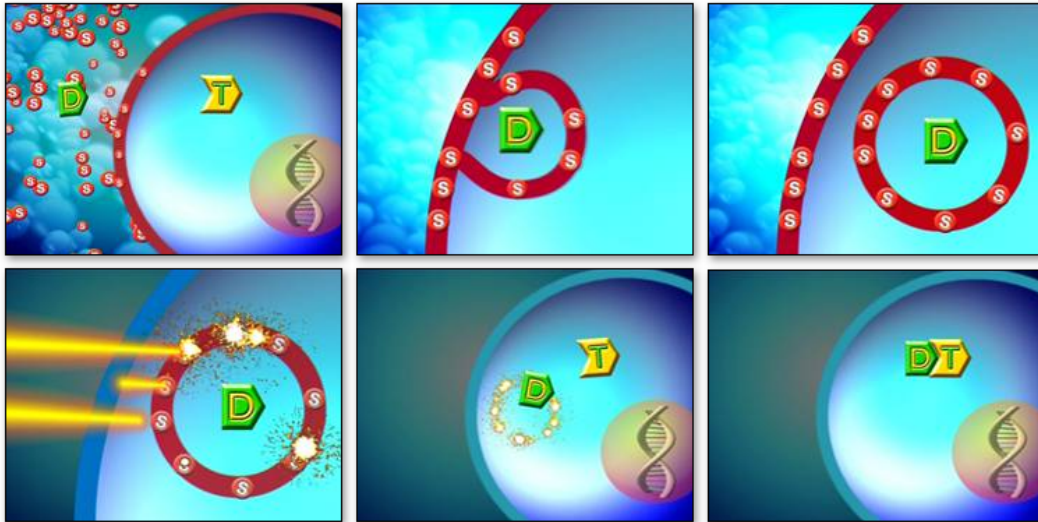


Fotokjemisk internalisering (PCI) som metode for  
aktivering av terapeutiske makromolekyler.  
Evaluering av betydningen av autofagi for  
behandlingseffekt.



av

My Anh Tu

*Master i biomedisin*  
*Avdeling for helsefag*

Mai 2010



Fotokjemisk internalisering (PCI) som metode for  
aktivering av terapeutiske makromolekyler.  
Evaluering av betydningen av autofagi for  
behandlingseffekt.

av

My Anh Tu

*Master i biomedisin*  
*Avdeling for helsefag*

Masteroppgave, 60 studiepoeng, utført ved Radiumhospitalet  
(Institutt for kreftforskning, Avdeling for Strålingsbiologi) og HiO

20. Mai 2010



## Forord

Denne masteravhandlingen markerer avslutningen på Masterstudium i biomedisin ved Høgskolen i Oslo. Arbeidet ble utført ved Avdeling for strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning, på Radiumhospitalet i tidsrommet august 2009 - mai 2010. Prosessen å skrive en masteroppgave har vært spennende, lærerik og utfordrende. Fra denne prosessen tar jeg med meg større innsikt i et viktig og interessant felt og større interesse for forskning.

Først og fremst ønsker jeg å rette en stor takk til min veileder Dr. Kristian Berg for en interessant oppgave, god veiledning og faglig støtte. Takk for din interesse i min oppgave og all hjelp i utformingen av oppgaven.

I denne perioden har jeg fått æren av å være en del av den fantastiske PCI-gruppen. Takk for at dere har vært imøtekommende og inkluderende fra første dag, og at dørene alltid har vært åpne. En spesiell takk rettes til Dr. Anette Weyergang og Marie-Therese Strand Larsen for opplæring, gode råd og all hjelp på lab. Dere er en herlig gjeng som jeg kommer til å savne.

Takk til mine medstudenter og Kristine Kjeldal. Det er alltid godt å ha noen som er i samme situasjon. Takk for all støtte, gode samtaler og oppmuntring underveis. Dette året hadde ikke vært den samme uten dere. Tusen takk, jenter!

Til slutt vil jeg takke familie og venner for all oppmuntring. Og til min kjære Jørgen, takk for din særdeles enestående tålmodighet og støtte.

Norske Radiumhospital, Oslo, 20.05.2010

My Anh Tu

## Sammendrag

Kreft forventes å ramme hver tredje nordmann. Dagens kreftbehandlinger inkluderer hovedsakelig kirurgi, kjemoterapi og strålebehandling. Fotodynamisk terapi (PDT) er en relativ ny form for strålebehandling som utnytter fotosensitive forbindelsers (fotosensitisere) evne til å akkumulere seg i tumorvev. Lysaktivering av fotosensitisere medierer en irreversibel skade på tumorvevet ved dannelsen av reaktive oksygenforbindelser (ROS).

Utvikling av terapeutiske makromolekyler de seneste årene er vist å ha et stort potensiale innen kreftbehandling. Disse legemidlene utøver i mange tilfeller sin funksjon intracellulært. Et felles problem for disse legemidlene er at de degraderes i lysosomer etter internalisering ved endocytose, og får dermed ikke ytet sitt maksimale potensiale. Fotokjemisk internalisering (PCI) er en ny metode som tar i bruk de samme mekanismene som PDT, men som i tillegg vil kunne effektivt levere makromolekyler fra endolysosomer til cytosolen hvor de kan utøve sin effekt. PCI er vist å potensiere effekten til mange makromolekyler både *in vitro* og *in vivo* [70]. For videreutvikling av PCI-teknologien er det viktig å forstå hvilke faktorer som påvirker balansen mellom frigjøringen av makromolekyler fra endocytiske vesikler og celledød.

Autofagi er en proteindegraderingsvei som aktiveres ved næringsfattige- og stresstilstander i cellen som kan resultere både i celleoverlevelse og celledød. Dysfunksjon i autofagi er vist i mange sykdommer som neurodegradering og kreft. Enkelte behandlingsformer er å vist å indusere metabolsk stress og dermed aktivering av autofagi. Hvorvidt autofagimediert overlevelse burde være blokkert for å ytterligere promotere tumorcelledød er et aktuelt spørsmål. Oksidativt stress forårsaket av fotokjemisk behandling er vist å indusere autofagi [24]. Hensikten med denne oppgaven var derfor å studere betydningen av autofagi for behandlingseffekten etter fotokjemisk behandling. Det er vist at fotokjemisk behandling aktiverer proteinkinasene JNK og p38, hvorav aktivering av JNK fungerer som et overlevelsessignal mens p38-aktivering resulterer i celledød [77]. Dette er i samsvar med resultater i denne oppgaven da JNK inhibitoren SP600125 og p38 MAPK inhibitoren SB203580 viste en reversering av disse prosessene. Videre indikerer resultatene i denne oppgaven at JNK-mediert celledød ikke er autofagimediert. Resultatene for p38 viser ingen tilstrekkelig klar trend til å kunne trekke noen konklusjoner. Metodene som ble benyttet for å studere behandlingseffekten av fotokjemisk behandling var PDT og PCI med fotosensitiseren TPCS<sub>2a</sub> samt MTT-assay for viabilitetsmåling. Intracellulær lokaliseringen av TPCS<sub>2a</sub> ble studert med fluorescensmikroskopi. Deteksjon av autofagimarkøren LC3II ble gjort ved SDS-PAGE, Western blotting og immunodeteksjon. Manipulering av cellulære prosesser ble gjort med inhibitorer.

## Abstract

Cancer is expected to strike one third of the norwegian population. Current cancer treatment involves surgery, chemotherapy and radiation therapy. Photodynamic Therapy (PDT), a relatively new form of radiation treatment, utilizes photosensitive compounds (photosensitizers) and their ability to accumulate in cancerous tissue. Photosensitizers are activated upon irradiation, conveying irreperable damage to the cancer tissue through the formation of reactive oxygen species (ROS).

In later years, the development of therapeutic macromolecules have shown great potential in cancer treatment. In most cases, therapeutic macromolecules carry out their function intracellularly. A common problem for this type of pharmaceuticals is that they degrade considerably in the lysosomes after being internalised through endocytosis, thus not reaching their full potential. Photochemical Internalization (PCI) is a novel method relying on the mechanics of PDT, but also allowing the release of endocytosed macromolecules into the cytosol. PCI is shown to attenuate the effect of many macromolecules, *in vitro* as well as *in vivo* [70]. Understanding the factors that affect the balance between the release of macromolecules from endocytic vesicles and cellular death is important for the future development of PCI.

Autophagy is a protein degradation pathway that is activated by nutrient deprivation and cellular stress that may result in both survival and cell death. Alteration of autophagy is shown in diseases such as neurodegradation and cancer. Certain forms of treatment are shown to induce metabolic stress and thus activation of autophagy. Whether survival mediated by autophagy should be blocked to enhance tumor cell death is an important question. Oxidative stress caused by photochemical treatments is shown to induce autophagy [24]. The purpose of this Master thesis is to study the importance of autophagy in the effect of treatment offered by photochemical therapy. Photochemical therapy has been shown to activate JNK and p38. Activation of JNK mediates a cell survival signal whereas activation of p38 stimulates cell death [77]. The results of this thesis corroborate this behaviour, finding that the JNK inhibitor SP600125 and the p38 MAPK inhibitor SB203580 were able to reverse these processes. Furthermore, this thesis indicates that JNK-mediated cell death is not autophagy-mediated. For p38, results are too unclear to make any conclusion. The methods used to study the effect of photochemical therapy were PDT and PCI, using the photosensitizer TPCS<sub>2a</sub>. MTT-assy was used to determine cytotoxicity of the treatments. Intracellular localization of TPCS<sub>2a</sub> was studied using fluorescence microscopy. SDS-PAGE, Western blotting and immunodetection were used to detect the autophagic marker, LC3II. Inhibitors were used to manipulate cellular processes.

## Forkortelser

APS	Ammonium persulfat
Atg	Autofagi-spesifikke gener
ATP	Adenosintrifosfat
BH3	Bcl-2 homolog-3 domene
BSA	Bovint serum albumin
CMA	Chaperon-mediert autofagi
CT	Computertomografi
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DTT	Dithioreitol
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EF-2	Elongeringsfaktor-2
EGF	Epidermal vekstfaktor
EGFR	Epidermal vekstfaktor reseptor
EM	Elektronmikroskop
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERK	Ekstracellulært signalregulerte kinaser
ESCRT	Endosomal sortin complex required for transport
HDL	High density lipoprotein
HRP	Horseradish peroxidase
HpD	Hematoporfyrin derivat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoksid
IL	Interleukin
IM	Isolerende membran
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilo Dalton
LAMP-2A	Lysosom-assosiert membranprotein type 2A
LC3	Mikrotubuliassosiert light chain 3
LDL	Low density lipoprotein
LED	Lysemmerende diode
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MAPKAPK2	MAPK-aktivert proteinkinase 2
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
MHC class II	Major histocompatibility class II
mTOR	Mammalsk target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid



$M_w$	Molekylvektstandard
NT	No treatment
OD	Optisk densitet
OH	Hydroksyl
$O_2^-$	Superoksid anion
PBS	Fosfat buffret saline
PCI	Fotokjemisk internalisering
PDT	Fotodynamisk terapi
PE	Fosfatidyletanolamin
PI3K	Fosfoinositid 3-kinase
PI3P	Fosfatidylinositol 3-fosfat
PORF-TEG	Tetrakis-meso-(4-etylenglykol-2,3,5,6-tetrafluorofenyl) porfyrin
PpIX	Protoporfyrin IX
PVDF	Polyvinylidene difluorid
p38IP	p38-interagerende protein
RIP	Ribosominaktiverende protein
RNA	Ribonukleinsyre
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
SAPK	Stressaktivert proteinkinase
SB203580	p38 MAPk inhibitor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyakrylamid-gelelektroforese
siRNA	Small interfering RNA
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
SP600125	JNK inhibitor
TEMED	Tetrametyletylendiamin
TGN	Trans-Golgi nettverket
TNF	Tumor nekrose faktor
TNF-R	Tumor nekrose faktor reseptor
TOR	Target of rapamycin
$TPCS_{2a}$	Disulfonert tetrafenylklorin
$TPPS_{2a}$	Disulfonert mesotetrafenylporfin
TRAIL	TNF-relatert apoptose-induserende ligand
UVRAG	Ultraviolet irradiation resistance-associated gene
$^1O_2$	Oksygen i singlett tilstand
$^3O_2$	Oksygen i triplett grunntilstand
3MA	3-metyladenin, PI3K inhibitor
5-ALA	5-aminolevulinsyre

## Innhold

<b>1</b>	<b>Innledning</b>	<b>1</b>
1.1	Fotodynamisk Terapi . . . . .	1
1.1.1	Virkningsmekanismene bak PDT . . . . .	1
1.1.2	Fotosensibiliserende forbindelser . . . . .	3
1.1.3	Selektiviteten av PDT . . . . .	5
1.1.4	Terapeutiske effekter av PDT . . . . .	7
1.1.5	PDT-aktivering av proteinkinaser . . . . .	11
1.2	Fotokjemisk Internalisering . . . . .	11
1.2.1	Virkningsmekanismene bak PCI . . . . .	11
1.2.2	PCI-indusert levering av proteiner . . . . .	13
1.3	Autofagi . . . . .	15
1.3.1	Virkningsmekanismene bak autofagi . . . . .	16
1.3.2	Regulering av autofagi . . . . .	19
1.4	Formålet med oppgaven . . . . .	22
<b>2</b>	<b>Materialer og metoder</b>	<b>23</b>
2.1	Standardprosedyrer . . . . .	23
2.1.1	Sterilteknikk . . . . .	23
2.1.2	Cellelinjer og dyrkningsbetingelser . . . . .	23
2.1.3	Omsetting av celler . . . . .	23
2.1.4	Kvantifisering av celler . . . . .	24
2.1.5	Utsåing av celler . . . . .	25
2.2	Etablering av tetthetskurve . . . . .	25
2.3	Fluorescensmikroskopi . . . . .	26
2.4	PDT og PCI in vitro . . . . .	27
2.4.1	Fotosensitiser og makromolekyl . . . . .	27
2.4.2	Lyskilde . . . . .	28
2.4.3	PDT behandling . . . . .	28
2.4.4	PCI behandling . . . . .	29
2.4.5	Behandling med inhibitorer . . . . .	30
2.5	Viabilitetsmåling med MTT-assay . . . . .	32
2.6	Semikvantitative analyser av spesifikke proteiner . . . . .	33
2.6.1	Prøveopparbeidelse . . . . .	33
2.6.2	Bestemmelse av relativ proteinmengde . . . . .	34
2.6.3	SDS-PAGE . . . . .	35
2.6.4	Western blotting . . . . .	37

2.6.5	Immunodeteksjon . . . . .	39
2.6.6	Blokking og immunodeteksjon med SNAP i.d <sup>TM</sup> systemet . . . . .	41
2.6.7	Kontrollpunkter . . . . .	42
<b>3</b>	<b>Resultater</b>	<b>45</b>
3.1	Etablering av tetthetskurver . . . . .	45
3.2	Intracellulær lokalisering av TPCS <sub>2a</sub> . . . . .	46
3.3	Cellulær viabilitet etter PDT- og PCI-behandling . . . . .	47
3.4	Cellulær viabilitet ved behandling med inhibitorer . . . . .	49
3.4.1	PDT og PCI med SP600125 på NuTu-19 og ZR-75-1 celler . . . . .	49
3.4.2	PDT og PCI med SB203580 på NuTu-19 og ZR-75-1 celler . . . . .	50
3.4.3	PDT og PCI med 3-metyladenin på NuTu-19 og ZR-75-1 celler . . . . .	50
3.4.4	PDT på NuTu-19 med ulik inkubasjonstid med 3-metyladenin . . . . .	52
3.5	Semikvantitativ detektering av LC3IIB . . . . .	52
3.5.1	Effekt av JNK inhibering på LC3-aktivering etter PDT på NuTu-19 celler . . . . .	53
3.5.2	Effekt av p38 inhibering på LC3-aktivering etter PDT på NuTu-19 celler . . . . .	54
3.5.3	Effekt av PI3K inhibering på LC3-aktivering etter PDT på NuTu-19 celler . . . . .	55
3.6	Immunodeteksjon med SNAP i.d . . . . .	56
<b>4</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>59</b>
4.1	Intracellulær lokalisering av TPCS <sub>2a</sub> . . . . .	59
4.2	Cellulær viabilitet etter PDT- og PCI-behandling . . . . .	60
4.3	Effekten av SP600125 på cellulær viabilitet . . . . .	61
4.4	Effekten av SB203580 på cellulær viabilitet . . . . .	62
4.5	Eksperimentelle feilkilder . . . . .	62
4.5.1	Telling og utsåing av celler . . . . .	62
4.5.2	Uønsket belysning av TPCS <sub>2a</sub> . . . . .	63
4.5.3	Overlevelse målt med MTT-assay . . . . .	63
4.5.4	Effektforstyrrelse etter gjentatt opptining . . . . .	63
4.5.5	Immunodeteksjon med SNAP i.d. kontra tradisjonell metode . . . . .	63
4.6	Videre studier . . . . .	64
<b>5</b>	<b>Konklusjoner</b>	<b>66</b>
<b>A</b>	<b>Appendiks</b>	<b>74</b>
A.1	Kjemikalier . . . . .	74
A.2	Leverandører . . . . .	75

A.3 Løsninger . . . . .	76
-------------------------	----

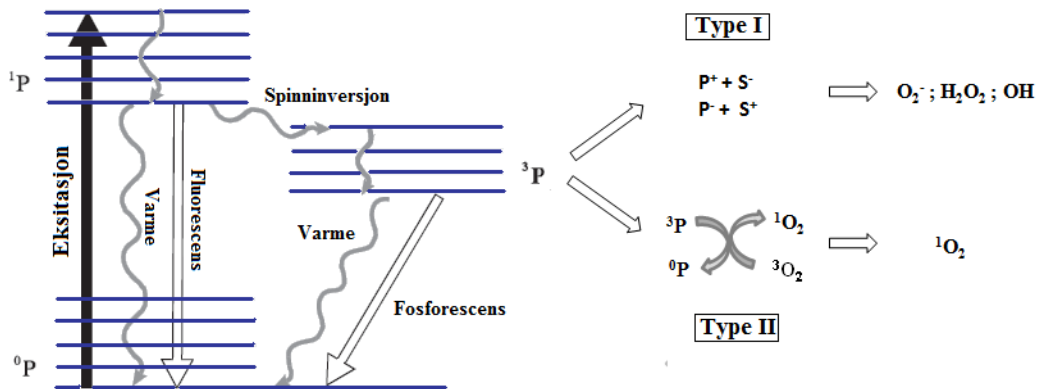
# 1 Innledning

## 1.1 Fotodynamisk Terapi

Lysterapi er blitt benyttet i mer enn tre tusen år, men det var ikke før i det forrige århundre at lysets terapeutiske egenskaper ble gjenoppldaget [21]. Medisinstudenten Oscar Raab oppdaget i 1900 at en kombinasjon av visse kjemikalier og lys kunne fremkalle celledød. Det var hans veileder H. von Tappeiner som ga denne observasjonen navnet fotodynamisk terapi (Photodynamic Therapy, PDT) [73]. PDT er en metode hvor fotosensibiliserende forbindelser (fotosensitisere), som lokaliseres til tumorvev, administreres topisk (lokalt) eller systemisk. Belysning ved bestemte bølglengder medfører en aktiviering av fotosensitisere. Resultatet er en irriterbar skade på tumorvevet grunnet fotokjemiske- og biologiske prosesser.

### 1.1.1 Virkningsmekanismene bak PDT

Konsentrasjonen av fotosensitisere brukt i PDT er i seg selv ufarlige [67]. Den cytotoxiske effekten av PDT initieres ved at fotosensitiseren absorberer lys (Figur 1.1). Absorpsjon av fotoner medfører at elektroner blir eksitert fra grunntilstand ( $^0P$ ) til et høyere tilstand. Ved belysning vil fotosensitiseren gå fra sitt grunntilstand til en kortlivet eksitert singlett tilstand ( $^1P$ ) som varer i nanosekunder. Fra singlettilstanden kan elektroner retunere til sin grunntilstand og dermed avgi energi i form av varme, emittere lys i form av fluorescens eller gjennomgå spinninversjon (intersystem crossing). Da fotosensitisere som brukes i PDT har en relativt høy akkumulering i tumorvev i forhold til normalt omkringliggende vev (ratio 2-3:1 for kjemisk syntetiserte fotosensitisere), vil fluorescens kunne benyttes i deteksjon av kreft (f.eks. 5-ALA hexyl ester, Hexvix<sup>®</sup>, benyttes i deteksjon av blærekrft) [9]. Alternativt vil en fraksjon av den eksiterte singlett tilstanden gjennomgå en spinninversjon slik at uparede elektroner får samme spinn. Dette resulterer i at fotosensitiseren går over i en triplettilstand ( $^3P$ ) som er mer langvarig (mikro- til millisekunder)[9, 10, 16]. Den eksiterte triplettilstanden kan avgi sin energi i form av varme/fosforescens eller alternativt reagere ved enten type I eller type II fotokjemisk reaksjon for å danne reaktive oksygenforbindelser (Reactive Oxygen Species, ROS ; Figur 1.1).



Figur 1.1: Forenklet Jablonski diagram som viser virkningsmekanismene bak PDT.

Ved lysabsorpsjon vil fotosensitisere eksitere til et høyere singlettilstand ( $^1P$ ). Fra  $^1P$  vil fotosensitisere kunne avgi energi i form av varme, fluorescens eller gjennomgå en spinninversjon til tripletttilstand ( $^3P$ ). Energien i  $^3P$  kan avgis i form av varme, fosforescens eller ROS via type I eller type II fotoreaksjoner [9].

### Type I fotokjemiske reaksjoner

Ved type I fotokjemisk reaksjon vil den eksiterte tripletttilstanden kunne danne radikaler ved å overføre elektroner eller hydrogenatomer til et nærtliggende substrat (f.eks. lipider i membraner). Disse radikalene vil videre kunne reagere med oksygen. Dette resulterer i dannelsen av oksygenradikaler som superoksidanionradikaler ( $O_2^-$ ), hydrogenperoksider ( $H_2O_2$ ) og hydroksylradikaler ( $OH$ ). Disse radikalene vil induserer oksidativt stress på nærliggende cellekomponenter [16].

### Type II fotokjemiske reaksjoner

Ved type II fotokjemiske reaksjoner vil fotosensitiseren i tripletttilstand overføre energien sin direkte til et dioksygen i triplett grunntilstand ( $^3O_2$ ). Dette medfører dannelsen av singlett oksygen ( $^1O_2$ ) [17].  $^1O_2$  er en svært reaktiv intermediat som vil oksidere biomolekyler som proteiner, nukleinsyrer og lipider. Ved skade på cellemembraner oksiderer  $^1O_2$  blant annet umettede fettsyrer, kolesterol og aminosyrer (tryptofan, cystein, histidin, methionin og fenylalanin) [9].

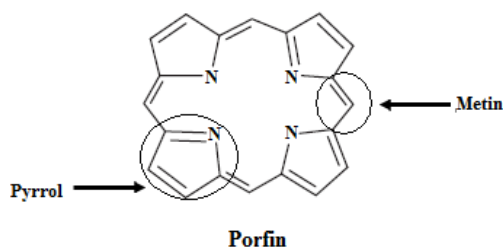
Både type I og II fotoreaksjoner kan inntreffe samtidig, men det er  $^1O_2$  som regnes som den viktigste mediatoren for den fototoksiske effekten av PDT [17, 26]. Ved både type I og II fotoreaksjoner er oksygen en nødvendighet. Det er blitt vist at hypoksiske celler som har mindre enn 5 % tilgang til oksygen, i forhold til celler med normal tilførsel av oksygen, er resistente mot PDT-behandling [52].

### 1.1.2 Fotosensibiliserende forbindelser

Pionerer som Raab, von Tappeiner og Jesionek oppdaget tidlig på 1900-tallet at en terapeutisk effekt oppstod når en kombinerer visse kjemikalier med lys. I 1903 publiserte von Tappeiner og Jesionek de første resultatene av fotodynamisk terapi på hudkreft ved bruk av eosin som fotosensitizer. De første studiene av bruken av fotosensitizer på mennesker ble utført i 1913 av Meyer-Betz. Han injiserte hematoporfyrin intravenøst på sine egne hender og observerte at både oppsvulming og smerte oppstod på områder som var blitt belyst. I 1955 utviklet Swartz hematoporfyrin derivat (HpD) ved acetylering og reduisering av hematoporfyrin. HpD viste seg å være dobbelt så fototoksisk som hematoporfyrin. HpD ble senere vist å lokalisere seg preferensielt til tumorvev av Lipson et al. i 1960, men det var imidlertid ikke før på 1970-tallet da Dougerty et al. klarte å behandle en større pasientgruppe for hudkreft at utviklingen av dagens PDT skjød fart [23].

Det kritiske elementet i PDT er fotosensitizeren. En fotosensitizer er en kjemisk enhet som ved absorpsjon av lys, og ved tilstedeværelse av oksygen, danner reaktive oksygenradikaler som resulterer i irreversibel skade på biomolekyler. Den ideelle fotosensitizeren bør preferensielt lokalisere og ha en rask akkumulering i tumorvev, ha rask clearance, være kjemisk ren, danne ROS effektivt, kunne absorbere lys ved høye bølgelengder samt ikke gi mørketoksisitet. Per i dag er det ingen fotosensitizerer som tilfredstiller alle disse kravene [63]. De fleste fotosensitizerer som brukes i dagens PDT er porfyriner eller deres reduserte analoger, kloriner [55].

Porfyriner består av fire pyrrolringer som er bundet sammen med fire metinbroer (Figur 1.2). Denne tetrapyrrolringstrukturen kalles porfin og deres derivater kalles for porfyriner. Tetrapyrrol er naturlige pigmenter (f.eks. klorofyll og heme). Disse naturlige forekommende tetrapyrroler har et metallion sentrert i strukturen. Ved kjemisk modifisering, kan en fjerne dette metallionet og danne effektive fotosensitizerer med ulike egenskaper samt gi dem fluorescerende egenskaper. Porfyriner og deres analoger som brukes i PDT er modifisert med sidegrupper som påvirker fotosensitizerens fysikalske- og kjemiske egenskaper. I porfyrinens kjerne er det nitrogenatomer som vil kunne binde metaller og danne metallofotosensitizerer. Binding av metallioner medfører endring i fotosensitizerens egenskaper som fotodynamisk stabilitet, absorpsjonsspekter, løslighet og evnen til å danne  $^1\text{O}_2$ . Binding av paramagnetiske metaller som  $\text{Fe}^{3+}$  vil øke sannsynligheten for non-radiative decay (dvs. avgi energi i form av varme) og dermed redusere dannelsen av ROS. Disse fotosensitizerer vil derfor ikke være egnet i PDT. I motsetning til paramagnetiske metaller vil diamagnetiske metaller som  $\text{Al}^{3+}$  i høyere grad gi en mer stabil triplettilstand og dermed effektiv dannelsen av ROS [9].

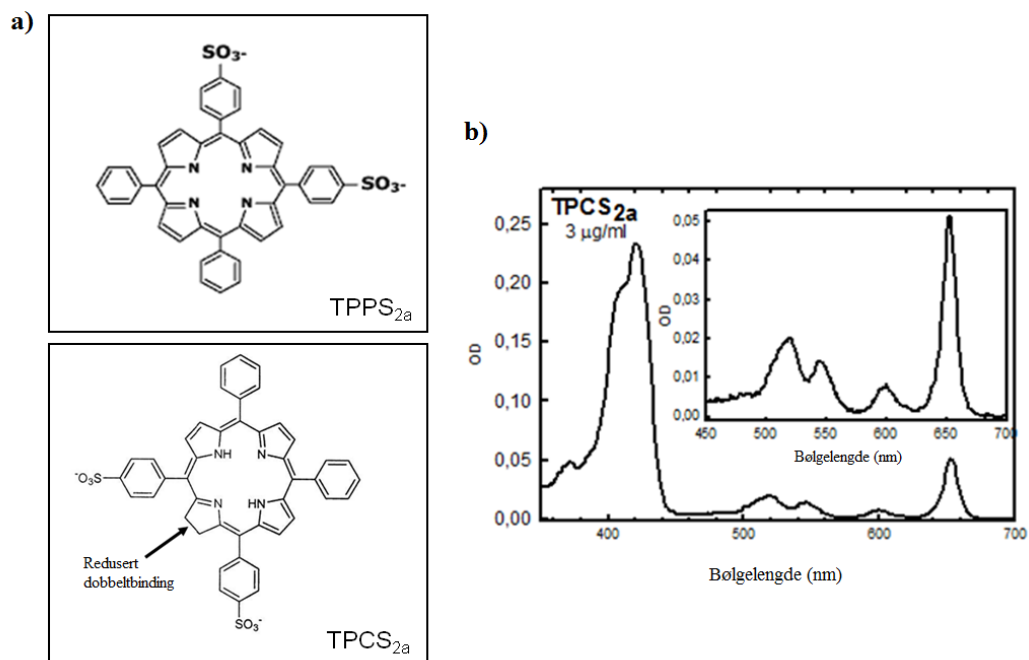


Figur 1.2: **Generell struktur av porfin** [9]

Fotosensitisere som har tetrapyrrolstruktur administreres vanligvis systemisk (intravenøst) da de i liten grad penetrerer hud. De systemiske fotosensitisere kan deles inn i to grupper: første- og andre-generasjons fotosensitisere. HpD og Photofrin<sup>®</sup> tilhører første generasjons fotosensitisere. Photofrin<sup>®</sup> var den første fotosensitiseren som ble godkjent for bruk i klinikken. Syntetiseringen av Photofrin<sup>®</sup> er vanskelig å reproducere da den er sammensatt av 60 ulike stoffer. I tillegg er den ikke særlig selektiv mot tumorvev samt at den gir en langvarig lysømfintlighet i huden grunnet sakte clearance fra normalvev. Disse faktorene har bidratt til utvikling av andre-generasjons fotosensitisere [63]. Disse absorberer lys ved høye bølgelengder (600 - 850 nm) som kan penetrere humant vev opp til 20 mm dypt [17], i motsetning til HpD som absorberer lys ved 630 nm og har en hudpenetrasjon på kun 5-10 mm [64]. Disse nye fotosensitisere har dessuten en kort halveringstid, rask (1-6 timer etter injeksjon) og selektiv akkumulering i tumorvev, effektiv clearance fra normalvev samt minimalt mørketoksisitet [17]. Av topiske fotosensitisere har vi blant annet 5-aminolevulinsyre (5-ALA, Levulan<sup>®</sup>) som er en endogent syntetisert fotosensitiser. Det vil si at den ikke er en fotosensitiser i seg selv, men at den blir metabolisert til det fotosensitive protoporfyrin IX (PpIX) via hembiosyntesen.

Fotosensitiseren som benyttes i denne studien er disulfonert tetrafenylklorin (TPCS<sub>2a</sub>, Amphinex<sup>®</sup>). Dette er en ny, patentert fotosensitiser som er utviklet av PCI Biotech til bruk for fotokjemisk internalisering (PCI, Avsnitt 1.2). TPCS<sub>2a</sub> tilhører porfyrinfamilien, men karakteriseres som et klorin da den har en redusert dobbeltbinding i en av pyrrolringene. Klorinfamilien absorberer lys ved bølgelenger som er godt inn i den røde delen av fargespekteret og har en absorpsjonstopp på rundt 652-660 nm (Figur 1.3, bilde b) [10]. Strukturelt sett er TPCS<sub>2a</sub> forholdsvis lik disulfonert mesotetrafenylporfin (TPPS<sub>2a</sub>) (Figur 1.3, bilde a) som er en amfifil fotosensitiser som lokaliseres hovedsaklig til endocytiske membraner [79]. Amfile fotosensitisere har både hydrofile og hydrofobe egenskaper, og er vist å være mer fotodynamisk aktive enn fotosensitisere som er symmetrisk hydrofile eller hydrofobe [52]. Antatt lokalisering av TPPS<sub>2a</sub> og TPCS<sub>2a</sub> er vist i figur 1.5.





Figur 1.3: Kjemisk struktur til TPPS<sub>2a</sub> og TPCS<sub>2a</sub> og eksitasjons- og emisjonsspekter for TPCS<sub>2a</sub>.

a) viser kjemisk struktur til de amfile fotosensitiserene TPPS<sub>2a</sub> og TPCS<sub>2a</sub>. TPCS<sub>2a</sub> har en redusert dobbeltbinding og karakteriseres som et klorin. b) viser eksitasjonsspekter (stort diagram) og emisjonsspekteret (liten diagram) for TPCS<sub>2a</sub> formulert i Cremophor ELP.

### 1.1.3 Selektiviteten av PDT

Antitumoreffekten av PDT er lokal selv om administreringen av fotosensitiserere som oftest er systemisk. Den lokale effekten skyldes at fotosensitiserere preferensielt akkumuleres i tumorvev og at administreringen av lys skjer lokalt. Selektiviteten av PDT vil derfor være avhengig av fotosensitiserens distribusjon og administrering av lys.

#### Distribusjon og av fotosensitiser

Forskjellige fotosensitiserere vil ha forskjellig distribusjonsmønster. Tetrapyrrol fotosensitiserere vil etter administrering oppføre seg som makromolekyler, enten ved at de binder seg til serumproteiner eller at de danner intermolekylære aggregater. Hydrofile fotosensitiserere har en tendens til å binde seg til albumin og andre frie proteiner i serum, mens hydrofobe- og amfile fotosensitiserere favoriserer binding til lipoproteiner. TPCS<sub>2a</sub> som benyttes i denne studien er forventet å binde seg i stor grad til LDL (low-density lipoproteiner) og HDL (high density lipoproteiner) i blod da studier av TPPS<sub>2a</sub> har vist denne favoriseringen [45]. Den eksakte mekanismen bak den preferensielle akkumuleringen av fotosensitiserere i tumorvev er ikke blitt klarlagt, men det er blitt foreslått mange

teorier. Et av dem er at fotosensitisere blir tatt opp via LDL-reseptorer da kreftceller har økt ekspresjon av disse. Kessel et al. har vist god korrelasjon mellom LDL reseptornivå og vevsopptak av HpD [42]. Overekspresjonen kan skyldes at kreftceller trenger kolesterol for biosyntesen av lipider til cellemembraner. Fotosensitisere som er bundet til LDL vil derfor kunne bli tatt opp av tumorceller ved reseptormediert endocytose. En annen teori er at tumorer har dårlig utviklet lymfesystem og at fotosensitisere derfor blir retinert i tumorvev. Makrofager som har infiltrert tumorer har vist å akkumulere opp til 13 ganger så mye fotosensitiser sammenlignet med kreftceller. Det er blitt foreslått at dette kan skyldes fagocytose av fotosensitiser-aggregater eller preferensiell opptak av lipoproteiner, som igjen er bundet til fotosensitisere [19]. I tillegg har tumorvev lavere ekstracellulær pH enn i normalt vev. Fotosensitisere vil ved lav pH bli mer hydrofobe, noe som bidrar til økt opptak av fotosensitisere [66]. Selektiviteten til PDT kan ytterligere økes ved målrettet levering av fotosensitiser til tumorvevet. En måte å gjøre dette på er å konjungere fotosensitisere til monoklonale antistoffer som er rettet mot antigener eller ligander som er overuttrykt hos kreftceller. Disse fotosensitisere kalles 3. generasjons fotosensitisere. En markør for denne type målrettet levering kan være epidermal vekstfaktor reseptorer (EGFR). Konjungering av peptider har også vist seg å være effektiv for målrettet levering. Disse peptidene vil etterligne de egenskapene de naturlige ligandene har. Gijsens et al. har blant annet vist at konjungering av fotosensitiseren Ce<sub>6</sub> med epidermal vekstfaktor (EGF) mot EGFR positive tumorer gir økt cytotoxicitet [63, 72].

Den intracellulære distribusjonsmønsteret har også vist å variere mellom fotosensitisere. Lipofile fotosensitisere som HpD og Photofrin<sup>®</sup> vil penetrere plasmamembranen og hovedsaklig lokalisere seg til mitokondrier og intracellulære membraner. Aggregerte- og hydrofile fotosensitisere som TPPS<sub>3</sub> og TPPS<sub>4</sub> lokaliseres til endosomer og lysosomer via endo- og pinocytose [17, 22, 60]. Den intracellulære lokaliseringen av TPCS<sub>2a</sub> er forventet å være i endolysosomale vesikler etter opptak ved endocytose.

### Administrering av lys

Den lokale effekten av PDT er avhengig av lokal levering av lys. Derfor vil PDT kun gjelde for tumorer hvor lys kan leveres direkte eller ved bruk av optiske fibre. Absorpsjonen av lys vil variere mellom vevstyper da de har ulike optiske egenskaper. Ved belysning av vev vil lys enten bli spredd eller absorbert. Disse to parametrene vil derfor være viktige for distribusjonen av lys og den lokale effekten av PDT. Høye bølglengder vil penetrere lys mest effektivt. Derfor prøver man å syntetisere fotosensitisere som absorberer lys ved disse bølglengdene samt å korrespondere fotosensitiseren og lyskildens emisjonsspekter. Tetrapyrrol-baserte fotosensitisere som ofte brukes i PDT vil ha størst absorbans mellom 400 og 430 nm (Soret bånd) og noe mindre absorpsjon over 550 nm (Q-båndene). I PDT

er man interessert i Q-bånd som er over 600 nm da disse bølgelengdene både gir god penetrering i vev og effektiv dannelse av ROS og  $^1O_2$ . Vevsmodeller viser at lys ved 600-700 nm penetrerer 50-200 % mer effektivt enn lys i 400-500 nm området [13, 18].

Lyskildene som brukes i PDT kan deles inn bredbånds- og diodelamper eller laser. Bredbåndslamper har et emisjonsspekter som spenner over et stort område av det synlige lysspekteret. Inkorporering av et filter til denne type lampe vil kunne begrense emisjonsspekteret, slik at kun lys ved bestemte bølgelengder slippes gjennom. Lysemmitterende dioder (LED) gir en høy og pålitelig emisjon i et smalt spektrum (intervall på 20-50 nm). Ved å sette sammen flere LED i et nettverk kan et større område bli belyst. I motsetning til bredbåndslamper og LED vil laser sende ut monokromatisk- (ved et bestemt bølgelengde) og kollimert (parallelt) lys. Ved å velge en laser som emitterer lys som korresponderes til fotosensitiserens absorpsjons maksimum vil en få en effektiv ROS dannelse. Lasere har i tillegg god presisjon og vil dermed kunne begrense skade på omkringliggende vev [17]. Teknikkene som brukes for å belyse tumorer vil variere utfra tumorens beliggenhet. Levering av lys til overflatiske tumorer gjøres ved bruk av optiske fibre som har påkoblet en mikrolinse som sprer lyset homogent over tumor. Dersom tumoren er tykkere enn 1 cm må en annen metode benyttes da lyspenetrering i humant vev er begrenset. Ved slike tumorer kan laserfibre med en lysspreder koplet på enden benyttes. Disse implanteres inn i tumorvevet ved bruk nåler og bildediagnostiserings teknikker som CT. PDT kan også brukes intra-operativt for å fjerne eventuelle resterende tumorceller [41].

#### 1.1.4 Terapeutiske effekter av PDT

PDT utøver sin toksiske effekt på tumorer ved hovedsaklig tre mekanismer; direkte drap på tumorceller, skade på tumorassosiert vaskulatur og aktivering av immunrespons. Skadeomfanget vil være avhengig av flere faktorer; som fotosensitiserens kjemiske egenskaper, lokalisering og konsentrasjon av fotosensitiser ved belysningstidspunktet, tiden mellom administrering og belysning, lysdosen, vevstype og oksygenkonsentrasjonen i vevet. Disse faktorene vil være gjensidig avhengige av hverandre [21, 26]. DNA-skader, mutasjoner og karsinogenese vil i liten grad inntreffe da fotosensitiserer ikke akkumuleres i cellekjernen, noe som skyldes fotosensitiserens negative ladning [12, 22].

#### PDT-indusert skade på tumorassosiert vaskulatur

Tumorcellenes viabilitet vil være avhengig av tilgangen på næringsstoffer. Disse næringsstoffene får de via de omkringliggende blodårene. Et mål innenfor cancerterapien vil derfor være å skade vaskulaturen. Ved å velge fotosensitiserer som lokaliseres til vaskulaturen ved belysningstidspunktet vil PDT medføre vaskulære skader som vaskulær kon-

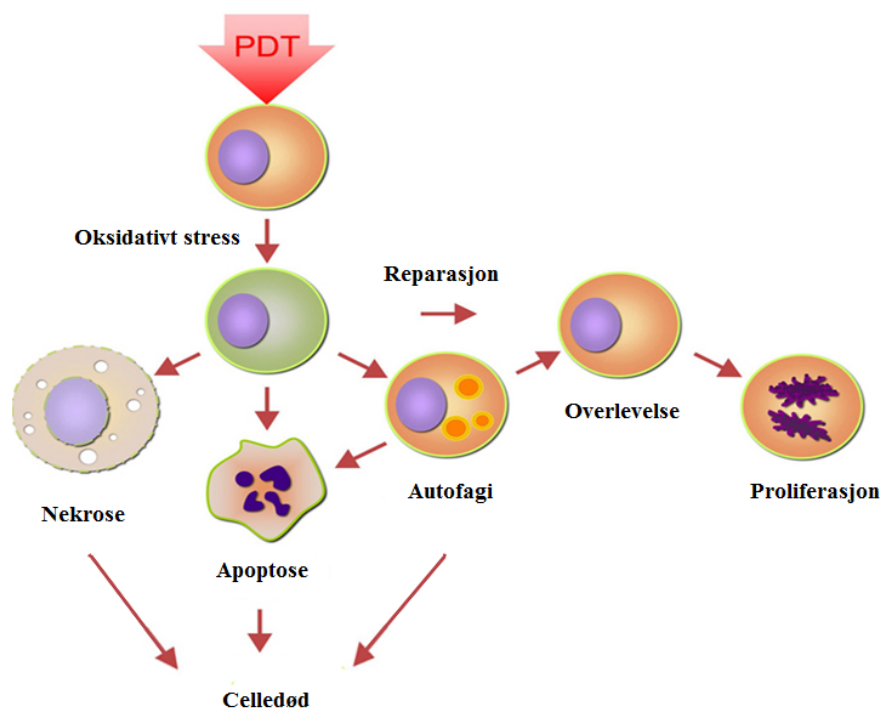
traksjon og trombosedannelse som fører til hypoksi (nedsatt oksygenforsyning) og anoksi (oksygenmangel i vevene). Dette bidrar til hemming av tumorvekst [21]. Henderson et al. viste at Photofrin<sup>®</sup>-PDT i en fibrosarkom musemodell medfører skade på vaskulaturen slik at tilgangen på oksygen ble begrenset for tumorcellene [26]. I tillegg har Norum et al. vist en inhibering av perfusjon etter PCI med bleomycin (Avsnitt 1.2) [61].

### **PDT-indusert aktivering av immunrespons**

PDT-induserte endringer i plasmamembraner kan aktivere fosfolipaser i membranene. Aktiveringen vil sette igang degraderingen av fosfolipider som igjen resulterer i en massiv frigjøring av inflammatoriske mediatorer. De inflammatoriske cytokinene interleukin (IL)-6 og -10 er vist å være oppregulert in vivo etter PDT. De inflammatoriske signalene medfører en rekruttering av nøytrofile granulocytter, mastceller og monocytter/makrofager til det skadede området. Denne type PDT-effekt vil ikke ha en stor betydning på tumordrapet etter PDT, men den vil ha en større betydning for langtidseffekten av PDT. Makrofager kan fagocyttere tumorceller som er drept eller skadet etter PDT. Vevsfaktorlikhetsmolekylene klasse II (major histocompatibility class II, MHC-II) som finnes på overflaten av makrofagene vil binde tumorspesifikke peptider og presentere dem for CD4<sup>+</sup> hjelper T-lymfocytter. Aktivering av CD4<sup>+</sup>-cellene vil igjen føre til at cytotoksiske CD8<sup>+</sup> T-lymfocytter blir mer sensitive mot tumorspesifikke epitoper. Dette vil føre til utvikling av en langvarig immunitet mot tumorceller da CD4<sup>+</sup>-cellene og CD8<sup>+</sup>-cellene senere vil kunne gjenkjenne disse spesifikke tumorcellene [19].

### **PDT-indusert drap av tumorceller**

Antitumoreffekten av PDT kommer hovedsaklig av dannelsen av ROS (Avsnitt 1.1.1). In vitro forsøk har vist at PDT reduserer antall tumorceller gjennom ROS-mediert skade [26] og tumorbiopsier etter PDT-behandling har vist at både apoptose og nekrose blir initiert [22]. Selv om initieringen av apoptose og nekrose er hovedresponsen etter PDT-behandling, er indusering av autofagi (Avsnitt 1.3) også blitt påvist (Figur 1.4). Moan et al. viste at <sup>1</sup>O<sub>2</sub> kun diffunderer 0,02 μm [54], dermed vil lokaliseringen av fotosensitiseren ved belysningstidspunktet korrespondere med stedet for primær fotokjemisk skade. Lokaliseringen av fotosensitiseren subcellulært vil derfor ha en stor påvirkning på hvilken type celledød som oppstår etter PDT.



Figur 1.4: **PDT-indusert drap av tumorceller.**

PDT-mediert skade medfører drap av tumorceller via nekrose, apoptose eller autofagi. Dersom skadeomfanget er liten vil autofagi kunne reparere skadene og dermed føre til celleoverlevelse. [65]

#### PDT-indusert nekrose

Nekrose er en prosess hvor cellen undergår en unaturlig død. Prosessene som resulterer i nekrose er skader som er irreversible slik at energiproduksjonen i cellene reduseres kritisk. Morfologisk observeres blant annet celledvelling og ødeleggelse av plasmamembran. Dette bidrar til at cellens indre miljø ødelegges slik at proteiner denatureres og en inflammatorisk respons blir aktivert grunnet lekkasje av cellulært innhold og pro-inflammatoriske molekyler.

Lipofile fotosensitiserere som lokaliseres til plasmamembraner har vist å favorisere nekrose. Hovedgrunnen til dette er at ROS-dannelsen medfører en oksidering av kolesterol og andre umettede fosfolipider i membraner og proteiner. Dette resulterer blant annet i permeabilitetsforandring i plasmamembranen og en rask uttømming av intracellulært ATP som igjen induserer nekrose [16].

### PDT-indusert apoptose

Apoptose er en form for programmert celledød som iverksettes innenfra cellen. I motsetning til nekrose er apoptose en ATP-avhengig prosess. Morfologisk kan apoptose karakteriseres ved cellekrymping, kjernekondensering, DNA-fragmentering og formering av apoptotiske legemer. De apoptotiske legemene pakker inn fragmenterte cellerester før de blir fjernet av fagocytter. Denne typen celledød vil derfor ikke aktivere en immunrespons.

I mammalske celler vil PDT kunne trigge to store apoptotiske veier; dødsreseptor-medierte og mitokondriemedierte veier. Ved begge veiene vil apoptose innebære aktivering av kaspaser, en familie av cystein proteaser. Alle kaspaser syntetiseres som pro-enzymmer og blir først aktivert som en respons på et apoptotisk signal eller ved proteolyse av en oppstrømskaspase (effektor kaspaser) [11].

Dødsreseptor-medierte signalveien blir formidlet gjennom celleoverflatereseptorer som FAS, TNF-R eller TRAIL reseptorer. Bruk av forskjellige fotosensitiserere har vist en økt aktivering av FAS og dens ligand FasL både *in vitro* og *in vivo*. Dødsligandstimulering resulterer i oligomerisering av reseptorer og rekruttering av adapterproteinet Fas-assosiert dødsdomene (FADD) og initierende prokaspase 8 og 10 og danner en dødsinduserende signalkompleks (death-inducing signaling complex, DISC). Autoaktivering av kaspase 8 og 10 fører til aktivering av effektor kaspasene 3 og 7 som induserer apoptose [16].

Fotosensitiserere som lokaliseres til mitokondrier eller endoplasmatiske retikulum (ER) er vist å indusere apoptose. Det er vist at den intracellulære  $\text{Ca}^{2+}$  konsentrasjonen økes etter PDT-behandling. Konsentrasjonsøkningen kan være et resultat av frigjøring av  $\text{Ca}^{2+}$ -ioner fra ER, mitokondrier eller ekstracellulære omgivelser. ROS-medierte skade på mitokondrier gir tap i mitokondriell membranpotensial, noe som forsterkes av  $\text{Ca}^{2+}$ -ioner, og medfører mitokondriell poreåpning. Dette vil igjen resultere i en lekkasje av cytokrom c til cytosolen. Cytokrom c vil binde seg til apoptose protease-aktiverende faktor 1 (Apaf-1) og ved tilstedeværelse av ATP kunne rekruttere prokaspase-9 og danne et intracellulært kompleks (apoptosom). Inni apoptosomen vil prokaspase-9 bli aktivert, noe som fører til aktivering av effektor kaspase-3 og induseringen av apoptose [67].

Berg et al. har vist at lysosomer er et mål for PDT[5]. Fotosensitiserere som lokaliseres til lysosomer er blitt vist av Kessel et al. å frigjøre cathepsiner til cytoplasmaen [43]. Cathepsiner vil i cytosolen enten kunne aktivere kaspaser eller kløyve Bid (pro-apoptotisk medlem av Bcl-2 proteinfamilien) til tBid. tBid vil lokalisere seg til mitokondriemembraner hvor den aktiverer Bax (pro-apoptotisk medlem av Bcl-2) som igjen resulterer i mitokondriell poreåpning, lekkasje av cytokrom c og dermed apoptoseindusering.[67].

### 1.1.5 PDT-aktivering av proteinkinaser

Oksidativt stress er vist å både aktivere og inhibere MAPK (mitogenaktivert protein-kinase) signalveier [53]. Blant målproteinene for MAPK er transkripsjonsfaktorer som regulerer ekspresjonen av proteiner som er viktige i proliferasjon, differensiering og overlevelse/død. Flere PDT-studier med forskjellige fotosensitiserere er vist å aktivere tre protein kinaser i MAPK familien; ekstracellulær signalregulert kinase (ERK), stressaktivert protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) og p38 [1, 46, 74, 77]. I motsetning til ERK som aktiveres ved mitogen (hormoner og veksfaktorer) stimuli, blir JNK og p38 aktivert av forskjellige former for stress. Aktivering av JNK og/eller p38 kan resultere i signaler for enten celleoverlevelse eller celledød. Hvilket av disse resultatene som blir gjeldende er avhengig av cellelinje og hvilken fotosensitiserer som er brukt. Assefa et al. har vist at en aktivering av JNK og p38 i HeLa celler (kreftceller fra livmorhals) beskytter cellene mot apoptose ved Hypericin-PDT [1]. mens Tong et al. viste at Photofrin-PDT induisert aktivering av JNK hadde liten effekt på celleoverlevelsen [74]. Karlova et al. har vist at en aktivering av p38 kaskaden med PORF-TEG-PDT fører til mitokondriell apoptose i flere cellelinjer. p38 er også vist å føre til celledød ved bruk av TPPS<sub>2a</sub>-PDT, mens bruk av samme fotosensitiserer resulterer i JNK-mediert overlevelse [77].

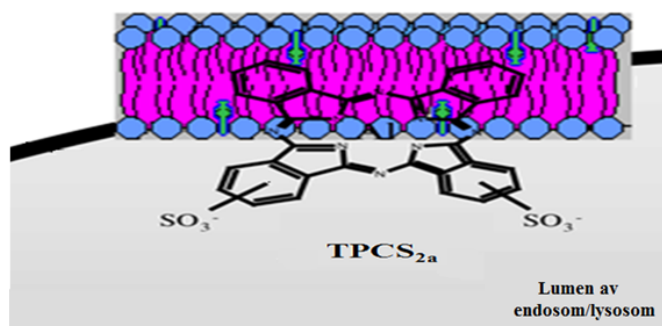
## 1.2 Fotokjemisk Internalisering

Fremskritt innenfor molekylær biologi og genetik samt bioteknologi har ført til utvikling av terapeutiske makromolekyler. Disse legemidlene har et stort potensiale i behandling av kreft og andre typer sykdommer. Makromolekyler som innehar terapeutiske egenskaper er blant annet proteiner, nukleinsyrer og peptider. Størrelsen vil variere fra noen få kilodalton (kDa) for peptider til flere hundre kDa for gener [48]. Da cellemembranen er impermeabel for molekyler som er større enn 1 kDa [2], vil cellemembranen være et hinder for levering av disse molekylerne. Mangel på en effektiv transportmekanisme inn i cellens cytosol er et felles problem for de fleste makromolekyler da disse molekylerne i mange tilfeller utøver sin effekt intracellulært. Fotokjemisk internalisering (PCI) er en ny metode for målrettet levering av slike makromolekyler til cytosol.

### 1.2.1 Virkningsmekanismene bak PCI

Mammalske celler har ulike mekanismer for å internalisere ekstracellulære materialer. Molekyler som er membranimpermeable grunnet størrelsen eller hydrofilisiteten vil kunne tas opp intracellulært ved endocytose. Endocytose er en cellulær mekanisme som utøves av alle typer celler bortsett fra modne erytrocytter. Internaliseringen skjer ved at cellemembranen danner en innbuktning som etterhvert avsnøres til en intracellulær vesikkel som inneholder endocyttert materiale. De endocytiske vesikler vil deretter fraktes til tidlige en-

dosomer hvor de kan bli resirkulert og eksocyttert (aktiv transport av molekyler ut av cellen) eller transportert videre til lysosomer. Impermeable molekyler som ikke har mekanisme for frigjøring fra endosomene vil kunne bli degradert i lysosomer, og dermed ikke kunne utøve sin intracellulære effekt. PCI er en metode for levering av endocytterte makromolekyler intracellulært. I likhet med PDT (Avsnitt 1.1) benytter PCI seg av fotosensitisere og lys. Fotosensitisere brukt i PCI kan være amfifile, f.eks. TPPS<sub>2a</sub> og TPCS<sub>2a</sub>. Den hydrofobe delen av fotosensitiseren vil kunne trenge inn i plasmamembranen, men da den også har en hydrofil del vil den ikke kunne penetrere gjennom cellemembranen. Slike fotosensitisere vil bli tatt opp ved endocytose og lokaliseres til endosomer og lysosomer. Den hydrofobe delen lokaliseres inn i membranene, mens den hydrofile delen lokaliseres til den hydrofile fasen i endosomer og lysosomer (Figur 1.5). Fotosensitisere aktiveres av lys og gir dannelsen av ROS, primært <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, som vil oksidere membrankomponenter. Da diffusjonslengden til <sup>1</sup>O<sub>2</sub> kun er på 0,02 μm vil den kunne skade membranen uten at innholdet i endolysosomene ødelegges. Indusert skade på membranene medfører frigjøringen av makromolekylene, som er fanget på innsiden av endosom/lysosom-membranene, og inn i cytosol hvor de kan utøve sin intracellulære effekt [2, 62]. Det er to strategier for levering av makromolekyler i PCI; ”lys etter” og ”lys før”.



Figur 1.5: Forventet lokalisering av TPCS<sub>2a</sub> [62].

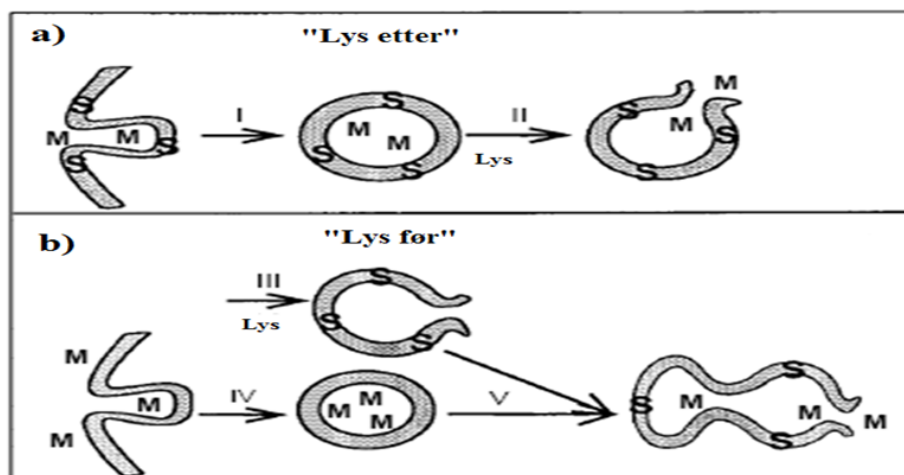
### ”Lys etter” -strategien

Ved ”lys etter”-strategien (Figur 1.6a) administreres lys etter opptak av makromolekylet. Dette er den opprinnelige strategien for PCI. Fotosensitiseren og makromolekylet vil ved denne metoden kunne tilsettes samtidig slik at disse lokaliseres til de samme vesiklene. Ved lysaktivering vil endolysosomale membraner få oksidative skader og frigjøringen av makromolekyler vil kunne finne sted. Begrensninger ved denne strategien er at makromolekyler vil kunne bli degradert av endolysosomale hydrolytiske enzymer før de blir frigjort. Makromolekyler som er lokalisert i nærheten av fotosensitisere vil i tillegg kunne bli skadet ved at ROS oksiderer aminosyrer i proteiner og peptider [4, 62].



"Lys før" -strategien

Ved "lys før"-strategien (Figur 1.6b) administreres lys før opptak av makromolekylet. Først gjennomføres en PDT-behandling hvor ROS-mediert skade på endocytiske membraner dannes. Makromolekylet tilsettes innen 6-8 timer etter PDT og vil tas opp via endocytose. Intakte endocytiske vesikler som inneholder makromolekylet vil kunne fusjonere med de skadede vesiklene slik at makromolekylet blir frigjort til cytosol [4].



Figur 1.6: PCI ved lys etter og lys førstrategi.

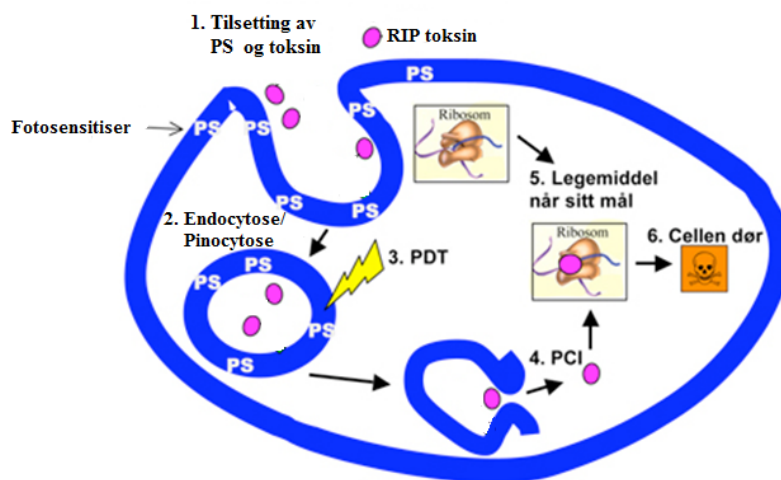
a) viser PCI med "lys etter"-strategien hvor både fotosensitizeren (S) og makromolekylet (M) lokaliseres til de samme endocytiske vesikler (I). Belysning medfører oksidative skader på membranene slik at makromolekylet frigjøres til cytosol (II). b) viser PCI med "lys før"-strategien hvor PDT medfører ROS-mediert skade på endocytiske membraner (III) før makromolekylet tilsettes (IV). Intakte vesikler som inneholder makromolekyler vil kunne fusjonere med de skadede vesiklene slik at makromolekylet frigjøres til cytosol (V) [68].

Både "lys før"- og "lys etter"-strategiene er vist å levere makromolekyler effektivt. Hvilken av disse to metodene som vil være mest egnet er avhengig av makromolekylet. Levering av proteintoksinet gelonin er vist i enkelte tilfeller å være mest virkningsfull med "lys før"-metoden [68], mens konjugatet EGF-saporin [78] og immuntoksinet cetuximab-saporin [83] har vist å være mest effektivt levert ved "lys etter"-strategien.

### 1.2.2 PCI-indusert levering av proteiner

PCI har vist å øke cytotoxiciteten til ribosominaktiverende proteiner (RIP, Figur 1.7) [8, 47, 68]. RIP er plantetoksiner som gir en irreversibel skade på ribosomer. Ribosomer finnes i cytosolen i alle celletyper og har ansvaret for proteinsyntesen. Strukturelt sett kan RIP deles inn i to grupper, type I- og II RIP, hvor begge resulterer i en inaktivering av proteinsyntesen. Den toksiske effekten av RIP vil ikke inntreffe før de internaliseres til

cytosolen. Type II RIP, f.eks. ricin, består av en aktiv enzymatisk A-kjede som er koblet til en B-kjede via hydrofobe bindinger og en disulfidbro, mens type I RIP, f.eks. gelonin, kun består av en A-kjede. B-kjeden har en galaktosebindende lektindomene som muliggjør binding til plasmamembraner. Denne egenskapen gjør at type II RIP blir tatt opp ved reseptormediert endocytose og transportert til cytosol, via Golgiapparatet og endoplasmatiske retikulum (ER), hvor disulfidbindingen mellom de to kjedene blir redusert. Opptaket av type I RIP skjer via pinocytose etterfulgt av transportering til lysosomer hvor de blir degradert. Den toksiske effekten til RIP kommer av at N-glykosidase i A-kjeden kløyver adenin<sub>4324</sub> i ribosomets store subenhet (60S). Eliminering av adenin<sub>4324</sub> resulterer i at eukaryote ribosomer ikke vil kunne binde elongeringsfaktor-2 (EF-2) da EF-2 bindesettet på subenheten 28S rRNA er blitt inaktivert. Konsekvensen av dette er en inaktivering av proteinsyntesen. Det er estimert at 1-10 toksinmolekyler er nok til å drepe en celle [7].



Figur 1.7: PCI av et toksin.

Administrering av et toksin sammen med en fotosensitiser (1) medfører en akkumulering i endocytiske vesikler etter opptak ved endocytose/pinocytose (2). Lysaktivering (3) av fotosensitiseren medfører ROS-medierte skader på endosommembranen slik at toksinet frigøres til cytosol (4). I cytosol vil toksinet kunne binde seg til ribosomet (5) og hemme proteinsyntesen som igjen resulterer i celledød (6).[76]

Makromolekylet som benyttes i denne studien er saporin. Saporin er isolert fra frøene til såpeurten *Saponaria officinalis* og tilhører type I RIP. En økende cytotoxisk effekt er observert i studier av PCI med saporin, både ved bruk av frie saporin molekyler og konjugerte saporin-forbindelser [47, 78, 83].

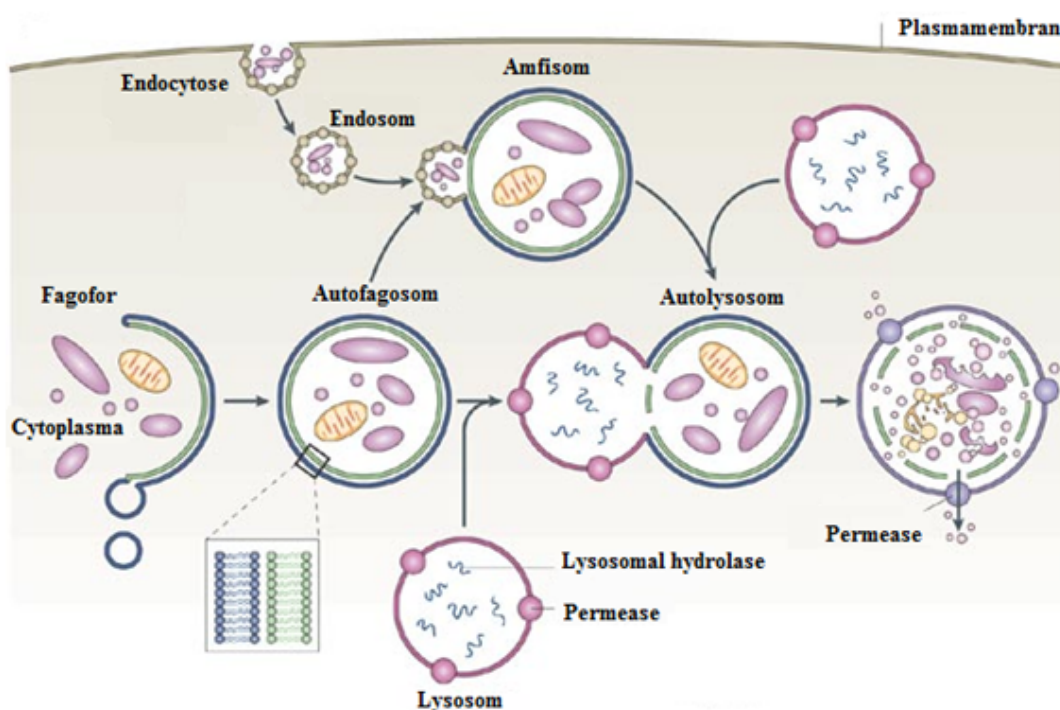
### 1.3 Autofagi

Ved mangel på næringsstoffer eller andre former for cellulær stress, vil cellen reagere med å øke ekspresjonen av stressproteiner samt nedregulere translasjonen og ribosom biogenesen. Degradering av proteiner er en responsmekanisme ved slike tilfeller, og kan skje ved ubiquitinerings eller ved autofagi. Ubiquitin er et protein som merker proteiner for proteolyse og har en kort turnover (nedbryting av proteiner over tid), mens autofagi har en lang turnover tid. Som en respons på mangelfull tilgang til næringsstoffer vil autofagi være den beste degraderingsmekanismen da en lengre turnover-tid gir en større tilgang på frie aminosyrer som er en nødvendighet i proteinsyntesen og/eller ved energiproduksjon[25]. Autofagi er derfor essensiell for cellens overlevelse, differensiering og homeostase. Autofagi fungerer i prinsippet som en beskyttelsesmekanisme mot patologiske prosesser som infeksjoner, kreft, neurodegradering, hjertesykdommer og aldring [49].

Christian de Duve blir regnet som grunnleggeren innenfor fagfeltet autofagi. de Duve oppdaget i 1955 lysosomer og han var den første som benyttet begrepet "autofagi" i 1963. Mens de Duve og andre hovedsaklig fokuserte på de avsluttende stegene (rett før- eller etter fusjonen med lysosomer) i autofagi, valgte Seglen et al. å fokusere på de tidlige stegene. Ved bruk av radioaktive prober fikk de identifisert fagoforer og amfiosomer. Selv om det er mer enn 40 år siden autofagi ble beskrevet, er det først i det siste tiåret at interessen for dette fagfeltet har blomstret [44].

Oksidativt stress på organeller eller cytosol forårsaket av fotokjemisk behandling vil kunne indusere autofagi [24]. Avhengig av skadeomfanget kan autofagi fungere som en aktivering av celledød eller som en beskyttelsesmekanisme mot celledød. Det finnes tre distinkte autofagi pathwayer; chaperon-mediert autofagi (CMA), mikroautofagi og makroautofagi. Felles for alle disse tre prosessene er at nedbrytingen av intracelleulære bestanddeler foregår via lysosomet. Ved CMA blir ufoldete proteiner transportert til lysosomene vha av det cytosoliske og lysosomale chaperonen hsp70 via membranreseptoren LAMP-2A (lysosom-assosiert membranprotein type 2A), mens ved mikroautofagi vil lysosomet direkte kapsle inn de bestanddelene som skal degraderes [14]. I denne studien vil fokuset være på makroautofagi (heretter kun kalt autofagi). Initiering av denne type autofagi er dannelsen av en isolerende membran, fagofor, som kapsler inn skadet intracellulært materiale i en cisterne med dobbel membran kalt autofagosom. Autofagosomer vil deretter kunne fusjonere med endosomer, og produktet av denne fusjonen kalles et amfiosom. Autofagosomer og amfiosomer kan deretter fusjonere med lysosomer og danne autolysosomer. Lysosomale hydrolaser i lysosomene vil degradere autofagosomenes indre membran og dets innhold. Degradert cellulært materiale blir frigjort ved hjelp av

permeaser (membranproteiner som transporterer stoffer over membraner) og resirkulert i cytosol (Figur 1.8) [44].



Figur 1.8: **Autofagi veien.**

Fagoforer kapsler inn skadet intracellulært materiale, og danner autofagosomer. Autofagosomer vil deretter kunne fusjonere med endosomer og danne amfiosomer. Autofagosomer og amfiosomer vil deretter fusjonere med lysosomer og danne autolysosomer. Innholdet i autolysosomene degraderes av lysosomal hydrolase, og blir frigjort vha. permeaser. [44]

### 1.3.1 Virkningsmekanismene bak autofagi

Virkningsmekanismene bak autofagiprosessen er ikke fullstendig klarlagt, men funn av ca. 30 autofagi-spesifikke gener (autophagy-related genes, Atg) i gjærceller har gitt oss et større innblikk. Mange av Atg funnet i gjær har også blitt identifisert med mammalske homologer. Autofagi kan deles inn i flere prosesser; indusering av autofagi, elongering av isolerende membran (IM), lukking av IM, fusjonering med endosomer og lysosomer samt degradering av intracellulære materialer.

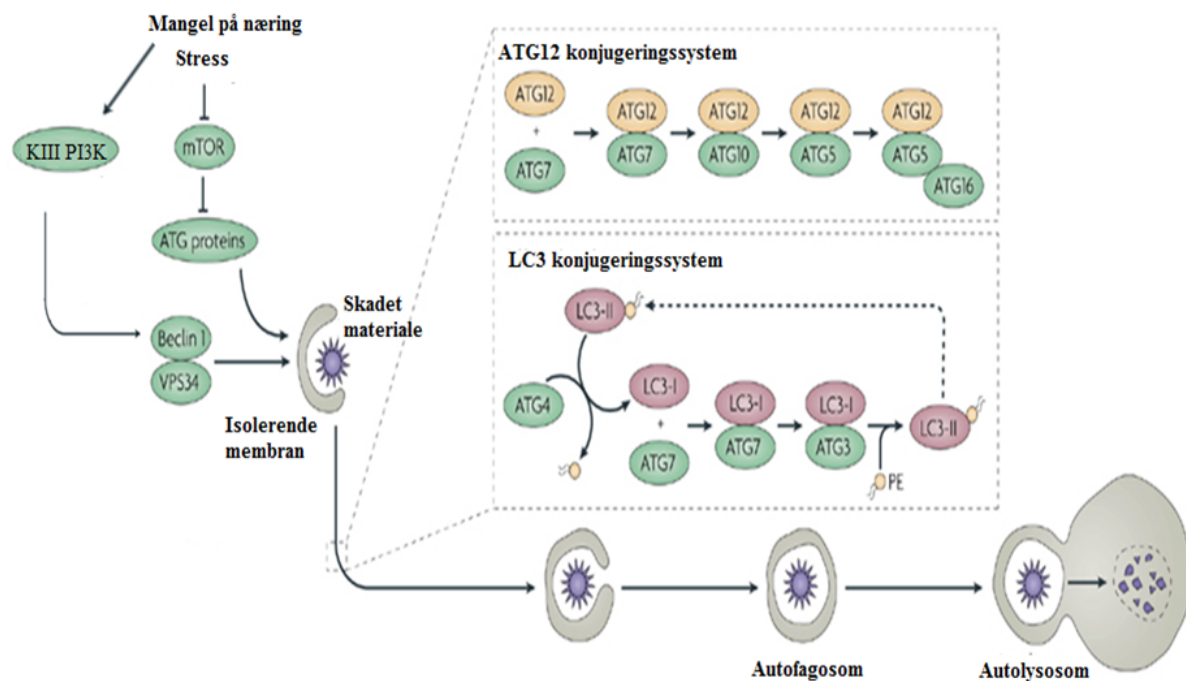
#### Indusering av autofagi

Hvordan autofagi gjenkjenner proteiner og organeller som skal isoleres og degraderes er ikke fullstendig forstått, men ubiquitinering er vist å være viktig i gjenkjennelsesprosessen av proteinaggregater. I tillegg er det blitt foreslått at peroksisomer, modne ribosomer og mitokondrier blir merket av spesifikke proteiner for autofagidegradering [14].

Induseringen av autofagi skjer ved fosforylering av nøkkelkomponenter i et induseringskompleks. I gjærceller består dette komplekset blant annet av Atg1, -11, -13 og -17. Atg1 er en serin/threonin kinase som virker nedstrøms for TOR (target of rapamycin). Stress medfører inhibering av TOR som igjen fører til at fosfoproteinet Atg13 defosforyleres og binder seg til Atg1. Sammen med Atg11 og -17 vil dette komplekset promotere autofagi (Figur 1.9). De mammalske Atg1 (mAtg1) homologene ULK1 og ULK2 er vist å ha en regulerende effekt på autofagi. Selv om ULK1 og ULK2 har mange likheter (52 % like) ser det ut som om de har motsatte effekter. siRNA (small interfering RNA) knockdown av ULK1 i HEK293A og HeLa celler viser en hemming av autofagi, noe som ikke kan sees ved mangel på ULK2 [51]. Induseringen av autofagi vil deretter trigge klasse III fosfoinositid 3-kinase (PI3K) som medfører en konvertering av fosfatidylinositol til fosfatidylinositol 3-fosfat (PI3P). Dette vil igjen føre til en rekruttering av det transmembrane proteinet Atg9/mAtg9 og assosierte lipider fra mitokondrier, ER og endosomer til den voksende vesikkelen [71].

#### Elongering av isolerende membran

Induseringen av autofagi medfører at klasse III PI3K kompleks I (Figur 1.9), bestående av Vps (vascuolar protein sorting)34, Vps15, Atg6 og Atg4, danner PI3P som vil fungere som et rekrutteringssignal for andre proteiner som trengs i elongeringsprosessen. Klasse III PI3K kompleks I vil rekruttere Atg12 som ved hjelp av Atg7- og -10 (fungerer som ubiquitin-aktiverende enzymer E1 og E2) konjugeres til Atg5. Konjugatet Atg5-12 vil deretter binde seg til Atg16L, og en homodimerisering av dette trimeriske komplekset danner det multimeriske komplekset Atg16L. Dette komplekset er igjen essensiell for rekrutteringen av microtubule-assosiert protein light chain 3 (LC3, mammalsk homolog til Atg8 i gjærceller). Ved indusering av autofagi vil cytosolisk LC3-I bli kløvet og konjugert med fosfatidyletanolamin (PE) ved hjelp av Atg3, -4 og -7. Dette konjugatet har fått navnet LC3-II og lokaliseres til autofagosommembraner. Både Atg16L komplekset og LC3-II er vist å være essensielle i dannelsen av autofagosomer. Det er blitt foreslått at Atg16L komplekset innehar egenskaper som bestemmer ekspanderingsstedet, mens LC3-II har fusjonerende egenskaper som vil katalysere elongeringen. Studier av MEF (mouse embryonic fibroblasts) som er isolert fra  $Atg3^{-/-}$  mus viser en sammenheng mellom disse to kompleksene. I  $Atg3^{-/-}$  MEF'er er det blitt vist en redusert konjugering mellom Atg12 og Atg5 samt ingen LC3-II. Ved bruk av EM (elektron mikroskopi) analyser er det blitt observert at autofagosomer dannes i  $Atg3^{-/-}$  MEF'er, men disse vesiklene er vist å være mye mindre enn de hos villtypene samt at de har en unormal form [51].



Figur 1.9: Virkningsmekanismene bak autofagi.

Mangelfull tilgang på næringsstoffer eller stress vil inhibere mTOR og aktivere klasse III PI3K. Disse signalene vil indusere autofagi ved å rekruttere Atg-proteiner og Beclin 1. Elongeringen av isolerende membran skjer via Atg12- og LC3 konjugeringssystem (se tekst).[33]

#### Lukking av isolerende membran

Mangel på LC3-II dannelse i  $Atg3^{-/-}$  MEF'er har vist at LC3 spiller en stor rolle i avsnøringsprosessen. IM i disse musene var enten ikke lukket eller så var de multilamellare (hadde flere lipidlag) [51]. Disse observasjonene er også blitt observert med benyttelsen av en ny metode som eliminerer LC3. Denne metoden tar i bruk eksogent inaktiv form av Atg4. Translatert LC3 (pro-LC3) vil ha en unødvendig C-terminalhale som kløyves av cystein proteasen Atg4, slik at det blir dannet ukonjugert, cytosolisk LC3-I. Ved autofagi vil Atg4 videre kunne kløyve LC3-I for å danne LC3-II som lokaliseres til IM. Ved overekspresjon av den inaktive Atg4 mutanten vil ikke LC3-II bli dannet da inaktiv Atg4 har høy affinitet til ukonjugert LC3-I. Kløyving av LC3-I til LC3-II vil derfor ikke finne sted. Hvordan LC3-II bidrar til lukkingen av IM er ikke helt klarlagt, men det er blitt foreslått at LC3-II katalyserer en form for revers hemifusjonering. Hemifusjon er når det proksimale lipidlaget på to membraner fusjonerer, og danner en fusjoneringspore som fullfører fusjoneringen [59].

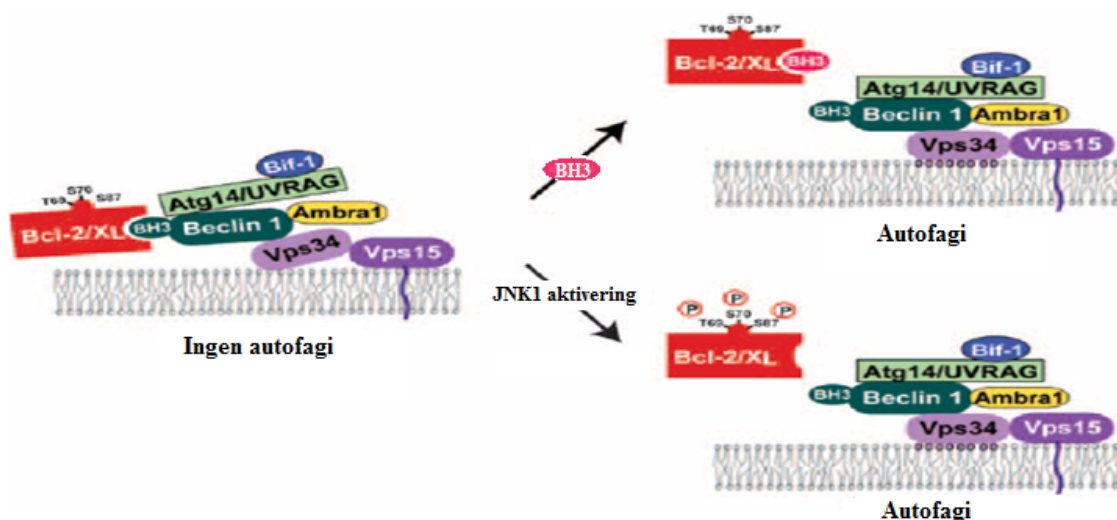
### Fusjonering med endosomer og lysosomer

Studier med immuno-EM analyser rettet mot LC3-II har vist et sterkt signal av LC3-II ved dannelsen av autofagosomer, og et svakere signal etter endt dannelse. Dette indikerer at LC3-II blir frigjort fra IM, vha. Atg4 protease, før fusjoneringen med endosomer eller lysosomer. Frigjøringen av LC3-II er nødvendig da tilstedeværelse av LC3-II vil kunne medføre en hemifusjonering mellom flere autofagosomer, noe som igjen medfører feil i senere steg [59]. ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) komplekser er vist å være essensiell i autofagi. ESCRT er proteinkomplekser som regulerer endosomal levering til lysosomer. En deletering av vps28 (ESCRT-I), vps25 (ESCRT-II), vps32 (ESCRT-III) eller vps4 (AAA-ATPase) har vist en akkumulering av autofagosomer som ikke er blitt degraderte. Intracellulær trafikk styres som oftest av Rab proteiner og SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) proteinfamilien. Både Rab- og SNARE proteiner medierer transporten og fusjonen av vesikler. Rab7 og Vti1 (en SNARE) er vist å være involvert i autofagien, mest sannsynlig for å hjelpe autofagosomer til å fusjonere med sen endosomer og lysosomer [51].

### **1.3.2 Regulering av autofagi**

Autofagi blir regulert av flere signalveier hvorav targetet of rapamycin (TOR) er en av de sentrale. TOR er en serin/threonin protein kinase som tilhører fosfatidylinositol kinase-relaterte kinase (PIKK) familien. Aktiviteten til mTOR (mammalsk TOR) reguleres av nivået på aminosyrer og glukose i cellene. Binding av mTOR til flere proteiner medfører dannelsen av to proteinkomplekser som har fått navnet mTOR kompleks 1- og 2 (mTORC1 og mTORC2). Funksjonen til mTORC1 er å regulere translasjon og ribosombiogenesisen i celler, mens mTORC2 regulerer fosforyleringen og aktiveringen av Akt/PKB signalveien. Ved mangel på næringsstoffer og stress vil mTORC1 bli hemmet og en induksjon av autofagi vil finne sted. I gjærceller er TORC1 vist å ha en direkte hyperfosforylerende effekt på Atg13 og en hemmende effekt på Atg1 kinase. Dette fører til at en konjugering mellom Atg13 og Atg1 ikke vil kunne finne sted, noe som trengs for å danne induseringskomplekset for autofagi. Dette er også blitt observert i mammalske celler hvor mTORC1 viser en regulerende effekt på Atg13 og ULK1/2. [40].

Oppstrøms for mTORC1 vil klasse III PI3K kunne regulere autofagi da de katalyserer produksjonen av PI3P som er nødvendig for induksjonen av autofagi. Inhibering av klasse III PI3K ved bruk av 3-metyladenin og wortmannin har vist å nedregulere autofagi. Klasse III PI3K er assosiert med Atg6/Beclin 1, og dette komplekset er med på å regulere autofagi. Beclin 1 har en Bcl-2 homologi-3 domene (BH3) som medierer dens interaksjon med Bcl-2 og Bcl-X<sub>L</sub>. En interaksjon mellom Beclin 1 og Bcl-2 medfører en inhibering av autofagi. In vitro forsøk med siRNA knockdown av Bcl-2 i HeLA celler er vist å gi autofagisk ak-



Figur 1.10: **Beclin 1 regulering av autofagi.**

En interaksjon mellom Beclin 1 BH3 domene og Bcl-2/Bcl- $X_L$  medfører en inhibering av autofagi. Initieringen av autofagi kan intrefte ved JNK1-mediert Bcl-2/Bcl- $X_L$  fosforylering eller en konkurrerende effekt om BH3-domenet.[71].

tivitet. Teorien kan ytterligere støttes av in vivo forsøk med transgene mus som uttrykker Bcl-2. I disse studiene er det funnet en nedregulering av autofagi ved næringsfattige tilstander. Denne anti-autofagiske effekten av Bcl-2 er kun sett på Bcl-2 som er lokalisert i ER, og ikke mitokondriell Bcl-2. Mekanismene bak dette er ennå ikke klarlagt. Det er blitt vist at to mekanismer er med på å regulere Bcl-2/Bcl- $X_L$  bindingen til Beclin 1. Disse to mekanismene er JNK1-mediert Bcl-2 fosforylering og en konkurrerende effekt om BH3-domenet (Figur 1.10). Ved næringsfattige og stress tilstander vil JNK1 aktivering kunne fosforylere Bcl-2/Bcl- $X_L$ . Dette fører til at Bcl-2/Bcl- $X_L$  frigjøres fra Beclin 1, og dermed vil autofagi bli induert. Den andre mekanismen går ut på at andre proteiner som har BH3 domener vil kunne konkurrere med Beclin 1 om Bcl-2/Bcl- $X_L$ . Dersom Beclin 1 BH3 domene ikke bindes til Bcl-2/Bcl- $X_L$ , vil dette gi pro-autofagisk aktivitet [71]. Andre proteiner som er assosiert med klasse III PI3K er UVRAG (ultraviolet irradiation resistance-associated gene) og Bif-1 (bax-interacting factor-1). UVRAG er funnet å ha en effekt på Beclin 1 ved direkte interaksjon, mens Bif-1 interagerer med Beclin 1 via UVRAG. Effekten av disse interaksjonene viser å være pro-autofagisk. Tap av Bif-1 er vist å hemme dannelsen av autofagosomer [14].

mAtg9 transport har vist å spille en essensiell rolle i reguleringen av autofagi. Ved normale forhold vil mAtg9 lokaliseres til trans-Golgi nettverket (TGN) og perifere endosomer. Ved mangelfull tilgang på næringsstoffer vil mAtg9 redistribueres til endosomer og autofagosomer fra TGN. Webber et al. har identifisert og vist at et protein binder seg til



c-terminal domenet til mAtg9 in vivo og på den måten regulere mAtg9 transporten. Dette proteinet har fått navnet p38-interagerende protein (p38IP) og trengs for aktiveringen av mAtg9 transporten og dermed induseringen av autofagi. Under normale forhold vil p38IP binde seg med høy affinitet til fosfo-p38 $\alpha$ , noe som medfører inhibering av autofagi. Ved mangelfull tilgang på næringsstoffer vil denne affiniteten bli svekket og p38IP vil kunne interagere med mAtg9 som igjen muliggjør dannelsen av autofagosomer. p38 $\alpha$  er dermed blitt foreslått å være en negativ regulator av autofagi [75].

#### 1.4 Formålet med oppgaven

Mitogenaktivert proteinkinase (MAPK)-kaskader blir ofte aktivert av forskjellige former for stress. MAPK-kaskadene regulerer ekspresjonen av proteiner som er viktige i proliferasjon, differensiering og overlevelse/celledød. Aktivering av proteinkinasene JNK og p38 kan resultere i pro- eller antiapoptotisk signaler. Studier med cytokiner og ceramider er vist å aktivere JNK og p38. Aktivering av JNK er rapportert å stimulere autofagimediert celledød som kan reverseres med inhibitoren SP600125, og TNF $\alpha$ -indusert celledød via apoptose og autofagi er vist å bli aktivert av p38 MAPK inhibitoren SB203580 [20, 50]. Oksidativt stress forårsaket av fotokjemisk behandling er også vist å aktivere både JNK og p38, men utnyttelse av de samme inhibitoren har vist å ha motsatt effekt på cellulær viabilitet [77]. Denne tilsynelatende motsatte effekten av JNK- og p38 MAPK inhibitorene kan skyldes at etter en fotokjemisk behandling vil autofagosomer forventes å fusjonere med skadede endosomer og lysosomer. Det kan derfor ikke forventes degradering av cellulære komponenter i autolysosomer. I stedet er det grunn til å anta at innholdet i autofagosomer resyklres tilbake til cytosol med ukjent effekt på cellulær viabilitet. Det er derfor ønskelig å undersøke betydningen av autofagi for behandlingseffekt etter fotokjemisk behandling.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Standardprosedyrer

#### 2.1.1 Sterilteknikk

Ved celledyrkning ble det brukt sterilteknikk/aseptisk teknikk for å unngå kontaminering. Dette innebærer at man må vaske hendene før man begynner å arbeide, bruke hansker og desinfisere dem med 70 % etanol regelmessig, bruke LAF-benk samt å desinfisere all utstyr med 70 % etanol før de tas inn i LAF-benken.

#### 2.1.2 Cellelinjer og dyrkningsbetingelser

Forsøkene i denne studien ble utført på to cellelinjer; ZR-75-1 som er en human brystcancer cellelinje (American Type Culture Collection no. CRL-1500) og NuTu-19 som er en rotte ovarial cancer cellelinje (en gave fra Dr. A.L. Major, University of Geneva). Flesteparten av tidligere studier av Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) er blitt gjennomført på NuTu-19, mens tidligere studier av apoptose og autofagi etter fotokjemisk behandling er blitt gjennomført på ZR-75-1.

Både ZR-75-1 og NuTu-19 ble dyrket i RPMI 1640 Medium med L-glutamin og natriumbikarbonat (Sigma-Aldrich). Til dette mediet ble det supplert med 10 % føtalt kalveserum (Fisher Scientific), 100 U/mL penicillin og 100  $\mu$ g/mL steptomycin (Sigma-Aldrich), heretter vil denne blandingen bli kalt medium. Begge cellelinjene ble dyrket i 75 cm<sup>2</sup> vevskulturflasker (Nunclon, monolagskultur) i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % v/v CO<sub>2</sub>. Mediet i vevskulturflaskene ble skiftet jevnlig for å sikre en adekvat tilførsel av næringsstoffer og vekstfaktorer til cellene.

#### 2.1.3 Omsetting av celler

Ved dyrking av celler i kultur vil cellene gjennomgå tre vekstfaser. Først inntreffer lag-fasen, etterfulgt av log-fasen og avsluttes med platåfasen. I lag-fasen bruker cellene tid på å feste seg til bunnen av vevskulturflasken samt å reparere skader på plasmamembranen forårsaket av trypsin. I denne perioden vil cellene ikke dele seg. I log-fasen starter cellene å dele seg og celletallet vil øke eksponensielt. I platåfasen vil cellene ikke lenger dele seg fordi hele dyrkningsareal i vevskulturflasken er okkupert (såkalt konfluent) og celleveksten er kontaktinhibert. Når det er konfluent vil cellene gå inn i en hvilefase hvor de stopper å vokse og vil etter hvert dø. For å unngå platåfasen må cellene omsettes, en såkalt passasje. Omsetting av celler er en prosess hvor celler blir høstet, fortynnet og resuspendert i en ny vevskulturflaske for å promotere videre vekst. For å kunne omsette celler må en først løse dem fra flaskebunnen. Adherente celler binder seg til vevskulturflaskebunnen ved hjelp

av proteiner på celleoverflaten.. Disse proteinene danner da en sterk bro mellom cellen og overflaten på flaskebunnen. For å løsne disse cellene fra vevsflaskebunnen, må disse proteinbroene brytes. Trypsin er en proteolytisk enzym som vil bryte ned disse proteinene ved hydrolyse på karboksylsetet til arginin og lysin. Tilstedeværelse av  $\text{Ca}^{2+}$  vil inhibere trypsin. Høye konsentrasjoner av  $\text{Ca}^{2+}$  bidrar til en sterk celle-celle adheranse (cadherin). Ved lave konsentrasjoner av  $\text{Ca}^{2+}$  vil denne adheransen svekkes. Trypsinløsningen blir derfor tilsatt EDTA. EDTA fungerer som en  $\text{Ca}^{2+}$  kelator og binder til seg  $\text{Ca}^{2+}$  [80].

#### Prosedyre:

1. Ved omsetting av begge cellelinjene ble medium og trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) løsning forvarmet til  $37^\circ\text{C}$ .
2. Dyrkningsmediet ble deretter sugd av og det ble tilsatt 1 mL sterilfiltrert 1x fosfat buffret saline (PBS) for å vaske bort overflødig medium da føtalt kalveserumet i mediumet vil inhibere trypsin. Sugde deretter av 1 x PBS.
3. Cellene ble deretter behandlet med 1 mL trypsin-EDTA for å løsne de adherente cellene fra flaskebunnen. Flaskene ble inkubert i ca. 3 minutter ved  $37^\circ\text{C}$  og 5 % v/v  $\text{CO}_2$ . Dunket deretter forsiktig på flasken for å løsne cellene fra flaskebunnen.
4. Det ble deretter tilsatt 9 mL medium for å nøytralisere trypsinet. Løsningen ble spylt mot bakveggen et par ganger vha. en 10 mL engangspipette for å mekanisk skille cellene fra hverandre slik at suspensjonen består av single celler.
5. Cellesuspensjonen ble fordelt i nye  $75\text{ cm}^2$  vevskulturflasker med 14 til 19,5 mL medium. Begge cellelinjene ble omsatt to ganger i uken med en splittratio på 3:10 (ZR-75-1) og 0,5:20 (NuTu-19).

#### **2.1.4 Kvantifisering av celler**

For å sikre reproduserbarhet ble cellene kvantitert. Celleantallet ble brukt til å finne ut hvor stort volum av cellesuspensjonen som skulle blandes med mediet for å gi riktig antall celler per brønn ved utsåing til forsøk. Celletellingen ble gjort ved bruk av en Bürker tellekammer (Glasstic<sup>®</sup> slide 10 w/grids, HYCOR). Tellekammeret brukes til visuell telling av celler, og konstruert slik at når det telles et bestemt antall ruter tilsvarer dette telling av celler i et visst volum. Tellekammeret fra HYCOR består av 9 ruter hvorav hver av disse har et volum på  $0,1\ \mu\text{L}$ . Kvantifiseringen ble gjort ved å telle 3 diagonale ruter vha. mikroskop. For å finne antall celler per mL suspensjon, ble gjennomsnittlig antall celler per rute multiplisert med  $10^4$ .

Prosedyre:

1. 1 dråpe av celleduspensjonen etter trypsin-EDTA behandlingen ble overført til et tellekammer.
2. Cellene ble talt i 3 diagonale ruter ved bruk av et mikroskop.
3. Celleantallet per mL suspensjon ble beregnet ved bruk av følgende formel:

$$\frac{\text{Antall talte celler}}{3} \cdot 10^4$$

**2.1.5 Utsåing av celler**

For viabilitetsmåling med MTT-assay ble både ZR-75-1 og NuTu-19 cellene sådd ut på 96-brønnersbrett (Nunclon) i 100  $\mu\text{L}$  medium. På bakgrunn av tetthetsforsøk ble det sådd ut 1 500 celler per brønn av NuTu-19 cellene, mens det ble sådd ut 15 000 celler per brønn av ZR-75-1 cellene. For høsting til Western Blot samt parallelle kontroller til MTT-måling ble begge cellelinjene sådd ut på 6-brønnersbrett (Nunclon) i 1,5 mL medium. Tettheten per brønn var 43 500 celler for NuTu-19 og 450 000 celler for ZR-75-1. Begge cellelinjene ble inkubert i 6 timer for at de skulle feste seg til brønnene før videre behandling.

**2.2 Etablering av tetthetskurve**

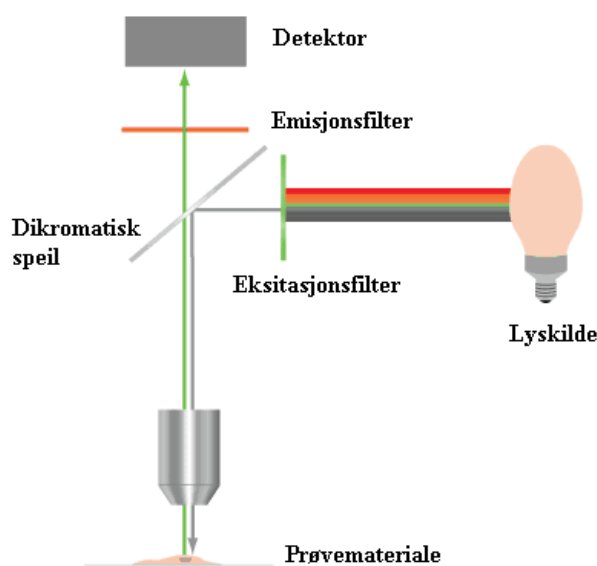
En tetthetskurve for ubehandlede celler ble gjort for hver av cellelinjene. Dette var for å kunne bestemme hvor tett cellene kunne såes ut for å unngå at cellene nærmet seg konfluens under forsøkene. For begge cellelinjene ble etablering av tetthetskurve gjort i 96-brønnersbrett. Celletettheten ble målt med MTT-assay 96 timer etter utsåing da både PDT- og PCI-forsøkene utføres over 4 dager.

Prosedyre

1. Sådde ut celler i 96-brønnersbrett. For NuTu-19 ble 100 til 12 000 celler sådd ut per brønn, og for ZR-75-1 ble det sådd ut 1000 til 62 000 celler per brønn. 6 timer etter utsåingen ble mediet sugd av og erstattet med nye 100  $\mu\text{L}$  medium og inkubert i 18 timer.
2. Vasket brønnene 2 ganger med medium og tilsatte nye 100  $\mu\text{L}$  medium. Inkuberte forsøket frem til dag 4 (96 timer etter utsåing)
3. Tettheten ble målt med MTT-assay (Avsnitt 2.5).

### 2.3 Fluorescensmikroskopi

Fluorescensmikroskopi er en metode for å detektere fluorescerende forbindelser (fluorokromer). Disse forbindelsene vil kunne ta opp energi i form av lys ved en bestemt bølgelengde. Absorpsjonen av ett foton medfører at ett elektron eksiteres fra grunntilstand til en høyere tilstand. Da denne tilstanden er kortlivet vil elektronet returnere til grunntilstanden og en fraksjon av de eksiterte elektronene vil kunne emitte lys i form av fluorescens. Fluorescensintensiteten vil være proporsjonal med mengde fluorescerende molekyler i objektet og deres evne til å avgi fluorescens. For å kunne visualisere fluorescens i mikroskopet trengs flere komponenter; lyskilde, et eksitasjonsfilter, et dikromatisk speil og et emisjonsfilter (Figur 2.1). Eksitasjonsfilteret vil filtrere lyset som kommer fra lyskilden slik at kun lys ved ønskede bølgelengder slippes gjennom. Bølgelengdene må derfor tilpasses eksitasjonsspekteret til den fluorescerende forbindelsen. Det dikromatiske speilet (beam splitter) vil splitte lysstrålen ved å reflektere lys under en viss bølgelengde, mens lys over denne bølgelengden vil slippes gjennom. Emisjonfilterets funksjon er å filtrere lyset som kommer fra objektet og skal sendes til detektoren slik at det emitterte lyset separeres fra eksitasjonslyset som har en kortere bølgelengde og eventuelt annet uønsket lys [31].



Figur 2.1: **Prinsippet for fluorescensmikroskopi.**

Lyset som treffer eksitasjonsfilteret vil bli filtrert slik at kun ønsket bølgelengde slippes gjennom. Det dikromatiske speilet vil splitte lysstrålen slik at lys under en viss bølgelengde reflekteres, mens lyst over denne bølgelengden slippes i gjennom. Emisjonfilteret vil filtrere lyset som kommer fra objektet og til detektoren, slik at emittert lys separeres fra eksitasjonslyset. [31]

Fotosensitizeren TPCS<sub>2a</sub> som benyttes i denne oppgaven karakteriseres som en fluorescerende forbindelse. Den intracellulære lokaliseringen av TPCS<sub>2a</sub> kan derfor bli studert ved bruk av fluorescensmikroskopi. Et Zeiss Imager.Z1 (Zeiss) og kameraet AxioCamMR3 (Zeiss) ble benyttet til denne deteksjonen.

#### Prosedyre:

1. Cellene ble sådd ut i 9,8 cm<sup>2</sup> vevskulturskåler (Falcon 3001 Becton Dickinson lab ware). Celletettheten for NuTu-19 var 50 000 celler og 200 000 celler for ZR-75-1 i 1,5 mL medium. Skålene ble inkubert ved 37 °C og 5 % v/v CO<sub>2</sub>.
2. Medium ble sugd av 24 timer etter utsåing av celler. Skålene som skulle være ubehandlet ble tilsatt 1,5 mL medium fritt for TPCS<sub>2a</sub>. Resterende skåler ble tilsatt 1,5 mL 0,4 µg/mL TPCS<sub>2a</sub> i medium. Skålene ble inkubert i 18 timer.
3. Skåler som skulle studeres etter 18 timer med TPCS<sub>2a</sub> uten ytterligere vaskeprosedyrer ble vasket 2 ganger med 1 mL kald 1x PBS (Appendiks A.3). Nye 1 mL 1x PBS ble deretter tilsatt. Skålene som skulle ha vaskeprosedyre ble vasket 2 ganger med 1 mL medium og tilsatt nye 1,5 mL medium før en inkubering på 4 timer. Samme vaskeprosedyre med PBS ble benyttet etter at de 4 timene var gått.
4. En del PBS ble sugd av og et dekkglass ble lagt over cellene i skålen. Overflødig væske ble sugd av med en pasteurpipette.
5. Cellene ble studert med et 40x objektiv. Det ble benyttet et eksitasjonsfilter med BP (båndpass) på 640/30 nm, et dikromatisk speil på 660 nm og et emisjonsfilter med BP 690/50. Lyskilden som ble benyttet var en metall halide lampe (HXP 120, Zeiss).

## 2.4 PDT og PCI in vitro

### 2.4.1 Fotosensitiser og makromolekyl

Prinsippet for fotosensitiserer er tidligere beskrevet (Avsnitt 1.1.2) Fotosensitizeren som er brukt i PDT- og PCI-forsøkene er disulfonert tetrafenylklorin (TPCS<sub>2a</sub>, Amphinex<sup>TM</sup>; PCI Biotech AS, Oslo). Dette er en amfifilt fotosensitiser som hovedsaklig akkumuleres i endosomale og lysosomale membraner. Alt arbeid med TPCS<sub>2a</sub> ble utført under minimalt med lys og forsøkene ble dekket med aluminiumsfolie før inkubering i varmeskap.

Makromolekylet som er benyttet i PCI-forsøkene er saporin. Saporin er en type 1 ribosominaktiverende proteintoksin (Avsnitt 1.2.2) som er isolert fra planten *Saponaria officinalis*. Dette toksinet er ikke spesielt toksisk før den når cytosol da den mangler en

membranbindende subenhet og translokiseres lite effektivt til cytosol. Konsentrasjonene som ble benyttet av både TPCS<sub>2a</sub> og saporin er basert på tidligere forsøk innad i gruppen.

#### 2.4.2 Lyskilde

Lyskilden som er benyttet i forsøkene er LumiSource<sup>®</sup> (PCI Biotech AS, Oslo). Lampen består av 4 lysrør (18 W/rør, Osram L 18/67) som emitterer blått lys med en topp på ca. 435 nm, og har en belysningsoverflate på 45 x 17 cm. For å hindre at cellene blir utsatt for hypertermi (celleskade pga. varme) og for å sikre en stabil belysning over tid, er lyskilden designet slik den blir avkjølt under belysning [77].

#### 2.4.3 PDT behandling

Ved behandling med PDT (Avsnitt 1.1) ble cellene sådd ut 6 timer før tilsetningen av TPCS<sub>2a</sub>. Cellene ble deretter inkubert med fotosensitizeren i 18 timer, slik at fotosensitizeren fikk tid til å lokalisere seg til endocystiske vesikler og lysosomer. Det ble utført 2 ganger vask for å fjerne overflødig TPCS<sub>2a</sub> samt TPCS<sub>2a</sub> som er på plasmamembraner. Cellene ble deretter inkubert med nytt medium i 4 timer før de belyses. Ved belysning vil det bli dannet reaktive oksygenforbindelser (ROS) som bidrar til at membraner skades, noe som kan medføre celledød. 48 timer etter belysning ble det gjort en viabilitetsmåling for å finne ut hvor mye celledrap behandlingen har medført (Figur 2.2).

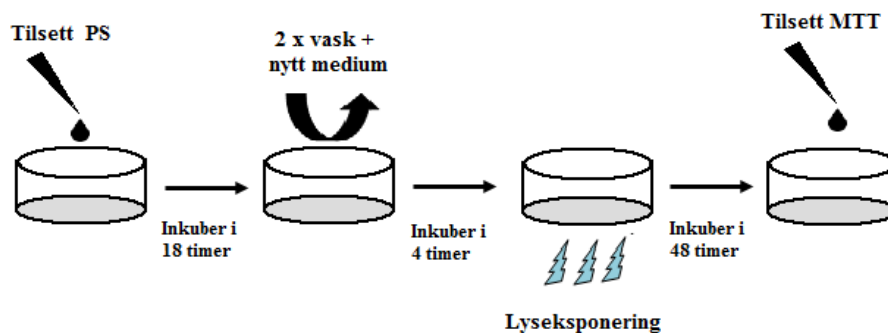
#### Prosedyre:

I disse forsøkene ble det benyttet 96-brønnersbrett.

1. Medium ble sugd av 6 timer etter utsåing av cellene.
2. Brønnene som skulle være ubehandlet ble tilsatt 100  $\mu\text{L}$  medium, mens resten av brønnene som skulle PDT-behandles ble tilsatt 100  $\mu\text{L}$  0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub>. Platene ble deretter pakket inn i aluminiumsfolie og inkubert i 18 timer.
3. Brønnene ble deretter vasket 2 ganger med 100  $\mu\text{L}$  medium, og tilsatt nye 100  $\mu\text{L}$  medium til brønnene. Cellene ble inkubert ved 37 °C i 4 timer før de ble utsatt for varierende lysdoser med LumiSource<sup>®</sup>. Kontrollcellene (ubehandlede celler) ble ikke eksponert for lys.
4. Cellene ble inkubert i ca. 48 timer før viabiliteten ble målt med MTT-assay (Avsnitt 2.5).

Den samme prosedyren ble benyttet for celler som skulle behandles i 6 brønners brett. Volum for inkubasjon med TPCS<sub>2a</sub> og vask var i disse forsøkene 1,5 mL.





Figur 2.2: Generell prosedyre for PDT.

6 timer etter utsåingen ble cellene inkubert med  $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> (PS) i 18 timer etterfulgt av 2x vask. Cellene ble deretter inkubert i medium fritt for TPCS<sub>2a</sub>. 4 timer etter vask ble cellene belyst og viabilitetsmåling med MTT-assay ble utført 48 timer etter lyseksponeringen.

#### 2.4.4 PCI behandling

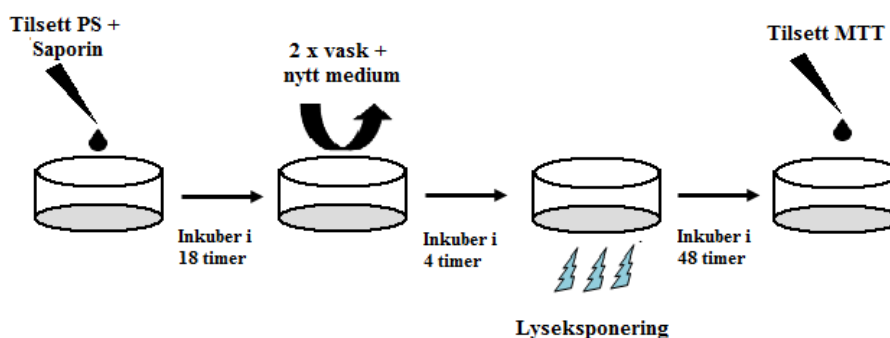
PCI (Avsnitt 1.2) bygger på de samme grunnprinsippene som PDT. I likhet med PDT-behandlingen ble cellene sådd ut 6 timer før tilsetning av fotosensitiser, men ved PCI behandlingen ble cellene i tillegg inkubert med et makromolekyl (saporin). Både fotosensitiseren og saporin lokaliseres til endocytiske vesikler og lysosomer. Ved belysning aktiveres fotosensitiseren slik at endocytiske og lysosomale membraner skades. Dette medfører at saporin, som er fanget på innsiden av de endocytiske membranene, blir frigjort til cytosol hvor den kan utøve sin toksiske egenskaper. Viabiliteten ble i likhet med PDT-behandlingen utført 48 timer etter belysning (Figur 2.3).

#### Prosedyre

I disse forsøkene ble det benyttet 96-brønnersbrett.

1. Medium ble sugd av 6 timer etter utsåing av cellene.
2. Brønnene som skulle være kontroller ble henholdsvis tilsatt  $100 \mu\text{L}$  kun medium,  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  saporin eller  $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> og  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  saporin. Brønnene som skulle PCI-behandles ble tilsatt  $100 \mu\text{L}$   $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> og  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  saporin. Platene ble pakket inn i aluminiumsfolie og inkubert i 18 timer.
3. Vasket brønnene med  $100 \mu\text{L}$  medium 2 ganger før de ble inkubert med nye  $100 \mu\text{L}$  medium i 4 timer.
4. Cellene ble deretter utsatt for varierende lysdoser med LumiSource<sup>®</sup>. Kontrollbrønnene ble ikke eksponert for lys.
5. Viabilitetsmåling med MTT-assay (Avsnitt 2.5) ble gjort ca. 48 timer etter belysning.

Den samme prosedyren ble benyttet for behandling av celler i 6 brønners brett. Volum for inkubasjon med TPCS<sub>2a</sub>, saporin og vask var 1,5 mL.



Figur 2.3: Generell prosedyre for PCI med ”lys etter”-strategien.

Cellene ble inkubert med 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> (PS) og 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  saporin i 18 timer etterfulgt av 2x vask. Deretter ble cellene inkubert med medium fritt for TPCS<sub>2a</sub> og saporin i 4 timer før belysning. Viabilitetsmåling med MTT-assay ble utført 48 timer etter lys.

#### 2.4.5 Behandling med inhibitorer

En inhibitor er et stoff som vil interferere med et enzym for å hemme dens aktivitet. Inhibitorer kan brukes for å studere metabolske signalveier samt for å forstå mekanismene bak enzymaktivitet. I denne oppgaven er det benyttet tre inhibitorer; SB203580, SP600125 og 3-metyladenin (3MA).

SB203580, [4-(4-fluorofenyl)-2-(4-metylsulfonfylfenyl)-5(4-pyridyl)imidazol], (Sigma-Aldrich) er en selektiv p38 MAPK inhibitor. Den vil inhibere aktiveringen til enzymet mitogenaktivert proteinkinase-aktivert protein kinase 2 (MAPKAPK2) som er nedstrøms for p38. p38 MAPK familien består av de fire isomerene p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  og p38 $\delta$ . SB203580 har kun vist å hemme p38 $\alpha$  og p38 $\beta$  ved å binde seg til molekylets ATP-setet, slik at ATP ikke vil kunne fosforilere molekylet [84].

SP600125, 1,9-Pyrazoloanthrone, (Calbiochem) er en selektiv og reversibel inhibitor av c-Jun N-terminal kinase (JNK). Den vil hemme JNK1, -2 og -3 slik at fosforileringen av proteinet c-Jun ikke inntreffer. I likhet med SB203580 vil SP600125 binde seg til molekylets ATP sete på en kompetativ måte [3].

3-metyladenin (Sigma-Aldrich) er en fosfoinositid 3-kinase (PI3K) inhibitor. Denne inhibitoren blir ofte brukt som en hemmer av autofagiveien da PI3K er essensiell i dannelsen av autofagosomer. 3MA vil kunne hemme både klasse I og III PI3K [82].

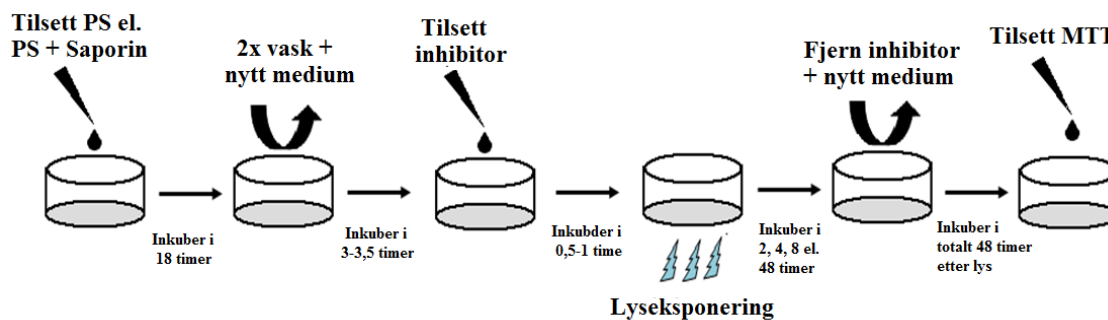
Prosedyre

I viabilitetsforsøk med inhibitorer (Figur 2.4) ble det benyttet 96-brønnersbrett.

1. 6 timer etter utsången av celler ble mediet sugd av.
2. Brønnene som skulle være kontroller ble henholdsvis tilsatt 100  $\mu\text{L}$  kun medium, 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  saporin eller 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> og 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  saporin. Brønnene som skulle PDT-behandles ble tilsatt 100  $\mu\text{L}$  0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub>. Brønnene som skulle PCI-behandles ble tilsatt 100  $\mu\text{L}$  0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> og 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  saporin. Platene ble pakket inn i aluminiumsfolie og inkubert i 18 timer.
3. Brønnene ble vasket med 100  $\mu\text{L}$  medium 2 ganger før de ble inkubert med nye 100  $\mu\text{L}$  medium og inkubert i 3-3,5 timer, avhengig i hvilke inhibitorer som ble brukt (Tabell 1).
4. Tilsatte 50  $\mu\text{L}$  av de respektive inhibitorene 1 time eller 30 minutter (Tabell 1) før cellene ble utsatt for varierende lysdoser med LumiSource.
5. Inhibitorene ble fjernet etter angitte tidspunkter i tabell 1 og tilsatt nye 100 $\mu\text{L}$  friskt medium .
6. Viabilitet ble målt 48 timer etter belysning med MTT-assay (Avsnitt 2.5).

Inhibitor	Konsentrasjon	Tilsetningstidspunkt (Før belysning)	Fjerningstidspunkt (Etter belysning)
SB203580	20 $\mu\text{M}$	1 time	2 timer
SP600125	5 $\mu\text{M}$	1 time	2 timer
3-metyladenin	10 mM	30 minutter	4, 8, 24 eller 48 timer

Tabell 1: **Konsentrasjon og tidspunkter for inhibitorer**



Figur 2.4: **Generell prosedyre for PDT og PCI med inhibitorer.**

Cellene ble inkubert med  $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> (PS) for de av cellene som skulle PDT-behandles eller  $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> (PS) og  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  saporin for de av cellene som skulle PCI-behandles i 18 timer etterfulgt av 2x vask. Deretter ble cellene inkubert med medium fritt for TPCS<sub>2a</sub> og saporin i 3-3,5 timer før tilsetning av inhibitorer og en inkubasjon på 30 minutter til 1 time før belysning (Tabell 1). Inhibitoren ble fjernet 2, 4, 8 eller 48 timer etter belysning og erstattet med nytt friskt medium. Viabilitetsmåling med MTT-assay ble utført totalt 48 timer etter lys.

Samme prosedyre ble benyttet for prøveopparbeidelse for kvantitativ deteksjon av proteiner. Det ble da benyttet 6-brønnersbrett. Og volumet i disse forsøkene var  $1,5 \text{ mL}$ .

## 2.5 Viabilitetsmåling med MTT-assay

MTT-assay er et kvantitativt kolorimetrisk assay for måling av viabilitet. MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, (Sigma-Aldrich) er et svakt gul-farget tetrazoliumsalt som danner vannløselige, mørke blå formazankrystaller ved inkubering med levende celler. Det mitokontrielle enzymet succinate dehydrogenase som finnes i levende celler medfører en kløyving av tetrazoliumringen, og dermed dannelsen av formazanprodukt. Isobutanol eller andre organiske løsninger blir brukt for å løse opp disse krystallene slik at det blir dannet et homogent løsning som kan måles med et spektrofotometer [58].

### Prosedyre:

1. Mediet ble sugd av ca. 48 timer etter belysning, og det ble tilsatt  $100 \mu\text{L}$   $0,5 \text{ mg}/\text{mL}$  MTT før cellene ble inkubert i 4 timer.
2. MTT-løsningen ble sugd av og erstatter med  $100 \mu\text{L}$  dimetyl sulfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich).
3. Platene ble satt til risting i 5 minutter. Avlesning av absorbans ( $570 \text{ nm}$ ) ble gjort ved bruk av PowerWave<sup>TM</sup> XS Microplate Spectrophotometer (BioTek) og programvaren Gen5 (BioTek).

## 2.6 Semikvantitative analyser av spesifikke proteiner

For å kunne detektere spesifikke proteiner er det flere metoder som må benyttes;

1. Prøveopparbeidelse (Avsnitt 2.6.1)
2. Bestemmelse av relativ proteinmengde (Avsnitt 2.6.2)
3. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE ; Avsnitt 2.6.3)
4. Blotting (Avsnitt 2.6.4)
5. Immunodeteksjon (Avsnitt 2.6.5)
6. Kontrollpunkter (Avsnitt 2.6.7)

### 2.6.1 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelsen består i å høste, vaske samt å lysere cellene vha. en lysesbuffer for å frigjøre målproteinene. Da man ønsker at cellulære prosesser ikke forekommer under prøveopparbeidelsen, blir dette gjort på is for å minimalisere effekten av disse. I tillegg består lysesbufferen av protease- og fosfatasehemmere for å hindre at enzymer i prøven kløyver eller defosforilerer proteinene. Ved lysing av celler vil lange DNA-tråder frigjøres, noe som bidrar til en viskøs masse. Det blir derfor brukt Benzonase endonuklease for å redusere viskositeten da den hydrolyserer nukleinsyrene.

#### Prosedyre:

1. Cellene ble sådd ut i 6-brønners brett og behandlet som beskrevet andre steder i kapittel 2. Celleantallet for NuTu-19 var 43 500 celler/brønn og 435 000 celler/brønn for ZR-75-1. Totalvolumet per brønn var 1,5 mL.
2. Brettene ble satt på is for å stoppe cellulære prosesser.
3. Mediet ble sugd av og 1 mL kald 1x PBS ble tilsatt i hver brønn for å vaske cellene.
4. PBS ble sugd av og 50  $\mu$ L lysesbuffer ble tilsatt i hver brønn.
5. Vippet på brettet slik at lysesbufferet (Appendiks A.3) ble jevnt fordelt i brønnene og til en seig masse av celler kunne sees.
6. Brukte en celskrape for å skrape sammen massen av celler, og overførte alt til et 1,8 mL eppendorfrør ved bruk av pipette.
7. 0,3  $\mu$ L benzonase ble tilsatt til røret før det ble satt på is.

8. Etter noen minutter ble røret vortexmikset og raskt spunnet ned ved 6000 RPMI før cellelysatet ble fordelt i 1,8 mL eppendorfrør; 10  $\mu\text{L}$  til ett rør (til kvantifisering av DNA; Avsnitt 2.6.2) og 25  $\mu\text{L}$  til de resterende rørene.
9. Cellelysatene ble oppbevart ved  $-80^\circ\text{C}$

### 2.6.2 Bestemmelse av relativ proteinmengde

For å kunne sammenligne proteinmengde i ulike prøver på samme gel, må disse prøvene være sammenlignbare. DNA fra celleekstraktene ble derofr målt. En kvantifisering av DNA ble gjort ved å benytte Ultrospec<sup>TM</sup> 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech) for å måle absorbans ved 260 og 230 nm. Dette gir et estimat på cellekonsentrasjonen i lysatet og benyttes til å beregne appliseringsvolumet for de ulike prøvene.

#### Prosedyre

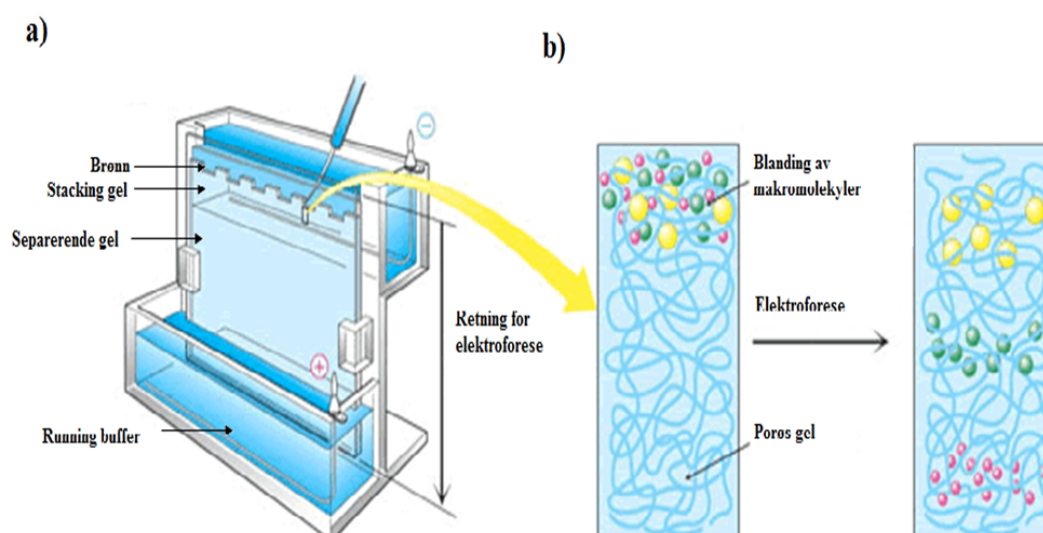
1. Lagde en blankprøve. Bromfenolblått i lysatet absorberer lys ved 260 og 230 nm. Spektrofotometeret må derfor korrigeres med hensyn på lyseringsløsningen som inneholdt bromfenolblått før måling av lysatene. Lyseringsløsningen (Appendiks A.3) ble først fortynnet 1:2 i ddH<sub>2</sub>O. Deretter ble 10  $\mu\text{L}$  av denne fortynnede lyseringsløsningen overført til et 1,8 mL eppendorfrør, og det ble tilsatt 490  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O. Denne blandingen blir heretter kalt blank.
2. Rørene som inneholdt 10  $\mu\text{L}$  lysat ble tilsatt 490  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O.
3. Blanken og prøvene ble deretter vortexet og spunnet ned.
4. Kyvetten ble vasket 2 ganger med blanken før spektrofotometeret ble nullstilt med blanken.
5. Kyvetten ble vasket 2 ganger med hver prøve før måling. Det ble gjort 3 målinger per prøve med et prøvevolum på 100  $\mu\text{L}$ .
6. Gjennomsnittlig DNA i prøvene ble beregnet, og appliseringsvolumet for hver prøve ble funnet ved å bruke følgende formel:

$$\frac{\text{max volum per brønn}}{\text{målt gj.snitt av den aktuelle prøven}} \cdot \text{gj.snitt av den minst konsentrerte prøven}$$

Max volum per brønn var 20  $\mu\text{L}$  i 15-brønners gel.

### 2.6.3 SDS-PAGE

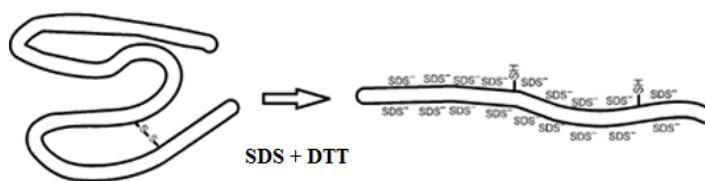
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) er en teknikk som brukes for å separere proteiner. Metoden utnytter proteinenes evne til å bevege seg i et elektrisk felt, noe som er avhengig av proteinstørrelse, ladning og proteinfolding (Figur 2.5). SDS-PAGE består av to geler; den øvre stackinggelen og den nedre separeringsgelen. Gelen blir dannet ved at akrylamid monomerer polymeriseres til et tredimensjonalt nettverk, en kjemiske prosess som blir katalysert av ammonium persulfat (APS) og tetrametyلهylen-diamin (TEMED, Bio-Rad). Stacking- og separeringsgelen vil variere i porestørrelsen da de inneholder ulik konsentrasjon av akrylamid. Da porestørrelsen reduseres med økende konsentrasjon av akrylamid, vil stackinggelen ha større porer enn separeringsgelen da den har en lavere konsentrasjon av akrylamid .



Figur 2.5: **SDS-PAGE**.

a) viser en forenklet oppsett for SDS-PAGE. b) viser at proteiner blir skilt i akrylamidgelen etter proteinstørrelse [35].

For at proteiner som har tilnærmet lik molekylvekt ikke skal migrere ulikt pga. proteinfoldingen, er det i lyseringsbufferen tilsatt det anioniske detergenten sodium dodecyl sulfate (SDS). Oppvarming med tilstedeværelse av SDS bidrar til denatureringen av sekundære- og tertiære- proteinstrukturer. I tillegg vil SDS coate de lineære proteinene med en uniform negativ ladning som er proporsjonal med proteinets masse (ca. 1,4 g SDS/1 g protein). Da SDS ikke denaturerer disulfid-bindinger som oppstår mellom cysteiner, er det tilsatt dithiothreitol (DTT) i lyseringsbufferen. DTT er et reduserende middel som bryter disulfidbindingene. Forbehandlingen med SDS og DTT bidrar dermed til at proteiner med lik størrelse vil vandre like langt gjennom gelen (Figur 2.6).



Figur 2.6: **Denaturering av proteiner.**

Tilstedeværelse av SDS og DTT ved proteindenaturering medfører at proteinene blir lineære og får en uniform negativ ladning [29].

Elektroforesebufferen (pH 8,3), også kalt runningbuffer, inneholder glycin. Ved denne pH vil glycin forekomme både som et switterion hvor nettoladningen er null, og som et negativt ladet molekyl. Når prøvene appliseres i brønnen på stackinggelen, og det elektriske feltet blir etablert, vil de negative molekylene bevege seg fra katoden (-) til anoden (+). Når disse kommer i stackinggelen som har en lavere pH (pH 6,8) vil de bli forandret til switterioner. Switterioner er immobile og vil dermed stanse bevegelsen i gelen. Da gelen er blitt buffret med Tris-HCL, vil den inneholde negativ ladde, mobile klorioner som også vil bevege seg mot anoden. Proteinene i lysatet har en lavere mobilitet enn klorionene, og vil dermed bli samlet mellom glycin og en front av klorioner. Dette bidrar til at prøvene blir konsentrert i smale bånd før de kommer i kontakt med separeringsgelen. Da separeringsgelen har en høyere pH (pH 8,8) vil glycinationene gjenopprette sin negative ladning, og fra nå av møter prøvene et konstant spenningsfelt slik at proteinene vil separeres etter deres størrelse på polyakrylamid gelen. Større proteiner vil ha en større negativ ladning og utsettes derfor for større elektriske krefter, men porestørrelsen vil hemme disse store proteinene til å migrere langt. Derfor vil det være slik at små proteiner vil vandre raskere gjennom gel-nettverket enn store proteiner. Proteinene vises som bånd i gelen sortert etter molekylvekt. For å kunne bestemme størrelsen på proteinene som detekteres, blir det applisert en molekylstandard til en av brønnene [36].

### Prosedyre

1. En stor glassplate med spacere på 1,5 mm (spacer plate, Bio-Rad) og en mindre glassplate (short plate, Bio-Rad) ble vasket med 70 % etanol. Glassplatene ble satt sammen i et stativ (casting stand, Bio-Rad). Separerende- og stackinggel ble laget etter oppskrift (Appendiks A.3).
2. Separerende gel ble støpt først (8,3 x 5,0 cm, Appendiks A.3). Det ble applisert 1 mL dH<sub>2</sub>O over den separerende gelen for å bevare en jevn kant. Gelen ble polymerisert i 30 min. Helte av dH<sub>2</sub>O og tørket bort overflødig vann med et filterpapir.
3. Stackinggel-løsningen (Appendiks A.3 ble helt over separeringsgelen til kanten av

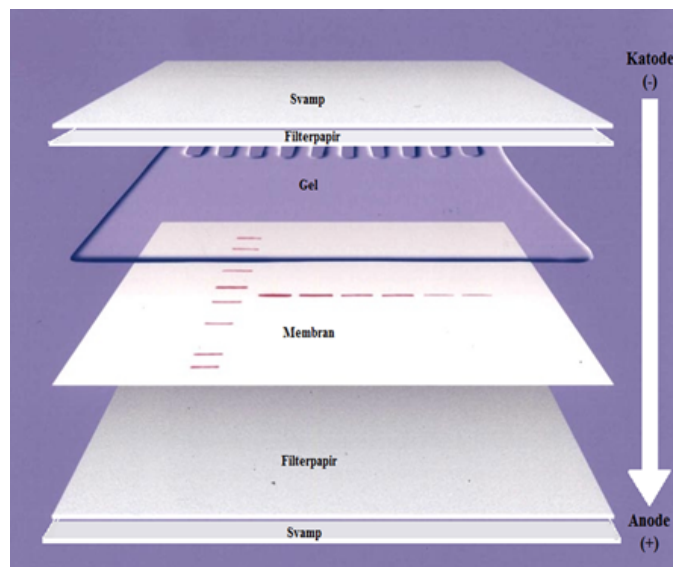


glassplatene. En 15-brønners kam ble satt i uten å danne luftbobler. Gelen ble polymerisert i 20 min.

4. Prøvene ble kokt ved 95 °C i 5 minutter, avkjølt på is, vortexet og spunnet ned.
5. Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell (Bio-Rad) ble satt sammen. Det indre kammeret ble fylt helt opp med 1x running buffer (Appendiks A.3), mens det ytre kammeret ble fylt opp til merket "2 gels" eller "4 gels" avhengig av hvor mange geler man kjører.
6. Fjernet kammen forsiktig opp av gelen. Hver brønn ble skylt med 1x runningbuffer for å fjerne evt. gelrester ved bruk av en 1 mL pipette.
7. Appliserte på prøver og molekylvektstandard. Prøvene ble applisert i henhold til relativ DNA-mengde (Avsnitt 2.6.2). 5  $\mu$ L av molekylvektstandard Precision Plus Protein WesternC Standards (Bio-Rad) ble applisert til en av brønnene. De brønnene som skulle være tomme ble applisert med 15  $\mu$ L lyseringsbuffer (1:2 fortynning, (Appendiks A.3).
8. SDS-PAGE ble kjørt på is ved 200 V til fronten hadde gått ned i enden av gelen (ca. 1 time). Strømkilden for gelelektroforesen var PowerPac HC power supply (Bio-Rad).

#### 2.6.4 Western blotting

Proteinene som er blitt separert med SDS-PAGE vil ikke være synlig for det blotte øyet. For å kunne detektere proteinene kan man først overføre proteinene til en polyvinylidene difluorid (PVDF)-membran (eller nitrocellulosemembran). Elektroblooming er en teknikk som bruker elektrisk spenning for å overføre proteinene fra polyakrylamidgelen over på membranen. Proteinene vil beholde sin relative posisjon som i gelen når den blir overført til membranen. Det blir først preparert en 'sandwich' som bl.a. inneholder gelen og membranen. Det er viktig at membranen er plassert mellom gelen og anoden (+) da spenningen og prøven vil bevege seg mot anoden. Dette skyldes at proteinene i prøven er negative etter interaksjonen med SDS. Membranen har høy bindingsaffinitet og binder uspesifikt. Den vil derfor binde alle proteiner like bra. I utgangspunktet er membranen hydrofob og har lav bindingsevne. For å oppnå den høye bindingsaffiniteten må membranen aktiveres. Aktivisering av membranen med metanol vil resultere i at membranen blir mer hydrofil. Dette gjør det mulig for vandige løsninger å penetrere membranen og dermed øke membranens bindingsoverflate. I tillegg inneholder transferbufferen metanol som hjelper ytterligere på proteinbindingen [56].



Figur 2.7: Sammensetning av transferkassett [38].

### Prosedyre

1. Klippet til en membran (Amersham Hybond- $P^{TM}$  PVDF Membrane, GE Health-care) i samme størrelsen som separeringsgelen. For å markere hvor brønn nr. 1 var, ble membranen klippet i øvre venstre hjørne.
2. Aktiverte membranen ved å legge den i et lokk med metanol i 15 sek. Membranen ble deretter lagt over i et lokk med transferbuffer (Appendiks A.3) for å kalibrere.
3. Gelplaten ble fjernet fra elektroforesekaret og den korte glassplaten ble vippet av. Brukte en gelskjærer for å skille stackinggelen fra separeringsgelen. Separeringsgelen ble lagt i samme lokk med transferbuffer som membranen.
4. La filterpapir og svamp i bløt i transferbuffer. Transferkassetten ble pakket etter følgende oppsett (Figur 2.7):

Svart kassettdel-svamp-filterpapir-gel-membran-filterpapir-svamp-hvit kassettdel

Etter siste filterpapir ble det rullet over med en rulle for å fjerne evt. luftbobler.

5. Transfercellen ble satt i transferkammeret (Bio-Rad). En magnet og en isblokk ble satt i transferkammeret før kammeret ble fylt helt opp med transferbuffer.
6. Elektroblottingen ble kjørt på kjølerom ved 100 V i 1,5 time. Strømkilden for elektroblottingen var PowerPac HC power supply (Bio-Rad).

### 2.6.5 Immunodeteksjon

Membranene som blir benyttet i Western blot er valgt pga av deres gode egenskaper til å binde proteiner. For å detektere proteiner benyttes det spesifikke antistoffer som er rettet mot de proteinene som er av interesse. Da antistoffer også er proteiner, vil disse kunne binde seg til membranen. Ved å blokke membranen før deteksjon med antistoff, kan man hindre disse uspesifikke bindingene. Blokkering innebærer at membranen blir lagt i en løsning som består av proteiner som ikke vil reagere med antistoffene. Løsningene som oftest blir brukt til dette formålet er tørrmelk eller bovint serum albumin (BSA). Proteinene i BSA og tørrmelk vil da binde seg til de frie bindingssetene på membranen. Dette gjør at det ikke vil være rom på membranen for antistoffer å binde seg når de blir tilsatt, bortsett fra på målproteinene. Dette vil redusere bakgrunnsstøy i sluttproduktet samt eliminere falsk positive resultater.

Etter blokkeringen blir proteinene dektekert via en indirekte deteksjonsmetode med antistoff. Dette innebærer at deteksjonen skjer i to trinn. Det første er at membranen blir inkubert med et primær antistoff som er spesifikt rettet mot det proteinet som skal detekteres. Det primære antistoffet vil gjenkjenne og binde seg til målproteinene på membranen, slik at det blir dannet et antistoff-proteinkompleks. Deretter blir all overflødig primær antistoff vasket bort før membranen blir inkubert med et sekundært antistoff, som er det andre steget. Det sekundære antistoffet vil binde seg spesifikt til det primære antistoffet. Det sekundære antistoffet er konjugert til et reporterenzym, f.eks. horseradish peroxidase (HRP), slik at det blir sendt ut signaler som muliggjør visualisering av komplekset (Figur 2.8). Jo flere sekundære antistoffer som binder seg til det primære antistoffet, desto sterkere blir signalet.

For å kunne visualisere komplekset etter immunoblotting blir teknikken chemiluminiscence brukt. Tilsetting av hydrogenperoksid og luminol til membranen fører til at Horseradish peroxidase (HRP) på det sekundære antistoffet oksiderer luminol. Produktet av denne reaksjonen er chemiluminiscens som vil være proporsjonalt med mengde målprotein på membranen. Proteinbåndene vil dermed kunne visualiseres på en fotografisk film da det emitterte lyset vil svarte filmen.



7. Lagde en fremkallingsløsning ved å blande like deler av deteksjonsvæskene chemiluminescent substrate A og chemiluminescent substrate B (0,5 mL av hver per membran), som utgjør LumiGLO<sup>®</sup> Chemiluminescent Substrate System (KPL). Membranene ble inkubert i denne løsningen i 5 min.
8. Etter inkuberingen ble overskuddsvæske fjernet ved å holde kanten av membranen mot et papirhåndkle. Membranene ble så lagt mellom to transparente ark og satt i Phosfor Screen kassett for å skjerme membranene fra lys.
9. Membranene ble fremkalt på Curix 60 (AGFA Healthcare). Kvantiteringen ble gjort ved bruk av GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) og softwareprogrammet Quantity One<sup>®</sup> (Bio-Rad)

Primært antistoff	Mw	Kons.	Inkuberings løsning	Sekundært antistoff	Kons.
$\beta$ -aktin	42 kDa	1:500	Tørrmelk	Anti-kanin	1:2000
LC3IIB	14 kDa	1:1000	BSA	Anti-kanin	1:1000

Tabell 2: Oversikt over primære- og sekundæreantistoffer (Cell Signaling Technology) brukt i forsøket

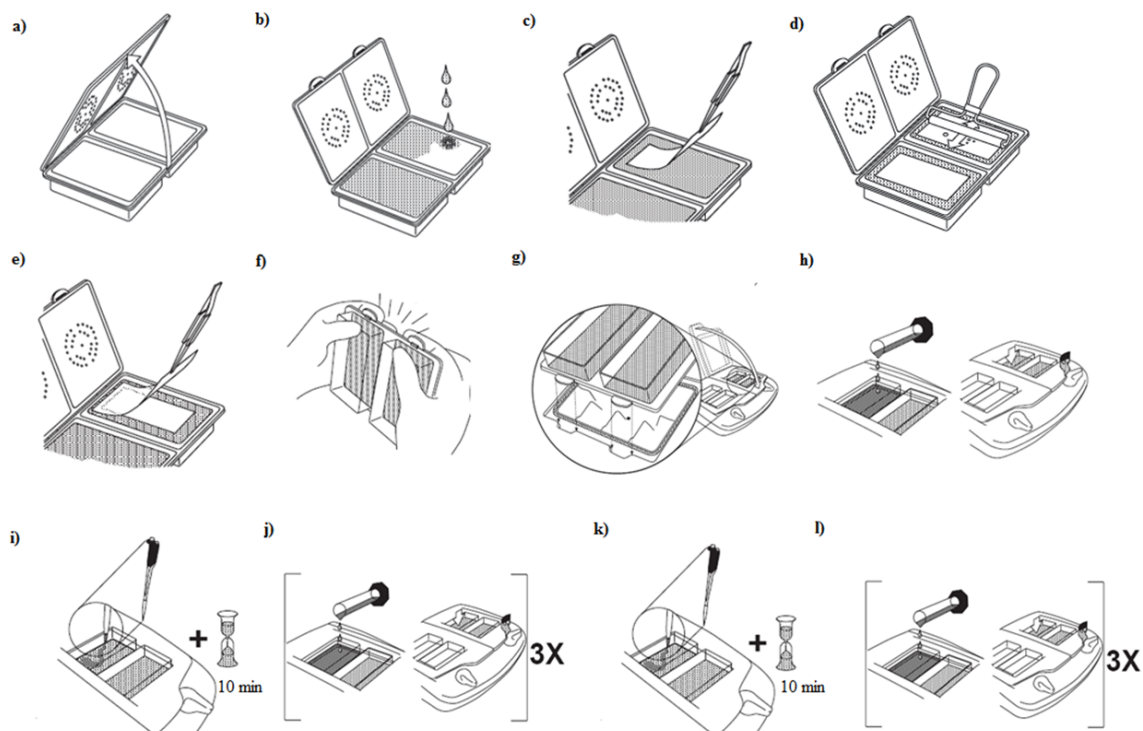
### 2.6.6 Blokking og immunodeteksjon med SNAP i.d.<sup>TM</sup> systemet

Tradisjonell immunodeteksjon av proteiner er tidskrevende. Millipore Corporation har derfor utviklet en ny metode for raskere deteksjon av proteiner etter Western blotting. SNAP i.d. protein systemet (Millipore) er basert på vakuumfiltrering (Figur 2.9). Det benyttes et vakuum til å trekke løsningene som brukes gjennom membranen, noe som tillater en raskere binding av blokkeringsløsning og antistoffer til membranen i motsetning til tradisjonell metode som benytter seg av diffusjon av reagenser.

#### Prosedyre

1. Lokket på undersiden av kassettholderen ble åpnet og filteret ble fuktet med ddH<sub>2</sub>O.
2. Membranen ble etter blottingen skilt fra gelen og overført til kassettholderen med proteinsiden ned mot filteret. Rullet over membranen med en rulle før en tørr spacer ble lagt over. Rullet over spaceren og lukket igjen lokket på kassettholderen. Kassettholderen ble satt på plass i SNAP i.d. systemet.
3. Membranen ble blokket med 15 mL 0,25 % tørrmelk (TMØ Brumundal). Vakuumet ble skrudd på og all tørrmelkløsning ble sugd gjennom umiddelbart.

4. Membranen ble deretter inkubert med primær antistoff i 10 minutter etterfulgt av 3 x 20 sekunder vask med 1x TTBS mens vakuomet stod på.
5. Inkuberte deretter membranen med sekundært antistoff i 10 minutter.
6. Membranen ble deretter vasket 3 x 20 sekunder med 1x TTBS før proteinene ble detektert og kvantitert som beskrevet i avsnitt 2.6.5.



Figur 2.9: Immunodeteksjon med SNAP i.d. systemet.

Bilder viser prosedyren for SNAP i.d. systemet. Lokket på undersiden av kassettholderen åpnes (a) og fuktes med ddH<sub>2</sub>O (b). Legg membran med proteinsiden ned mot filteret (c) og rull over med en rulle for å få god kontakt (d). Legg over en tørr spacer (e) og lukk igjen lokket (f). Sett kassettholderen i vakuumapparatet (g) og blokker med tørrmelk mens vakuomet står på (h). Tilsett primært antistoff (i) og inkuber i 10 minutter etterfulgt av 3 x vask (j). Tilsett sekundært antistoff (k) og inkuber i 10 minutter etterfulgt av 3 ganger vask (l). Overfør membran over til et lokk og tilsett deteksjonsvæske og fremkall (ikke vist på bildet) [37].

### 2.6.7 Kontrollpunkter

#### Coomassie Brilliant Blue

Commasie Brilliant Blue er et fargestoff som brukes for å farge proteiner. Ved å farge gelen med Commasie Brilliant Blue etter blottingen, kan man se om overføringen av proteiner fra gelen til membranen har vært vellykket. Gelen bør helst ikke ha noen synlige

proteinbånd, da disse skal ha blitt overført til membranen.

#### Prosedyre

1. Etter blottingen ble gelen inkubert med Coomassie Brilliant Blue (Appendiks A.3) i 30 min i romtemp. på svak risting. Coomassie Brilliant Blue ble tatt vare på da denne kunne brukes om igjen.
2. Gelen ble deretter vasket med dH<sub>2</sub>O for å fjerne overflødig fargeløsning.
3. Gelen ble inkubert med avfargingsløsning (Appendiks A.3) i 30 min.
4. En visuell kontroll ble utført.

#### **Ponceau S**

Dette er en rask og reversibel fargemetode som brukes for å lokalisere proteinbånd på membranene. Ponceau S er en anionisk fargestoff som vil binde seg til aminogrupeer på proteinene og danne en svak rødfarge. Ved å benytte denne metoden kan man se om overføringen fra gelen til membranen har vært vellykket.

#### Prosedyre

1. Membranen ble vasket raskt med 1x TTBS.
2. Inkuberte membranene med Ponceau S (Appendiks A.3) i 30 min i romtemp. på svak risting. Ponceau S ble tatt vare på da denne kunne brukes om igjen.
3. Vasket med 1x TTBS til proteinbåndene ble synlige på membranen.
4. En visuell kontroll ble utført.

#### **$\beta$ -Aktin**

Aktin er proteiner som er involvert i blant annet cellens motilitet og struktur.  $\beta$ -Aktin er en av seks identifiserte isoformer, og er høyt uttrykt i alle celletyper.  $\beta$ -Aktin brukes derfor ofte som loading kontroll for å sjekke at lik antall celler er tilsatt i hver brønn og for å gi sammenligningsgrunnlag. Dersom aktinbåndene har lik intensitet, vil dette være en indikasjon på at det er like mange celler i hver prøve. Ved ujevn appliseringen kan proteinbåndene korrigeres i forhold til aktinmengden.

Prosedyre

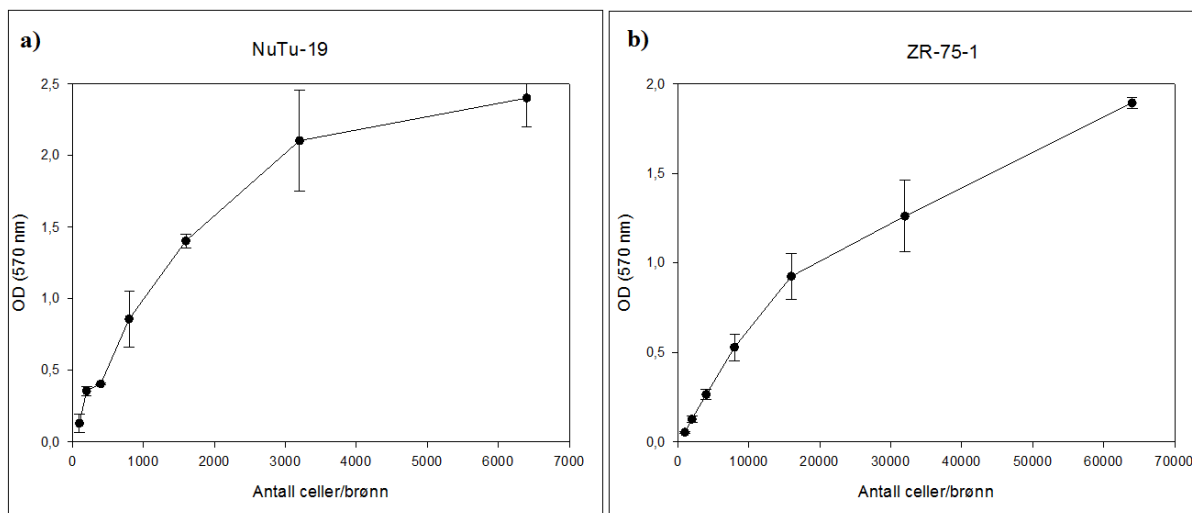
1. Membranen ble etter detektering av målproteiner aktivert ved å legge det i metanol i 15 sek. Kalibrerte deretter membranen raskt i 1x TTBS.
2. Membranen ble blokkert i 5 % tørrmelk i 1 time ved romtemperatur.
3. Inkuberte membranen med anti-Aktin (Sigma-Aldrich) over natt ved 4 °C.
4. Utførte 3 x 10 min vask før membranen ble inkubert med sekundært antistoff i 1 time ved romtemp.
5. Vasket 3 x 10 min før proteinene ble detektert og kvantitert som beskrevet ovenfor (Avsnitt 2.6.5).



### 3 Resultater

#### 3.1 Etablering av tetthetskurver

Celler i monolagskultur vokser eksponensielt til de når et punkt hvor dyrkningsarealet i brønnene er okkuperte og cellene er konfluente. Ved konfluens vil veksthastigheten reduseres og cellene vil etter hvert dø. Etablering av tetthetskurver ble initielt gjort for å kunne estimere antall celler som skulle såes ut i forsøkene slik at konfluens ble unngått. Denne estimeringen ble også gjort med hensyn på reproduserbarhet da vekstbetingelsene i hvert forsøk bør være relativt like. Etableringen av tetthetskurver ble gjennomført på 96-brønnersbrett med økende celletetthet for både NuTu-19 og ZR-75-1 (Figur 3.1). Viabilitetsmåling av cellene med MTT-assay ble utført 96 timer etter utsåingen da forsøk med PDT og PCI går over 4 dager.



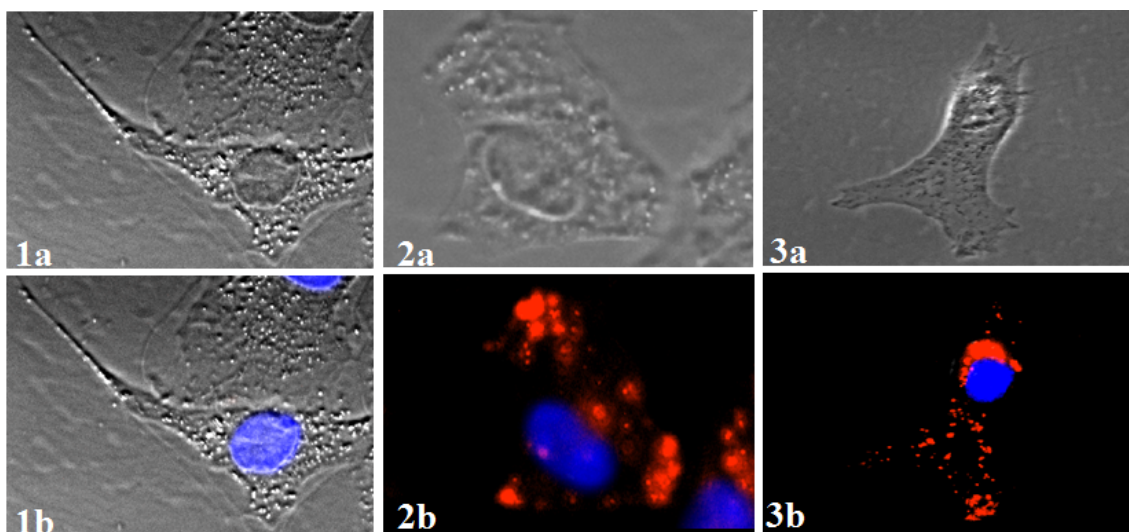
Figur 3.1: Tetthetskurver for NuTu-19 og ZR-75-1 celler.

Celletetthet målt med MTT-assay (570 nm) 96-timer etter utsåing er plottet mot antall celler sådd ut per brønn i 96-brønnersbrett. Verdiene er middelerdier av tre paralleller +/- standardavvik. a) viser tetthetskurven for NuTu-19, mens b) viser tetthetskurven for ZR-75-1

Celleantallet (ved utsåing) som skulle brukes i videre forsøk måtte ligge i det lineære området for å unngå at cellene går konfluent under forsøket. Celletettheten av NuTu-19 ble bestemt til 1500 celler i 96-brønnersbrett og 43 500 celler i 6-brønnersbrett. For ZR-75-1 ble celletettheten bestemt til 15 000 celler i 96-brønnersbrett.

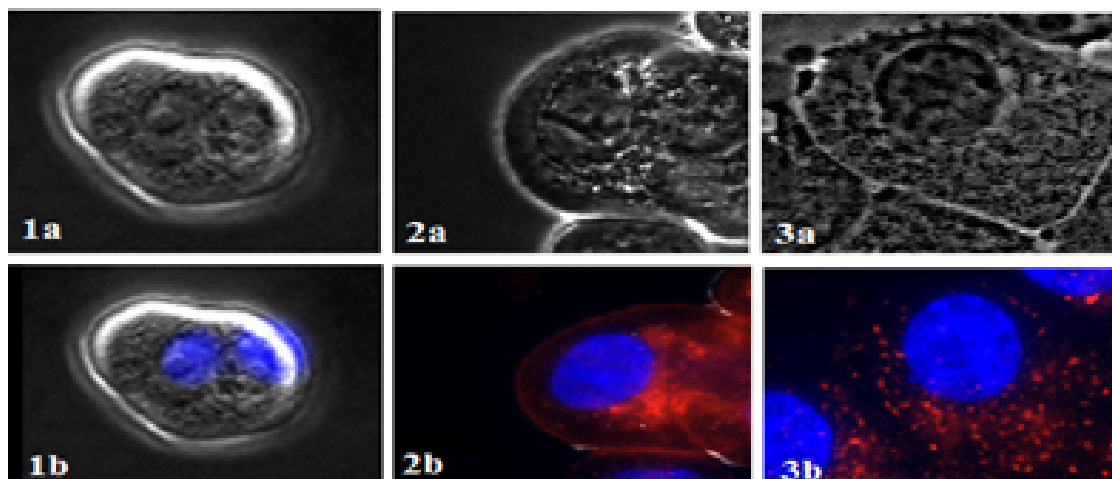
### 3.2 Intracellulær lokalisering av TPCS<sub>2a</sub>

PCI er en metode for målrettet levering av makromolekyler til cytosol. Forutsetningene for en vellykket behandling med PCI er at fotosensitizeren lokaliseres til endocytiske vesikler. TPCS<sub>2a</sub> er en amfifil fotosensitizer som er forventet å lokalisere til membranene i endosomale og lysosomale vesikler etter opptak ved endocytose. Da TPCS<sub>2a</sub> har fluorescerende egenskaper, kan den intracellulære lokaliseringen detekteres med fluorescensmikroskopi. Cellene ble inkubert med 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> i 18 timer. I tillegg er det ønskelig å se hva vask og 4 timers inkubering med medium fritt for TPCS<sub>2a</sub> har å si for lokaliseringen av TPCS<sub>2a</sub>.



Figur 3.2: Lokalisering av TPCS<sub>2a</sub> i NuTu-19 celler.

Bildene viser lokalisering av TPCS<sub>2a</sub> i NuTu-19 celler etter 1) ingen inkubasjon med TPCS<sub>2a</sub> (NT), 2) 18 timer inkubasjon med TPCS<sub>2a</sub> og 3) 18 timer inkubasjon med TPCS<sub>2a</sub> med påfølgende vask og inkubasjon i medium fritt for TPCS<sub>2a</sub> i 4 timer. a) viser fasekontrastbilder av cellenes morfologi, mens b) viser fluorescensen (med unntak av 1b) av TPCS<sub>2a</sub> (rødt). Cellene er i tillegg blitt behandlet med Hoechst 33342 for å vise cellens kjerne (blått). Bildene er tatt med 40x objektiv, og intensiteten er justert for å kunne sammenligne fluorescensen etter de ulike behandlingene.



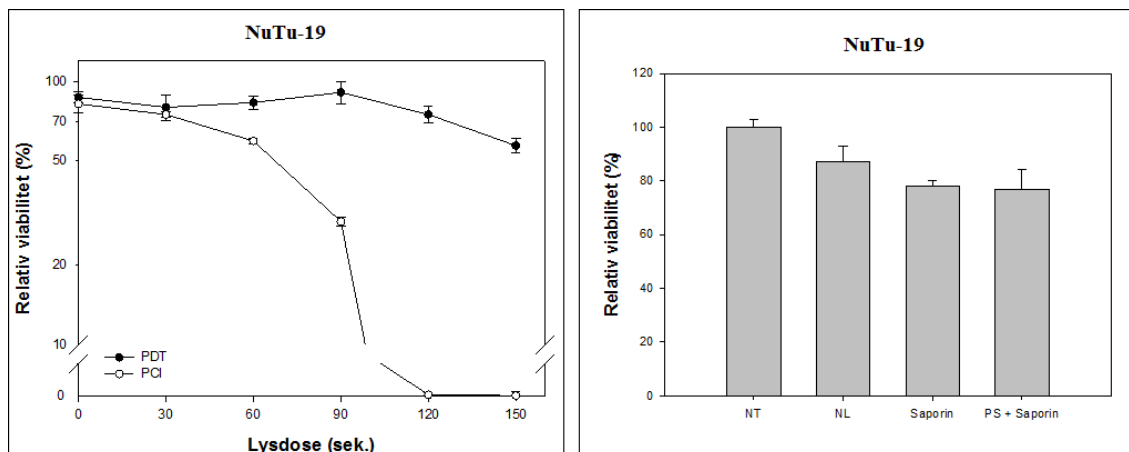
Figur 3.3: Lokalisering av TPCS<sub>2a</sub> i ZR-75-1 celler.

Lokalisering av TPCS<sub>2a</sub> i ZR-75-1 celler etter 1) ingen inkubasjon med TPCS<sub>2a</sub> (NT), 2) 18 timer inkubasjon med TPCS<sub>2a</sub> og 3) 18 timer inkubasjon med TPCS<sub>2a</sub> med påfølgende vask og inkubasjon i medium fritt for TPCS<sub>2a</sub> i 4 timer. a) viser fasekontrastbilder av cellenes morfologi, mens b) viser fluorescensen (med unntak av 1b) av TPCS<sub>2a</sub> (rødt). Cellene er i tillegg blitt behandlet med Hoechst 33342 for å vise cellens kjerne (blått). Bildene er tatt med 40x objektiv, og intensiteten er justert for å kunne sammenligne fluorescensen etter de ulike behandlingene.

I begge cellelinjene ble det ikke detektert rød fluorescens i de ubehandlede cellene (Figur 3.2 1b og 3.3 1b). Celler som ble behandlet med TPCS<sub>2a</sub> i 18 timer viste TPCS<sub>2a</sub> lokalisert i granula samt en diffus fluorescens på plasmamembranene, spesielt på ZR-75-1 cellene (Figur 3.2 2b og 3.3 2b). De av cellene som var blitt behandlet med TPCS<sub>2a</sub> og påfølgende vask samt en inkubering på 4 timer i medium fritt for TPCS<sub>2a</sub> viste kun et granulært fluorescenssmønster av TPCS<sub>2a</sub>. Den diffuse fluorescensen som ble observert med celler som ikke gjennomgikk vaskeprosedyre var ikke lenger å detektere (Figur 3.2 3b og 3.3 3b).

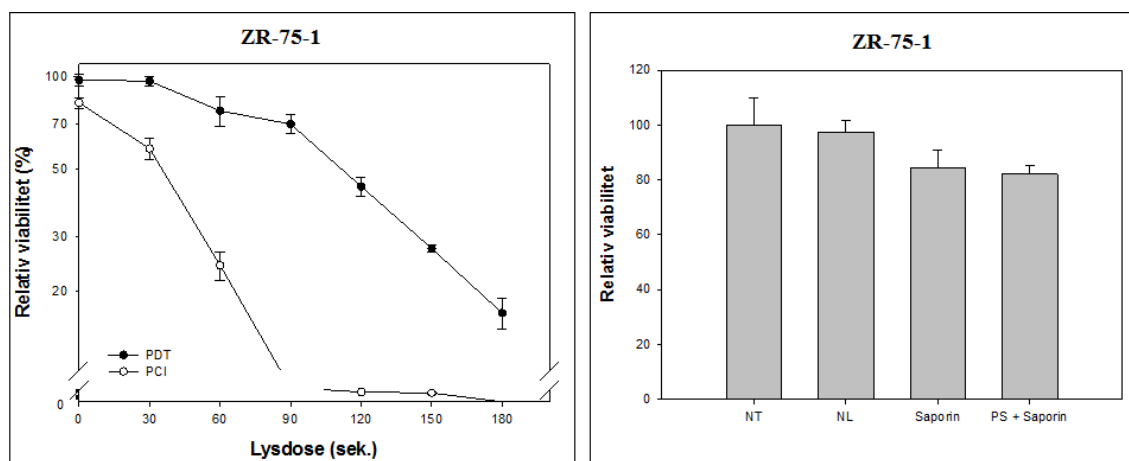
### 3.3 Cellulær viabilitet etter PDT- og PCI-behandling

En viabilitetstest ble gjennomført for å kunne sammenligne effekten av PDT- og PCI-behandling på NuTu-19 og ZR-75-1 cellene. Makromolekylet som benyttes i PCI-behandlingen er saporin. Saporin er en type 1 RIP som utøver sin effekt på ribosomer i cytosolen ved å hemme proteinsyntesen, og er potensielt meget cytotoxisk. Et felles problem for type 1 RIP er at de blir degradert etter endocytisk opptak og dermed ikke kan utøve sin cytotoxiske effekt. PCI av saporin vil kunne øke den cytotoxiske effekten til saporin da PCI er en metode for målrettet levering av endocytiske makromolekyler. For å kunne se effekten av PDT og PCI på NuTu-19 og ZR-75-1 cellene, ble cellene inkubert med 0,4 µg/mL TPCS<sub>2a</sub> og/eller 0,5 µg/mL saporin i 18 timer. Viabiliteten ble målt med MTT-assay 48 timer etter lyseksponering.



Figur 3.4: PDT- og PCI-behandling på NuTu-19 celler.

Cellulær viabilitet for NuTu-19 etter behandling med henholdsvis PDT og PCI. Cellene ble inkubert med  $0,4 \mu\text{g/mL}$  TPCS<sub>2a</sub> (PS) og/eller  $0,5 \mu\text{g/mL}$  saporin i 18 timer. Viabiliteten beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller (NT) og er plottet mot lysdosen. Histogrammet viser kontrollceller (ikke lysekspontert); ubehandlede celler (NT), kun TPCS<sub>2a</sub> 15(NL), kun saporin og TPCS<sub>2a</sub> sammen med saporin. Verdiene er middelerverdier av tre paralleller +/- standardavvik.



Figur 3.5: PDT- og PCI-behandling på ZR-75-1 celler.

Cellulær viabilitet for ZR-75-1-celler etter behandling med henholdsvis PDT og PCI. Cellene ble inkubert med  $0,4 \mu\text{g/mL}$  TPCS<sub>2a</sub> (PS) og/eller  $0,5 \mu\text{g/mL}$  saporin i 18 timer. Viabiliteten beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller (NT) og er plottet mot lysdosen. Histogrammet viser kontrollceller (ikke lysekspontert); ubehandlede celler (NT), kun TPCS<sub>2a</sub> (NL), kun saporin og TPCS<sub>2a</sub> sammen med saporin. Verdiene er middelerverdier av tre paralleller +/- standardavvik.

Ved begge cellelinjene viste PCI av en økende cytotoxisk effekt i forhold til PDT. Denne effekten ser ut til å være avhengig av lysdose. 50 % drap av NuTu-19 celler med PCI av saporin krever en lysdose på ~60 sekunder, mens PDT trenger ~3 ganger så høy lysdose for å oppnå samme effekt (Figur 3.4). En tilsvarende effekt kunne observeres på ZR-75-1 celler (Figur 3.5). Konsentrasjonene av saporin og TPCS<sub>2a</sub> som er benyttet ved både PDT

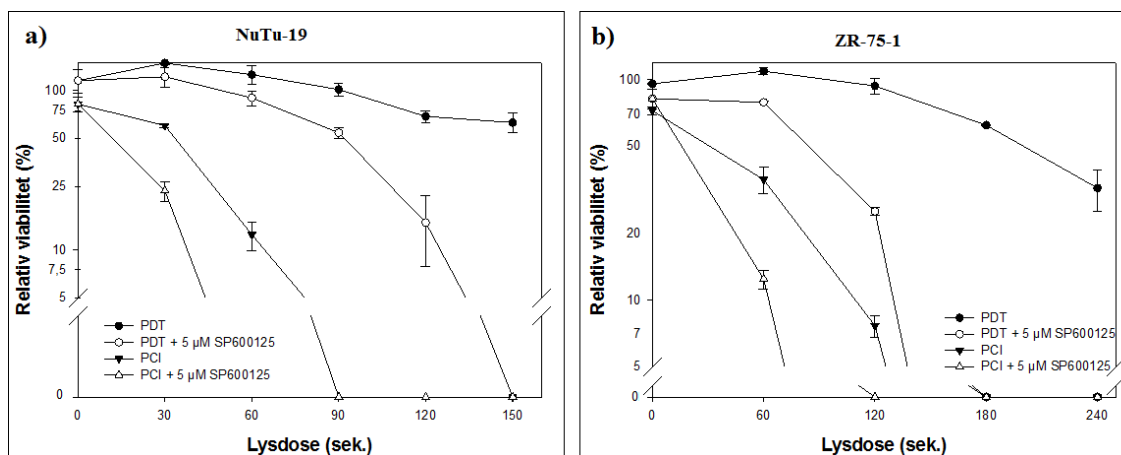
og PCI ser ikke ut til å være cytotoxiske i seg selv (Figur 3.4 og 3.5, histogram).

### 3.4 Cellulær viabilitet ved behandling med inhibitorer

Det var ønskelig å se hvilke effekter en hemming av JNK, p38 og autofagi hadde å si for cellulær viabilitet etter behandling med PDT og PCI. Inhibitorene som ble benyttet i disse forsøkene var SP600125 (JNK inhibitor), SB203580 (p38 MAPK inhibitor) og 3-metyladenin (3MA, PI3K inhibitor). Cellene ble behandlet med 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> og/eller 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  saporin i 18 timer før en inkubering på 3-3,5 timer i medium fritt for TPCS<sub>2a</sub> og saporin etterfulgt av inkubering med inhibitorene. Inhibitorene ble fjernet ved forskjellige tidsintervaller etter lyseksponering. Viabilitet ble målt med MTT-assay 48 timer etter lys.

#### 3.4.1 PDT og PCI med SP600125 på NuTu-19 og ZR-75-1 celler

PDT er vist å aktivere c-Jun N-terminal kinase (JNK) [77]. SP600125 er en JNK inhibitor som hemmer fosforyleringen av c-Jun. Cellene ble tilsatt 5  $\mu\text{M}$  SP600125 en time før lyseksponering og fjernet to timer etter lys.



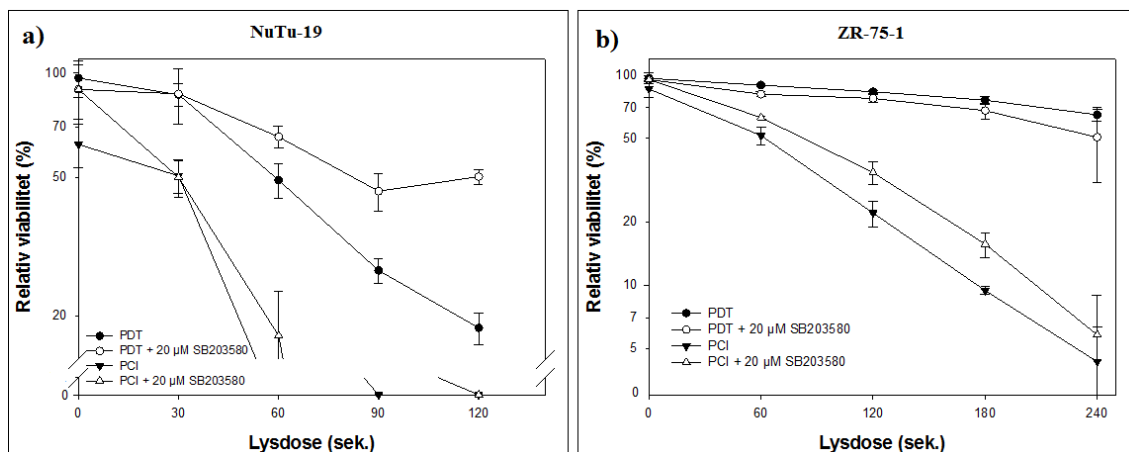
Figur 3.6: PDT- og PCI-behandling med SP600125 på NuTu-19 og ZR-75-1 celler.

Cellulær viabilitet for a) NuTu-19 og b) ZR-75-1 etter behandling med PDT og PCI med JNK inhibitoren SP600125. Cellene ble inkubert med 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> og 5  $\mu\text{M}$  SP600125 eller 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub>, 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  saporin og 5  $\mu\text{M}$  SP600125 som beskrevet i teksten. Viabiliteten beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller og er plottet mot lysdosen. Verdiene er middelerverdi av tre paralleller +/- standardavvik.

Resultatene indikerer at PDT- og PCI-behandling med JNK hemmeren SP600125 gav en høyere cytotoxiske effekt som økte med lysdose (Figur 3.6). Dette ser ut til å gjelde begge cellelinjene. PCI med SP600125 ser ut til å være mer effektiv når det kommer til celledrap sammenlignet med kun PCI i seg selv. Den samme trenden kan sees ved PDT med SP600125 og kun PDT.

### 3.4.2 PDT og PCI med SB203580 på NuTu-19 og ZR-75-1 celler

I likhet med JNK er p38 MAPK vist å bli aktivert etter PDT-behandling [77]. For å se hvilke effekter en hemming av p38 MAPK har på cellulær viabilitet ble det benyttet inhibatoren SB203580. Cellene ble tilsatt 20  $\mu$ M SB203580 en time før lyseksponering og fjernet to timer etter lys.



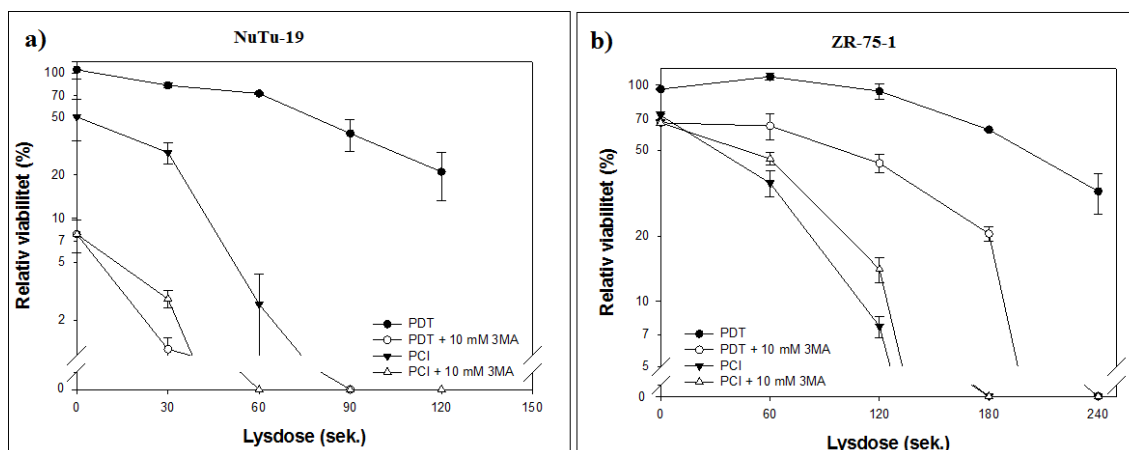
Figur 3.7: PDT- og PCI-behandling med SB203580 på NuTu-19 og ZR-75-1 celler.

Cellulær viabilitet for a) NuTu-19 og b) ZR-75-1 etter behandling med PDT og PCI med p38 inhibatoren SB203580. Cellene ble inkubert med 0,4  $\mu$ g/mL TPCS<sub>2a</sub> og 20  $\mu$ M SB203580 eller 0,4  $\mu$ g/mL TPCS<sub>2a</sub>, 0,5  $\mu$ g/mL saporin og 5  $\mu$ M SB203580 som beskrevet i teksten. Viabiliteten beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller og er plottet mot lysdosen. Verdiene er middelerverdi av tre paralleller +/- standardavvik.

I NuTu-19 ble det observert at PDT med SB203580 gir en økt viabilitet sammenlignet med PDT alene (Figur 3.7a). Denne observasjonen ble kun sett ved celledrap på 30 % eller høyere med PDT alene. Lyseksponering på 120 sekunder gav 80 % celledrap med PDT, mens PDT med SB203580 kun gav 50 % celledrap. Den inhiberende effekten på celledrap med SB203580 ble ikke observert med PCI i NuTu-19 cellene. PDT med SB203580 gav ingen effekt på cellulær viabilitet i ZR-75-1 cellene sammenlignet med PDT alene i det målte doseområdet (Figur 3.7b). I motsetning til NuTu-19 cellene, viste SB203580 en svakt inhiberende effekt på den cytotoxiske effekten av PCI i ZR-75-1 cellene.

### 3.4.3 PDT og PCI med 3-metyladenin på NuTu-19 og ZR-75-1 celler

Klasse III PI3K signalveien er essensiell i induseringen av autofagi og dermed også for cellulær viabilitet. 3-metyladenin er en inhibitor som hemmer både klasse I og klasse III PI3K. For å se hvilken effekt 3-metyladenin har på viabiliteten ble cellene inkubert med 10 mM 3-metyladenin 30 minutter før lyseksponering og fram til viabilitetsmåling 48 timer etter belysning.



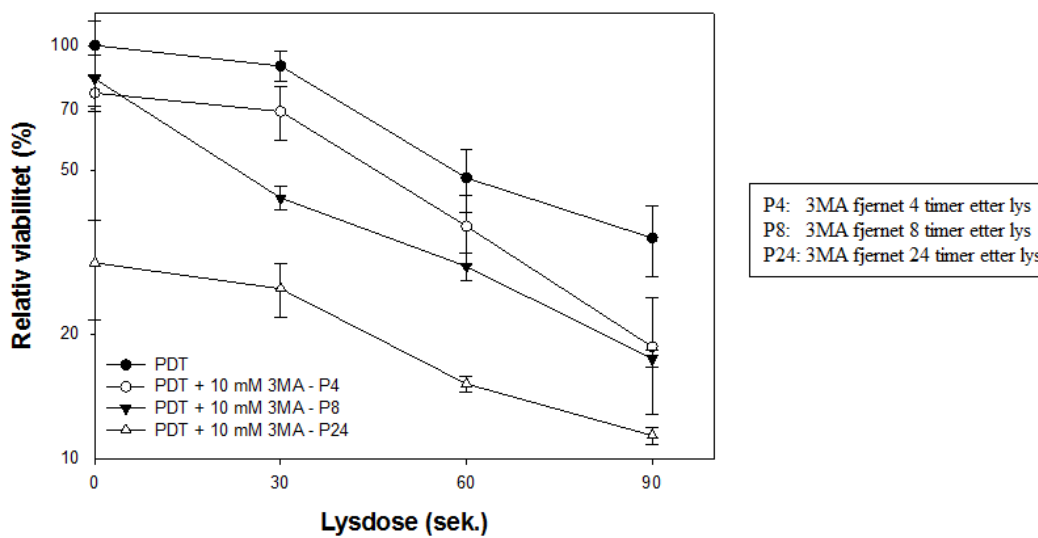
Figur 3.8: PDT- og PCI-behandling med 3-metyladenin på NuTu-19 og ZR-75-1 celler.

Cellulær viabilitet for a) NuTu-19 og b) ZR-75-1 etter behandling med PDT og PCI med PI3K inhibitoren 3-metyladenin (3MA). Cellene ble inkubert med  $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> eller  $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> og  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  saporin i 18 timer. 10 mM 3MA ble tilsatt 30 minutter før belysning og fjernet 48 timer etter lys. Viabiliteten beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller og er plottet mot lysdosen. Verdiene er middelerverdi av tre paralleller +/- standardavvik.

3-metyladenin viste seg å være meget toksisk for NuTu-19 cellene. En reduksjon i viabilitet på mer enn 90 % ble observert i celler som var behandlet med 10 mM 3MA uten lys (Figur 3.8a). Det vil ikke være noe sammenligningsgrunnlag av PDT og PCI med 3MA på NuTu-19 da viabilitetskvantiteringen er gjort på data som hadde en OD lavere enn 0,1. Disse verdiene kan skyldes bakgrunnstøy ved absorbanmålingen. 3MA viste seg også å være cytotoxisk for ZR-75-1 cellene, men dog i mindre grad enn NuTu-19 celler. Et celledrap på 30 % ble observert for ZR-75-1 celler som var behandlet med 3MA uten lys. Resultatene viser at PDT med 3MA på ZR-75-1 cellene er mer cytotoxisk enn PDT alene (Figur 3.8b). PCI-behandling med 3MA sammenlignet med PCI alene på ZR-75-1 celler viste å gi en svak positiv effekt på viabiliteten.

### 3.4.4 PDT på NuTu-19 med ulik inkubasjonstid med 3-metyladenin

Da PDT-behandling med 48 timers inkubasjonstid med 3MA etter belysning på NuTu-19 viste seg å være meget cytotoxisk (Figur 3.8a), var det ønskelig å se hvor lenge NuTu-19 tåler en inkubering med 3MA. Det ble derfor satt opp et forsøk hvor 10 mM 3MA ble tilsatt 30 minutter før belysning og fjernet henholdsvis 4, 8 og 24 timer etter lys.



Figur 3.9: PDT-behandling av NuTu-19 celler med ulik inkubasjonstid med 3-metyladenin.

Cellulær viabilitet etter PDT med PI3K inhibitoren 3-metyladenin (3MA). Cellene ble inkubert med 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> i 18 timer. 10 mM 3MA ble tilsatt 30 minutter før belysning og fjernet henholdsvis 4 (P4), 8 (P8) og 24 (P24) timer etter lys. Viabiliteten beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller og er plottet mot lysdosen. Verdiene er middelverdier av tre paralleller +/- standardavvik.

Resultatet viser at en inkubasjonstid på total 4,5 og 8,5 timer ikke er tilstrekkelig for å få en forskjell i cellulær viabilitet sammenlignet med PDT. Denne forskjellen kan observeres etter en inkubasjonstid på 24,5 timer med 3MA. Denne effekten ser ut til å være en forskyvning av PDT-behandlingen (Figur 3.9).

### 3.5 Semikvantitativ detektering av LC3IIB

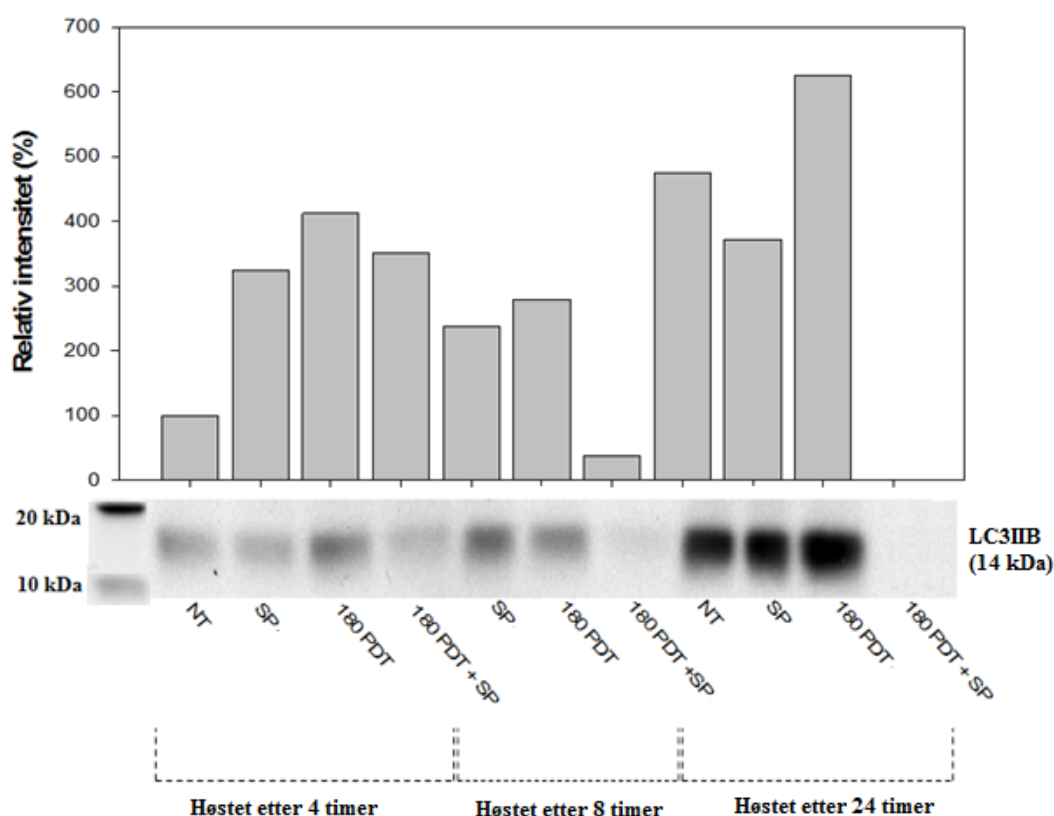
Autofagi er en cellulær prosess hvor cellen kan redde seg selv eller gjennomgå programmert celledød. Hvilken resultat som blir gjeldende er avhengig av skadeomfanget. Microtubuli-assosiert protein light chain 3 (LC3) er et protein som er essensiell i dannelsen av autofagosomer. Ved indusering av autofagi vil cytosolisk LC3I bli kløvet til LC3II. Dannelsen av LC3II blir derfor ofte brukt for å se om autofagi er aktivert. Det er tidligere blitt vist at TPCS<sub>2a</sub>-PDT aktiverer autofagi [24]. Det er derfor ønskelig å se på hvilke



effekter en hemming av JNK, p38 og PI3K har å si for autofagi ved å bruke proteinet LC3IIB som markør for autofagi. Cellene ble behandlet med  $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  TPCS<sub>2a</sub> i 18 timer før en varierende inkubasjonstid (avhengig av inhibitor) med inhibitor. NuTu-19 cellene ble deretter høstet for videre analyse med SDS-PAGE, Western blotting og påfølgende immunodeteksjon.

### 3.5.1 Effekt av JNK inhibering på LC3-aktivering etter PDT på NuTu-19 celler

SP600125 er en hemmer av JNK1, -2 og -3. JNK1 er tidligere vist å spille en viktig rolle i reguleringen av autofagi. Ved aktivering av JNK vil JNK1 kunne fosforylere BH3 domenet til beclin1, slik at en indusering av autofagi finner sted. Cellene ble tilsatt  $5 \mu\text{M}$  SP600125 1 time før lys og fjernet to timer etter lys. NuTu-19 cellene ble høstet 4, 8 og 24 timer etter 180 sekunder med belysning.



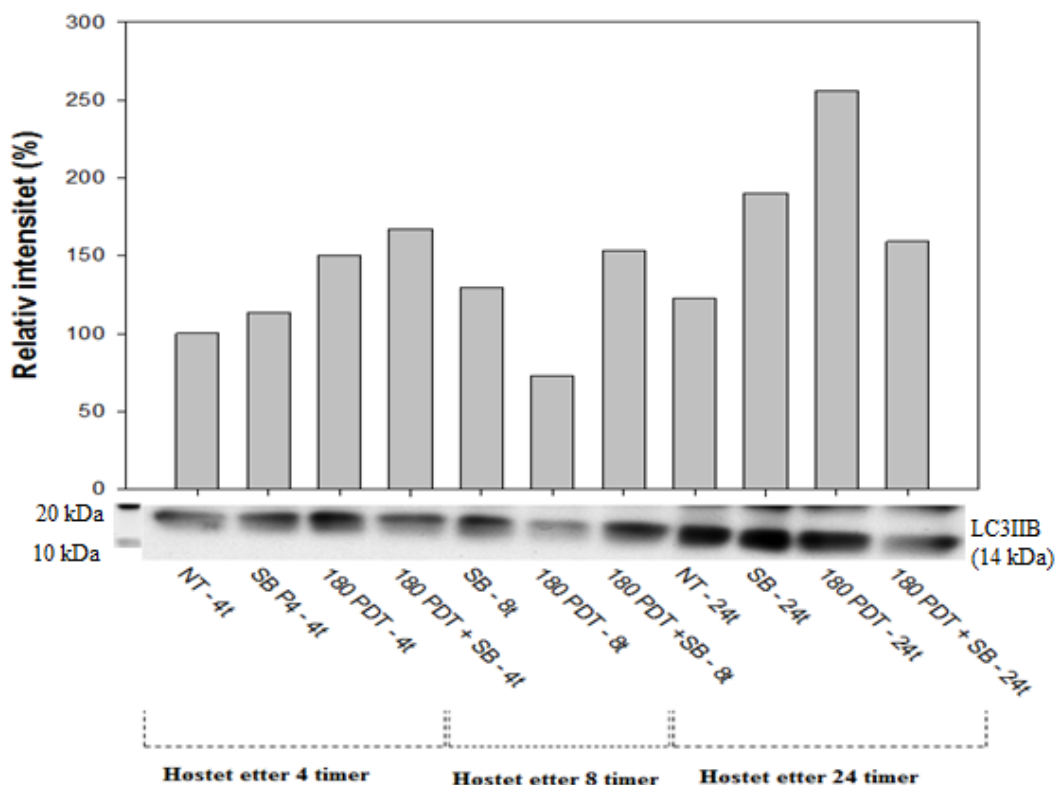
Figur 3.10: Effekt av JNK inhibering på LC3-aktivering etter PDT på NuTu-19.

Bildet viser ekspresjon av LC3IIB etter behandling med TPCS<sub>2a</sub>-PDT og  $5 \mu\text{M}$  SP600126 som indikert i figuren og beskrevet i teksten. NuTu-19 cellene ble behandlet med PDT og belyst i 180 sekunder. Høsting av celler ble gjort 4, 8 og 24 timer etter belysning. Kvantiteringen av intensiteten er beregnet relativt til NT (ubehandlede celler) og korrigert med hensyn til aktinmengde (ikke vist i figuren).

Resultatet viser at LC3IIB dannes etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT og at SP600125 har nedregulerende effekt på LC3IIB dannelse, og at denne effekten øker med tiden etter behandling (Figur 3.10). Behandling med PDT og SP600125 drepte for mange celler ved de indikerte betingelser til å kunne detekttere LC3IIB 24 timer etter belysning.

### 3.5.2 Effekt av p38 inhibering på LC3-aktivering etter PDT på NuTu-19 celler

Aktivering av p38 er vist å ha en regulerende effekt på autofagien [75] ved at fosforylert p38 $\alpha$  vil binde seg til p38-interagerende protein (p38IP). Dette vil medføre at p38IP ikke vil kunne interagere med mAtg9 og dermed inhibere autofagi. SB203580 er en p38 MAPK inhibitor, og er vist å hemme p38 $\alpha$  og p38 $\beta$ . NuTu-19 cellene ble tilsatt 20  $\mu$ M SB203580 1 time før lys og fjernet to timer etter lys og høstet 4, 8 og 24 timer etter 180 sekunder med belysning.



Figur 3.11: Påvisning av LC3IIB etter PDT med SB203580 på NuTu-19 celler

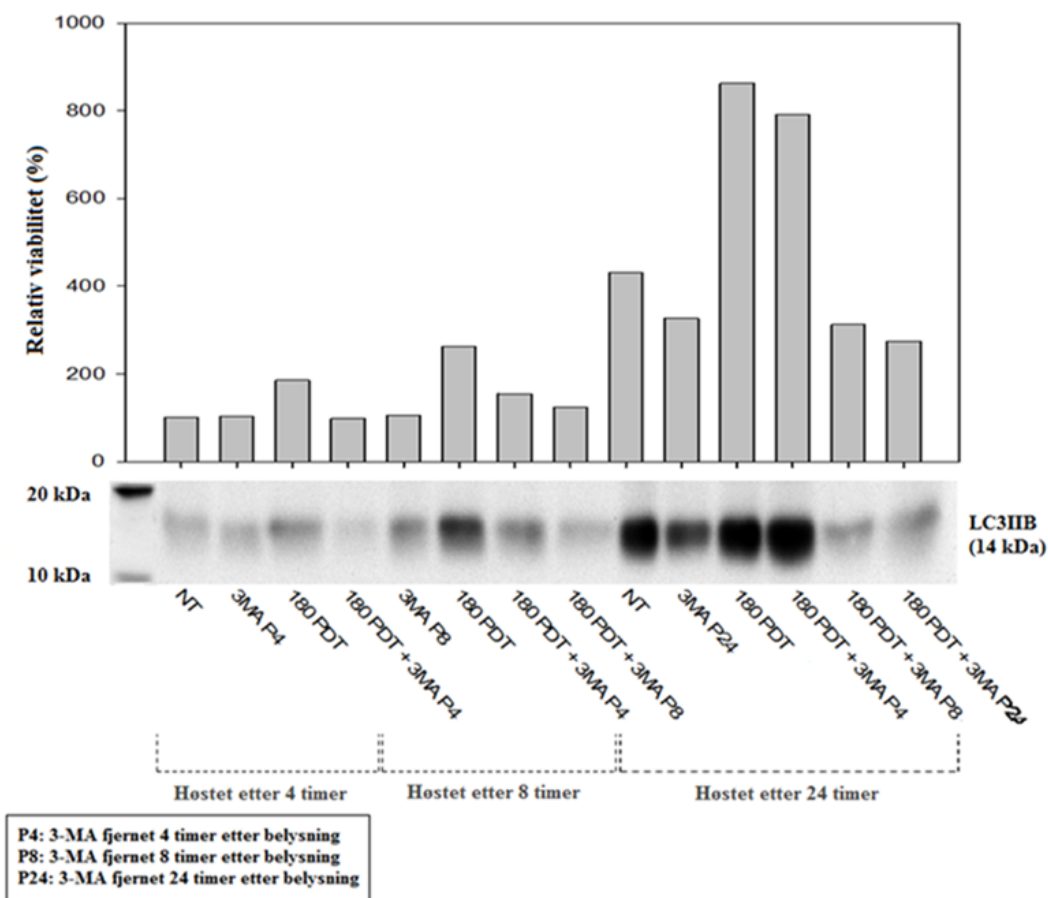
Bildet viser ekspresjon av LC3IIB etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT med 20  $\mu$ M SB203580 som indikert i figuren og beskrevet i teksten. NuTu-19 cellene ble behandlet med PDT og belyst i 180 sekunder. Høsting av celler ble gjort 4, 8 og 24 timer etter belysning. Kvantiteringen av intensiteten er beregnet relativt til NT (ubehandlede celler) og korrigert med hensyn til aktinmengde (ikke vist i figuren).

Resultatet viser at LC3IIB dannes etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT, men inhibering av p38 ser ut til å ha varierende grad av effekt på dannelse av LC3IIB etter behandling med TPCS<sub>2a</sub>-PDT (Figur 3.11). Det er imidlertid gjennomført for få forsøk til å kunne trekke noen endelige konklusjoner.

### 3.5.3 Effekt av PI3K inhibering på LC3-aktivering etter PDT på NuTu-19 celler

3-metyladenin er en fosfoinositid 3-kinase (PI3K) inhibitor som hemmer både klasse I og klasse III. Klasse III PI3K er vist å være vesentlig i induseringen av autofagi. Ved tilstedeværelse av 3MA vil det være forventet å se en nedregulering i kløyving av LC3I til LC3II [82]. Cellene ble behandlet med TPCS<sub>2a</sub>-PDT og belyst i 180 sekunder. 3MA ble tilsatt 30 minutter før lyseksposering og fjernet henholdsvis 4, 8, 24 timer. Høstingen av celler ble gjort med de samme tidsintervallene. For å se om hemming av LC3IIB dannelse etter PDT med 3MA er reversibel ble noen celler ”pulset” og inkubert i medium fritt for 3MA frem til høsting.

Resultatet viser at TPCS<sub>2a</sub>-PDT induserer autofagi da LC3IIB blir oppregulert etter 4 timer med 180 sekunders belysning (Figur 3.12). Denne oppreguleringen ser ut til å øke med tiden. 3MA kombinert med TPCS<sub>2a</sub>-PDT gir en nedregulering av LC3IIB dannelse sammenlignet med PDT alene. Ved pulsing av 3MA ble det observert at LC3IIB ble oppregulert igjen, særlig i celler som var pulset i 4,5 timer med 3MA. Celler som var pulset med 3MA i 8,5 timer ble det kun observert en svak oppregulering 24 timer etter lysbehandling.

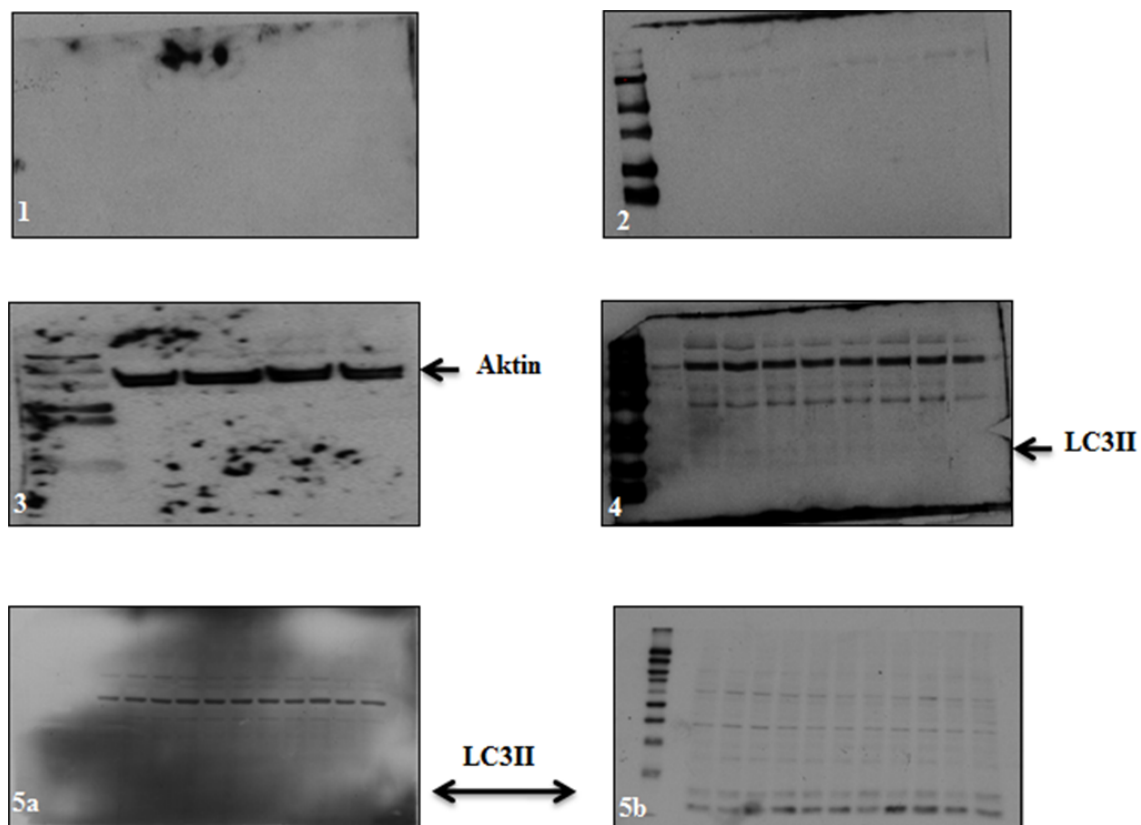


Figur 3.12: Effekt av PI3K inhibering på LC3-aktivering etter PDT på NuTu-19 celler

Bildet viser ekspresjon av LC3IIB i NuTu-19 celler etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT med 10 mM 3-metyladenin. Som indikert på figuren og i teksten ble 3MA tilsatt 30 minutter før lys og fjernet henholdsvis 4 (P4), 8 (P8) og 24 (P24) timer etter belysning på 180 sekunder. Høsting av celler ble gjort 4, 8 og 24 timer etter belysning, som indikert på figuren. Kvantiteringen av intensiteten er beregnet relativt til NT (ubehandlede celler) og korrigert med hensyn til aktinmengde (ikke vist i figuren).

### 3.6 Immunodeteksjon med SNAP i.d

Det ble initielt benyttet ferdigstøpt gel (Pierce) for SDS-PAGE og SNAP i.d. protein systemet (Millipore) for immunodeteksjon etter Western blot da gruppen ønsket å gå over til disse metodene grunnet tidsbesparing.



Figur 3.13: **Proteindetektering med SNAP i.d.**

Bildet viser diverse resultater fra immunodeteksjon med SNAP i.d. gjort på ZR-75-1 og NuTu-19 celler behandlet med PDT. 1) viser deteksjon av LC3IIB med ferdigstøpt gel, 2) viser deteksjon av LC3IIB med egen støpt gel, 3) viser deteksjon av aktin med egen støpt gel, 4) viser deteksjon av LC3IIB med egen støpt gel med ny innkjøpt antistoff og 5) viser deteksjon av LC3IIB med SNAP i.d (a) kontra tradisjonell metode for immunodeteksjon (b)

Prosedyrene som ble benyttet den første tiden var innhentet fra en annen gruppe, og figur 3.13 bilde 1 viser resultatet av første kjøring. Dette resultatet viste verken deteksjon av målproteinene (LC3IIB) eller molekylvektstandarden. For å sjekke om proteinene fra SDS-PAGE var overført til membranen, ble Ponceau farging (Avsnitt 2.6.7) benyttet for å lokalisere proteiner på membranen. Denne testen viste at ingen proteiner var blitt overført (data ikke vist). Det viste seg at utnyttelsen av ferdigstøpte geler krevde egne buffere (running- og blottebuffer). Figur 3.13 bilde 2 viser resultatet etter endring av buffere hvor kun deteksjon av molekylvektstandarden og noe uspesifikt binding ble observert. Det ble derfor bestemt at egne støpte geler skulle benyttes da dette har gitt gode resultater tidligere innad i gruppen. Etter flere kjøring uten deteksjon av LC3IIB, ble aktin benyttet som en positiv kontroll for å utelukke feil ved ekstrakter og overføring av proteiner til membranen. Resultatet (Figur 3.13, bilde 3) viser en klar detektering av aktin. Det ble nå fokusert på antistoffet da dette var gammelt, og effekten kan ha blitt svekket etter

gjentatte opptininger. Det ble derfor kjøpt inn nytt antistoff. Figur 3.13 bilde 4 viser svake bånd av LC3IIB og mye uspesifikke bindinger. Dette indikerer at betingelsene fortsatt ikke var optimale. Celleantallet ble justert opp uten at det hjalp på intensiteten på båndene (data ikke vist). Etter flere gjennomganger med gruppen ble det fokusert på strømkilden som en mulig feilkilde. Det ble oppdaget at vannet ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) som ble benyttet i det nye Forskningsbygget hadde et høyt kalkinnhold, og derfor kunne ha interferert med strømstyrken. Det ble derfor laget nye reagenser med ionebyttet vann. Figur 3.13 bilde 5a viser resultatet av SNAP i.d. under optimaliserte betingelser. Det var i tillegg ønskelig å sammenligne spesifisiteten og sensitiviteten av denne metoden kontra tradisjonell metode (Figur 3.13, bilde 5b). Resultatene viste at tradisjonell metode for immunodeteksjon er mer egnet til deteksjonen av LC3IIB, sammenlignet med SNAP i.d. systemet, for forsøk gjort i denne oppgaven.

## 4 Diskusjon

### 4.1 Intracellulær lokalisering av TPCS<sub>2a</sub>

Det kritiske elementet i både PDT og PCI er fotosensitizeren. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> regnes som den primære mediatoren for fototoksisk effekt og er vist å kun migrere 0,02 μm [54]. Lokaliseringen av fotosensitizeren ved belysningstidspunktet vil derfor korrespondere med stedet for primær fotokjemisk skade. PCI er en metode for målrettet levering av endocytiske makromolekyler. Forutsetningen for effektiv PCI er at fotosensitizeren lokaliseres til endolysosomale vesikler. Dersom fotosensitizeren lokaliseres til plasmamembranen vil en oksidasjon av kolesterol, umettede fosfolipider og proteiner i membranene oppstå. Dette vil igjen resultere i permeabilitetsforandringer i plasmamembranen og redusert ATP som vil indusere nekrose. Avhengig av prosessens hastighet, vil dette kunne ha en innvirkning på endocytert levering ved benyttelsen av PCI. Intracellulær lokaliseringen av TPCS<sub>2a</sub> ble derfor studert. TPCS<sub>2a</sub> er en amfifil fotosensitizer som har mange likhetstrekk med TPPS<sub>2a</sub> som har en dokumentert lokalisering til endolysosomale vesikler [79]. TPCS<sub>2a</sub> vil derfor være forventet å lokalisere seg til endolysosomale vesikler etter opptak ved endocytose.

For både NuTu-19 og ZR-75-1 celler ble det observert en granulær fluorescens etter inkubering med TPCS<sub>2a</sub> i 18 timer med påfølgende vask og 4 timers inkubering med medium fritt for TPCS<sub>2a</sub> (Figur 3.2 og 3.3, bilde 3b). Den granulære fluorescensen som visualiseres antas å avspeile endolysosomal lokalisering av TPCS<sub>2a</sub>. I tillegg ble det observert en diffus fluorescens over hele cellen for de av cellene som var inkubert med TPCS<sub>2a</sub> i 18 timer uten vask (Figur 3.2 og 3.3, bilde 2b). TPCS<sub>2a</sub> har amfifile egenskaper som gjør at de kun vil kunne penetrere inn i cellulære membraner, men ikke trenge igjennom. Derfor vil den diffuse fluorescensen som ble observert trolig skyldes TPCS<sub>2a</sub> i plasmamembranen og ikke lokalisering i cytosol. Fravær av diffus fluorescens på plasmamembranen etter vaskeprosedyre tyder på at TPCS<sub>2a</sub> ble vasket bort fra plasmamembranen. For ubehandlede celler ble det som forventet ikke detektert fluorescens (Figur 3.2 og 3.3, bilde 1b). I tillegg var cellene behandlet med Hoechst 33342 for å visualisere cellekjernen. Det er ikke forventet at TPCS<sub>2a</sub> skal lokaliseres til cellekjernen grunnet fotosensitizerens negative ladning [12, 22]. Dette stemmer godt overens med observasjoner gjort i denne studien.

## 4.2 Cellulær viabilitet etter PDT- og PCI-behandling

PDT og PCI er metoder som induserer irreversible skader på tumorvev grunnet fotokjemiske- og biologiske prosesser. Antitumoreffekten av begge metoder er lokal da fotosensitisere preferensielt lokaliseres til tumorvev og administrering av lys skjer lokalt. Klinisk bruk av PDT er blitt godkjent for detektering og behandling av flere krefttyper [15]. En begrensning i PDT er at belysningstiden for effektiv behandling kan være lang og kan forårsake akutte skader på normalvevet som begrenser lysdosen som kan appliseres. Ofte vil normalvevet regenereres, men alvorlige bivirkninger som lyssensitivitet er observert. En forbedring av denne metoden vil derfor være å redusere eksponeringstiden av lys samtidig som den cytotoksiske effekten på tumorvev opprettholdes. PCI er en ny metode under utvikling og studier i forskjellige cellelinjer og tumormodeller *in vivo* indikerer at PCI trenger en langt lavere lysdose for å oppnå de samme effektene som PDT [4, 28, 70]. Dette er i samsvar med observasjoner gjort i denne studien.

Den cytotoksiske effekten som observeres med PCI er et resultat av vellykket levering av toksinet i kombinasjon med fotokjemisk behandling. Makromolekylet som er benyttet i denne studien er saporin, en type 1 RIP. Denne typen toksiner er potensielt meget cytotoxicke, men da de etter opptak ved pinocytose ofte degraderes i lysosomer får de ikke utøvd sin intracellulære effekt. Cytotoksiteten av type 1 RIP er i *in vitro* studier vist å kunne øke opp til 300 ganger i kombinasjon med fotokjemisk behandling [28]. Ved begge behandlingsformene er det benyttet konsentrasjoner som i seg selv ikke gir cytotoxicitet. Dette kan sees ut fra figur 3.4 og 3.5, hvor saporin og TPCS<sub>2a</sub> alene eller i kombinasjon uten lyseksponering viser kun en svak reduksjon i cellulær viabilitet. Dette er gunstig da fotosensitisere og legemidler ofte administreres systemisk og tilstedeværelse av disse i normalvev vil forekomme. Resultatene i denne studien indikerer at PCI er mer effektiv sammenlignet med PDT. Ved PDT måtte det benyttes ca. 3 ganger så høy lysdose for å oppnå samme cytotoxicitet som etter behandling med PCI (Figur 3.4 og 3.5). Dette er gjelder for begge cellelinjene som er benyttet i denne studien.

PCI er per i dag ikke godkjent for klinisk bruk, men er i en klinisk fase I/II studie ved University College Hospital i London. Resultatene har vært oppsiktsvekkende og indikerer at PCI er en effektiv og selektiv metode da behandlingen kun har hatt cytotoxicke effekter på tumor og ikke omkringliggende normalvev. Generelt kan det se ut som PCI vil være mer hensiktsmessig kontra PDT da metoden oppnår cytotoxicisk effekt ved lavere lysdoser [34].



### 4.3 Effekten av SP600125 på cellulær viabilitet

Proteinkinasen JNK er kjent for å bli aktivert av ulike former for stress, som UV-lys og oksidativt stress. Studier med cytokiner og ceramider (lipidmolekyler) har vist å indusere aktiveringen av disse proteinkinasene. Aktivering av JNK er vist å resultere i celledød da JNK inhibitoren SP600125 øker viabiliteten [50]. JNK er også blitt rapportert å bli aktivert etter fotokjemisk behandling, men behandling med de samme inhibitorene ser ut til å ha en motsatt effekt på cellulær viabilitet [77]. Dette er i samsvar med resultatene fra denne studien da en hemming med SP600125 resulterte i en økt cytotoksisk effekt etter fotokjemisk behandling (Figur 3.6). Weyergang et al. rapporterte at TPPS<sub>2a</sub>-PDT gav en økt cytotoksitet i kombinasjon med SP600125 i NuTu-19 celler, men denne effekten var imidlertid i liten grad observert ved TPPS<sub>2a</sub>-PCI av gelonin [77]. Disse resultatene motstrider funn i denne oppgaven. I denne studien ble det vist at PCI av saporin med SP600125 resulterer i økt cytotoksitet. Denne effekten ser ut til å øke med lyseksponering både ved PDT og PCI, og ser ut til å gjelde for både NuTu-19 og ZR-75-1 cellene. Det ble i disse studiene benyttet amfile fotosensitisere, makromolekyler av type 1 RIP og lysdoser i samme område, dermed skulle en forvente at resultatene var i samsvar. Forskjeller i resultatene kan skyldes biologisk variasjon, ulik konsentrasjon av fotosensitisere samt ulike fotosensitisere (TPPS<sub>2a</sub> og TPCS<sub>2a</sub>).

SP600125 er vist å kunne binde seg til andre proteinkinaser enn JNK. Den er blant annet vist å hemme aktiveringen av S6K1, en effektor nedstrøms for mTOR [39]. Dette viser at SP600125 kan ha en negativt regulerende funksjon på mTOR, som har en essensiell rolle i reguleringen av autofagi. Dersom mTOR aktiviteten blir inhibert vil dette være et signal på å aktivere autofagi via rekruttering av flere Atg-proteiner. Dette kan muligens være en forklaring på observasjonene Li et al. gjorde med ceramid-indusert celledød da autofagi ble funnet å være aktivert [50]. Den tilsynelatende motsatte effekten av JNK på fotokjemisk induert celledød kan derfor skyldes en aktivering av autofagiveien. Etter fotokjemisk behandling vil autofagosomene forventes å fusjonere med skadede endosomer og lysosomer og en kan ikke forvente at degraderingen av cellulære komponenter i autolysosomer vil finne sted. I stedet er det grunn til å anta at innholdet i autofagosomer resykleres tilbake til cytosol med en ukjent effekt på cellulær viabilitet. For å studere om JNK-mediert celledød går via autofagi, ble det i tillegg til SP600125 benyttet PI3K inhibitoren 3-metyladenin. 3MA er vist å hemme både klasse I og klasse III PI3K, som har en regulerende rolle på autofagi. For å detektere om fotokjemisk behandling aktiverer autofagi ble det benyttet autofagi-markøren LC3. Ved induseringen av autofagi vil cytosolisk LC3I kløyves til LC3II, og en deteksjon av LC3IIB vil derfor reflektere aktivering av autofagi. Resultatene fra denne studien viser at PDT aktiverer autofagi da en oppregulering av LC3IIB er observert (Figur 3.10). Ved å kombinere PDT med SP600125 ble LC3IIB nedregulert i forhold til PDT

alene, dette er spesielt synlig 8 timer etter lyseksponering. Figur 3.12 viser at inhiberingen av LC3IIB-dannelsen etter PDT i kombinasjon med 3MA er reversibel dersom 3MA blir fjernet fra cellene. PDT med 8,5 timers inkubering med 3MA ser ikke ut til å ha noen effekt på cellulær viabilitet (Figur 3.9). Siden dannelsen av LC3IIB er nedregulert etter PDT-behandling med SP600125 og en nedregulering av LC3IIB etter 8,5 timer ikke har en innvirkning på viabiliteten, er dette en indikasjon på at JNK-mediert celledød etter fotokjemisk behandling ikke er autofagimediert. Dette kan muligens være forklaringen på den motsatte effekten som er observert etter JNK-aktivering med ceramider og cytokiner da disse ser ut til å være autofagimedierte.

#### 4.4 Effekten av SB203580 på cellulær viabilitet

I likhet med JNK, blir proteinkinasen p38 aktivert av ulike former for cellulært stress. Cheng et al. viste at  $\text{TNF}_\alpha$ -indusert celledød via apoptose og autofagi ble aktivert av inhibatoren SB203580 [20]. Weyergang et al. viste at både  $\text{TPPS}_{2a}$ -PDT og  $\text{TPPS}_{2a}$ -PCI av gelonin reduserte den cytotoxiske effekten av den fotokjemiske behandlingen ved bruk av den samme inhibatoren [77]. Resultatene av forsøkene med fotokjemisk behandling og SB203580 som ble utført i denne oppgaven varierte i graden av samsvar med resultatene til Weyergang et al. For NuTu-19 cellene, ble det vist at SB203580 reduserte den cytotoxiske effekten av  $\text{TPCS}_{2a}$ -PDT, mens dette ikke ble vist for  $\text{TPCS}_{2a}$ -PCI av saporin (Figur 3.7a). For ZR-75-1 cellene, ble det ikke observert en reduksjon av cytotoxisk effekt av  $\text{TPCS}_{2a}$ -PDT, mens dette til en viss grad ble observert for  $\text{TPCS}_{2a}$ -PCI av saporin (Figur 3.7b). Forskjeller i resultatene kan igjen skyldes biologisk variasjon, ulik konsentrasjon av fotosensitisere samt ulike fotosensitisere ( $\text{TPPS}_{2a}$  og  $\text{TPCS}_{2a}$ ).

Inhibering av p38 har varierende grad av effekt på dannelse av LC3IIB etter behandling med  $\text{TPCS}_{2a}$ -PDT (Figur 3.11). Det vil derfor være nødvendig med ytterligere studier for å kunne trekke konklusjoner angående sammenhengen mellom autofagi og p38 MAPK-aktivering.

#### 4.5 Eksperimentelle feilkilder

##### 4.5.1 Telling og utsåing av celler

For å sikre reproduserbarheten på forsøkene ble antall celler talt før utsåing. Dette ble gjort ved å pipettere en dråpe av cellesuspensjonen til et tellekammer og telle cellene manuelt ved bruk av et mikroskop. Mulige feilkilder er at cellesuspensjonen ikke er representativt for uttaket da det kan tenkes at den ikke er homogen samt at operatøren kan ha vært unøyaktig under telleprosessen. I tillegg ble uttak av cellesuspensjonen og fortynningen til

ønsket konsentrasjon gjort manuelt ved pipettering. Dersom det er gått lang tid mellom kalibrering av pipetter vil volumet som tas ut være feilaktig. Dette vil kunne medføre til at for få eller for mange celler blir sådd ut og arbeidet blir vanskelig å reproducere.

#### 4.5.2 Uønsket belysning av TPCS<sub>2a</sub>

Etter tilsettelse av TPCS<sub>2a</sub> ble all arbeid med cellene konsekvent utført under dempet lys. Det kan likevel ikke utelukkes at uønsket lys kan ha bidratt til aktivering av fotosensitiseren og dermed en økt effekt av fotokjemisk behandling. Ved forsøk hvor celler skulle ha forskjellige lysdoser er det ofte at de blir sådd ut på samme brett. En mulig feilkilde vil derfor være at noen celler vil kunne bli lyseksponert lenger enn de skulle grunnet lysspredningen i brettene. Celler som skulle være kontroller ble sådd ut på egne brett som ikke ble belyst, men det kan ikke utelukkes uønsket lyseksponering.

#### 4.5.3 Overlevelse målt med MTT-assay

I denne studien ble MTT-assayet benyttet til å måle cellulær viabilitet. Svakheten ved denne metoden er at den måler mitokondriell aktivitet i cellene. Døende celler kan imidlertid fortsatt ha en viss mitokondrieaktivitet. Dersom målingen av MTT skjer kort tid etter behandlingen kan dette resultere i økt cellulær viabilitet etter fotokjemisk behandling. En sikrere metode for viabilitetsmåling er klonogen overlevelse. Metoden er basert på at en enkeltcelle skal kunne gi opphav til en avgrenset koloni av celler. En begrensning ved denne metoden er at det kan ta lang tid mellom behandling og cytotoksitets-assay samt at den ikke egner seg for alle cellelinjer da ikke alle vokser til en avgrenset koloni.

#### 4.5.4 Effektforstyrrelse etter gjentatt opptining

Både saporin, inhibitorer og antistoffer som er benyttet i denne oppgaven oppbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Gjentatte opptininger kan bidra til en redusert effekt av disse.

#### 4.5.5 Immunodeteksjon med SNAP i.d. kontra tradisjonell metode

Innføring av nye metoder ved et laboratorie vil ofte kreve optimaliseringer, selv om disse metodene er godt innarbeidet ved andre laboratorier. Det vil derfor være behov for justering av protokoller før metoden tas i bruk ved eget laboratorie. I denne oppgaven ble det initielt benyttet en ny metode for immunodeteksjon (SNAP i.d.) etter Western blotting. Flere feilkilder ble identifisert og korrigert på underveis. Det ble blant annet observert at bruk av ferdige innkjøpte geler trengte egne buffere og at det destillerte vannet på laboratoriet hadde et høyt kalkinnhold som påvirket strømstyrken. Disse interferensene er av stor betydning for metoder som SDS-PAGE og Western blotting. Videre ble det stilt spørsmål til kvaliteten av det primære antistoffet da både molekylvektstandarder og den

positive kontrollen (aktin, Figur 3.13 bilde 3) ble detektert, men ikke målproteinet. En svekkelse av antistoffets kvalitet kan komme av mange opptininger da det ble benyttet et gammelt antistoff.

SNAP i.d. fra Millipore påstås å være mer økonomisk enn tradisjonell metode. Dette kan muligens stemme da den benytter mindre volumer av reagenser, men det bør tas hensyn til at ved tradisjonell metode kan mye av utstyret bli gjenbrukt, mens SNAP i.d. metoden krever bruk av engangsutstyr (kassettholdere) som kan ha høy innkjøpspris. En nøyere beregning vil måtte gjøres for å finne hvilken metode som er mest lønnsom når det kommer til pris.

Etter å ha sammenlignet begge metoder for immunodeteksjon, ble det besluttet å benytte tradisjonell metode da SNAP i.d. viser å være mindre spesifikk og sensitiv med det primære antistoffet som benyttes i denne oppgaven samt at bakgrunnen ofte ble for sterk og ujevn. En tanke kan være å kombinere begge metodene ved å benytte tradisjonell metode til og med inkubering av primært antistoff og SNAP i.d. for vask og inkubering av sekundært antistoff. Dette vil kunne gi en tidsbesparelse (2 timer) samtidig som spesifisiteten og sensitiviteten beholdes.

#### 4.6 Videre studier

Da resultatene i denne oppgaven indikere at JNK-mediert celledød går via andre mekanismer enn autofagi, og med den kunnskapen vi har om at lokaliseringen av fotosensitiseren vil være det primære målet for fotokjemisk skade, vil apoptose være en mulig døds mekanisme. Siden TPCS<sub>2a</sub> er lokalisert i endolysosomale vesikler, vil skader på disse kunne resultere i at cathepsiner frigjøres fra lysosomer og ut i cytosolen. Cathepsinene vil kunne mediere apoptose ved å kløyve Bid til tBid som lokaliseres til mitokondrier hvor de aktiverer pro-apoptotiske Bax. Dette resulterer i en frigjøring av cytokrom c og dermed apoptose-indusering [67]. Selv om dette muligens er en mekanisme for JNK-mediert celledød, har Berg et al. rapportert at cathepsiner trolig i liten grad har en innvirkning på celledød [5, 6].

TPPS<sub>2a</sub>, som primært lokaliseres til endolysosomale vesikler, er vist å relokaliseres til endoplasmatisk retikulum (ER) etter belysning [69]. TPCS<sub>2a</sub> er strukturelt sett tilnærmet lik TPPS<sub>2a</sub>, og en kan dermed forvente at en relokalisering til ER også vil kunne oppstå etter lys for TPCS<sub>2a</sub>. Fotosensitisere som er lokalisert i ER er vist å indusere apoptose og nekrose [67], men med TPCS<sub>2a</sub> er det vist at nekrose i liten grad forekommer [24]. Dette underbygger hypotesen om at JNK-mediert celledød skjer via apoptose.

I tillegg til å fungere som en transportsystem vil ER også kunne fungere som en sensor mot

stress gjennom de tre transmembranen proteinene PERK (kinase), IRE1 (kinase) og ATF (transkripsjonsfaktor). Det kan tenkes at en relokalisering av fotosensitiserende hit vil kunne indusere cellulær stress som fanges opp av ER. Dette kan medføre at IRE1 aktiverer JNK signalveien [57]. JNK er kjent for å regulere Bcl-2 familien av proteiner, og aktivert JNK kan derfor fosforylere proapoptotiske Bax og Bak som setter i gang apoptotiske prosesser. I tillegg vil JNK også kunne aktivere tumor supressor proteinet p53 som kan resultere i cellesyklus arrest eller apoptose [27].

Det hadde på denne bakgrunn vært av interesse å studere relokaliseringen av TPCS<sub>2a</sub> og dens sammenheng med apoptose. Relokaliseringen av TPCS<sub>2a</sub> kan studeres ved å benytte fluorescensmikroskopi. For å studere apoptotiskmediert celledød etter fotokjemisk behandling kan en se på effektor-kaspase-3 som er essensiell i apoptosen. Dette kan blant annet gjøres ved å detektere proteinet med Western blot, men dette er tidligere vist å gi svake signaler [24]. Apoptose kan også bli målt enzymatisk med fluorescensdetektering. Denne metoden benytter kaspase-3 substratet Z-DEVD som er bundet til AMC (Z-DEVD-AMC). Kløyving av dette substratet av kaspase-3 vil resultere i detekterbar fluorescens. Fluorescensintensiteten vil være proporsjonal med kaspase-3 aktivitet [30].

3-metyladenin er per idag en av de mest brukte inhibitorene for å hemme autofagi. Man har lenge trodd at inhiberingen av autofagi kommer av at 3MA hemmer klasse III PI3K fra å danne PI3P som trengs for induseringen av autofagi, men 3MA er også vist å hemme klasse I PI3K. Aktivering av klasse I PI3K vil aktivere AKT som igjen vil kunne aktivere mTOR kompleks 1 (mTORC1) og dermed inhibere autofagi. Nyere studier tyder på at 3-metyladenin har en tveegget rolle på autofagien i næringsrikt medium. Wu et al. observerte at PI3P var nedregulert de tre første timene etter tilsetningen av 3MA, men at denne ble oppregulert til normalen (ubehandlet prøve) etter ni timers inkubasjon med 3MA. Det ble i tillegg observert at PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (produkt av klasse I PI3K aktivering) ble hemmet i hele ni timer ved tilstedeværelse av 3MA. Disse resultatene viser at 3MA i næringsrikt medium har en vedvarende inhiberende effekt på klasse I PI3K, mens hemmingen av klasse III PI3K er forbigående [82]. Dette vil igjen påvirke cellulær viabilitet og resultatene i denne oppgaven da 3MA ble inkubert i næringsrikt medium. Det vil derfor være nødvendig å gjenta forsøkene med en annen inhibitor av autofagi, for eksempel med wortmannin. Wortmannin er vist å ha en vedvarende nedregulerende effekt på PI3P, også i næringsrikt medium [81].

## 5 Konklusjoner

Den intracellulære lokaliseringen av den amfifile fotosensitizeren TPCS<sub>2a</sub> ble som forventet vist å være i endolysosomale vesikler. Behandling med TPCS<sub>2a</sub>-PDT og TPCS<sub>2a</sub>-PCI av saporin på NuTu-19 og ZR-75-1 celler resulterte i cytotoksiske effekter målt som redusert vitalitet. Resultatene i denne studien indikerer at PCI av saporin er mer effektiv sammenlignet med PDT da den ga økt celledød ved lavere lysdoser. Dette er i samsvar med tidligere resultater [70].

Cellulære prosesser ble manipulert med inhibitorer for å studere effekten av disse på vitalitet etter fotokjemisk behandling. JNK inhibitoren SP600125 gav økt cytotoxicitet for både NuTu-19 og ZR-75-1 celler ved behandling med PDT og PCI. Samme inhibitor hadde en nedregulerende effekt på LC3IIB aktivering sammenlignet med PDT alene. p38 MAPK inhibitoren SB203580 viste en reduksjon i cytotoxicisk effekt med PDT for NuTu-19 celler. Denne effekten var ikke målbar i ZR-75-1 cellene. I motsetning til NuTu-19 cellene, viste SB203580 en svakt inhiberende effekt på den cytotoxiciske effekten av PCI i ZR-75-1 cellene. PI3K inhibitoren 3-metyladenin viste seg å være meget toksisk for NuTu-19 cellene ved inkubering i 48 timer etter både PDT og PCI, mens inkubering av samme inhibitor i 4 og 8 timer gav ingen cytotoxicisk effekt etter PDT-behandling. 3MA viste seg også å være cytotoxicisk for ZR-75-1 cellene, men dog i mindre grad enn NuTu-19 celler.

Resultatene i denne studien indikerer at JNK-mediert celledød ikke er autofagomediert. Det trengs ytterligere studier for å kunne trekke noen konklusjoner for p38-mediert celledød da resultatene er vist å variere.

## Referanser

- [1] Z Assefa, A Vantieghem, P Vandenabeele W Declercq, JR Vandenheede, W Merlevede, P de Wittel og P Agostinis. The activation of the c-Jun N-terminal Kinase signaling pathways protect HeLa cells from apoptosis following Photodynamic Therapy with Hypericin. *Journal of Biological Chemistry*, 13:8788–8796, 1999.
- [2] LM Bareford og PW Swaan. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(8):748–758, 2007.
- [3] BL Bennett, DT Sasaki, BW Murray, EC O’Leary, ST Sakata, W Xu, JC Leisten, A Motiwala, S Pierce, Y Satoh, SS Bhagwat, AM Manning og DW Anderson. Sp600125, an anthrapyrazolone inhibitor of jun n-terminal kinase. *PNAS*, 98:13681–13686, 2001.
- [4] K Berg, A Høgset, L Prasmickaite, A Weyergang, A Bonsted, A Dietze, PJ Lou, S Bown, OJ Norum, HMT Møllergård og PK Selbo. Photochemical internalization (PCI): A novel technology for activation of endocytosed therapeutic agents. *Medical Laser Appl.*, 21:239–250, 2006.
- [5] K Berg og J Moan. Lysosomes as photochemical targets. *Int. J. Biochem*, 59:814–822, 1994.
- [6] K Berg og J Moan. The influence of the cysteine protease inhibitor l-trans-epoxysuccinyl-leucyl amido(4-guanido) (E64) on photobiological effects of tetra(4-sulfonatophenyl)porphine. *Cancer Lett.*, 88(2):227–236, 1995.
- [7] K Berg, PK Selbo, L Prasmickaite og A Høgset. Photochemical drug and gene delivery. *Curr Opin Mol Ther*, 6:279–287, 2004.
- [8] K Berg, PK Selbo, L Prasmickaite, TE Tjelle, K Sandvig, J Moan, G Gaudernack, Ø Fodstad, S Kjølrsrud, H Anholt, GH Rodal, SK Rodal og A Høgset. Photochemical internalization: A novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Research*, 59:1180–1183, 1999.
- [9] K Berg, PK Selbo, A Weyergang, A Dietze, L Prasmickaite, A Bonsted, BØ Engesaether, E Angell-Petersen, T Warloe, N Frandsen og A Høgset. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *J Microsc.*, 218:133–147, 2005.
- [10] MEB Berstad. Fotokjemisk internalisering (PCI) av HER2-rettet immunotoksin; trastuzumab-saporin. Hovedfagsoppgave, Universitet i Bergen; Galenisk farmasi, 2009.

- [11] KM Boatright og GS Salvesen. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.*, 15(6):725–31, 2003.
- [12] M Bostad. PCI av immuntoksin målrettet mot stamcellemarkøren CD133. Hovedfagsoppgave, Høgskolen i Oslo; Biomedisin, 2009.
- [13] L Brancalion og H Moseley. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Laser Med Sci*, 17:173–186, 2002.
- [14] A Brech, T Ahlquist, RA Lothe og H Stenmark. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Molecular oncology*, 3:366–375, 2009.
- [15] SB Brown, EA Brown og I Walker. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*, 5:497–508, 2004.
- [16] E Buytaert, M Dewaele og P Agostinis. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.*, 1776:86–107, 2007.
- [17] PG Calzavara-Pinton, M Venturini og R Sala. Photodynamic Therapy: Update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 21:293–302, 2007.
- [18] AP Castano, TN Demidova og MR Hamblin. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnoses and Photodynamic Therapy*, 1:279–293, 2004.
- [19] AP Castano, TN Demidova og MR Hamblin. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnoses and Photodynamic Therapy*, 2:91–106, 2005.
- [20] Y Cheng, F Qiu, SI Tashiro, S Onodera og T Ikejima. ERK and JNK mediate TNF $\alpha$ -induced p53 activation in apoptotic and autophagic O929 cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376:483–488, 2008.
- [21] DE Dolmans, D Fukumura og RK Jain. Photodynamic Therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3:380–387, 2003.
- [22] TJ Dougherty, CJ Gomer, BW Henderson, G Jori, D Kessel, M Korbelik, J Moan og Q Peng. Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90:889–905, 1998.
- [23] TJ Dougherty, GB Grindey, R Fiel, KR Weishaupt og DG Boyle. Photoradiation Therapy. ii. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst.*, 55:115–121, 1975.



- [24] MN Faraj. Cellesignalering etter pdt: Betydning av nekrose, apoptose og autofagi. Hovedfagsoppgave, Høgskolen i Oslo, 2009.
- [25] M Hamasaki og T Yoshimori. Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS Lett.*, 584:1296–1301, 2010.
- [26] BW Henderson og T Dougherty. How does Photodynamic Therapy work? *Photochem Photobiol.*, 55:145–157, 1992.
- [27] I Herr og KM Debatin. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98(9):2603–2614, 2001.
- [28] A Høgset, L Prasmickaite, PK Selbo, M Hellum, BØ Endesæter, A Bonsted og K Berg. Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56:95–115, 2004.
- [29] Internett. Denaturering av proteiner. <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/ET/et0703/et0703-fig-0001-1-full.gif>.
- [30] Internett. Enzchek caspase-3 assay kit # 1. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp13183.pdf>.
- [31] Internett. Fluorescensmikroskop. <http://www.scienceinyoureyes.com/index.php?id=79>.
- [32] Internett. Immunodeteksjon. <http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/immunodetection/wbProtocol.html>.
- [33] Internett. Indusering av autofagi. [http://www.nature.com/nri/journal/v7/n10/fig\\_tab/nri2161\\_F2.html](http://www.nature.com/nri/journal/v7/n10/fig_tab/nri2161_F2.html).
- [34] Internett. PCI Biotech. <http://www.pcibiotech.no/>.
- [35] Internett. SDS-PAGE bilde. [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html).
- [36] Internett. SDS-PAGE prinsipp. <http://www.iob.uio.no/forskning/celler/teknikk/WB.html>.
- [37] Internett. Snap i.d. <http://www.novaseptic.no/userguides/tech1/00103871>.
- [38] Internett. Transferkassett. <http://news.thomasnet.com/fullstory/Membrane-Sandwiches-make-western-blotting-easier-13151>.
- [39] HO Jin, SK Seo, SH woo, ES Kim, HC Lee, DH Yoo, TB Choe, SI Hong, JI Kim og IC Park. SP600125 negatively regulates the mammalian target of rapamycin via ATF4-induced Redd1 expression. *FEBS Letters*, 583:123–127, 2009.

- [40] CH Jung, SH Ro, J Cao, NM Otto og DH Kim. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584:1287–1295, 2010.
- [41] AC Kübler. Photodynamic Therapy. *Medical Laser Application*, 20:37–45, 2005.
- [42] D Kessel. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Letters*, 33(2):183–188, 1986.
- [43] D Kessel, MG Vicente og JJ Jr Reiners. Initiation of apoptosis and autophagy by Photodynamic Therapy. *Lasers Surg Med.*, 38:482–488, 2006.
- [44] DJ Klionsky. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:931–937, 2007.
- [45] M Kongshaug, J Moan og SB Brown. The distribution of porphyrins with different tumour localising ability among human plasma proteins. *Br J Cancer*, 59(2):184–188, 1989.
- [46] J Kralova, M Dvorak, M Koc og V Kral. p38 MAPK plays an essential role in apoptosis induced by photoactivation of a novel ethylene glycol porphyrin derivative. *Oncogene*, 27:3010–3020, 2008.
- [47] PS Lai, CL Pai, CL Peng, MJ Shieh, K Berg og PJ Lou. Enhanced cytotoxicity of saporin by polyamidoamine dendrimer conjugation and Photochemical Internalization. *J Biomed Mater Res A*, 87A:147–155, 2007.
- [48] B Lebleu. Delivering information-rich drugs - prospects and challenges. *Trends Biotechnol.*, 14(4):109–110, 1996.
- [49] B Levine og G Kroemer. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.*, 132(1):27–42, 2008.
- [50] DD Li, LL Wang, R Deng, J Tang, Y Shen, JF Guo, Y Wang, LP Xia, GK Feng, QQ Liu, WL Huang, YX Zeng og XF Zhu. The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene*, 28:886–898, 2009.
- [51] A Longatti og SA Tooze. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death and Differentiation*, 16:956–965, 2009.
- [52] IJ MacDonald og TJ Dougherty. Basic principles of Photodynamic Therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 5:105–129, 2001.
- [53] JA McCubrey, MM LaHair og RA Franklin. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP Kinase signaling pathways. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8:1775–1789, 2006.

- [54] J Moan og K Berg. The photodegradation of porphoryns in cells can be used to estimate the lifetime of singlett oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 53:549–553, 1991.
- [55] H Mojzisova, S Bonneau, P Maillard, K Berg og D Brault. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. *Photochem Photobiol Sci.*, 8(6):778–787, 2009.
- [56] C Moore. *Introduction to Western Blotting*. AbD SeroTec, 2009.
- [57] L Moretti, YI Cha, KJ Niemann og B Lu. Switch between apoptosis and autophagy. *Cell Cycle*, 6(7):793–798, 2007.
- [58] T Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55–63, 1983.
- [59] T Noda, N Fujita og T Yoshimori. The late stages of autophagy: How does the end begin? *Cell Death and Differentiation*, 16:984–990, 2009.
- [60] BB Noodt, K Berg, T Stokke, Q Peng og JM Nesland. Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. *British Journal of Cancer*, 79(1):72–81, 1999.
- [61] OJ Norum, JV Gaustad, E Angell-Petersen, EK Rofstad, Q Peng, KE Giercksky og K Berg. Photochemical Internalization of bleomycin is superior to Photodynamic Therapy due to the therapeutic effect in the tumor periphery. *Photochemistry Photobiology*, 85:740–749, 2009.
- [62] OJ Norum, PK Selbo, A Weyergang, KE Giercksky og K Berg. Photochemical Internalization (PCI) in cancer therapy: From bench towards bedside medicine. *J Photochem Photobiol B*, 96(2):83–92, 2009.
- [63] D Nowis, M Makowski, T Stoklosa, M Legat, T Issat og J Golab. Direct tumor damage mechanisms of Photodynamic Therapy. *Acta Biochim Pol*, 52:339–352, 2005.
- [64] ES Nyman og PH Hynninen. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J Photochem Photobiol B*, 73:1–28, 2004.
- [65] B Ortel, CR Shea og P Calzavara-Pinton. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Front Biosci*, 14:4157–4172, 2009.
- [66] Q Peng, J Moan og LS Cheng. The effect of glucose administration on the uptake of Photofrin II in a human tumor xenograft. *Cancer Letters*, 58(1-2):29–35, 1991.

- [67] K Plaetzer, T Kiesslich, T Verwanger og B Krammer. The modes of cell death induced by PDT: An overview. *Med. Laser Appl.*, 18:7–19, 2003.
- [68] L Prasmickaite, A Høgset, PK Selbo, BØ Engesæter, M Hellum og K Berg. Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 86:652–657, 2002.
- [69] GH Rodal, SK Rodal, J Moan og K Berg. Lysosomes-bound Zn(II)-phthalocyanine. mechanisms for cellular uptake and photosensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 45:150–159, 1998.
- [70] PK Selbo, A Høgset, L Prasmickaite og K Berg. Photochemical Internalisation: A novel drug delivery system. *TumorBiology*, 23:103–112, 2002.
- [71] S Sinha og B Levine. The autophagy effector beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene*, 27:S137–S148, 2009.
- [72] N Solban, I Rizvi og T Hasan. Targeted Photodynamic Therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38:522–531, 2006.
- [73] R Sroka, H Stepp og H van den Bergh. From the editors. *Med. Laser Appl.*, 18:5–6, 2003.
- [74] Z Tong, G Singh, K Valerie og AJ Rainbow. Activation of the stress-activated JNK and p38 map kinases in human cells by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 71:77–85, 2003.
- [75] JL Webber og SA Tooze. Coordinated regulation of autophagy by p38 $\alpha$  MAPK through matg9 and p38IP. *The EMBO Journal*, 29:27–40, 2010.
- [76] A Weyergang. Fotokjemisk internalisering av EGFR-rettete legemidler. *Norsk Farmaceutisk Tidsskrift*, 10:18–19, 2009.
- [77] A Weyergang, O Kaalhus og K Berg. Photodynamic therapy with an endocytically located photosensitizer cause a rapid activation of the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase, p38, and c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase with opposing effects on cell survival. *Mol Cancer Ther*, 7(6):1740–1750, 2008.
- [78] A Weyergang, PK Selbo og K Berg. Photochemically stimulated drug delivery increases the cytotoxicity and specificity of EGF-saporin. *Journal of Controlled Release*, 111:165–173, 2006.
- [79] A Weyergang, PK Selbo og K Berg. Y1068 phosphorylation is the most sensitive target of disulfonated tetraphenylporphyrin-based Photodynamic Therapy on epidermal growth factor receptor. *Biochem Pharmacol*, 74(2):226–235, 2007.

- [80] K Wilson og J Walker. *Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press, sixth edition utgave, 2005.
- [81] YC Wu, WKK Wu, Y Li, L Yu, ZJ Li, CCM Wong, HT Li, JJY Sung og CH Cho. Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A<sub>1</sub> lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382:451–456, 2009.
- [82] YT Wu, HL Tan, G Shul, C Bauvy, Q Huang, MR Wenk, CN Ong, P Codogno og HM Shen. Dual role of 3-methyladenine in modulation og autophagy via different temporal patterns of inhibition on Class I and III Phosphoinositide 2-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14):10850–10861, 2010.
- [83] WL Yip, A Weyergang, K Berg, HH Tønnesen og PK Selbo. Targeted delivery and enhanced cytotoxicity of cetuximab-saporin by Photochemical Internalization in EGFR-positive cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*, 4(2):241–251, 2006.
- [84] HY Yong, MS Koh og A Moon. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert Opin investig Drugs*, 18(12):1893–1905, 2009.

## A Appendiks

### A.1 Kjemikalier

Acrylamid/Bis solution	(BioRad, USA)
Ammonium persulfate	(BioRad, USA)
Antibiotikafritt skummetmelkpulver	(TMØ Brumundal, Norge)
Benzonase	(Merck, Tyskland)
Bovine serum albumin, BSA	(Sigma-Aldrich, USA)
Dimethyl sulfoxide, DMSO	(Sigma-Aldrich, USA)
Eddiksyre	(Merck, Tyskland)
Føtalt kalveserum, FCS	(Fisher Scientific, USA)
Glycin	(BioRad, USA)
LumiGlo	(KPL, USA)
Metanol	(Sigma-Aldrich, USA)
MTT-assay	(Sigma-Aldrich, USA)
Natriumfluorid, NaF	(Sigma-Aldrich, USA)
Phosphate buffered saline, PBS	(Sigma-Aldrich, USA)
Penicillin-streptomycin	(Sigma-Aldrich, USA)
Phosphatase inhibitor cocktail I	(Sigma-Aldrich, USA)
Phosphatase inhibitor cocktail II	(Sigma-Aldrich, USA)
Ponceau S	(Sigma-Aldrich, USA)
Protease inhibitor cocktail	(Sigma-Aldrich, USA)
RPMI 1640 medium	(Sigma-Aldrich, USA)
Saporin	(Sigma-Aldrich, USA)
SB203580, p38 inhibitor	(Sigma-Aldrich, USA)
Sodium dodecyl sulfate, SDS	(BioRad, USA)
SP600125, JNK inhibitor	(CalBiochem, USA)
TEMED	(BioRad, USA)
TPCS <sub>2a</sub>	(PCI Biotech, Norge)
Trisbase	(Sigma-Aldrich, USA)
Trizma-HCl	(Sigma-Aldrich, USA)
Trypsin-EDTA	(Sigma-Aldrich, USA)
3-methyladenin	(Sigma-Aldrich, USA)

**A.2 Leverandører**

AGFA Healthcare	Belgia
American Type Culture Collection	USA
Amersham Biosciences	Storbritannia
Bio-Rad Laboratories	USA
BioTek	USA
Calbiochem	Storbritannia
Cell Signaling Technology	USA
Fisher Scientific	USA
GE Healthcare	Sverige
HYCOR	USA
KPL	USA
Merck	tyskland
Millipore	USA
Nunclon	Danmark
PCI Biotech	Norge
Pierce Biotechnology	USA
TMØ Brumumundal	Norge
Zeiss	Tyskland

**A.3 Løsninger****APS 10 %**

APS	0,2 g
Aqua pure	2 mL

*Oppbevares ved 4 °C*

**BSA 5 %**

BSA	5 g
1x TTBS	100 mL

*Oppbevares ved -20 °C*

**Coomassie Brilliant Blue 0,1 %**

Metanol CP	50 %
Eddiksyre	10 %
Coomassie Brilliant Blue	0,1 %
Aqua pure	fortynnet til 1 L

*Oppbevares ved romtemperatur*

**Avfargingsløsning**

Metanol	40 %
Eddiksyre	10 %
Aqua pure	fortynnet til 1L

*Oppbevares ved romtemperatur*

**Lyseringsløsning**

6,2 mM Tris-HCl pH 6,8	12,5 mL
30 % w/v SDS	6,6 mL
100 % Glycerol	10 mL
DTT	0,77 g
1 % Bromphenylblue	1 mL
Aqua pure	fortynnet til 1 L

*Oppbevares ved 4 °C og lysbeskyttet*



**Lyseringsbuffer (1 mL)**


---

Lyseringsstock	945 $\mu\text{L}$
Protease inhibitor cocktail	10 $\mu\text{L}$
Phosphatase inhibitor cocktail I	10 $\mu\text{L}$
Phosphatase inhibitor cocktail II	10 $\mu\text{L}$
2 M $\beta$ -Glycerol phosphate	10 $\mu\text{L}$
$\text{Na}_2\text{VO}_4$	5 $\mu\text{L}$
200 mM PMSF	5 $\mu\text{L}$
200 mM NaF	5 $\mu\text{L}$

---

*Oppbevares på is***MTT 5 mg/mL**


---

MTT	250 mg
1x PBS	50 mL

---

*Oppbevares ved 4°C og lysbeskyttet***Ponceau S**


---

Eddiksyre	5 %
Ponceau S	0,1 %
Aqua pure	fortynnet til 50 mL

---

*Oppbevares ved romtemperatur***Separerende gel 12 %**


---

Aqua pure	4,35 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL
10 % w/v SDS stock	0,1 mL
40 % Acrylamide/bis	3 mL
10 % APS	50 $\mu\text{L}$
TEMED	5 $\mu\text{L}$

---

*Polymeriseres i romtemperatur*

**Stacking gel**


---

Aqua pure	3,2 mL
1,5 M Trizma-HCl pH 8,8	1,25 mL
10 % w/v SDS stock	50 $\mu$ L
40 % Acrylamide/bis	0,5 mL
10 % APS	25 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L

---

*Polymeriseres i romtemperatur***10x TBS pH 7,6**


---

Trisbase	12,11 g
NaCl	87,66 g NaCl
Aqua pure	fortynnet til 1 L

---

*Oppbevares i romtemperatur***1x TTBS**


---

10x TBS	100 mL
Aqua pure	900 mL
100 % Tween 20	1 mL

---

*Oppbevares i romtemperatur***10x Runningbuffer pH 8,3**


---

Trisbase	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
Aqua pure	fortynnet til 1 L

---

*Oppbevares i romtemperatur***1x Runningbuffer**


---

10x Runningbuffer	100 mL
Aqua pure	100 mL

---

*Oppbevares i romtemperatur*

**3-methyladenin 80 mM**

---

3-methyladenin	120 mg
NaCl	60 mg
1 M HCl	50 $\mu$ L
Aqua pure	10 mL

---

*Oppbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$*