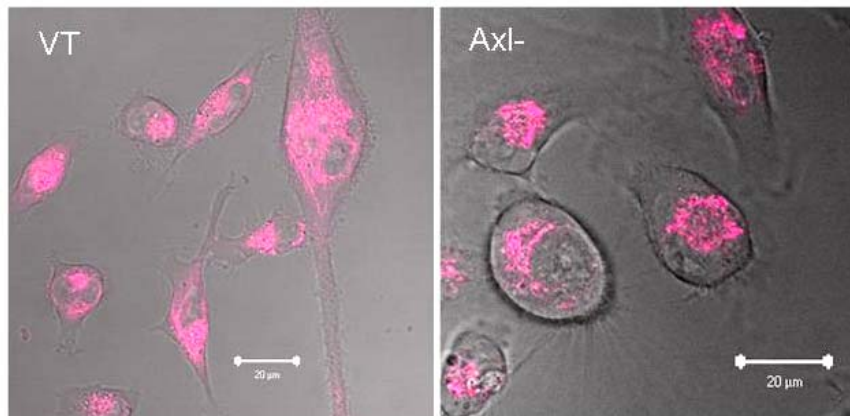


**Mulige interaksjoner mellom
tyrosin kinase reseptoren Axl, metabolisme og proliferasjon
i brystkreftceller (MDA-MB-231)**

av

Ingunn Bergslien

Masteroppgave i Farmasi



Senter for Farmasi
Institutt for Biomedisin
Medisinsk fakultet



Universitetet i Bergen
2009

Forord

Dette arbeidet ble utført ved Institutt for Biomedisin, Universitetet i Bergen, fra august 2008 til juni 2009.

Først av alt vil jeg rette en stor takk til veileder og første ammanuensis Karl Johan Tronstad som har holdt den røde tråden i arbeidet, og som har vært positiv og hjelpsom.

Likeså mye vil jeg takke biveileder Julie Nikolaisen som alltid har satt av tid til meg, og hjulpet meg. Jeg er veldig takknemlig, Julie.

En stor takk må også rettes til Ingrid Strand som har gjort livet lettere på lab'en. Alltid var det god hjelp å få og svar å finne.

”Mitokondrie-gruppa” hadde ikke vært det samme uten det sosiale, og det sosiale hadde ikke vært det samme uten Hanne R. Hagland og Linn H. Nilsson. Hanne har også fulgt godt opp gjennom hele prosessen.

Gisle Størseth Solhaug; hva hadde vel masteren vært uten deg? Kommer til å savne deg og ”farmasifamilien” mye!

Takk til Knut, mamma og pappa, familie og venner for god støtte og mange minnerike stunder gjennom studietiden.

Bergen, 19. mai 2009

Ingunn Bergslien

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Innholdsfortegnelse	II
Forkortelser	V
1 Introduksjon	1
1.1.2 Laktatsyre fermentering	2
1.1.3 Mitokondriene og deres energiomsetning	3
1.1.3.2. Sitronsyresyklus	4
1.1.3.3 Oksidativ fosforylering	4
1.2 Kreftcellenes unike energimetabolisme	5
1.2.1 Warburg effekten	6
1.2.2 Faktorer som potensielt bidrar til aerob glykolyse i kreft	6
1.2.2.1 GLUT-1 og HK II	6
1.2.2.2 ”Crabtree effekten”	7
1.2.2.3 Hypoksi induserbar faktor (HIF)	8
1.3 Signalveier som knytter sammen metabolisme og vekstregulering i kreftceller	9
1.3.1 Akt signalvei	9
1.3.2 AMP-aktivert protein kinase (AMPK)	9
1.4 Tyrosin kinase reseptoren Axl	10
1.4.1 Tyrosin kinase reseptorer (TKRer)	10
1.4.2 Oppdagelsen av Axl	11
1.4.3 Oppbygning og aktivering av Axl	11
1.4.4 Signalisering via Axl	12
1.4.5 Axl i tumor dannelse og metastase	13
1.4.6 Axl og Warburg, en potensiell link?	14
2 Mål	16
3 Materialer	17
3.1 Kjemikalier	17
3.2 Cellelinjer	19
3.3 Buffere og løsninger	19
3.3.1 Rutine kulturmedium	19
3.3.2 PBS løsning	20
3.3.3 Frysemedium	20
3.3.4 Trypan blå løsning	20
3.3.5 Buffere og løsninger for laktatmåling	20
3.3.6 Buffere og løsninger for lysering av celler	20
3.3.7 Buffere og løsninger for SDS-PAGE	21
3.3.8 Buffere og løsninger for proteinoverføring (blotting) og blokkering	21
3.4 Molekylære standarder for Western blotting	21
3.5 Antistoffer for Western blotting	22
3.6 Antistoffer for flow cytometriske analyser	22
3.7 Fluorescerende prøber for analyse av levende celler	23
3.8 Kommersielle analyser	23
3.9 Dataprogrammer	23
3.10 Forbruksmaterialer	23
3.11 Teknisk utstyr	24
4 Metoder	25
4.1 Dyrking og vedlikehold av cellelinjene	25

4.1.1	Cellelinjene	25
4.1.2	Trypsinering og splitting av cellene	25
4.1.3	Bestemmelse av celletall	25
4.1.4	Frysing og opptining av celler	26
4.2	Proliferasjonsmåling	26
4.2.1	MTT	27
4.2.2	BrdU	27
4.2.3	alamarBlue®	28
4.3	Kartlegging av energimetabolismen	28
4.3.1	Oksygrafi	28
4.3.2	Laktat målinger	29
4.4	Proteinuttrykk	29
4.4.1	SDS-PAGE og Western blotting	29
4.4.1.1	Lysering av celler, og måling av proteinkonsentrasjon	29
4.4.1.2	Reduksjons SDS polyakrylamid gel elektroforese ("Reducing SDS-PAGE")	30
4.4.1.3	Western Blotting	30
4.4.2	Flow cytometri	32
4.4.2.1	Immunomerking av Axl for flow cytometrisk analyse	33
4.4.2.2	Flow cytometrisk analyse av fikserte celler	33
4.5	Morfologi	34
4.5.1	Merking av celler med MitoTracker® Deep Red 633 for visualisering av mitokondriell morfologi.	34
4.6	Forsøksdesign	34
4.6.1	Initiale proliferasjonsforsøk	34
4.6.2	Utvidede dybdestudier med utvalgte betingelser	34
4.6.2.1	Proliferasjonsbestemmelse med metabolske modulatorer	34
4.6.2.2	Flerparameter undersøkelse av to metabolske modulatorer	35
5	Resultater	36
5.1	Cellemodellen	36
5.1.1	Karakterisering av cellemodellen med flow cytometri	36
5.1.2	Karakterisering av cellemodellen med Western Blotting	37
5.2	Mitokondriell morfologi i VT og Axl-	38
5.3	Karakterisering av energimetabolismen	39
5.3.1	Oksygrafi	39
5.3.2	Aerob glykolyse og laktat produksjon	41
5.4	Proliferasjon	41
5.4.1	Proliferasjonsmåling og celletetthet	42
5.4.1.1	Bestemmelse av optimal celletetthet	42
5.4.1.2	Sammenligning av metodene	44
5.4.2	Metabolsk manipulering og proliferasjonsbestemmelse	45
5.5	Multiparameter analyse av to metabolske modulatorer	47
5.5.1	Deteksjon av relativ mitokondriemengde	47
5.5.2	Flow cytometrisk analyse av Akt og AMPK uttrykking og fosforylering	48
5.5.2.1	Akt	49
5.5.2.2	AMPK	51
5.5.3	Laktat	56
6	Diskusjon	57
7	Konklusjoner	65
8	Fremtidige perspektiver	66
	Referanser	67

Appendiks 1	73
Flow cytometriske undersøkelser av mitokondrier og redoks-balanse	73
1.1 Metode	73
1.2 Resultater	75
1.2.1 Mitokondriemengde (måling av kardiolipin)	75
1.2.2 Membranpotensiale	75
1.2.3 Oksidativt stress	76
Appendiks 2	77
Appendiks 3	78

Forkortelser

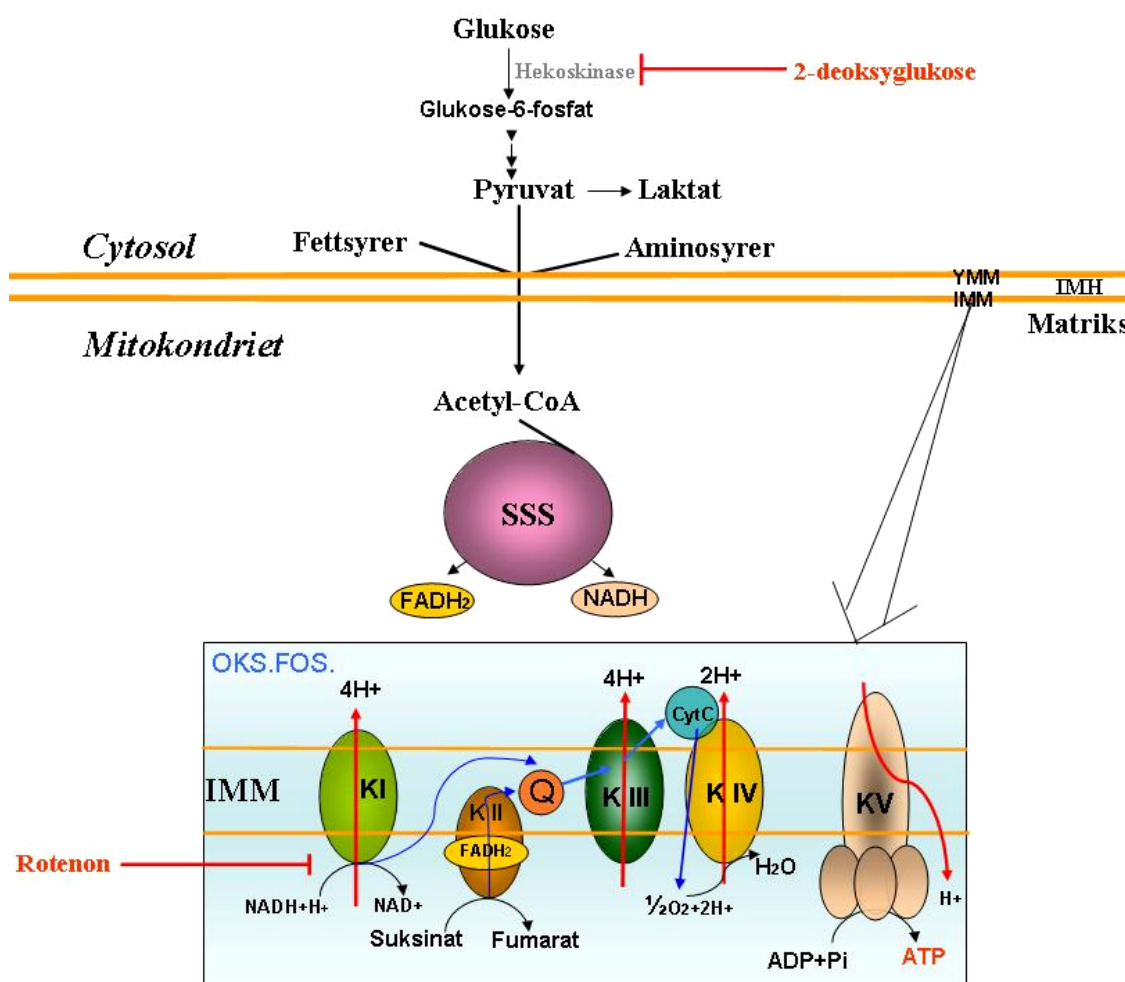
Forkortelse	Navn
2DG	2-deoksyglukose
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivert protein kinase
ATP	Adenosintrifosfat
Axl-	MDA-MB-231 Axl-
BrdU	5-bromo-2'-deoksyuridin
ddH ₂ O	Dobbeldestillert H ₂ O
Eng.	Engelsk
ERK/MAPK	Mitogen-aktivert protein kinase"
ETK	Elektrontransportkjeden
EtOH	Etanol
EVF	Epidermal vekst faktor
FNIII	Fibronektin type III
G6P	Glukose-6-fosfat
Gas6	"Growth arrest spesific gene 6"
GBD	Glykogen bindende domene
Gla	Gammakarboksylglutamatsyre
GLUT	Glukosetransportør
HIF	Hypoksi induserbar faktor
HK	Heksokinase
Ig	Immunoglobulin
IMH	Intermembrant hulrom
IMM	Indre mitokondriemembran
LDH	Laktat dehydrogenase
LG	Laminin G
MMP	Metalloproteinase
MP	Mikroplate
mtDNA	Mitokondrielt DNA
mTOR	"mammalian target of rapamycin"

MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrasolium bromid
Mw	Molekylvekt (gram/mol)
nDNA	Nukleært DNA
NFκB	”nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
Oks.fos.	Oksidativ fosforylering
PB	PBS-0,2 % BSA
PDH	Pyruvat dehydrogenase
PDK1	Fosfoinositid-avhengig kinase 1
PGC-1α	”Peroxisome proliferator-activated receptor γ, coactivator 1 α”
PI ₃ K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP3	Fosfatidylinositol 3,4,5 trifosfat
PLCγ	Fosfolipase Cγ
PPARγ	”Peroxisome proliferator-activated receptor γ”
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rictor	”rapamycin-insensitive companion of mTOR”
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
rRNA	Ribosomalt RNA
SSS	Sitronsyresyklus
TAM	<u>Ty</u> ro3, <u>A</u> x1, <u>M</u> er
TBST-MLK	TBST- 3 % melk
TK	Tyrosin kinase
TKR	Tyrosin kinase reseptor
tRNA	transfer RNA (overførings RNA)
TSC2	”tuberous sclerosis complex-2”
UCP	avkoblings proteiner
v	Volum (l)
VDAC	“Voltage dependent anion channel”
VGMC	Vaskulære glatte muskelceller
VT	MDA-MB-231 villtype
w	Vekt (g)
YMM	Ytre mitokondriemembran

1 Introduksjon

1.1 Energimetabolisme

Energimetabolisme er samlebetegnelse for alle de prosesser i en celle som krever energi (anabole) og som avgir energi (katabole). Cellene trenger energi for å kunne vokse og proliferere, og for å kunne signalisere og respondere på endringer i ekstra- og intracellulært miljø. De katabole prosessene består av nedbrytning av karbohydrater, fettsyrer og aminosyrer som illustrert i Figur 1.1. Nedbrytningen av glukose til karbondioksid og vann kan deles opp i flere delprosesser som hver bidrar i produksjon av ATP, som er den universelle energibæreren. I den følgende teksten oppsummeres hovedtrekkene av cellenes utnyttelse av glukose som energikilde.



Figur 1.1: Oversikt over nedbrytning av glukose for energiproduksjon

Nedbrytning av glukose til pyruvat består av ti enzymkatalyserte steg og gir et netto utbytte på 2 ATP. Prosessen foregår i cytosol. Ved aerobe forhold oksideres pyruvat videre i mitokondriene, mens under anaerobe forhold reduseres pyruvat til laktat. De kjemiske inhibitorene 2-deoksyglukose og rotenon som hemmer henholdsvis glykolyse og respirasjon er angitt, da disse er aktuelle i studien. (SSS= sitronsyresyklus, OKS.FOS= oksidativ fosforylering, K= kompleks, Q= coenzym Q, YMM= ytre mitokondriemembran, IMH= intermembrant hulrom (mellomrommet mellom membranene), IMM= indre mitokondriemembran, Cyt.C= cytokrom C)

Se påfølgende tekst for ytterligere detaljer.

1.1.1 Glykolyse

Animalske celler nytter glukose via tre hovedveier, hvorav den ene er oksidasjonen av glukose via glykolyse for å skaffe til veie energi i form av ATP. Alternativt blir glukose lagret som polysakkarid (glykogen) eller sukrose, eller oksidert via pentosefosfat veien.

Kartleggingen av glykolysen ble fullført i 1930 årene, og var den første metabolske veien beskrevet. Ett glukosemolekyl blir gjennom ti enzymkatalyserte steg omdannet til to molekyler av 3-karbon-komponenten pyruvat, som er endeprodukt i prosessen. Energi som frigjøres konserveres i form av ATP og NADH. Totalt forbrukes 2 molekyler ATP, mens det dannes 4 ATP molekyler og 2 NADH molekyler. Netto utbytte fra glykolysen blir dermed 2 ATP og 2 NADH. Omdanningen av glukose til pyruvat skjer i cytosol, og under glykolysen frigjøres bare en fraksjon av den totalt tilgjengelige energien i molekylet.

Totalreaksjon for glykolysen:



Heksokinasene (HK) katalyser omdanningen av glukose til glukose-6-fosfat (G6P) som er det første- og ett av de hastighetsbestemmende trinnene i glykolysen (Figur 1.1). HK hemmes av den kjemiske inhibitoren 2-deoksyglukose (2DG), som omdannes til den ikke-metaboliserbare komponenten 2-deoksyglukose-6-fosfat i det første steget av glykolysen, og behandling av celler med 2DG fører derfor til at ATP nivået synker (Sato et al.,1993)

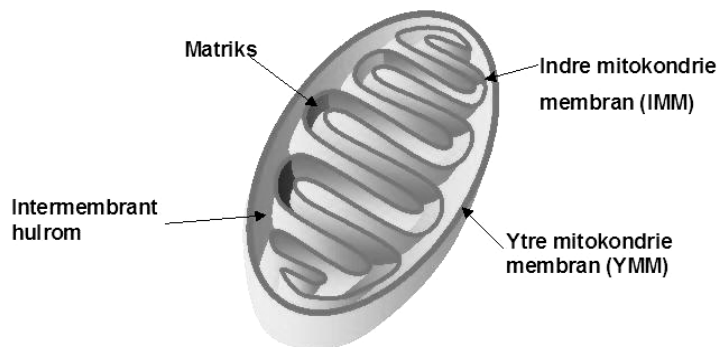
1.1.2 Laktatsyre fermentering

Fullstendig oksidasjon av glukose krever aerobe forhold. Under anaerobe forhold degraderes glukose via en fermenteringsprosess. NADH som dannes i glykolysen må regenereres til NAD^+ , fordi NAD^+ nyttes som elektronakseptor i sluttfasen av glykolysen. Hvis NAD^+ ikke regenereres vil glykolysen stoppe opp. Under aerobe forhold avgis elektroner fra NADH til O_2 ved mitokondriell respirasjon. Ved anaerobe forhold (for eksempel ved hypoksi) regenereres NAD^+ ved overføring av elektroner fra NADH til pyruvat, som resulterer i dannelsen av laktatsyre (Figur 1.1). Reaksjonen katalyseres av laktat dehydrogenase (LDH). ATP utbyttet fra glykolysen under anaerobe forhold er mye lavere enn ved fullstendig oksidering av glukose via mitokondriell respirasjon; henholdsvis 2 ATP per glukosemolekyl versus 30-32 ATP per glukosemolekyl. 15 ganger så mye glukose trengs dermed under anaerobe forhold for å gi det samme energiutbyttet som ved aerobe forhold.

1.1.3 Mitokondriene og deres energiomsetning

1.1.3.1 Mitokondrienes struktur og egenskaper

Mitokondrier er dobbeltmembran omsluttete organeller med dynamiske egenskaper (Figur 1.2). De kan danne filamentøse nettverk, strekke seg, trekke seg sammen, fusjonere og fragmentere (McBride et al., 2006). Strukturen og antall mitokondrier per celle varierer fra vev til vev, men størrelsesmessig er de generelt 1-2 μm lange og 0,5-1 μm brede.



Figur 1.2 Mitokondriets oppbygning

Den YMM omslutter organellen, mens den IMM består av mange innbuktninger kaldt cristae, som gir IMM en stor overflate. Organellen blir på grunn av dobbeltmembranen inndelt i to; hulrommet som ligger mellom IMM og YMM (intermembrant hulrom), og matriks som er omsluttet av IMM. Transport av molekyler og proteiner mellom disse to rommene, og mellom organellen og cytosol, er strengt regulert.

Mitokondriell funksjon er et vidt begrep som må defineres ut ifra cellenes kontekst. Generelt varierer funksjonen fra vev til vev avhengig av vevets metabolske krav. Mitokondriene spiller en avgjørende rolle i oksidativ metabolisme, samt i andre metabolske prosesser som glukoneogenese, urea syklus og regenerering av cytosolsk NAD^+ . I tillegg til de rent metabolske oppgavene spiller mitokondriene også en sentral rolle i apoptose, gen regulering, cellyklus kontroll, intracellulær kalsium homeostase og fosfat regulering (McBride et al., 2006).

Mitokondriene har eget DNA (mtDNA) som totalt sett utgjør under 1 % av totalt cellulært DNA, men genproduktene er essensielle for normal cellulær funksjon. Genomet er et sirkulært DNA molekyl, 16,6 kb stort, og koder for 13 proteiner i elektron transport kjeden (ETK), i tillegg til 2 rRNA og 22 tRNA nødvendige for translasjon av mitokondrielle gener (Singh og Costello, 2009).

1.1.3.2. Sitronsyresyklus

Før metabolittene (glukose, andre karbohydrater og fettsyrer) kan entre sitronsyresyklus (SSS) må karbonskjelettene brytes ned til acetyl-gruppen på acetyl-CoA. Pyruvat fra glykolysen fraktes fra cytosol og inn i mitokondriene, og reagerer der med coenzym A (CoA), som resulterer i dannelsen av acetyl-CoA (Figur 1.1). Reaksjonen kalles oksidativ dekarboksylering og er katalysert av pyruvat dehydrogenase (PDH) komplekset (Briere et al., 2006). Acetyl-CoA går deretter inn i SSS som består av åtte enzymkatalyserte steg. Energi som frigis konserveres i form av GTP og elektrondonorene NADH og FADH₂. For fullstendig oksidering av glukose, under aerobe forhold, donerer NADH og FADH₂ i neste steg elektroner til respirasjonskjeden (Figur 1.1).

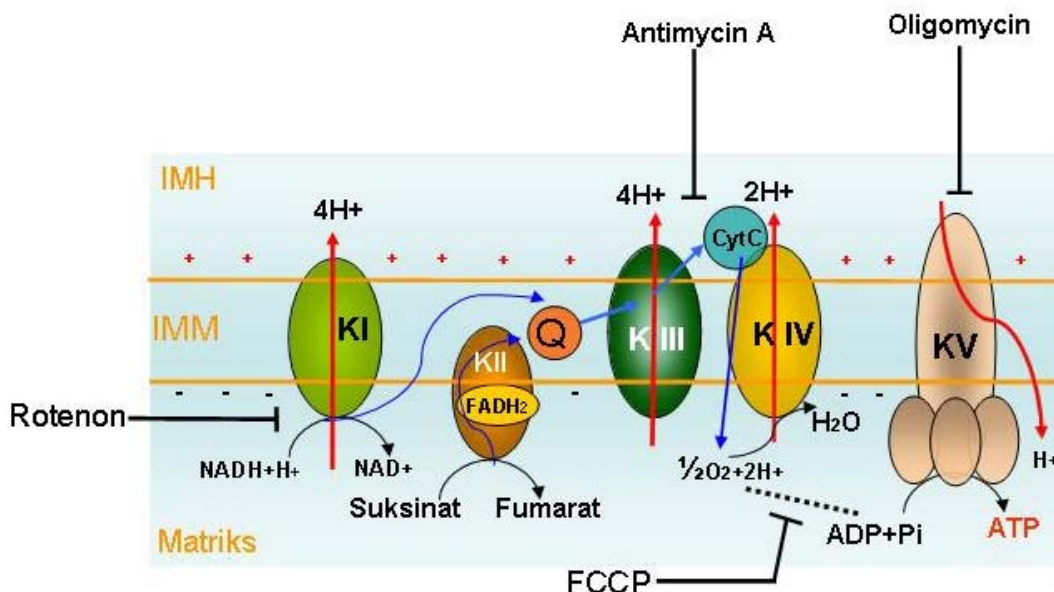
1.1.3.3 Oksidativ fosforylering

Alle oksidative steg i degraderingen av glukose, andre karbohydrater, fett og aminosyrer konvergerer i dette siste steget av cellulær respirasjon, hvor energi frigitt fra oksidasjonen driver syntese av ATP. Som illustrert i Figur 1.1 involverer prosessen reduksjon av O₂ til H₂O hvor elektroner doneres fra NADH og FADH₂ dannet i SSS og andre katabolske veier.

Oksidativ fosforylering, også omtalt som mitokondriell/cellulær respirasjon forgår i indre mitokondriemembran (IMM) og består av at elektroner strømmer via en serie membranbundne bærerproteiner kalt elektrontransport kjeden (ETK) (Figur 1.3).

Bærerproteinene omtales som proteinkompleks I-IV (Figur 1.3).

Energi frigitt fra elektronenes vandring gjennom proteinkompleksene er koblet til transport av protoner gjennom kompleks I, III og IV, og på denne måten konserveres den frie energien som et elektrokjemisk potensiale over IMM (Mitchell 1961). Den elektrokjemiske kraften som bygges opp kalles membranpotensial og driver en transmembran strøm av protoner ned deres konsentrasjonsgradient, hvor energi som frigjøres nyttes til fosforylering av ADP katalysert av ATP syntase (Kompleks V) (Nelson og Cox 2000).



Figur 1.3 Oksidativ fosforylering og inhibitorer av elektrontransport

Oksidativ fosforylering foregår i den IMM hvor en kjede av protein komplekser (omtalt som kompleks I-IV) deltar i transporten av elektroner avgitt fra NADH og suksinat. Transporten av elektroner er koblet til transport av protoner (H^+) over membranen som fører til at en elektrokjemisk gradient dannes (membranpotensiale). I kompleks V nyttes energien fra den elektrokjemiske gradienten til fosforylering av ADP. Ulike inhibitorer og deres virkested i ETK er angitt.

I enkelte typer vev, som i brunt fettvev, er cellene spesialiserte til å danne varme istedenfor ATP fra katabole prosesser. Fenomenet kalles "avkobling" og skyldes at energien i protongradienten ikke blir benyttet til ATP produksjon, men blir frigjort som varme. Når protoner lekker gjennom IMM brytes linken mellom membranpotensial og ATP syntese, og energien frigjøres som varme. Avkobling av mitokondriene er en naturlig forekommende prosess som involverer en familie av proteiner kaldt "avkoblingsproteiner" (uncoupling protein, UCP) (Jezek et al., 1998).

1.2 Kreftcellenes unike energimetabolisme

Cellene i kroppen er under kontinuerlig kontroll med hensyn på vekst og proliferasjon. De kontrollerende mekanismene består av utallige signalnettverk som formidler budskap om liv eller død, vekst, proliferasjon, hvile eller aldring. Kreftceller derimot, har en unik evne til å overse vekstrestriksjoner, unngå aktivering av immunsystemet og ignorere dødssignaler (Hanahan og Weinberg, 2000). På denne måten har de et tilnærmet grenseløst replikasjonspotensial som resulterer i dannelsen av tumorer bestående av til dels udifferensierte celler. Utviklingen av maligne celler (neoplasmer) er ikke en ett-steps-prosess,

men krever koordinerte endringer i ulike signalveier. Slike endringer kan skyldes mutasjoner i tumorsupressor gener eller onkogener (Hanahan og Weinberg, 2000).

Tumorcellene opplever store variasjoner i deres nærmiljø som gir dem metabolske utfordringer. Deler av en hurtigvoksende tumor vil oppleve perioder med dårlig blodtilførsel, som resulterer i dårlig næringstilgang og hypoksi, samtidig som avfallsstoffer hoper seg opp, mens andre deler av tumoren kan ha rikelig kontakt med sirkulasjonen. Evnen til å takle metabolsk stress blir derfor avgjørende for kreftcellenes overlevelse og proliferasjon.

Kreftcellenes unike egenskaper, som overkjører vanlige cellers ”oppførsel”, har fanget forskernes interesse gjennom flere tiår. I dette komplekse bildet vil man gjerne lete etter, og prøve å finne fellesnevner som kan angripes terapeutisk.

1.2.1 Warburg effekten

I normale celler er balansen mellom glykolyse og mitokondriell respirasjon finregulert.

Hurtigvoksende og udifferensierte tumorceller viser derimot generelt høyere glykolyserate sammenlignet med friske celler, selv under tilstrekkelig O₂ tilgang, som resulterer i høy laktat produksjon (Warburg, 1956). Denne observasjonen av det som ofte blir omtalt som aerob glykolyse ble første gang ble beskrevet av Otto Warburg i 1924, og tyder på at kontrollmekanismen som regulerer balansen mellom glykolyse og mitokondriell respirasjon er forstyrret i kreftceller. Fenomenet har derav fått navnet Warburg effekten.

Det karakteristiske økte glukoseopptaket i kreftceller blir i dag utnyttet i kreft diagnostikk ved hjelp av positronemisjonstomografi (PET-scanning) med bruk av ¹⁸F-2-deoksyglukose som radiomarkør (Keloff et al., 2005).

Warburg selv hevdet at den drivende kraften bak økt glykolyse i tumorceller skyldtes en irreversibel skade av den mitokondrielle funksjonen; hvis kreftcellene ikke kompenserte med å øke den glykolytiske fluksen ville energibehovet ikke bli dekket (Warburg, 1956).

Medvirkende faktorer til et slik metabolsk skifte, sett i ulike typer tumorer, er i dag et aktuelt tema innen forskning og utgjør et potensielt terapeutisk angrepspunkt.

1.2.2 Faktorer som potensielt bidrar til aerob glykolyse i kreft

1.2.2.1 GLUT-1 og HK II

I tumorer har man observert at glukoseopptaket i cellene er forhøyet blant annet på grunn av oppregulering glukosetransportør 1 (GLUT-1). GLUT-1 er en høyaffinitets-transportør, som tilhører familien av Na⁺-uavhengige glukose transportører (GLUT), som fremmer passiv diffusjon av glukose over plasmamembranen (Thorens, 1996). Tilnærmet alle vev i kroppen

uttrykker GLUT-1, og uttrykkningen induseres ved onkogen transformasjon av celler (Uldry og Thorens 2004).

En annen faktor som kan knyttes til økt glykolytisk aktivitet er HK II. Det finnes fire isoformer av HK i mammalske celler (Katzen og Schimke, 1965), hvorav HK II er den dominerte isoformen i kreftceller, og den er ofte overuttrykket (Pedersen et al., 2002). HKII har evne til å binde til den spenningsavhengige anion kanalen (VDAC) som sitter i YMM. ATP som genereres under oksidativ fosforylering forlater mitokondriene via denne kanalen og gir HKII rikelig tilgang til ATP som kinasen nytter til fosforylering av glukose (Pedersen et al., 2002). Binding av HKII til VDAC beskytter i tillegg mot apoptose (Pastorino et al., 2003)

I tillegg til faktorene som er nevnt over har man sett transkripsjonell oppregulering av andre transportører og enzymer som deltar i opptaket og nedbrytningen av glukose. LDH aktiviteten er målt 3,7-7 ganger høyere i humane brysttumorer sammenlignet med normalt vev (Balinsky et al., 1984).

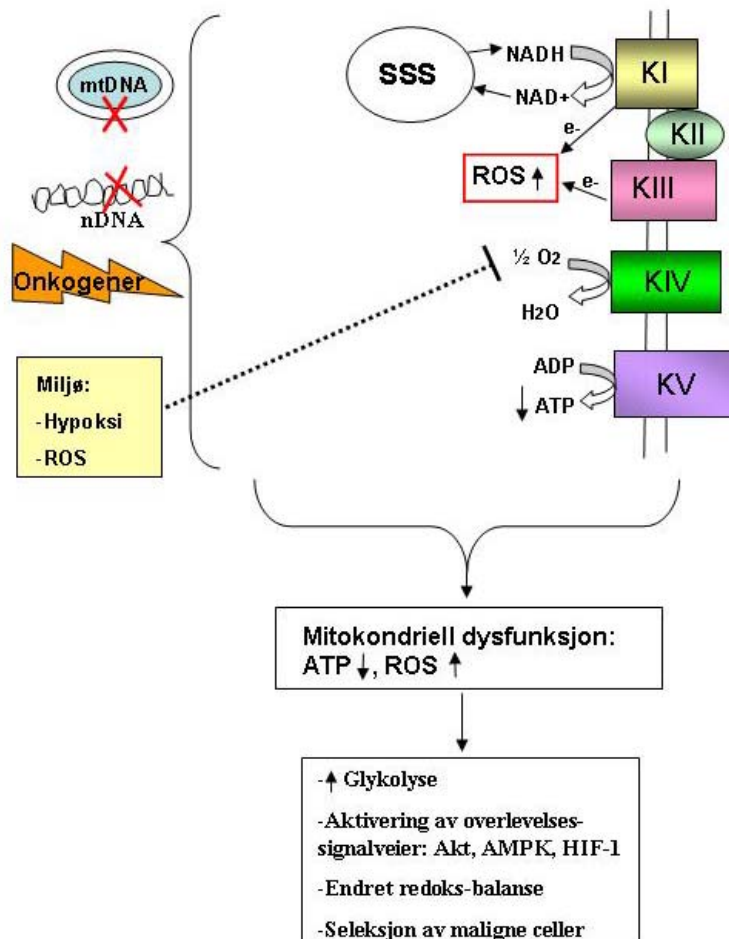
1.2.2.2 "Crabtree effekten"

Ved å øke glukosetilgangen for hurtigvoksende tumorer inhiberes den mitokondrielle respirasjonen delvis (Sussman et al., 1980). Fenomenet er veldokumentert og har fått navnet "Crabtree effekten". Ved hemmet mitokondriell respirasjon må kreftcellene kompensere for energitapet ved å øke glykolyseraten, som blant annet fører til at pH i cytosol reduseres på grunn av økt laktat produksjon (Hagland et al., 2007). pH reduksjonen kan innvirke på pH sensitive oksidase enzymer, som 2-oksoglutarat dehydrogenase komplekset og cytokrom *bc₁* komplekset, som igjen virker negativt inn på den mitokondrielle respirasjonen (Sussman et al., 1980). På denne måten oppstår det en "ond sirkel" som fører til at den mitokondrielle funksjonen reduseres.

mtDNAet er sårbart for oksidativ ødeleggelse og mutasjoner, og dette skyldes trolig den nærliggende produksjonen av reaktive oksygeforbindelser (ROS) (Grossman and Shoubridge, 1996). Inntil 2 % av den totale O₂ mengden som forbrukes i oksidativ fosforylering gjennomgår en ett-elektrons reduksjon og danner superoksid i normalt respirerende celler, men nivået kan være langt høyere i kreftceller (Turrens et al., 1997). Dette gjør og at kreftceller er utsatt for en høyere mutasjonsrate sammenlignet med normale celler. Ulike faktorer som virker inn på den mitokondrielle funksjonen i tumorer er illustrert i Figur 1.4.

1.2.2.3 Hypoksi induserbar faktor (HIF)

HIF-1 α er en transkripsjonsfaktor som brytes ned i nærvær av O₂ ved hjelp av ubiquitinligasen Von Hippel Lindau (VHL) proteinet. Ved hypoksi stabiliseres HIF-1 α , som translokterer til nukleus, binder HIF-1 β og induserer uttrykkningen av gener som øker angiogenese og glykolyse (Figur 1.4) (Selak et al., 2005, Pugh og Ratcliffe, 2003). Økning av HIF-1 α er påvist i aggressive tumorer og årsaken skyldes blant annet at VHL proteinet er mutert (Moreno-Sanchez et al., 2007). Metastatiske tumorcellelinjer som MDA (brystkreft) viser høye nivåer av HIF-1 α , overuttrykking av glykolytiske enzymer og høy glykolytisk rate uavhengig av O₂ nivå, mens ikke-metastatiske brysttumor cellelinjer (MCF-7) viser oppregulering av de ulike faktorene kun ved hypoksi (Robey et al., 2005).



Modifisert fra Chen et al., 2007

Figur 1.4 Faktorer som bidrar til økt mitokondrielt stress, mitokondriell dysfunksjon og aerob glykolyse. Figuren viser hvordan ulike tumorfremmende faktorer kan innvirke med viktige elementer i mitokondriell funksjon. Se tekst for detaljer.

1.3 Signalveier som knytter sammen metabolisme og vekstregulering i kreftceller

1.3.1 Akt signalvei

Serin/threonin kinasen Akt tilhører den cAMP avhengige-, cGMP avhengige protein kinase C familien (Stambolic og Woodgett, 2006). Akt aktiveres av vekstfaktorstimulerte tyrosin kinase reseptorer, og Akt mediert signalisering spiller en fundamental rolle for celleproliferasjon, vekst og overlevelse (Datta et al., 1999). Tumor utvikling og progresjon skyldes at balansen mellom celleproliferasjon og overlevelse (apoptose) forskyves. Akt signalvei er en av de hyppigst dysregulerte signalveiene i tumorer (Nicholson og Anderson, 2002) og den unormale Akt aktiviteten fører til ukontrollert celleproliferasjon, endret energimetabolisme og økt resistens mot apoptose (Figur 1.5) (Kim et al. 2001, Bijur og Jope 2003, Majewski et al., 2004, Plas og Thompson, 2005).

For aktivering rekrutteres Akt til plasmamembranen og binder fosfatidylinositol 3,4,5 trifosfat (PIP3). PIP3 dannes ved aktivering av fosfatidylinositol3-kinase (PI3K), som igjen aktiveres av vekstfaktorstimulerte reseptorer eller Ras (Sarbasov et al., 2005). Aktivering av de ulike faktorene i signalveien foregår via en fosforyleringskaskade hvor fullstendig aktivering av Akt krever fosforylering av to seter. Fosfoinositid-avhengig kinase 1 (PDK1) fosforylerer threonin 308, mens "mammalian target of rapamycin" (mTOR) i kompleks med rictor 2 fosforylerer serin 473 (Sarbasov et al., 2005).

Den økte glykolytiske raten i tumorer kan delvis forklares på grunn av den unormalt høye Akt aktiviteten (Elstrom et al., 2004). Akt trigger transkripsjonen av GLUT-1 og stimulerer faktorens translokasjon til plasmamembranen som fører til at glukoseopptaket øker, samtidig som internalisering av transportøren hemmes (Wieman et al., 2007). I tillegg regulerer Akt bindingen av HK II til VDAC (Pastorino et al., 2005).

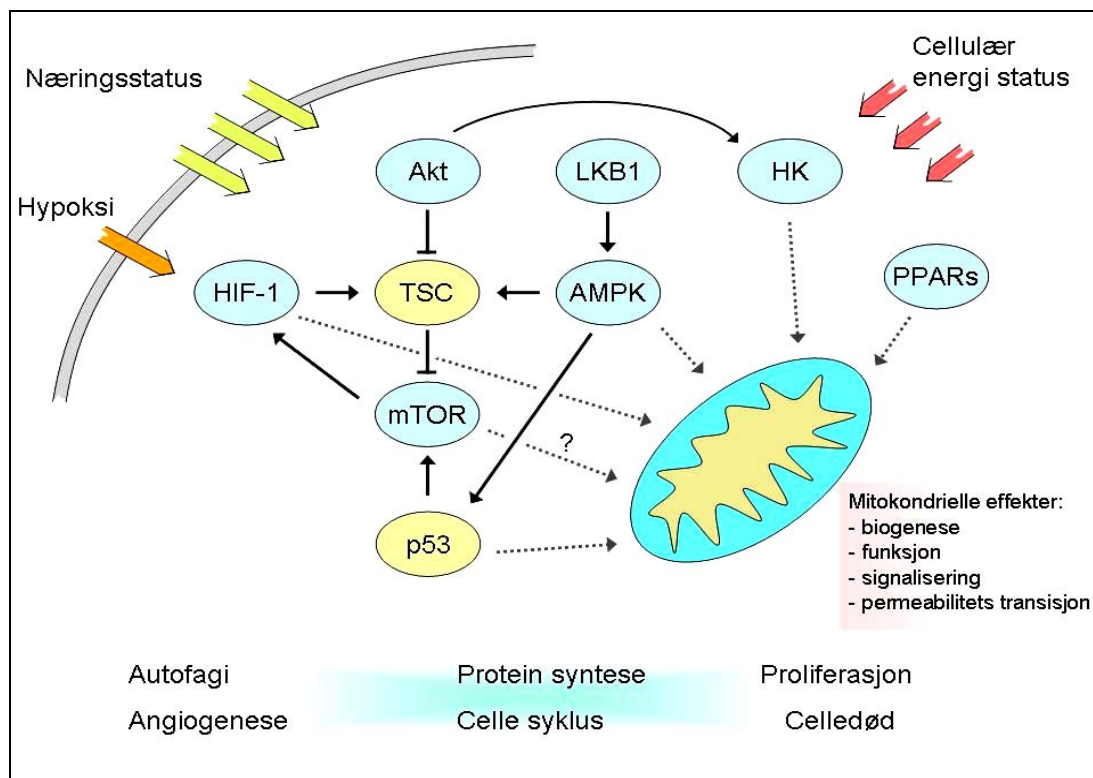
1.3.2 AMP-aktivert protein kinase (AMPK)

AMPK er en serin/threonin proteinkinase som fungerer som en energisensor i cellene. Lav energistatus og cellulært stress som øker AMP:ATP ratioen aktiverer kinasen. Ved lavt ATP nivå, som ved hypoksi og dårlig næringstilgang, fosforyleres en rekke substrater av AMPK som fører til at energi krevende (anabole) prosesser hemmes og energigivende (katabole) prosesser aktiveres (Towler og Hardie, 2007). AMPK aktivering fører også til stimulering av mitokondriell biogenese mediert via PGC-1 α (Canto et al., 2009) (Figur 1.5).

AMPK signalsystemet kan sees på som en motpart til Akt signalvei fordi AMPK inhiberer aktivering av mTOR (Figur 1.5) (Inoki et al., 2003). Dette fører AMPK direkte inn i rekken av proteiner som kan knyttes til kreft, blant annet fordi mTOR er oppregulert i en rekke

tumorer (Schmelzle og Hall, 2000). Figur 1.5 oppsummerer AMPK sin rolle i tilknytning til kreft.

AMPK komplekset består av de tre subenhetene α , β og γ , hvorav α subenheten har katalytisk aktivitet. Ved økt AMP:ATP ratio binder AMP til et regulatorisk sete på γ subenheten, og AMP binding favoriserer fosforylering av en spesifikk threonin enhet på α subenheten (threonin 172) utført av tumor suppressoren LKB1 kinase (Figur 1.5) (Hawley et al.,1996).



Modifisert fra Hagland et al., 2007

Figur 1.5 AMPK og Akt sine mulige roller i kreft er knyttet til energimetabolisme, overlevelse og proliferasjon i tumorceller.

Figuren skisserer noen av de mest sentrale mekanismene som interagerer som respons på energistatus og vekstregulering.

1.4 Tyrosin kinase reseptoren Axl

1.4.1 Tyrosin kinase reseptorer (TKRer)

Tyrosinkinase reseptor (TKR) familien tilhører gruppen membrankryssende reseptorer, og karakteriseres av et cytoplasmisk domene med tyrosinkinase aktivitet (Hunter 1998).

TKR'ene er essensielle i signalomformingskaskader som medierer inter- og intracellulær kommunikasjon, og de kontrollerer fundamentale cellulære prosesser som cellykluskontroll, metabolisme, celle migrering, overlevelse, proliferasjon og differensiering (Schlessinger 2000). Reseptorfamilien inkluderer en rekke vekstfaktoraktiverte reseptorer, og sees derfor

ofte i sammenheng med initiering eller progresjon av kreft, enten på grunn av mutasjoner som gir økt aktivitet (funksjon) eller reseptor/ligand overuttrykking (Hunter et al., 1998).

1.4.2 Oppdagelsen av Axl

Axl ble oppdaget i 1988 som et uidentifisert gen med transformerende egenskaper i to pasienter med kronisk myelogen leukemi (Liu et al., 1988). I 1991 ble genet klonet og identifisert som en RTK av to uavhengige grupper som kalte reseptoren henholdsvis Axl (O'Bryan et al., 1991) og UFO (Janssen et al., 1991). På samme tid ble Axl identifisert av ytterligere en gruppe som kalte genet for "adhesjons-relatert kinase" (Ark) (Rescigno et al., 1991). Reseptoren omtales heretter som Axl.

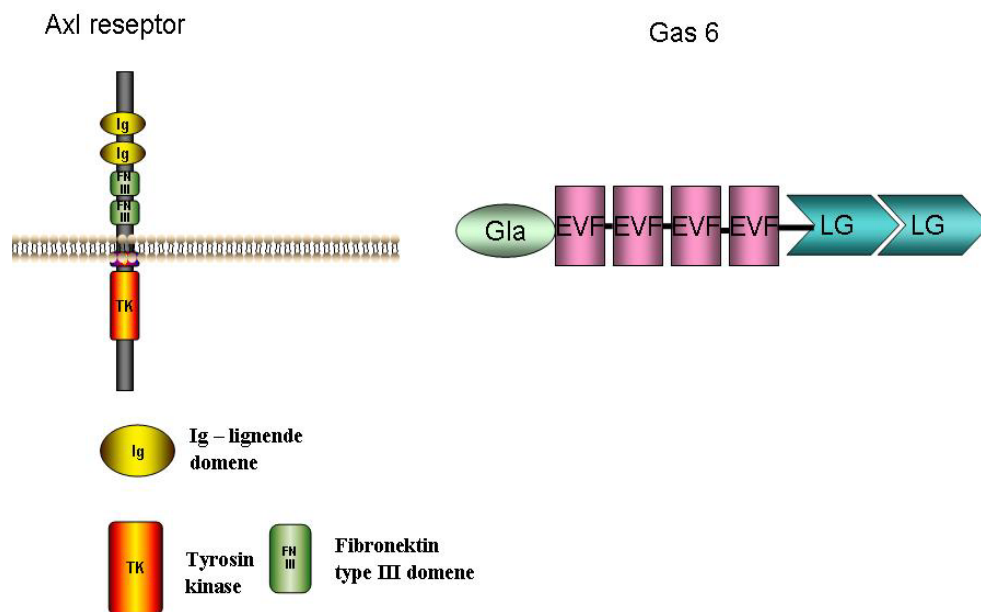
Normalt uttrykkes Axl i de fleste organer og celletyper i kroppen, mens overuttrykking av reseptoren er identifisert ulike humane tumorer som livmor-, gastrisk-, prostata-, colon-, melanoma-, tyreoid-, lunge-, og brystcancer (Oppsummert i Linger et al., 2008). I den humane brystkreft cellelinjen MDA-MB-231 er uttrykkningen av Axl rapportert 12 ganger høyere enn i normale brystceller (Meric et al., 2002).

1.4.3 Oppbygning og aktivering av Axl

Axl tilhører subfamilien av RTK'er som kalles TAM. TAM familien består av de tre reseptorene Sky(Tyro3), Axl og Mer, hvor navnet kommer av forbokstavene til de tre reseptorene i familien. Axl er den av reseptorene som hittil er hyppigst assosiert med kreft. I tillegg til å være et gen med transformerende egenskaper, er Axl normalt involvert i immunitet, blodplate funksjon og spermatogenese (Oppsummert i Linger et al., 2008).

Axl aktiveres av den vitamin K-avhengige liganden "product of growth arrest-specific gene 6" (Gas6), og sammen danner de en aktiv ligand-reseptor dimer 2:2 (Sasaki et al., 2006).

Figur 1.6 viser oppbygningen av Axl og Gas6.

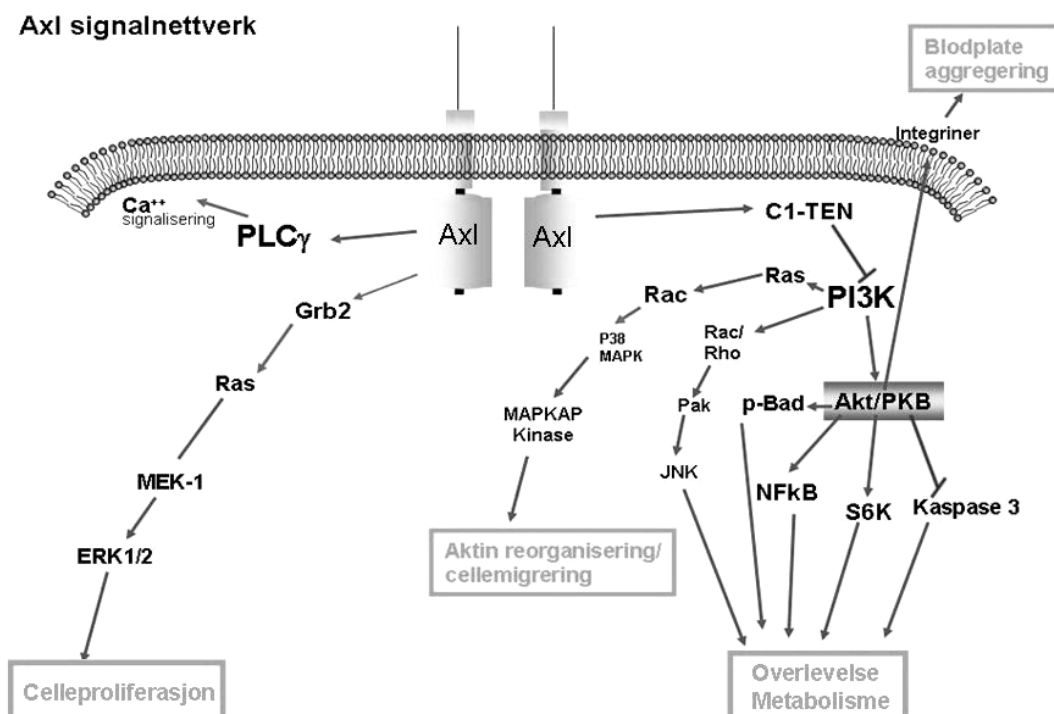


Figur 1.6 Oppbyggingen av Axl og Gas 6

Axl består ekstracellulært (N terminalt) av to immunoglobulin lignede domener (Ig), som utgjør bindingssetet for Gas 6, og to fibronektin type III domener (FNIII). Det intracellulære domenet har tyrosin kinase aktivitet (C terminalt). Gas6 består av en gamma-karboksyglutamatsyre (Gla) region, fire "epidermal vekst faktor" (EVF) repetisjoner, og to reseptorbindende globulære laminin G-lignende (LG) domener.

1.4.4 Signalisering via Axl

De første studiene identifiserte PI₃K og fosfolipase C γ (PLC γ) som intracellulære bindingspartnere for Axl, og signalisering via disse bindingspartnerne har betydning for overlevelse og proliferasjon (Linger et al., 2008). Ulike studier har senere vist at Gas6-mediert reseptor aktivering stimulerer celleoverlevelse, proliferasjon, cellemigrasjon og celleadhesjon via ulike signalveier (se Figur 1.7 med referanser).



Figur 1.7 Signalveier mediert via Axl

Gas6/Axl signalsystemet er aktivert i vaskulaturen og er involvert i onkogen transformasjon av celler. Axl regulerer celleoverlevelse, vekst og proliferasjon (Hasanbsic et al., 2004, Sawabu et al., 2007, Holland et al., 2005), samt celle migrasjon og adhesjon (bl.a Vajkoczy et al., 2006) via de ulike signalveiene angitt i figuren.

1.4.5 Axl i tumor dannelse og metastase

Som til nå beskrevet er overuttrykking av Axl observert i en rekke typer humane tumorer. Samtidig er forhøyet Axl uttrykking assosiert med dårlig prognose i klinikken (Nakano et al., 2003, Shieh et al., 2005). I ulike studier har man knyttet reseptorens onkogene potensial til reseptor overuttrykking. Deriblant førte overuttrykking av Axl til transformasjon av fibroblaster i fravær av ligand *in vitro* (Burchert et al., 1998), og i en annen studie fant man at uttrykking av Axl er nødvendig for tumordannelse av MDA-MB-231 *in vivo* (Holland et al., 2005). Studiene indikerer at Axl er et gen med transformerende egenskaper.

Generelt er nivåene av Axl høyere i metastaser sammenlignet med normalt vev og primære tumorer, og det er funnet korrelasjon mellom uttrykking av Axl og tumorstadium, derav i brystkreft (Berclaz et al., 2001). Axl uttrykking i tumorer har vist seg å korrelere med egenskaper som er typiske for aggressive tumorer som migrasjon, invasjon og angiogenese. Alle disse faktorene er nødvendige for metastase dannelse.

Cellulær morfologi og adhesjon er to avgjørende faktorer knyttet til migrasjon og invasjon av tumorceller. Som vist i Figur 1.7 er Axl signalisering knyttet til regulering av aktin cytoskjelettet. Underuttrykking av Axl gir tumorceller en fenotype som er karakterisert som mindre invasiv med tap av filopodier, redusert mobilitet og tap av celle-celle kontakter

(Vajkoczy et al., 2006). Det ekstracellulære domenet til Axl består av adhesjonsmolekyl lignende motiver, som indikerer at Axl kan være involvert i celle-celle interaksjoner (Figur 1.7) (Bellosta et al., 1995, McCloskey et al., 1997).

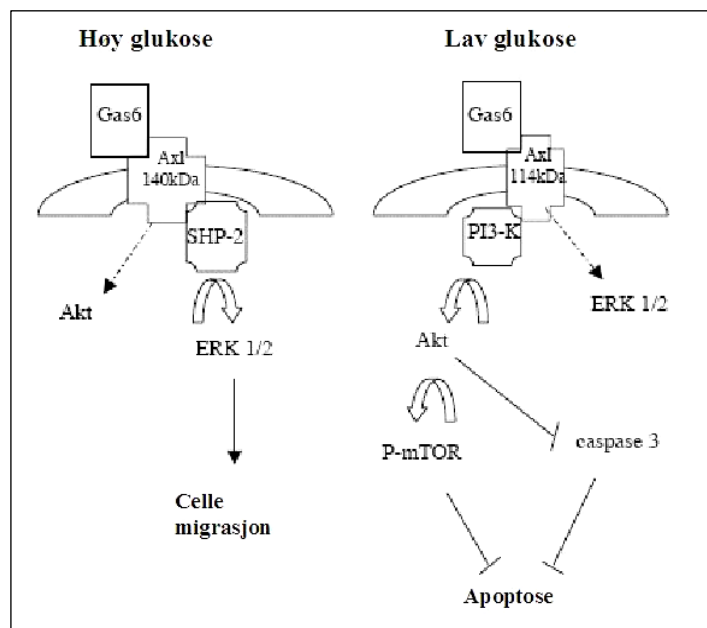
Utviklingen av en metastase karakteriseres av den primære tumorens evne til å trenge gjennom bindevev, blant annet ved å produsere matriks degraderende enzymer som matriks metalloproteinaser (MMP'er). Disse proteinene er kollagenaser som bryter ned kollagen. Axl kan spesifikt, og Gas6-uavhengig, inducere uttrykking av MMP-9 mediert via ERK/ NFκB signalvei (Tai et al., 2008).

Tumorer kompenserer for redusert O₂ og næringstilgang ved å inducere angiogenese for å sikre celleproliferasjon, samtidig som angiogenese er nødvendig for malign transformasjon. I tillegg til å være et gen med transformerende egenskaper er Gas6/Axl systemet aktivert i vaskulaturen. Proliferasjon og migrering av vaskulære glatte muskelceller (VGMC) danner grunnlaget initiering av angiogenese under normale forhold, og studier har vist at migrasjon av VGMC korrelerer med uttrykket av Axl (Fridell *et al.*, 1998). I en musemodell førte underuttrykking av Axl til redusert vaskularisering av tumoren, samtidig som funksjonaliteten til sirkulasjonen ble redusert (Holland *et al.*, 2005). Disse funnene tyder på at Axl spiller en rolle i angiogenese *in vivo*.

1.4.6 Axl og Warburg, en potensiell link?

Axl uttrykkes i invasive brystkreftcellelinjer som har høye nivåer av HIF-1, overuttrykker glykolytiske enzymer og har en oppregulert aerob glykolyse (som MDA-MB-231), men ikke i tumorer med lavere invasivitet og normal glykolyse (som MCF-7) (Zhang et al., 2008, Robey et al., 2005). Det er kjent at både stabilisering av HIF-1 og uttrykking av Axl korrelerer med induksjon av angiogenese, slik at det er en mulig sammenheng mellom disse faktorene. Samtidig er signalveiene som aktiveres av Axl de samme signalveiene som har vist seg å være bidragsyttere til kreftcellenes avvikende metabolisme.

I tillegg har man sett at Axl signalisering avhenger av glukosenivået. Effekten av glukoseendring med hensyn på Axl signalisering er undersøkt i VGMC (Cavet et al., 2008). I høy glukose fant man Axl mediert celle migrering via ERK1/2 signalvei, mens i lav glukose fant man Axl mediert celleoverlevelse via Akt signalvei (Figur 1.8).



(modifisert fra Cavet et al., 2008)

Figur 1.8 Signalisering via Axl avhenger av glukosenivået i VGMC

I høy glukose (27,5mmol/l): Gas6 stimulering av 140kDa Axl fører til aktivering av ERK1/2 (via SHP-2) som resulterer i celledigrasjon. I lav glukose (5,5mmol/l): Gas6 stimulering av 114 kDa Axl fører til aktivering av Akt og mTOR med simultan inhibering av kaspase 3. Glukosenivået hadde innvirkning på interaksjonsaffiniteten mellom bindingspartnere. Begge mekanismene virker anti-apoptotisk i cellene.

Imidlertid ble betydningen av Gas6/Axl i diabetes nefropati undersøkt, hvor man *in vitro* fant at ved å øke cellenes glukose tilgang ble uttrykket av Gas6/Axl oppregulert, med simultan aktivering av Akt/mTOR signalvei (Arai et al., 2008). I samme studie økte glomerulær Gas6/Axl uttrykking simultant med økt fosforylering av Akt i to *in vivo* modellsystemer. Funnene fra de to ulike studiene presentert indikerer at Axl signalisering via Akt signalvei avhenger av glukosenivå, men at reguleringen kan variere avhengig av vev.

På dette grunnlaget ønsker vi å undersøke om Axl spiller en rolle for proliferasjonen av-, og metabolismen i brystkreft cellelinjen MDA-MB-231.

2 Mål

Metabolismen i kreftceller er assosiert med økt aerob glykolyse, et fenomen omtalt som Warburg effekten. Den forhøyede glykolytiske raten utgjør en av de større forskjellene, som skiller normale celler fra kreftceller, og forståelse av de underliggende mekanismene er viktig for å kunne utvikle målrettet kreftterapi.

Brystkreft cellelinjen MDA-MB-231 er karakterisert som aggressiv og invasiv, og viser høye rater av aerob glykolyse, sammenlignet med brystkreft cellelinjer med lavere invasivitet.

Tyrosin kinase reseptoren Axl overuttrykkes i MDA-MB-231 og andre metastatiske tumor cellelinjer, og overuttrykking er assosiert med dårlig prognose i klinikken. Axl er knyttet til prosesser karakteristiske for metastatiske tumorer som celleadhesjon, cellemigrering og angiogenese.

I dette studiet søker vi etter en potensiell sammenheng mellom Axl nivå, tumor metabolisme og celleproliferasjon i MDA-MB-231 ved å sammenligne MDA-MB-231 (VT) med den modifiserte cellelinjen MDA-MB-231 Axl- (Axl-).

Følgende undermål kan defineres:

- Studere proliferasjonsprofilen til cellelinjene. Til dette skal vi bruke tre ulike metoder som detekterer proliferasjon og sammenligne dem.
- Kartlegge energimetabolismen ved å måle glykolyse (laktatproduksjon) og mitokondriell respirasjon (oksygenforbruk).
- Avgjøre glykolyseavhengigheten og respirasjonsavhengigheten til cellene ved å bestemme IC_{50} for de metabolske inhibitorene rotenon og 2DG.
- Studere mitokondriell struktur og funksjon
- Studere Akt og AMPK signalveiene, som er begge er knyttet til celleoverlevelse og proliferasjon

3 Materialer

3.1 Kjemikalier

Kjemikalie	Kjemisk formel, forkortelse	Mw, (g/mol)	Leverandør
2-deoksy-D-glukose	C ₆ H ₁₂ O ₅	164,16	Sigma
2-Mercaptoetanol	C ₂ H ₁₂ OS	78,1	Merck
30 % akrylamid/bis løsning, 37,5:1	-	-	Merck
Ammonium persulfat	H ₈ N ₂ O ₈ S ₂ , APS	228,2	BioRad
Aprotinin fra bovin lunge	C ₂₈₄ H ₄₃₂ N ₈₄ O ₇₉ S ₇	6511,44	Sigma
Bovint serum albumin, 1,49mg/ml	BSA	-	Sigma-Aldrich
Karbyl cyanide 4-(trifluormetoksy)-fenylhydrason	C ₁₀ H ₅ F ₃ N ₄₀ , FCCP	254,17	Sigma
Cytocrome c	Cyt c	12500	Sigma
Digitonin, ~50% (TLC)	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₉	1229,31	Fluka
Dimetylsulfoksid HYBRI- MAX®	(CH ₃) ₂ SO, DMSO	78,1	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium uten fenolrød (+ 4500 mg glukose/L, med L-glutamin)	DMEM	-	Gibco
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (+ 4500 mg glukose/L, uten L-glutamin)	DMEM	-	Sigma
Etanol, 96 %	C ₂ H ₅ OH, EtOH	46,1	Vinmonopolet
Føtalt bovint serum	FBS	-	PAA:The Cell Culture Company
Formaldehyde, 37% løsning	CH ₂ O	30,03	Sigma
Frysetørket melk (0,6 % (w/w) fett)	-	-	Marvel
Glutamat	C ₅ H ₈ NO ₄ Na	169,1	Sigma
Glysin, > 99,7 %	C ₂ H ₅ NO ₂	75,07	Merck
Glyserol > 99,5%	C ₃ H ₈ O ₃	92,1	Fluka
Hydrogen peroksid løsning, 30 % (v/v) i H ₂ O	H ₂ O ₂	34,01	Sigma
Hydrazin	H ₂ NNH ₂ ·H ₂ O	32,04	Sigma
Kaliumklorid	KCl	74,55	Merck
Leupeptin hemisulfat salt	C ₂₀ H ₃₈ N ₆ O ₄ ·1/2H ₂ SO ₄	475,59	Sigma

Luminol, >97 %	$C_8H_7N_3O_2$	177,16	Sigma
L-glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	146,14	Sigma
Malaic acid	$C_4H_6O_5$	134,1	Sigma
Metanol	CH_3OH	32,0	Merck
Monokaliumfosfat	KH_2PO_4	136,1	Merck
NAD ⁺	-	663,43	Fluka
N,N,N',N'-tetrametyletyldiamid	$C_6H_{16}N_2$, TEMED	116,2	BioRad
Natriumklorid	NaCl	58,44	Merck
Natrium deoksyholat	$C_{24}H_{39}O_4Na$, NaDOC	414,6	Calbiochem
Natriumhydroksid	NaOH	39,997	Merck
Natrium ortovanadat	Na_3VO_4	183,91	Sigma
Natrium dodecylsulfat	$C_{12}H_{25}O_4SNa$, SDS	288,4	Merck
Nonidet P40	$(C_6H_4O)_n C_{14}H_{22}O$, NP40	-	Sigma
Oligomycin	-	800	Sigma
p-Kumar syre	$HOC_6H_4CH=$ $CHCO_2H$	164,16	Sigma
Penicillin/Streptomycin (100x)	$C_{16}H_{17}N_2NaOS$: $C_{42}H_{84}N_{14}O_{26}S_3$, PenStrep	-	PAA: The Cell Culture Company
Fenylmetansylfonyl fluorid	$C_7H_7FO_2S$, PMSF	174,19	Sigma
Ponceau S	$C_{22}H_{12}N_4Na_4O_{13}S_4$	760,57	Sigma
Rotenon	$C_{23}H_{22}O_6$	394,42	Sigma
Saltsyre	HCl	36,5	Merck
Trizma® base, >99,9 % titrering	$C_4H_{11}NO_3$, TRIS	121,14	Sigma
Trypan Blå	$C_{23}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$	960,81	Sigma
TWEEN® 20	-	-	Sigma

3.2 Cellelinjer

Cellelinje	Celle type	Opphav	Modifikasjoner	Levrandør
MDA-MB-231 VT	Human, epitellignende bryst adenokarsinoma cellelinje (Østrogenreseptor negativ (ER-))	Kaukasisk, 51 år gammel kvinne. Stammer fra pleural effusjon.	Villtype (VT)	Jim Lorens, Avdeling for Biomedisin, UiB
MDA-MB-231 Axl-	Samme som MDA-MB-231 VT	Samme som MDA-MB-231 VT	Axl "nedslåing" utført av Jim Lorens' gruppe, (se under).	Jim Lorens, Avdeling for Biomedisin, UiB
3T3	Fibroblast cellelinje fra embryoer av "Swiss albino mouse"	Opparbeidet fra deaggregerte "Swiss albino mouse" embryoer i 1962		Jim Lorens, Avdeling for Biomedisin, UiB

Informasjon i kolonne 2 og 3 i tabellen stammer fra databasene "DSMZ" (http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/cell_line_index.php) og "Human and animal cell lines" (<http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cname-1c.html>)

MDA-MB-231 VT cellene

Cellelinjen gir opphav til aggressive og invasive brysttumorer. Cellene er østrogenreseptor negative, som fører til resistens mot kjemoterapi (hormonterapi). Axl overuttrykkes i cellene, og overuttrykkningen korrelerer med invasiviteten. Studier av Axl som potensielt terapeutisk mål i cellelinjen er derfor av interesse.

MDA-MB-231 Axl- cellene

Den modifiserte cellelinjen ble laget ved å slå ned Axl ved hjelp av shRNA. Metoden ble utført som beskrevet i artikkelen til Holland et al., 2005 (se ref.)

3T3 cellene

3T3 er standardcellelinjen blant fibroblaster, og cellene brukes hyppig i biokjemiske og cellebiologi studier, inkludert studier av vekstfaktorer da cellene uttrykker og signaliserer via et vidt spekter av reseptorer. Vi inkluderte cellelinjen som en referanse for kontroll.

3.3 Buffere og løsninger

3.3.1 Rutine kulturmedium

Ingredienser	Final konsentrasjon
DMEM (4,5 g/l glukose, uten L-glutamin) ¹⁾	90 % (v/v)
Føtalt bovint serum (FBS) ²⁾	10 % (v/v)
L-glutamin	1 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin (100x)	1 % (v/v)

¹⁾Medium brukt ved proliferasjonsstudier med MTT: DMEM uten fenolrødt.

²⁾Varmeinaktivert i 30 minutter ved 56°C.

3.3.2 PBS løsning

Løsning	Ingredienser	Final konsentrasjon
PBSx1	Natriumklorid	0,8 % (w/v)
	Kaliumklorid	0,02% (w/v)
	Monokaliumfosfat	0,2% (w/v)
	Natriumhydroksid	Til pH 7,3

3.3.3 Frysemedium

Ingredienser	Final konsentrasjon
DMEM (4,5 g/l glukose med l-glutamin)	70 % (v/v)
Føtalt bovint serum	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

3.3.4 Trypan blå løsning

Løsning	Ingredienser	Final konsentrasjon
Trypan blå løsning	Tryfan blå	0,6 % (w/v)
	NaCl	0,9 % (w/v)

3.3.5 Buffere og løsninger for laktatmåling

Løsning	Ingredienser	Final konsentrasjon
Løsning A	NAD ⁺	10,55 mM
	Glycin	64,51 mM
	Hydrazin ¹⁾	163,64 mM
	5 M NaOH	Til pH 9,5 (ca 0,5 % (v/v))
Løsning B	L-laktat dehydrogenase	13 enheter (units)

¹⁾ Giftig

3.3.6 Buffere og løsninger for lysering av celler

Løsning	Reagens	Final konsentrasjon
NP40 RIPA buffer	Nonidet P40 (NP40)	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	NaDOC ¹⁾	0,5 % (w/v)
	1M TRIS-HCl (pH 7,4)	50mM
	5M NaCl	150mM
RIPA lyserings buffer ²⁾	Aprotinin (i 0,9 % NaCl)	153,6nM
	Leupeptin (i 0,9 % NaCl)	2,1mM
	Natrium ortovanadat	2mM
	PMSF ³⁾	1mM
	NP40-RIPA buffer	97,8 %

¹⁾ Toksisk; bruk munnbind og vekt med undertrykk ved innveing

²⁾ Lages på is.

³⁾ PMSF er kun aktiv i 30 minutter etter tillaging

3.3.7 Buffere og løsninger for SDS-PAGE

Løsning	Reagens	Final konsentrasjon
4x "Sample buffer"	Glyserol (95 % løsning)	40 % (v/v)
	SDS (20 % løsning)	8 % (v/v)
	1,5M Tris-HCl pH 8,8	279mM
	2-Mercaptoetanol	4 % (v/v)
	BTB	tilnærmet 0,1 mg/ml (w/v)
10 % Separasjons gel	30 % akrylamid/bis løsning	10 % (w/v)
	1,5M Tris-HCl (pH 6,8)	375mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,05 % (w/v)
	TEMED	5 % (v/v)
4 % "Stacking gel"	30 % akrylamid/bis løsning	4 % (w/v)
	0,5M Tris-HCl (pH 8,6)	125mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,05 % (w/v)
	TEMED	5 % (v/v)
10x "Running buffer"	Tris	250mM
	Glycin	1,92M
	SDS	1 % (w/v)

3.3.8 Buffere og løsninger for proteinoverføring (blotting) og blokkering

Løsning	Ingredienser	Final konsentrasjon
1x Overførings buffer	Tris	25mM
	Glysin	192mM
	Metanol	20 % (w/v)
Trietanolamin bufret saltløsning- Tween 20 (TBST)	Tris-Hcl (pH8,0)	25mM
	NaCl	125mM
	Tween 20	0,1 % (v/v)
Blokkerings buffer	TBST med 3 % tørrmelk	100 % (v/v)
Deteksjons reagenser: Løsning A	Tris-HCl (pH 8,5)	100mM
	Luminol	254mM
	p-kumar syre	15,5mM
	Tris-HCl (pH 8,5)	100mM
Løsning B	Hydrogen peroksid løsning	1,8mM
Ponceau S løsning	Ponceau S	0,2 % (w/v)
	Triklør eddiksyre	3 % (v/v)

3.4 Molekylære standarder for Western blotting

Standard	Område	Leverandør
Precision Plus Protein dual color standards	10-250 kDa	BioRad
Magic Mark ^{MT} XP Western Protein Standard	20-220 kDa	Invitrogen

3.5 Antistoffer for Western blotting

Antistoff	Vert	Fortynning	Løsning	Leverandør
1^o antistoff				
Anti-Axl	Mus	1:3000	PB	R&D Systems
Anti-beta-Aktin	Kanin	1:5000	TBST-MLK	abCam
2^o antistoff				
Anti-mus IgG (H+L)-HRP konjugat	Geit	1:5000	TBST-MLK	BioRad
Anti-kanin IgG(H+L)-HRP konjugat	Geit	1:2000	TBST-MLK	BioRad

3.6 Antistoffer for flow cytometriske analyser

Antistoff	Vert	Fortynning	Leverandør
1^o antistoff			
Anti-hAxl	Mus	1:200	R&D systems
p-Akt _{ser473}	Kanin	1:25	Cell signalling
p-Akt _{thr308}	Kanin	1:100	Cell signalling
Akt _{total}	Kanin	1:100	Cell signalling
p-AMPK α _{thr172}	Kanin	1:50	Cell signalling
AMPK α	Kanin	1:50	Cell signaling
p-AMPK β _{ser108}	Kanin	1:100	Cell signalling
AMPK β	Kanin	1:50	Cell signalling
ACC	Kanin	1:400	Cell signalling
p-ACC _{ser79}	Kanin	1:25	Cell signalling
2^o antistoff			
Alexa 647	Geit	1:1000	BD Bioscience
Goat anti rabbit			
Anti-mus APC	Geit	1:5000	Molecular Probes

3.7 Fluorescerende prober for analyse av levende celler

Probe	Metode	Laser	Maks Eksitasjon	Maks Emisjon	Detektor	Parameter	Leverandør
NAO (acridin orange 10-nonyl bromide)	Flow cytometri	488	495nm	519nm	FL1	Relativ mitokondrie mengde	Invitrogen Molecular Probes
TMRM	Flow cytometri	488	549nm	577nm	FL-2	Membran potensial	Invitrogen Molecular Probes
CM ₂ -H ₂ DCFDA	Flow cytometri	488	495nm	517nm	FL-1	Oksidativt stress (ROS)	Invitrogen Molecular Probes
MitoTracker® Deep Red	Mikroskopi	633	640nm	662nm	-	Mitokondrie morfologi	Invitrogen Molecular probes

3.8 Kommersielle analyser

Kit	Leverandør
Vybrant® MTT cell proliferation Assay Kit	Molecular Probes
Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
alamarBlue® Assay	Invitrogen
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology

3.9 Dataprogrammer

Program	Bruksområde	Leverandør
BD CellQuest™	Flow cytometri	BD Biosciences
DatLab 4	Oksygrafi	Oroboros
Quantity One	Western blotting	BioRad
FlowJo	Bearbeidelse av data fra flow cytometri	FlowJo
LSM 5 Image Examiner	Bilde prosessering	Carl Zeiss

3.10 Forbruksmaterialer

Materiale	Leverandør
Acrodisc® sprøyte filter	FALL corporations
Cellekultur flasker	Sarstedt / Nunc
Kanyler	BD
Mikroplater	Sarstedt
Pipetter	Sarstedt
Rør	Sarstedt/ VWR
Sprøyter	Terumo

3.11 Teknisk utstyr

Utstyr	Levrandør
BD FACSCalibur™ Flow Cytometer	BD biosciences
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
DU530, Life Science UV/VIS spektrofotometer	Beckman
EL _x 808 IU Ultra MP reader	Bio-Tek instruments
Finnpipette	Thermolab systems
Fluor-S™ MultiImager	BioRad
Haake W26 vannbad	Haake
Laminal Air Flow kabinet	Nuaire
Mikroplate leser (modell 550)	BioRad
Mini-protean 3 elektroforese celle for SDS-PAGE	BioRad
Mini Spin	Eppendorf
Minitrans blotte celle for Western blott	BioRad
Ms2 minishaker	IKA®
Nikon Eclipse TS100 lysmikroskop	Nikon
OROBOROS Oxygraph-2k	Oroboros instruments
Rotamax 120	Heidolph
Transonic 310 sonicator	Elma
UVM 340 ELISA leser	ASYS
Zeiss LSM 510 Meta konfokal mikroskop	Carl Zeiss

4 Metoder

4.1 Dyrking og vedlikehold av cellelinjene

4.1.1 Cellelinjene

De tre cellelinjene MDA-MB-231 VT/Axl- og 3T3 ble alle dyrket i DMEM komplett medium og oppbevart under standardiserte forhold i inkubator. Inkubatoren holder 37°C og 5 % CO₂. Alle forsøk med levende celler ble utført under sterile forhold i et LAF "laminar air flow" kabinett. Alle løsninger/væsker som ble tilsatt cellekulturene ble forvarmet til 37°C i vannbad. Overflater og utstyr ble desinfisert med 70 % etanol før bruk.

4.1.2 Trypsinering og splitting av cellene

Cellelinjene MDA-MB-231 VT/Axl- og 3T3 er alle adherente celletyper og ble dyrket i henholdsvis 175 cm² og 75 cm² cellekultur flasker.

MDA-MB-231 VT /Axl- ble dyrket til en konfluens på ca 90 % før de ble splittet, mens 3T3 cellene ble dyrket til en konfluens på ca 70 %.

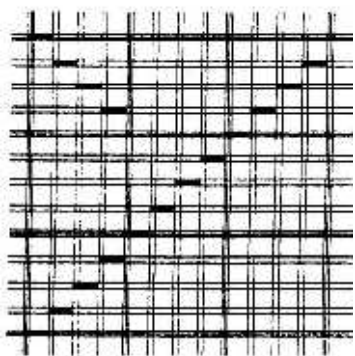
For å løsne cellene fra flaskebunnen ble trypsin-EDTA og PBS tilsatt etter forholdet 3:1 for MDA-MB-231 VT/Axl- cellene og 1:1 for 3T3 cellene. Cellene ble så innkubert i ca 1 minutt ved romtemperatur. MDA-MB-231 VT/Axl- cellene satt relativt godt festet til flaskebunnen, så ved trypsinering gav vi flasken et lett slag på undersiden slik at cellene løsnet. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette et volum forvarmet komplett DMEM som tilsvarte minimum volumet trypsin-EDTA tilsatt. Cellene ble deretter overført til 15 ml rør og sentrifugert ved 800 rpm i 4 minutter ved romtemperatur. Cellepelletten ble resuspendert i komplett DMEM og splittet 1:3 eller 1:4 (dette varierte noe) ca annenhver dag.

4.1.3 Bestemmelse av celletall

For å bestemme celletall brukte vi Bürker cellekammer. Kammeret rommer et bestemt volum, slik at ved å tilsette en celleduspensjon kan antall celler per ml bestemmes.

Kammeret inneholder et rutenett (Figur 4.1), og ved å telle antall celler i 16 ruter kan celletallet bestemmes ved hjelp av følgende ligning:

$$\text{antall celler} / \text{antall ruter} \times 1,6 \times 10^5 \times \text{fortynningsfaktor} = \text{celler/ml}$$



Figur 4.1 Burker cellekammer

Rutenettet består av ni store ruter, og hver av disse består igjen av 16 ruter. Ved celledetelling telte vi antall celler i tre av de store rutene (3x16 ruter), beregnet snittet og fulgte ligningen over.

Trypan blå er en farge som brukes for selektiv farging av døde celler. Levende celler med intakt celledmembran farges ikke. Ved farging av cellene med trypan blå løsning kan man ved celledetelling med bruk av mikroskop skille mellom døde og viable celler.

4.1.4 Frysing og opptining av celler

Cellene ble trypsinert, celledtettheten ble bestemt, og etter sentrifugering ved 800 rpm i 4 minutter ble cellene resuspendert i frysemedium til en tetthet på ca 2×10^6 celler/ml. Nunc cryorør a 1,8 ml ble tilført 1 ml av celledsuspensjonen hver. For optimal nedkjøling av cellene ble rørene rullet inn i papir og satt i en isoporboks, da dette bremser nedkjølingsprosessen, før de ble satt i en frysersom holdt -80°C over natten. Deretter ble cryorørene overført til en tank med flytende N_2 for langtidslagring.

For opptining av cellene ble cryorørene desinfisert med 70 % etanol før de ble åpnet forsiktig i LAF-kabinettet for å fjerne eventuelt overtrykk i rørene. Deretter ble rørene tint hurtig ved oppvarming i hånden. Cellene ble resuspendert i forvarmet komplett DMEM (37°C) og overført til celledkultur flasker. Mediet ble skiftet neste dag. Videre ble cellene dyrket som beskrevet i avsnitt 4.1.2.

4.2 Proliferasjonsmåling

Kvantitativ deteksjon av vekstrater brukes for å teste ulike stoffers innvirkning på replikasjonen, for eksempel innvirkningen av cytotoxiske kjemikalier og for screening av biologisk aktive komponenter. Det finnes ulike metoder for å detektere vekstrate, og blant de vanligste er fluorescerende og kromogene indikatorer.

4.2.1 MTT

Analysemetoden er basert på omdanningen av det løselige saltet MTT (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrasolium bromid) til detekterbare blå formasan krystaller av metabolske aktive enzymer. Den eksakte virkningsmekanismen er imidlertid ikke kjent (Berredige et al., 2005). Formasan blir løseliggjort og konsentrasjonen kan deretter bestemmes ved absorbansmåling. Absorbansen korrelerer lineært med vekstraten.

Prosedyren ble utført i henhold til instruks fra produsent. Cellekulturer dyrket på 96-brønners MP ble tilsatt MTT (12mM Stock) tilsvarende 10 % av kulturmediet (1,0mM) i 4 timer. Etter inkubasjon med SDS-HCl i 18 timer ble absorbansen avlest ved 570nm.

4.2.2 BrdU

BrdU er en kolorimetrisk immunanalytisk metode for *in vitro* celledsystemer basert på målinger av inkorporasjon av pyrimidin analogen 5-bromo-2'-deoksyuridin (BrdU) under DNA replikasjon. BrdU innlemmes istedenfor tymidin under DNA syntese i prolifererende celler og kan detekteres ved hjelp av BrdU-spesifikt antistoff, konjugert til peroksidase, som gir et farget produkt ved tilsetning av substrat (tetramtyl-benzidin). Absorbansen korrelerer direkte med mengden av DNA syntetisert under inkuberingsperioden.

Prosedyren ble utført i henhold til instruks fra produsent og er her oppsummert trinn for trinn:

1.	Så ut celler
2.	Merking av celler med BrdU
3.	Inkuber med fikserings/denaturerings løsning
4.	Inkuber med Anti-BrdU POD
5.	Vaske steg
6.	Substrat reaksjon
7.	Deteksjon

Cellene ble merket med "BrdU merkings løsning" (primært antistoff) tilsatt til en finalkonsentrasjon på 10µM i 4 timer. Fikserings/denaturerings løsning ble tilsatt i 30 minutter og deretter fjernet før sekundært antistoff ble tilsatt. MP ble inkubert med sekundært antistoff i 60 minutter før cellene ble vasket tre ganger med PBS. Deretter ble substratløsning tilsatt og absorbansen avlest etter 10 og 15 minutter på en ELISA plateleser ved 370 nm (referansebølglengden ble satt til 492nm).

4.2.3 alamarBlue®

Denne metoden er basert på omdanningen av det blå, ikke-fluoriserende fargestoffet resazurin av mitokondrielle og andre metabolske aktive enzymer til det rosa, fluoriserende resorufin.

Resorufin er vannløselig og kan detekteres både spektrofotometrisk og fluorimetrisk.

Produsenten oppgir at cellene ikke påvirkes av kjemikaliene som tilsettes i metoden, slik at det lar seg gjøre å ta målinger på ulike tidspunkt av de samme cellene.

Forsøket ble utført i henhold til prosedyre fra produsent. alamarBlue® ble tilsatt tilsvarende 10 % av kulturmediet og deretter ble absorbanen avlest ved tidspunktene 2, 3, 4 og 23 timer ved bølgelengdene 570nm og 600nm.

Beregninger ble utført i henhold til prosedyre fra produsent.

4.3 Kartlegging av energimetabolismen

4.3.1 Oksygrafi

For analyse på oksygraf blir prøven av celler tilsatt i et lukket kammer. Instrumentet som ble brukt i forsøket har to 2 ml kammere med hver sin oksygensensor som gjør det mulig å kjøre to prøver samtidig. Kammerene holder konstant temperatur under forsøket og en omrøringsmekanisme sørger for homogen oksygen konsentrasjon i prøven. Systemet er ugjennomtrengelig for oksygen slik at kun oksygen oppløst i mediet i prøven registreres.

Elektrodene er koblet til en PC, og dataprogrammet som benyttes tillater ”online” observasjon av oksygenivåer og forbruksrater i kammerene. Ved å tilføre ulike substrater og inhibitorer av respirasjonsskjeden separat, kan man se på oksygenforbruket ved den enkelte behandling, og dermed måle ulike parametere av den mitokondrielle funksjonen.

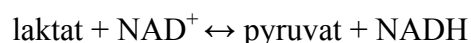
Tabell 4.4 viser ulike kjemikalier som ble tilført cellene under eksperimentet. Resultatet ble analysert ved hjelp av dataprogrammet Oroboros DatLab 4.

Tabell 4.1 Kjemikalier tilsatt ved okygrafi

Kjemikalie	Funksjon
Antimycin A	Blokkerer elektrontransport ved kompleks III, mellom cytokrom b og cytokrom c1.
Digitonin	Permeabiliserer cellemembranen
FCCP	Avkobler; inhiberer koblingen mellom elektrontransport og ATP produksjon.
Oligomycin	Blokkerer ATP syntese
Rotenon	Inhiberer elektrontransport ved kompleks I ved å blokke NADH-dehydrogenase
Suksinat	Elektron donor til kompleks II
Malat	Substrat i SSS (NADH produksjon)
Glutamat	Substrat i SSS (NADH produksjon)

4.3.2 Laktat målinger

Ved å måle laktatkonsentrasjonen i mediet cellene har blitt dyrket i kan vi avgjøre hvor glykolytiske cellelinjene er relativt til hverandre. Sentrifugerte mediumprøver tilsettes laktat dehydrogenase (løsning B) som katalyserer reaksjonen:



NADH som produseres i reaksjonen detekteres spektrofotometrisk ved 340nm.

Medium som cellene hadde gått i, fra ulike forsøk, ble tatt vare på og oppbevart ved 4°C frem til videre analyse. Prøvene ble analysert på en 96-brønners MP sammen med en standardrekke med 0-4mM laktat (eksempel på standardrekke er gitt i appendiks 2). Prøvene og standardene ble fortynnet i PBS. Per brønn tilsatte vi 20 µl prøve og 170µl løsning A. Absorbansen ble avlest på spektrofotometer ved 340nm. Deretter ble 10µl løsning B tilsatt i hver brønn, og MP ble deretter inkubert ved romtemperatur i 1 time, før absorbansen på ny ble avlest ved 340nm. Laktatverdien i prøvene ble beregnet ved å trekke fra bakgrunnen (før reaksjon) og den negative kontrollen (tilsatt løsning B uten celler), og deretter kalkulert relativt til kontroll hvor kontroll i våre forsøk var VT cellene:

Relativ mengde laktat = (absorbans - bakgrunn - negativ kontroll)/kontroll

(Prosedyren er beskrevet i artikkelen Yang og Balcarcel, 2004 (se ref.))

4.4 Proteinuttrykk

4.4.1 SDS-PAGE og Western blotting

4.4.1.1 Lysering av celler, og måling av proteinkonsentrasjon

Cellene ble overført til 15 ml rør og sentrifugert ved 800 rpm i 4 minutter før mediet ble fjernet. Prosessen ble gjentatt ved å vaske med PBS. Rørene ble så satt på is og pelleten ble

løst i 500µl kald RIPA lyseringsbuffer og inkubert i 1-2 minutter, før rørene ble sentrifugert ved 1350 rpm i 5 minutter ved 4°C. Lysatet ble overført til eppendorf rør og oppbevart ved -20 °C.

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt spektrofotometrisk ved 562nm ved å bruke Pierce® BCA Protein Assay Kit som inneholder en albumin proteinstandard. (Standardrekke: se appendiks 3)

4.4.1.2 Reduksjons SDS polyakrylamid gel elektroforese ("Reducing SDS-PAGE")

"Sample bufferen" inneholder den anioniske detergensen SDS og reduksjonsmiddelet 2-mercaptoetanol. SDS denaturerer proteinenes sekundær og tertiær struktur, og tilfører negativ ladning til hvert protein som korresponderer med den respektive molekylstørrelsen. Ved gel-elektroforese tilføres et elektrisk felt over gelen og på grunn av den totale negative ladningen vil hvert enkelt protein vandre gjennom gel-matriksen mot anoden. Vandringsslengden korresponderer med massen (i kDa) til det enkelte proteinet.

Gelen som elektroforesen foregår i er bygget opp av et nettverk av den organiske polymeren polyakrylamid hvor konsentrasjonen av polyakrylamid kan varieres avhengig av størrelsen til proteinene av interesse. Gelen består av to lag, hvorav det øvre laget kalles "stacking gel", som samler prøvene til smale bånd før separasjonen begynner. Separasjonen foregår i den nedre delen av gelen som kalles separasjonsgelen.

Elektroforesen ble satt opp og kjørt i et system fra BioRad. Geltykkelsen var 1mm og stacking- og separasjonsgelen inneholdt henholdsvis 4 % og 10 % akrylamid. Gelen ble satt i en egnet bufferløsning og kjørt ved romtemperatur med konstant spenning på 200V inntil proteinene med lavest molekylvekt hadde vandret til bunnen av gelen.

4.4.1.3 Western Blotting

Metoden går ut på å overføre de separerte peptidkjedene etter elektroforesen (SDS-PAGE) fra gelen og over til en membran, hvor proteiner av interesse detekteres spesifikt ved å merke med antistoff. Prosessen hvor overføringen skjer kalles blotting, og når spenning driver prosessen kalles det elektroblotting.

Etter SDS PAGE ble gelen tatt ut av systemet og lagt i blottebuffer i ca 10 minutter. Til blottingen brukte vi en polyvinylidendifluorid (PVDF) membran som først må aktiveres i 100 % metanol. For overføring av proteinene brukte vi et "Tank overførings"-system fra BioRad innstilt med en konstant spenning på 19V. Blottingen ble utført i 12 timer på kjølerom.

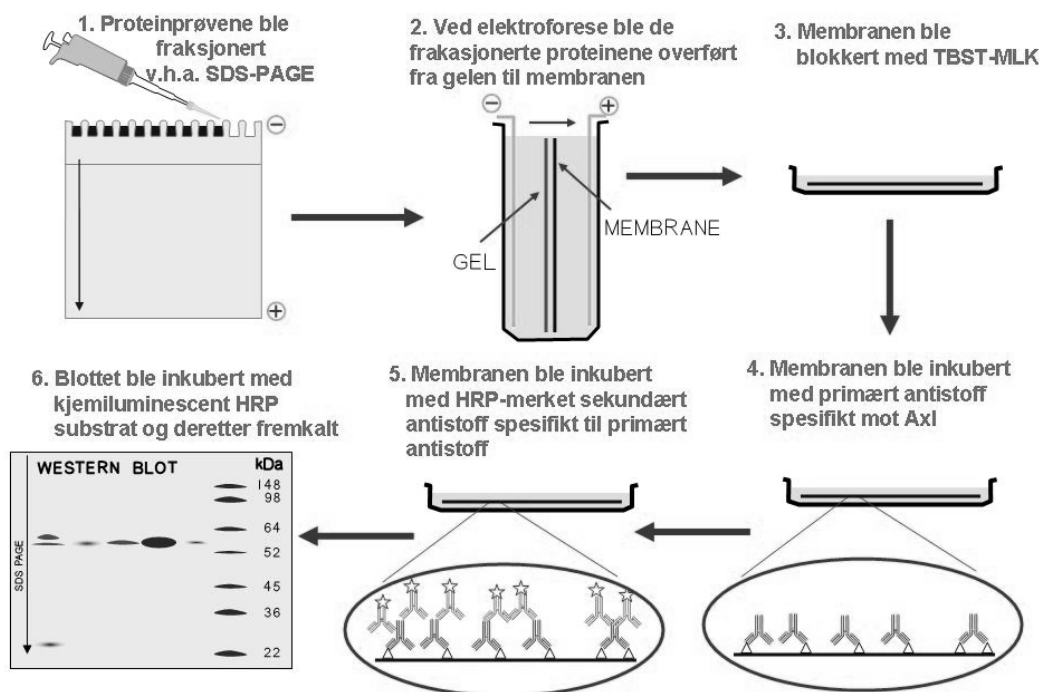
For å sjekke at lik mengde protein var tilsatt i brønnene ble blottet farget med Ponceau S løsning i ca 30 sekunder, og blottet ble deretter skyllet i ddH₂O.

For å hindre uspesifikk binding av antistoff ble membranen lagt i blokkeringsbuffer i ca 2 timer ved romtemperatur. Etter blokkeringen ble membranen inkubert med primært antistoff fortynnet i TBST-MLK og satt på kjølerom over natten. Påfølgende dag ble membranen vasket en gang med TBST-MLK og 3x10 minutter med TBST før sekundært antistoff ble tilsatt.

Membranen ble inkubert i 2 timer i romtemperatur med Horseradish peroksidase (HRP) konjugert sekundært antistoff fortynnet i TBST-MLK, og deretter vasket i 3x10 minutter med TBST, før den ble lagt i ddH₂O.

For å detektere antistoff bundet til membranen tilsatte vi et substrat (ECL reagens: løsning A blandet med løsning B, 1:1, se 3.3.7). Antistoffet er konjugert med et enzym som reagerer med luminol i ECL-reagensen, og i reaksjonen dannes luminiscence. Membranen ble inkubert med ECL-reagensen i ett minutt i romtemperatur og deretter ble resultatet avlest i et digitalt bildetakingsystem fra BioRad. Programvaren som ble brukt var "QuantityOne".

Western Blotting



Figur 4.2 Utførelse av Western blotting

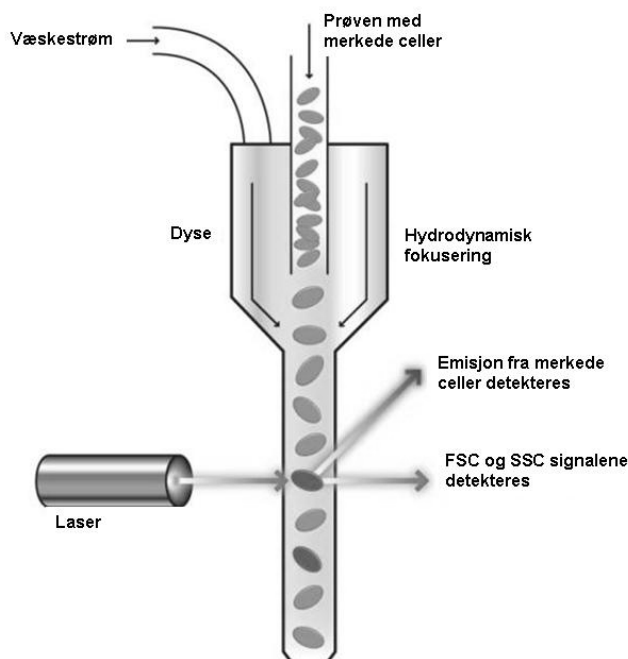
Se tekst for detaljer.

4.4.2 Flow cytometri

Flow cytometri er en metode for å kunne studere, telle og sortere partikler eller celler av en viss størrelsesorden (0,2 - 150 mikrometer) i en suspensjon. Teknikken gjør det mulig å utføre multiparameter analyse av den enkelte celle.

Cellene presenteres for et optisk system bestående av lasere, speil, filtre og detektorer. På grunn av hydrodynamisk fokusering av cellene vil kun en enkelt celle passere laserstrålen ved ett gitt tidspunkt, og spredningen av lyset detekteres (spredning og/eller emisjon) (Figur 4.3). Signalene konverteres til elektriske impulser som kan analyseres ved hjelp av dataprogrammer.

De ulike parameterne man måler ved flow cytometri er forover spredning (eng. forward scatter = FSC), sideveis spredning (eng. side scatter = SSC) og fluorescens. Grovt sett er størrelsen til FSC signalet proporsjonal med cellens volum, mens SSC signalet er et mål for cellens indre granularitet og kompleksitet. Ved å merke celler med en fluoriserende markør vil markøren eksiteres til et høyere energinivå når en laserstråle med passende bølgelengde treffer, og energien frigjøres deretter som fotoner (emisjon) som detekteres. Hver markør har et karakteristisk absorpsjons- og emisjonsspekter som vi kan nytte til analyse av celler. Alle flow cytometriske analyser ble utført ved bruk av BD FACS CaliburTM flow cytometer sammen med BD CellQuest data programvare. For videre analyse av dataene brukte vi programvaren FlowJo.



Figur 4.3 Prinsipp for flow cytometri

Se tekst for detaljer.

Figuren er hentet fra <http://www.abcam.com/ps/CMS/Images/Flow-Cytometry-Diagram2.jpg> og modifisert.

4.4.2.1 Immunomerking av Axl for flow cytometrisk analyse

2×10^5 celler av VT og Axl- celler ble overført til eppendorf rør. 1 mL kald PBS-0,2 % BSA (PB) løsning ble tilsatt hvert rør og cellene ble spunnet ned på sentrifuge ved en hastighet på $700 \times g$ i 5 minutter i rom temperatur. Cellene ble resuspendert i 100 μ l Axl antistoff løsning (1:200 løst i kald PB), negative kontroller ble inkludert, og cellene ble inkubert i romtemperatur i 45 minutter. Deretter ble cellene vasket to ganger med PB løsningen, og supernatanten ble fjernet før cellene ble resuspendert i 100 μ l sekundært antistoff (1:5000 i PB løsning). Cellene ble inkubert 30 minutter i romtemperatur (i mørket) og deretter vasket to ganger som beskrevet over.

4.4.2.2 Flow cytometrisk analyse av fikserte celler

For fiksering, permeabilisering og immunomerking av celler for flow cytometrisk analyse fulgte vi en protokoll fra Cell Signaling

(<http://www.cellsignal.com/support/protocols/Flow.html>)

Cellene ble trypsinert på is, sentrifugert ved 800rpm i 4 min og resuspendert iskald PBS. Deretter ble cellene sentrifugert på ny, resuspendert i 1 ml 3,7 % formaldehyd i PBS og fiksert på is i 10 min. Fikseringsløsningen ble fjernet ved sentrifugering som beskrevet over. Cellepelletten ble så resuspendert i iskald 90 % metanol til en celletetthet på 2×10^6 celler/ml, og inkubert i 30 minutter på is for permeabilisering. Prøvene ble lagret ved -20°C .

For analyse ble 125 μ l celleduspensjon (250 000 celler) tilsatt i 15 ml rør. Cellene ble vasket ved å tilsette 2,5 ml inkubasjonsbuffer og ble deretter sentrifugert ved $700g$ i 5 minutter før supernatanten ble fjernet, og vaskingen ble repetert. For blokkering ble cellene resuspendert i 100 μ l inkubasjonsbuffer, og inkubert i 10 minutter ved romtemperatur, før primært antistoff ble tilsatt. Prøvene ble inkubert med primært antistoff i 60 minutter i romtemperatur, og prøvene ble deretter vasket 2 ganger med inkubasjonsbuffer som beskrevet over. Sekundært antistoff (fortynnet i inkubasjons buffer) ble tilsatt og prøvene inkubert ved romtemperatur i 30 minutter. Tilslutt ble cellene vasket 2 ganger som tidligere beskrevet, og deretter resuspendert i 0,3 ml iskald PBS. Cellene ble overført til analyserør for flow cytometri og satt på is.

4.5 Morfologi

4.5.1 Merking av celler med MitoTracker® Deep Red 633 for visualisering av mitokondriell morfologi.

For visualisering av mitokondriell morfologi i MDA-MB 231 VT/Axl- brukte vi den fluoriserende markøren MitoTracker® Deep Red (MTDR). MTDR farger mitokondriene i levende celler og akkumuleringen av proben avhenger av membranpotensialet. Eksitasjons maksimum for MTDR er 640 nm og emisjons maksimum er 662 nm.

Vi sådde ut celler på skåler med innebygd coverslipp og dagen etter ble det tilsatt MTDR til en final konsentrasjon på 500nM. Cellene ble inkubert med fargestoffet i 30 minutter. Mediet ble så fjernet og cellene ble vasket 3 ganger med rutine kulturmedium, før det ble tilsatt 1ml medium uten fenol rød supplert med 10 % FBS.

Deretter ble det tatt bilde av cellene med konfokal mikroskopet Zeiss LSM 510 Meta.

4.6 Forsøksdesign

4.6.1 Initiale proliferasjonsforsøk

Initiale forsøk ble utført for å finne optimal celletetthet for MTT, BrdU og alamarBlue ved å så ut 1000-15 000 celler/brønn på en 96-brønners MP. Cellene ble deretter inkubert ved 37°C i 24 timer før prosedyren ble utført som beskrevet i avsnitt 4.2.

4.6.2 Utvidede dybdestudier med utvalgte betingelser

4.6.2.1 Proliferasjonsbestemmelse med metabolske modulatorer

For proliferasjonsbestemmelse av MDA-MB-132 VT/Axl- behandlet med metabolske modulatorer ble celler sådd ut med en tetthet på 4000 celler per brønn på 96-brønners. Etter 24 timer ble cellene behandlet med kondisjonert medium som cellene ble inkubert med i nye 24 timer. De siste 4 timene av behandlingstiden ble cellene inkubert med MTT og BrdU. 3T3 celler ble inkludert i studiene med rotenon. I BrdU forsøkene ble rotenon og 2DG tilsatt etter dosebredden gitt i tabell 4.2, mens i MTT forsøkene ble rotenon tilsatt etter dosebredden gitt i tabell 4.2.

Absorbansen ble korrigert ved å trekke fra absorbansen fra den negative kontrollen (en brønn uten celler), og relativ proliferasjon ble beregnet som ratio av gjennomsnittet av korrigert absorbans av behandlede celler mot ubehandlede celler (kontrollen).

Tabell 4.2 Metabolske modulatorer

Modulator	Dosebredde
Rotenon (løst i EtOH) ¹⁾	0,05-10 μ M
2-deoksyglukose (løst i rutine kulturmedium)	0,34-10mM

¹⁾ Rotenon ble løst i EtOH til en final konsentrasjon på 0,2mM, og deretter tilsatt til ønsket konsentrasjon i rutine kulturmedie.

4.6.2.2 Flerparameter undersøkelse av to metabolske modulatorer

2,5 millioner MDA-MB-231 VT/Axl- celler ble sådd ut i 75cm² cellekulturflasker og inkubert under standard forhold ved 37°C i 24 timer. Deretter ble mediet erstattet med kondisjonert medium beskrevet i Tabell 4.3, og cellene ble inkubert i nye 24 timer.

Tabell 4.3 Metabolske modulatorer

Behandling	Final konsentrasjon rotenon	Final konsentrasjon 2DG
Kontroll	-	-
Lav rotenon	0,25 μ M	-
IC ₅₀ rotenon	0,5 μ M	-
Lav 2DG	-	2mM
IC ₅₀ 2DG	-	4mM

* Rotenon er giftig slik at munnbind ble brukt ved innveing. Rotenon ble løst i EtOH til en konsentrasjon på 0,2mM og deretter løst i rutine kultur medium.

*2DG ble løst i rutine kultur medium

Etter 24 timers behandling ble det utført flow cytometrisk analyse av levende celler (se appendiks 1) og fikserte celler (avsnitt 4.4.2.2), samt gjort laktat målinger (avsnitt 4.3.2).

5 Resultater

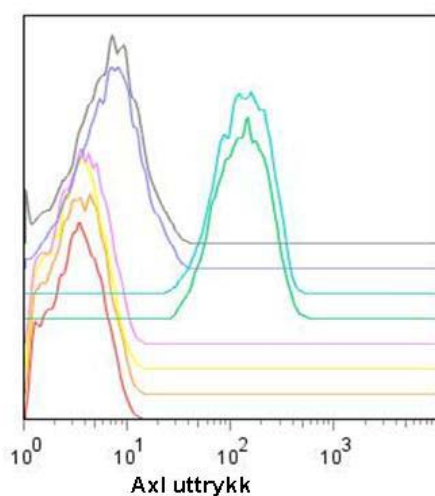
5.1 Cellemodellen

Cellelinjen MDA-MB-231 stammer fra en brystkrefttumor som ble karakterisert som aggressiv og invasiv (Zhang et al., 2008). Tyrosin kinase reseptoren Axl er overuttrykket i denne- og andre typer tumorer, og dens funksjon er blant annet knyttet til overlevelse, angiogenese og metastase (Meric et al., 2002, Linger et al., 2008). Imidlertid er Axl en relativt nyopptaget tyrosin kinase reseptor (bl.a. O'Bryan et al., 1991), og det er derfor av interesse å studere dens betydning i tumor signalisering og metabolisme.

MDA-MB-231 celler hvor uttrykket av Axl er redusert (slått ned) ble laget ved hjelp av shRNA før dette master prosjekt startet. For å forsikre oss om at uttrykkningen av Axl faktisk var lavere i den modifiserte MDA-MB-231 cellelinjen (MDA-MB-231 Axl-), sammenlignet vi uttrykket av Axl med umodifiserte villtype (VT) celler (MDA-MB-231 VT) ved hjelp av flow cytometrisk analyse og Western blotting.

MDA-MB-231 VT omtales heretter som VT, mens MDA-MB-231Axl- omtales som Axl-.

5.1.1 Karakterisering av cellemodellen med flow cytometri



	Prøve	Axl uttrykk
	Axl-	6,23
	Axl-	6,48
	VT	128,88
	VT	125,60
	Axl- sek.kontroll	3,43
	VT sek.kontroll	3,20
	Axl- autofluorescens	3,27
	VT autofluorescens	3,17

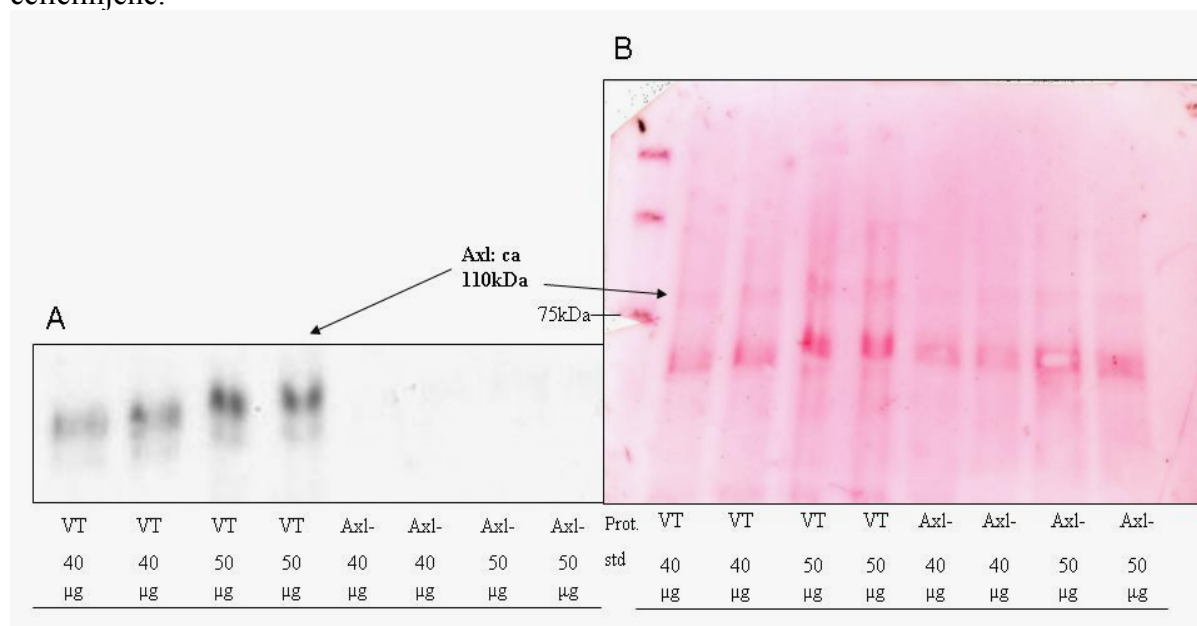
Figur 5.1 Axl underuttrykking påvist med flow cytometri

Cellene ble merket med antistoff mot Axl (1:200 i PB) og deretter sekundært antistoff konjugert med APC (1:5000 i PB). Autofluorescens kontroll og sekundær antistoff kontroll (sek.kontroll) ble inkludert. 10 000 celler per prøve ble analysert på flow cytometer.

Kurvene i **Figur 5.1** viser relativ mengde av Axl (geo.mean) i de ulike prøvene detektert med antistoff. Kurven for Axl- cellene er forskjøvet til venstre i figuren som viser at uttrykket av Axl er lavere i Axl- enn i VT cellene. Kurvene for autofluorescens og 2^o antistoff kontrollene bekrefter resultatet.

5.1.2 Karakterisering av cellemodellen med Western Blotting

Som en ekstra kontroll utførte vi Western blotting for å detektere uttrykket av Axl i de to cellelinjene.



Figur 5.2 Axl underuttrykking påvist med Western blotting

VT og Axl- celler dyrket under rutineforhold ble lysert i RIPA buffer. Lysatet ble kjørt på gel før de separerte proteinene ble overført til membran. Blottet ble merket med antistoff mot Axl, 1:3000 i PBS. A) Western Blott. B) Membranen ble farget med Ponceou S løsning for å sjekke at lik mengde protein var satt på gelen, og deretter scannet. Figuren angir hvordan brønnene ble fylt. Båndet på 75kDa fra protein standarden er indikert på figur B, og pilen til høyre indikerer hvor vi fant Axl båndet. Figuren viser ett av to identiske forsøk.

Figur 5.2 bekrefter funnet fra **Figur 5.1** og viser at uttrykket av Axl er markant lavere i de manipulte Axl- cellene. Molekylmassen til Axl er ca. 110kDa og pilen til høyre indikerer hvor vi fant båndet som er vist i **Figur 5.2 A**. Et bånd på 75kDa fra proteinstandard (prot.std.) er avmerket for sammenligning. **Figur 5.2 B** viser at de parallelle brønnene ble fylt med lik mengde protein, og at brønnene fylt med en lavere mengde protein (40µg) er svakere farget enn brønnene fylt med en høyere mengde protein (50µg).

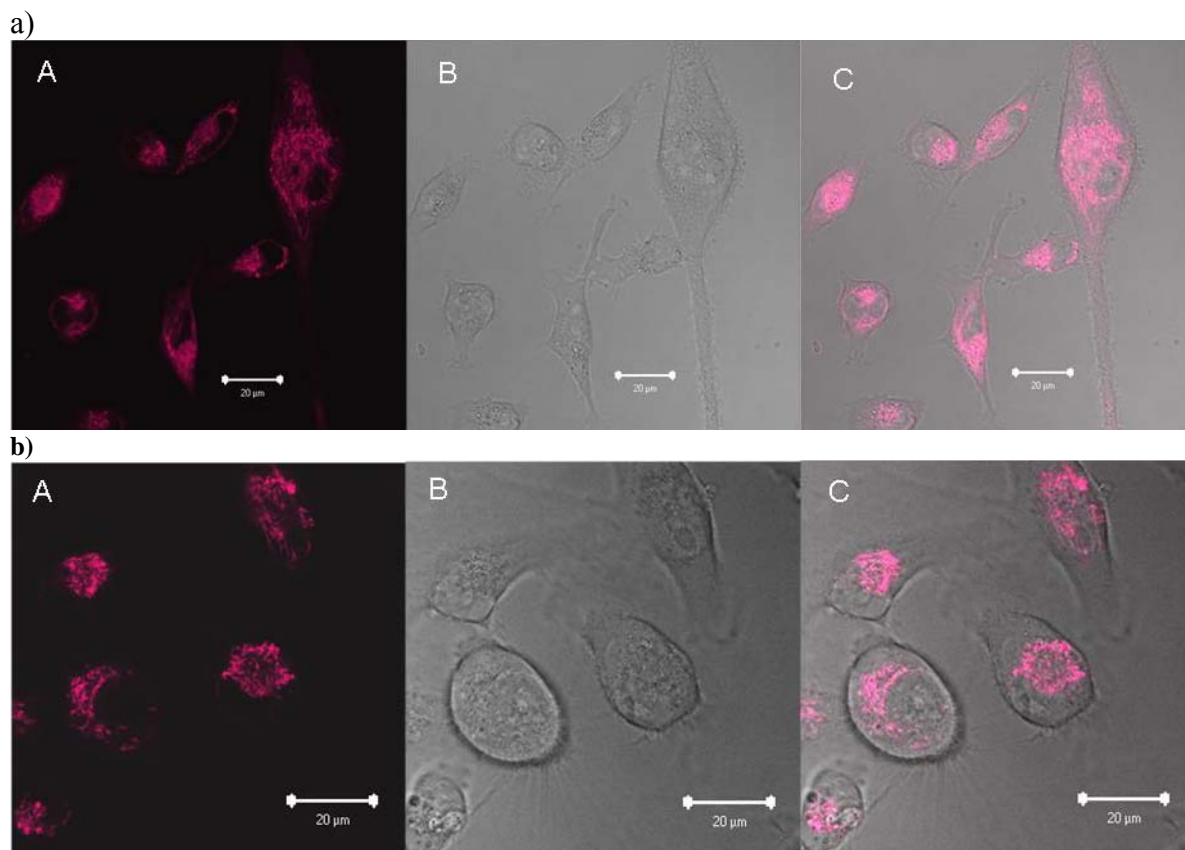
Blottet ble i tillegg merket med antistoff mot aktin, som er en anerkjent metode for å detektere lik fylling av brønnene. Ved deteksjon så vi kun skygger av brønnene i kanten av blottet (data ikke vist). Det er derfor rimelig å anta at vi ved SDS-PAGE hadde kjørt elektroforesen for lenge, slik at proteiner på molekulstørrelsen til aktin hadde vandret utenfor gelen. Aktin har

en molekylvekt på 42 kDa, sammenlignet med Axl som har en molekylvekt på ca 110 kDa. Farging av membranen med Ponceau S ble derfor brukt som alternativ metode. Som forventet viste resultatene fra flow cytometri og Western blotting at den modifiserte cellelinjen hadde et markant lavere uttrykk av Axl sammenlignet med VT cellene.

5.2 Mitokondriell morfologi i VT og Axl-

For å studere Axl sin eventuelle betydning for cellemorfologien og den mitokondrielle morfologien tok vi bilder av de to cellelinjene farget med MitoTracker® Deep red (MTDR). Bildene er angitt i **Figur 5.3** og viser at VT cellene er langstrakte med filopodier, i motsetning til Axl- cellene som er rundere og mangler filopodier. I Axl- cellene er mitokondriene i større grad samlet rundt kjernen, sammenlignet med i VT cellene som har utstrekte mitokondrier spredt i hele den cellulære matriksen. I begge cellelinjene sees mitokondriene som filamentøse nettverk.

Cellemorfologien fra bildene stemmer overens med erfaring fra studier av cellekulturene i kulturflaske under lysmikroskop, ved å bruke 10-40x objektiv. I lysmikroskopet er Axl- cellene rundere enn VT cellene, men det finnes innslag av langstrakte celler. VT cellene er sees derimot kun som langstrakte, og bare celler som har løsnet fra flaskebunnen er runde (døde celler). Derimot, i Axl- kulturen sitter de runde cellene beskrevet i **Figur 5.3b** fast til flaskebunnen (levende celler).



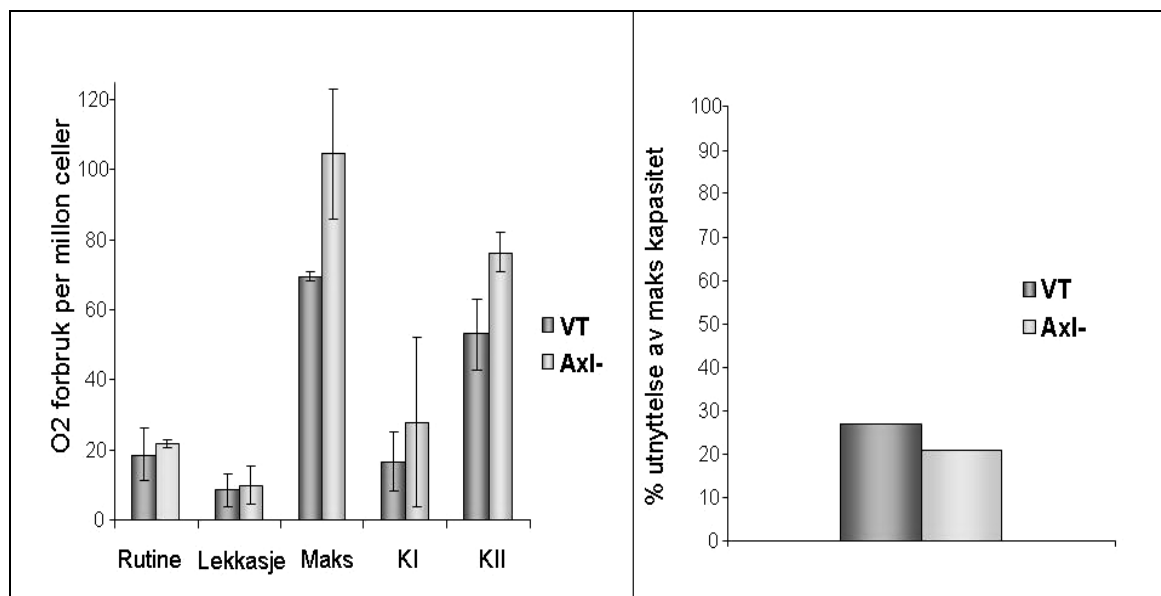
Figur 5.3 Visualisering av celle- og mitokondrie morfologi

a) VT og b) Axl- celler ble farget med MTDR med en final konsentrasjon på 500nM og deretter inkubert i 30 minutter under standard forhold i inkubator. Cellene ble så vasket tre ganger med rutine kulturmedium, før DMEM uten fenolrød ble tilsatt. Bildene er tatt med Zeiss LSM 510 Meta konfokal mikroskop med et 63x vann immersjons objektiv. MTDR ble eksitert med en laser med bølglengde på 633nm, emisjonen ble detektert fra 650nm og oppover(Long pass filter 650nm). A) MTDR, B) Differensiell interferens kontrast (DIC) bilde, C) Overlegg

5.3 Karakterisering av energimetabolismen

5.3.1 Oksygrafi

Kreftceller som har en økt aerob glykolyse viser ofte en redusert respirasjons kapasitet (Hagland et al., 2007). Fordi bildene av de to cellelinjene viste at den mitokondrielle morfologien var forskjellig ønsket vi å undersøke om respirasjonen varierte mellom cellelinjene. O₂ forbruket ble målt på oksygraf. Rutinerespirasjonen i cellene ble målt, og ved hjelp av ulike kjemikalier (se **Tabell 5.1**) ble mitokondriene manipulert for å studere ulike aspekter av respirasjonsaktiviteten.



Figur 5.4: O₂ forbruk i MDA-MB-231 VT / Axl-

Figuren viser ulike parametere av cellulær respirasjon målt i MDA-MB-231 VT/Axl- celler. Celler ble dyrket rutine kulturmedie under rutineforhold før de ble analysert på Oroboros oksygraf-2k. De ulike parametere og deres funksjon er beskrevet i **Tabell 5.1**. Grafen til høyre viser prosent utnyttelse av maks kapasitet. To forsøk ble utført og figurene viser snittet av disse.

Tabell 5.1 Kjemikalier tilsatt ved oksygrafi og parametere målt

Forkortelse	Parameter målt	Kjemikalie	Kjemikaliets funksjon
Rutine	Rutine respirasjon	Malat og glutamat	Produksjon av NADH via TCA
Lekkasje	Lekkasje av protoner gjennom MM	Oligomycin	Kompleks V hemmer
Maks	Maksimal respirasjonskapasitet	FCCP	Avkobler
KI	Kompleks I (KI) sitt bidrag til maksimal respirasjonskapasitet (KI = maks-KII)	-	-
KII	Kompleks II (KII) sitt bidrag til maksimal respirasjonskapasitet	Rotenon	Hemmer KI
% utnyttelse	Rutine/maks. Hvor stor del av den maksimale respirasjonskapasiteten cellene bruker under rutineforhold; kalles "kobling" av ETK.	-	-

Figur 5.4 viser at rutine respirasjonen i de to cellelinjene er tilnærmet lik, men at den maksimale respirasjonen i Axl- cellene er forhøyet sammenlignet med VT cellene. Dette betyr at Axl- cellene bruker en mindre del (6 % mindre) av den totale respirasjonskapasiteten under rutine forhold, sammenlignet med VT cellene (**Figur 5.4 til høyre**). VT cellene utnytter ca 1/4, mens Axl- cellene utnytter ca 1/5 av den totale respirasjonskapasiteten. Figurene viser

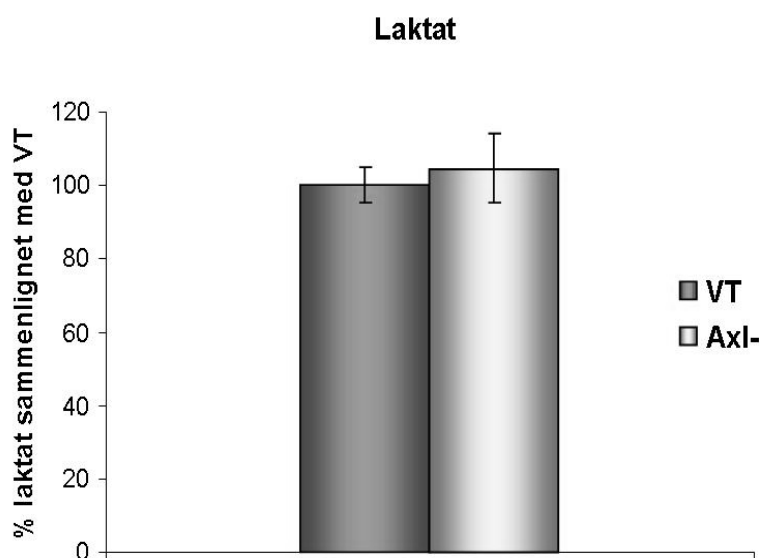
også at bidraget til den maksimale respirasjonskapasiteten er større fra kompleks II enn fra kompleks I i begge cellelinjene.

Dataene indikerer totalt sett at Axl- cellene synes å ha en høyere maksimal respirasjonskapasitet, og en lavere prosentvis utnyttelse av maks kapasitet, sammenlignet med VT cellene.

5.3.2 Aerob glykolyse og laktat produksjon

I nærvær av O₂ utskilles laktat fra cellene som et resultat av aerob glykolyse. Fenomenet er observert i en rekke tumortyper, deriblant brystkreft (Robey et al., 2005).

For å avdekke om den ene cellelinjen var mer glykolytisk enn den andre ble laktatmålinger av mediet cellene hadde gått i utført.



Figur 5.5: Laktatproduksjon i VT og Axl-

6 millioner celler av VT og Axl- ble sådd ut og dyrket under standardforhold i inkubator i 24 timer. Mediet ble deretter tatt av og analysert som beskrevet i metodedelen. Figuren viser ett av to representative forsøk oppgitt som gjennomsnitt +/- standardavvik med n=4.

Av **Figur 5.5** ser vi at de to cellelinjene er viser tilnærmet samme glykolytiske aktivitet under rutineforhold.

5.4 Proliferasjon

De observerte forskjellene mellom cellelinjene indikerte at Axl- cellene hadde en høyere maksimal respirasjon og avvikende mitokondriell morfologi sammenlignet med VT cellene.

5.4.1 Proliferasjonsmåling og celletetthet

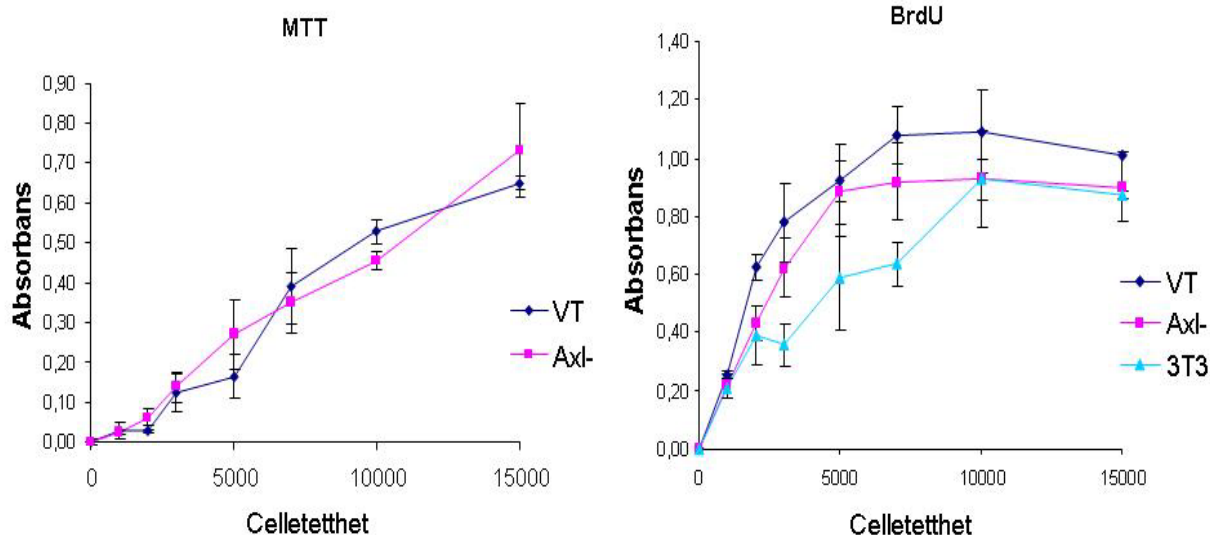
For å undersøke eventuelle forskjeller mer inngående var det naturlig å starte med å måle vekstraten til cellene. Til dette ble tre ulike metoder som detekterer proliferasjon brukt. Innledningsvis sammenlignet vi de tre deteksjonsmetodene MTT, BrdU og alamarBlue for å finne optimale testforhold med hensyn på celletetthet. Metodene benytter ulike prinsipper for måling av proliferasjon og vitalitet, hvorav MTT og alamarBlue måler enzymatisk aktivitet, mens BrdU måler DNA replikasjon (for detaljer; se Metoder). Bruk av disse metodene ville derfor også kunne gi oss tilleggsinformasjon om eventuelle fysiologiske endringer i Axl-cellene.

Vi ønsket å måle proliferasjonen i cellekulturer som var i eksponentiell vekstfase. Det var derfor viktig å tilrettelegge forsøkene slik at cellekulturene var subkonfluente, for å unngå at cellene ble påvirket av ytre faktorer som konfluens, næringsmangel og avfallstoffer.

5.4.1.1 Bestemmelse av optimal celletetthet

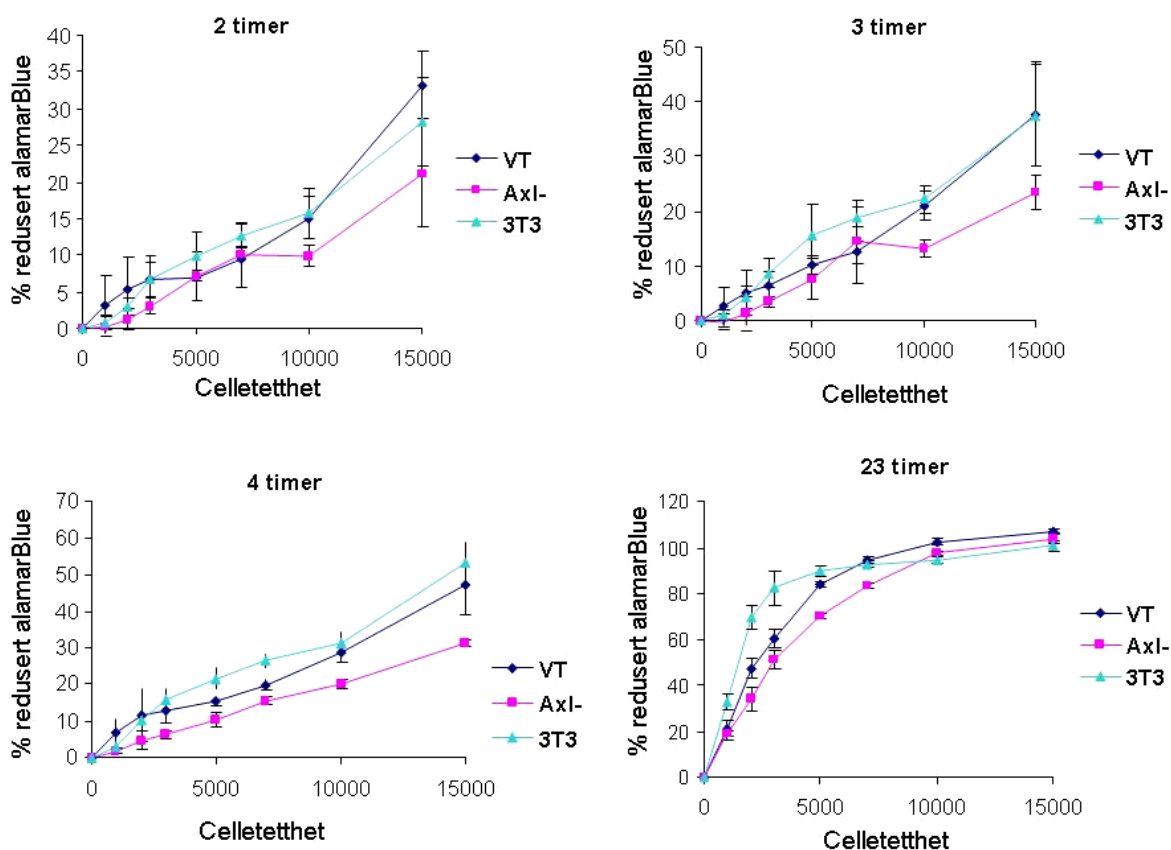
Figur 5.6 viser proliferasjonen av VT og Axl- cellene detektert med MTT og BrdU, mens **Figur 5.7** viser proliferasjonen detektert med alamarBlue. Fibroblast cellelinjen 3T3 ble inkludert som en referanse for sammenligning i forsøkene utført med BrdU og alamarBlue. MTT omdanningen øker tilnærmet lineært med økt celletetthet for både VT og Axl- cellene og tilsvarende ser vi av deteksjonen med alamarBlue etter 2, 3 og 4 timers inkubasjon. Etter 23 timers inkubering med alamarBlue er tilnærmet 100 % av den tilsatte mengden alamarBlue omdannet for celletettheter over 5000 for alle cellelinjene. Av grafene i BrdU forsøket ser vi at proliferasjonen avtar ved celletettheter over 7000celler/brønn for VT cellene, og ved celletettheter over 5000 celler/brønn for Axl- cellene, nedenfor er forholdet tilnærmet lineært. Basert på disse observasjonene er det hensiktsmessig å velge en celletetthet under 5000, og for å være på den sikre siden ble 4000 celler valgt. Dette var tilsvarende det vi fant for 3T3 cellene.

Totalt sett indikerer **Figur 5.6** og **5.7** at vekstraten til VT og Axl- cellene er tilnærmet lik under rutine forhold.



Figur 5.6 Bestemmelse av optimal celletetthet utført med MTT og BrdU

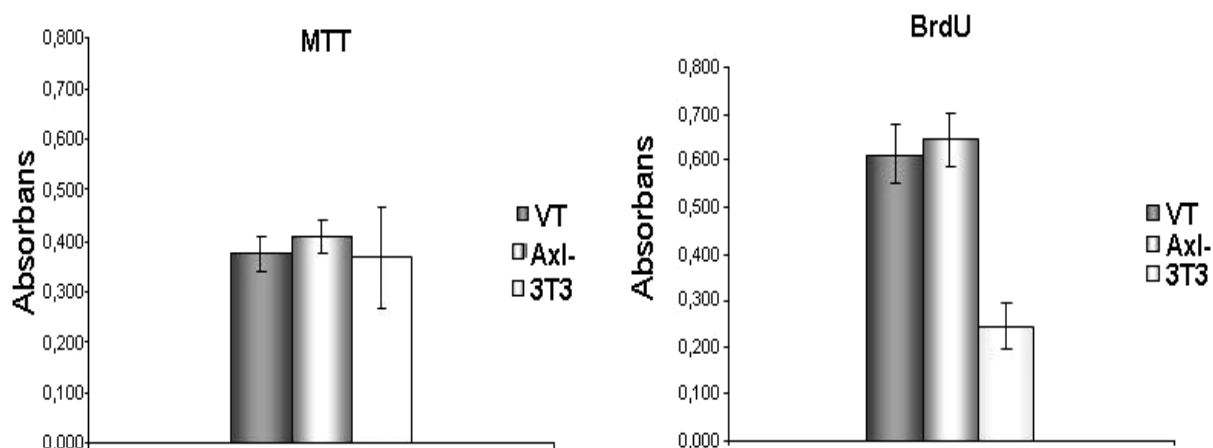
MDA-MB-231 VT/Axl- celler ble sådd ut med en tetthet på 0-15000 celler på 96-brønners MP i rutine kulturmedie. Cellene ble inkubert i 24 timer under standardforhold i inkubator, før cellene ble merket med MTT og BrdU i 4 timer. For MTT ble absorbans avlest ved 570 nm, og ved BrdU ble absorbans avlest ved 370nm (referansebølglengde på 492nm) på Asys UVM ELISA leser. Forsøket ble utført en gang og verdiene er gitt som gjennomsnitt +/- standardavvik med n=4.



Figur 5.7 Bestemmelse av optimal celletetthet utført med alamarBlue

MDA-MB-231 VT/Axl- og 3T3 celler ble sådd ut med en tetthet på 0-15000 celler på 96-brønners MP i rutine kulturmedie. 3T3 celler ble inkludert som kontroll. Cellene ble inkubert i 24 timer under standardforhold i inkubator og etter tilsetning av alamarBlue ble absorbansen avlest etter 2, 3, 4 og 23 timer ved 570nm og 600nm på Asys UVM ELISA leser. Forsøket ble utført en gang og verdiene er gitt som gjennomsnitt +/- standardavvik med n=4. Andel (%) redusert alamarBlue ble beregnet i henhold til prosedyren fra produsenten, og verdiene er gitt som gjennomsnitt +/- standardavvik med n=4.

Som en ekstra kontroll ble 4000 celler/brønn sådd ut og proliferasjonen ble detektert med MTT og BrdU. 3T3 cellelinjen ble inkludert som referanse.



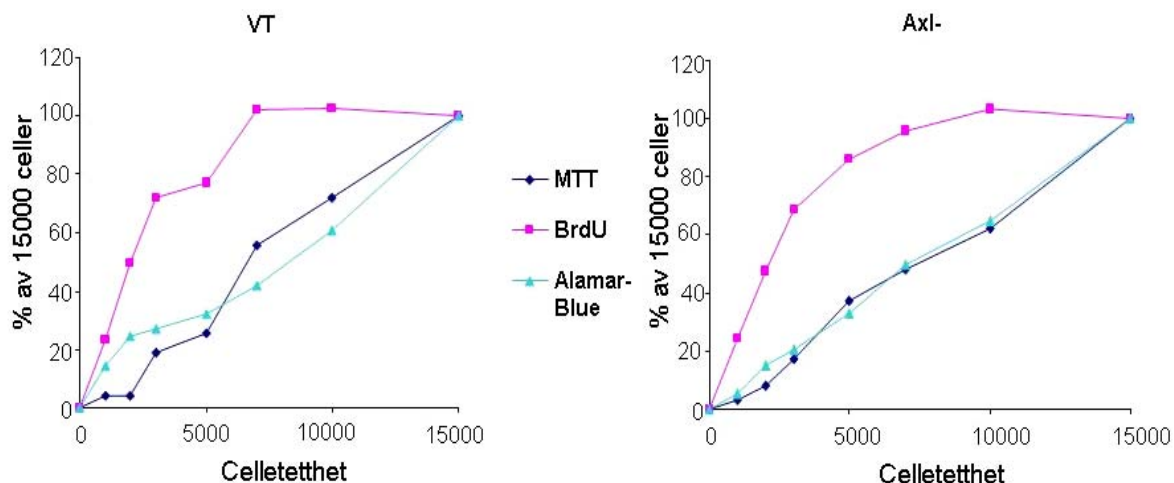
Figur 5.8: Proliferasjon under rutineforhold detektert med MTT og BrdU

MDA-MB-231VT /Axl- og 3T3 celler ble sådd ut med en celletetthet på 4000 celler/brønn på en 96-brønners MP i rutine kulturmedie og inkubert under standardforhold i 48 timer. Cellene ble inkubert med MTT og BrdU de 4 siste timene. Absorbansen ble avlest ved 570nm for MTT og ved 370nm (referansebølgelengde på 492 nm) for BrdU på Asys UVM ELISA leser. MTT forsøket er utført to ganger og BrdU forsøket er utført tre ganger. Figuren viser ett representativt forsøk for hver av metodene og verdiene er gitt som gjennomsnitt +/- standardavvik med n=4.

Figur 5.8 indikerer at VT og Axl- cellene har lik proliferasjonsprofil under rutineforhold, detektert med både MTT og BrdU. Imidlertid var resultatene noe varierende for 3T3 cellene som kan skyldes at cellene hadde gått for tett og differensiert.

5.4.1.2 Sammenligning av metodene

Figur 5.9 viser at inkorporeringen av BrdU avtar ved høye celletettheter, mens omdanningen av MTT og alamarBlue øker tilnærmet lineært. Metodene har forskjellige analyseprinsipper; MTT og alamarBlue omdannes av metabolske enzymer, mens BrdU inkorporeres i DNA under DNA syntese.



Figur 5.9: Relativ sammenligning av proliferasjon målt med MTT, BrdU og alamarBlue

Figur 5.6 og 5.7 fremstilt som prosent av absorbansen til 15000 celler for hver av de tre proliferasjonsmetodene utført. For de tre metodene er cellene inkubert med henholdsvis MTT, BrdU og alamarBlue i 4 timer.

Standardavvik er utelatt for å gjøre figuren mer oversiktlig, men de er gitt i Figur 5.6 og 5.7.

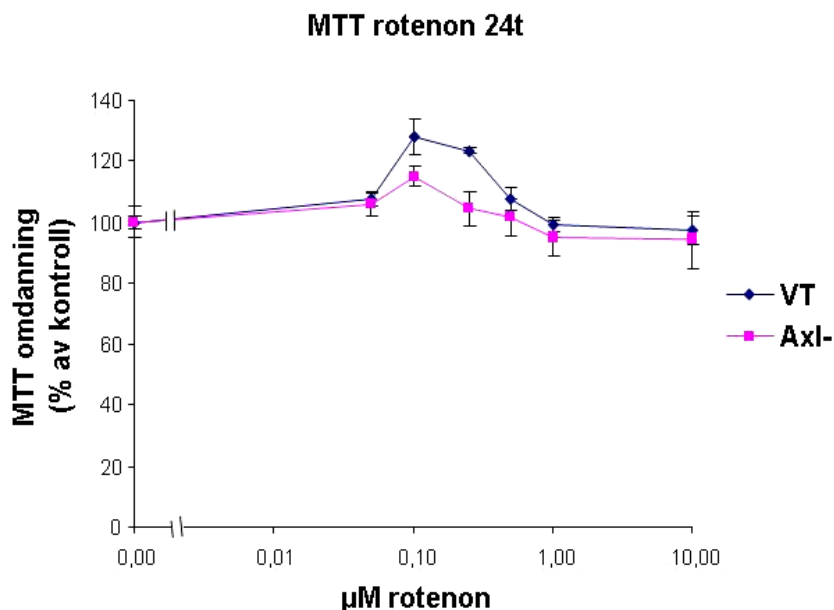
5.4.2 Metabolsk manipulering og proliferasjonsbestemmelse

Vi ønsket å studere proliferasjonsprofilen til VT og Axl- cellene ved metabolsk modulering.

Ved å manipulere cellene med de metabolske inhibitorene rotenon og 2DG ønsket vi å undersøke om de to celledinjene responderte forskjellig. Siden MTT og alamarBlue assayene viste veldig like resultater bestemte vi oss for å bruke MTT og BrdU i videre studier.

Rotenon inhiberer kompleks I i respirasjonskjeden, og ved å behandle celler med rotenon kan vi avgjøre hvor avhengige cellene er av respirasjonen for å vokse. Metabolsk fleksible celler kan øke den glykolytiske raten for å opprettholde energiproduksjonen, eller benytte alternative metabolske ruter for å kjøre respirasjonen via respirasjonskompleks II (Hagland et al., 2007). 2DG er en glykolysehemmer som inhiberer heksokinase (HK) som katalyserer det første steget i glykolysen. Ved inhibering av HK må cellene finne alternative katabolske ruter for å opprettholde proliferasjonen.

Vi ønsket å finne den konsentrasjonen av rotenon og 2DG som gav 50 % hemming av proliferasjonen, $IC_{50 \text{ ROTENON}}$ og $IC_{50 \text{ 2DG}}$, i MDA-MB-231 VT/Axl- ved hjelp av MTT og BrdU, og detektere eventuelle forskjeller mellom celledinjene med tanke på sensitiviteten ovenfor inhibitorene.

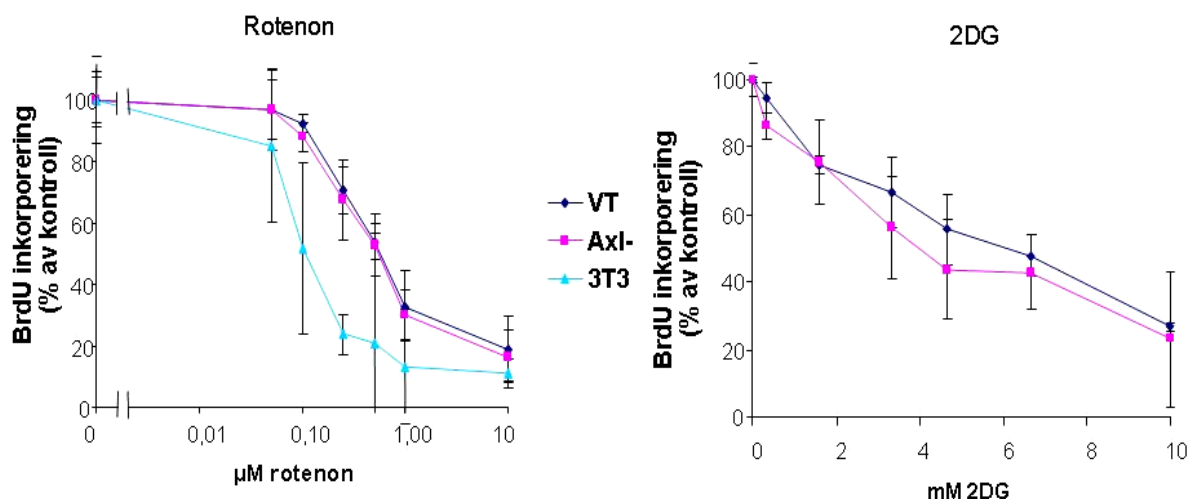


Figur 5.10: Dosekurve av rotenon etter 24 timers behandling, utført med MTT

Celler ble sådd ut i rutine kulturmedie med en tetthet på 4000 celler per brønn på 96-brønners MP og inkubert under standardforhold i 24 timer. Deretter ble rotenon tilsatt i dosebredden 0-10µM og cellene ble inkubert i nye 24 timer. De siste 4 timene av behandlingstiden ble cellene inkubert med MTT. Absorbans ble avlest på Asys UVM ELISA leser ved 570nm. Prosedyren ble for øvrig utført som beskrevet i avsnitt 4.2.1. Figuren viser ett representativt forsøk av i alt to utførte forsøk, og verdiene er gitt som gjennomsnitt +/- standardavvik med n=4.

Vi forventet at proliferasjonen skulle avta med økende konsentrasjon rotenon, men av **Figur 5.10** ser vi at dette ikke er tilfelle i vårt forsøk. Forsøket ble også repetert med tilnærmet samme resultat. Dette kan skyldes metodologiske feilkilder eller molekylære interaksjoner mellom rotenon og MTT. Av tidsmessige hensyn ble det besluttet at MTT assayet skulle tas ut i de videre studiene.

Figur 5.11 indikerer at VT og Axl- cellene har samme vekstrate ved hemming av respirasjonen (**Figur 5.11** til venstre) og ved hemming av glykolysen (**Figur 5.11** til høyre). På grunnlag av henholdsvis tre og to forsøk ble $IC_{50\text{ ROTENON}}$ beregnet til ca 0,5µM og $IC_{50\text{ 2DG}}$ beregnet til ca 4mM for både VT og Axl- cellene.



Figur 5.11: Dosekurve av rotenon og 2DG

Celler ble sådd ut i rutine kulturmedie med en tetthet på 4000 celler per brønn på 96-brønners MP, og inkubert under standardforhold i 24 timer. Rotenon ble deretter tilsatt i dosebredden 0-10µM mens 2DG ble tilsatt i dosebredden 0-10mM, og cellene ble inkubert i nye 24 timer. De siste 4 timene av behandlingstiden ble cellene inkubert med BrdU. Cellelinjen 3T3 ble inkludert som kontroll i rotenon forsøket. Førørig ble prosedyrene utført i henhold til instruks fra produsent. Absorbans og fluoresens ble avlest på Asys UVM ELISA leser. Figuren viser ett representativt forsøk av i alt tre utførte forsøk for rotenon og to forsøk for 2DG, og verdiene er gitt som gjennomsnitt +/- standardavvik med n=4. Imidlertid sprikte resultatene for 3T3 mellom de ulike rotenon forsøkene.

5.5 Multiparameter analyse av to metabolske modulatorer

Til nå har proliferasjonsstudiene vist at VT og Axl- cellene har tilnærmet lik proliferasjonsprofil under rutineforhold, og at de responderer likt ved behandling av de to metabolske modulatoren rotenon og 2DG. Imidlertid viser bildene at Axl- cellenes mitokondrie morfologi avviker fra VT cellenes, samtidig som oksygraf dataene indikerer at det er en forskjell i respirasjonen.

For å studere eventuelle bakenforliggende mekanismer for observasjonene ble cellene behandlet som angitt i **Tabell 5.2** i 24 timer, og ulike metabolske parametere ble målt.

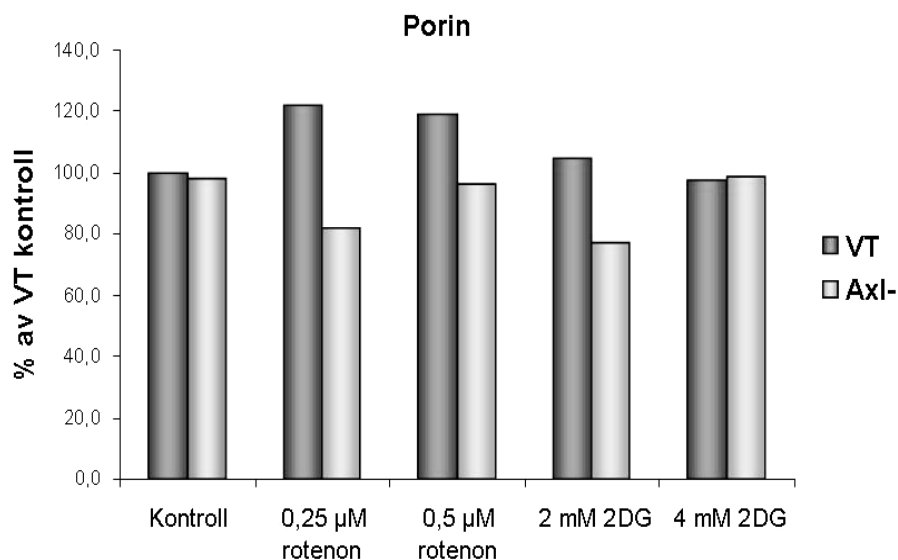
Tabell 5.2 Behandling av cellene for utførelse av multiparameter analyse

Behandling	Konsentrasjon
Rotenon IC ₅₀	0,5µM
Rotenon ½ IC ₅₀	0,25µM
2DG IC ₅₀	4mM
2DG ½ IC ₅₀	2mM

5.5.1 Deteksjon av relativ mitokondriemengde

Cellenes evne til å opp- og nedregulere mitokondriemengden som respons på miljøforandringer gir en indikasjon på hvor metabolsk fleksible cellene er. Proteinet porin, også omtalt som spennings avhengig anion kanal (VDAC), finnes kun i den YMM, og deteksjon av proteinet benyttes som et relativt mål av mitokondriemengden.

Vi var interessert i å undersøke om mitokondriemengden varierte mellom cellelinjene MDA-MB-231 VT/Axl-, og om mitokondriemengden ble påvirket av metabolsk påkjenning fra de to metabolske modulatorene rotenon og 2DG.



Figur 5.12: Deteksjon av porin utført med flow cytometrisk analyse

6 millioner VT og Axl- celler ble sådd ut i rutine kulturmedie og inkubert i 24 timer under rutine forhold. Mediumet ble fjernet og erstattet med kondisjonert kulturmedie tilsatt rotenon og 2DG (konsentrasjonene angitt i Tabell 5.2), kontroll ble inkludert, og cellekulturene ble inkubert i nye 24 timer. Cellene ble deretter trypsinert på is, fiksert og permeabilisert. For flow cytometrisk analyse ble cellene merket med antistoff mot porin og deretter sekundært antistoff (Alexa 647). 10 000 celler/behandling ble analysert på flow cytometer. Forsøket ble utført en gang.

Figur 5.12 viser deteksjon av porin i VT og Axl- cellene relativt til VT kontroll, angitt i prosent. Ved deteksjon av porin fant vi at mitokondriemengden er tilnærmet lik i de to ubehandlede cellelinjene. For VT cellene fører behandling med rotenon til en ca 20 % økning av mitokondriemengden for begge konsentrasjoner, mens celler behandlet med 2DG ikke viser noen forskjell sammenlignet med VT kontroll. For Axl- cellene viser figuren at mitokondriemengden reduseres med 20 % ved tilførsel av 0,25µM rotenon og 2mM 2DG sammenlignet med Axl- kontroll, mens tilføring av 0,5µM rotenon og 4mM 2DG ikke gir noen endring av betydning sammenlignet med Axl- kontroll.

5.5.2 Flow cytometrisk analyse av Akt og AMPK uttrykking og fosforylering

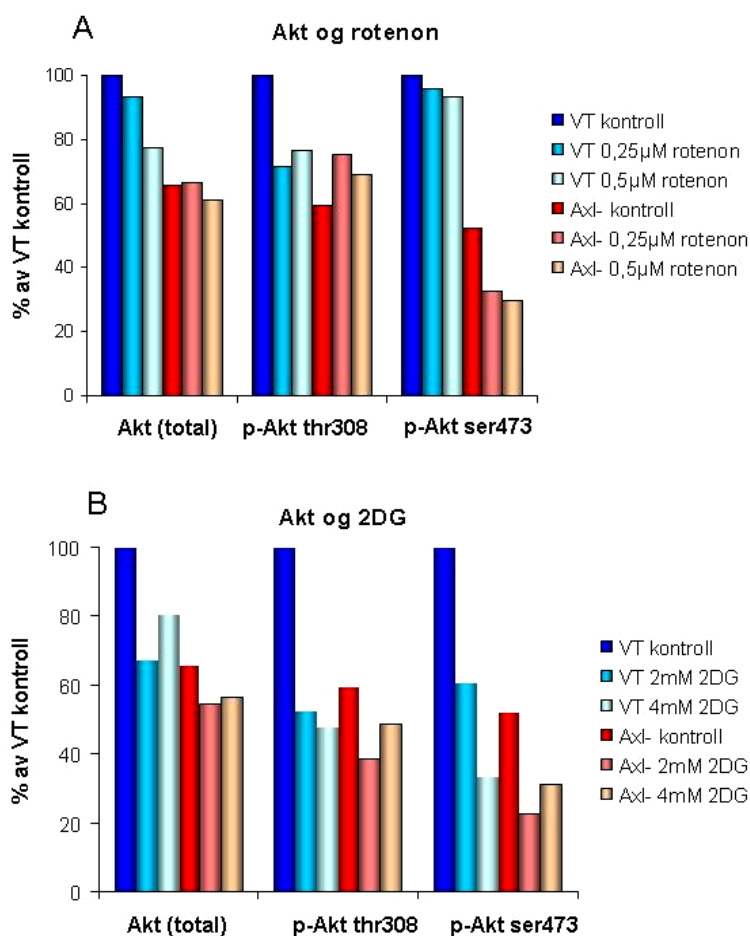
Ut fra de ulike funnene beskrevet over var det av interesse å studere faktorer som bidrar til reguleringen av cellulær metabolisme og proliferasjon. Signalveier mediert via Akt og AMPK regulerer blant annet cellevekst og proliferasjon avhengig av ytre og indre cellulære forhold

som næringstilgang og stress. I tillegg er dysfunksjon i de to signalveiene assosiert med økt overlevelse og proliferasjon, samt avvikende energimetabolisme i tumorceller.

5.5.2.1 Akt

Akt signalvei er oppregulert i en rekke tumorer og er assosiert med det glykolytiske skiftet som beskrives i litteraturen (Elstrom et al., 2004). Under stressende forhold fører Akt mediert signalisering til økt celleoverlevelse ved å hemme initiering av apoptose (Pastorino et al., 2005). Aktiviteten til Akt avhenger av fosforyleringsgraden til de to fosforyleringssetene serin 473 og threonin 308. Fosforylering av begge setene er nødvendig for maksimal Akt aktivering. Ved å bruke Akt-spesifikke antistoffer ble uttrykket og fosforyleringsstatusen til Akt bestemt i VT og Axl- cellene ved hjelp av flow cytometri.

Figur 5.13 angir de ulike parametrene som prosent av VT kontroll. De ulike parametere for hvert forsøk er også oppgitt i **Tabell 5.3** og **5.4** som prosentvise verdier av VT kontroll. For ubehandlede celler viser figurene at både uttrykket av Akt, og de fosforylerte formene av Akt, er betydelig lavere i Axl- cellene, sammenlignet med i VT cellene (ca 35-50 % reduksjon). Forskjellen er størst for p-Akt_{ser473}. (Tallmaterialet er det samme for ubehandlede celler i **Figur 5.13 A** og **B**).



Figur 5.13 Flow cytometrisk analyse av Akt

6 millioner celler av MDA-MB-231 VT/Axl- ble sådd ut i rutine kulturmedie og inkubert i 24 timer under rutine forhold. Mediet ble fjernet og erstattet med kondisjonert kulturmedie tilsatt de metabolske modulatorene rotenon (A) og 2DG (B) etter konsentrasjonene angitt i Tabell 5.2, kontroll ble inkludert, og cellekulturene ble inkubert i nye 24 timer. Cellene ble deretter trypsinert på is, fiksert og permeabilisert. For flow cytometrisk analyse ble cellene merket med henholdsvis anti-Akt_{total}, anti-p-Akt_{thr308} og anti-p-Akt_{ser473}, og deretter sekundært antistoff (Alexa647). 10 000 celler/behandling ble analysert på flow cytometer. Forsøket ble utført en gang. Tallmaterialet er det samme for ubehandlede celler i figur A og B.

Rotenon og Akt

Figur 5.13 A viser at ved rotenonbehandling av VT cellene er fosforylerings statusen til Akt relativt uforandret, påvist ved deteksjon av p-Akt_{ser473}. Rotenonbehandling av Axl- cellene har liten effekt for Akt_{total} uttrykket, men fosforyleringen av serin 473 i Axl- cellene redusert med 2/3 sammenlignet med *behandlede* VT celler. Ut fra våre data indikerer dette at Akt aktiviteten er betydelig redusert i Axl- cellene. Effektene av respirasjonshemming for uttrykket av de tre formene for Akt ser ut til å være doseavhengig i begge cellelinjene, selv om den doseavhengige forskjellen er liten.

2DG og Akt

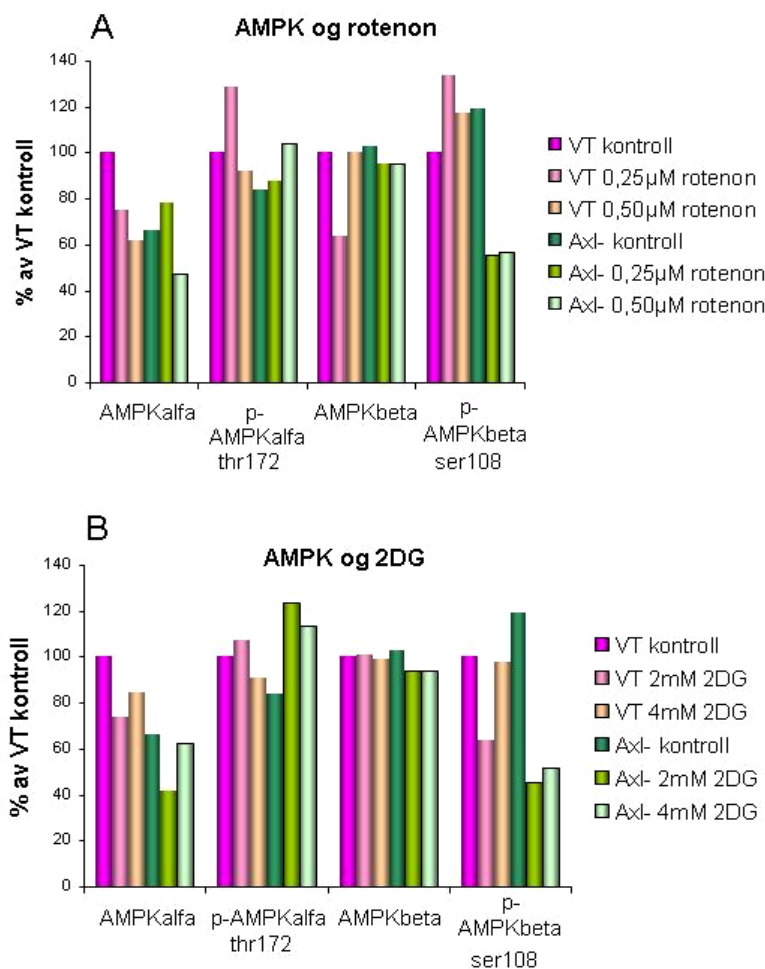
Figur 5.13 B viser at uttrykket av Akt_{total} og de to fosforylerte formene ved behandling med 2DG er betydelig redusert i VT cellene, sammenlignet med kontrollene. Det reduserte uttrykket er doseavhengig for de fosforylerte formene av Akt. I VT cellene utgjør p-Akt_{ser473} kun ca 30 % av av VT kontroll ved behandling med 4mM 2DG, som indikerer en betydelig redusert Akt aktivitet. I Axl- cellene avtar også fosforyleringsstatusen til Akt ved 2DG behandling, sammenlignet med kontrollene. Imidlertid er uttrykket av de tre formene for Akt under rutine forhold lavere i Axl- cellene enn i VT cellene, slik at Axl- cellene relativt sett er mindre sensitive for behandling med 2DG i forhold til VT cellene.

5.5.2.2 AMPK

AMPK har en viktig posisjon i cellene når det gjelder å balansere celleproliferasjon i forhold til næringstilgang, og faktoren aktiveres ved forhøyet AMP:ATP ratio. AMPK kan også sees på som en motpart til Akt fordi aktivert AMPK indirekte inhiberer faktoren (Inoki et al., 2003). Ved å påføre cellene metabolsk stress forventer vi en forhøyet AMPK aktivitet, og aktiviteten avhenger av fosforyleringsgraden til threonin172 på α -subenheten (Woods et al., 2003). Fosfospesifikke antistoffer kan derfor brukes ved flow cytometri for å måle den relative AMPK aktiviteten.

Figur 5.14 angir i prosent uttrykket av de ulike parametrene målt sammenlignet med VT kontroll. Sammenligning av de ulike parametre for hvert forsøk er også oppgitt i **Tabell 5.3** og **5.4** som prosentvise verdier av VT kontroll.

Figuren viser at i ubehandlede celler er uttrykket av AMPK α og p-AMPK α_{thr172} lavere i Axl - cellene, henholdsvis 34 % og 16 %, sammenlignet med VT cellene, mens uttrykket ikke varierer mellom de to cellelinjene for AMPK β . For p-AMPK β_{ser108} er uttrykket i ubehandlede celler ca 20 % høyere i Axl- sammenlignet med VT cellene. (Tallmaterialet er det samme for ubehandlede celler i begge **Figur 5.14 A** og **B**).



Figur 5.14 Flow cytometrisk analyse av AMPK

6 millioner celler av MDA-MB-231 VT/Axl- ble sådd ut i rutine kulturmedie og inkubert i 24 timer under standard forhold. Mediumet ble fjernet og erstattet med kondisjonert kulturmedie tilsatt rotenon og 2DG etter konsentrasjonene angitt i Tabell 5.2, kontroll ble inkludert, og cellekulturene ble inkubert i nye 24 timer. Cellene ble deretter trypsinert på is, fiksert og permeabilisert. For flow cytometrisk analyse ble cellene merket med anti-AMPK α , anti-p-AMPK α_{thr172} , anti-AMPK β og anti AMPK β_{ser108} og deretter sekundært antistoff (Alexa 647). 10 000 celler/behandling ble analysert på flow cytometer. To forsøk ble utført med tilsvarende resultat for AMPK α , mens de andre forsøkene ble utført en gang. Tallmaterialet er det samme for ubehandlede celler i begge figurene.

AMPK og rotenon

Figur 5.14 A viser rotenonavhengige variasjoner av uttrykket av AMPK i MDA-MB-231VT/Axl-. Vi observerer at uttrykket av AMPK α er lavere i VT cellene ved behandling med rotenon sammenlignet med kontroll, og effekten synes å være doseavhengig. Samtidig viser figuren at uttrykket av p-AMPK α_{thr172} øker ved rotenonbehandling i begge cellelinjer som forventet. For AMPK β sees ingen rotenon avhengige variasjoner for cellelinjene. Figuren viser imidlertid et økt uttrykk av p-AMPK β_{ser108} i VT cellene ved behandling med rotenon, mens en tydelig motsatt effekt sees i Axl- cellene.

AMPK og 2DG

Figur 5.14 B viser 2DG avhengige variasjoner for uttrykket av AMPK i cellelinjene. I både VT og Axl- cellene ser vi et redusert uttrykk av AMPK_{alfa}, samt en økning i fosforylering av p-AMPK_{α_{thr172}} ved behandling. Det økte uttrykket av p-AMPK_{α_{thr172}} er mest uttalt for Axl- cellene. Uttrykket av AMPK_β er tilnærmet uforandret i begge cellelinjene. For p-AMPK_{β_{ser108}} reduseres uttrykket betraktelig ved behandling med 2DG i Axl- cellene, tilsvarende det reduserte uttrykket vi ser ved behandling med rotenon.

Totalt sett, ved behandling med rotenon og 2DG, reduseres uttrykket av AMPK_α mens uttrykket av AMPK_β er relativt uforandret i cellelinjene. Fosforyleringen av threonin 172 øker i begge cellelinjene som forventet, men for p-AMPK_{β_{ser108}} observerte vi et betydelig redusert uttrykk i Axl- cellene.

AMPK-deaktivert ACC

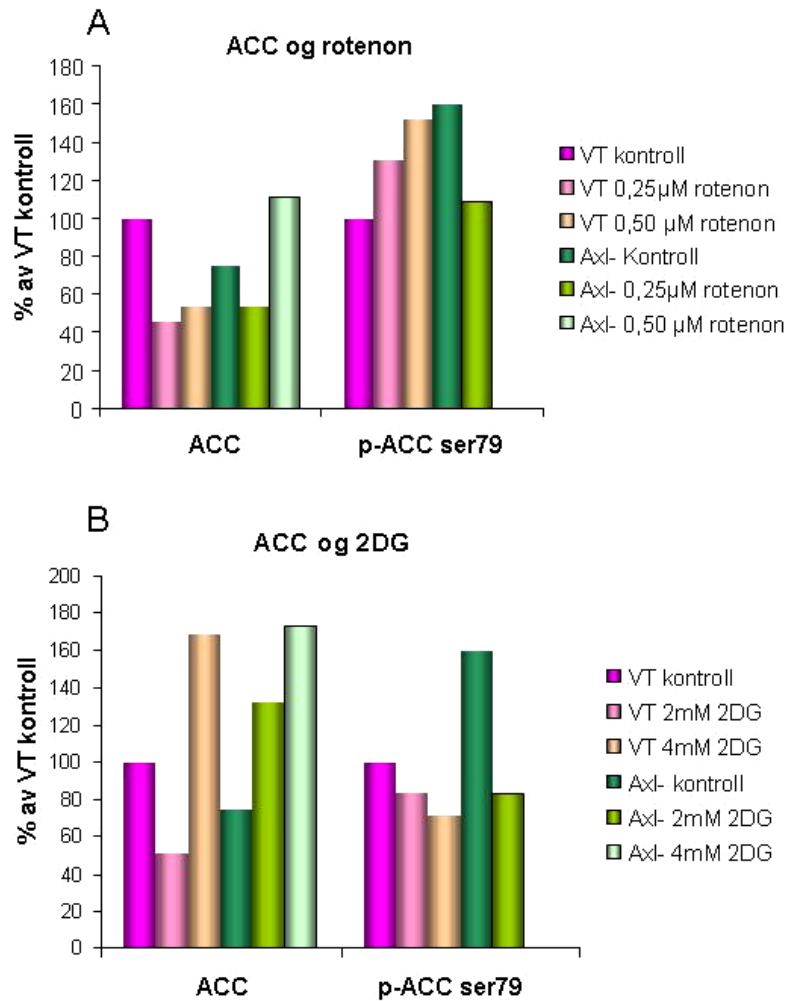
ACC deaktiveres nedstrøms for AMPK, og fosforylering av serin 79 indikerer inaktivitet (Carlson et al., 1973). Vi forventer derfor at uttrykket av p-ACC_{ser79} følger uttrykket av p-AMPK_{α_{thr172}} og p-AMPK_{β_{ser108}}, samt at uttrykket av p-ACC_{ser79} øker ved behandling med de metabolske inhibitorene rotenon og 2DG.

Figur 5.15 angir uttrykket av de ulike parametrene i prosent sammenlignet med VT kontroll. Sammenligning av de ulike parametre for hvert forsøk er også oppgitt i **Tabell 5.3** og **5.4** som prosentvise verdier av VT kontroll.

Figuren viser at i ubehandlede celler er uttrykket av ACC lavere i Axl- enn i VT cellene, mens fosforylering av serin 79 i ubehandlede Axl- celler er økt med 60 % sammenlignet med i VT cellene. (Tallmaterialet er det samme for ubehandlede celler i **Figur 5.15 A** og **B**).

Ved behandling med rotenon (**A**) avtar uttrykket av ACC i VT cellene, mens fosforylering av p-ACC_{ser79} som forventet øker. Denne økningen korrelerer med økt fosforylering av p-AMPK_{α_{thr172}} omtalt tidligere. For Axl- cellene er fosforyleringsstatusen til serin 79 lavere ved rotenonbehandling, som kan sammenlignes med nedgangen for p-AMPK_{β_{ser108}} (omtalt tidligere).

Ved behandling med 2DG (**B**) øker uttrykket av ACC i både VT og Axl- cellene. Derimot ser vi en nedgang av p-ACC_{ser79} i begge cellelinjene. Sistnevnte kan sammenlignes med det reduserte uttrykket vi observerer for p-AMPK_β i Axl- cellene.



Figur 5.15 Flow cytometrisk analyse av ACC og p-ACC_{ser79}

6 millioner celler av MDA-MB-231 VT/Axl- ble sådd ut i rutine kulturmedie og inkubert i 24 timer under standard forhold. Mediumet ble fjernet og erstattet med kondisjonert kulturmedie tilsatt de metabolske modulatorene rotenon og 2DG etter konsentrasjonene angitt i figuren (IC_{50} verdi og $\frac{1}{2} IC_{50}$ verdi), kontroll ble inkludert, og cellekulturene ble inkubert i nye 24 timer. Cellene ble deretter trypsinert på is, fiksert og permeabilisert. For flow cytometrisk analyse ble cellene merket med antistoff mot ACC og antistoff mot p-ACC_{ser79}, og deretter sekundært antistoff (Alexa 647). 10 000 celler/behandling ble analysert på flow cytometer. Forsøket ble utført en gang. Tallmaterialet er det samme for ubehandlede celler i begge figurene.

Tabell 5.3 Relative avvik av Akt, AMPK og ACC i MDA-MB-231 VT/Axl- behandlet med rotenon.

Antistoff	Behandling					
	VT			Axl-		
	Kontroll	0,25µM rotenon	0,5µM rotenon	Kontroll	0,25µM rotenon	0,5µM rotenon
Akt relaterte						
Akt _{total}	-	- 8%	- 23%	-34%	-34%	-39%
p-Akt _{thr308}	-	-29%	-24%	-41%	+25%	+31%
p-Akt _{ser473}	-	-4%	-7%	-48%	-67%	-71%
AMPK relaterte						
AMPK α	-	-25	-38	-34	-21	-53
AMPK β	-	-36	0	+3	-5	-5
p-AMPK α _{thr172}	-	+29	-8	-16	-12	+4
p-AMPK β _{ser108}	-	+33	+17	+19	-45	-44
ACC	-	-54	-47	-25	-47	+11
p-ACC _{ser79}	-	+30	+52	+60	+9	Data mangler

Verdiene er beregnet som relative avvik i prosent sammenlignet med villtype (VT) kontroll.

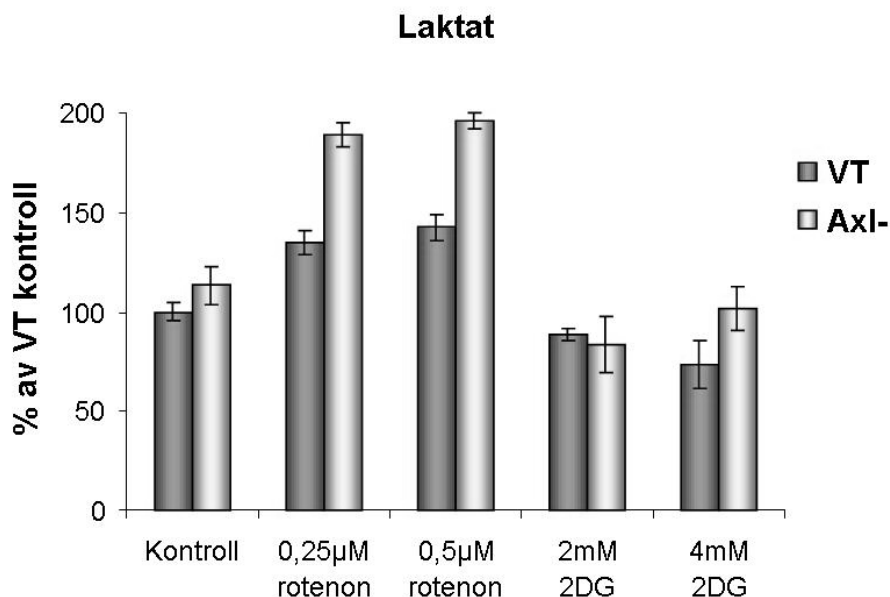
Tabell 5.4 Relative avvik av Akt, AMPK og ACC i MDA-MB-231 VT/Axl- behandlet med 2DG.

Antistoff	Behandling					
	VT			Axl-		
	Kontroll	2mM 2DG	4mM 2DG	Kontroll	2mM 2DG	4mM 2DG
Akt relaterte						
Akt _{total}	-	-33%	-19%	-34%	-46%	-44%
p-Akt _{thr308}	-	-48%	-52%	-41%	-62%	-51%
p-Akt _{ser473}	-	-39%	-66%	-48%	-77%	-69%
AMPK relaterte						
AMPK α	-	-26	-16	-44	-58	-37
AMPK β	-	+1	-1	+3	-6	-6
p-AMPK α _{thr172}	-	+7	-9	-16	+24	+13
p-AMPK β _{ser108}	-	-36	-2	+19	-55	-48
ACC	-	-50	+69	-25	+32	+73
p-ACC _{ser79}	-	-16	-29	+60	-18	Data mangler

Verdiene er beregnet som relative avvik i prosent sammenlignet med villtype (VT) kontroll.

5.5.3 Laktat

Fra proliferasjonsstudiene fant vi at cellelinjene viser den samme overlevelsen under stressede forhold. Vi ønsket derfor å belyse en annen side av cellenes evne til å omstille seg metabolsk når a) respirasjonen hemmes og når b) glykolysen hemmes, ved å måle laktatproduksjonen og studere eventuelle forskjeller.



Figur 5.16 Laktatproduksjon i VT og Axl- cellene

6 millioner celler av VT og Axl- ble sådd ut og dyrket i rutine kulturmedie under standardforhold i inkubator i 24 timer. Mediet ble fjernet og erstattet med kondisjonert medium tilsatt de metabolske modulatorene rotenon og 2DG, som angitt i Tabell 5.2, og inkubert under standard forhold i nye 24 timer. Medium ble deretter tatt ut og laktatmålinger utført som beskrevet i metodedelen. Figuren viser ett representativt forsøk av totalt to utførte forsøk, og verdiene er gitt som gjennomsnitt +/- standardavvik med n=4.

Som beskrevet i avsnitt 5.3.2 ser vi av figuren at Axl- cellene viser samme glykolytisk aktivitet som VT cellene under normale forhold (samme tallmateriale som i figur 5.5).

Som forventet viser **Figur 5.16** at begge cellelinjene oppregulerer glykolysen ved respirasjonshemming, og at glykolysen hemmes ved behandling med 2DG. Figuren indikerer imidlertid at ved respirasjonshemming har Axl- cellene en høyere laktatproduksjon enn VT cellene, og de kompenserer relativt sett mer enn VT cellene ved å oppregulere den glykolytiske aktiviteten.

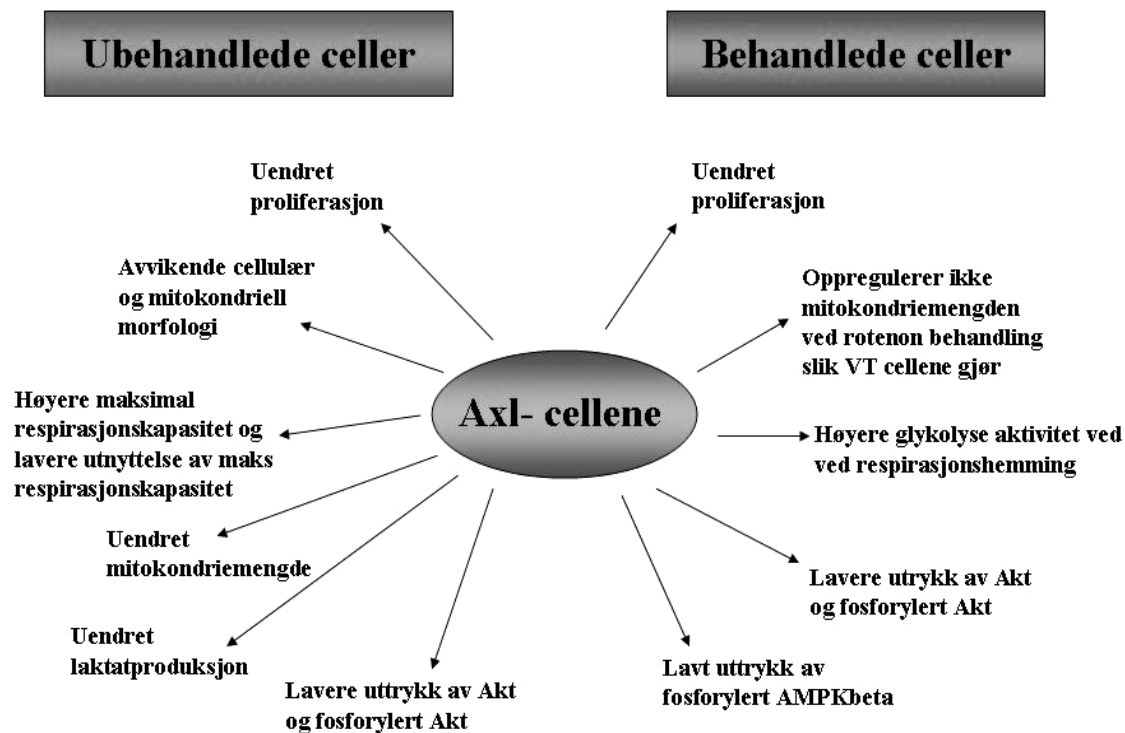
Samlet sett indikerer dataene fra porin deteksjon og laktat målinger at ved respirasjonshemming oppregulerer VT cellene mitokondriemengden, mens Axl- cellene kompenserer ved å oppregulere glykolysen.

6 Diskusjon

Denne studien har tatt for seg å undersøke proliferasjonsprofilen og ulike aspekter av metabolismen i cellelinjene MDA-MB-231 VT/Axl-, for å belyse om Axl signalisering kan være involvert i noen av prosessene som fører til det glykolytiske skiftet observert i tumorer. Brystkreft cellelinjen MDA-MB-231 er karakterisert som aggressiv og invasiv, og har en høyere glykolyse aktivitet sammenlignet med brystkreft cellelinjer med lavere invasivitet (Zhang et al., 2008, Robey et al., 2005). Fra litteraturen vet vi at Axl er involvert i ulike prosesser tilknyttet metastase, derav i MDA-MB-231 (Holland et al., 2005). Noen av signalnettverkene som kontrollerer disse prosessene er også involvert i oppreguleringen av glykolysen i tumorer, og forståelse av de underliggende mekanismene er derfor viktig for å kunne utvikle målrettet terapi.

Etter hva vi kjenner til har få studier tidligere omtalt problemstillingen som her er beskrevet, i alle fall ikke med den samme innfalsvinkelen. Vi har derfor brukt flere ulike metoder for å prøve å kartlegge og danne et oversiktsbilde av Axl sin potensielle rolle i tumor metabolisme. Denne diskusjonen er basert på de observasjonene og tolkningene vi har gjort basert på våre data, med vitende om at repetisjon av enkelte forsøk vil være nødvendig for å trekke sikre konklusjoner. Metodenes begrensninger blir også omtalt. Omfanget av oppgaven og tidsaspektet har satt sin begrensning for hva som er mulig å gå inn på og studere i detalj når det kommer til de utallige signalveiene som potensielt kan bidra til trendene vi har observert. Nye studier kan bekrefte eller avkrefte de observasjonene som her blir diskutert.

Ved test av cellemodellen fant vi at Axl uttrykket var betydelig lavere i den modifiserte cellelinjen, som indikerte at vi kunne bruke cellemodellen i videre studier. **Figur 6.1** oppsummerer resultatene våre.



Figur 6.1 Oppsummering av resultater

Figuren viser resultatene for Axl- cellene sammenlignet med VT cellene.

Ulike metoder for å måle proliferasjon og viabilitet benytter forskjellige analyseprinsipper og kan derfor gi ulike resultater av cellenes respons. De vanligste metodene måler celledetthet, metabolsk aktivitet eller DNA syntese. Det er viktig å være klar over hva en egentlig måler for å kunne trekke de riktige konklusjonene. Vi sammenlignet her tre ulike assay; MTT, BrdU og alamarBlue for å finne optimale testforhold for hver av metodene med hensyn på celledetthet.

Det er kjent at MTT og alamarBlue assayene viser linearitet over et vidt spenn av celledettheter (oppgitt fra produsent), noe vi kunne bekrefte i våre forsøk. MTT og alamarBlue omdannes av metabolske enzymer i cellene, men mekanismene er ikke fullstendig kartlagt. Med andre ord detekterer disse assayene cellulær metabolsk aktivitet, i motsetning til BrdU, som måler DNA replikasjon. Forsøkene utført med BrdU viser at inkorporering av BrdU avtar for høye celledettheter under testforholdene beskrevet (Figur 5.6). Dette kan skyldes faktorer som konfluente cellekulturer, mangel på næring og opphopning av avfallstoffer. Alle disse faktorene kan virke hemmende for proliferasjonen.

Det lineære forholdet vi observerer etter fire timers inkubasjon med MTT og alamarBlue (Figur 5.9) kan forklares ut fra at ved å øke celledettheten øker mengden metabolske enzymer tilgjengelig for å omdanne substratene. Metabolske enzymer hemmes ikke i like stor grad

under suboptimale vekstforhold som populasjonsveksten gjør. Det er derfor viktig å påpeke at disse metodene ikke nødvendigvis detekterer celleproliferasjon. Tilsvarende observasjoner er også gjort tidligere, og en har for eksempel observert at MTT assayet kan gi avvikende resultater i forsøk hvor en manipulerer energimetabolismen uten nødvendigvis å påvirke celleproliferasjon (Tronstad et al., 2001). På bakgrunn av observasjonene var BrdU assayet best egnet til deteksjon av proliferasjon, men av de tre metodene testet var denne metoden mest sensitiv for valg av celletetthet.

Våre resultater fra MTT forsøkene viser, i motsetning til hva vi hadde forventet, ingen doseavhengig reduksjon av proliferasjonen ved tilsetning av rotenon (Figur 5.10). Dette er i strid med hva vi målte med BrdU (Figur 5.11), og kan indikere at MTT ikke kan brukes som deteksjonsmetode i proliferasjonsstudier som inkluderer rotenon. Den eksakte mekanismen for reduksjon av MTT er ukjent, men mitokondrieavhengig reduksjon er en av teoriene (Berridge et al., 2005). Optimal celletetthet ble valgt på bakgrunn av BrdU studiet som viste størst sensitivitet med hensyn på celletetthet (Figur 5.6). I MTT studiet gir celletettheten vi valgte (4000 celler/brønn) svært lavt signal, noe som kan ha ført til at doseavhengig reduksjon av proliferasjonen ved bruk av rotenon ikke kom til uttrykk.

Fra proliferasjonsstudiene fant vi at VT og Axl- cellene viste lik proliferasjonsprofil under rutineforhold (Figur 5.8). Dette er konsistent med andre studier som har vist MDA-MB-231 VT/Axl- ikke viser signifikante proliferative forskjeller *in vitro* (Holland et al., 2005, Zhang et al., 2008). Imidlertid, og av stor interesse, viser den førstnevnte studien at tap av Axl hemmer vekst av humane tumorer i en *in vivo* MDA-MB-231 xenograft modell. Studien antyder også at mekanismene bak observasjonene i xenograft modellen, i forhold til *in vitro* modellen, ikke er klarlagt, men at Axl sin betydning i tumorformasjon og progressjon trolig er knyttet til interaksjoner mellom tumor og stroma. Celleproliferasjon i en tumor avhenger delvis av signaler fra de ytre omgivelser (eks cytokiner). I *in vitro* studier tas cellene ut av sin opprinnelige kontekst og dette er derfor en av hovedsvakhetene ved denne typen studier. Det kan imidlertid synes som at den observerte effekten i studien til Holland er celletype avhengig, da en studie av en lungeadenokarsinoma cellelinje med lavt Axl nivå viste redusert proliferativ kapasitet og økt apoptose *in vitro* (Shieh et al., 2005).

Det er et kjent fenomen at kreftceller som oppregulerer glykolysen i mange tilfeller har nedregulert mitokondriell respirasjon, og at respirasjonskjeden kan være mer eller mindre defekt (Hagland et al., 2007). Litteraturen beskriver MDA-MB-231 (med høyt uttrykk av Axl)

som glykolytisk, selv under rikelig tilgang på O₂, sett relativt til brystkreft cellelinjer med lavere invasivitet og lavere Axl uttrykk (Robey et al., 2005). Våre laktatmålinger tyder på at Axl-nivået ikke har så mye å si for glykolyse aktiviteten i MDA-MB-231 cellene under normale kulturbetingelser (Figur 5.5). Imidlertid så vi at Axl- cellene hadde en høyere respirasjonskapasitet (Figur 5.4). I denne sammenhengen var det interessant for oss å undersøke om Axl- cellene var mindre avhengige av glykolysen enn VT cellene for å kunne proliferere.

I proliferasjonsforsøkene med BrdU fant vi at VT og Axl- cellene har lik proliferasjonsprofil ved hemming av respirasjonen og glykolysen, mediert via henholdsvis rotenon og 2DG. Laktatmålingene bekreftet at behandlingen virket som forventet ved henholdsvis å øke og senke glykolyseraten til cellene (Figur 5.16). Dette tyder på at VT og Axl- cellene baserer seg på energiproduksjon fra glykolyse og respirasjon i lik grad for å kunne vokse og proliferere. BrdU forsøkene gav reproduserbare dose-respons kurver for både rotenon og 2DG i MDA-MB-231 VT og Axl-, og på bakgrunn av forsøkene ble IC₅₀ ROTENON bestemt til 0,5µM, og IC₅₀ 2DG bestemt til 4mM for VT og Axl- cellene.

Selv om proliferasjonsstudiene indikerte at cellelinjene har lik proliferasjonsprofil fant vi avvikende cellulær og mitokondriell morfologi mellom VT og Axl- cellene (Figur 5.3). VT cellene var mer langstrakte med filopodier, mens Axl- cellene var rundere uten filopodier. Bildene viste at mitokondriene i VT cellene var utbredt i hele den cellulære matriksen, i motsetning til Axl- cellene som har mitokondriene lokalisert rundt kjernen. I begge cellelinjene synes mitokondriene å danne nettverk. Ut ifra observasjonene er det rimelig å spørre seg om den observerte morfologien til Axl- cellene skyldes fravær av Axl, eller selve behandlingen disse cellene har gjennomgått ved nedslåingen av Axl. Dette kan eventuelt undersøkes ved å reintrodusere Axl.

Flere studier viser at tap av Axl fører til endret cellemorfologi med tap av filopodier. Glioblastomaceller overuttrykker Axl, og transfeksjon av disse cellene med en ufunksjonell Axl mutant førte i en studie til endret cellemorfologi, tap av filopodier, redusert motilitet og tap av celle-celle kontakter (Vajkoczy et al., 2006). En annen studie sammenlignet MDA-MB-231VT/Axl- celler og fant at den modifiserte cellelinjen manglet filopodie strukturer, samt at den var mindre invasiv (Zhang et al., 2008). I denne studien ble cellelinjen MCF-7 inkludert som referanse. Disse cellene har lav invasiv kapasitet og lavt uttrykk av Axl, og viste seg å ha samme fenotype som den modifiserte MDA-MB-231 cellelinjen. På bakgrunn av funnene fra

de ulike studiene, som støtter våre data, er det rimelig å anta at tap av Axl gir en fenotype av MDA-MB-231 med redusert invasiv kapasitet.

Den avvikende mitokondrielle morfologien til Axl- cellene er av interesse for oss. Figur 5.3 viser at det mitokondrielle nettverket i VT cellene har en større utbredelse i den cellulære, matriksen, sammenlignet med i Axl- cellene. Mitokondriene er dynamiske organeller som kan forandre morfologi avhengig av cellesyklus og ulike ytre forhold, som når cellene behandles med toksiske forbindelser, og forandringene skjer raskt (minutter) (Karbowski og Youle, 2003). I tillegg er mitokondriene hovedmediatorer i apoptose, og celler i tidlig apoptotisk fase viser avvikende mitokondriell morfologi sammenlignet med normale celler (Karbowski og Youle, 2003). Potensielt skyldes den avvikende mitokondrielle morfologien til Axl- cellene fravær av Axl, men ut fra observasjonene som litteraturen beskriver kan en mulig forklaring være at Axl- cellene trivdes dårligere under forsøksbetingelsene, sammenlignet med VT cellene, slik at mitokondriemorfologien endret seg. Hvorfor det skulle være slik vet vi imidlertid ikke.

For danne et så komplett bilde som mulig av de to cellelinjenes metabolske profil, under rutineforhold og ved metabolsk stress, ble ulike parametere målt. Ved målinger av porin som markør fant vi at cellelinjene har tilnærmet lik mitokondriemengde (Figur 5.12). Dette er interessant i forhold til den observerte avvikende mitokondrielle morfologien (Figur 5.3). Imidlertid forteller ikke disse to parametrene noe om funksjonaliteten til respirasjonsskjeden. Ved å kartlegge respirasjonsprofilen fant vi at rutine respirasjonen i de to cellelinjene er lik, men at den maksimale respirasjonskapasiteten i Axl- cellene er forhøyet, samt at forskjellen ikke skyldtes lekkasje av elektroner da denne parameteren er tilnærmet lik hos begge cellelinjer (Figur 5.4). Dataene fra respirasjonsmålingene indikerer også at Axl- cellene bruker en mindre del av den totale respirasjonskapasiteten, sammenlignet med VT cellene. Ut fra disse observasjonene er det naturlig å stille spørsmålet; er Axl- cellene metabolsk mer fleksible enn VT cellene?

En måte å måle metabolsk fleksibilitet på er å behandle celler med metabolske inhibitorer og studere responsen, slik vi gjorde. Cellene ble behandlet med rotenon og 2DG i 24 timer, og ulike parametere av den metabolske funksjonen ble målt. Ved deteksjon av porin fant vi at VT cellene oppregulerer mitokondriemengden ved behandling med rotenon, mens Axl- cellene ikke kompensere ved å øke mitokondriemengden (Figur 5.12). Potensielt kan Axl- cellene kompensere for energitapet ved å øke respirasjonsraten (Axl- cellene kan øke den prosentvise

utnyttelsen fordi de har ”mer å gå på”). Imidlertid finnes det ingen publikasjoner som omtaler relasjonen mellom Axl og mitokondriell respirasjon etter hva vi kjenner til.

Ett av de andre funnene våre, detektert ved laktatmålinger, indikerer at Axl- cellene viser en større evne til å oppregulere glykolysen enn VT cellene ved rotenon behandling (Figur 5.16). Dette er også en mulig forklaring på hvordan Axl- celler som utsettes for metabolsk stress kompenserer, sammenlignet med VT cellene.

Måling av mitokondriell biogenese, membranpotensial og reaktive oksygenforbindelser ble også forsøkt målt ved hjelp av spesifikke fluorescerende prober og flow cytometri (Appendiks 1). Disse målingene viste seg å bli problematiske grunnet fluorescerende proteiner som var introdusert i forbindelse med den genetiske modifiseringen av cellene.

I flerparameter undersøkelsene ble cellene behandlet med hver av de metabolske inhibitorene i 24 timer. Hvis det er en forskjell mellom cellelinjene med hensyn på porinmengden, slik dataene indikerer, er behandlingstiden potensielt for kort til å kunne få frem tydelige forskjeller. Selv om celler responderer raskt på miljøendringer, vil ikke oppreguleringen av mitokondriene nødvendigvis komme til sitt fulle uttrykk i løpet av 24 timer. Imidlertid er behandlingen cytotoxisk, slik at det ikke er sikkert at cellene hadde tålt 2-3 dagers behandling. Forsøket gir en indikasjon på at VT cellene har evne til å oppregulere mitokondriemengden ved rotenonbehandling, i motsetning til Axl- cellene, men forskjellene kunne potensielt kommet tydeligere til uttrykk ved lengre behandlingstid.

Studier har vist at oppregulering av mitokondriell energiproduksjon som kompensatorisk mekanisme i celler utsatt for metabolsk stress er mediert via AMPK. Aktivering av signalsystemet AMPK/PGC-1 α /PPAR γ øker mitokondriell biogenese og cellulær respirasjon (Wu et al., 1999). Hvis dette er en av mekanismene som forklarer oppreguleringen av mitokondriemengden ved rotenonbehandling, kan vi forvente at AMPK nivået er høyest i VT cellene ved respirasjonshemming. Som forventet detekterte vi høyest aktivering av AMPK i VT cellene ved behandling med rotenon (Figur 5.14).

Vi observerte en tydelig og interessant effekt i Axl- cellene ved behandling med både rotenon og 2DG. Uttrykket av den fosforylerte formen av AMPK β var redusert, og effekten ble også observert nedstrøms ved deteksjon av fosforyleringsgraden til ACC (Figur 5.15). AMPK består av de tre subenhetene α , β og γ , hvorav α - og γ -subenhetene sine funksjoner er kjent, mens AMPK β sin eksakte funksjon er usikker (Woods et al., 2003). Imidlertid inneholder β -

subenheten et glykogenbindene domene (GBD), og studier har vist at AMPK kolokaliserer med glykogen (Polekhina et al., 2003). De fleste studier måler AMPK aktivitet ved å måle fosforylerings nivået av threonin 172 (Woods et al., 2003). Imidlertid viser litteraturen at autofosforylering av serin 108 på AMPK β er nødvendig for AMPK aktivitet (Warden et al., 2001). Etter hva vi kjenner til har den eventuelle relasjonen mellom Axl og AMPK aldri blitt publisert, men ut ifra observasjonene er det en potensiell sammenheng mellom Axl og AMPK, da faktorene synes å påvirke hverandre. Interessant nok er begge faktorer involvert i angiogenese.

Akt er kjent som en viktig mediator i overlevelsessignalisering under stressede forhold, blant annet ved å øke lokaliseringen av HKII til VDAC, som fører til inhibering av apoptose (Pastorino et al., 2003). Axl signalisering via Akt øker celleoverlevelsen i ulike studier via anti-apoptotiske mekanismer (Lee et al., 2002, Hasanbasic et al., 2004).

I denne studien antok vi at fosforylering av Akt på serin 473 og threonin 308 var entydig med at Akt var aktiv, selv om vi ikke målte fosforyleringsstatusen til målproteiner nedstrøms for Akt. Vi observerte at aktiveringen av Akt var opptil 50 % lavere i Axl- cellene under rutine forhold (Figur 5.13). Imidlertid ser dette ut til å være en konsekvens av en i utgangspunktet lav uttrykking av Akt i den modifiserte cellelinjen. Et lavere uttrykk kan bety at Axl- cellene har en mer normalisert Akt aktivitet, som samsvarer mer med Akt aktiviteten i normale celler, da studier viser at ulike tumorer har et unormalt høyt uttrykk av Akt (Nicholson og Anderson, 2002). I studien kunne vi inkludert en referanse cellelinje for mulig å få svar på dette, eventuelt hadde det vært interessant å inkludere en brystkreft cellelinje med lav invasivitet (eks MCF-7).

Et lavere Akt uttrykk i Axl- cellene kan potensielt bety at disse cellene er mindre glykolytiske, da økt uttrykking av Akt i tumorer er assosiert med blant annet økt transkripsjon og stimulering av transport av GLUT-1 til plasmamembranen (Elstrom et al., 2004). Vi observerte ikke at Axl- cellene var mindre glykolytiske, men respirasjonsmålingene viste at de har en større respirasjonskapasitet, som kan tyde på at Axl- cellene totalt sett har en metabolisme som ligger nærmere "normalen", sammenlignet med VT cellene.

Ved metabolsk stress, som i vår studie ble mediert via rotenon og 2DG, økte ikke Akt aktiviteten slik enkelte studier beskriver (Pastorino et al., 2002), snarere tvert imot. Generelt for begge cellelinjene avtok aktiviteten til Akt ved metabolsk stress (Figur 5.13). Vi så imidlertid at AMPK aktiviteten var oppregulert, slik at disse to signalveiene potensielt regulerer hverandre i en stressrespons.

Vi observerte at aktiviteten til Akt ble betraktelig redusert ved behandling med 2DG i begge cellelinjene, men relativt sett var reduksjonen større i VT cellene enn i Axl- cellene.

Resultatene våre viser at 2DG mediert stress fører til en Akt aktivitet i VT cellene som er på nivå med aktiviteten i Axl- cellene, slik at VT cellene potensielt får en mer normalisert Akt aktivitet ved glykolyse hemming.

Rotenon behandlingen hadde ikke stort utslag for aktiviteten til Akt i VT cellene. Full aktivering av Akt krever fosforylering av to fosforylerings seter. Threonin 308 må fosforyleres av PDK for at serin 473 kan bli fosforylert, imidlertid kan threonin 308 bli defosforylert uten at serin 473 blir det (Sarbasov et al., 2005). Rotenonbehandling gir størst utslag for defosforylering av serin 473 i Axl- cellene, mens det er motsatt for VT (threonin 308). Dette kan tyde på at reguleringen av signalveien under stress er ulik i de to cellelinjene. I tidligere studier har man blant annet observert at Axl signalisering via Akt avhenger av glukosenivå (Arai et al., 2008). Det hadde derfor vært av interesse å måle Axl sin betydning for proliferasjonen av- og ulike metabolske parametere i MDA-MB-231 VT/Axl- celler dyrket i medium med høy og lav glukose konsentrasjon.

7 Konklusjoner

Denne studien har sammenlignet proliferasjon og ulike metabolske parametere i MDA-MB-231 VT/Axl- celler. Vi observerte at cellene med lavere Axl uttrykk:

- hadde endret cellulær og mitokondriell morfologi.
- hadde uendret proliferasjonsrate.
- hadde en høyere respirasjons kapasitet og brukte en mindre andel av respirasjonskapasiteten under rutineforhold.
- hadde uendret sensitivitet ovenfor rotenon og 2DG i proliferasjonsforsøkene.
- hadde en høyere glykolyse aktivitet ved respirasjonshemming.
- ikke oppregulerte mitokondriemengden under hemming av respirasjonen slik VT cellene gjorde.
- hadde lavere uttrykk av Akt_{total} og fosforylert Akt både under rutineforhold og ved metabolsk manipulering.
- blant annet hadde et tydelig redusert uttrykk av fosforylert AMPK_β ved metabolsk manipulering, som gav utslag i at fosforyleringen av ACC var lav.

Noen av disse observasjonene bygger på et relativt begrenset antall forsøk (grunnet tidsbegrensning) og vil måtte bekreftes i nye forsøk. Resultatene har likevel gitt indikasjoner som vi har prøvd å sette i sammenheng med annen tilgjengelig litteratur. Det kan konkluderes at proliferasjonen til de to celletypene er uendret under de testede betingelser. Vi finner likevel en rekke endringer i metabolske egenskaper og relaterte signalfaktorer. De to cellelinjene synes begge å være metabolsk fleksible under stress, men fleksibiliteten synes å involvere ulike kompensasjonsmekanismer. Disse observasjonene kan potensielt knyttes til observasjonen av avvikende mitokondriell morfologi i Axl- cellene, sammenlignet med VT cellene.

På grunn av et lavere Akt uttrykk og en lavere fosforyleringsstatus av Akt i Axl- cellene, samt lav AMPK aktivitet under stressede forhold, kan disse faktorene hver for seg, eller sammen, innvirke på overlevelsen og proliferasjonen til cellene, slik at overlevelsen totalt sett er uforandret.

8 Fremtidige perspektiver

Repetisjon av forsøkene og nye tilnæringsmåter kan gi økt innsikt i de mekanismene som potensielt regulerer- og reguleres av Axl i tumorvekst og metabolisme. Nye spørsmål har oppstått i løpet av studien, da dataene våre tyder på at det er en metabolsk forskjell mellom cellelinjene, men som ikke synes å virke inn på proliferasjonen. Cellelinjene kan benytte seg av alternative katabolske ruter for å tilegne seg energi som vi ikke har studert.

Underuttrykking av Axl har i studier vist seg å redusere proliferasjonen av MDA-MB-231 Axl- *in vivo*, men ikke *in vitro* (Holland et al., 2005). Forklaringen er imidlertid ikke kjent. Dette er konsistent med resultatene våre. Fremtidige studier av proliferasjon og metabolisme bør derfor undersøkes *in vivo*. Ulike metoder kan benyttes for å studere celler i omgivelser som er mer lik deres naturlige omgivelser. En tilnæringsmåte, i tillegg til dyreforsøk, er for eksempel å dyrke cellene i multicelle spheroider.

Interessante funn som bør studeres og eventuelt bekreftes av nye studier er sammenhengen mellom den mitokondrielle morfologien i Axl- cellene og respirasjonen. Flere parametere av den mitokondrielle funksjonen kan testes, blant annet membranpotensial. En annen tilnæringsmåte for å studere metabolsk fleksibilitet er å dyrke cellene i høy og lav glukose, og måle ulike parametere som proliferasjon, metabolisme, samt aktiviteten til signalveier som Akt og AMPK. Siden vi ikke kjenner til publikasjoner som omtaler relasjonen mellom Axl og AMPK, kan dette være en studie for fremtiden siden Axl, ut fra våre resultater, synes å være avgjørende for AMPK signalisering under metabolsk stress. Dette kan også studeres ved fravær av glukose.

Axl sin rolle i metastase, uavhengig av mekanisme, fører reseptoren inn i rekken av tyrosin kinase reseptorer som er av terapeutisk interesse. I tumorer induseres uttrykking av Axl ved behandling med ulike kjemoterapeutika (Hong et al., 2008). Axl inhibitorer kan potensielt redusere invasiviteten og utviklingen av metastaser, samt øke følsomheten for kjemoterapeutika.

Referanser

Arai H, Nagai K, Doi T: Role of growth arrest-specific gene 6 in diabetic nephropathy. *Vitam Horm* 2008;78:375-392.

Balinsky D, Platz CE, Lewis JW: Enzyme activities in normal, dysplastic, and cancerous human breast tissues. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:217-224.

Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C: The receptor tyrosine kinase ark mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol* 1995;15:614-625.

Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Kieffer I, Dreher E, Andres AC: Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. *Ann Oncol* 2001;12:819-824.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:127-152.

Bijur GN, Jope RS: Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 2003;14:2415-2419.

Briere JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P: Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C1114-1120.

Burchert A, Attar EC, McCloskey P, Fridell YW, Liu ET: Determinants for transformation induced by the axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1998;16:3177-3187.

Canto C, Auwerx J: Pgc-1alpha, sirt1 and ampk, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:98-105.

Carlson CA, Kim KH: Regulation of hepatic acetyl coenzyme a carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 1973;248:378-380.

Cavet ME, Smolock EM, Ozturk OH, World C, Pang J, Konishi A, Berk BC: Gas6-axl receptor signaling is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:886-891.

Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P: The warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39:267-274.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival: A play in three acts. *Genes Dev* 1999;13:2905-2927.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB: Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3892-3899.

Fridell YW, Villa J, Jr., Attar EC, Liu ET: Gas6 induces axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998;273:7123-7126.

Grossman LI, Shoubridge EA: Mitochondrial genetics and human disease. *Bioessays* 1996;18:983-991.

Hagland H, Nikolaisen J, Hodneland LI, Gjertsen BT, Bruserud O, Tronstad KJ: Targeting mitochondria in the treatment of human cancer: A coordinated attack against cancer cell energy metabolism and signalling. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11:1055-1069.

Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD: Intracellular signaling pathways involved in gas6-axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1207-1213.

Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG: Characterization of the amp-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates amp-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:27879-27887.

Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, Lai GM, Chuang SE: Receptor tyrosine kinase axl is induced by chemotherapy drugs and overexpression of axl confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett* 2008;268:314-324.

Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Frieria AM, Atchison RE, McLaughlin J, Swift SE, Pali ES, Yam G, Wong S, Lasaga J, Shen MR, Yu S, Xu W, Hitoshi Y, Bogenberger J, Nor JE, Payan DG, Lorens JB: Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res* 2005;65:9294-9303.

Hunter T: The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect* 1998;94:81-119.

Inoki K, Zhu T, Guan KL: Tsc2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577-590.

Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, Bartram CR: A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 1991;6:2113-2120.

Jezek P, Engstova H, Zackova M, Vercesi AE, Costa AD, Arruda P, Garlid KD: Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998;1365:319-327.

Karbowski M, Youle RJ: Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10:870-880.

Katzen HM, Schimke RT: Multiple forms of hexokinase in the rat: Tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965;54:1218-1225.

- Kelloff GJ, Krohn KA, Larson SM, Weissleder R, Mankoff DA, Hoffman JM, Link JM, Guyton KZ, Eckelman WC, Scher HI, O'Shaughnessy J, Cheson BD, Sigman CC, Tatum JL, Mills GQ, Sullivan DC, Woodcock J: The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. *Clin Cancer Res* 2005;11:7967-7985.
- Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV: Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001;21:893-901.
- Lee WP, Wen Y, Varnum B, Hung MC: Akt is required for axl-gas6 signaling to protect cells from e1a-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21:329-336.
- Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK: Tam receptor tyrosine kinases: Biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 2008;100:35-83.
- Liu E, Hjelle B, Bishop JM: Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1952-1956.
- Majewski N, Nogueira V, Robey RB, Hay N: Akt inhibits apoptosis downstream of bid cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol Cell Biol* 2004;24:730-740.
- McCloskey P, Fridell YW, Attar E, Villa J, Jin Y, Varnum B, Liu ET: Gas6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase axl. *J Biol Chem* 1997;272:23285-23291.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S: Mitochondria: More than just a powerhouse. *Curr Biol* 2006;16:R551-560.
- Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC: Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:361-367.
- Mitchell P: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961;191:144-148.
- Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E: Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 2007;274:1393-1418.
- Nakano T, Tani M, Ishibashi Y, Kimura K, Park YB, Imaizumi N, Tsuda H, Aoyagi K, Sasaki H, Ohwada S, Yokota J: Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:665-674.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers
- Nicholson KM, Anderson NG: The protein kinase b/akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002;14:381-395.
- O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET: Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991;11:5016-5031.

- Plas DR, Thompson CB: Akt-dependent transformation: There is more to growth than just surviving. *Oncogene* 2005;24:7435-7442.
- Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB: Mitochondrial binding of hexokinase ii inhibits bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:7610-7618.
- Pastorino JG, Hoek JB: Hexokinase ii: The integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* 2003;10:1535-1551.
- Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N: Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase ii to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res* 2005;65:10545-10554.
- Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH: Mitochondrial bound type ii hexokinase: A key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 2002;1555:14-20.
- Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, van Denderen B, Murthy S, Feil SC, Jennings IG, Campbell DJ, Witters LA, Parker MW, Kemp BE, Stapleton D: Ampk beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol* 2003;13:867-871.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ: Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the hif system. *Nat Med* 2003;9:677-684.
- Rescigno J, Mansukhani A, Basilico C: A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. *Oncogene* 1991;6:1909-1913.
- Robey IF, Lien AD, Welsh SJ, Baggett BK, Gillies RJ: Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia* 2005;7:324-330.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of akt/pkb by the rictor-mtor complex. *Science* 2005;307:1098-1101.
- Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Gohring W, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E: Structural basis for gas6-axl signalling. *EMBO J* 2006;25:80-87.
- Sato R, Goldstein JL, Brown MS: Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase prevents phosphorylation by amp-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by atp depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:9261-9265.
- Sawabu T, Seno H, Kawashima T, Fukuda A, Uenoyama Y, Kawada M, Kanda N, Sekikawa A, Fukui H, Yanagita M, Yoshibayashi H, Satoh S, Sakai Y, Nakano T, Chiba T: Growth arrest-specific gene 6 and axl signaling enhances gastric cancer cell survival via akt pathway. *Mol Carcinog* 2007;46:155-164.
- Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-225.

- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E: Succinate links tca cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting hif-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005;7:77-85.
- Schmelzle T, Hall MN: Tor, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:253-262.
- Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG, Chu YW, Lee HS, Wu CW: Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia* 2005;7:1058-1064.
- Singh KK, Costello LC: Mitochondria and cancer. Springer Science+Business Media, LLC 2009.
- Stambolic V, Woodgett JR: Functional distinctions of protein kinase b/akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* 2006;16:461-466.
- Sussman I, Erecinska M, Wilson DF: Regulation of cellular energy metabolism: The crabtree effect. *Biochim Biophys Acta* 1980;591:209-223.
- Tai KY, Shieh YS, Lee CS, Shiah SG, Wu CW: Axl promotes cell invasion by inducing mmp-9 activity through activation of nf-kappab and brg-1. *Oncogene* 2008;27:4044-4055.
- Thorens B: Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol* 1996;270:G541-553.
- Towler MC, Hardie DG: Amp-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 2007;100:328-341
- Tronstad KJ, Berge K, Flindt EN, Kristiansen K, Berge RK: Optimization of methods and treatment conditions for studying effects of fatty acids on cell growth. *Lipids* 2001;36:305-313.
- Turrens JF: Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997;17:3-8.
- Uldry M, Thorens B: The slc2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 2004;447:480-489.
- Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, Kiessling F, Eichelsbacher U, Essig M, Read TA, Erber R, Ullrich A: Dominant-negative inhibition of the axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5799-5804.
- Warden SM, Richardson C, O'Donnell J, Jr., Stapleton D, Kemp BE, Witters LA: Post-translational modifications of the beta-1 subunit of amp-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J* 2001;354:275-283.
- Warburg O: On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-314.
- Warburg O: On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956;124:269-270.

Woods A, Vertommen D, Neumann D, Turk R, Bayliss J, Schlattner U, Wallimann T, Carling D, Rider MH: Identification of phosphorylation sites in amp-activated protein kinase (ampk) for upstream ampk kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 2003;278:28434-28442.

Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC: Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/akt regulation of glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell* 2007;18:1437-1446.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM: Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator pgc-1. *Cell* 1999;98:115-124.

Yang Y, Balcarcel RR: 96-well plate assay for sublethal metabolic activity. *Assay Drug Dev Technol* 2004;2:353-361.

Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, Szabadkai I, Daub H, Keri G, Ullrich A: Axl is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res* 2008;68:1905-1915.

Appendiks 1

Flow cytometriske undersøkelser av mitokondrier og redoks-balanse

1.1 Metode

Ved hjelp av tre fluoriserende prober så vi på tre ulike parametere. Vi brukte Nonyl Acridine Orange (NAO) til å måle mitokondriemengden (kardiolipin) i cellene, Tetra Metyl Rhodamine Metyl ester (TMRM) for å måle mitokondrielt membranpotensiale og CM₂-H₂DCFDA for å gi et relativt mål på reaktive oksygen forbindelser (ROS) i cellene. FCCP og H₂O₂ ble inkludert som kontroller. FCCP er en avkobler som kutter koblingen mellom respirasjonsskjeden og ATP produksjon i mitokondriene, som resulterer i at membranpotensialet utslettes, mens H₂O₂ er en sterkt oksiderende agen.

Initiale forsøk

Initiale forsøk ble utført for å bestemme hvilke konsentrasjoner av de tre probene vi skulle bruke i senere forsøk. Prøver med en tetthet på 10⁶ celler/ml ble tilsatt NAO, TMRM og CM₂-H₂DCFDA og inkubert ved 37°C etter **Tabell 1**. Etter merking ble prøvene satt på is frem til analysering.

Analysen av 10 000 celler/prøve ble utført ved bruk av BD FACS Calibur™ flow cytometer og BD CellQuest data software. Data ble videre analysert av dataprogrammet FlowJo.

Tabell 1: Prober brukt ved flow cytometri

Probe	Dosebredde	Inkuberingstid
NAO	0-300nM	15 minutter
TMRM	0-500nM	30 minutter
CM ₂ -H ₂ DCFDA	0-20μM	30 minutter

Flow cytometrisk analyse av mitokondrier og redoks-balanse i behandlede celler

Cellene ble behandlet som angitt i **Tabell 2** før analysen startet.

Tabell 2: Metabolske modulatorer

Behandling	Final konsentrasjon rotenon	Final konsentrasjon 2-deoksyglukose (2-DG)
Kontroll	-	-
Lav rotenon (rl)	0,25µM	-
IC ₅₀ rotenon (rh)	0,5µM	-
Lav 2-D (2l)	-	2mM
IC ₅₀ 2-DG (2h)	-	4mM

* Rotenon er giftig og munnbind ble brukt ved innveing. Rotenon ble løst i EtOH til en konsentrasjon på 0,2mM og deretter løst i rutine kultur medium.

*2-DG ble løst i rutine kultur medium

For flow cytometrisk analyse av levende celler ble celletettheten justert til $1 \cdot 10^6$ celler/ml og prøver a 250µl celleduspensjon ble tilsatt de ulike probene som angitt i tabell 2. Som kontroll ble prøver med ubehandlede celler tilsatt FCCP rett før tilsetting av NAO og TMRM, og H₂O₂ rett før tilsetting av CM₂-H₂DCFDA, også angitt i tabell 3. Prøvene tilsatt NAO ble etter inkubering sentrifugert ved 800g i 4 minutter og resuspendert i kald PBS Etter merking ble prøvene satt på is frem til analysering.

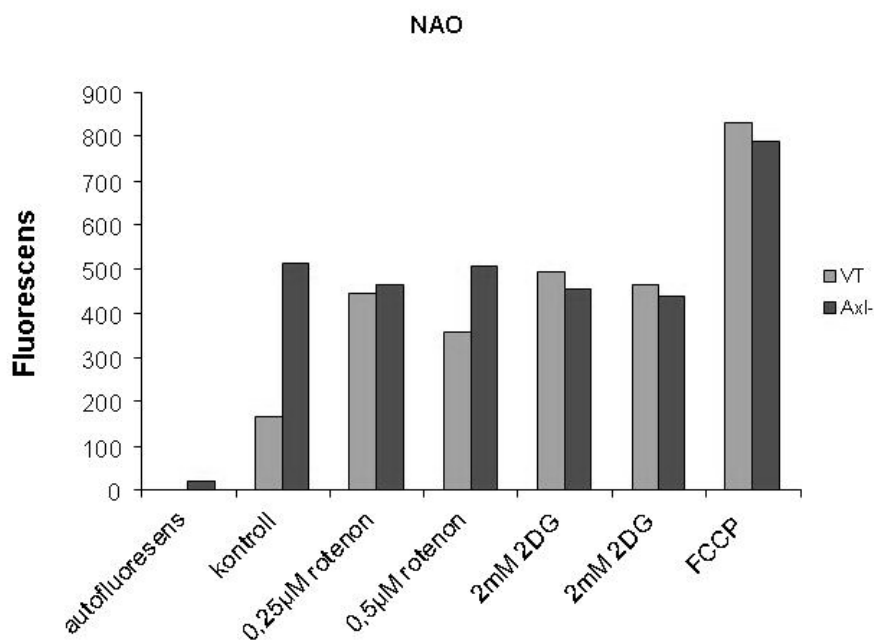
Analyse av 10 000 celler/prøve ble utført ved å bruke BD FACS Calibur™ flyt cytometer og BD CellQuest data programvare. For videre analyse av dataene brukte vi programvaren FlowJo.

Tabell 3 Prober brukt ved flow cytometri og kjemikalier tilsatt som kontroll

Probe/kjemikalie	Final konsentrasjon	Kontroll kjemikalie (final konsentrasjon)	Inkuberingstid (37°C)
NAO	200nM	FCCP (0,05M)	15 min
TMRM	200nM	FCCP (0,05M)	30 min
CM ₂ -H ₂ DCFDA	5µM	H ₂ O ₂ (0,8M)	30min

1.2 Resultater

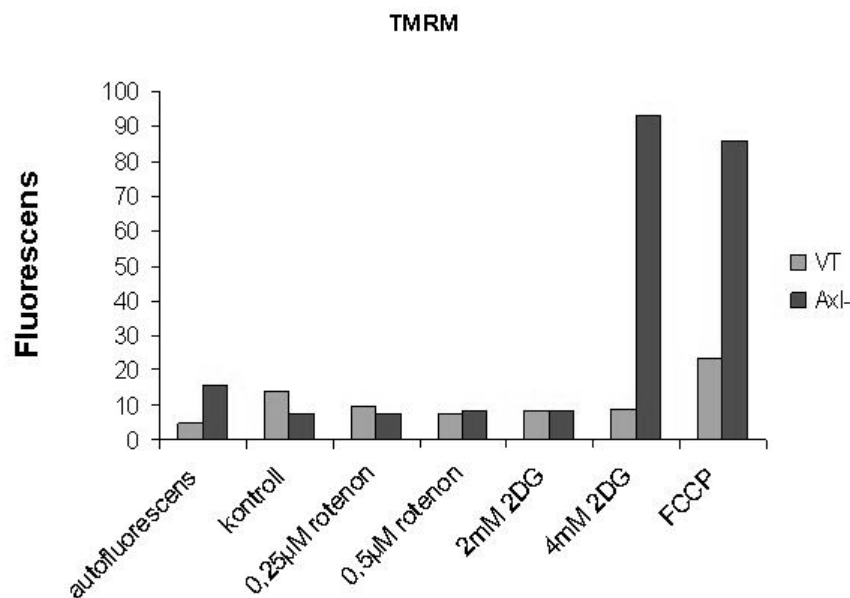
1.2.1 Mitokondriemengde (måling av kardiolipin)



Figur 1 Kardiolipin som relativt mål for mitokondriemengde detektert med NAO

Celler ble sådd ut og inkubert i 24 timer under standardforhold i inkubator, før medium ble byttet ut med medium tilsatt rotenon og 2DG og inkubert i nye 24 timer. NAO ble tilsatt til en finalkonsentrasjon på 200nM per $0,5 \cdot 10^6$ celler. Som kontroll ble FCCP tilsatt en prøve av hver av celledinjene til en finalkons på 0,2mM. Målinger ble utført på BD FACS CaliburTM og detektert i FL-1. Forsøket er utført en gang.

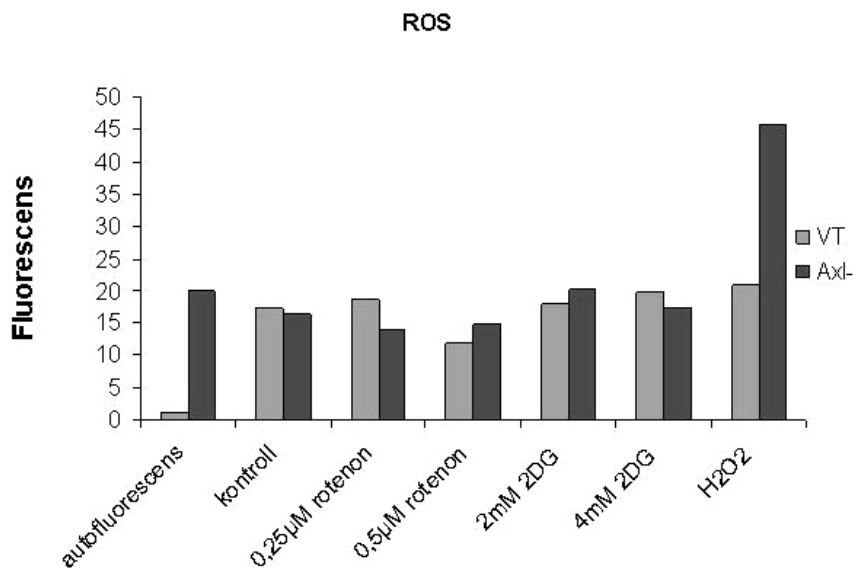
1.2.2 Membranpotensiale



Figur 2 Membranpotensiale detektert med TMRM

Celler ble sådd ut og inkubert i 24 timer under standardforhold i inkubator, før medium ble byttet ut med medium tilsatt rotenon og 2DG og inkubert i nye 24 timer. TMRM ble tilsatt til en finalkonsentrasjon på 200nM per $0,5 \cdot 10^6$ celler. Som kontroll ble FCCP tilsatt en prøve av hver av celledinjene til en finalkons på 0,2mM. Målinger ble utført på BD FACS CaliburTM og detektert i FL-2. Figuren viser snittet av to paralleller.

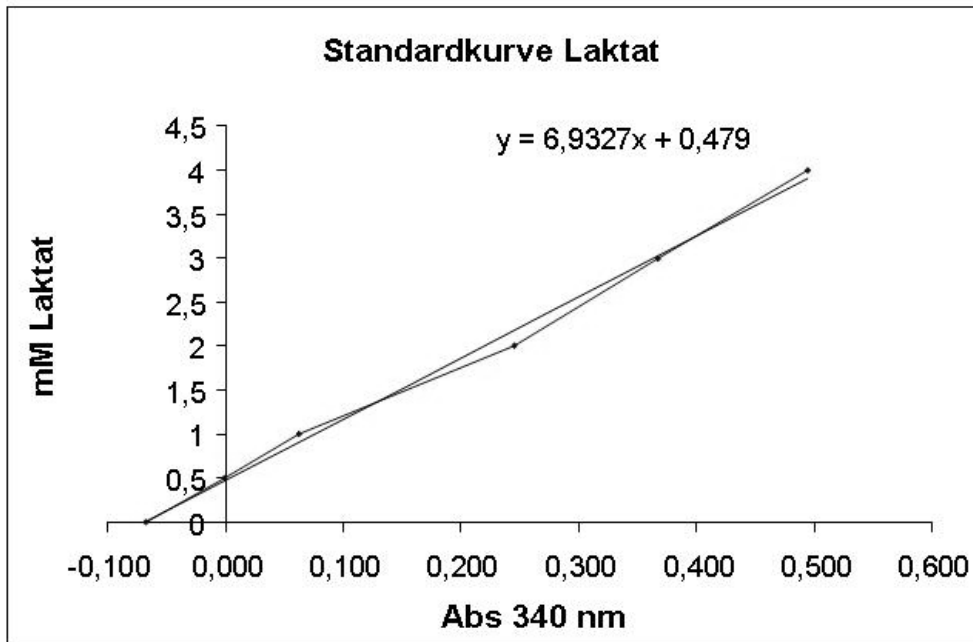
1.2.3 Oksidativt stress



Figur 3 Oksidativt stress detektert med CM₂H₂DCFDA

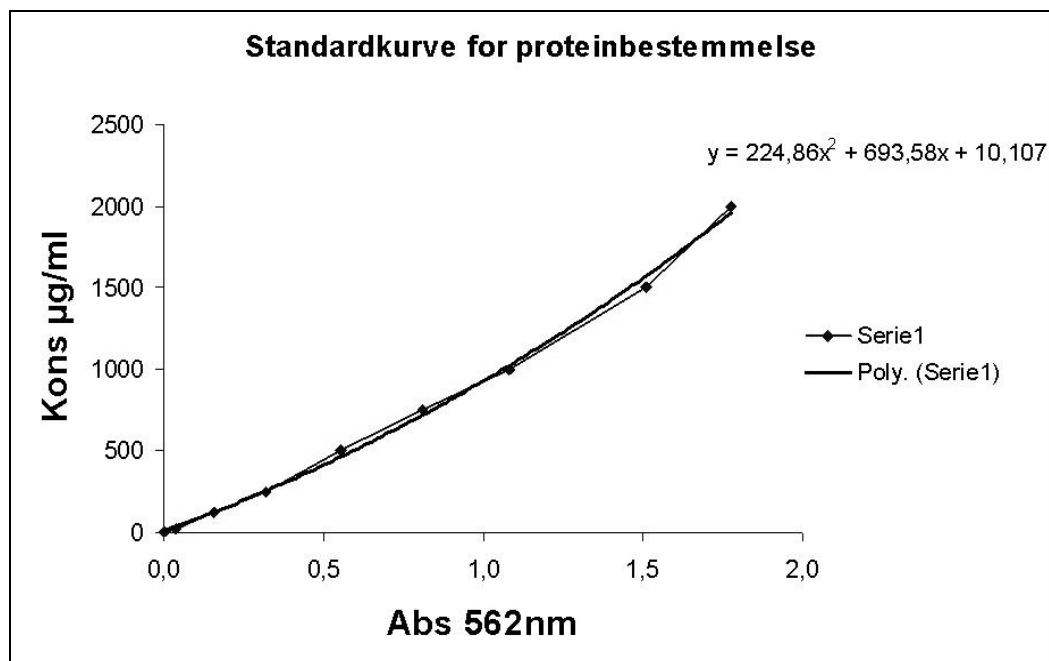
Celler ble sådd ut og inkubert i 24 timer under standardforhold i inkubator, før medium ble byttet ut med medium tilsatt rotenon og 2DG og inkubert i nye 24 timer. CM₂H₂DCFDA ble tilsatt til en finalkonsentrasjon på 5µM per 0,5*10⁶ celler. Som kontroll ble H₂O₂ tilsatt en prøve av hver av cellelinjene til en finalkons på 100µM. Målinger ble utført på BD FACS CaliburTM og detektert i FL-1. Figuren viser snittet av to paralleller.

Appendiks 2



Figur 4 Eksempel på standardkurve for laktatmålinger

Appendiks 3



Figur 5 Standardkurve for proteinbestemmelse før SDS-PAGE