celler og om dette videre påvirker ATA-cellenes evne til å stimulere migrasjon av kreftcellene.

Det ble gjort 2 uavhengige forsøk og supernatanter fra hvert forsøk ble brukt i minst to migrasjonsforsøk.

Figur 3.6.A viser at transfeksjon med Smad7-siRNA ikke endrer ATAs evne til å stimulere kreftcellenes migrasjon sammenlignet med kontroll-siRNA som er satt til 100 %. Figur 3.6.B viser at når Smad7 er nedregulert i ATA-cellene er cellene signifikant mindre effektive i nærvær av IL-1 α til å stimulere migrasjon av BxPC3-celler.



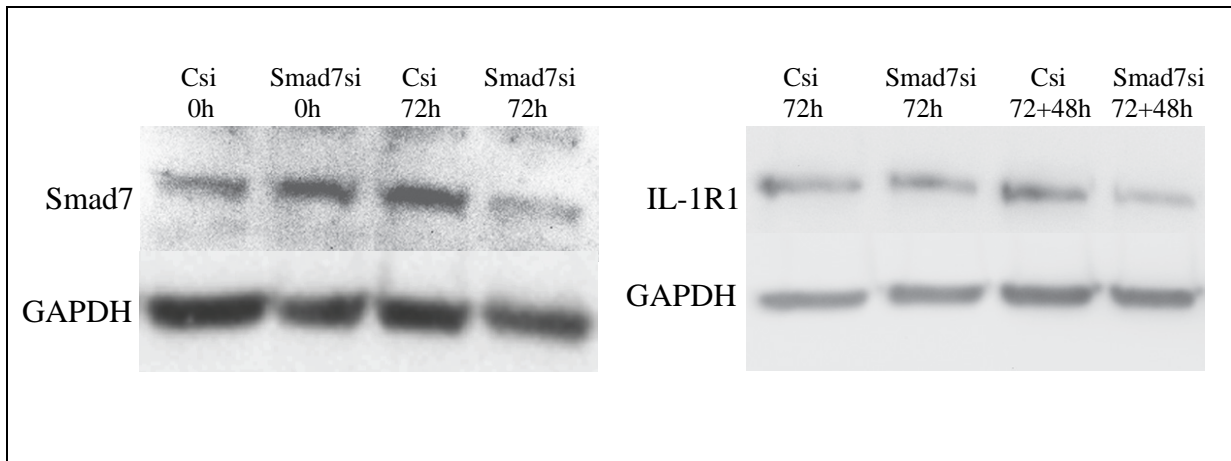
Figur 3.6. Effekter av Smad7 nedregulering på ATAs evne til å stimulere BxPC3-migrasjon i seg selv (A), og etter behandling med IL-1α (B).

ATA cellene ble dyrket i 6-brønners Brett til konfluens, vasket 2 ganger med saltvann og transfektert med 100 nM Smad7 siRNA/ 20 nM kontroll siRNA (Csi) i 72 timer. Deretter ble de vasket, tilsatt serumfritt medium og inkubert i 48 timer til. Da ble halvparten av brønnene tilsatt IL-1α (1 ng/ml) og inkubert i 72 timer til.

Supernatanter ble da høstet og brukt som kondisjonert medium for BxPC3-cellene i skrape-analyse (200.000 celler pr brønn). Bildene ble tatt ved start av forsøket og etter 12 timer. Det er vist bilder fra ett representativt forsøk (C). Resultatene i A og B er presentert som gjennomsnitt ± SEM av 8 paralleller. *** betyr at det er signifikant forskjell mellom merkede grupper (p<0,001).

For å undersøke om disse effektene skyldes IL-1R1-nedregulering som konsekvens av Smad7-nedregulering, ble det utført Western-blotting med prøver høstet etter 72 timers transfeksjon, og etter 48 timers serumfri inkubasjons periode etter transfeksjon. Figur 3.7 presenterer både Smad7- og IL-1R1-nivåer i ATA-cellene rett før og på visse tidspunkter etter

transfeksjonen. Smad7 ble nedregulert etter 72 timers transfeksjon med Smad7-siRNA sammenlignet med cellene som ble transfektert med kontroll-siRNA (Csi). IL-1R var omtrent på samme nivå etter 72 timers transfeksjon, men etter ytterligere 48 timer med bare serumfritt medium, dvs. på tidspunktet når cellene stimuleres med IL-1 α , var den på betydelig lavere nivå.



Figur 3.7. Western-blott, Smad7 og IL-1R1 etter transfeksjon med Smad7-siRNA og kontroll-siRNA (Csi).

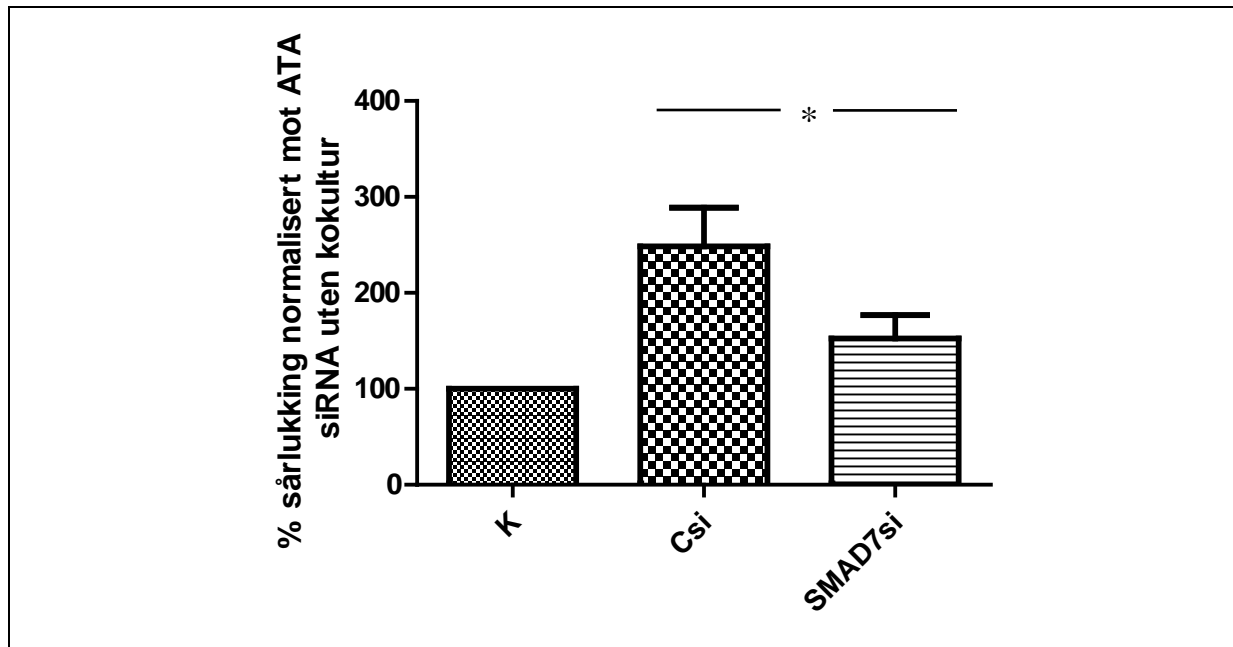
Cellene ble høstet til Western-analyse før transfeksjon, etter 72 timers transfeksjon med 100 nM Smad7-siRNA eller 20nM kontroll-siRNA (Csi) og i tilfelle av analysing av IL-1R1-nivåer også etter ytterligere 48 timer i serumfritt medium. GAPDH ble brukt som kontroll for proteinmengde i prøvene. Det ble gjort 3 forsøk som viser det samme.

3.7.3 Effekter av Smad7-nedregulering i ATA-cellene etter indirekte kokultur med BxPC3-cellene

ATA-cellene ble behandlet som i foregående forsøk, bortsett fra at stellatcellene ikke ble inkubert med IL-1 α , men stod i indirekte kokultur med BxPC3-celler i 12 timer. Når innleggene ble fjernet etter 12 timer, ble medium fra innleggene overført til tilsvarende brønn med ATA-cellene. Stellatcellene ble inkubert i ytterligere 60 timer etter at innleggene med BxPC3-cellene ble fjernet. Supernatantene ble høstet og brukt i skrape-forsøk på BxPC3-celler.

Figur 3.8 viser at kommunikasjonen mellom stellatcellene og kreftcellene var betydelig dårligere når Smad7 var nedregulert. Dette støtter forrige resultat som viste at nedregulering

av Smad7 førte til dårligere samspill mellom ATA- og BxPC3-cellene, noe som resulterte i mindre migrasjon av kreftceller.



Figur 3.8. Effekter av Smad7 nedregulering når manipulerede ATA-cellene er i kokultur med BxPC3-celler.

ATA-cellene ble sådd ut i 12-brønners brett, dyrket i serumholdig medium til konfluens, vasket to ganger med NaCl og transfektert i 72 timer med 100 nM Smad7 siRNA/ 20 nM kontroll siRNA i medium med 1 % FBS. Deretter ble de vasket to ganger med saltvann, medium byttet til serumfritt og inkubert i 48 timer til. BxPC3-cellerne ble sådd ut i brønninnlegget dagen før serumfritt periode for ATA ble ferdig (250.000 celler pr brønn) og inkubert over natt. Etter ATAs 48 timers serumfritt periode, ble BxPC3-cellerne vasket forsiktig med saltvann, innleggene plassert i brett med ATA-cellene og tilsatt 500 μ l serumfritt medium i hver innlegg. Deretter ble de inkubert i kokultur i 12 timer. Etter det ble innleggene fjernet, mens medium fra innleggene ble overført i tilsvarende brønner med ATA-cellene og videre inkubert i ytterligere 60 timer. Kondisjonert ATA-medium ble brukt som medium for BxPC3-cellerne i skrape-analyse (200.000 celler pr brønn) med 24 timers oppfølgingsintervall. Kontrollen er ATA uten kokultur. Resultater er normalisert mot manipulert ATA uten kokultur som er satt til 100 %, og presentert som gjennomsnitt \pm SEM av tre forsøk med to paralleller i hvert forsøk. * betyr at det er signifikant forskjell mellom merkede grupper ($p < 0,05$).

4 Diskusjon

4.1 Metodologiske aspekter

4.1.1 Skrape-analyse

Metoden er veletablert i laboratoriet, og den er enkel og billig i bruk. Allikevel forelå det ikke mye data angående bruk av BxPC3-celler i denne metoden. Vi fant i tilgjengelig litteratur at noen sår ut cellesuspensjon i medium med 10 % FBS som dråper på 100-150 μ l, lar dem feste seg og deretter tilsetter medium med liten prosent av FBS [61], mens andre sår ut celler og etter at de har festet seg, lager sår. Det er viktig med riktig celletetthet, og dette er avhengig av celletype og platetype som brukes, og må vurderes nøye [59]. Metoden er sensitiv for sted hvor det dannes sår, sårstørrelse og om det er noen cellerester igjen som ikke er vasket bort. Hvis man lager sår mot kanten av cellelaget migrerer cellene ikke i samme grad som hvis det lages sår i midten, noe som skyldes forskjellig celletetthet i forskjellige områder av cellelaget. Det finnes på markedet innlegg som kan plasseres i brønn før cellene sås ut slik at det dannes identiske sår i alle brønner, men disse systemene er kostbare i bruk.

Cellene ble først sådd ut i plater slik at en dråpe på 100 μ l med vist antall celler ble plassert i midten av hver brønn. Av praktiske årsaker ble cellene først inkubert over natt for å gjøre det enklere å lage sår akkurat i midten av cellelaget. Cellene tålte dette dårlig og begynte å løsne veldig fort og dette gjorde at det var umulig å gjennomføre 24-timers forsøk. Årsaken kan være at cellene ble for tette eller brukte opp all næring fra mediet. Derfor benyttet vi framgangsmåten som ble brukt i laboratoriet fra tidligere: cellene ble sådd ut og etter 2,5-3 timer når de har festet seg, ble det tilsatt serumfritt medium og inkubert over natt for å så lage sår dagen etter.

Å lage sår i midten av cellelaget var den største utfordringen siden det var vanskelig å visualisere nøyaktig hvor cellelaget ligger. Dette var trolig årsaken til de fleste variasjoner i resultatene siden sår plassert mot kanten av cellelaget der cellene ikke var tette nok forårsaket mindre migrasjon. I noen tilfeller beveget cellene seg motsatt vei slik at såret ble større. Forklaring kan være at BxPC3-cellebeveger seg til andre tomme rom enn selve såret når de ikke vokser tett nok. Dette er også årsaken til at vi måtte justere cellekonsentrasjon som ble

sådd ut i platene. Alt under 150.000 celler pr brønn var for lite og best erfaring hadde vi med 200.000 celler pr brønn. Det er også veldig viktig hvor det tas bilder med digitalt kamera siden det ligger til grunn for beregning av resultater og kan være årsak til variasjon i resultatene.

4.1.2 Transfeksjon

Generelle krav for vellykket transfeksjon er robust protokoll og enkel framgangsmåte uten uttrykte toksiske effekter. Det er mange faktorer som kan påvirke i hvilken grad uttrykket av ønsket gen nedreguleres i et slikt forsøk: transfeksjonseffektivitet, transkripsjonsnivå av ønsket gen og proteinstabilitet, samt effektiviteten av siRNA som benyttes. Tilstedeværelse av serum påvirker ikke effektivitet av transfeksjon med Lipofectamine[®] 2000 i betydelig grad [66], men vi undersøkte hvordan cellene oppfører seg uten serum og med 1 % serum. Siden cellene måtte stå i serumfritt medium i ytterligere fem dager etter transfeksjon, viste det seg at færre celler løsnet hvis transfeksjonen ble utført med 1 % serum i medium.

Transfeksjonseffektiviteten var den samme i begge grupper. Transfeksjon av primærceller kan være problematisk og kan ofte være lite effektivt [66]. Derfor brukte vi 72 timer og 100 nM Smad7-siRNA i transfeksjonen for å få best mulig nedregulering av Smad7 i ATA-stellatcellene. Cellene var i lik tilstand under disse betingelsene som ved kortere inkubasjonstider (24 og 48 timer) og lavere Smad7-siRNA-konsentrasjon (20nM og 50nM).

Etter transfeksjonen ble cellene vasket for at ikke siRNA skulle være til stede i supernatanter fra disse manipulerede cellene som skulle brukes i migrasjonsforsøk. Hvis ikke det var tilfelle, måtte vi planlegge mer kompliserte, kostbare og tidskrevende migrasjonsforsøk med flere kontroller for å undersøke om siRNA, OptiMEM eller Lipofectamine påvirker migrasjon, siden de ville vært til stede i ATA-supernatantene.

Etter 72 timers transfeksjon ble mediet byttet til serumfritt og cellene inkubert i 48 timer før stimulering med IL-1 α eller indirekte kokultur med BxPC3-celler. Denne tiden var nødvendig for å oppnå autokrin TGF β -effekt på IL-1R1 i ATA-celler. Denne prosessen krever tid fordi den er sammensatt og inkluderer genendringer. Når Smad7 er nedregulert på RNA-nivå, må først eksisterende proteinnivå degraderes og dette tar tid. Først da er den hemmende effekten av Smad7 på Smad-avhengig-TGF β -signaleringen borte og Smad-komplekset kan modifisere

genuttrykket av blannet annet IL-1R1. Da går det igjen mer tid før uttrykket av IL-1R1 på proteinnivå endres. For vårt forsøk var det viktig å ha nok tid til alle disse hendelsene siden målet var å nedregulere IL-1R1 ved Smad7-nedregulering. Det at IL-1R1 ikke var nedregulert på proteinnivå etter 72 timers transfeksjon, men først etter ytterligere 48 timer i serumfritt medium (Figur 3.8) bekrefter at det er en konsekvens av autokrin TGF β -signaleringen som har kommet i gang etter at Smad7 ble nedregulert og at tiden kan være avgjørende for dette steget.

Inkubasjonstid etter stimulering av modifiserte stellatceller var 72 timer i stedet for 96 timer som i andre forsøk hvor det ble laget stellatcellesupernatanter fordi det var for lenge å ha ATA-cellene i serumfritt medium i ytterligere 4 dager etter at de allerede var inkubert 48 timer i serumfritt medium. Tidligere forsøkt indikerte at cellene begynte å løsne fra brønnene etter 5 dagers inkubering i serumfritt medium og det var derfor stor sannsynlighet for at cellene ville begynne å dø hvis de ble inkubert i serumfritt medium mer enn 5 dager.

4.2 Direkte effekter av IL-1 α og TGF β på BxPC3-migrasjon

Stellatceller ble stimulerte med IL-1 α og TGF β , alene eller i kombinasjon, for å påvirke deres evne til å stimulere kreftcellenes migrasjon. Disse faktorene var til stedet i det kondisjonerte mediet som ble brukt på kreftcellene i skrape-analyse. Derfor måtte vi undersøke om disse faktorene i seg selv hadde direkte effekter på kreftcellenes migrasjon. Det viste seg at IL-1 α og TGF β ikke hadde direkte effekter på BxPC3-migrasjon (Figur 3.1). Ved å blokkere IL-1 α -signaleringen med IL-1RA ble ikke kreftcellenes evne til å migrere endret. Det viste at IL-1 α ikke hadde autokrin effekt på migrasjonen av BxPC3-celler. Ved å vise dette, utelukket vi også at migrasjonseffektene som kondisjonert medium hadde var et resultat av IL-1 α og/eller TGF β tilsatt for stellatcellenes behandling.

TGF β omtales i litteraturen som migrasjonsstimulerende faktor i pankreaskreft. TGF β stimulerer EMT i TGF β -responsive kreftcellelinjer (for eksempel Panc-1) som er assosiert med økt migrasjon og invasjon [67] og forskere mener at det er en hovedstimulator av EMT [47]. Det at BxPC3-cellene ikke migrerte mer en kontrollen når de ble behandlet med TGF β

kan skyldes Smad4/DPC4-mutasjon i BxPC3-cellene. Denne mutasjonen er til stede i 55 % av pankreassvulster [54].

4.3 Ulike stellatcellers evne til å stimulere migrasjon av BxPC3-celler

4.3.1 Effekt av ustimulerte stellatceller på BxPC3-migrasjon

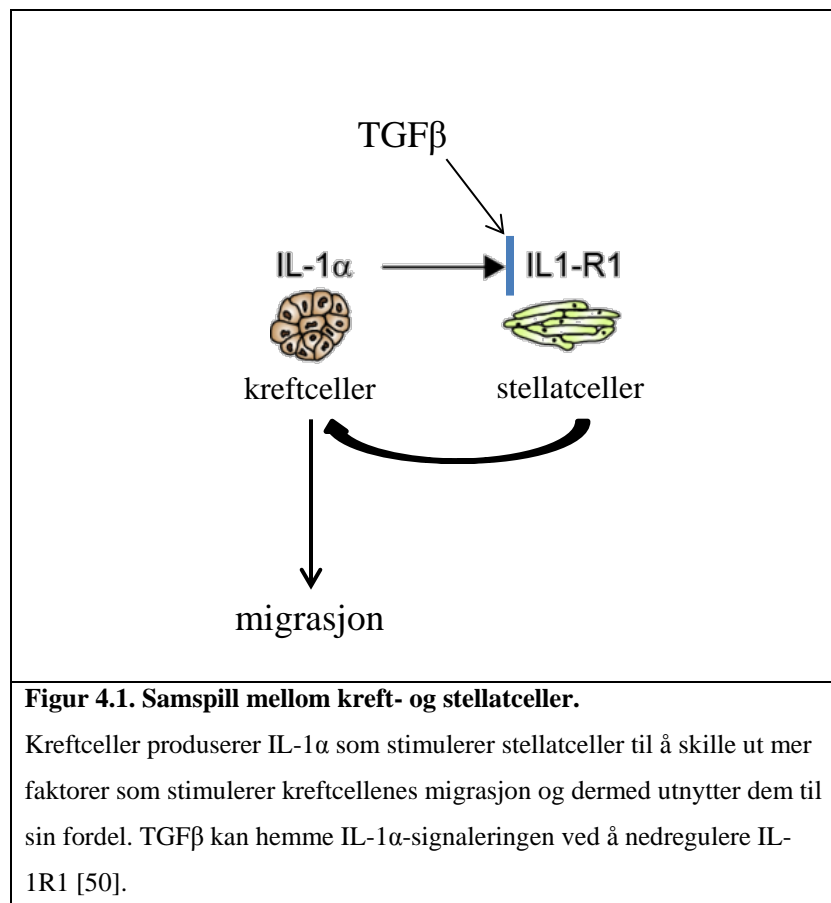
Stromal reaksjon kan utgjøre store deler av duktalt adenokarsinom i pankreas (noen ganger inntil 80 %) [35]. Aktiverte stellatceller kan representere opptil 70 % av tumormasse [36]. Derfor valgte vi å jobbe med stellatceller framfor andre celletyper som finnes i stroma.

Som vist i Figur 3.3 hadde ulike stellatcellelinjer forskjellig potensial til å stimulere BxPC3-celler til å migrere. Stellatcellene vi brukte er fra flere ulike pasienter og representerer trolig bare en liten del av svulstene. Svulster er heterogene og har ofte celler med ulike egenskaper i forskjellige deler av svulsten. Dette innebærer også immunceller som videre kan påvirke andre celler i mikromiljøet. Det er også mulig at den stromale reaksjonen ikke er like utviklet i alle deler av en svulst. Alt dette kan være mulige årsaker til hvorfor ulike stellatcellelinjer stimulerer migrasjon av kreftceller i forskjellig grad. Dette viser at stellatceller er langt fra homogen celletype.

4.3.2 Effekt av IL-1 α og TGF β -stimulering av stellatceller på BxPC3-migrasjon

IL-1 α spiller en viktig rolle i kommunikasjonen mellom kreftcellene og stromaet i pankreaskreft. IL-1 α produseres av kreftcellene og påvirker stellatcellene slik at de skiller ut større mengder av inflammatoriske faktorer. Blokkering av IL-1 α -mediert samspill mellom stellat- og kreftcellene reduserer vekst, metastasering og invasjon av pankreaskreft både *in vitro* og *in vivo* i mus modeller [44, 68]. TGF β er et cytokin som er til stede i tumor-mikromiljøet og kan være både tumorsuppressor og tumorpromotor [45]. Siden TGF β kan

virke hemmende på IL-1 α -mediert samspill mellom stellat- og kreftceller [50] ønsket vi å undersøke om behandling med TGF β kunne påvirke stellatcellenes evne til å stimulere migrasjon, samt effekter som IL-1 α hadde på stellatcellenes stimuleringspotensial med og uten TGF β til stede (Figur 4.1).



Indirekte effekter av IL-1 α på BxPC3-migrasjon

I Figur 3.4 ser vi at ulike stellatcellelinjer ikke var like effektive med hensyn på å stimulere migrasjon etter stimulering med IL-1 α . ATA-, KSB-, GLP- og AL-cellene ble sterkere stimulatorer av BxPC3-migrasjon etter behandling med IL-1 α , men det var ikke tilfelle med andre cellelinjer. KS2-cellene fikk dårligere evne til å stimulere kreftcellenes migrasjon etter IL-1 α -behandling. Forklaringen kan være at KS2-cellene produserer andre faktorer som stimulerer migrasjon enn andre stellatcellelinjer. De faktorene (ikke identifisert) virker trolig

så sterkt stimulerende at IL-1 α tilsetning ikke hadde noen effekt. Andre forklaring kan være at ved behandling med IL-1 α aktiveres eller hemmes noen signaleringsveier i KS2-cellene slik at de skiller ut mindre faktorer som støtter migrasjon. Det at noen cellelinjer ikke fikk bedre evne til å stimulere migrasjon etter behandling med IL-1 α kan også skyldes at de har så lite IL-1R1 at tilføring av IL-1 α ikke hadde effekt fordi alle reseptorene allerede er aktivert.

Indirekte effekter av TGF β på BxPC3-migrasjon

Ulike stellatcellelinjer stimulerer BxPC3-migrasjon i forskjellig grad. TGF β kunne redusere denne effekten i noen stellatcellelinjer (ATA og KS2), men ikke i andre. Dette kan kanskje skyldes forskjellige nivåer av TGF β -reseptorer (ikke undersøkt) eller at ulike ustimulerte stellatceller skiller ut forskjellige migrasjonsstimulerende faktorer og dermed aktiverer forskjellige signaleringsveier i BxPC3 cellene (løpende prosjekt i forskningsgruppen).

TGF β hemmet også IL-1 α -mediert effekt av ATA-, TJS- og KS2-cellene på BxPC3-migrasjon, men ikke i andre cellelinjer. Forskjeller i denne effekten kan skyldes IL-1R1 nivåer i stellatceller. Hvis det er lavt uttrykk av reseptoren i utgangspunktet har TGF β trolig ikke noe betydelig effekt på autokrin nedregulering av IL-1R1. Det kan også skyldes forskjellige nivåer av Smad7 som er naturlig inhibitor av TGF β -signaleringen [69] eller molekyler som regulerer Smad7. Lavt uttrykk av Smad7 i stellatcellene kan medføre økt autokrin TGF β -signalering og det resulterer i økt autokrin nedregulering av IL-1R1. I slike celler er IL-1R1 allerede nedregulert og derfor vil tilsatt TGF β ikke ha effekt på deres evne til å stimulere kreftcellenes migrasjon i nærvær av IL-1 α . KS2- og særlig ATA-cellelinje har høyt uttrykk av IL-1R1 (upublisererte data, Vegard Tjomsland) og det kan kanskje være årsaken til at TGF β i betydelig grad hemmet den IL-1 α -mediert stimulerende effekten av stellatceller på BxPC3-migrasjon.

Generelt sett kan forskjeller i TGF β -effekten også forklares med mulige mutasjoner i TGF β -signaleringen som kan være til stede eller at TGF β -signal går via Smad-uavhengig vei eller at forskjellige signalveier samarbeider. Dette kan føre til at ulike stellatcellelinjer svarer forskjellig på TGF β -behandlingen. Disse endringene i transduksjon av TGF β -signalet kan medføre at TGF β -signalet påvirker IL-1R1 i forskjellig grad, slik at reduksjon av migrasjonsstimulerende effekter som stellatcellene har på kreftcellene blir ulik. Andre

forklaring kan være at endringene i TGF β -signaleringen fører til at stellatcellene skiller ut migrasjonsstimulerende faktorer i forskjellig grad avhengig av hvilken vei signal går gjennom.

Resultatene kan tyde på at det er fordel å ha TGF β til stede i tumor-mikromiljøet. Dette taler delvis mot dagens litteratur. Gjennomgått litteratur viser at TGF β er en sterk tumorpromotor i sen fase av kreftutvikling ved å stimulere EMT og invasjon, samt metastasering i samarbeid med andre signaleringsveier [67, 70]. Det må ikke utelukkes mulige positive effekter som TGF β kan ha i en tumor, men da gjerne i tidlig fase [67]. Mutasjoner i TGF β -signaleringsveier fører til malignitet [45], men det kan være mulig å utnytte TGF β s hemmende effekt på «cross-talk» mellom kreft- og stellatceller i PDAC ved å manipulere på TGF β -signaleringen i stellatcellene slik at de ikke blir like mottakelige for signaler fra kreftcellene. Resultater peker på at TGF β har en hemmende effekt på PSCs evne til å stimulere migrasjon av kreftceller også uavhengig av IL-1 α stimulering.

4.4 Effekter av preinkubering av stellatceller med TGF β

I Figur 3.5 ser vi at preinkubering av stellatceller med 4 ng/ml TGF β hadde forskjellige effekter på IL-1 α -mediert kommunikasjon mellom kreft- og stellatceller. Dette kan videre resultere i både mindre og mer migrasjon av kreftceller sammenlignet med migrasjonseffekter av ustimulerte stellatcellene. Mer migrasjon kan skyldes at TGF β nedregulerer IL-1R1 og når den tas bort fra systemet økes uttrykket av IL-1R1 i ATA-cellene, mens i TJS-cellene holder reseptoren seg på lavt nivå og dermed fremstår som dårligere på å stimulere migrasjon etter IL-1 α behandlingen. Men vi undersøkte ikke videre disse effektene, men fortsatte med forsøk hvor vi manipulerte på TGF β signaleringen i stede for å tilsette eller fjerne selve TGF β fra systemet.

4.5 Effekter av Smad7-nedregulering i ATA-cellene

ATA-cellelinjen ble benyttet i dette forsøket fordi det var en av cellelinjene som stimulerte kreftcellenes migrasjon betydelig etter behandling med IL-1 α . Vi har samtidig vist at TGF β var med på å hemme IL-1 α -mediert kommunikasjonen mellom ATA-cellene og BxPC3-cellene (Figur 3.4). Det er vist på RNA-nivå at ATA cellene har høyt uttrykk av både Smad7 og IL-1R (upubliserte data, Vegard Tjomsland).

Smad7 spiller en viktig rolle i TGF β -signalering siden den hemmer aktivering av reseptor-regulert Smad2 og Smad3 (R-Smad), og Smad4 (co-Smad). Smad7 hemmer dannelsen av Smad-komplekset og effekter komplekset har i cellekjernen. Det resulterer i hemming av TGF β s effekter på transkripsjon via Smad-avhengig signalvei [46].

Ved å redusere Smad7-nivået, forventet vi også å få nedregulert IL-1R1, siden den Smad-avhengige TGF β -signalveien ikke lenger er hemmet. Som resultat av denne nedreguleringen forventet vi at IL-1 α hadde mindre effekt på stellatcellenes evne til å stimulere migrasjon av kreftceller.

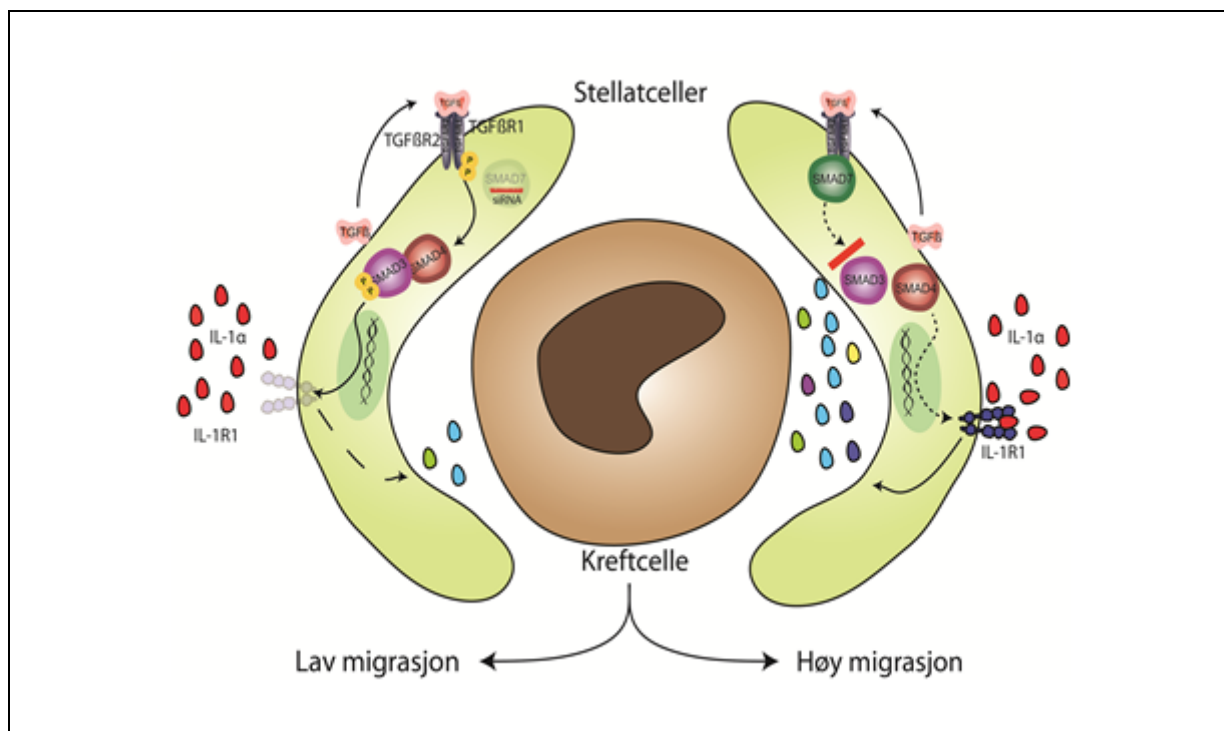
Derfor var det av interesse å manipulere Smad7-nivået i ATA-stellatcellene for å studere effekten dette har på cellenes evne til å stimulere kreftcellers migrasjon. På den måten kunne vi få mer kunnskap om Smad7 og i hvilken grad denne faktoren påvirker kommunikasjonen mellom kreft- og stellatceller i pankreas og om den kan da være et nytt mål for målrettet terapi.

Tidligere studie har vist at Smad7 er overuttrykt i pankreaskreftceller [71], mens i en nyere studie av pankreaskreft biopsier har *Kim et al.* vist at Smad7 har lavt eller ingen uttrykk i 80% av pasientene sammenlignet med normalt pankreasvev og at overlevelse var betydelig bedre blant pasienter med lavt uttrykk enn blant de med høyt uttrykk av Smad7 [72]. *Wang et al.* har funnet at lave nivåer av Smad7 i pankreaskreft er assosiert med lymfemetastaser og dårlig prognose [49]. Denne forskjellen mellom uttrykk i cellelinjer sammenlignet med vev kan skyldes endring av fenotype i vevskultursystemer. Vi har vist at nedregulering av Smad7 i stellatcellene (ATA) resulterte i mindre migrasjon av kreftceller fordi IL-1 α -mediert kommunikasjonen mellom disse cellene ble hemmet (Figur 3.6). Dette kan skyldes at autokrin TGF β -signaleringen er i gang igjen når Smad7s hemmende effekt tas bort ved bruk av siRNA og en av effektene er nedregulering av IL-1R1. Tilsatt IL-1 α påvirker da i mindre grad ATA-

cellene og derfor skiller de ut mindre migrasjonsstimulerende faktorer. Akkurat hvilke transkripsjonsfaktorer og hvilke andre mekanismer som er involvert i IL-1R1-nedregulering er uklart. Videre, om nedregulering er på gennivå, om eksisterende reseptorer degraderes eller om signaltransduksjon blokkeres når IL-1 α har bundet seg til reseptor, har vi ikke undersøkt.

Siden IL-1 α er en faktor som produseres av kreftceller i tumor-mikromiljøet har vi videre brukt indirekte kokultur med BxPC3-celler i stede for stimulering med IL-1 α . Figur 3.8 viser at når Smad7 er negulert responderte ATA-cellene dårligere på signaler fra kreftceller. En forklaring på dette kan være at det skyldes lavere nivåer av IL-1R1 i stellatcellene.

Disse to funnene tyder på at lavt Smad7 åpner for TGF β -mediert IL-1R- nedregulering og at dette fører til svakere samspill mellom stellat- og kreftceller og dermed mindre migrasjon og sannsynligvis mindre metastaser (Figur 4.2). Men i en svulst eksisterer cellene ikke isolert og samspillet i svulsten er derfor mye mer komplisert. Stroma inneholder flere komponenter enn bare stellatceller og kan variere betydelig avhengig av svulsttype og lokalisasjon. Dette indikerer at sammensetning av stroma er avhengig av komplekse interaksjoner mellom kreftceller, stromaceller og ECM [65]. Men, siden stellat celler utgjør store deler av tumorstromaet kan deres rolle i stroma-tumor interaksjoner anses som viktig.



Figur 4.2. Kreftcellers migrasjon i nærver av stellatceller med høyt vs. lavt uttrykk av Smad7.

I stellatceller med høyt uttrykk av Smad7 er Smad-avhengig autokrin TGFβ-signalerings hemmet og cellene responderer på IL-1α ved å skille ut store mengder av migrasjonsstimulerende faktorer. Dette resulterer i høy migrasjon av kreftcellene (til høyre i bilde). Etter Smad7-nedregulering ved bruk av Smad7-siRNA nedreguleres IL-1R1 som konsekvens av autokrin TGFβ-signalerings. Dette fører til at stellatcellene skiller ut mindre migrasjonsfaktorer og blir dårligere på å hjelpe kreftcellene til å migrere (til venstre i bilde).

4.6 KS2-cellelinje

KS2-cellene hadde større evne til å stimulere BxPC3-migrasjon enn alle andre cellelinjer (Figur 3.3). Stimulering med IL-1α førte ikke til at denne cellelinjen økte migrasjonen av kreftcellene, men TGFβ hemmet i betydelig grad KS2-effekter på cellemigrasjon både med og uten IL-1α stimulering (Figur 3.4). I tillegg hadde denne cellelinjen så sterk stimulerende effekt på kreftcellenes migrasjon at såret ble fullstendig lukket etter 24 timer, noe som førte til at oppfølgingstid for dette forsøket ble justert til 8 timer. Disse forskjellene denne cellelinjen viser sammenlignet med andre cellelinjer vi undersøkte kan skyldes at den skiller ut andre migrasjonsstimulerende faktorer som videre kan føre til aktivering av andre signaleringsveier i BxPC3-cellene. Dette er noe som forskningsgruppen skal undersøke videre.

5 Konklusjon

En av konklusjonene er at stellatceller fra ulike pankreastumorer er relativt ulike. De hadde forskjellig evne til å stimulere kreftcellenes migrasjon i seg selv og svarte ulikt på forskjellige faktorer. En cellelinje (KS2) var en ekstremt sterk migrasjonsstimulator i seg selv. Dette viser at stellatceller ikke kan betraktes som en uniform celletype hvor alle celler har like egenskaper.

En annen konklusjon er at Smad7 kan spille viktig rolle i IL-1 α -mediert kommunikasjonen mellom stellat- og kreftceller. Smad7-nedregulering resulterte i at stellatceller fikk mindre evne til å stimulere migrasjon av kreftceller etter behandling med IL-1 α og etter inkubering med faktorer kreftcellene produserte i nærvær av stellatceller. Dette skyldes at ved lavt Smad7-uttrykk i stellatcellene nedregulerer egenprodusert TGF β nivået av IL-1R1, noe som fører til at IL-1 α har mindre effekt på stellatcellene. Siden vi har vist at stellatceller med høyt uttrykk av Smad7 stimulerte kreftcellenes migrasjon i betydelig større grad i nærvær av IL-1 α og andre faktorer kreftceller produserte i indirekte kokultur med stellatceller enn stellatceller med lavt uttrykk av Smad7 gjør, kan det tyde på at Smad7-nivåer i stellatcellene har betydning for hvor mye kreftcellene kan migrere i pankreaskreft.

En ny strategi i behandlingen kan mulighens være å angripe/hemme Smad7 i stellatceller, da noen studier har vist at pasienter med lavt Smad7 i stellatceller har bedre prognose [72]. Men korrelasjonen mellom Smad7 og overlevelse, samt metastaser og prognose må undersøkes videre, i tillegg til at Smad7s rolle i samspill mellom kreft- og stellatceller må være bedre forstått.

6 Veien videre

Denne oppgaven er begynnelse på et prosjekt forskningsgruppen skal gå videre med. For å kunne si mer om Smad7s rolle og betydning er det ønskelig å utføre immunofarging av vevet for både Smad7 og IL-1R1, samt å studere korrelasjoner mellom *in vivo*- og *in vitro*-data for å undersøke om Smad7- og IL-1R1-nivåer i vevet muligens kan være prognostiske faktorer. Det er også ønskelig å undersøke signalveier som aktiveres i BxPC3-celler når de behandles med forskjellige kondisjonert media for å finne ut hvordan signaleringen er involvert i samspill mellom stellat- og kreftceller og identifisere mulige målmolekyler for framtidens behandling, i tillegg til å undersøke videre samspillet mellom BxPC3 og KS2-celler for å finne ut hvorfor KS2-cellene er så ekstremt sterk migrasjonsstimulator og dermed få bedre forståelse for hvilke signalveier det er viktig å blokkere for å unngå høyt nivå av migrering og dermed metastasering i pankreaskreft.

Litteraturliste

1. H.P.Rang, e.a., *Pharmacology*. , 2012. p. 673-676.
2. Katzung, B.G., *Basic&Clinical Pharmacology*. 9th ed., 2004, p.898-899.
3. David E. Golan, A.H.T.J., Ehrin J. Armstrong, Joshua M. Galanter, April Wang Armstrong, Ramy A. Arnaout, Harris S. Rose, *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. , 2005, p.498-499.
4. Loberg, E.M., J. Lomo, and J. Maehlen, [*Will the revolutionary knowledge of apoptosis play an important role in medicine?*]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2000. **120**(1): p. 57-61.
5. Vinay Kumar, A.K.A., Nelson Fausto, *Robins and Cortran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. 2005. p. 939-9352: Elsevier Inc.
6. Norsk Helseinformatikk AS., *Kreft i bukspyttkjertelen*. [cited 31.07.2014]; Available from: <http://nhi.no/sykdommer/kreft/magetarm-kreft/bukspyttkjertelkreft-2187.html>.
7. Kolodecik, T., et al., *Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 415.
8. Omary, M.B., et al., *The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 50-9.
9. Polistina, F., et al., *Neoadjuvant strategies for pancreatic cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(28): p. 9374-9383.
10. Li, D., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1049-57.
11. Tjomsland, V., et al., *Interleukin 1alpha sustains the expression of inflammatory factors in human pancreatic cancer microenvironment by targeting cancer-associated fibroblasts*. Neoplasia, 2011. **13**(8): p. 664-75.
12. Diener, M.K., et al., *Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(5): p. Cd006053.
13. Hamada, S., A. Masamune, and T. Shimosegawa, *Alteration of pancreatic cancer cell functions by tumor-stromal cell interaction*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 318.
14. Krefregisteret, *Nøkkeltall*. [31.07.2014.]; Available from: www.krefregisteret.no.
15. Soreide, K., H. Immervoll, and A. Molven, [*Precursors to pancreatic cancer*]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2006. **126**(7): p. 905-8.
16. Sohn, T.A., et al., *Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators*. J Gastrointest Surg, 2000. **4**(6): p. 567-79.
17. Vincent, A., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2011. **378**(9791): p. 607-20.
18. Ralph H. Hruban, M.G., Jennifer Parsons, et al., *Progression model for pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**: p. 2969-2972.
19. el-Kamar, F.G., M.L. Grossbard, and P.S. Kozuch, *Metastatic pancreatic cancer: emerging strategies in chemotherapy and palliative care*. Oncologist, 2003. **8**(1): p. 18-34.
20. Warshaw, A.L. and C. Fernandez-del Castillo, *Pancreatic carcinoma*. N Engl J Med, 1992. **326**(7): p. 455-65.
21. Pericleous, M., et al., *Nutrition and pancreatic cancer*. Anticancer Res, 2014. **34**(1): p. 9-21.
22. Michaud, D.S., *Epidemiology of pancreatic cancer*. Minerva Chir, 2004. **59**(2): p. 99-111.
23. Lowenfels, A.B. and P. Maisonneuve, *Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2006. **20**(2): p. 197-209.
24. Hart, A.R., H. Kennedy, and I. Harvey, *Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. **6**(3): p. 275-82.
25. Onoue, M., et al., *Surgical resection deteriorates gemcitabine-induced leukopenia in pancreatic cancer*. Int J Clin Oncol, 2004. **9**(3): p. 174-8.
26. Conroy, T., C. Gavaille, and A. Adenis, *Metastatic pancreatic cancer: old drugs, new paradigms*. Curr Opin Oncol, 2011. **23**(4): p. 390-5.
27. Sjoquist, K.M., et al., *Personalising pancreas cancer treatment: When tissue is the issue*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(24): p. 7849-7863.

28. Thota, R., J.M. Pauff, and J.D. Berlin, *Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review*. Oncology (Williston Park), 2014. **28**(1): p. 70-4.
29. Choi, M., S. Razzaque, and R. Kim, *Systemic therapy of advanced pancreatic cancer: has the landscape changed?* Clin Adv Hematol Oncol, 2012. **10**(7): p. 442-51.
30. Heinemann, V., et al., *Tumour-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma: rationale and current evidence for new therapeutic strategies*. Cancer Treat Rev, 2014. **40**(1): p. 118-28.
31. Norsk legemiddelhandbok., *Pankreascancer*. 2014: <http://legemiddelhandboka.no/>.
32. Franco, O.E., et al., *Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(1): p. 33-9.
33. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
34. Apte, M.V., et al., *Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells*. Pancreas, 2004. **29**(3): p. 179-87.
35. Erkan, M., et al., *The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **9**(8): p. 454-67.
36. Froeling, F.E., J.F. Marshall, and H.M. Kocher, *Pancreatic cancer organotypic cultures*. J Biotechnol, 2010. **148**(1): p. 16-23.
37. Vonlaufen, A., et al., *Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2008. **68**(7): p. 2085-93.
38. Hwang, R.F., et al., *Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression*. Cancer Res, 2008. **68**(3): p. 918-26.
39. Wilson, J.S., R.C. Pirola, and M.V. Apte, *Stars and stripes in pancreatic cancer: role of stellate cells and stroma in cancer progression*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 52.
40. Apte, M.V., et al., *Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture*. Gut, 1998. **43**(1): p. 128-33.
41. Xu, D., et al., *Cancer cell-derived IL-1alpha promotes HGF secretion by stromal cells and enhances metastatic potential in pancreatic cancer cells*. J Surg Oncol, 2010. **102**(5): p. 469-77.
42. Sawai, H., et al., *Interleukin-1alpha enhances the aggressive behavior of pancreatic cancer cells by regulating the alpha6beta1-integrin and urokinase plasminogen activator receptor expression*. BMC Cell Biol, 2006. **7**: p. 8.
43. Tjomsland, V., et al., *The desmoplastic stroma plays an essential role in the accumulation and modulation of infiltrated immune cells in pancreatic adenocarcinoma*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 212810.
44. Tjomsland, V., et al., *IL-1alpha expression in pancreatic ductal adenocarcinoma affects the tumor cell migration and is regulated by the p38MAPK signaling pathway*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70874.
45. Tian, M., J.R. Neil, and W.P. Schiemann, *Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer*. Cell Signal, 2011. **23**(6): p. 951-62.
46. Luo, L., et al., *SMAD7: a timer of tumor progression targeting TGF-beta signaling*. Tumour Biol, 2014.
47. Cano, C.E., Y. Motoo, and J.L. Iovanna, *Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 1947-57.
48. Stolfi, C., et al., *The dual role of Smad7 in the control of cancer growth and metastasis*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(12): p. 23774-90.
49. Wang, P., et al., *Low-level expression of Smad7 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with pancreatic cancer*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(4): p. 826-35.
50. Harvey, A.K., P.S. Hrubey, and S. Chandrasekhar, *Transforming growth factor-beta inhibition of interleukin-1 activity involves down-regulation of interleukin-1 receptors on chondrocytes*. Exp Cell Res, 1991. **195**(2): p. 376-85.
51. Deer, E.L., et al., *Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines*. Pancreas, 2010. **39**(4): p. 425-35.
52. Tan, M.H., et al., *Characterization of a new primary human pancreatic tumor line*. Cancer Invest, 1986. **4**(1): p. 15-23.

53. ATCC, *BxPC3* (ATCC[®] CRL-1687[™]). [cited 08.07.2014.]; Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1687.aspx?geo_country=no.
54. Tascilar, M., et al., *The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(12): p. 4115-21.
55. Dai, J.L., et al., *Transforming growth factor-beta responsiveness in DPC4/SMAD4-null cancer cells*. Mol Carcinog, 1999. **26**(1): p. 37-43.
56. Legendre, O., A. Sookdeo, and D.A. Foster, *BxPC3 pancreatic cancer cells express a truncated Smad4 protein upon PI3K and mTOR inhibition*. Oncol Lett, 2014. **7**(4): p. 1165-1168.
57. Hahn, S.A., et al., *DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1*. Science, 1996. **271**(5247): p. 350-3.
58. 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.
59. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.
60. Hulkower, K.I. and R.L. Herber, *Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery*. Pharmaceutics, 2011. **3**(1): p. 107-24.
61. Brusevold, I.J., et al., *Migration induced by epidermal and hepatocyte growth factors in oral squamous carcinoma cells in vitro: role of MEK/ERK, p38 and PI-3 kinase/Akt*. J Oral Pathol Med, 2012. **41**(7): p. 547-58.
62. Brusevold, I.J., et al., *Role of LPAR3, PKC and EGFR in LPA-induced cell migration in oral squamous carcinoma cells*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 432.
63. *ECL Western Blotting Detection Reagents, ECL Western Blotting Analysis System*. Amersham Pharmacia Biotech UK Limited 1999.
64. Mahadevan, D. and D.D. Von Hoff, *Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(4): p. 1186-97.
65. Chu, G.C., et al., *Stromal biology of pancreatic cancer*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 887-907.
66. Dalby, B., et al., *Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications*. Methods, 2004. **33**(2): p. 95-103.
67. Ellenrieder, V., et al., *Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation*. Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 4222-8.
68. Elaraj, D.M., et al., *The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1088-96.
69. Nakao, A., et al., *Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 631-5.
70. Neuzillet, C., et al., *Perspectives of TGF-beta inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas*. Oncotarget, 2014. **5**(1): p. 78-94.
71. Kleeff, J., et al., *The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer*. Oncogene, 1999. **18**(39): p. 5363-72.
72. Kim, Y.H., et al., *Prognostic significance of the expression of Smad4 and Smad7 in human gastric carcinomas*. Ann Oncol, 2004. **15**(4): p. 574-80.