

# Uttrykk og betydning av GRP78 i myelomceller

**Kine Husteli Kristiansen**

Cellebiologi for medisinsk/teknisk personell

Innlevert: desember 2014

Hovedveileder: Atle M. Bones, IBI

Medveileder: Toril Holien, Kreftforskning og molekylærmedisin

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for biologi



## **Forord**

Denne masteroppgaven ble utført ved institutt for biologi og arbeidet ble utført ved Myelomgruppen, Institutt for Kreftforskning og Molekylærmedisin (IKM) ved NTNU, St. Olavs Hospital, Universitetssykehus i Trondheim.

Først og fremst vil jeg gi en stor takk til min veileder, Toril Holien for alt du har lært meg. Du møter meg alltid med et smil og har gitt meg god hjelp både gjennom praktiske og faglige utfordringer. Jeg setter også stor pris på den hjelpen du har gitt meg gjennom skriveprosessen. Du har vært en stor faglig inspirasjon, og for meg er du en ubegrenset kilde til kunnskap om myelomatose. Takk til avdelingsingeniørene Hanne Hela, Berit Størdal, Lill Anny Grøseth, Solveig Kvam og Glenn Buene for at dere alltid ga meg fine celler til forsøk, besvarte alle mine spørsmål og for at dere alltid skapte god stemning på cellelaboratoriet.

Jeg vil også takke til BFI studiefond, Laboratoriemedisinsk klinikk og studiefondet ved St. Olavs Hospital for økonomisk støtte under mitt masterløp. Syns det er flott at dere støtter videreutvikling av bioingeniører. Tusen takk til mine strålende kollegaer ved avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs Hospital, for at dere alltid er oppmuntrende og støttende. Tusen takk til ledelsen og min nærmeste leder, Inger Johanne Haugen, for at jeg fikk muligheten til å gjennomføre studiet kombinert med jobb ved avdelingen. Støtten og tilretteleggingen jeg har fått fra deg, Inger Johanne, verdsetter jeg meget høyt.

Mine fantastiske venninner, studievenner på kontoret og løpelaget ved St. Olavs Hospital fortjener en stor takk. Dere gir meg energi og glede gjennom hverdagen. Jeg vil rette en spesiell takk til deg, Siri, for veldig god hjelp og konstruktive tilbakemeldinger gjennom skriveprosessen.

Tusen takk kjære mamma for at du alltid har troen på meg og for at du har lært meg å se positivt på nye utfordringer, og aldri gi opp uansett hva jeg møter på min vei.

Trondheim, Desember 2014

Kine Husteli Kristiansen

## Sammendrag

Myelomatose, også kjent som beinmargskreft, er en hematologisk malign sykdom i antistoffproduserende plasmaceller i beinmargen. Kreftsykdommen er fortsatt uhelbredelig, og resistensutvikling mot medikamenter er en stor utfordring. Myelomceller karakteriseres av en opphopning av monoklonale immunoglobuliner og er utsatt for ER-stress. De er derfor avhengige av en streng kontroll av ER-stress for å overleve. GRP78 er et viktig ER-chaperon som hjelper med folding av proteiner. Hos pasienter med visse typer kreft er proteinet GRP78 funnet på celleoverflaten hos kreftceller, men ikke hos friske celler. Den fysiologiske funksjonen og hvordan GRP78 uttrykkes på celleoverflaten er uklar. Nyere studier viser at GRP78 på celleoverflaten kan danne komplekser med spesifikke proteiner som er med på å regulere både proliferasjon og viabilitet. Det er også vist at hemming av GRP78 på celleoverflaten ved hjelp av spesifikke antistoff kan føre til celledød.

I denne oppgaven er ulike humane myelomcellelinjer undersøkt for uttrykk av GRP78 mRNA (HSPA5) og protein, både intracellulært og på celleoverflaten. Myelomcellelinjene som ble testet ut i denne oppgaven viste ulikt, men generelt høyt uttrykk av HSPA5 mRNA og totalt proteinnivå av GRP78, mens overflateuttrykk av GRP78 varierte fra negativt til ulik grad av positivt uttrykk. Det ble ikke oppdaget en sammenheng mellom intracellulært uttrykk og overflateuttrykk av GRP78.

Det ble forsøkt å se om endring av nivået av ER-stress kunne påvirke uttrykket av GRP78. Bruk av proteasomhemmere, som potensielt gir økt ER-stress, ga økt total proteinmengde av GRP78, men det ble ikke observert noen form for endring av overflateuttrykket til GRP78. Det ble også gjort forsøk med siRNA mot HSPA5 for å se om det påvirket overflatenivået av GRP78 og om det påvirket cellenes følsomhet for proteasomhemmere. Bruk av siRNA nedregulerte mRNA-nivået av HSPA5 og den totale proteinmengden av GRP78, mens overflateuttrykket av GRP78 forble uforandret. Nedregulering av HSPA5 ble heller ikke funnet å være av betydning for overlevelse eller respons til proteasomhemming for INA-6 celler. Det ble undersøkt om GRP78 kunne binde heparin, som en mulig forklaring på GRP78 sin evne til å binde til overflaten. Overflatenivået av GRP78 ble redusert med tilsats av heparin, noe som kan tyde på at GRP78 er delvis avhengig av binding til heparansulfatkjeder

på celleoverflaten. Hemming av GRP78 på celleoverflaten med antistoffene Mab159- og N-20 ga ingen endring av viabiliteten.

## **Abstract**

Multiple Myeloma, also known as bone marrow cancer, is a hematological malignancy in antibody-producing plasma cells in the bone marrow. This type of cancer is still incurable and development of resistance against drugs is a major challenge. One characteristic of myeloma cells is accumulation of monoclonal immunoglobulins, and they are therefore highly exposed to ER-stress and are dependent on a strict control of ER-stress to survive. GRP78 is an important ER chaperone that helps the folding of proteins. In patients with certain types of cancer GRP78 is found on the cell surface of cancer cells, but not on healthy cells. The physiological function and how GRP78 is expressed on the cell surface is unknown. Recent studies show that GRP78 on the cell surface can form complexes with specific proteins that are involved in regulating both proliferation and viability. It has also been shown that inhibition of GRP78 on the cell surface with specific antibodies can cause cell death.

In this thesis different human myeloma cell lines were examined for expression of GRP78 mRNA (HSPA5) and protein, both intracellular and on the cell surface. Myeloma cell lines that were tested in this thesis showed different, but a generally high expression of HSPA5 mRNA and total protein levels of GRP78, whereas cell surface expression of GRP78 ranged from negative to varying degrees of positive expression. A correlation between intracellular expression and surface expression of GRP78 was not detected.

Attempts were made to see if the changes in the level of ER-stress could affect the expression of GRP78. Use of proteasome inhibitors, that potentially induce ER-stress, increased the total amount of GRP78 protein, but no changes of the cell surface expression of GRP78 were observed. siRNA against HSPA5 was used to see if the level of HSPA5 affected the cell surface expression of GRP78 and whether this affected cells sensitivity to proteasome inhibitors. Use of siRNA down regulated mRNA levels of HSPA5 and the total protein amount of GRP78, while the surface expression of GRP78 remained unchanged. Down regulation of HSPA5 was not found to influence for survival or response to proteasome inhibition of INA-6 cells. It was tested whether GRP78 can bind heparin, as a possible explanation of GRP78's

ability to bind to the cell surface. Surface level of GRP78 was reduced by the addition of heparin, which may indicate the GRP78 is partly dependent on binding to heparin sulfate chains on the cell surface. Inhibition of GRP78 on the cell surface with the antibodies Mab159 and N-20 did not result in changes of viability.





# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Introduksjon</b>	<b>1</b>
1.1	Myelomatose	1
1.2	Humane myelomcellelinjer	2
1.3	Endoplasmatisk retikulum (ER)	3
1.3.1	Endoplasmatisk stress	3
1.3.2	Ufoldet proteinrespons (UPR)	4
1.3.3	ER-assosiert degradering (ERAD)	6
1.4	GRP78	6
1.5	Proteasomet og intracellulær proteindegradering	8
1.6	Proteasomhemmere som behandlingsmetode	9
1.7	Proliferasjon	10
1.8	Apoptose	12
<b>2</b>	<b>Materiale og Metode</b>	<b>15</b>
2.1	Myelomcellelinjer og betingelser for cellekultur	15
2.2	Antistoff	16
2.3	Z2 Coulter Counter	17
2.4	RT-qPCR	17
2.5	Western blot	19
2.6	Intracellulær merking av GRP78	21
2.7	Flowcytometri	22
2.7.1	Uttrykk av C- og N-terminal ende av GRP78 på celleoverflaten	24
2.8	Heparinvask	24
2.9	Transfeksjoner og siRNA	24
2.10	Påvisning av apoptose	26
2.11	Proliferasjonstudier	29
<b>3</b>	<b>Resultater</b>	<b>31</b>
3.1	Uttrykk av GRP78-mRNA i 11 ulike myelomcellelinjer	31
3.2	Totalt proteinuttrykk av GRP78 i 11 ulike myelomceller	32
3.3	Lokalisering av intracellulært GRP78	33
3.4	GRP78 uttrykt på celleoverflaten i 11 ulike myelomceller	34
3.4.1	Variierende uttrykk av GRP78 N-terminal ende	37
3.5	Binding av GRP78 på celleoverflaten	38
3.6	Stimulering med proteasomhemmere og VCP-hemmer	39
3.7	Effekt av redusert HSPA5-uttrykk på celleoverlevelse og overflateuttrykk av GRP78	41
3.7.1	Betydning av GRP78 for overlevelse av myelomceller	44
3.7.2	siRNA kombinert med proteasomhemmere og VCP-hemmer	45
3.8	Nedslåing av VCP	47
3.9	Hemming av overflateuttrykt GRP78 med antistoff	48
3.9.1	Antistoffet N-20	48
3.9.2	Antistoffet Mab 159	49
<b>4</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>50</b>
4.1	Humane myelomcellelinjer	50
4.2	Antistoff	51
4.3	Intracellulært uttrykk av GRP78	51
4.4	GRP78 uttrykt på celleoverflaten	53
4.5	Hva binder GRP78 på celleoverflaten	55

4.6	Proteasomhemmere og VCP-hemmer.....	56
4.7	Betydning av GRP78 for overlevelse av myelomceller.....	57
4.8	Hemming av GRP78 på celleoverflaten med antistoff .....	58
<b>5</b>	<b>Konklusjon og videre arbeid .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Referanser.....</b>	<b>62</b>

## Forkortelser

ADP	Adenosin difosfat
ATP	Adenosin trifosfat
ATF4	Aktiverende transkripsjonsfaktor 4
ATF6	Aktiverende transkripsjonsfaktor 6
Bcl-2	B-celle lymfom 2
BiP	Bindende immunglobulin protein
BSA	Bovint serum albumin
CHOP	C/EBP homolog protein
Ct-verdi	Cycle treshold verdi
DBeQ	2,4-dibenzylaminoquinazoline
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERAD	ER-assosiert degradering
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GRP78	Glukoseregulert protein 78 kDa
HGF	Hepatocyt growth factor
HSP	Heat shock protein
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRE1 $\alpha$	Inositol krevende enzym 1 $\alpha$
kDa	Kilodalton
mRNA	Messenger RNA
PERK	PKR-lignende ER-enzym
PI	Propidiumiodid
PS	Fosfatidylserin
rh	Rekombinant humant
RT-qPCR	RealTime-kvantitativ polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat - polyakrylamid gelelektroforese
siRNA	Small interfering RNA
TBS	Tris-bufret saltvann

TBST	Tris-bufret saltvann med 0,1% av såpen Tween-20
UPR	Ufoldet proteinrespons
VCP	Valosine containing protein

# 1 Introduksjon

Myelomatose, også kjent som beinmargskreft, er en hematologisk malign sykdom i antistoffproduserende plasmaceller i beinmargen (1). Kreftsykdommen er fortsatt uheldelig, og resistensutvikling mot medikamenter er en stor utfordring ved behandling (2). Myelomatose har en høy produksjon av immunoglobulin og er utsatt for endoplasmatisk retikulum (ER)-stress. Myelomceller er derfor avhengig av streng kontroll av ER-stress, folding og degradering av proteiner. Glukoseregulert protein 78 kDa (GRP78) er et protein som hovedsakelig befinner seg inne i ER som et ER-chaperon og bidrar med folding av proteiner. Det er i noen krefttyper vist at proteinet GRP78 kan være lokalisert på celleoverflaten hos kreftceller, men ikke hos friske celler. Transporten av GRP78 til celleoverflaten er enda ukjent, men enkelte studier hevder at ER-stress aktivt fremmer lokalisering av GRP78 på celleoverflaten (3-5). Hemming av GRP78 på celleoverflaten ved hjelp av antistoff kan føre til celledød (3, 6). På grunnlag av dette var det derfor interessant å finne ut:

- Hvordan er det generelle uttrykket av GRP78 i myelomceller av GRP78
- I hvilken grad uttrykker myelomceller GRP78 på celleoverflaten
- Hvilken betydning har proteasomhemmere for uttrykket av GRP78
- Hvilken innvirkning har dette for overlevelse og respons på cytostatika hos myelomceller.

## 1.1 Myelomatose

Myelomceller har samme fenotypiske karakteristikk som langt-levende plasmaceller, men uttrykker i tillegg hypermuterte immunoglobulin-gener. Dette medfører en opphopning av monoklonale immunoglobuliner både i urin og blod hos myelompasienter. Myelomatose forårsaker ulike systemiske komplikasjoner som blant annet anemi og nyredysfunksjon (2, 7-9). Nedbrytning av bein og hyperkalsemi er også noen av kjennetegnene ved myelomatose (7).

Myelomatose utgjør totalt 1% av alle kreftsykdommer og 13% av alle hematologiske kreftsykdommer. Gjennomsnittsalderen for påvisning av myelomatose er 66 år og

forekomsten av sykdommen øker med alderen. Myelomatose forekommer sjelden før fylte 40 år og det er større forekomst av myelomatose blant menn enn kvinner (9).

Det har blitt observert overuttrykk av heparansulfat på myelomceller (10). Heparansulfat er et polysakkarid som finnes på celleoverflaten av de fleste celler. På myelomceller finnes heparansulfat hovedsakelig på overflatereseptoren syndecan-1 (CD138). Reseptorer og ulike vekstfaktorer binder til heparansulfat, og kan slik være med å regulere cellenes tilgang på vekstfaktorer (11, 12).

Myelomceller har som nevnt høy produksjon av immunglobulin. Dette gjør de svært utsatt for ER-stress, og de er derfor avhengig av streng kontroll av ER-stress for å kunne overleve. På grunn av opphopning av monoklonale immunglobuliner er myelomceller helt avhengig av aktivisering av ufoldet proteinrespons (UPR). UPR svarer på ER-stress ved å øke transkripsjonen av gener som koder for chaperoner og øker degradering av proteiner for å motvirke den økte mengden med ufoldete proteiner inne i ER. I myelomceller er UPR meget aktiv i myelomceller og aktiviteten øker i takt med sykdomsutviklingen (2).

I motsetning til andre kreftcelletyper er myelomceller kjent for å være sensitive for ER-stress induisert apoptose, for eksempel ved hemming av proteindegradering ved bruk av proteasomhemmere som fører til opphopning av ufoldete proteiner. Sensitiviteten ovenfor proteasomhemmere kan mulig forklares med at myelomcellene har et høyt basalt nivå av ER-stress (2).

## **1.2 Humane myelomcellelinjer**

Humane myelomcellelinjer er et viktig verktøy for å kartlegge biologien til myelomceller, og mye av nåværende forståelse for myelomatose kommer fra studier på myelomcellelinjer (13, 14).

De fleste av cellelinjene er fra myelompasienter med langtkommet sykdom og er hovedsakelig etablert fra pleuravæske og perifert blod, mens kun noen få humane myelomcellelinjer er etablert fra beinmarg. Ved langtkommet sykdom vil

myelomcellene i noen tilfeller kunne gå fra beinmarg hvor veksten og overlevelsen deres er avhengig av ulike faktorer, til pleuravæske og perifert blod hvor de kan vokse og leve mer uavhengige. Fenotypisk er myelomcellelinjene svært heterogene. Andre karakteristikk er at de er Epstein-Barr virus (EBV) negative, vokser i suspensjon, har kromosomale forandringer som er identiske i de primære tumorcellene og de har uttrykk av bestemte overflatemarkører. Proliferasjonshastigheten varierer mellom de ulike myelomcellelinjer, og enkelte av cellelinjene er avhengige av cytokiner eller vekstfaktorer for regulering av vekst og overlevelse (13, 15).

Etablering av en kontinuerlig, prolifererende myelomcellelinje anses som vanskelig. De krever ofte støtte fra stromaceller fra beinmargen, ekstracellulære proteiner, cytokiner eller andre løselige faktorer som bidrar til feste og celle-celle kontakt. Myelomcellene som finnes i marginen karakteriseres av sin lave proliferasjonshastighet og ved etablering av en ny cellelinje er det økt risiko for at myelomcellene blir utkonkurrert av ikke-maligne B-celler som har blitt transformert av EBV (15, 16).

### **1.3 Endoplasmatisk retikulum (ER)**

ER er en organell som finnes i alle eukaryote celler. Organellen har en sentral rolle i proteinbiosyntesen og produserer lipider, sekretoriske- og transmembrane proteiner (17). Proteinfolding foregår i ER og korrekt folding av proteinene er avhengig av chaperoner. Disse krever kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) og adenosin-trifosfat (ATP) for å bidra til dannelsen av disulfidbindinger mellom proteinkjedene (18). Et riktig foldet protein fraktes ut av ER via den sekretoriske veien. Feilfoldet protein forblir i ER, hvor det prosesseres videre til det har rett folding. Et protein som ikke oppnår rett folding kan bli utsatt for ER-assosiert degradering (ERAD) (19).

#### **1.3.1 Endoplasmatisk stress**

Forhold som forstyrrer ER-funksjonen, som f.eks. hemming av proteindegradering, fører til akkumulering og aggregering av ufoldet og feilfoldet protein i ER som igjen kan føre til ER-stress. Transmembrane ER-proteiner vil detektere ER-stress og cellen vil svare med å aktivere signalveier som går under fellesbetegnelsen ufoldet

proteinrespons (UPR), som bidrar til å gjenopprette normal ER funksjon. Ved tilfeller der cellen ikke klarer å tilpasse seg, eller nøytralisere stresset vil UPR indusere apoptose (2, 19).

Det fysiologiske miljøet inne i kreftceller og friske celler har mange ulikheter. Typiske kjennetegn på det intracellulære miljøet hos en kreftcelle er blant annet lavt oksygennivå, lav pH, lavt glukosenivå og lavt nivå av andre næringsstoffer. Dette er faktorer som kan bidra til økt ER-stress. Mange kreftceller har derfor utviklet ulike mekanismer for å tilpasse seg ER-stress og unngår dermed stress-indusert apoptose (6, 19).

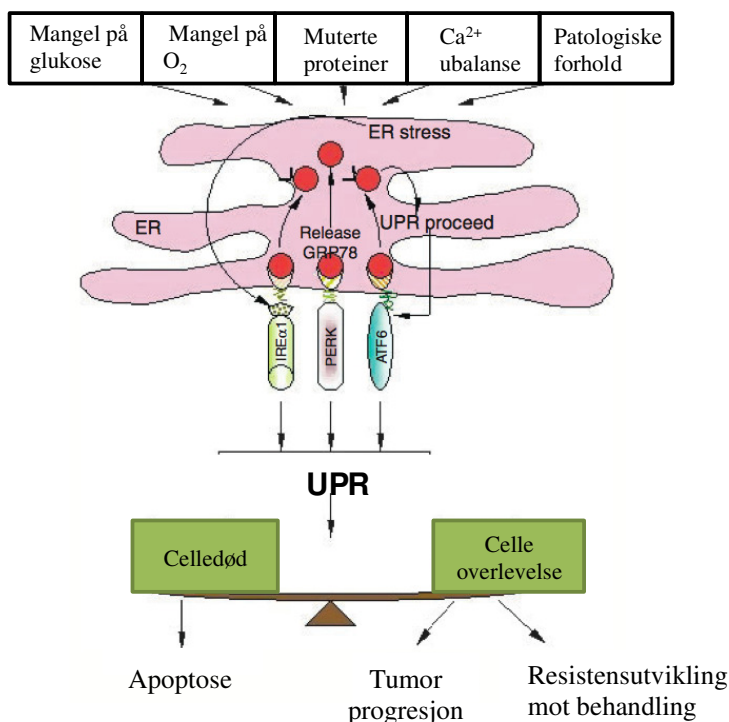
### **1.3.2 Ufoldet proteinrespons (UPR)**

Under normale tilstander vil det intracellulære miljøet alltid være under forandring. For å opprettholde en balanse i respons til ER-stress skjer det en signalering mellom ER og cellekjernen. Signaleringen er kjent som UPR og er en mekanisme med stor betydning for fysiologisk tilpasning (2). Signaleringen vil gi økt transkripsjon av UPR-assosierte gener slik at cellen kan tilpasse seg ER-stresset (19). Disse genene koder for ER-chaperoner, proteiner som gir økt proteindegradering i cytosol, samt mange andre proteiner som er med på å øke ER sin evne til å folde proteiner (17). UPR gjør det på denne måten mulig for cellen å motvirke stresset. Mislykkes UPR å adaptere stresset i det intracellulære miljøet eller at oppstått skade er for stor, vil UPR sørge for cellesyklusarrest og apoptose induseres. Cellene med mislykket UPR blir da fjernet for å hindre toksisitet til nærliggende celler (19, 20). UPR forhindrer i tillegg aggregering av feilfoldet protein ved å starte ERAD som vil initiere autofagi (2, 20). Tilstander som forstyrrer proteinfoldingsprosessen i ER og aktiverer UPR kan blant annet være kjemiske forbindelser eller næringsmangel (20).

ER har tre hovedsensorer for stress; de transmembrane ER-proteinene inositol krevende enzym  $1\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), PKR-lignende ER enzym (PERK) og aktiverende transkripsjonsfaktor (ATF) 6 (Figur 1.1). I ER-lumen sitter N-terminal ende av disse proteinene og GRP78 holder de inaktive ved å være bundet til stress-sensorene. Ved



en akkumulering av ufoldet protein vil GRP78 dissosiere fra ER-stress-sensorene, og de aktiveres og indukere UPR (2, 21).



**Figur 1.1:** GRP78 regulerer balansen mellom viabilitet og apoptose hos kreftceller ved å opprettholde protein foldingskapasiteten i ER. ER stress-sensorene IRE1 $\alpha$ , PERK og ATF6 holdes inaktive av GRP78 og forhindrer at ER-assosierte pro-apoptiske mekanismer aktiveres. Kreftcellene kan vokse videre og dette kan i noen tilfeller føre til resistensutvikling mot behandling. Figuren er hentet og modifisert fra (22).

PERK er en serin/treonin proteinkinase som fosforylerer eukaryot initieringsfaktor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) slik at generell mRNA-translasjon hemmes. Selv om den generelle translasjonen reduseres fører fosforylering av eIF2 $\alpha$  til økt translasjon av enkelte proteiner, blant annet ATF4 som stimulerer aktiveringen av gener involvert i apoptose og tilpasning til ER stress (2, 21).

Aktivering av IRE1 $\alpha$  fører til oligomerisering av IRE1 $\alpha$  som kutter XBP1 mRNA. En kortere sekvens av XBP1 (XBP1s) kan da fungere som en transkripsjonsfaktor og oppregulere gener som koder for proteiner involvert i proteinfolding, kvalitetskontroll og ERAD (21, 23).

Aktivering av ATF6 medfører kløyving til en aktiv transkripsjonsfaktor som transporteres tilbake til kjernen og øker transkripsjonen av XBP1, gener som koder for ER chaperoner og ERAD assosierte proteiner (19, 21).

C/EBP homologt protein (CHOP) er en pro-apoptotisk transkripsjonsfaktor som blir oppregulert av alle de tre ER stress-sensorene. En funksjon til CHOP er å indusere apoptose ved å regulere uttrykket av ulike proteiner. CHOP vil blant annet undertrykke uttrykket av anti-apoptotiske B-celle lymfom 2 (Bcl-2) proteiner (21, 24).

### **1.3.3 ER-assosiert degradering (ERAD)**

ERAD er en del av ER sitt kvalitetskontrollsystem som gjenkjenner feilfoldete proteiner og sørger for at de blir værende i ER, og ikke fortsetter prosessen til å bli et ferdig protein. Viser det seg at proteinet ikke kan foldes riktig blir det merket med ubiquitin, og dermed merket for degradering. Feilfoldet protein transporteres ut av ER til degradering av 26S proteasomer som befinner seg i cytosol (20).

p97 er et chaperon av type II ATPaser også kjent som "Valosin containing protein" (VCP). VCP binder ubiquitinerte proteiner og transporterer de til proteasomer for degradering (25-27). Mangel på VCP fører til akkumulering av ubiquitinerte proteiner og en svekket ERAD (25, 27).

## **1.4 GRP78**

Glukoseregulert protein 78 kDa (GRP78) fungerer som et chaperon som katalyserer foldingen av proteiner i ER. Proteinets bindes ikke-kovalent til eksponerte aminosyresekvenser som normalt er gjemt i indre del av det riktig foldete proteinet. Binding av GRP78 forhindrer ufoldet protein i å aggregere til uløselige, ikke fungerende inklusjoner, og hjelper proteinene med å oppnå sin stabile naturlige form (3, 17, 28).

GRP78 er også kjent som immunoglobulin (Ig) tungkjede bindende protein (BiP) og tilhører "Heat shock protein" (HSP) familien. HSP familien befinner seg hovedsakelig

i cytosol, mens de glukoseregulerte proteinene (GRP) holder til i ER og i mitokondrier. GRP78 er konstant uttrykt på et basalt nivå og opprettholder organbalanse via ulike mekanismer (6). Affiniteten GRP78 har til andre polypeptider er avhengig av ATP og dens hydrolyse til adenosin-difosfat (ADP) (22).

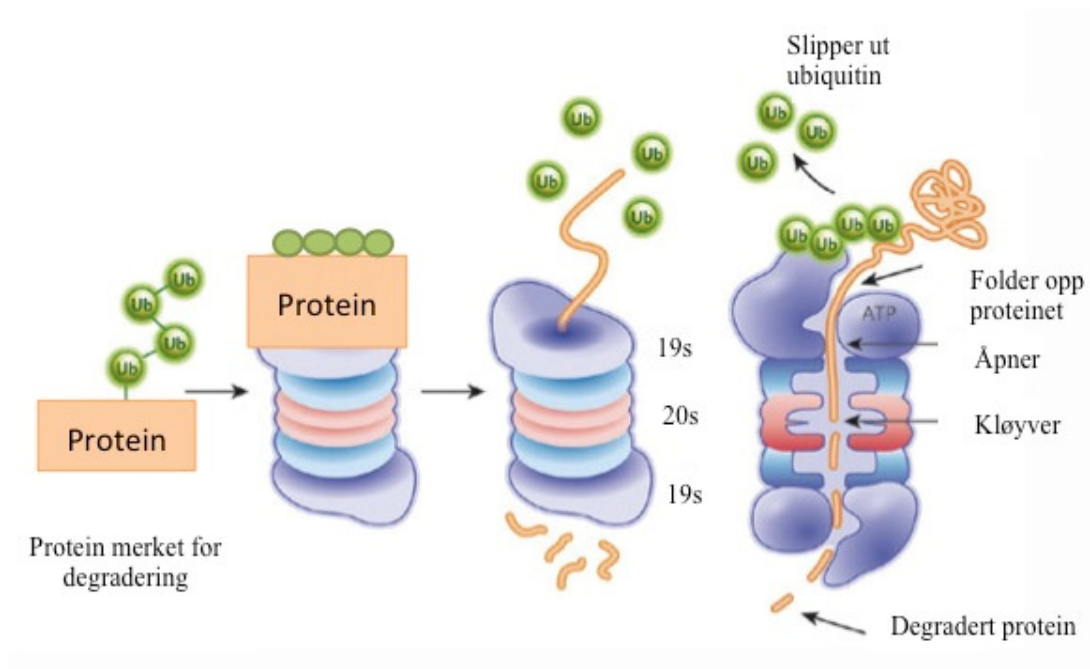
Nyere studier har vist at en fraksjon av GRP78 kan finnes på celleoverflaten til kreftceller fra bryst, lunge, mage og prostata, og at ER-stress aktivt fremmer lokalisering av GRP78 på celleoverflaten (3-5). Den fysiologiske funksjonen av GRP78 på celleoverflaten er uklar, men nyere studier viser til at GRP78 på celleoverflaten danner komplekser med spesifikke proteiner som er med på å regulere både proliferasjon og viabilitet (4).

Det har blitt vist at nedslåing av genet HSPA5, som koder for GRP78, reduserte proliferasjonen i bryst- og tarmkreftceller samt at GRP78 kan ha betydning for metastasering (4, 6). Studier fra prostatakreft viser at hemming av GRP78 på celleoverflaten kan være et potensielt mål for kreftbehandling (29, 30). En studie på brystkreft viser at hemming av GRP78 fører til apoptose (31). En stor ulempe med tradisjonell behandling av kreft, som kjemoterapibehandling og strålebehandling, er at den også i stor grad skader friske celler. For å kunne utvikle en spesifikk behandling som kun reagerer med kreftcellene, og ikke de friske, er det viktig å få kartlagt celleoverflaten til kreftcellene (6, 32).

Økt uttrykk av GRP78 i kreftceller har blitt korrelert med negativ kreftprognose og resistensutvikling mot medikamenter, muligens fordi GRP78 kan fungere som en anti-apoptotisk faktor (3, 33). Det har blitt rapportert at høyt uttrykk av GRP78 er korrelert med en dårlig prognose i brystkreft (34) og lungekreft (35). Dette kan skyldes at GRP78 kan begrense apoptose under ER stress (34). Høy konsentrasjon av sirkulerende autoantistoff mot GRP78 på celleoverflaten i serum fra prostatakreftpasienter har blitt påvist (30). Det er beskrevet at sirkulerende autoantistoff mot GRP78 er korrelert med en negativ prognose i prostatakreft (36).

## 1.5 Proteasomet og intracellulær proteindegradering

Alle eukaryotiske celler har organellen 26S proteasomet som er en ATP-avhengig protease. 26S proteasomet er et multifunksjonelt enzymkompleks som identifiserer og degraderer ubiquitinerte proteiner. Proteasomet gjenkjenner og binder ubiquitin via 19s enheten. Når proteinet er bundet til 19s enheten vil proteinet foldes opp og bli kløvet av 20s enheten av proteasomet (Figur 1.2). Proteiner som blir merket med ubiquitin for degradering er i hovedsak feilfoldete, men proteiner som er ansvarlig for regulering av viktige cellulære prosesser kan også bli merket for degradering. Dette gjelder spesielt for proteiner som kontrollerer apoptose, cellesyklus og DNA replikasjon. Hemming av proteasomaktivitet kan føre til cellesyklusarrest og apoptose (37, 38). Proteasomer står for ca. 80% av den intracellulære degraderingen av proteiner (39, 40).



**Figur 1.2** Modifisert illustrasjon av hvordan proteasomet fungerer (41). Protein merket med ubiquitin gjenkjennes av 19s enheten til proteasomet som binder proteinet. Proteinet blir deubiquitinert og foldet opp ved bruk av energi. Protein vil videre bli kløvet opp i mindre peptider av 20s enheten til proteasomet.

De resterende 20% av den intracellulære degraderingen av proteiner utføres ved hjelp av autofagi. Autofagi er en cellulær nedbrytningsprosess som cellen selv induserer for

å fjerne skadelige cytoplasmatiske komponenter, som for eksempel proteinaggregater, eller når cellen opplever sult og må bryte ned proteiner for å få tilgang på aminosyrer til ny proteinsyntese (2, 19, 42). ER-stress kan også aktivere autofagi. Aktiveringen skjer gjennom UPR via PERK- eller IRE1 $\alpha$ -aktivering. Det har blitt antydnet at autofagi er en viktig tilpasningsmekanisme i forsøket på å redde celler fra døden (43).

## **1.6 Proteasomhemmere som behandlingsmetode**

Proteasomhemmere kan benyttes i behandlingen av myelomatose ved at de hemmer aktiviteten til proteasomet. Dette gir følger for ulike signalveier som støtter vekst, proliferasjon og overlevelse i kreftceller. Hemming av proteasomaktivitet stimulerer ulike apoptotiske signalveier og induserer ER-stress respons ved å stoppe degradering av ufoldet og feilfoldet protein (44).

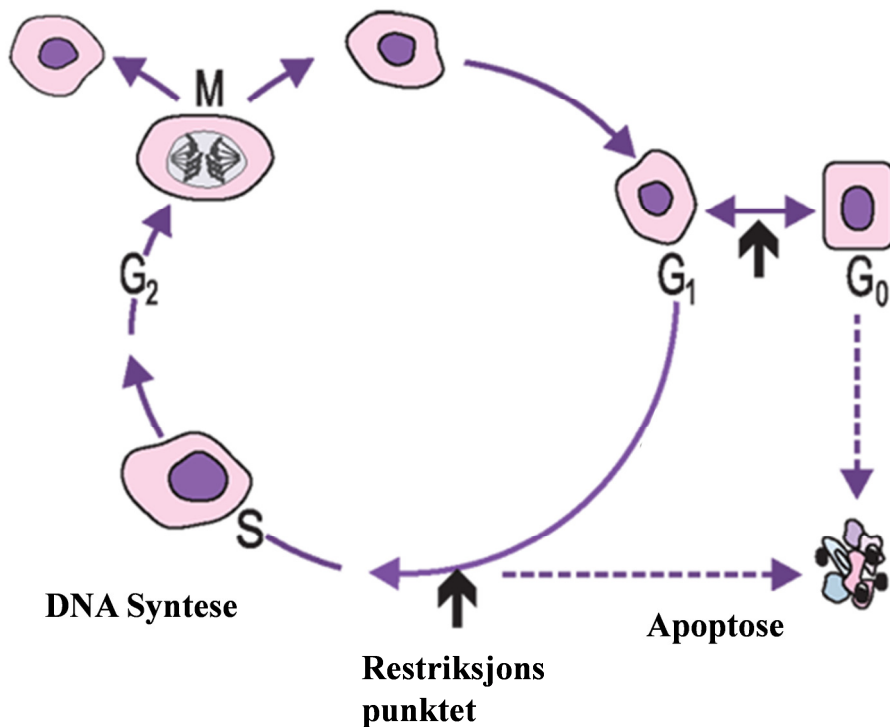
Bortezomib (Velcade) er den første proteasomhemmeren som inngikk i klinisk utprøving (37). Bortezomib er en selektiv og reversibel hemmer av 26S proteasomkomplekset og induserer apoptose i myelomceller (38). Bortezomib binder direkte til 20S proteasomkomplekset og hemmer enzymaktiviteten (37, 40) og induserer ER-stress respons. Høy produksjon av immunoglobuliner er med på å bedre effekten av proteasomhemmere i myelomceller, og er en viktig grunn til at proteasomhemmere virker godt i behandling av myelompasienter (45).

Carfilzomib (PR-171) er en proteasomhemmer som skiller seg fra Bortezomib både strukturelt og funksjonelt. Den blokkerer proteasomet irreversibelt, har ulik spesifisitet og gir en mer langvarig hemming, sett i forhold til Bortezomib (38, 46). Det har blitt vist at Carfilzomib trigger cellesyklusarrest, induserer apoptose og aktiverer stressresponsveier i myelomcellene. Carfilzomib kan også ha effekt mot cellelinjer og primærceller som er resistente mot Bortezomib (45).

2,4-dibenzylaminoquinazoline (DBeQ) er en ATP-konkurrerende hemmer som reversibelt hemmer VCP ATPase, og dermed ERAD. Den er ikke direkte en proteasomhemmer, men hindrer ufoldet protein i å transporteres til proteasomet for degradering. Resultatet blir, som ved proteasomhemming, en opphopning av feilfoldet proteiner som kan føre til ER-stress induisert apoptose (26, 47, 48).

## 1.7 Proliferasjon

Proliferasjon er vekst eller reprodusering av celler. Hastigheten på proliferasjonen er avhengig av hvor raskt cellene fullfører cellesyklusen (17). Cellesyklusen består av fire koordinerte faser (Figur 1.3). Første fase (G1) er fasen hvor cellen forbereder seg på celledeling. For å få fortsette videre i G1 er de avhengig av at ekstracellulære vekstsignaler, også kjent som mitogener, er tilgjengelige. I løpet av G1 kan cellene bli stoppet og overført til en ikke-delende fase (G0). Andre fase er kjent som S-fasen hvor det foregår DNA syntese og kromosomene i cellen dupliseres. Tredje fase er G2 og i denne fasen foregår proteinsyntese. Denne fasen er den som tar lengst tid av de fire siden cellen trenger tid for å kunne vokse i størrelse. Kromosomene vil også segregeres i løpet av G2. I siste fase (M-fasen) foregår mitose, cellen deler seg, og gir to identiske datterceller (17, 49).



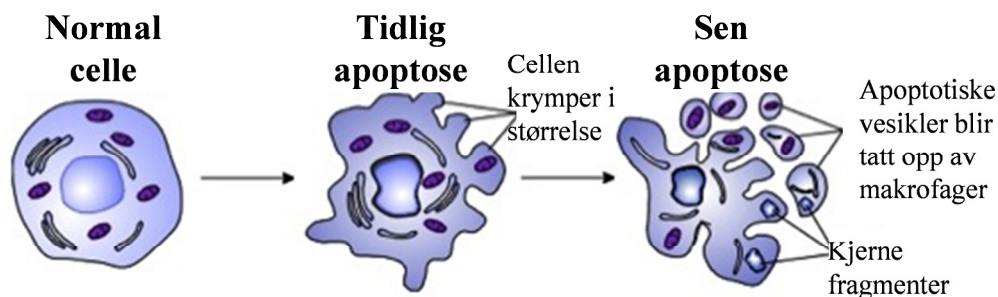
**Figur 1.3** Produksjonen av nye celler skjer gjennom cellyklusen. Den består av fire koordinerte faser, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> og M. Den første er G<sub>1</sub> hvor cellene er avhengig av mitogener for å kunne fortsette. I løpet av G<sub>1</sub> er det ulike kontrollpunkt som kontrollerer DNA sekvensen til cellen som er i cellyklusen. Viser denne DNA sekvensen avvik går cellen til G<sub>0</sub> hvor en eventuell skade kan repareres, eventuelt blir cellen sendt til apoptose. Cellen kan også bli sendt direkte til apoptose via restriksjonspunktet som er et viktig kontrollpunkt før cellene fortsetter til S-fasen hvor DNA syntese gjennomføres. G<sub>2</sub> er fasen hvor proteinsyntese foregår og cellene øker i størrelse. Deretter entrer de siste fase, M-fasen hvor mitose en celledeling foregår. Figuren er hentet og modifisert (50).

Kreftceller er kjent for ukontrollert økning i antall. Dette kan oppstå som en følge av feilregulering av mitogener, resistensutvikling mot apoptose eller oppståtte defekter i sjekkpunktene gjennom cellyklusen. Dette gjør at kreftcellene ikke blir stoppet i løpet av cellyklusen og kan fortsette med å replikere sitt genom og dele seg til nye datterceller (51, 52).

## 1.8 Apoptose

Apoptose, programmert celledød, er en koordinert prosess hvor cellen dreper seg som styres av molekylær signalering i hver enkelt celle (53). Apoptose karakteriseres ved at kromatinet kondenseres, cellen minker i størrelse og DNA kløyves av endonukleaser. Cellen vil miste sin opprinnelige symmetri av negativt ladde fosfolipider, fosfatidylseriner, i plasmamembranen. Friske celler har fosfatidylseriner på innsiden av membranen, mens apoptiske celler vil eksponere disse på celleoverflaten slik at makrofager kan gjenkjenne og fjerne dødende celler. Apoptose fungerer som en mekanisme for å fjerne uønskede celler uten å påføre skade på nærliggende friske celler (43, 54).

Apoptose kan deles i to ulike stadier, tidlig apoptose og sen apoptose (Figur 1.4). Tidlig apoptose karakteriseres ved at cellestørrelsen blir mindre, cytoplasma og organellene blir tettere pakket og det mest typiske er at kromatinet kondenseres, samt eksponering av fosfatidylseringer. Sen apoptose er et stadium hvor membranen blir ødelagt, kjernen fragmenteres og det blir avsnøret apoptotiske vesikler som blir tatt opp av makrofager (43).



**Figur 1.4** Apoptose kan deles inn i to ulike stadier: 1) Tidlig apoptose hvor cellen vil bli mindre i størrelse, kondensering av kromatinet og eksponering av fosfatidylseriner. 2) Sen apoptose som karakteriseres ved fragmentering av kjernen og avsnøring av apoptotiske vesikler som inneholder fragmenter fra innsiden. Disse vesiklene blir tatt opp av makrofager for å hindre skade hos nærliggende celler. Figuren er hentet og modifisert fra (55).



Det er to hovedsignalveier som starter apoptose, de aktiveres av henholdsvis ekstracellulær og intracellulær stimuli. Begge signalveiene starter en signaleringskaskade hvor inaktive cysteinproteaser kløyves til aktive kaspaser som igjen aktiverer flere kaspaser. Ekstracellulær signalering aktiverer kaspase 8 og 10, mens intracellulær signalering aktiverer kaspase 9. Videre aktiverer begge effektor kaspase 3 som resulterer i cytokrom C-utslipp fra mitokondrier og induserer celledød. ER-stress er et eksempel på intracellulært stimuli som kan forårsaket apoptose (17).

Endringer i regulering av celledød, som nedgang i muligheten til å kvitte seg med celler kan komme av overproduksjon av celler eller overuttrykk av proteiner som hindrer apoptose, og kan være faktorer som bidrar til alvorlig sykdom, blant annet kreft (43).

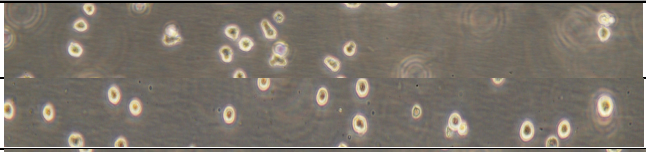
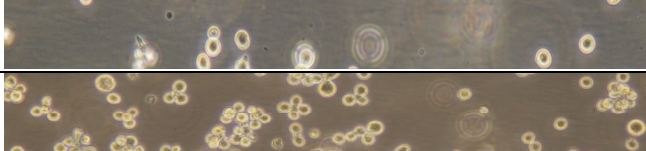
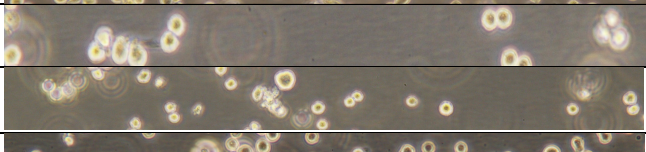
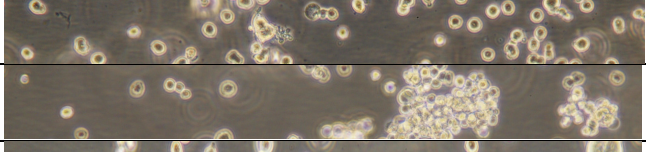
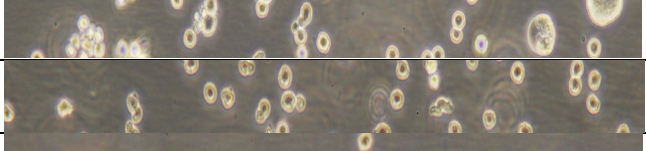
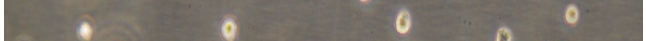


## **2 Materiale og Metode**

### **2.1 Myelomcellelinjer og betingelser for cellekultur**

I denne oppgaven ble 11 myelomcellelinjer benyttet for å undersøke uttrykket av GRP78 både intracellulært og på celleoverflaten. Alle forsøkene ble utført i 2% humant serum og de cytokinavhengige cellelinjene fikk i tillegg interleukin (IL)-6 (1 ng/mL). Oversikt over de ulike myelomcellelinjene, biologisk opprinnelse, bilde (x20) og karakteristikk, samt hvilke betingelser de ulike cellelinjene har til vekstmedium vises i Tabell 2.1.

**Tabell 2.1** Oversikt over benyttede humane myelomcellelinjer, biologisk opprinnelse, krav til vekstmedium, utseende og karakteristikk

Cellelinje	Opprinnelse	Vekstmedium	Utseende (x 20)	Karakteristikk
IH-1	PE	10 % HS i RPMI IL-6 (sup.)		Avlange celler * 1:5
OH-2	PE	10 % HS i RPMI IL-6 (sup.)		Hyperdiploid kromosom * 2:1
KJON	PB	5 % HS i RPMI + IL-6 (sup)		Hyperdiploid kromosom * 1:3
ANBL-6	PB	10 % FCS i RPMI IL-6 (1 ng/ml)		Rosetter * (Tilsetter ekstra medium)
INA-6	PE	10 % FCS i RPMI IL-6 (1 ng/ml)		Dubletter * 1:10
RPMI-8226	PB	20 % FCS i RPMI		Heterogeneceller * 1:5
U-266	PB	15 % FCS i RPMI		* 1:5
JJN-3	BM	10 % FCS i RPMI		Klaser * 1:10
CAG	BM	10 % FCS i RPMI		Semi-aderent * 1:10
KMS-12-BM	BM	20 % FCS i RPMI		* 1:10
URVIN	PB	10 % FCS i RPMI IL-6 (sup.)		* 1:5

FCS- Føtalt kalve serum; HS- varme inaktivert humant serum (Blodbank, St. Olavs Universitetssykehus); RPMI-1640 (Sigma Aldrich) tilsatt L-glutamin (100 mg/mL) og gentamycin (20 mg/mL); IL-6 (Biosource, CA, USA). PE-pleuravæske, PB-perifert blod, BM-beinmarg. \* Graden av fortynning er en indikasjon på proliferasjonshastighet.

## 2.2 Antistoff

Antistoff er i denne oppgaven brukt i flere metoder og eksperiment for å påvise protein. Tabell 2.2 gir en oversikt over antistoffer som er benyttet i de ulike metodene.

**Tabell 2.2** Oversikt over antistoff benyttet til flowcytometri og Western blot, arten de kommer fra, brukskonsentrasjon, katalog nr. og produsent

Primærantistoff	Art	Brukskonsentrasjon	Katalog nr.	Produsent	Western blot	Flow
GRP78 N-terminalt	Kanin	136 µg/mL	69043	Sigma Aldrich	1:15 000	ja
GRP78 C-terminalt	Kanin	20 µg/mL	Ab151269	Abcam		ja
N-20	Kanin	8-, 4-, 2- og 1 µg/mL	Sc-1050	Santa Cruz		ja
Mab159	Mus	50 µg/mL	-	Gave fra Parkash S. Gill, University of Southern California.		ja
GAPDH	Mus	-	Ab8245	Abcam, Cambridge, UK	1: 30 000	
CHOP L63F7	Mus	-	2895s	Cell Signaling Technology	1:1000	
Anti-HGF (2B5)	Mus	10 µg/mL	-	Myelomgruppen		ja
VCP 7F3	Kanin	-	2649s	Cell Signaling Technology	1:1000	
FK2 α-Ubiquitin	Mus	10 µg/mL	BML-PW8810	Enzo, Life Science	1:1000	
<b>Isotype antistoff</b>						
L-MYC	Kanin	20 µg/mL	Sc 28699	Santa Cruz		ja
Normalkanin serum	Kanin	136 µg/mL	AB 105C	R&D		ja
IgG Pure Blue	Mus	10-, 50 µg/mL	349040	BD Bioscience		ja
<b>Sekundærantistoff</b>						
Polyklonal geit, anti-kanin, konjugert med HRP	Geit	-	P0448	Dako, Danmark	1:3000 1:10 000	
Polyklonal geit, anti-mus, konjugert med HRP	Geit	-	P0447	Dako, Danmark	1:5000	
Alexa Fluor 647 (anti-kanin)	Geit	-	A21245	Life Technologies		1:1000
Ig FITC (anti-kanin)	Geit	-	4030-02	Southern Biotechnology		1:10
Ig FITC (anti-mus)	Geit	-	349031	BD Bioscience		1:10
IR Dye® 800 (anti-mus)	Geit	0,1 µg/mL	926-32210	LI-COR Bioscience	1:5000	

### **2.3 Z2 Coulter Counter**

Z2 Coulter counter benytter en ikke-optisk metode for telling og bestemmelse av størrelsen til partikler i en løsning, her brukt for bestemmelse av celleantall. Prinsippet baserer seg på bruk av elektrisk impedans for å måle volum av partiklene mens de enkeltvis passerer en blenderåpning med definert størrelse. Dette kan gjøres ved at partiklene blir suspendert i en fortennet ledende væske. På sidene av blenderåpningen er det elektroder, strømmen vil være fysisk begrenset innenfor blenderåpningen. Partiklene blir dratt inn via vakuum gjennom blenderåpningen, der de fortrenger et volum tilsvarende partiklenes størrelse. Dette generer målbare pulser som kan konverteres til partikkelstørrelse og antall ved hjelp av avansert elektronikk. Coulter Counter (Beckman Coulter) gir nøyaktig resultat av partiklenes størrelse og konsentrasjon (56). I denne oppgaven ble 20 µL av en gitt celleduspensjon blandet med 10 mL isotonløsning.

### **2.4 RT-qPCR**

Ved bruk av Polymerase chain reaction (PCR) kan en bestemt DNA sekvens raskt amplifiseres. Dette er mulig på grunn av primere, DNA sekvenser, som inneholder en bestemt rekkefølge av nukleotider komplementær til DNA sekvensen som amplifiseres (17).

PCR er en analysemetode som består av  $x$  antall repetisjoner av en syklus, hvor hver syklus inneholder tre ulike trinn. I første trinn denatureres dobbeltrådet DNA til enkeltrådet DNA ved 95°C. I andre trinn senkes temperaturen og primerne kan binde seg til en komplementær sekvens på enkeltrådet DNA. I tredje trinn binder enzymet DNA-polymerase seg, leser av sekvensen hvor primeren er bundet og setter deretter sammen komplementære nukleotider (17).

RealTime-kvantitativ PCR (RT-qPCR) er en PCR-variant som kan benyttes for å undersøke fysiologiske endringer i genuttrykket på messenger RNA (mRNA-nivå). Før en RT-qPCR analyse kan gjennomføres, må isolert total-RNA reverstranskriberes til komplementært DNA, også kalt cDNA. DNA-polymerasen har exonukleaseaktivitet og vil kløyve en bundet DNA-sekvens eller probe som er merket med en fluorokrom og en

quencher. Når proben blir kuttet, vil man få emisjon av fluorescens fordi quencheren ikke lenger kan hindre emisjonen. Mengde DNA-produkt som blir produsert korreleres til intensiteten av emisjonslyset (57, 58). Etter hver syklus gjøres en fotometrisk avlesning som gir en cycle threshold (Ct)-verdi for hver enkelt prøve. Ct-verdien til en prøve reflekterer antall sykluser som må til for å danne den mengde DNA-produkt som kreves for å avgi nok fluorescens til å overstige bakgrunnsstøy. Ct-verdien er omvendt proporsjonal med mengde DNA-produkt (59, 60).

Når fysiologiske endringer i et genuttrykk skal undersøkes blir mRNA-nivå uttrykt som relativt til et nivå av en intern RNA kontroll. Et referansegene, som for eksempel husholdningsgenet GAPDH, benyttes som regel til RNA-kontroll (61).

Genet HSPA5 koder for GRP78, og det ble utført RT-qPCR for å undersøke i hvilken grad ulike myelomceller uttrykker HSPA5 mRNA. Isolering av total-RNA ble utført ved bruk av metoden RNeasy® Minikit (Qiagen).

RNA ble analysert med NanoDrop 1000 (ND1000 Spectrophotometer) for å få oversikt over konsentrasjon og kvaliteten på total-RNA i prøvene. Revers transkripsjon for å syntetisere cDNA ble utført med High Capacity RNA-to-cDNA kit med Thermal Cycler (Applied Biosystems)

Deteksjon av genuttrykket til myelomceller ble utført på StepOne Plus Real Time PCR Systems med TaqMan® Universal PCR master mix, primere for genet HSPA5 (Hs00607129\_gH), ACTB (Hs03023943\_g1), TBP (Hs00427620\_m1), USF2 (Hs00231528\_m1) og GAPDH (Hs99999905\_m1) (Applied Biosystems). ACTB, TBP, USF2 og GAPDH ble brukt som referansegene til normalisering av HSPA5-uttrykk.

For å vise nedregulering av HSPA5 mRNA ved bruk av siRNA ble det utført RT-qPCR for HSPA5 (Hs00607129\_gH) hvor kun GAPDH ble brukt for normalisering av uttrykket.

## 2.5 Western blot

Western blot er en metode for å detektere proteiner ved å separere proteinene med gelelektroforese og deretter påvisning ved bruk av spesifikt antistoff (62). Metoden ble brukt for å påvise totalt proteinuttrykk i de 11 ulike myelomcellelinjer. Cellene ble sentrifugert og vasket i kald PBS før cellepelletten ble lysert i lysisbuffer (40 µL pr. 1 million celler) (Tabell 2.3). NP40-basert lysisbuffer ble valgt for de fleste Western blot analyser, med unntak av ved deteksjon av CHOP da Urea-lysisbuffer ble valgt for å være sikker på å få løst opp proteinet. CHOP er en transkripsjonsfaktor og det er en fare for å ikke få med alle kjernelokaliserte proteiner med bruk av den NP40-baserte lysisbufferen.

**Tabell 2.3** Oversikt over benyttede lysisbuffer med innhold.

Lysisbuffer	Innhold
NP40-basert	Nonidet-P40 (NP40) (1%, Sigma Aldrich) Glyserol (10%) Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) NaCl (150 mM) Blanding av proteasomhemmere (Complete Mini EDTA-free, Roche, Mannheim, Germany) Fosfatasehemmere, NaF (50 mM) & Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (1 mM)
Urea	Urea (8 M) TritonX-100 (0,5%) Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)

Natriumdodecylsulfat - polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) kan benyttes for å separere proteiner i et cellelysat (63). SDS denaturerer og binder seg til proteinene slik at de blir negativt ladet. DTT, som er et sterkt reduserende agens, bidrar med å kløve disulfidbindinger (S-S) til sulfhydrylgrupper (SH) og sørger for at proteinene mister sin sekundær- og tertiærstruktur. Dette gjør det mulig å separere proteinene i forhold til molekylvekt (64).



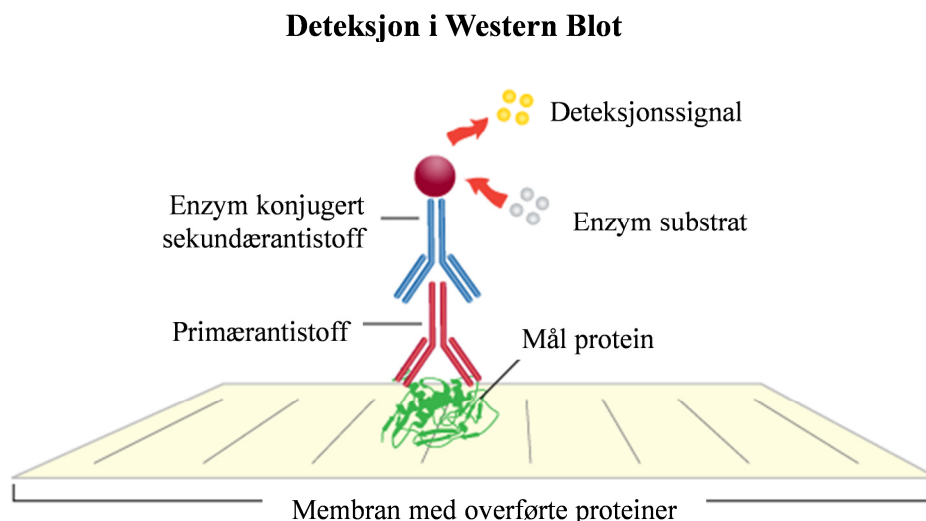
For å separere proteinene i cellelysatet ble NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel, Novex® (by life Technologies, LA, USA) benyttet. 15 µL cellelysat ble blandet med 5 µL NuPAGE® LDS Samplebuffer (4X)(by life Technologies) tilsatt DTT (100mM) og inkubert på varmeblokk med 70°C i 10 min før 20 µL ble applisert i hver brønn. 3 µL av en standard med kjent molekylvekt, See BluePlus2 Prestained standard (by life Technologies, LA, USA), ble anvendt som referanse.

Gelen ble kjørt på Power Ease 500 (by life Techologieis) i 30 minutter, på henholdsvis 80- og 150V og 120 minutter på 180V med NuPAGE®, MOPS SDS Running Buffer (20X) (by Life Technologies). Når strømmen kobles til, vandrer de negativt ladde proteinene mot den positivt ladde elektroden gjennom polyakrylamid-nettverket i gelen. Porestørrelsen avhenger av hvor mye akrylamid som brukes i produksjon av gelen. Størrelsen til proteinene påvirker vandringshastigheten gjennom gelen, hvor de minste proteinene vil vandre fortest, altså lengst. Molekylvekten til proteiner blir målt i kilodalton (kDa) (64).

Etter endt SDS-PAGE kjøring, overføres de separerte proteinene på gelen til en nitrocellulosemembran (using Blot® Gel Transfer Stack Nitrocellulose – Regular, by life Technologies). Dette gjøres ved hjelp av metoden elektroblotting (iBLOT™, by life Technologies), som baseres på elektrisk strøm for å overføre proteiner fra gelen til nitrocellulosemembranen. Proteinbinding er basert på hydrofobiske interaksjoner og ladde interaksjoner mellom membran og proteiner. Nitrocellulosemembranen blokkeres før tilsats av spesifikt antistoff. Blokkeringen utføres ved å tilsette 5% tørrmelk i Tris-bufret saltvann (TBS) med 0,1% av såpen Tween-20 (TBST).

Etter 1 time med blokkering av membranen i romtemperatur, ble primærantistoff tilsatt og inkubert ved 4°C i 3 døgn. Deretter ble vask med TBST utført i 3 omganger, for å fjerne ubundet antistoff og unngå uspesifikk farging i videre trinn. Fortynnet sekundærantistoff, konjugert med et reporter enzym, horseradish peroxidase (HRP) ble tilsatt og inkubert 1 time i romtemperatur. Etter utført vask med TBST i 3 omganger ble substrat (Super Signal® WestFemto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) tilsatt. Substratet kløyver HRP og resulterer i luminescens, som er proporsjonalt med

mengde protein (Figur 2.1). Luminescens ble detektert ved bruk av CCD kamera (FC Odyssey, LI-COR, Biosciences).



**Figur 2.1** Western blot er en metode for å detekterer proteiner ved å separere proteinene med gelelektroforese og deretter påvisning ved bruk av et spesifikt antistoff. Separerte proteiner overføres til en nitrocellulosemembran. Primærantistoff binder til målprotein, og tilsatt sekundærantistoff konjugert med enzymet HRP binder deretter til primærantistoffet. Substrat som kløyver HRP tilsettes og det blir produsert et dekteksjonssignal (luminescens). Figuren er hentet og modifisert fra (65).

Celler til utførte Western blot ble sådd ut i 24 brønners brett (Corning Costar, Corning, NY, USA) og behandlet som anvist i resultatdelen. Ulike antistoff ble brukt og antistoff mot GAPDH ble bruk som normaliseringskontroll. Antistoffene som ble brukt er listet i Tabell 2.2.

## 2.6 Intracellulær merking av GRP78

Intracellulær lokalisering av et spesifikt protein kan påvises ved hjelp å permeabilisere cellene før merking med spesifikt antistoff. I denne oppgaven var det ønskelig å påvise intracellulær lokalisering av GRP78 i INA-6 celler. 96-brønners brett med mørke vegger og blank bunn (Corning Costar, Corning, NY, USA) ble dekket med 0,01% Poly-L-lysin (P4707, Sigma Aldrich) for at cellene kunne feste seg til brønner ved fiksering. INA-6

celler ble høstet, sentrifuseret og resuspendert i PBS. Videre utførelse er beskrevet i Tabell 2.4.

**Tabell 2.4** Protokoll for intracellulær merking.

Behandling	Tid	Reagens
Fiksering	15min (romtemperatur)	Paraformaldehyd (4%)
Vask x 3	-	PBS
Permeabilisering	15 min (på is)	0,5% Triton-X100 (Sigma)
Vask x 3	-	PBS
Blokkering	2 timer	10% bovint serum albumin (BSA)
Vask x 1	-	PBS
Primærantistoff	Over natt (4°C)	Anti-GRP78 (N-terminal ende, 136 µg/mL)
Vask x 1	-	PBS
Sekundærantistoff	1 time	Alexa Fluor 647 (1:1000)
Vask x 1	-	PBS
Kjernefarge	10 min	Grønt fluoreserende (1:10 000 av SYTO-13, 57575, Life Technologies)

Etter endt inkubering av kjernefarge ble den intracellulære merkingen analysert på fluorescensmikroskopet ScanR (Olympus) med hjelp av Kristine Misund.

## 2.7 Flowcytometri

Flowcytometri benyttes til kvantifiserende målinger av enkeltceller i suspensjon, samtidig som det er mulig å si noe om celleinnholdet, morfologien til cellen og uttrykk av reseptorer på celleoverflaten. Prinsippet baseres på målinger av fluorescens og lysspredning (63). En cellesuspensjon kan merkes med monoklonalt antistoff konjugert med fluorescerende molekyler og styres gjennom en dyse i en tynn væskestrøm sammen med en saltløsning, som fungerer som føringsvæske. Det forårsaker at det genereres en strøm av væske som inneholder enkeltceller og disse vil så passere en monokromatisk

laserstråle. Når cellen passerer forårsaker den en spredning av laserlyset. Spredningen blir detektert som pulser ved hjelp elektronikk. Lavvinkel spredning (FSC = forward scatter) gir informasjon om cellenes størrelse, mens høyvinkel lysspredning (SSC = side scatter) gir informasjon om intracellulært innhold, som for eksempel grad av granularitet (63, 66, 67).

Uttrykket av proteiner på celleoverflaten kan måles ved at cellene merkes med monoklonale antistoffer som er konjugert med fluorescerende molekyler. Når laserlyset treffer hver enkelt celle, vil fluorescensmolekylene bundet til antistoff bli eksitert til et høyere energinivå. Når fluorescensmolekylene faller tilbake til sitt grunnivå, avgir fluorokromen lysenergi, som går under navnet emisjon. Dette emisjonslyset sprer seg i alle retninger og samles opp av optikk, som dirigerer lyset videre til ulike filtre og dikromatiske speil som isolerer en bestemt bølgelengde. Videre analyseres og prosesseres informasjonen av et dataprogram (66, 67).

11 myelomcellelinjer ble testet for uttrykk av GRP78 på celleoverflaten. Cellene ble sentrifugert ved lav temperatur (4°C) for å forhindre en eventuell denaturering eller internalisering av ulike proteiner. Cellepelletten ble resuspendert og antall celler bestemt ved hjelp av Z2 Coulter Counter. Alt arbeid ble utført på is, for å sikre mest mulige spesifikk binding av antistoffene. Et bestemt antall celler til forsøket ble tatt ut fra celledensjonen til merking med antistoff. Cellene ble vasket, tilsatt 100 µL primærantistoff, og deretter inkubert på is i 30 min. Før sekundærantistoffet ble tilsatt, ble det gjennomført et vasketrinn, dette for å fjerne ubundet primærantistoff og unngå falske positive svar. Cellene ble inkubert 30 min på is etter tilsatt av sekundærantistoff. Sekundærantistoffet er konjugert med et spesifikt fluorokrom, og det ble derfor gjennomført nytt vasketrinn etter endt inkubering, for å unngå falske positive signal. Et BD LSR II flowcytometer (BD, Bioscience, USA) ble benyttet for samling av data og resultatene ble analysert med FlowJo software.

### **2.7.1 Uttrykk av C- og N-terminal ende av GRP78 på celleoverflaten**

300 000 celler ble fordelt i to rør, hvor første rør ble merket med isotypeantistoff og det andre rør ble merket med primærantistoff. Begge rørene ble merket med sekundær antistoff konjugert med fluorokrom. Benyttede antistoff er listet opp i Tabell 2.2.

## **2.8 Heparinvask**

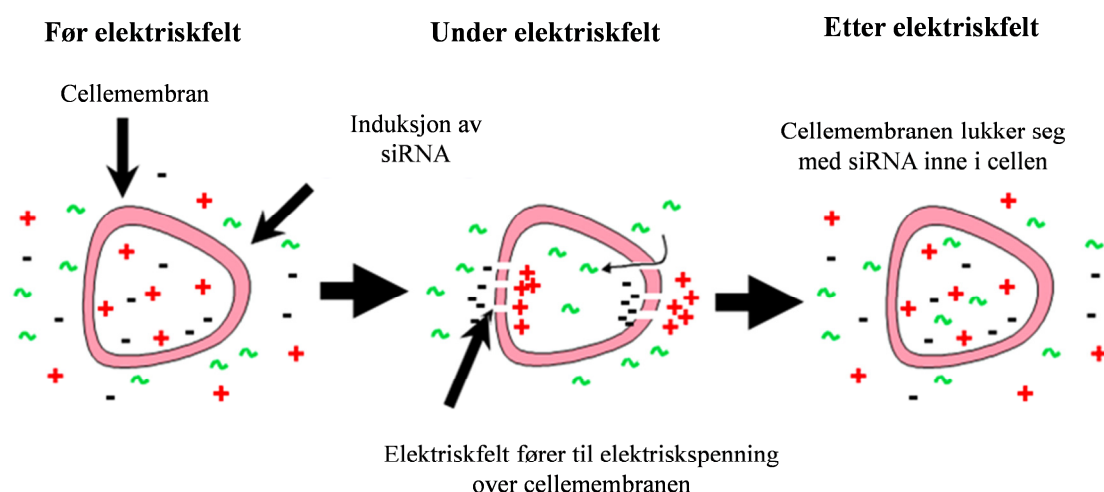
Det er ikke beskrevet hva som binder GRP78 på celleoverflaten og det ble derfor utført heparinvask for å undersøke om GRP78 på celleoverflaten kan være bundet til heparansulfatkjeder (11). En viktig vekstfaktor for myelomceller er hepatocyt vekstfaktor (HGF) og det er vist at den binder til heparansulfatkjeder på myelomceller (68). Den ble derfor brukt som positiv kontroll i dette forsøket. Halvparten av INA-6 cellene ble behandlet med HGF og halvparten av de ble i tillegg behandlet med heparin. INA-6 behandlet med HGF og heparin fungerte som kontroll på at heparinet virket optimalt og brøt forbindelsen mellom heparansulfat og HGF.

INA-6 celler ble behandlet med 0, 10, eller 100 µg/mL heparin. Flowcytometer ble benyttet for å se etter forandringer i uttrykk av GRP78 på celleoverflaten etter behandling med heparin. Cellene ble merket med isotypekontroll (Normalserum fra kanin, 136 µg/mL), spesifikt antistoff mot GRP78 (N-terminal ende, 136 µg/mL) og inkubert 30 min på is. Vasketrinn ble utført for å fjerne ubundet antistoff og deretter ble cellene merket med sekundærantistoff (geit, anti-kanin, Alexa Fluor 647, 1:1000).

## **2.9 Transfeksjoner og siRNA**

RNA interferens kan brukes til å slå ned et genuttrykk ved at små dobbeltrådede RNA segmenter kutter komplementære mRNA sekvenser (69). Enzymet DICER fra RNaseIII familien kutter lange dobbeltrådede RNA til korte segmenter på rundt 21-23 basepar, kalt korte interfererende RNA (siRNA). Disse fungerer som guide-sekvenser og inngår i RISC-komplekset som kløyver templat mRNA med lik basesekvens (70). Ved å slå ned spesifikke gener er det mulig å analysere og evaluere genets fysiologiske rolle (71).

Elektroporeringsmetoden Nucleofector technology ble benyttet for transfeksjon av myelomcellelinjen INA-6. Metoden kombinerer elektriske parametere og reagenser for å få plasmid DNA, oligonukleotider og siRNA direkte inn i cellekjernen (72). Dette skjer under påvirkning av en sterk elektrisk puls som danner porer i cellemembranen, samt en elektrostatiske drivkraft som transporterer store molekyler inn i cellekjernen (Figur 2.2) (73).



**Figur 2.2** Figuren viser en normal, celle uten elektriskpuls, med intakt cellemembran og balanse mellom positive og negative ladninger på inn- og utsiden av membranen. siRNA tilsettes kuvetten med celler og når de blir utsatt for et elektriskfelt, så dannes små hull i membranen, hvor ladningene innen og utenfor cellen fordeler seg i forhold til det elektriske feltet. Etter elektriskpuls vil membranen lukke seg med siRNA inne i cellen og ladningene går tilbake til naturlig fordeling, med likevekt mellom inn- og utsiden av membranen. Figuren er hentet og modifisert fra (74).

For å finne betydningen av GRP78-uttrykk ble INA-6 celler transfektert ved hjelp av elektroporering (Nucleofector<sup>TM</sup> II, Amaxa, Biosystems). Det ble benyttet Nucleofector kit R (11506479, Lonza, Fisher Scientific) GRP78 spesifikke siRNA s6979, s6980, s6981 (4427037, Ambion, Life Technologies), Negativ kontroll 1 (4390843) og Negativ kontroll 2 (4390846, Ambion, Life Technologies) og VCP spesifikke siRNA s14766 (4392420) og s14765 (4390824, Ambion, Life Technologies) (1  $\mu$ M). Siden cellene er vanskelige å transfektere og denne metoden maksimalt gir 30-40% transfeksjonseffektivitet var det nødvendig med en seleksjonsmetode. Cellene ble derfor

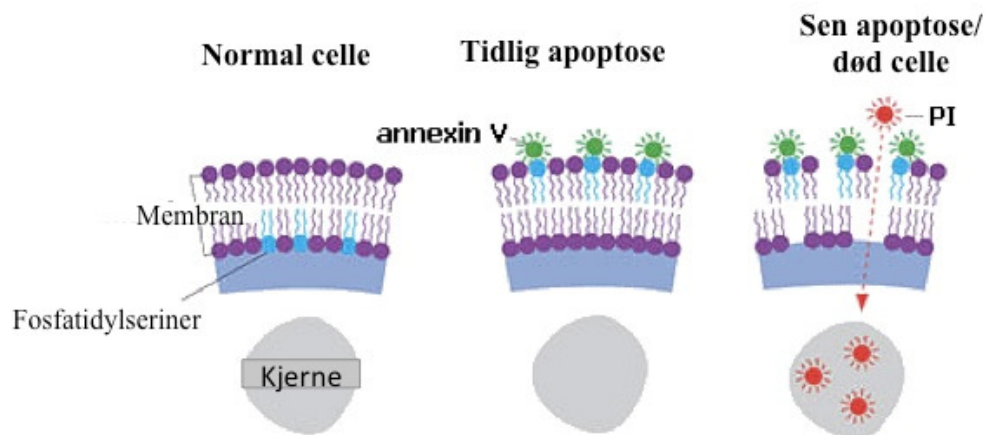
kotransfektet med et plasmid som koder for trunkert CD4 (2,5 µg/kuvette). Kotransfeksjon med trunkert CD4 ble utført for å kunne differensiere mellom celler som har tatt opp siRNA og cellene som ikke har blitt elektroporert. Trunkert CD4 har kun ekstracellulærdel og ingen intracellulærdel, og vil derfor ikke gi noen signalisering inne i cellene. CD4 ble kun benyttet som en reseptor for å skille transfekterte fra utransfekte celler.

Transfekte INA-6 celler ble sådd ut i 24-brønners brett (Corning Costar, Corning, NY, USA) og inkubert ved 37°C i 5% CO<sub>2</sub>-skap over natt. Neste dag ble CD4 positive celler isolert ved hjelp av paramagnetiske kuler (Dynabeads® CD4 positive Isolation kit, by Life Technologies). Celler uten CD4 ble vasket vekk og de resterende cellene ble inkubert videre i 5% CO<sub>2</sub>-skap, 37°C over natt.

Transfekte INA-6 celler med siRNA mot VCP ble analysert ved Western blot for å påvise om nedslått gen for VCP hadde betydning for totalprotein nivået til GRP78.

## **2.10 Påvisning av apoptose**

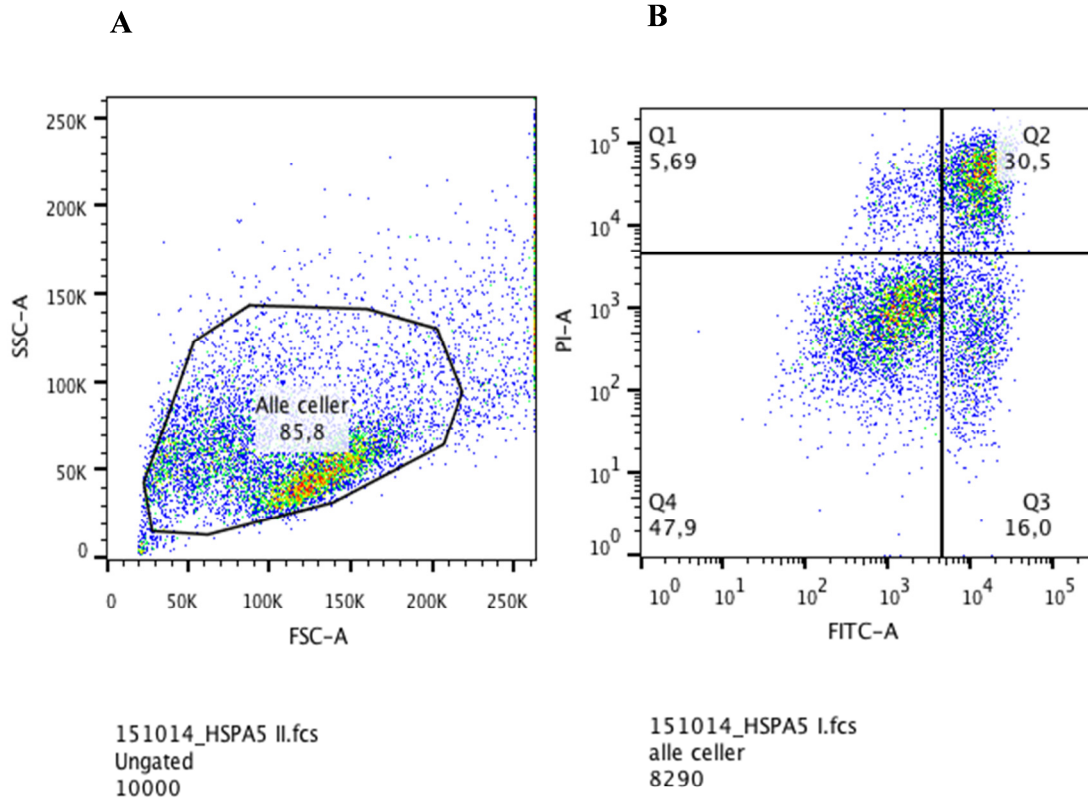
Eksponering av fosfatidylserine (PS) er kjennetegnet på at cellen befinner seg i tidlig apoptose (Figur 2.3). Annexin V (35-36 kDa), er et Ca<sup>2+</sup> avhengig, rekombinant protein som binder fosfatidylseriner med høy affinitet. FITC-merket annexin V kan benyttes sammen med flowcytometri for å påvise eksponerte fosfatidylseriner på celleoverflaten (75).



**Figur 2.3** En normal celle har fosfatidylseriner vendt inn mot den cytoplasmatiske delen av cellen. Eksponering av fosfatidylseriner på celleoverflaten er et typiske kjennetegn på at cellen er i apoptose. FITC-merket Annexin V sammen med  $\text{Ca}^{2+}$  fester seg til fosfatidylseriner på celleoverflaten og dette kan påvises ved bruk av flowcytometri. Sen apoptose/ døde celler kjennetegnes ved at membranen er ødelagt og permeabel, og PI entre cellen og binde seg til DNA. Annexin V og PI kan dermed benyttes for å skille mellom tidlig og sent apoptotiske/døde celler. Figuren er hentet og modifisert fra (76).

Permeabiliteten av plasmamembranen er en sentral forskjell mellom tilstandene tidlig- og sen apoptose. Propidium iodide (PI) er et fargestoff som binder seg til DNA. Levende celler med en intakt cellemembran vil ikke kunne reagere med PI. Celler som befinner seg i stadiet sen apoptose/død karakteriseres ved at membranen er permeabel og opptak av PI er mulig. Ved bruk av flowcytometer og FlowJo er det mulig å skille tidlig apoptotiske fra sent apoptotiske/døde celler. Resultatet blir prosessert i dataprogrammet FlowJo og cellene presenteres i diagram med fire kvadranter Q1-Q4. Q2 representerer sent apoptotiske/døde celler, Q3 representerer tidlig apoptotiske celler og Q4 inneholder levende celler (Figur 2.4) (43, 75).





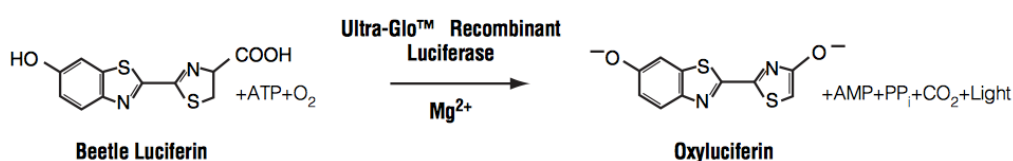
**Figur 2.4 A:** Cellene markeres for videre analysering i programmet FlowJo. **B:** Cellene deles opp ut i fra merking av annexin V og opptak av PI. Q4 er viable celler som er både annexin V og PI negativ, Q2 er annexin V negativ og PI positiv sent apoptotiske/døde celler, Q3 er annexin V positiv og PI negativ og viser antall celler i apoptose (77).

For å observere om nedslåing av genet HSPA5 har noen betydning for overlevelsen til INA-6, ble transfekterte INA-6 celler merket med Annexin V/PI kit (Nexins Research, Hoeven, Netherlands). Basert på tidligere erfaring ved myelomgruppa er siRNA effekten best ved dag tre. Cellene ble inkubert på is i 1 time med annexin V FITC (0,2 µg/mL) i bindingbuffer. PI (1,4 µg/mL) ble tilsatt 5 minutter før analysering med BD LSR II flowcytometer (BD, Biosciences, USA)

## 2.11 Proliferasjonstudier

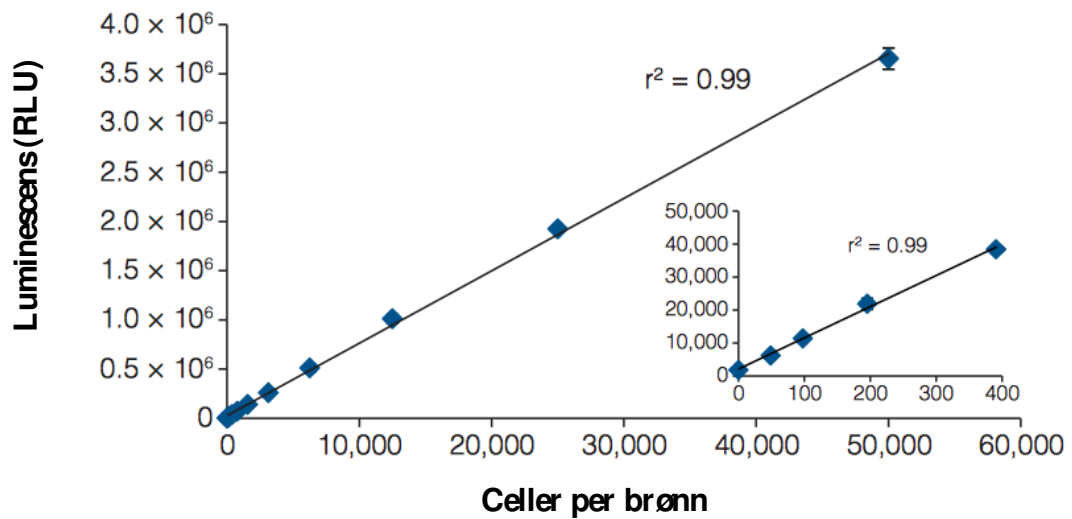
ATP kan benyttes som en indikator på levende celler på grunn av dens funksjon som en energibærer og evne til å frigi energi, dersom cellen utfører energikrevende prosesser (17). Bestemme det relative antallet levende celler i en cellekultur kan benyttes til kvantifisering av tilstedeværende ATP molekyler (78).

CellTiter Glo (G7573, Promega, Nerliens Meszansky AS) er en celleproliferasjonsmetode som baseres på et termostabilt enzym, luciferase, (Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase). Romtemperert CellTiter Glo reagens tilsettes cellemediumet i brønnene for å igangsette lysing av cellene som fører til frigjørelse av ATP. Ved hjelp av mono-oksydering vil Luciferin, som også er en del av reagenset, bli konvertert til inaktive oxyluciferin som avgir detektbart lys (luminescens) (Figur 2.5). Denne reaksjonen blir katalysert av enzymet Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase og er avhengig av at ATP, magnesium ( $Mg^{2+}$ ) og oksygen ( $O_2$ ) er tilgjengelig (78).



**Figur 2.5** Luciferinreaksjon. Luciferin blir konvertert til oxyluciferin ved katalysering av luciferase i nærvær av magnesium ( $Mg^{2+}$ ), oksygen ( $O_2$ ) og ATP. Et av produktene fra reaksjonen er lys som kan detekteres ved hjelp av Victor plateleser (78).

Mengden ATP er den begrensende faktoren i denne analysen, og målt luminescens vil derfor være proporsjonal med mengde ATP tilstede i brønnen (Figur 2.6) (78).



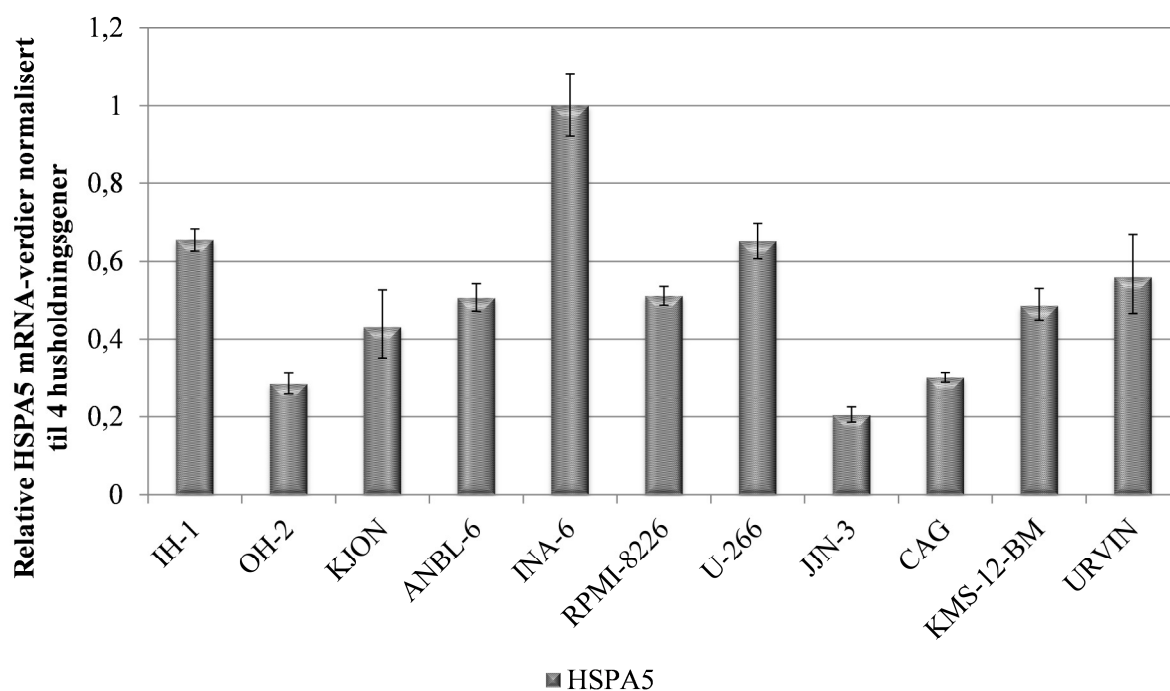
**Figur 2.6** Antall celler i cellekulturen er direkte proporsjonal med mengden ATP i cellekulturen, og dette er målt med luminescens (78).

INA-6 ble sådd ut i hvite 96 brønners brett med flat og blank bunn (Corning Costar, Corning, New York, USA), 10 000 celler/brønn ble behandlet som indikert i resultatdelen og inkubert i CO<sub>2</sub>-skap med 5% CO<sub>2</sub> og 37°C. Etter endt inkubering ble cellene avkjølt til romtemperatur før CellTiter Glo reagenset i tilsvarende mengde som totalvolumet i brønnen ble tilsatt hver brønn. Brettet ble inkubert 2 min med risting, og tilslutt 10 min på benk. Luminescens fra hver brønn ble så avlest med en Victor plateleser (PerkinElmer Inc., Waltham, MA).

### 3 Resultater

#### 3.1 Uttrykk av GRP78-mRNA i 11 ulike myelomcellelinjer

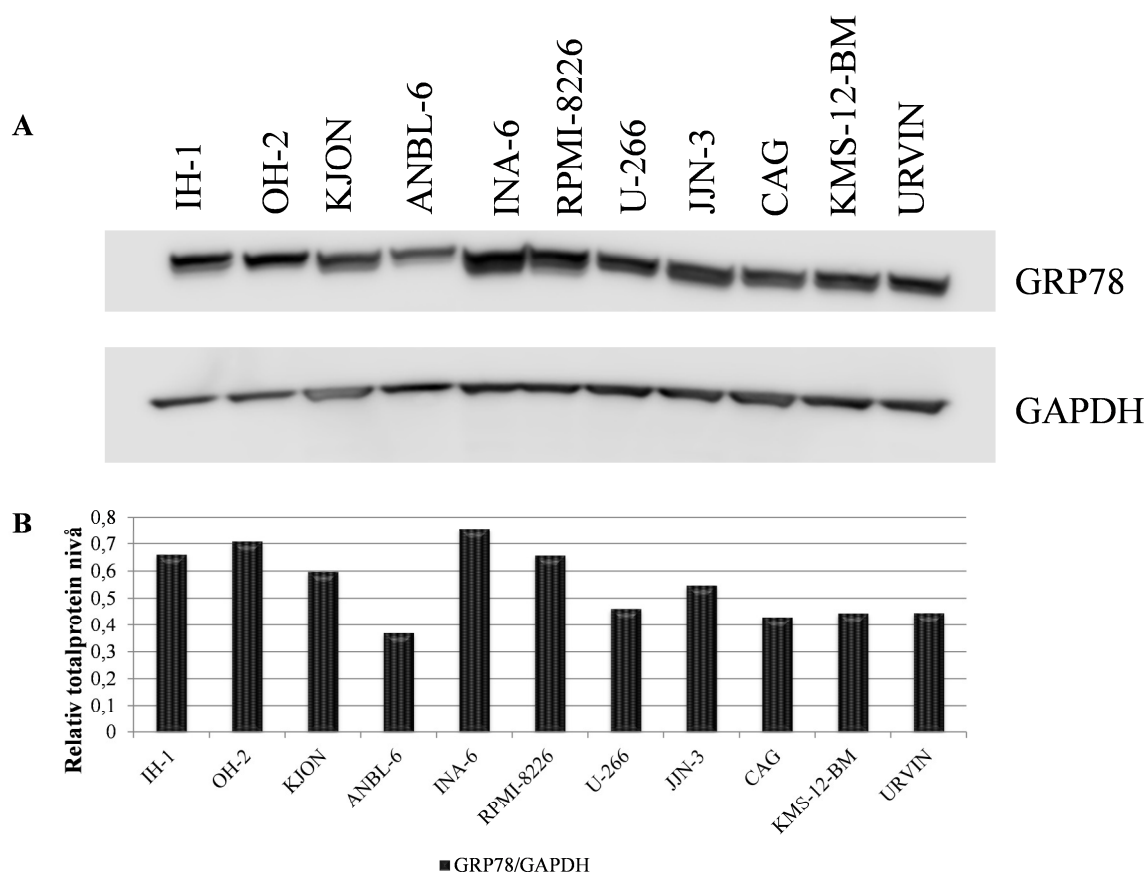
Et av målene for oppgaven var å undersøke det totale uttrykket av GRP78 mRNA og proteinnivå hos de 11 ulike myelomcellelinjene (Tabell 2.1). Videre var det ønskelig å relatere det intracellulære uttrykket til overflateuttrykk av GRP78. Det generelle mRNA uttrykket av gen HSPA5 som koder for GRP78 ble undersøkt først. Kvantifisering av mRNA-uttrykk ble utført med RT-qPCR hvor mRNA-verdier av gen HSPA5 ble relatert til fire ulike husholdningsgener; GAPDH, ACTB, TBP og USF2. Alle gen ble analysert i tripliket. Alle myelomcellelinjene viste ulikt, men høy grad av uttrykt mRNA-verdier til gen HSPA5 og Ct-verdiene varierte fra 21,5 til 23,8. mRNA uttrykket til INA-6 var høyest og ble satt til 1 (Figur 3.1).



**Figur 3.1** Genet HSPA5 koder for GRP78 og RT-qPCR ble benyttet for å kvantifisere mRNA uttrykket av HSPA5 i 11 ulike myelomcellelinjer. mRNA uttrykket i de 11 myelomcellelinjene vises relativt til fire ulike husholdningsgener, GAPDH, ACTB, TBP og USF2. Uttrykket i INA-6 var høyest og ble satt til 1. Standardavvik er markert som feilliner på søylene.

### 3.2 Totalt proteinuttrykk av GRP78 i 11 ulike myelomceller

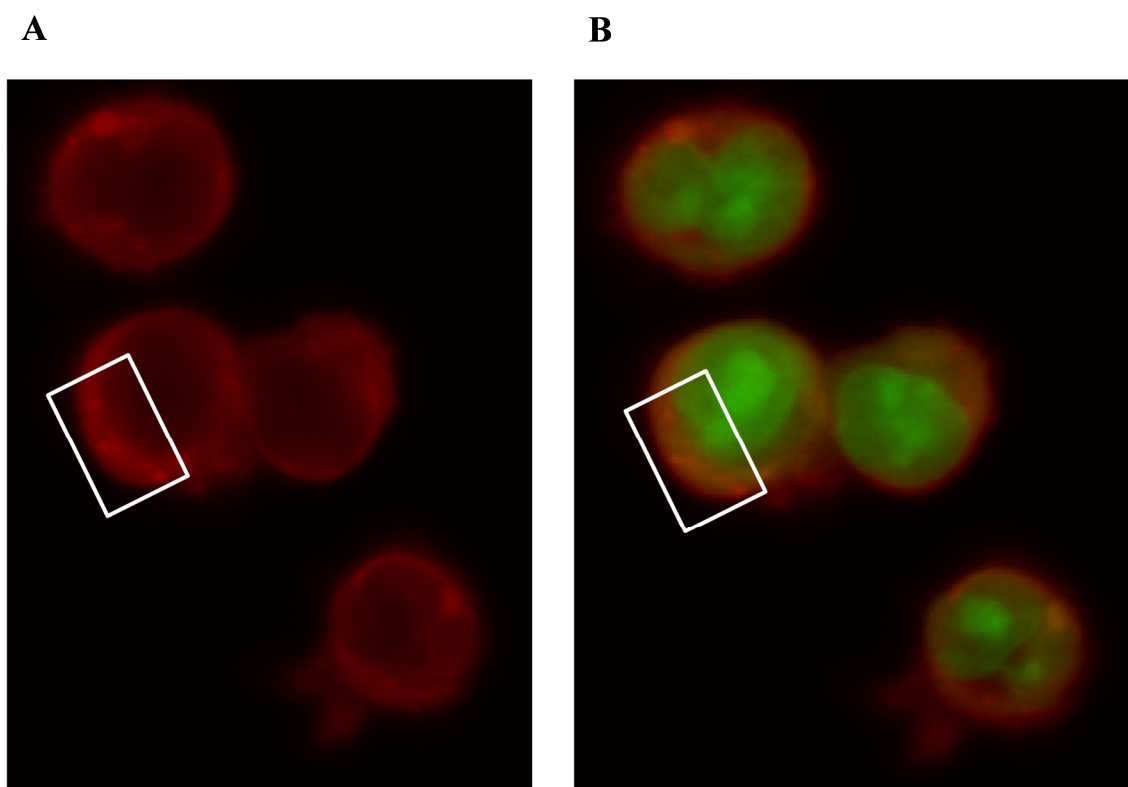
For å se etter eventuelle samsvar mellom mRNA og total mengde GRP78 protein i de 11 myelomcellelinjene ble det utført Western blot. Før applisering av cellelysat på gel ble mengden protein målt (MicroBCA™ Protein Assay Kit, 23235, Thermo Scientific) og justert slik at lik mengde protein ble tilsatt hver brønn. Antistoff som var rettet mot N-terminal ende av GRP78 ble benyttet for påvisning. Antistoff mot GAPDH ble benyttet som normaliseringskontroll. Det ble påvist ulik mengde totalprotein av GRP78 (Figur 3.2). Beregnet ratio ut i fra målt luminescens fra GRP78- og GAPDH-bånd. INA-6 viste høyest mengde totalprotein av GRP78.



**Figur 3.2 A:** Mengde totalprotein av GRP78 (78 kDa) i 11 myelomcellelinjer, påvist ved bruk av Western Blot og spesifikt antistoff mot N-terminal ende av GRP78. GAPDH (37 kDa) ble benyttet som normaliseringskontroll. **B:** Signalstyrken i båndene ble beregnet med ImageStudio Ver3.1 software og ratio mellom målt luminescens fra GRP78- og GAPDH-bånd er beregnet. INA-6 viste høyest mengde totalprotein av GRP78.

### 3.3 Lokalisering av intracellulært GRP78

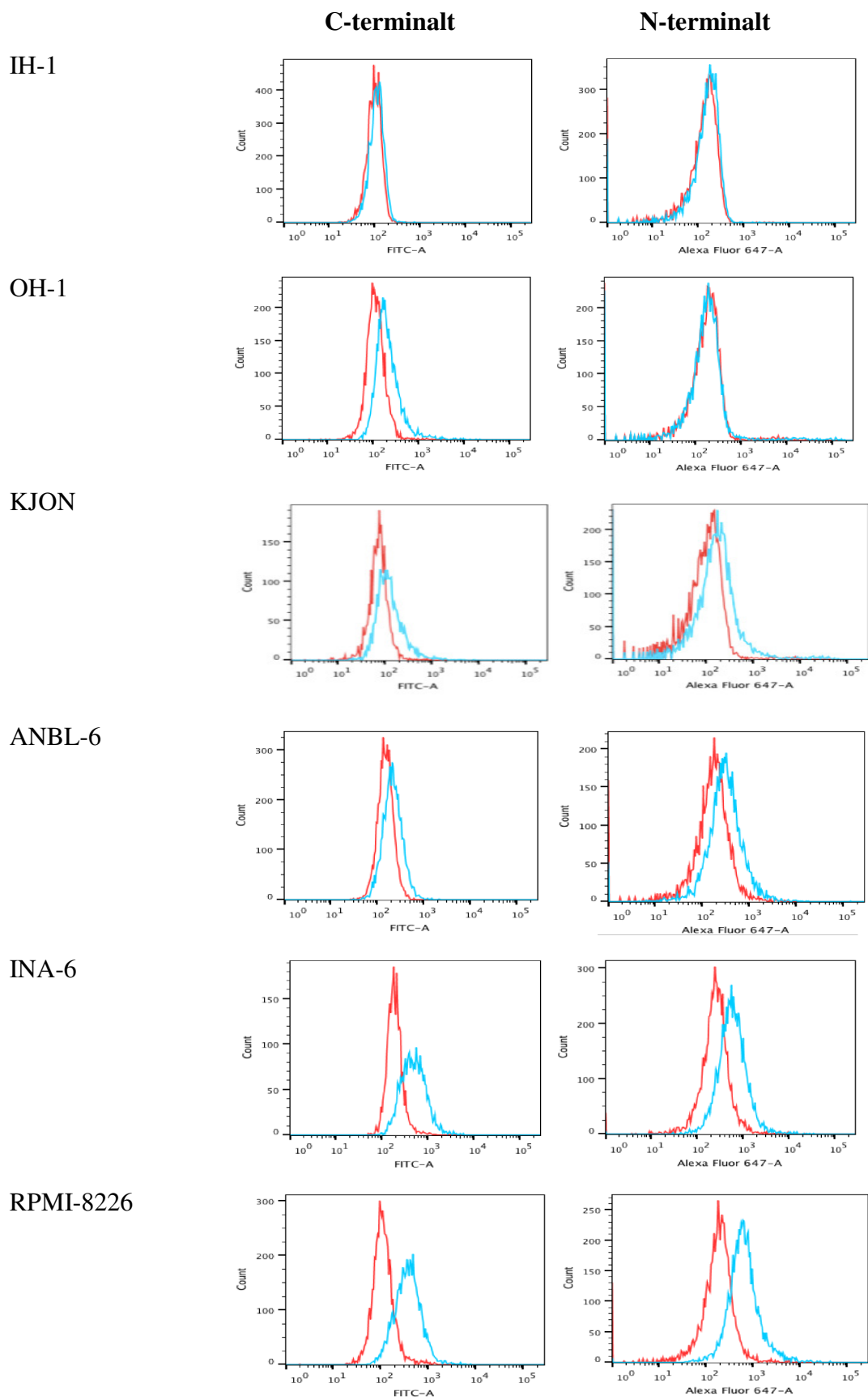
Hensikten med å påvise GRP78 intracellulært i INA-6 celler var å se hvor hovedvekten av GRP78 er lokalisert i ustimulerte celler. Cellene ble fiksert og merket i 96 brønners brett før analysering med ScanR fluorescensmikroskop. Som vist i Figur 3.3 ble GRP78 positivt merket intracellulært, hovedsakelig i cytoplasma. Dette indikerer at GRP78 er lokalisert rundt kjernen, muligens inne i ER.



**Figur 3.3 A:** INA-6 celler intracellulært merket med primærantistoffet GRP78 mot N-terminal ende og sekundærantistoffet Alexa Fluor 647. Bildene er tatt med mikroskopet ScanR. Den hvite rammen viser signal av intracellulær GRP78 . **B:** Viser samme celler som **A**, med farging (SYTO-13) av cellekjernene som indikerer at GRP78 er lokalisert rundt cellekjernene hos INA-6 cellene.

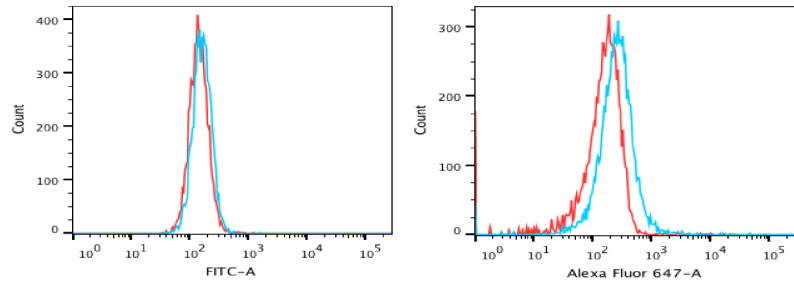
### **3.4 GRP78 uttrykt på celleoverflaten i 11 ulike myelomceller**

Antistoff rettet mot C- og N-terminal ende av GRP78 ble benyttet for å studere i hvilken grad myelomceller uttrykker GRP78 på celleoverflaten. Prøvene ble analysert med flowcytometri, og FlowJo ble benyttet for å prosessere resultatene og fremstille uttrykket av GRP78 på celleoverflaten (Figur 3.4) Isotypeantistoff ble brukt for å definere hva som er negativt signal for hver celletype og alt over dette ble betraktet som positivt uttrykk av GRP78. Geometrisk gjennomsnittsverdi for hver cellelinje ble også beregnet (Tabell 3.1). Det ble på forhånd utført titrering av begge antistoffene for å finne optimal konsentrasjon for merking av GRP78. Resultatene viste at de 11 myelomceller har ulikt uttrykk av GRP78 på celleoverflaten, både med N- og C-terminal ende. IH-1 og KMS-12-BM ga negativt resultat, mens de andre myelomceller ga ulik grad av positivt resultat på både N- og C-terminal ende av GRP78. Cellelinjen INA-6 ble hovedsakelig valgt til videre forsøk på grunnlag av godt uttrykk av både C- og N-terminal ende på celleoverflaten, men også fordi INA-6 er den cellelinjen som er lettest å transfektere blant de 11 myelomceller som ble benyttet (79).

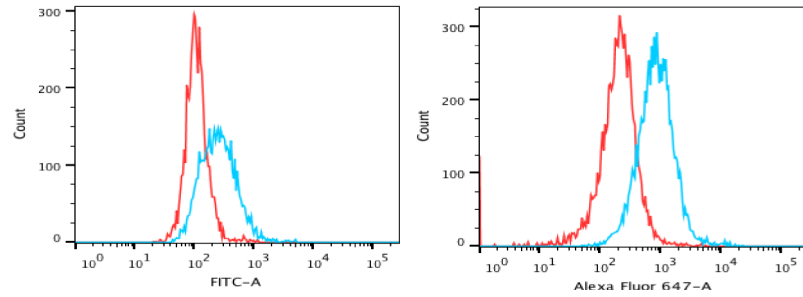




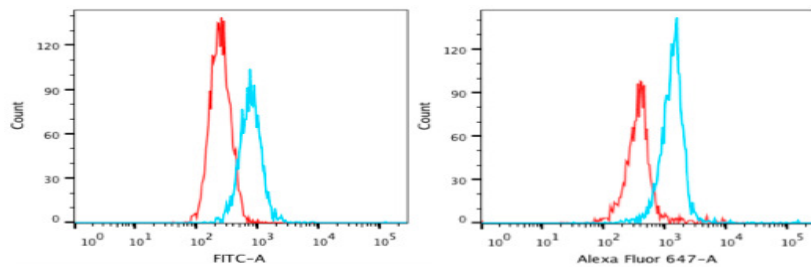
U-266



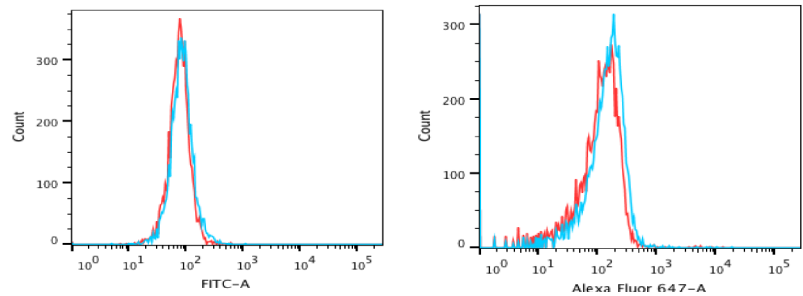
JJN-3



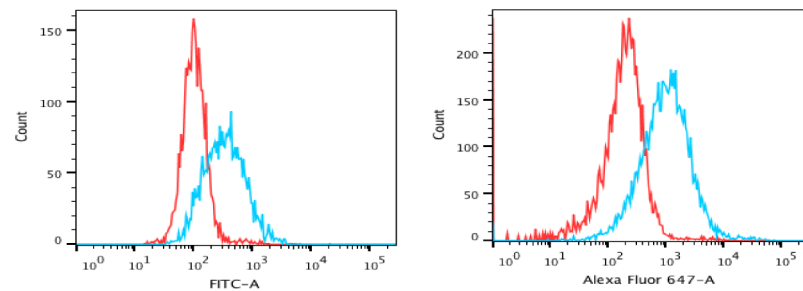
CAG





KMS-12-BM



URVIN



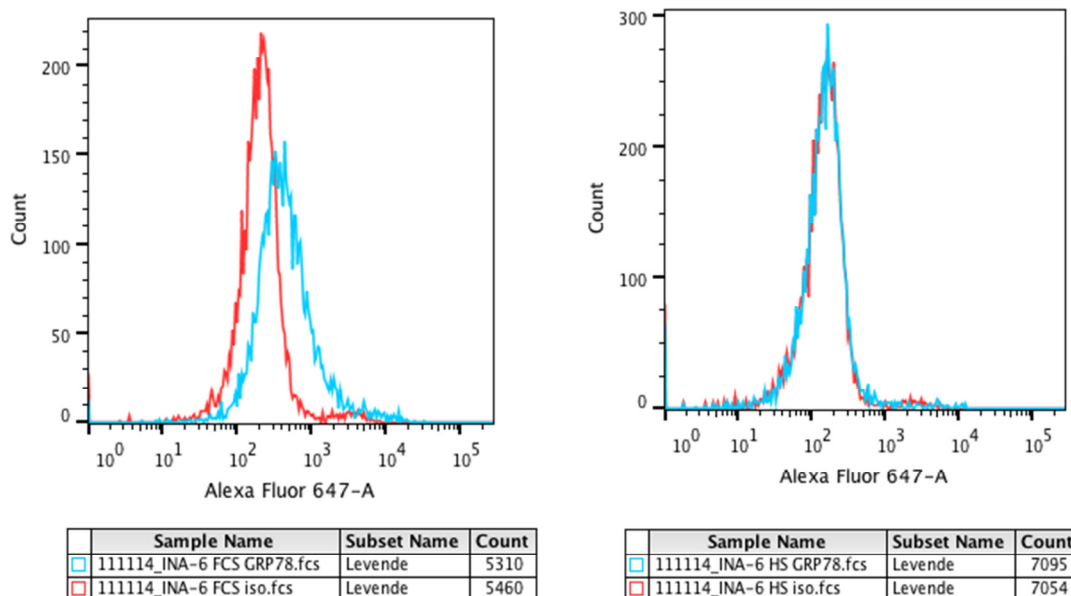
**Figur 3.4** Uttrykk av GRP78 på celleoverflaten hos 11 ulike myelomcellelinjer. GRP78 er merket både mot C- (FITC) og N-terminal ende (Alexa Fluor 647) med isotype- og spesifikke antistoff  og analysert ved bruk av flowcytometri.

**Tabell 3.1:** Skift i fluoresens målt med flowcytometri og analysert med FlowJo. Beregnet geometrisk gjennomsnitt for antistoff mot C- og N- terminal ende av GRP78, samt beregnet ratio mellom isotypeantistoff (kontroll) og spesifiktantistoff (mot C-/N-terminal ende av GRP78).

Cellelinje	Geometrisk gjennomsnitt				Ratio C-terminal	Ratio N-terminal
	Kontroll	C-terminal GRP78	Kontroll	N-terminal GRP78		
IH-1	100	115	355	396	1,15	1,12
OH-2	123	244	728	1021	1,98	1,40
KJON	78,9	156	323	533	1,97	1,65
ANBL-6	157	231	924	1187	1,47	1,28
INA-6	199	526	1204	2965	2,64	2,46
RPMI-8226	127	416	566	1402	3,27	2,48
U-266	149	167	359	600	1,12	1,67
JJN-3	120	306	426	864	2,55	2,03
CAG	250	760	670	1535	3,04	2,29
KMS-12-BM	81,3	92,4	254	330	1,13	1,30
URVIN	119	409	521	1576	3,44	3,02

### 3.4.1 Varierende uttrykk av GRP78 N-terminal ende

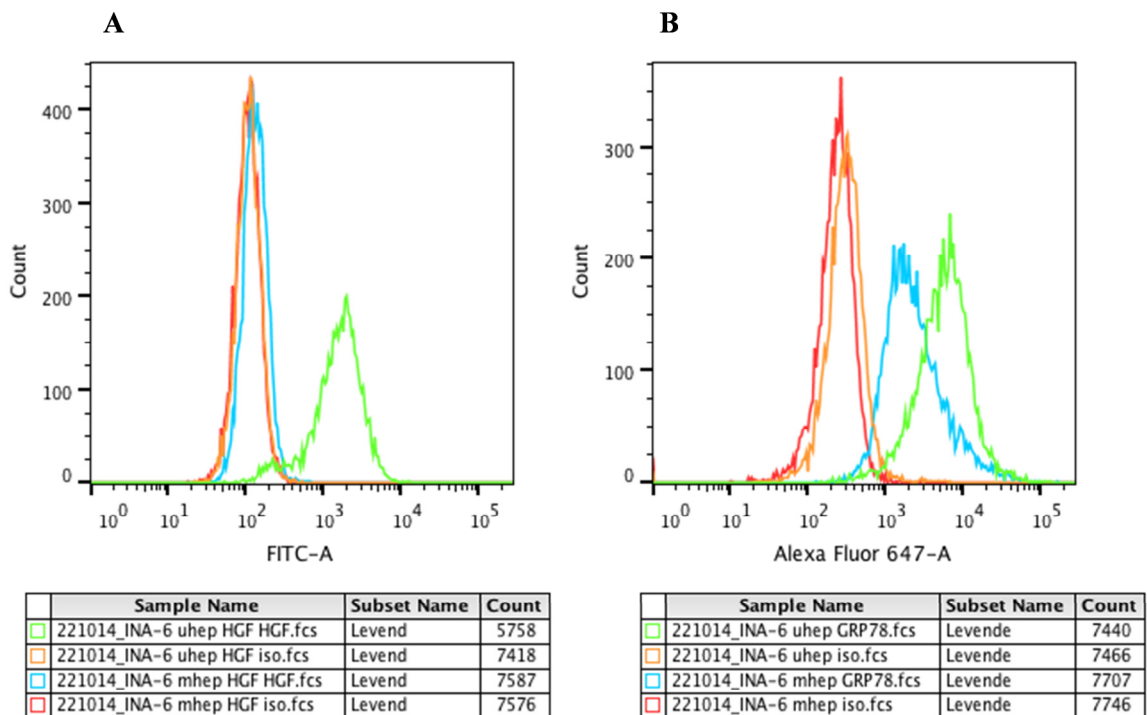
Uttrykket av GRP78 på celleoverflaten har variert veldig fra gang til gang. Uttrykket har aldri vært negativt, men grad av positivt uttrykk har vist variasjon. Det er utført flere forsøk for å undersøke mulige faktorer som kan påvirke overflateuttrykket av GRP78 til INA-6. Faktorer som celletetthet, stimulering over natt med medium uten serum hvor 0,1% BSA erstattet 10% kalveserum og medium uten glukose ble testet ut. Ingen av disse faktorene ga noe svar på hvilke faktorer som påvirker variasjonen av GRP78 på overflaten til INA-6. Stimulering med kalveserum og humant serum over natt ble også utført. Uttrykk av GRP78 ble analysert ved bruk av flowcytometri på vanlig måte. Kalveserum sammenlignet med humant serum viste redusert uttrykt av GRP78 på celleoverflaten til INA-6 (Figur 3.5). Forsøket med kalveserum og humant serum ble kun utført to ganger, med omtrent samme resultat.



**Figur 3.5** INA-6 celler stimulert med kalveserum (FCS) og humant serum (HS) over natt. Uttrykk av GRP78 på celleoverflaten til INA-6 ble analysert ved bruk av flowcytometri og merket med antistoff rettet mot N-terminal ende av GRP78. Isotypeantistoff ble benyttet som negativ kontroll. Humant serum viste nedgang i GRP78 uttrykt på celleoverflaten til INA-6.

### 3.5 Binding av GRP78 på celleoverflaten

Hvordan GRP78 blir fraktet og lokalisert på celleoverflaten er foreløpig ikke kjent og det var derfor ønskelig å studere hva som binder GRP78 på celleoverflaten. Det ble utført heparinvask for å se om GRP78 kan være et heparinbindende protein. Heparin vil bryte en eventuell binding mellom GRP78 og heparansulfatkjedene på celleoverflaten. INA-6 behandlet med HGF, som binder til heparansulfatkjeder, og videre med og uten heparin, ble benyttet som kontroll på at heparinet fungerer (Figur 3.6A). INA-6 ble behandlet med ulike konsentrasjoner av heparin. Analysen ble gjentatt flere ganger med inkubering både i romtemperatur og på is, og alle forsøkene ga reproduserende resultat. Prøvene ble analysert ved bruk av flowcytometri og FlowJo. INA-6 behandlet med HGF og heparin ga negativt resultat som indikerer at heparinet fungerte optimalt under forsøkene. INA-6 behandlet med heparin og merket med GRP78 antistoff mot N-terminal ende viste en liten nedgang i forhold til INA-6 uten heparinbehandling (Figur 3.6B). Nedgang i uttrykk av GRP78 på celleoverflaten indikerer at GRP78 binder delvis til heparansulfatkjeder.

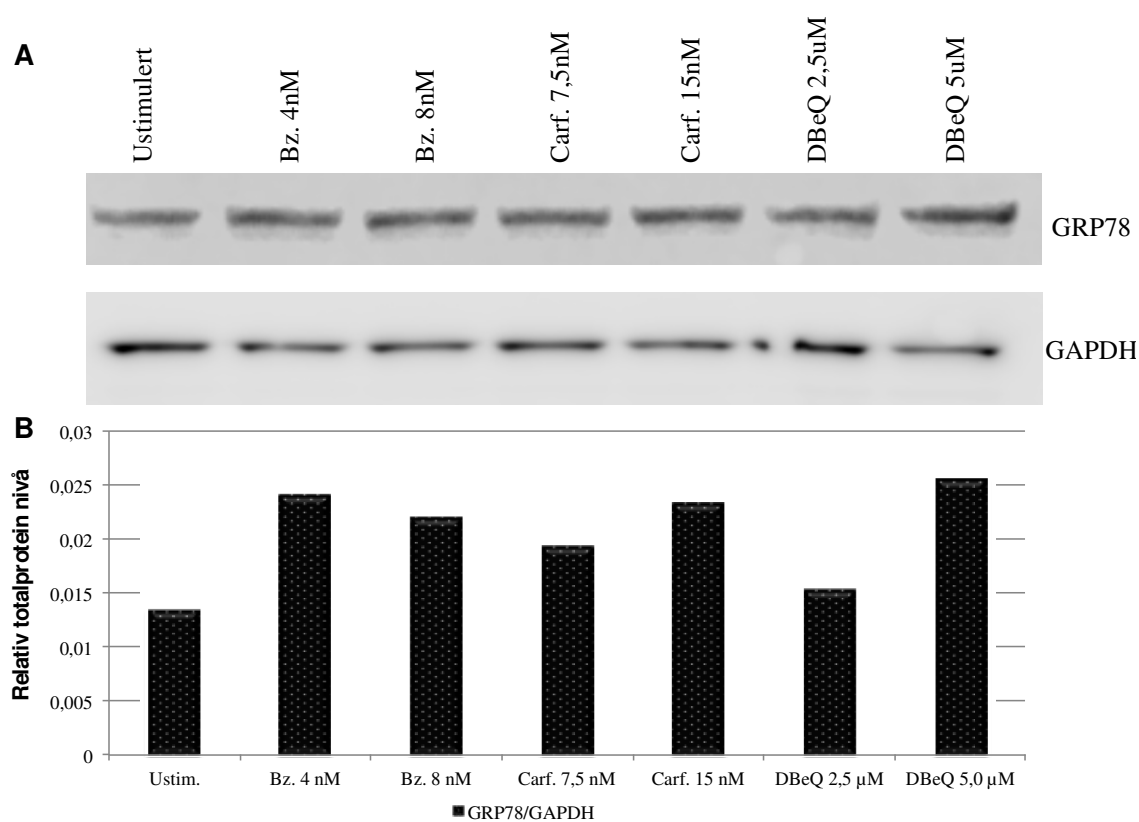


**Figur 3.6** Heparinvask ble utført for å påvise hva som binder GRP78 på celleoverflaten **A:** INA-6 ble behandlet med HGF før halvparten av celleduspensjonen ble behandlet med heparin som kontroll på at heparinet fungerer. **B:** INA-6 behandlet med spesifikt antistoff mot N-terminal ende til GRP78 hvor halvparten INA-6 cellene ble behandlet med heparin og den andre halvparten ikke ble behandlet. INA-6 behandlet med heparin viste en delvis nedgang i uttrykk av GRP78 på celleoverflaten.

### 3.6 Stimulering med proteasomhemmere og VCP-hemmer

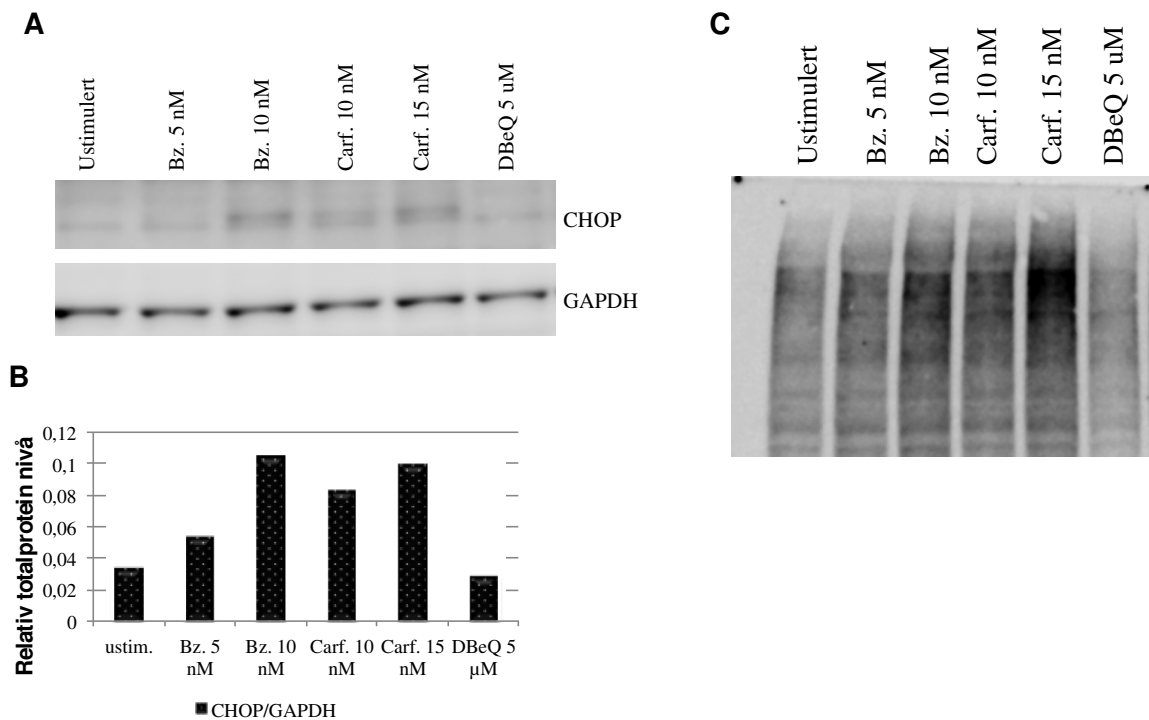
Det er kjent at myelomceller generelt har høy grad av ER-stress og trenger et velfungerende apparat for å bryte ned overskudd av immunoglobulinkjeder. INA-6 ble stimulert i 6 timer med proteasomhemmerne Bortezomib (PS-432, S1013, Selleckhem), Carfilzomib (PR-171, A-1098, Active Biochem) og VCP-hemmeren DBeQ (SI9750, Lifesensors.com) for å undersøke om ytterligere påføring av stress ga utslag på mengde GRP78 protein (Figur 3.7). Western blot ble benyttet med GAPDH som normaliseringskontroll og INA-6 ustimulert som negativkontroll. Ratio av

GRP78/GAPDH ble beregnet ut fra signalstyrken på båndene. Behandling med DBeQ (5,0  $\mu$ M) ga den største økningen i GRP78 protein.



**Figur 3.7 A:** INA-6 ble stimulert i 6 timer med Bortezomib, Carfilzomib og DBeQ for å undersøke effekten av proteasomhemming og VCP-hemming på total proteinnivået av GRP78. GAPDH ble benyttet som loadingkontroll. **B:** Beregnet ratio ut i fra målt luminescens fra GRP78- og GAPDH-bånd. Behandling med DBeQ (5 $\mu$ M) ga den største økningen i GRP78 protein.

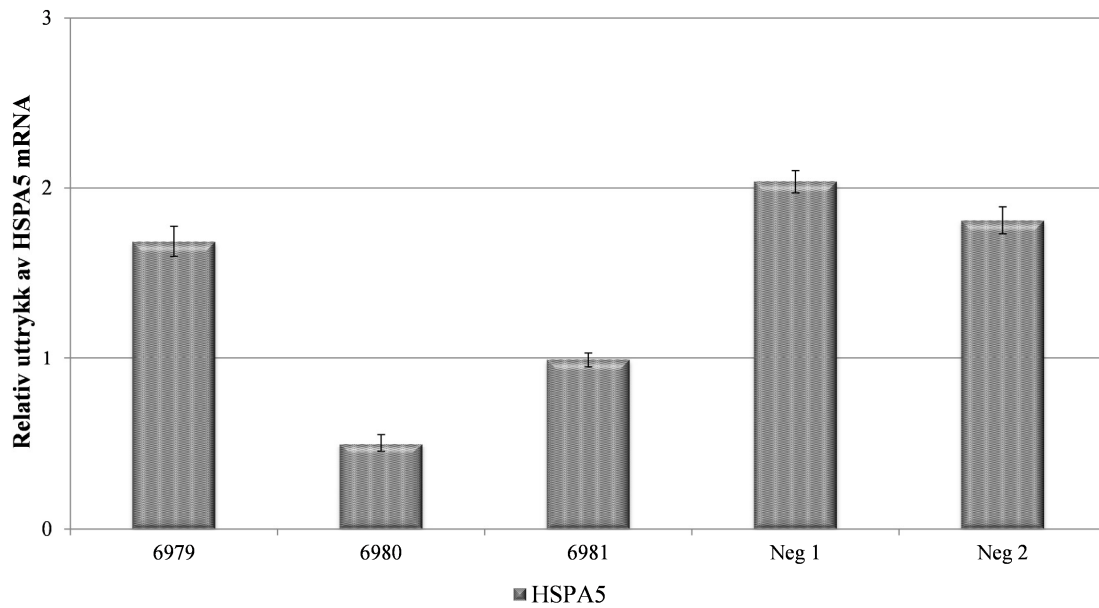
CHOP er en pro-apoptotisk transkripsjonsfaktor som blir oppregulert av alle de tre ER-stress-sensorene. Det var derfor ønskelig å behandle INA-6 med ulike hemmere for å potensielt gi økt ER-stress og dermed undersøke om det ga endring i mengde CHOP-protein og ubiquitinerte proteiner. INA-6 ble stimulert i 6 timer med Bortezomib, Carfilzomib og DBeQ. Ustimulert INA-6 ble benyttet som negativ kontroll og GAPDH ble benyttet som normaliseringskontroll. Cellepelletene ble lysert i UREA-lysisbuffer og analysert med Western Blot. De høyeste konsentrasjonene av Bortezomib og Carfilzomib ga størst økning av CHOP proteinnivå (Figur 3.8A). Det ble også påvist større mengde ubiquitinerte proteiner ved de høyeste konsentrasjonene av Bortezomib og Carfilzomib (Figur 3.8C).



**Figur 3.8 A:** INA-6 stimulert i 6 timer med ulike hemmer og total proteinnivå av CHOP (27 kDa) ble påvist ved bruk av Western Blot. **B:** Beregnet ratio ut i fra målt luminescens fra CHOP- og GAPDH-bånd. De høyeste konsentrasjonene av bortezomib og carfilzomib ga størst økning av CHOP proteinnivå. **C:** Total proteinnivå av ubiquitinererte proteiner ble påvist i samme blot som A. De høyeste konsentrasjonene av bortezomib og carfilzomib ga størst økning av ubiuitinerte proteiner.

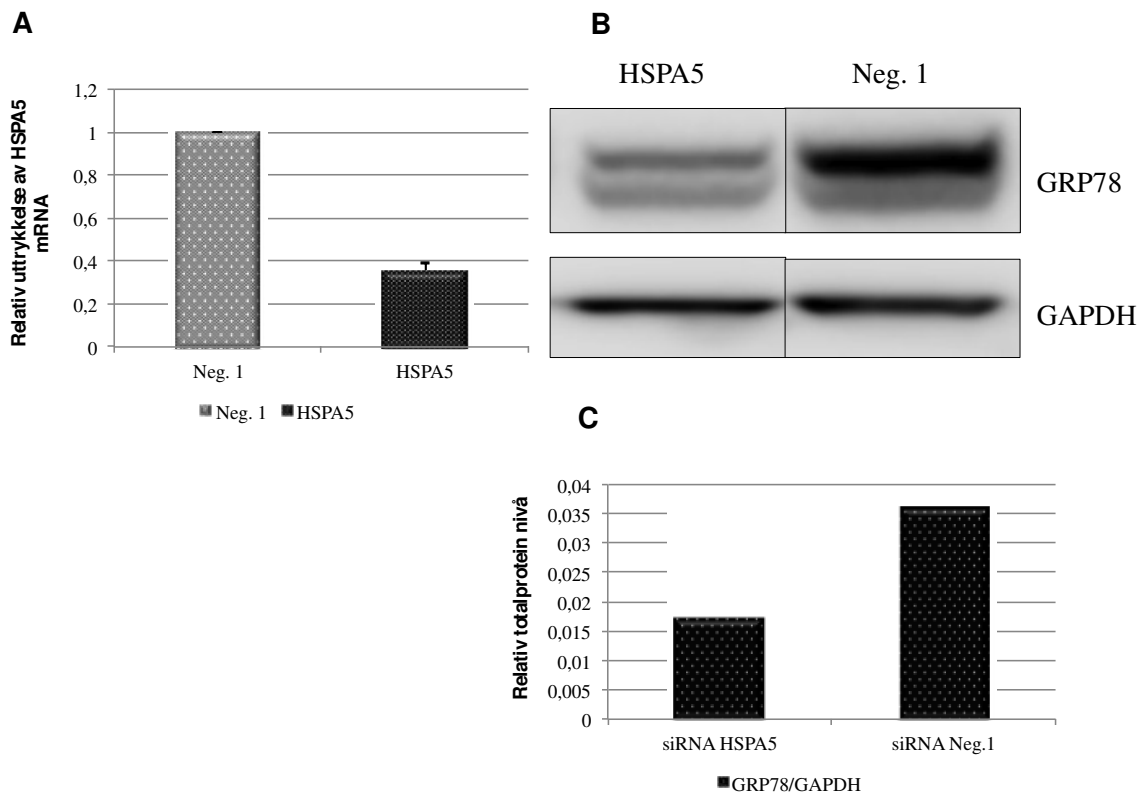
### 3.7 Effekt av redusert HSPA5-uttrykk på celleoverlevelse og overflateuttrykk av GRP78

For å undersøke om mRNA-uttrykk av HSPA5 er viktig for overlevelse og/eller overflateuttrykk av GRP78 i myelomceller ble det utført transfeksjon av INA-6 med siRNA rettet mot HSPA5. Forskjellige typer siRNA ble undersøkt for å finne den som mest effektivt slo ned genet HSPA5, og dermed ga størst nedgang i HSPA5 mRNA. Transfeksjonen av INA-6 ble utført ved hjelp av elektroporering. RT-qPCR ble benyttet for å vurdere hvilken siRNA som ga best nedslåing av HSPA5 mRNA og resultatene ble satt som relative mot uttrykk av GAPDH (Figur 3.9). Alle gen er analysert i triplikat. siRNA 6980 og Neg. 1 ble valgt til videre transfeksjonsforsøk.



**Figur 3.9** Ulike siRNA ble testet i INA-6 celler for å finne hvilken type siRNA som fungerte mest optimalt, ved å gi størst nedgang i HSPA5 mRNA verdier. Standardavvik er markert som feillinjer på søylene. siRNA 6980 og Neg. 1 ble valgt til videre transfeksjonsforsøk.

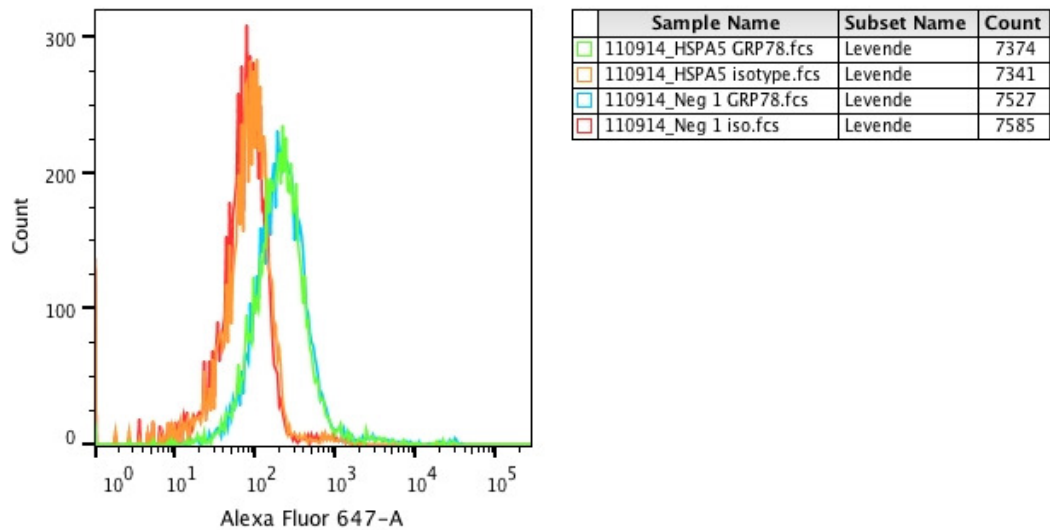
For å se om transfeksjon med siRNA 6980 mot HSPA5 ga nedgang i proteinuttrykk ble PCR-resultat sammenlignet med Western blot (Figur 3.10). Western blot samsvarte med RT-qPCR resultatene og viste nedgang i GRP78 proteinmengde. Disse resultatene viste at transfeksjonen av INA-6 var vellykket.



**Figur 3.10 A:** Relativt mRNA-uttrykk av HSPA5 etter transfeksjon med HSPA5 siRNA6980 og Neg 1 kontroll-siRNA. Neg 1 er satt til 1, for å vise nedgangen i relativt uttrykk av HSPA5 mRNA. Transfeksjonsforsøket og PCR-analysen er utført tre ganger med anslagsvis likt resultat og resultatene er fremstilt som gjennomsnitt av verdiene. GAPDH er benyttet som husholdningsgen. Standardavvik er markert som feillinjer på søylene. **B:** Western blot viser nedgang i totalt GRP78 proteinnivå. GAPDH ble brukt som normaliseringskontroll. **C:** Ratio mellom signalstyrken til GRP78- og GAPDH spesifikke bånd fra **(B)**.

Det ble videre undersøkt om transfeksjon av INA-6 med siRNA 6980 ga endring i uttrykket av N-terminal ende av GRP78 på celleoverflaten. siRNA Neg.1 ble benyttet som negativ kontroll. Overflateuttrykket ble merket med isotypeantistoff og antistoff mot N-terminal ende av GRP78 (Tabell 2.2) og analysert ved hjelp av flowcytometri og FlowJo. Nedslåing av HSPA5 ga ingen endring i uttrykk av N-terminalt GRP78 på celleoverflaten (Figur 3.11).

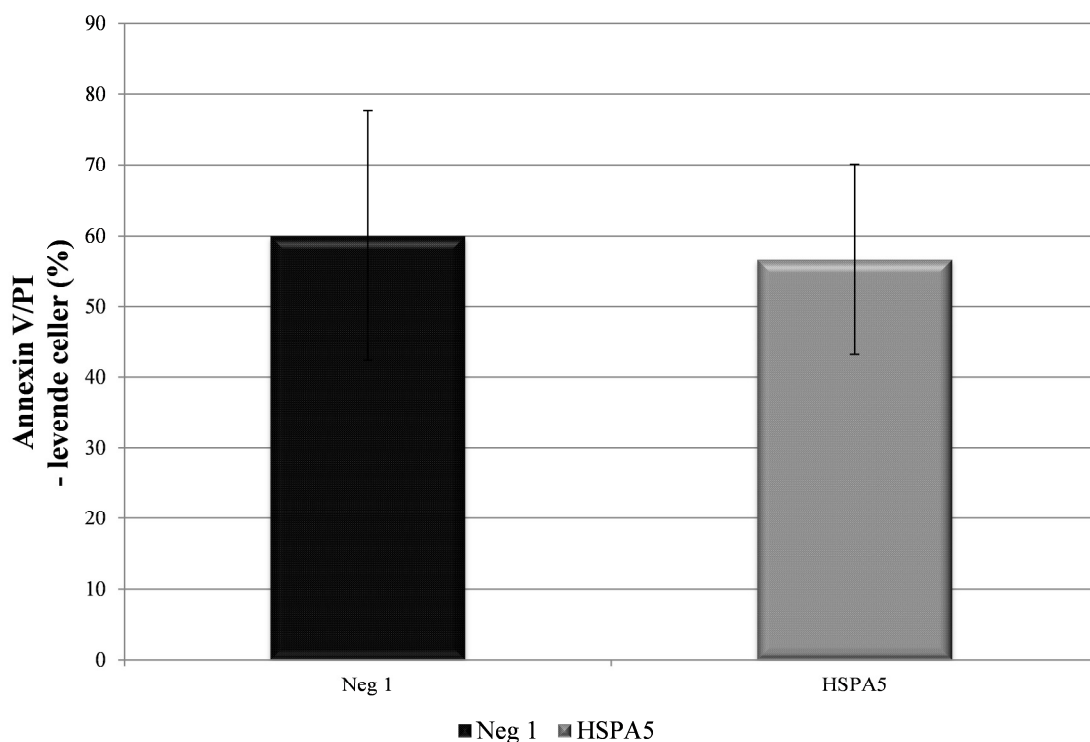




**Figur 3.11** INA-6 transfektert med siRNA 6980 ble merket med isotypeatistoff og antistoff mot N-terminal ende av GRP78 og analysert ved hjelp av flowcytometri og FlowJo. INA-6 tranfektert med siRNA Neg.1 er benyttet som negativ kontroll. Transfektete INA-6 celler viste ingen endring av N-terminalt GRP78 på celleoverflaten.

### 3.7.1 Betydning av GRP78 for overlevelse av myelomceller

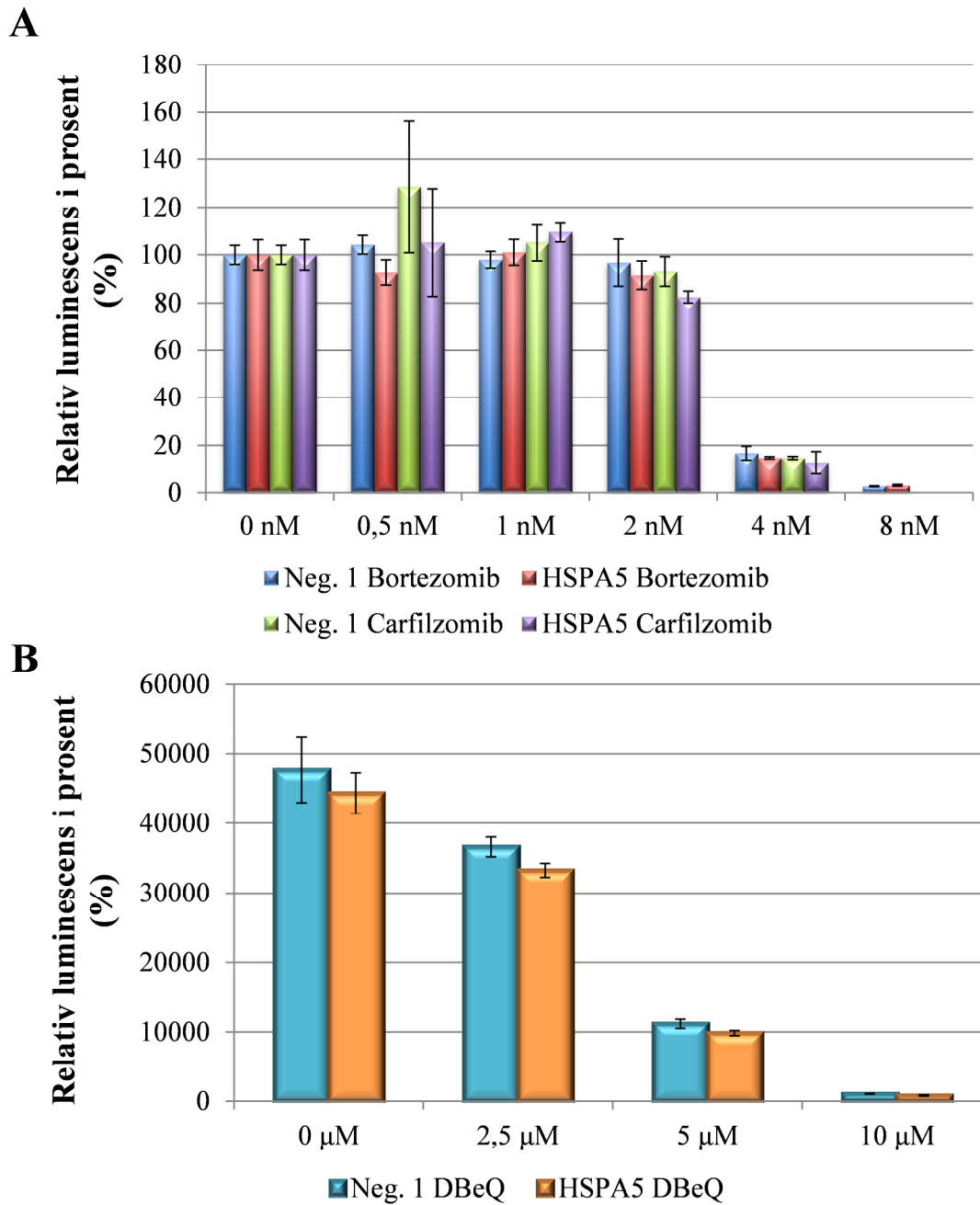
Betydningen av HSPA5-uttrykk for overlevelse hos INA-6 ble studert etter vellykket transfeksjon. Cellenes viabilitet ble testet ved bruk av Annexin V/PI-merking på transfeksjonsdag 3, hvor virkningen av siRNA vanligvis er best med denne metoden. Forsøket ble gjentatt to ganger, med forholdsmessig likt resultat hvor gjennomsnittsverdien er grunnlaget for figuren. Nedslått HSPA5 førte til lite endring i antall levende celler (Figur 3.12).



**Figur 3.12** Transfekterte INA-6 celler ble analysert med Annexin V/PI for å påvise betydningen HSPA5 uttrykk har for overlevelse i INA-6. Celler som var negative for både annexin V og PI ble betraktet som levende. Figuren er et resultat fra gjennomsnittsverdier fra to parallelle forsøk. Standardavvik er markert som feillinjer på søylene. Det ble påvist liten endring i antall levende celler.

### 3.7.2 siRNA kombinert med proteasomhemmere og VCP-hemmer

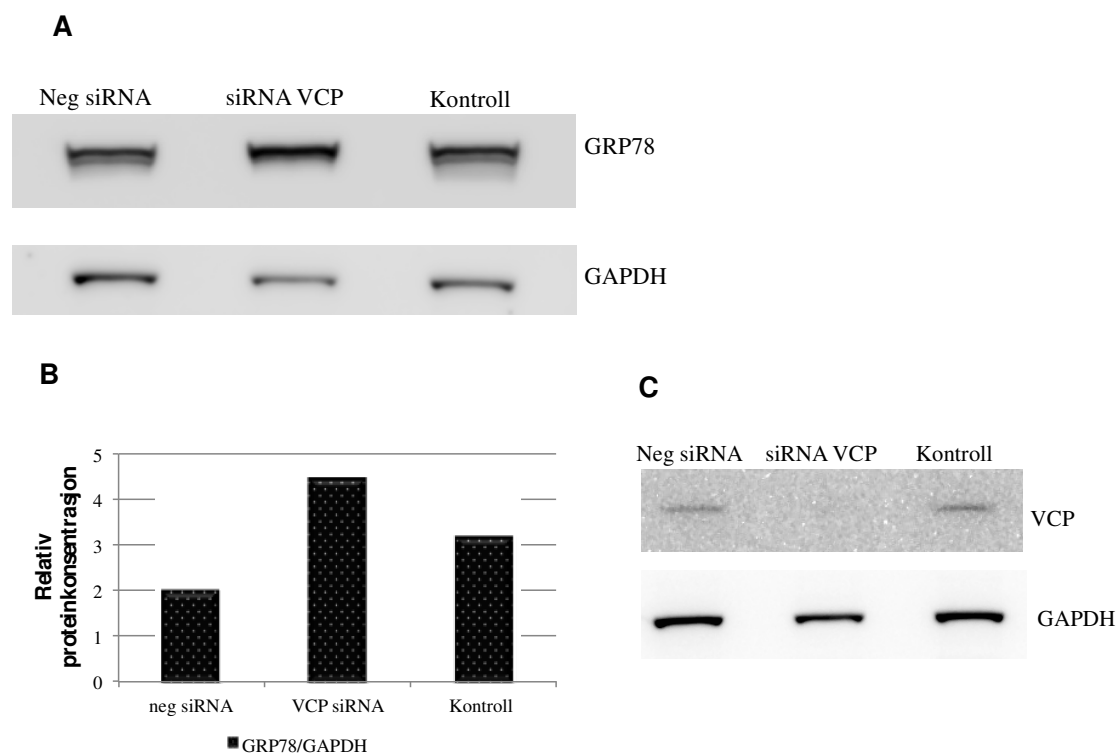
Det var ønskelig å se om redusert uttrykk av HSPA5 fører til endring i cellenes følsomhet for ulike ER-stress-induserende stoff. Transfekterte INA-6 celler ble derfor sådd ut og stimulert over natt med Bortezomib, Carfilzomib og DBeQ. INA-6 transfektert med siRNA Neg 1 ble benyttet som negativ kontroll. Proliferasjonen ble målt ved metoden CellTiter Glo. Det ble ikke påvist noen endring i cellenes følsomhet for disse stoffene i celler med redusert uttrykk av HSPA5 (Figur 3.13).



**Figur 3.13 A:** Transfektert INA-6 ble behandlet over natt med Bortezomib og Carfilzomib. CellTiterGlo ble benyttet for å måle effekten transfeksjon og proteasomhemmere har på viabiliteten. Det ble ikke påvist noen endring i cellenes følsomhet for Bortezomib og Carfilzomib. **B:** Transfekterte INA-6 celler inkubert med DBeQ hvor viabiliteten ble målt ved bruk av metoden CellTiterGlo. Det ble ikke påvist noen endring i cellenes følsomhet for DBeQ. Standardavvik er markert som feillinjer på søylene.

### 3.8 Nedslåing av VCP

INA-6 celler ble transfektert med siRNA mot VCP som bidrar til transport av proteinaggregater fra ER til proteasomer. Hensikten med forsøket var å undersøke om redusert uttrykk av VCP har betydning for GRP78-uttrykket. Det ble i forkant utført Western blot for å kontrollere effekten av transfeksjonen ved å se på grad av redusert proteinuttrykk for VCP (Figur 3.14). Western blot ble også benyttet for å påvise en endring i proteinmengde av GRP78. INA-6 med nedslått VCP viste et redusert proteinuttrykk av VCP, samtidig som den viste økt proteinnivå av GRP78 sammenlignet med kontroller med intakt VCP (Figur 3.14). GAPDH ble benyttet som normaliseringskontroll.



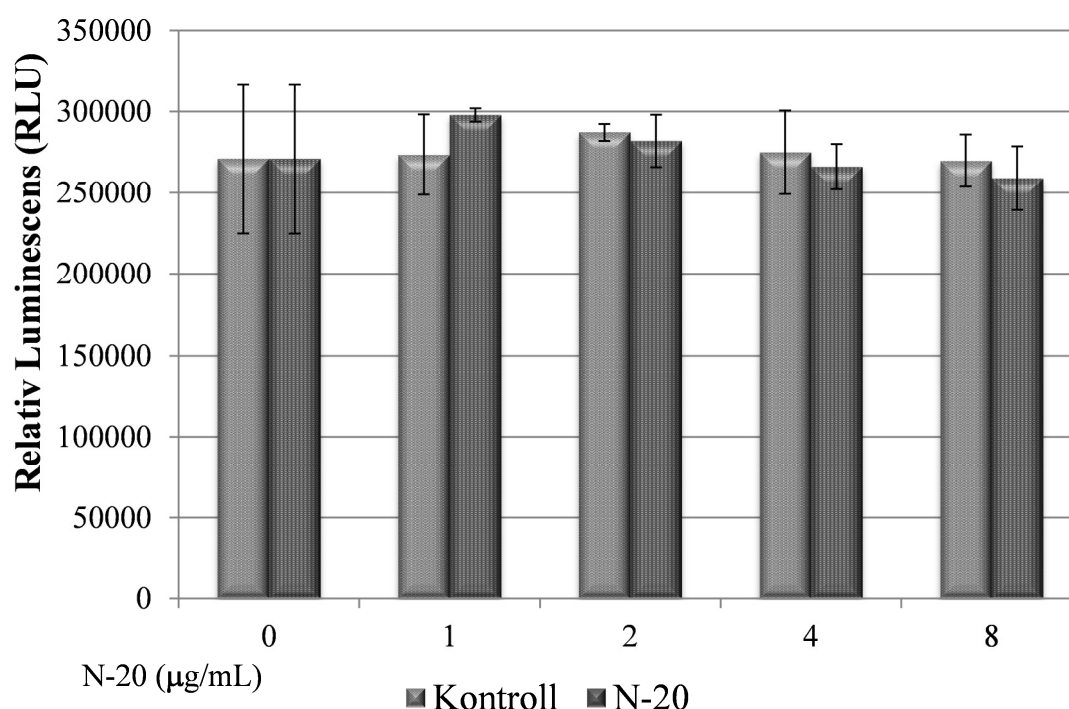
**Figur 3.14 A:** Transfektete INA-6 celler med siRNA mot VCP ble undersøkt med Western blot for hvilken innvirkning nedslått VCP har på proteinmengden av GRP78. GAPDH er benyttet som normaliseringskontroll. **B:** Beregnet ratio mellom signalstyrken til GRP78- og GAPDH spesifikke bånd fra (A) **C:** Reduksjon av proteinnivå av VCP etter siRNA VCP ble påvist ved bruk av Western blot. GAPDH ble benyttet som normaliseringskontroll. Nedslått VCP viste redusert VCP proteinnivå, samtidig som den viste økt GRP78 proteinnivå.

### 3.9 Hemming av overflateuttrykt GRP78 med antistoff

Et av målene i oppgaven var å undersøke hvilken innvirkning hemming av overflateuttrykt GRP78 har på overlevelse og respons på cytostatika hos myelomceller. Antistoffene GRP78 N-20 og Mab159 har begge vist en reduksjon på viabilitet blant enkelte kreftcellelinjer fra brystkarsinom- og tarmkreft (6). På grunnlag av dette var det derfor interessant å undersøke hvilken effekt disse antistoffet har på myelomcellelinjen INA-6. CellTiter Glo ble benyttet for å undersøke om antistoffene N-20 og Mab159 hadde betydning for viabiliteten til INA-6.

#### 3.9.1 Antistoffet N-20

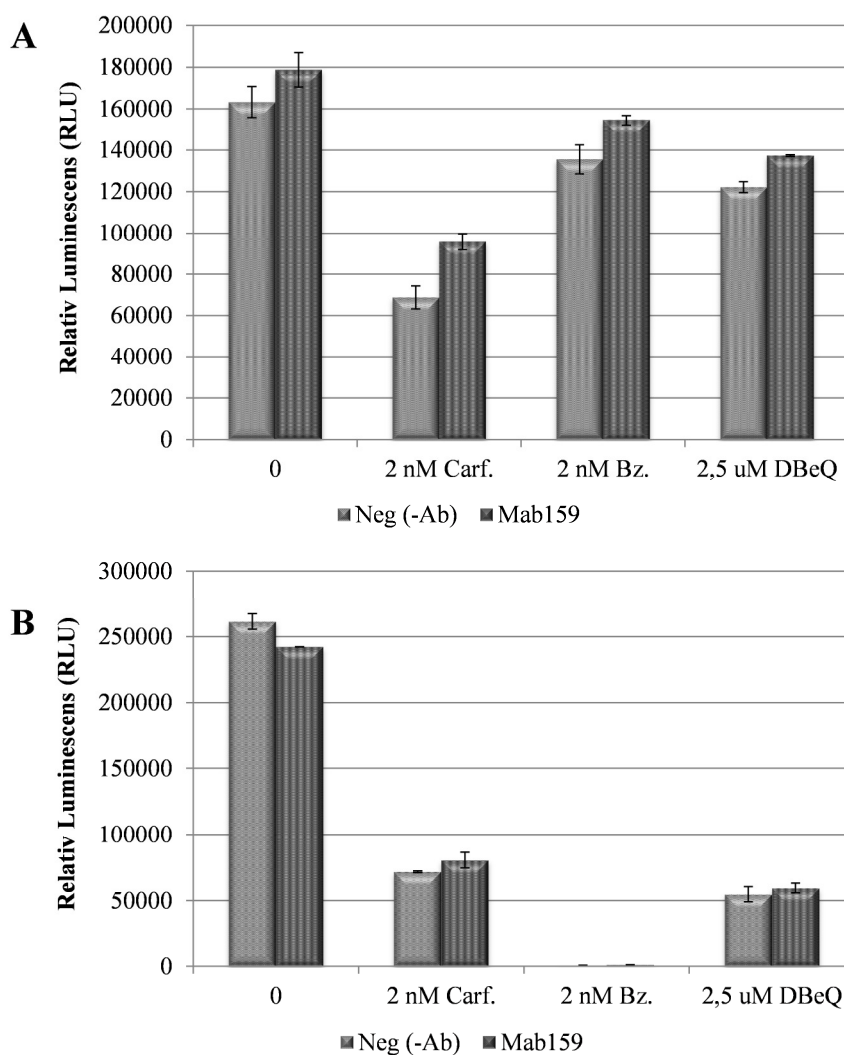
INA-6 celler ble behandlet i tre døgn med ulike konsentrasjoner av antistoffet GRP78 N-20 (0-, 1-, 2-, 4- og 8  $\mu\text{g/mL}$ ). Irrelevantantistoff L-MYC ble benyttet i samsvarende konsentrasjoner som negativ kontroll. Hver konsentrasjon er satt opp i triplikat. Behandling med antistoffet N-20 ga ingen endring i viabiliteten til INA-6 (Figur 3.15).



**Figur 3.15** INA-6 ble behandlet i tre døgn med ulike konsentrasjon (0-, 1-, 2-, 4- og 8  $\mu\text{g/mL}$ ) av antistoffet GRP78 N-20. Det irrelevanteantistoffet L-MYC ble benyttet som negativ kontroll. Standardavvik er markert som feillinjer på søylene. Behandling med antistoffet N-20 ga ingen endring i viabiliteten til INA-6.

### 3.9.2 Antistoffet Mab 159

Mab159 er et monoklonalt antistoff mot C-terminal ende av GRP78. INA-6 celler ble sådd ut og behandlet med en kombinasjon av antistoffet Mab159 (50 µg/mL) og Bortezomib (2nM), Carfilzomib (2,5 nM) eller DBeQ (2,5 µM), for å se etter eventuelle synergier. INA-6 uten tilsatt antistoff Mab159, kun behandlet med ulike hemmere, ble benyttet som negativ kontroll. Hver kombinasjon er satt opp i triplikat. To parallelle forsøk ble utført, hvor det første ble inkubert over natt og det andre i tre døgn. Behandling med Mab159 ga ingen endring i viabiliteten til INA-6 (Figur 3.16).



**Figur 3.16 A:** INA-6 celler behandlet over natt med antistoffet Mab159 kombinert med Bortezomib, Carfilzomib eller DBeQ for å undersøke eventuelle synergier med antistoffet Mab159. INA-6 behandlet kun med ulike hemmere ble benyttet som negativ kontroll. **B:** Samme oppsett som A, inkubert i tre døgn. Standardavvik er markert som feillinjer på søylene. Både **A** og **B** viste ingen endring i viabiliteten til INA-6.

## 4 Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke uttrykket av GRP78 i myelomcellelinjer intracellulært og spesielt på celleoverflaten. Videre var det ønskelig å finne ut hvilken innvirkning et eventuelt overflateuttrykk har for overlevelse og respons på cytostatika hos myelomcellene. Det var også av interesse å undersøke faktorer som kan påvirke overflateuttrykket av GRP78 på myelomceller. Det er kjent at proteasomhemmere har effekt på myelomceller og nydiagnostiserte myelompasienter responderer ofte godt på behandling med proteasomhemmere (80). Det var derfor ønskelig å undersøke hvilken innvirkning proteasomhemmere har på uttrykket av GRP78. Hemming av GRP78 på celleoverflaten ble utført på grunnlag av tidligere studier som viser at kreftceller går i apoptose ved hemming av GRP78 på celleoverflaten med spesifikke antistoff.

### 4.1 Humane myelomcellelinjer

Bruken av myelomcellelinjer er et viktig analyseverktøy som bidrar til å kunne kartlegge biologien til myelomceller, men de gir ikke et fullstendig bilde av myelomatose. Selv om et eksperiment gir like resultat i ulike typer myelomcellelinjer betyr det ikke nødvendigvis at resultatene gjenspeiler situasjonen i primære myelomceller.

Primære myelomceller er i de fleste tilfeller avhengig av mikromiljøet i beinmargen for å overleve og de deler seg som regel svært sakte (81). En av ulempene ved å benytte cellelinjer er at de hovedsakelig er etablert fra pleuravæske eller perifert blod hvor de i stor grad har blitt uavhengige av mikromiljøet for å overleve, de deler seg raskere og de har mistet noen av sine karakteristiske egenskaper (13). En annen feilkilde er at ca. 50% av myelompasienter er hyperdiploide, dvs. at de har ekstra mange kromosomer og trisomi på oddetallskromosomer (82). Celler fra disse pasientene har vist seg å være ekstra vanskelig å dyrke in vitro og det er derfor svært få myelomcellelinjer som er hyperdiploide. Når ulike effekter hos myelomcellelinjer studeres må de potensielle feilkildene tas med i betraktningen og forsøk utført på cellelinjene er kun et bidrag til å forstå biologien til myelomcellene. Resultat fra eksperimenter utført på myelomcellelinjer bør verifiseres ved bruk av primære myelomceller fra pasienter. Selv

om cellelinjer ikke gir et fullstendig bilde av myelomatose er cellelinjer en analysemodell som forenkler studiene av molekyllære og biologiske funksjoner.

## **4.2 Antistoff**

I denne oppgaven baseres resultatene hovedsakelig på anvendelse av antistoff. Antistoff er et analyseverktøy som har stor nytteverdi innenfor laboratorieforskning, men antistoff har også en del potensielle feilkilder som må tas i betraktning når resultatene skal vurderes. Antistoff varierer med tanke på affinitet og hvor spesifikt det binder til et gitt protein. For å kunne anse antistoffene som spesifikke og resultatene som troverdige har valideringen av antistoffene vært en integrert del av forsøkene. Antistoffene som er benyttet i oppgaven anses å være spesifikke for GRP78 på grunnlag av disse funnene:

- 1) Samsvar i overflateuttrykk mellom ulike antistoff
- 2) Riktig størrelse på Western blot
- 3) Mindre protein (WB) ved bruk av siRNA
- 4) Omtrentlig forventet lokalisering ved intracellulær merking
- 5) Påvist både ned- og oppregulering av GRP78-uttrykket på celleoverflaten

## **4.3 Intracellulært uttrykk av GRP78**

Ett av målene for oppgaven var å undersøke i hvilken grad myelomceller har GRP78 uttrykt på celleoverflaten. Det er uklart hva som gjør at GRP78 blir uttrykt på celleoverflaten og hvilken eventuell betydning GRP78 på celleoverflaten har for myelomceller. Tidligere studier hevder at ER-stress er en faktor som bidrar til uttrykk av GRP78 på celleoverflaten (3-5). Det ble derfor sett etter en potensiell sammenheng mellom intracellulærtuttrykk og celleoverflateuttrykk av GRP78. Det ble også undersøkt hvilken betydning proteasomhemmere har for uttrykk av GRP78 både intracellulært og på celleoverflaten.

mRNA-uttrykk av genet HSPA5 som koder for GRP78, samt analyse av mengde totalprotein av GRP78 ble benyttet for å se etter en potensiell sammenheng mellom genuttrykk og protein totalt sett. mRNA-uttrykk av HSPA5 ble utført med RT-qPCR



hvor mRNA uttrykk ble satt som relative til uttrykk av husholdningsgener i samme cellelinje.

Ved kvantifisering av genuttrykk er det flere potensielle feilkilder som det er viktig å være klar over. Normalisering av mRNA-nivåer til en intern kontroll eller husholdningsgener er mye brukt (83). Når genuttrykk skal sammenlignes mellom ulike celler har tidligere studier vist at GAPDH-uttrykk som intern kontroll kan variere veldig (83, 84). For å minimalisere feil som følge av bruk av kun enkeltkontroll til normalisering er bruk av et sett med husholdningsgener en mulig løsning. Til denne oppgaven ble det derfor utført normalisering til 4 ulike husholdningsgener (USF2, ACTB, GAPDH og TBP) for å oppnå en mer troverdig sammenligning av HSPA5 mRNA mellom de ulike cellelinjene.

Det er kjent at myelomceller har mye ER-stress (2), og resultater fra RT-qPCR viser at mRNA uttrykket av HSPA5 i de 11 myelomcellelinjene er generelt høyt med Ct-verdier som varierer fra 21,5 til 23,8 (Figur 3.1).

Det totale nivået av GRP78-protein i de ulike cellelinjene ble påvist ved hjelp av Western blot. Intracellulær lokalisering av det aktuelle proteinet er en viktig faktor med tanke på valg av lysisbuffer og dermed oppnå et pålitelig resultat ved Western blot. En lysisbuffer som inneholder NP40, en ikke-ionisk detergent, vil gi oppløsning av cellemembranen, mens cellekjernen og eventuelle proteinaggregater kan forbli intakt. Proteiner lokalisert inne i cellekjernen blir dermed i liten grad med i cellelysatet. Ved deteksjon av det totale proteinnivået av GRP78-protein ble NP40-lysisbuffer vurdert som god nok, siden ER befinner seg i cytosol, og GRP78 hovedsakelig er lokalisert i ER (28). For å kunne sammenligne proteinnivået av GRP78 mellom de ulike cellelinjene ble proteinkonsentrasjon målt på forhånd, og lik mengde protein ble applisert til brønnene. I tillegg ble GAPDH benyttet som normaliseringskontroll (Figur 3.2). Bruken av GAPDH som normaliseringskontroll er heller ikke i Western blot en gullstandard, siden med GAPDH kan være høyere uttrykt i cellelinjer som deler seg raskere. Sann sett er det vanskelig å få en presis sammenligning av proteinnivået av GRP78 mellom de 11 myelomcellelinjene. Det at lik mengde protein er tilsatt pr. brønn kan være et like godt mål som det å normalisere mot GAPDH.

#### 4.4 GRP78 uttrykt på celleoverflaten

Ett av målene for oppgaven var å undersøke i hvilken grad myelomcellelinjer uttrykker GRP78 på celleoverflaten. Studier viser at GRP78 er uttrykt på overflaten av kreftceller fra bryst, prostata og tarm, men ikke på celleoverflaten til friske celler (3-5, 85). Ved hjelp av flowcytometri og antistoff rettet mot C- og N-terminal ende av GRP78, ble celleoverflateuttrykket hos 11 ulike myelomcellelinjer undersøkt. Antistoffene ble vurdert som pålitelige og at de påviste GRP78 spesifikt på celleoverflaten. Det ble påvist uttrykk av både C- og N-terminal ende av GRP78 hos 9 av 11 myelomcellelinjer, med varierende grad av uttrykk (Figur 3.4). Resultatene tyder ikke på noen direkte sammenheng mellom mengde GRP78 intracellulært og GRP78 uttrykt på celleoverflaten. For eksempel har IH-1 omtrent negativt uttrykk på celleoverflaten av både C- og N-terminal ende av GRP78, mens det totale intracellulære uttrykket er høyere enn i cellelinjer som har høyere uttrykk av GRP78 på celleoverflaten.

GRP78 er et chaperon som øker ved akkumulering av ufoldete eller feilfoldete proteiner, noe som kan være en respons til ER-stress (19). Det er kjent at myelomcellene har mye ER-stress, men om mengde totalprotein av GRP78 korrelerer med graden av ER-stress er vanskelig å si. Det er ikke utført noen analyser i denne oppgaven for å undersøke det basale nivået av ER-stress i de ulike cellelinjene. I stedet er det gjort forsøk på å endre ER-stressnivået og uttrykket av GRP78 i cellelinjer med ulike behandlinger. Med utgangspunkt i studier som hevder at ER-stress får GRP78 til å uttrykkes på celleoverflaten (3-5), ble INA-6 behandlet med proteasomhemmere og VCP-hemmer for å se om et potensielt økt ER-stress ga økt uttrykk av GRP78 i cellene på celleoverflaten. INA-6 stimulert med proteasomhemmere og VCP-hemmer viste økt uttrykk av totalprotein nivået av GRP78 (Figur 3.7), mens overflateuttrykket forble uforandret sammenlignet med ustimulerte celler. Uforandret overflateuttrykk, men økt totalprotein nivå av GRP78 tyder på at ER-stress kan utelukkes som en direkte årsak til uttrykk av GRP78 på celleoverflaten til myelomceller.

Resultatene fra ulike flowcytometriforsøk i denne oppgaven kommer hovedsakelig fra myelomcellelinjen INA-6. Denne cellelinjen ble valgt på grunnlag av godt uttrykk av både C- og N-terminal ende på celleoverflaten, men også fordi INA-6 er den cellelinjen som er lettest å transfektere blant de 11 myelomcellelinjer som ble benyttet (79).

Uttrykket av GRP78 på celleoverflaten har variert veldig mellom ulike forsøk. Uttrykket var aldri negativt, men grad av positivt uttrykk viste stor variasjon. Det er utført flere forsøk for å undersøke mulige faktorer som kan påvirke overflateuttrykket av GRP78 på denne cellelinjen. Antistoffene er vurdert som spesifikke og varierende uttrykk pga. uspesifikke antistoff er derfor usannsynlig. Utførelsen av forsøkene er alltid utført ved en temperatur på 4°C, for å forhindre endringer på cellemembranen. Faktorer som celletetthet og stimulering med medium uten serum og glukose er testet ut. Ingen av disse faktorene ga noe svar på hvilke faktorer som påvirker variasjonen i GRP78 på overflaten til INA-6. Dette spørsmålet står derfor ubesvart.

De 11 ulike myelomcellelinjene uttrykker GRP78 på celleoverflaten ulikt, og det var derfor ønskelig å undersøke om forskjellene i celleoverflateuttrykt GRP78 skyldes at cellelinjene gror i forskjellige typer serum. Det ble utført eksperiment med og uten serum. Serum eller ikke serum ga ingen endring i uttrykket. Kalveserum og humant serum ble sammenlignet og humant serum ga nedgang i uttrykt GRP78 i INA-6 (Figur 3.5). Forsøket med kalveserum og humant serum ble kun utført to ganger, med omtrentlig likt resultat, og det er derfor vanskelig å si noe angående resultatet siden overflateuttrykket ellers har variert fra forsøk til forsøk. Det er likevel mulig å spekulere i potensielle årsaker til et lavere uttrykk eller dårlig merking av celler som har vokst i humant serum. Serum er en blanding av kjente og ukjente faktorer som cytokiner, vekstfaktorer, proteiner og antistoff som det ikke er mulig å ha full kontroll over. En kan tenke seg at det kan være noe i humant serum som gir negativ effekt på INA-6 sin binding av GRP78 på celleoverflaten. Alternativt kan det finnes autoantistoff mot GRP78 hos enkelte individer som kan føre til dårligere binding av det tilsatte antistoffet ved merking til flow. Slike autoantistoff er hovedsakelig relatert til ulike patologiske tilstander (86) og det er derfor usannsynlig at de er tilstede i blodgiverserumet som er benyttet her. IH-1 ble beregnet som negativ på uttrykk av både C- og N-terminal ende av GRP78 og vokser i humant serum (Tabell 2.1), det gjør også OH-2 og KJON, og OH-2 gir positivt uttrykk av C-terminal ende, mens KJON gir positivt uttrykk av både C- og N-terminal ende (Figur 3.4). Det ble altså ikke påvist noen klar sammenheng mellom type serum cellene ble dyrket i og overflateuttrykk av GRP78.

INA-6 stimulert med proteasomhemmere induserer ER-stress respons ved å stoppe degradering av ufoldet og feilfoldet protein (44). Økt ER-stress har i denne oppgaven ikke vist å ha noen betydning for GRP78 uttrykt på celleoverflaten til INA-6. INA-6 ble behandlet med rhGRP78 for å undersøke om årsak til uendret GRP78 uttrykk på celleoverflaten ved økt ER-stress skyldtes at celleoverflaten var mettet for binding av GRP78. Hypotesen angående mettet celleoverflate ble forkastet da det var mulig å oppregulere uttrykket av GRP78 ved behandling med rhGRP78. På grunn av mangel på tid ble ikke dette forsøket repetert og det varierende uttrykket av GRP78 gjør det vanskelig å trekke noen konklusjoner. Det er anbefalt å repetere forsøket i videre studier. IH-1 ga samsvarende resultat mellom IH-1 med rhGRP78 og negativ kontroll. Dette kan tyde på at IH-1 mangler evne til å binde GRP78 på celleoverflaten.

#### **4.5 Hva binder GRP78 på celleoverflaten**

Hva som gjør at GRP78 kan finnes på celleoverflaten er enda ukjent og det ble derfor utført et forsøk for å undersøke om GRP78 kan binde til heparin og da potensielt til heparansulfatkjeder (11, 68). Myelomceller uttrykker store mengder av proteoglykanet syndecan-1 som har heparansulfatkjeder festet til seg. Ved å vaske INA-6 celler med heparin var det mulig å delvis redusere uttrykket av GRP78 på celleoverflaten. Dette kan tyde på at heparinet konkurrerte ut binding til heparansulfatkjeder. Forsøket ble utført flere ganger og med ulike konsentrasjoner av heparin for å forsikre at den delvise nedgangen ikke skyldtes for liten konsentrasjon av heparin i forhold til vekten/størrelsen av proteinet og resultatene var reproducerbare. Analysen ble utført både ved romtemperatur og på is, for å være sikker på at reduksjon av uttrykt GRP78 ikke skyldtes temperaturen og en evt. internalisering av GRP78. Inkubering i romtemperatur og på is ga likt resultat, og kan antyde at internalisering av GRP78 ikke er årsaken til en delvis reduksjon av GRP78 uttrykket. Resultatene kan indikere at GRP78 på celleoverflaten delvis er avhengig av binding til heparansulfatkjeder på celleoverflaten (Figur 3.6).

## 4.6 Proteasomhemmere og VCP-hemmer

Mengde totalprotein av GRP78 øker ved stimulering med proteasomhemmere og VCP-hemmer. Økt mengde av GRP78 kan være en respons på stimulering med ulike hemmere, og kan indikere at INA-6 prøver å redusere/tilpasse ER-stresset ved å øke mengde GRP78 for å bidra i folding av ufoldet- og feilfoldet protein.

CHOP ble oppregulert av alle de tre ER-stress-sensorene. CHOP er en transkripsjonsfaktor som kan antas å være lokalisert både i kjernen og i cytosol (20, 23). Det ble derfor valgt å bruke Urea-lysisbuffer da den løser opp både celle- og kjernemembran, og cellelysatsen vil inneholde proteiner fra cytosol og kjerne, samt DNA. Ved stimulering av Bortezomib og Carfilzomib ble CHOP oppregulert i INA-6 (Figur 3.8). Resultatene viste at proteasomhemming ga forventet ER-stressrespons (37). Det ble detektert ubiquitinerte proteiner på samme blot, og oppregulering av CHOP samsvarte med høy mengde av ubiquitinerte proteiner. Heller ikke ved disse konsentrasjonene viste INA-6 noen endring av GRP78 uttrykt på celleoverflaten.

En av funksjonene til VCP er å frakte ubiquitinerte proteiner til proteasomet. Når funksjonen til VCP blir hemmet vil dannelse av proteinaggregater øke, ERAD går ned som potensielt kan resultere i økt ER-stress (25-27). Det ble forsøkt å se på ER-stress og opphopning av GRP78 i celler behandlet med en hemmer av VCP, nemlig DBeQ. Som vist ved hjelp av CellTiter Glo, førte denne hemmeren til celledød (Figur 3.13). Imidlertid ble ikke CHOP oppregulert etter DBeQ-behandling. Dette kan skyldes at høyere konsentrasjon av DBeQ er nødvendig eller at cellene skulle vært behandlet over lengre tid. En annen forklaring kan være at DBeQ ikke er helt spesifikk for hemming av VCP. En mer spesifikk måte å undersøke funksjonen til et protein kan være ved å slå ned uttrykket ved hjelp av siRNA. Det ble gjort i INA-6 celler for å undersøke om det ga en økning av GRP78. Nedregulert VCP hos INA-6 ga økt total proteinnivå av GRP78 (Figur 3.14) og indikerer at nedslått VCP kan forårsake økt ER-stress ved en eventuell opphopning av ubiquitinerte proteiner. Det ble forsøkt å detektere ubiquitinerte proteiner på samme blot, men uten deteksjon av signal. En mulig forklaring kan være at cellepelletene var løst i NP40-basert lysisbuffer og at de store proteinaggregatene, hvor flestparten av de ubiquitinerte proteinene sannsynligvis befinner seg, ikke ble løst opp.

## 4.7 Betydning av GRP78 for overlevelse av myelomceller

For å kunne si noe om en eventuell betydning av GRP78 hos myelomceller ble det utført transfeksjon av INA-6 celler med spesifikt siRNA mot genen HSPA5. På grunnlag av tidligere erfaring ved myelomgruppen er effekten av transfeksjonen sett å være størst ved dag 3, og forsøkene med transfekterte INA-6 er derfor utført ved dette tidspunkt. Viabiliteten til de transfekterte cellene ble målt ved hjelp av annexin V/PI-merking. Teorien tilsier at myelomceller er avhengig av strengt kontrollert ER-stress for å overleve (2). Det ble ikke observert noen spesifikk endring av overlevelse hos INA-6 celler med nedslått HSPA5 gen sammenlignet med INA-6 med intakt HSPA5 (Figur 3.12). PCR og Western blot av de samme cellene viste at siRNA hadde fungert ved at HSPA5 mRNA var redusert og det var totalt mindre protein av GRP78 (Figur 3.10). Nedreguleringen var ikke fullstendig og det var fortsatt igjen mye protein og stabiliteten GRP78 er ukjent. Det gjenværende proteinet kan være tilstrekkelig til å opprettholde ER-balansen til INA-6 cellene. Bruk av siRNA sørger for at genuttrykket går ned en viss tidsperiode, men genuttrykket vil gradvis komme tilbake til normal tilstand. Det er mulig at en effekt av nedslått HSPA5 hadde blitt synlig om cellene kunne hatt nedslått HSPA5 over en lengre tidsperiode. Dette kunne vært oppnådd ved bruk av celler med stabilt uttrykk av HSPA5 short hairpin RNA/shRNA (87).

Studier har vist at nedslåing av HSPA5 øker sensitiviteten til gliomaceller ved behandling (88). Lymfomceller går i apoptose ved kombinasjonen av nedslått HSPA5 gen og behandling med Bortezomib (89). For å undersøke eventuelle synergier eller additive effekter ved å slå ned HSPA5, ble det tilsatt proteasomhemmere til INA-6 celler behandlet med siRNA og proliferasjonen ble målt med CellTiter Glo. Resultatene er analysert både med tanke på proliferasjon og uttrykk av GRP78 på celleoverflaten. Ingen av analysene viser endring av proliferasjon eller overflateuttrykk. Sensitiviteten til de ulike proteasomhemmerne og VCP-hemmeren forble uendret, sammenlignet med negativ kontroll (Figur 3.13).

## 4.8 Hemming av GRP78 på celleoverflaten med antistoff

Økt uttrykk av GRP78 i kreftceller har blitt korrelert med negativ kreftprognose og resistensutvikling mot behandling, muligens fordi GRP78 kan fungere som en anti-apoptotisk faktor (3, 33). Tidligere studier har vist at hemming av GRP78 på celleoverflaten ved hjelp av antistoff kan føre til celledød (3, 6).

Et av målene for oppgaven var å undersøke om hemming av GRP78 uttrykt på celleoverflaten hadde betydning for viabiliteten. Antistoffet Mab159 ble mottatt som gave fra Parkash S. Gill, University of Southern California. Mab159 er et spesifikt monoklonalt antistoff mot C-terminal ende av humant GRP78. Det er vist at antistoffet ikke har noen kryssreaksjoner med GRP78 sin nærmeste paralog HSP70 (6). Forskningen til Parkash S. Gill viste at uttrykket av GRP78 på celleoverflaten ble tydelig nedregulert ved behandling med antistoffet Mab159. Ulike data viser at antistoffet Mab159 førte til internalisering av overflate GRP78. De testet antistoffet på en brystkarsinomcellelinje, MCF7, og en tarmkreftcellelinje, HT29 (6). Disse cellene ble preinkubert i glukosefritt medium før forsøket for å oppregulere uttrykket av GRP78 på celleoverflaten (6). I denne oppgaven ble derfor Det ble derfor INA-6 sådd ut i glukosefritt medium over natt, men sammenlignet med negativ kontroll var overflateuttrykket av GRP78 uforandret. Stimulering med anbefalt konsentrasjon av antistoffet Mab159 (50 µg/mL) ga ingen endring i viabiliteten til INA-6. Mab159 i kombinasjon med ulike proteasomhemmere ga heller ingen endring av effekten. En eventuell hemming av GRP78 på celleoverflaten til INA-6 ble analysert ved hjelp av metoden CellTiter Glo, som er en følsom analysemetode som trolig ville gitt utslag på en liten endring av ATP-konsentrasjonen. Forsøkene ble utført tre ganger med reproduserende resultat.

Det ble undersøkt om antistoffet Mab159 binder til GRP78 uttrykt på celleoverflaten til INA-6, ved bruk av flowcytometri og med samme konsentrasjon av antistoff som ble brukt til proliferasjonsforsøket. Det var ikke mulig å påvise positiv binding av Mab159. Det kan indikere at antistoffet ikke har affinitet for GRP78 uttrykt på myelomceller. Ingen binding av Mab159 til INA-6 kan være en årsak til at ingen effekt ble funnet på proliferasjonen ved INA-6 stimulert med Mab159 (Figur 3.16).

Studier ved bruk av et annet antistoff, N-20, har vist at antistoffet blokkerer et reseptorbindingsete for GRP78 (90, 91) slik at GRP78 ikke kan reagere med komponenter som gjør at Akt fosforylering og cellulær proliferasjon blir hemmet i MCF10A epitelceller fra brystkreft (92). INA-6 ble forsøkt behandlet med N-20 antistoffet, men dette ga heller ingen endring av viabiliteten. Binding av antistoffet N-20 til GRP78 ble testet ved flowcytometri og antistoffet viste binding til GRP78 på celleoverflaten til INA-6. Ingen effekt av antistoffet N-20 kan indikere at GRP78 uttrykt på myelomceller ikke har noen betydning for overlevelse (Figur 3.15).

Antistoffet PAT-SM6 er et IgM antistoff som er isolert fra magekreft og er med i kliniske forsøk av myelompasienter. Det er vist at PAT-SM6 gir en kryssbinding på celleoverflaten av andre komponenter på celleoverflaten i tillegg til GRP78 (3, 93). Denne kryssbindingen på overflaten kan være en mulig årsak til indusering av apoptose hos myelomceller stimulert med PAT-SM6. Det er vanskelig å si om det er hemming av GRP78 eller om det er kryssbindingen på celleoverflaten som induserer apoptose. Dette antistoffet har dessverre ikke vært tilgjengelig for testing i denne oppgaven.



## 5 Konklusjon og videre arbeid

Myelomcellerlinjene som ble testet ut i denne oppgaven viste ulikt, men generelt høyt, uttrykk av HSPA5 mRNA og totalt proteinnivå av GRP78, mens overflateuttrykk av GRP78 varierte fra negativt til ulik grad av positivt uttrykk. Det ble ikke oppdaget en sammenheng mellom intracellulært uttrykk og overflateuttrykk av GRP78. Det ble heller ikke funnet noen sammenheng mellom proteasomhemmere, som potensielt gir økt ER-stress, og endring av overflateuttrykket til GRP78. Både proteasomhemming og hemming av VCP ved hjelp av siRNA ga en økning i den totale mengden av GRP78, sannsynligvis på grunn av opphopning av feilfoldete immunoglobulinkjeder. Flere forsøk bør gjennomføres for å påvise sammenhengen mellom hemming av proteindegradering (oppnopning av feilfoldet protein/immunoglobulin), induksjon av ER-stress og uttrykk av GRP78. Videre kunne det vært interessant å undersøke hva som skjer når den andre formen for proteindegradering blir hemmet, nemlig autofagi.

Resultatene i denne oppgaven antyder at GRP78 delvis er avhengig av binding til heparansulfatkjeder på celleoverflaten. For å bli mer sikker på om heparansulfatkjeder er viktige for binding av GRP78 er det mulig å gjøre videre forsøk. En eventuell binding kan vises mer spesifikt ved bruk av eksisterende cellelinjer som er modifisert til å ha defekt syntese av heparansulfat.

Bruk av siRNA for å slå ned HSPA5 nedregulerte mRNA-nivået av HSPA5 og de totale proteinmengden av GRP78, mens overflateuttrykket av GRP78 forble uforandret. HSPA5 ble funnet til å sannsynligvis ikke være av betydning for overlevelse eller respons til cytostatika for INA-6 celler. Det kan hende at resultatene hadde vært annerledes med mer stabil eller effektiv nedregulering av genet. For å oppnå dette er det mulig å transudere myelomceller med short hairpin RNA ved hjelp av lentivirus. Alternativt kunne genet vært slått ut ved hjelp av den nyere Crispr/Cas9-metoden, men en forutsetning for at denne metode er vellykket er at cellene overlever uten uttrykk av HSPA5.

Hemming av GRP78 på celleoverflaten med Mab159 og N-20 antistoffene ga ingen endring av viabiliteten. Det er i motsetning til hva som er sett i andre celletyper. Det hadde vært svært interessant å få tilgang på IgM-antistoffet PAT-SM6 og testet det *in*

*vitro* med ulike kombinasjoner av cytostatika. Det er ikke like spesifikt for GRP78, men er vist å gi effekt på myelomceller.

Det er funnet autoantistoff mot GRP78 på celleoverflaten i serumet til pasienter med prostatakraft som korrelerer med en negativ prognose. Det hadde vært interessant å undersøke serumet fra myelompasienter med tanke på autoantistoff mot GRP78 og blant annet se om dette korrelerer med følsomhet til behandling og overlevelse.

## 6 Referanser

1. Holien T, Våtsveen TK, Hella H, Waage A, Sundan A. Addiction to c-MYC in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(12):2450-3.
2. Vincenz L, Jager R, O'Dwyer M, Samali A. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: targeting the Achilles heel of multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(6):831-43.
3. Rasche L, Duell J, Morgner C, Chatterjee M, Hensel F, Rosenwald A, et al. The natural human IgM antibody PAT-SM6 induces apoptosis in primary human multiple myeloma cells by targeting heat shock protein GRP78. *PloS one*. 2013;8(5):e63414.
4. Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(4):263-76.
5. Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W, et al. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell*. 2004;6(3):275-84.
6. Liu R, Li X, Gao W, Zhou Y, Wey S, Mitra SK, et al. Monoclonal Antibody against Cell Surface GRP78 as a Novel Agent in Suppressing PI3K/AKT Signaling, Tumor Growth, and Metastasis. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(24):6802-11.
7. Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IMS, Abildgaard N, et al. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*. 2000;95(2):388-92.
8. Maes K, Menu E, Van Valckenborgh E, Van Riet I, Vanderkerken K, De Bruyne E. Epigenetic modulating agents as a new therapeutic approach in multiple myeloma. *Cancers*. 2013;5(2):430-61.
9. Mehta GR, Suhail F, Haddad RY, Zalzaleh G, Lerma EV. Multiple myeloma. *Disease-a-month : DM*. 2014.
10. Lamorte S, Ferrero S, Aschero S, Monitillo L, Bussolati B, Omede P, et al. Syndecan-1 promotes the angiogenic phenotype of multiple myeloma endothelial cells. *Leukemia*. 2012;26(5):1081-90.
11. Matsuo I, Kimura-Yoshida C. Extracellular distribution of diffusible growth factors controlled by heparan sulfate proteoglycans during mammalian embryogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2014;369(1657).
12. Sanderson RD, Yang Y, Suva LJ, Kelly T. Heparan sulfate proteoglycans and heparanase—partners in osteolytic tumor growth and metastasis. *Matrix Biology*. 2004;23(6):341-52.
13. Drexler HG, Matsuo Y. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leukemia research*. 2000;24(8):681-703.
14. Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Bataille R, Van Riet I, Van Camp B, Omede P, et al. Human myeloma cell lines as a tool for studying the biology of multiple myeloma: a reappraisal 18 years after [letter]. *Blood*. 1995;86(10):4001-2.
15. Jernberg-Wiklund H, Nilsson K. Multiple myeloma cell lines. *Human Cell Culture: Springer*; 2002. p. 81-155.
16. Jernberg-Wiklund H, Nilsson K. Multiple Myeloma Cell Lines. In: Masters JW, Palsson B, editors. *Human Cell Culture*. Human Cell Culture. 3: Springer Netherlands; 2002. p. 81-155.
17. Alberts Bea. *Molecular Biology of THE CELL*. 5 ed. New York: Garland Science; 2008.

18. Nakamura M, Gotoh T, Okuno Y, Tatetsu H, Sonoki T, Uneda S, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress pathway is associated with survival of myeloma cells. *Leukemia & Lymphoma*. 2006;47(3):531-9.
19. Wang W-A, Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014;1843(10):2143-9.
20. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *2006-06-15 00:00:00*. 4907-16 p.
21. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*. 2006;7(9):880-5.
22. Zhuang L, Scolyer RA, Lee CS, McCarthy SW, Cooper WA, Zhang XD, et al. Expression of glucose-regulated stress protein GRP78 is related to progression of melanoma. *Histopathology*. 2009;54(4):462-70.
23. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell*. 2001;107(7):881-91.
24. Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*. 2006;11(1):5-13.
25. Ju J-S, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnicka-Worms D, Baloh RH, et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *The Journal of Cell Biology*. 2009;187(6):875-88.
26. Auner HW, Moody AM, Ward TH, Kraus M, Milan E, May P, et al. Combined inhibition of p97 and the proteasome causes lethal disruption of the secretory apparatus in multiple myeloma cells. *PloS one*. 2013;8(9):e74415.
27. Dai RM, Li C-CH. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol*. 2001;3(8):740-4.
28. Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational Quality Control: Folding, Refolding, and Degrading Proteins. *Science*. 1999;286(5446):1888-93.
29. Dong D, Stapleton C, Luo B, Xiong S, Ye W, Zhang Y, et al. A Critical Role for GRP78/BiP in the Tumor Microenvironment for Neovascularization during Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Research*. 2011;71(8):2848-57.
30. Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C, Urzua C, Gawdi G, Pizzo SV. Prostate Cancer Cell Proliferation In vitro Is Modulated by Antibodies against Glucose-Regulated Protein 78 Isolated from Patient Serum. *Cancer Research*. 2006;66(23):11424-31.
31. Raiter A, Yerushalmi R, Hardy B. Pharmacological induction of cell surface GRP78 contributes to apoptosis in triple negative breast cancer cells. *2014*.
32. Liu Y, Steiniger SCJ, Kim Y, Kaufmann GF, Felding-Habermann B, Janda KD. Mechanistic Studies of a Peptidic GRP78 Ligand for Cancer Cell-Specific Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*. 2007;4(3):435-47.
33. Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Binding of Activated  $\alpha$ 2-Macroglobulin to Its Cell Surface Receptor GRP78 in 1-LN Prostate Cancer Cells Regulates PAK-2-dependent Activation of LIMK. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(28):26278-86.
34. Fernandez P, Tabbara S, Jacobs L, Manning FR, Tsangaris T, Schwartz A, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;59(1):15-26.

35. Langer R, Feith M, Siewert JR, Wester H-J, Hoefler H. Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus. *BMC cancer*. 2008;8(1):70.
36. Mintz PJ, Kim J, Do K-A, Wang X, Zinner RG, Cristofanilli M, et al. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotech*. 2003;21(1):57-63.
37. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(3):630-9.
38. Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer research*. 2007;67(4):1783-92.
39. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research*. 1999;59(11):2615-22.
40. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, Buchholz TJ, Dajee M, Ho MN, et al. Antitumor Activity of PR-171, a Novel Irreversible Inhibitor of the Proteasome. *Cancer Research*. 2007;67(13):6383-91.
41. Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*. 2009;458(7237):422-9.
42. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
43. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.
44. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(11):1046-60.
45. Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orłowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later2012 2012-08-02 00:00:00. 947-59 p.
46. Reece DE. Carfilzomib in multiple myeloma: gold, silver, or bronze?2012 2012-10-04 00:00:00. 2776-7 p.
47. Chou T-F, Brown SJ, Minond D, Nordin BE, Li K, Jones AC, et al. Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(12):4834-9.
48. Fang C-J, Gui L, Zhang X, Moen DR, Li K, Frankowski KJ, et al. Evaluating p97 Inhibitor Analogues for Their Domain Selectivity and Potency against the p97-p47 Complex. *ChemMedChem*. 2014;n/a-n/a.
49. Cooper GM. *The eukaryotic cell cycle*. 2000.
50. Thoralf Christoffersen ØF, Gustav Lehne, Olav Dahl. *Kreftceller og kjemoterapi* Farmakologisk institutt, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo; Farmakologisk institutt, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo; 2009. Available from: [http://cytostatikaboken.moses.no/index.php?seks\\_id=40&element=Del&k=1](http://cytostatikaboken.moses.no/index.php?seks_id=40&element=Del&k=1).
51. Afshari CA, Barrett JC. Cell cycle controls: potential targets for chemical carcinogens? *Environmental health perspectives*. 1993;101(Suppl 5):9.
52. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
53. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1999;47(9):1101-9.

54. Koopman G, Reutelingsperger C, Kuijten G, Keehnen R, Pals S, Van Oers M. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84(5):1415-20.
55. O'Day DH. Apoptosis Animated CELL BIOLOGY2012 [181114]. Available from: <http://www.utm.utoronto.ca/~w3cellan/apoptosis.html>.
56. Coulter B. COULTER COUNTER Analyzers 2014. Available from: <https://http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/industrial/products/coulter-counter-analyzers/index.htm>
57. Bustin S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002;29(1):23-39.
58. Scientific TF. Basic Principles of qPCR: Thermo Fischer Scientific; 2013. Available from: <http://www.thermoscientificbio.com/applications/pcr-and-qpcr/introduction-to-qpcr/>.
59. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996;6(10):986-94.
60. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques: JBT*. 2004;15(3):155.
61. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl M. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*. 2006;28(19):1601-13.
62. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*. 2012;4(9):429.
63. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. In: FAGBOKFORLAGET, editor. Oslo2008. p. 367-8.
64. Hayworth D. Overview of Protein Electrophoresis: Thermo Scientific, pierce Protein Biology Products; 2014. Available from: <http://www.piercenet.com/method/overview-electrophoresis>.
65. Leinco Technologies I. General Western Blot Protocol: Leinco Technologies; 2014. Available from: [http://www.leinco.com/general\\_wb](http://www.leinco.com/general_wb).
66. Brown M, Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*. 2000;1221-1229.
67. Murphy K. Immunobiology. 8 ed. New York: Garland Science; 2012.
68. Derksen PW, Keehnen RM, Evers LM, van Oers MH, Spaargaren M, Pals ST. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood*. 2002;99(4):1405-10.
69. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363-6.
70. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee S-K, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nature medicine*. 2002;8(7):681-6.
71. Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(5):2783-8.
72. Xiao Y-T, Xiang L-X, Shao J-Z. Bone morphogenetic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;362(3):550-3.

73. Lise A, Tuan R. Electroporation-Mediated DNA Transfection of Embryonic Chick Limb Mesenchymal Cells. In: Tuan R, Lo C, editors. *Developmental Biology Protocols. Methods in Molecular Biology™*. 137: Humana Press; 2000. p. 377-82.
74. APPARATUS BH. Cell transfection & Cell fusion products. BTX HARVARD APPARATUS The Electroporation Experts 2014.
75. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2011(50).
76. Biomol. Annexin V Apoptosis Detection Kit: Biomol; [18114]. Available from: [http://www.biomol.de/infos\\_imgenex.html?id=647](http://www.biomol.de/infos_imgenex.html?id=647).
77. Kristiansen HK. 2014. p. Upublisert data.
78. Promega. Luciferase Assay System USA: Promega Corporation; 2011. Available from: <https://no.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.pdf>.
79. Holien T. Transfeksjon av myelomceller ved hjelp av Nucleofektorteknologi Norges ingeniør- og teknologiorganisasjon 2007. Available from: <http://www.nito.no/Fagmiljo/Bioingeniorfaglig-institutt/Bioingenioren/Alle-Bioingenioren/Bioingenioren-2007/Bioingenioren-11-2007/FAG-Transfeksjon-av-myelomceller-ved-hjelp-av-Nucleofektorteknologi/>.
80. Jagannath S, Durie B, Wolf J, Camacho E, Irwin D, Lutzky J, et al., editors. Bortezomib Therapy Alone and in Combination with Dexamethasone for Patients with Previously Untreated Multiple Myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*; 2005.
81. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):585-98.
82. Smadja N, Fruchart C, Isnard F, Louvet C, Dutel J, Cheron N, et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia*. 1998;12(6):960-9.
83. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 2004;37:112-9.
84. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues 2005 2005-01-01 00:00:00. 389-95 p.
85. Ni M, Zhang Y, Lee A. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J*. 2011;434:181-8.
86. Leslie D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(10):1417-22.
87. Taxman DJ, Moore CB, Guthrie EH, Huang MT-H. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *RNA Therapeutics*: Springer; 2010. p. 139-56.
88. Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS. The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. *Cancer Research*. 2007;67(20):9809-16.
89. Roué G, Pérez-Galán P, Mozos A, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L, et al. The Hsp90 inhibitor IPI-504 overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma in vitro and in vivo by down-regulation of the prosurvival ER chaperone BiP/Grp78. *Blood*. 2011;117(4):1270-9.

90. Davidson DJ, Haskell C, Majest S, Kherzai A, Egan DA, Walter KA, et al. Kringle 5 of Human Plasminogen Induces Apoptosis of Endothelial and Tumor Cells through Surface-Expressed Glucose-Regulated Protein 78. *Cancer Research*. 2005;65(11):4663-72.
91. Philippova M, Ivanov D, Joshi MB, Kyriakakis E, Rupp K, Afonyushkin T, et al. Identification of proteins associating with glycosylphosphatidylinositol-anchored T-cadherin on the surface of vascular endothelial cells: role for Grp78/BiP in T-cadherin-dependent cell survival. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(12):4004-17.
92. Gray PC, Vale W. Cripto/GRP78 modulation of the TGF- $\beta$  pathway in development and oncogenesis. *FEBS letters*. 2012;586(14):1836-45.
93. Rauschert N, Brandlein S, Holzinger E, Hensel F, Muller-Hermelink H-K, Vollmers HP. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest*. 2008;88(4):375-86.