



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Tumorheterogenitet og autofagiflux

Tumor heterogeneity and autophagy flux

Av / by

Aiza Ashfaq, Mika Othélo Landmark, Cathrine Ringsrud

Trondheim, 2021

Forord

Denne bacheloroppgaven ble gjennomført som avsluttende prosjekt av bioingeniørutdanningen ved NTNU Trondheim våren 2021. Oppgaven ble gitt av Senter for molekylær inflammasjonsforskning (CEMIR) ved fakultet for medisin og helsevitenskap, NTNU, og laboratoriearbeidet gjennomført i laboratoriene til Institutt for bioingeniørfag og CEMIR ved St. Olav's Hospital.

Vi vil med dette sende en stor takk til våre fantastiske veiledere, PhD-stipendiat Apsana Lamsal og senioringeniør Sonja Andersen. Vi setter stor pris på deres hjelp med både faglige og praktiske spørsmål, og uendelige entusiasme. Det har vært et svært spennende prosjekt, og en glede å få arbeide med dere.

Trondheim, 27. mai 2021



Aiza Ashfaq



Mika Othélo Landmark



Cathrine Ringsrud

Sammendrag

Kreftsvulster er kompliserte nettverk bestående av flere celletyper med ulike funksjoner og mekanismer, noe som beskrives som heterogenitet. I dette prosjektet ble autofagiflux, morfologi og veksthastighet til kloner av den murine brystkreftcellelinjen 66cl4 undersøkt for heterogenitet. Autofagi spiller en viktig rolle i utviklingen av kreft, og manipulering av autofagi kan være en mulig behandlingsstrategi for ulike tumorer. Det er derfor interessant å se på hvordan særlig autofagiflux varierer mellom cellene.

Cellekulturer av den opprinnelige 66cl4-cellelinjen og fem utvalgte kloner ble behandlet med autofagiinhibitoren BafA1 i forskjellige tidsintervaller, før det ble laget proteinekstrakter av cellene. Western Blott med indirekte immunfarging ble så benyttet for å separere og visualisere proteinbåndene for autofagiproteinene LC3B og p62, samt «husholdsproteinene» ERK 1/2. Membranene ble så scannet, og proteinbåndene kvantitert. Cellekulturene ble i tillegg målt og telt, og vurdert visuelt i mikroskop.

Klonene og den opprinnelige cellelinjen viste tydelige forskjeller i morfologi og veksthastighet, der to kloner skilte seg ut ved at den ene vokste raskere og den andre saktere enn den opprinnelige cellelinjen. Det ble også observert ulikheter i klonenes metabolisme, hvor særlig én forårsaket større pH-endring i vekstmediet.

De basale nivåene av p62 og LC3B normalisert mot ERK 1/2 varierte sterkt mellom hvert eksperiment, men det finnes likevel holdepunkter for at noen av klonene skiller seg fra den opprinnelige cellelinjen. Autofagiflux i klonene kunne ikke normalisert mot ERK 1/2, da det ble påvist at ERK 1/2 er betydelig påvirket av BafA1. De ikke normaliserte resultatene indikerer at autofagiflux er noe ulik hos 66cl4 og klonene. På grunn av store avvik er det ikke mulig å påvise signifikante forskjeller mellom noen av klonene og den opprinnelige cellelinjen, men internt mellom enkelte av klonene synes det å være klare ulikheter.

Ut fra disse observasjonene og resultatene er dette en indikasjon på at det er heterogenitet innad i 66cl4-cellelinjen for vekstrate, morfologi og autofagi, og det ville vært svært interessant med videre undersøkelser for både å vurdere dette nærmere og se om de andre klonene etablert fra cellelinjen viser lignende tendenser.

Abstract

Cancerous tumours are complicated networks consisting of multiple types of cells with various functions and mechanisms, which is described as heterogeneity. In this project, autophagy flux, morphology, and growth rate for clones of the murine breast cancer cell line 66cl4 were examined for heterogeneity. Autophagy plays an important role in the development of cancer, and manipulation of autophagy mechanisms may be a viable treatment option for some tumours. It is therefore interesting to look at how autophagy flux varies between the clones and original cell line.

Cell cultures from the original 66cl4 cell line and five chosen clones were treated with autophagy inhibitor BafA1 for set time intervals, before protein concentrates were made from the cells. Western Blot with indirect immunostaining were then used to separate and visualise the protein bands of autophagy proteins LC3B and p62, as well as «household proteins» ERK 1/2. Membranes were then scanned, and the protein bands quantified. Additionally, the cell cultures were measured and counted, and inspected visually in a microscope.

The clones and the original cell line showed clear differences in morphology and growth rates, where two of the clones particularly stood out with one having a higher growth rate and another having a slower growth rate. Differences were also observed in the clones' metabolism, where one clone caused a noticeable change in growth medium pH.

Base levels of p62 and LC3B normalised against ERK1/2 were highly inconsistent between experiments, and even though it is not possible to be sure, there is still reason to conclude that some of the clones are different from the original cell line. Autophagy flux in the cells could not be normalised against ERK1/2, as it is proven that ERK1/2 is strongly affected by the BafA1 treatment. The non-normalised results indicates that autophagy flux is somewhat different between clones and 66cl4. Due to big discrepancies between parallels, it is not possible to detect significant differences between some of the clones and the original cell line, but between a few of the singular clones some differences are detectable.

Based on these observations and results, there are indications of heterogeneity within the 66cl4 cell line for parameters such as growth rate, morphology and autophagy, and further investigation into this, and whether the rest of the clones shows the same tendencies, would be very interesting.

Forkortelser

AKT	Protein kinase B
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis (amyotrofisk lateralsklerose)
AMP	Adenosine monophosphate (adenosinmonofosfat)
AMPK	Adenosine monophosphate activated protein kinase (adenosinmonofosfat-aktivert kinase)
ATG	Autophagy-related gene (autofagirelaterte gener)
ATP	Adenosine triphosphate (adenosintrifosfat)
BafA1	Bafilomycin A1
Bcl-2	B-cell lymfoma
Bif-1	Bax-interacting factor-1
BNIP3	Bcl-2/adenovirus E2 B19 kDa protein-interacting protein 3
CAFs	Cancer associated fibroblasts
DUBs	Deubiquitinating enzymes (de-ubiquiterende enzymer)
EMT	Epithelial Mesenchymal Transistion
ER	Endoplasmic reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
FIP200	Focal adhesion kinase family interacting protein of 200kD
GDP	Guanosine diphosphate (guanosindifosfat)
GTP	Guanosine triphosphate (guanosindintrifosfat)
HIF	Hypoxia-inducible transcription factor
IRE1	Inositol requiring kinase 1
IRS1	Insulin reseptor substrat 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
mAb	Monoklonalt antistoff
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
p62	Sequestosome-1
pAb	Polyklonalt antistoff
PAS	Pre-autophagosomal structure (pre-autofagosomal struktur)
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1 (fosfoinositid-avhengig protein kinase- 1)

PE	Phosphatidylethanolamine (fosfatidyletanolamin)
PERK	Protein kinase R-like ER kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (fosfatidylinositol-3-fosfat kinase)
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate (fosfatidylinositol-3-fosfat)
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat)
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5- triphosphate (fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfat)
PKB	Protein kinase B
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAG	Recombination-activating genes
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RHEB	Ras homolg enriched in brain
ROS	reactive oxygen species
RTK	Receptor tyrosin kinase
SQSTM1	Sequestosome-1
SLE	Systemisk lupus erythematosus
TP53	Tumor suppressor protein 53
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor-associated factor-2
TSC	Tuberous sclerosis
Ub	Ubiquitin
ULK1	Unc-51-like kinase
UPR	Unfolded protein response (unfoldet protein respons)
UPS	Ubiquitin-Proteasome System
UVRAG	UV irradiation resistance-associated gene
V-ATPase	Vacuolar ATPase
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A (Vaskulær endothelial vekstfaktor-A)
VPS15	Vacuolar protein sorting 15
VPS34	Vacuolar protein sorting 34
WIPI	WD-repeat PtdIns(3)P effector protein

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	III
Forkortelser.....	IV
Innholdsfortegnelse.....	VI
1 Introduksjon.....	1
1.1 Cellulær homeostase.....	1
1.1.1 Ubiquitin proteasom-systemet (UPS).....	1
1.1.2 Autofagi.....	3
1.2 Makroautofagi.....	4
1.2.1 Initiering av autofagi.....	5
1.2.2 Nukleering.....	5
1.2.3 Fagoforforlengelse, -lukking og -modning.....	5
1.2.4 Fusjon og degradering.....	6
1.2.5 Selektiv og ikke-selektiv autofagi.....	6
1.2.6 Måling av autofagi.....	7
1.2.7 Regulering av autofagi.....	7
1.2.8 Dysregulert autofagi.....	10
1.3 Kreft.....	11
1.3.1 Mutasjoner som kan føre til kreft.....	12
1.3.2 Hallmarks.....	12
1.3.3 Tumorheterogenitet.....	16
1.3.4 Autofagi og kreft.....	17
1.4 Mål med oppgaven.....	19
2 Material og metoder.....	21
2.1 Cellelinjene.....	21
2.2 Metoder.....	21
2.2.1 Celledyrkning og subkultivering.....	21
2.2.2 Behandling med Bafilomycin A1.....	22
2.2.3 Høsting av celler og tillaging av proteinekstrakter.....	22
2.2.4 Prøveopparbeiding og proteinkonsentrasjonsmåling.....	22
2.2.5 Gel-elektroforese.....	23
2.2.6 Overføring av protein til membran.....	23
2.2.7 Farging av Western Blott.....	24

2.2.8	Avlesning og tolkning av Western Blott	25
3	Resultater.....	26
3.1	Morfologi og veksthastighet.....	26
3.2	Basale nivå av p62 og LC3B	30
3.2.1	p62.....	30
3.2.2	LC3B	31
3.3	Autofagiflux	33
3.3.1	66cl4	33
3.3.2	Klon 2.....	35
3.3.3	Klon 4.....	36
3.3.4	Klon 5.....	37
3.3.5	Klon 6.....	38
3.3.6	Klon 8.....	39
3.3.7	Sammenligning av omsetningen til de ulike klonene	40
4	Diskusjon.....	41
5	Konklusjon	50
6	Referanser.....	51
7	Vedlegg	58

1 Introduksjon

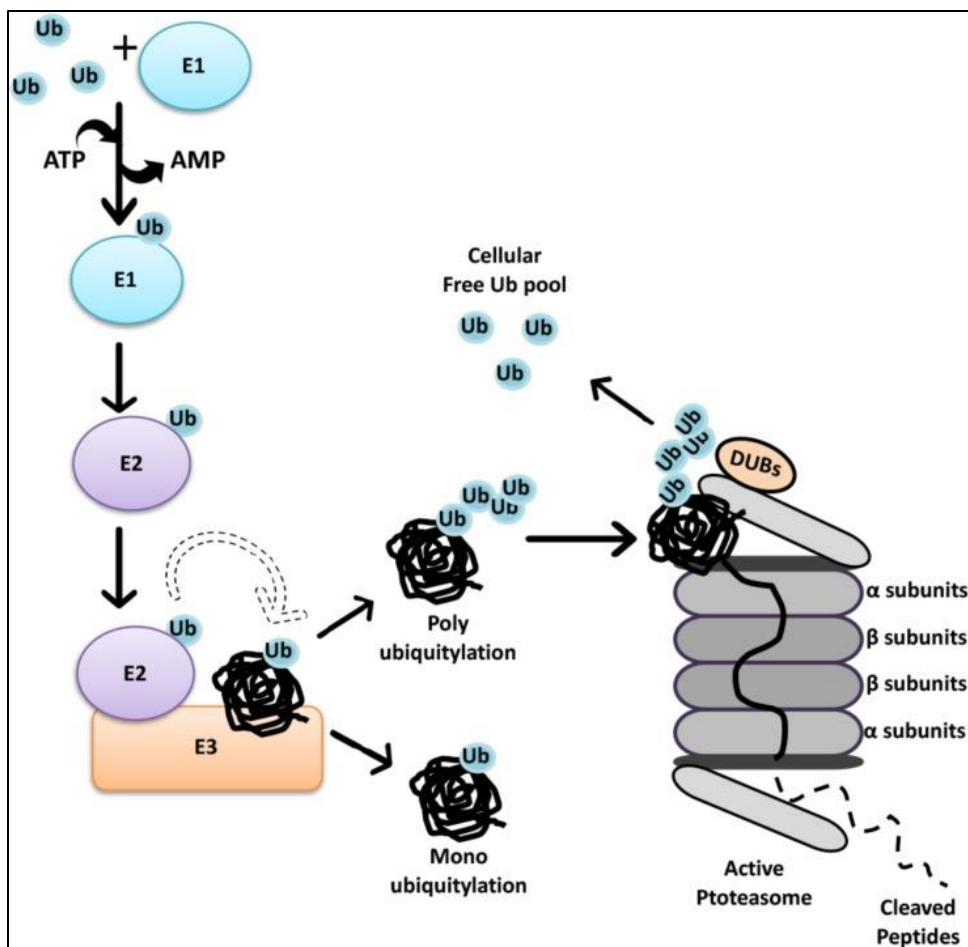
1.1 Cellulær homeostase

Homeostase refererer til kroppens evne til å fysiologisk regulere sin indre balanse, og sørge for et stabilt indre miljø. Leveren, bukspyttkjertelen, nyrene og hjernen, hovedsakelig hypotalamus, hjelper til med å opprettholde kroppens homeostase (A. Abozendah et al., 2018). På et cellulært nivå er det viktig å ha en balanse mellom prosesser som bygger opp forbindelser (anabolisme) og prosesser som bryter ned (katabolisme). Dette er nøye regulert og vil variere i respons på tilgang på næring, hormoner, cytokiner, vekstfaktorer, stress osv. (VanPutte, Regan and Russo, 2014). Blant cellenes organeller, er mitokondriene og lysosomene svært viktige for å opprettholde homeostasen (Wong et al., 2019). Mitokondriene er en sentral organelle i cellens metabolisme, da flere viktige biokjemiske prosesser finner sted her, som oksidativ fosforylering og Krebs syklus (Mishra and Chan, 2016). Lysosomer inneholder mange ulike hydrolaser, som gjør lysosomene til det primære katabolske senteret i cellene (Mony, Benjamin and O'Rourke, 2016).

De to viktigste katabolske prosesser i eukaryote celler kalles ubiquitin proteasom-systemet (UPS) og autofagi ("selvspising"). På generell basis vil proteiner som har kort levetid eller er feilfoldete og løselige bli fjernet ved UPS, mens proteiner som har lang levetid eller har dannet uløselige proteinaggregater blir eliminert via autofagi (Groll and Huber, 2003) (Klionsky, 2007). I tillegg er autofagi ikke begrenset til proteiner, og inkluderer også fjerningen av bl.a. overflødige eller skadede intracellulære organeller, bakterier og virus (Yuk, Yoshimori and Jo, 2012).

1.1.1 Ubiquitin proteasom-systemet (UPS)

Proteiner som har kort levetid, som er feilfoldet eller skadet på annet vis, vil bli brutt ned via UPS. For at dette skal skje, må de merkes slik at de blir gjenkjent av komponentene i UPS-systemet. Merkingen gjøres med et protein som heter ubiquitin. En skjematisk fremstilling av UPS-systemet er vist i figur 1.1.



Figur 1.1: Forenklet fremstilling av ubiquitin proteasom-systemet (UPS). Ubiquitin (Ub) festes til målproteiner ved hjelp av ulike enzymer (E1, E2 og E3). De-ubiquitinerende enzymer (DUBs) kan fjerne ubiquitin fra målproteinene når disse brytes ned i proteasomene. Hentet fra: (Kocaturk and Gozuacik, 2018)

Ubiquitin (Ub) er et lite protein på 76 aminosyrer som kan festes til andre proteiner i en prosess kalt ubiquitinering. Hovedfunksjonen for ubiquitin er å merke proteiner for nedbryting (Swatek and Komander, 2016). Merkingen av målprotein skjer i flere trinn. Prosessen er skissert i Figur 1, og starter med at Ub festes til en cysteingrouppe hos et aktiverende enzym E1 gjennom en ATP-avhengig prosess, og er dermed aktivert. Det aktiverte ubiquitin blir deretter overført til et ubiquitin-konjugerende enzym E2. Ub-E2-komplekset blir videre bundet til en ubiquitin ligase, E3, som binder både målproteinet og Ub-E2-komplekset og overfører Ub til en lysingruppe på målproteinet. Dette kan gjøres mange ganger, til proteinet blir multi-ubiquitinert og kan lettere gjenkjennes av proteasomet. Når flere Ub blir koblet til hverandre, skjer dette på lysingrunder hos Ub selv, og Ub-kjedene som dannes kan ha ulike lengde og ulike forgreninger. Når multi-merkede målproteiner kommer i kontakt med et proteasom, vil dette gjenkjenne Ub, og frakte målproteinet inn i hulrommet til proteasomet hvor det foldes ut og brytes ned til peptider. Ub som var benyttet i merkingen blir sluppet fri ved hjelp av de-ubiquitinerende enzymer (DUBs) slik at de kan benyttes på nytt ved nye ubiquitineringer (Zhang *et al.*, 2013).

1.1.2 Autofagi

Autofagi er en katabolsk prosess som spiller en viktig rolle i balansering av cellulær homeostase, metabolisme og vekstregulering (Chang, 2020). Ordet “autofagi” kommer fra gresk og betyr “selvspising”. Dette ordet ble første gang brukt i 1963 av Christian de Duve, mannen som oppdaget lysosomene på 50-tallet og som var den første som beskrev hvordan lysosomer er involvert i autofagi (Klionsky, 2008).

Autofagi degraderer ulikt innhold i cytoplasma, som for eksempel organeller, feilfoldede/-aggregerte proteiner og patogener. Ved hjelp av autofagi kan cellene overleve stress-situasjoner som mangel på ernæring, hypoksi, skade på organeller og infeksjoner ved å fjerne ting som er farlig for cellene samt å resirkulere nedbrytningsproduktene som aminosyrer, fettsyrer, karbohydrater og nukleotider (Verma *et al.*, 2021). Defekter i autofagi er koblet til utvikling av en rekke sykdommer som inkluderer neurodegenerering (Alzheimer, Parkinson, amyotrofisk lateralsklerose ALS), muskel- og hjertesykdommer og infeksjon, samt aldringsprosessen (Chang, 2020). I tillegg viser mange studier at autofagi er viktig ved kreftsykdom; se for eksempel review-artikkel av Eileen White *et al.* fra 2015 (White, Mehnert and Chan, 2015). Autofagi og kreft vil bli omtalt nærmere i kapittel 1.3.4.

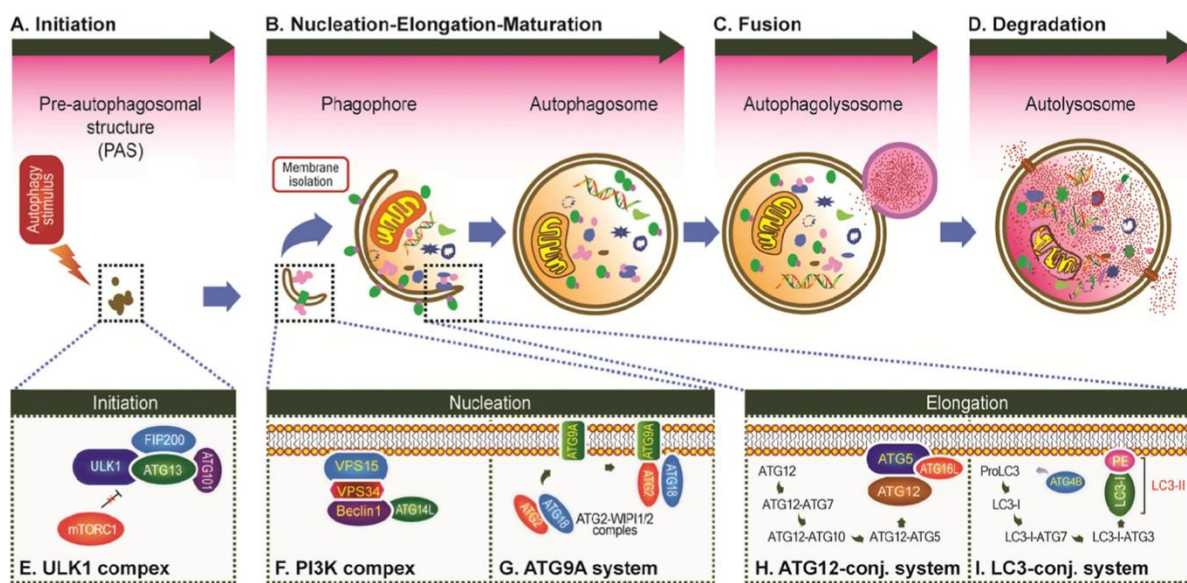
Tre forskjellige typer autofagi, basert på forskjellige mekanismer for å styre cytoplasmisk innhold i lysosomene for proteolytisk nedbrytning, har blitt beskrevet:

- Makroautofagi: En prosess avhengig av at det dannes en struktur med dobbel membran, kalt autofagosom (Parzych and Klionsky, 2014). Autofagosomet fanger de cellulære komponentene og proteinene som skal degraderes, og smelter sammen med et lysosom, noe som danner autolysosomet hvor degraderingen finner sted (Ravanan, Srikumar and Talwar, 2017).
- Microautofagi: Små deler av cytoplasma som skal degenereres kommer inn i lysosomet gjennom en invaginasjon eller deformasjon av den lysosomale membranen (Parzych and Klionsky, 2014).
- Chaperon-mediert autofagi: Mekanisme avhengig av chaperon-proteiner som gjenkjenner spesielle aminosyresekvenser hos proteiner i cytosol og binder seg til disse, og dirigerer proteinene til lysosomet. Her vil reseptorer på overflaten sammen med proteiner på innsiden av lysosomet sørge for at proteinene kommer seg gjennom lysosom-membranen, slik at de kan degraderes (Parzych and Klionsky, 2014).

1.2 Makroautofagi

Makroautofagi er den best beskrevne og den antatt mest viktige formen for autofagi, og heretter vil dette refereres til som "autofagi". Mekanismen av autofagi ble først studert i gjær, og det ble identifisert en hel familie av autofagirelaterte gener (*ATG*) (Tsukada and Ohsumi, 1993). Autofagimekanismen er høyt konservert fra gjær til pattedyr, og de aller fleste *ATG*-proteiner i gjær har en homolog hos pattedyr. Dette står godt oppsummert i en artikkel av Reggiori et al. 2002 (Reggiori and Klionsky, 2002).

Autofagi er en flertrinnsprosess som kan deles inn i initiering, nukleering, forlengelse, autofagosom-modning og degradering (se figur 1.2). Ved initiering av autofagi og nukleering dannes det en dobbelmembran som kalles fagofor. Under neste trinn utvides fagoforen rundt de autofagiske substratene, også kalt kargoet. Deretter lukkes fagoforen og danner et autofagosom som omslutter de autofagiske substratene (Verma *et al.*, 2021). Størrelse på autofagosomet varierer basert på organisme og kargo-type (Parzych and Klionsky, 2014). Autofagosomet fusjonerer med et lysosom og danner et autofagolysosom. Dette fører til degradering av kargoet sammen med den innerste membranen av autofagosomet ved hjelp av lysosomale hydrolaser. Biprodukter som aminosyrer, fettsyrer, karbohydrater og nukleotider blir frigjort for gjenbruk (Verma *et al.*, 2021).



Figur 1.2: Sjematisk oversikt over autofagi. A) Initiering: aktivering av ULK1 kompleks og rekruttering av ATG proteiner til PAS. B) Nukleering: rekruttering av ATG proteiner og lipider for å danne fagofor. Forlengelse: Utvidelse av fagofor rundt autofagiske substrater som skal degraderes. Modning: lukking av fagofor og dannelse av autofagosom som inneholder substrater. C) Fusjon: Fusjon av autofagosom med lysosom og dannelse av autofagolysosom. D) Degradering: degradering av substrater i autofagolysosom. For øvrige detaljer: se tekst som omhandler hvert enkelt trinn (Li, He and Ma, 2020).

De ulike trinnene i autofagiprosessen vil bli beskrevet i noe mer detalj i avsnittene under. Som nevnt tidligere er det mange av komponentene som er konservert mellom gjær og pattedyr, og i de tilfeller hvor navnene er ulike vil de her bli angitt med mammalske navn først og navnet fra gjær deretter.

1.2.1 Initiering av autofagi

Autofagi initieres ved dannelse av en fagofor. Hos gjær skjer dette i pre-autofagosomal struktur (PAS) (se figur 2) mens det hos pattedyr kan skje på områder av endoplasmatisk retikulum (ER) hvor det er anrikt med det fosforylerte lipidet fosfatidylinositol-3-fosfat (PI3P) (Axe et al., 2008). Dannelse av fagoforen er avhengig av kinaseaktiviteten til "unc-51-like kinase 1 complex" (ULK1). ULK1-komplekset består av ULK1/ATG1, ATG13, "focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD" (FIP200) og ATG101 (figur 2E). Aktiviteten til ULK1-komplekset reguleres i hovedsak av kinasene adenosinmonofosfat -aktivert kinase (AMPK) og "mammalian target of rapamycin" (mTOR). Ved god tilgang på næring, vil mTOR være aktiv og sammen med "regulatory-associated protein of mTOR" (RAPTOR) vil de assosiere med ULK1-komplekset og fosforylere både ULK1 og ATG13 (Hung et al., 2012). Dette fører til inaktivering av ULK1-komplekset, noe som hindrer autofagi. Ved mangel på næring, blir mTOR dissosiert fra ULK1-komplekset (Hung et al., 2012). Da blir ULK1 og ATG13 delvis defosforylert, og samtidig vil AMPK nå være aktiv og fosforylere ULK1-komplekset på andre fosforyleringssteder som øker aktiviteten av komplekset. Når ULK1-komplekset er aktivt, vil autofagi kunne initieres ved dannelse av fagofor (Li, He and Ma, 2020).

1.2.2 Nukleering

Dette trinnet initieres av fosfatidylinositol-3-fosfat kinase klasse III kompleks (PI3K-III-kompleks). PI3K-III-kompleks aktiveres av ULK1-komplekset, og består av Beclin-1, ATG14, "vacuolar protein sorting 34" (VPS34) og VPS15 (figur 1.2F). VPS34 er sentral i komplekset, ettersom dette er en PI3-kinase. Dette komplekset fosforylerer fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat (PIP2) til fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfat (PIP3)(Mizushima, Yoshimori and Ohsumi, 2011). PIP3 er viktig for nukleering og vekst av fagoforen (Ravanan, Srikumar and Talwar, 2017). Dannelse av PIP3 fører til rekruttering av andre autofagi-proteiner som "WD repeat protein interacting with phosphoinositides" (WIPI/ATG18) (figur 1.2G). WIPI danner kompleks med ATG2A/B, og disse blir rekruttert til fagofor-membranen av fosforylert ATG9A og danner et kompleks der (Li, He and Ma, 2020). ATG9A er et transmembranprotein som er svært viktig for transport av membranmateriale, for eksempel fra ER, plasma membran eller mitokondrie, til den voksende fagoforen (Mizushima, Yoshimori and Ohsumi, 2011) (Melia, Lystad and Simonsen, 2020).

1.2.3 Fagoforforlengelse, -lukking og -modning

Forlengelse av fagoforen involverer to ulike konjugeringssystemer. Det første inkluderer ATG12, som er et ubiquitin-lignende protein. ATG12 danner et konjugat med ATG5 ved hjelp av det E1-lignende enzymet ATG7 og det E2-lignende enzymet ATG10. Dette ATG12-ATG5-konjugatet reagerer videre med ATG16L1 og danner ATG12-ATG5-ATG16L-komplekset. Dette komplekset rekrutteres til den

voksende fagofor membranen av WIPI2 (Melia, Lystad and Simonsen, 2020) og bidrar med krumning av fagoforen (Ravanan, Srikumar and Talwar, 2017), (Mizushima, Yoshimori and Ohsumi, 2011). ATG12-ATG5-ATG16L-konjugatet er viktig for det andre konjugeringssystemet, som inneholder det ubiquitin-lignende proteinet "microtubule-associated protein light chain 3" (LC3) (Shibutani and Yoshimori, 2014).

LC3 lages først som en pro-form, og denne kløyves av en ATG4 protease slik at det dannes LC3-I. Så vil ATG12-komplekset, sammen med ATG7 (E1-lignende enzym) og ATG3 (E2-lignende), føre til en kovalent binding mellom fosfatidyletanolamin (PE) i fagofor membranen og LC3-I slik at det dannes LC3-PE (LC3-II) (Shibutani and Yoshimori, 2014). LC3-II kan brukes som en markør for å kvantitere autofagi, da mengde LC3-II korrelerer med antall autofagosomer. I prosessen med rekruttering av LC3 til fagoforen vokser denne, og til slutt vil den lukkes og danne et autofagosom (Ravanan, Srikumar and Talwar, 2017). Lukkingen involverer også ulike proteiner, som for eksempel "endosomal sorting complexes required for transport" (ESCRT) (Melia, Lystad and Simonsen, 2020).

1.2.4 Fusjon og degradering

Etter dannelsen av et modent autofagosom, vil dette kunne fusjonere med et lysosom og danne et autofagolysosom. Fusjoneringen involverer en rekke proteiner (Melia, Lystad and Simonsen, 2020) og ved sammensmeltingen vil den ytterste membranen av autofagosomet fusjonere med lysosom-membranen. De hydrolytiske enzymene i lysosomene vil så føre til nedbrytning av den innerste membranen i autofagosomet, og deretter degradering av innholdet, som proteiner og organeller. Dermed frigjøres aminosyrer, fettsyrer, karbohydrater og nukleotider for gjenbruk (Li, He and Ma, 2020) (Verma et al., 2021).

1.2.5 Selektiv og ikke-selektiv autofagi

Selektiv autofagi refererer til nedbrytning av spesifikke substrater som for eksempel proteinaggregater, mitokondrier, endoplasmatisk retikulum eller bakterielle patogener (Yin, Pascual and Klionsky, 2016). Substrater som skal nedbrytes gjenkjennes av spesifikke autofagireseptorer, som for eksempel "sequestosome-1" (SQSTM1), også kjent som p62 (Bjørkøy, Lamark and Johansen, 2006). Disse reseptorene gjenkjenner kargo som er merket for nedbrytning samtidig som de kan binde til LC3B-II som finnes på fagoforen. På denne måten vil reseptorene sørge for at det som skal brytes ned, og kun dette, blir levert til fagoforene (Pankiv et al., 2007).

Ikke-selektiv autofagi refererer til nedbrytning av tilfeldige, store deler av cytoplasma for å resirkulere næringsstoffer. Denne prosessen kan initieres i stress situasjoner som næringsstoffmangel eller metabolske forstyrrelser (Yin, Pascual and Klionsky, 2016).

1.2.6 Måling av autofagi

I denne oppgaven skal de autofagi-spesifikke proteinene p62 og LC3B benyttes til å undersøke autofagifluxen i cellene. p62 er et protein som ofte benyttes til å undersøke autofagiflux da det binder det som skal degraderes til autofagi-membranen (Larsen *et al.*, 2010). Ettersom p62 selv primært blir degradert ved autofagi, vil man ved å manipulere autofagien og se hvilken effekt dette har på forekomst av p62 kunne evaluere autofagiflux (Clarke *et al.*, 2015) (Bjørkøy *et al.*, 2005). LC3B er en del av konjugeringssystemet ATG8/LC3 som er viktig i modning av autofagosomet og forekomsten av den lipiderte varianten, LC3-II, er dermed en indikator på antall autofagosomer som finnes i cellene.

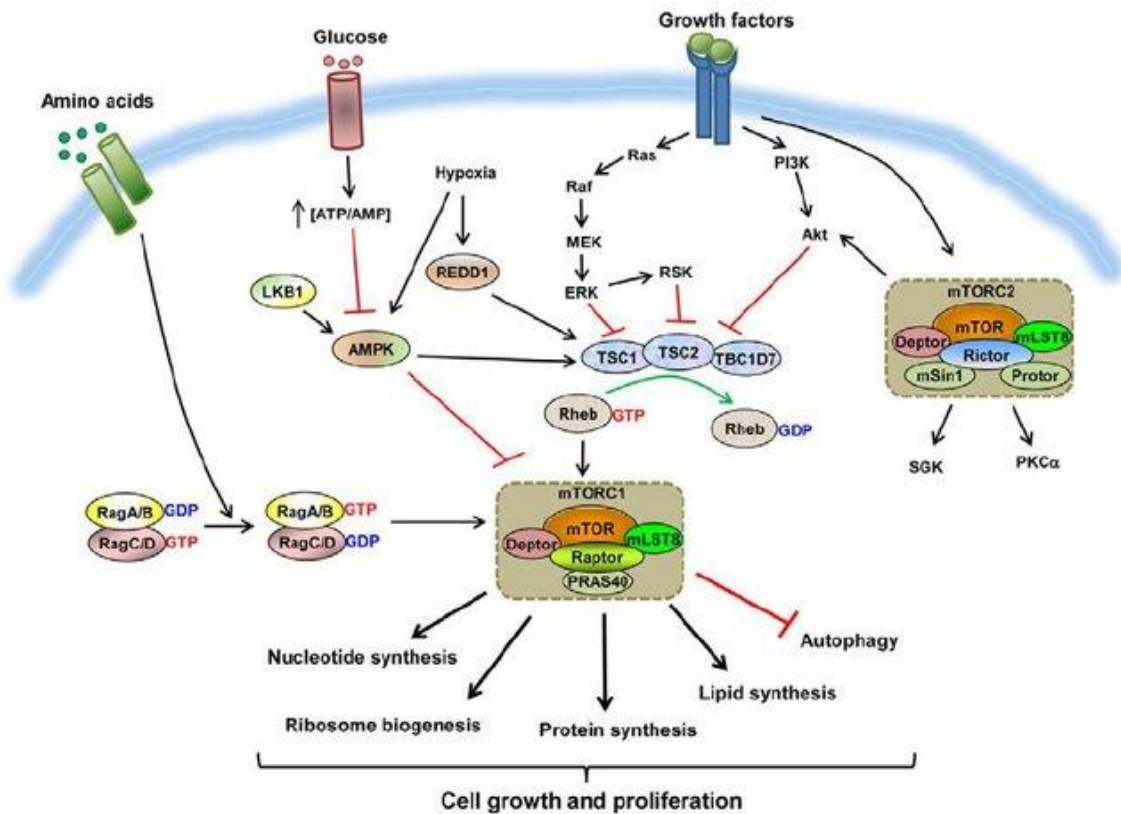
Bafilomycin A1 (BafA1) er en inhibitor av fusjonen av autofagosomet og lysosomet i autofagi-prosessen (Mauvezin *et al.*, 2015), og nøytraliserer pH i lysosomene slik at hydrolasene blir inaktive, ved å inhibere protonpumpen V-ATPase i lysosomene (Klionsky *et al.*, 2016). Grunnet denne funksjonen benyttes BafA1 til å inhibere autofagi-prosessen i cellene (Klionsky *et al.*, 2016) (Xie *et al.*, 2014). Opphopning av autofagi-reseptoren p62 og lipidert LC3B-II grunnet stanset autofagi ved behandling av BafA1 kan ikke i seg selv gi et fullstendig bilde på autofagien i cellene, men kan benyttes til å gi en pekepinne på hvordan autofagifluxen i cellene er (Pugsley, 2017). Jo større akkumuleringen av p62/LC3B-II er etter Baf-behandling, jo høyere kan man anta at autofagifluxen var i utgangspunktet.

1.2.7 Regulering av autofagi

Autofagi er involvert i cellevekst, overlevelse og utvikling, og er derfor en tett regulert prosess for å hindre ubalansert aktivering og cellulær skade (Chen and Klionsky, 2011). Autofagi reguleres av et komplekst nettverk som består av ulike signalveier. Stressforhold som mangel på næring, vekstfaktorer, hypoksi, patogen infeksjon og ER-stress utløser induksjon av autofagi (He and Klionsky, 2009).

1.2.7.1 Næringsstatus (mTOR, AMPK)

Autofagi er nøye regulert, og sentralt for hele prosessen er aktiviteten av ULK1-komplekset. Dette må være aktivt for at autofagi skal kunne initieres. To svært viktige regulatorer av dette komplekset er mTOR og AMPK (se figur 1.3) (He and Klionsky, 2009).



Figur 1.3: Oversikt over faktorerer som regulerer mTOR (Kim, Buel and Blenis, 2013).

mTOR

mTOR inngår i to ulike komplekser, mTOR kompleks 1 (mTORC1) og mTOR kompleks 2 (mTORC2). Det er mTORC1 som er viktig for regulering av autofagi (Ravanan, Srikumar and Talwar, 2017).

I situasjoner med god tilgang på næring og vekstfaktorer, vil mTOR være aktiv og cellen vil gjennomføre mange ulike anabolske prosesser, som for eksempel proteinsyntese. Aktiveringen av mTOR kan skje på en rekke måter, som illustrert i figur 1.3.

Vekstfaktorer, som insulin, kan binde seg til spesifikke reseptorer på plasmamembranen, (Wang and Zhang, 2019). Dette fører til aktivering av PI3-kinase (PI3K) som fosforylerer PIP2 til PIP3. Dette rekrutterer fosfoinositid-avhengig protein kinase-1 (PDK1) og protein kinase B (PKB), også kjent som AKT. AKT vil fosforylere og inhibere "tuberous sclerosis" (TSC) som forekommer i et kompleks og som i sin tur fører til at "Ras homolog enriched in brain" (RHEB) blir aktivert. RHEB binder guanosintrifosfat (GTP) og har GTPase-aktivitet og vil ved aktivering omdanne GTP til guanosindifosfat (GDP). RHEB med GTP er en negativ regulator av mTORC1, så når GTP omdannes til GDP forsvinner denne inhiberingen og mTORC1 blir aktivert. Vekstfaktor-mediert aktivering av mTOR kan også involvere andre signalveier enn PI3K/AKT, for eksempel Ras-Raf-MEK-ERK-veien. For detaljer, se for eksempel review-artikkel av Kim et al, 2013 (Kim, Buel and Blenis, 2013).

Aminosyrer er også viktige for å regulere aktiviteten av mTORC1 (se figur 1.3). Dette skjer via en prosess som involverer aktiviteten av ulike små GTPaser kalt “recombination-activating genes”; RAG (RAG A, B, C og D). Disse danner heterodimere, og ved god tilgang på aminosyrer vil RAG GTPase blir aktivert og rekrutterer mTORC1 til overflaten av lysosomet. Her vil andre viktige regulatorer, som for eksempel RHEB, være til stede slik at reguleringen av mTOR-aktivitet blir koordinert (Wang and Zhang, 2019).

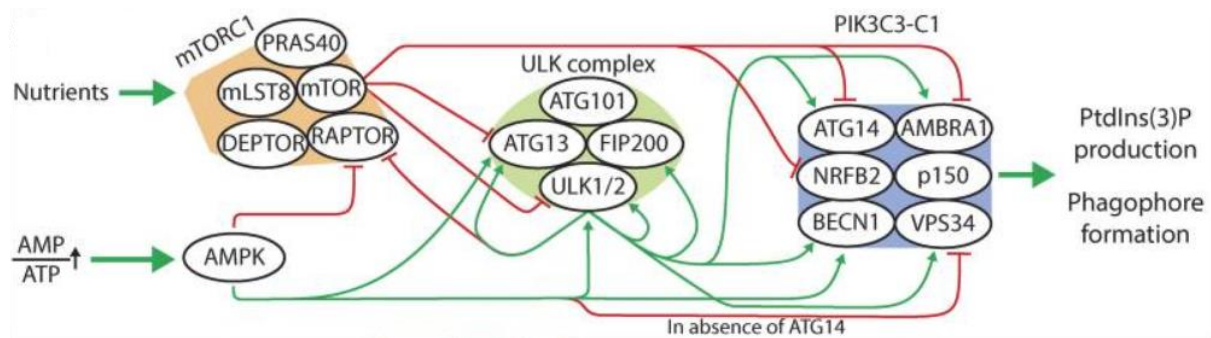
AMPK

Cellen kan også regulere mTORC1 gjennom aktiviteten av AMPK (He and Klionsky, 2009). Som vist i figur 1.3 vil tilgangen på glukose være avgjørende for ratio mellom ATP og AMP. Ved lav næringstilgang vil det dannes mer AMP og ratioen ATP/AMP reduseres. Dette vil aktivere AMPK, som så vil inhibere mTORC1 ved å fosforylere og inhibere RAPTOR, en del av mTORC1 (Kim, Buel and Blenis, 2013).

mTORC1, AMPK og autofagiregulering

I næringsrike situasjoner hvor cellene har nok tilgang på vekstfaktorer og/eller aminosyrer, blir mTORC1 aktivert. mTORC1 er en negativ regulator av autofagi. Aktivert mTORC1 fosforylerer og inaktiverer ULK1-komplekset (ULK1 og ATG13 fosforyleres) og PI3K-komplekset (NRFB2, ATG14 og AMBRA1), som vist i figur 1.4. Både ULK1-komplekset og PI3K-komplekset er nødvendige for at autofagosomet blir dannet, og inaktivering av disse kompleksene fører til inhibering av autofagi (Melia, Lystad and Simonsen, 2020). Ved mangel på vekstfaktorer og/eller aminosyrer, vil ikke signalveiene være aktiverte og resultatet er at mTORC1 inaktiveres. Inaktivering av mTORC1 aktiverer ULK1- og PI3K-komplekset, og autofagi initieres for å gjenopprette næringsbalansen i cellene (Wang and Zhang, 2019).

I tillegg til mTORC1, kan autofagi bli regulert av AMPK. AMPK er en positiv regulator av autofagi. Som nevnt over, kan redusert tilgang på energi øke konsentrasjon på AMP, og dermed vil AMPK bli aktivert. Aktivert AMPK kan regulere autofagi på to måter (se figur 1.4). Den ene måten er ved å inhibere mTORC1. Dette gjør at den negative reguleringen forsvinner og autofagi initieres. Den andre måten er gjennom direkte aktivering av ULK1-komplekset og PI3K-komplekset, noe som fører til induksjon av autofagi gjennom dannelse av autofagosom (Melia, Lystad and Simonsen, 2020).



Figur 1.4: Oversikt over hvordan mTORC1 og AMPK regulerer autofagi (Melia, Lystad and Simonsen, 2020).

1.2.7.2 Cellulært stress (hypoxia, ER-stress)

Autofagi spiller ikke bare en viktig rolle ved mangel på næring, men også når cellene blir utsatt for hypoksi. Oksygen er nødvendig for å opprettholde metabolske prosesser i cellen ved å danne ATP gjennom oksidativ fosforylering i mitokondriene (Russell, Yuan and Guan, 2014). Lav konsentrasjon av oksygen vil aktivere "hypoxia-inducible transcription factor" (HIF). HIF aktiverer autofagi gjennom "Bcl-2/adenovirus E2 B19 kDa protein-interacting protein 3" (BNIP3). BNIP3 konkurrerer med Beclin-1 for binding med Bcl-2 (Zhang *et al.*, 2008). Dette fører til frigjøring av Beclin-1, en viktig komponent av PI3K-komplekset, noe som induserer autofagi (Huang *et al.*, 2018). Den andre prosessen for å indusere autofagi under hypoksi er gjennom AMPK. Lave konsentrasjoner av oksygen reduserer ATP-nivået, som gir økt AMP og dermed aktiverer AMPK. Som beskrevet over vil aktivering av AMPK føre til inaktivering av mTORC1 og induksjon av autofagi (Russell, Yuan and Guan, 2014).

En annen type cellulært stress hvor autofagi spiller en viktig rolle er i ER-stress. Endoplasmatisk retikulum (ER) er en intracellulær organelle som har mange viktige oppgaver, som syntese, modifikasjon og prosessering av proteiner. Noen fysiologiske og patologiske faktorer fører til forstyrrelser i ER-homeostasen, noe som refereres til som «ER stress». Da kan det oppstå proteiner som er ufoldet eller feilfoldet. Ufoldet protein respons (UPR) er en adaptiv respons som er begrenset til kortvarig stress, og hvis stresset overstiger kapasiteten til UPR blir autofagi induert (Qi and Chen, 2019). ER-stress kan også føre til økt Ca^{2+} fra ER til cytoplasma. Økt Ca^{2+} i cytoplasma aktiverer AMPK, noe som induserer autofagi (Ravanan, Srikumar and Talwar, 2017) (Qi and Chen, 2019).

1.2.8 Dysregulert autofagi

Autofagi spiller en helt avgjørende rolle i cellulær homeostase. Defekter i regulering av autofagi kan føre til sykdommer som neurodegenerative lidelser, kreft, patogeninfeksjon og metabolske sykdommer (Ravanan, Srikumar and Talwar, 2017). Autofagi er involvert i å beskytte mot neurodegenerasjon fordi autofagi kan fjerne skadede mitokondrier og toksiske proteiner eller mikroaggregater (Friedman *et al.*, 2012). Et av kjennetegnene ved mange neurodegenerative sykdommer er akkumulering av aggregerte

proteiner som unnslipper den nedbrytende prosessen og som etter hvert resulterer i nevronal celledød (Yin, Pascual and Klionsky, 2016).

Parkinsons sykdom er en av de vanligste neurodegenerative sykdommene, og i en omfattende genetisk undersøkelse av pasienter med denne diagnosen ble det funnet at unormal mengde av ATG5, ATG7, ATG12 og LC3B kan føre til Parkinsons sykdom (Chen, Zhu, et al., 2013) (Chen, Pang, et al., 2013) (Li et al., 2017) (Xu et al., 2013). Det ble her observert akkumulering av proteinaggregater i hjernevevet, noe som indikerer hvor viktig autofagi er for degradering av proteinaggregater (Friedman et al., 2012).

Mutasjon i ATG-gener som er nødvendige i de fleste trinnene i autofagiprosessen er koblet mot ulike sykdommer hos mennesker (Levine and Kroemer, 2019). For eksempel kan mutasjon i ATG16L1 føre til Crohns sykdom. Mutasjonen i dette genet resulterer i redusert selektiv autofagi. I tillegg fører den til redusert fjerning av bakterier og økt produksjon av inflammatorisk cytokin (Lassen et al., 2014). Et annet eksempel er mutasjon i ATG5 som fører til redusert autofagiaktivitet, og kan forårsake sykdommer som ataksi, systematisk sklerose og systematisk lupus erythematosus (SLE) (Martinez et al., 2016) (Kim et al., 2016).

Dysregulert autofagi er assosiert med kreft som blir beskrevet i detalj videre i oppgaven (Onorati et al., 2018).

1.3 Kreft

Kreft omtales som en av de vanligste sykdommene i verden, til tross for at begrepet kreft i seg selv inkluderer en samling av sykdommer. I 2020 ble det estimert 19,3 millioner nye kreft-diagnoser i verden (Sung et al., 2021). Hver tredje nordmann eller -kvinne vil bli diagnostisert med kreft innen de fyller 75 år, og antall oppdagede krefttilfeller har økt kontinuerlig de siste tiårene (Larsen, 2019). Basert på denne statistikken er det tydelig at kreft rammer stadig flere personer, noe som gjør det viktig å forske på mekanismene for kreftutvikling, hvordan tumorer oppfører seg, hvordan kreft påvirker enkeltindivider, og hvordan en kan forbedre behandlingsmuligheter og overlevelse.

Kreft defineres som en samling av sykdommer som kommer av ukontrollert proliferasjon av celler og/eller redusert celledød (Alberts et al., 2014). Hvis dette skjer i et organ, vil det etter hvert danne seg en klump av celler; en tumor. Kreft er aggregater av celler avledet fra en grunnleggercelle som ikke lenger er en integrert del av miljøet. Kreftcellene er forskjellige fra deres normale naboer, og har raskere delingshastighet, høy metabolsk hastighet, unormal morfologi og evne til å invadere nye cellulære områder (Cooper, 2000). Tumor kan være enten godartet (benign) eller ondartet (malign). En benign tumor forholder seg til sin egen lokalisasjon og vil ikke spre seg til verken omkringliggende vev eller metastasere til andre deler av kroppen via sirkulasjons- eller lymfesystemene. En malign tumor

derimot vil kunne gjøre begge deler, og det er disse egenskapene som gjør de maligne tumorene farlige (Cooper, 2000).

1.3.1 Mutasjoner som kan føre til kreft

Gener som er sentrale i kreftutviklingen er klassifisert som tumorpromotorer/proto-onkogener og tumorsuppressorer. Tumorpromotorer eller proto-onkogener er gener som normalt vil hjelpe en celle med å vokse (Patrick Davis, 2021). Mutasjoner i proto-onkogener kan føre til et kreftfremkallende gen, onkogen. Onkogener stimulerer økt celleoverlevelse og proliferasjon. Aktivering av onkogener involverer hovedsakelig en «gain of function»-mutasjon. Disse mutasjonene er som regel dominante, og ett mutert allel er nok for å gi kreftutvikling (Alberts et al., 2014). Et eksempel på proto-onkogen er Ras. Ras spiller en viktig rolle i en rekke signalveier som regulerer vekst, proliferasjon, overlevelse og differensiering. Mutasjoner i Ras kan føre til signaler som promoterer ukontrollert cellevekst (Murugan, Grieco and Tsuchida, 2019).

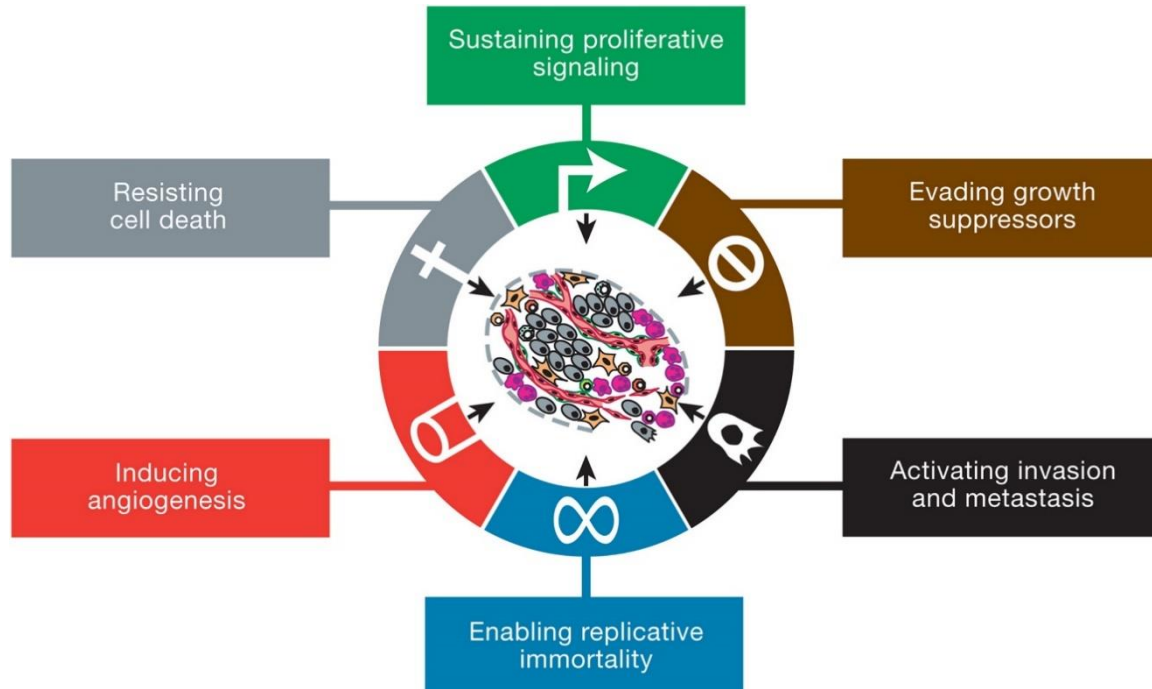
Tumorsuppressor-gener er en fellesbetegnelse på gener som har som hovedfunksjon å bremse celleproliferasjon slik at for eksempel skade i DNA eller RNA eller feil hos organeller kan rettes opp i, eller stimulere cellen til å gå i apoptose (Patrick Davis, 2021). «Loss of function»-mutasjoner i tumorsuppressorer gjør at celledelingen og -utviklingen kommer ut av kontroll, som kan føre til utvikling av kreftceller. «Loss of function»-mutasjoner er som regel recessive. Da må begge alleler være mutert for å eliminere tumorsuppressor-genet. Hvis det oppstår mutasjon i bare ett allel, vil det gjenværende allelet fortsatt opprettholde normal funksjon (Alberts *et al.*, 2014). Et eksempel på «loss of function»-mutasjon er «phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10» (PTEN). PTEN blokkerer PI3K-signalering ved å defosforylere PIP3 til PIP2, noe som inhiberer celleproliferasjon, -overlevelse og -vekst. «Loss of function» i PTEN fører til dysregulering av PI3K signalvei og aktivering av AKT, og fremmer dermed cellevekst (Jiang and Liu, 2009).

1.3.2 Hallmarks

Kreftceller er annerledes enn de normale, friske cellene. På det cellulære nivået vil celler som danner maligne tumorer gjerne ha ett eller flere typiske kjennetegn, kjent som «Hallmarks». Disse ble først presentert av Hanahan og Weinberg i 2000 som den gang pekte på seks kjennetegn ved kreftceller (figur 1.5). Blant disse finner vi selvforsyning av vekstsignaler, blokkering av anti-vekstsignaler, evnen til å utføre vevsinvasjon og metastasere, ubegrenset replikasjonspotensiale, evne til å manipulere til vedvarende angiogenese og evnen til å unnsnippe apoptose (Hanahan and Weinberg, 2000). I en oppdatert utgave av Hallmarks of Cancer fra 2011 utpekte de fire tilleggsårsaker som er viktige for kreftutvikling, herunder genominstabilitet og mutasjoner, tumorfremmende inflammasjon,

reprogrammering av energimetabolismen og unngåelse av immundestruksjon (Hanahan and Weinberg, 2011).

Sammen utgjør disse kjennetegnene viktige parametere for å vurdere årsakene til og utviklingen av kreft, og de opprinnelige seks vil nedenfor bli presentert litt mer inngående.



Figur 1.5: De seks Hallmarks (kjennetegn) som fremmer tumorvekst: Denne figuren viser de seks kjennetegnene som ble opprinnelig foreslått i 2000. Figuren er hentet fra *Hallmarks of Cancer: Next Generation* (Hanahan and Weinberg, 2011)

1.3.2.1 Opprettholdelse av proliferativ signalering

Cellers vekst og deling kontrolleres normalt av vekstsignaler som binder seg til reseptorer på cellens overflate. Produksjon og utskillelse av disse signalene kontrolleres av andre celler i nærområdet og formidles ved parakrin signalisering (Hanahan and Weinberg, 2011). Kreftceller dysregulerer disse signalene, i hovedsak enten ved å fremme produksjon og utskillelse av vekstsignaler (Cheng et al., 2008), uttrykke muterte reseptorer som alltid er aktivert eller overuttrykk av reseptorene på celleoverflaten (Hanahan and Weinberg, 2011). Begge fører til raskere progresjon i cellesyklusen, og økt cellevekst og -deling. Kreftcellene kan også sende signaler til normale rekrutterte celler i tumor-assosiert stroma, som videre supplerer kreftcellene med vekstsignaler (Cheng et al., 2008).

1.3.2.2 Blokkering av anti-vekstsignaler

Alle celler har flere mekanismer som skal sikre at celleveksten bremses og ikke kommer ut av kontroll. Hos kreftceller har denne kontrollen gått tapt. Dette er ofte resultat av mutasjoner i tumorsuppressor-gener. Tumorsuppressor-gener koder for proteiner som er involvert i DNA-reparasjon, inhibering av celledeling, indusering av apoptose og derved undertrykker metastase. Ved defekter i disse, vil

kontrollfunksjonen bli svekket slik at cellene fortsatt vil vokse med mangler i stedet for å indusere apoptose (Hanahan and Weinberg, 2011).

Genet som koder for retinoblastoma-assosiert protein (RB) er et typisk tumorsuppressor-gen, som er viktig for prosessering av signaler og som regulerer om en celle skal proliferere eller indusere apoptose. Et annet svært viktig tumorsuppressor-gen er genet for tumor protein 53 (TP53) (Hanahan and Weinberg, 2000).

De vanligste genetiske endringene i solide tumorer er i tumorsuppressor-gener. Mutasjoner i TP53 er den mest vanlige, og flesteparten av alle tumorer har minst en mutasjon i dette genet, uavhengig av lokalisasjon (Hainaut and Pfeifer, 2016). Under normale omstendigheter vil aktivering av TP53 resultere i en stor variasjon av celleresponser, som apoptose, cellesyklus-arrest, DNA-reparasjon, metabolsk adaptasjon og endring av cellulære karakteristika som differensierings-stadium til cellen. Ved mutasjon vil ikke disse celleresponsene gå som normalt, noe som fører til ukontrollert cellevekst (Aubrey, Strasser and Kelly, 2016).

1.3.2.3 Evnen til å utføre vevsinvasjon og metastasere

Kreftceller gjennomgår “Epithelial Mesenchymal Transition” (EMT), en prosess der kreftcellene mister sin epiteliale fenotype og i stedet får en mer mesenkymal fenotype. Gjennom EMT øker kreftcellene sin evne til å unngå apoptose, de mister sin cellepolaritet og sin celle-til-celle adhesjon, blir mer bevegelige, de får evnen til å løsne fra epitelunderlaget, invadere vev og derved metastasere (Thiery *et al.*, 2009).

Enkelte kreftceller vil da kunne bevege seg inn i omkringliggende vev, eller fraktes via blod eller lymfe til andre steder i kroppen, hvor en sekundærtumor vil kunne dannes (Hanahan and Weinberg, 2011). Dette er den mest dødelige egenskapen til kreftcellene, og medvirker til flertallet av kreft-relaterte dødsfall (Fares *et al.*, 2020) (Steege, 2006). Utviklingen av en sekundærtumor kan variere veldig i forløp og er avhengig av kreftcellens oppbygning og egenskaper for overlevelse på en sekundær lokalisasjon. Dermed kan en pasient ha fått behandling for en primærtumor mens en sekundærtumor er i de tidligste stadiene i utviklingen og ikke enda oppdaget. Pasienten vil da ha stor sannsynlighet for en ny kreftdiagnose innen kort tid. Forventet overlevelse av en sekundær kreftdiagnose er mye lavere enn en primær diagnose, da belastningen av den primære har gitt pasienten et dårligere utgangspunkt for å tåle behandlingen (Martin *et al.*, 2013).

En av årsakene til utvikling av metastaser, er mutasjoner i eller feilregulering av tumorsuppressoren E-cadherin. E-cadherin bidrar til adhesjon mellom epitelceller i vev, og mellom celler og overflater. En feil i dette proteinet fører blant annet til økt bevegelighet hos cellen, noe som altså er knyttet til både

vevsinvasjon og metastaser (Wong *et al.*, 2018). Funksjonstap hos E-cadherin er forbundet med dårligere prognoser og overlevelse hos pasienter med ulike krefttyper (Wong *et al.*, 2018).

1.3.2.4 Ubegrenset replikasjonspotensiale

Normale celler har et begrenset celledelingspotensiale. Telomerene, som er repetitive, ikke-kodende DNA-sekvenser på endene av kromosomene, er viktige for dette. Under replikasjon, før celledeling, vil noe av telomerene ikke bli replikert og DNA-trådene blir gradvis kortere. Etter et visst antall celledelinger er telomerene så korte at de ikke har den beskyttende egenskapen lengre, og ved replikering vil ikke hele genomet bli replikert. Dette gir kromosomal instabilitet, og cellen vil fjernes ved apoptose (Hanahan and Weinberg, 2011). I normale, somatiske celler er genet for telomerase inaktivert. Telomerase er et enzym som kan forlenge telomerene. Hos ca. 90% av humane krefttilfeller er dette genet aktivert (Jafri *et al.*, 2016), og dette vil bidra til å gi kreftcellene ubegrenset celledelings- og dermed vekst-potensiale (Low and Tergaonkar, 2013).

1.3.2.5 Manipulere til vedvarende angiogenese

Tumorvev er, som normale celler, avhengig av å kunne skaffe seg næring og oksygen, samt å kunne kvitte seg med avfallsstoffer og CO₂. Angiogenese er dannelsen av blodkar fra eksisterende blodårer, og er et annet kjennetegn på kreftceller. Angiogenesen er aktiv i fosterstadiet, gjennom vekst og fysiologiske prosesser som sårheling og under menstruasjonssyklusen (Hanahan and Folkman, 1996). Hvis ikke kar må repareres for å kunne fordele blod til alle cellene i kroppen, er denne mekanismen som regel ikke aktivert. Tidlig i tumorutviklingen vil kreftcellene stimulere til angiogenese ved å skille ut vekstfaktorer som stimulerer karutvikling, som for eksempel vaskulær endothelial vekstfaktor A (VEGF-A). Kreftcellene bidrar på denne måten til at det dannes nye forgreininger fra etablerte blodkar og på denne måten skaffer de seg blodtilførsel (Hanahan and Weinberg, 2011).

Angiogenese bidrar til at kreftcellene i nydannede tumorer får tilgang på sirkulasjonssystemet, som kreftcellene også kan utnytte for å metastasere. Men kreftceller kan også benytte eksisterende blodkar til å metastasere hvis veksten tillater det, og kan metastasere uten angiogenese.

Dårlig blodtilførsel ved dårlig angiogenese til tumorcellene kan føre til en lavere vekstrate for tumoren, men kan også beskytte den mot behandlingsmetoder som benytter seg av blodtilførselen (Saman *et al.*, 2020).

1.3.2.6 Evnen til å unnsnippe apoptose

Programmert celledød ved apoptose er en naturlig barriere mot kreftutvikling. Apoptose er et av kroppens viktigste forsvar mot mutasjoner, feil og mangler i cellene, og fjerner unødvendige og usunne celler fra kroppen ved å bryte dem ned (Fernald and Kurokawa, 2013). Apoptose induseres ved cellulære tilstander som for eksempel alvorlig DNA-skade i cellene. Tumorceller utvikler en rekke strategier for å begrense cellenes apoptose og dermed øke overlevelsen (Lowe and Lin, 2000). En av de vanligste metodene er tap av eller endring i TP53 slik at ødelagte celler ikke blir oppdaget og dermed heller ikke fjernet ved apoptose. Andre måter apoptose kan stoppes er ved å øke produksjon av eller sensitivitet for overlevelses-signaler eller anti-apoptotiske signaler, eller blokkere signaler som fremmer apoptose fra utsiden av cellen (Hanahan and Weinberg, 2011).

1.3.3 Tumorheterogenitet

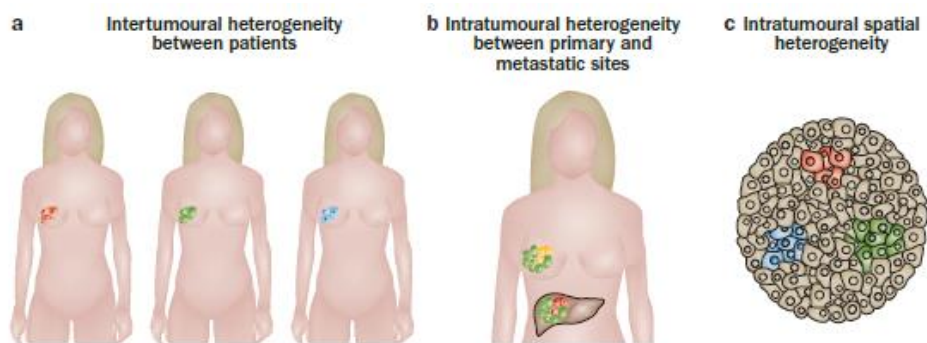
Tumorer er sammensatte masser av forskjellige celler som fibroblaster, immunceller og vaskulære celler, som sammen med kreftcellene danner et tumormikromiljø (Hanahan and Coussens, 2012).

Tumormikromiljøet er dynamisk og endres over utviklingen av tumoren, bl.a vil det bli økt antall endotelialceller ved større behov for blodkar, og flere celler generelt ved tumorvekst (Bissell and Radisky, 2001). De stromale cellene og sammensetningen av celler som danner dette mikromiljøet påvirker kreftcellenes egenskaper, som tumorvekst, evnen til å metastasere, angiogenese og produksjon av overlevelsessignaler (Egeblad, Nakasone and Werb, 2010).

Rekrutteringen av stromale celler er essensiell for kreftcellenes overlevelse, da disse gir kreftcellene mulighet til å få tak i næringsstoffer, kvitte seg med avfallsstoffer og utnytte cellene til essensielle prosesser for tumorvekst og spredning (Burrell *et al.*, 2013).

Sammensetningen av stroma varierer fra pasient til pasient og mellom ulike tumorer. Tumorer med mye stroma er assosiert med dårlig klinisk prognose (Wu *et al.*, 2016) (Bissell and Radisky, 2001).

Fremskritt innen molekylær diagnostikk og sekvenseringsteknologi har vist at kreftsvulstene er heterogene og har genetiske, epigenetiske, og fenotypiske variasjoner. (Dagogo-Jack and Shaw, 2018) (Meric-Bernstam and Mills, 2012).



Figur 1.6 Ulike typer tumorheterogenitet. A. Intertumoral heterogenitet mellom pasienter med histologisk like, men ulike mutasjoner i tumorene. B. Intratumoral heterogenitet mellom primær og metastatisk tumor grunnet forskjellige genetiske mutasjoner. C. Intratumoral heterogenitet grunnet ulike subpopulasjoner i tumoren. Figuren er modifisert og hentet fra: (Meric-Bernstam and Mills, 2012).

Det finnes flere typer tumorheterogenitet, som vist i figur 1.6. Man har for eksempel heterogenitet mellom pasienter hvor tumorene er histologisk like, men hvor det er ulike mutasjoner som ligger til grunn for utvikling av tumorene (intertumoral heterogenitet (A)). Hos en og samme pasient kan det være molekylære forskjeller mellom den primære tumoren og metastasene (intratumoral heterogenitet (B)). Dette kan skyldes at de hadde ulike genetiske endringer allerede før metastasen forlot primærtumoren (heterogenitet innad i primærtumoren, som illustrert i figur 1.6 C) eller at metastasen blir påvirket av vevet den etableres i og miljøet rundt. Man kan også ha intratumoral heterogenitet innen én og samme svulst hvor det vokser ulike subpopulasjoner av kreftceller som er genetisk forskjellige (Hanahan and Weinberg, 2011) (Meric-Bernstam and Mills, 2012). Intertumoral heterogenitet kommer i hovedsak av spontane mutasjoner, og ulike rekrutterte celler.

1.3.4 Autofagi og kreft

Autofagi har en signifikant, men kontekst-spesifikk rolle i kreft. På den ene siden fungerer autofagi som en suppressor som hindrer tumordannelse, men det er også vist at autofagi kan bidra til å fremme tumorvekst (White, Mehnert and Chan, 2015).

1.3.4.1 Autofagi som tumorsuppressor

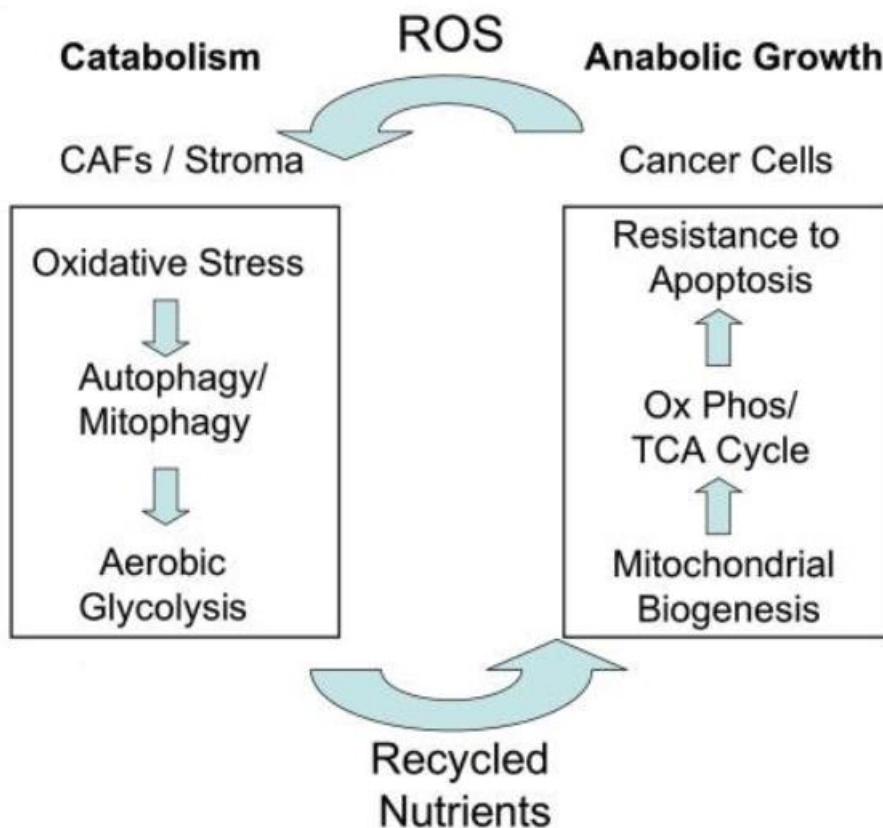
Feil i reguleringen av autofagi kan føre til økning i skadede organeller som mitokondrier, noe som øker produksjon av «reactive oxygen species» (ROS). Dette fører til akkumulering av bl.a. skadet DNA som kan spille en direkte rolle i tumorpromosjon, noe som tyder på at autofagi har en tumorsuppressor-funksjon (Jin, 2006) (White, Mehnert and Chan, 2015). Dette understøttes av flere studier. Eksempelvis er det tidligere vist at 40 til 75% av bryst-, eggstokk- og prostatakreft har monoallelisk tap av genet for det autofagi-relaterte proteinet Beclin-1 (Aita *et al.*, 1999) (Liang *et al.*, 1999) (Shen *et al.*, 2008). I

tillegg ble det påvist at monoallelisk tap av Beclin-1 i mus kan føre til kreftutvikling, noe som bekrefter at Beclin-1 fungerer som en tumor suppressor (Qu *et al.*, 2003) (Yue *et al.*, 2003). Andre eksempler på proteiner som fungerer som tumorsuppressor er “UV irradiation resistance-associated gene” (UVRAG) og “Bax-interacting factor-1” (Bif-1). Begge proteinene er positive regulatorer av Beclin-1, og fremmer autofagi (Takahashi *et al.*, 2007). Mutasjon i UVRAG og nedsatt aktivitet av Bif-1 kan gi økt risiko for kreft i tykktarm, mage, bryst, prostata og blære (S. Y. Kim *et al.*, 2008) (Lee *et al.*, 2006) (Bekri *et al.*, 1997) (Coppola, Oliveri, *et al.*, 2008) (Coppola, Khalil, *et al.*, 2008) (M. S. Kim *et al.*, 2008). ATG5 og ATG7 er også viktige tumorsuppressorer. Mus som mangler ATG5 og ATG7 utvikler levertumorer, i tillegg til skadede mitokondrier og oksidativt stress (Takamura *et al.*, 2011).

1.3.4.2 Autofagi som tumorpromotor

Som beskrevet ovenfor kan autofagi være viktig for å forebygge kreftutvikling. Det er imidlertid også studier som viser at under gitte betingelser kan autofagi være involvert i å fremme tumorvekst. Kreftceller i en etablert tumor er som regel utsatt for metabolsk stress grunnet hypoksi og mangel på næring. Som beskrevet tidligere vil næringsmangel kunne fremme autofagi, og i tillegg vil hypoksi kunne gi en økning av transkripsjonsfaktoren HIF1-alfa, som promoterer autofagi i cellene. Økt autofagi vil bidra til å opprettholde kreftcellenes overlevelse (Choi, Ryter and Levine, 2013) (Pavlides *et al.*, 2011). Derfor kan inhibering av autofagi resultere i apoptotisk tumorcelledød. For eksempel har genetiske studier i mus vist at inaktivering av autofagigenet FIP200 kan bidra til redusert tumorvekst (Wei *et al.*, 2011).

Ifølge en studie kan kreftceller benytte sine naboceller for å få dekt sitt næringsbehov (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010). Kreftcellene sender ut signalstoffer som øker autofagien hos nabocellene. Dette konseptet kalles «battery-operated tumor growth» (figur 1.7). Her fungerer nabocellene som et «batteri», som overfører energi fra seg selv til kreftcellene. Figur 1.7 viser at kreftcellene kan indusere ROS-produksjon i stromaceller som “cancer associated fibroblasts” (CAFs), noe som fører til oksidativt stress. Oksidativt stress i CAFs resulterer i aktivering av autofagi via HIF1-induksjon. Dette gjør at CAFs bryter ned for eksempel mitokondrier og andre cellulære komponenter ved autofagi, og de vil deretter frigjøre de ferdig nedbrutte næringsstoffene til omgivelsene. Disse næringsstoffene tas så opp og gjenbrukes av kreftcellene for å dekke deres næringsbehov, noe som fører til tumorprogresjon (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010).



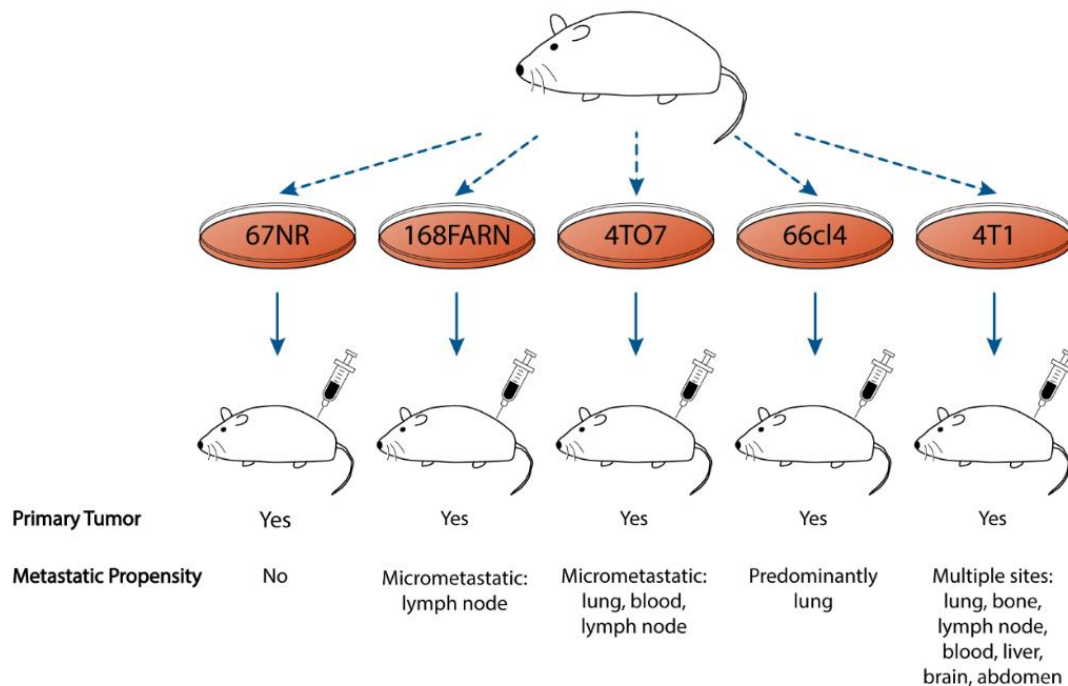
Figur 1.7: Oversikt over modellen «Battery-operated tumor growth». Tumornekst kan bli støttet av frigjøring av næringsstoffer fra stromaceller som «Cancer-associated fibroblasts» (CAF's). Denne frigjøringen dekker næringsbehov av kreftceller. Dette gjør at apoptose av kreftceller inhiberes. Bildet hentet fra (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010)

Det viser seg at det er et komplekst forhold mellom tumorsuppressor-/proto-onko-gener og autofagi i kroppens celler. Ved ubalanse i disse genene vil autofagi kunne induseres når det ikke er behov og dermed fjerne friske celler, eller unngå å bli induert når det faktisk er behov og dermed la kreftceller kunne få utvikle seg fritt. Reguleringen av disse genene og prosessen er dermed ytterst viktig i normal cellevekst og for å unngå utvikling av kreft (Maiuri *et al.*, 2009).

1.4 Mål med oppgaven

I dette bachelorprosjektet er det blitt benyttet en cellelinje fra den såkalte 4T1-tumormodellen. Dette er en modell som omfatter 5 unike cellelinjer som hver representerer kloner isolert fra én spontan brystkrefttumor oppstått hos en BALB/cfC3H-mus, og som ble etablert på begynnelsen av 90-tallet av C.J. Aslakson og F.R. Miller (Aslakson and Miller, 1992). Som illustrert i figur 1.8, kan alle de fem cellelinjene (67NR, 168FARN, 66cl4, 4TO7 og 4T1) danne primærtumor når de implanteres tilbake i BALB/c-mus, men de skiller seg fra hverandre hva angår metastatiske egenskaper. Cellelinjen 67NR metastaserer ikke i det hele tatt, mens 4T1 metastaserer til svært mange ulike vev. I dette prosjektet har

det blitt fokusert på cellelinjen 66cl4 som i hovedsak metastaserer fra bryst til lunge via lymfesystemet (Aslakson and Miller, 1992).



Figur 1.8: Cellelinjer isolert fra spontant oppstått brystkreftsvulst hos BALB/cfC3H-mus. Ill: (Neckmann, 2018)

I tidligere forsøk hos forskningsgruppen ved Inst. for Bioingeniørfag ledet av Geir Bjørkøy har preliminnære data indikert at det kan være heterogenitet innad i 66cl4-cellelinjen når det gjelder cytokinproduksjon. Det ble i 2020 derfor laget enkeltcelle-kloner av cellelinjen for å kunne undersøke dette videre.

Heterogenitet innad i cellelinjen vil kunne uttrykkes på mange ulike måter, for eksempel om cellene uttrykker forskjellige nivåer av spesifikke proteiner, har ulik morfologi og hvis de har ulike veksthastighet. I dette prosjektet brukes autofagiflux, og i tillegg observasjoner av cellene, som indikatorer på denne typen heterogenitet.

Autofagi spiller en viktig rolle i utviklingen av kreft, og manipulering av autofagi kan være en mulig behandlingsstrategi for ulike tumorer. Det er derfor interessant å se på hvordan autofagiflux varierer mellom klonene.

Problemstillingen blir dermed:

Er det påvisbar heterogenitet mellom den opprinnelige cellelinjen 66cl4 og de utvalgte enkeltklonene hva angår morfologi, veksthastighet og autofagiflux?

2 Material og metoder

2.1 Cellelinjene

På forskningsgruppen ved Institutt for Bioingeniørfag ledet av Geir Bjørkøy ble det i 2020 laget enkeltcelle-kloner av 66cl4-cellelinjen. Disse ble laget ved å så ut cellene ved veldig høy fortykning slik at det skulle kunne dannes kolonier med opprinnelse i kun 1 celle. Det ble totalt laget over 30 slike enkeltcelle-kloner som ble frosset ned og lagret for senere studier av heterogenitet. Vi har her fått tildelt 5 tilfeldig utvalgte kloner som alle hadde vist godt vekstpotensiale før nedfrysing, samt den opprinnelige 66cl4-cellelinjen.

2.2 Metoder

2.2.1 Celledyrkning og subkultivering

66cl4-cellene er adherente celler, og ble dyrket i DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza 12-604F) med L-glutamin og 4,5 g/L glukose, tilsatt 10% føtalt kalveserum, og 1% Penicillin-Streptomycin (hhv. 100 U/mL og 100 µg/mL, Sigma-Aldrich P0781). Alt arbeid med cellekulturer ble utført på steril benk i avtrekksskap, med sterilt utstyr.

For å sikre at cellene ikke ble postkonfluente og fremdeles hadde plass til å dele seg, ble de subkultivert hver 3-4 dag. Samme fremgangsmåte ble også brukt for å så ut cellene til eksperimenter. Ved subkultivering og utsåing ble gammelt medium fjernet, cellene ble vasket to ganger med PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma) og det ble tilsatt trypsin med EDTA (hhv 0.5 g/L og 0.2 g/L, Lonza BE17-161E). Cellene ble satt i inkubatorskap, og for både 66cl4-cellelinjen og alle klonene tok det relativt lang tid (typisk minst 10 minutter) før de var løst fra underlaget og fra hverandre. Det ble gradvis tilsatt medium for å inaktivere trypsinet, og cellene ble pipettert gjentatte ganger i dyrkningsflasken for å oppnå enkeltceller. Når dette var oppnådd, ble det tilsatt medium til et totalvolum av 10 mL og suspensjonen ble telt. Ved vedvarende problemer med å få enkeltceller ble litt celleduspensjon flyttet over til et Eppendorfrør og pipettert gjentatte ganger med en mindre pipette for å skille cellene fra hverandre med større kraft, og dette ble da brukt for telling av cellene.

Ved telling ble 20 µL celleduspensjon blandet med 10 mL isoton saltvannsløsning, og cellene ble telt i en Coulter Counter (Beckman Coulter Z2) mellom 7 og 15 mm.

Basert på forskningsgruppens tidligere erfaringer med 66cl4-cellelinjen visste en at det var behov for å så ut 1.575×10^6 celler for dyrkning i 75 cm² flaske i fire dager og 3.150×10^6 celler for tre dager. Det var også kjent at det på 6-brønnersbrett (9.5 cm²/brønn) burde såes ut 7.98×10^5 celler for 66cl4-cellelinjen for eksperimenter med varighet på 2 døgn, og det ble her antatt at klonene ville vokse

tilnærmelsesvis likt med den opprinnelige cellelinjen. Det var derfor ikke lagt opp til noen optimalisering av celledtall i forbindelse med denne oppgaven.

Cellene ble kontrollert i mikroskop, og satt inn i inkubatorskap (37°C, 5% CO₂).

2.2.2 Behandling med Bafilomycin A1

Cellene ble sådd ut i 6-brønnersbrett med 7.98x10⁵ celler pr. brønn i et totalvolum på 3 ml (266 000 celler/ml). Den påfølgende dagen ble volum i brønnene sjekket, og 24t-brønner fikk tilsatt Bafilomycin A1 (BafA1) (Santa Cruz Biotechnology, sc-201550A, løst i DMSO til 160 µM) til en sluttkonsentrasjon på 100 nM. Neste dag ble tilsats av BafA1 gjentatt ført for 6t-brønnene og siden 2t-brønnene, før alle brønnene, inklusive ubehandlede kontroller, til slutt ble høstet på samme tidspunkt. Konsentrasjon av BafA1 ble valgt ut fra tidligere erfaringer på forskningsgruppa med 66cl4-cellelinja.

2.2.3 Høsting av celler og tillaging av proteinekstrakter

6-brønnersbrettene ble plassert på is, medium ble fjernet og brønnene vasket med kald PBS. 50 µL ureabuffer (se vedlegg 1) ble tilsatt i hver brønn og fordelt med celledraper, og de lyserte cellene ble skrappt sammen og overført til Eppendorf-rør. Prøvematerialet ble oppbevart ved -80°C fram til alle celleeksperimenter var gjennomført, og det var klart for å fortsette med prøveopparbeiding før Western Blotting.

2.2.4 Prøveopparbeiding og proteinkonsentrasjonsmåling

Prøvematerialet ble tint, satt på risting (4°C, 1500 rpm, 15 min) og sentrifugert (20 000 G, 15 min, 4°C) og supernatanten ble overført til nye rør.

Konsentrasjonsmåling av proteiner ble gjort ved bruk av Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad #5000006, fortynnet 1:5 med sterilt vann). Prøvene ble fortynnet i Bio-Rad (1 µL prøve pr. 999 µL Bio-Rad for eksperiment 1, og 1 µL pr. 1399 µL for eksperiment 2 og 3), og etter ca. 10 min inkubering ved romtemperatur ble absorbans ved 595 nm avlest på Shimadzu UV-1800 UV-VIS Spectrophotometer. Absorbansen ble lagt inn i regneark, og konsentrasjonen beregnet med formel 2.1. Stigningstallet, 22.02, er fra en BSA-standardkurve laget for lenge siden. Dette gir ikke helt nøyaktig konsentrasjon av proteiner, men gjør prøvene sammenlignbare med hverandre. Konsentrasjon oppgis i µg/µL.

Formel 2.1

$$C_{protein} = \frac{Abs. \times \text{fortynningsfaktor} \times 22.02}{1000}$$

2.2.5 Gel-elektroforese

Lik mengde protein fra alle prøver ble tatt ut, og det ble tilsatt 10 mM Tris-HCl til likt volum og konsentrasjon. Prøvene ble deretter tilsatt LDS-buffer (4X, Invitrogen NuPAGE, NP0007) og DTT (1M, PanReac AppliChem DTT solution, A3668) til en sluttkonsentrasjon på hhv 1X og 0.05 M. Sluttvolum av prøve, Tris, LDS og DTT var 30 μ L i forsøk 1 (appliserte 25 μ L/brønn), og 25 μ L i forsøk 2 og 3 (appliserte 20 μ L/brønn). Proteinmengde per brønn var 40 μ g. Detergent, denaturering med DTT samt varmedenaturering på varmeblokk (80°C, 10 min), fjerner den spesifikke ladningen og endrer strukturen på proteinene, slik at kun vekten/størrelsen av proteinet innvirker på proteinets vandring i elektroforese-gelen.

«Loading mix» til bruk i tomme brønner og i standardene ble laget av Tris-HCl og LDS-buffer. Standarder ble tilberedt med hel og halv mengde av Odyssey One-Color Protein Molecular Weight Marker (Li-Cor 928-40000, proteinbånd med størrelse på 10 til 250 kDa), og begge brukes i hver gel for å sikre at orienteringen på gelene var lett identifiserbar.

XCell4 SureLock™ Midi-Cell gel-elektroforesekar med ThermoFischer NOVEX NuPAGE 4-12% Bis-Tris Midi Gel(WG1402) ble satt sammen. Gelen er todelt, der første parti har lavere tetthet i gelen for å la store proteiner vandre uten for store hindringer, og andre parti høyere tetthet for å separere mindre proteiner bedre. Elektroforesekarer ble fylt med MOPS-buffer (Life Technologies Novex NuPAGE MOPS SDS Running buffer 20X, fortynnet til 1X med ionebyttet vann).

Gelen ble kjørt på 200 V i omtrent 50 minutter med Life Technologies PowerEase 300 W som strømkilde.

2.2.6 Overføring av protein til membran

Gelkassetten ble åpnet forsiktig, og brønner og nedre kant av gel fjernet. Filterpapir fuktet i ionebyttet vann ble lagt på for å stabilisere gelen, og eventuelle luftbobler fjernet med rulle. Gelen ble løsnet fra kassetten, og overflyttet til klargjort blottestack (Invitrogen iBlot 2 NC Regular Stacks, IB23001). Blottestack'en består ferdig sammensatt av et lag nitrocellulose, gel med elektroder, filterpapir, membran, proteingel fra elektroforese med tilhørende filterpapir, ny gel med elektrode, og et siste lag nitrocellulose. Blottestack'en ble plassert i et blotteapparat, iBlot 2 (Life Technologies), og kjørt med et 7 minutters blotteprogram bestående av tre faser (1 min 20 V, 4 min 23 V, 2 min 25 V). Den elektriske strømmen trekker med seg proteinene fra elektroforesegelen til membranen, slik at gelens proteiner blir likt plassert på membranen som i gelen.

Etter blotteprogrammet er ferdig, ble stack'en tatt ut fra apparatet og membranen pakket ut, merket, og delt mellom markørene for 37 og 25 kDa.

2.2.7 Farging av Western Blott

Membranene med proteiner farges ved bruk av en indirekte antistoff-metode, hvor primærantistoffet binder seg til proteinet en ønsker å undersøke og det avlesbare sekundærantistoffet igjen binder seg til primærantistoffet.

Membranbitene ble plassert i lystette rør, tilført blockingbuffer (1:1 TBS (20mM Titriplex II (Sigma 1084171000), 137 mM NaCl) og Li-Cor Odyssey Blocking Buffer TBS), og inkubert 1 time i romtemperatur. Blockingløsningen ble helt av, og 5 mL primærantistoff for p62 eller LC3B (tabell 2.1) tilført hvert korresponderende rør og inkubert på rulle ved 4°C over natt.

Primærantistoffløsningen ble gjenbrukt til alle membranene.

Membranene ble deretter vasket i TBST (TBS med 0.1% Tween-20 (Sigma P1379)) 3 × 10 minutter. Tilhørende sekundærantistoff ble tilført, og membranene inkubert på rulle i romtemperatur i 1 time. Membranene ble så vasket 3 × 10 minutter i TBS og tørket før scanning.

Tabell 2.1: Antistoffer brukt til Western Blott

Primærantistoff				
Antistoff		Antigen	Produsent	Fortynning
GP62-C pAb, marsvin		p62, ca. 62 kDa	Progen	1:1000 i
#3868 mAb, kanin		LC3B-I og LC3B-II, hhv. 16 og 14 kDa	Cell Signaling Technology	TBST/Odyssey Blocking Buffer (1:1)
#9107 mAb, mus		p44/42 MAPK (ERK1/2), ca. 44/42 kDa	Cell Signaling Technology	
Sekundærantistoff				
Antistoff	Signal	Antigen	Produsent	Fortynning
926-32411, IRDye® 800CW Geit anti-marsvin	NIR, 800 nM	Marsvin-IgG	Li-Cor	1:5000 i TBST/Odyssey Blocking Buffer (1:1)
926-32213, IRDye® 800CW Esel anti-kanin		Kanin-IgG		
926-32210, IRDye® 800CW Geit anti-mus		Mus-IgG		

Membranene ble scannet (se 2.2.8), før øvre del av membranen (proteiner 37 kDa og større) ble farget på nytt med antistoff for ERK1/2. Samme metode for primær- og sekundærantistoff ble benyttet.

2.2.8 Avlesning og tolkning av Western Blott

Membranene ble scannet med Li-Cor Odyssey CLx Imaging System, og behandlet i Li-Cor Image Studio. For å hente ut tallmateriale fra de scannede membranene benyttet vi programmets analyseverktøy, hvor hvert proteinbånd fra alle forsøkene defineres og kvantiteres, før verdiene ble eksportert til Excel.

Ved kartlegging av basalt uttrykk av målproteiner (p62 og LC3B) er signalene normaliserte i forhold til husholdspoteinene ERK1/2. Dette ble gjort ved at for eksempel signalet for p62 i en ubehandlet kontroll hos en cellelinje ble delt på signalet for ERK1/2 fra samme prøve. De normaliserte tallene for p62 og LC3B i alle ubehandlede prøver ble så brukt for å sammenligne klonene og den opprinnelige cellelinjen ved å sette signalene relativt til 66cl4-cellelinjen.

Ved kartlegging av autofagiflux hos 66cl4, ble tilsvarende normalisering brukt. Her ble først signalene for målproteinet i de Baf-behandlede prøver gjort relative til sin tilhørende kontroll. Tilsvarende ble signalene for ERK1/2 gjort relative for Baf-prøvene i forhold til ubehandlet kontroll. Til sist ble de relative signalene for målproteinet delt på de tilhørende relative signalene for ERK1/2.

Ved kartlegging av autofagiflux i klonene, ble det brukt tall fra de behandlede prøvene uten å normalisere signalene mot ERK1/2. De ble kun gjort relative til sin ubehandlede kontroll. For sammenligning med 66cl4 ble det her brukt ikke-normalisert signaler også for denne cellelinjen.

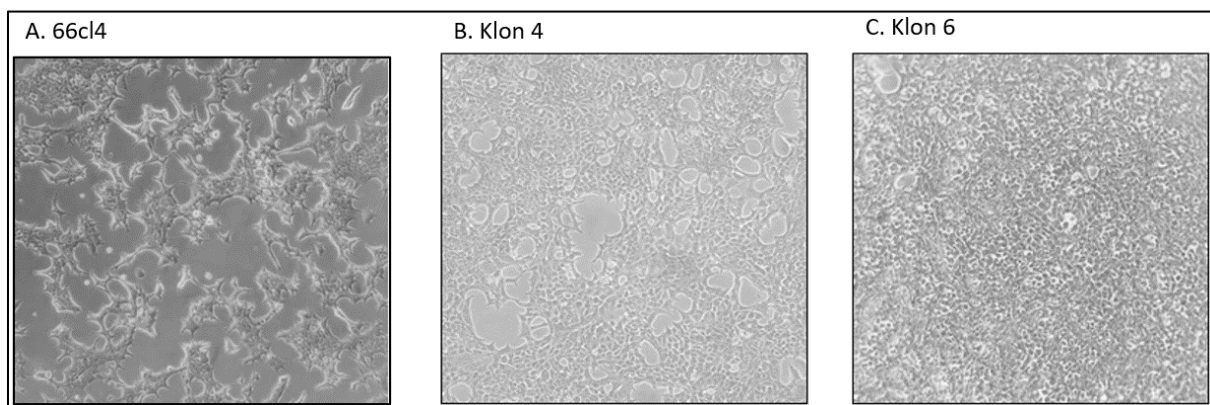
3 Resultater

I denne oppgaven ble det benyttet den murine brystkreft-cellelinjen 66cl4 samt 5 ulike kloner av denne. Det ble gjort forsøk for å kartlegge cellenes vekstegenskaper og deres autofagiflux, for derved å vurdere eventuell heterogenitet blant de ulike cellene.

3.1 Morfologi og veksthastighet

Det ble gjort jevnlig observasjoner av cellene i dyrkningsperioden (16 dager). Observasjonene ble gjort basert på utseende til cellene, farge på medium, konfluensen til cellene og en vurdering av antall døde celler.

Morfologi



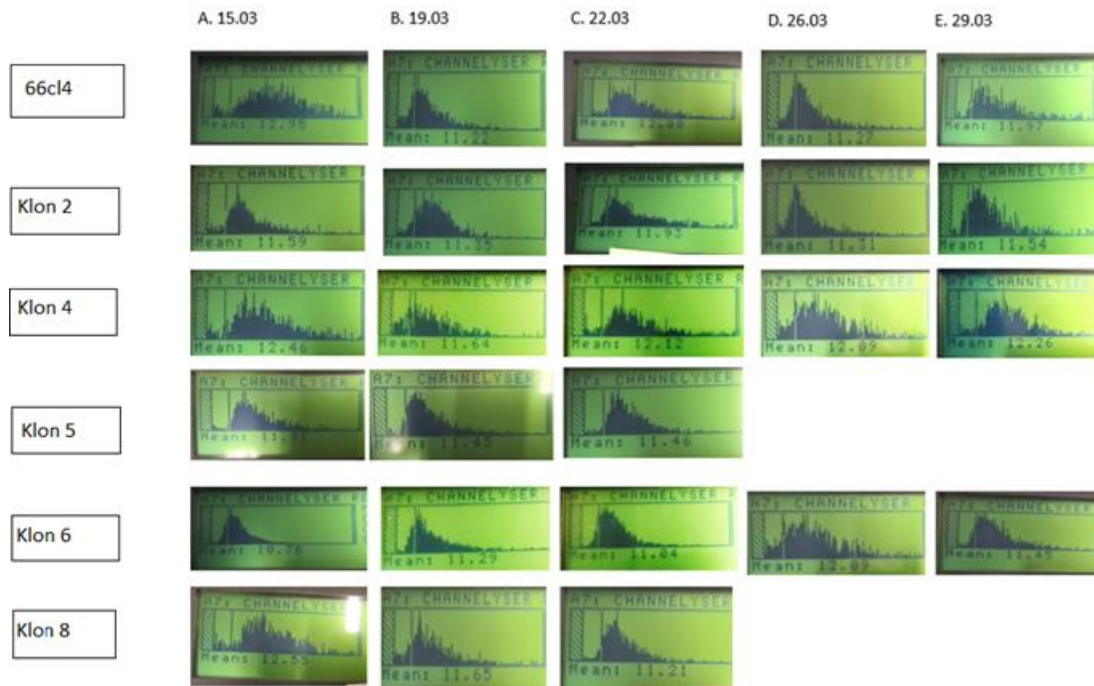
Figur 3.1: Morfologi hos 66cl4, klon 4 og klon 6. Bilder er tatt gjennom mikroskop av 66cl4-cellelinjen (A), klon 4 (B) og klon 6(C) og viser noe ulik morfologi hos cellene

66cl4-cellelinjen er avbildet på et annet tidspunkt i dyrkningsfasen enn klonene er, og cellelinjen er dermed ikke direkte sammenliknbar med klonene, men kan benyttes for å gi en indikasjon på cellenes morfologi. Både 66cl4-cellelinjen og klon 4 har utstrakte celler med asymmetrisk form, mens cellene i klon 6 er mer kompakte og runde som vist i figur 3.1. De klonene som ikke er avbildet, har en morfologi som er tilnærmet lik den presentert i klon 4.

Fargen på medium varierte veldig mye fra begynnelsen til slutten av dyrkningsperioden. Fargen på mediet gjenspeiler pH-verdien, og vil for eksempel bli gulere hvis cellene skiller ut mye laktat. Dette blir dermed en indikator på cellenes metabolisme, og hvorvidt cellen henter energi fra anaerob glykolyse eller oksidativ fosforylering. Her kunne vi se at fargen endret seg fra rødlig til mer oransje når cellene gikk fra nylig utsådd til mer konfluente, som forventet. Det var en del variasjon i fargen som ble observert fra forsøk til forsøk, men generelt var det slik at for klon 4 var mediet betydelig mer guloransje

enn for de andre klonene og den opprinnelige cellelinjen, noe som tyder på høyere utskillelse av laktat fra denne klonen.

Ved telling av cellene i Coulter Counter ble det tatt bilder som viser hvordan cellene fordeler seg i det størrelsesområdet hvor de ble telt (7-15 μm). I figur 3.2 er alle bilder satt sammen i en oversiktsfigur.



Figur 3.2: Størrelsesfordeling av celler for 66cl4, klon 2, klon 4, klon 5, klon 6 og klon 8. Figur 4.2 A viser kurver utgitt ved celletelleren Coulter Counter den 15.mars, B viser kurver fra den 19.mars, C fra den 22.mars, D fra 26.mars og E fra den 29.mars 2021

Figuren viser at noen av klonene fremstår med ulik størrelsesfordeling de ulike dagene. Noen av grafene har bred topp, noe som indikerer en blanding av enkeltceller og små aggregater. Disse aggregatene kan ha påvirkning på celletall, siden disse celleaggregatene ble telt som en stor celle. Noen av grafene har samlet og smal topp, noe som indikerer at cellene i cellesuspensjonen var enkeltceller og at celletall fra disse dagene kan stoles på.

Ved telling i Coulter Counter fremkommer også gjennomsnittlig cellestørrelse, og resultatene fra alle tellinger er oppsummert i tabell 3.1. I tillegg viser tabellen gjennomsnittet av alle målingene for hver cellevariant, standardavvik og t-test. Standardavviket for 66cl4, klon 6 og klon 8 er veldig høye, noe som indikerer at det er stor forskjell mellom de gjennomsnittlige cellestørrelsene fra de forskjellige dagene som også er synlig i figuren 3.2. t-test ble gjennomført for å sammenligne de forskjellige klonene mot 66cl4. Siden p-verdier på alle klonene er veldig høye, indikerer dette at det ikke er signifikante forskjeller mellom den opprinnelige cellelinjen og de ulike klonene.

Tabell 3.1: Gjennomsnittlig cellestørrelse ved alle tellinger med beregnet gjennomsnitt, standardavvik og t-test

	Cellestørrelse					Gjennom -snitt	Standard -avvik	t-test
	15.mars	19.mars	22.mars	26.mars	29.mars			
66cl4	12.90	11.22	12.00	11.27	11.97	11.87	0.68	
Klon 2	11.59	11.35	11.93	11.31	11.54	11.54	0.25	0.36
Klon 4	12.46	11.64	12.12	12.09	12.26	12.11	0.30	0.50
Klon 5	11.91	11.45	11.46			11.61	0.26	0.47
Klon 6	10.78	11.29	11.04	12.09	11.45	11.33	0.50	0.19
Klon 8	12.55	11.65	11.21			11.80	0.68	0.90

Veksthastighet

Cellene ble telt i forbindelse med utsåing til forsøkene og ved subkulturering for å videreføre cellelinjene. Alle cellevariantene ble sådd ut med likt antall, som var basert på antall dager cellene skulle dyrkes før neste telling og høsting. Tabell 3.2 A og B viser totalt antall celler i flaskene ved høsting, samt at det er gjort beregninger hvor det totale antall celler ved høsting enten er relatert til hvor mange celler som ble sådd ut opprinnelig, eller hvor mange dager cellene har vært dyrket før høsting. Det er også beregnet relativ vekst for klonene, sammenlignet med den opprinnelige cellelinjen.

Tabell 3.2 A: Oversikt over de absolutte celletallene, celletallene delt på antall utsådde celler, celletall pr. dag og relativ vekst sammenlignet med villtypen. Del 1 er fra 19/3 og 22/3

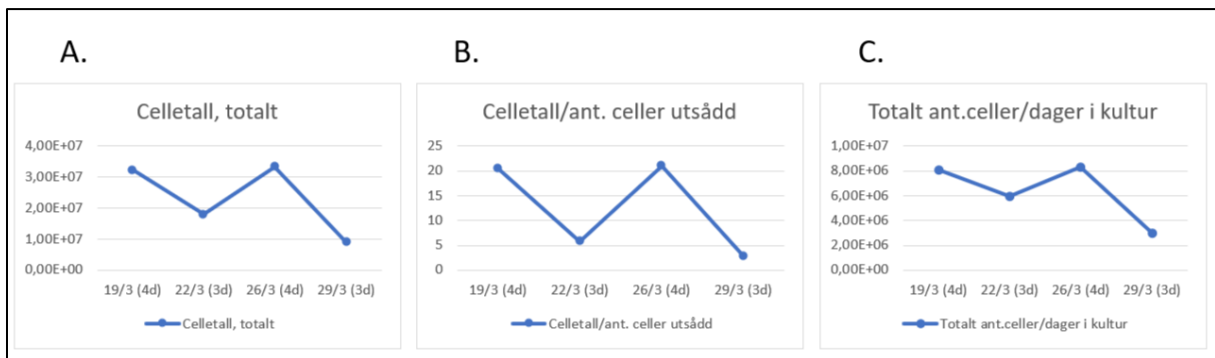
Celle-variant	Celletall 19/3-21 (4d)	Celletall /antall celler utsådd	Celletall /dag	% (relativt til 66cl4)	Celletall 22/3- 21(3d)	Celletall /antall celler utsådd	Celletall /dag	% (relativt til 66cl4)
66cl4	3,23E+07	20,49	8,07E+06	1,00	1,79E+07	5,69	5,97E+06	1,00
Klon 2	1,97E+07	12,50	4,92E+06	0,61	1,73E+07	5,49	5,76E+06	0,97
Klon 4	8,52E+06	5,41	2,13E+06	0,26	1,13E+07	3,60	3,78E+06	0,63
Klon 5	3,44E+07	21,85	8,61E+06	1,07	1,84E+07	5,85	6,14E+06	1,03
Klon 6	3,50E+07	22,21	8,75E+06	1,08	4,53E+07	14,37	1,51E+07	2,53
Klon 8	1,28E+07	8,14	3,21E+06	0,40	1,80E+07	5,71	6,00E+06	1,01

Tabell 3.2 B: Oversikt over de absolutte celletallene, celletallene delt på antall utsådde celler, celletall pr. dag og relativ vekst sammenlignet med villtypen. Del 2 er fra 26/3 og 29/3

Celle-variant	Celletall 26/3-21 (4d)	Celletall /antall celler utsådd	Celletall /dag	% (relativt til 66cl4)	Celletall 29/3-21 (3d)	Celletall /antall celler utsådd	Celletall /dag	% (relativt til 66cl4)
66cl4	3,32E+07	21,08	8,30E+06	1,00	8,99E+06	2,85	3,00E+06	1,00
Klon 2	1,90E+07	12,08	4,76E+06	0,57	1,09E+07	3,46	3,64E+06	1,21
Klon 4	1,20E+07	7,61	3,00E+06	0,36	1,60E+07	5,09	5,35E+06	1,78
Klon 6	6,06E+07	38,44	1,51E+07	1,82	2,45E+07	7,78	8,17E+06	2,73

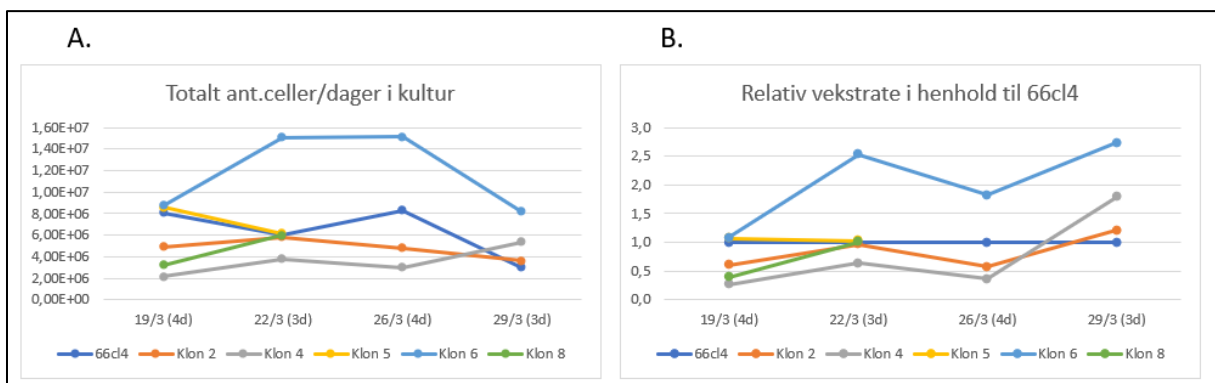
Klon 5 og 8 er utelatt fra tabell 3.2 B ettersom disse ikke hadde noen vekst ved høsting den 26.mars på grunn av feil ved forrige utsåing, og derfor ikke kunne telles.

Det er mange måter å fremstille cellevekst. Som vist i tabell 3.2 kan celletallene betraktes som de er i seg selv, eller relateres til utsådde celler eller dyrkningstid. I figur 3.3 er dette fremstilt grafisk for den opprinnelige cellelinjen, 66cl4. Som det fremgår av figuren, er det store variasjoner mellom observasjonene. Målet med å så ut forskjellige antall celler var å kompensere for ulik dyrkningstid, 3 eller 4 dager, slik at cellene skulle være like konfluente ved høsting, men dette lyktes ikke. For å forsøke å korrigere for variasjonen og dermed enklere kunne få frem forskjeller mellom de ulike cellelinjene, er det forsøkt å relatere celletellingene til antall celler utsådd (figur 3.3 B) eller til antall dager i kultur (figur 3.3 C). Som det kommer frem av grafene, er det å korrelere antall celler ved høsting til antall dager i kultur som gir best resultat (se også rådata i vedlegg 2). Denne metoden ble derfor benyttet til å videre vurdere veksthastigheten til klonene.



Figur 3.3: Celletallene fra 66cl4 hvor A viser de totale celletallene, B celletallene delt på antall celler utsådd og C totale celletall delt på antall dager i kultur (estimert av daglig vekst)

Vekstraten for alle cellevarianter er illustrert grafisk i figur 3.4 nedenfor, hvor altså celletall for alle cellevarianter er korrelert til antall dager i kultur (figur 3.4 A). Det er også fremstilt hvordan de ulike klonenes vekstrate fremstår relativt til den opprinnelige cellelinjen 66cl4 (figur 3.4 B)



Figur 3.4: Oversikt over de ulike cellelinjene og deres respektive vekstrate. A er basert på antall celler delt på antall dager i kultur og B er basert på den relative vekstraten i forhold til 66cl4

I figur 3.4 fremkommer det tydelig at klon 6 har den høyeste daglige vekstraten og klon 4 har generelt den laveste vekstraten unntatt ved siste avlesning. Klon 2 hadde omtrent samme vekstrate som 66cl4. Klon 5 og Klon 8 hadde bare to avlesninger, og det er vanskelig å se på kun disse avlesningene hvordan vekstrate klonene hadde. I sum viser disse resultatene en viss heterogenitet i veksthastighet mellom den opprinnelige cellelinjen og noen av de undersøkte klonene.

3.2 Basale nivå av p62 og LC3B

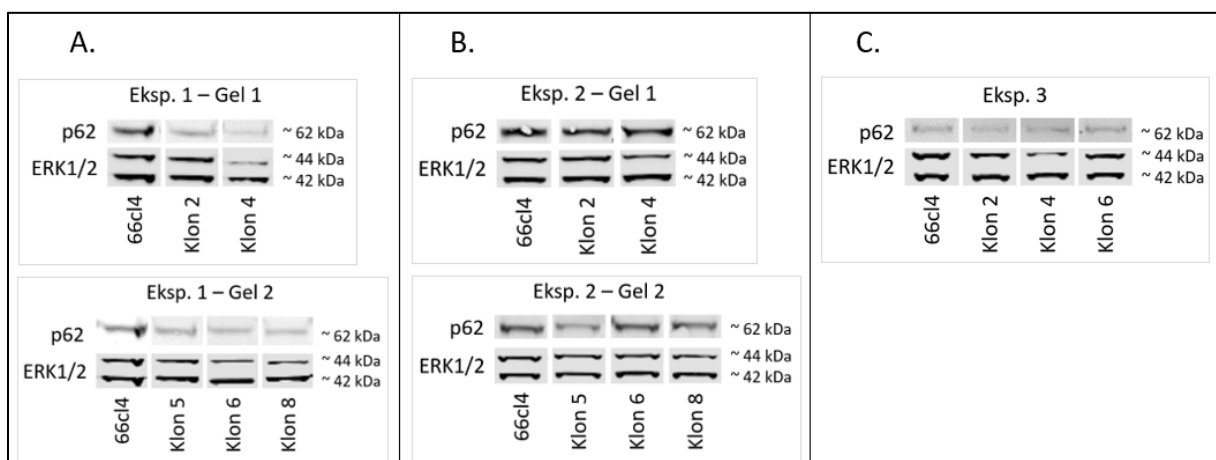
Det ble laget proteinekstrakt fra 66cl4 og de 5 klonene for å kvantitere nivået av LC3B og p62 ved hjelp av Western Blott. Resultater fra proteinmålinger er vist i vedlegg 3. For alle prøver ble det brukt 40 µg protein i hver brønn. Membranene ble klippet mellom 25 og 37 kDa for å kunne legge på antistoff for p62 og LC3B på separate membraner og dermed minimere problemer med uspesifikke bånd fra antistoffene. For å normalisere signalene ble det brukt antistoff mot ERK1/2 som var forventet å være til stede i lik mengde ved de aktuelle forsøksbetingelsene.

Totalt ble det gjennomført tre eksperiment, med unntak av klon 5 og klon 8 hvor det kun ble gjennomført to. Prøvene fra hvert forsøk ble fordelt på to geler, og for sammenligning ble ubehandlet 66cl4 fra samme eksperiment brukt på begge gelene.

Bilder vist i følgende figurer er fremstilt ved hjelp av programmet «Image Studio Lite» fra Li-Cor. Programmet ble brukt ved scanning av våre Western Blott-membraner, og for påfølgende kvantitering av p62, LC3B og ERK1/2.

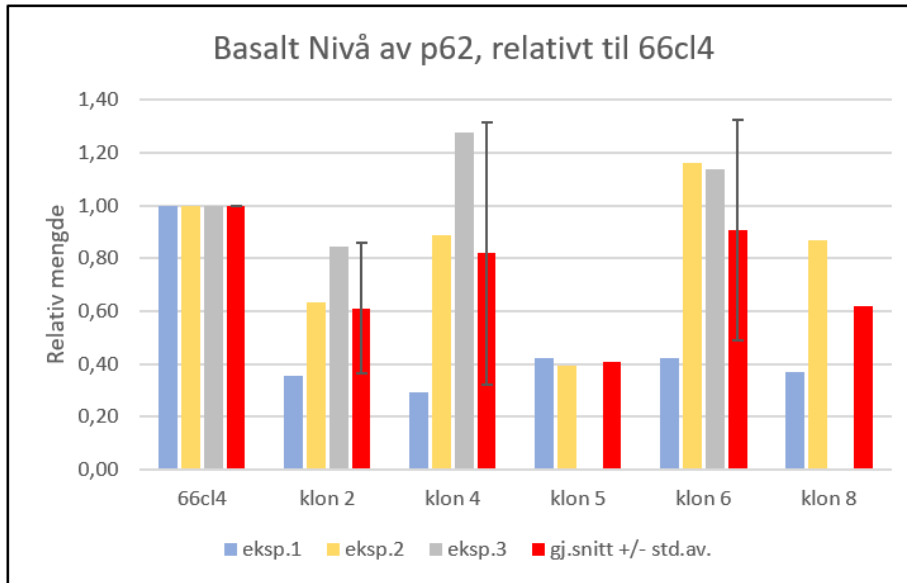
3.2.1 p62

I figur 3.5 nedenfor er det vist avbildninger av Western Blott med ekstrakter fra ubehandlede celler (kontroller) fra alle cellelinjene etter farging med antistoff for p62 samt ERK1/2.



Figur 3.5: Basalt nivå av p62 hos 66cl4 og de ulike klonene. A er fra eksperiment 1, gel 1 og gel 2, B er fra eksperiment 2, gel 1 og gel 2, og C er fra eksperiment 3. Nivå av ERK1/2 er brukt for normalisering.

Resultatene fra figur 3.5 er presentert grafisk i figur 3.6, hvor signalene er gjort relative til den opprinnelige cellelinjen.



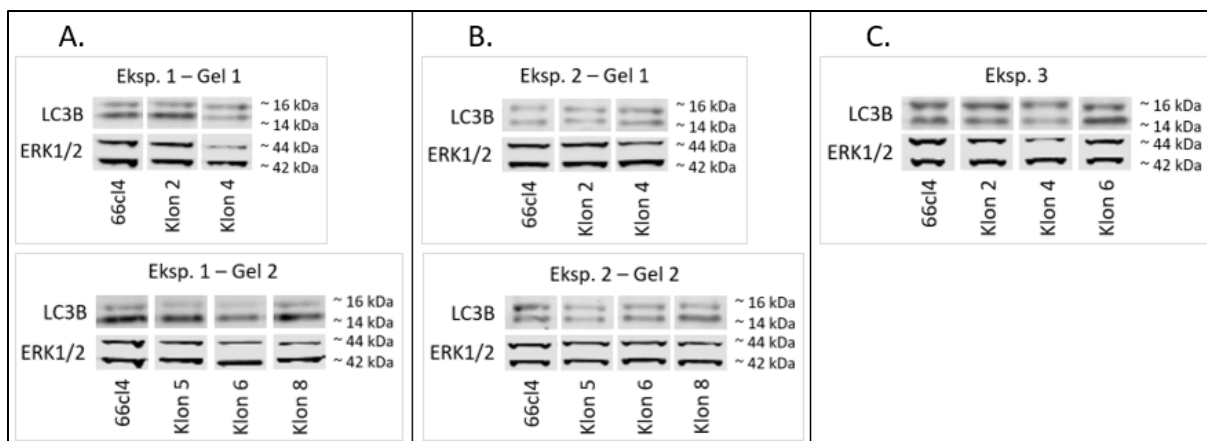
Figur 3.6: Basalt nivå av p62 i de ulike klonene normalisert mot ERK1/2, fremstilt relativt til 66cl4.

Det kan observeres i figur 3.5 at forekomsten av ERK1/2 hos klon 4 synes å variere mellom eksperimentene. Dette må tas i betraktning i vurdering av de normaliserte resultatene.

I henhold til de normaliserte signalene er det tydelige forskjeller i basalt nivå av p62 mellom noen av klonene og 66cl4 (figur 3.6). Klon 2, klon 5 og klon 8 har betydelig lavere signaler enn 66cl4, men det bør bemerkes at det for klon 5 og klon 8 kun er gjort to eksperimenter og hos klon 8 er det stor forskjell i resultatene fra disse. For klon 4 og klon 6 varierer resultatene veldig mye mellom de ulike eksperimentene. Dette gjenspeiles i det høye standardavviket for disse klonene.

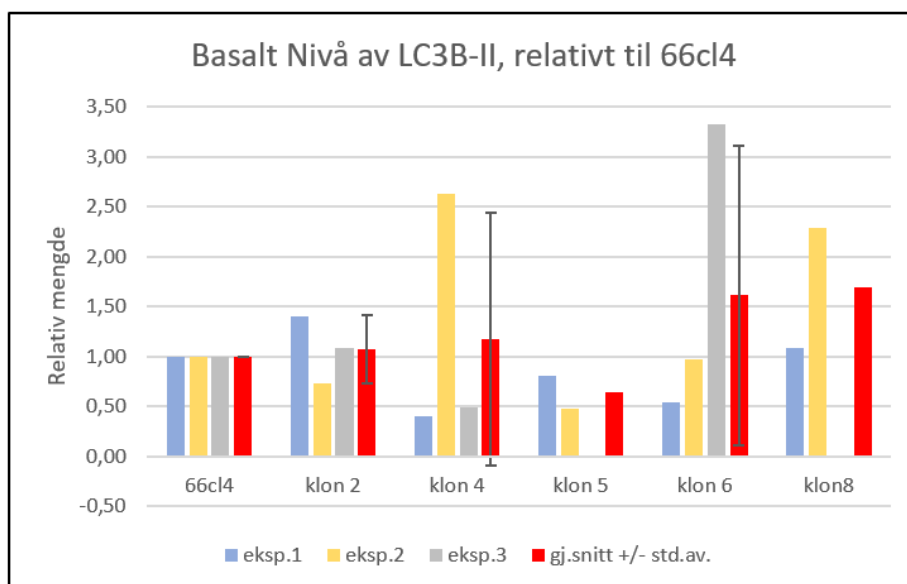
3.2.2 LC3B

Det ble også gjort antistofffarginger for å se på det basale nivået av en annen viktig autofagimarkør, LC3B. I figur 3.7 er det vist Western Blott med ekstrakter fra ubehandlede celler (kontroller) fra alle cellelinjene etter farging med antistoff for LC3B, samt ERK1/2.



Figur 3.7: Basalt nivå av LC3B hos 66cl4 og de ulike klonene. A er fra eksperiment 1, gel 1 og gel 2, B er fra eksperiment 2, gel 1 og gel 2, og C er fra eksperiment 3. Nivå av ERK1/2 er brukt for normalisering.

Resultatene fra fargingene vist i figur 3.7 er fremstilt grafisk i figur 3.8 nedenfor. Tilsvarende som for p62, er også her de bearbejdede tallene gjort relative til den opprinnelige cellelinjen 66cl4.



Figur 3.8: Basale signaler av LC3B-II normalisert mot ERK1/2 og relativt til 66cl4.

LC3B observeres på membranen som to bånd. Det er båndet på ~14 kDa som er den lipiderte formen av LC3B, LC3B-II, og det er dette båndet som benyttes til å se på autofagi i cellelinjene. Fordi de to LC3B-båndene ligger svært nært hverandre, er det vanskelig å få kvantifisert kun det båndet som omhandler autofagi og samtidig klare å unngå at det andre båndet påvirker resultatene (f.eks. ved at det kommer med i området som definerer bakgrunnsignalene). I tillegg kan båndene gå i hverandre, slik at det er vanskelig å separere dem. Dette gir stor usikkerhet i kvantifiseringen.

I henhold til de basale signalene vist i figur 3.8 er det mye variasjon i det basale uttrykket av LC3B-II mellom alle klonene, og også innad for hver klon mellom eksperimentene. Klon 2 er den med minst

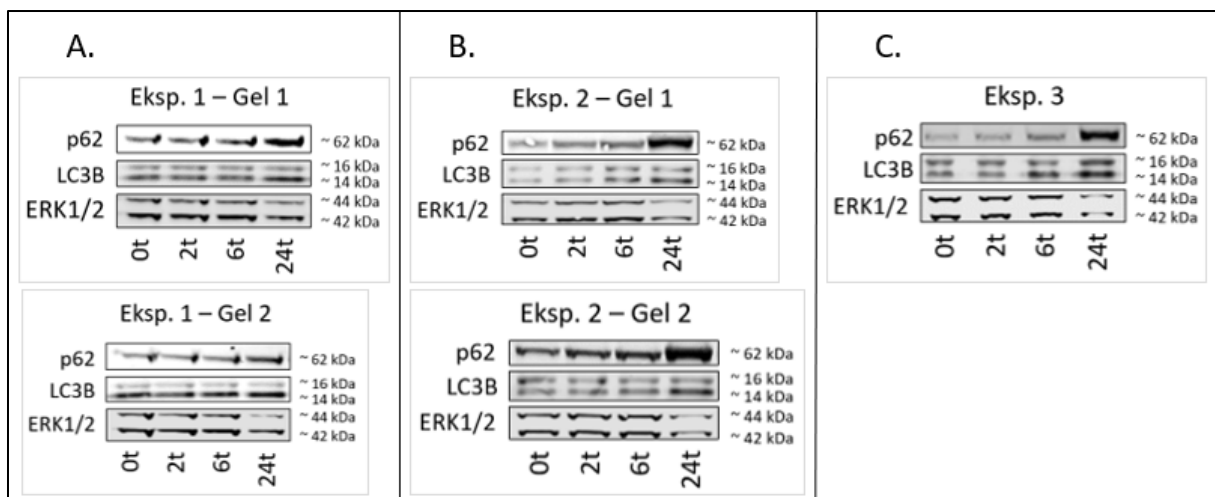
variasjon og har et LC3B-II-nivå som ligner mest på den opprinnelige cellelinjen. Klon 5 har tydelig lavere basalt nivå av LC3B-II, men her er det kun gjort to eksperimenter. For klon 8 kan det se ut som nivået av LC3B-II er høyere enn hos originalcellelinjen, men også her er det kun to eksperimenter og for denne klonen er det stor variasjon mellom disse eksperimentene. For klon 4 og klon 6 er det også svært store variasjoner mellom eksperimentene, hvilket gjør det vanskelig å konkludere om graden av heterogenitet i basale LC3B-II-nivå.

3.3 Autofagiflux

Ett av hovedmålene med oppgaven var å undersøke om det foreligger forskjeller i autofagiflux mellom de ulike cellevariantene. For å finne ut av dette, ble 66cl4 og klonene behandlet med BafA1 som er en autofagi-hemmer. Den basale verdien blir her omtalt som 0t, da den ikke blir behandlet med BafA1, og ble satt til den relative mengden 1. Avlesningene fra de behandlede prøvene ble så justert etter denne og fikk da et relativt signal i henhold til kontrollen.

3.3.1 66cl4

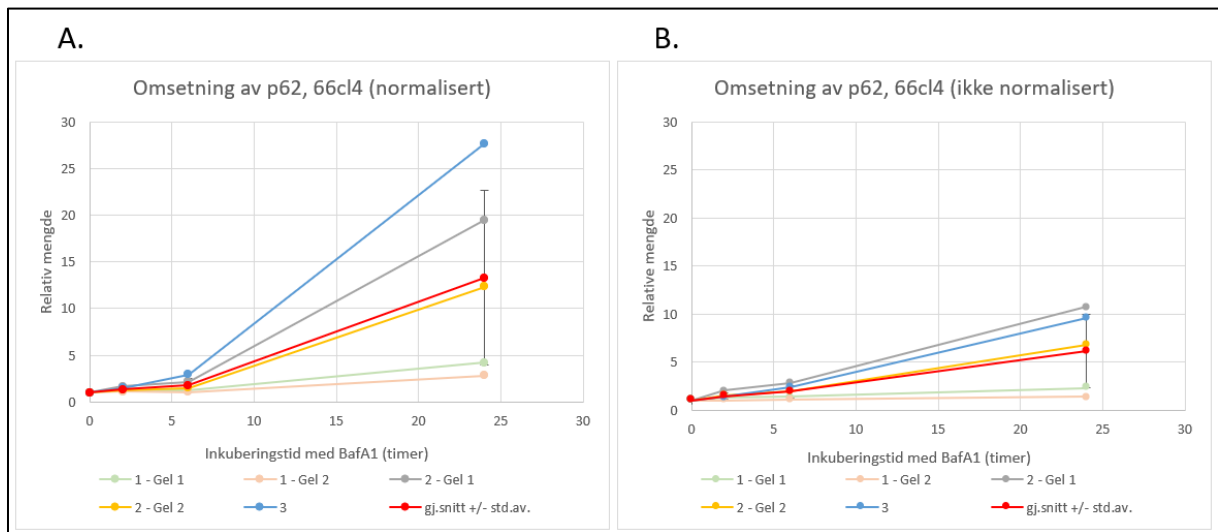
Autofagiflux for den opprinnelige cellelinjen 66cl4 ble vurdert ved å se på nivå av p62 og LC3B-II etter BafA1-behandling i opptil 24 timer. Western Blottene er vist i figur 3.9 og verdiene fra kvantifiseringene er presentert i vedlegg 4.



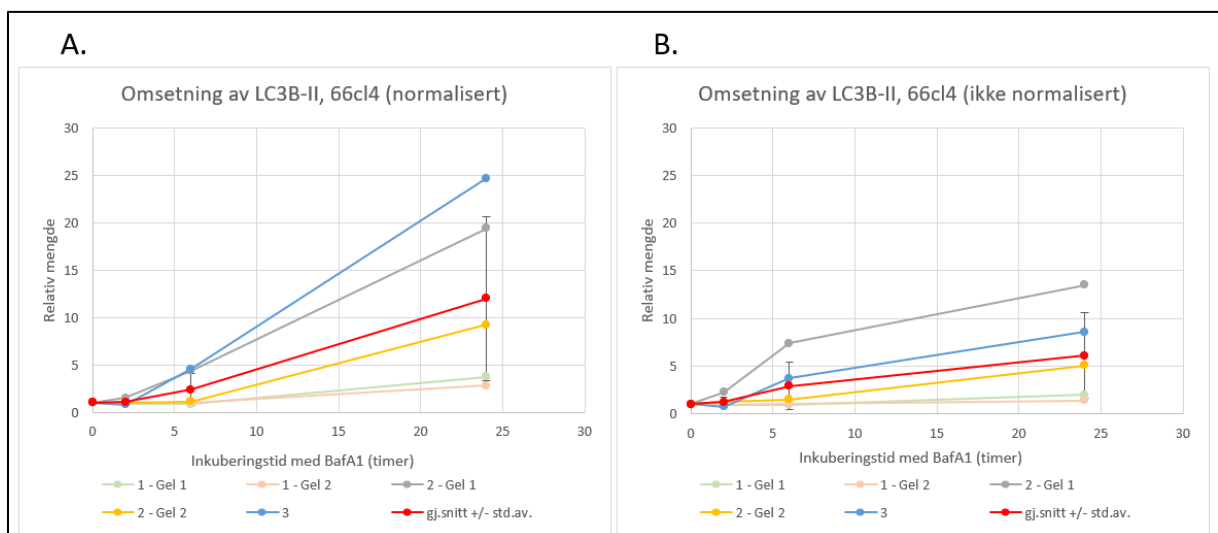
Figur 3.9: Nivå av p62, LC3B og ERK1/2 i 66cl4 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A er fra eksperiment 1, gel 1 og 2, B er fra eksperiment 2, gel 1 og gel 2, og C er fra eksperiment 3.

I figur 3.9 er det en tydelig observerbar nedgang av ERK1/2 i 24t-brønner på alle gelene. Dette vekker spørsmålet om ERK er egnet til å benyttes som en kontroll for mengde protein påsatt gelene («loadingkontroll»). En forutsetning for å kunne brukes til dette, er at uttrykket av proteinet holder seg konstant ved de aktuelle forsøksbetingelsene. For å se på påvirkningen ERK har på avlesningene,

settes avlesningene som er normalisert med ERK opp mot avlesningene som ikke er normalisert med ERK. Dette presenteres i figur 3.10 for p62 og figur 3.11 for LC3B-II.



Figur 3.10: p62 i 66cl4 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer, relativt til ubehandlet kontroll. A er normalisert mot ERK1/2, B er ikke normalisert mot ERK1/2



Figur 3.11: LC3B-II i 66cl4 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer, relativt til ubehandlet kontroll. A er normalisert mot ERK1/2, B er ikke normalisert mot ERK1/2

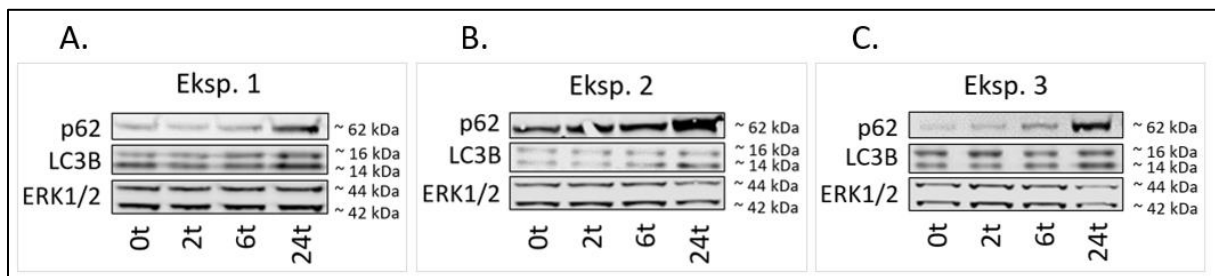
Det er stor variasjon i nivå for både p62 og LC3B-II mellom hvert forsøk, og variasjonen øker utover i forsøkene slik at det særlig ved 24 timer er store forskjeller. I de normaliserte kurvene er denne spredningen betydelig mye større, hvilket kommer av at nivåene av ERK1/2 går ned som følge av BafA1-behandlingen, særlig etter 24 timer. Dette forsterker forskjellene. Ved å ikke normalisere mot ERK1/2 blir denne spredningen mindre for både p62 og LC3B-II. Noe spredning er fortsatt observerbart, men den er betydelig mindre uten normaliseringen enn med.

Ettersom ERK1/2 har fått et svakere uttrykk i 24t prøvene i alle eksperimentene, er det klart at ERK1/2 ikke er egnet som kontrollprotein i dette forsøket. Om man normaliserer resultatene med ERK1/2, vil

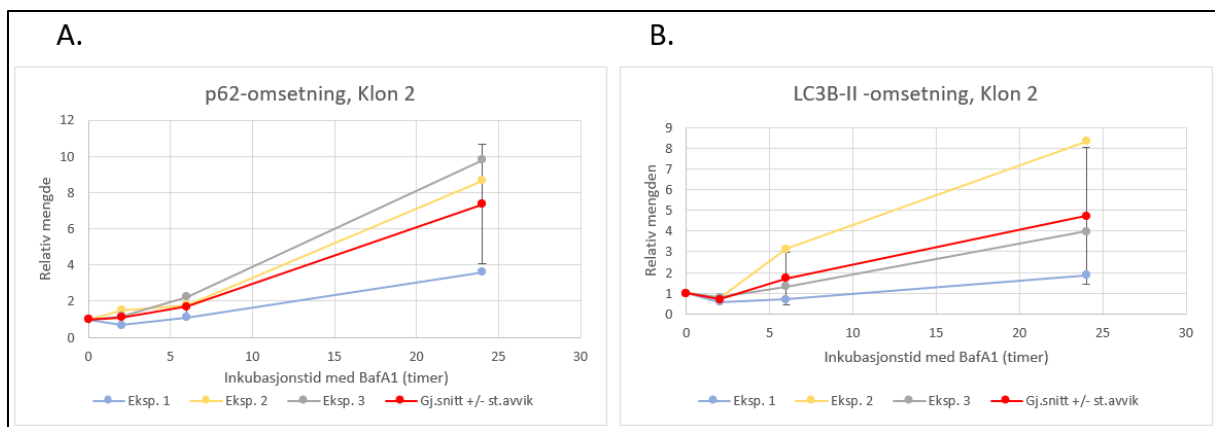
man gi et uriktig bilde av endringene i p62 og LC3B-II og dermed autofagifluxen. Det ble derfor bestemt at det ved beregningene som skulle benyttes til å lage grafene kun skulle brukes ikke-normaliserte tall.

3.3.2 Klon 2

Autofagiflux for klon 2 ble vurdert ved å se på nivå av endringer i nivå av p62 og LC3B-II etter BafA1-behandling i opptil 24 timer. Western Blottene er vist i figur 3.12. Grafene i figur 3.13 er basert på ikke normaliserte verdier presentert i vedlegg 4.



Figur 3.12: Nivå av p62, LC3B og ERK1/2 i klon 2 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser eksperiment 1, B viser eksperiment 2 og C viser eksperiment 3.

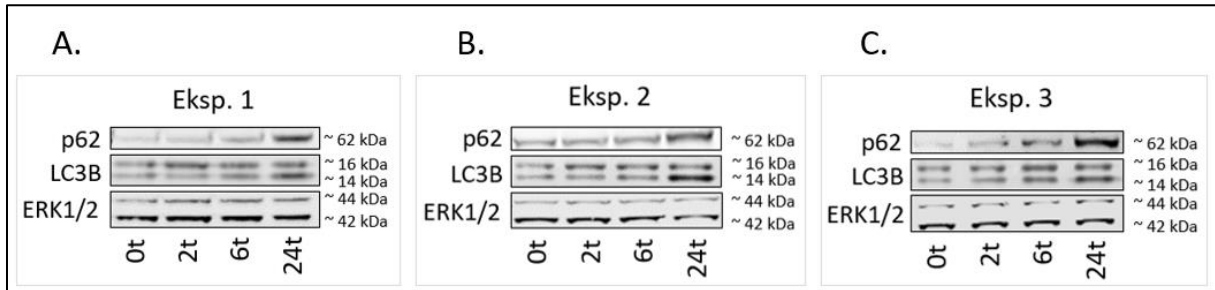


Figur 3.13: p62- og LC3B-II-omsetningen i klon 2 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser p62 og B viser LC3B-II

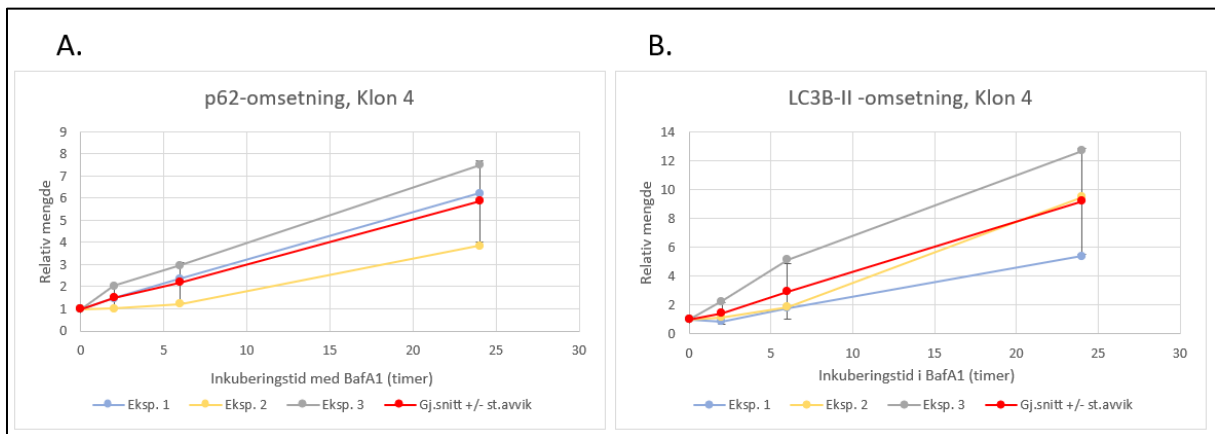
Klon 2 viser liten endring i forekomst av ERK1/2 ved BafA1-behandling i eksp.1, men det i eksp. 2 og 3 er tydelig at nivået endres over tid. Dette underbygger at det er de ikke-normaliserte signalene som benyttes i grafene i figur 3.13. p62-omsetningen har en tydelig økning i alle eksperimentene. Det er ett eksperiment som skiller seg ut fra de andre (eksp.1) hvor effekten av BafA1-behandlingen er klart mindre, og dette er bakgrunnen for det store standardavviket i grafen. Også for LC3B-II ser man at det i eksperiment 1 er en klart lavere effekt av BafA1-behandlingen. Her skiller eksperiment 2 seg ut med en kraftig akkumulering av LC3B-II, og de store forskjellene mellom forsøkene gir, som for p62, et stort standardavvik. Det kan her se ut som om det i klon 2 er en høyere omsetning av p62 enn av LC3B-II, men de store standardavvikene gjør at forskjellen ikke er signifikant.

3.3.3 Klone 4

Autofagiflux for klon 4 ble vurdert ved å se på nivå av endringer i nivå av p62 og LC3B-II etter BafA1-behandling i opptil 24 timer. Western Blottene er vist i figur 3.14. Grafene i figur 3.15 er basert på ikke normaliserte verdier presentert i vedlegg 4.



Figur 3.14: Nivå av p62, LC3B og ERK1/2 i klon 4 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser eksperiment 1, B viser eksperiment 2 og C viser eksperiment 3.

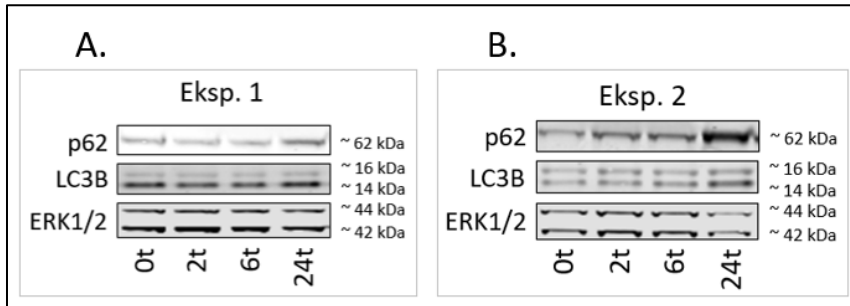


Figur 3.15: p62- og LC3B-II -omsetningen i klon 4 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser p62 og B viser LC3B-II

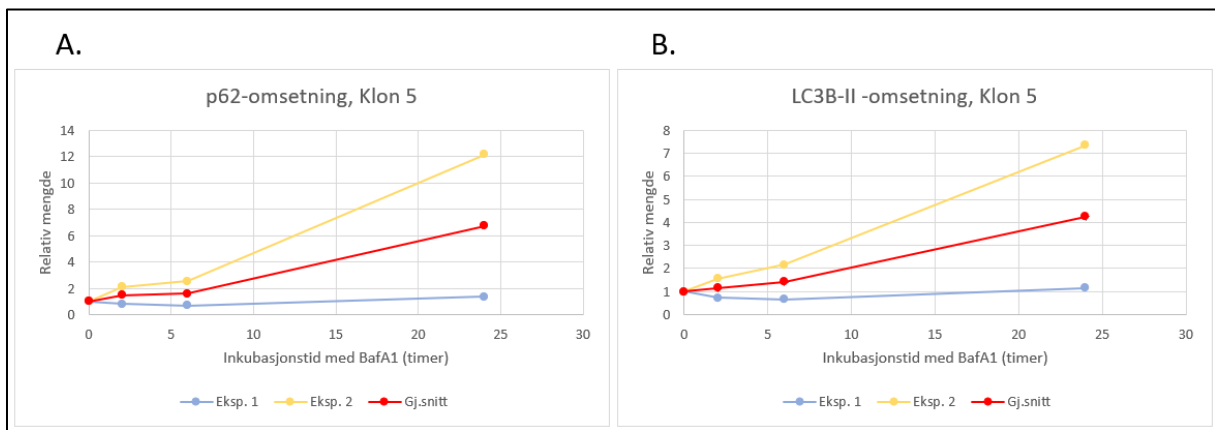
Klon 4 har noe mindre forskjeller i effekten av BafA1 mellom eksperimentene enn hva klon 2 har, men det er fortsatt betydelig avvik mellom eksperimentene. For p62 skiller eksp. 2 seg ut med en lavere økning enn ved de andre eksperimentene. For LC3B-II er det vanskelig å si om noen av eksperimentene skiller seg ut fra de andre da resultatene er jevnt fordelt over gjennomsnittsgrafen. Den relative økningen til LC3B-II kan tilsynelatende se ut til å være større enn for p62 i denne klonen, men det høye standardavviket gjør også her (som for klon 2) at akkumulering av disse to autofagimarkørene ikke er signifikant forskjellig.

3.3.4 Klon 5

Autofagiflux for klon 5 ble vurdert ved å se på nivå av endringer i nivå av p62 og LC3B-II etter BafA1-behandling i opptil 24 timer. Western Blottene er vist i figur 3.16. Grafene i figur 3.17 er basert på ikke normaliserte verdier presentert i vedlegg 4.



Figur 3.16: Nivå av p62, Lc3B og ERK1/2 i klon 5 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser eksperiment 1 og B viser eksperiment 2.

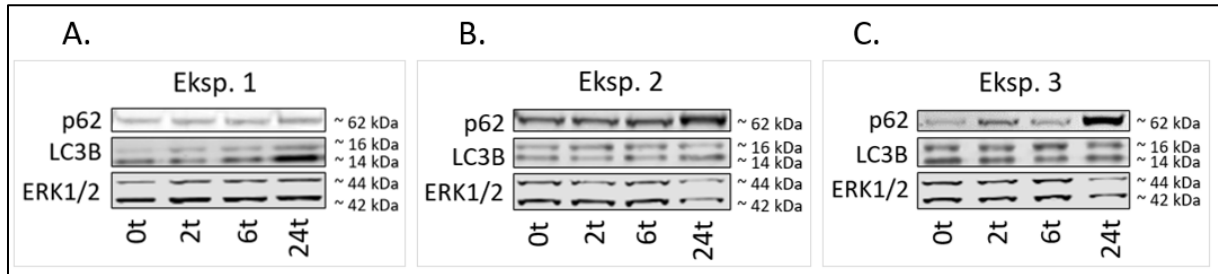


Figur 3.17: p62- og LC3B-II-omsetningen i klon 5 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser p62 og B viser LC3B-II.

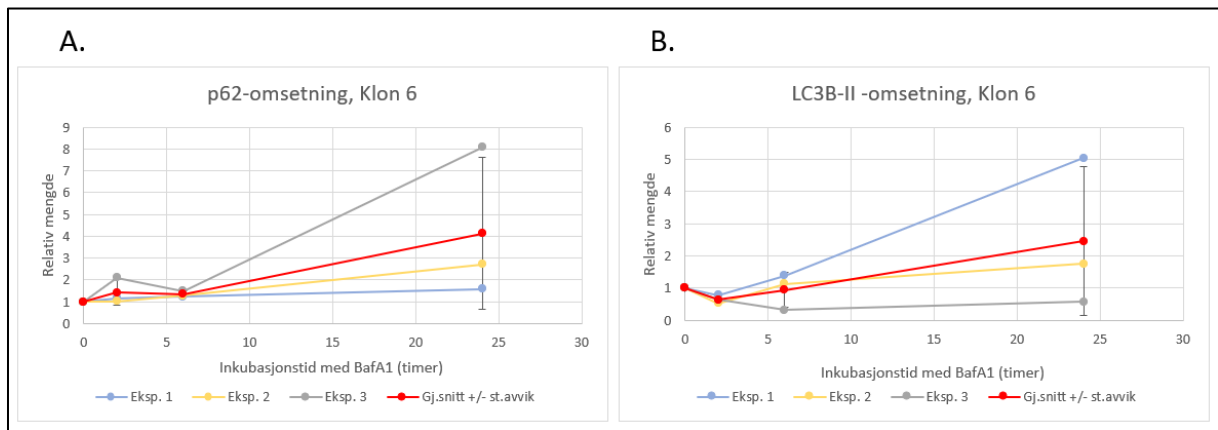
Vurdering av autofagiflux for klon 5 er vanskelig, ettersom det er veldig stor forskjell i effekten av BafA1 i de to eksperimentene som ble gjennomført. I eksperiment 1 er det veldig liten effekt av BafA1, både på nivå av p62 og av LC3B-II. I eksperiment 2, derimot, er det en veldig bra effekt og en tydelig akkumulering av begge autofagimarkørene. Fordi det kun er to tilgjengelige forsøk, er det satt opp en gjennomsnittskurve, men det er ikke gjort beregninger av standardavvik.

3.3.5 Klon 6

Autofagiflux for klon 6 ble vurdert ved å se på nivå av endringer i nivå av p62 og LC3B-II etter BafA1-behandling i opptil 24 timer. Western Blottene er vist i figur 3.18. Grafene i figur 3.19 er basert på ikke normaliserte verdier presentert i vedlegg 4.



Figur 3.18: Nivå av p62, LC3B og ERK1/2 i klon 6 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser eksperiment 1, B viser eksperiment 2 og C viser eksperiment 3.

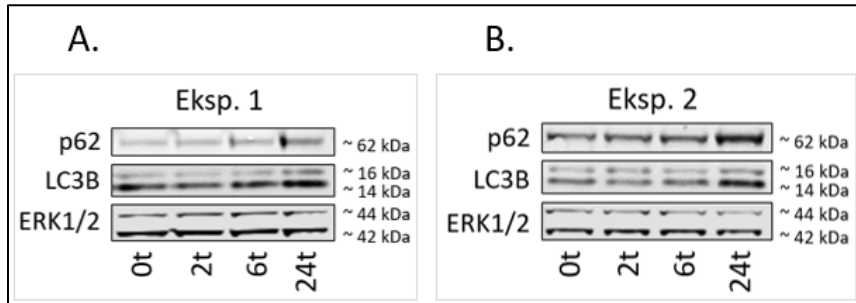


Figur 3.19: p62- og LC3B-II -omsetningen i klon 6 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser p62 og B viser LC3B-II

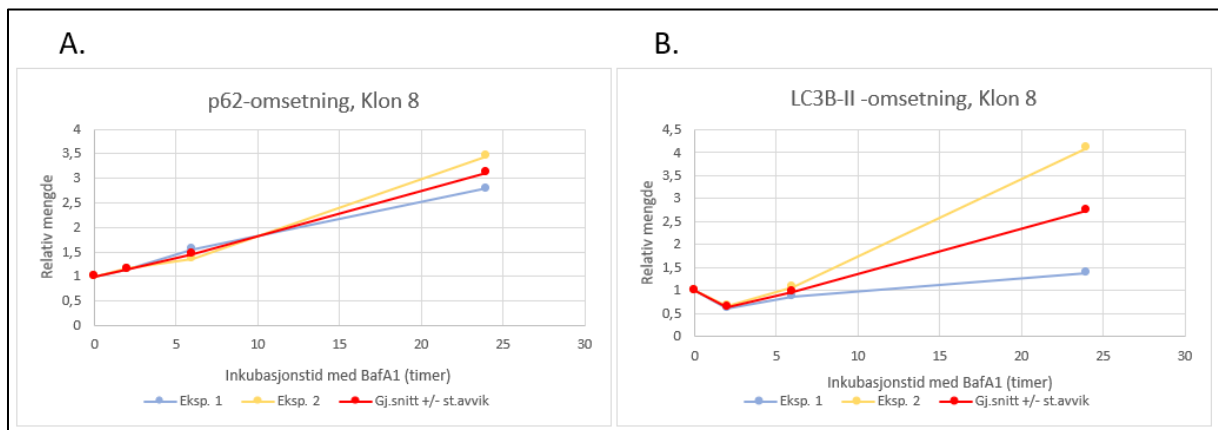
Klon 6 viser store forskjeller i effekten av BafA1 mellom eksperimentene, spesielt etter 24 timers inkubasjonstid. I begge grafene kommer det frem at et av eksperimentene viser en betydelig høyere akkumulering av den aktuelle autofagimarkøren i grafen. For p62 er dette eksp. 3 og for LC3B-II er dette eksp. 1. De forøvrige resultatene i figur 3.19 viser en relativ liten effekt av langtidshandling med BafA1, som tyder på en lav autofagiflux. Det er likevel vanskelig å sikkert vurdere dette, da det er stor variasjon mellom eksperimentene.

3.3.6 Klon 8

Autofagiflux for klon 8 ble vurdert ved å se på nivå av endringer i nivå av p62 og LC3B-II etter BafA1-behandling i opptil 24 timer. Western Blottene er vist i figur 3.20. Grafene i figur 3.21 er basert på ikke normaliserte verdier presentert i vedlegg 4.



Figur 3.20: Nivå av p62, LC3B og ERK1/2 i klon 8 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser eksperiment 1 og B viser eksperiment 2.

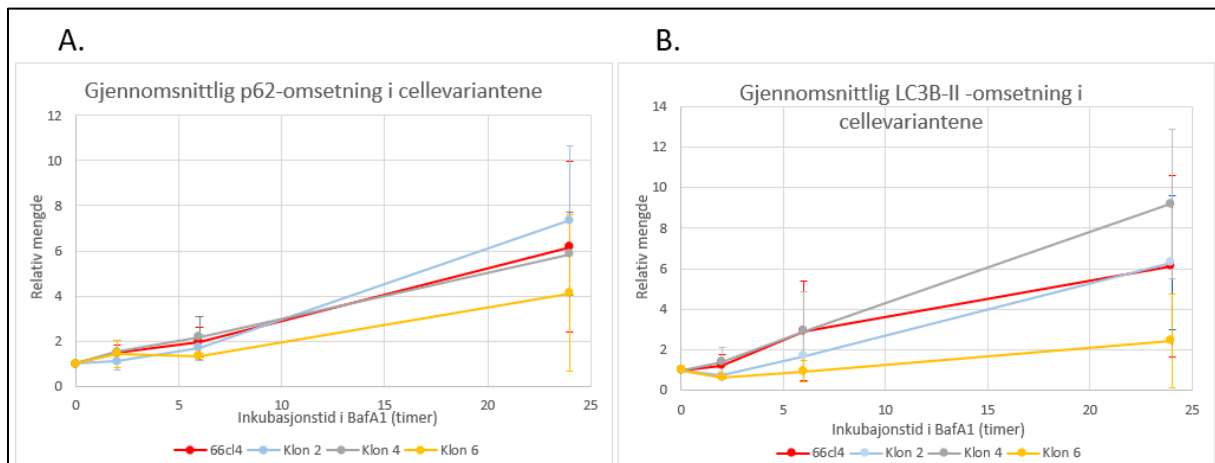


Figur 3.21: p62- og LC3B-II-omsetningen i klon 8 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser p62 og B viser LC3B-II.

Klon 8 viser lite forskjeller i effekten av BafA1 mellom eksperimentene for p62. LC3-II omsetningen derimot viser større forskjeller mellom eksperimentene, med en lav akkumulering under eksp. 1 og en større akkumulering under eksp. 2, spesielt merkbar etter 24 timer inkubasjon. Fordi det er kun to tilgjengelige forsøk, er det satt opp en gjennomsnittskurve, men det er ikke gjort noen beregninger av standardavvik.

3.3.7 Sammenligning av omsetningen til de ulike klonene

Autofagiflux for klonene sammenlignes for å se om det er signifikante forskjeller mellom akkumulering av autofagimarkørene mellom de ulike klonene, og om klonene avviker signifikant fra den opprinnelige cellelinjen. Gjennomsnitts-omsetningen av p62 og LC3B-II for 66cl4 og tre av klonene er presentert i figur 3.22. Klon 5 og klon 8 er utelatt fra begge grafene ettersom disse kun inngikk i to eksperimenter og det er således ikke mulig å beregne noe standardavvik for dem.



Figur 3.22: Gjennomsnittlig p62- og LC3B-II-omsetning 66cl4, klon 2, klon 4 og klon 6 etter behandling med BafA1 i 2, 6 og 24 timer. A viser p62 og B viser LC3B-II.

Av grafene i figur 3.22 kommer det frem at alle klonene har samme tendens som den opprinnelige cellelinjen med en økende akkumulering av autofagimarkørene etter økende inkubasjonstid med BafA1. Det kommer også frem at klon 6 har gjennomsnittlig lavere p62-omsetning enn den opprinnelige cellelinjen, og klon 2 har gjennomsnittlig høyere p62-omsetning enn den opprinnelige cellelinjen. Klon 4 har en høyere LC3B-II omsetning enn den opprinnelige cellelinje, og klon 6 har den gjennomsnittlig laveste omsetningen av LC3B-II blant alle klonene og er betydelig lavere enn den opprinnelige cellelinjen. Imidlertid er det store variasjoner mellom eksperimentene, hvilket gjenspeiles i de store standardavvikene, hvor standardavviket til 66cl4-cellelinjen overlapper med standardavvikene til alle klonene i figuren. Det kan allikevel observeres at det er ingen overlapp mellom standardavvikene til klon 4 og klon 6 i LC3B-II omsetningen, som er en indikasjon på at det kan være en viss forskjell i autofagiflux mellom disse klonene.

4 Diskusjon

Ulikheter i morfologi

Ved undersøkelse av 66cl4 og de forskjellige klonene i mikroskop, ble det observert morfologiske forskjeller mellom klonene, vist i figur 3.1. 66cl4 og de fleste av klonene hadde utstrakte celler med asymmetrisk form, både underveis i dyrkningsprosessen (ved lav konfluens) og ved høsting av kulturene (høy konfluens). Klon 6 var derimot mer rund og kompakt i utseende. Forskjellen var særlig tydelig når cellene var subkonfluente, men også i forbindelse med høsting, altså når alle cellevariantene var omtrentlig 90-100% konfluente eller postkonfluente (kun klon 6). Vi anser forskjellen i morfologi som betydelig og et tegn på heterogenitet i 66cl4-cellelinjen. Det ville vært svært interessant å vite om slike morfologiske ulikheter også er mulig å observere hos andre kloner isolert fra 66cl4, eller om det kun er klon 6 som skiller seg ut her.

Ut fra forskningsgruppas tidligere erfaringer med den opprinnelige cellelinja, er det kjent at disse cellene kan være veldig vanskelig å få gode cellesuspensjoner av. Cellene sitter veldig godt fast til underlaget og til hverandre, og det er derfor vanskelig å oppnå enkeltcelle-suspensjoner. På grunn av høy sannsynlighet for aggregater i flere av cellesuspensjonene, er det knyttet usikkerhet til målingen av cellestørrelse ved telling i Coulter Counter. Dette fremgår også i figur 3.2 hvor er åpenbart at det har vært veldig problematisk å oppnå enkeltcelle-suspensjoner, og at det har variert veldig fra gang til gang hvorvidt en cellevariant har gitt en cellesuspensjon med mange aggregater (bred topp) eller få aggregater (smal topp). Den store variansen gjør også at det ikke er mulig å påvise noen signifikant forskjell i cellestørrelse ut fra resultatene her (se tabell 3.1).

Om en derimot tar utgangspunkt i cellestørrelse for de beste cellesuspensjonene, med smalest topp for hver cellelinje, og antar at det i disse er oppnådd rimelig representative resultater for cellelinjen, vil en kunne se noe ulikhet i cellestørrelsen. For 66cl4 og klon 2 er tellingen fra 26.03 best, hvor de har en gjennomsnittlig størrelse på hhv. 11,27 og 11,31 μm . Klon 5 har beste cellesuspensjon 19.05 med en snittstørrelse på 11,45 μm , og for klon 8 er 11,21 μm 22.03 trolig mest representativ. Klon 6 har best cellesuspensjon 15.03, og ser ut til å ha en noe lavere gjennomsnittlig cellestørrelse enn resten av variantene, på 10,78 μm . Dette kan ha sammenheng med at klon 6 også har høyere celletellinger og ulik morfologi enn de andre variantene. Klon 4 har ingen gode cellesuspensjoner, og grafene tyder på store vanskeligheter med å få enkeltceller. Dette gjør mest representative cellestørrelse vanskelig å bestemme, men det er ikke umulig at klon 4 er noe større enn resten av variantene, slik gjennomsnittsstørrelsen viser. Klon 4 ser ut til å være vanskeligere å skille i enkeltceller enn resten av variantene, noe som kan ha ulike årsaker. Det er selvsagt mulig at det kun kommer av feil i praktisk gjennomføring av separasjonen, men siden samme problem oppstår ved alle tellingene, er det også en betydelig mulighet for at det er egenskaper hos selve klonen som forårsaker utfordringene. En mulig slik egenskap er endret

uttrykk av adhesjonsmolekyler på cellenes overflate, slik at de sitter bedre fast i hverandre og er vanskeligere å bryte opp enn de andre variantene.

For å avgjøre om dette er reelle forskjeller mellom cellevariantene eller kun et resultat av tilfeldig variasjon, bør eksperimentet gjentas flere ganger med særlig fokus på konsekvent teknikk, lik trypsinering av cellekulturene og nøye tillaging av suspensjoner.

Under arbeid med 66cl4-cellelinjen og de ulike klonene, ble det observert tydelig gulere medium hos klon 4 enn alle de andre. Mediet som ble brukt er tilsatt pH-indikatoren fenolrødt, som har omslag fra klarrosa til gul/oransje fra pH 7.5. Fargen på mediet kan dermed fortelle oss noe om cellenes metabolisme, da de danner melkesyre som et biprodukt av denne. Dette forsurer cellekulturen og gjør fargen på mediet gulere. At klon 4 har så mye gulere medium enn alle de andre indikerer en betydelig økt aerob glykolyse, noe som fører til utskillelse av melkesyre, og dermed lavere pH og omslag i indikatoren. Det er også særlig interessant at klon 4, som har blant de laveste celletallene ved alle tellinger, har hatt stor nok metabolsk aktivitet til å endre pH i mediet så betydelig, når andre kloner med flere celler påvirket pH i sitt miljø mindre. Det var observert litt variasjon mellom de andre klonene, men ingen så tydelig og konsekvent som for klon 4. Det ble også observert noe gulere medium hos alle cellekulturene ved det siste eksperimentet, men årsaken er ukjent. Dette kan være observasjonsfeil, da fargeobservasjon ikke er standardisert og derfor vanskelig å påvise.

Veksthastighet

Ved hver av utsåing av cellelinjene ble det sådd ut samme antall celler for 66cl4 og hver klon. Antall celler som ble sådd ut var basert på en delingsrate på ca. 1 deling per døgn, og ble tilpasset til om cellene skulle dyrkes i 3 eller 4 dager før neste høsting og telling, med like mange utsådde celler av alle klonene og 66cl4. Dersom alle cellevariantene hadde hatt samme veksthastighet som 66cl4, skulle man da optimalt ha oppnådd samme grad av konfluens og samme celletall for den enkelte cellevariant ved hver høsting. Likevel har celletallene til de ulike klonene ved høsting et vidt spenn i verdier. Selv ikke for 66cl4 er celletallene lik etter 3 dager og 4 dager i kultur; det ble konsekvent høyere celletall etter 4 dager enn etter 3 dager til tross for at antall utsådde celler var justert for dyrkningstid. Ulik veksthastighet for cellevariantene har flere mulige følgefeil, inkludert at det på tidspunktene for BafA1-tilsetning var veldig ulikt antall celler som ble behandlet (noe som kan ha gjort at effekten av BafA1-behandlingen kan ha blitt ulik for variantene), og at antall celler høstet for å lage proteinekstrakt varierte mye. Ved en eventuell gjentakelse av forsøket bør en unngå denne variasjonen som kommer av antall vekstdager og ulike celletall for disse dagene, eller justere antall utsådde celler basert på resultatene av flere forsøk, og gjøre nøyere undersøkelser av veksthastighet for å få likere tellinger og tetthet i de ulike celleeksperimentene.

Det var variasjoner også i konfluens ved høsting mellom eksperimentene innad i enkelte cellelinjer. En av klonene hadde en observert konfluens på 35-40% i brønnen behandlet med BafA1 i 24 timer ved høsting i ett eksperiment, mens i et annet eksperiment hadde klonen konfluens på omtrent 80% i tilsvarende brønn. Det er vanskelig å si sikkert hvorfor det ble slik, og variasjoner i konfluens kan til dels være på grunn av at observasjonene ikke er standardiserte og gjort av ulike personer, men en sterkt medvirkende årsak er trolig at det var store problemer med å lage enkeltcellesuspensjoner av cellekulturene til utsåing. Dersom cellene fremdeles er aggregerte ved telling vil ikke tellingen gi et riktig antall celler, da flere små, sammenhengende celler vil telles som en stor. Dette ser en klare tegn på at har hendt på avbildningene av cellefordelingskurvene, figur 3.2. Når en bruker celletallene fra en slik telling til å beregne hvor mye celledensitet som skal sås ut videre vil en ende opp med å så ut flere celler enn ønsket, og antallet utsådde celler vil heller ikke være likt for de ulike cellevariantene eller mellom eksperimentene. Dette vil føre til forskjeller både i konfluens og celletall ved neste høsting, og underveis i eksperimentet.

Enzymet trypsin benyttes til å bryte bindinger mellom cellene, og mellom cellene og dyrkningsflasken, og er derfor avgjørende for å få en enkeltcellesuspensjon. Under splitting av cellene var det nødvendig med lengre behandling med trypsin-EDTA for å få enkeltceller enn det som vanligvis er anbefalt, opp til nærmere en halv time, mot normalt rundt 5 minutter. Selv med lengre behandlingstid var det ikke alltid mulig å få separert cellene. Behovet for lengre virkningstid kan være tegn på at det er benyttet for lavt volum av trypsin, og en økning vil mulig kunne ha redusert virkningstiden og forbedret separasjonen av cellene. Ved lang trypsinbehandling er det fare for at trypsinet også bryter ned andre cellemembranproteiner, og etter hvert påfører cellen skade. Slike skader kan teoretisk ha ført til påvirkning av autofagiresponsen til cellene, men dette er ikke mulig å påvise i disse eksperimentene.

For å finne den beste måten å presentere veksthastigheten ble tre ulike metoder utprøvd; totalt celletall (ved høsting) uten justeringer, celletall ved høsting delt på antall utsådde celler, og celletall ved høsting justert i henhold til antall dager i kultur. Av disse tre ble det bestemt at celletall pr. dag i kultur er den beste måten å presentere celletallene, da denne ga tall som ble mest like (det ble minst variasjon mellom celletall oppnådd etter 3 og 4 dagers dyrking) for den enkelt cellevariant. Ved å justere celletallene for antall dager i kultur ble det således enklere å kunne få frem forskjeller i veksthastighet mellom de ulike cellevariantene.

Det kommer tydelig frem at klon 6 hadde de høyeste celletallene ved hver høsting og dermed den høyeste vekstraten. Hos denne klonen ble det observert den høyeste konfluensen (alltid 100% eller postkonfluent) ved observasjon før høsting, og selv ved vanskeligheter med å få enkeltceller, og dermed større sannsynlighet for å få lavere celletall enn hva som reelt var tilfellet, hadde klonen de høyeste celletallene. De høye celletallene stemmer også godt overens med den observerte endringen i

morfologi; cellene i denne klonen var mindre utstrakte enn de øvrige cellevariantene og dermed kunne ha plass til flere celler før det ble oppnådd konfluens.

Klon 4 har jevnt over det laveste celletallet, unntatt ved siste høsting. Dette tyder på at klon 4 vokser saktere enn 66cl4-cellelinjen og de andre klonene, noe som ble gjenspeilet i at denne klonen hadde jevnt over den lavest observerte konfluensen (rundt 70 %) ved høstingene.

Klon 2 har omtrent samme vekstrate som 66cl4, kun noe lavere. For klon 5 og klon 8 foreligger det celletall fra kun to høstinger, noe som er for lite til å determinere hvordan vekstraten til disse klonene er.

Det er altså her vist at det foreligger heterogenitet mellom de ulike cellevariantene når det kommer til vekstrate. Av fem undersøkte kloner, er det én som vokser raskere og én som vokser saktere enn den opprinnelige 66cl4-cellelinjen. Om en gjorde samme eksperiment med et stort antall kloner fra 66cl4 skulle gjennomsnittet av klonenes veksthastighet tilsvart den for 66cl4, men siden en her kun har brukt fem utvalgte kloner, kan en ikke sammenligne gjennomsnittlig veksthastighet hos klonene med den opprinnelige cellelinjen.

Basale nivåer av p62 og LC3B-II

Det var her et mål å se på den basale forekomsten av autofagimarkørene p62 og LC3B i den opprinnelige cellelinjen 66cl4 og de 5 utvalgte klonene. Graden av heterogenitet skulle vurderes, og i figur 3.6 er det vist en grafisk fremstilling av basale nivåer av p62 normalisert mot ERK1/2. Som det fremgår av figuren, har 66cl4 et høyere gjennomsnittlig nivå av p62 enn alle klonene. Etter 66cl4, er gjennomsnittlige p62 nivåer fra høyest til lavest klon 6, klon 4, klon 8, klon 2 og klon 5. Imidlertid er det for nesten alle kloner et veldig stort avvik i p62-nivå fra eksperiment til eksperiment. Generelt er det slik at et redusert p62-nivå basalt kan komme av enten redusert autofagi, hvor p62 er nedregulert og dermed mindre uttrykt, eller at autofagifluxen er høyere slik at mer p62 er omsatt. De store variasjonene her gjør det dessverre umulig å skulle avgjøre om det er signifikante forskjeller i basalt nivå av p62 mellom de ulike cellevariantene som ble undersøkt. Det kan være flere mulige årsaker til dette store avviket.

Som tidligere nevnt ble det observert at det var tildels betydelige forskjeller i cellenes tetthet ved høstingstidspunktet. Dette kan ha påvirket cellenes uttrykk av autofagimarkørene, uten at dette er nærmere undersøkt her. I tillegg kommer feilkilder knyttet til kvantiteringen av proteinene på Western Blott membranene. På enkelte av membranene var det stor grad av uspesifikk binding av sekundærtantistoff, noe som gjorde kontrasten mellom membranbakgrunnen og selve proteinbåndet dårlig. Dette kan redusere signalet av proteinbåndet, særlig om det også er lavt innhold av protein eller finnes andre forstyrrelser i bakgrunnen. Noen av proteinbåndene var også dårlig definert, enten ved at

de ble for utstrakte horisontalt eller fikk vertikale «haler». Dette gjør det vanskelig å separere ulike bånd fra hverandre og å få med hele båndet, og signalene blir derfor mindre spesifikke for det enkelte båndet. I noen tilfeller var det også dukket opp små bobler i selve båndene som forstyrret signalene. Alle de nevnte forholdene kan føre til enten for høye eller for lave verdier av p62 og LC3B-II.

Avviket på basale nivå av p62 mellom hvert eksperiment kan også komme ved at det er tre ulike personer som har gjennomført eksperimentene. Dette kan føre til avvik i fremgangsmåte og teknikk i alle ledd (fra celletelling til utsåinger, behandling av celler med autofagihemmer, høsting av celler og laging av proteinekstrakter, applisering på geler, etc.), noe som kan ha påvirket resultatene og bidratt til variasjon.

Det ble som nevnt også undersøkt heterogenitet for autofagimarkøren LC3B. Som beskrevet i teoridelen, er lipidering av LC3B til LC3B-II et viktig trinn i autofagiprosessen, og forekomsten av LC3B-II kan brukes som en indikasjon på hvor mange autofagosomer en celle inneholder. Basalt nivå av LC3B-II normalisert mot ERK1/2 er presentert i figur 3.8. Fra denne figuren kan man se at gjennomsnittlige nivåer av LC3B-II i klon 8, klon 6, klon 4 og klon 2 (i synkende rekkefølge) er høyere enn 66cl4, og kun klon 5 er lavere. Imidlertid er det slik at nesten alle klonene har et stort avvik mellom eksperimentene, spesielt klon 4 og klon 6, og for to av klonene (klon 5 og 8) er det kun gjennomført to eksperimenter. I sum medfører dette at det er ikke mulig å si om det er signifikante forskjeller i basalt nivå av LC3B-II i disse klonene. Årsaken til en stor variasjon mellom klonene kan være de samme som ga stor variasjon for p62, som diskutert tidligere.

Autofagiflux

Det var et sentralt mål i oppgaven å få undersøkt om de ulike cellevariantene hadde ulik autofagiflux. For å undersøke dette ble cellene behandlet med BafA1 som inhiberer autofagi.

ERK 1/2 ble valgt som «loadingkontroll» i eksperimentene, da det var forventet at ERK 1/2 ikke skulle påvirkes av BafA1. For 66cl4 er det sammenlignet hvordan omsetningen av p62 og LC3B-II fremstår avhengig av om signalene er normalisert mot ERK1/2 eller ikke. I figur 3.10 og 3.11 fremkommer det da at det blir veldig mye større variasjon mellom forsøkene ved å bruke normaliserte verdier. Dette skyldes at nivået av ERK1/2 går tydelig ned etter 24 timer BafA1-behandling, som vist i figur 3.9. Den samme nedgangen ble observert for alle cellevariantene. Det er nærliggende å trekke konklusjonen at det for disse cellene ved de aktuelle betingelsene ikke var mulig å normalisere verdiene mot ERK1/2, og ERK1/2 er derfor uegnet som «loadingkontroll» i disse eksperimentene. Bruken av ERK1/2 var basert på forskningsgruppas tidligere erfaringer, og med andre cellelinjer har det ved 24 timers behandling med BafA1 ikke blitt observert endringer i nivå av ERK1/2. Hadde det vært mulig tidsmessig, skulle det her ha blitt lagt på andre antistoff mot andre

«loadingkontroller», for eksempel b-actin eller glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase, men det ble det ikke tid til her.

Resultatene for 66cl4 viser at den gjennomsnittlige omsetningen av p62 virker å være omtrent lik den gjennomsnittlige omsetningen av LC3B-II. Det er observert noe mer usikkerhet i LC3B-II-avlesningene enn i p62-avlesningene.

Klon 2 viser en tydelig akkumulering av både p62 og LC3B-II ved BafA1-behandling, og det kan se ut som den gjennomsnittlige p62-omsetningen er høyere enn LC3B-II-omsetningen. Imidlertid er det store variasjoner mellom forsøkene, slik at det er ingen signifikant forskjell i omsetningen av p62 og LC3B-II. For p62 skiller eksp.1 seg ut med en betydelig lavere effekt av BafA1 enn i de to andre parallellene, som også er tydelig på bildet av western blottet vist i figur 3.12. Også for LC3B-II er det tydelig at det i eksp.1 er svært liten effekt av BafA1. Ved å se på western blottet for eksp.1, fremgår det også at det i akkurat dette forsøket ikke er en nedgang i ERK1/2 etter 24 timer, slik det er i eksp.2 og 3. Dette er også en indikasjon på at BafA1 ikke har hatt samme effekt her som i de to andre forsøkene. Hva som er grunnen til dette, er litt uklart. Det kan ha vært unøyaktigheter ved tilsats av BafA1 (veldig små volumer), eller at cellenes tetthet var annerledes i dette forsøket enn i de andre. I tillegg til mulige variasjoner som påvirker selve biologien i forsøkene, så kommer også tekniske forhold inn. Ved behandling av de scannede membranene ble det for eksperiment 1 observert mye bakgrunnsstøy på membranen, og båndene hadde «hale», som gjorde det vanskelig å avgrense båndene man skulle kvantitere og derved få representative resultater.

En mulig årsak kan være proteinmålinger som overskred det lineære området for spektrofotometrimetoden som ble brukt. Metoden for proteinmåling var definert som lineær opp til en absorbans på ca. 0,6, og alle verdier over dette er tilknyttet en viss usikkerhet. Som vist i vedlegg 3 var flere av avlesningene høyere enn dette, noe som kan gi store avvik i proteinkonsentrasjonen i prøvene, og dermed feil mengde tilsatt protein på gel. Avlesningen av proteinbånd fra membran vil da også være usikker. Ved stor usikkerhet kan en ikke trekke fullstendige konklusjoner, og dersom det hadde vært tid til det i prosjektet ville prøvene blitt fortynnet mer, slik at alle absorbansavlesningene hadde vært innenfor lineært område.

Klon 4 viser en tydelig akkumulering av både p62 og LC3B-II, og det kan synes som om økningen er størst for LC3B-II. Imidlertid er det for klon 4 som for klon 2 så store variasjoner mellom eksperimentene, at det er ingen signifikant forskjell mellom omsetning av p62 og LC3B. For klon 4 er det verdt å merke seg at forholdet mellom de to båndene for ERK1 og ERK2 er annerledes enn hos de andre cellevariantene. Som det fremgår av bildene av Western Blottene, er det en lavere forekomst av den største formen av proteinet. Hvilke konsekvenser dette har for cellene er uklart, men ettersom ERK1/2 er viktig for intracellulær signalering, kan dette tenkes å være av betydning. Avviket i ERK1/2 har ingen betydning for evalueringen av autofagi-resultatene, ettersom det for autofagiflux-

beregningene uansett ikke ble benyttet normaliserte data. Denne klonen har imidlertid skilt seg ut med tanke på både vekst og metabolisme.

Ut fra denne klonens evne til å gjøre mediet gult, er det grunn til å tro at cellene her har en endret metabolisme og i større grad enn de andre variantene benytter seg av aerob glykolyse. Klonen danner melkesyre og dette gir en lavere pH i mediet som potensielt kan gjøre at cellene trives mindre og dermed kan føre til en minsket cellevekst. Dette er i overensstemmelse med våre observasjoner, hvor denne klonen viste seg å ha en lavere vekstrate enn de øvrige. Hvorvidt redusert veksthastighet kan ha noe med økt næringsbehov å gjøre på grunn av at cellene så ut til å foretrekke glykolyse fremfor en mer effektiv utnyttelse av næringen ved å bruke oksidativ fosforylering, er ikke gjort noe forsøk på å avklare her. Vi har f.eks. ikke undersøkt hvor mye glukose som var igjen i mediet ved høsting av celler etter 3 eller 4 dager i kultur.

Den økte glykolysen hos klon 4 gir en mindre effektiv utnyttelse av næring enn hva som oppnås ved oksidativ fosforylering, og som nevnt ovenfor kan dette potensielt innebære at disse cellene trenger mer tilgang på næring enn hva mediet kan tilby. Når autofagien blir stoppet, vil ikke klonen kunne resirkulere byggesteiner til vekst og overlevelse like godt som før. Dette kan medføre at cellene uttrykker mer og mer autofagi-proteiner for å øke autofagien, men da prosessen er stoppet av BafA1, vil det bli akkumulering av disse, noe en ser tendenser til med klonens økte omsetning av LC3B-II.

Klon 5 kan ikke trekkes noen konklusjoner om da det spriker veldig i observasjonene, og kun er gjennomført to eksperimenter. Dette gjør det vanskelig å vite hvilken som avviker mest fra det representative. Dermed er ikke klon 5 sammenlignbar med 66cl4-cellelinjen eller de andre klonene.

For klon 6 er det veldig stor variasjon mellom eksperimentene. Det er ingen systematikk i hvorvidt BafA1 har hatt en effekt. Eksempelvis er det for p62 en veldig klar akkumulering i eksp. 3, mens det for LC3B-II i samme forsøk er bortimot ingen endring. I eksperiment 1 er det helt motsatt, for her gir BafA1 en klar akkumulering av LC3B-II men ikke av p62. Hva som er bakgrunn for disse store variasjonene, er uklart. Ett mulig moment som kan spille inn er at dette er en klon som skiller seg ut fra de andre med å ha en klart høyere vekstrate. Dette kan potensielt ha gjort denne klonen spesielt utsatt for variasjoner ved utsåing og derved gitt mer variasjon i hvor tett cellene var fra eksperiment til eksperiment. Graden av konfluens kan tenkes å påvirke cellenes autofagiflux, men det er uklart hvorfor de to autofagimarkørene «oppfører» seg så ulikt. Det kan ikke utelukkes at denne klonen har en eller annen form for dysregulering av autofagi ettersom effektene på p62 og LC3B-II ikke synes å være koordinert i det hele tatt, men dette må undersøkes nærmere for å eventuelt kunne bekrefte.

Selv om ikke bakgrunnen for all variasjon i resultatene for klon 6 kan forklares så langt, så er det klart at denne klonen har gitt resultater som avviker fra 66cl4-cellelinjen og de øvrige klonene. Klonen hadde høyest celletall ved hver telling, høyest konfluens både i brønner (etter kun 2 dagers dyrking) og i flaske (etter 3 og 4 dager), hadde en mer kompakt morfologi, og synes å ha en noe lavere omsetning av

p62 og LC3B-II, altså en noe lavere autofagiflux. Det er mye usikkerhet tilknyttet klonen, men allikevel tyder observasjonene på at klon 6 er et eksempel på heterogenitet blant cellene i den opprinnelige cellelinjen 66cl4.

Klon 8 viser etter BafA1-behandling en graf med en jevn økning i p62, og de to gjennomførte eksperimentene viser lite avvik fra hverandre. For LC3B-II-omsetningen er det en betydelig større forskjell i resultatene fra de to eksperimentene, og det er derfor vanskelig å si noe om LC3B-II-omsetningen. Noe av bakgrunnen for de store variasjonene for LC3B-II kan komme av at proteinbåndene på membranen viser til dels sammenhengende bånd i eksp. 1, noe som kan gi vanskeligheter med kvantitering av proteinet. Det vil være nødvendig med flere eksperimenter for å fastslå hvordan den faktiske autofagifluxen er for denne klonen.

For å kunne vurdere heterogeniteten i autofagiflux, ble det forsøkt å sammenligne gjennomsnittlig omsetning av p62 og LC3B-II hos de ulike cellevariantene. To av klonene måtte utelates fordi de kun var brukt i to eksperimenter og ikke hadde et standardavvik som kunne sammenlignes med de øvrige klonene og 66cl4. Alle cellevariantene har imidlertid så store standardavvik, at når disse tas med i betraktningen er det ingen av klonene som har en omsetning av p62 eller LC3B-II som er signifikant forskjellig fra 66cl4.

Derimot observeres det ingen overlapp mellom standardavvikene til klon 4 og klon 6 i LC3B-II omsetningen, som er en indikasjon på at det kan være en viss forskjell i autofagiflux mellom disse klonene. Dermed blir det nødvendig med videre undersøkelser og gjentatte forsøk for å fastslå hvorvidt det faktisk er en forskjell i autofagiflux mellom klonene. Resultatene støtter at det eksisterer en viss grad av heterogenitet blant klonene, men hvor signifikant denne er kan ikke konkluderes med ved dette forsøket.

Da det er tilknyttet stor usikkerhet i alle målingene, kan dette påvirke resultatene og ingen endelig konklusjon kan trekkes uten videre undersøkelser.

Mulige endringer i cellelinjen og klonene

Kreftceller har økt evne til spontane mutasjoner og kan raskt utvikle nye egenskaper, noe som gjør at alle grafene og celledellingene som er blitt presentert kun vil være representativ for cellelinjens egenskaper akkurat da de ble høstet. Dermed kan uttrykket av autofagi-proteinene endre seg i begge retninger over tid, noe som gir eventuelle konklusjoner om cellelinjen eller klonen kortere holdbarhet.

66cl4-cellelinjen dyrkes som regel frem til passasje 40. En senere passasje har større risiko for å være ulik den opprinnelige cellelinjen grunnet spontane mutasjoner, spesielt ved cellelinjer som har høyt vekstpotensiale, slik som disse cellene. Klonene som ble brukt ble etablert fra 66cl4-cellelinjen da

denne hadde passasjenummer 23. De ble da etablert fra enkeltceller, noe som gjør at de sammenlignet med den opprinnelige 66cl4 har vært igjennom veldig mange celledelinger. Ved siste eksperiment ble celler fra kloner med passasje 33 og 66cl4 med passasje 29 benyttet.

Disse mulige forskjellene mellom parallellene kunne vært redusert ved å gjennomføre analysen uten tid og passasjer mellom, slik at cellene stammer fra samme cellekultur og har likest mulig egenskaper. Det er også noe mulighet for at særlig klonene har begynt å bli «slitne» etter for mange delinger, noe som kan være medvirkende årsak til at veksthastigheten for noen av klonene reduseres utover i prosjektet. Da det ikke var kapasitet på lab til å kunne gjennomføre flere parallelle eksperimenter, ble dette ikke tatt hensyn til.

5 Konklusjon

66cl4 og de fem undersøkte klonene av denne cellelinjen viste tydelige forskjeller i morfologi og veksthastighet, der to kloner skilte seg ut ved at den ene vokste raskere og den andre saktere enn den opprinnelige cellelinjen. Det ble også observert ulikheter i klonenes metabolisme, hvor særlig én forårsaket større pH-endring i vekstmediet.

De basale nivåene av p62 og LC3B normalisert mot ERK 1/2 varierte sterkt mellom hvert eksperiment, og selv om det ikke er mulig å si noe sikkert finnes det likevel holdepunkter for at noen av klonene skiller seg fra den opprinnelige cellelinjen. Autofagiflux i klonene kunne ikke normaliseres mot ERK 1/2, da det ble påvist at ERK 1/2 er betydelig påvirket av BafA1. De ikke-normaliserte resultatene indikerer at autofagiflux er noe ulik hos 66cl4 og klonene. På grunn av store avvik er det ikke mulig å påvise signifikante forskjeller mellom noen av klonene og den opprinnelige cellelinjen, men internt mellom enkelte av klonene synes det å være klare ulikheter.

Ut fra disse observasjonene og resultatene er dette en indikasjon på at det er heterogenitet innad i 66cl4-cellelinjen for vekstrate, morfologi og autofagi, og det ville vært nødvendig og svært interessant med videre undersøkelser for både å vurdere dette nærmere og se om de andre klonene etablert fra cellelinjen viser lignende tendenser.

6 Referanser

- A. Abozendah, H. *et al.* (2018) 'CH103 – Chapter 8: Homeostasis and Cellular Function – Chemistry', 15 December. Available at: <https://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch103-allied-health-chemistry/ch103-chapter-9-homeostasis-and-cellular-function/> (Accessed: 25 April 2021).
- Aita, V. M. *et al.* (1999) 'Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21', *Genomics*, 59(1), pp. 59–65. doi: 10.1006/geno.1999.5851.
- Alberts, B. *et al.* (2014) *Essential Cell Biology*. 4th edn. Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Aslakson, C. J. and Miller, F. R. (1992) 'Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor', *Cancer Research*, 52(6), pp. 1399–1405. doi: Published March 1992.
- Aubrey, B. J., Strasser, A. and Kelly, G. L. (2016) 'Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5), p. a026062. doi: 10.1101/cshperspect.a026062.
- Axe, E. L. *et al.* (2008) 'Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum', *The Journal of Cell Biology*, 182(4), pp. 685–701. doi: 10.1083/jcb.200803137.
- Bekri, S. *et al.* (1997) 'Detailed map of a region commonly amplified at 11q13-->q14 in human breast carcinoma', *Cytogenetics and Cell Genetics*, 79(1–2), pp. 125–131. doi: 10.1159/000134699.
- Bissell, M. J. and Radisky, D. (2001) 'Putting tumours in context', *Nature Reviews Cancer*, 1(1), pp. 46–54. doi: 10.1038/35094059.
- Bjørkøy, G. *et al.* (2005) 'p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death', *Journal of Cell Biology*, 171(4), pp. 603–614. doi: 10.1083/jcb.200507002.
- Bjørkøy, G., Lamark, T. and Johansen, T. (2006) 'p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery', *Autophagy*, 2(2), pp. 138–139. doi: 10.4161/auto.2.2.2405.
- Burrell, R. A. *et al.* (2013) 'The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution', *Nature*, 501(7467), pp. 338–345. doi: 10.1038/nature12625.
- Chang, N. C. (2020) 'Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi: 10.3389/fcell.2020.00138.
- Chen, D., Zhu, C., *et al.* (2013) 'A novel and functional variant within the ATG5 gene promoter in sporadic Parkinson's disease', *Neuroscience Letters*, 538, pp. 49–53. doi: 10.1016/j.neulet.2013.01.044.
- Chen, D., Pang, S., *et al.* (2013) 'Genetic analysis of the ATG7 gene promoter in sporadic Parkinson's disease', *Neuroscience Letters*, 534, pp. 193–198. doi: 10.1016/j.neulet.2012.12.039.
- Chen, Y. and Klionsky, D. J. (2011) 'The regulation of autophagy – unanswered questions', *Journal of Cell Science*, 124(2), pp. 161–170. doi: 10.1242/jcs.064576.

- Cheng, N. *et al.* (2008) 'Transforming Growth Factor- β Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion', *Molecular Cancer Research*, 6(10), pp. 1521–1533. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203.
- Choi, A. M. K., Ryter, S. W. and Levine, B. (2013) *Autophagy in Human Health and Disease*, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1205406>. Massachusetts Medical Society. doi: 10.1056/NEJMra1205406.
- Clarke, A. J. *et al.* (2015) 'Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(5), pp. 912–920. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204343.
- Cooper, G. M. (2000) 'The Development and Causes of Cancer', *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/> (Accessed: 12 April 2021).
- Coppola, D., Oliveri, C., *et al.* (2008) 'Bax-interacting factor-1 expression in prostate cancer', *Clinical Genitourinary Cancer*, 6(2), pp. 117–121. doi: 10.3816/CGC.2008.n.018.
- Coppola, D., Khalil, F., *et al.* (2008) 'Down Regulation of Bax-Interacting Factor-1 (Bif-1) in Colon Cancer', *Cancer*, 113(10), pp. 2665–2670. doi: 10.1002/cncr.23892.
- Dagogo-Jack, I. and Shaw, A. T. (2018) 'Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(2), pp. 81–94. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166.
- Egeblad, M., Nakasone, E. S. and Werb, Z. (2010) 'Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism', *Developmental Cell*, 18(6), pp. 884–901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012.
- Fares, J. *et al.* (2020) 'Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), pp. 1–17. doi: 10.1038/s41392-020-0134-x.
- Fernald, K. and Kurokawa, M. (2013) 'Evading apoptosis in cancer', *Trends in Cell Biology*, 23(12), pp. 620–633. doi: 10.1016/j.tcb.2013.07.006.
- Friedman, L. G. *et al.* (2012) 'Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of α -synuclein and LRRK2 in the brain', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(22), pp. 7585–7593. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5809-11.2012.
- Groll, M. and Huber, R. (2003) 'Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(5), pp. 606–616. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00390-4.
- Hainaut, P. and Pfeifer, G. P. (2016) 'Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(11), p. a026179. doi: 10.1101/cshperspect.a026179.
- Hanahan, D. and Coussens, L. M. (2012) 'Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment', *Cancer Cell*, 21(3), pp. 309–322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) 'Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis', *Cell*, 86(3), pp. 353–364. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*, 100(1), pp. 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- He, C. and Klionsky, D. J. (2009) 'Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy', *Annual review of genetics*, 43, pp. 67–93. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
- Huang, H. Y. *et al.* (2018) 'The roles of autophagy and hypoxia in human inflammatory periapical lesions', *International Endodontic Journal*, 51(S2), pp. e125–e145. doi: <https://doi.org/10.1111/iej.12782>.
- Hung, C.-M. *et al.* (2012) 'mTOR-Dependent Cell Survival Mechanisms', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), pp. a008771–a008771. doi: 10.1101/cshperspect.a008771.
- Jafri, M. A. *et al.* (2016) 'Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies', *Genome medicine*, 8(1), pp. 69–87. doi: 10.1186/s13073-016-0324-x.
- Jiang, B.-H. and Liu, L.-Z. (2009) 'PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis', *Advances in Cancer Research*, 102, pp. 19–65. doi: 10.1016/S0065-230X(09)02002-8.
- Jin, S. (2006) 'Autophagy, Mitochondrial Quality Control, and Oncogenesis', *Autophagy*, 2(2), pp. 80–84. doi: 10.4161/auto.2.2.2460.
- Kim, M. *et al.* (2016) 'Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay', *eLife*, 5. doi: 10.7554/eLife.12245.
- Kim, M. S. *et al.* (2008) 'Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability', *Human Pathology*, 39(7), pp. 1059–1063. doi: 10.1016/j.humpath.2007.11.013.
- Kim, S. G., Buel, G. R. and Blenis, J. (2013) 'Nutrient regulation of the mTOR Complex 1 signaling pathway', *Molecules and Cells*, 35(6), pp. 463–473. doi: 10.1007/s10059-013-0138-2.
- Kim, S. Y. *et al.* (2008) 'Decreased expression of Bax-interacting factor-1 (Bif-1) in invasive urinary bladder and gallbladder cancers', *Pathology*, 40(6), pp. 553–557. doi: 10.1080/00313020802320440.
- Klionsky, D. J. (2007) 'Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(11), pp. 931–937. doi: 10.1038/nrm2245.
- Klionsky, D. J. (2008) 'Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve', *Autophagy*, 4(6), pp. 740–743. doi: 10.4161/auto.6398.
- Klionsky, D. J. *et al.* (2016) 'Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)', *Autophagy*, 12(1), pp. 1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.
- Kocaturk, N. M. and Gozuacik, D. (2018) 'Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, p. 128. doi: 10.3389/fcell.2018.00128.
- Larsen, I. K. (2019) *Cancer in Norway 2019 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway*. oslo. Available at: <https://www.kreftregisteret.no/Generelt/Rapporter/Cancer-in-Norway/cancer-in-norway-2019/> (Accessed: 16 May 2021).
- Larsen, K. B. *et al.* (2010) 'A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/SQSTM1', *Autophagy*, 6(6), pp. 784–793. doi: 10.4161/auto.6.6.12510.

- Lassen, K. G. *et al.* (2014) 'Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), pp. 7741–7746. doi: 10.1073/pnas.1407001111.
- Lee, J. W. *et al.* (2006) 'Decreased expression of tumour suppressor Bax-interacting factor-1 (Bif-1), a Bax activator, in gastric carcinomas', *Pathology*, 38(4), pp. 312–315. doi: 10.1080/00313020600820880.
- Levine, B. and Kroemer, G. (2019) 'Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective', *Cell*, 176(1), pp. 11–42. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.048.
- Li, X., He, S. and Ma, B. (2020) 'Autophagy and autophagy-related proteins in cancer', *Molecular Cancer*, 19(1), p. 12. doi: 10.1186/s12943-020-1138-4.
- Li, Y. *et al.* (2017) 'Novel and functional ATG12 gene variants in sporadic Parkinson's disease', *Neuroscience Letters*, 643, pp. 22–26. doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.028.
- Liang, X. H. *et al.* (1999) 'Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1', *Nature*, 402(6762), pp. 672–676. doi: 10.1038/45257.
- Low, K. C. and Tergaonkar, V. (2013) 'Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer', *Trends in Biochemical Sciences*, 38(9), pp. 426–434. doi: 10.1016/j.tibs.2013.07.001.
- Lowe, S. W. and Lin, A. W. (2000) 'Apoptosis in cancer', *Carcinogenesis*, 21(3), pp. 485–495. doi: 10.1093/carcin/21.3.485.
- Maiuri, M. C. *et al.* (2009) 'Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes', *Cell Death & Differentiation*, 16(1), pp. 87–93. doi: 10.1038/cdd.2008.131.
- Martin, T. A. *et al.* (2013) *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective*, *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/> (Accessed: 4 May 2021).
- Martinez, J. *et al.* (2016) 'Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells', *Nature*, 533(7601), pp. 115–119. doi: 10.1038/nature17950.
- Martinez-Outschoorn, U. E. *et al.* (2010) 'The autophagic tumor stroma model of cancer or "battery-operated tumor growth"', *Cell Cycle*, 9(21), pp. 4297–4306. doi: 10.4161/cc.9.21.13817.
- Mauvezin, C. *et al.* (2015) 'Autophagosome–lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification', *Nature Communications*, 6(1), p. 7007. doi: 10.1038/ncomms8007.
- Melia, T. J., Lystad, A. H. and Simonsen, A. (2020) 'Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure', *The Journal of Cell Biology*, 219(6). doi: 10.1083/jcb.202002085.
- Meric-Bernstam, F. and Mills, G. B. (2012) 'Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9(9), pp. 542–548. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.127.
- Mishra, P. and Chan, D. C. (2016) 'Metabolic regulation of mitochondrial dynamics', p. 9.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. (2011) 'The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), pp. 107–132. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.

- Mony, V. K., Benjamin, S. and O'Rourke, E. J. (2016) 'A lysosome-centered view of nutrient homeostasis', *Autophagy*, 12(4), pp. 619–631. doi: 10.1080/15548627.2016.1147671.
- Murugan, A. K., Grieco, M. and Tsuchida, N. (2019) 'RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine', *Seminars in Cancer Biology*, 59, pp. 23–35. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.06.007.
- Neckmann, U. (2018) *On the Identification of Features of Aggressive Breast Cancer Development*. PhD. Norges Teknisk-Naturvitenskaplige Universitet.
- Onorati, A. *et al.* (2018) 'Targeting autophagy in cancer', *Cancer*, 124(16), pp. 3307–3318. doi: 10.1002/cncr.31335.
- Pankiv, S. *et al.* (2007) 'p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp. 24131–24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200.
- Parzych, K. R. and Klionsky, D. J. (2014) 'An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation', *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), pp. 460–473. doi: 10.1089/ars.2013.5371.
- Patrick Davis, C. (2021) *Definition of Cancer, MedicineNet*. Available at: <https://www.medicinenet.com/cancer/definition.htm> (Accessed: 10 April 2021).
- Pavlidis, S. *et al.* (2011) 'Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis', *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), pp. 1264–1284. doi: 10.1089/ars.2011.4243.
- Pugsley, H. R. (2017) 'Assessing Autophagic Flux by Measuring LC3, p62, and LAMP1 Co-localization Using Multispectral Imaging Flow Cytometry', *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (125), p. e55637. doi: 10.3791/55637.
- Qi, Z. and Chen, L. (2019) 'Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy', in Qin, Z.-H. (ed.) *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science*. Singapore: Springer (Advances in Experimental Medicine and Biology), pp. 167–177. doi: 10.1007/978-981-15-0602-4_8.
- Qu, X. *et al.* (2003) 'Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene', *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), pp. 1809–1820. doi: 10.1172/JCI20039.
- Ravanan, P., Srikumar, I. F. and Talwar, P. (2017) 'Autophagy: The spotlight for cellular stress responses', *Life Sciences*, 188, pp. 53–67. doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.029.
- Reggiori, F. and Klionsky, D. J. (2002) 'Autophagy in the Eukaryotic Cell', *Eukaryotic Cell*, 1(1), pp. 11–21. doi: 10.1128/EC.01.1.11-21.2002.
- Russell, R. C., Yuan, H.-X. and Guan, K.-L. (2014) 'Autophagy regulation by nutrient signaling', *Cell Research*, 24(1), pp. 42–57. doi: 10.1038/cr.2013.166.
- Saman, H. *et al.* (2020) 'Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches', *Cancers*, 12(5). doi: 10.3390/cancers12051172.
- Shen, Y. *et al.* (2008) 'Decreased expression of autophagy-related proteins in malignant epithelial ovarian cancer', *Autophagy*, 4(8), pp. 1067–1068. doi: 10.4161/auto.6827.
- Shibutani, S. T. and Yoshimori, T. (2014) 'A current perspective of autophagosome biogenesis', *Cell Research*, 24(1), pp. 58–68. doi: 10.1038/cr.2013.159.

- Steeg, P. S. (2006) ‘Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges’, *Nature Medicine*, 12(8), pp. 895–904. doi: 10.1038/nm1469.
- Sung, H. *et al.* (2021) ‘Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries’, *CA Cancer J Clin.*, 72(3), pp. 209–249. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Swatek, K. N. and Komander, D. (2016) ‘Ubiquitin modifications’, *Cell Research*, 26(4), pp. 399–422. doi: 10.1038/cr.2016.39.
- Takahashi, Y. *et al.* (2007) ‘Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis’, *Nature Cell Biology*, 9(10), pp. 1142–1151. doi: 10.1038/ncb1634.
- Takamura, A. *et al.* (2011) ‘Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors’, *Genes & Development*, 25(8), pp. 795–800. doi: 10.1101/gad.2016211.
- Thiery, J. P. *et al.* (2009) ‘Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease’, *Cell*, 139(5), pp. 871–890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993) ‘Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*’, *FEBS Letters*, 333(1–2), pp. 169–174. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E).
- VanPutte, C. L., Regan, J. L. and Russo, A. F. (2014) *Seeley’s anatomy & physiology*. 10th ed. Edited by C. L. VanPutte and R. R. Seeley. New York, NY: McGraw-Hill.
- Verma, A. K. *et al.* (2021) ‘Autophagy Paradox of Cancer: Role, Regulation, and Duality’, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, p. e8832541. doi: 10.1155/2021/8832541.
- Wang, Y. and Zhang, H. (2019) ‘Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway’, in Qin, Z.-H. (ed.) *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science*. Singapore: Springer (Advances in Experimental Medicine and Biology), pp. 67–83. doi: 10.1007/978-981-15-0602-4_3.
- Wei, H. *et al.* (2011) ‘Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis’, *Genes & Development*, 25(14), pp. 1510–1527. doi: 10.1101/gad.2051011.
- White, E., Mehnert, J. M. and Chan, C. S. (2015) ‘Autophagy, Metabolism, and Cancer’, *Clinical Cancer Research*, 21(22), pp. 5037–5046. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0490.
- Wong, S. *et al.* (2018) ‘E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications.’, *Critical reviews in oncology/hematology*, 121, pp. 11–22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.
- Wong, Y. C. *et al.* (2019) ‘Regulation and Function of Mitochondria–Lysosome Membrane Contact Sites in Cellular Homeostasis’, *Trends in Cell Biology*, 29(6), pp. 500–513. doi: 10.1016/j.tcb.2019.02.004.
- Wu, J. *et al.* (2016) ‘Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis’, *Oncotarget*, 7(42), pp. 68954–68965. doi: 10.18632/oncotarget.12135.
- Xie, Z. *et al.* (2014) *Bafilomycin A1 inhibits autophagy and induces apoptosis in MG63 osteosarcoma cells*. Available at: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2014.2281#> (Accessed: 15 April 2021).

Xu, J. *et al.* (2013) 'Identification of a novel 21bp-insertion variant within the LC3B gene promoter in sporadic Parkinson's disease', *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 161(5), pp. 441–443. doi: 10.1016/j.trsl.2012.12.006.

Yin, Z., Pascual, C. and Klionsky, D. J. (2016) 'Autophagy: machinery and regulation', *Microbial Cell*, 3(12), pp. 588–596. doi: 10.15698/mic2016.12.546.

Yue, Z. *et al.* (2003) 'Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), pp. 15077–15082. doi: 10.1073/pnas.2436255100.

Yuk, J.-M., Yoshimori, T. and Jo, E.-K. (2012) 'Autophagy and bacterial infectious diseases', *Experimental & Molecular Medicine*, 44(2), pp. 99–108. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.032.

Zhang, H. *et al.* (2008) 'Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia*', *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), pp. 10892–10903. doi: 10.1074/jbc.M800102200.

Zhang, L. *et al.* (2013) 'Both K63 and K48 ubiquitin linkages signal lysosomal degradation of the LDL receptor', *Journal of Lipid Research*, 54(5), pp. 1410–1420. doi: 10.1194/jlr.M035774.

7 Vedlegg

Liste over vedlegg:

- 1 Reagenser
- 2 ⁶⁶cl4 celletall og beregninger
- 3 Proteinmålinger
- 4 Datamateriale fra Western Blott

Vedlegg 1: Reagenser

Ureabuffer

8M urea (Sigma U5378)

0.50% Triton-X (Triton x-100, Sigma T8787)

0.1M DTT, dithiothreitol

1X complete proteaseinhibitor (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche)

2X fosfataseinhibitor-cocktail PIC2 (Sigma P5726) og PIC3 (Sigma P0044)

Vedlegg 2: 66cl4 celletall og beregninger

Tabell 1: 66cl4-celletall presentert via totalt celletall, celletall pr. celler utsådd og celletall pr. dager i kultur. Og de relative veksttallene til første avlesning

	19/3 (4d)	22/3 (3d)	26/3 (4d)	29/3 (3d)	Hvor mange % utgjør celletallene rel. til første celletall?		
					22/3 (3d)	26/3 (4d)	29/3 (3d)
Celletall Totalt	3,23E+07	1,79E+07	3,32E+07	8,99E+06	55,49	102,88	27,85
Celletall/ant. Celler utsådd	20,49	5,69	21,08	2,85	27,75	102,88	13,93
Totalt ant.celler/ dager i kultur	8,07E+06	5,97E+06	8,30E+06	3,00E+06	73,99	102,88	37,14

Tabellen er benyttet til å lage diagrammene i figur 3.3 og beregningen til å begrunne valget av presentasjon av celletall for klonene i forhold til 66cl4

Vedlegg 3: Proteinmålinger

66c14

Tabell 1: Oversikt over proteinavlesningene på spektrofotometer og den beregnede proteinkonsentrasjonen for hvert av eksperimentene i 66c14-cellelinjen.

Sample	Eksperiment 1 – 17.03			Eksperiment 2 – 24.03			Eksperiment 3 – 31.03		
	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)
66c14 – 0t	0,651	1000	13,81	0,724	1400	22,18	0,648	1400	19,94
	0,604			0,716			0,647		
66c14 – 2t	0,649	1000	14,07	0,515	1400	15,95	0,572	1400	17,93
	0,630			0,521			0,592		
66c14 – 6t	0,571	1000	12,68	0,571	1400	16,89	0,565	1400	17,69
	0,582			0,526			0,584		
66c14 – 24t	0,375	1000	8,22	0,260	1400	7,41	0,365	1400	10,98
	0,372			0,221			0,348		

Klon 2

Tabell 2: Oversikt over proteinavlesningene på spektrofotometer og den beregnede proteinkonsentrasjonen for hvert av eksperimentene i klon 2.

Sample	Eksperiment 1 – 17.03			Eksperiment 2 – 24.03			Eksperiment 3 – 31.03		
	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)
Klon 2 – 0t	0,355	1000	7,66	0,419	1400	12,74	0,486	1400	14,91
	0,341			0,408			0,482		
Klon 2 – 2t	0,403	1000	8,69	0,365	1400	11,10	0,506	1400	15,75
	0,387			0,356			0,517		
Klon 2 – 6t	0,377	1000	8,03	0,391	1400	12,12	0,565	1400	17,71
	0,353			0,396			0,585		
Klon 2 – 24t	0,362	1000	7,79	0,285	1400	8,65	0,332	1400	10,40
	0,346			0,277			0,343		

Klon 4

Tabell 3: Oversikt over proteinavlesningene på spektrofotometer og den beregnede proteinkonsentrasjonen for hvert av eksperimentene i klon 4

Sample	Eksperiment 1 – 17.03			Eksperiment 2 – 24.03			Eksperiment 3 – 31.03		
	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)
Klon 4 – 0t	0,564	1000	12,53	0,340	1400	9,84	0,384	1400	11,60
	0,575			0,299			0,369		
Klon 4 – 2t	0,685	1000	14,71	0,320	1400	9,69	0,410	1400	12,27
	0,652			0,309			0,387		
Klon 4 – 6t	0,575	1000	12,93	0,337	1400	10,01	0,386	1400	12,00
	0,600			0,313			0,393		
Klon 4 – 24t	0,397	1000	8,69	0,252	1400	8,19	0,307	1400	9,13
	0,393			0,280			0,286		

Klon 5

Tabell 4: Oversikt over proteinavlesningene på spektrofotometer og den beregnede proteinkonsentrasjonen for hvert av eksperimentene i klon 5

Sample	Eksperiment 1 – 17.03			Eksperiment 2 – 24.03		
	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)
Klon 5 – 0t	0,449	1000	10,35	0,526	1400	16,00
	0,492			0,513		
Klon 5 – 2t	0,577	1000	13,15	0,440	1400	13,23
	0,618			0,419		
Klon 5 – 6t	0,589	1000	12,89	0,448	1400	14,01
	0,583			0,462		
Klon 5 – 24t	0,417	1000	9,217	0,215	1400	6,73
	0,417			0,222		

Klon 6

Tabell 5: Oversikt over proteinavlesningene på spektrofotometer og den beregnede proteinkonsentrasjonen for hvert av eksperimentene i klon 6

Sample	Eksperiment 1 – 17.03			Eksperiment 2 – 24.03			Eksperiment 3 – 31.03		
	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)
Klon 6 – 0t	0,413	1000	9,30	0,496	1400	14,68	0,601	1400	18,48
	0,432			0,599					
Klon 6 – 2t	0,566	1000	12,58	0,651	1400	19,93	0,657	1400	20,36
	0,578			0,665					
Klon 6 – 6t	0,521	1000	11,65	0,513	1400	15,15	0,705	1400	22,04
	0,538			0,471			0,726		
Klon 6 – 24t	0,368	1000	7,90	0,324	1400	9,78	0,315	1400	9,89
	0,350			0,311			0,327		

Klon 8

Tabell 6: Oversikt over proteinavlesningene på spektrofotometer og den beregnede proteinkonsentrasjonen for hvert av eksperimentene i klon 8

Sample	Eksperiment 1 – 17.03			Eksperiment 2 – 24.03		
	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)	Abs	Dilution	Cons. (µg/µL)
Klon 8 – 0t	0,449	1000	9,85	0,369	1400	11,77
	0,446			0,395		
Klon 8 – 2t	0,519	1000	11,19	0,340	1400	10,69
	0,498			0,354		
Klon 8 – 6t	0,470	1000	10,32	0,368	1400	11,60
	0,468			0,385		
Klon 8 – 24t	0,412	1000	8,79	0,259	1400	7,47
	0,387			0,226		

Vedlegg 4: Datamateriale fra Western Blott

66cl4

Tabell 1: p62-avlesning for 66cl4 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1 – Gel 1	1 – Gel 2	2 – Gel 1	2 – Gel 2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid							
0t	1	1	1	1	1	1	0
2t	1,21077	1,09028	1,68898	1,28132	1,52618	1,35950	0,24344
6t	1,22297	1,06343	2,18250	1,52703	2,94668	1,78852	0,77629
24t	4,21717	2,83675	19,49652	12,34829	27,65085	13,30992	10,45498

Tabell 2: p62-avlesning for 66cl4 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1 – Gel 1	1 – Gel 2	2 – Gel 1	2 – Gel 2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid							
0t	1	1	1	1	1	1	0
2t	1,33476	0,98561	2,03774	1,54589	1,38596	1,45799	0,38319
6t	1,37768	1,07194	2,85849	2,00000	2,42607	1,94684	0,73365
24t	2,26609	1,39568	10,75472	6,81159	9,62406	6,17043	4,22482

Tabell 3: LC3B-II –avlesning for 66cl4 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1 – Gel 1	1 – Gel 2	2 – Gel 1	2 – Gel 2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid							
0t	1	1	1	1	1	1	0
2t	0,88884	1,00814	1,50360	1,03553	0,81736	1,05069	0,26824
6t	0,84004	1,02229	4,41309	1,13833	4,54950	2,39265	1,91023
24t	3,73446	2,83765	19,40999	9,22897	24,68296	11,97881	9,69162

Tabell 4: LC3B-II –avlesning for 66cl4 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1 – Gel 1	1 – Gel 2	2 – Gel 1	2 – Gel 2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid							
0t	1	1	1	1	1	1	0
2t	0,97987	0,91136	2,27273	1,24935	0,74227	1,23111	0,61025
6t	0,94631	1,03047	7,40260	1,49091	3,74570	2,92320	2,75152
24t	2,00671	1,39612	13,50649	5,09091	8,59107	6,11826	5,02393

Resultatene for 66cl4 er presentert grafisk i resultatdelen 3.3 – Autofagiflux. Basert på dette er det valgt at ikke normaliserte data skal vises grafisk for klonene, da disse gir et mye lavere avvik enn de normaliserte tallene gjør, og de normaliserte tallene ville gitt et uriktig bilde på autofagifluxen. Dette kommer av at ERK1/2 ikke er egnet som uavhengig kontroll og påvirker avlesningene, spesielt i 24t-brønnene.

Klon 2

Tabell 5: p62-avlesning for klon 2 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,68529	1,07767	1,29983	1,02093	0,31117
6t	1,08813	1,40825	2,53624	1,67754	0,76068
24t	3,33855	12,45609	14,3559	10,05019	5,88956

Tabell 6: p62-avlesning for klon 2 – ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,67305	1,50965	1,16525	1,11599	0,42047
6t	1,09461	1,77072	2,22881	1,69805	0,57058
24t	3,61677	8,67196	9,78813	7,35896	3,28853

Tabell 7: LC3B-II –avlesning for klon 2 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,57633	0,68176	0,89746	0,71852	0,16369
6t	0,70336	2,88368	1,50517	1,69740	1,10280
24t	1,71553	11,33894	5,84	6,29816	4,82803

Tabell 8: LC3B-II –avlesning for klon 2 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,56604	0,75566	0,80455	0,70875	0,12598
6t	0,70755	3,13575	1,32273	1,72201	1,26238
24t	1,85849	8,32579	3,98182	4,72203	3,29658

Klon 4

Tabell 9: p62-avlesning for klon 4 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,86240	0,89706	1,99922	1,25289	0,64657
6t	1,39618	1,19076	2,90040	1,82911	0,93343
24t	5,12145	5,33943	7,76502	6,07530	1,46739

Tabell 10: p62-avlesning for klon 4 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	1,48179	1,02176	2,02652	1,51002	0,50297
6t	2,36695	1,22280	2,96970	2,18648	0,88732
24t	6,21849	3,85492	7,5	5,85780	1,84911

Tabell 11: LC3B-II –avlesning for klon 4 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,48102	0,99454	2,18933	1,22163	0,87650
6t	1,05320	1,79179	5,02210	2,62236	2,11079
24t	4,44268	13,14176	13,16936	10,25127	5,03040

Tabell 12: LC3B-II –avlesning for klon 4 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,82650	1,1328	2,21922	1,39284	0,73187
6t	1,78549	1,84	5,142083	2,92252	1,92239
24t	5,39432	9,488	12,71989	9,20074	3,67122

Klon 5

Tabell 13: p62-avlesning for klon 5 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	Gj.snitt	St.avvik
Tid				
0t	1	1	1	0
2t	0,67342	1,51272	1,09307	0,59348
6t	0,69344	2,01959	1,35652	0,93773
24t	1,5625	17,43257	9,49754	11,22184

Tabell 14: p62-avlesning for klon 5 – ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	Gj.snitt	St.avvik
Tid				
0t	1	1	1	0
2t	0,82008	2,11909	1,46958	0,91854
6t	0,67803	2,53940	1,60872	1,31619
24t	1,375	12,13660	6,75580	7,60960

Tabell 15: LL3B-II –avlesning for klon 5 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	Gj.snitt	St.avvik
Tid				
0t	1	1	1	0
2t	0,59864	1,10982	0,85423	0,36146
6t	0,67141	1,72108	1,19625	0,74223
24t	1,31853	10,53707	5,92780	6,51850

Tabell 16: LC3B-II –avlesning for klon 5 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	Gj.snitt	St.avvik
Tid				
0t	1	1	1	0
2t	0,72901	1,55469	1,14185	0,58384
6t	0,65649	2,16406	1,41028	1,06602
24t	1,16031	7,33594	4,24812	4,36683

Klon 6

Tabell 17: p62-avlesning for klon 6 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,83328	1,02695	2,48358	1,44794	0,90210
6t	0,92609	1,17366	1,44813	1,18263	0,26114
24t	1,40073	5,05910	19,92233	8,79406	9,80943

Tabell 18: p62-avlesning for klon 6 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	1,15072	1,00503	2,10111	1,41895	0,59524
6t	1,23478	1,28643	1,49447	1,33856	0,13747
24t	1,59130	2,71859	8,08847	4,13279	3,47178

Tabell 19: LC3B-II –avlesning for klon 6 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,55933	0,53081	0,75069	0,61361	0,11957
6t	1,03448	1,03379	0,31280	0,79369	0,41646
24t	4,43914	3,26871	1,40869	3,03885	1,52824

Tabell 20: LC3B-II –avlesning for klon 6 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	3	Gj.snitt	St.avvik
Tid					
0t	1	1	1	1	0
2t	0,77241	0,51948	0,63509	0,64233	0,12662
6t	1,37931	1,13312	0,32281	0,94508	0,55278
24t	5,04310	1,75649	0,57193	2,45718	2,31648

Klon 8

Tabell 21: p62-avlesning for klon 8 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	Gj.snitt	St.avvik
Tid				
0t	1	1	1	0
2t	0,99631	1,03432	1,01531	0,02687
6t	1,38511	1,23951	1,31231	0,10296
24t	2,90756	3,83424	3,37090	0,65526

Tabell 22: p62-avlesning for klon 8 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	Gj.snitt	St.avvik
Tid				
0t	1	1	1	0
2t	1,14078	1,15574	1,14826	0,01058
6t	1,55825	1,36885	1,46355	0,13393
24t	2,79126	3,45082	3,12104	0,46638

Tabell 23: LC3B-II-avlesning for klon 8 – Normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	Gj.snitt	St.avvik
Tid				
0t	1	1	1	0
2t	0,52956	0,59663	0,56310	0,04742
6t	0,77037	0,97832	0,87434	0,14704
24t	1,44180	4,55984	3,00082	2,20479

Tabell 24: LC3B-II-avlesning for klon 8 – Ikke normalisert med ERK1/2

Eksp.	1	2	Gj.snitt	St.avvik
Tid				
0t	1	1	1	0
2t	0,60635	0,66667	0,63651	0,04265
6t	0,86667	1,08040	0,97353	0,15113
24t	1,38413	4,10385	2,74399	1,92314