



# **Cellesignalering etter PDT: Betydning av nekrose, apoptose og autofagi**

av

**Maalim Najmuddin Faraj**

**Master i biomedisin**

**Avdeling for helsefag**

Masteroppgave, 60 studiepoeng, utført ved Radiumhospitalet og HiO

20. mai 2009



Avdeling for Strålingsbiologi  
**RADIUMHOSPITALET**





## FORORD

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for strålingsbiologi, Radiumhospitalet i perioden august 2008 – mai 2009.

Jeg vil først og fremst takke min veileder Dr. Kristian Berg, gruppeledere i PCI gruppen, for at jeg fikk lov til å utføre oppgaven i hans gruppe. Jeg takker han for hans ukentlige veiledning samt hans optimisme for mine resultater. Jeg vil også takke for all den tiden han har brukt på lesing av oppgaven

Jeg vil også rette en takk til Dr. Anette Weyergang som presenterte meg for oppgaven og som har vist engasjement for mitt arbeid samt oppmuntret meg gjennom denne prosessen.

Videre vil jeg rette en stor takk til Marie-Therese Strand for opplæring på lab og Dr. Pål Kristian Selbo for teknisk hjelp. Susan Shazidi fortjener også en takk for hjelp med Jurkat cellene.

Jeg vil også takke familien min, spesielt min mor for hennes stadige oppmuntring i den vanskelige avsluttende tiden. Mannen min skal ha stor takk for en særdeles enestående tålmodighet og støtte. Jeg vil også benytte sjansen til å takke min bror for hans generelle interesse for oppgaven.

Til slutt vil jeg takke alle som jobber i PCI gruppen for et flott år.

Radiumhospitalet, Oslo 20. Mai 2009

Maalim Najmuddin Faraj



# **INNHold**

FORKORTELSER .....	9
SAMMENGRAG .....	10
ABSTRACT .....	11
1. INNLEDNING .....	12
1.1. Fotodynamisk behandling (PDT).....	12
1.1.1. Fotokjemiske reaksjoner .....	13
1.1.1.1. Type I og type II fotokjemisk reaksjoner .....	14
1.1.2. FOTOSENSITIZERE .....	15
1.1.2.1. Godkjente fotosensitizere i Norge .....	18
1.2. Terapeutiske effekter av PDT .....	18
1.3. PDT induisert celledød .....	19
1.3.1. PDT induisert nekrose .....	20
1.3.2. PDT induisert apoptose.....	21
1.3.2.1. Dødsreseptor mediert apoptose induisert av PDT.....	23
1.3.2.2. Mitokondrie mediert apoptose induisert av PDT .....	23
1.3.3. Apoptose initiert etter lysosomale skader .....	24
1.3.4. PDT induisert autofagi.....	26
1.4. Fotokjemisk internalisering (PCI).....	27
1.4.1 Saporin.....	28
2. HENSIKT MED OPPGAVEN.....	29
3. MATERIALER OG METODER .....	30
3.1. Cellelinje.....	30
3.2. Telling av celler til forsøk .....	30
3.3. Prosedyre for behandling med PDT og PCI .....	31
3.3.1. Lyskilde .....	31
3.4. Detektering av toksisitet med MTT-assay.....	31

3.5. Fluorescens mikroskopi .....	32
3.6. SDS-PAGE .....	34
3.6.1. Isolering av celleekstrakter for kromatografisk analyse .....	36
3.6.2. Måling av DNA .....	36
3.6.3. Gelkjøring .....	37
3.7. Western Blot og immunoblotting .....	39
3.7.1. Western blot .....	39
3.7.2. Immunoblotting .....	40
3.7.3. Detektering av proteiner .....	41
3.7.4. Loading kontroll .....	41
3.7.4.1. Aktin .....	41
3.7.4.2. Ponceau S farging .....	42
3.8. Caspase-3 aktivitet .....	42
3.9. Deteksjon av Nekrose .....	44
3.10. Deteksjon av apoptose .....	45
3.10.1. Morfologisk deteksjon av apoptose .....	45
3.10.2. Deteksjon av apoptose via Western blot .....	46
3.11. Deteksjon av autofagi .....	47
4. RESULTATER .....	48
4.1. Tetthetskurver av ZR-75-1 i 6- og 96-brønnersbrett .....	48
4.2. Lokalisering av TPCS <sub>2a</sub> .....	49
4.3. PDT og PCI-behandling .....	51
4.3.1 Cellulær overlevelse etter PCI- og PDT-behandling .....	51
4.3.2 Cellulær overlevelse etter PCI med forskjellige saporin konsentrasjoner .....	52
4.3.3 Saporin toksisitet .....	53
4.4. PDT induisert nekrose .....	54

4.4.1. Cellulær overlevelse etter behandling med PDT, med og uten vask .....	56
4.4.2. Undersøkelse av primær og sekundær nekrose.....	57
4.5 PDT induisert apoptose .....	58
4.5.1. Kjernekonkondensering i Jurkat celler etter CPT behandling .....	58
4.5.2 Mikroskopering av apoptotiske celler.....	60
4.5.3. Western blot analyse av PARP for bestemmelse av apoptose.....	61
4.5.4. Caspase-3 aktiviteten i PDT behandlede celler .....	63
4.6. PDT induisert Autofagi .....	64
5. DISKUSJON .....	66
5.1. Sammenligning av PDT og PCI behandlingen.....	66
5.2. Intracellulær lokaliseringen av TPCS <sub>2a</sub> er av betydning for celledøden	67
5.3. TPCS <sub>2a</sub> -PDT induserer nekrose i liten grad.....	68
5.4. TPCS <sub>2a</sub> -PDT induserer apoptose .....	69
5.5. TPCS <sub>2a</sub> -PDT induisert autofagi.....	71
5.6. Fordeler og ulemper med de forskjellige celledødsmechanismene.....	72
6. KONKLUSJONER .....	73
REFERANSER.....	74
VEDLEGG .....	79



## FORKORTELSER

$^1\text{O}_2$	Oksygen i singlett tilstand
AGT	Autofagi-spesifikk genene
ATP	Adenosintrifosfat
BP	Dichronic beam (lyssplittende speil)
BSA	Bovine serum albumin
CPT	Camptothecin
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann
DMSO	Dimetyl sulfoxide
EDTA	Etylenediaminetetraacetate
FCS	Føtalt kalve serum
FT	Eksitasjonsfilter
HRP	Horse radish peroksidase
kDa	Kilo Dalton
LC3	Light chain 3
LDL	Low density lipoprotein
LP	Long pass filter (emisjonsfilter)
MTT	3-[4,5-dimetylthiazol-2-y]-2,5 difenyltetrazolium bromide
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffer saline
Pc 4	Silicon phthalocyanine
PCI	Fotokjemisk internalisering
PDT	Fotodynamisk terapi
PI	Propidium Jodid
RIPs	Ribosominaktiverende protein
ROS	Reaktive oksygen forbindelser
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamid-gelelektroforese
TNF	Tumor nekrose faktor
TPCS <sub>2a</sub>	Disulfated tetraphenyl chlorin
TPPS <sub>2a</sub>	Meso-tetrafenylporfin med to sulfonatgrupper på tilgrensede fenyrlinger

## SAMMENGRAG

**Bakgrunn:** Begrensningene med mange av dagens kreftbehandling er mangel på selektivitet (Abraham and Altaha 2007). Fotodynamisk terapi (PDT) er en relativ ny behandlingsalternativ innen kreftbehandling (Ortel et al. 2009). Lysaktiverbare forbindelser (fotosensitizerer), synlig lys og oksygen er de viktigste komponentene i PDT. PDT medierer dannelse av reaktiv oksygen forbindelser (ROS) som induserer celledød ved nekrose, apoptose og autofagi avhengig av flere faktorer blant dem lokaliseringen av fotosensitizeren intracellulært. Lite skade oppstår på normalt vev grunnet høy akkumulering av fotosensitizer i tumor etterfulgt av begrensende lyseksponering til behandlingsområde.

En annen ny metode under utvikling er fotokjemisk internalisering (PCI) (Selbo et al. 2002). Metoden benyttes til å levere makromolekyler som proteiner, DNA og RNA. Makromolekylet lokaliseres i endosomer/lysosomer med fotosensitizerene bundet til membranen. Belysning av fotosensitizeren danner ROS som resulterer i ruptur på endosomale/lysosomale membraner. Som et resultat av dette blir makromolekylet frigjort til cytosol hvor den kan utøve ønsket effekt.

**Hensikt:** I denne oppgaven var hovedmålet å studere mekanismer som er involvert i PDT induisert celledød med særlig hensyn til nekrose, apoptose og autofagi. Kunnskapen kan brukes til blant annet å optimalisere PCI med spesielt hensyn til hvilke type makromolekyl som skal gis.

**Metode:** Metodene som ble benyttet er PDT/PCI behandling av ZR-75-1, med fotosensitizeren TPCS<sub>2a</sub> samt fluorescensmikroskopi, fluorescensmålinger, SDS-PAGE, Western blot og MTT-assay til måling av celleviabilitet.

**Resultater:** PDT og PCI induiserte cytotoxiske effekter i ZR-75-1 cellene målt som redusert viabilitet. PCI av saporin var mer effektiv enn PDT da den ga celledød ved lavere lysdoser i forhold til PDT. Nekrose ble induisert i liten grad etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT. Apoptoseassosiert caspase-3 aktivitet, PARP kløving og kjernekondensering ble observert etter PDT. I tillegg ble autofagiassosiert LC3B-II transformasjon observert. Både apoptose og autofagi ble induisert avhengig av lysdoser og tiden etter PDT.

**Konklusjon:** TPCS<sub>2a</sub>-PDT induserer i liten grad nekrose i ZR-75-1 cellene. Både apoptose og autofagi blir derimot induisert etter PDT i ZR-75-1 cellene. Immunrespons forårsaket av nekrose kan forventes å være av mindre betydning etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT.

## ABSTRACT

**Background:** One of the problems in cancer therapy today is lack of selectivity (Abraham and Altaha 2007). Photodynamic therapy (PDT) is a relatively new alternative in cancer therapy (Ortel et al. 2009). The process of cell destruction is induced by a light activated compound (photosensitizer) and oxygen after visible light exposure. The light exposure induces formation of reactive oxygen species (ROS). PDT treated cells has been shown to induce necrosis, apoptosis and autophagy. Normal cells are damaged in to a lesser degree due to the photosensitizers high accumulation in tumor and limitation of the treated area by exposing only the tumor area to light.

Another novel cancer treatment under development is photochemical internalization (PCI) (Selbo et al. 2002). The principle of this method is to enhance the delivery of macromolecules such as proteins, DNA and RNA to the cells. The macromolecules are located in the membranes of endosomes/lysosomes. The ROS mediate rupture of these membranes after light exposure and the macromolecules are released into the cytosol where they have access to their targets.

**Purpose:** In this thesis the mechanisms involved in PDT induced cell death was investigated, mainly necrosis, apoptosis and autophagy. This knowledge is used to optimize PCI by using the type of macromolecule that can optimize the therapeutic outcome.

**Method:** PDT and PCI treatment of ZR-75-1 cells with TPCS<sub>2a</sub> as the photosensitizer was the primary method utilized in this study. The MTT-assay was used to investigate the cell viability after these treatments. To investigate the mechanism of PDT induced cell death spectrofluorometry, fluorescence microscopy, SDS-PAGE and Western blot were used.

**Results:** A decrease in cell viability after PDT and PCI was observed. PCI showed a greater effect at a lower light dose compared with PDT. Necrosis was induced in a less degree after TPCS<sub>2a</sub>-PDT in ZR-75-1 cells. Apoptosis associated caspase-3 activity, PARP cleavage and nuclear condensation was observed after PDT. In addition autophagy associated LC3B-II formation was observed. Both apoptosis and autophagy was induced in a light dose-dependent manner as well for the time after PDT.

**Conclusion:** TPCS<sub>2a</sub>-PDT induced necrosis to a low extent in the ZR-75-1 cells. Both apoptosis and autophagy where on the other hand induced after PDT. The immunoresponse associated with necrosis may be absent after PDT.

# 1. INNLEDNING

## *1.1. Fotodynamisk behandling (PDT)*

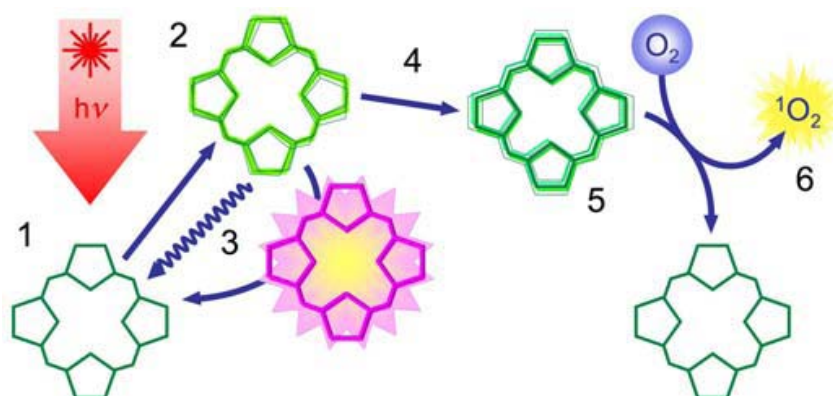
Behandlingsmetodene benyttet mot kreft i dag er mange (Abraham and Altaha 2007). Kirurgi, stråleterapi og kjemoterapi er blant de viktigste. Disse behandlingsmetodene utnytter kreftcellenes spesielle egenskaper blant dem lav pH og rask celledeling. Ofte har disse behandlingsmetodene også virkning på normale celler. Derfor har spesifisitet mot kreftcellene vært et fokus ved utvikling av nye behandlingsmetoder.

Fotodynamisk terapi (PDT) er en relativ ny og selektiv metode som benyttes til å eliminere kreftceller (Dolmans et al. 2003). Synlig lys, fotosensiterende forbindelser og oksygen er hovedkomponentene i PDT (Almeida et al. 2004; Dolmans et al. 2003). En fotosensiterende forbindelse (eller lysaktiverbar forbindelse, forkortet fotosensitizer) er et molekyl som blir eksitert av lys ved en bestemt bølgelengde. Sammen med lyset og nærliggende oksygen står fotosensitizeren for fotoreaksjoner som ender med å skade cellene ved å danne reaktive oksygen forbindelser. Selektivitetsproblematikken ved kreftbehandling har vært liten innen PDT da den har vist seg å være dobbelt selektivt ved at fotosensitizerer i høyere grad akkumuleres i tumor og at belysningen begrenses til målområde.

Midten av 1970-årene ble et vendepunkt for PDT da de første kliniske forsøkene startet (Dolmans et al. 2003). Blære- og hudkreft var de første krefttypene som fikk initiert PDT behandling i et klinisk forsøk. Etter dette har både svulster i lunge, spiserør og magen blitt behandlet med PDT hvor resultatene har vært lovende. Også andre type tumorer er blitt undersøkt, men der har behandlingsresultatene vært begrenset. Foscan-PDT er godkjent mot hode og nakke tumorer. PDT har også blitt godkjent og mye brukt ved non-melanoma hudkreft (basal celle karcinom, aktinisk keratose og Bowens sykdom) (Ericson et al. 2008).

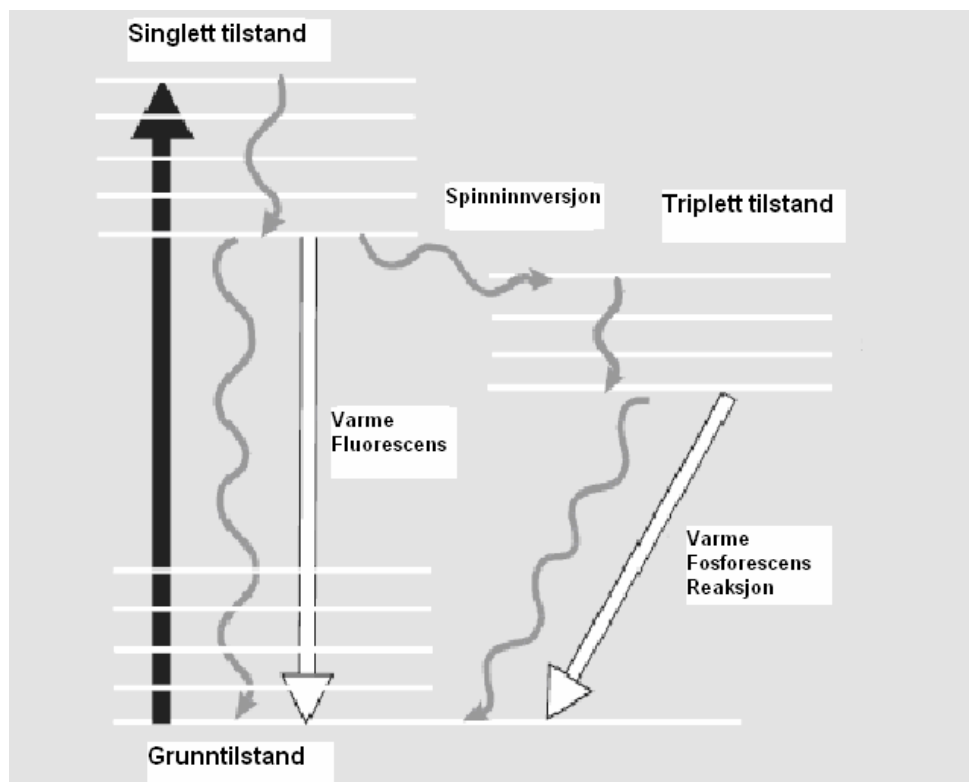
### 1.1.1. Fotokjemiske reaksjoner

Fotosensitizerer er kjemiske forbindelser som etter lysabsorpsjon kan forandre andre kjemiske forbindelser enten kjemisk eller fysisk (Berg et al. 2005). Fotosensitizerens evne til å forandre andre forbindelser kommer av fotokjemiske reaksjoner som danner reaktive oksygen forbindelser (ROS, Reactive oxygen species), der singlett oksygen er den viktigste formen i PDT.



Figur 1.1. En forenklet illustrasjon av eksitering av en fotosensitizer og veien tilbake til grunntilstand (Ortel et al. 2009).

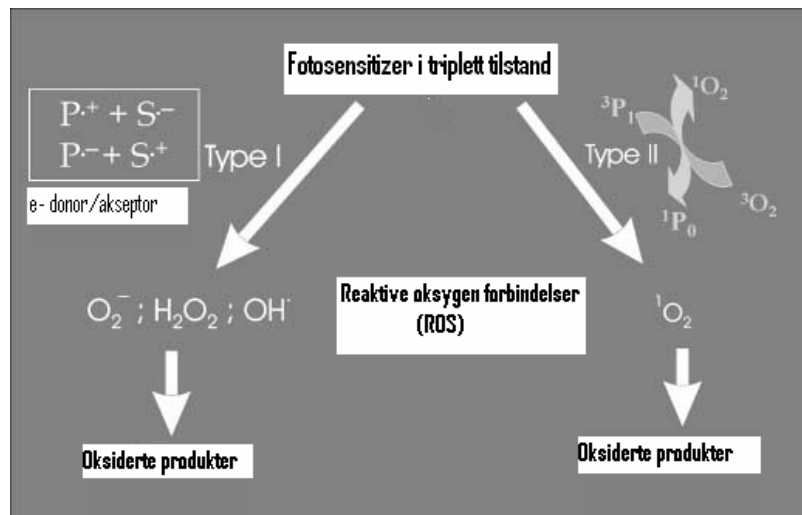
Ved absorpsjon av lys vil en fotosensitizer eksitere et elektron og gå over til en tilstand med høyere energi nivå, kalt singlett tilstand (Figur 1.2) (Dolmans et al. 2003). Fotosensitizerens singlett tilstand (2 i Figur 1.1) er kortlivet (nanosekunds nivå) og det skjer derfor lite fra denne tilstanden. Energien i singlett tilstanden kan avgis som varme, fluorescens (3 i Figur 1.1) eller gjennomgå spinninversjon (intersystem crossing) til triplett-tilstand (4 i Figur 1.1). Triplett-tilstand er også en reaktiv tilstand, men mer stabil enn singlett-tilstand (mikrosekunds nivå). Fotosensitizerer i triplett-tilstand kan på vei tilbake til grunntilstand (5 i figur 1.1) frigi energien som varme/fosforescens eller alternativt reagere med andre nærliggende kjemiske forbindelser og oksidere disse. En fotosensitizer kan gi to forskjellige fotokjemiske reaksjoner, type I eller type II, som vil bli beskrevet nedenfor.



Figur 1.2. Jablonski diagram viser fotosensitizerens eksitasjon fra grunntilstand til singlett tilstand. Derfra kan fotosensitizeren enten gå tilbake til grunntilstand ved å avgi energi i form av varme eller fluorescens. Alternativt kan fotosensitizeren gjennomgå en spinninversjon over til triplett tilstand. Tilbake fra triplett tilstand vil energien enten avgis som varme/fosforescens eller overføres til substrater og danne ROS enten via type I eller type II fotoreaksjoner (Berg et al. 2005).

#### 1.1.1.1. Type I og type II fotokjemisk reaksjoner

Ved type I fotokjemisk reaksjon reagerer fotosensitizeren i triplett tilstand direkte med bromolekyler i for eksempel cellemembraner eller andre organeller i cellen (Dolmans et al. 2003; Moor 2000). Fotosensitizeren vil overføre enten et hydrogen atom eller et elektron til substratet og gi produkter med elektronoverskudd eller -underskudd (Figur 1.3). De dannede produktene reagerer med oksygen og gir oksygenradikaler som gir cellen oksidative skader.



Figur 1.3. Type I og Type II fotokjemiske reaksjoner oppstår når fotosensitizeren går tilbake til grunntilstand ( $^1P_0$ ) etter eksitering. Ved type I fotokjemisk reaksjon reagerer fotosensitizeren i triplett tilstand ( $^3P_1$ ) direkte med et substrat som ved å reagere med oksygen danner reaktive oksygen forbindelser (ROS). Ved type II fotokjemisk reaksjon reagerer fotosensitizeren med oksygen i grunntilstand ( $^3O_2$ ) og resulterer i dannelsen av singlett oksygen ( $^1O_2$ ) (Berg et al. 2005).

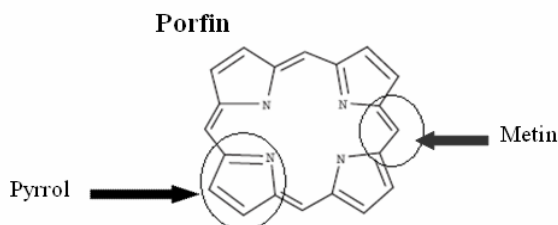
Under type II fotokjemiske reaksjoner derimot reagerer fotosensitizeren i triplett-tilstand ved å overføre dets energi direkte til oksygen (Dolmans et al. 2003). Oksygen vil i sin tur gå fra grunntilstand,  $O_2$ , over til singlett tilstand (singlett oksygen,  $^1O_2$ ) som er meget reaktiv (Figur 1.3). Singlett oksygen vil hovedsakelig gi membran skader ved å oksidere aminosyrer, umettede fettsyrer og kolesterol. I tillegg kan guanin bli oksidert (Berg et al. 2005).

Hvilke type fotokjemiske reaksjoner som oppstår er avhengig av ratio mellom flere prosesser som type fotosensitizer, konsentrasjon av substrater og oksygen, bindingsaffinitet mellom fotosensitizer og substrat (Dolmans et al. 2003).

### 1.1.2. Fotosensitizere

De fleste fotosensitizere (med noen unntak) er basert på tetrapyrrole makrosykler (Berg et al. 2005; Dolmans et al. 2003). Disse kjemiske forbindelser består av fire pyrrol enheter knyttet sammen med fire metin broer til en syklisk konfigurasjon. En

felles betegnelse for disse tetrapyrrol ringene er porfin (Figur 1.4), der derivatene kalles porfyriner.



Figur 1.4. Struktur for porfin og dets karakteristik (Berg et al. 2005).

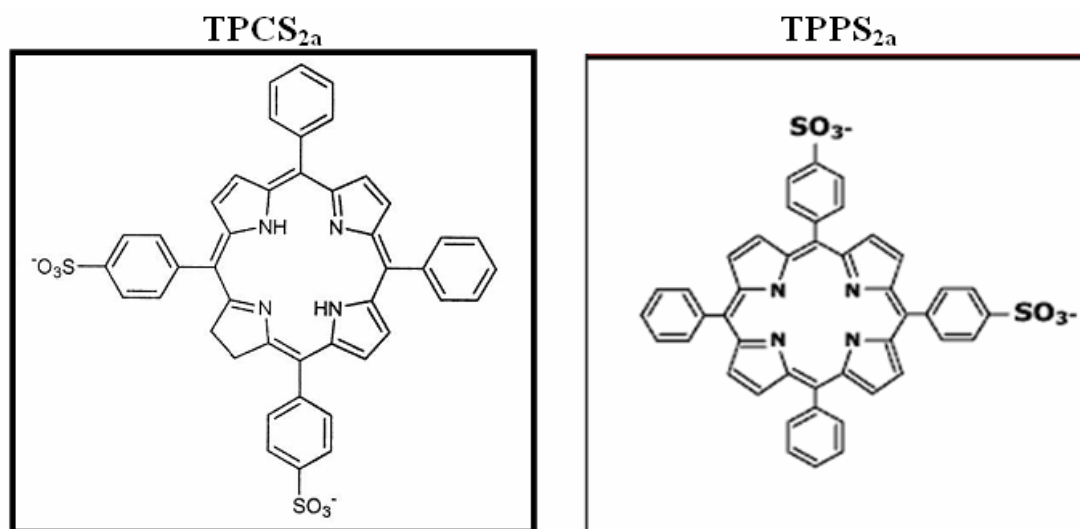
Fotosensitizerer er godt egnet både for terapeutisk og diagnostisk bruk på grunn av den høye akkumuleringen i tumorvev i forhold til normale vev (Berg et al. 2005; Zhou 1989). *In vivo* har forskjellige porfyrinbaserte fotosensitizerer vist lokalisering i høyere grad i tumorvev enn i annet normalt vev der ratio forandres med forskjellige fotosensitizerer (el-Far and Pimstone 1986). Den preferentielle akkumuleringen i tumor synes å ha mange årsaker knyttet til egenskaper i kreftvev som høy andel av LDL reseptorer, lav pH og høy kollagen mengde i omgivelsen, redusert lymfatisk drenering og lekkende vaskulatur (Berg et al. 2005).

Singlett oksygen er mest effektiv (mer stabil) i hydrofobe omgivelser (Ian J. Macdonald and Thomas J. Dougherty 2001). Hydrofile fotosensitizerer er derfor lite egnet bortsett fra behandlinger rettet mot vaskulaturen. De mest effektive fotosensitizerer for PDT er enten hydrofobe eller amfifile da de legger seg i membranen.

Amfifile fotosensitizerer er betegnelsen på fotosensitizerer med både hydrofile og delvis hydrofobe egenskaper (Ian J. Macdonald and Thomas J. Dougherty 2001). Disse fotosensitizerer er mer fotodynamisk aktive enn de hydrofile fotosensitizerer. Den hydrofobe delen av fotosensitizeren vil lokaliseres inn i membranen, mens den

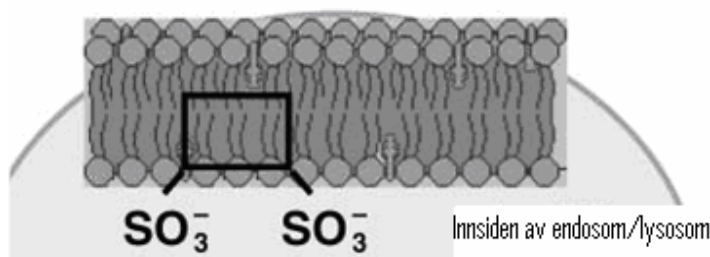


hydrofile delen vil lokaliseres mot den hydrofile fasen (Hogset et al. 2002; Ian J. Macdonald and Thomas J. Dougherty 2001). Amfifilisiteten hemmer også gjennomtrengning av membraner (Berg et al. 2005). På grunn av den korte levetiden til singlett oksygen (0,01-0,04  $\mu$ s) og den korte diffusjons lengden (10-20 nm) vil skade dannes i membranen nær fotosensitizeren.



Figur 1.5. Strukturene til TPPS<sub>2a</sub> og TPCS<sub>2a</sub>. TPCS<sub>2a</sub> har en redusert dobbeltbinding i en av tetrapyrrolringene og foreligger derfor som tre isomerer hvor 1 er vist i figuren.

Fotosensitizeren som brukes i våre forsøk er TPCS<sub>2a</sub> (disulfonated tetraphenyl chlorin) og tilhører porfyrin gruppen. TPCS<sub>2a</sub> er ganske lik TPPS<sub>2a</sub> (mesotetraphenylporphine) som er et amfifilt fotosensitizer (Figur 1.5). Den lokaliseres hovedsakelig i endocytiske membraner og lysosomer (de Bruin et al. 2008; Weyergang et al. 2007). Figur 1.6 illustrerer antatt lokalisering av disse i endocytiske- og lysosomale membraner der de hydrofile sulfonat gruppene peker ut i hydrofile omgivelser, mens den hydrofobe delen er integrert i den lipofile delen av membranen.



Figur 1.6. Lokalisering av TPPS<sub>2a</sub> (og mulig TPCS<sub>2a</sub>) på endosomale/lysosomale membraner (Berg et al. 2005).

#### *1.1.2.1. Godkjente fotosensitizere i Norge*

Foreløpig har to fotosensitizere til bruk ved fotodynamisk terapi fått markedsføringstillatelse i Norge: Metylaminolevulinat (Metvix) (Metvix 2009) og temoporfin (Foscan) (Foscan 2009). Begge fotosensitizerne er porfirinderivater som brukes hovedsakelig dersom annet behandling ikke er egnet.

#### **1.2. Terapeutiske effekter av PDT**

PDT har vist seg i flere studier å være effektivt ved behandling av kreft (Dolmans et al. 2003; Zhou 1989). Den terapeutiske effekten av PDT kommer av tre forskjellige mekanismer. Direkte drap av tumorcellene generert via ROS er en av disse mekanismene. Dette er blitt demonstrert blant annet av Tian et al. i dyr implantert med tumorceller (Tian et al. 2006). Volum av tumor ble signifikant redusert som et resultat av drap på tumorceller i de PDT behandlede dyrene.

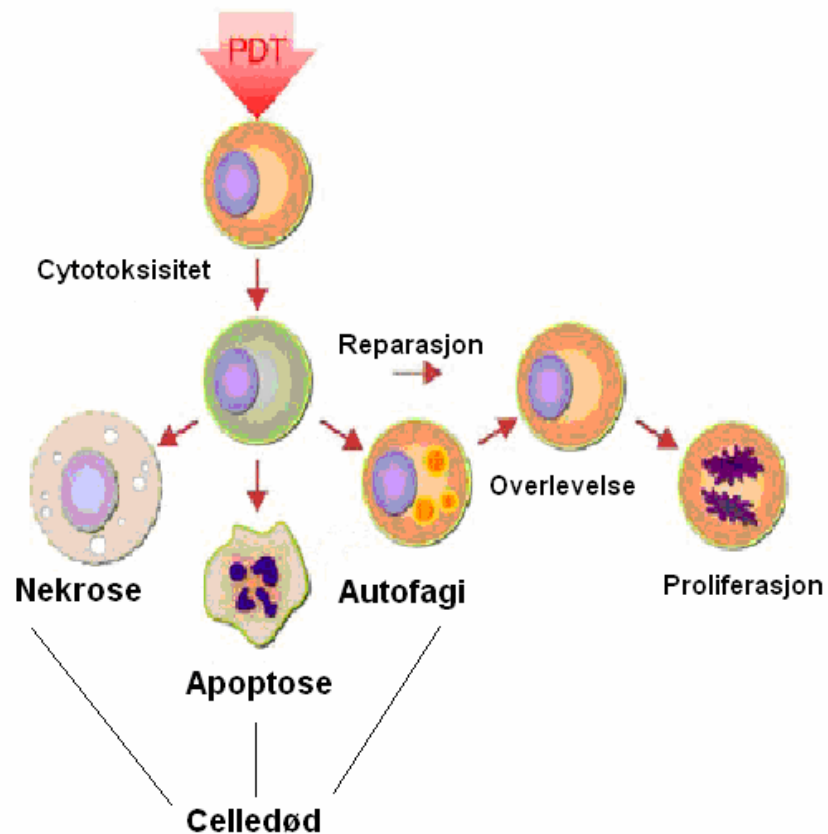
Lim et al. observerte i tillegg til direkte celledrap skade på tumor vaskulaturen i dyr etter PDT behandling (Lim et al. 2006). Balansen mellom tumor vaskulær skade og direkte skade på tumor avhenger av tiden mellom injisering av fotosensitizeren og belsningen. Kortere tid mellom injeksjon og belsning ga vaskulær skade i høyere grad da fotosensitizeren fortsatt befant seg i vaskulaturen. Skaden på tumorassosiert

vaskulatur resulterte i mangel på næring og oksygen i tillegg til vaskulær kontraksjon og trombose dannelse (Dolmans et al. 2003).

Immunrespons mot tumor cellene innbefattes i den terapeutiske effekten av PDT (van Duijnhoven et al. 2003). I PDT behandlede dyr implantert med samme tumormodell har det i mange tilfeller ikke ført til oppvekst av tumor. En ytterligere aktivering av antigenpresenterende celler som stimulerte T-celle produksjon ble observert (Gollnick et al. 2006).

### ***1.3. PDT induisert celledød***

Direkte celledrap er en av de viktigste terapeutiske effektene av PDT. Det finnes ulike måter en celle kan dø på som nekrose, apoptose og autofagi (Edinger and Thompson 2004). Apoptose er en programmert celledød i motsetning til nekrose som blant annet kan skyldes direkte skade på plasmamembranen som resulterer i ukontrollert ionefluks over plasmamembranen. Autofagi oppstår først og fremst for å redde den skadede cellen. I tilfeller hvor skaden er alt for stor til å kunne redde cellen vil autofagi resultere i celledrap. I motsetning til nekrose vil apoptose og autofagi i mindre grad føre til inflammasjon. PDT har vist å inducere alle disse formene for celledød (Figur 1.7) (Ortel et al. 2009).



Figur 1.7. PDT induisert celledød via nekrose, apoptose og autofagi. Etter PDT behandling kan tumor cellene død enten via nekrose, apoptose eller autofagi. I noen tilfeller hvor PDT har forårsaket mindre vesentlige skader på cellen vil autofagi føre til overlevelse av cellen og videre proliferasjon (Ortel et al. 2009).

### 1.3.1. PDT induisert nekrose

Nekrose oppstår ved ATP nedgang på nivå hvor det vil være umulig for en celle å overleve (Edinger and Thompson 2004). Nekrose karakteriseres av cytoplasma tømning, plasmamembranens sammenbrudd/ødeleggelse og inflammasjonsinduksjon rundt den døende cellen. Kjerne morfologien blir også forandret under nekrose på en uorganisert måte. Svelling av celle-organeller, mitokondriell dysfunksjon og oksidativ stress er knyttet til og observert ved nekrose (Degterev and Yuan 2008).

PDT induisert nekrose *in vivo* og *in vitro* skiller seg fra hverandre (Zhou 1989).

Nekrose induisert *in vivo* kommer primært av to faktorer. Den ene skyldes en

sekundær respons på skade PDT initierer på tumor vaskulaturen som fører til anoksi (oksygenmangel) av tumor og ender i tumor nekrose. Derimot skyldes den andre faktoren lokaliseringen av fotosensitizeren (Ahn et al. 2004). Fotosensitizere lokalisert på plasmemembranen vil både *in vivo* og *in vitro* resultere i PDT induisert nekrose da skaden fra ROS vil oppstå der fotosensitizeren er lokalisert. Fotosensitizere som angis å være lokalisert i lysosomer har også initiert nekrose i større grad enn apoptose *in vitro* (Copley et al. 2008). Golgi apparat-lokaliserende fotosensitizere er rapportert å også lede til nekrotisk celledød (Fabris et al. 2001). Balansen mellom initieringen av nekrose og apoptose avhenger av ATP nivået i cellen.

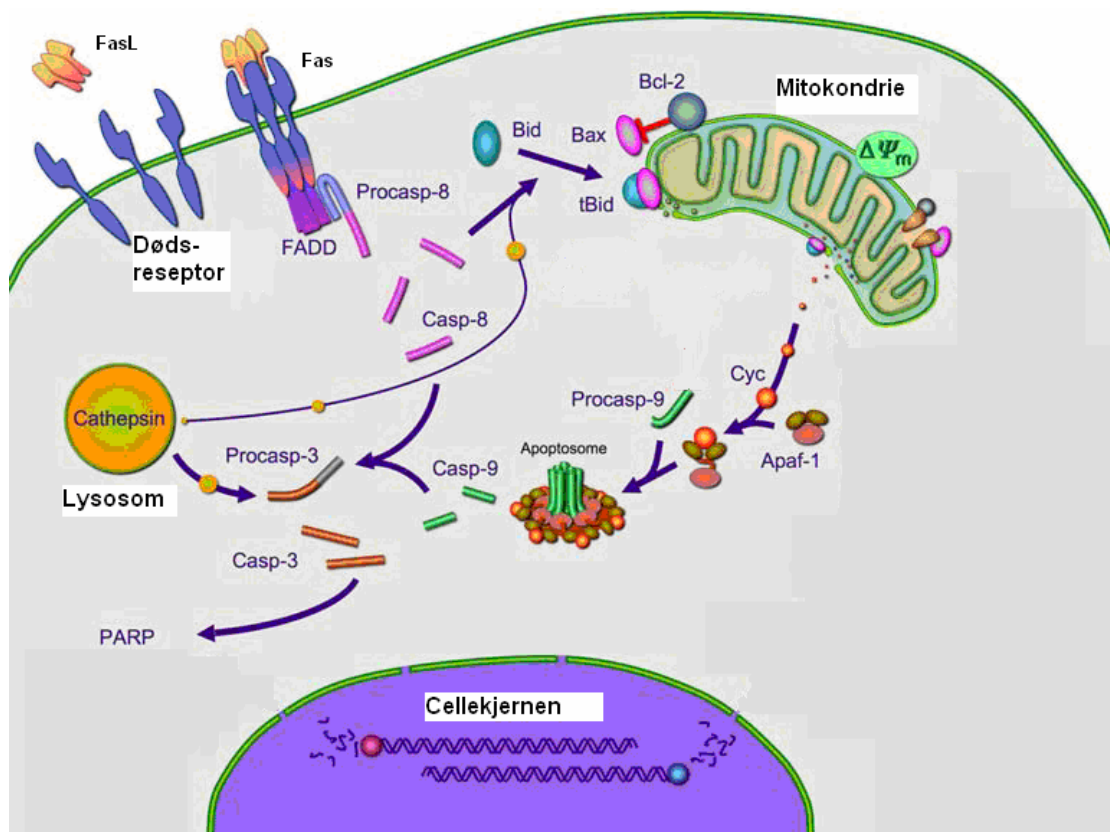
Flere studier *in vitro* har konstatert en økende nekroseandel med økende PDT doser (Chernyak et al. 2006; Luo and Kessel 1997; Nagata et al. 2003). I tillegg til fotosensitizers konsentrasjon og lysstyrken har celletype og fotosensitizers lokalisering betydning for hvilke type celledød som oppstår etter PDT (Piette et al. 2003). PDT initiert nekrose *in vitro* kan hemmes ved bruk av antioksidanter som tilleggsbehandling for å forhindre inflammasjon samtidig som cellene hovedsakelig dør via apoptose (Chernyak et al. 2006).

### **1.3.2. PDT induisert apoptose**

Apoptose er en programmert celledød som har en viktig rolle i menneskets utvikling i fosterstadiet (Degterev and Yuan 2008). I motsetning til nekrose vil celler som gjennomgår apoptose unngå en inflammasjon i større grad (Edinger and Thompson 2004). Dette kommer av at den døende cellen blir pakket i apoptotiske bodies uten at plasmamembranen blir brutt. Apoptotiske bodies blir så gjenkjent av fagocytotiske celler som fjerner disse.

Celler som dør via apoptose gjennomgår mange endringer som et resultat av caspase (cysteine proteaser) aktiveringer (Edinger and Thompson 2004). I prinsipper skjer caspase aktiveringen enten ved dødsreseptor mediert apoptose eller frigjøring av

apoptotiske mediatorer fra mitokondriet i mitokondriemediert apoptose. PDT induserer begge formene for apoptose (Almeida et al. 2004; Ortel et al. 2009), men den mitokondriemedierte formen er den dominerende (Ortel et al. 2009). Begge formene for apoptose kommer av aktivering av initiator caspaser, enten caspase-8 eller -9 (Almeida et al. 2004; Edinger and Thompson 2004). Disse initiator-caspasene vil i sin tur aktivere effektor caspasene (caspase-3, -6 og -7). Effektor-caspasene kløver flere proteiner som resulterer i de morfologiske endringene observeres ved apoptose slik som cellekrymping, cellekjerne kondensering og DNA fragmentering. Alt dette fører til at cellen blir delt i mindre apoptotiske bodies for så å bli fjernet av fagocytotiske celler.



Figur 1.8. PDT induserer apoptose via to hovedveier, dødsreseptormediert og mitokondriemediert. I tillegg kan lysosomale enzymer (cathepsin) initiere apoptose.  $\Delta\Psi_m$ ; mitokondrie membran potensial, Casp; caspase (Ortel et al. 2009).

### *1.3.2.1. Dødsreseptor mediert apoptose induisert av PDT*

Dødsreseptor mediert apoptose starter ved at cellens tumor nekrose faktor (TNF) reseptorfamilien blir stimulert, deriblant dødsreseptoren Fas (Almeida et al. 2004). I PDT behandlede celler er det rapportert at antallet Fas reseptorer og dets ligand FasL økes med Pc 4-PDT (Ahmad et al. 2000). Dette gir en binding mellom Fas og adapter molekylet FADD (Figur 1.8). Fas-FADD komplekset binder procaspase-8 som aktiverer seg selv og kløver Bid til en trunkert form av Bid, tBid (Almeida et al. 2004). tBid fremskynder celledød ved å skade mitokondriene og samtidig aktivere de proapoptotiske proteinene Bax og Bak. I tillegg inaktiveres prooverlevelses proteiner som i sin tur vil føre til cytochrom C frigjøring. Caspase-8 kløver også procaspase-3 og aktiverer den. Dette fører til videre reaksjoner som ender opp med apoptotisk celledød.

### *1.3.2.2. Mitokondrie mediert apoptose induisert av PDT*

PDT kan initiere mitokondriemediert apoptose ved å trigge ruptur i mitokondriens membran (Almeida et al. 2004). Dette fører til cytochrom C frigjøring som vil binde seg til Apaf-1 og procaspase-9 og danner et kompleks (Apoptosome) (Figur 1.8). Komplekset som dannes aktiverer caspase-9 som resulterer i kløving av procaspase-3 til sin aktive form, caspase-3. Aktivering av caspaser i celler behandlet med PDT fører til kløving av en del celleproteiner, blant dem poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). PARP er et viktig protein i forhold til reparasjon av skade på DNA (Ame et al. 2004). Skader på DNA induserer PARP aktivering som medfører videre aktivering av DNA reparasjonsveien.

Noen fotosensitizere lokaliseres i mitokondriene, noe som kan gi mitokondriemediert apoptose da ROS vil ødelegge mitokondrienes membran (Sasnauskiene et al. 2009). I mange tilfeller er en av de første forandringene som forekommer etter PDT er tap av mitokondriets membran potensial,  $\Delta\Psi_m$  (Kessel et al. 2000) etterfulgt av cytochrom C frigjøring (Kessel et al. 2000; Sasnauskiene et al. 2009). Caspase aktiveringer (Tian et al. 2006), deriblant caspase-3 (Fabris et al. 2001; Kuhara et al. 2008; Tian et al. 2006),

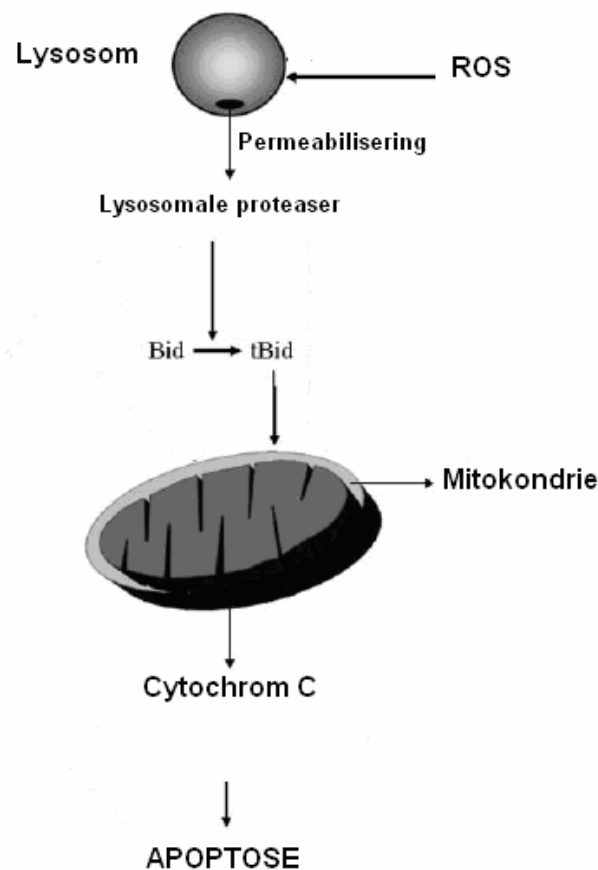
er et resultat av disse prosessene i tillegg til PARP kløving (Kuhara et al. 2008; Luo and Kessel 1997).

### ***1.3.3. Apoptose initiert etter lysosomale skader***

Fotosensitizere kan lokaliseres forskjellige steder i en celle, blant annet i endosomer og lysosomer. Celleviabiliteten reduseres etter skader på lysosomer mediert av ROS (Ian J. Macdonald and Thomas J. Dougherty 2001). ROS medierte lysosomale skader bidrar til frigjør av lysosomale proteaser, spesielt små cathepsiner, til cytosol (Guicciardi et al. 2004). Cathepsinene som er mest forbundet med lysosom-indisert apoptose er cathepsin B, L og D. Lysosomale enzymer er mest aktive ved sur pH slik det er i lysosomene, men noen av cathepsinene vil også kunne uttøve en effekt ved nøytral pH.

Ved stor grad av lysosomal permeabilisering vil en rask organell nedbrytning forekomme, blant annet nedbrytning av proteiner i plasmamembranen og føre til lekkasje som resultere i nekrose (Guicciardi et al. 2004). Imidlertid vil en partiell permeabilisering av lysosomene føre til at cellen gjennomgår apoptose (Figur 1.9). Noen caspaser, slik som caspase-3 og -7, har vist seg å være forholdsvis svake substrater for cathepsiner, spesielt cathepsin B og L. Frigjøringen av cathepsiner i cytosol fører både direkte og indirekte til mitokondriell dysfunksjon og kløving av Bid samt dets translokalisering til mitokondriene der den kan føre til blant annet frigjøring av cytochrom C (Figur 1.9).





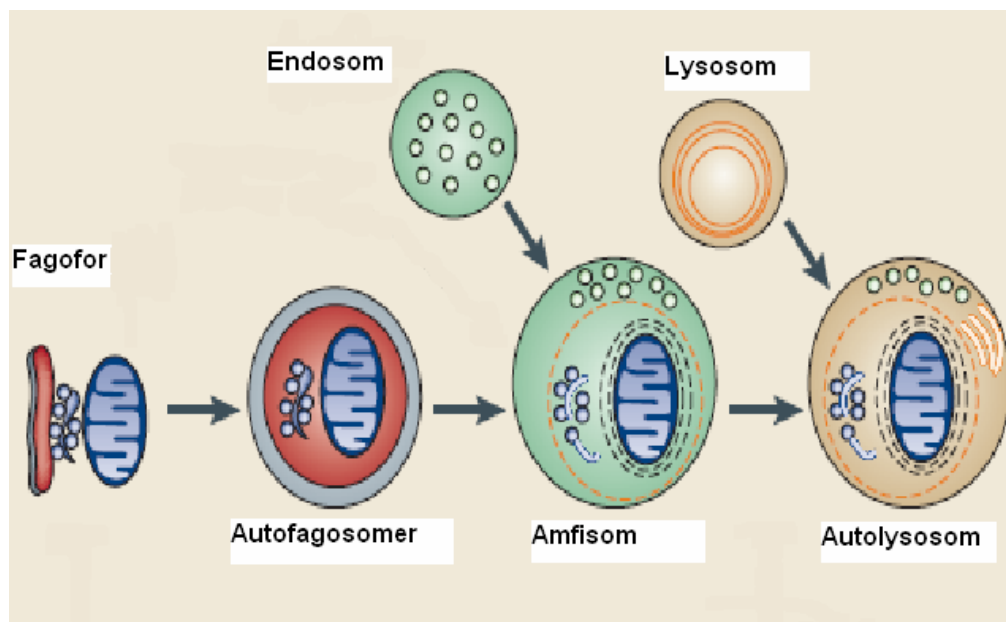
Figur 1.9. Partiell skade via ROS på lysosomene fører til frigjøring av lysosomale proteaser. Disse proteasene kløver Bid til tBid som translokaliseres til mitokondriene hvor den induserer cytochrom C frigjøring. Frigjøring av cytochrom C aktiverer kaskadereaksjoner som ender i apoptotisk celledød (Guicciardi et al. 2004).

Ved høye PDT doser har det vært rapportert en oppregulering av nekrotisk celledødsfraksjon med fotosensitizere lokalisert i lysosomer. Derimot med en mer moderat PDT dose har apoptose vært dominerende (Nagata et al. 2003). Ved de moderate dosene forekommer en degradering av DNA etter forandringer i mitokondrienes membran potensial. En økende kløving av Bid og cytochrom C frigjøring forekommer parallelt med økende timer etter PDT behandlingen (Kessel et al. 2000; Reiners, Jr. et al. 2002). I tillegg er det rapportert en kløving av caspase-9, aktivering av caspase-3 (Reiners, Jr. et al. 2002) og skader på Bcl-2 (Ichinose et al. 2006). En hemming av cathepsiner beskytter cellene mot apoptose mediert celledød (Ichinose et al. 2006).

### 1.3.4. PDT induisert autofagi

Autofagi er betegnelse på en prosess som enten kan beskytte en celle mot celledød eller initiere autofagisk celledød (Kroemer and Jaattela 2005). En skade på organeller eller i cytosol vil initiere autofagi. Det skadede proteinet eller organellen blir kapslet inn av en isolerende membran, fagofor, som danner vesikler med dobbelt membran kalt autofagosomer (Figur 1.10). Autofagosomer fusjonerer med endosomer og/eller lysosomer for å danne amfisomer og/eller autolysosomer for å degradere innholdet i autofagosomene.

Autofagi kan gi celledød enten direkte ved autofagisk celledød eller være oppstrøms eller nedstrøms for apoptose (Scarlati et al. 2009). Autofagi kan i tillegg oppstå side om side med apoptose.



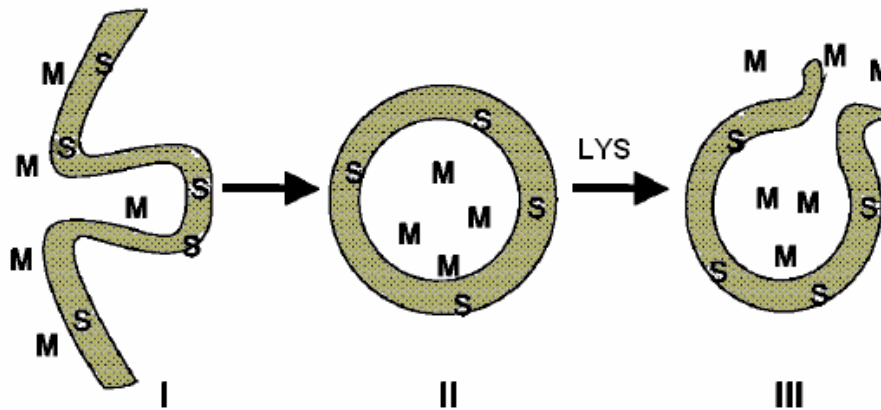
Figur 1.10. Mekanismer for autofagi. Fagofor kapsler inn skadet celle-organell/protein og danner autofagosomer. Autofagosomer kan fusjonere med både endosomer og/eller lysosomer og danner henholdsvis amfisomer og/eller autolysosomer (Kroemer and Jaattela 2005).

Autofagi-prosessen blir kontrollert av autofagi-spesifikk genene (ATG), der BECN1 (ATG6) er en av de esensielle (Kroemer and Jaattela 2005). Mange Atg proteiner som blir dannet under autofagi blir benyttet til å detektere autofagi. Atg8 (også kjent som Microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3), som inngår i dannelsen av autofagosomene, er en av de mest anvendte proteinene innenfor autofagi deteksjon.

ROS medierte skader på celler etter PDT induserer autofagi som mekanisme for å fjerne den dannede skaden og hindre celledød (Buytaert et al. 2006). Imidlertid vil omfattende ROS dannelse etter PDT indusere celledød assosiert med autofagi (Buytaert et al. 2006; Kessel et al. 2006b; Kessel et al. 2006a; Sasnauskiene et al. 2009; Xue et al. 2008). Både økende PDT doser (Sasnauskiene et al. 2009) og timer etter PDT behandlingen gir økende autofagi-assosiert transformasjon av LC3-I til LC3-II (Xue et al. 2008). Det har vært rapportert etter PDT doble membran vesikler assosiert med autofagosomer ved hjelp av elektronmikroskopi (Kessel et al. 2006a; Xue et al. 2008). PDT behandlede celler der apoptose ikke forekommer blir autofagi ansvarlig for celledøden (Xue et al. 2008).

#### ***1.4. Fotokjemisk internalisering (PCI)***

Fotokjemisk internalisering (PCI) er en ny metode som er under utvikling innen kreftbehandling for å levere makromolekyler som proteiner, DNA og RNA til celler (Selbo et al. 2002). På samme måte som PDT inngår fotosensitizer, synlig lys og oksygen i PCI metoden, men i tillegg gis et makromolekyl. Første trinnet i PCI er makromolekylets kapsling i endocytiske vesikler med fotosensitizerne inkorporert i membranen (Figur 1.11). Cellene blir dernest eksponert for lys. Lyset som blir absorbert av fotosensitizeren danner ROS, der singlett oksygen ( $^1O_2$ ) er den dominerende formen. Den induerte ødeleggelse av vesiklenes membraner resulterer i frigjøringen av makromolekylet til cytosol. PCI er vist å øke den behandlede effekten av en rekke makromolekyler som plantetoksiner ved å frigjøre de fra endocytiske vesikler før de blir degradert etter fusjonering med lysosomer (Fretz et al. 2007).



Figur 1.11. Mekanismer for PCI. Fotosensitizerer (S) lokaliseres på membranen samtidig som makromolekylene (M) kapsles inn i endocytiske vesikler (I og II). Ved lys eksponering dannes en ruptur i membranen og M slippes ut i cytosol (III) (Selbo et al. 2002).

#### 1.4.1 Saporin

Saporin er et ribosom-inaktiverende protein (RIPs) isolert fra *Saponaria officinalis* (såpeurt) (Lai et al. 2008). Den hemmer proteinsyntesen ved å gi en irreversibel skade på ribosomene. Med hensyn til de strukturelle forskjellene til RIPs fra planter er de delt i to grupper, type I og type II RIPs. Saporin tilhører type I RIPs som ikke er spesielt toksisk før den har nådd cytosol. Saporin blir hovedsakelig lokalisert i lysosomer hvor de blir degradert, et felles problem type I RIPs.

Saporin er blitt benyttet i forbindelse med PCI hvor en økende cytotoxisk effekt av saporin har vært observert (Fretz et al. 2007). Saporin er benyttet i denne oppgaven som makromolekylet i PCI.

## **2. HENSIKT MED OPPGAVEN**

Hensikten med denne oppgaven var å studere celledødsmekanismene etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT med særlig fokus på nekrose, apoptose og autofagi. I tillegg til dette ble PDT behandlingen sammenlignet med PCI behandlingen. Denne kunnskapen er viktig for å kunne bedre forstå hvilke muligheter og begrensninger man har til å optimalisere PCI-metoden. I tillegg vil studiene bidra til utvikling av de immunstimulerende mulighetene som er rapportert for PDT.

### 3. MATERIALER OG METODER

#### 3.1. Cellelinje

Cellelinjen som er blitt brukt i forsøkene er ZR-75-1 kjøpt fra ATCC-LGC. Denne adherente bryst cancer cellelinjen er isolert fra en 63 år gammel kaukasiske kvinne som tidligere har vært behandlet mot bryst cancer (ZR-75-1 2009). Disse cellene er blitt benyttet i studier der legemidler for behandling av brystkreft er blitt undersøkt (Kim et al. 2005).

Arbeid med disse cellene har foregått i sterile omgivelser i LAF-benk og det er benyttet aseptisk arbeidsteknikk. ZR-75-1 ble dyrket i RPMI-1640 (Sigma, St.Louis MO) tilsatt 10% føtalt kalveserum (FCS, Fisher Scientific, Pittsburgh), 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin (Penicillin/Streptomycin solution, Sigma) og 2 mM glutamin (L Glutamin, Sigma) (heretter kun kalt medium). Cellene ble dyrket i 75 cm<sup>2</sup> vevskulturflasker (Nunc, Roskilde, Danmark) og inkubert ved 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i luften.

Cellene ble splittet 2 ganger i uken. Først ble cellemediet sugd av for deretter å bli vasket med trypsinløsning (Trypsin-EDTA solution (1x), Sigma). Deretter ble cellene behandlet med 1 ml trypsinløsning. Trypsinet, som er en protease, gjør at cellene løsner fra flaskebunnen, mens EDTA i trypsinløsningen gjør at cellene løsnes fra hverandre. Etter at cellene var løsnet ble de resuspendert i medium slik at trypsinløsningen ble nøytralisert. Ved omsetting av cellene ble cellene fortynnet 1:2.

#### 3.2. Telling av celler til forsøk

Før hvert forsøk ble cellene først talt. Etter trypsineringen ble cellene overført til et rør og sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm (tilsvarer 70 g). Medium ble så sugd av og cellene resuspendert i 5 ml nytt medium. 50 µl ble sugd av og applisert i åpningen

på et tellekammer (KovaGlasstic Slide 10, Hycor Biomedical Inc., UK). Tre av totalt 9 ruter på tellekammeret ble talt. Hver rute har et volum på 0,1  $\mu$ l, så for å få celleantall i ml ble gjennomsnittet av de tre rutene multiplisert med en faktor på  $10^4$ .

### ***3.3. Prosedyre for behandling med PDT og PCI***

ZR-75-1 cellene ble sådd ut i enten 96-, 6-brønners brett eller skåler (alle fra Nunc) etter hvilke videre forsøk som skulle utføres. Etter at cellene festet seg til bunnen av brettene (ca 4-6 timer) ble mediet skiftet med nytt medium tilsatt 0,2  $\mu$ g/ml TPCS<sub>2a</sub> (PCI Biotech AS, Oslo). I PCI forsøkene ble i tillegg til TPCS<sub>2a</sub> 0,5  $\mu$ g/ml protein toksinet saporin (Sigma) tilsatt. Cellene ble deretter inkubert i 18 timer pakket i aluminiumsfolie beskyttet mot lyseksponering. Cellene ble vasket 2 ganger, og inkubert i ytterligere 4 timer i TPCS<sub>2a</sub>- og saporinfritt medium før lyseksponering. I noen forsøk ble cellene ikke vasket, derimot direkte belyst.

#### ***3.3.1. Lyskilde***

LumiSource (PCI Biotech AS) med blått filter ble benyttet ved belysning av cellene. Lampen består av fire 18-W Osram L 18/67 standard lystuber. Med det blå filteret vil lyset som kommer gjennom ha et gjennomsnittlig bølgelengde på rundt 435 nm. Lysboksen blir kjølt under belysningen for å hindre at cellene skades av varmen (hyperthermia) og for at belysningen holdes stabilt over tid (Selbo et al. 2006).

### ***3.4. Detektering av toksisitet med MTT-assay***

Den kvantitative MTT-metoden for måling av viabilitet baserer seg på måling av mitokondriell enzymaktivitet. Gul tetrazoliumsalt (3-[4,5-dimetylthiazol-2-y]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), Sigma) blir kløvet av blant annet succinat dehydrogenase i levende celler. Kløvingen resulterer i dannelsen av mørkeblå vannløselig formazankrystaller som løses i DMSO (dimetyl sulfoxide, Fluka, SIGMA, Sveits). Den optiske tettheten i DMSO-krystall-løsningen måles med

spektrofotometer. Absorbansen fra de løste formazankrystallene korrelerer med antall metabolsk aktive celler.

MTT-løsning ble laget på forhånd ved å løse MTT i 1x PBS (phosphate-buffered saline, SIGMA) til en konsentrasjon på 5 mg/ml. Løsningen ble oppbevart ved 4 °C og beskyttet mot lys.

Følgende optimaliserte prosedyren for MTT-metoden ble benyttet (Selbo et al. 2006):

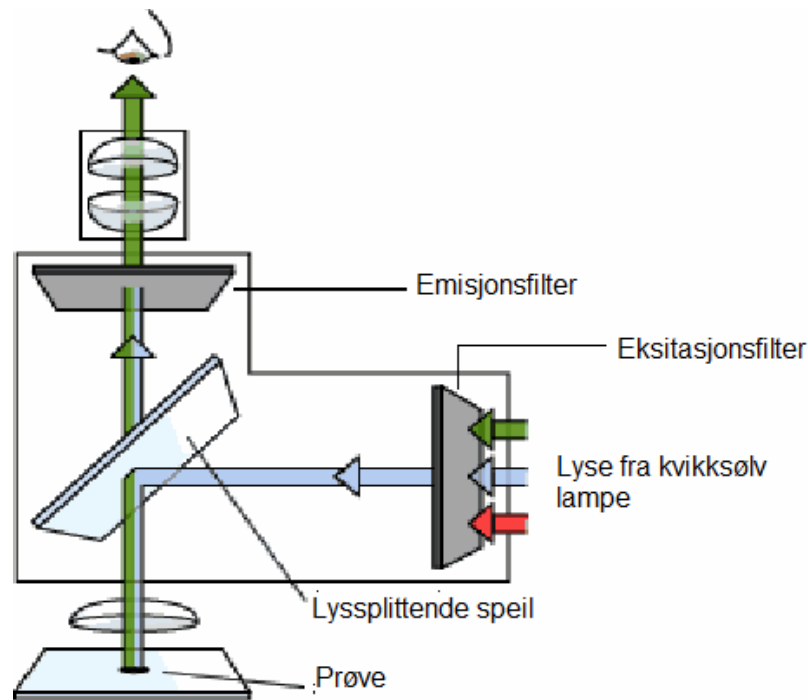
- Mediet ble sugd av og byttet med medium tilsatt 0,25 mg/ml MTT-assay
- Cellene ble inkubert i MTT-assayet til formazankrystallene ble synlige (ca etter 1-4 timer)
- MTT-mediet ble sugd av og DMSO ble tilsatt for å løse formazankrystallene
- Cellene ble ristet i 5 minutter
- Absorbansen ble målt ved 570 nm

Overlevelse ble kalkulert relativt til kontrollceller som ikke hadde fått behandling, verken i form av fotosensitizer og eller belysning.

### ***3.5. Fluorescens mikroskopi***

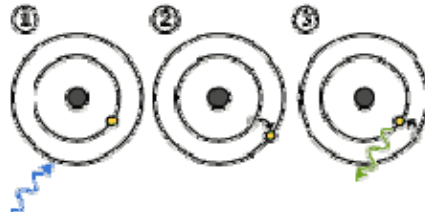
ZR-75-1 cellene ble observert i et Zeiss Axioplan epifluorescence mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Tyskland) med et digitalkamera (air-cooled charge-coupled device camera (Quantix; Photometrics, Tucson, AZ)) som var koblet til et bilderedigeringsprogram (analySIS PRO 3.0; Soft Imaging System GmbH, Munster, Tyskland). En HBO/100 W kvikksølv lampe ble brukt for å gi eksiterende lys og filtre ble brukt til å spesifisere ønsket bølgelengde. Metoden baseres på deteksjon av fluorescerende lys etter lysabsorpsjon av et fluorescerende stoff (fluorokrom).





Figur 3.1. Prinsipp for fluorescens mikroskopi. Lyset som sendes inn gjennom eksitasjonsfilter får ønsket bølgelengde. Lyset treffer lyssplittende speil som splitter lyset og sender den på prøvematerialet. Lyset sendes tilbake fra prøvematerialet gjennom et emisjonsfilter for å fjerne bakgrunnslys for bedre deteksjon av fluorescens fra prøven (Fluorescensmikroskopi 2009).

Lyset som sendes inn fra en kvikksølv lampe blir sortert til ønsket bølgelengde ved hjelp av en eksitasjonsfilter (Figur 3.1). Lyset med ønsket bølgelengde blir sluppet gjennom filteret og treffer et lyssplittende speil (beamsplitting mirror) som splitter lyset og fører den på prøven. Lyset som består av fotoner treffer prøven (1 i Figur 3.2) og eksiterer et elektron til et orbital med høyere energi nivå (2 i Figur 3.2). På vei tilbake til grunntilstand vil den energien som var tatt opp av elektronet bli gitt ut som lys (3 i Figur 3.2). Dette emitterte lyset fra prøven blir synliggjort ved at kun lys med lavere energi og lengre bølgelengde fra prøven blir sluppet gjennom det neste filteret, emisjonsfilteret (Figur 3.1). De fluorescerende områdene på prøven blir synliggjort via den mørkebakgrunnen som blir dannet ved hjelp av emisjonsfilteret.



Figur 3.2. Eksitasjon av et elektron via et foton til et nytt orbital med høyere energinivå. Den absorberte energien frigjøres som lys på vei tilbake til opprinnelig orbital (Fluorescensmikroskopi 2009).

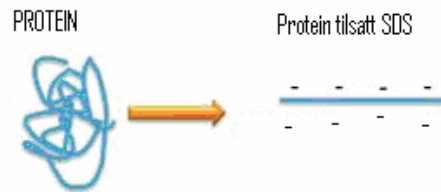
Følgende prosedyre ble fulgt ved fluorescensmikroskopering av ZR-75-1:

- ZR-75-1 celler ble sådd ut i skåler
- 0,2  $\mu\text{g/ml}$  TPCS<sub>2a</sub> ble tilsatt påfølgende dag og inkubert i 18 timer
- Cellene ble vasket to ganger og ytterligere inkubert i fotosensitizerfritt medium

For deteksjon av TPCS<sub>2a</sub> lokalisering i ZR-75-1 cellene ble fluorescensbildene tatt med 395-440 nm band pass eksitasjonsfilter (FT), en 460 nm lyssplittende speil (dichronic beam splitter, BP) og 610 nm emisjonsfilter (long pass filter, LP).

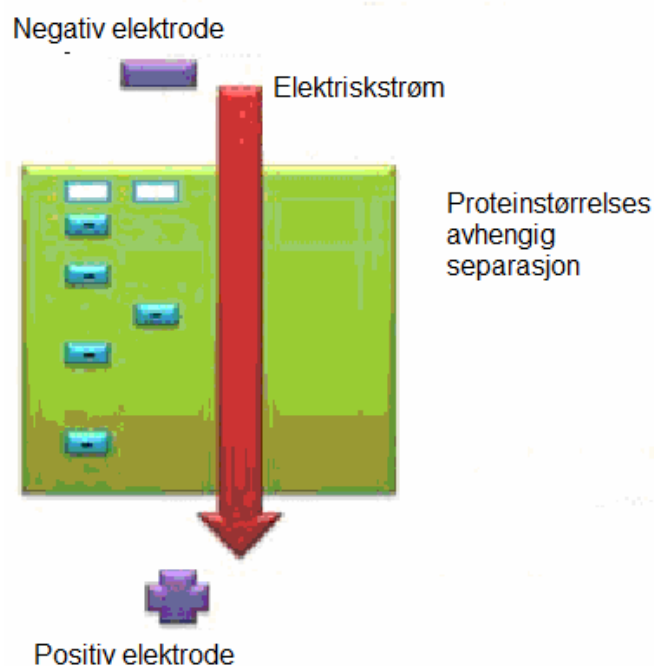
### 3.6. SDS-PAGE

SDS-PAGE er en metode som anvendes til å separere proteiner etter størrelse i et elektrisk felt. Teknikken kan benyttes til bestemmelse av proteinstørrelse, renhetsbestemmelse, semi kvantitering og til Western blotting. Metoden utnytter egenskapene til natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate-SDS) til protein separasjon ved hjelp av polyakrylamid gelelektroforese (polyacrylamide gel electrophoresis-PAGE). SDS er negativladde molekyler som binder seg til proteinene og gir dem negativ ladning (negativcoating) (Figur 3.3).



Figur 3.3. SDS bindes til proteinene for å gi proteinene en negative ladning (coating) (SDS-PAGE 2009).

De negativcoatede proteinene blir separert etter størrelse ved hjelp av separeringsmetoden PAGE (Figur 3.4). Proteinene vandrer med ulik hastighet mot positiv pol etter deres størrelse i strømkoblet elektroforesekammer.



Figur 3.4. Separering av proteiner ved hjelp av SDS-PAGE. Små proteiner vandrer raskere enn store gjennom gelen (SDS-PAGE 2009).

Små proteiner vil vandre raskere nedover gelen enn store proteiner. Gelen inneholder mellom 7,5-15 % polyacrylamid etter deteksjonsproteinenes masse.

### **3.6.1. Isolering av celleekstrakter for kromatografisk analyse**

ZR-75-1 cellene ( $1 \cdot 10^6$ ) ble sådd ut i 6-brønnersbrett og PDT behandlet som beskrevet i avsnitt 3.4. Isolering av celleekstrakter ble utført etter følgende prosedyre:

- Brettene ble satt på is for å stoppe cellulære prosesser
- Mediet ble sugd av og tatt vare på, da noen av cellene fløt i mediet (spesielt 8 og 24 timer etter belysning)
- Mediet ble sentrifugert i 3 min ved 1000 rpm (tilsvarer 70 g)
- Supernatanten ble kastet og pelleten ble resuspendert i 50  $\mu$ l lyseringbuffer (Se vedlegg)
- Brønnene med resterende celler ble tilsatt 100  $\mu$ l lyseringbuffer og skrapet av
- Begge lysatene ble blandet
- 0,3  $\mu$ l benzonase (MERCK, Darmstadt, Tyskland) ble tilsatt for å fordøye DNA
- Løsningene ble vortexet og 50  $\mu$ l ble porsjonert i Eppendorfrør (Eppendorf, Hamburg, Tyskland)
- Et rør ble tilsatt 10  $\mu$ l og merket for DNA-måling
- Prøvene ble fryst i  $-80$  °C inntil de ble benytte

### **3.6.2. Måling av DNA**

Den semi-kvantitative delen av SDS-PAGE avhenger av at det i utgangspunktet blir tilsatt samme mengde cellelysater i hver brønn. DNA-innholdet ble målt og volumet ble så justert slik at DNA-innholdet i hver prøve var tilnærmet likt. Apparatet som ble brukt til måling av DNA var Eltrospec 2100pro UV/visible spectrophotometer. DNA-innholdet ble målt ved å måle absorbansen i lysatløsningene ved 260 nm.

Følgende prosedyre ble fulgt:

- De merkede rørene satt av til DNA-måling (10  $\mu$ l cellelysate) ble tatt opp av fryseren og tint

- 490 µl destillert vann (dH<sub>2</sub>O) ble tilsatt hvert rør
- Apparatet ble nullstilt med blank, dH<sub>2</sub>O
- Før hver måling ble kyvetten vasket to ganger med lysatløsningen
- Gjennomsnittet ble beregnet

Lysatløsningen med minst DNA konsentrasjon ble tilsatt i gelen med høyest volum, 40 µl (i geler med 10 brønn og 30 µl i gel med 15 brønn). De andre prøvene ble justert i forhold til den lysatløsningen med minst DNA konsentrasjon ved hjelp av formelen:

$$\frac{40 \mu\text{l}}{\text{Gjennomsnitt målt DNA konsentrasjon}} \times \text{minst gjennomsnitts verdi}$$

### 3.6.3. Gelkjøring

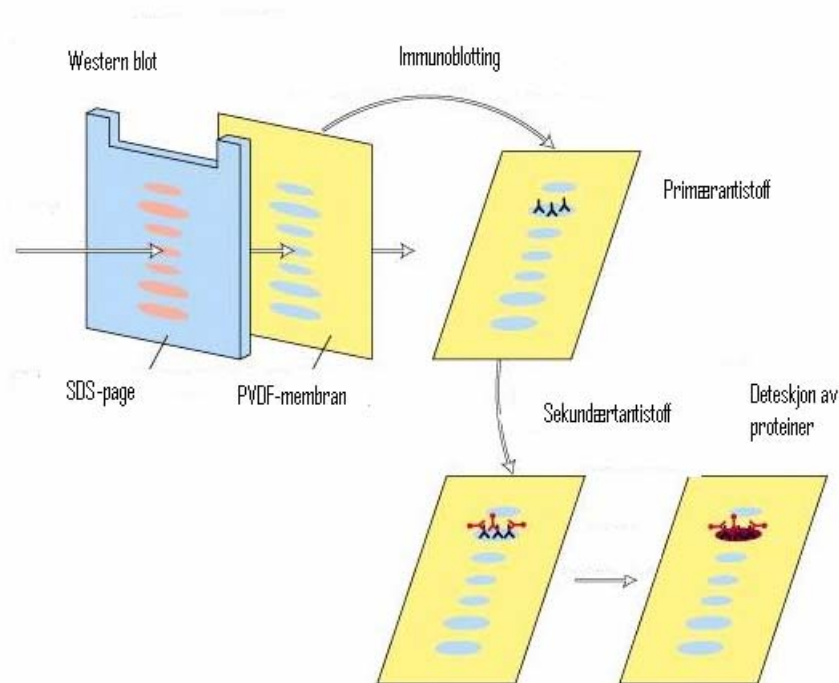
Gelene ble laget etter oppskrift optimaliser av gruppen (Weyergang et al. 2007). Det ble først laget en separerende gel ( se vedlegg). TEMED setter i gang polymeriseringsreaksjonen og derfor tilsettes rett før støping av gelen. Deretter ble en stacking gel (se vedlegg) laget. Denne gelen har som hensikt å samle prøvematerialet over den separerende gelen.

Følgende prosedyre ble fulgt:

- De isolerte celleekstraktene (lysatene) som var fryst ble tatt ut av fryseren og tint
- Deretter ble lysatene varmet ved 95 °C i 5 min på varmeblokk dette for at proteinene mister sin tredimensjonale struktur og lettere kan separeres gjennom gelen
- Deretter ble de avkjølt på is og vortexet og spunnet ned
- Lysatprøvene ble pipetert på gelen i volumer bestemt etter DNA innhold (forklart i 3.8.2.)

- Precision Plus Protein WesternC Standards (Bio-Rad Laboratories) ble brukt som molekylvektsstandard
- Elektroforesekammeret ble tilsatt 1 x running buffer (10 x running buffer fortynnet i destillert vann, se vedlegg)
- Elektroforesekammeret ble kjørt på 200 V (400 mA) i 45 minutter, til det ble sett av fronten hadde gått helt ned.

### 3.7. Western Blot og immunoblotting



Figur 3.5. Prinsippet for Western blot og immunoblotting. Proteiner fra gel blir overført til PVDF – membran ved hjelp av western blotting. Plasseringen til ønskede proteiner blir synliggjort med primær og sekundær antistoff ved immunoblotting etterfulgt av en HRP-deteksjonsmetode. (Western blot og Immunoblotting 2009).

#### 3.7.1. Western blot

Western Blot er en metode som blir brukt til å overføre proteinene fra polyakrylamid gelen over på et polyvinylidene difluoride (PVDF) – membran (Amersham Hydrion-P PVDF Membrane, GE Healthcare, Amersham Biosciences, Amershamplace, UK) ved hjelp av elektrisk spenning. Dette gjøres for at proteinene blir tilgjengelige for antistoff ved immunoblitting. PVDF – membranen blir lagt på gelen mellom to filter papir i en kassett med svamp på hver sider. Kassetten blir lagt i transferbuffer (se vedlegg) hvor det ved hjelp av den elektriske spenningen proteinene blir overført fra gelen over til PVDF – membranen med sammen organisering som på gelen.

Følgende prosedyre ble fulgt:

- PVDF – membranen ble dynket i metanol og lagt på vippe i transferbuffer
- Gelen ble lagt i transferbuffer etter fjerning av stacking gel
- Transercellen ble satt sammen
- Western blot ble kjørt i kjølerom på maks volt (ca 50 V) og 400 mA i 60 minutter

### **3.7.2. Immunoblotting**

Ønskede proteiner detekteres på PVDF – membranen ved hjelp av immunoblotting. Prinsippet for immunoblotting er deteksjon av proteinene med antistoff. PVDF – membranen inkuberes først med et primært antistoff, rettet mot det ønskede proteinet. Dernest inkuberes PVDF – membranen med et sekundært antistoff som er rettet mot det primære antistoffet.

PVDF – membranens gode proteinbindende egenskaper øker faren for binding av antistoffene på membranen fremfor de ønskede proteinene de er rette mot. For å hindre denne uspesifikke bindingen av antistoffene til membranen blir membranflatene uten proteinfestet til seg blokkert med melkeproteiner med tørrmelk- (Skummetmelkpulver, Nestle Molicoinstant, Nestle food service, Vevey, Sveits) vask.

Følgende prosedyre ble fulgt:

- PVDF – membranen ble inkubert etter Western blotting i 15 ml 5% tørrmelk tillaget i TTBS (se vedlegg)
- Dernest ble PVDF – membranen inkubert overnatt med primært antistoff ved 4 °C enten i melk eller i BSA (Sigma) etter firmaets kriterier
- Påfølgende dag ble PVDF – membranen vasket med TTBS og inkubert i 1 time med sekundært antistoff (antikanin antistoff, Cell Signaling Technology)



og Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate (brukt til å detektere molekylvektstandarder, Bio-Rad) i melk ved romtemperatur

- PVDF – membranen ble ytterligere vasket med TTBS før detektering (beskrevet nedenfor)

### ***3.7.3. Detektering av proteiner***

To ulike metoder ble testet for detektering av proteinene festet på PVDF – membranen. Begge metodene baseres på reaksjoner der lys blir produsert. Det sekundære antistoffet er konjugert til HRP (horseradish peroxidase) som vil i nærheten av hydrogen peroksid katalyserer oksidasjon av luminol. Det tidspunktet luminol går tilbake til sin opprinnelige form blir lys produsert. Dette lyset blir fanget opp og korrelert med proteinets lokalisering på membranen. En enhancer blir i mange tilfeller brukt til å øke tiden og intensiteten av det emitterte signalet.

Den ene metoden som ble testet for deteksjon av proteiner på PVDF – membran var ECL Plus Western blotting Detection System (GE Healthcare, Amershamplace, UK) på Pharaos (Bio-Rad). Denne metoden ga dårlige bilder og noen utolkelige resultater. Den andre metoden (Chemilum. Kit fra BioRad på ChemiDoc (Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc XRS)) ga fine bilder hvor det var lett å lese av resultater. Begge metodene brukte omtrent like lang tid. Chemilum kittet med ChemiDoc som ga best resultater ga grunnlag for bruk av denne deteksjonsmetoden i øvrige forsøk.

### ***3.7.4. Loading kontroll***

#### ***3.7.4.1. Aktin***

Aktin er et av mange proteinene som er uttrykt i alle celletyper. Ofte blir slike proteiner brukt til å kontrollere for mengden lysatløsning tilsatt (loadet) har vært likt i alle brønnene under SDS-PAGE.

Følgende prosedyre ble fulgt:

- PVDF – membranen ble etter detektering av proteinene, vasket med TTBS
- Dernest inkubert 1 time i melk
- PVDF – membranen ble inkubert overnatt med anti-Aktin antistoff (Sigma) ved 4 °C.
- Samme vaskeprosess, sekundær antistoff og deteksjonsmetode som beskrevet ovenfor ble benyttet videre

#### 3.7.4.2. Ponceau S farging

En annen metode for kontroll av loading på gel er Ponceau S farging. Denne metoden ble benyttet i noen forsøk. Prinsippet for metoden er farging av alle proteiner på PVDF – membranen. Etter fargingen velges et eller flere proteinbånd på PVDF – membranen for visuelt sammenligning i proteinuttrykket mellom brønnene.

Følgende prosedyre ble fulgt:

- PVDF – membranen ble vasket med TTBS
- Membranen ble deretter inkubert i 30 minutter med Ponceau S (Sigma)
- Vask med TTBS ble utført til proteinbåndene ble synlige på membranen
- En visuell kontroll ble utført

### 3.8. Caspase-3 aktivitet

Caspase-3 er en av effektor-caspasene som er av betydning for den apoptotisk-medierte celledøden (Degterev and Yuan 2008). Caspase-3 aktiviteten i celler behandlet med PDT ble undersøkt for å bestemme den apoptotiske celledøden initiert etter PDT. Til dette formålet ble EnzChek Caspase-3 Assay Kit # 1 (Molecular Probes, Invitrogen, Oslo) benyttet etter flere forsøk med Western blot av caspase-3 som gav svake signaler. Prinsippet for metoden er kløving av et av de spesifikke caspase-3 substratene Z-DEVD (aminosyresekvens Asp-Glu-Val-Asp, der Z er

betegnelse for benzyلكarbonyl gruppe) (Prosedyre fra invitrogen 2009). Caspase-3 substratet Z-DEVD er bundet til AMC (Z-DEVD-AMC) som ved kutting gir en detekterbar fluorescens ( $\lambda_{ex} = 342 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 441 \text{ nm}$ ). Økende fluorescensintensiteten er et tegn på økende caspase-3 aktivitet.

For å bekrefte at kløvingen av Z-DEVD-AMC kom av caspase-3 aktivitet i behandlede celler ble Ac-DEVD-CHO (reversibel aldehydhemmer av caspase-3 lignende enzymer) tilsatt. Hemmeren tilsettes behandlede celler sammen med Z-DEVD-AMC. Fluorescens blir dernest målt for å kontrollere for Z-DEVD-AMC kløving. Dersom fluorescens bortfaller (ingen Z-DEVD-AMC kløving) blir fluorescensen målt i behandlede celler etter Z-DEVD-AMC tilsetning korreleres med caspase-3 aktiviteten.

Følgende prosedyre ble fulgt:

- ZR-75-1 cellene ble sådd ut i 6-brønnersbrett og PDT behandlet på samme måte som beskrevet over (3.3)
- 24 timer etter belysning ble mediet overført til et Eppendorfrør og cellene ble trypsinerte. Mediet som var blitt tatt vare på ble brukt til å nøytralisere trypsinet
- Cellesuspensjonen ble så sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm (tilsvarer 50 g)
- Supernatanten ble kastet og cellepelleten ble resuspendert i PBS og sentrifugert på nytt, dette for å fjerne medium-rester
- Deretter ble cellepelleten resuspendert på ny i lysisbuffer fra kittet og inkubert i 30 minutter på is
- De lyserte cellene ble sentrifugert i 5 min ved 5000 rpm (tilsvarer 1250 g)
- Supernatanten ble overført til nye Eppendorfrør
- 1  $\mu\text{l}$  1 mM Ac-DEVD-CHO inhibitor ble tilsatt prøvene som var satt av som kontroll for caspase-3 aktiviteten og inkubert ved romtemperatur i 10 minutter
- Resterende prøver ble tilsatt DMSO for å ta høyde for DMSO tilsatt Ac-DEVD-CHO inhibitoren og inkubert på samme måte

- 50 µl 2 x Substrat working-løsning ble tilsatt hver prøve og kontroll
- Prøvene ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur
- Fluorescence ble målt med en fluorometer

Det ble også sådd ut celler til å måle celle viabiliteten ved hjelp av MTT – metoden parallelt med celler sådd ut til måling av caspase-3 aktiviteten. Disse fikk PDT behandling som cellene preparert for caspase-3 målingene.

### ***3.9. Deteksjon av Nekrose***

Nekrose er en av flere måter en celle kan død på. For å detektere hvorvidt PDT induerte nekrose i ZR-75-1 cellene ble Propidium jodid (PI, Sigma) benyttet. PI kan ikke passere intakte membraner og trenger derfor inn i celler med permeabel membran. Ved nekrose er plasmamembranen brutt og kommer PI inn i cellen hvor den binder seg til DNA. Ved eksitasjon med grønt lys (546 nm) vil de PI-holdige cellene emittere detekterbar rød fluorescens.

For å finne riktig prosedyre for PI farging og mikroskopering ble ZR-75-1 cellene sådd ut i skåler med en celletetthet på  $1 \cdot 10^5$  celler/skål. Dagen etter ble mediet skiftet for å kompensere for tilsetningen av fotosensitizer ved PDT forsøk. Den tredje dagen ble noen av skålene før mikroskopering vasket med kaldt PBS etterfulgt av 0,5 µg/ml PI (fortynnet i PBS) tilsetning. Noen skåler ble tilsatt PI direkte etter at mediet ble fjernet og mikroskopert. Vask med kaldt PBS ga mange nekrotiske celler derfor ble det i de resterende forsøkene kun mediet fjernet og PI ble tilsatt direkte før mikroskopering. Fluorescens av PI ( $\lambda_{ex} = 536$  nm og  $\lambda_{em} = 617$  nm) ble tatt med BP 546 nm, FT 580 nm og LP 590 nm.

Følgende prosedyre ble fulgt:

- ZR-75-1 cellene sådd ut i skåler og PDT behandlet

- En time (i noen forsøk også 2 og 4 timer) etter belysning ble PI tilsatt. 1 time etter belysning ble valgt for å unngå sekundær nekrose
- Cellene ble talt 5 forskjellige steder i skålet
- Prosent ble beregnet, antall PI positive celler i forhold til totalt antall celler.

For å stimulere nekrose ble i noen forsøk vasketrinnet i PDT (den ytterligere inkuberingen i fotosensitizerfritt medium) utelatt. Dette for å etterlate fotosensitizeren på plasmamembranen.

### ***3.10. Deteksjon av apoptose***

Når en celle gjennomgår apoptose i motsetning til nekrose blir mange intracellulære mekanismer forandret, dette kan både være i form av en aktivering eller deaktivering av flere proteiner. Disse intracellulære prosessene fører til de synlige morfologiske endringene observert ved apoptose. Disse endringene ble benyttet for å undersøke forekomsten av apoptose i ZR-75-1 celler behandlet med TPCS<sub>2a</sub>-PDT.

#### ***3.10.1. Morfologisk deteksjon av apoptose***

De morfologiske endringene ved apoptose ble benyttet til å undersøke forekomsten av apoptose i PDT behandlede celler. Hoechst 33342 (Sigma) farging ble benyttet som metode for deteksjon av de morfologiske endringene i ZR-75-1 cellene. Hoechst 33342 farger cellenes kjerner og ved fluorescensmikroskopering kan formen av cellekjernen studeres. Kjernekondensering eller fragmentering er en av de vanlige morfologiske endringene som oppstår under apoptose. Dette blir godt synlig med Hoechst 33342 fargingen. Klare og hele cellekjerner ble definert som ikke apoptotiske, mens cellekjerner som var delt i flere små deler ble definert som apoptotiske celler.

Følgende prosedyre ble benyttet:

- ZR-75-1 celler sådd ut i skåler og PDT behandlet påfølgende dag
- Cellene ble tilsatt 10  $\mu$ M Hoechst 33342 ( $\lambda_{ex}$  = 343 nm,  $\lambda_{em}$  = 483 nm) 1 time før mikroskopering
- Medium ble sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm (tilsvarende 70 g) for å ta med celler som fløt i mediet
- Cellene som fremdeles var i skålene ble trypsinert
- Alle cellene ble blandet sammen og sentrifugert
- Cellene ble resuspendert i PI og pipettert på et objektglass med et dekkglass over
- Fluorescence av Hoechst 33342 ble tatt med FT 395 nm og LP 420 nm
- Rundt 100 celler ble talt under mikroskoperingen og prosentandelen av de apoptotiske cellene ble beregnet i forhold til totalt antall celler
- PI-positive celler ble observert og visuelt kontrollert for å være på samme nivå med kontrollene (i forsøkene hvor nekrose ble detektert)

### ***3.10.2. Deteksjon av apoptose via Western blot***

Western blot prosedyre beskrevet ovenfor (3.7) ble benyttet til å detektere endringer av proteiner etter PDT. Under apoptose blir både PARP og caspase-3 kløvet. Disse proteinene ble detektert med primære antistoff rettet mot både caspase-3 og PARP, caspase-3 antistoff (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA) og PARP antistoff (Cell Signaling Technology).

Som positiv kontroll til apoptose i Western blot ble cellelinjen Jurkat (En sjenerøs gave fra Susan Shahzidi, avdeling for Patologi, Radiumhospitalet) brukt. Jurkat er humane T celle lymfocytter som ble etablert i 1970-årene fra en 14 år gammel gutt med T celle leukemi (Jurkat 2009). Disse cellene er suspensjonsceller og de dyrkes i samme medium som for ZR-75-1 cellene.

Jurkat cellene ble stimulert til apoptose med Camptothecin (CPT, En sjenerøs gave fra Susan Shahzidi) ved en konsentrasjon på 10  $\mu$ M. CPT er en reversibel DNA topoisomerase I hemmer. Den stimulerer apoptose ved å hemme topoisomerase I og dermed indusere kjedebrudd i DNA. Disse cellene ble sådd ut i 6-brønnesbrett med celletetthet på  $8 * 10^5$  celler/ml i serumfritt medium tilsatt CPT. Cellene ble inkubert i 4 timer og deretter høstet på samme måte som beskrevet i 3.6.1.

### ***3.11. Deteksjon av autofagi***

Slik beskrevet i Innledingen (1.3.4) av oppgaven kan celler behandlet med PDT gjennomgå autofagi. Autofagi er en mekanisme der cellen prøver å redde seg selv ved å fordøye skadeårsaken. LC3-I blir transformert til LC3-II under dannelsen av autofagosomer (Chen et al. 2009). LC3 finnes i tre isoformer i mennesker der kun en av dem ble undersøkt i denne oppgaven, LC3B isoformen.

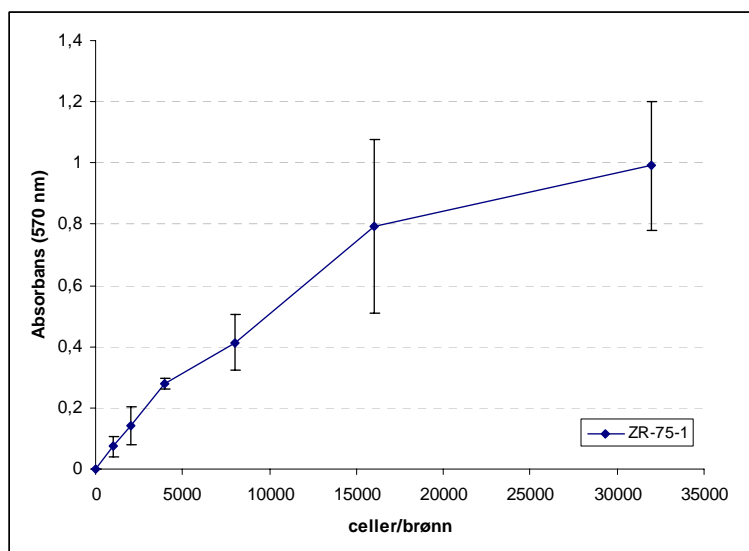
Samme prøvematerialer opparbeidet for apoptose ble benyttet til deteksjon av autofagi. Ved hjelp av Western blot ble transformering av LC3B-I (16 kDa) til LC3B-II (14 kDa) studert. Det primære antistoffet som ble brukt under immunoblottingen var rettet mot LC3B (i BSA) (Cell Signaling Technology).

## 4. RESULTATER

### 4.1. Tetthetskurver av ZR-75-1 i 6- og 96-brønnersbrett

Celler i monolagskultur vokser normalt lineært inntil de når konfluens. Kreftceller kan i varierende grad fortsette å vokse, men vanligvis reduseres celleveksten betydelig når cellene nærmer seg konfluens. For å forsikre reproduserbarhet er det viktig at forsøkene utføres slik at vekstbetingelsene er relativt like i hvert enkelt forsøk. Det ble derfor gjort forsøk for å bestemme hvilken celletetthet ved utsåing av ZR-75-1 som egnet seg best for forsøk i 6- og 96-brønners brett.

ZR-75-1 cellene ble sådd i ut med økende celletetthet. Celletettheten ble målt etter 4 dagers inkubering i medium ved hjelp av MTT-assay (3.4). Fire dager ble valgt som inkuberingstid da dette er den tiden de lengste forsøkene tok. Cellene ble vasket hver dag for å mimikere skifte av medium i forsøkene med PDT og PCI.

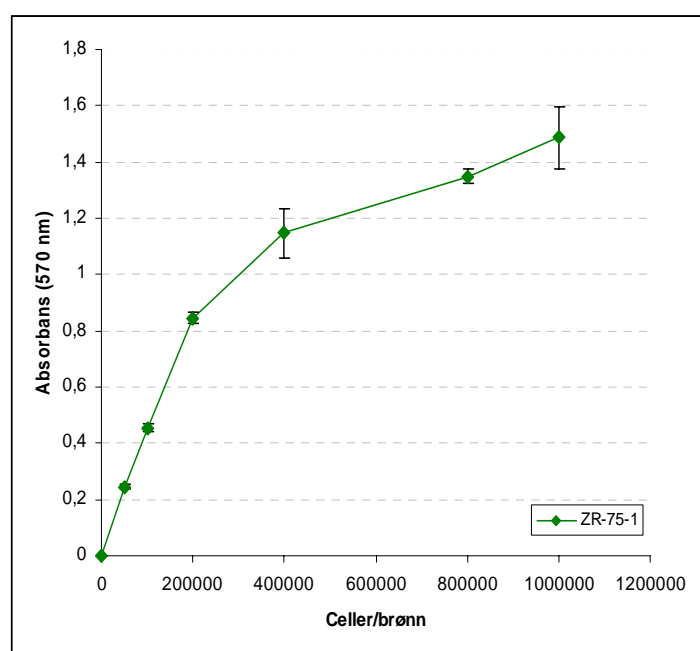


Figur 4.1. Tetthetskurve for ZR-75-1 celler i 96-brønnersbrett. y-aksen viser absorbansmålingene etter MTT-assay og x-aksen viser antall celler sådd ut per brønn. Gjennomsnittsverdi for tre paralleller +/- Standardavvik.



Celletettheten som skulle benyttes i de ulike forsøkene måtte ligge i den lineære delen av tetthetskurven for å sikre at cellene ikke ville nå konfluens i løpet av forsøkene.

Tettheten som skulle benyttes ble bestemt til 15000 celler/ brønn for 96 brønners brett og 600 000 celler/brønn for 6 brønners brett (Figur 4.1 og 4.2).



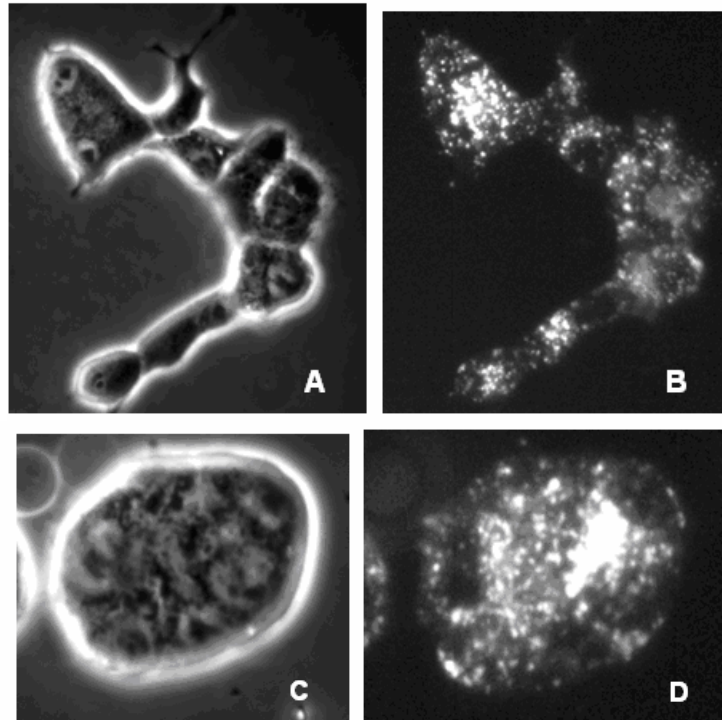
Figur 4.2. Tetthetskurve for ZR-75-1 celler i 6-brønnersbrett. y-aksen viser absorbansmålingene etter MTT-assay og x-aksen viser antall celler sådd ut per brønn. Gjennomsnittsverdi av to paralleller +/- Standardavvik.

#### 4.2. Lokalisering av TPCS<sub>2a</sub>

TPCS<sub>2a</sub> er en amfifil fotosensitizer som er relativt strukturelt lik TPPS<sub>2a</sub> (disulfonert meso-tetraphenylporphine). Som beskrevet i Innledningen (1.1.2.) lokaliseres TPPS<sub>2a</sub> hovedsakelig i endosomer og lysosomer (Weyergang et al. 2007). Det var derfor forventet at TPCS<sub>2a</sub> også skulle lokaliseres i endosomer og lysosomer.

Intracellulær lokalisering av TPCS<sub>2a</sub> ble undersøkt med fluorescence mikroskopi som beskrevet i Materialer og Metoder. Figur 3.3 B og D viser lokalisering av TPCS<sub>2a</sub> i ZR-75-1 cellene basert på fluorescence mikroskopi. Den granulære fluorescensen fra

TPCS<sub>2a</sub> er lik den man finner for TPPS<sub>2a</sub> som er karakteristisk for lokalisering i endocytiske vesikler og lysosomer.



Figur 4.3. Lokalisering av TPCS<sub>2a</sub> i ZR-75-1 celler. Figur A og C viser fasekontrast og figur B og D viser fluorescence. ZR-75-1 cellene ble sådd ut i skåler, dagen etter ble 0,2 µg/ml TPCS<sub>2a</sub> tilsatt og inkubert i 18 timer. Dag tre ble cellene vasket og inkubert i ytterligere 4 timer før mikroskopering.

I enkelte tilfeller, avhengig av cellelinje og inkubasjonsbetingelser, ble det observert en diffus fluorescence over hele cellen som tidligere er vist med TPPS<sub>2a</sub> å skyldes lokalisering av fotosensitizeren på plasmamembranen (Weyergang et al. 2007). Under de gitte betingelsene lokaliseres TPCS<sub>2a</sub> i liten grad på plasmamembranen i ZR-75-1 cellene (Figur 4.3 B og D).

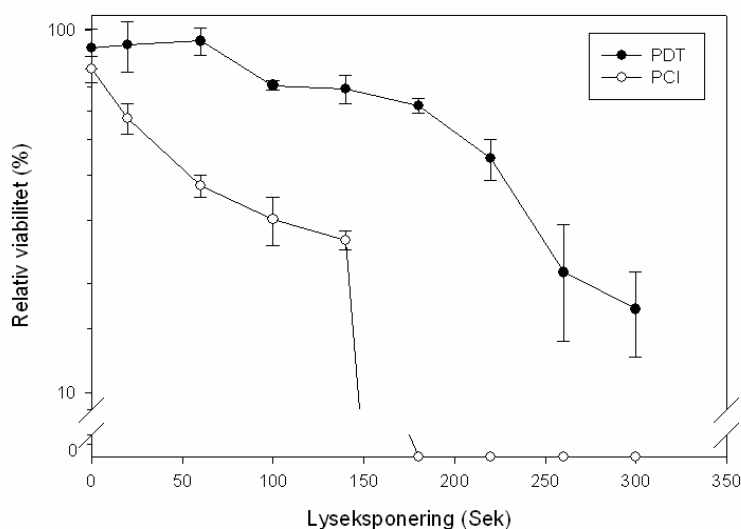
### 4.3. PDT og PCI-behandling

#### 4.3.1 Cellulær overlevelse etter PCI- og PDT-behandling

For å sammenligne og undersøke ZR-75-1 cellenes viabilitet etter PDT og PCI av saporin ble ZR-75-1 cellene sådd ut og behandlet med PDT og PCI av saporin før MTT-assayet ble benyttet. Resultatet er vist i Figur 4.4.

Den økende cytotoxiske effekten øker med økende lysdoser etter både PDT og PCI i samsvar med tidligere rapporter (Sasnauskiene et al. 2009; Selbo et al. 2006).

Viabiliteten ble redusert til 40 % etter PCI-behandling med 60 sekunders lys (Figur 4.4). En langt høyere lysdose (220 sekunder) måtte til for å oppnå samme effekten for PDT (Figur 4.4).

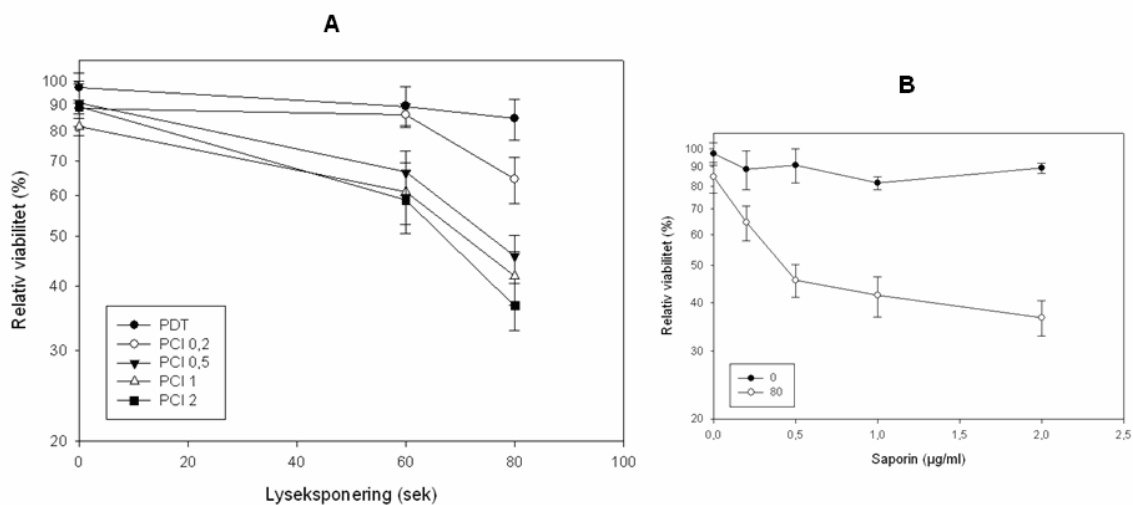


Figur 4.4. Cellulær overlevelse for ZR-75-1 celler etter behandling med PDT og PCI av saporin. Cellene ble sådd ut i 96-brønners Brett og inkubert med 0,2  $\mu\text{g/ml}$  TPCS<sub>2a</sub> i 18 timer. Dagen etter ble cellene vasket og inkubert i ytterligere 4 timer før de ble belyst. Celleviabiliteten ble undersøkt med MTT-assay. Viabiliteten (%) ble beregnet i forhold til ubehandlede celler (y-akse) og lyseksponeringen ble beregnet i sekunder (x-akse). Gjennomsnittsverdi av tre paralleller +/- standardavvik.

Celle viabiliteten for ZR-75-1 cellene kun behandlet med fotosensitizer alene eller en kombinasjon av fotosensitizer og saporin (uten lys) viste en liten nedgang i viabiliteten i forhold til ubehandlede celler. Denne cytotoksiske effekten kan forkalres ved mulig lyseksponering av kontrollene i løpet av forsøkene. Cytotoksisk effekt av saporin har tidligere blitt rapportert (Lai et al. 2008), dette kan forklare nedgangen i celleviabilititene etter behandling med saporin.

#### 4.3.2 Cellulær overlevelse etter PCI med forskjellige saporin konsentrasjoner

Effektiviteten av PCI med forskjellige saporin konsentrasjoner ble undersøkt ved å så ut ZR-75-1 cellene, tilsette fotosensitizer og forskjellige konsentrasjoner av saporin for deretter å belyse og utføre et MTT-assay (beskrevet i Materialer og Metoder).



Figur 4.5. ZR-75-1 celler behandlet med PDT og PCI med forskjellige saporin konsentrasjoner. Figur A: Tallene bak PCI er saporinkonsentrasjonen i µg/ml. Den relative viabiliteten ble beregnet i forhold til ubehandlede celler ved hjelp av MTT-assay. Figur B: Relativ viabilitet beregnet ved hjelp av MTT-assay i celler uten lysbehandling (0) og celler belyst i 80 sekunder (80). Dette er satt opp mot saporinkonsentrasjonen (µg/ml) i x-aksen. Gjennomsnittet av seks paralleller +/- standardavvik.

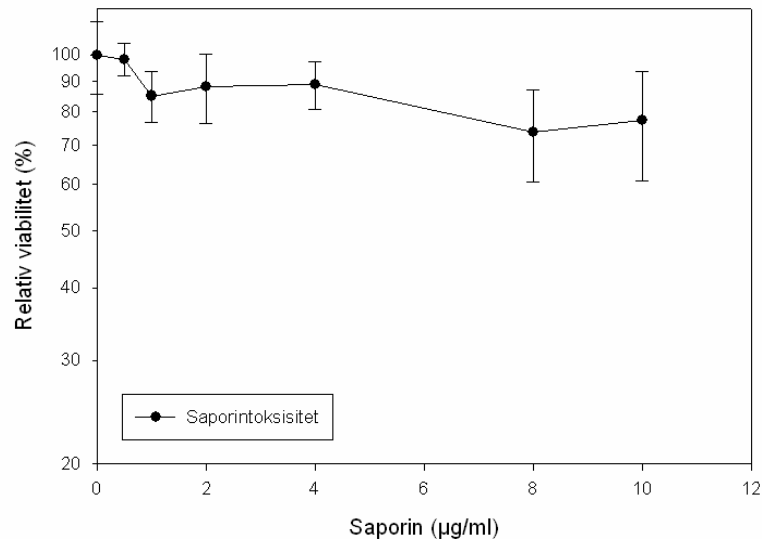
Viabiliteten i PDT-behandlede celler ble redusert med ca 13 % etter 80 sekunders lys ( $p = 0,01$ ) (Figur 4.5 A). En større effekt ble observert etter PCI av 0,5  $\mu\text{g/ml}$  saporin der 60 sekunders belysning reduserte viabiliteten til 66 % ( $p < 0,01$ ) (Figur 4.5 A). 80 sekunders lys reduserte viabiliteten ytterligere til 46 % i PCI behandlede celler (0,5  $\mu\text{g/ml}$  saporin) ( $p < 0,01$ ). PCI behandlinger med 0,2, 1 og 2  $\mu\text{g/ml}$  saporin viste den samme tendensen (Figur 4.5 A).

Saporin alene har redusert viabiliteten med 11-19 % med økende konsentrasjon (Figur 4.5 B). Den reduserte viabiliteten er større med PCI-behandling, da den er redusert fra 36-64 % med økende saporinkonsentrasjon ved 80 sekunders lysbehandling (Figur 4.5 B).

#### ***4.3.3 Saporin toksisitet***

For å undersøke om den økte effekten etter PCI av saporin var et resultat av PCI effekt (frigjøring av toksinet fra endocytiske vesikler) og ikke av saporin toksisiteten alene ble det utført forsøk der protokollen for PCI behandlingen ble benyttet uten tilsetning av fotosensitizer. ZR-75-1 cellene sådd ut i 96-brønnersbrett og inkubert med saporin fra 0,2  $\mu\text{g/ml}$  til 10  $\mu\text{g/ml}$ . Dagen etter saporin inkuberingen (etter 18 timer) ble cellene vasket og den fjerde dagen ble cellenes viabilitet undersøkt ved hjelp av MTT-assay.

Som også observert i tidligere publikasjoner (Lai et al. 2008) synker viabiliteten i saporin behandlede celler med økende saporinkonsentrasjoner (Figur 4.6). Ved 8 og 10  $\mu\text{g/ml}$  saporin er viabiliteten redusert signifikant med henholdsvis 26 og 23 % ( $p = 0,002$  for 8  $\mu\text{g/ml}$  og  $p = 0,008$  ved 10  $\mu\text{g/ml}$  saporin). Viabiliteten i celler behandlet med 0,5  $\mu\text{g/ml}$  saporin, som er den konsentrasjonen brukt i PCI, reduserte med ikke signifikante 2 % (Figur 4.6).

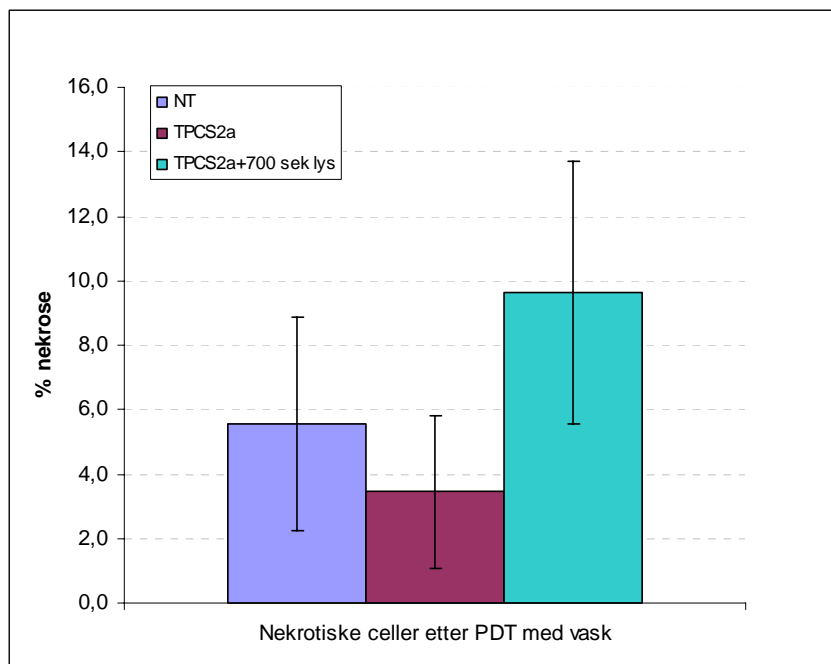


Figur 4.6. Celletoksisitet etter saporin behandling av ZR-75-1 cellene. Relativ viabilitet (%) ble beregnet i forhold til ubehandlede celler ved hjelp av MTT-assay. Gjennomsnittsverdi av seks paralleller +/- standardavvik.

#### 4.4. PDT induisert nekrose

Som beskrevet i Materialer og Metoder ble propidium jodid (PI) brukt til å detektere nekrotiske celler ved hjelp av fluorescence mikroskopi. PDT behandlede celler ble talt 1 time etter lysbehandling og prosentandel nekrose ble beregnet i forhold til antall talt celler.

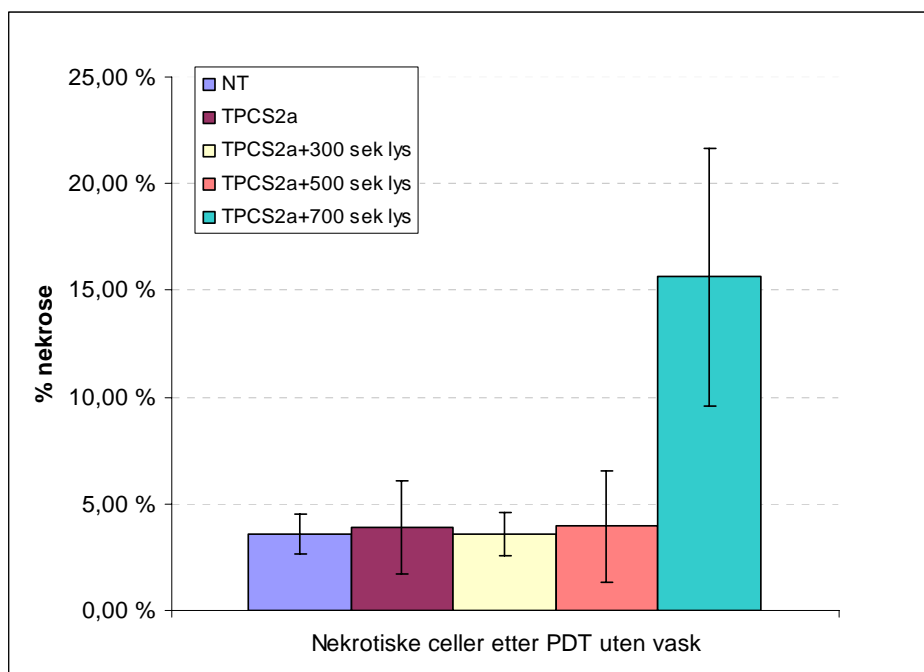
Celler behandlet med TPCS<sub>2a</sub> og 300 sekunders lys hadde ikke mer enn 4 % ( $p = 0,55$ ) høyere nekrose andel enn ubehandlede celler. Det ble derfor forsøkt å øke lysdosen for å kunne estimere hvor store lysdoser som krevdes for å inducere nekrose etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT. PDT indiserte nekrose i ZR-75-1 cellene først når lysdosen ble økt til 700 sekunder (Figur 4.7). Selv ved en så høy lysdose var imidlertid ikke nekroseandelen signifikant høyere enn i de ubehandlede cellene ( $p = 0,17$ ).



Figur 4.7. Nekrose i ZR-75-1 celler etter PDT behandling. Andelen nekrose ble beregnet i forhold til totalt antall celler. Gjennomsnitt av fire paralleller +/- standardavvik.

Nekrose kan stimuleres med PDT ved at konsentrasjonen av fotosensitizeren på plasmamembranen økes ved belysningstidspunktet (Piette et al. 2003). Dette ble benyttet i ZR-75-1 cellene ved å ikke vaske cellene etter 18 timers inkuberingen med fotosensitizeren.

Selv ved betingelser hvor det er forventet mer fotokjemisk skade på plasmamembranen kan det ikke ses noe forhøyet nekrose fraksjon før ved 700 sekunders lysbehandling (Figur 4.8). PDT med 700 sekunder lysbehandling induerte imidlertid under disse betingelsene en signifikant økning i nekrotisk fraksjon fra ca 4 % PI positive ubehandlede celler til ca 15 % ( $p = 0,008$ ).



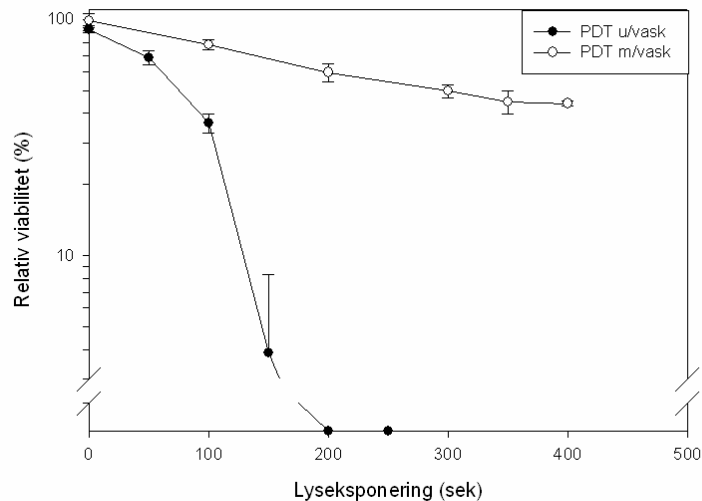
Figur 4.8. PDT induisert nekrose uten vask. Nekroseandelen ble beregnet i forhold til totalt antall celler. Gjennomsnitt av fire paralleller +/- standardavvik.

#### **4.4.1. Cellulær overlevelse etter behandling med PDT, med og uten vask**

Forsøkene over viste at med vask måtte veldig høye doser til for induere nekrose. Selv uten vask var nekrotisk fraksjon kun ca. 15 %. Derfor var det interessant å undersøke hvor stor fraksjonen for nekrose var i forhold til den totale celledøden.

PDT-behandlede celler ga en redusert viabilitet for både vaskede og uvaskede celler avhengig av lysdosene (Figur 4.9). Resultatene viser en vesentlig høyere følsomhet for lys i uvaskede celler. Når cellene ikke ble vasket ble viabiliteten redusert til 36 % etter 100 sekunders lys, mens vasking av cellene resulterte i 78 % viabilitet med samme lysdose. Siden viabiliteten er langt lavere enn nekrosefraksjonen indukerer resultatene at cellene gjennomgår en annen type celledød enn nekrose.

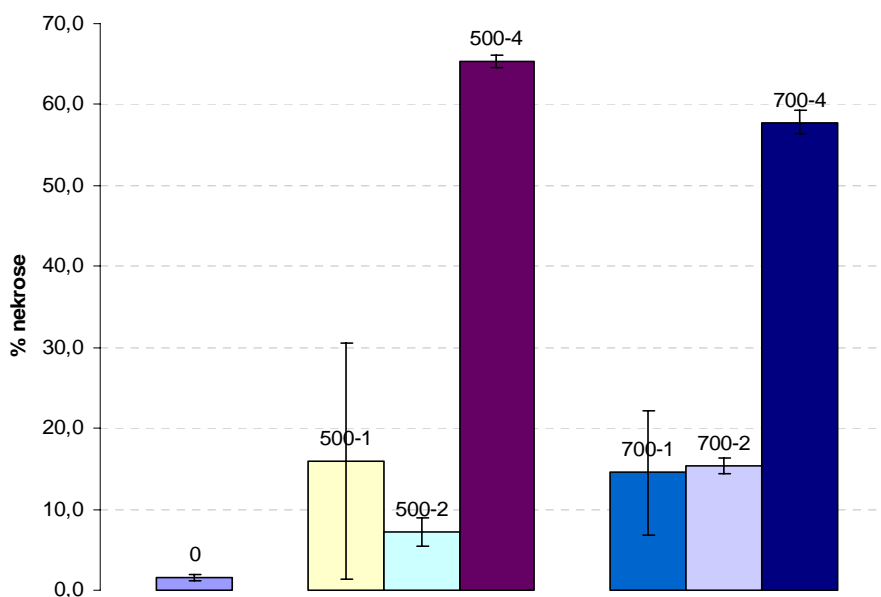




Figur 4.9. Celleviabiliteten etter PDT behandlede ZR-75-1 celler både med (m/vask) og uten vask (u/vask). Den relative viabiliteten ble beregnet i forhold til ubehandlede celler ved hjelp av MTT-assay og lyseksponeeringen ble beregnet i sekunder. Gjennomsnitt av 6 paralleller +/- standardavvik.

#### 4.4.2. Undersøkelse av primær og sekundær nekrose

Fare for falsk deteksjon av nekrose (sekundær nekrose) er stor in vitro da cellefragmenter etter andre typer celledød også blir farget med PI. For å være sikker på at resultatet i 4.4. kommer av primær nekrose og ikke sekundær nekrose ble andelen nekrotiske celler også telt 2 og 4 timer etter bestråling i tillegg etter 1 time. Stolpediagrammet i Figur 3.10 viser klart at nekrose målt ved PI opptak øker signifikant 4 timer etter belysningen både etter 500 ( $p < 0,01$ ) og 700 ( $p < 0,01$ ) sekunders lys i forhold til ubelyste celler. To timer etter belysning ga også signifikante forskjeller i forhold til ubelyste celler behandlet med fotosensitizer. Det var ingen signifikant forskjell i antall PI positive celler 1 time etter lys. Disse resultatene gir indikasjoner på at den observerte nekrosefraksjonen først observert er primære, mens etter fire timer forekommer sekundær nekrose.



Figur 4.10. Mikroskopering av ZR-75-1 celler etter 1, 2 og 4 timer etter PDT behandlingen uten vask. Det første tallet viser til lysdosen i sekunder, mens det andre tallet viser antallet timer mikroskopering ble utført etter PDT behandlingen. Gjennomsnitt av to paralleller +/- standardavvik.

#### **4.5 PDT induisert apoptose**

Apoptose, som beskrevet i Innledningen (1.3.2.), er en programmert og kontrollert form for celledød. Apoptose initieres ved aktivering av en rekke signalveier som resulterer i cellulære morfologiske endringer. Disse endringene benyttes for å undersøke om celler gjennomgår apoptose.

##### **4.5.1. Kjernekonversering i Jurkat celler etter CPT behandling**

Camptothecin (CPT) inducerer apoptose i Jurkat celler ved å hemme DNA topoisomerase I, og dermed inducerer kjedebrudd i DNA (Hortelano et al. 2002). Disse cellene ble brukt som positiv kontroll for apoptose i Western blot analysen.

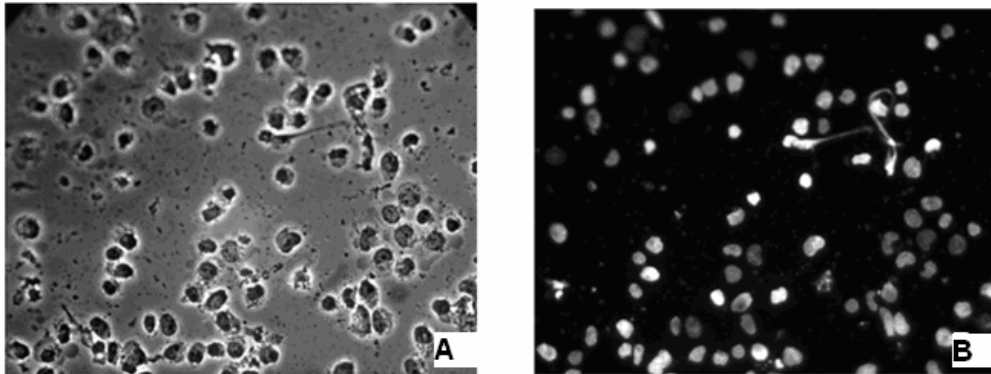
En mye benyttet metode for å undersøke om PDT inducerer apoptose er å farge cellene med Hoechst 33342. Celler som gjennomgår apoptose får flere morfologiske forandringer, blant dem kjernekonversering. Hoechst 33342 penetrerer intakte

membraner og binder seg til DNA i cellekjernen i viable celler og kan detekteres med fluorescence mikroskopi. Dette gjør det enkelt å skille mellom kondenserte og fragmenterte apoptotiske celler og normale celler.

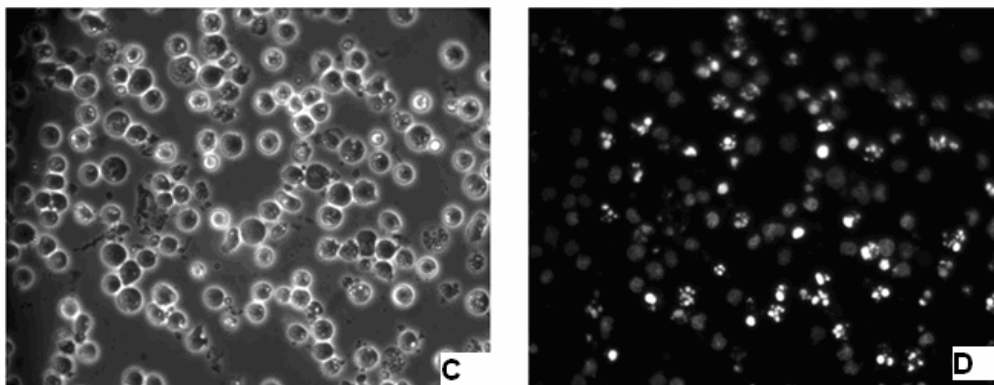
For å kontrollere induksjonen av apoptose i Jurkat celler ble cellene inkubert i serumfritt medium tilsatt CPT i 4 timer. Deretter ble cellene farget med Hoechst 33342 og mikroskopert og tatt bilde av som beskrevet i Materialet og Metoder.

Jurkat celler inkubert i serumfritt medium viste i liten grad DNA-kondensering i cellekjernene (Figur 4.11 B), mens Jurkat celler inkubert i serumfri medium tilsatt CPT viste en høyere andel DNA-kondenserte cellekjerner (Figur 4.11 D). Denne induseringen av apoptose skyldes CPT og ikke inkuberingen av Jurkat cellene i serumfritt medium. Strukturen på cellekjernen i apoptose ble benyttet som erfaringsgrunnlag for mikroskopisk deteksjon av apoptose. I tillegg ble CPT-behandlede Jurkat celler benyttet som positiv kontroll for apoptose i Western blotting.

Uten CPT



Med CPT



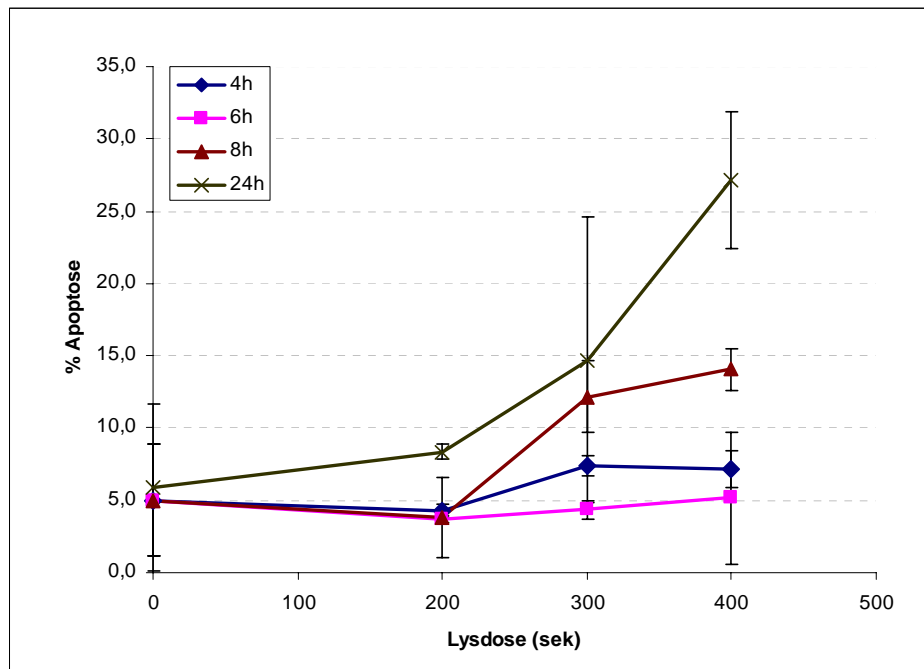
Figur 4.11. Jurkat celler behandlet med CPT i C og D. A og C viser fasekontrast, mens B og D viser fluorescence av Jurkat cellene inkubert med Hoechst.

#### ***4.5.2 Mikroskopering av apoptotiske celler***

For å detektere graden av induisert apoptose etter PDT ble ZR-75-1 cellene inkubert med Hoechst 33342 og PI etter PDT behandling som beskrevet i Materialer og Metoder. Andelen av nekrotiske celler målt med PI var lav, rundt det samme som er sett ovenfor i 4.4.

PDT-behandlingen ga en generell økning i antallet apoptotiske celler med økende lysdoser (Figur 4.12). Apoptosefraksjonen økte også med økende tid etter PDT-behandling. Antallet apoptotiske celler 4 og 6 timer etter belysning var under 10 %. Først 8 timer etter PDT-behandlingen økte antallet apoptotiske celler opp mot 15 % ved 400 sekunders lys. Den høyeste andelen apoptotiske celler ble oppnådd etter 24

timer, opp mot 15 % ved 300 sekunders lys og ca. 27 % ved 400 sekunders belysning. Prosentandelen apoptose etter 200 sekunders belysning var på samme nivå som kontrollene bortsett fra celler mikroskopert 24 timer etter PDT-behandling.



Figur 4.12. Kondenserte cellekjerner etter PDT behandling. ZR-75-1 cellene ble mikroskopert etter forskjellige timer (h) etter PDT behandlingen med vask. Deretter ble cellene inkubert med Hoechst 33342 og antall apoptotiske celler ble talt, prosent andel apoptose ble beregnet i forhold til totalt antall celler. Gjennomsnittet av to paralleller +/- standardavvik.

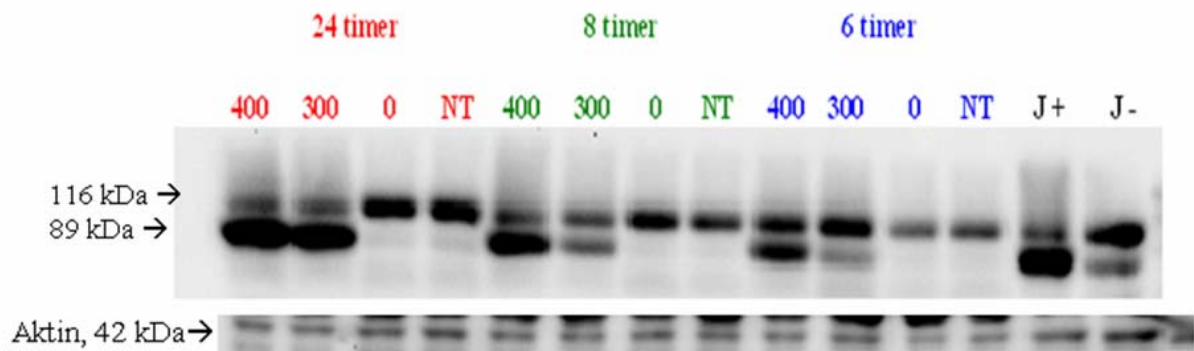
#### 4.5.3. Western blot analyse av PARP for bestemmelse av apoptose

PARP er en av flere proteiner som kløves av aktiv caspase-3 ved apoptose (Boulares et al. 1999). For å undersøke på proteinnivå mekanismene som blir satt i gang etter PDT ble kløving av PARP undersøkt med Western blotting.

For å analysere hvorvidt PARP ble kløvet etter PDT ble ZR-75-1 cellene lysert ved forskjellige tidspunkter etter belysning. Apoptose er en mer langsom prosess i forhold til nekrose etter PDT og spesielt langsom med lysosomalt lokaliserte fotosensitizere

(Noodt et al. 1999). Som beskrevet ovenfor kunne det ikke detekteres PDT induisert kjernekonddensering 4 timer etter belysning. Med dette som bakgrunn ble ZR-75-1 cellene lysert henholdsvis 6, 8 og 24 timer etter belysning for å undersøke PARP kløving via Western blot. Ukløvet PARP er 116 kDa. Kun en av de to kuttete delene av PARP kunne detekteres med antistoffet som var brukt, og den hadde størrelse på 89 kDa. Dette var i samsvarer med forsøk der PARP kløving er blitt undersøkt ved hjelp av Western blotting (Kuhara et al. 2008).

Fire timer etter PDT kunne det ikke ses noen PARP kløving i ZR-75-1 cellene (ikke vist). PARP ble midlertidig tydelig kløvet i Jurkat celler etter behandling med CPT (Figur 3.13). Seks timer etter belysning av ZR-75-1 cellene ble en svak kløving av PARP i celler belyst med 300 sekunder sett og en betydelig kløving av PARP ble observert etter 400 sekunders belysning. Det samme ble observert for celler lysert 8 timer etter belysning, men båndene her var i tillegg sterkere i forhold til cellene lysert etter 6 timer. I celler lysert 24 timer etter belysning var kløvingen av PARP meget sterk ved begge lysdosene som ble undersøkt. Også her ble PARP kløvet i større grad i celler belyst i 400 sekunder enn celler belyst i 300 sekunder.

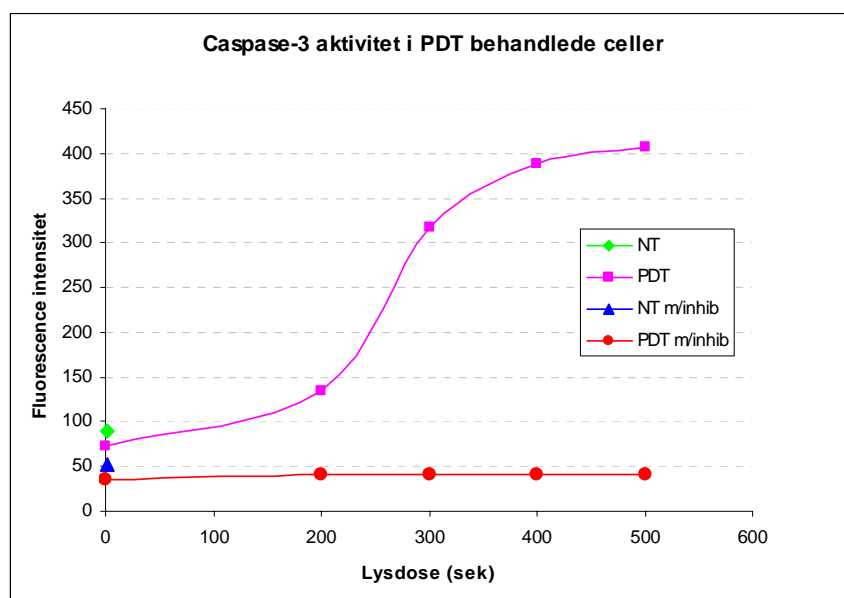


Figur 4.13. Western Blot analyse av PARP kløving. NT; ubehandlede celler, J+; Jurkat behandlet med CPT i serumfritt medium, J-; Jurkat celler kun inkubert i serumfritt medium. Tallene indikerer sekunder belysning med vask. PARP (116 kDa) kløves i to deler der kun en er detekterbart (89 kDa). Aktin ble brukt som kontroll for loadingen.

#### 4.5.4. Caspase-3 aktiviteten i PDT behandlede celler

Det viste seg å være vanskelig å detekttere kløvet og aktivert caspase-3 ved hjelp av Western blot. Caspase-3 aktiviteten ble derfor undersøkt med EnzChek Caspase-3 Assay Kit # 1 som detekterer enzymatisk caspase-3 aktivitet. Celleekstrakter fra PDT behandlede ZR-75-1 cellene ble som beskrevet i Materialer og Metoder tilsatt Z-DEVD-AMC substratet som ved kutting med caspase-3 gir fluorescence som benyttes til å kvantifisere caspase-3 aktivitet. For å være sikker på at det er caspase-3 som gir denne kuttingen blir det laget kontroller med Ac-DEVD-CHO, en hemmer av caspase-3 liknende proteaser.

Figur 4.14 viser fluorescence intensiteten fra celleekstraktene som resultat av caspase-3 aktivitet. PDT-behandlede celler viser klart en caspase-3 aktivitet. Denne aktiviteten øker med økende lysdose, i samsvar med undersøkelsene av kjernekonkondensering og PARP kløving.



Figur 4.14. Caspase-3 aktivitet i PDT behandlede ZR-75-1 celler med vask. Fluorescence intensiteten økte med økende kutting av Z-DEVD-AMC som er en substrat for caspase-3 lignende proteaser. Inhibitoren Ac-DEVD-CHO ble tilsatt PDT behandlede celler for å bestemme om den målte fluorescensen var spesifikk for caspase-3 aktiviteten. Dette er et representativt forsøk av tre paralleller der doseresponsen er den samme. NT; ubehandlede celler, m/inhib; prøver tilsatt Ac-DEVD-CHO.

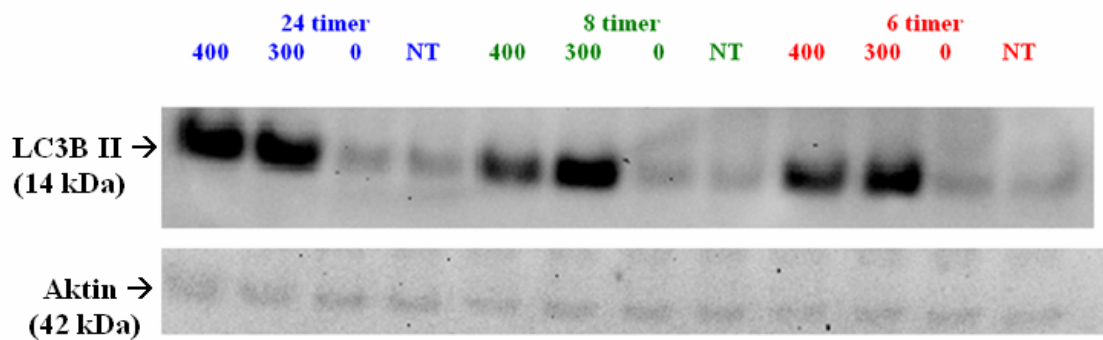
Det er ingen forandringer i fluorescence intensiteten fra prøver tilsatt Ac-DEVD-CHO inhibitor. Grafen viser en liten aktivitet av caspase-3 i kontrollcellene, celler ikke tilsatt fotosensitizer og celler tilsatt fotosensitizer uten lysaktivering. Til og med denne aktiviteten blir hemmet ved tilsetningen av Ac-DEVD-CHO inhibitoren. Dette tilsier at aktiviteten som er sett i PDT behandlede celler kan relateres til aktiviteten av caspase-3.

#### ***4.6. PDT induisert Autofagi***

Som nevnt i Innledningen (1.3.3.) kan en celle i tillegg til å dø via apoptose eller nekrose også dø via autofagi. Autofagosomer som fusjonerer med lysosomer og fordøyer innholdet i autofagosomene er en av mekanismene i autofagi. Omdannelsen av LC3 I (16 kDa) til LC3 II (14 kDa) skjer når autofagosomene dannes. Western blot analyse ble gjort for å se hvorvidt dette proteinet blir omdannet i TPCS<sub>2a</sub>-PDT behandlede ZR-75-1 celler.

Økende LC3B-II omgjøring ble observert med økende tid etter belysning (Figur 4.15). Båndene for LC3B-II var sterkere for celler lysert 24 timer etter PDT-behandlingen i forhold til henholdsvis både 6 og 8 timer etter PDT. Ubehandlede celler (NT og 0) viste veldig svake bånd uavhengig av når cellene ble lysert. Resultatene for celler lysert 6 og 8 timer etter PDT viser noe større andel av LC3B II omdannelse etter 300 sekunders lys enn etter 400 sekunder.





Figur 4.15. Omgjøring av LC3B II (14 kDa) etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT behandlede ZR-75-1 celler. NT; ubehandlede celler, 0; celler behandlet med 0,2 µg/ml TPCS<sub>2a</sub> uten lys, 300 og 400; indikerer antall sekunder cellene ble belyst etter vask.

## 5. DISKUSJON

### *5.1. Sammenligning av PDT og PCI behandlingen*

PDT og PCI er spesifikke behandlingsformer innefor kreft da fotosensitizerer akkumuleres i høyere grad i tumorvev (el-Far and Pimstone 1986) i tillegg til begrensningen av målområdet ved at kun tumor blir belyst. Den cytotoksiske effekten av PDT og PCI er godt dokumentert i tidligere publikasjoner (Sasnauskiene et al. 2009; Selbo et al. 2006) og er i ovenstemmelse med cytotoksiske effekter som er observert på ZR-75-1 cellene i denne oppgaven (Figur 4.4). Begge behandlingsformene har cytotoksiske effekter i lys- og konsentrasjonsområder som ikke ville forårsake uønsket toksisitet da lys alene, saporin alene, fotosensitizer alene eller en kombinasjon av fotosensitizer og saporin uten lysbehandling ikke viste cytotoksiske effekter på ZR-75-1 cellene. Dette er fordelaktig i forhold til klinisk betingelse da både fotosensitizeren og legemidlet (i vårt tilfelle saporin) administreres systemisk og derfor kan akkumuleres i normalvev i noen grad.

Behandlingen med PCI ga bedre resultater enn behandling med PDT (Figur 4.4), noe som også har blitt observert i andre studier (Selbo et al. 2006). I forhold til behandling med PDT må en langt høyere lysdose til for å drepe samme antall celler enn for behandling med PCI (Figur 4.4). Med hensyn på effektivitet i behandlingene er PCI i større grad hensiktsmessig og brukervennlig da belysningstiden er lavere og samtidig mer effektiv i forhold til PDT.

PCI av saporin var mer effektiv med økende saporinkonsentrasjoner opptil 2 µg/ml (Figur 4.5). For å undersøke i hvor stor grad PCI øker den cytotoksiske effekten av saporin var det ønskelig å undersøke om høyere doser av saporin alene kunne indusere cytotoksiske effekter. Saporintoksisiteten viste seg å øke svakt med økende konsentrasjon (Figur 4.6), men selv med den høyeste saporin konsentrasjonen (10 µg/ml) var celleviabiliteten ikke sunket med mer enn ca. 20 %.

Saporinkonsentrasjonene (0,2 – 2 µg/ml) som ble brukt i PCI behandlingene resulterte i en mindre nedgang i viabiliteten (< 20 %). Dette viser at saporin er svært lite cytotoxisk alene, men i kombinasjon med fotosensitizeren TPCS<sub>2a</sub> induseres det en betydelig toksitet som kommer av at de saporinholdige endocytiske vesiklene ødelegges av ROS og saporin slippes ut i cytosol hvor den utøver sin cytotoxiske effekt.

### ***5.2. Intracellulær lokaliseringen av TPCS<sub>2a</sub> er av betydning for celledøden***

Den intracellulær lokaliseringen av fotosensitizerer har vist seg å være av betydning for effekten av PDT-behandlingen (Kuhara et al. 2008; Luo and Kessel 1997; Sasnauskiene et al. 2009). Med hensyn til at TPCS<sub>2a</sub> lokaliseres på endosomale/lysosomale membraner (Figur 4.3) kan PDT-effekten ha blitt induert av skade på disse membranene. Det er blitt vist at skade på lysosomer gir forskjellige celledød avhengig av hvorvidt skaden har ført til en partielle eller en full permeabilitet av lysosomene (Guicciardi et al. 2004). Store skader fører til en full permeabilitet av lysosomene og ender opp i nekrose, mens en moderat skade som fører til partiell permeabilitet av lysosomene inducerer hovedsakelig apoptotisk celledød. Dette kan kobles opp mot tidligere publikasjoner som har vist at høye PDT doser fører til nekrose, mens lave eller moderate PDT doser har ført til apoptose (Nagata et al. 2003). Dette har også vært tilfelle for TPCS<sub>2a</sub>-PDT der høye lysdoser har vist tendenser til nekrose og lavere lysdoser har ført hovedsakelig til apoptose.

Tiden det tar før apoptose assosierte endringer i proteiner blir observert etter PDT avhenger av fotosensitizerens lokalisering intracellulært (Granville et al. 1998; Matroule et al. 2001; Sasnauskiene et al. 2009). PDT behandlede celler med den mitokondrie-lokaliserende fotosensitizeren BPD-MA (Granville et al. 1998) og PPME (lokaliseres både i endoplasmatiske retikulum, Golgi apparatet og lysosomene) (Matroule et al. 2001) viste en rask caspase-3 aktivering og PARP kløving, henholdsvis to og en time etter lyseksponeringen. Imidlertid tok det lengre tid (6 timer post-PDT) før TPCS<sub>2a</sub>-PDT behandlede ZR-75-1 cellene viste apoptotisk-assosierte endringer som kløving av PARP (Figur 4.13) og kjernekonddering (Figur 4.12).

### **5.3. TPCS<sub>2a</sub>-PDT induserer nekrose i liten grad**

Det er tidligere rapportert at celler dør i økende grad via nekrose med økende PDT doser (Chernyak et al. 2006; Luo and Kessel 1997; Nagata et al. 2003), noe som også viste seg å være tilfelle for TPCS<sub>2a</sub>-PDT i ZR-75-1 celler, men ved en ganske lav fraksjon på ca. 10 % (Figur 4.7). Dette kan komme av at med vaskeprotokollen så fjernes det meste av fotosensitizeren fra plasmamembranen som har vist seg å være det viktigste skadestedet med hensyn til induksjon av nekrose (Piette et al. 2003).

PDT-behandling med den lysosomal-lokaliserende fotosensitizeren ATX-S10(Na) induserte nekrose etter PDT doser som tilsvarer ca. 99 % cytotoxisk dose (Nagata et al. 2003). Den lave nekrosefraksjonen etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT kan komme av at de undersøkte lysdosene (500 og 700 sekunders lys) ga mindre enn 99 % celledrap. Etter 400 sekunders belysning i nærvær av TPCS<sub>2a</sub> ble viabiliteten redusert med ca 45 % (Figur 4.9). Undersøkelse av høyere lysdoser hadde vært interessant for TPCS<sub>2a</sub>-PDT, men ikke i forhold til PCI da en så høy dose ikke er relevant med hensyn til den ønskede effekten.

For å undersøke muligheten for å indusere nekrose med TPCS<sub>2a</sub>-PDT ble cellene behandlet med lys uten å inkubere cellene i fotosensitizer-fritt medium før lys. Selv under disse betingelsene ble kun 15 % detektert som nekrotiske (Figur 4.8). Denne lave fraksjonen kan komme av at en stor fraksjon av TPCS<sub>2a</sub> er lokalisert i endocytiske vesikler. Nekrotisk fraksjon økte fra 10 til 15 % ved å fjerne vaskeprosedyren før lys. Nekrose skyldes trolig fotosensitizerens lokalisering på plasmamembranen. Nekrose som oppstår etter PDT hvor vaskeprosedyren er inkludert kan også skyldes fotosensitizerens lokalisering på plasmamembranen. Den kan imidlertid også komme av stor skade på lysosomene da store skader på lysosomene kan ha ført til en full permeabilitet av lysosomene og dermed en rask frigjøring av lysosomale enzymer som har vist å indusere nekrose (Guicciardi et al. 2004).

Den lave nekrose fraksjonen i forhold til den totale celledøden kommer trolig av at ZR-75-1 cellene dør av andre celledøds mekanismer enn nekrose ved TPCS<sub>2a</sub>-PDT. Noodt et. al har vist en høy apoptotisk fraksjon med TPPS<sub>2a</sub>-PDT (Noodt et al. 1999). Som påpekt i Innledningen (1.1.2) er TPCS<sub>2a</sub> og TPPS<sub>2a</sub> strukturelt ganske like noe som gir en pekepinn på at også TPCS<sub>2a</sub>-PDT i større grad inducere apoptose.

Nekrosen som er blitt observert i Figurene 4.7 og 4.8 kan være et resultat av sekundær nekrose da forsøkene er gjort in vitro hvor makrofager ikke er tilgjengelige for fjerning av for eksempel apoptotiske cellefragmenter som kan gi falske indikasjoner på nekrose. Nekrotisk fraksjon økte imidlertid betydelig mellom to fire timer etter PDT-behandlingen (Figur 4.10). Det er derfor sannsynlig at tidligfase nekrose (1-2 timer etter PDT) skyldes primær nekrose, mens den økte andelen 4 timer etter PDT kan kobles til sekundær nekrose.

#### ***5.4. TPCS<sub>2a</sub>-PDT inducerer apoptose***

Flere publikasjoner har tatt for seg apoptose etter PDT-behandling (Fabris et al. 2001; Noodt et al. 1999; Reiners, Jr. et al. 2002). Disse har vist at PDT inducerer apoptose ved forskjellige mekanismer alt avhengig av blant annet fotosensitizer (dets lokalisering intracellulært), PDT doser og tiden etter PDT-behandling. For TPCS<sub>2a</sub>-PDT har tiden etter PDT-behandling spilt en stor rolle for apoptose deteksjon. Andel apoptotiske celler økte med økende tid etter PDT behandling (Figur 4.12). I forhold til nekrose er apoptose en langsom prosess da en del kaskadereaksjoner må gjennomgås. I tillegg har lokaliseringen av fotosensitizeren vist seg å være av betydning for initieringen av apoptose (Noodt et al. 1999). Fotosensitizerer som lokaliseres hovedsakelig i endosomer/lysosomer viser en relativ sen aktivering av apoptose.

I tillegg til kjernekonkondenseringen ble caspase-3 aktivert og PARP kløvet, begge avhengige av lysdosen og inkubasjonstiden etter PDT (Figur 4.13 og 4.14). Tidligere publikasjoner har vist at PARP kløving er caspase avhengig (Ame et al. 2004). Denne kløvingen viser seg å være katalysert direkte av caspase-3 (Boulares et al. 1999). Den

økende kløvingen av PARP kan dermed kobles til den økende aktiveringen av caspase-3 sett etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT.

Apoptose er tidligere vist å være den viktigste formen for celledød etter TPPS<sub>2a</sub>-PDT (Noodt et al. 1999). Dette kan også være tilfelle for TPCS<sub>2a</sub>-PDT da nekrose synes å spille en liten rolle, mens apoptose synes å være den dominerende formen for celledød (Figur 4.9 og 4.12). På grunn av singlett-oksygenets korte liv og diffusjonslengde (Berg et al. 2005) er det sannsynlig at oksidasjonsskadene etter PDT forekommer primært på endosomene og lysosomene da TPCS<sub>2a</sub> har vist å lokaliseres der (Figur 4.3). En mulig apoptotisk vei for ZR-75-1 cellene etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT er en lysosomal mediert apoptose. Skader på lysosomer har vist caspase-3 aktivering i tillegg til kløving av Bid og cytochrom C frigjøring (Reiners, Jr. et al. 2002). Apoptose etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT behandlingen kommer sannsynlig av at skade på lysosomene gir en partiell permeabilisering. De lysosomale enzymene som blir frigjort med tiden medierer sannsynlig apoptose ved å kløve Bid (Guicciardi et al. 2004). Kløving av Bid gir tBid som translokteres til mitokondriene hvor den er med på å frigjøre cytochrom C. Cytochrom C frigjøringen setter i gang en kaskade av reaksjoner der caspase-3 aktivering og PARP kløving er involvert som beskrevet i Innledningen (1.3.2) (Ortel et al. 2009).

Frigjøring av cathepsiner er med på induseringen av apoptose, men muligens i liten grad etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT da cathepsiner skades av PDT (Berg and Moan 1994) og Stefiner (små cystein proteinase hemmere) i cytosol binder cathepsinene og hemmer deres effekt (Lenarcic et al. 1996). Apoptoseinduksjon etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT i ZR-75-1 cellene kan også komme av skade på andre celleorganeller. TPPS<sub>2a</sub> er vist å relokiseres til endoplasmatisk retikulum etter lys eksponering av celler (Rodal et al. 1998). Dette kan også være tilfelle for TPCS<sub>2a</sub>. Skade på endoplasmatisk retikulum er dokumentert å indusere apoptose så vel som nekrose (Matroule et al. 2001). En argument for medieringen av apoptotisk celledød via endoplasmatisk retikulum-skade istedenfor lysosomal skade er at TPCS<sub>2a</sub>-PDT kan ha skadet de lysosomale enzymene da dette har vært vist med TPPS<sub>2a</sub>-PDT (Berg and Moan 1994). Hvorvidt skaden har ført til total skade på enzymene avhenger av ratio mellom bundet fotosensitizer til

membranen og fotosensitizer i matrix. Lokalisering i større grad i matrix er assosiert med økt PDT-indusert skade på cathepsinene. En liten uskadet og uhemmet fraksjon av lysosomale enzymer kan likevel ha ført til den overnevnte Bid kløvingen.

Apoptose initieringen etter skade på endoplasmatisk retikulum kan videre ha skadet mitokondriene og ført til frigjøring av cytochrom C etterfulgt av caspasekaskadeaktiveringer som ender i cellens død via apoptose (Berg and Moan 1994; Matroule et al. 2001).

Ubehandlede celler har vist en bakgrunns-apoptose på ca. 5 % (Figur 4.12). Disse kan være nekrotiske celler som har også gitt positiv utslag på kjernekonkondensering da andelen nekrose målt med PI farging kun ble kontrollert for å dokumentere at nekrotisk fraksjon var i forventet område og ikke kontrollert for hver enhet apoptotisk celle.

### ***5.5. TPCS<sub>2a</sub>-PDT indusert autofagi***

Autofagi kan i tillegg til å redde en skadet celle føre til celledød (Scarlati et al. 2009). Celler som dør ved autofagi kan dø direkte av autofagi ved autofagisk celledød eller som oppstrøms eller nedstrøms til apoptose og føre til celledød. I tillegg kan autofagi og apoptose samarbeide om induksjon av celledød. På samme måte som apoptose er autofagi både avhengig av lysdose og tiden etter PDT-behandling (Figur 4.15).

Transformasjonen av LC3B-I til LC3B-II som er assosiert med autofagosomdannelser var noe høyere i de svakeste lysdosene etter både 6 og 8 timer etter PDT. Disse resultatene kan tolkes som en indikasjon på at autofagi induseres raskere enn apoptose i ZR-75-1 cellene etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT og muligens være oppstrøms for apoptose.

Relativ betydning av autofagi som celledøds mekanisme kan ikke estimeres fra de forsøkene som ble utført i denne studien. Fraksjonen apoptose var ikke større enn 27 % ved en cytotoxisk dose på ca. 50 % (Figur 4.12 og 4.9) noe som kan tyde på at celledødsfraksjonen via autofagi kan være i underkant av fraksjonen for apoptose.

Publikasjonene som har tatt for seg autofagi etter PDT-behandling har vist en transformasjon av LC3-I til LC3-II (Kessel et al. 2006b; Sasnauskiene et al. 2009). Dette har ikke vært observert i ZR-75-1 cellene etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT, da kun et bånd ble detektert (Figur 3.15). Dette båndet har blitt korrelert med LC3B-II (14 kDa) da vekten var under 15 kDa, mens LC3B-I (16 kDa) ikke ble observert.

### ***5.6. Fordeler og ulemper med de forskjellige celledødsmechanismene***

Både fordeler og ulemper er forbundet med de forskjellige celledødsmechanismene. En autofagisk respons kan både bli sett på som positivt og negativt i forhold til celledød da den både kan være en reddende mekanisme eller føre til celledød (Kroemer and Jaattela 2005). Det er nødvendig å undersøke mer om hvilke doser og betingelser som fører til autofagi induert celledød.

Nekrose kan være fordelaktig i forbindelse med den immunresponsen som er observert etter PDT som kan føre til en vaksinasjonslignende effekt (Ortel et al. 2009; van Duijnhoven et al. 2003). Samtidig kan nekrose være negativt med hensyn til induseringen av inflammasjon som kan føre til bivirkning hos en pasient (Chernyak et al. 2006). Apoptotisk celledød er i mange tilfeller ønskelige med hensyn på en liten inflammsjonsinduksjon da cellene pakkes i apoptotiske bodies (Edinger and Thompson 2004). Samtidig kan det være fare for at den immunresponsen assosiert med nekrose være fraværende. Nye studier viser at apoptose kan bidra til immustimulerende effekter (Tesniere et al. 2008). Ytterligere studier er nødvendig for å vurdere dette med hensyn til immunresponsen etter PDT.



## 6. KONKLUSJONER

Behandling i ZR-75-1 cellene med PDT og PCI induerte cytotoksiske effekter målt som redusert viabilitet. PCI av saporin var mer effektiv enn PDT da den ga celledød ved lavere lysdoser i forhold til PDT.

Det ble foretatt undersøkelse av TPCS<sub>2a</sub>-PDT induert celledød med spesielt hensyn til nekrose, apoptose og autofagi. TPCS<sub>2a</sub>-PDT i ZR-75-1 cellene har vist i liten grad å induere nekrotisk celledød. Apoptotisk celledød har vist seg dominerende i den undersøkte fotosensitizerens konsentrasjon- og lysdose-skala. I tillegg har autofagi blitt induert etter TPCS<sub>2a</sub>-PDT.

Denne kunnskapen kan benyttes i PCI med TPCS<sub>2a</sub> med hensyn på hvilke makromolekyl som bør velges. En immunostimulerende legemiddel kan være til fordel da celledøden via nekrose var fraværende i den undersøkte lysdosen. Ytterligere studier hvor TPCS<sub>2a</sub>-PDT blir undersøkt i andre cellelinjer med hensyn på den induerte celledøden er nødvendig.

## REFERANSER

Abraham J and Altaha R. (2007). *ESSENTIALS OF CLINICAL ONCOLOGY*. Marsh R.D.W. and Samuel J. (eds). Jaypee Brothers Medical Publishers (p) Ltd: New Delhi, pp. 505-613.

Ahmad N, Gupta S, Feyes DK and Mukhtar H. (2000). *J Invest Dermatol*, **115**, 1041-1046.

Ahn WS, Bae SM, Huh SW, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, Kim CK, Kim JK and Kim YW. (2004). *Int J Gynecol Cancer*, **14**, 475-482.

Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP and Duarte CB. (2004). *Biochim Biophys Acta*, **20;1704**, 59-86.

Ame JC, Spenlehauer C and de MG. (2004). *Bioessays*, **26**, 882-893.

Berg K and Moan J. (1994). *Int J Cancer*, **59**, 814-822.

Berg K, Selbo PK, Weyergang A, Dietze A, Prasmickaite L, Bonsted A, Engesaeter BO, ngell-Petersen E, Warloe T, Frandsen N and Hogset A. (2005). *J Microsc*, **218**, 133-147.

Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S and Smulson M. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 22932-22940.

Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR and Agostinis P. (2006). *Autophagy*, **2**, 238-240.

Chen YJ, Huang WP, Yang YC, Lin CP, Chen SH, Hsu ML, Tseng YJ, Shieh HR, Chen YY and Lee JJ. (2009). *Autophagy*, **5**, 173-183.

Chernyak BV, Izyumov DS, Lyamzaev KG, Pashkovskaya AA, Pletjushkina OY, Antonenko YN, Sakharov DV, Wirtz KW and Skulachev VP. (2006). *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 525-534.

Copley L, van der WP, Wirtz KW, Parker MI and Leaner VD. (2008). *Int J Biochem Cell Biol*, **40**, 227-235.

de Bruin KG, Fella C, Ogris M, Wagner E, Ruthardt N and Brauchle C. (2008). *J Control Release*, **130**, 175-182.

Degterev A and Yuan J. (2008). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 378-390.

- Dolmans DE, Fukumura D and Jain RK. (2003). *Nat Rev Cancer*, **3**, 380-387.
- Edinger AL and Thompson CB. (2004). *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 663-669.
- el-Far MA and Pimstone NR. (1986). *Cancer Res*, **46**, 4390-4394.
- Ericson MB, Wennberg AM and Larko O. (2008). *Ther Clin Risk Manag*, **4**, 1-9.
- Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S and Reddi E. (2001). *Cancer Res*, **61**, 7495-7500.
- Fluorescensmikroskopi.  
[http://nobelprize.org/educational\\_games/physics/microscopes/fluorescence/index.html](http://nobelprize.org/educational_games/physics/microscopes/fluorescence/index.html)  
. 2009.  
Ref Type: Art Work
- Foscan. <http://www.legemiddelhandboka.no/xml/>. 2009.  
Ref Type: Catalog
- Fretz MM, Hogset A, Koning GA, Jiskoot W and Storm G. (2007). *Pharm Res*, **24**, 2040-2047.
- Gollnick SO, Owczarczak B and Maier P. (2006). *Lasers Surg Med*, **38**, 509-515.
- Granville DJ, Carthy CM, Jiang H, Shore GC, McManus BM and Hunt DW. (1998). *FEBS Lett*, **437**, 5-10.
- Guicciardi ME, Leist M and Gores GJ. (2004). *Oncogene*, **23**, 2881-2890.
- Hogset A, Prasmickaite L, Hellum M, Engesaeter BO, Olsen VM, Tjelle TE, Wheeler CJ and Berg K. (2002). *Somat Cell Mol Genet*, **27**, 97-113.
- Hortelano S, Zeini M, Castrillo A, Alvarez AM and Bosca L. (2002). *Cell Death Differ*, **9**, 643-650.
- Ian J. Macdonald and Thomas J. Dougherty. Basic principle of photodynamic therapy. 5[2], 105-129. 8-2-2001. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*.  
Ref Type: Generic
- Ichinose S, Usuda J, Hirata T, Inoue T, Ohtani K, Maehara S, Kubota M, Imai K, Tsunoda Y, Kuroiwa Y, Yamada K, Tsutsui H, Furukawa K, Okunaka T, Oleinick NL and Kato H. (2006). *Int J Oncol*, **29**, 349-355.
- Jurkat. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx>

[?ATCCNum=TIB-152&Template=cellBiology#50685](#). 2009.

Ref Type: Catalog

Kessel D, Luo Y, Mathieu P and Reiners JJ, Jr. (2000). *Photochem Photobiol*, **71**, 196-200.

Kessel D, Vicente MG and Reiners JJ, Jr. (2006a). *Autophagy*, **2**, 289-290.

Kessel D, Vicente MG and Reiners JJ, Jr. (2006b). *Lasers Surg Med*, **38**, 482-488.

Kim R, Tanabe K, Emi M, Uchida Y and Toge T. (2005). *Cancer*, **103**, 2199-2207.

Kroemer G and Jaattela M. (2005). *Nat Rev Cancer*, **5**, 886-897.

Kuhara T, Watanabe D, Akita Y, Takeo T, Ishida N, Nakano A, Yamashita N, Ohshima Y, Kawada M, Yanagishita T, Tamada Y and Matsumoto Y. (2008). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **24**, 142-146.

Lai PS, Pai CL, Peng CL, Shieh MJ, Berg K and Lou PJ. (2008). *J Biomed Mater Res A*, **87**, 147-155.

Lenarcic B, Krizaj I, Zunec P and Turk V. (1996). *FEBS Lett*, **395**, 113-118.

Lim DS, Ko SH, Lee CH, Ahn WS and Lee WY. (2006). *Photochem Photobiol*, **82**, 600-605.

Luo Y and Kessel D. (1997). *Photochem Photobiol*, **66**, 479-483.

Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, Jolois O, Hunt DW and Piette J. (2001). *Oncogene*, **20**, 4070-4084.

Metvix. <http://www.felleskatalogen.no/>. 2009.

Ref Type: Catalog

Moor AC. (2000). *J Photochem Photobiol B*, **57**, 1-13.

Nagata S, Obana A, Gohto Y and Nakajima S. (2003). *Lasers Surg Med*, **33**, 64-70.

Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q and Nesland JM. (1999). *Br J Cancer*, **79**, 72-81.

Ortel B, Shea CR and Calzavara-Pinton P. (2009). *Front Biosci*, **14:4157-72.**, 4157-4172.

Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule JY, Habraken Y and Agostinis P. (2003). *Biochem Pharmacol*, **66**, 1651-1659.

Prosedyre fra invitrogen. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp13183.pdf>. 2009.  
Ref Type: Catalog

Reiners JJ, Jr., Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM and Kessel D. (2002). *Cell Death Differ*, **9**, 934-944.

Rodal GH, Rodal SK, Moan J and Berg K. (1998). *J Photochem Photobiol B*, **45**, 150-159.

Sasnauskiene A, Kadziauskas J, Vezelyte N, Jonusiene V and Kirveliene V. (2009). *Apoptosis*.

Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ and Codogno P. (2009). *Cell Death Differ*, **16**, 12-20.

SDS-PAGE. [http://www.molecularstation.com/no/sds-page-gel-electrophoresis/&usg=ALkJrhiN5iUseJL\\_c4DS\\_F9NmZ-zUAnPkw](http://www.molecularstation.com/no/sds-page-gel-electrophoresis/&usg=ALkJrhiN5iUseJL_c4DS_F9NmZ-zUAnPkw). 2009.  
Ref Type: Art Work

Selbo PK, Hogset A, Prasmickaite L and Berg K. (2002). *Tumour Biol*, **23**, 103-112.

Selbo PK, Weyergang A, Bonsted A, Bown SG and Berg K. (2006). *J Pharmacol Exp Ther*, **319**, 604-612.

Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L and Kroemer G. (2008). *Cell Death Differ*, **15**, 3-12.

Tian Y, Leung W, Yue K and Mak N. (2006). *Biochem Biophys Res Commun*, **348**, 413-420.

van Duijnhoven FH, Aalbers RI, Rovers JP, Terpstra OT and Kuppen PJ. (2003). *Immunobiology*, **207**, 105-113.

Western blot og Immunoblotting.  
<http://homepages.strath.ac.uk/%7EEdfs99109/BB310/WesternBlotting.html>. 2009.  
Ref Type: Art Work

Weyergang A, Selbo PK and Berg K. (2007). *Biochem Pharmacol*, **74**, 226-235.

Xue LY, Chiu SM, Azizuddin K, Joseph S and Oleinick NL. (2008). *Autophagy*, **4**, 125-127.

Zhou CN. (1989). *J Photochem Photobiol B*, **3**, 299-318.

ZR-75-1. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1500&Template=cellBiology>. 2009.

Ref Type: Catalog

## VEDLEGG

### Separating Gel

Polyacrylamid innhold (Bio-Rad)	7,5 %	10 %	12 %	12 %	15 %	15 %
dH <sub>2</sub> O	5,45 ml	4,85 ml	4,35 ml	6,5 ml	3,6 ml	5,4 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	3,75 ml	2,5 ml	3,75 ml
10%(w/v)SDS stock	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,15 ml	0,1 ml	0,15 ml
Acrylamide/bis (40% stock)	1,9 ml	2,5 ml	3 ml	4,5 ml	3,75 ml	5,55 ml
10% ammonium persulfate	50 µl	50 µl	50 µl	75 µl	50 µl	75 µl
TEMED (Bio-Rad)	5 µl	5 µl	5 µl	7,5 µl	5 µl	7,5 µl
Total monomer	10 ml	10 ml	10 ml	15 ml	10 ml	15 ml

### Stacking Gel

	1	2
dH <sub>2</sub> O	3,2 ml	6,4 ml
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml	2,5 ml
10%(w/v)SDS stock	50 µl	100 µl
Acrylamide/bis (40% stock)	0,5 ml	1 ml

10% ammonium persulfate	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<b>Total monomer</b>	<b>5 ml</b>	<b>10 ml</b>

Lyseringsbuffer:

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

2 % (w/v) SDS

10 % glycerol

50 mM DTT

0,01 % bromophenol blue

10  $\mu$ l/ml protease inhibitor cocktail (Sigma)

10  $\mu$ l/ml phosphatase inhibitor cocktail 1 (Sigma)

10  $\mu$ l/ml Phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma)

1 mM PMSF

1 mM NaVO<sub>4</sub>

1 mM NaF

20 mM  $\beta$ -glycerolphosphate

10 x runningbuffer:

30 g tris

144 g Glycine

10 g SDS alle fra Bio-Rad

1000 ml Aq.Pur.



Transferbuffer:

15,1 g Tris

71,4 g Glycin

1000 ml Metanol (Sigma)

3,75 g SDS

Aq.Pur. opptil 5 liter

TTBS:

890 ml Aq.Pur.

100 ml TBS (1000 ml Aq.Pur., 12,11 g tris og 87,66 g NaCl (Sigma))

10 ml 10 % Tween 20

