

Felicia Rylander og Sajaki Sritharan

p62/SQSTM1 sin rolle i regulering av type I interferon-responsen i metastaserende brystkreftceller

Bacheloroppgave i Bioingeniør

Veileder: Apsana Lamsal, PhD student & Geir Bjørkøy, professor

Mai 2019

Felicia Rylander og Sajaki Sritharan

p62/SQSTM1 sin rolle i regulering av type I interferon-responsen i metastaserende brystkreftceller

Bacheloroppgave i Bioingeniør

Veileder: Apsana Lamsal, PhD student & Geir Bjørkøy, professor
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne oppgaven er skrevet i forbindelse med bachelorprosjekt ved institutt for bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Oppgaven ble gitt av professor Geir Bjørkøy og hans gruppe ved Senter for Molekylær Inflammasjonsforskning (CEMIR), fakultet for medisin og helsevitenskap ved NTNU. Prosjektet ble gjennomført i perioden mars til mai 2019. Alt laboratoriearbeid ble utført på CEMIR sine laboratorier i Kunnskapssenteret ved St. Olavs Hospital.

Først vil vi rette all stor takk til vår faglige veileder og PhD-student Apsana Lamsal for all hjelp med praktisk opplæring, laboratoriearbeid og faglig veiledning. Vi vil også takke vår prosessveileder professor Geir Bjørkøy for god motivasjon og positiv innstilling, samt for god faglig behjelpelighet.

Vi ønsker å takke CEMIR og Bjørkøy-gruppen for å ha gitt tilgang til alt forarbeid, og alle ressurser som reagenser og cellelinjer som har vært nødvendig for dette prosjektet.

I tillegg vil vi takke alle på laboratoriene for å ha tatt oss godt imot og bidratt til et trivelig fagmiljø, og spesielt takk til Unni Nonstad og Camilla Wolowczyk som har bistått med hjelp til spørsmål og praktisk arbeid på laboratoriet.

Avsluttende vil vi takke hverandre for et godt og dedikert samarbeid, noe som har gjort dette prosjektet utfordrende og lærerik.

Vi er glad for vårt bidrag til viktig kreftforskning!

Felicia Rylander

Trondheim, mai 2019

Sajaki Sritharan

Trondheim, mai 2019

Sammendrag

Kreft er en genetisk sykdom som karakteriseres av ukontrollert proliferasjon av celler i et vev. Brystkreft er en av de hyppigste kreftformene på verdensbasis, og har også flest overlevelser i Norge. Det er flere typiske kjennetegn på kreft, hvor evnen til å unngå immunforsvarets destruering er et av dem. Immunsystemets overvåkning er viktig for å kunne gjenkjenne og eliminere kreftceller før de danner en svulst.

Type I interferon (IFN)-respons spiller en viktig rolle i anti-kreft-immunrespons, da flere studier viser at økt ekspresjon av type I IFN-stimulerende gener korrelerer med en bedre sykdomsprognose. Forskningsgruppen har tidligere funnet at den metastaserende cellelinjen 66cl4 har en konstant aktivering av type I IFN-respons når cellene dyrkes i cellekultur. Imidlertid er hele denne responsen nedregulert i tumorer dannet av de samme cellene. I dette prosjekt skulle vi forsøke å finne hva som gjør at type I IFN-responsen kan være aktivert uten at cellene eksponeres for kjente aktivatorer av denne responsen. Vi skulle også forsøke å finne hvorfor denne responsen skrur av i svulster dannet av de samme cellene.

I prosjektet ble cellelinjen 66cl4 og varianter av denne benyttet, i tillegg til 67NR. Disse er en del av tumormodellen 4T1 fra BALB/c mus. Utleverte transkriptomdata for disse cellelinjene ble benyttet som grunnlag for de ulike forsøkene. Cellekulturer fra de spesifikke cellelinjene ble utsatt for aminosyresult, autofagi-inhibering og TBK1-inhibering, og deretter analysert for type I IFN-respons i form av CXCL10-produksjon. Dette ble gjort for å se på om p62 og autofagi regulerer type I IFN-responsen.

Resultater viser klart at økt mRNA-nivå av CXCL10 gir bedre prognose for østrogen- og progesteronreseptor-negative brystkreftpasienter. Både Western blot og ELISA viser tydelig at 66cl4-celler danner betydelig mer CXCL10 enn 67NR. Om cellene sultes for aminosyrer, øker autofagien, dermed reduseres også CXCL10-produksjonen. Inhibering av TBK1 med ulike inhibitorer hemmer også dannelsen av CXCL10. Nedslag av p62 hos 66cl4-klonene E8 og E11 resulterte i kraftig redusert produksjon av CXCL10, i forhold til villtypen. Ut ifra resultatene kan det bekreftes at autofagi og p62 regulerer type I IFN-responsen og dannelsen av CXCL10.

Resultatene kan forhåpentligvis benyttes til å forstå hva som gjør ulike tumorer immunologisk aktive (varme) eller inaktive (kalde), og hvordan de inaktive kan aktiveres, for eksempel ved å aktivere type I IFN-responsen. Det er samtidig viktig å unngå kontinuerlig type I IFN-respons, da dette assosieres med immunsuppresjon, og kobles til dårlig respons på visse behandlinger.

Abstract

Cancer is a genetic disease characterized by uncontrolled proliferation of cells in a tissue. Breast cancer is one of the most common types of cancer at world basis, and the one with highest survival in Norway. Cancer has several features, one of them being evading immune destruction. Immune surveillance plays an important role in the recognition and elimination of upcoming tumours, but somehow cancer cells evade this. Type I interferon (IFN)-response plays an important role in anti-cancer immune response as various studies shows that elevated expression of type I IFN-stimulating genes correlates with a better prognosis. The research group has previously found that cell line 66cl4 has a constant activation of the type I IFN-response when growing in a culture. However, this response is downregulated in the same cells when forming a tumour. In this project, it was examined how type I IFN-response can be activated without the cells being exposed to known activators. In addition, tests were performed to find out why this response is shut down in tumours made of the same cells.

For this project the 66cl4 cell line and versions of it were used, in addition to 67NR. These belong to the 4TI tumour model from BALB/c mouse. Distributed transcriptome data for these cell lines were used as foundation for the project. The cells were exposed to various conditions and analysed for type I IFN-response in the form of CXCL10-production. In addition, studies with starvation of the cells for amino acids, and inhibition of autophagy as well as TBK1, were performed to see if p62 and autophagy regulates type I IFN-response.

The results clearly show a correlation between high mRNA-levels of CXCL10 and a better prognosis for estrogen- and progesterone-receptor-negative breast cancer patients. Both Western blot and ELISA distinctly shows that 66cl4 cells produce far more CXCL10 than 67NR does. When the cells are under starvation, autophagy increases, resulting in decreased CXCL10-production. Inhibition of TBK1 also inhibits the production of CXCL10.

Knockdown of p62 in the 66cl4 clones E8 and E11 resulted in greatly reduced CXCL10-production, compared to 66cl4 wild type cells. Based on these results it can be confirmed that autophagy and p62 regulates type I IFN-response and production of CXCL10. Hopefully, these results can be used for understanding the mechanisms that make tumours immunologically active (hot) or inactive (cold), and how the inactive tumours can be activated by for example activating type I IFN-response. At the same time, continuous type I IFN-response must be avoided as it is associated with immunosuppression and bad response to certain treatments.

Forklaring av ord og forkortelser

c-di-GMP – Cyclic di-guanosine monophosphate

cGAMP – Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate

DAI – Z-DNA binding protein 1, DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors

DNA – Deoksyribonukleinsyre

ds – Double stranded

IFI16 – Interferon Gamma Inducible Protein 16

IFN – Interferon

IFNAR – Interferon alpha and beta receptor subunit 1

Ikkε – IκB kinase ε

IRF3 – Interferon regulatory factor 3

JNK/c-Jun – c-Jun N-terminal kinases

LC3 – Mikrotubuli-assosiert protein 1 lett kjede 3

LIR – LC3-interacting region

LPS – Lipopolysakkarid

MAPK – Mitogen-activated protein kinase

MHC – Major histocompatibility complex (histokompatibilitetskompleks)

NF-kappa-B – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK-celler – Natural killer-celler

Nrf2 – Nuclear factor erythroid 2–related factor 2

PB1-domene – Phox og Bem1p-domene

PRR – Pattern recognition receptor

RNA – Ribonukleinsyre

ss – Single stranded

STING – Stimulator of interferon genes (transmembrane protein 173)

SQSTM 1 – Sequestosome 1 (p62)

TBK1 – Serine/threonine-protein kinase TBK1

TGF- β – Transforming growth factor beta

UBA-domene – Ubiquitin associated domain

Innhold

Forord	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	III
Forklaring av ord og forkortelser	IV
1. Innledning	7
1.1 Kreft.....	7
1.1.1 Unngåelse av immunforsvarets destruering – «voksende, viktig hallmark»	9
1.2 Heterogenitet og tumorens mikromiljø	11
1.3 Autofagi	13
1.4 Type I IFN-responsen.....	14
1.5 p62 (Sequestosome 1).....	16
1.6 STING	17
1.7 TBK1	17
1.8 CXCL10.....	17
1.9 Hypotese og problemstilling	18
2 Materiale og metode	21
2.1 Celledyrking.....	21
2.2 Proteinekstraksjon fra celler	22
2.3 Western Blot	22
2.4 ELISA.....	24
2.5 Aminosyresult og inhibering av autofagi	25
2.6 Stimulering med TBK1-inhibitor.....	26
3 Resultater	27
3.1 Lavt nivå av CXCL10-mRNA i brystkreftbiopsier korrelerer med dårlig prognose hos brystkreftpasienter	27
3.2 Nivå av CXCL10 i 66cl4 villtype og 67NR, samt utskilt mengde i cellemedium.....	29
3.3 Argininsult og hemming av autofagi påvirker CXCL10-produksjonen.....	31
3.4 Påvisning av knockdown (nedslag) av p62.....	33
3.5 Kjemisk hemmer av TBK1 reduserer den konstante syntesen av CXCL10 i 66cl4 cellene	35
4 Diskusjon	37
5 Referanser	41
6 Vedlegg	43

1. Innledning

Kreftsvulster dannes når cellenes celledeling er ukontrollert økt og/eller cellene lever for lenge. Den bakenforliggende årsaken er mutasjoner i gener som koder for proteiner som kontrollerer disse grunnleggende celle-prosessene. Kreftcellene kan metastasere, det vil si at de kan spre seg fra primærtumoren via blodbanen og lymfesystemet og etablere sekundære tumorer i nærliggende vev og andre organer. De tidligste tilfeller av kreft ble funnet datert tilbake til 3000 fvt. blant beintumorfossiler, mumifiserte mennesker i Egypt og ble beskrevet i gamle skrifter (1).

Det ble estimert 18 millioner krefttilfeller i verden i 2018, hvor 9,5 millioner av tilfellene var hos menn og 8,5 millioner hos kvinner. De vanligste krefttypene på verdensbasis er lungekreft og brystkreft, og utgjør hver 12,3% av krefttilfellene diagnostisert i 2018 (2). Antall tilfeller av kreft i Norge i 2017 var omtrent 34 000, hvor prostatakreft hos menn, brystkreft hos kvinner, og lungekreft hos begge kjønn var de hyppigst forekommende (3). Lungekreft har størst dødelighet, mens prostatakreft og brystkreft har flest overlevelser (Cancer in Norway, 2017). Bedre forståelse over kreftcellenes biologiske prosess har gitt kunnskap til å utvikle ulike behandlingsmetoder, noe som har redusert mortaliteten av kreft. Cellegift, strålebehandling og kirurgi er de vanligste behandlingsformene, men nyere teknologi og forskning gir mulighet for mer målrettede og persontilpassede behandlingsformer (4).

1.1 Kreft

Kreft klassifiseres som en genetisk sykdom som karakteriseres av rask og ukontrollert proliferasjon og/eller hemmet celledød av celler i et vev (5).

Kreft oppstår på grunn av mutasjoner i gener som kontrollerer celleproliferasjon, differensiering og cellulær homeostase. Disse genene klassifiseres i to kategorier: onkogener og tumorsuppressorgener. Overuttrykk av onkogener og tap av tumorsuppressorgener er tilsammen den drivende kraften for tumorutvikling. Onkogener oppstår når proto-onkogener muteres, og ved mutasjon får onkogener «gain of function». Dette leder til økt celleproliferasjon, redusert celledifferensiering og inhibering av celledød. Disse egenskapene er typiske for kreftceller (6).

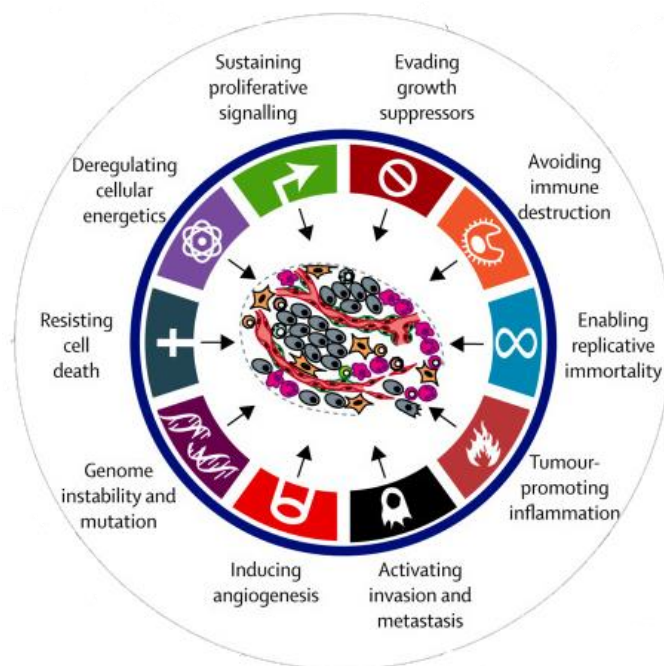
For at kreft skal utvikles kreves også inaktivering eller tap av normale celleregulatoriske gener, også kjent som tumorsuppressorgener (7). Tumorsuppressorgener hindrer ukontrollert

celleproliferasjon og cellevekst, i tillegg holder de proto-onkogener under kontroll. De deltar også i mekanismen som reparer skadet DNA og andre viktige signalveier, samt i å indusere apoptose. Ved mutasjoner i disse gener oppstår det "Loss of function", noe som kan lede til tumorutvikling (8).

Det finnes generelt to typer av genetiske mutasjoner, spontane mutasjoner i cellen som kan utvikles til en kreftcelle og arvelige varianter (germline mutasjoner) som er tilstede i alle cellene i kroppen og som gir en økt risiko for utvikling av kreft. Mindre enn 10% av krefttilfellene har en arvelig forklaring og ervervede mutasjoner er den klart vanligste årsaken til kreft. De oppstår når gener skades i en enkel celle, og videreføres når denne cellen deler seg flere ganger og danner en tumor. Disse mutasjonene oppstår spontant gjennom livet og sjansen øker med alder, men mutasjonsfrekvensen øker ved røyking, stråling og virus. Denne typen mutasjon føres ikke videre til neste generasjon, og defineres som sporadisk kreft.

Germline mutasjoner er mindre vanlige og oppstår i reproduktive celler, altså i en spermie- eller eggcelle. Disse mutasjonene føres videre til neste generasjon, og mutasjonene kopieres til hver celle hos embryoet/barnet, også definert som arvelig kreft (9).

Kreftcellenes regulering av normal celleproliferasjon og homeostase er defekt. Det finnes mer enn 100 ulike typer av kreft og subtyper av tumorer som kan sees i organer. D. Hanahan og R.A. Weinberg foreslo at det store utvalget av ulike kreftcelle-genotyper kan forklares med seks ulike forandringer i cellens fysiologi (10). Disse forandringene kalles «hallmarks» (kjennetegn) og er egenskaper som kreves for at en krefttumor skal kunne utvikles. Disse seks kjennetegnene er; opprettholde celleproliferasjon, unngå vekstsuppressor, motstå celledød, muliggjøre replikativ udødelighet, induksjon av angiogenese, og aktivere invasjon og metastasering (11). De seneste årene har det blitt publisert oppdaterte artikler med flere hallmarks der også immunsuppresjon og aktivering av tumor-fremmede betennelsereaksjoner er inkludert som kjennetegn (figur 1) (12).



Figur 1: Oppdaterte «hallmarks» for kreft. Egenskaper som hos en celle kan gi malign utvikling. Bildet er hentet og modifisert fra en artikkel (12) som omhandler hvordan disse egenskaper kan brukes som angrepspunkter ved kreftbehandling.

Differensieringen av kreftcellene er viktig for alvorlighetsgraden av kreft, samt dens metastatiske egenskap. Høyt differensierte tumorceller er relativt lik opphavscellen, og disse er som regel godartede. Lavt differensierte tumorceller er veldig ulik opphavscellen, og disse er ofte ondartede. Jo lavere differensiering av cellene, desto større er risikoen for at de sprer seg (metastaserer) (13). Metastasering skjer i flere steg og starter med cellebiologiske endringer i kreftceller som leder til invasjon av nærliggende vev. Deretter tar kreftcellene seg ut i blod- og lymfekar, og videre ut i sirkulasjonssystemet. Til slutt, gjennom ekstravasasjon, tar de seg til parenkym i perifert vev der små masser av kreftceller danner mikrometastaser. Dette vil utvikle seg til at de vokser til makroskopiske tumorer. Det dannes da kolonisering av nytt vev (11).

1.1.1 Unngåelse av immunforsvarets destruksjon – «voksende, viktig hallmark»

I artikkelen «The Hallmarks of Cancer: Next Generation» presenteres et nytt kjennetegn, egenskapen til å unngå immunforsvarets destruksjon. Immunovervåking innebærer at celler og vev er under konstant overvåking av immunsystemet. Denne overvåkingen er ansvarlig for å gjenkjenne og eliminere største delen av begynnende kreftceller og fremtidige tumorer. Med dette i bakhodet må tumorer som har oppstått i kroppen ha lyktes med å unngå å bli oppdaget eller drept av kroppens immunsystem.

At immunsystemets overvåkning er viktig tydeliggjøres av den store økningen av visse krefttyper hos immunkomprimerte personer, disse er midlertidig oftest virale krefttyper (14). Dette er altså ikke så relevant for brystkreft, men studier som er blitt gjort de seneste årene på både genetisk modifiserte mus og på mennesker (klinisk epidemiologi) tyder på at immunforsvaret fungerer som en viktig barriere mot formering og utvikling av tumorer, i noen tilfeller av non-virale krefttyper (11).

Genetisk modifiserte mus har blitt analysert for endringer i danning av karsinogen-fremkalte tumorer. Hos musene modifisert til å ha mangel på ulike komponenter av immunsystemet, ble det observert at tumorer oppsto hyppigere og/eller vokste fortere, sammenlignet til de immunkompetente kontrollene (REFs). Spesielt, mangel på utviklingen av funksjonen hos CD8⁺ cytotoksiske T-lymfocytter, CD4⁺ T_h1 hjelper T-celler eller natural killer (NK)-celler førte til tydelige økninger i tumorinsidens. I tillegg ble det også observert at mus med kombinert immunmangel i både T-celler og NK-celler var enda mer mottagelig for utvikling av kreft. Disse resultatene tyder på at både det medfødte og ervervede immunforsvaret bidrar til immunovervåkning, og er dermed med på å fjerne tumor (11).

I tillegg har transplantasjons-eksperiment vist at kreftceller som har oppstått i immunkompromitterte mus ofte ikke kan initiere sekundære tumorer i immunkompetente verter. I motsetning er kreftceller fra tumorer, som har oppstått i immunkompetente mus, like god på å initiere tumorer i både immunkompromitterte og immunkompetente verter (15, 16). Disse resultatene kan tolkes som at veldig sterkt immunogene kreftcellekloner elimineres rutinemessig i immunkompetente verter, i en prosess som kalles «immunoediting». Dette gjør at kun svakt immunogene varianter overlever, kan vokse og danne tumor. Disse svakt immunogene cellene kan derfor kolonisere både immunkompromitterte og immunkompetente verter. Når immunogene kreftceller oppstår i immunkompromitterte verter blir de ikke selektivt eliminert, og kan derfor vokse videre sammen med de svakt immunogene kreftcellene. Når celler fra "non-edited" tumorer transplanteres i en genetisk kompatibel mottaker, frastøtes de når de da, for første gang, støter på et kompetent immunsystem i den nye verten (17).

Dette er midlertidig et forenklet bilde av tumor-vert immunologiske interaksjoner, da sterkt immunogene kreftceller kan unngå å bli nedbrutt av immunforsvaret gjennom å inaktivere komponenter i immunsystemet, som normalt vil bryte de ned. For eksempel kan kreftceller paralisere infiltrerende CD8⁺ cytotoksiske T-lymfocytter og NK-celler gjennom å sekretere

TGF- β (transforming growth factor beta) eller andre immunsuppressive faktorer. De kan også virke gjennom rekruttering av inflammatoriske celler som er aktivt immunsuppressive, for eksempel anti-inflammatoriske makrofager (M2/TAMs), regulatoriske T-celler og myeloid-deriverte suppressor celler. Alle disse immuncellene kan aktivt dempe de cytotoksiske lymfocyttenes aktivitet (11).

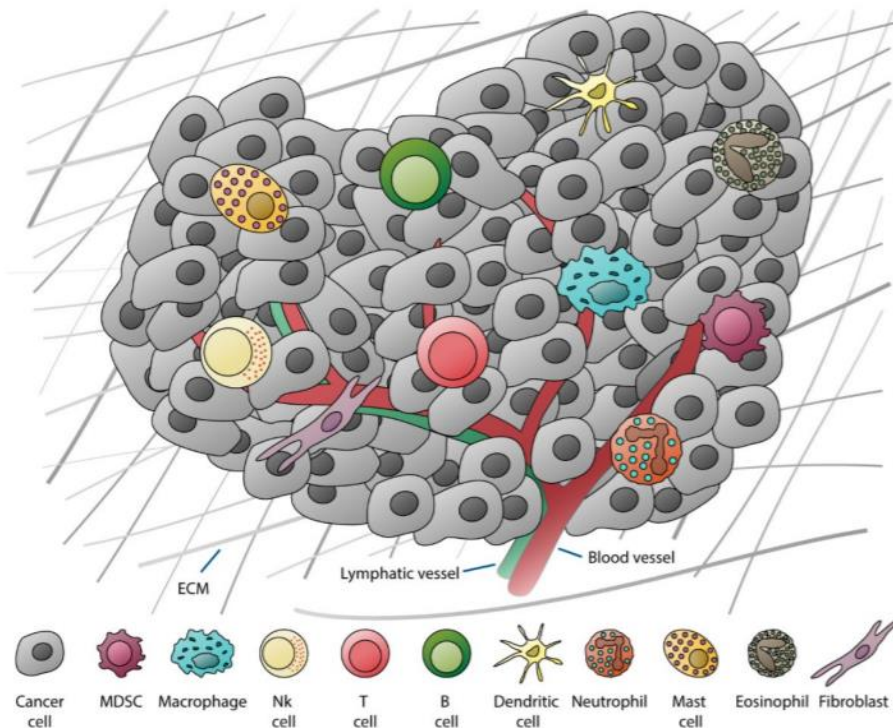
1.2 Heterogenitet og tumorens mikromiljø

Nye studier viser et omfattende genetisk mangfold både mellom tumorer (intertumoral heterogenitet) og i tumorer (intratumoral heterogenitet), noe som utgjør en stor utfordring for persontilpasset kreftmedisin. En viktig årsak til genetisk heterogenitet i kreft er genom-instabilitet. Denne instabiliteten leder til en økt mutasjonsrate og kan påvirke utviklingen av kreftgenomet gjennom en mengde mekanismer.

Intratumoral mangfold oppstår i uttrykk av protein-biomarkører og på flere ulike genetiske og epigenetiske nivåer. Genetisk distinkte subklonale populasjoner av celler oppstår gjennom intercellulær genetisk variasjon, som følges av selektiv oppvekst av kloner med en fenotypisk fordel i et gitt tumormikromiljø (18).

Tumorer er altså mer enn en masse av prolifererte kreftceller (figur 2). De er komplekse vev som består av flere ulike celletyper som samhandler og påvirker hverandre. Rekrutterte normale celler danner tumor-assosiert stroma og deltar aktivt i dannelsen av tumor.

Stromaceller bidrar til utvikling og uttrykk av visse hallmark-egenskaper. Dette betyr at også tumorens mikromiljø bidrar til utviklingen av en tumor, og må tas i betraktning (11).



Figur 2: En tumor er mer enn bare en masse av prolifererende celler. Tumorens mikromiljø består av flere ulike sorter av celler, som får tumoren til å fungere som et nytt organ (19).

Tumorer kan deles inn i «varme-» (T-celle-inflammerede) og «kalde-» (ikke T-celle-inflammerede) tumorer, utifra nærvær av immunceller. Tumorens mikromiljø er med og former kroppens immunrespons ved kreft. De viktigste immuncellene i tumorens mikromiljø er T-celle, natural killer-celler, makrofager, dendritiske celler, granulocytter, B-celler og myeloid-deriverte suppressorceller. Heterogenitet gjør det mulig å observere forskjeller i tumormikromiljøet (20).

Varme tumorer har en overflod av tumorinnfiltrerende lymfocytter og viser en initial immunrespons, som vil dempes ved oppregulering av «immune checkpoints» (inhibitoriske reseptorer) eller økt antall suppressive immunceller. I motsetning til dette er kalde tumorer definert ved mangel på en tilstrekkelig populasjon av eksisterende svulstinfiltrerende lymfocytter. Det finnes flere årsaker til at en tumor kan være kald. I en type av kalde tumorer virker det som det ikke finnes noen aktivering eller rekruttering av T-celler, til forskjell fra i en annen type kalde tumorer der T-celler tiltrekkes til tumorens periferi, men mislykkes i å trenge seg inn i tumoren (20).

Det virker altså som at oppsettet av immunceller i tumorens mikromiljø har betydelse for prognosen i flere typer av kreft.

Tumorens mikromiljø produserer et spesielt oppsett av cytokiner og kjemokiner for å tilkalle T-celler. Ved undersøkelser som er blitt gjort av genekspressjons-profiler av kjemokiner i samarbeid med immuncelleinfiltrasjon av ulike tumorer, har det konsekvent blitt funnet at uttrykk av kjemokin CXC ligand (CXCL)9 og CXCL10 korrelerer med immuncelleinfiltrasjon. Kjemokin CC ligand (CCL)2 og CCL5 har også blitt positivt assosiert med infiltrasjon, men de virker også å ha en negativ effekt på migrasjonen av T-celler til tumorens mikromiljø (20).

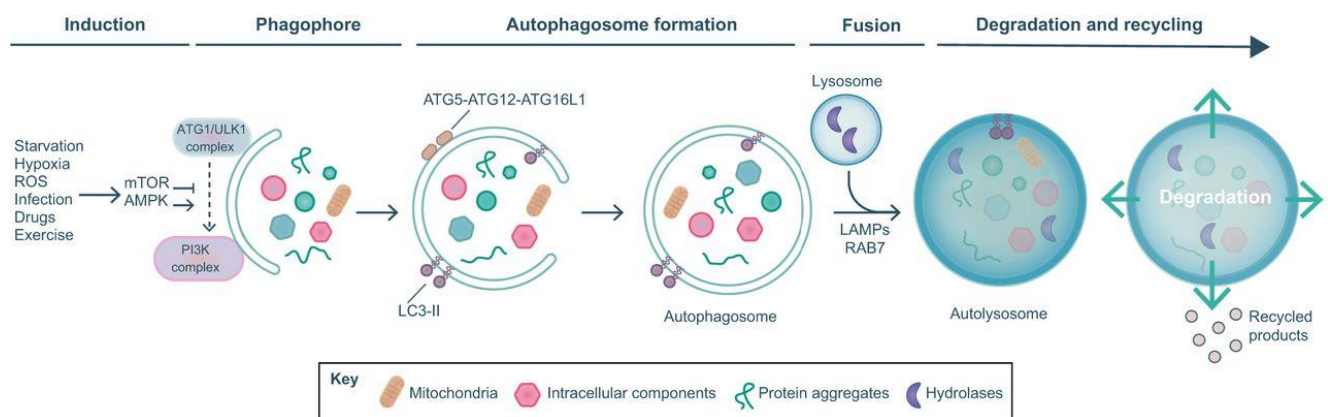
1.3 Autofagi

Makroautofagi (heretter referert til som autofagi) er en katabolsk vei for isolering og transport av cytosoliske komponenter for nedbrytning til lysosomet. Dette skjer ved at deler av cytoplasma eller organeller blir isolert i dobbelt-membranbundede vesikler, kalt autofagosom (21). Mikrotubuli-assosiert protein 1 lett kjede 3 (LC3)-molekyler er strukturelle forbindelser som sitter på autofagosomale membraner. Det finnes tre typer av LC3-molekylet (LC3A, LC3B og LC3C), hvor LC3B-variantene I og II blir benyttet som indikatorer for autofagi (22). LC3B-I er den cytosoliske formen som blir omgjort til den lipiderte formen LC3B-II, som sitter på membranen til autofagosomer. LC3B-II fungerer som en adapter som binder komponenter (for eksempel feilfoldede proteiner), og leverer disse til autofagosomet for videre degradering (23, 24). Autofagosomet fusjonerer i ettertid med et lysosom, hvor innholdet og indre membraner blir degradert, da makromolekyler blir resirkulert (figur 3) (21).

Kortvarige proteiner brytes ned av proteasomer, mens lengelevende proteiner og enkelte organeller brytes ned ved hjelp av autofagi. Studier har i tillegg vist at ved aminosyreindusert autofagi, og dermed en økning i antall autofagosomer. I tillegg til cellulær homeostase, har autofagi også en viktig rolle under celledifferensiering, vevsmodellering, celledefens under bakterie- og virusinfeksjoner, ved apoptose og kreft (21).

Kreft oppstår som resultat av dysregulering av veier som regulerer celledifferensiering, celleproliferasjon og celleoverlevelse. Dysfunksjonelle mitokondrier vil for eksempel produsere reaktive oksygenradikaler (ROS), et av de vanligste mutagener, altså de gir økt risiko for kreftutvikling. Autofagi beskytter mot mutasjoner tidlig i kreftcelledannelsen ved å degradere ødelagte mitokondrier. På en annen side vil autofagi kunne bidra til kreft ved å fremme overlevelse. Kreftcellene i en voksende tumor er avhengig av næringsstoffer og oksygen, noe tumoren vil ha begrenset tilgang til, på grunn av manglende blodtilførsel.

Autofagiprosessen er dermed viktig for å kompensere for sult. Nylige data er mest konsistente med en modell hvor autofagi bidrar til svulstundertrykkelse, og at mangler i autofagi kan bidra til onkogenese (25).



Figur 3: Autofagiens mekanisme. mTOR- og AMPK-signalveiene styrer induksjon av autofagi, og er avhengig av ATG1/ULK1-kompleks-aktivering. ATG5 og ATG12 konjugerer og binder til ATG16L. ATG5-ATG12-ATG16L-komplekset katalyserer konjugasjon av LC3-I til lipidfosfatidyletanolamin (PE) for å danne LC3-II, hvilket letter forankringen med autofagosomalmembranen. Autofagosomet smelter deretter sammen med et lysosom, en prosess som involverer flere lysosomale proteiner, inkludert LAMP og RAB7 (late endosome). Etter nedbrytning ved hjelp av lysosomale hydrolaser, omdannes de endelige produktene (aminosyrer, lipider og nuklotider) til cytoplasmaet til bruk i nye anabole reaksjoner, for å opprettholde cellehomeostase (26).

1.4 Type I IFN-responsen

Interferoner (IFN) er småmolekylære proteiner som fungerer som signalmolekyler. De seneste årene har det blitt mer kjent at type I IFN-respons spiller en viktig rolle i anti-kreft-immunrespons, da studier viser at tumorekspresjon av type I IFN og IFN-stimulerende gener (IGSs) korrelerer med en bedre sykdomsprognose (27).

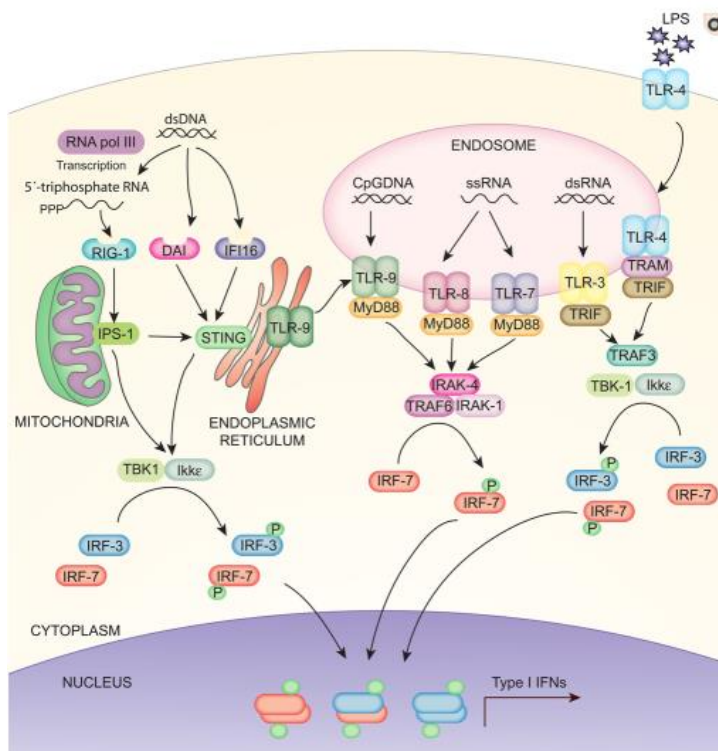
IFN ble oppdaget i 1957 av Alick Isaacs og Jean Lindemann i influensainfekterte kyllingembryoceller. De virker som et "første-linje-forsvar" i det medfødte immunforsvaret, og er viktige i forsvaret mot virus (28).

IFN er en superfamilie av cytokiner med pleiotropisk effekt på mange celletyper, og består av tre subtyper: type I, type II og type III (29).

Type I IFN består av IFN α (12 subtyper), IFN β , IFN κ , IFN ϵ og IFN ω . Makrofager og dendritiske celler produserer hovedsakelig IFN β , mens hematopoietiske celler og plasmacytoide dendritiske celler hovedsakelig produserer IFN α (28).

Når mønster-gjenkjenningsreseptorer (PRRs) detekterer mikrobielle produkter (for eksempel dsRNA, ssRNA, virale glykoproteiner, LPS) starter flere ulike immun- og non-immunceller å produsere og utskille IFN (28). Disse IFN regulerer i sin tur det medfødte og adaptive immunforsvaret via flere ulike mekanismer. Dette skjer for eksempel gjennom å promotere MHC-ekspresjon, NK-cytotoksitet, høyaffinitet-antigen-spesifikk T-celle og B-celle-respons, begrense aktivering av pro-inflammatoriske signalveier og cytokinproduksjon (27). DNA eller RNA fra vertscellen kan også indusere produksjon av type I IFN. Cytosoliske DNA-sensorerer (som DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI)) kan i tillegg til fremmede DNA, også gjenkjenne eget DNA som er lekket ut i cytosolen i skadde eller døende celler. Dette leder til en økt produksjon av type I IFN (29).

Når PRR detekterer en patogen induseres IFN gjennom aktivering av transkripsjonsfaktor IRF3 (Interferon regulatory factor 3) (figur 4). Når IFN produseres trigger de «nedstrømsignaler», som gjennom et antall reaksjoner til slutt aktiverer transkripsjon av en gruppe gener som kalles IFN-stimulerende gener (ISGs). Disse genene koder for proteiner som bidrar til å beskytte celler mot virale infeksjoner gjennom ulike mekanismer, som inhibering av virus-inntrenging, replikering, translasjon, sammensetting og frigjøring(27).



Figur 4: Signalveier som leder til produksjon av type I IFN. Cytosolisk dsDNA kan gjenkjennes av reseptorene DAI og IFI16, som induserer en STING-avhengig aktivering av TBK-1 og Ikke. Disse vil i sin tur trigge IRF-3/7 fosforylering, dimerisering, nukleær translokasjon og type-1 IFN-gentranskripsjon (29).

Nesten alle celletyper uttrykker type I IFN-reseptor (IFNAR, en heterodimer som består av subenhetene IFNAR1 og IFNAR2), som gjør at IFN kan utøve direkte anti-virale effekter på nesten alle celletyper.

For en balansert og korrekt respons må disse prosessene finjusteres ved signalering, transkripsjon og translasjon. Tap av denne finjusteringen kan resultere i uavbrutt IFN-signalering, immunsuppresjon og vevsskade, noe som er involvert i patogenese for kroniske virale infeksjoner, autoimmune sykdommer og kreft. IFN virker også å ha en todelt rolle i kreft-immunologi og behandling. Uavbrutt IFN-signalering assosieres med immunsuppresjon og har blitt koblet til dårlig respons på gentoksiske og radiotoksiske behandlinger (27).

1.5 p62 (Sequestosome 1)

p62 er et multifunksjonelt protein på 62 kDa, og kalles også for Sequestosome 1 (SQSTM 1) på grunn av sin egenskap til å kunne danne aggregater. p62 er 440 aminosyrer langt og har en NH₂-terminal Phox og Bem1p (PB1)-domene, som følges av en ZZ-type finger-domene, en PEST-region som antas å inneholde fosforyleringssetet, samt en COOH-terminal ubiquitin-assosiert (UBA)-domene. p62 binder non-kovalent til ubiquitin eller polyubiquitin-kjeder via sin UBA-domene. PB1-domenen benyttes både for polymerisering av p62 og for å binde til andre proteiner som har PB1-domener (21).

Akkumulering av ubiquitinerede proteiner i cytoplasma og/eller nukleære inklusjoner ses ved flere alvorlige sykdommer assosiert med prematur celledød (30). p62 leverer disse ubiquitinerede komponentene for autofagisk degradering via C-terminalens UBA-domene eller LIR (LC3-interacting region)-domene for å unngå akkumulering. PB1-domenen promoterer prosessen.

Det intracellulære nivået av p62 avhenger av transkripsjonell regulering og post-translasjonell autofagisk degradering. Transkripsjonen av p62 styres av oksidativ stress (Nrf2), Ras/MAPK-signalvegen, JNK/c-Jun signalvegen og enkelte kjemiske forbindelser. Inhibering av proteasom og sult kan også starte syntese av p62. p62 styres i tillegg av autofagi, da det fungerer som et substrat under autofagisk degradering. Når autofagi aktiveres reduseres uttrykket av p62. I enkelte cellelinjer kan overuttrykt p62 øke proteinaggregering og gi en beskyttende effekt for cellens overlevelse (31).

1.6 STING

Stimulator of interferon genes protein (STING) regulerer produksjon av type I IFN (IFN- α og IFN- β). STING gjenkjenner og binder syklisk d-GMP (c-di-GMP), komponenter produsert av bakterier og syklisk GMP-AMP (cGAMP). cGAMP er et signal som produseres av syklisk GMP-AMP syntase (cGAS) som respons til DNA i cytosol. Når STING binder til c-di-GMP og cGAMP dempes autoinhibering (negativ proteinregulering), noe som gjør at STING kan aktivere signalveier som leder til transkripsjon av NF-kappa-B og IRF3 (figur 4). Dette induserer uttrykk av type I IFN, og setter cellen i et anti-vitalt stadium (32).

1.7 TBK1

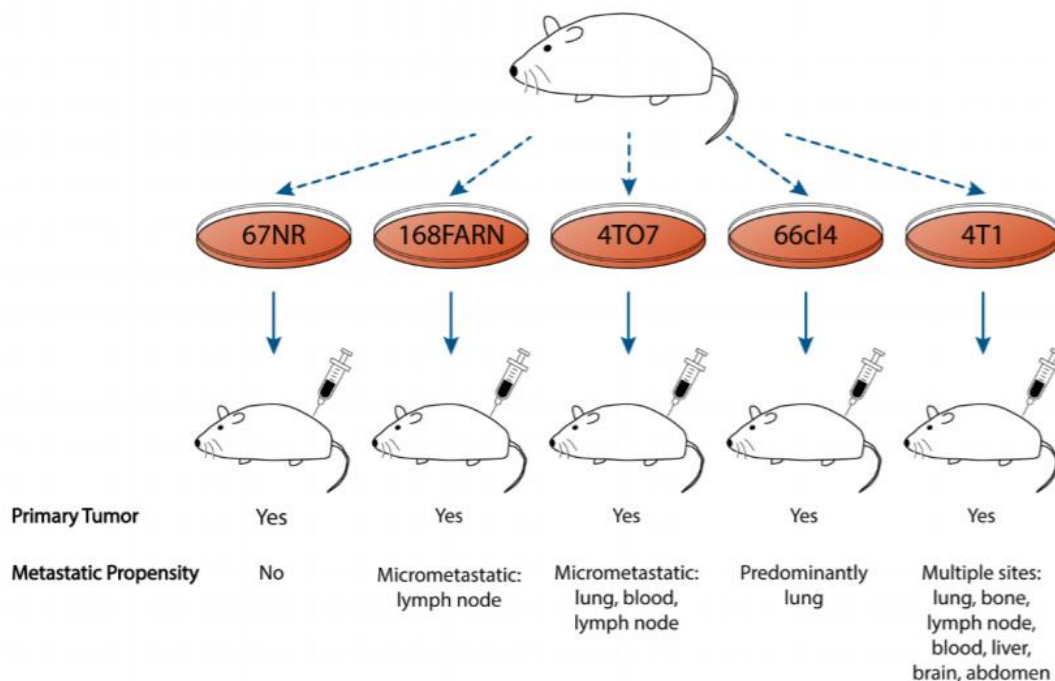
TBK1 (Serine/threonine-protein kinase TBK1) er en kinase som er essensiell i reguleringen av inflammatorisk respons mot fremmede agens. Når Toll-like reseptorer aktiveres av bakterielle eller virale komponenter, samarbeider TBK1 med TRAF3 og TANK og fosforylerer interferon-regulatoriske faktorer IRF3 og IRF7, samt DDX3X. Dette muliggjør homodimerisering og nukleær translokasjon av IRF som leder til transkripsjonell aktivering av pro-inflammatoriske og antivirale gener, som IFN α og IFN β . I kreftceller promoterer patologisk aktivering av TBK1 onkogenisk transformasjon ved å undertrykke programmert celledød (19).

1.8 CXCL10

C-X-C motif kjemokin 10 (CXCL10) er også kjent som interferon γ -indusert protein 10 kDa (IP-10) (33). CXCL10 er et kjemokin som tilhører CXC-kjemokinfamilien, og som skilles ut av celler som er blitt stimulert av type I IFN for å tilkalle aktiverte T-celler via kjemotakse (34). Den binder til CXCR3-reseptor for å indusere kjemotakse, apoptose, cellevekst og angiostase. Forandringer i nivå av uttrykt CXCL10 har blitt assosiert med inflammatoriske sykdommer, inkludert tumorutvikling. Proteinet fungerer også som en biomarkør, som forteller noe om alvorlighetsgraden hos ulike sykdommer (33).

1.9 Hypotese og problemstilling

Til dette bachelorprosjektet har tumormodellen 4T1 blitt benyttet. Dette er en genetisk identisk (syngene) brystkreftmetastase-modell. Siden modellen ble etablert i 1978, har nye cellelinjer og varianter av de originale cellelinjene blitt utviklet (19). Modellen består av subpopulasjonslinjene 67NR, 168FARN, 66cl4, 4TO7 og 4TI, som har blitt isolert fra en spontant oppstått brystkrefttumor i BALB/cfC3H mus. Alle fem cellelinjer kan danne primærtumor når de implanteres tilbake i BALB/c mus, men de skiller seg fra hverandre etter metastatisk egenskap. I dette prosjektet har det blitt fokusert på cellelinjepopulasjonen 66cl4 som metastaserer fra brysttumor til lunge og ulike knockdown-varianter av denne. Som kontroll har vi brukt cellelinjen 67NR som ikke kan danne metastaser (figur 5) (19).



Figur 5: 4T1 brystkreftmodell, mus. Alle fem cellelinjer kan danne primærtumor når de implanteres i BALB/c-mus, men de har ulike egenskap for metastase (19).

I tillegg har transkriptomdata (tabell 1) utlevert fra Geir Bjørkøy fra CEMIR blitt brukt. RNA fra cellelinjene 66cl4 og 67NR i både cellekultur og i tumor fra mus ble transkriert i 4-7 paralleller. Transkrierte data viser tydelig økning i nivå av CXCL10 og andre interferoner som tilhører type I IFN-responsen (Irgm og Isg15) hos 66cl4-celler i kultur, i motsetning til i tumor. Sammenlignet med 67NR er denne økningen mye større.

Tabell 1: Transkriptomdata viser store forskjeller i nivå av ulike gener i 66cl4-cellene i kultur og tumor, samtidig som at det er store forskjeller sammenlignet med 67NR. Transkriptomdata er utlevert fra Geir Bjørkøy (CEMIR). RNA fra cellelinjene 66cl4 og 67NR ble transkribert i 4-7 paralleller. Resultatene er i transkript per million transkript (TPM).

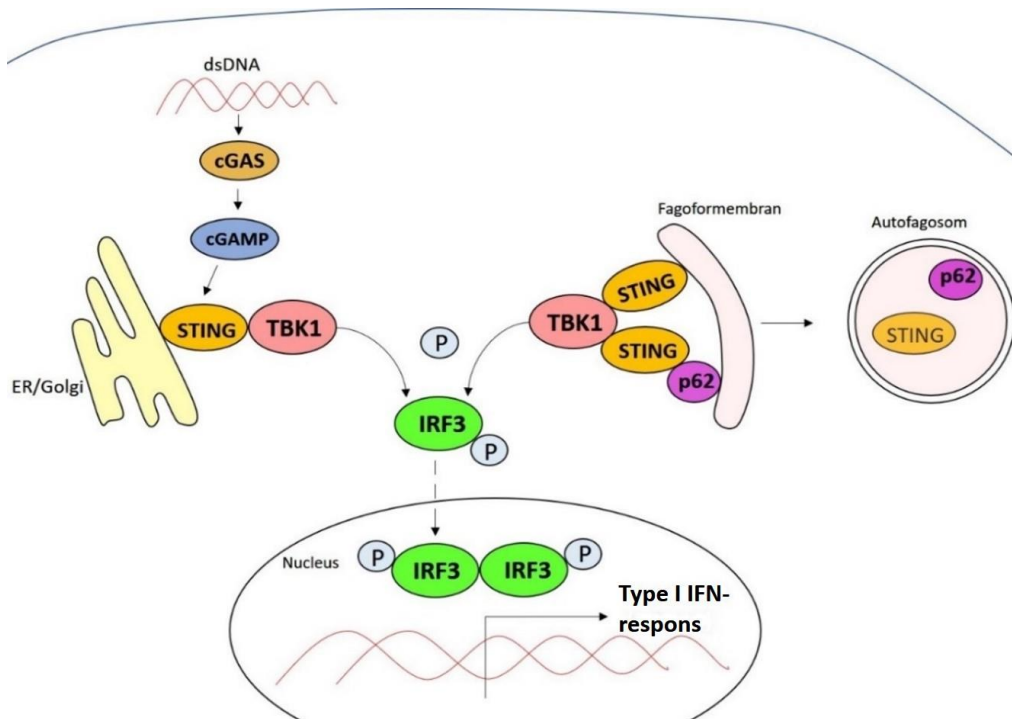
GEN	66CL4 OG 67NR I KULTUR (TPM)			PRIMÆR TUMOR GENERERT FRA 66CL4 OG 67NR (TPM)		
	66cl4	67NR	p-verdi	66cl4	67NR	p-verdi
CXCL10	125,97	1,90	0,03	15,48	47,70	0,00
IRGM1	172,98	5,92	0,00	33,14	43,65	0,59
ISG15	728,83	7,52	0,00	44,96	117,93	0,04
STING/ TMEM173	23,51	3,02	0,00	34,08	25,28	0,01
SQSTM1 /P62	112,34	253,16	0,00	164,18	221,75	0,08
ASS1	0,00	0,47	0,06	1,21	5,20	0,04
ARG1	0,01	0,01	0,98	114,62	0,19	0,00

Det er blitt observert at CXCL10 (og resten av type I IFN-responsen) er økt på mRNA-nivå i 66cl4 cellene i forhold til 67NR cellene når disse dyrkes i kultur. Basert på dette funnet kan ulike hypoteser formuleres. Den første hypotesen er at den vesentlige økningen av disse transkriptene også reflekteres i et tydelig økt nivå av CXCL10-protein i cellene og skilt ut fra cellene.

Det er og blitt observert at type I IFN-responsen dempes kraftig i tumor i forhold til i cellekultur. Denne observasjonen gir opphav til en ny hypotese om at den tydelige økningen av type I IFN-responsen i cellekultur skyldes akkumulering av komplekser av STING dannet av SQSTM1/p62.

I transkriptomdata ble det i tillegg funnet at mRNA og protein-nivå av arginase 1 er mye høyere i 66cl4 enn i 67NR tumorene. Derfor er den siste hypotesen at den tydelige dempingen av type I IFN-responsen skyldes sult av kreftceller i tumoren. Sultresponsen inkluderer økt autofagi som fjerner STING-SQSTM1 kompleksene og skrur av type I IFN-responsen. Om denne hypotesen er riktig, skal type I IFN-responsen også i kultur være sensitiv for aminosyresult.

For å kunne utføre relevante forsøk på å bekrefte/avkrefte hypotesene, er det ønskelig å vite hvordan type I IFN-responsen blir induisert. Signalveien til type I IFN-respons vil gjøre det lettere å forstå hvilke komponenter og forhold som kan regulere produksjon av type I IFN. Basert på tidligere forskning og fakta har det blitt laget en illustrasjon i form av en oversiktsmodell over antatt signalvei for stimulering av type I IFN-responsen (figur 6).



Figur 6: En oversiktsmodell over antatt signalvei, som stimulerer type I IFN-respons i form av CXCL10-dannelse. Antar at type I IFN-respons blir induisert via STING bundet til p62 og/eller uten binding til p62. Om responsen blir induisert via STING bundet til p62, antas den å være regulert av autofagi.

Problemstillingen for dette bachelorprosjektet er:

Er autofagi involvert i regulering av type I interferon-responsen hos metastaserende brystkreftceller?

2 Materiale og metode

Alt arbeid i forbindelse med cellekultur ble utført på steril benk i avtrekksskap, med sterile utstyr. Prøvene ble hele tiden oppbevart på is, eller i fryser (-80°C), for å opprettholde proteinkonsentrasjonen. Ved 4°C eller kaldere vil proteaseaktiviteten være redusert, dermed vil ikke proteiner ødelegges eller gå tapt.

En liste over alle reagenser som er blitt benyttet er lagt ved (vedlegg 1).

2.1 Celledyrking

Vekstmedium for brysttumorecellene 67NR og 66cl4 ble laget ved å tilsette føtalt bovint serum (10%), L-Glutamin (1%) og Penicillin/Streptomycin (1%) i DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium).

Cellekulturene ble observert i mikroskop for å kontrollere celletettheten i kulturen.

Cellekulturene ble splittet når de var 80% konfluente, og splitteratio ble bestemt etter cellekonfluensen. Gammelt medium ble fjernet, og cellene ble vasket to ganger med PBS (Sigma Dulbecco's Phosphate Buffered Salin). Cellene ble tilsatt trypsin og ble inkubert ved 37°C (5% CO₂) i noen minutter, for å løsne cellene fra underlaget. Så snart cellene løsnet ble trypsineringen stoppet ved å tilsette medium med 10% serum (inneholder potente trypsin-inhibitorer). Avhengig av celletettheten i utganskulturen, ble et lite volum av celleduspensjonen overført til en ny flaske og tilsatt medium. Cellekulturflasker ble merket med cellelinje, dato, passasjenummer og navn.

Cellene ble så sådd ut i brønner/skåler for å videre benyttes til tester. For utsåing av celler i brønner er det viktig med likt antall celler i alle brønnene, hvor antall celler som er nødvendig er avhengig av brønnens størrelse. Det ble derfor først utført automatisk celletelling (Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer). Til celletelling ble det benyttet en løsning med 20µL celleduspensjon (fra splitting) og 10 mL isotonisk buffer, og hver cellelinje ble telt i paralleller. Avhengig av antall celler/mL, ble en bestemt mengde volum celleduspensjon (fra splitting) fortynnet i fullmedium og tilsatt i hver brønn/skål, og deretter inkubert ved 37°C (5% CO₂).

2.2 Proteinekstraksjon fra celler

Til lysering ble det brukt urea lyseringsbuffer (8M). Lyseringsbufferen er laget av urea (60,06g/mol), Triton-x (100%), DDT (1M, reduseringsmiddel, Applichem), PI (complete 25x, protease inhibitor, Sigma Aldrich), PIC2 og PIC3 (250x, fosfatase inhibitorer, Sigma Aldrich). Medium fra cellekultur i petriskål/brønn ble fjernet med Vacuum Boy-pipette og cellekulturen ble vasket med PBS. All PBS ble fjernet før tilsats av lyseringsbuffer.

Lyseringsbufferen løser cellene fra skålen/brønnen og lyserer cellene. De løste cellene ble skrapet løs med en celleskraper og deretter pipetert over i eppendorf-rør, som umiddelbart ble plassert på is.

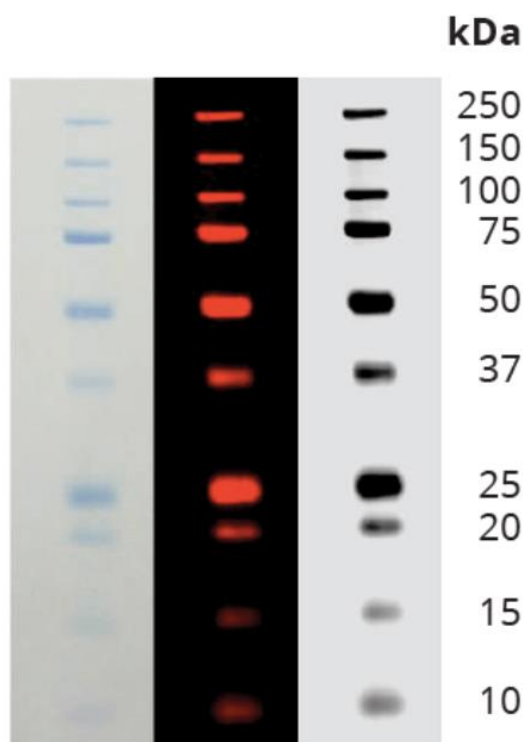
For å isolere proteinene i cellene ble cellene først fullstendig lysert ved å ristes på risteinstrument (2 timer ved 4°C), og deretter sentrifugert (13 000 rpm 20 min ved 4°C). Supernatanten fra hver prøve ble benyttet til å måle proteinkonsentrasjon. For å måle proteinkonsentrasjon ble supernatant blandet med BioRad-reagens (BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate fortynnet i destillert vann 1:5). Lyseringsbuffer ble benyttet som blank. Absorbansen i prøvene ble målt fotometrisk (Thermo Spectronic, Gensys20) ved 595 nm, og absorbansene ble brukt som grunnlag for å bestemme proteinkonsentrasjon i lysatet.

2.3 Western Blot

Western blot er en metode (også kalt immunoblot) som benyttes for å detektere og kvantitere spesifikke proteiner i prøveekstrakter, ved hjelp av primærantistoff rettet mot proteiner som undersøkes, og sekundærantistoff som er merket og binder seg til primærantistoffet.

Proteinene i lysatet denatureres av varmebehandling og separeres etter størrelse og ladning ved elektroforese gjennom polyakridamid gel.

Prøver ble fortynnet med Tris-HCL-buffer (10mM) i forhold til prøvens proteinkonsentrasjon. Prøvebuffer ble laget av LDS (4x) og DTT (1M) i 5:1 forhold, og ble deretter tilsatt i prøvene. Prøvene ble blandet og denaturert på varmeblokk på 80°C i 10 minutter. Det ble deretter utført gelelektroforese i MES running buffer (1x, fortynnet fra 20x stock), hvor type gel ble valgt i forhold til størrelsen på proteinene som skulle detekteres (4-12% eller 12% polyakrylamid gel). Gelelektroforesen ble kjørt i 35 minutter ved 120V (Invitrogen PowerEase®500, program «NuPage Gel»). Det ble også benyttet størrelsesmarkør (Odyssey Molecular weight marker) (figur 7).



Figur 7: Viser Odyssey Molecular weight marker (størrelsesmarkør). Bildet er generert ved å benytte digitalt kamera (venstre) og Odyssey CLx Infrared Imaging System (midten og høyre).

Etter endt gelektroforese ble gelen tatt ut, og benyttet til å lage en «sandwich» med blottepapir, filterpapir og blottemembran. Luftbobler ble fjernet og de sammensatte lagene ble deretter plassert i blotteinstrument (Invitrogen iBlot®2, program 0) for tørr blotting i 7 minutter. Dette for å overføre proteinene til blottemembranet. Ved endt blotting ble membranen satt i et rør tilsatt blockingbuffer (Odyssey Blocking buffer + 1xTBST Bjørkøy variant forhold 1:1), og blokkert i 1 time i romtemperatur for å forhindre uspesifikk binding.

Membranen ble deretter tilsatt primærantistoffløsning (Odyssey blockingbuffer + 1x TBST Bjørkøy variant 1:1, tabell 2). Membran med primærantistoff ble inkubert over natten ved 4°C, deretter vasket med 1xTBST (Bjørkøy variant) før tilsats av sekundærantistoff.

Sekundærantistoff er fortennet i samme løsning som primærantistoff, og er bundet til en fluorescerende forbindelse. Membranen ble inkubert beskyttet fra lys ved romtemperatur i 1 time. Deretter ble den vasket med 1xTBS (Bjørkøyvariant) og 1xTBST (Bjørkøyvariant).

Membranen ble tørket på papir minst 45 minutter i romtemperatur (10 minutter i varmeskap), beskyttet fra lys, før den ble analysert på Odyssey CLx (Li-Cor).

Tabell 2: Primær- og sekundærantistoff benyttet til Western blot farging. Antistoffene ble fortynnet i Blocking buffer + 1xTBST (Bjørkøy variant) (forhold 1:1), etter fortynning oppgitt i tabell for hvert antistoff.

Primærantistoff		Sekundærantistoff		
Antistoff	Fortynning	Antistoff	Fortynning	Fluorescerende farge
Kanin anti-CXCL10 (IgG)	1:1000	Geit anti-kanin IgG	1:5000	Grønn
Mus anti-ERK ½	1:2000	Geit anti-mus IgG	1:10 000	Rød
Kanin anti-LC3B	1:1000	Esel anti-marsvin IgG	1:5000	Grønn
Marsvin anti-p62 (IgG)	1:1000			
Kanin anti-STING	1:1000			

2.4 ELISA

ELISA står for Enzyme-linked immunosorbent assay, og er en immunologisk metode for å kunne påvise biologiske komponenter (35). ELISA er en sensitiv metode hvor man benytter antistoffer bundet til et kromofort enzym til å detektere et spesifikt protein. Når antistoffet binder seg til antigenet i prøven vil det kromofore enzymet utløse en fargereaksjon når substrat tilsettes. Fargeintensiteten måles for å beregne konsentrasjon. Det benyttes standarder med kjente konsentrasjoner av substansen, hvor disse blir benyttet til å lage en standardkurve for videre beregning av konsentrasjon for prøvene.

Cellemedium fra utsåingsflasker ble samlet og sentrifugert. Supernatantene ble samlet og filtret før analysering.

Et 96-brønns Brett ble benyttet til ELISA-analyse. Det ble utført vasking med vaskebuffer på Tecan Hydrospeed etter hvert trinn, frem til tilsats av substratløsning. Prøver og antistoff ble fortynnet i reagens-fortynner, utenom capture-antistoff, som ble fortynnet i steril PBS.

Capture-antistoff (50 µL, 2,00µg/mL) ble tilsatt i alle brønnene og inkubert i romtemperatur (RT) over natten. Brønnene ble blokkert med reagens-fortynner i RT i 1 time. Prøve (50µL) ble tilsatt og inkubert i RT i 2 timer. Deteksjons antistoff (50 µL, 100ng/mL) ble tilsatt i alle brønnene, og inkubert i 2 timer i RT. Brønnene ble inkubert i 20 minutter med arbeidsfortynnet Streptavidin-HRP (50µL, 1:40 fortynning) i hver brønn, Deretter ble brønnene inkubert med substratløsning (50µL) i 20 minutter beskyttet mot lys, innen

stoppløsning (50µL) ble tilsatt for å stoppe reaksjonen i brønnene.

Fargeintensiteten ble målt på BIO-RAD iMark™ Microplate Reader ved 450nm og 570nm.

2.5 Aminosyresult og inhibering av autofagi

Hver cellepopulasjon ble sådd ut med 300 000 celler/brønn i 6-brønns brett, og ble inkubert til minst 80% konfluensitet. Mediet ble byttet ut med ulike medier med ulik grad av arginin-/aminosyresult (tabell 3). Det ble utført det samme på enda et 6-brønns brett, men med tilsatt autofagi-inhibitor BafilomycinA1 (100 nM, fortynnet fra 160µM-stock løst i EtOH) som vist i tabell 4. Cellene ble inkubert med de ulike løsningene i 4 timer. Deretter ble de vasket med PBS og høstet. Proteinkonsentrasjon ble målt og beregnet for å deretter utføre Western blot for deteksjon av CXCL10 og STING.

Tabell 3: Oppsett for 6-brønnsbrett til forsøk med arginin/aminosyresult. Det ble tilsatt HBSS (som har full aminosyresult), 100%, 90% og 50% med argininsult. Fullmedium (FM/DEMEM) ble benyttet som ustimulert kontroll.

Fullmedium (DMEM)	HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	100 % Argininsult
90 % Argininsult	50 % Argininsult	

Tabell 4: Oppsett 6-brunnsbrett for forsøk med arginin/aminosyresult, i tillegg til hemming av autofagi med BafilomycinA1. Det ble tilsatt HBSS (som har full aminosyresult), 100%, 90% og 50% med argininsult. Fullmedium (FM/DEMEM) ble benyttet som ustimulert kontroll.

Fullmedium (DMEM) + BafilomycinA1	HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) + BafilomycinA1	100 % Arginin/aminosyresult + BafilomycinA1
90 % Arginin/aminosyresult + BafilomycinA1	50 % Arginin/aminosyresult + BafilomycinA1	

2.6 Stimulering med TBK1-inhibitor

Det ble sådd ut 300 000 celler/brønn i 6-brønns brett, og ble inkubert til de hadde nådd minst 80% konfluensitet til dagen etter. Cellene ble deretter behandlet med TBK1-inhibitorene MRT67307 (20 mM, Sigma) og BX795 (20 mM, Axon Medchem), hvor begge inhibitorene inhiberer fosforylering av TBK1. Cyclohexamid (CHX 1mg/ml løst i EtOH) inhiberer proteinsyntesen, og ble benyttet som kontroll. BX og MRT ble fortynnet til 1µM og 5µM, og CHX ble fortynnet til 1µM. De fortynnede inhibitorene ble deretter tilsatt i tilhørende brønner (tabell 5), og inkubert ved 37°C (5% CO₂) i 6 timer.

Tabell 5: Oppsett for 6-brunnsbrett for forsøk for TBK1-inhibering. Det ble tilsatt 1µM og 5µM av BX795 og MRT67307, og 10 µM av CHX. Fullmedium (FM/DMEM) ble benyttet som ustimulert kontroll.

Ustimulert – fullmedium (DMEM)	1 µM BX795	5 µM BX795
Cyclohexamide 10 µM	1 µM MRT67307	5 µM MRT67307

Cellene ble deretter vasket med PBS og høstet. Det ble målt og beregnet proteinkonsentrasjon, og utført Western blot på for å detektere CXCL10 i cellene.

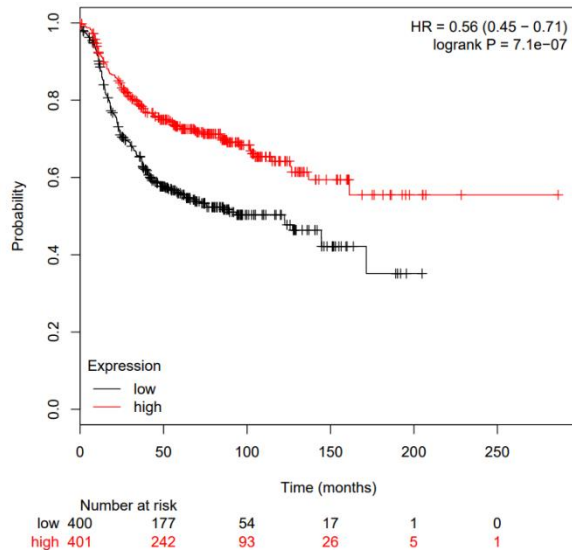
3 Resultater

3.1 Lavt nivå av CXCL10-mRNA i brystkreftbiopsier korrelerer med dårlig prognose hos brystkreftpasienter

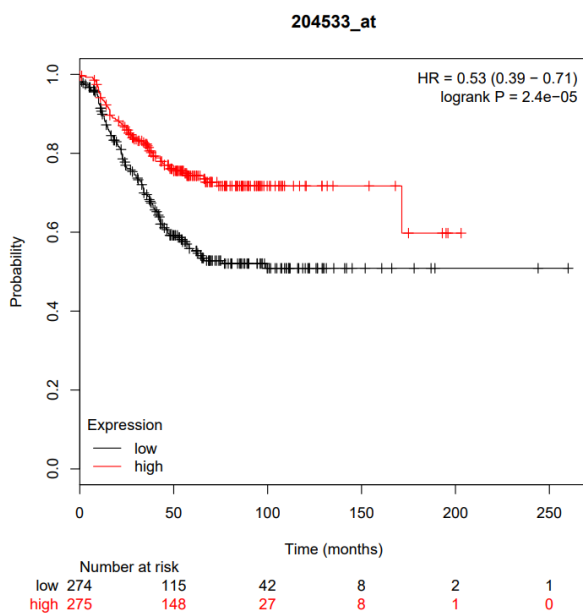
For det første er det interessant å vite hvilken rolle type I IFN-induserte proteinet CXCL10 spiller hos brystkreftpasienter. En riktig regulert IFN-respons er generelt viktig for å kunne opprettholde kroppens immunsystem. I denne analysen ble CXCL10 mRNA-nivå brukt som markør for type I IFN-responsen.

For å se om mRNA-nivå av CXCL10 i krefttumorer har betydning for brystkreftpasienter, ble det utført Kaplan Meier-plot både for østrogenreseptor (ER)-negative (figur 8) og progesteron (PR)-negative (figur 9) brystkreftpasienter. Kaplan Meier plot ble laget via <http://kmplot.com> og viser sammenhengen mellom mRNA-nivå av CXCL10 i tumorbiopsier og sannsynligheten for overlevelse uten tilbakefall (relapse free survival), for eksempel ved spredning til lymfeknuter.

Resultatene vises for 801 østrogenreseptor (ER)-negative og 540 progesteronreseptor (PR)-negative brystkreftpasienter. Mengden uttrykk av CXCL10 er splittet på medianen, der de med lavt uttrykt CXCL10 ligger under medianen, mens de med høyt uttrykt CXCL10 ligger over medianen. Resultatene tyder klart på at økt nivå av CXCL10-mRNA gir bedre prognose uten tilbakefall for både ER- og PR-negative brystkreftpasienter.



Figur 8: mRNA-nivå av CXCL10 påvirker tydelig overlevelse uten tilbakefall (relaps free survival) hos ER-negative brystkreftpasienter. CXCL10-uttrykk over medianen korrelerer med en større sannsynlighet for overlevelse uten tilbakefall, i motsetning til CXCL10-uttrykk under medianen, som gir en dårligere prognose slikt sett. Resultatet vises for 801 østrogenreseptor-negative brystkreftpasienter, der mRNA-nivå av CXCL10 har blitt målt og resultatet er splittet på medianen. Plottet er laget ved hjelp av <http://kmplot.com>.



Figur 9: mRNA-nivå av CXCL10 påvirker tydelig overlevelse uten tilbakefall hos PR-negative brystkreftpasienter. Uttrykk av CXCL10 over medianen korrelerer med en bedre prognose enn ved uttrykk under medianen. Resultatene er basert på 549 progesteronreseptor-negative brystkreftpasienter, der mRNA-nivå av CXCL10 har blitt målt og resultatet er splittet på medianen. Plottet er laget ved hjelp av <http://kmplot.com>.

Plottene for ER-negative og PR-negative brystkreftpasienter viser tydelig at økt mRNA-nivå av CXCL10 har stor betydning for sannsynligheten for overlevelse uten tilbakefall for disse pasientene, og det er dermed et dårlig tegn å ha lavt nivå av CXCL10 mRNA i tumorbiopsi.

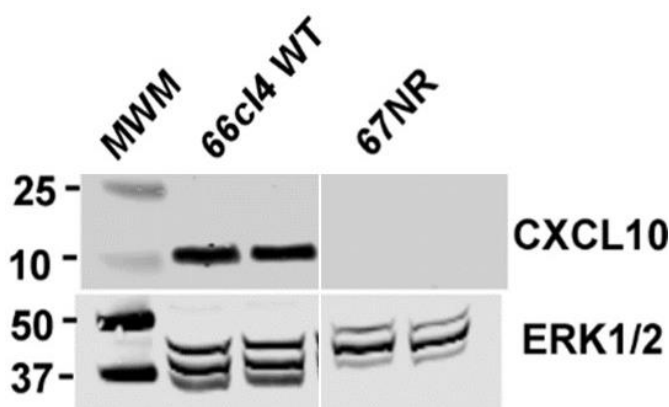
3.2 Nivå av CXCL10 i 66cl4 villtype og 67NR, samt utskilt mengde i cellemedium

Utifra resultatene over vet vi at mRNA-nivå av CXCL10 i tumor er viktig for prognosen hos ER- og PR-negative brystkreftpasienter. Transkriptomdata (tabell 1) har allerede påvist at det er betydelig økt nivå av CXCL10-transkript hos 66cl4-celler og 67NR-celler i kultur.

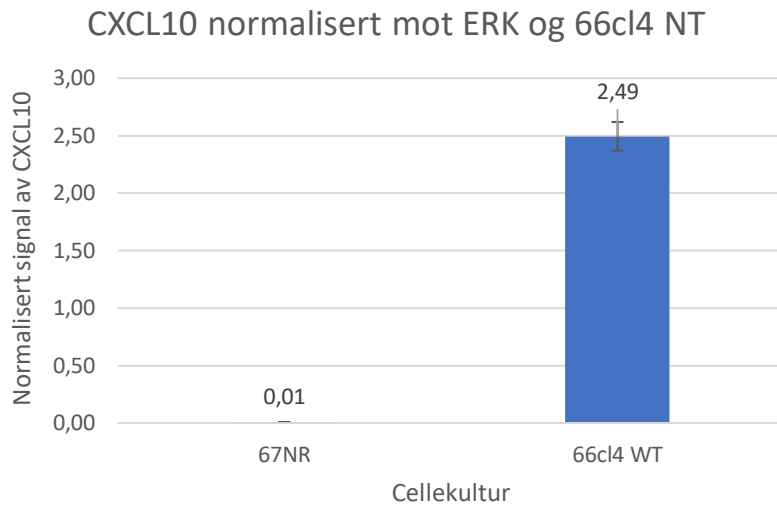
Spørsmålet var om denne forskjellen i CXCL10-nivå bare er i cellene, eller om det er betydelig forskjell i utskilt mengde også.

For å påvise denne forskjellen ble det utført Western blot for cellelinjene 66cl4 og 67NR, hvor det ble benyttet antistoff for å detektere CXCL10 i proteinlysate fra cellene (figur 10). Blot-resultatene viste en tydelig økt intracellulær CXCL10-nivå hos 66cl4-cellene sammenlignet med 67NR. Disse resultatene ble kvantifisert for å kunne visualisere resultatet med tall, som vist i figur 11. Mengden CXCL10 i 66cl4-cellene ble kvantifisert til 2,49, i motsetning til 67NR som bare hadde 0,01, noe som kan betegnes som negativ verdi.

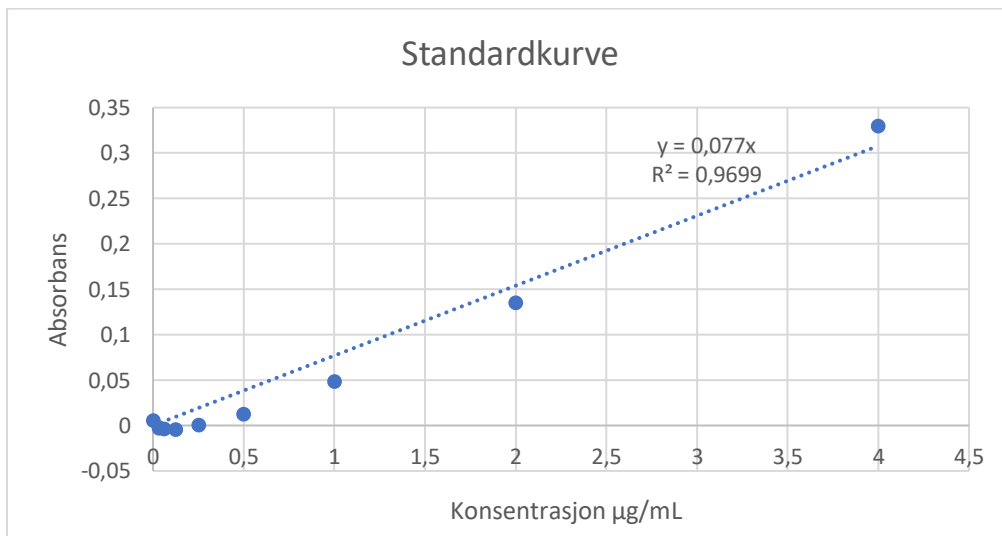
For å studere utskilt mengde CXCL10 ble det utført ELISA. Det ble først etablert en standardkurve, hvor det ble benyttet 8 standarder med ulike kjente konsentrasjoner av rekombinant CXCL10. Denne analysen viste at det var et lineært samsvar mellom mengde CXCL10 og avlest signal fra 0,5 µg/mL til 4µg/mL (figur 12). Cellemediet for 66cl4- og 67NR-cellene ble samlet etter 3 dager, hvor konfluensiteten var på 80%, og analysert for CXCL10 (figur 13). Standardkurven ble benyttet til å beregne CXCL10-konsentrasjonen for prøvene. Resultatene viser en signifikant økt mengde av CXCL10-protein som er skilt ut i cellemediet for 66cl4, i motsetning til 67NR som ikke har skilt ut noe.



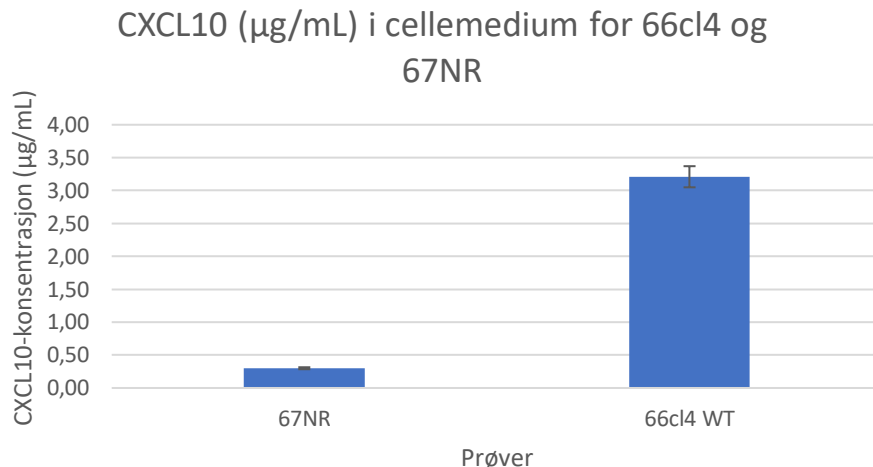
Figur 10: Det er en betydelig økt i mengde CXCL10 hos 66cl4-celler (villtype), i motsetning til 67NR-celler. Det er utført to paralleller av hver prøve, hvor det er tilsatt 50µg proteinlysate i hver brønn. Det er benyttet primærantistoff for deteksjon av CXCL10 og ERK ½. ERK ½ er detektert for å kunne vurdere mengde tilsatt prøve, noe som ser ganske likt ut i dette forsøket.



Figur 11: 66cl4 villtype (WT) inneholder et mye høyere nivå av CXCL10 enn 67NR, noe som bekrefter Western blot-resultatet. Kvantifiseringen er utført for 2-4 paralleller av hver prøve ved hjelp av Excel. De er normalisert mot mengden CXCL10 i 66cl4 non-target (NT) og mengde ERK ½ i cellene. Diagrammet viser i tillegg 5% standardavvik for parallellene.



Figur 12: Det er linearitet for CXCL10 i cellemedium for konsentrasjoner mellom 0,5 $\mu\text{g/ml}$ og 4 $\mu\text{g/ml}$. Det ble benyttet 8 standarder med konsentrasjoner fra 4 $\mu\text{g/mL}$ med 2-folds fortyninger, i tillegg til blank



Figur 13: Mengden utskilt CXCL10 i cellemediet for 66cl4 (villtype) er klart mer enn for 67NR. Cellene har stått i cellemediet i 3 dager før mediet ble analysert, med 80% konfluensitet. Blank-verdi er trukket fra resultatene og alle verdier er innenfor standardkurven, utenom 67NR som er under det lineære området. Diagrammet viser resultater for 3-5 paralleller for hver prøve, og 5% standardavvik for parallellene.

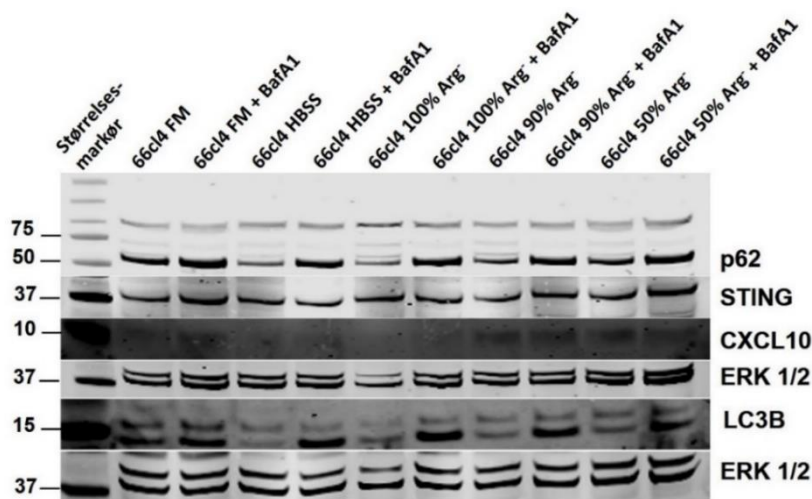
Nivåen av CXCL10 er betydelig høyere hos 66cl4 (villtype) enn hos 67NR, både intracellulært og utskilt. Resultatene fra Western blot samsvarer ganske bra med ELISA resultatene, og type I IFN-respons i form av CXCL10 ser ut til å være kraftig aktivert for 66cl4 villtype. Transkriptomdata (tabell 1) viser dog at 66cl4-cellene har betydelig redusert mengde CXCL10 når de danner tumor, noe som kan ha flere årsaker, og som det blir forsøkt nærmere på videre. Etter negative resultater for 67NR, blir denne cellelinjen benyttet som negativ kontroll for videre forsøk.

3.3 Argininsult og hemming av autofagi påvirker CXCL10-produksjonen

I følge transkriptomdataene (tabell 1) er det mye arginase i 66cl4 tumorer, og nesten ingenting i cellekultur. Arginase er et enzym som bryter ned arginin, noe som kan antas å forårsake sult i tumoren. Dataene viser også at 66cl4 i cellekultur og i tumor ikke har genet som koder for arginin (ASS1), dette er en essensiell aminosyre for brysttumor, som kun produseres av lunge og nyrer. Da transkriptomdataene i tillegg viser at det er mye CXCL10 i 66cl4 cellekultur, men nesten ingenting i tumorer, kan det antas at det er sammenheng mellom tilgang på næringsstoffer og type I IFN-respons. I tidligere studier er det vist at aminosyresult gir økt autofagi, dermed er det også fordelaktig å se om autofagi har sammenheng med type I IFN-respons.

En mulig årsak til tydelig redusert type I IFN-respons i 66cl4-tumorer, kan være mangel på tilgang til tilstrekkelig med næringsstoffer i tumoren, eller på grunn av den økte mengden

arginase. For å se om CXCL10 nivå i cellene blir påvirket av tilgjengelighet på protein, ble det utført et forsøk på å sulte 66cl4-cellene for arginin og alle aminosyrer (figur 14). Cellene ble inkubert i HBSS for full aminosyresult, og i 100%, 90% og 50% argininsultet medium, i tillegg til fullmedium som normal kontroll. Det ble i tillegg utført et forsøk på å hemme autofagien ved å tilsette BafA1. Cellene ble sultet og hemmet med BafA1 i 4 timer, ved 80% konfluensitet. Det ble utført Western blot for å detektere p62, STING, CXCL10 og LC3B, hvor 50µg proteinlysats ble tilsatt i hver brønn.



Figur 14: p62 (62 kDa) og CXCL10 (10 kDa) er redusert betydelig ved økende sult, i motsetning er de økt ved hemmet autofagi. Dette gjenspeiles også for STING (37 kDa), men ikke i like stor grad. LC3B-I (14 kDa) og LC3B-II (16 kDa) er tydelig redusert ved sult, og økt ved BafA1, hvor den lipiderte form (LC3B-II) er mest økt. Det er blitt benyttet antistoff for å detektere p62, CXCL10 og STING, hvor ERK ½ (37 kDa) er benyttet som kontroll på mengde tilsatt prøve. Det er tilsatt 50 µg proteinlysats i hver brønn, og ERK ½ viser ganske fin fordeling av mengden tilsatt prøve. Cellene i HBSS har full aminosyresult, mens de resterende har 50%, 90% og 100% argininsult. Cellene ble sultet og hemmet med BafA1 i 4 timer, ved 80% konfluensitet. Tilsvarende forsøk ble utført for 67NR, som ga negative resultater for CXCL10 og STING, dette stemmer med at den er benyttet som en negativ kontroll.

Resultatene viser tydelig redusert mengde av CXCL10 ved økende argininsult og ved fullstendig aminosyresult. Ved tilsats av BafA1 vises det klart at mengden CXCL10 øker. Resultatene bekrefter også redusert p62 ved økende sult, og sterkt økt ved hemmet autofagi. STING viser også svak økning ved inhibering av autofagi, og reduksjon ved sult, men ikke like tydelig som p62 og CXCL10. LC3B-I og LC3B-II reduseres kraftig ved økende sult, men av LC3B-variantene er LC3B-II er mest økt ved hemmet autofagi. ERK1/2 gjenspeiler at det er tilsatt ganske like mengder prøver. Samme forsøk ble utført for 67NR celler, som en negativ kontroll, noe som ga vellykket resultat.

Både p62 og CXCL10 er klart redusert ved sult, noe som bekrefter at sult regulerer type I IFN-responsen. Argininsult og full aminosyresult gir like resultater, noe som tyder på at

arginin spiller en viktig rolle ved sult. Ved å hemme autofagi er det også klare resultater på at nivåene av både p62 og CXCL10 er økt, noe som forteller at autofagi også regulerer type I IFN-respons i form av CXCL10-produksjon. LC3B er en autofagimarkør, og benyttes i dette forsøket som en kontroll. Den lipiderte formen (LC3B-II) sitter på fagofor membranen, og ved hemmet autofagi bør mengden LC3B-II være økt, noe som det er ved dette forsøket, dermed regnes BafA1-forsøket som vellykket.

3.4 Påvisning av knockdown (nedslag) av p62

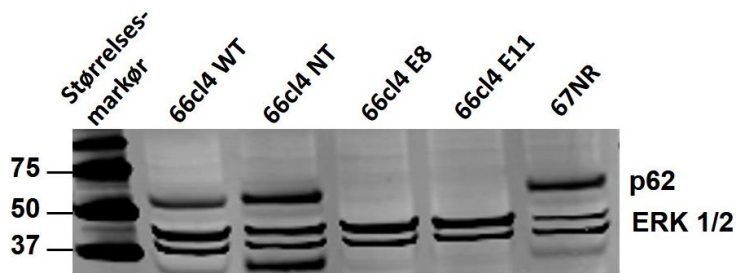
Utifra tidligere resultater kan det bekreftes at 66cl4 produserer mer CXCL10 enn 67NR. Det har også blitt vist at det er en klar sammenheng mellom aminosyresult og type I IFN-respons, samtidig som det er en sammenheng mellom autofagi og type I IFN-respons. p62 er et protein som er koblet til autofagiprosessen, og det er dermed relevant å se om p62 regulerer type I IFN-responsen. Forskningsgruppen (Bjørkøy-gruppen) har tidligere utført p62 knockdown (nedslag av p62) i visse 66cl4-celler ved å slå av transkripsjonen av SQSTM1 (gen som koder for p62) med CRISPR/Cas9-teknikk og viral transduksjon. Cellepopulasjonen 66cl4 non-target (NT) ble behandlet likt som klonene med p62-nedslag, men uten «target» på SQSTM1.

For å se om nedslag av p62 har fungert, og for å finne graden av p62-nedslaget ble det utført Western blot for p62-nedslåtte celleklonene E8 og E11. Antistoff mot p62 ble benyttet for å detektere proteinet (figur 15). Resultatene viser klart at nedslaget av p62 har fungert.

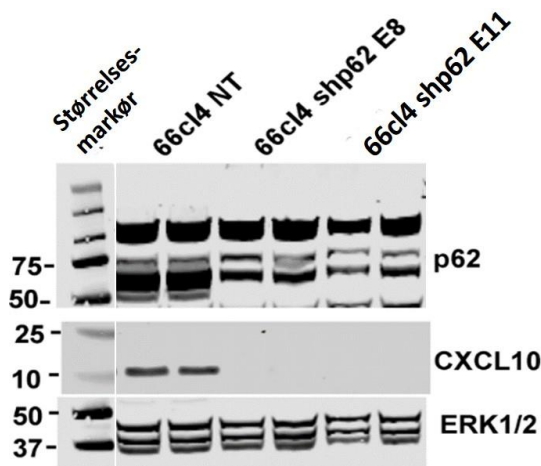
Kvantifisering av flere blot-paralleller av p62 hos de p62-nedslåtte cellene E8 og E11 gjorde det mulig å beregne %-nedslag. p62-nedslaget hos E8-cellene ble beregnet til 94,6%, mens hos E11-cellene var det 99,6% p62-nedslag.

Sammen med Western blot i figur 10 ble p62-nedslåtte celleklonene E8 og E11 også analysert for å detektere CXCL10, dette vises i figur 16. Western blot av E8 og E11 for CXCL10 viste klart ingen produksjon av proteinet, i motsetning til non-target som har økt produksjon.

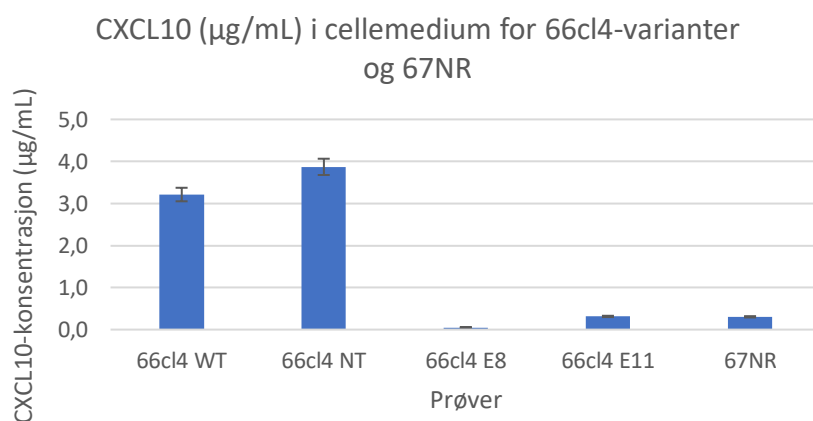
For å se på mengden utskilt CXCL10, ble det også utført ELISA (figur 17), hvor cellene hadde stått i cellemedium i 3 dager med 80% konfluensitet. ELISA-resultatene for klonene E8 og E11 er innenfor standardkurven, men under det lineære området.



Figur 15: Det er betydelig redusert produksjon av p62 hos E8- og E11-klonene. De p62-negslåtte klonene 66cl4 E8 og 66cl4 E11 viser tydelig at det ikke er noe bånd for p62 (62 kDa). Ved kvantitering av mengde p62 av flere paralleller, ble det beregnet p62-nedslag på 94,6% for E8-varianten og 99,6% for E11-varianten. Kvantifisert mengde p62 ble normalisert mot non-target (NT) og ERK ½. Det ble benyttet antistoff mot p62 for å detektere proteinet. 50µg proteinlysat er tilsatt, og mengden ERK ½ viser jevn fordeling av mengde prøve.



Figur 16: Ved nedslag av p62 er det klart ingen CXCL10-produksjon. E8 og E11 klonene har ingen bånd for CXCL10 (10 kDa), noe som tyder sterkt på at p62 regulerer type I IFN-respons (CXCL10). Det er blitt benyttet antistoff mot CXCL10 for å detektere proteinet, og det er tilsatt 50µg proteinekstrakt i hver brønn med to paralleller for hver prøve. Nivå av ERK ½ er ganske jevnt, og viser en jevn fordeling av mengde prøve.



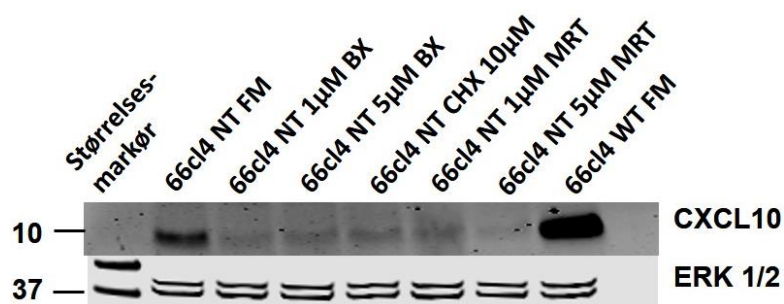
Figur 17: Det er tydelig redusert mengde utskilt CXCL10 i cellediet for p62-nedslåtte 66cl4-kloner E8 og E11. Sammenlignet med villtypen og non-target, ligger utskilt nivå av CXCL10 for E8 og E11 omtrent likt med negativ kontroll 67NR. Cellene har stått i cellediet i 3 dager før mediet ble analysert, med 80% konfluensitet. Blank-verdi er trukket fra resultatene, og alle verdier er innenfor standardkurven, utenom 66cl4 E8, E11 og 67NR, som er under det lineære området. Diagrammet viser resultater for 3-5 paralleller for hver prøve, og 5% standardavvik for parallellene.

p62-nedslag har fungert hos klonene E8 og E11. Både resultatene fra Western blot og Elisa viser kraftig redusert produksjon av CXCL10 hos E8- og E11-klonene. Dette tyder på at de har veldig lave verdier av utskilt CXCL10, omtrent på likt nivå med negativ kontroll, 67NR. Forsøket regnes som vellykket da p62-nedslag har fungert, og det kan konkluderes med at ved undertrykkelse av p62 induseres det ikke type I IFN-respons.

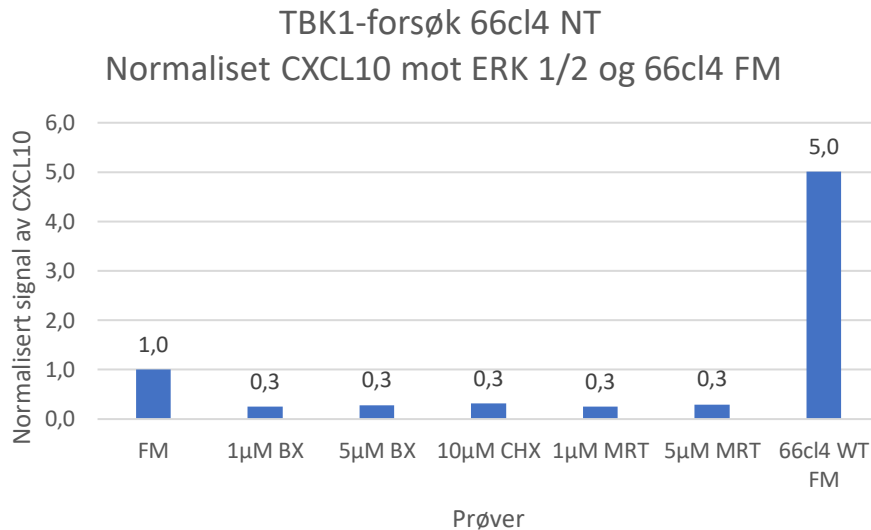
3.5 Kjemisk hemmer av TBK1 reduserer den konstante syntesen av CXCL10 i 66cl4 cellene

Forsøkene hittil bekrefter at type I IFN-respons hos metastaserende 66cl4-celler er regulert av p62, aminosyresyntese og autofagi. Da TBK1 er et av de nærmeste trinnene i signalveien til type I IFN-responsen, er det relevant å se om TBK1 regulerer produksjon av CXCL10.

Det ble utført forsøk på å hemme TBK1 ved hjelp av ulike konsentrasjoner av inhibitorer av typen BX795 og MRT67307. Cyclohexamide ble benyttet som kontroll for inhibering av proteinsyntesen. Cellene ble inkubert med inhibitorer i 6 timer, og hadde 80% konfluensitet. Det ble utført Western blot med antistoff for deteksjon av CXCL10, hvor 50µg proteinlysate ble tilsatt i hver brønn (figur 18). Western blot resultatene ble kvantifisert for å kunne visualisere resultatet med tall (figur 19). Resultatene viser at uttrykket av CXCL10 er kraftig redusert ved inhibert TBK1 og proteinsyntese. Det ser ut til at alle benyttede konsentrasjoner av inhibitorene fungerer likt. Sammenlignet med fullmedium (satt til verdi av 1), ligger de inhiberte cellene på CXCL10-verdi 0,3. Dette er igjen mye lavere enn verdien for villtypen.



Figur 18: CXCL10 (10 kDa) forsvinner nesten ved hemming av TBK1 hos 66cl4 non-target-celler. Cellene ble inkubert med inhibitorer i 6 timer, og hadde 80% konfluensitet. Det er tilsatt 50 µg proteinlysate i hver brønn. 66cl4 WT FM er benyttet som en positiv kontroll for CXCL10. Det er blitt benyttet antistoff mot CXCL10 for å detektere proteinet. ERK 1/2 viser lik fordeling av prøvemengde.



Figur 19: Det er tydelig redusert mengde CXCL10 hos TBK1-inhiberte non-target celler. Alle TBK1-hemmerene inhiberer CXCL10-produksjonen like mye, og gir likt resultat. Cyclohexamide er en proteinsynteseinhibitor, og ble benyttet som kontroll. CXCL10-dannelsen hemmes like mye ved inhibering av TBK1 som proteinsyntesen. Resultatene er normalisert mot nivå av ERK 1/2 i NT- cellene FM.

Funnene tyder klart på at TBK1 er meget viktig for indusering av type I IFN-responsen og dannelsen av CXCL10. Produksjonen av CXCL10 ble også like mye redusert med behandling av Cyclohexamide (CHX), som blokkerer ny-syntese av proteiner. Dette viser på at CXCL10-dannelsen hemmes like mye ved inhibering av TBK1 som ved inhibering av hele proteinsyntesen.

4 Diskusjon

I de fleste studier på type I IFN-responsen er det immunceller som har blitt forsket på. I dette prosjektet har vi tatt utgangspunkt i epiteliale brystkreftceller av metastaserende type.

Etttersom det oftest er de epiteliale cellene som er infiserte ved virale/bakterielle sykdommer, og ikke immuncellene, er det relevant å studere nettopp disse cellene. Ved å studere epiteliale kreftceller blir resultatene ekstra interessante, i tillegg til at de gir en ny innfallsvinkel.

Transkriptomdata som vi fikk utlevert av Bjørkøy-gruppen har gitt prosjektet er godt utgangspunkt. Dataene viser klart at 66cl4 metastaserende brystkreftceller har en mye høyere mRNA nivå av CXCL10 og resten av type I IFN-responsen i forhold til 67NR-cellene. I tillegg viser transkriptomdata at hos 66cl4-cellene er det en kraftig dempet type I IFN-respons i tumor sammenlignet med i kultur. Dataene viser også at mRNA- og protein-nivå av arginase 1 er betydelig høyere i 66cl4- enn i 67NR-tumorene. Ut ifra disse funnene ble det gjort ulike analyser av type I IFN-responsen i form av CXCL10-produksjon, ved å endre på betingelser og forhold i cellekulturene.

Problemstillingen for bachelorprosjektet ble formulert til «*Er autofagi involvert i type I interferon-responsen?*»

Det var først og fremst ønskelig å vite hvilken betydning CXCL10 og type I IFN-respons har for brystkreftpasienter, og det ble derfor laget Kaplan Meier-plot. Det ble funnet ut at økt mengde mRNA av CXCL10 ser ut til å ha betydning for østrogenreseptor- og progesteronreseptor-negative brystkreftpasienter, da dette korrelerer med større sannsynlighet for overlevelse uten tilbakefall av kreft.

Utifra transkriptomdata kan man se at det er betydelig økt nivå av CXCL10-mRNA hos 66cl4-celler, i motsetning til 67NR-celler i cellekultur. Det var ønskelig å se om denne økningen også var på proteinnivå, både i cellene og utskilt mengde. For å påvise denne økningen ble det utført Western blot og ELISA for disse cellelinjene. Resultatene bekreftet transkriptomdata, og viste tydelig at 67NR nesten ikke har noe uttrykk av CXCL10, i motsetning til 66cl4 villtype som både inneholder og skiller ut mye av proteinet. Etter det resultatene viste, ble 67NR videre benyttet som en negativ kontroll for CXCL10.

Videre var spørsmålet om hvorfor 66cl4-cellene i tumor har et så betydelig redusert mRNA-nivå av CXCL10. Flere studier har vist at aminosyresult hos celler gir økt autofagi.

Transkriptomdata viser at det ikke er produksjon av arginin i verken cellekultur eller i tumor av 66cl4-celler, noe som gjør arginin til en essensiell aminosyre for brystkreftceller. I tillegg

viser dataene at det er betydelig økt mengde arginase i tumor. Da arginase er et enzym som spalter arginin, kan dette tyde på at tumoren er påvirket av argininsult. I prosjektet ble det derfor utført forsøk på å sulte 66cl4-cellekultur for arginin og alle aminosyrer. Siden mangel på næringsstoffer og autofagi har sammenheng, ble det også utført forsøk på å hemme autofagien hos cellene. Forsøket resulterte i at type I IFN-responsen, ved dannelse av CXCL10, ble kraftig redusert ved økende arginin- og aminosyresult, noe som også gjenspeilte seg for p62 og STING. Ved å hemme autofagien ble det tydelig at verken p62 eller STING ble brutt ned, noe som resulterte i økt mengde på grunn av akkumulering, hvilket ga økt nivå av CXCL10. Dette viser klart at aminosyresult og autofagi regulerer type I IFN-responsen hos 66cl4-cellene.

Når det påvises at autofagi regulerer type I IFN-responsen, er det relevant å se om p62 har sammenheng med dette. CXCL10-nivået ble målt i 66cl4-klonene E8 og E11, da disse har nedslått p62 gjennom CRISPR/Cas9-teknikk. Det viste seg at disse cellene nesten ikke danner noe CXCL10. Kontroll på p62-nedslaget var vellykket, og nedslaget ble beregnet til å være 94,6% for E8-klonen og 99,6% for E11-klonen. Det kan konkluderes med at ved undertrykkelse av p62 induseres det ikke type I IFN-respons i 66cl4-celler.

Når man beveger seg lenger ned i signalveien for type I IFN-responsen, kan en se at TBK1 er nært knyttet til induksjon av type I IFN-respons. For å se hvorvidt dette proteinet er viktig for produksjon av CXCL10, ble det utført et forsøk på å hemme TBK1 med ulike inhibitorer. Dette resulterte i at dannelsen av CXCL10 ble like betydelig redusert for alle typer av inhibitorer, og det kan konkluderes at TBK1 regulerer type I IFN-respons.

Ut ifra resultatene kan problemstillingen besvares med at det bekreftes at autofagi er involvert i type I IFN-responsen. p62 og aminosyresult, som begge har sammenheng med autofagiprosessen, ser ut til å regulere produksjon av CXCL10, og dermed type I-IFN-respons. Siden vi i dette bachelorprosjektet har hatt begrenset med tid, så har visse forsøk kun blitt gjort en gang, men likevel viser forsøkene tydelige resultater. For å sikre resultatene, bør det gjøres flere paralleller. Prosedyrene og metodene som er benyttet er veletablerte, og resultatene kan ses på som preliminare funn.

Resultatene kan forhåpentligvis benyttes til en bedre forståelse for hva som gjør tumorer immunologisk aktive (varme) eller inaktive (kalde), og muligheten til å aktivere de inaktive ved for eksempel å kunne aktivere type I IFN-responsen. Vi vet nå at p62,

aminosyre/argininsult, autofagi og TBK1 påvirker type I IFN-responsen, noe som kan gjøre disse betydningsfulle for eventuell fremtidig immunterapibehandling av brystkreftpasienter.

I dag benyttes for eksempel T-lymfocyt-assosiert protein 4 (CTLA-4) og programmert celledød-protein 1 (PD-1) til immunterapibehandling. CTLA-4 og PD-1 er reseptorer som negativt regulerer T-celleaktivering og ved immunterapibehandling inhiberes disse for å øke T-celleaktivering i tumor. En økt T-celleaktivering har vist seg å være gunstig for kroppens anti-tumorrespons og tros kunne være gunstig ved kreftbehandling (36). Det er tenkelig at inhibering av autofagi skulle kunne benyttes på et lignende vis, da autofagien tydelig påvirker CXCL10-nivået, som i sin tur påvirker tilkalling av aktiverte T-celler til tumor. Man skulle også kunne øke transkripsjonen av p62 for å få mer CXCL10, men i så fall i kombinasjon med inhibering av autofagi, som at p62 ellers vil bli brutt ned med autofagi.

Ved forsøket med arginin/aminosyresult var det tydelig at dette påvirket nivå av CXCL10, altså type I IFN-responsen. En studie viser at arginase kommer fra nøytrofile granulocytter i tumoren. Det finnes i granula hos cellene, og blir skilt ut ved aktivering. Arginase bryter ned arginin og gjør at tumoren ender opp i argininsult, noe som kan føre til undertrykkelse av T-celler (37). Dette gjør at man kan anta at nivå av arginase, også nøytrofile granulocytter, indirekte påvirker type I IFN-responsen i disse krefttumorene. Det pågår akkurat nå et antall forsøk basert på denne teori, på pasienter med kreft eller andre sykdommer. I noen av disse forsøkene behandles pasienter med arginase-inhibitor, og i noen med arginase for å bryte ned arginin (38). Med tanke på våre resultater hadde det for 66cl4-celler vært mest optimalt å behandle med arginase-inhibitor eller tilførsel av arginin til pasient/tumor.

Utifra resultatene kan hypotesene for prosjektet bekreftes. Det er en vesentlig økning av CXCL10 på proteinnivå hos 66cl4-cellene sammenlignet med 67NR. Den tydelige økningen av CXCL10 hos 66cl4-celler i kultur, i motsetning til i tumor, skyldes akkumulering av komplekser av STING og p62. Den tydelige dempingen av type I IFN-responsen i tumor skyldes sult av kreftceller, noe som øker autofagi som fjerner STING-SQSTM1-komplekset, og dermed skur av type I IFN-responsen. Dette viser at økt type I IFN-respons er avhengig av redusert autofagi.

Konklusjonen for prosjektet er at autofagi regulerer type I IFN-responsen hos metastaserende 66cl4-brystkreftceller. Type I IFN-respons hos kreftceller er viktig for å kunne aktivere kroppens immunsystem, slik at kreftceller kan bekjempes. Det viser seg at 66cl4-cellene i tumor ikke har denne responsen, noe som etter flere forsøk vises å være på grunn av

aminosyresult og økt autofagi. Å kunne behandle disse tumorene med medikament som kan aktivere type I IFN-responsen kan antas gi en bedre prognose for pasienter med brystkreft. Samtidig er det viktig å unngå uavbrutt IFN-signalering, da dette assosieres med immunsuppresjon, og har blitt koblet til dårlig respons på gentoksiske og radiotoksiske behandlinger (26).

5 Referanser

1. team TACSmaec. Early History og Cancer2018 08.04.2019]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.htm>.
2. Global cancer statistics for the most common cancers: World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research; [Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>.
3. Cancer in Norway 2017- Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway08.04.2019]. Available from: <https://www.kreftregisteret.no/globalassets/cancer-in-norway/2017/cin-2017.pdf>.
4. Kreftbehandling: Kreftforeningen; [Available from: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/kreftbehandling/>.
5. Cancer [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21878/def-item/A4620/>.
6. Chia H. Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. Nature Education. 2008;1(33).
7. Xuning Emily Guo BN, Aram Sandaldjian Modrek, Wen-Hwa Lee. Targeting Tumor Suppressor Networks for Cancer Therapeutics. Current Drug Targets. 2014;15(1).
8. Catherine Joyce AK. Cancer, Tumor-Suppressor Genes2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532243/>.
9. The Genetics of Cancer [updated Approved by the Cancer.Net Editorial Board, 03/2018. Available from: <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/genetics/genetics-cancer>.
10. Douglas Hanahan RA. The Hallmarks of Cancer. CellPress. 2000;100(1):57-70.
11. Douglas Hanahan RAW. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. CellPress. 2011;144(5):646-74.
12. Hanahan D. Rethinking the war on cancer. The Lancet. 2014;383(9916):558-63.
13. Bertelsen BI. Patologi, Menneskets sykdommer. 2 ed. Oslo: Gyldendal Akademisk; 2011.
14. Claire M. Vajdic MTvL. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. International Journal of Cancer. 2009;125(8).
15. Michele W. L. Teng JBS, Catherine M. Koebel, Robert D. Schreiber, Mark J. Smyth. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. Journal of Leukocyte Biology. 2008;84(4).
16. Ryungsa Kim ME, Kazuaki Tanabe. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology. 2007;121(1).
17. Mark J.Smyth GPD, Robert D.Schreiber. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. Advances in Immunology. 2006;90:1-50.
18. Rebecca A. Burrell NM, Jiri Bartek & Charles Swanton. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. Nature. 2013;501:338-45.
19. Neckmann U. On the Identification of Features of Aggressive Breast Cancer Development [Thesis for the Degree of Philosophiae Doctor]: Norwegian University of Science and Technology; 2018.
20. Lieke L van der Woude MG, Altuna Halilović, Carl Figdor. Migrating into the tumor: a roadmap for T cells. 2017;3(11).
21. Geir Bjørkøy TL, Andreas Brech, Heidi Outzen, Maria Perander, Aud Øvervatn, Harald Stenmark, Terje Johansen. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. 2005;171(4).

22. Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene*. 2012;31:4397.
23. Yukiko Kabeya NM, Takashi Ueno, Akitsugu Yamamoto, Takayoshi Kirisako, Takeshi Noda, Eiki Kominami, Yoshinori Ohsumi, Tamotsu Yoshimori. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO Journal*. 2000.
24. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*. 2004;117(13):2805-12.
25. Beth Levine JY. Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115(10).
26. Boya P, Codogno P, Rodriguez-Muela N. Autophagy in stem cells: repair, remodelling and metabolic reprogramming. *Development*. 2018;145(4):dev146506.
27. Duale Ahmeda EC. Role of cellular metabolism in regulating type I interferon responses: Implications for tumour immunology and treatment. 2017;409.
28. Kun Chen JL, Xuetao Cao. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. 2017;83.
29. Mercedes B. Fuertes S-RW, Byron Burnett, Yang-Xin Fu, Thomas F. Gajewski. Type I IFN response and innate immune sensing of cancer. 2013;34(2):67-73.
30. Terje Høyvarde Clausen TL, Pauline Isakson, Kim D. Finley, Kenneth Bowitz Larsen, Andreas Brech, Aud Øvervatn, Harald Stenmark, Geir Bjørkøy, Anne Simonsen & Terje Johansen. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. 2010;6(3):330-44.
31. Wei Jing Liu LY, Wei Fang Huang, Lin Jie Guo, Zi Gan Xu, Hong Luan Wu, Chen Yang and Hua Feng Liu. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. 2016;21(29).
32. UniProtKB - Q86WV6 (STING_HUMAN) [Internet]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q86WV6>.
33. Mingli Liu SG, Jacqueline M.Hibbert, Vidhan Jain, Neeru Singh, Nana O.Wilson, Jonathan K.Stiles. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2011;22(3):121-30.
34. Jennifer H. Dufour MD, Michael T. Liu, Josephine H. Leung, Thomas E. Lane and Andrew D. Luster. IFN- γ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *The Journal of Immunology*. 2002;168(7).
35. Halse J. ELISA. Store Norske Leksikon2018.
36. Judith A. Seidel AO, Kenji Kabashima. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Frontiers in Oncology*. 2018;8(86).
37. Kelly L. Singel BHS. Neutrophils in the tumor microenvironment: trying to heal the wound that cannot heal. *Immunological Reviews*. 2016;273(1).
38. . Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Arginase&cntry=&state=&city=&dist=>.

6 Vedlegg

Vedlegg 1: Reagensliste

Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (PBS), D8537, Sigma

Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM), Bio Whittaker®, Lonza, lot nr: 0000704255.

L-glutamin, DE-17-605E, Lonza

Penicillin/Streptomycin GIBCO, Invitrogen, 15070-063

Trypsin, BE17-161E

10xTBS (Tris-Buffered Saline, Bjørkøyvariant) – 24,2 g trisbase (121,1 g/mol), 80 g NaCl (58,4 g/mol), 800 mL deionisert vann. pH justeres til 7,6 med HCl.

1xTBS bruksløsning (Bjørkøyvariant) – 10xTBS fortynnet i destillert vann, forhold 1:10

TBST (Tris-Buffered Saline Tween, Bjørkøyvariant) – 100 ml 10xTBS, 900 ml destillert vann, 10 ml 10% Tween.

Odyssey Blocking Buffer (TBS), produsent: LI-COR, lot nr: Y2843, Part no: 927-50000,

BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, kontrollnummer: 64237033, Cat# 500-0006,

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), lot nr: RNBG1810, Sigma

Ditiotreitol (DTT), 1 M (0,1 M i buffer), #A3668.0050, Applichem.

Protease inhibitor cocktail (PI), 25x (1x i buffer), Sigma Aldrich, #11873580001

Phosphatase inhibitor cocktail 2 (PIC2), 250x (5x i buffer), Sigma Aldrich, #P5726

Phosphatase inhibitor cocktail 3 (PIC3), 250x (5x i buffer), Sigma Aldrich, # P0044

10 μ M TrisHCl – 1 M TrisHCl fortynnet i destillert vann, forhold 1:100

1xMES bruksløsning – 20xMES fortynnet i destillert vann, forhold 1:10.

MES SDS Running Buffer (20x), Cat. no: NP0002-02, Invitrogen NuPage®

LDS Sample Buffer (4x), ref: NP0007, Invitrogen NuPage®

12% Bis-Tris Gel, ref. nr: NP0342BOX, Invitrogen NuPage®

4-12% Bis-Tris Gel, ref. nr: NP0322BOX, Invitrogen NuPage®

Odyssey Molecular weight marker, Li-Cor, 928-40000

Odyssey sec. Ab red channel (680 RD), IRDye®, Li-Cor

- Goat anti-mouse, 926-68070

Odyssey sec. Ab green channel (800 CW), IRDye®, Li-Cor

- Goat anti-rabbit, 926-32211
- Donkey anti-GP, 926-32411

Primary Ab, Cell Signaling Technology

- LC3B (D11) XP(R), Rabbit mAb, ref: 05/18, 38685
- P44/42 MAPK (ERK1/2) 3A7, mouse mAb, ref: 09/18, 91075

Rb pAb to IP10 (CXCL10), ABCAM, ab9938, lot nr: GR9225-43

pAb anti-sting/TMEM173, Novus, NBP2-244683SS

SQSTM1/p62 (D-3), mouse monoclonal IgG₁, Santa Cruz Biotechnology, sc-28359

CHX (Cyclohexamide) 1 mg/ml løst i EtOH, 25.05.2011, K.P, V.M

MRT67307, CAS 1190378-57-4, Sigma

BX 795, Axon Medchem

BafA1, 160µM løst i EtOH, #54645, Cell signalling Technology.

TMB Substrate Set, cat: 421101, BioSite

Streptavidin HRP B, R&D Systems, part. no: 893975

10% BSA, 10/17

Capture antibody mouse IP-10 (CXCL10), R&D Systems DuoSet, part. no: 840734

Detection antibody mouse IP-10 (CXCL10), R&D Systems DuoSet, part. no: 840735

2N H₂SO₄ ELISA Stop Solution, VWR Chemicals, cas:7664-93-9

Vaskeløsning ELISA: PBS (Phosphate Buffered Salin (10 tabletter løst i 1 L milliQ-vann),
VWR Life Science, lot nr:0015-195) + 10 % Tween

