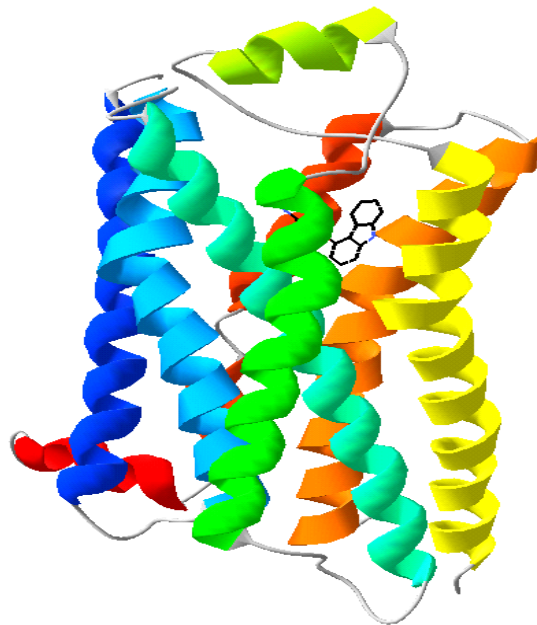


Effekt av β_2 -adrenerg reseptor på prostatakreftcellelinjer

- med fokus på epitelial-mesenkymal transisjon,
migrasjon & proliferasjon



Ingunn Holm



2010

Effekt av β_2 -adrenerg reseptor på prostatakreftcellelinjer

- med fokus på epitelial-mesenkymal transisjon
migrasjon & proliferasjon

av

Ingunn Holm

Masterstudium i Biomedisin

Avdeling Helsefag

Masteroppgave, 60 studiepoeng, utført ved Urologisk Forskningsinstitutt,
Avdeling for Urologi, Oslo Universitetssykehus, Aker og HiO

20 mai 2010



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Urologisk Forskningsinstitutt, Avdeling for Urologi på Oslo Universitetssykehus, Aker i perioden fra august 2009 til mai 2010. Leder for denne forskningsgruppen og ekstern veileder under arbeidet med oppgaven har vært professor Kristin Austlid Taskén. Min interne kontaktperson på Høgskolen i Oslo har vært Elin Leirvoll Aschim.

Jeg vil takke min veileder Kristin for at hun alltid har tatt seg god tid når jeg har kommet og banket på hennes dør. Takk for raske tilbakemeldinger og alltid tilgjengelighet på email. Jeg setter stor pris på at du har engasjert deg i mitt arbeid og bidratt til å gjøre dette året lærerikt for meg og for å ha gitt meg muligheten til å få et innblikk i den urologiske kreftforskningsverden.

Jeg vil også rette en stor takk til doktorgradsstipendiat Helene Hartvedt Grytli for stor hjelp under dette arbeidet. Hun har alltid vært tilgjengelig og villig til å svare på spørsmål og bidratt med hjelp til praktisk arbeid. Spesielt takk for din nøydsommelighet og dine gode tilbakemeldinger under skriveprosessen. Og for sosialt samvær!

Takk til den øvrige gruppen på Urologisk Forskningsinstitutt, Håkon Ramberg og Olov Ögren, for god hjelp på lab og selskap i lunsjen. En stor takk rettes også til damene på Seksjon for forskning ved Hormonlaboratoriet på Oslo Universitetssykehus, Aker. Hos dere sitter latteren alltid løst. Spesielt takk til Vigdis Enge og Anne Nærby for hjelp med sekvensering og til Bente Holme for hjelp med tritium-måling.

Takk også til Bioteknologisenteret for lånet av utstyr til ^3H -tymidin-inkorporeringsassay.

En felles takk til alle for et lærerikt og spennende år jeg ikke vil glemme!

Oslo Universitetssykehus, Aker
Mai 2010

Ingunn Holm

Sammendrag

Prostatakreft er den vanligste kreftformen blant menn i Norge med over 4000 nye tilfeller hvert år. Økt levealder i befolkningen i tillegg til hyppigere diagnostisering i tidligere stadier av sykdommen enn tidligere, er blant årsakene til at stadig flere tilfeller oppdages. Den store variasjonen i klinisk forløp, samt prostatakreftens variable og uforutsigbare biologi, gjør det vanskelig å forutsi prognosen til hvert enkelt individ.

β_2 -adrenerg reseptor (ADRB2) er en G-protein koblet reseptor som det finnes mye av i prostata. ADRB2 er blant annet kjent for å stimulere aktiviteten av androgenreseptor og spiller en rolle i cellevekst, adhesjon og metabolisme. ADRB2 er vist å være nedregulert i metastasert prostatakreft, og lavt uttrykk av reseptoren er assosiert med dårlig prognose av klinisk lokalisert prostatakreft. ADRB2 kan i fremtiden tenkes å være en potensiell prognostisk biomarkør for aggressiv prostatakreft, men før den tid gjenstår det å kartlegge hvilken rolle reseptoren har i utviklingen av prostatakreft og hvilken signalveier den er involvert i.

I denne masteroppgaven er det undersøkt hvorvidt signalering via ADRB2 er med på å regulere nivået E-cadherin, Snail og RKIP. Dette er gener som er involvert i omdannelsen av epiteliale prostatakreftceller til mesenkymale prostatakreftceller, en prosess som kalles epitelial- mesenkymal transisjon (EMT). EMT er en prosess som er viktig under embryoutviklingen, men det er også vist at prosessen er viktig for metastasering av kreftceller også i prostatakreft.

Prostatakreftcellelinjer ble i oppgaven stimulert med isoproterenol, en agonist for ADRB2, og RNA ble høstet etter ulike tidspunkter. Nivået av mRNA for E-cadherin, Snail og RKIP ble undersøkt ved bruk av real time RT-PCR. Det ble detektert en signifikant reduksjon i mRNA-nivå for Snail etter 24 timer i LNCaP-celler stimulert med isoproterenol stimulering i forhold til ustimulerte celler, men det ble ikke detektert noe forskjell i mRNA-nivå for E-cadherin og RKIP. Protein-nivået av RKIP ble undersøkt ved hjelp av Western blot, men det ble ikke observert noe forskjell mellom ustimulerte - og isoproterenol stimulerte celler.

Det ble også undersøkt om ADRB2-signalering hadde noe effekt på migrasjonen av prostatakreftcellelinjene. Migrasjonsassay viste at cellenes evne til å migrere økte når cellene ble stimulert med isoproterenol i den ikke-metastaserende prostatakreftcellelinjen LNCaP, men effekten var motsatt for den metastaserende prostatakreftcellelinjen DU145. I tillegg ble det undersøkt om ADRB2 spiller en rolle for proliferasjonen av prostatakreftcellene. ^3H -tymidin inkorporeringsassay viste at hemming av ADRB2 førte til en signifikant nedgang i celleproliferasjonen, som ble ytterligere forsterket når ADRB2 ble slått ut i LNCaP-celler.

Abstract

Prostate cancer is the leading form of cancer among men in Norway with over 4000 new incidences every year. Increased lifespan, in addition to more frequently diagnoses in early stage of the cancer than before, is some of the reasons why the incidences seems to be increasing. The big differences in clinical outcome, in addition to the variable and unpredictable biology of prostate cancer, make it difficult to predict the prognosis for a given individual.

In the prostate you will find a lot of β_2 -adrenergic receptor (ADRB2), which is a member of the G-protein coupled receptor family. ADRB2 is among others known for stimulating the activity of the androgen receptor, and to take part in cell growth, adhesion and metabolism. ADRB2 has been shown to be down-regulated in metastatic prostate cancer, and low expression of the receptor is associated with poor prognosis of clinical localized prostate cancer. In the future ADRB2 could be a potential prognostic biomarker for aggressive prostate cancer, but the role of the receptor in prostate cancer and in different signalling-pathways needs to be clarified.

In this master thesis it is studied whether signaling through ADRB2 is contributing to regulate the levels of E-cadherin, Snail and RKIP. These are all genes that are involved in the transformation of epithelial prostate cancer cells to mesenchymal prostate cancer cells, a process called EMT. EMT is an process that is important during the development of the embryo, and it is also important for the metastasis of cancer cells - also in prostate cancer.

Prostate cancer cell lines were in this project stimulated with isoproterenol, an agonist for ADRB2, and RNA was harvested after different time points. The mRNA-level of E-cadherin, Snail and RKIP were studied by real time RT-PCR. A significant reduction in mRNA-level for Snail after 24 hours was detected when stimulating cells with isoproterenol, compared to cells left untreated. No differences in mRNA-levels were detected for E-cadherin and Snail. The proteinlevel for RKIP was studied by Western blot, but no difference between isoproterenol stimulated – and cells left untreated was detected.

Whether signaling through ADRB2 has effects on the migration of the prostate cancer cell lines was also studied. Migration-assay showed that the cells ability to migrate was improved by stimulating the cells with isoproterenol in the non metastatic cell line LNCaP, but this effect was apposite in the metastatic prostate cancer cell line DU145.

In addition it was studied whether ADRB2 plays a role in the proliferation of the prostate cancer cells. ^3H -thymidin incorporation assay showed that inhibiting ADRB2 lead to a significant reduction in cell proliferation when ADRB2 was knocked down in LNCaP-cells.

Innhold

FORORD	3
SAMMENDRAG	4
ABSTRACT	5
1 INNLEDNING.....	12
1.1 PROSTATAKREFT	12
1.1.1 Prostatakjertelens oppbygning og funksjon	12
1.1.2 Diagnostisering av prostatakreft	13
1.1.3 Androgenreseptor- signalering i prostatakreft.....	15
1.1.4 Behandling av prostatakreft	14
1.2 B2-ADRENERG RESEPTOR (ADRB2)	15
1.2.1 Betydningen av betablokkere for progresjonen av prostatakreft.....	18
1.3 KREFTUTVIKLING.....	18
1.3.1 Proliferasjon.....	19
1.4 MIGRASJON	19
1.4.1 Vasodilator-stimulert fosfoprotein (VASP)	20
1.5 EPITELIAL-MESENKYMAL TRANSISJON (EMT).....	20
1.5.1 EMT-markører.....	22
1.6 METASTASERING	24
1.7 MÅL MED OPPGAVEN	25
2. MATERIALER OG METODER.....	26
2.1 CELLEDYRKNING	26
2.1.1 LNCaP	26
2.1.2 DU145	27
2.1.3 Subkultivering	27
2.1.4 Agens og stimuleringer	28
2.2 EKSTRAKSJON AV TOTAL RNA.....	28

2.2.1 Prinsipp	28
2.2.2 Utførelse	29
2.2.3 Måling av total RNA-konsentrasjon	30
2.2.4 Kvalitetssjekk av total RNA	30
2.3 SEMI-KVANTITATIV REAL TIME RT-PCR	30
2.3.1 Prinsipp	30
2.3.2 Primere	31
2.3.3 Kontroll av PCR-produkt	32
2.3.4 Referansegen	33
2.3.5 Utførelse	33
2.3.6 Relativ kvantifisering.....	34
2.4 PROTEIN EKSTRAKSJON	36
2.4.1 Prinsipp	36
2.4.2 Utførelse	36
2.4.3 Måling av proteinkonsentrasjon	37
2.5 WESTERN BLOT	37
2.5.1 Prinsipp	37
2.5.2 Utførelse	38
2.5.3 Loadingkontroll	40
2.6 MIGRASJONSSASSAY	40
2.6.1 Prinsipp	40
2.6.2 Utførelse	41
2.6.3 Relativ kvantifisering.....	41
2.7 TRANSIENT TRANSFEKSJON MED SIRNA.....	42
2.7.1 Prinsipp	42
2.7.2 Utførelse	42
2.8 ³ H-TYRIDIN INKORPORERINGSASSAY	43

2.8.1	Prinsipp	43
2.8.2	Utførelse	43
2.9	STATISTISKE ANALYSER OG BEREGNINGER.....	44
3.	RESULTATER.....	45
3.1	KVALITETSKONTROLL AV MATERIALER OG METODER	45
3.1.1	RNA-kvalitet	45
3.1.2	Ett-trinns real time RT-PCR versus to-trinns real time RT-PCR.....	45
3.1.3	Bearbeidelse av real time RT-PCR data.....	46
1.1.3	3.1.4 Transfeksjon.....	48
3.2	EKSPERIMENTELLE RESULTATER	49
3.2.1	Effekten av isoproterenol på nivået av EMT-markører i prostatakrefte- cellelinjene LNCaP og DU145	49
3.2.2	Effekten av isoproterenol på fosforylering av Vasodilator-stimulert fosfoprotein i LNCaP-celler	51
3.2.3	Effekten av isoproterenol og propranolol på migrasjon av LNCaP- og DU145- celler	52
3.2.4	Effekten av isoproterenol og betablokkere på proliferasjonen til LNCaP-celler	53
3.2.5	Signifikanstesting	55
4.	DISKUSJON.....	56
4.1	METODOLOGISKE ASPEKTER.....	56
4.1.1	Valg av modellsystem	56
4.1.2	Valg av metoder.....	56
4.2	DISKUSJON AV EKSPERIMENTELL RESULTATER.....	60
4.2.1	ADRB2-signalering syntes ikke å kunne regulere nivået av EMT-markører i LNCaP- eller DU145-celler	60
4.2.2	ADRB2-signalering viste ingen effekt på fosforylering av Vasodilator-stimulert fosfoprotein	62
4.2.3	ADRB2-signalering økte LNCaP-cellenes evne til å migrere	62

4.2.2	Nedgang i proliferasjon både ved stimulering og hemming av ADRB2 i LNCaP-celler	63
4.2.5	Valg av isoproterenol som stimulant og nivået av ADRB2 i LNCaP-celler	64
4.2.6	Betydningen av statistisk signifikans	65
4.2.7	Prognostiske markører i prostatakraft	66
4.2.8	Fremtidlige studier.....	67
4.2.9	Konklusjon	67
5.	LITTERATURLISTE	68
6.	VEDLEGG	74
	Vedlegg I Reagenser og utstyr.....	75
4.2.2	Vedlegg II Løsninger.....	80
4.2.3	Vedlegg III Sjekking av PCR-produkt	82
4.2.4	Vedlegg IV To-trinns real time RT-PCR	83
4.2.5	Vedlegg V Standardkurver real time RT-PCR	84
4.2.6	Vedlegg VI Oversikt over p-verdier ved signifikanstesting	85

Forkortelse**Forklaring (original forklaring på engelsk)**

ADRB2	Adrenerg reseptor beta 2 (β_2 -adrenergic receptor)
AR	Androgenreseptor
ARE	Androgenreseptor respons element
ATCC	"American type culture collection"
bp	Basepar
BSA	Bovint serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monofosfat
CCD	"Charged coupled device"
cDNA	Komplementært DNA (complementary DNA)
CPM	Telling per minutt (counts per minute)
DHT	Dihydrotestosteron
dH ₂ O	Destillert vann
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksyribonukelinsyre
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal vekstfaktor
EMT	Epitelial-mesenkymal transisjon
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FCS	Føtalt kalveserum
FSH	Follikkelstimulerende hormon
(GEF	Guanine nucleotide exchange factor)
GFP	Grønt fluoriserende protein
G6PD	Glukose-6-fosfat dehydrogenase
HCl	Hydrogenklorid
HIF-1 α	Hypoksi-induserende faktor-1 α
HRP	Horseradish peroxidase
<i>In vivo</i>	"I kroppen" ("within the living")
<i>In vitro</i>	"I reagensrør", utenfor kroppen (fra lat, i glass)
ISO	Isoproterenol
KCl	Kaliumklorid
kDa	Kilo Dalton
LAF	Laminær strømning (laminar air flow)
LDS	Lauryl dodecyl sulfat
LH	Luteiniserende hormon
LHRH	Luteiniserende hormon-frigjørende hormon

LNCaP	Lymfeknute prostatakraft (lymph node cancer prostate)
M	Molar
Mm	Millimolar
ml	Milliliter
mRNA	Budbringer RNA (messenger RNA)
MTT	Method of transcriptional and translational
NaCl	Natrium klorid
NADPH	Nikotinamid-adenindinukleotid fosfat
NCBI	National center for biotechnology information
NE	Neuroendokrin
NED	Neuroendokrin differensiering
NP-40	Nonyl phenoxypropylpolyethoxyethanol 40
OD	Optisk tetthet (optic density)
PBS	Fosfat bufret saltvann (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase kjedereaksjon (polymerase chain reaction)
PDEF	Prostata derivert ets faktor
PEBP1	Phosphatidylethanolamine binding protein 1
Pen/Strep	Penicillin og streptomycin
PET	Polyethylene terephthalate
PI	Propidium iodid
PVDF	Polyvinylidene fluoride
PROP	Propranolol
PSA	Prostata spesifikt antigen
RCF	Relativ sentrifugalkraft (g) (relative centrifugal force)
RIN	RNA integritet nummer
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RKIP	Raf kinase inhibitor protein
RNA	Ribonukleinsyre
RPM	Omdreninger per minutt (revolutions per minute)
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfat
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Enkelt nukleotid polymorfi (single-nucleotide polymorphism)
TAE	Tris acetat EDTA
TBS-T	Tris buffret saltvann–tween
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
qPCR	Kvantitativ PCR (quantitative PCR)

1 INNLEDNING

1.1 Prostatakraft

Prostatakraft er den vanligste kreftformen i Norge med over 4000 nye tilfeller hvert år, og står for 29 % av all kreft som oppdages blant menn (1, 2). I 2008 ble det registret 4391 nye tilfeller og insidensen ser ut til å øke. I 2007 var prostatakraft den nest mest dødelige kreftformen etter lungekreft, med 1097 dødsfall forårsaket av prostatakraft (1, 2). Økt levealder i befolkningen, samt tidligere og mer aktiv diagnostisering er blant årsakene til at stadig flere nye tilfeller oppdages (1, 2). Hos de fleste vil tilstedeværelse av prostatakraft ikke medføre klinisk sykdom, mens enkelte vil utvikle sykdom med et klinisk aggressivt forløp. Den store variasjonen i klinisk forløp, som følge av prostatakraftens variable og uforutsigbare biologi, gjør det vanskelig å forutsi prognosen til ett enkelt individ. Om en histologisk påvist svulst i framtiden vil gi opphav til klinisk sykdom hos den enkelte pasienten er også svært vanskelig å forutsi (3). Det foreligger per i dag omfattende dokumentasjon på at miljø- og livsstilsfaktorer, i tillegg til kjente risikofaktorer som rase og alder, har betydning for utviklingen av prostatakraft. Overhyppighet i enkelte familier gir en indikasjon på at genetiske faktorer også har betydning for utviklingen av prostatakraft (4). Fem ulike enkelt-nukleotid polymorfismer (SNP) er funnet å være assosiert med prostatakraft. Hver enkelt SNP har alene liten påvirkning, men kombinasjonen av SNPene sammen med familiehistorikk har en kumulativ og signifikant assosiasjon med prostatakraft (5). Arvelig prostatakraft, som antas å være årsaken til omtrent 5 % av alle prostatakrafttilfeller, er derfor sannsynligvis et resultat av flere defekte gener med lav penetrans (3).

1.1.1 Prostatakjertelens oppbygning og funksjon

Prostata (blærehalskjertelen) er en kjertel hos menn på størrelse med en valnøtt. Den er lokalisert rett under urinblæren og omslutter urinrørets øvre del (illustrert i figur 1). Kjertelen er en viktig del av mannens reproduktive system, da prostatas hovedfunksjon er å produsere næringsrik væske for spermene. Kjertler i prostata tømmer sitt sekret i urinrøret under ejakulasjonen ved kontraksjon av glatt muskulatur i prostata. Sekretet inneholder næringsstoffer som gjør spermene befruktningsdyktige og bevegelige når de forlater urinrøret. Funksjonen styres av kjønnshormonet testosteron som hovedsakelig produseres i testiklene. Testosteron er et androgent steroidhormon som blant annet er ansvarlig for mannlige trekk, seksualitet, vekst og differensiering av prostatakjertelen, samt dannelsen av spermier (4, 6-9). I epitelcellene i prostata konverteres testosteron til den mer potente metabolitten dihydrotestosteron (DHT) via enzymet 5 α -reduktase (7, 10).



Figur 1. Prostatakjertelens plassering (www.abc-helsekost.no).

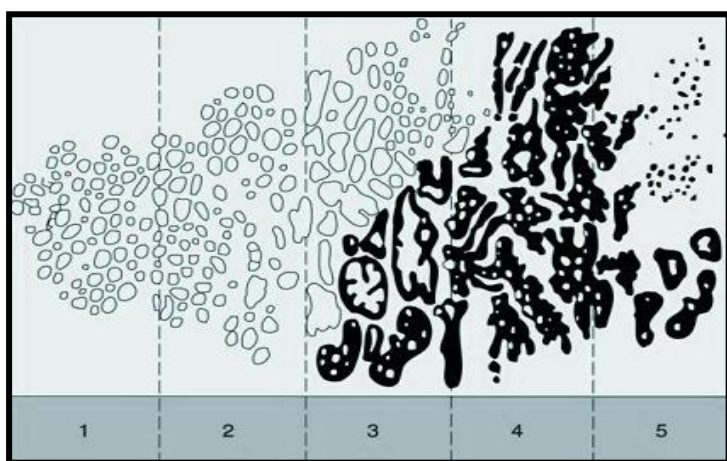
Histologisk består prostatakjertelen av to lag med epitelceller dekket av fibromuskulære stromaceller. Epitelcellene utgjør omtrent 70 % av kjertelen, mens stromacellene som hovedsakelig består av glatte muskelceller og fibroblaster utgjør de resterende 30 % (11, 12). En asymmetrisk fordeling av ulike adhesjonsmolekyler bidrar til epitelcellenes orientering og kjertelens struktur. Disse molekylene forankrer cellene til en basalmembran og gjør dem lite bevegelige (13). Innenfor basalmembranen finner man sekretoriske luminalceller, basalceller og neuroendokrine celler (NE). Basalcellene nær basalmembranen inkluderer et lite antall celler som regnes som stamcellene til prostatakjertelen. Dannelsen av prostatakarsinom kjennetegnes ved tap av basalceller. De sekretoriske cellene omslutter kjertelrøret og har en polarisert intracellulær organisering, mens NE-cellene i prostata ligger spredt i kjertelen. NE-celler i prostata spiller en viktig rolle i både vekst og differensiering av prostata, samt i patogenesen av prostatakraft (11, 12). Forekomsten av NE-lignende celler i prostata er ofte større i prostatakarsinom enn i normalt prostatavev. Neuroendokrin differensiering (NED) er dessuten vist å være korrelert med tumorstadium, tap av androgensensitivitet, autokrin- og parakrin aktivitet og dårlig prognose (14).

1.1.2 Diagnostisering av prostatakraft

Prostataspesifikt antigen (PSA) er en kallikrein-protease som skiller ut fra epitelcellene i prostata. PSA spalter proteiner i sædvæsken og bedrer spermens muligheter for bevegelse ved å gjøre sædvæsken mer flytende (3, 15). Forhøyet PSA-verdi i serum kan være en indikasjon på malign sykdom i prostata. Måling av total PSA i serum har derfor hatt en sentral rolle i utredning, diagnostikk, behandling og oppfølging av prostatakraftpasienter de siste 20 årene (3). Likevel er sammenhengen mellom økt risiko for klinisk relevant prostatakraft og PSA-verdier i serum foreløpig ikke fullstendig kartlagt. PSA er en følsom markør som kan gi en indikasjon på sykdom i prostata, men den er ikke kreftspesifikk. PSA-verdier under 4 µg/l ansees som normale, men verdiene må alltid vurderes opp mot funn ved rektal undersøkelse av prostatakjertelen. Verdier over 4 µg/l kan gi mistanke om kreft selv om prostatakjertelen er normal ved palpasjon, og disse pasientene må derfor

undersøkes videre. Dersom prostatakjertelen er forstørret, som ved benign prostata hyperplasi (BPH), kan verdier opptil 20-30 mg/l ansees som "normale" (16).

Diagnosen stilles av en patolog som undersøker cellenes morfologi og vekstmønster i en liten vevsprøve (biopsi) fra prostata. Gleasongradering benyttes for å beskrive kreftcellenes vekstmønster, og graderes fra 1-5 der 1 tilsvarer høyt differensierte celler og grad 5 tilsvarer lavt differensierte celler. Gleason graderingssystem er illustrert i figur 2. På grunn av prostatakreftens heterogenitet beregnes skåringen ved å kalkulere summen av to dominante histologiske mønstre. Gleasonskår 1-4 er godt differensierte celler, 5-7 er moderat bra differensierte celler og 7-10 er dårlig differensierte celler. Gleasonskår viser seg å korrelere bra med påfølgende metastaseringspotensial og overlevelse (17).



Figur 2. Gleason graderingssystem. Skjematisk fremstilling av Gleason graderingssystem, der grad 1 tilsvarer høyt differensierte celler og grad 5 tilsvarer lavt differensierte celler (<http://www.keyholeurology.co.uk/prostatecancer.html>).

1.1.3 Behandling av prostatakraft

Dersom prostatakraften ikke har spredt seg kan den behandles ved kirurgisk fjerning av prostata eller med lokal stråling. Det finnes ikke noen kurativ behandling for lokalavansert- og metastaserte svulster. Denne typen svulster kan derimot behandles ved bruk av hormon- og/eller anti-androgenerapi, der målet henholdsvis er å senke androgennivået i kroppen eller å hemme effekten av androgener. Androgener er essensielle for utvikling og vekst av prostata. Likeledes er de fleste prostatakraftcellene avhengig av androgener for å proliferere og leve. Derfor har redusert nivå av sirkulerende androgener, samt hemming av androgenreseptor vært hovedfokus for behandling av hormonavhengig prostatakraft (18). Androgenproduksjonen kan hemmes ved bruk av luteiniserende hormon-frigjørende hormon (LHRH) – analoger. Tilførsel av LHRH-analoger vil gi en økning i frigjørelsen av follikkelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH) etterfulgt av en økning i konsentrasjonen av testosteron i serum. Etter omtrent 2 uker vil denne frigjøringen føre til en reduksjon i produksjonen av testosteron som følge av negativ feedback. LHRH-analoger

har vist å gi en subjektiv behandlingseffekt hos 80 % av menn med prostatakraft (19). Hormonbehandling av prostatakraft vil imidlertid kun forårsake en midlertidig reduksjon av tumormassen (20). Hos de fleste pasienter vil prostatakraften over tid (ca 2-3 år) utvikle hormonuavhengig prostatakraft, kalt kastrasjonsresistens, hvilket det hittil ikke foreligger noen helbredende behandling for (7, 18).

1.1.4 Androgenreseptor- signalering i prostatakraft

Androgenreseptor (AR) er en ligandavhengig transkripsjonsfaktor og en del av kjernereseptorfamilien (18). Før binding av ligand holdes AR i en inaktiv form ved at den er assosiert til ulike heat shock proteiner (10). Binding av DHT til AR i cytoplasma fører til frigjøring av heat shock proteinene og fosforylering og dimerisering av reseptoren. Videre translokteres AR til kjernen med påfølgende binding til androgen responsive element (ARE) gjennom ett høyt konservert DNA-bindingsdomene. Prosessen initierer transkripsjon av ulike gener som er involvert i blant annet proliferasjon, apoptose og differensiering av prostatacellene (7, 18).

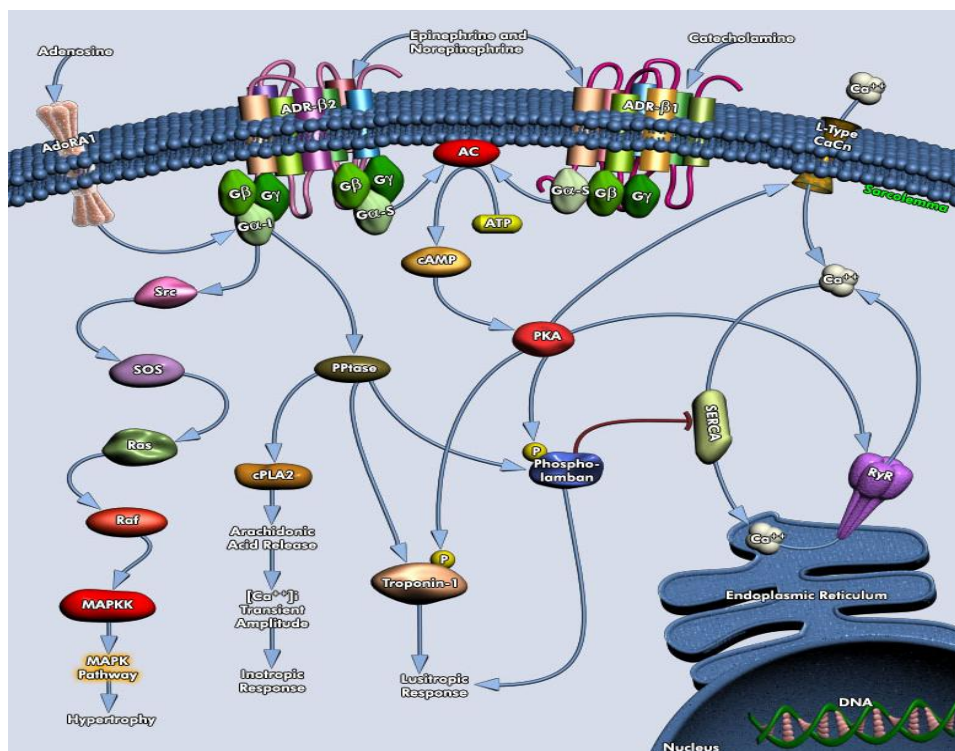
AR-signalering synes også å være viktig kastrasjonsresistent prostatakraft. Kastrasjonsresistente prostatakraftceller uttrykker AR og AR-regulerte gener som for eksempel PSA, noe som tyder på at AR er aktivert i disse kreftcellene til tross for fravær av androgener (7, 20). Det er vist at økt uttrykk av AR gjør prostatakraftceller følsomme for lave nivåer av androgener (21). *In vitro* kan AR aktiveres av andre faktorer enn androgener, og i dyremodeller har det vist seg at økt uttrykk av AR er assosiert med progresjonen av kastrasjonsresistent prostatakraft (21). I mennesker er AR i enkelte tilfeller funnet å være overuttrykt i kastrasjonsresistente prostatakarsinomer, i tillegg er det vist seg å være høy frekvens av muterte AR i disse kreftsvulstene (20). AR-signaleringen er regulert av nivået av både ligander og reseptoren selv (21).

Omdannelsen til kastrasjonsresistent er også assosiert med økt uttrykk av G-protein koblede reseptorer (GPCR) lokalisert til plasmamembranen. Fordi prostatakraftcellene uttrykker forhøyet nivå av både GPCR og deres tilhørende ligander, lurer man på om reseptorene er konstitutivt aktive og bidrar til progresjon av prostatakraft. Hvilke mekanismer som regulerer AR aktivitet i fravær av androgener og fører til utviklingen av kastrasjonsresistens, er fortsatt noe uklart (20).

1.2 β_2 -adrenerg reseptor (ADRB2)

Det finnes to hovedtyper adrenerge reseptorer, α -adrenerge reseptorer og β -adrenerge reseptorer, som igjen deles inn i ulike subgrupper (22). I prostata finner man mest α_1 - og β_2

andrenerge reseptorer (20). Adrenerge reseptorer tilhører gruppen av GPCR, som er den største familien av transmembrane proteiner i vertebrater (23, 24). Adrenerge reseptorer stimuleres av katekolaminer som noradrenalin (norepinefrin) og adrenalin (epinefrin). Dette er neurotransmittere som frigjøres fra neuroner i prostata eller produseres i binyrene (25, 26). Det er kjent at β_2 -adrenerg reseptor (ADRB2) stimulerer AR aktiviteten, samt har en rolle i cellevekst, adhesjon og metabolisme (24, 25). Binding av ligand til reseptoren fører til en konformasjonsendring av reseptorens transmembrane- og intracellulære domene, og fører på denne måten til aktivering av reseptoren. Aktivert reseptor fungerer som en guanin nukleotid utvekslingsfaktor (GEF) for α -subenheten av et heterotrimerisk G-protein ved at den katalyserer løsrivelse av guanin-di-fosfat (GDP) og binding av guanin trifosfat (GTP) slik at G-proteinet aktiveres. Den aktiverte G-protein subenheten G_s vil videre aktivere adenylyl syklase (AC). Dette fører til en økning i intracellulært syklisk adenin monofosfat (cAMP). De fleste effekter av cAMP medieres via aktivering av protein kinase A (PKA), men cAMP kan også aktivere Epac (cAMP-GEF) og ionekanaler (27). Sekundært vil også andre signalveier aktiveres (20, 22). I hjertevev er det vist at ADRB2 kan signalere både via G_s og G_i , mens ADRB1 kun signalerer via G_s . Signalering via G_s er i andre modellsystemer vist å føre til apoptose, mens signalering via G_i fører til økt celleoverlevelse (28). Det er kjent at ADRB2 signalerer via G_s i prostataceller, men det er foreløpig ukjent om signalering via G_i også kan forekomme. Figur 3 viser en skjematisk oversikt over ulike signalveier som kan aktiveres ved stimulering av adrenerge reseptorer.



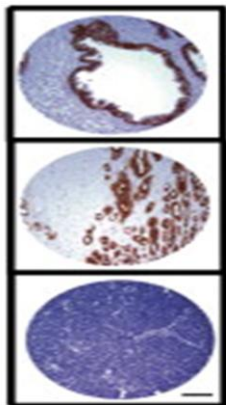
Figur 3. Skjematisk oversikt over ulike signalveier som kan aktiveres ved β -adrenerg stimulering (Qiagen).

Forruten å regulere AR-aktivitet, kan ADRB2 bidra indirekte til utviklingen av kastrasjonsresistent prostatakraft ved å forårsake neuroendokrin differensiering (NED).

Cox et al har vist at *in vitro* differensiering av prostatakraftcellelinjene LNCaP og PC3 til fenotypiske neuroendokrine celler kan induseres av forskolin og ADRB2-agonistene isoproterenol og epinefrin (14, 29). Funnene indikerer at agens som fører til økning av intracellulært cAMP kan regulere NED *in vivo*. Som nevnt tidligere er NED assosiert med aggressiv prostatakraft (30).

ADRB2 er vist å være den dominerende adrenergreseptor subtypen i LNCaP- og PC3-celler (30). Ramberg et al har vist i en studie at uttrykk av ADRB2 er oppregulert i androgenuavhengige prostatakraftcellelinjer (LNCaP-C4, LNCaP-C4-2 og DU145) sammenliknet med den androgenavhengige prostatakraftcellelinjen LNCaP. Videre fant de at ADRB2-nivået var økt i maligne celler i humane prostata vevsprøver og i metastaser sammenliknet med BPH og normalt prostatavev. Studien viste også at mRNA-nivået av ADRB2 i prostata var sterkt nedregulert hos pasienter som hadde mottatt hormonbehandling mot prostatakraft (25).

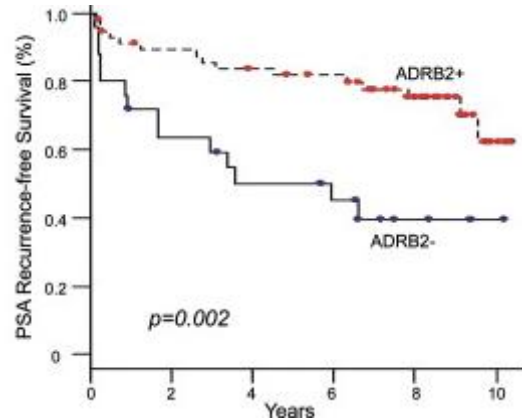
Yu et al har tidligere vist at ADRB2 er et direkte mål for transkripsjonell hemming av Enhancer of Zeste 2 (EZH2). EZH2 er en transkripsjonell repressor, og er en del av Polycomb protein-gruppen, og er under vurdering som en mulig biomarkør for prostatakraft (24). Feil i reguleringsmekanismen av denne repressoren påvirker celleproliferasjon, celleinvasjon og transformasjon av benigne prostataepitelceller (31). Mekanismen bak dette er uklar, men en mulighet er at EZH2 kan fremskynde tumorgenese ved hemming av kritiske tumorsuppressorgener. Yu et al viste i sin studie at EZH2 bandt til ADRB2 promotor og dermed hemmet uttrykket av ADRB2. Ved implantering av DU145-prostatkraftceller i mus (xenograftmodell) hemmet ADRB2 stimulering tumorvekst av prostatakraftcellene. Videre ble det observert at hemming av ADRB2 førte til en betraktelig økning i invasivitet hos benigne prostataepitelceller. Ifølge studien er dessuten et lavt nivå av ADRB2 signifikant assosiert med sykdomstilbakefall etter fjerning av prostata (prostatektomi). Dette er illustrert i figur 4 ved Kaplan-Meier overlevelseskurve. Observasjonene indikerer at redusert uttrykk av reseptoren er assosiert med progresjonen av human prostatakraft, og at ADRB2 kan tenkes å være en potensiell prognostisk biomarkør for aggressiv prostatakraft (24). Figur 4 viser immunfaring av ADRB2 i henholdsvis benign prostata, lokalisert prostata og metastasert prostatakraft, utført av Yu og kollegaer. De fant i studien at nivået av ADRB2 er høyest i benign prostata, moderat i lokalisert prostatakraft og underuttrykt i metastasert prostatakraft.



Benign prostata

Lokalisert prostatakraft

Metastasert prostatakraft



Figur 4. ADRB2 i prostata. Immunfarging viser at nivået av ADRB2 er høyest i benign prostata, moderat i lokalisert prostatakraft og undertrykt i metastasert prostatakraft (venstre). Kaplan-Meier overlevelseskurve viser at individer med klinisk lokalisert prostatakraft som har lavere nivå av ADRB2 har høyere risiko for sykdomstilbakefall etter prostektomi (høyre) (Yu et al).

1.2.1 Betydningen av betablokkere for progresjonen av prostatakraft

Sammenhengen mellom bruk av betablokkere og risikoen for kreft har lenge vært kontroversiell. En kohortstudie fra 2003 (32) fant at bruk av betablokkere reduserte risikoen for utvikling av kreft signifikant, mens andre studier ikke har funnet noe sammenheng mellom bruk av betablokkere og risikoen for å utvikle kreft (33). I en kanadisk studie ble det funnet at risikoen for å utvikle prostatakraft sank hos pasienter som brukte betablokkere (34). En britisk studie (35) fant at pasienter behandlet med betablokkere hadde større sannsynlighet for å dø av kreft enn pasienter som mottok annen behandling. Denne forskjellen var dog ikke signifikant. En nylig offentliggjort studie (mars 2010, BBC News) fra Storbritannia og Tyskland fant at kreftpasienter som brukte betablokkere hadde lavere risiko for å dø av kreften. Studien viste at pasientgruppen som brukte betablokkere hadde 71 % mindre sannsynlighet for å dø av brystkreft sammenliknet med pasienter som mottok annet behandling enn betablokkere.

1.3 Kreftutvikling

Kreft oppstår fordi normale kontrollsystemer for cellevekst ødelegges, og er assosiert med fenotypiske forandringer av en celle (11). Cellevekst er en balanse mellom produksjon av nye celler (proliferasjon) og celledød. I en organisme er det nødvendig at vevsgrenser respekteres. Derfor kommuniserer cellene i kroppen med hverandre gjennom produksjon og utskillelse av vekstfaktorer, hormoner og neuropeptider. Disse vekstsignalene regulerer cellevekst ved å påvirke faktorer som styrer proliferasjon eller kontrollert celledød, apoptose. Utvikling av malign vekst oppstår fordi cellenes normale kontrollsystemer for cellevekst ødelegges og cellene får evne til å dele seg i det uendelige (22). Etter hvert som kreftsvulsten vokser er det også viktig at den utvikler blodtilførselen for å sikre tilgang på næring. Videre må cellene tilegne seg nye egenskaper for å kunne metastasere og invadere

vev. For å utvikle kreft må altså en rekke kontrollmekanismer suksessfullt ødelegges. Seks essensielle endringer er beskrevet av Weinberg og Hanahan postulert i 2000 (36).

1.3.1 Proliferasjon

Både BPH og prostatakreft karakteriseres av unormal celleproliferasjon. I BPH berører de proliferative prosessene både epitelceller og stromaceller, mens i prostatakreft oppstår som oftest proliferative unormaliteter i luminalceller. NE-celler i prostata har også en proliferativ påvirkning på prostatacellene. NE-celler skiller ut neuropeptidene bombesin og serotonin, som kan stimulere proliferasjonen av nærliggende celler (30).

Studier har vist at AR-signalerer regulerer cellyklusprogresjonen ved å indusere signaler som fremmer G1- syklinavhengig kinase-aktivitet og inaktivere tumorsuppressorgenet retinoblastoma ved fosforylering. Kun et lite antall studier har studert den direkte påvirkningen cellyklus har på AR aktiviteten. Cellyklus er avhengig av degradering av AR. Likevel er det funnet at mange proteiner som interagerer eller modulerer AR også er regulert under cellyklusen. AR kan videre moduleres direkte gjennom cellyklusen enten transkripsjonelt eller posttranskripsjonelt ved fosforylering, acetylering eller ubiquitinerings (10).

1.4 Migrasjon

Celle migrasjon er en forutsetning for utvikling av metastaser og bestemmes av signalstoff som for eksempel neurotransmittere i miljøet. Det er tidligere vist at migrasjon av blant annet prostatakreftcellelinjen PC3 er forbedret av stressrelaterte transmittere som noradrenalin (37). Dette er også vist i brystkarsinomceller og colonkarsinomceller (38, 39). Effekten er vist å kunne hemmes ved bruk av betablokkere. Palm et al har ved bruk av en xenograft modell vist at neurotransmitterstyrende regulering av migrasjon også er tilfelle *in vivo*. Utviklingen av metastaser økte ved stimulering av noradrenalin, mens betablokkeren propranolol hemmet denne effekten. Veksten av primærtumoren var dog ikke affisert av noen av behandlingene (26).

Celle migrasjon initieres av dannelsen av en stor utvekst på den fremre delen, "leading edge", av en celle. Utveksten resulterer i en forlengelse av fremre del - og en sammentrekning av bakre del av cellen, som beveger seg i en spesifikk retning som respons på ulike miljøforandringer rundt cellen (40, 41). Aktinfilamenter kobles raskt sammen i bunter og nettverk i cellens framstikkende del. I vertebrater kalles denne framstikkende delen lamellipodium. I noen tilfeller finner man fingeraktige membranfilamenter kalt filopodia, utgående fra den fremre delen av en migrerende celle. Filopodia danner fokale

adhesjoner til celleoverflaten og cellen migrerer langs en overflate i forlengelsen av filopodia (41). For at en celle skal kunne bevege seg spontant kreves en rekke prosesser som membransammentrekning, forlengelse av cytoskjelettet, reorganisering av aktin, celleavrunding og cellespredning (40).

1.4.1 Vasodilator-stimulert fosfoprotein (VASP)

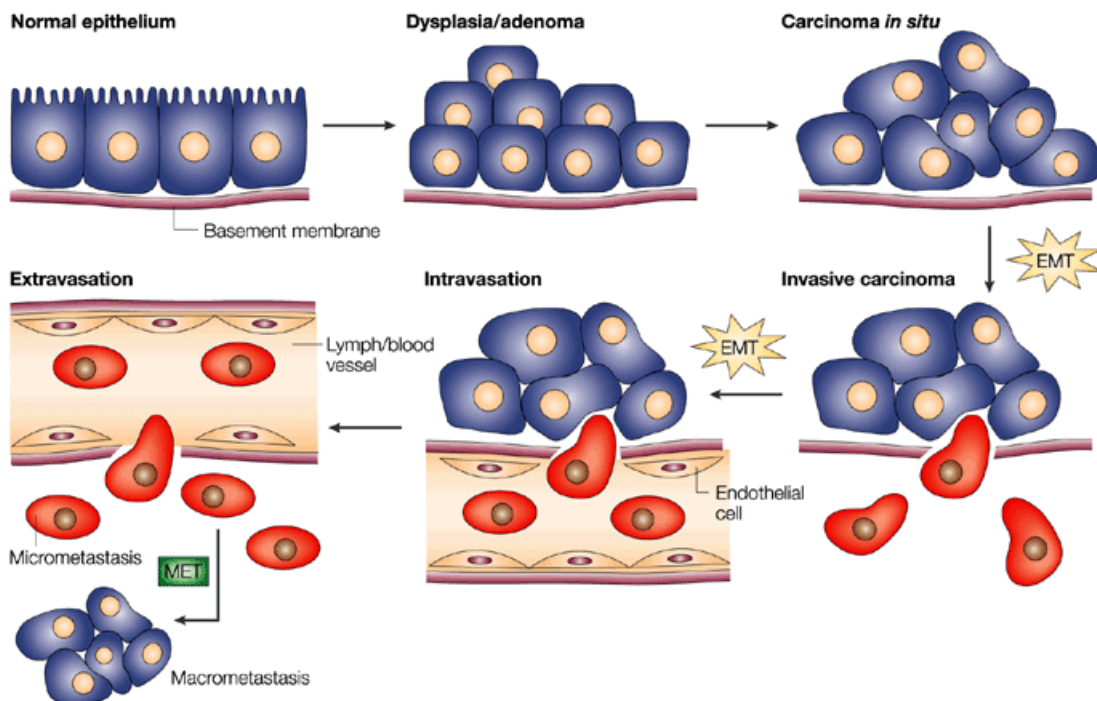
Vasodilator-stimulert fosfoprotein (VASP) er medlem av Ena/VASP familien og bidrar i reguleringen av aktin-dynamikken, som videre letter cellenes retningsbestemte motilitet. Aktin er en styrende prosess under cellemigrasjon og derfor er VASP en avgjørende komponent under denne prosessen. VASP ble opprinnelig identifisert som et substrat for protein kinase A (PKA) og protein kinase G (PKG). Gjennom VASP sin assosiasjon med aktinfilamentenes ruflete ender har VASP muligheten til å forlenge aktin-polymeriseringen, samt forlenge spredning av membraner ved å regulere cellemigrasjonen. Fosforylering av VASP er nødvendig for migrasjon av celler, og indikerer celleløsrivelse fra ekstracellulær matriks (40). Tre ulike fosforyleringssteder er identifisert, hvorav fosforylering av aminosyre serin 157 hovedsakelig forekommer når VASP fosforyleres av PKA (42).

1.5 Epitelial-mesenkymal transisjon (EMT)

Epitelial-mesenkymal transisjon (EMT) er en viktig prosess under normalutvikling av embryo, organer, vev, sårheling, reparasjon og metastasering av kreftceller (43, 44). Flere av endringene epitelcellene i en primærtumor gjennomgår for å få en metastaserende og invasiv fenotype likner på endringene som skjer under embryogenesen (13, 45). Prosessen som skjer under fosterutviklingen kalles gastrulasjon. Den karakteriseres ved at cellene nær midtlinjen i epiblast får motile egenskaper og migrerer mot sentrum av embryoet hvor det danner mesoderm. Epiblast utvikles videre til å danne ektoderm, mens mesoderm senere gir opphav til mesenkym. Denne fenotypiske endringen omtales som EMT (13). De molekylære endringene under EMT karakteriseres ved at koblingene mellom epitelcellene svekkes slik at cellene mister sin polaritet, og får en økning i invasiv kapasitet ved migrasjon gjennom ekstracellulær matriks og basalmembranen. Cellene erverver en migrerende fenotype ved at den polariserte foredelingen av cytoskjelettet og organeller endres (13, 46).

I prostatakarzinomer sees ved EMT molekylære endringer som redusert uttrykk av epiteliale markører, til fordel for induksjon av markører som kjennetegner mesenkymale celler. Typiske markører som undertrykkes er epitelialt cadherin (E-cadherin), cytokeratin og γ -catenin, mens nevralt cadherin (N-cadherin), som er typisk for stromaceller, vimentin, fibronektin og proteaser har økt uttrykk (13, 46). I den senere tid er det publisert

observasjoner som kan tyde på at EMT er en reversibel prosess. Epitelceller med mesenkymale egenskaper kan gå tilbake til å bli celler med epiteliale egenskaper ved å etablere metastaser (13, 46). Dette indikerer at prosessen er dynamisk. Prosessen kan ikke forklares kun med genetiske endringer, da funnene viser at den i tillegg er regulert av miljøet rundt cellen (45, 46). Celler som gjennomgår EMT kan enten migrere ut fra sitt epiteliale lag til andre steder i kroppen og forbli mesenkymale, eller redifferensiere tilbake til epitelceller gjennom en prosess som betegnes som mesenkymal-epitelial transisjon (MET) (47). MET er i likhet med EMT kjent for å spille en sentral rolle i embryogenesen (48). For MET er bildet av epiteliale markører motsatt, med en cadherin-switch, der E-cadherin er overuttrykket og N-cadherin er undertrykket (46, 49). Det er foreløpig uklart om EMT tumor celler nødvendigvis må resultere i en fullstendig omdannelse til mesenkymale celler eller om en delvis- eller transient EMT kan være like vanlig (47). Figur 5 viser en tegning av EMT og MET i progresjonen av karsinomceller.



Nature Reviews | Cancer

Figur 5. Epitelial-mesenkymal transisjon (EMT) og mesenkymal-epitelial transisjon (MET) i progresjonen av karsinomceller. Normalt epitelvev organisert til en basalmembran kan proliferere og gi opphav til en godartet svulst (adenom). Genetiske og epigenetiske forandringer kan føre til dannelsen av karsinoma in situ, dekket av en intakt basalmembran. Videre endringer kan indusere lokal spredning av karsinomceller, muligens gjennom EMT, og basalmembranen fragmenteres. Cellene kan infiltrere lymfe- og blodbanen, og fraktes langt til andre organer ved hjelp av passiv transport. Andre steder kan enkelte karsinomceller forbli enslige (mikrometastaser) eller danne et nytt karsinom ved MET ("Epithelial–mesenchymal transitions in tumor progression, Jean Paul Thiery").

På slutten av forrige århundre ble det for første gang identifisert selvfornyende stamcelle-liknende celler i tumorer. Disse cellene kalles cancer stamceller (CSC) eller tumorinitierende celler. Stamceller har mulighet til selvfornyelse gjennom en symmetrisk celledeling ved å produsere flere stamceller, eller ved asymmetrisk deling ved å produsere progenitorceller. Progenitorceller kan differensiere til mange ulike celler og utføre vevsspesifikke funksjoner. Det synes å være en direkte forbindelse mellom EMT og økning i epitelial stamcelle egenskaper. Gjennom dannelsen av tumormetastase, som ofte blir muliggjort via EMT, ser det ut til at metastaserende kreftceller er avhengig av evnen til selvfornyelse for å danne makrometastaser. Dette fremmer muligheten for at omdannelsen av celler ved EMT har evnen til å generere selvfornyende celler i likhet med stamceller (46-48).

Metastaseprosessen er tilsynelatende overfladisk lik prosessen som skjer under reparasjon av vev og regenerasjon. Prosessen gjør det mulig for voksne stamceller å gå ut i vevsbeholdningen (for eksempel beinmarg), sirkulasjonen og sekundære vevsområder hvor de kan proliferere, differensiere og ta del i vevsreparasjon. På grunnlag av dette spekuleres det om en mulig sammenheng mellom mindre differensierte stamceller og mesenkymale celler oppstått ved EMT (47, 48).

1.5.1 EMT-markører

Forsøk *in vitro* har vist at ulike vekstfaktorer i mikromiljøet rundt en tumor har mulighet til å inducere EMT (47). I prostatakreftcellelinjer har overuttrykk av Caveolin-1 (CAV1), DNA-binding protein inhibitor (ID1) og Hypoksi-induserende faktor-1 α (HIF-1 α) vist å kunne inducere EMT i LNCaP-celler (50, 51), mens stimulering med epidermal vekstfaktor (EGF) eller fjerning av prostata derivert ets faktor (PDEF) har vist å kunne inducere EMT i DU145-celler (52, 53).

Studier i dyremodeller har vist at nøkkeltranskripsjonsfaktorer, som for eksempel Snail og Twist, som er involvert i EMT også er aktivert i kreftceller. Kunstig uttrykk av Snail og Twist i epiteliale kreftceller har vist å kunne inducere omdannelse til en mesenkymal fenotype etterfulgt av maligne egenskaper som invasivitet og dannelse av metastaser (47).

EMT-markører er i oppgaven benyttet som betegnelse på gener som reguleres under EMT-prosessen. I oppgaven er nivået av E-cadherin, Snail og RKIP undersøkt. Figur 6 illustrerer hvordan disse EMT-markørene interagerer med hverandre.

1.5.1.1 E-cadherin

E-cadherin er et kalsiumavhengig transmembrant glykoprotein som finnes i de fleste epitelceller (54). Det fungerer som et celle-til-celle-adhesjonsmolekyl og danner interaksjoner mellom celler via molekylets ekstracellulære domene. Det intracellulære domenet medierer signalering til aktin i cellens cytoskjelett ved forankring av cadherin-

dimere til aktinfilamenter via β -catenin. I den senere tid har forskning vist at cateniner også er delaktige i signalering som regulerer vekst og differensiering i cellen. Cateniner er ofte nedregulert i prostatakarsinomer (13, 46). Genekspresjonsstudier har vist at transkripsjonell hemming av E-cadherin er en nøkkelbegivenhet i migrasjon og metastasering av kreftceller (13, 55). Tap av E-cadherin korrelerer med økning av N-cadherin, som er karakteristisk for EMT (13, 46).

1.5.1.2 Snail

Snail tilhører familien for sine finger transkripsjonsfaktorer, og er essensiell for induksjonen av EMT i embryogenesen og i dannelsen av tumormetastaser (55). Opprinnelig var Snail identifisert som en viktig faktor i utviklingen av embryo, differensiering av neuroner, celledeling og celleoverlevelse (56). Snail spiller også en viktig rolle i fremming av motstand mot apoptose og regulering av cellyklusprogresjon (57). Snail er transkripsjonelt regulert av signalering via nukleær faktor kappa B (NF- κ B) (58). Snail trigger induksjon av metastasering ved transkripsjonell hemming av metastasesuppressor gener som E-cadherin og Raf kinase inhibitor protein (RKIP) (56). I tillegg nedregulerer Snail uttrykket av epiteliale markører som mucin-1 og cytokeratin 18, og bidrar til oppregulering av de mesenkymale markørene vimentin og fibronektin (59).

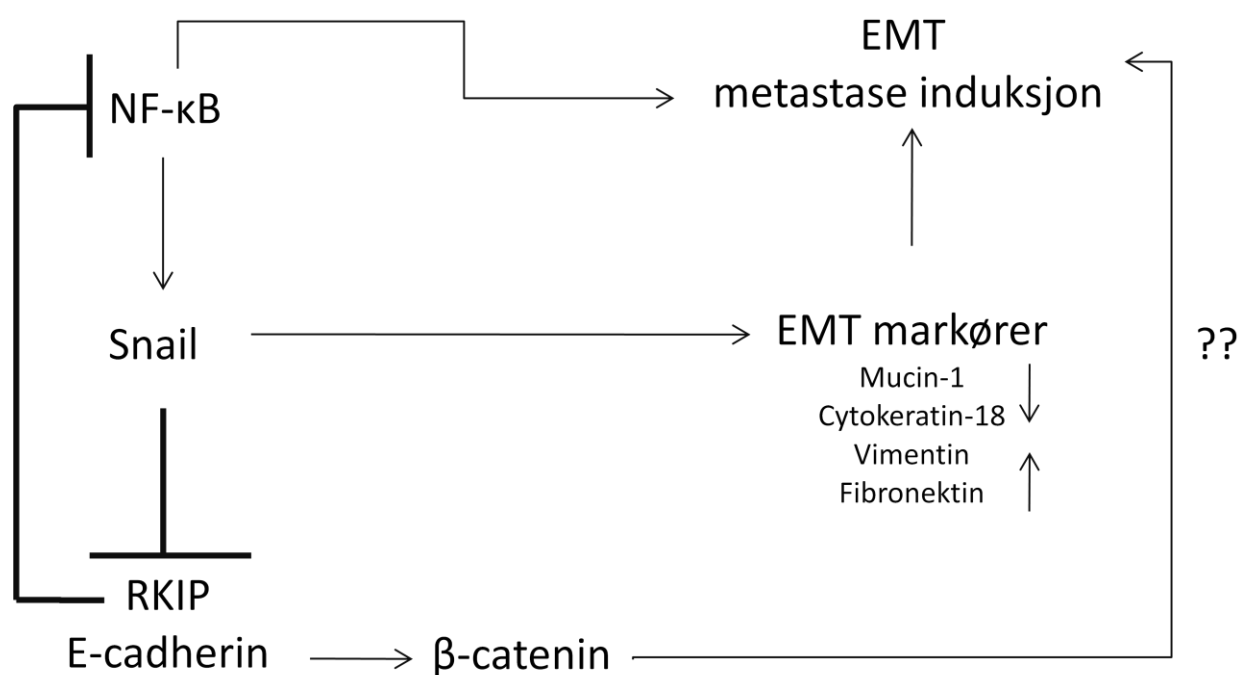
1.5.1.3 RKIP

RKIP tilhører en konservert gruppe av proteiner kalt phosphatidylethanolamine bindende protein (PEBP), som deltar i reguleringen av vekst og overlevelsessignalveier (60). Betydningen av RKIP i utviklingen av metastaser ble tydeliggjort da det i dyremodeller ble funnet at gjenopprettelse av RKIP-uttrykk hemmet utviklingen av metastaser i prostatakraft (61). Nylig er RKIP blitt identifisert og karakterisert som et metastasesuppressor protein (62). Det fungerer ved å hemme, ved at det bindes til Raf-1 og dermed forhindrer den fysiske interaksjonen mellom Raf mitogen aktivert protein (MAP)-kinase signalvei-1 og MEK (60). EMT rekrutterer samarbeidet mellom proto-onkogenet Ras og reseptor-tyrosin kinaser til å indusere nedstrøms MAP-kinase signalering, assosiert med tumorprogresjon og dårlig prognose (63). RKIP er vist å være nedregulert i en rekke krefttyper, deriblant metastatisk prostatakraft (62). Tap eller nedbryting av RKIP er assosiert med metastaserende sykdommer og økt antall massive tumorer (62, 64).

Det er tidligere kjent at RKIP, i tillegg til å hemme MAP-kinase-signalveien, hemmer signalering via NF- κ B (65). Nylig er RKIP funnet å være regulert av Snail, og det er vist at overuttrykk av Snail nedregulerer uttrykket av RKIP i prostatacellerlinjer. RKIP-uttrykket er også negativt korrelert med uttrykket av Snail i metastatiske prostataprøver. På grunn av Snails negative effekt på celleoverlevelse og proliferasjon, kan det tenkes at RKIP har en ny

nedstrømseffekt på Snail's transkripsjonsakse som er viktig i progresjon og metastasering av kreft (66). Proteinnivå av RKIP er vist å korrelere med intracellulært-nivå av E-cadherin (67).

I cellekultur er RKIP-uttrykket lavt i de invasive og metastaserende prostatakreftcellelinjene DU145 og PC3, mens uttrykket er høyt i den ikke-invasive prostatakreftcellelinjen LNCaP (66). I følge Zheng Fu et al er RKIP-uttrykket redusert i prostatakreftmetastaser og RKIP kan derfor muligens brukes som en selvstendig prognostisk markør i prostatakreft (62).



Figur 6. Samspillet mellom EMT-markører. Skjematisk illustrasjon over hvordan de ulike epitelial-mesenkymal transisjon (EMT)-regulerte genene fungerer i forhold til hverandre. Nukleær faktor kappa B (NF-κB)-signalering fører til induksjon av EMT og oppregulering av Snail. Oppregulering av Snail fører videre til nedregulering av de epiteliale markørene Mucin-1 og Cytokeratin-18 og oppregulering av de mesenkymale markørene Vimentin og Fibronektin. Oppregulering av mesenkymale markører fører til EMT metastase induksjon. Snail kan hemme metastasesuppressor proteinene RKIP og E-cadherin, som videre fører til hemming av NF-κB signalveien via RKIP. β-catenin frigjøres fra E-cadherin komplekset i cytoplasma under EMT, hvor det interagerer med andre proteiner. Det spekuleres i om frigjøring av β-catenin kan føre til EMT metastase induksjon.

1.6 Metastasering

Metastasering av kreftceller er en prosess som består av mange steg. Hvert steg kan være hastighetsbestemmende, da feil i ett av stegene eliminerer cellene fra denne prosessen. Løsrivelse av celler fra primærtumoren med påfølgende invasjon til blod og lymfatisk sirkulasjon eller til nervebaner, er de initierende stegene i tumor metastaseringen. For at celler skal løsrives fra primærtumoren og invadere omkringliggende vev må faktorer som

økt cellemobilitet og aktivering av proteolytiske enzymer som type IV kollagenase, katepsin og plasminogen foreligge. Utfallet av metastaseringen er avhengig av interaksjonen mellom de metastaserende cellene og verten i sirkulasjonen, samt miljøet rundt et organ cellene invaderer. Videre følger homing til re-invasjon av basalmembran, ledsaget av MET, før vekst og differensiering av celler kan forekomme. Det er funnet *in vitro* ved bruk av Matrigel-dekket membraner at kun en sub-populasjon, både i prostatakraftceller og primære prostatakraftceller, har potensial til invasjon ved hjelp av EMT-medierte prosesser (68). Obduksjonsstudier viser at metastaser fra prostatakraft er vanligst å finne i regionale lymfeknuter, dernest følger skjellet før lunger og lever (11).

1.7 Mål med oppgaven

Hensikten med oppgaven er å undersøke hvilken effekt signalering via ADRB2 har på uttrykket av ulike EMT-markør, migrasjon og proliferasjon i prostatakraftceller.

Følgende spørsmål ble stilt:

- Reguleres nivået av EMT-markørene E-cadherin, Snail og RKIP når prostatakraftceller stimuleres med isoproterenol, en agonist for β -adrenerge reseptorer?
- Påvirker ADRB2-signalering fosforylering av VASP?
- Hvilken effekt har stimulering med isoproterenol og hemming med betablokker på prostatakraftcellenes evne til å migrere?
- Hvilken betydning har signalering via ADRB2 på proliferasjon av prostatakraftceller?

2. MATERIALER OG METODER

2.1 Celledyrkning

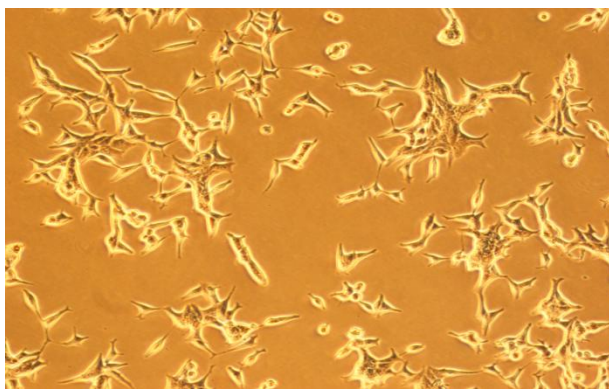
Det ble primært benyttet to ulike cellelinjer i oppgaven, LNCaP og DU145. Alt arbeid med celler ble utført i LAF-benk med steril teknikk. Cellene ble oppbevart i flytende nitrogen og tint ved behov. Tinte celler ble dyrket i 1 x RPMI 1640 med L-glutamin (Invitrogen) tilsatt 10 % føtalt kalveserum (FCS) (Invitrogen), 50 units/ml penicillin og 50 µg/ml streptomycin. Cellene ble oppbevart i CO₂-inkubatorskap (5 % CO₂, 37 °C). Det ble foretatt en mycoplasma test (MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit, Lonza) på cellene hver gang nye celler ble tint. Ved positivt resultat ble infiserte celler destruert og nye celler ble tint.

2.1.1 LNCaP

LNCaP-cellene brukt i oppgaven er fra American Type Culture Collection (ATCC). Disse cellene er androgen sensitive og stammer fra en metastase i venstre lymfeknute hos en 50 år gammel kaukasiske mann med bekreftet metastasert prostatakarsinom. Cellene responderer på 5-alfa-dihydrotestosteron (5α-DHT), produserer prostataspesifikt antigen (PSA) og uttrykker en mutert variant av androgen reseptor (AR) (69, 70).

LNCaP-cellene er adherente epitelceller som vokser relativt sakte. Cellene ble subkultivert en gang i uken, da de var omtrent 85 -90 % konfluente og ble inkubert uforstyrret i 48 timer etter subkultivering. Cellene fikk nytt medium tre ganger per uke.

I oppgaven ble det benyttet LNCaP-celler som var fra passasje 21 til passasje 31. Cellene var i passasje 20 da de ble mottatt fra ATCC.



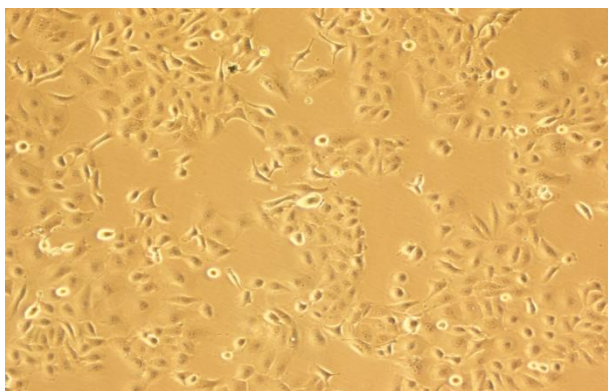
Figur 7. LNCaP-celler i kultur

2.1.2 DU145

DU145-cellene (ATCC) er androgen uavhengige og stammer fra hjernen til en 69 år gammel kaukasisk mann med metastasert prostatakarsinom og lymfatisk leukemi. Cellene uttrykker verken PSA eller AR (71, 72).

DU145-cellene er adherente epitelceller, som vokser raskere enn LNCaP-cellene og må derfor subkultiveres oftere. Cellene ble subkultivert to ganger i uken, og fikk nytt medium tre ganger i uken.

I oppgaven ble det benyttet DU145-celler fra passasje 66 – passasje 73. Cellene var i passasje 60 da de ble mottatt fra ATCC.



Figur 8. DU145-celler i kultur

2.1.3 Subkultivering

Cellene ble trypsinert og subkultivert når de var omtrent 85 - 90 % konfluente. LNCaP-cellene ble subkultivert en gang per uke, mens DU145-cellene ble subkultivert to ganger per uke. Medium ble sugd av cellekulturflasken og 10 ml trypsin (SIGMA ALDRICH) ble tilsatt. Cellene ble inkubert med trypsin i henholdsvis 1 minutt for LNCaP-celler og 5 minutter for DU145-celler. Trypsin er en protease som kløyver adhesjonsproteiner som sørger for at cellene sitter fast til cellekulturflasken. Etter inkubering med trypsin ble trypsinet sugd av og cellene ble videre løsnet fra flaskene ved tilsetning av 10 ml medium direkte mot cellene. Cellene i mediet ble så overført til et 12 ml rør og sentrifugert ned ved 1500 rpm i 5 minutter. Etter sentrifugering ble mediet sugd av og pelleten bevart. Cellene ble deretter resuspendert i 10 ml nytt medium.

Celleantallet i celsuspensjonen ble bestemt ved bruk av 21 Coulter Particel Counter (Beckman Coulter). 40 μ l resuspenderte celler ble tilsatt 20 ml isoton løsning og deretter målt på instrumentet. 3×10^6 celler ble sådd ut i en 175 cm² cellekulturflaske (Corning Incorporated Costar®).

2.1.4 Agens og stimuleringer

Cellene ble stimulert når de var 60 - 80 % konfluente, som regel fem dager etter subkultivering for LNCaP-celler og to dager etter subkultivering for DU145-celler. De ulike agensene ble fortynnet i RPMI-medium med serum og antibiotika og tilsatt cellene. Alle agens som ble benyttet i denne oppgaven har tidligere blitt brukt ved dette laboratoriet og konsentrasjonene av de forskjellige agensene er dermed valgt ut med bakgrunn i tidligere erfaring og basert på andres publikasjoner. Agensene er enten løst i 100 % metanol (isoproterenol), DMSO (karvedilol) eller Rnase-fritt vann (propranolol og ICI 118.551). For å utelukke at en eventuell effekt av stimulering av celler med isoproterenol ikke medieres via metanolen den er løst i, ble tilsvarende mengde metanol også tilsatt til de ustimulerte kontrollene i alle forsøkene.

Tabell 1: Oversikt over ulike agens benyttet i oppgaven

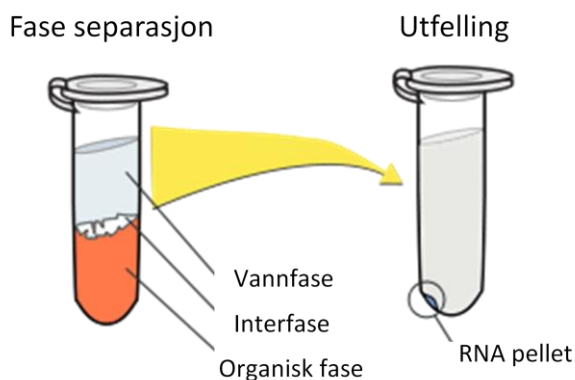
Agens	Virkning	Konsentrasjoner benyttet i oppgaven
ICI 118.551	Selektiv antagonist mot ADRB2	10 μ M og 100 μ M
Isoproterenol	Ikke-selektiv agonist mot β -adrenerge reseptorer	10 μ M
Karvedilol	Ikke-selektiv antagonist mot adrenerge reseptorer (både α - og β -reseptorer)	10 μ M og 25 μ M
Propranolol	Ikke-selektiv antagonist mot β -adrenerge reseptorer	10 μ M

2.2 Ekstraksjon av total-RNA

2.2.1 Prinsipp

TRIzol[®] reagens (Invitrogen) er en guanidin basert RNA-ekstraksjonsbuffer som kan benyttes til å ekstrahere RNA. Metoden kalles guanidinium-thiocyanat-fenol-kloroform ekstraksjon eller kun fenol-kloroform ekstraksjon, og er basert på faseseparering ved hjelp av sentrifugering av en blanding bestående av en vannløselig prøve, RNA, fenol, kloroform samt den denaturerende løsning guanidin thiocyanat. TRIzol[®] reagenset inneholder høye konsentrasjoner med guanidine isothiocyanat og fenoler som hemmer RNase aktiviteten

ved å denaturere ribonukleaser som degraderer RNA, samt fjerner DNA kontaminering. Ved tilsetning av kloroform og deretter sentrifugering vil de ulike fasene kunne skilles fra hverandre. Dette resulterer i en øvre vannfase, en nedre organisk fase og en interfase. Omtrent alt RNA er å finne i vannfasen, mens DNA og proteiner befinner seg i interfasen og den organiske fasen. RNA felles ut av den vannløselige fasen ved tilsetning av isopropanol (2-propanol), før RNA vaskes med etanol for å fjerne guanidin isothiocyanat kontamineringen (73, 74).



Figur 9. RNA isolering ved fase-separering. Skjematisk fremstilling av de ulike fasene etter separasjon, samt RNA pellet etter utfelling med isopropanol (figuren er hentet fra Wikipedia, men gjort endringer på).

2.2.2 Utførelse

2,5 x 10⁵ celler per brønn for LNCaP-celler og 3,5 x 10⁵ celler per brønn for DU145-celler ble sådd ut i 6-brønners cellekulturplater (Corning Incorporated Costar®), og inkubert i RPMI medium tilsatt FCS og antibiotika. Cellene ble stimulert med 10 µM isoproterenol som beskrevet under kapittel 2.1.4.

Total-RNA ble ekstrahert ved bruk av TRIzol® reagens i henhold til protokoll fra produsent (Invitrogen). Prosedyren ble utført på romtemperatur, der annet ikke er beskrevet.

Cellene ble først vasket en gang med 1,0 ml kald PBS før væsken ble sugd av og 1,0 ml TRIzol® reagens tilsatt. Cellene ble deretter skrapet og lysatet ble overført til eppendorfrør. Lysatet ble inkubert i 5 minutter og 0,2 ml kloroform ble tilsatt. Prøvene ble vortexet i omtrent 15 sekunder og deretter inkubert 2 - 3 minutter, før de ble sentrifugert på 12 000 rcf i 15 minutter ved 4 °C. Øverste fase av prøvene ble deretter overført til nye rør. RNA ble så felt ut ved tilsetning av 0,5 ml isopropanol og vending av prøvene. Prøvene fikk stå i 10 minutter før de ble sentrifugert på 12 000 rcf i 10 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble så helt av, og pelleten ble vasket i 1,0 ml 70 -75 % etanol. Prøvene ble vortexet og sentrifugert på 12 000 rcf i 5 minutter ved 4 °C. Etanolen ble så helt av og pelletene fikk stå til tørking til de ble glassklare. Pelletene ble deretter løst i 10 -20 µl RNase-fritt vann, der størrelsen på pelleten avgjorde mengden RNase-fritt vann. Prøvene stod videre 30 minutter for å sikre at pelleten ble fullstendig løst, før de ble satt på is. Prøvene ble deretter fryst ned ved -70 °C etter måling av RNA konsentrasjon.

2.2.3 Måling av total RNA-konsentrasjon

Total RNA-konsentrasjon ble målt ved bruk av NanoDrop Spektrofotometer ND-1000 (Saveen Werner AB). Instrumentet ble først nullstilt ved å måle 2,0 µl Rnase-fritt vann. Deretter ble 2,0 µl prøve applisert på en fiber-optisk måleenhet og prøven ble målt. Instrumentet fungerer ved at en annen fiber-optisk kabel kommer i kontakt med løsningen, slik at løsningen danner en bro mellom de fiber-optiske endene. En pulserende xenon-blinkende lampe fungerer som lyskilde og spektrofotometeret brukes til å måle lyset som har passert gjennom prøven. Konsentrasjonen er kalkulert ut i fra Beers'lov, som sier at lysabsorpsjonen til en prøve er proporsjonal med konsentrasjonen til prøven. Spektrofotometrisk kvantitering av RNA baseres på at en nukleinsyre blant annet består av konjugerte ringstrukturer som absorberer lys ved 260 nm. Ved 260 nm vil en optisk tetthet (OD) på 1 tilsvare omtrent 40 µg/ml RNA. Absorbansen måles ved 260 nm og 280 nm, og ratioen mellom disse målingene forteller noe om renheten av prøven. A_{260}/A_{280} ratioen bør være nær 2,0 for at RNA kvaliteten skal være tilfredsstillende ren. Dersom ratioen er betydelig lavere kan dette være en indikasjon på at prøven inneholder proteiner, fenoler eller andre forurensninger som absorberer lys ved 280 nm (75).

2.2.4 Kvalitetssjekk av total RNA

Et utvalg av RNA prøvene ble kjørt på Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) for å sjekke RNA-kvaliteten med hensyn på RNA-degradering og eventuell DNA-kontaminering. Prøvene ble kjørt i henhold til leverandørens protokoll "Agilent RNA 6000 Pico Kit Quick Start Guide". 2,0 ng RNA ble applisert på en chip bestående av en gel innkapslet i små kanaler. RNA molekylene separeres ved at de vandrer gjennom gelen, og er basert på de ulike molekylære størrelsene av RNA-molekylet. Komponentene i prøven detekteres ved hjelp av laserindusert fluorescens. Resultatet visualiseres i form av et elektroferogram hvor målt mengde fluorescens korrelerer med mengde RNA av en gitt størrelse. Bioanalyseren oppgir blant annet RNA Integritets Nummer (RIN) som et mål på kvaliteten til RNA, samt de ulike fraksjonene av ribosomalt-RNA (5S, 12S og 28S) i prøven. RIN-verdien representerer hele elektroforesebildet av RNA-prøven og inkluderer tilstedeværelse eller fravær av degraderte produkter. En RIN-verdi på 10 tilsvarer et fullstendig intakt RNA, mens en RIN-verdi på 1 tilsvarer et fullstendig degradert RNA (76).

2.3 Semi-kvantitativ real time RT-PCR

2.3.1 Prinsipp

Real time revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-PCR), ofte referert til som real time PCR eller kvantitativ PCR (qPCR), er en metode som kan benyttes dersom man ønsker

å undersøke om det er en forskjell i mRNA-nivået mellom ulike prøver. Dette kan for eksempel være før og etter en behandling.

RNA transkriberes til cDNA ved hjelp av enzymet revers transkriptase. Deretter foregår en fluorescensmerket PCR. PCR-produktet kan enten detekteres med spesifikke prober som er fluorescensmerket eller fluoriserende reagenser som binder DNA. I denne oppgaven ble det fluoriserende reagenset SYBR® Green 1 benyttet. SYBR® Green binder seg til "minor groove" på DNA-tråden, og fluorescensintensiteten øker ved binding til denne dobbelheliksen. Mengde PCR produkt måles som en økning i dobbeltrådet DNA mellom hver sykel. SYBR® Green`s binding til DNA-tråden er uspesifikk, slik at binding til all dobbeltrådet DNA i reaksjonen vil gi et fluoriserende signal som detekteres.

Et instrument monitorerer PCR-amplifikasjonen mens reaksjonen forløper. Deretter blir dataene analysert i et tilhørende software, før dataene blir importert til en Microsoft Office Excel-fil for videre behandling. I oppgaven ble instrumentet MJ Opticon Monitor (Bio-Rad) benyttet og alle data er analysert ved bruk av softwaret Opticon Monitor versjon 3.1 (Bio-rad).

2.3.2 Primere

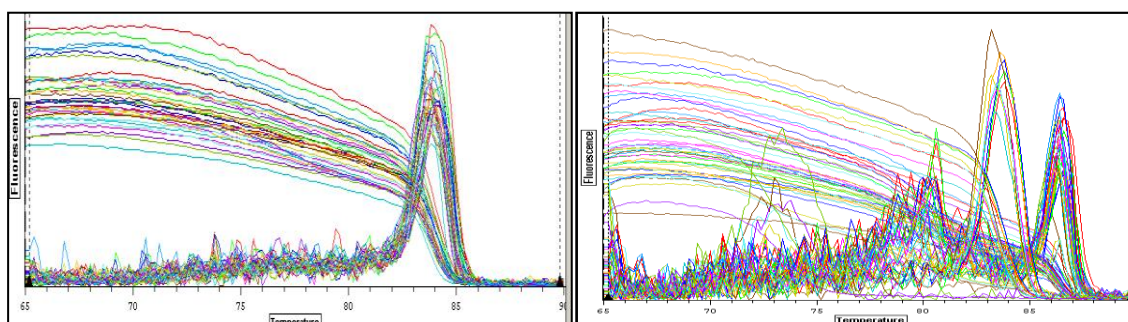
Real time RT-PCR krever bruk av spesifikke primere for et optimalt resultat. mRNA-sekvensen fra de ulike genene ble først lastet ned fra databasen National Center for Biotechnology Information (NCBI) (77), og de gen-spesifikke primerene ble deretter designet ved bruk av Primer 3 Plus (78). Kvaliteten på de utvalgte primerene med hensyn på primer-dimerer, hårnålstrukturer, palindromer og repetisjoner med mer, ble deretter kontrollert ved bruk av programmet Netprimer (79). Primersekvensene ble lagt så langt mot 5`-enden av genene som mulig. Sekvensene ble lagt i en ekson-intron overgang dersom dette var mulig, for å forhindre amplifisering av eventuelt genomisk-DNA. Optimal størrelse på PCR-produkt som dannes under real time RT-PCR er 80 -120 basepar (bp), noe som måtte tas hensyn til ved design av primere.

Tabell 2: Oversikt over primere benyttet i oppgaven

Offisielt gennavn (triviell navngivning)	NM-kode (referanse sekvens i NCBI for mRNA transkript)	Forward primer (3' - 5')	Revers primer (5' - 3')	Størrelse på real time RT PCR-produkt
PEBP1 (RKIP)	NM_002567,2	tggtcttgattcaggaagc	tggtgaccaccaggaatga	107 bp
CDH1 (E-cadherin)	NM_004360,3	cctgggactccacactacaga	tgtgagcaattctgcttga	119 bp
SNAI1 (Snail)	NM_005985,2	cagtgcctcgaccactatgc	tagggctgctggaaggtaaa	120 bp
G6PD (G6)	NM_000402,3	tgcatgagccagataggc	acagggaggagatgtggttg	100 bp

2.3.4 Kontroll av PCR-produkt

For å sjekke at det ble dannet kun ett PCR-produkt under amplifisering ble det gjort en smeltepunktsanalyse på slutten av hver real time RT - PCR. Dersom rådata viser flere ulike smeltepunkt kan dette tyde på at prøven er kontaminert med genomisk-DNA eller at det forligger ulike spleisevarianter av det aktuelle genet. Det kan også bety at primerene som er benyttet er uspesifikke under gitte reaksjonsbetingelser og dermed har dannet flere PCR-produkter.



Figur 10. Smeltepunktsanalyse. Eksempel på PCR produkt med kun ett smeltepunkt (venstre) og PCR produkt med flere smeltepunkt (høyre).

Det ble foretatt en kontroll av alle primerne før hvert enkelt primerpar ble godkjent for real time RT – PCR analyse. Kriterium som ble satt var at det kun skulle være én

smeltepunktsskurve. Dette ble bekreftet ved å kjøre PCR-produktene på en 3 % Metaphor agarosegel og sammenlikne resultatet av gelkjøringen med resultatet fra real time RT-PCR. Dersom real-time RT-PCR kjøringen gav én smeltepunktsskurve skulle også visualisering av PCR-produkt i gelen vise ett bånd. I tillegg ble teoretisk størrelse på PCR-produktene bekreftet ved visualisering på gel. PCR-produktene til primerparene som tilfredsstilte kravene ble deretter sekvensert for en siste sjekk, mens de primerparene som ikke oppfylte kravene ble ekskludert fra forsøkene. Sekvenseringen ble utført av Seksjon for forskning på Hormonlaboratoriet ved Oslo Universitetssykehus, Aker. ABI PRISM® 377 DNA sekvensator (Applied Biosystem) ble benyttet for analysering. Instrumentet foretar en automatisert analyse av fluorescensmerkede DNA-fragmenter som kjøres på en polyakrylamidgel. Metoden baseres på Sanger's dideoxy metode og er en kombinasjon av syklisk sekvensering og fluorescenssekvensering. Beskrivelse av analyseoppsett er å finne i vedlegg III.

2.3.5 Referansegen

Referansegen brukes for å justere for eventuelle konsentrasjonsforskjeller mellom de ulike RNA- prøvene som skal sammenliknes. Det er viktig å velge et referansegen som er stabilt uttrykt og ikke reguleres av de ulike stimuleringene som benyttes, slik at mRNA-uttrykket til dette genet påvirkes minst mulig. I denne oppgaven ble det benyttet glukose-6-fosfat dehydrogenase (G6PD) som referansegen. G6PD er et nøkkelenzym i pentose-fosfat-signalveien og et viktig anti-oksidativt enzym. G6PD er også benyttet av andre som referansegen i real time RT-PCR på prostatakreftceller og er benyttet i en studie hvor det er undersøkt hvilke gener som kan benyttes til normalisering i prostatakreft (2).

TATA-box binding protein (TBP) ble testet ut som et alternativt referansegen. Stimulering av prostatakreftceller gav samme effekt ved bruk av TBP som referansegen som ved bruk av G6PD, men TBP var noe lavere uttrykt. Siden G6PD visste seg å være stabilt innen - og mellom forsøkene er alle dataene i denne oppgaven basert på G6PD som referansegen.

2.3.6 Utførelse

Real time RT-PCR kan enten utføres ved en ett-trinnsreaksjon der cDNA-syntesen og PCR-amplifikasjonen skjer i ett og samme rør, eller som en to-trinnsreaksjon der cDNA-syntesen og PCR-amplifikasjonen utføres i to separate rør. I oppgaven er det hovedsakelig benyttet ett-trinns real time RT-PCR og alle resultater er basert på denne metoden. Det ble imidlertid testet ut om to-trinns real time RT-PCR metoden gav sammenliknbare resultater med ett-trinns RT-PCR metoden. Oppsett for to-trinnsmetoden er å finne i vedlegg IV.

Til ett-trinns real time RT-PCR ble B-R One-Step SYBR® Green qRT-PCR Kit (Quanta) benyttet. Under hele prosedyren ble det jobbet på is og det ble jobbet så hurtig som mulig, da RNA er meget utsatt for degradering.

En mastermiks ble laget etter følgende oppskrift:

	Volum per reaksjon
One-Step SYBR® Green Master Mix (2x)	10,0 µl
Forward primer (10µM)	1,0 µl
Revers primer (10µM)	1,0 µl
qScript One-Step RT	0,4 µl
Rnase Fritt vann	5,6 µl
Total volume	18,0 µl

18,0 µl mastermiks ble fordelt på hver brønn i en 96-brønnsplate og 2,0 µl total-RNA (50ng/µl) ble tilsatt sine respektive brønner på platen. Optiske lokk ble satt på platen før platen ble spunnet på 2000 rcf i ca 10 sekunder, slik at all væsken ble samlet i bunnen av brønnene. Platen ble satt i instrumentet (MJ Opticon Monitor) og real time RT- PCR reaksjonen ble kjørt etter følgende program.

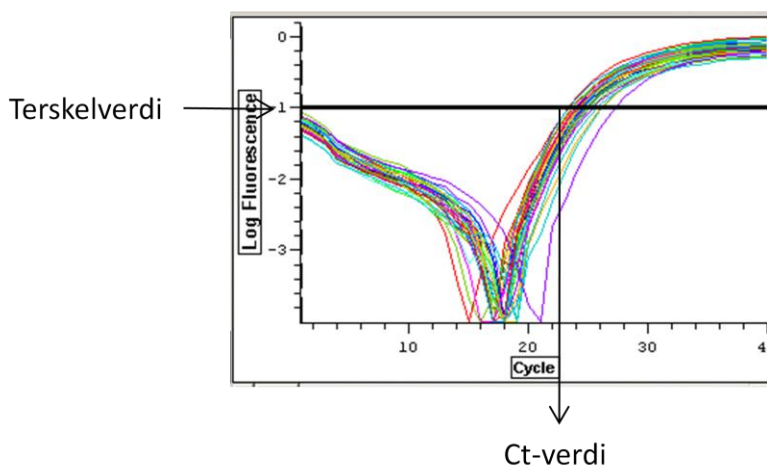
Program 1:

1. 48 °C 10 minutter
2. 95 °C 5 minutter
3. 95 °C 15 sekunder
4. 55 °C 1 minutt
5. Plateavlesning
6. Sykel 3-5 gjentas 39 ganger
7. 72 °C 2 minutter
8. Smeltekurveanalyse fra 65 °C-90 °C, avleses hver 0,2 °C for hvert 5. sekund
9. 6 °C ∞

2.3.7 Relativ kvantifisering

Terskeveldi er et vilkårlig valgt nivå av fluorescens som er høyere enn intensiteten av all bakgrunnstøy. På dette punktet skal PCR reaksjonen være i den eksponentielle fasen og reagenser skal være i overskudd. Denne verdien kan enten bestemmes manuelt eller automatisk. I denne oppgaven er terskelverdien bestemt manuelt for hvert enkelt primersett.

Ct-verdi er definert som det antall sykler som trengs for å nå en valgt terskelverdi, som er over kalkulert bakgrunnsfluorescens for den enkelte prøve (80). Verdien kan bestemmes manuelt eller automatisk, der sistnevnte er benyttet i denne oppgaven. Ct-verdien er invers proporsjonal med mengde mRNA i prøven, og vil dermed reflektere mRNA mengden til ett gitt mRNA i prøven. Jo lavere Ct-verdi, jo mer mRNA er det i prøven. Ct-verdien kan variere ut i fra sensitiviteten til deteksjonssystemet som benyttes.



Figur 11. Ct-verdi versus terskelverdi. Illustrasjon på hva som skiller terskelverdi fra Ct-verdi. Terskelverdi er den horisontale linjen, mens Ct-verdi er kryssningspunktet med linjen (vertikal linje).

Ved relative kvantifisering relateres PCR-signalet til målgenet til en annen prøve, som for eksempel kan være en ubehandlet kontroll. Relativ kvantifisering uttrykker forandring i steady state mRNA-nivå av et gen relatert til mRNA-nivå av et referansegen.

Det finnes to ulike hovedmåter å beregne relativ kvantifisering på. Man kan enten benytte standardkurvemethoden eller komparativ Ct-metoden. I standardkurvemethoden kalkuleres ukjent mengde mRNA ut fra en standardkurve for et spesifikt gen og normaliseres ut i fra et referansegen, som også er beregnet ut i fra en standardkurve. Komparativ Ct-metoden beregner den relative genekspressjonen ut i fra formelen $2^{-\Delta\Delta CT}$. Denne formelen er basert på antakelsen om at amplifiseringseffektiviteten av både målgenet og referansegenet er omtrent lik i den eksponentielle fasen av PCR-amplifikasjonen og at amplifiserings-effektiviteten er nær 100 %. Dersom amplifiseringseffektiviteten til målgenet og referansegenet er sprikende kan man benytte en kompensasjonsprotokoll. Litteraturen hevder at nøyaktigheten til denne metoden er sammenliknbar med standardkurvemethoden og har en bedre nøyaktighet enn komparativ Ct-metoden (81). I denne oppgaven var det nødvendig å benytte en annen utregningsformel enn $2^{-\Delta\Delta CT}$, da effektiviteten til de ulike primerparene var ulike og forskjellig fra 100 %. Dette ble beregnet ved bruk av standardkurver og relative effektivitetsplot for å sjekke korrelasjonen mellom amplifiseringseffektiviteten av hvert enkelt primersett mot effektiviteten til referansegenet. En standardkurve benyttes for å sjekke lineariteten mellom detektert signal og mengde PCR-produkt dannet i real time RT-PCR-reaksjonen.

Korrelasjonen mellom Ct-verdi og ulike konsentrasjoner av RNA skal være så nær 1 som mulig.

Følgende utregningsformel ble derfor benyttet for alle real time RT-PCR data:

$$\frac{(1+E_{\text{målgen}})^{\Delta Ct_{\text{målgen}}}}{(1+E_{\text{referansegen}})^{\Delta Ct_{\text{referansegen}}}}$$

der E er amplifiseringseffektiviteten til medianen av hver enkelt prøve og ΔCt er differansen mellom ustimulert prøve og stimulert prøve.

2.4 Protein ekstraksjon

2.4.1 Prinsipp

Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-buffer er en lysesbuffer som, på grunn av sitt høye saltinnhold og tilstedeværelse av detergent, har evne til å lysere celler slik at proteiner i cellene kan frigjøres i løsning. Bufferen har også evnen til å frigjøre membranassosierte proteiner. Når lysing av cellene starter begynner umiddelbart proteolysering, defosforilysering og denaturering av proteinene. Hemmere tilsettes derfor cellystatet for å begrense disse intracellulære prosessene. Ved å sette cellystatet til blanding ved rotasjon vil membranproteinene løses opp ytterligere. Lysatet sentrifugeres så ned for å skille celledbris, som inkluderer fragmenter fra membraner og organeller, fra intakte proteiner. Etter sentrifugering vil celledbris legge seg i bunnen av røret og danne pellet, mens frigjorte proteiner vil befinne seg i supernatanten.

2.4.2 Utførelse

1×10^6 LNCaP-celler ble sådd ut i 10 cm^2 cellekulturskåler (Corning Incorporated Costar®). Cellene gikk i RPMI-medium tilsatt FCS og antibiotika og ble stimulert med $10 \mu\text{M}$ isoproterenol som beskrevet under kapittel 2.1.4.

Cellene ble vasket to ganger i 5,0 ml kald Phosphat buffered saline (PBS). Væsken ble sugd av og 400 μl kald RIPA-buffer med protease- og fosfatase hemmere (Thermo Scientific) ble tilsatt. Cellekulturskålene ble skrapet og lysatet overført til eppendorfrør. Der flere skåler skulle høstes samtidig ble alle skåler stående på is fra det tidspunktet høstingen startet. Prøvene ble satt til blanding ved rotering i 30 minutter ved 4°C , før de ble sentrifugert i 20 minutter ved 12 000 rcf ved 4°C . Supernatanten ble så overført til nye eppendorfrør og prøvene ble deretter fryst ned ved -70°C .

2.4.3 Måling av proteinkonsentrasjon

2.4.3.1 Prinsipp

Proteinkonsentrasjonene ble målt med Bradford assay på et UV spektrofotometer. Analysen er en kolometrisk proteinanalyse basert på et skifte i absorbanse til fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250. Absorbansmaksimumet skifter fra 465 nm til 595 nm når det binder seg til proteiner i løsningen. I et surt miljø vil proteinene binde seg til Coomassie fargestoffet, noe som resulterer i et skift fra en rødbrun farge med maksimal absorbanse på 465 nm, til en blå farge med maksimal absorbanse på 610 nm (82). Den spektrofotometriske målingen er basert på Beers' lov. Spektrofotometeret beregner gjennomsnittlig absorbanse av parallellene og bruker en forhåndslaget standardkurve til å beregne proteinkonsentrasjonen i µg/ml. Standardkurven lages av ulike fortynninger av Bovine Serum Albumin (BSA) i RIPA buffer tilsatt proteinfargeløsning. En felles stock-løsning av BSA benyttes for å sikre reproduktibilitet mellom forsøkene. I denne oppgaven ble det ikke laget en egen standardkurve, siden en tidligere kurve dekket konsentrasjonsområdet av interesse og erfaring på laben tilsier at standardkurven blir lik hver gang den settes opp. Standardkurven som ble benyttet dekket konsentrasjonsområdet fra 5,0 – 25,0 µg/ml (5-, 10-, 15-, 20- og 25 µg/ml) og hadde en linearitet (r^2) på 98,8 %.

2.4.3.2 Utførelse

2,0 – 6,0 µl proteinlysat ble tilsatt 1,0 ml filtrert proteinfargeløsning (Bio-Rad) fortynnet 1:5 i destillert vann. Alle prøvene ble satt opp i duplikater. Lik mengde proteinlysat med RIPA-buffer ble tilsatt proteinfargeløsningen for hver analyserunde. Det ble først tilsatt 2,0 µl proteinlysat til fargeløsningen, men dersom konsentrasjonsmålingen var utenfor standardkurven ble prøven målt på nytt med mer proteinlysat. Et ekstra rør som kun inneholdt proteinfargeløsning og tilsvarende mengde RIPA-buffer som proteinlysat for de resterende prøvene, ble laget som blank. Prøvene ble vortexet og overført til engangskuvetter før de ble målt på UV-spektrofotometeret Ultrospec 3300 pro (Amersham Bioscience).

2.5 Western blot

2.5.1 Prinsipp

Western blot, også kalt immunoblott, er en teknikk som brukes når man skal detektere tilstedeværelse - eller relative mengder av spesifikke proteiner i en prøve. Proteinene separeres på en polyakrylamidgel i et elektrisk felt basert på proteinenes molekylvekt. Mobiliteten til et protein er invers proporsjonal til dets molekylære friksjon, som igjen er et resultat av størrelse og form. Ved å tilsette prøvebuffer blir proteinenes mobilitet

proporsjonalt med proteinets størrelse. Prøvebufferen inneholder de anioniske detergentene Sodium dodecyl sulfat (SDS) og Lauryl dodecyl sulfat (LDS) som sammen med gir proteinene en kappe av negative ladninger. Før prøvene kan appliseres på en gel må proteinene i lysatet denatureres ved oppvarming til 95 °C. Under oppvarmingen bidrar SDS med å bryte ned disulfidbindinger til sulfhydrylgrupper slik at polypeptidene får en utstrakt form og protein-protein interaksjoner brytes.

I oppgaven ble det benyttet en polyakrylamidgel med gradient (4-12 %), der tettheten på gelen øker nedover gelen. Denne type geler brukes for å få god separasjon av både små og store proteiner. Polyakrylamidgelen er også denaturert og inneholder SDS som gir en sterk negativ ladning til de denaturerte polypeptidene og deler dem i ulike sub-enheter. For å kunne bestemme størrelsen på proteinene som har vandret i gelen ble en størrelsesmarkør med kjente proteinstørrelser tilsatt. Størrelsesmarkøren benyttet i oppgaven består av proteiner i størrelsesorden 20 -100 kDa.

Proteinene på polyakrylamidgelen overføres til en membran som inkuberes med spesifikke antistoff rett mot de aktuelle antigene. Etter overføring av proteiner til membranen blir de gjenværende frie bindingssetene blokkert ved bruk av tørrmelk - eller BSA for å hindre uspesifikk binding av antistoffer til membranen. Vanligvis er dette en to-trinnsreaksjon, der man benytter primært- og sekundært antistoff. Det primære antistoffet er spesifikt for det proteinet man ønsker å detektere, mens det sekundære antistoffet gjenkjenner epitopet på primær antistoffet og danner et kompleks med dette. Det sekundære antistoffet er merket med pepperrot peroksidase (HRP), som i nærvær av hydrogenperoksidase oksiderer substratet luminol. Lyset som genereres kan detekteres og er proporsjonalt med mengden protein på membranen innenfor et gitt område.

2.5.2 Utførelse

2.5.2.1 Prøvepreparering og SDS Polyakrylamid Gel Elektroforese (SDS-PAGE)

30,0 – 40,0 µg total protein ble først fortynnet i RIPA-buffer med protease- og fosfatase hemmere (Thermo Scientific) til et totalvolum på 20,0 µl før 6,3 µl NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (Invitrogen) ble tilsatt hver av proteinlysatene. Lysatene ble varmet opp til 95 °C i 5 minutter og ble deretter satt på is før de ble applisert på en NuPAGE^R 4-12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen). 2,5 µl MagicMark[™] Xp (Invitrogen) ble applisert i brønnen lengst til venstre i gelen. 1xNuPAGE[®] MOPS SDS Running-buffer (Invitrogen) ble tilsatt elektroforesekaret og gelen ble kjørt på 200 Volt i ca 30-45 minutter eller til fargestoffet i prøvebufferen hadde vandret lengst ned i gelen.

2.5.2.2 Overføring til PVDF-membran

Etter SDS-PAGE ble proteinene overført til en Polyvinylidene fluoride (PVDF)-membran av typen Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore). Membranen ble først aktivert 1.minutt i metanol, før den ble lagt i et kar med NuPAGE® Transfer-Buffer (Invitrogen) sammen med svamper og filterpapir i 5 minutter. De ulike komponentene ble deretter pakket i en blotteholder i følgende rekkefølge: svamper – filterpapir - polyakrylamidgel –PVDF-membran – filterpapir – svamper. Blotteholderen ble satt i et elektroforesekar med polyakrylamidgelen nærmest katoden og PVDF membranen nærmest anoden. Transferbuffer ble tilsatt til holderen og destillert vann ble etterfylt rundt holderen for å avkjøle systemet under overføringen. Strømmen ble satt på 35 Volt i 1 time.

2.5.2.3 Blokking av membran og inkubering med antistoff

Etter overføring av proteiner til membranen ble de gjenværende frie bindingssetene blokkert ved bruk av tørrmelk - eller BSA fortynnet i Tris buffered saline-tween (TBS-T). Hva som ble valgt var avhengig av hvilke proteiner som skulle studeres. Som regel ble tørrmelk benyttet, men dersom man skulle studere fosforylerte proteiner ble BSA benyttet. Melk inneholder fosfoproteinet kasein og dette kan gi høy bakgrunnsstøy når man skal studere fosforylerte proteiner, fordi fosfo-antistoffet kan gjenkjenne kaseinet i melken.

Membranen ble lagt på vippe i blokkeringsbuffer i 2 timer på romtemperatur. Etter blokking ble ny blokkeløsning med primært antistoff i riktig konsentrasjon tilsatt. Det primære antistoffet var fortynnet i enten tørrmelk - eller BSA løst i TBS-T og etter kriterier som nevnt over. Membranen ble inkubert med primært antistoff i 2 timer i romtemperatur eller på 4 °C over natt, der sistnevnte ble mest benyttet i oppgaven. Etter 3 x 5 minutters vasking med TBS-T ble sekundært antistoff tilsatt membranen. Alle sekundære antistoff benyttet i oppgaven ble fortynnet 1:10 000 i TBS-T. Membranen ble inkubert med sekundært antistoff i 1 time før den ble vasket 3 x 5 minutters med TBS-T.

Tabell 3: Oversikt over ulike antistoff benyttet i oppgaven

Antistoff (antistoff klon)	Eksperimentell størrelse (kDa)	Primært antistoff produsert i	Blokket i	Primært antistoff (fortynning)	Fortynnet i
α -tubulin	~ 48	Kanin	5 % tørrmelk	1 : 1000	5 % tørrmelk
pVASP	~ 48	Kanin	5 % BSA	1 : 1000	5 % BSA

PEBP1	~ 22	Geit	2,5 % tørrmelk	1 : 2000	5 % tørrmelk
VASP	~ 48	Kanin	5 % BSA	1 : 1000	5 % BSA

2.5.2.4 Fremkalling og deteksjon

For å visualisere antistoff-antigen komplekset ble Immobilon Western, Chemiluminines HRP Substrate (Millipore) benyttet. 1,5 ml HRP Substrate Luminol Reagent og 1,5 ml HRP Substrate Peroxide Solution ble blandet og tilsatt membranen. Fremkallingsvæsken fikk ligge på membranen i 5 minutter før membranen ble fremkalt med et CCD kamera (Syngene, VWR). Kameraet gir et digitalt bilde av membranen, som er mulig å redigere i etterkant. Membranen ble eksponert for lys i varierende antall minutter. Som regel gav 5 minutters eksponering det beste resultatet, det vil si at alle båndene gav detekterbare signal og ingen av båndene var overeksponert innenfor det lineære området.

2.5.3 Loadingkontroll

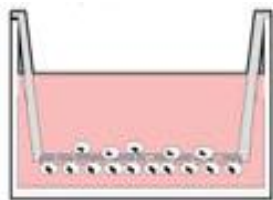
For å kontrollere at det ble applisert lik mengde protein til alle brønnene på gelen ble det kjørt en loadingkontroll etter fremkallingen av membranen. Dette ble gjort ved å inkubere den samme membranen med et antistoff som man antar er stabilt uttrykt i ustimulerte- og stimulerede celler. I denne oppgaven ble α -tubulin, som inngår i mikrotubuli og har en viktig rolle i bevegelse av cytoskjelettet, benyttet som loadingkontroll. Det ble også testet ut antistoff mot extracellulær signal-regulert kinase (ERK) som loadingkontroll, men siden α -tubulin antistoffet var mer spesifikt ble dette valgt.

2.6 Migrasjonssassay

2.6.1 Prinsipp

Migrasjonssassay ble benyttet for å studere cellenes migrasjons egenskaper *in vitro* og ble utført ved bruk av BD Falcon cellekultur-insert (BD Biosciences). Kamrene består av en polyethylene terephthalate (PET)-membran med 8 micron porestørrelse. Kamrene ble plassert i en BD Falcon 6-brønners plate (BD Biosciences) tilsatt medium med serum som kjemoattraktant, mens cellene ble sådd ut i serumfritt-medium. Celler med migrerende egenskaper vil vandre gjennom PET-membranen mot kjemoattraktanten på undersiden av membranen. Cellene som ble sådd ut var på forhånd merket med ^3H -tymidin. ^3H sender ut lav energi betastråler som kan detekteres ved bruk av en scintillasjonsteller. Talletallene ble

oppgitt i CPM og indikerer mengde utstrålt radioaktivitet som detekteres i løpet av ett minutt.



Figur 12. Migrasjonskammer. Illustrasjon av celler utsådd i kamre, der de migrerte cellene befinner seg under polyetylene terephthalate(PET)-membranen, mens cellene som ikke migrerer ligger igjen på oversiden av membranen (BD Biosciences).

2.6.2 Utførelse

$1,5 \times 10^6$ LNCaP-celler og DU145-celler i RPMI tilsatt FCS ble sådd ut i en 75cm^2 cellekulturflaske (Corning Incorporated Costar®). Ved omtrent 50 % konfluens ble 2,0 ml ^3H -merket tymidin ($50\mu\text{Ci}$) i RPMI og antibiotika og 10 ml RPMI med FCS og antibiotika tilsatt cellene. Cellene fikk gå i dette mediet i 24 timer før de ble subkultivert og sådd ut i migrasjonskammerne. Omtrent 2 timer før cellene ble sådd ut ble brønner og kamre rehydrerte med 2,0 ml serum- og antibiotikafritt RPMI medium (37°C). Platen med medium ble satt i CO_2 -inkubatorskap på 37°C . Etter rehydreringen ble 2,5 ml kjemoattraktant tilsatt hver av brønnene i en ny 6-brønnersplate. Serum- og antibiotikafritt medium ble fjernet fra kamrene før de ble overførte til brønnene med kjemoattraktant ved hjelp av en steril pinsett. En cellesuspensjon med ^3H -merket celler ble tillaget og fordelt på tre rør. $10\mu\text{M}$ isoproterenol og $10\mu\text{M}$ propranolol ble tilsatt i hvert sitt rør, mens det siste røret ble ikke tilsatt stimulant. 1×10^5 ^3H -merket celler ble så sådd ut i hvert kammer. Cellene fikk stå i CO_2 -inkubatorskap på 37°C i 48 timer før de ble høstet i tellerør. 2 tellerør ble merket for hver brønn, ett rør for oversiden av membranen og ett rør for undersiden. Mediet i kamrene ble fjernet og kamrene ble tatt ut av 6-brønnersplaten ved bruk av en steril pinsett. Membranene ble tørket av på over- og undersiden med en vattpinne fuktet i destillert vann. Vattpinnen ble så knekt av og vattedotten med celler puttet ned i hvert sitt respektive tellerør. Da alle cellene var høstet ble 4,0 ml scintillasjonsvæske (LumaSafe™ Plus Highest load safety cocktail) tilsatt hvert av rørene. Rørene ble så korket og fikk stå litt før de ble talt ved bruk av WinSpectral 1414 Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer). Hver prøve ble talt i 5 minutter på recovery-program.

2.6.3 Relativ kvantifisering

Relativ mengde migrerte celler ble beregnet ved prosentandel av celler på undersiden av membranen i forhold til total antall celler utsådd.

Det ble også testet ut om det var mulig å kvantifisere migrerte celler uten bruk av radioaktiv merking. Dette ble gjort ved å fikser cellene med 100 % metanol og farge cellene med 1 % toluidine blue i 1 % borax løsning (Sigma Aldrich) på en slide, for deretter å telle antall celler under- og over membranen ved mikroskopering. Denne manuelle kvantifiseringen medførte en stor usikkerhet og var meget tidkrevende. Derfor ble merking av celler med ^3H tymdin og automatisert kvantitering heller benyttet.

2.7 Transient transfeksjon med siRNA

2.7.1 Prinsipp

Transient transfeksjon er en forbigående prosess som innebærer innføring av fremmed DNA til en eukaryot celle. I oppgaven er cellene transfektert med short interfering RNA (siRNA). siRNA er et dobbelttrådet RNA-molekyl på 20-25 bp der gensekvensen er spesifikt rettet mot sekvensen i en gen man ønsker å slå ut, det vil si stoppe transkripsjonen av det aktuelle genet. Det finnes ulike transfeksjonsmetoder for å få cellene til å ta opp DNA. I oppgaven ble det benyttet en lipid-basert metode der det blir dannet liposomer som kapsler inn det vannløselige DNA-molekylet. Liposomene blir tatt opp av cellen, fordi cellemembranen består av lipider og er dermed svært fettløselig. Størrelsen på liposomene er avgjørende for hvor effektivt de blir tatt opp i cellen. Antibiotika kan hemme transfeksjonseffektiviteten derfor bør antibiotikafritt medium benyttes i transfeksjonsforsøk.

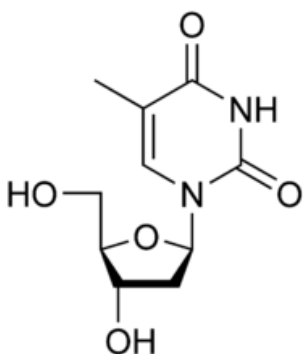
2.7.2 Utførelse

Antibiotikafritt-medium ble tilsatt cellene omtrent 2 timer før transfeksjon. Transfeksjonen ble utført med DharmaFECT DUO transfeksjonsreagens (Thermo Scientific) i henhold til leverandørens protokoll. 0,3 μl DharmaFECT DUO transfeksjonsreagens ble tilsatt 5,0 μl siRNA (2 μM) per brønn. Cellene ble transfektert med siRNA mot ADRB2 (Dharmacon). Som transfeksjonskontroll ble siRNA mot AR og On-targetplus siRNA negativ kontroll (Dharmacon) benyttet. siRNA ble først fortynnet i 1 x siRNA buffer (Thermo Scientific), før serumfritt-RPMI-medium i forholdet 1:1 ble tilsatt. DharmaFECT DUO transfeksjonsreagens ble også fortynnet i serumfritt-medium til samme totalvolum som siRNA i serumfritt-medium. Etter 5 minutters inkubering på romtemperatur ble siRNA og transfeksjonsreagentet blandet sammen ved pipettering. Løsningen ble inkubert på romtemperatur i 20 minutter, før RPMI-medium med serum ble tilsatt. Løsningene utgjorde sammen transfeksjonsmediet. 100 μl transfeksjonsmedium ble tilsatt per brønn og cellene fikk gå i transfeksjonsmedium i 24 timer.

2.8 ³H-tymidin inkorporeringsassay

2.8.1 Prinsipp

³H-tymidin inkorporering benyttes som et mål på cellenes vekst- og proliferasjonshastighet. Tymidin er forløperen til tymin og er en av de fire basene som inngår i DNA molekylet. ³H-merket tymidin inkorporeres i DNA-tråden i stedet for tymidin under cellenes replikasjon. På denne måten vil mengde inkorporert tymidin være et mål på hvor fort cellene replikerer sitt DNA og dermed hvor fort de prolifererer. Inkorporert ³H-tymidin kan deretter kvantifiseres på grunnlag av den avgitte radioaktive strålingen fra ³H-isotopen.



Figur 13: Molekylstruktur av tymidin (Wikipedia).

2.8.2 Utførelse

$1,0 \times 10^4$ LNCaP-celler per brønn ble sådd ut i en 96-brønnersplate (Corning Incorporated Costar®). Cellene gikk i RPMI tilsatt serum og antibiotika i tre døgn før de ble transfektert. Omtrent 2 timer før transfeksjon ble det foretatt mediumskift på cellene med antibiotikafritt-RPMI-medium tilsatt serum. Transfeksjonen ble utført som beskrevet i kapittel 2.7.2. Cellene ble stimulert omtrent ett døgn etter transfeksjon. Stimuleringene ble satt opp i seks paralleller. Cellene ble stimulert med isoproterenol (10 μ M), ICI 118.551 (10 μ M og 100 μ M) og karvedilol (10 μ M og 25 μ M), som beskrevet i kapittel 2.1.4. Transfeksjonsmediet ble avpipettert og 200 μ l medium med stimulant ble tilsatt hver brønn. Etter omtrent ett døgn ble 50 μ l ³H-tymidin (25 μ Ci/ml) i RPMI med antibiotika tilsatt hver av brønnene. Cellene fikk gå med ³H-tymidin i omtrent 18 timer før de ble fryst ned på - 20 °C. Cellene ble senere tint i CO₂-inkubatorskap ved 37 °C og høstet ved hjelp av Packard Filtermate 196 Harvester (Packard Instruments). Dette ble gjort ved at cellene ble overført fra 96-brønnsplaten til et filterpapir (Unifilter-96, Perkin Elmer) ved hjelp av en vakumpumpe. Etter at cellene ble overført til filterpapiret ble filteret tørket i varmeskap på 90 °C i omtrent 15 minutter til det var helt tørt. 4,5 ml scintillasjonsvæske (Microscint™ 0 High Efficiency LSC Cocktail, PerkinElmer) ble deretter tilsatt det tørre filterpapiret og ble puttet i en plastpose og forseglet. Posen ble lagt i en scintillasjonsteller (1450 LSC & Luminescence

Counter MicroBETA TriLux, Perkin Elmer) og strålingen fra inkorporert ³H-tymidin i cellene ble registrert. Telletid ble satt til ett minutt per brønn og telletallene ble oppgitt i CPM. Verdiene ble brukt til videre bearbeiding i Microsoft Office Excel.

2.9 Statistiske analyser og beregninger

For real time RT-PCR ble alle forsøkene utført med 3 replikater i minst 3 uavhengige forsøk. Medianen til triplikatene ble benyttet til videre beregninger. Gjennomsnittet av de 3 uavhengige forsøkene ble benyttet til framstilling av resultatet og standardavvik til gjennomsnittet ble beregnet for hvert tidspunkt (figur 19 og 20).

For migrasjonsassay ble forsøket utført 2 uavhengige ganger med duplikater i forsøk 1 og i henholdsvis 8 (isoproterenol) og 7 (propranolol) paralleller i forsøk 2 for LNCaP-celler. Gjennomsnittet til hvert av forsøkene ble beregnet og gjennomsnittet for de to forsøkene ble beregnet og benyttet til framstilling av resultatet. Standardavviket til gjennomsnittene for de ulike stimuleringene ble beregnet som vist på figur 23. For DU145-celler ble migrasjonsassay utført 1 gang med henholdsvis 8 (isoproterenol) og 7 (propranolol). Gjennomsnittet til parallellene med tilhørende standardavvik ble benyttet til framstilling av resultatet som vist på fig 24.

For ³H-tymidin inkorporeringsassay ble forsøket utført med 6 paralleller i 4 uavhengige forsøk. Gjennomsnittet til de 6 parallellene ble beregnet for hvert forsøk og gjennomsnittet til alle forsøkene ble benyttet til framstilling av resultat. Standardavviket ble beregnet for de ulike stimuleringene som vist på figur 25.

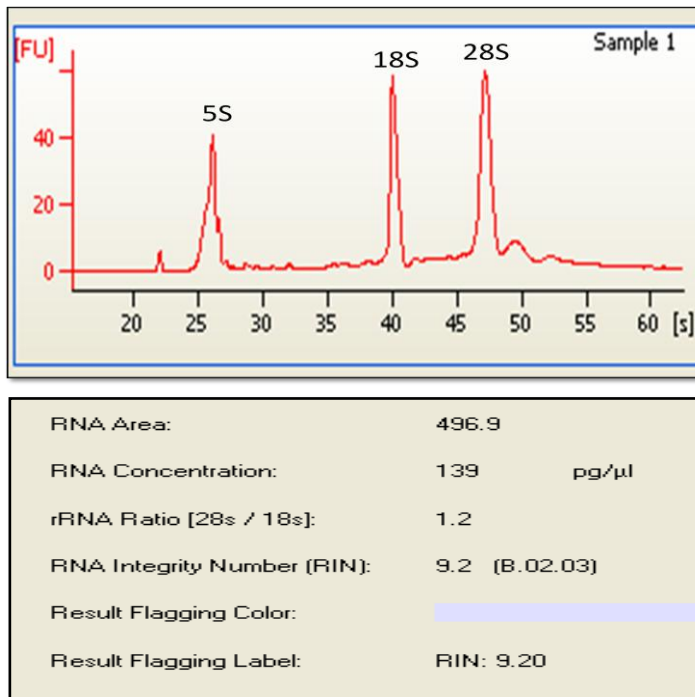
Statiske tester ble utført ved bruk av to-sidig paret t-test med statistikkprogrammet PASW Statistics versjon 18 (tidligere kalt SPSS). $P < 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant. Valg av test er basert på antakelsen om normalfordelte data.

3. RESULTATER

3.1 Kvalitetskontroll av materialer og metoder

3.1.1 RNA-kvalitet

RNA-kvaliteten på utvalget av åtte prøver som ble kjørt på Agilent 2100 Bioanalyzer viste god kvalitet, og ble vurdert ut fra toppene på elektroferogrammet og RIN- verdiene. De fleste RIN- verdiene lå over 9,0, med unntak av en prøve som hadde RIN- verdi på 8,1. Elektroferogrammet viste at fraksjonene av ribosomalt-RNA (5S, 18S og 28S) i prøvene var tilfredsstillende og viste ikke tegn til degradering av prøvene.



Figur 14. Vurdering av RNA-kvalitet ved analysering på Agilent 2100 Bioanalyzer. Eksempel på en av RNA-prøvene benyttet i denne oppgaven kjørt på Agilent 2100 Bioanalyzer. Figuren øverst viser fraksjonen av ribosomalt RNA i prøven, i form av toppene for henholdsvis 5S, 18S og 28S. Figuren nederst viser ulike parametre for RNA kvalitet, der RNA Integritets Nummer (RIN)-verdien representerer hele elektroforesebildet av RNA-prøven. En RIN -verdi på 10 tilsvarer fullstendig intakt RNA, mens en RIN -verdi på 1 tilsvarer et fullstendig degradert RNA.

3.1.2 Ett-trinns real time RT-PCR versus to-trinns real time RT-PCR

Oppsett av real time RT-PCR i to reaksjoner viste noe høyere amplifiseringseffektivitet enn ved oppsett i en reaksjon. Samtidig var Ct-verdiene noe høyere ved to-trinnsmetoden enn ved ett-trinnsmetoden. Testen ble kun foretatt for to ulike primerpar. For referansegenet (G6PD) gav tottrinnsmetoden mindre spredning i Ct-verdi enn ett-trinnsmetoden. Tabell 4 viser data fremskaffet ved de ulike metodene ved bruk av primere for G6PD (n=1).

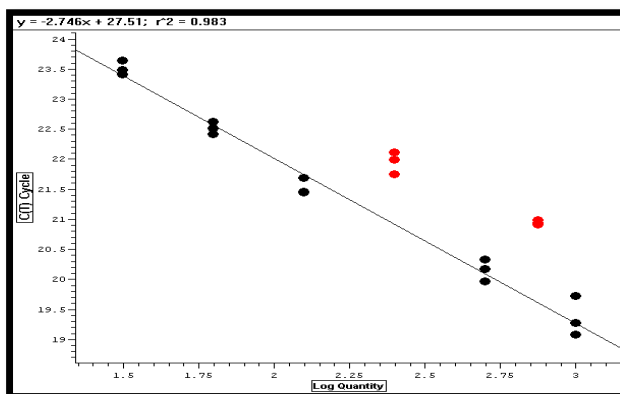
Tabell 4: Sammenlikning av data fremkommet av ett-trinns- versus to-trinnsmetoden.

Et utvalg på seks tilfeldige RNA-prøver ble kjørt på både ett-trinnsmetoden og to-trinnsmetoden, for å sammenlikne Ct-verdi og amplifiseringseffektivitet. Tabellen viser Ct-verdier og amplifiseringseffektiviteten på RNA-prøvene der primere for G6PD ble benyttet.

Ett-trinnsmetode (Ct)	To-trinnsmetode (Ct)	Ett-trinnsmetode (amplifikasjons-effektivitet)	To-trinnsmetode (amplifikasjons-effektivitet)
19,75	22,03	94,73 %	101,80 %
20,97	23,45	85,54 %	85,53 %
20,50	22,74	91,22 %	95,34 %
19,85	22,28	97,70 %	100,25 %
20,01	22,98	101,24 %	105,28 %
19,82	22,89	101,66 %	103,12 %

3.1.3 Bearbeidelse av real time RT-PCR data

Standardkurver ble benyttet til å validere PCR-reaksjonen for hvert primersett. Standardkurvene viste en lineær sammenheng mellom Ct-verdier og RNA i ulike konsentrasjoner, og indikerte at Ct-verdiene korrelerte med RNA-konsentrasjonen, både ved høye og lave utgangskonsentrasjoner av RNA. Figur 15 viser eksempel på standardkurve for G6PD. Korrelasjonskoeffisienten ($r^2 = 0,98$) og indikerer at det er en lineær sammenheng mellom Ct-verdi og ulike konsentrasjoner av RNA for dette primersettet. Alle fortyningene er kjørt i triplikater ($n=1$). To av konsentrasjonene (markert rødt) indikerte feil fortyning, og er ekskludert fra korrelasjonslikningen. De resterende standardkurvene er å finne i Vedlegg V.



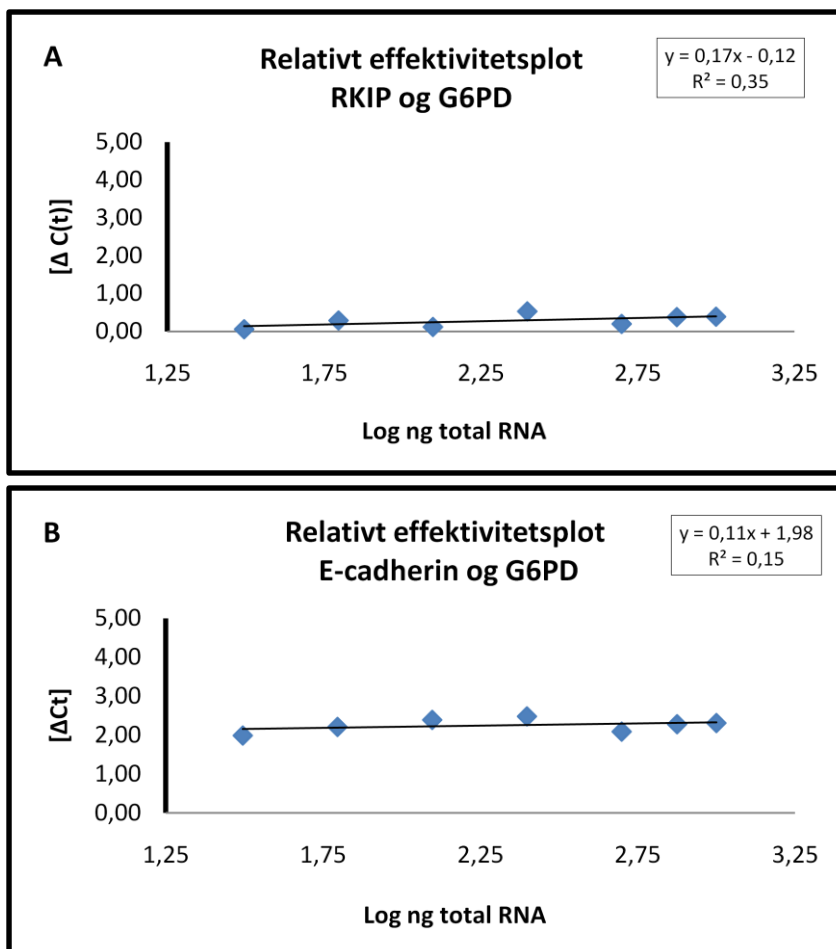
Figur 15. Standardkurve for G6PD. Kurven viser Ct-verdier på y-aksen og logtransformerte konsentrasjoner av RNA (31,2, 62,5, 125, 250, 500 og 750 ng) på x-aksen. Korrelasjonskoeffisienten (r^2) = 0,983 og indikerer at det er en lineær sammenheng mellom Ct-verdi og RNA-konsentrasjonene.

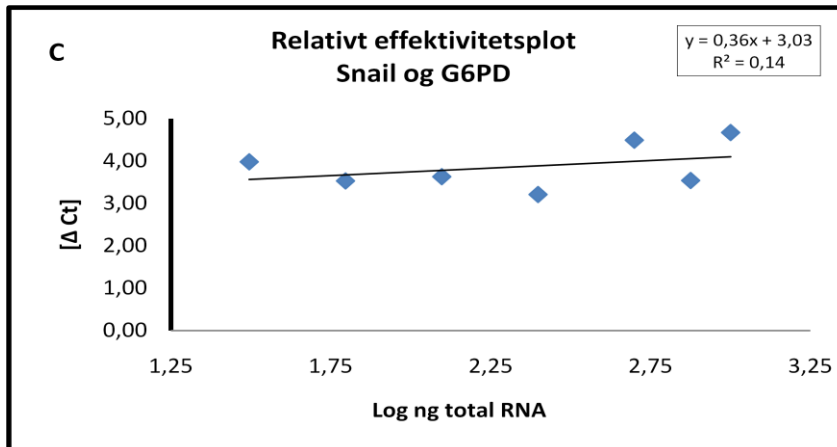
Effektivitetsplottene viser korrelasjonen mellom amplifiseringseffektiviteten til hvert primersett og amplifiseringseffektiviteten til referansegens (G6PD) primere. For at $2^{-\Delta\Delta CT}$ utregningsformelen skal kunne benyttes er kravet til regresjonslikningen at stigningstallet til linjen skal være $<0,10$ (83). Dette var ikke tilfelle for noen av plottene, derfor ble det valgt å benytte en utregningsformel med korrigerende for ulik amplifikasjonseffektivitet.

Figur 16 viser relative effektivitetsplott for RKIP, E-cadherin og Snail. Plottene viste at stigningstallet for RKIP var 0,17, for E-cadherin 0,11 og for Snail 0,36. Ingen av disse stigningstallene tilfredsstilte kravet for bruk av $2^{-\Delta\Delta CT}$ utregningsformelen.

Korrelasjonskoeffisientene (R^2) viste at det var en liten korrelasjon mellom hvert av primersettene for RKIP, E-cadherin og Snail mot primersettet for G6PD.

Det er ønskelig med liten korrelasjon mellom primerne, da økning i korrelasjon indikerer større forskjell i amplifiseringseffektivitet. Plottene viste at R^2 var 0,35, 0,15 og 0,14 for henholdsvis RKIP, E-cadherin og Snail.

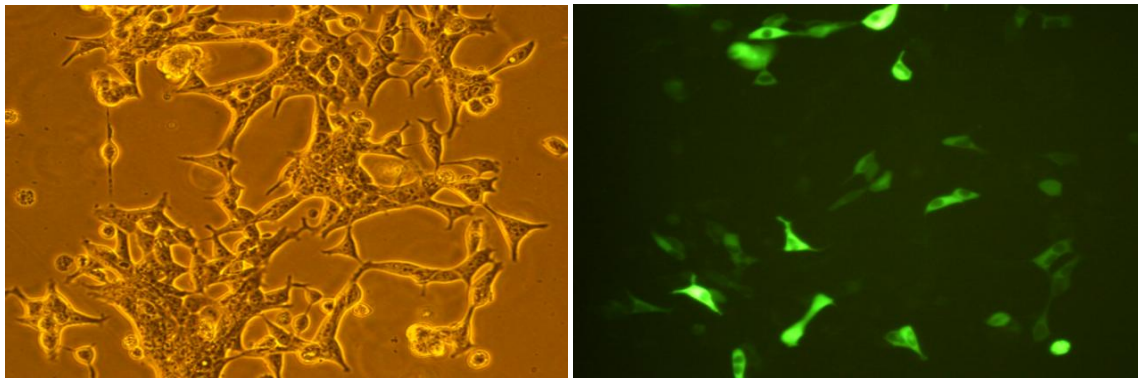




Figur 16. Relativt effektivitetsplott. Relativt effektivitetsplott for primerne til henholdsvis RKIP og G6PD (A), E-cadherin og G6PD (B) og Snail og G6PD (C). Ulike konsentrasjoner av total RNA (31,2, 62,5, 125, 250, 500 og 750 ng) er logtransformert og vist på x-aksen, mens forskjellen i Ct-verdi for det respektive primersettet og referansegenet (ΔCt) er vist på y-aksen. Ingen av plottene tilfredsstiller kravet om stigningstall $<0,10$, som gjelder ved bruk av $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utregningsformelen ($n=1$).

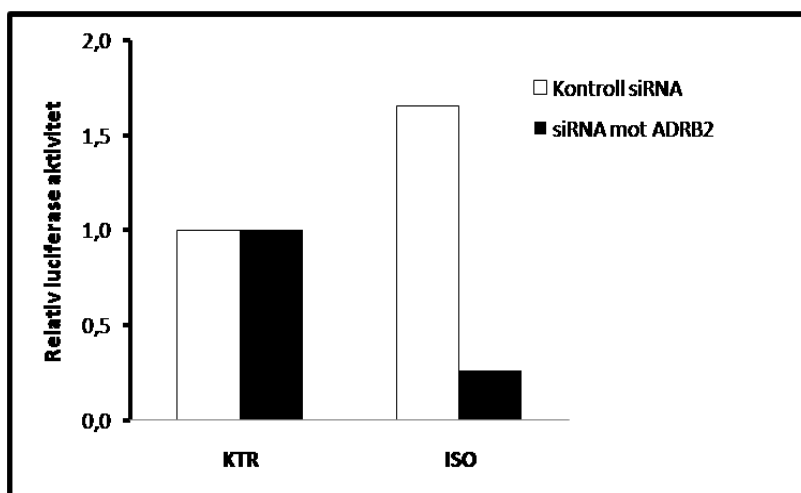
3.1.4 Transfeksjon

Transfeksjonseffektiviteten ble testet ved transfeksjon av Green Fluorescens Protein (GFP). GFP sender ut en grønn fluorescens som er synlig ved eksponering for blått lys. Resultatet viste at cellene hadde tatt opp omtrent 30-50 % av transfektert protein.



Figur 17. Transfekterte LNCaP-celler i kultur. Bildet til venstre viser transfekterte LNCaP-celler tatt med vanlig lysmikroskop, mens bildet til høyre viser transfekterte LNCaP-celler tatt med eksponering for blått lys. Bildet viser opptak av Green Fluorescens Protein (GFP), som er et mål på cellens transfeksjonseffektivitet (Håkon Ramberg upubliserede data).

For å teste transfeksjon i 96-brønnsformat og funksjonell effekt av siRNA ble det kjørt luciferase-assay. Måling av luciferase-aktivitet viste at cellene hadde tatt opp reporter-konstrukt og er dermed et indirekte mål på at transfeksjonen fungerte i 96-brønnsformat (figur 18).



Figur 18. Luciferase-aktivitet i transferte LNCaP-celler. Ved binding av androgenreseptor til androgen respons element vil transkripsjonen av Luciferase aktiveres. Luciferase-aktiviteten vil dermed være et mål på om cellene har tatt opp plasmidene, og dermed vil man anta at også siRNA er tatt opp ved transfeksjon. Dataene er vist i forhold til ustimulerte celler transfektet med kontroll siRNA (On-Targetplus siRNA negativ control) (KTR). Cellene ble stimulert med 10 μ M isoproterenol (ISO) (n=1).

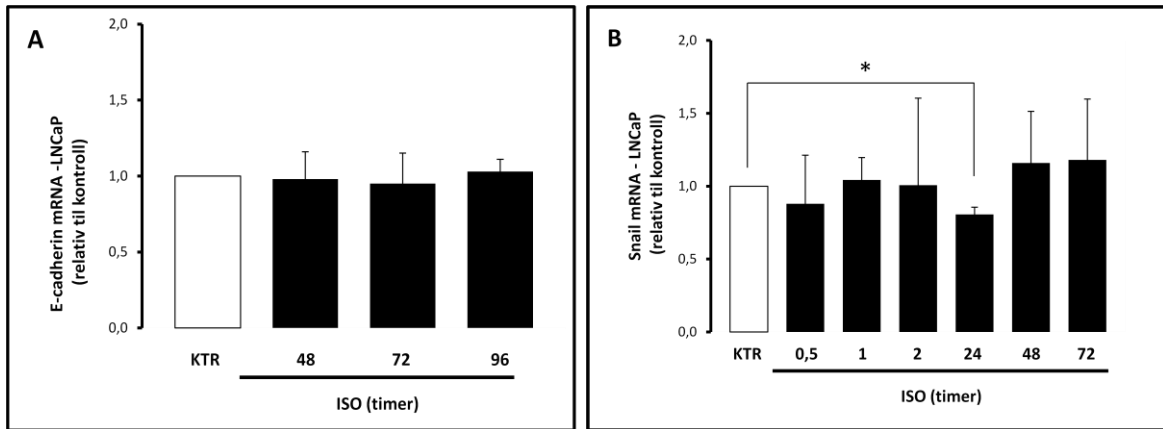
3.2 Eksperimentelle resultater

3.2.1 Effekten av isoproterenol på nivået av EMT-markører i prostatakreft-cellelinjene LNCaP og DU145

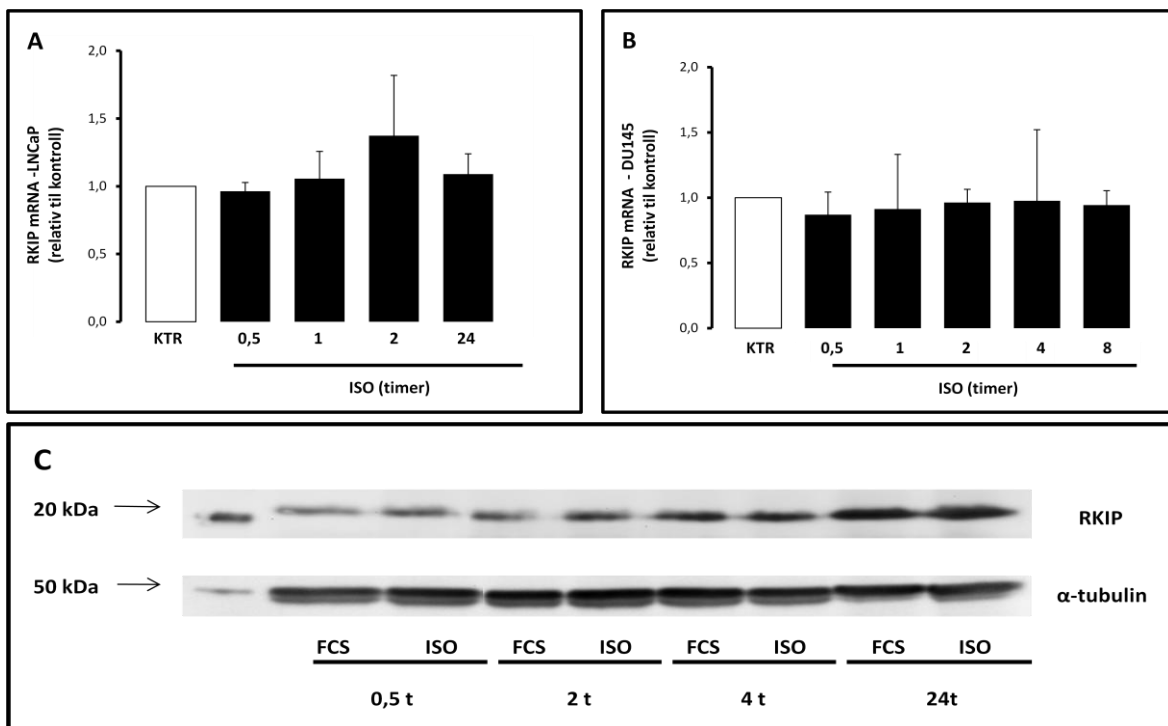
For å undersøke om ADRB2-signalering har en effekt på transformasjonen av epiteliale celler til mesenkymale celler, ble prostatakreftcellerlinjene LNCaP og DU145 stimulert med 10 μ M isoproterenol. Total-RNA ble høstet etter ulike tidspunkt og RNA-ekstraktene ble kjørt på real time RT-PCR for å undersøke mRNA-nivået av ulike gener som tidligere er vist å være involvert i EMT. mRNA-nivået ble undersøkt for E-cadherin, Snail og RKIP. mRNA-nivået av E-cadherin og Snail ble undersøkt i LNCaP-celler, mens mRNA-nivået av RKIP ble undersøkt i både LNCaP- og DU145-celler. Forsøkene ble utført i triplikater (n=3).

Real time RT-PCR viste at stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol i 48-, 72- og 96 timer ikke hadde noe signifikant effekt på mRNA-nivået av E-cadherin (figur 19A). Videre viste resultatene at stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol i 24 timer ga en signifikant reduksjon på 20 % i mRNA-nivået av Snail sammenliknet med ustimulert kontroll ($p=0,02$) (figur 19B). Stimulering med isoproterenol hadde ingen signifikant effekt på mRNA-nivået av RKIP i verken LNCaP- eller DU145-celler (figur 20A,B). Oversikt over øvrige p-verdier er å finne i vedlegg VII.

For å undersøke effekten av ADRB2 på protein-nivået av RKIP ble det kjørt Western blot med proteinekstrakter fra LNCaP-celler stimulert med isoproterenol (10 μ M) i 0,5-24 timer. Western blot viste ingen tegn til at isoproterenol reguler protein-nivået av RKIP i LNCaP-celler (figur 20C).



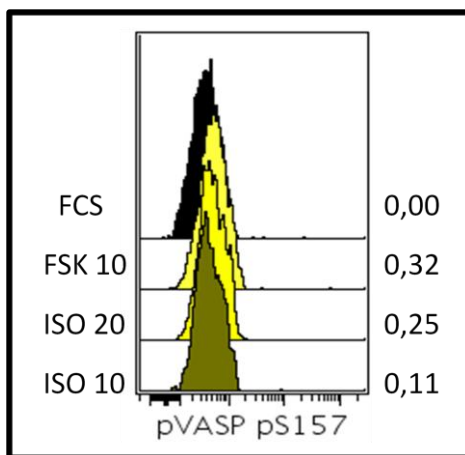
Figur 19. mRNA-nivå av E-cadherin og Snail i LNCaP-celler. Relativt mRNA-nivå av E-cadherin (A) og Snail (B) i LNCaP-celler etter stimulering med isoproterenol (ISO) sammenliknet med ustimulert kontroll (KTR) etter angitt antall timer. Figur 19A viser at mRNA-nivået av E-cadherin ikke reguleres av isoproterenol stimulering i 48-, 72- og 96 timer. Figur 19B viser en signifikant reduksjon på 20 % i mRNA-nivå av Snail i isoproterenol stimulerede LNCaP-celler høstet etter 24 timer. Dataene er vist i forhold til ustimulerte celler (KTR) ved hvert tidspunkt. Forsøkene er utført tre uavhengige ganger (n=3) i triplikater. Figurene viser gjennomsnittet av relativ ratio i forhold til kontroll for alle forsøkene med tilhørende standardavvik. Dataene er normalisert ved bruk av G6PD som referansegen. * indikerer at det er en statistisk signifikant forskjell ($p < 0,05$).



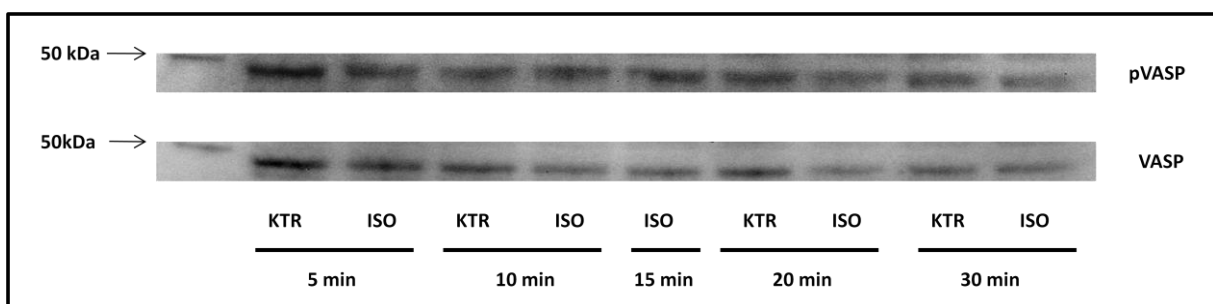
Figur 20. mRNA-nivå (LNCaP og DU145) og protein-nivå (LNCaP) av RKIP. Relativt mRNA-nivå av RKIP i henholdsvis LNCaP-celler (A) og DU145-celler (B) etter stimulering med isoproterenol (ISO) sammenliknet med en ustimulert kontroll (KTR) etter angitt antall timer. Figur 20A viser en økning i mRNA-nivå av RKIP etter 2 timer med isoproterenol stimulering i LNCaP-celler. Denne økningen er ikke statistisk signifikant ($p > 0,05$). Figur 20B viser ingen regulering i mRNA-nivå av RKIP etter stimulering med isoproterenol etter angitt antall timer i DU145-celler. Dataene er vist i forhold til ustimulerte celler (KTR) ved hvert tidspunkt. Forsøkene er utført tre uavhengige ganger (n=3) i triplikater. Figuren viser gjennomsnittet av relativ ratio i forhold til kontroll for alle forsøkene med tilhørende standardavvik. Dataene er normalisert ved bruk av G6PD som referansegen. Figur 20C viser representativt Western blot av RKIP i ekstrakter fra LNCaP-celler stimulert med isoproterenol (ISO) i 0,5-, 1-, 2-, 4- og 24 timer sammenliknet med ustimulert kontroll (KTR). Forsøket er utført tre uavhengige ganger (n=3) ved hjelp av Western blot. α -tubulin er benyttet som loadingkontroll.

3.2.2 Effekten av isoproterenol på fosforylering av Vasodilator-stimulert fosfoprotein i LNCaP-celler

Bakgrunnen for dette forsøket var tidligere funn gjort av forskningsgruppen på Aker. Forskningsgruppen fant ved kjøring på fosfo-flowcytometri at stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol ga økt fosforylering av VASP (figur 21). Det ble på grunnlag av dette bestemt at de preliminnære funnene skulle undersøkes ved kjøring av nye proteinekstrakter på Western blot. Proteiner ble ekstrahert etter stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol (10 μ M) i 5-30 minutter.



Figur 21. Fosforylering av VASP. Grad av fosforylering av Vasodilator-stimulert fosfoprotein (VASP) på serin 157 i LNCaP-celler etter ulike stimuleringer, undersøkt ved flowcytometri. Forskyvning av kurve til høyre indikerer økt mengde fosforylert VASP (pVASP) detektert. Første linje (sort topp) indikerer ustimulerte LNCaP-celler, andre linje (gul topp) indikerer LNCaP-celler stimulert med 10 μ M forskolin (FSK) i 10 minutter, tredje linje (gul topp) indikerer LNCaP-celler stimulert med 10 μ M isoproterenol (ISO) i 20 minutter og fjerde linje (grønn topp) indikerer LNCaP-celler stimulert med 10 μ M isoproterenol (ISO) i 10 minutter. Tallene til høyre viser relativ økning i fosforylering i forhold til ustimulert kontroll (FCS). Forsøket er kun utført en gang (n=1). (Helene H. Grytli og Håkon Ramberg upubliserte data).

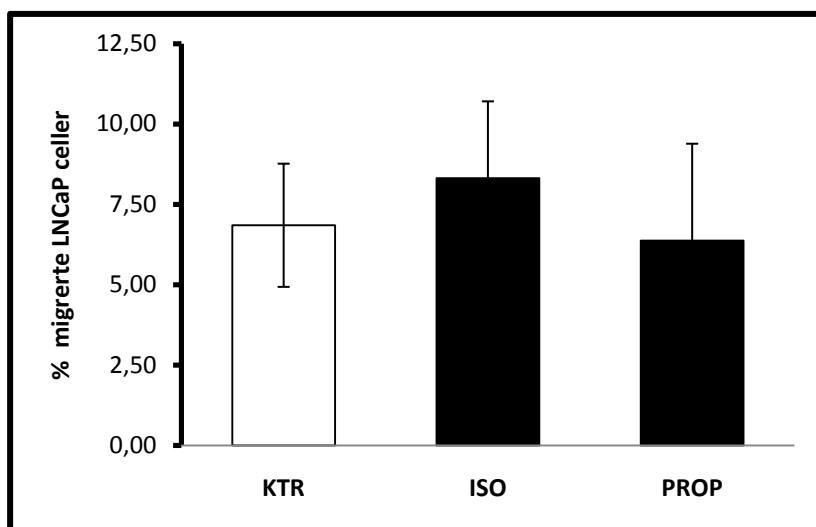


Figur 22. Protein-nivå av pVASP i LNCaP-celler. Protein-nivå av fosforylert Vasodilator-stimulert fosfoprotein på aminosyren serin 157 (pVASP) i LNCaP-celler stimulert med isoproterenol (ISO) i 5, 10, 15, 20 og 30 minutter sammenliknet med ustimulerte celler (KTR). For 15 minutter intervallet finnes ingen ustimulert kontroll. Forsøket er utført tre uavhengige ganger (n=3) ved hjelp av Western blot. VASP er benyttet som loadingkontroll.

Western blot detekterte ikke noe forskjell i fosforylering av VASP på aminosyre serin 157 ved stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol etter verken 5-, 10-, 20- eller 30 minutter (figur 22).

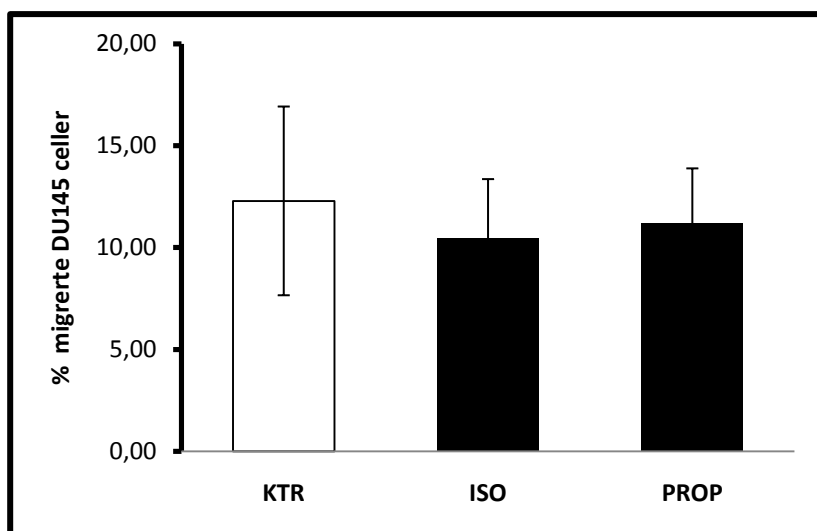
3.2.3 Effekten av isoproterenol og propranolol på migrasjon av LNCaP- og DU145- celler

For å undersøke hvorvidt ADRB2-signalering påvirker migrasjon av prostatakreftceller ble migrasjonsassay utført med LNCaP-celler og DU145-celler. Cellene ble stimulert med 10 μ M isoproterenol og 10 μ M propranolol i serumfritt-medium og sådd ut i migrasjonskamre bestående av en tynn PET-membran. Medium med serum ble benyttet som kjemoattraktant, og cellene migrerte gjennom membranen mot kjemoattraktanten. Forsøket ble utført to uavhengige ganger for LNCaP-celler (n=2) og én gang for DU145-celler (n=1).



Figur 23. Effekt av isoproterenol og propranolol på migrasjonen av LNCaP-celler. Effekten av isoproterenol (ISO) og propranolol (PROP) på migrasjonen av LNCaP-celler, vist ved andel celler (i %) som har migrert gjennom en polyethylene terephthalate (PET)-membran i forhold til totalt antall celler sådd ut. Stimulering med isoproterenol økte cellenes evne til å migrere med 21 % sammenliknet med ustimulert kontroll, mens hemming med propranolol reduserte cellenes evne til å migrere med 7 % sammenliknet med ustimulert kontroll. Forsøket er utført to uavhengige ganger (n=2) i duplikater for forsøk 1 og i henholdsvis 8- (ustimulerte - og ISO-stimulerte celler) og 7 paralleller (PROP- stimulerte celler) for forsøk 2. Kontrollen (KTR) indikerer andel ustimulerte celler vandret gjennom PET-membranen i forhold til ustimulerte celler som ikke har vandret gjennom membranen. Figuren viser gjennomsnitt av gjennomsnittet fra begge forsøkene med tilhørende standardavvik. Ingen av resultatene er statistisk signifikante ($p > 0,05$).

Migrasjonsassay viste at stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol økte cellenes evne til å migrere gjennom membranen med 21 % sammenliknet med ustimulert kontroll, mens hemming med propranolol reduserte cellenes evne til å migrere med 7 % i forhold til ustimulert kontroll (figur 23). Ingen av resultatene var statistisk signifikante ($p =$ henholdsvis 0,16 og 0,39). Oversikt over p-verdier er å finne i vedlegg VI.



Figur 24. Effekt av isoproterenol og propranolol på migrasjonen av DU145-celler. Effekten av isoproterenol (ISO) og propranolol (PROP) på migrasjonen av DU145-celler, vist ved andel celler (i %) som har migrert gjennom en polyethylene terephthalate (PET)-membran i forhold til totalt antall celler sådd ut. Kontrollen (KTR) indikerer andel ustimulerte celler vandret gjennom PET-membranen i forhold til ustimulerte celler som ikke har vandret gjennom membranen.

Stimulering med isoproterenol reduserte cellenes evne til å migrere med 15 % sammenliknet med ustimulert kontroll, mens hemming med propranolol reduserte cellenes evne til å migrere med 9 % sammenliknet med ustimulert kontroll. Forsøket er utført en gang (n=1) i henholdsvis 8- (ustimulerte - og ISO-stimulerte celler) og 7 paralleller (PROP-stimulerte celler). Figuren viser gjennomsnitt av dataene med tilhørende standardavvik. Det er ikke utført statistiske tester.

Som det fremgår av resultatene i figur 24 så det ut som effekten av isoproterenol var motsatt for DU145-celler. Migrasjonsassay viste at andel celler som hadde migrert gjennom PET-membranen ble redusert med 15 % i forhold til ustimulert kontroll når cellene ble stimulert med isoproterenol, mens andel migrerte celler ble redusert med 9 % i forhold til den ustimulerte kontrollen når cellene ble tilsatt propranolol. Videre viste migrasjonsassayet at over dobbelt så mange av DU145-celleene hadde vandret gjennom PET-membranen i forhold til LNCaP-celleene (figur 23 og 24).

3.2.4 Effekten av isoproterenol og betablokkere på proliferasjonen til LNCaP-celler

For å undersøke effekten av ADRB2-signalering på cellenes evne til å proliferere ble det utført ³H-tymidin inkorporeringsassay med LNCaP-celler. Cellene ble stimulert med isoproterenol (10 µM), hemmet med ICI 118.551 (10 µM og 100 µM) eller karvedilol (10 µM og 25 µM), eller forble ustimulert. Effekten av ADRB2 ble undersøkt ved å transfektere cellene med siRNA mot ADRB2.

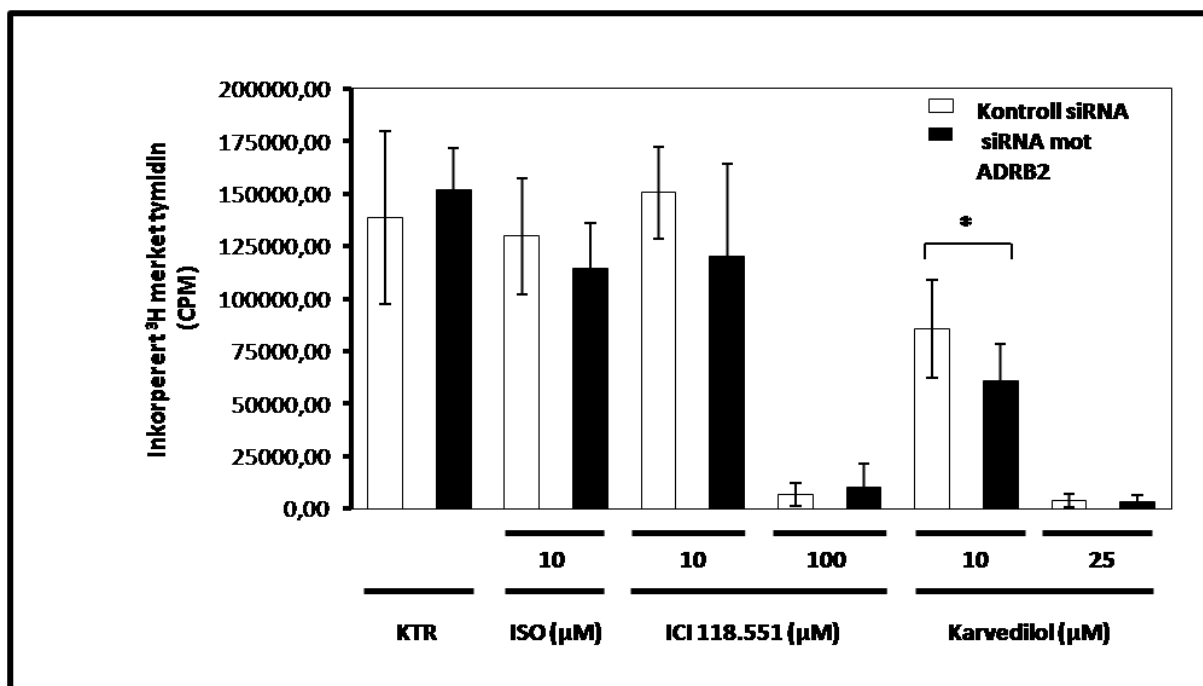
³H-tymidin inkorporeringsassay viste at proliferasjonen av LNCaP-celler gikk ned ved hemming med den ADRB2 spesifikke antagonisten ICI 118.551, samt med den ikke-selektive alfa- og betablokkeren karvedilol. Ut fra figur 25 ser man at transfeksjon med siRNA mot ADRB2 forsterket den hemmende effekten av ICI 118.551 og karvedilol i lave konsentrasjoner.

Figuren viser at siRNA mot ADRB2 gav en liten økning i tymidin inkorporeringen av ustimulerte LNCaP-celler, men effekten var ikke signifikant. Det ble heller ikke observert noen signifikant effekt av isoproterenol på proliferasjon av LNCaP-celler i disse forsøkene. Derimot gav isoproterenol en reduksjon på 25 % av tymidin inkorporeringen når cellene var transfektert med siRNA mot ADRB2.

100 μ M ICI118.551 hemmet inkorporering av tymidin i LNCaP-celler med over 90 %, mens det ble ikke observert noen effekt av 10 μ M ICI 118.551. Ved 10 μ M ICI 118.551 ble det imidlertid observert en nedgang på 21 % i tymidin inkorporering når cellene ble transfektert med siRNA mot ADRB2 sammenlignet med kontroll siRNA.

Karvedilol, både 10 μ M og 25 μ M, hemmet proliferasjon av LNCaP-celler med henholdsvis 60 % og 97 %. I celler stimulert med 10 μ M karvedilol ble det observert en ytterligere reduksjon i tymidin inkorporering når cellene var transfektert med siRNA mot ADRB2. I dette tilfellet var effekten av siRNA mot ADRB2 signifikant ($p=0,05$).

Det ble kun foretatt statistiske tester ved sammenlikning av forskjell mellom LNCaP-celler transfektert med siRNA mot ADRB2 (ADRB2- celler) og LNCaP-celler transfektert med kontroll siRNA (ADRB2 + celler) ved stimulering eller hemming med de samme agensene. Oversikt over p-verdier er å finne i Vedlegg VI.



Figur 25. Effekten av isoproterenol og betablokkere på proliferasjonen av LNCaP-celler. Effekten av stimulering med isoproterenol (ISO) og betablokkere (ICI 118.551 og karvedilol) på proliferasjonen av LNCaP-celler. Cellene er transfektert med siRNA mot ADRB2 og kontroll siRNA (On-Targetplus siRNA negativ control), og stimulert med ISO (10 μ M), ICI118.551 (10 μ M og 100 μ M) og karvedilol (10 μ M og 25 μ M) i 24 timer før høsting. Cellene er merket med 3 H-tymidin og tymidin inkorporeringen er målt med scintillasjonsteller (CPM). Forsøket er utført fire uavhengige ganger med 6 paralleller for hver stimulering ($n=4$). Figuren viser gjennomsnittsverdien av gjennomsnittet til parallellene for hvert av forsøkene med tilhørende SD-avvik. * indikerer at det er en statistisk signifikant forskjell ($p<0,05$).

3.2.5 Signifikanstesting

Alle dataene ble signifikanstestet med paret t-test. Paret t-test er valgt på grunnlag av antakelsen om at variablene som ble studert var normalfordelte. Alle forsøkene ble utført i cellelinjer som i teorien skal være like fra gang til gang. Det var derfor nærliggende å tro at dersom et tilstrekkelig antall forsøk hadde blitt utført ville dette datamaterialet fulgt en normalfordeling. Da det kun ble utført 1-4 forsøk for hver analyse i denne oppgaven foreligger det for få data til å kunne teste om datamaterialet er normalfordelt ved bruk av statistiske tester.

Oversikt over p-verdier ved signifikanstesting er å finne i vedlegg VI

4. DISKUSJON

4.1 Metodologiske aspekter

4.1.1 Valg av modellsystem

LNCaP-celler er i denne oppgaven benyttet som modell for prostatakraft. I oppgaven var det er ønskelig å benytte et modellsystem som skiller en aggressiv og metastaserende prostatakraft fra lokalisert prostatakraft. Fordelen ved å bruke LNCaP som modellsystem er at denne cellelinjen er mer lik opprinnelige prostataceller enn mange andre prostatakraft-cellelinjer med høyere metastaseringspotensial, som for eksempel DU145- og PC3-celler. Fordi tilgjengeligheten på ferske prostataceller fra pasienter både er begrenset og arbeidskrevende velger man i stedet å studere det i velkarakteriserte cellelinjer. Det er verdt å understreke at cellelinjer ikke vil kunne gjenspeile nøyaktig hva som skjer *in vivo*. Forsøk i ferske prostataceller fra pasienter vil heller ikke gjenspeile nøyaktig hva som skjer, da det å fjerne cellene fra sitt naturlige miljø induserer en rekke endringer av cellenes opprinnelige egenskaper. LNCaP-celler karakteriseres som en ikke-metastaserende og en ikke-invasiv cellelinje. DU145-celler, som også ble benyttet i noen av forsøkene, karakteriseres som en mer aggressiv cellelinje med et mer metastaserende og invasivt potensial enn LNCaP-celler. DU145-celler er i likhet med LNCaP-celler epitelceller, men er i tillegg beskrevet å ha mesenkymale egenskaper. Egenskapene er med på å gjøre det lettere for DU145-cellene å migrere og invadere. I migrasjonsassay i oppgaven ble det observert at dobbelt så mange DU145-celler migrerte gjennom PET-membranen i forhold til LNCaP-celler. Dette er også i samsvar med hva andre har beskrevet i litteraturen for disse cellelinjene.

4.1.2 Valg av metoder

4.1.2.1 Real time RT-PCR

Real time RT-PCR er ansett som en av de mest sensitive metodene for deteksjon av mRNA og setter store krav til sjekk av hva som måles og til valg av normaliseringsmetode. I oppgaven er det benyttet uspesifikk deteksjon av mRNA ved bruk av SYBR[®] Green I. Denne deteksjonsmetoden har hovedsakelig to fordeler framfor bruk av probe-basert deteksjon. For det første er det ikke nødvendig med optimalisering av sekvensspesifikk probe, og SYBR[®] Green I kan derfor inkorporere i optimaliserte og veletablerte protokoller. I tillegg er denne deteksjonsmetoden betydelig billigere. Ulempen med SYBR[®] Green er at den binder uspesifikt, og man må derfor være sikker på at kun ett PCR-produkt produseres og at dette representerer genet man studerer. Videre vil eventuell DNA-kontaminasjon gi falsk positiv signal. Utvalget av prøver som ble kontrollert på Bioanalyser viste ikke tilstedeværelse av

DNA i prøvene. Dette kunne blitt sjekket ytterligere ved intron-spesifikke primere, for å avdekke eventuell tilstedeværelse av DNA i prøven.

Mange velger å DNase- behandle prøver for å eliminere eventuell DNA kontaminering, siden spektrofotometrisk måling ikke skiller mellom RNA og DNA i prøven (45,53). Muligheten for kontaminasjon av RNA med RNaser og følgelig degradering av RNA i prøvene er også et stort potensielt problem.

Dataene fra real time RT-PCR kan påvirkes av kvaliteten på RNAet. Forurensninger i RNA-ekstraktet kan påvirke effektiviteten av enzymene. Teoretisk skal RNA ha en renhets ratio (A_{260}/A_{280}) på over 2,0, men ofte aksepteres en ratio på 1,8-2,0. Dersom ratioen er betydelig lavere kan dette være en indikasjon på at prøven inneholder proteiner, fenoler eller andre forurensninger som absorberer lys ved 280 nm. I oppgaven er også prøver som har ratio under 1,8 blitt inkludert i studien, og dette kan muligens være med på å forklare noe av variasjonen i resultatene. Videre kan degradering gi feil resultat men er avhengig hvor primerne er lagt, da degradering av mRNA hovedsakelig starter fra 3'-enden. Resultatet fra kjøring av åtte utvalgte prøver på Bioanalyser viste RIN-verdier over 9,0, med unntak av en prøve, og tyder ikke på betydelig degraderte produkter. Kun et utvalg av prøvene ble testet, så det er ingen garanti for at alle RNA prøvene benyttet i oppgaven er av samme kvalitet. Men da prøvene er behandlet etter samme prosedyrer vil det være nærliggende å tro at kvaliteten på de resterende prøvene er lik kvaliteten på de prøvene som ble kjørt på Bioanalyser. I tillegg var 28S/18S-ratioen stabil mellom prøvene, noe som også indikerer intakt RNA.

RT-reaksjonen og PCR kan enten settes opp i samme reaksjon eller som to separate reaksjoner. Fordelene med å sette opp kun én reaksjon er at det er færre pipetteringssteg, og muligheten for introduksjon av variasjon som følge av pipettering begrenses. Det er dessuten både mindre tidkrevende og krever også mindre RNA. Hvor mye RNA som er tilgjengelig og hvor mange gener som skal undersøkes, vil derfor ofte ha betydning for hvilken metode som velges. Ulempene med oppsett i én reaksjon er at det ikke er mulig å justere cDNA-konsentrasjonen før PCR oppsett, slik at muligheten for ulikheter i cDNA-konsentrasjon er tilstede. Da det under arbeidet med oppgaven ble foretatt uttesting av to-trinnsmetoden, gav den inntrykk av samme trend som resultater framskaffet med ett-trinnsmetoden. Flere prøver må kjøres for å slå fast dette med sikkerhet. Metodene gav i tillegg ulike Ct-verdier med høyere Ct-verdier ved bruk av to-trinnsmetoden. Dette kan forklares ut i fra at det er justert for cDNA-konsentrasjonen i dette oppsettet, og mindre RNA foreligger i prøven. I tillegg viste to-trinnsmetoden bedre effektivitet, antakelig av samme grunn som nevnt over.

Relative effektivitetsplot viste liten grad av korrelasjon mellom hvert enkelt primersett og primerne for referansegenet (G6PD), som er ønskelig ettersom lik amplifiseringseffektivitet for de ulike primersettene etterstrebes. Derimot viste stigningstallene, som er avgjørende for valg av utregningsformel, at ingen av primerne oppfylte kravet for bruk av $2^{-\Delta \Delta CT}$ utregningsformel (figur 16). Amplifiseringseffektiviteten varierte mellom de ulike primerparene og innenfor primerparet. Variasjon av effektivitet mellom primerparene er avhengig av nukleotidsammensetningen i primerne, lengden på PCR-produkt dannet under reaksjonen og reaksjonsbetingelsene i oppsettet. Dette er igjen avgjørende for om primerne vil danne uspesifikke produkter, og avgjørende for effektiviteten. Standardkurvene som ble kjørt viste at det var samsvar mellom Ct-verdi og RNA i ulike konsentrasjoner (vedlegg V). Det var høyest grad av korrelasjonen for G6PD (figur 15). Dette kan muligens forklares ut i fra blant annet lengden på amplifiseringsproduktet til G6PD (100 bp), som antas å være optimal størrelse for real time RT-PCR produkter. Primerne for G6PD viste også best effektivitet, antakelig av samme grunn som nevnt over. Alle primerparene gav amplikon i størrelsesorden 100 – 120 bp, som i utgangspunktet er akseptable lengder for real time RT-PCR. Det ble likevel observert dårligere amplifikasjons-effektivitet i PCR-reaksjonene til E-cadherin og Snail, som gav de lengste PCR-produktene på henholdsvis 119 bp og 120 bp.

Det burde antakelig vært benyttet flere referansegenen for normalisering av data. Dette kunne medført et mer nøyaktig resultat, og kunne gjort det lettere å fange opp eventuelle tilfeldigheter i dataene. Bruk av G6PD som referansegen er validert i en studie av Falk et al, der det ble vist et stabilt uttrykk av genet i både benigne - og maligne prostataprøver (2, 68). I tillegg tilsier erfaring i laben at dette genet er stabilt uttrykt. Disse erfaringene ble også bekreftet under arbeid med denne oppgaven. Der referansegenet viste unormal Ct-verdi, ble RNA konsentrasjonen for den aktuelle prøven målt på nytt og ny real time RT-PCR ble satt opp.

4.1.2.2 Western Blot

Riktig isolering av protein-ekstrakt er avgjørende for resultat av Western Blot. Loading-kontrollen skal kunne fange opp ujevnheter i protein-konsentrasjoner. Variasjoner i loadingkontrollen kan indikere at protein-konsentrasjonen i alle tilfellene ikke var helt nøyaktig. Unøyaktig loading syntes å være et problem i Western blotet for VASP (figur 22). I dette tilfelle burde det i tillegg vært testet om andre loadingkontroller hadde gitt jevnere uttrykk. Fosforylert VASP var noe problematisk å detektere. Det hadde derfor vært hensiktsmessig og inkludert en positiv kontroll, som for eksempel et protein-ekstrakt som overuttrykker VASP. Spesifisiteten til antistoffene som er benyttet, sammen med valg av fortykning, inkubasjonstid og temperatur vil også kunne påvirke resultatet. I oppgaven gav antistoffene for VASP og pVASP mange ulike bånd på Western blotet, mens antistoffene for

RKIP og α -tubulin kun gav et bånd hver. Antistoffene for VASP og pVASP ble fortynnet i BSA, mens RKIP og α -tubulin ble fortynnet i tørrmelk. Da melk inneholder fofoproteinet kasein som kan gi høy bakgrunnsstøy for fosforylerte proteiner, ble BSA benyttet for VASP og pVASP.

Western blot resultat viste også ujevnt uttrykk av RKIP (figur 20C). Nivået av RKIP økte med tiden, uavhengig av stimulering. I dette tilfellet kan det kanskje tenkes at det forelå en autokrin regulering i cellene, der cellene produserte vekstfaktorer, hormoner eller neuropeptider som cellene selv reagerte på. Dette kan også tenkes å være tilfelle for VASP, da lave signaler som nevnt var en utfordring. Ved å ha inkludert en positiv kontroll i forsøksoppsettet for VASP kunne dette ha hjulpet med å bestemme hvilke bånd som var korrekt, da det som nevnt ble observert flere bånd ved dette antistoffet. Dersom disse autokrine faktorene induserer VASP, vil VASP-nivået ha økt mellom hvert mediumskift.

Deteksjon av antigen-antistoff komplekset ved bruk av Immobilon Western er en dynamisk reaksjon som endres konstant med tiden. Derfor kan tiden blottet blir eksponert for lys være avgjørende for resultatet. Det er derfor viktig å velge et tidspunkt innenfor det lineære området. Kvantifisering av båndene på membranen ble kun gjort visuelt. Det ble ikke valgt å kvantifisere Western blotene, da endringene erfaringsmessig var for små til å fanges opp ved analyse av fargeintensitet i bildet.

4.1.2.3 Migrasjonsassay

Migrasjonsassay viste at det var stor spredning mellom de ulike parallellene i forsøket, og den største utfordringen var derfor å gjøre forsøksbetingelsene så like som mulig i hver brønn. Siden celler som ble benyttet var ^3H -merket og dermed ikke kunne telles maskinelt, ble antall celler som ble sådd ut beregnet ved et estimat basert på cellenes normale proliferasjonshastighet. LNCaP-celler har lett for å klumpe seg sammen og kan være vanskelig å løse opp igjen. En utfordring var derfor å løse opp disse klumpene før cellene ble sådd ut, slik at antall celler i hver brønn skulle være mest mulig likt. Før de ^3H -merkede cellene ble talt med scintillasjonsteller måtte de skrapes av membranen med en vattpinne. Denne skrapingen kan ha introdusert variasjoner i forsøket, da cellene ikke var synlige og det var vanskelig å vite om alle cellene var kommet med. Dersom det hadde vært mulig å måle cellene direkte fra membranen, som lar seg gjøre ved fluorescensmerking, ville celleantallet antakelig blitt mer nøyaktig.

En del utprøvnings av metoden ble foretatt, da analysen ikke tidligere var utført i laben. Fiksering av celler på dekkglass etterfulgt av farging ble testet ut. Den største utfordringen med denne kvantiteringsmetoden var at det var vanskelig å gjøre en objektiv vurdering, da andel migrerte celler måtte beregnes ved manuell telling i mikroskop. Det var dessuten

vanskelig å skille hva som faktisk var celler, da celler som hadde migrert gjennom membranen ofte hadde gjennomgått morfologiske endringer. I enkelte tilfeller var det også vanskelig å skille mellom migrerte celler og celler som ikke hadde migrert gjennom membranen. ³H-merking av celler og telling med scintillasjonsteller er derimot, i tillegg til å være en rask og enkel metode, en objektiv vurdering og byr derfor ikke på de samme utfordringene.

4.1.2.4 ³H-tymidin inkorporeringsassay

I oppgaven er ³H-tymidin inkorporering benyttet som et mål på hvordan antall levende celler endrer seg i løpet av tiden cellene inkuberes med tymidin. Dette gjenspeiler summen av hvor mange celler som har delt seg og hvor mange som har dødd. Metoden gir informasjon om nydannet DNA i cellene og benyttes som et indirekte mål på hvor fort cellene prolifererer. For å sjekke andel apoptotiske celler kan man blant merke cellene med propidium iodide (PI) for deretter å foreta en analyse ved bruk av flowcytometri. Dette ble det imidlertid ikke tid til å gjøre innenfor tidsrammene for dette prosjektet. Noen celler vil antakelig ha dødd etter transfeksjon, da dette er en stor påkjenning for cellene. Dette vil i så fall være tilfelle for alle cellene, og vi antar derfor at dette ikke påvirker resultatet.

4.2 Diskusjon av eksperimentell resultater

4.2.1 ADRB2-signalering syntes ikke å kunne regulere nivået av EMT-markører i LNCaP- eller DU145-celler

Ut fra resultatene som har fremkommet i denne oppgaven virker det ikke som om signalering via ADRB2 har noe effekt på omdannelsen av epiteliale celler til mesenkymale celler i LNCaP- eller DU145-celler. Valg av stimuleringsintervall i forsøkene er basert på preliminaire forsøk, der tidspunktene som så interessante ut er gått videre med og undersøkt i denne oppgaven. Som vist på figur 19 og 20 regulerte ikke isoproterenol nivået av EMT-markørene E-cadherin, RKIP eller Snail verken på mRNA- eller på protein-nivå. Det er verdt å merke seg at det her kun er studert et utvalg markører som ikke vil speile hele EMT- bildet.

EMT er en prosess som tidligere er beskrevet i prostatakreftecellelinjene LNCaP, DU145 og PC3 (44, 49). LNCaP-celler har lavt basalnivå av mesenkymale markører og har en epitelial fenotype (59). Enkelte betegner denne cellelinjen som EMT negativ (44), men ulike studier har vist at disse cellene har mulighet til å omdannes til en mesenkymal fenotype. Prosessen er vist å bli induert av blant annet HIF-1 α i LNCaP-celler (44). Overuttrykk av HIF-1 α har vist å kunne induere markører assosiert med mesenkymal fenotype i LNCaP-celler (50). I DU145-celler er basalnivået av epiteliale markører i flere studier vist å være lavt og denne

cellelinjen betegnes derfor som en mesenkymal fenotypisk cellelinje eller og som EMT positiv (59). Transformasjon av DU145-celler er vist å være induisert av stimulering med blant annet EGF (52).

Det er tidligere vist at hemming av celle-til-celle adhesjonsmolekylet E-cadherin vil kunne inducere migrasjon og metastasering av celler (43). Som vist på figur 19A ble det ikke observert noen regulering av mRNA-nivået av E-cadherin etter stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol. Lite spredning i resultatene er med på å styrke denne konklusjonen. I oppgaven gav real time RT-PCR lave Ct-verdier, noe som indikerer et høyt mRNA-nivå i cellene. Dette var å forvente, da dette genet i stor grad er uttrykt i LNCaP-celler.

Videre ble det funnet en signifikant reduksjon på 20 % i mRNA-nivå for Snail ved stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol i 24 timer (figur 19B). Snail er en repressor for E-cadherin, og det ville derfor naturlig å tenke at regulering av Snail vil kunne påvirke mRNA-nivået av E-cadherin. Siden Snail er en transkripsjonsfaktor, vil en nedgang i mRNA-nivået av dette genet teoretisk kunne føre til at mer E-cadherin vil bli dannet. Dette har ikke gitt utslag i endrede mRNA-nivåer av E-cadherin i denne oppgaven. Til tross for at statistikken viser signifikant forskjell ved 24 timer for Snail ser man at denne endringen kun er 20 %. Dette kan være en reell reduksjon, men det kan også være et falskt positivt resultat. Likevel er det verdt å understreke at også små forskjeller kan ha funksjonelle betydninger. Basalnivået av Snail er vist å være lavt i LNCaP-celler (59). Real time RT-PCR rådata indikerte lavt nivå av Snail i LNCaP-celler, da Ct-verdiene var en del høyere enn for de andre markørene.

S. Baritaki et al har i sin studie vist at ved å overuttrykke RKIP ved bruk av CMV-HA-RKIP ekspresjonsvektor, endret DU145-celle seg morfologisk til en mer epitelial fenotype, mens LNCaP-celler bevarte sin epiteliale fenotype uten signifikante endringer (59). Funn i oppgaven tyder på at isoproterenol ikke regulerer uttrykket av RKIP verken på mRNA- eller protein-nivå (figur 20). I oppgaven viste real time RT-PCR lave Ct-verdier for RKIP i LNCaP-celler og en del høyere Ct-verdier for RKIP i DU145-celler, noe som var i samsvar med hva som var forventet. Protein-nivået av RKIP er vist å være høyt i LNCaP-celler og lavt i DU145-celler (59). Det ble i oppgaven forsøkt å kjøre Western blot med proteinekstrakter fra DU145-celler med antistoff for RKIP (PEBP1). Det lyktes ikke å detektere proteiner fra verken isoproterenol stimulerte eller ustimulerte celler. Dette er antakelig på grunn av lavt basalnivå av RKIP i DU145-celler. Resultater fra dette Western blotet er valgt å ikke tas med i oppgaven. Western blot med isoproterenol stimulerte - og ustimulerte celler detekterte protein-nivå av RKIP i LNCaP-celler (figur 20C).

En studie utført av J. Yu og kollegaer har funnet at hemming av ADRB2 med ICI 118.551 regulerer uttrykket av EMT-markører og celleadhesjonsmolekyler i den androgen responsive humane prostataepitelcellelinjen RWPE (24). Studien viser oppregulering av de mesenkymale markørene N-cadherin og vimentin ved hemming av RWPE celler med ICI 118.551. Ingen signifikante endringer ble observert i E-cadherin-nivået. Selv om det ikke lyktes å vise i forsøk utført i denne oppgaven kan funnene fra J. Yu et al tyde på at ADRB2 likevel kan være involvert i EMT, og at hemming av reseptoren kan føre til utvikling av en mesenkymal fenotype. Da dette er studert i en prostataepitelcellelinje kan det tenkes at ADRB2 har en funksjon i EMT på et tidlig stadium i kreftutviklingen og dette kan være med på å forklare hvorfor effekten ikke ble observert i prostatakreftcellelinjene benyttet i denne oppgaven.

4.2.2 ADRB2-signalering viste ingen effekt på fosforylering av Vasodilator-stimulert fosfoprotein

Vasodilator-stimulert fosfoprotein (VASP) er et protein som bidrar i reguleringen av aktin og er en styrende kraft under migrasjonsprosessen (40). Det er kjent at VASP er et substrat for PKA, og siden ADRB2 også er involvert i PKA- signalering kunne det tenkes at isoproterenol kunne regulere fosforylering av VASP. Som vist på figur 22 viste Western blot at stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol ikke hadde noe effekt på fosforyleringen av VASP (pVASP). Preliminært forsøk indikerte at fosforyleringen av VASP økte etter stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol. Hvorvidt denne økningen i fosforylering er av betydning er uvisst. Flowcytometri er en mer sensitiv metode enn Western blot, og små forskjeller som kan detekteres ved bruk av flowcytometri vil ikke nødvendigvis kunne sees på Western blot. Ut i fra Western blotet utført i denne oppgaven ansees de preliminare funnene ved fosfo-flowcytometri som så små at det er konkludert med at ADRB2 ikke ser ut til å ha noe effekt på fosforyleringen av VASP i modellsystemet som ble benyttet.

4.2.3 ADRB2-signalering økte LNCaP-cellenes evne til å migrere

Migrasjonsassay antydte at stimulering av LNCaP-celler med isoproterenol øker cellenes evne til å migrere, mens hemming med propranolol syntes å redusere evnen til å migrere i forhold til kontroll (figur 23). Effekten av isoproterenol stimulering er motsatt for DU145-celler, der migrasjonsassayet viste at cellenes evne til å migrere ble dårligere ved isoproterenol stimulering. Tilsetning av propranolol førte til at cellemigrasjonen gikk noe ned i forhold til kontrollen, men dette var kun minimalt. Det er stor spredning i resultatene, og forsøket må repeteres flere ganger for å minimere denne usikkerheten (figur 24).

Migrasjonsassay med LNCaP-celler ble utført først, og siden resultatet viste en tendens til at stimulering med isoproterenol gav flere migrerende celler var det forventet at denne effekten ville bli større ved utførelse på DU145-celler. Dette viste seg imidlertid ikke å

stemme, da effekten her var motsatt. Da forsøket er utført to uavhengige ganger for LNCaP-celler og kun en gang for DU145-celler, er det derfor nødvendig å utføre begge forsøkene flere ganger, spesielt i DU145-celler, for å kunne få mer konklusive data. Til tross for usikkerhet i begge forsøkene viste forsøkene at omtrent dobbelt så mange DU145-celler i forhold til LNCaP-celler hadde migrert gjennom membranen. Dette er i samsvar med litteraturen og kunnskapene om DU145-celler har høyere potensial for migrasjon og metastasering enn LNCaP-celler.

Det er vist at ADRB2 kan signalere både via G_s og G_i i hjertevev. Signalering via G_i fører til økt celleoverlevelse, mens signalering via G_s fører til apoptose (28). Det er kjent at ADRB2 signalerer via G_s i prostata, men det kan tenkes at også signalering via G_i kan forekomme i prostataceller. Aktivering av begge signalveiene kan muligens forklare noe av spredningen i resultatet. Man kan også spekulere i om ulike signalveier er dominerende i ulike celletyper. Det er tidligere vist at migrasjon av blant annet prostataceller *in vitro* øker ved stimulering av stressrelaterte transmittorer som noradrenalin, som virker på adrenerge reseptorer. Dette er vist i prostatakreftcellelinjen PC3 (26). Dette stemmer overens med funnet i denne oppgaven for LNCaP-celler. Videre er det beskrevet at betablokkere hemmer migrasjon av kreftceller og fører til økt overlevelse (BBC). Dette ser også ut til å samsvare med funnene for både LNCaP- og DU145-celler.

Forskjellen i funn mellom de to cellelinjene kan også ha sammenheng med nivået av AR i de to cellelinjene. LNCaP-celler uttrykker en mutert variant av AR, mens DU145-cellene ikke uttrykker denne reseptoren. Siden ADRB2 er kjent for å stimulere AR-aktiviteten kan det jo tenkes at stimulering av DU145-celler med isoproterenol kan føre til aktivering av andre signalveier som fører til nedgang i migrasjonen. Dette er kun spekulasjoner, og det må nok en gang understrekes at flere forsøk må inkluderes for å få mer konklusive data.

4.2.2 Nedgang i proliferasjon både ved stimulering og hemming av ADRB2 i LNCaP-celler

^3H -tymidin inkorporeringsassay viste at hemming av ADRB2 reduserte proliferasjonen og/eller økte celledød av LNCaP-celler (figur 25). Tidligere er det observert at stimulering av ADRB2 hemmer inkorporering av ^3H -tymidin, men denne effekten var svært liten i forsøkene som er presentert i denne oppgaven. Observasjonene er motsatt av hva man ville forventet å finne, da stimulering med agonist og antagonist teoretisk er forventet å ha motsatt rettede effekter på celleproliferasjonen. Noe overraskende ble effekten ytterligere forsterket når ADRB2 ble slått ut i cellene. Det at siRNA mot ADRB2 synes å øke proliferasjonen / hemme celledød i ustimulerte prostatakreftcellelinjer (LNCaP) er imidlertid i tråd med tidligere funn om at lave nivåer av ADRB2 er assosiert med rask progresjon av prostatakraft (Helene H. Grytli upubliserte data og Yu et al). LNCaP-cellene

var mest følsomme for karvedilol i konsentrasjonen 10 μM . Dette kan forklares ved at karvedilol både er en alfa- og betablokker, og hemming av α -adrenerge reseptorer også er vist å redusere celleproliferasjonen i prostatakraftcellelinjer (84). Dette vil videre kunne forklare hvorfor effekten av karvedilol, som blokker både α - og β -adrenerge reseptorer, har større effekten enn hemming med den spesifikke ADRB2 antagonist ICI 118.551. Det ble observert en ytterligere reduksjon i tymidin-inkorporering når cellene ble transfektert med siRNA mot ADRB2. Dette kan bety at signalering fra β -adrenerge reseptorer aktiverer signalveier som motvirker effekten av α -adrenerg signalering. Da EMT er assosiert med økt celleproliferasjon, vil man ikke forvente at agens som hemmer proliferasjonen også fremmer mesenchymal transisjon (44).

Et kjennetegn for β -adrenerg signalering er reseptorens mulighet til å hemme celleproliferasjonen i noen celletyper og stimulere cellevekst i andre (85). Litteraturen viser til studier der det ikke er observert noe effekt av ADRB2-signalering verken i benigne prostataceller eller i prostatakarsinomceller. I studien utført av Yu og kolleger så de ikke noe effekt på celleproliferasjon ved hemming av ADRB2 i prostataceller (24). Likeledes fant Palm et al at verken stimulering med norepinephrine eller hemming med betablokkere gav utslag på celleproliferasjonen i den humane prostatakarsinomcellelinjen PC3 (26).

At celleproliferasjonen kan gå ned både ved stimulering og hemming av reseptoren kan muligens også forklares ut i fra at hemming av celler med betablokkere i høye konsentrasjoner kan føre til uspesifikke effekter og påvirke andre signalveier som kan påvirke cellenes proliferasjon. Nedgangen i proliferasjon, som følge av stimulering og hemming, kan også tenkes å skyldes toksiske effekter som følge av for høy konsentrasjon av de ulike agensene. Dette kan medføre celledød og dermed tap av celler eller signalering via andre signalveier som har en negativ effekt på proliferasjonen.

Anti-androgenet bicalutamid fører også til hemming av proliferasjon i LNCaP-celler. Kanskje kan det tenkes at også betablokkere har mulighet å hindre aktivering av AR og at dette er en mulig mekanisme bak nedgang i proliferasjonen. Som nevnt tidligere, er det vist at isoproterenol induserer androgen regulerte gener (20)

4.2.5 Valg av agens og nivå av ADRB2 i modellsystem

Isoproterenol, som er benyttet i oppgaven, er en syntetisk agonist som ikke finnes naturlig i kroppen. Denne agonisten skal etterlikne de endogene katekolaminene noradrenalin og adrenalin og virker på β -adrenerge reseptorer. Isoproterenol er ikke spesifikk for ADRB2, men virker også på andre β -adrenerge reseptorer. Isoproterenol er vist å være en full agonist, en like potent ADRB2-agonist som adrenalin og mer potent enn noradrenalin (30, 86).

Under arbeidet med denne oppgaven ble det observert at effekten av stimulering av celler med isoproterenol var liten. ³H-tymidin inkorporeringsassay viste at proliferasjonen til cellene gikk ned etter stimulering med isoproterenol, men effekten var mindre enn tidligere observert. Migrasjonsassayene ble også utført med samme batch av LNCaP-celler fra ATCC. Det ble også utført morfologisk undersøkelse av cellene etter stimulering med isoproterenol for å undersøke omdannelsen av epitelceller til neuroendokrin lignende celler, som er kjent å kunne forårsakes av ADRB2 (30). Tilsvarende kontroll ble også gjennomført av da prosjektet startet opp, men i motsetning til hva som ble observert ved oppstart av prosjektet (høsten 2009), viste den nye celle-batchen liten grad av neuroendokrin differensiering. Det ble derfor spekulert i om ny batch av LNCaP-celler (ATCC) hadde lavere uttrykk av ADRB2. Real time RT-PCR detekterte også lavere mRNA-nivå av ADRB2 i den nye batchen av LNCaP-celler, og det vil derfor videre bli undersøkt om manglende isoproterenol effekt skyldes lavere nivå av ADRB2. Det er ikke kjent at uttrykket av ADRB2 endrer seg i LNCaP-celler avhengig av nummeret av cellepassasjer, som er observert for blant annet PI3K (18).

Både propranolol og karvedilol er henholdsvis betablokker og alfa- og betablokker som per i dag benyttes klinisk, hovedsakelig ved behandling av hypertensjon. Funn ved bruk av disse i cellekulturforsøk vil derfor være av stor betydning og biologisk relevans. ICI 118.551 er vist å være en potent antagonist for ADRB2 (87), men benyttes kun i forsøks- og ikke klinisk i sammenheng. Sammenhengen mellom bruk av betablokkere og risikoen for utvikling av kreft har vært mye studert i epidemiologiske studier (32-35). Som tidligere nevnt i oppgaven har enkelte av studiene vist lovende effekter, også for risikoen for utvikling av aggressiv prostatakreft.

Bruk av syntetiske ligander kan ikke likestilles med kroppens egne substanser, heller kan ikke forsøk *in vitro* likestilles med hva som skjer i kroppen *in vivo*. Likevel kan det gi en indikasjon eller ide på hvordan prosesser foreløper, og er gode utgangspunkt for *in vivo* forsøk i dyremodeller.

4.2.6 Betydningen av statistisk signifikans

I oppgaven ble det funnet to statistisk signifikante funn ($p < 0,05$). Paret t-test viste at det var en statistisk signifikant reduksjon i mRNA-nivå av Snail mellom ustimulerte - og isoproterenol stimulerte LNCaP-celler etter 24 timer ($p = 0,02$). Med dette menes at det er 2 % sannsynlighet for at dette resultatet har fremkommet ved tilfeldigheter.

Likeledes ble det ved bruk av paret t-test funnet at det var en statistisk signifikans ($p = 0,05$) i ³H-tymidin inkorporering mellom LNCaP-celler transfektert med kontroll siRNA og med LNCaP-celler transfektert med siRNA mot ADRB2 når cellene ble stimulert med 10 μ M

karvedilol. Dette funnet kan forklares ut i fra at det faktisk er en reell forskjell i cellenes proliferasjon når reseptoren blir slått ut og cellene hemmes med denne antagonisten, men kan også ha oppstått som følge av tilfeldigheter. I dette tilfelle vil man kunne forvent at 1 av 20 observasjoner kan gi et falskt positivt svar.

En p-verdi avhenger av usikkerheten i målingene, størrelsen på materialet og hvor stor endring som skjer. En liten p-verdi betyr at det er liten sannsynlighet for at funnet skyldes tilfeldigheter. Det er verdt å nevne at statistisk signifikant og biologisk relevant forskjell ikke nødvendigvis er det samme. Et resultat kan være statistisk signifikant uten å ha biologisk relevans. Det er viktig å repetere forsøket minst tre uavhengige ganger, da man ikke kan stole på at konklusjoner basert på forsøk kun utført én gang representerer virkeligheten. Sistnevnt er en allmenn regel i basalforskning, og er også erfart i denne oppgaven.

4.2.7 Prognostiske markører i prostatakraft

Forskere verden over jobber med å finne gode markører som kan være med og forutsi en aggressiv sykdomsutvikling av prostatakraft. Som nevnt tidligere er PSA den eneste screeningsmarkøren for prostatakraft per i dag. European Association of Urology (EAU) publiserte i 2009 at PSA-screening førte til 30 % økt overlevelse av prostatakraft (88). Likevel er det er enighet om at PSA-screening fører til overdiagnostisering. På tross av spesifisitetproblemer ved diagnostikk av prostatakraft, er PSA den beste serologiske tumormarkøren for prostatakraft man har i dag, og den eneste som rutinemessig kan benyttes til å identifisere sykdom i prostata.

I litteraturen finner man mange ulike forslag på markører som man mener kan brukes som biomarkører for progresjonen av prostatakraft. Blant annet mener Zheng Fu et al at RKIP kan brukes som en selvstendig prognostisk markør i prostatakraft, da de mener å ha funnet et redusert uttrykk av dette proteinet i prostatakraftmetastaser (62). Videre mener Yu et al at ADRB2 kan tenkes å være en potensiell prognostisk biomarkør for aggressiv prostatakraft, da de mener å ha funnet at redusert uttrykk av reseptoren kan være assosiert med progresjonen av human prostatakraft (24). Det vil være nødvendig med ytterligere forskning før ADRB2 kan benyttes som en biomarkør for prostatakraft, da reseptorens signaleringsmekanisme ennå ikke er fullstendig kartlagt. Antakelig vil det også være nødvendig med måling av flere biomarkører for å kunne gi et godt bilde på sykdomsutviklingen av prostatakraften, siden denne typen kreft blant annet kjennetegnes ved sin heterogenitet.

4.2.8 Fremtidige studier

Det viktigste i forhold til videre studier basert på forsøk i denne oppgaven vært å få avklart om stimulering med isoproterenol har motsatt effekt på migrasjon i LNCaP-celler og i DU145-celler, som ble observert i oppgaven. Som nevnt tidligere ville det derfor vært nødvendig å inkludere flere forsøk for å få mer konklusive data, både for LNCaP- og DU145-celler. Dersom det hadde vært mer tid disponibelt i denne masteroppgaven ville det også vært interessant å benytte LNCaP- og DU145-celler, som enten overuttrykker ADRB2 eller som er transfektert med siRNA mot ADRB2, og kjørt migrasjonsassay på stimulerede og hemmede celler. Det kunne også vært aktuelt å hemme med andre betablokkere enn de som er benyttet i oppgaven, for eksempel den spesifikke ADRB2-antagonisten ICI 118.551. I tillegg ville det vært interessant å kjøre invasionsassay på både utransfektete- og transfektete stimulerede celler (LNCaP og DU145), for å studere cellenes invasive egenskaper og undersøke hvilken effekt ADRB2 har på denne prosessen.

Videre ville det vært både lærerikt og nødvendig å følge opp resultatet fra ^3H -tymidin inkorporeringsassay for å prøve å forstå årsaken til nedgang i celleproliferasjonen, og for å undersøke om effekten av spesielt 10 μM karvedilol faktisk skyldes nedgang i proliferasjon eller om redusert tymidin inkorporering heller skyldtes apoptose. Dette kan blant annet la seg gjøre ved bruk av MTT-assay for å sjekke cellenes vitalitet eller ved PI-flow for å sjekke for apoptose. Eventuelle funn ved bruk av LNCaP som modellsystem vil kunne forutsi hva som skjer på et tidlig tidspunkt i utviklingen av prostatakreft, og dermed ha høyere potensial for terapeutiske intervensjoner enn ved funn i mer aggressive cellelinjer. Likevel ville det vært spennende å studere andre prostatakreftcellelinjer med et mer metastaserende og invasivt potensial. Ved positive funn i cellelinjer kan man velge å bekrefte dataene ved å lage ferske cellekulturer fra pasientvev.

4.2.9 Konklusjon

I denne oppgaven var det ingen funn som indikerte at transformasjon av epiteliale prostatakreftceller til mesenkymale prostatakreftceller (EMT) ble mediert via ADRB2-signalering, ved bruk av LNCaP og DU145 som modellsystem. Fosforylering av VASP, som kan regulere migrasjon, ble heller ikke regulert av ADRB2-signalering. ADRB2-signalering syntes imidlertid å ha betydning for cellens evne til å migrere, der effekten av ADRB2 så ut til å være motsatt rettet i LNCaP-celler i forhold til DU145-celler. Videre førte hemming av ADRB2 til en signifikant nedgang i celleproliferasjonen i LNCaP-celler. Denne effekten syntes å bli forsterket når nivået av ADRB2 ble redusert med siRNA.

5. LITTERATURLISTE

Reference List

- (1) Institutt for populasjonsbasert kreftforskning. Kreftregisteret. www.kreftregisteret.no 2009 December 22
- (2) Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med* 2005;83:1014-24.
- (3) Taskén K.A. Markører for påvisning av prostatakraft og prediksjon av prognose. *Tidsskrift for Den norske legeforening* . 2005.
Ref Type: Magazine Article
- (4) Wolfgang Lilleby og Jon Sudbø. Biologi og behandlingsmuligheter ved utvikling av prostatakraft. *Tidsskrift for Den norske legeforening* . 2005.
Ref Type: Magazine Article
- (5) Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S, Stattin P, Li G, et al. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med* 2008;358:910-9.
- (6) abc-helsekost. Godartet prostata-forstørrelse? www.abc-helsekost.no 2010
- (7) Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1665-71.
- (8) Bjålie J.G. HESOSØV. Menneskekroppen, fysiologi og anatomi. 2001.
- (9) Dr.med Håkon Wæhre. Prostatakraft. <http://helsenett.no/> 2007 October 26
- (10) Balk SP, Knudsen KE. AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal* 2008;6:e001.
- (11) M.Wirth JEABS-DSK. *Molecular Biology of Prostate Cancer*. 1998.
- (12) Wang W. Inflammation and prostatic carcinogenesis - a morphological study of the human prostate. 2007.
- (13) H Skogseth H Bertilsson J Halgunset. Epitelial-mesenkymal transisjon og prostatakraft. *Tidsskrift for Den norske legeforening* . 29-5-2008.
Ref Type: Magazine Article
- (14) Cox ME, Deeb PD, Lakhani S, Parsons SJ. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res* 1999;59:3821-30.
- (15) Kirby RS. *An Illustrated Pocketbook of PROSTATIC DISEASES*. 2010.
- (16) Einrem B. PSA (Prostata spesifikt antigen). www.rikshospitalet.no 2007 November 24

-
- (17) Epstein JI, Pizov G, Walsh PC. Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer* 1993;71:3582-93.
- (18) Kaarbo M, Mikkelsen OL, Malerod L, Qu S, Lobert VH, Akgul G, et al. PI3K-AKT-mTOR pathway is dominant over androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Cell Oncol* 2010;32:11-27.
- (19) Felleskatalogen. www.felleskatalogen.no 2010 May 12
- (20) Kasbohm EA, Guo R, Yowell CW, Bagchi G, Kelly P, Arora P, et al. Androgen receptor activation by G(s) signaling in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280:11583-9.
- (21) Waltering KK, Helenius MA, Sahu B, Manni V, Linja MJ, Janne OA, et al. Increased expression of androgen receptor sensitizes prostate cancer cells to low levels of androgens. *Cancer Res* 2009;69:8141-9.
- (22) Simonsen TAJLR. *Illustrert farmakologi, 2.utgave. 1998.*
- (23) Ritter SL, Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:819-30.
- (24) Yu J, Cao Q, Mehra R, Laxman B, Yu J, Tomlins SA, et al. Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. *Cancer Cell* 2007;12:419-31.
- (25) Ramberg H, Eide T, Krobert KA, Levy FO, Dizeyi N, Bjartell AS, et al. Hormonal regulation of beta2-adrenergic receptor level in prostate cancer. *Prostate* 2008;68:1133-42.
- (26) Palm D, Lang K, Niggemann B, Drell TL, Masur K, Zaenker KS, et al. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer* 2006;118:2744-9.
- (27) Grandoch M, Rose A, ter BM, Jendrossek V, Rubben H, Fischer JW, et al. Epac inhibits migration and proliferation of human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 2009;101:2038-42.
- (28) Xiao RP. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* 2001;2001:re15.
- (29) Cox ME, Deeble PD, Bissonette EA, Parsons SJ. Activated 3',5'-cyclic AMP-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *J Biol Chem* 2000;275:13812-8.
- (30) Nagmani R, Pasco DS, Salas RD, Feller DR. Evaluation of beta-adrenergic receptor subtypes in the human prostate cancer cell line-LNCaP. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1489-94.
- (31) Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 2006;24:268-73.

-
- (32) Algazi M, Plu-Bureau, Flahault A, Dondon MG, Le MG. [Could treatments with beta-blockers be associated with a reduction in cancer risk?]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2004;52:53-65.
- (33) Fletcher AE, Beevers DG, Bulpitt CJ, Coles EC, Dollery CT, Ledingham JG, et al. Cancer mortality and atenolol treatment. *BMJ* 1993;306:622-3.
- (34) Perron L, Bairati I, Harel F, Meyer F. Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada). *Cancer Causes Control* 2004;15:535-41.
- (35) Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* 1998;317:713-20.
- (36) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- (37) Lang K, Drell TL, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, et al. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer* 2004;112:231-8.
- (38) Masur K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Res* 2001;61:2866-9.
- (39) Drell TL, Joseph J, Lang K, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:63-70.
- (40) Hasegawa Y, Murph M, Yu S, Tigyi G, Mills GB. Lysophosphatidic acid (LPA)-induced vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates lamellipodia formation to initiate motility in PC-3 prostate cancer cells. *Mol Oncol* 2008;2:54-69.
- (41) Lodish et al. *Molecular Cell Biology*. 2008.
- (42) *Cell Signalling Technology*. www.cellsignal.com 2010
- (43) Zhu ML, Kyprianou N. Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. *FASEB J* 2009.
- (44) Jiang YG, Luo Y, He DL, Li X, Zhang LL, Peng T, et al. Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Int J Urol* 2007;14:1034-9.
- (45) Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2007;91:21-8.
- (46) Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2008;7:3112-8.
- (47) Reiman JM, Knutson KL, Radisky DC. Immune promotion of epithelial-mesenchymal transition and generation of breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2010;70:3005-8.

-
- (48) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.
- (49) Ke XS, Qu Y, Goldfinger N, Rostad K, Hovland R, Akslen LA, et al. Epithelial to mesenchymal transition of a primary prostate cell line with switches of cell adhesion modules but without malignant transformation. *PLoS One* 2008;3:e3368.
- (50) Luo Y, He DL, Ning L, Shen SL, Li L, Li X. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 2006;119:713-8.
- (51) Cao J, Chiarelli C, Richman O, Zarrabi K, Kozarekar P, Zucker S. Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *J Biol Chem* 2008;283:6232-40.
- (52) Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 2003;4:499-515.
- (53) Gu X, Zerbini LF, Otu HH, Bhasin M, Yang Q, Joseph MG, et al. Reduced PDEF expression increases invasion and expression of mesenchymal genes in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4219-26.
- (54) Giehl K, Menke A. Microenvironmental regulation of E-cadherin-mediated adherens junctions. *Front Biosci* 2008;13:3975-85.
- (55) Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:155-66.
- (56) Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* 2004;24:306-19.
- (57) Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 2004;18:1131-43.
- (58) Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, et al. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 2004;23:7345-54.
- (59) Baritaki S, Chapman A, Yeung K, Spandidos DA, Palladino M, Bonavida B. Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by the novel proteasome inhibitor, NPI-0052: pivotal roles of Snail repression and RKIP induction. *Oncogene* 2009;28:3573-85.
- (60) Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, et al. RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:17515-23.
- (61) Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:878-89.

-
- (62) Fu Z. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. 2006.
- (63) Grunert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:657-65.
- (64) Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:878-89.
- (65) Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D, et al. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2001;21:7207-17.
- (66) Beach S, Tang H, Park S, Dhillon AS, Keller ET, Kolch W, et al. Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene* 2008;27:2243-8.
- (67) Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415-28.
- (68) Klarmann GJ, Hurt EM, Mathews LA, Zhang X, Duhagon MA, Mistree T, et al. Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:433-46.
- (69) Product Information Sheet for ATCC CRL-1740. ATCC LNCaP. 2010.
Ref Type: Pamphlet
- (70) Veldscholte J, Berrevoets CA, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Mulder E. Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation. *Biochemistry* 1992;31:2393-9.
- (71) Product Information Sheet for ATCC HTB-81. ATCC DU145. 2010.
Ref Type: Pamphlet
- (72) Scaccianoce E, Festuccia C, Dondi D, Guerini V, Bologna M, Motta M, et al. Characterization of prostate cancer DU145 cells expressing the recombinant androgen receptor. *Oncol Res* 2003;14:101-12.
- (73) Meng L, Feldman L. A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis* siliques and dry seeds. *Biotechnol J* 2010;5:183-6.
- (74) Invitrogen. TRIzol. www.invitrogen.com 2010
- (75) Nano Drop Spectrophotometer. Nano Drop Spectrophotometer, ND-1000, User's Manual. 2010.
Ref Type: Pamphlet
- (76) Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006;7:3.

-
- (77) National Center for Biotechnology Information, (NCBI). NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 2010 Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (78) bioinformatics. Primer 3 Plus. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> 2010 Available from: URL: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- (79) PREMIER Biosoft International. Netprimer. <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/> 2010 Available from: URL: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>
- (80) Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004;15:155-66.
- (81) Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 2002;302:52-9.
- (82) Experimental Biosciences. Bradford protein assay. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html> 2010
- (83) Schmittgen TD. Real-time quantitative PCR. *Methods* 2001;25:383-5.
- (84) Kanda H, Ishii K, Ogura Y, Imamura T, Kanai M, Arima K, et al. Naftopidil, a selective alpha-1 adrenoceptor antagonist, inhibits growth of human prostate cancer cells by G1 cell cycle arrest. *Int J Cancer* 2008;122:444-51.
- (85) Stork PJ, Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 2002;12:258-66.
- (86) Weigl N, Seifert R. Distinct interactions of human beta1- and beta2-adrenoceptors with isoproterenol, epinephrine, norepinephrine, and dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;327:760-9.
- (87) O'Donnell SR, Wanstall JC. Evidence that ICI 118, 551 is a potent, highly Beta 2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize Beta-adrenoceptor populations in tissues. *Life Sci* 1980;27:671-7.
- (88) Roobol MJ, Kerkhof M, Schroder FH, Cuzick J, Sasieni P, Hakama M, et al. Prostate cancer mortality reduction by prostate-specific antigen-based screening adjusted for nonattendance and contamination in the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). *Eur Urol* 2009;56:584-91.
- (89) CAMBREX Bio Science. GelStar. www.biov.cn/down/GelStar.pdf 2010 Available from: URL: www.biov.cn/down/GelStar.pdf
- Battista, M. C., et al. "Inhibition of DHCR24/Seladin-1 impairs cellular homeostasis in prostate cancer." *Prostate* (2010).
- Horoszewicz, J. S., et al. "LNCaP model of human prostatic carcinoma." *Cancer Res.* 43.4 (1983): 1809-18.

Product Information Sheet for ATCC CRL-1740. ATCC LNCaP. 2010.

Ref Type: Pamphlet

Product Information Sheet for ATCC HTB-81. ATCC DU145. 2010.

Ref Type: Pamphlet

6. VEDLEGG

Vedlegg I	Reagenser og utstyr
Vedlegg II	Løsninger
Vedlegg III	Sjekking av PCR-produkt
Vedlegg IV	To-trinns real time RT-PCR
Vedlegg V	Standardkurver real time RT-PCR
Vedlegg VI	Oversikt over p-verdier ved signifikanstesting

Tabell 5: Oversikt over reagenser benyttet i oppgaven

Produkt	Katalog nummer	Produsent
α -tubulin, antistoff	T-9026	Sigma/AKK
ADRB2 siRNA (50mol)	J-005436-07-0050	VWR /Dharmacon
Agarose, For Routine Use	A9539-500G	SIGMA ALDRICH
Albumin, bovine serum (BSA) Fraction V, minimum 96%, lysophilized powder	A4503-50G	SIGMA ALDRICH
Bio-Rad protein assay – dye reagent concentrate	500-0006	Bio-Rad
Borax Solution	HT1002-1000ML	SIGMA ALDRICH
B-R On-Step SYBR®Green qRT-PCR Kit	170-8893BR	Quanta BIOSCIENCES
Carvedilol (50mg)	C3993 50MG	SIGMA ALDRICH
DharmaFECT® Duo Transfection Reagent	T-2010-03	Thermo Scientific
DU145	HTB-81	LGC Standards/ATCC
Fosfo-VASP,antistoff	3111	Cell Signalling Technology
Føtalt Kalve Serum, 500ml EU approved	10270-106	Invitrogen
Gel Star Nucleic Acid Gel Stain, 10 000 x concentration in DMSO	50 535	Lonza
Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	78420	Thermo Scientific
ICI 118 551, Beta2-AR hemmer (5mg)	I127	SIGMA ALDRICH
Immobilon-P	IPVH00010	Millipore

TransferMembrane, PVDF, pore size: 0,45µm		
Immobilon Western, Chemiluminines HRP Substrate, 500ml	WBKLS0500	Millipore
Isopropanol (2-propanol)	59304 -1L-F	SIGMA ALDRICH
Isoproterenol hydroklorid	I-5627	SIGMA ALDRICH
Isoton II Diluent	8448011	Nerliens Meszansky
LNcaP Clone FGC	CRL-1740	LGC Standards/ATCC
Luciferase Assay Substrate	E151A	Promega
LumaSafe™ Plus Highest load safety cocktail		Perkin Elmer
MagicMark™ Xp, Western Standard	LC 5602	Invitrogen
Metanol	152506X	VWR
MetaPhor® Agarose	50184	Cambrex
Microscint™ 0 High Efficiency LSC Cocktail	6013611	Perkin Elmer
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	LT07-418	Lonza
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel, 1,5mm x 10 well	NP0335BOX	Invitrogen
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	NP0008	Invitrogen
NuPAGE® MOPS SDS Running buffer(20x)	NP0001-02	Invitrogen
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	NP0006-1	Invitrogen
On-Targetplus siRNA negativ control (15 nmol)	D-001810-01-05	VWR/Dharmacon

Propranolol (100mg)	P8688	SIGMA ALDRICH
PBP protein (RKIP), antistoff	ab87892	Abcam
Protease Inhibitor Coctail EDTA-free (100x)	78415	Thermo Scientific
qScript™ cDNA Synthesis Kit	95047-500	Quanta BIOSCIENCE
Rektifisert sprit	600051	Arcus
Reporter Lysis Buffer (5x)	E397A	Promega
RPMI 1640 med L-glutamin (1x) 500ml	21875-034	GIBCO, Invitrogen
RNA 6000 Pico Kit til Bioanalyzer	5067-1513	Matriks
siRNA-buffer (5x)	B-002000-UB	Thermo Scientific
Taq PCR Kit	E5000S	New England BioLabs
³ H-Thymidine (5mCi)	TRA-120	Amersham
Toluidine O Blue	T3260-5G	SIGMA ALDRICH
Triklormetan (kloroform)	32211	SIGMA ALDRICH
TRIzol® Reagent	15596-018	Invitrogen
Trypsin (25g)	T-4799	SIGMA ALDRICH
TWIST (H-81), antistoff	sc15393	Santa Cruz Biotechnology
VASP, antistoff	3112	Cell Signalling Technology
Tørrmelk (med lavt fettinnhold)	ukjent	Tine
UltraPURE, Rnase, Dnase fritt vann	10977-035	Invitrogen

Tabell 6: Oversikt over utstyr benyttet i oppgaven

Produkt	Katalog nummer	Produsent
ABI PRISM 377 DNA Sequencer		Applied Biosystems
Agilent 2100 Bioanalyzer		Agilent Technologies
21 Coulter Particel Counter		Beckman Coulter
CCD-kamera, Synergene Chemi Genius		VWR
Cell Culture Plate, 6 well	3506	Corning Incorporated Costar®
Cell Culture Plate, 96 well	3598	Corning Incorporated Costar®
Cell Culture DISH, 100 mm x 20 mm style	430167	Corning Incorporated Costar®
Cell lifter	3008	Corning Incorporated Costar®
Companion plate, 6-brønners	353502	BD BioScience
CORNING® Flask, 75 cm ² cell culture flask	430641	Corning Incorporated Costar®
CORNING® Flask, 175 cm ² cell culture flask	431080	Corning Incorporated Costar®
Control Insert, 6-brønner	354576	BD BioScience
Filterpapir (454x150mm)	516-0029	VWR
Kyvetter, engangs	101424-100	VWR
1450 LSC & Luminescence Counter MicroBETA TriLux		Perkin Elmer
Micoplate scintillation and luminescence counter		Packard

Multiplate® PCR plates, low 96-well white	MLL9651	Bio-Rad
NanoDrop Spectrophotometer	ND-1000	Saveen Werner AB
NUPAGE blottekar		Invitrogen
NUPAGE elektroforesekar		Invitrogen
MJ Opticon Monitor 3		Bio-Rad
Packard Filtermate 196 Harvester, Unifilter- 96		Packard Instruments
Power supply Seiko DPU414		Bio-Rad
Ultra Clear Cap Strips	AB-0866	Thermo Scientific
Ultraspec 3300		Amersham Bioscience
Unifilter-96 GF/c	6005174	Perkin Elmer
UV transilluminator		Hoefler

Vedlegg II Løsninger

Tris-acetat/EDTA (TAE) – buffer (50x)

Reagens	Slutt-konsentrasjon	Volum
Tris	2,0 M	60,6 g
EDTA	0,05 M	25 ml
dH ₂ O		400 ml

Vei inn 60,6 g Tris i et begerglass og løs det i ca.150 ml renset vann. Pipetter ut i LAF-benk 25 ml sterilfiltrert 0,5 M EDTA (pH 8,0) over i begerglasset. Tilsett eddiksyre (100%) til pH 8,0. Overfør løsningen til målekolbe og juster volumet med renset vann til 250 ml.

Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBS-T) (1x)

Reagens	Volum
NaCl	80 g
KCl	2 g
Tris-base	30 g
Tween 20	5 ml
dH ₂ O	10 l

pH justeres til 8,0

RIPA-buffer

Reagens	Konsentrasjon	Slutt-konsentrasjon	Volum
NaCl	4 M	150 mM	18,75 ml
NP-40	100 %	1 %	5,00 ml
SDS	10 %	0,10 %	5,00 ml
Tris-HCl	1 M	50 mM	25,00 ml
dH ₂ O			446,25 ml
		Slutt volum	500,00 ml

RIPA-buffer med protease- og fosfatase hemmere

Reagens	Volum
RIPA-buffer	5 ml
Protease Inhibitor Cocktail	50 µl
Halt™ Phosphatase Inhibitor	50 µl

Transfer-buffer (1x)

Reagens	Volum
20 x NuPAGE transferbuffer	50 ml
Metanol	200 ml
dH ₂ O	750 ml

Vedlegg III

Sjekking av PCR-produkt

Støping 3 % Metaphor agarosegel

1,5 g MetaPhor® Agarose (Cambrex) ble løst i 50 ml 1 x TAE-buffer. Løsningen ble kokt til alt var fullstendig løst. 1,0 µl Gel Star Nucelic Acid Gel Stain (Lonza) ble tilsatt etter at løsningen var avkjølt. Kammer ble deretter satt i gelkaret og den avkjølte løsningen helt i karet. Løsningen fikk stå å hvile til den var stivnet. Tok deretter ut kammene og overførte gelen til elektroforesekaret. Helte så på 1 x TAE-buffer så det dekket gelen.

Kjøring av 3 % Metaphor agarosegel

Blandet 4,0 µl sample-buffer med ca 20 µl PCR-produkt og tok ut 9,0 µl av blandingen og appliserte dette på gelen. Tilsatt 7,0 µl 50 bp stige lengst til venstre-, høyre- og i midten av gelen. 1,0 µl Gel Star Nucelic Acid Gel Stain (Lonza) ble deretter tilsatt i bufferen ved gelens positive pol (anoden) før gelen ble satt til kjøring på 80 Volt. Gel Star Nucelic Acid Gel Stain inneholder fluorescens som binder seg til det dobbeltrådede DNA-heliksen og gir fra seg ut en fluorescerende farge. Fargen er mulig å detektere når gelen bestråles med UV lys med 300 nm (89). Gelen ble kjørt i omtrent 2 timer eller til fargefronten hadde vandret 2/3 ned på gelen. PCR produktene ble visualisert ved bruk av en UV-transilluminator (Hoefel) og bildetaking med CCD-kamera.

Sekvensering

Laget først cDNA-syntese ved bruk av qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta).

En mastermiks ble laget etter leverandørens anbefalinger og etter følgende oppskrift:

	Volum per reaksjon
qScript Reaction Mix (5x)	4,0 µl
Nucleasefitt vann	14,0 µl
qScript RT (enzym)	1,0 µl
Totalt	20,0 µl

19,0 µl mastermiks ble fordelt på antall rør tilsvarende antall cDNA-synteser som skulle lages. 1,0 µl total-RNA (0,6 µg) ble tilsatt reaksjonene. cDNA-syntesen ble kjørt etter følgende program.

Program 2:

1. 22°C 5 min
2. 42°C 30 min
3. 85°C 5 min
4. 4°C ∞

Etter endt cDNA syntes ble PCR satt opp ved bruk av Taq PCR Kit (Biolabs). Brukte anbefalinger fra leverandør, men skalerte ned reaksjonen fra 50 µl til 25 µl.

Satt opp PCR på cDNA transkriptene etter følgende oppsett:

	Volum per reaksjon
Forward primer (10uM)	1,0 ul
Revers primer (10uM)	1,0 ul
Standard Taq Reaction Buffer	2,5 ul
MgCl ₂	1,5 ul
dNTP	0,5 ul
Nucleasefritt vann	17,4 ul
Taq DNA Polymerase	0,1 ul
cDNA templat (50ng/ul)	1,0 ul
Totalt	25 ul

PCR produktet ble deretter sekvensert på ABI PRISM® DNA sekvensator (Applied Biosystems).

Vedlegg IV To-trinns real time RT-PCR

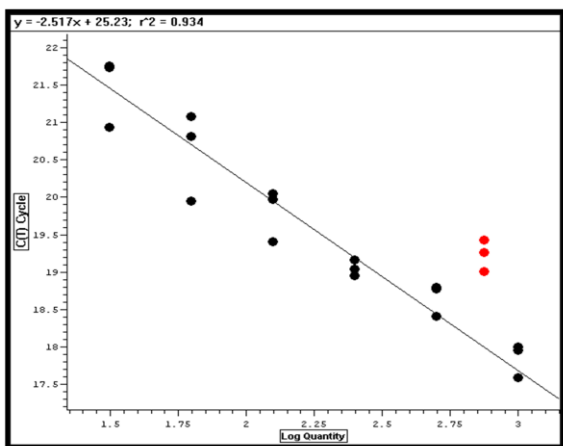
For to-trinnsmetoden ble det først kjørt cDNA-syntese, der qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta) benyttet. Mastermiks ble laget etter tilsvarende oppskrift som beskrevet under sekvensering (vedlegg III) og kjørt på program 2.

Real time RT-PCR ble satt opp med B-R One-Step SYBR® Green qRT-PCR Kit, som også ble benyttet i ett-trinnsmetoden. Samme oppsett som ved ett-trinnsmetoden ble benyttet, men revers transkriptase enzymet qScript One-Step Rt ble ikke tilsatt. Det ble kompensert for det tapte volumet med Rnase-fritt vann, slik at total volumet ble 20,0 µl. Reaksjonene ble kjørt på program 1 på MJ Opticon Monitor, men det første trinnet (cDNA-syntesen) ble sløffet.

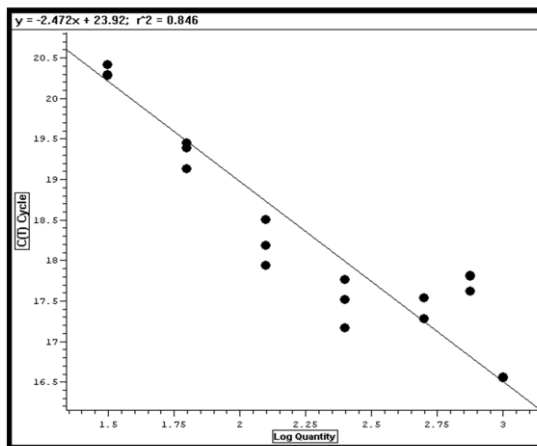
4.2.2 Vedlegg V

Standardkurver real time RT-PCR

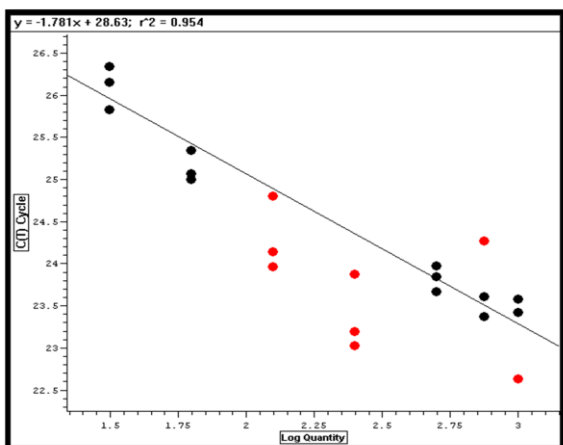
RKIP



E-cadherin



Snail



4.2.3 Vedlegg VI

Oversikt over p-verdier ved signifikanstesting

Tabell 7: Oversikt over signifikanstesting av forskjell i mRNA-nivå av RKIP i ustimulerte-versus ISO-stimulerte DU145-celler etter angitte timer utført ved paret t-test.

Null-hypotese (H ₀)	Stimuleringstid (antall timer)	Antall observasjoner i hver gruppe (n)	Statistisk test	p-verdi
$m_U - m_S = 0$	0,5	3	Paret t-test	0,32
$m_U - m_S = 0$	1,0	3	Paret t-test	0,96
$m_U - m_S = 0$	2,0	3	Paret t-test	0,59
$m_U - m_S = 0$	4,0	3	Paret t-test	0,95
$m_U - m_S = 0$	8,0	3	Paret t-test	0,47

m_U – middelerdien av ustimulerte celler

m_S – middelerdien av stimulerde celler

Tabell 8: Oversikt over signifikanstesting av forskjell i mRNA-nivå av RKIP i ustimulerte-versus ISO-stimulerte LNCaP-celler etter angitte timer utført ved paret t-test.

Null-hypotese (H ₀)	Stimuleringstid (antall timer)	Antall observasjoner i hver gruppe (n)	Statistisk test	p-verdi
$m_U - m_S = 0$	0,5	3	Paret t-test	0,43
$m_U - m_S = 0$	1	3	Paret t-test	0,67
$m_U - m_S = 0$	2	3	Paret t-test	0,28
$m_U - m_S = 0$	24	3	Paret t-test	0,41

m_U – middelerdien av ustimulerte celler

m_S – middelerdien av stimulerde celler

Tabell 9: Oversikt over signifikanstesting av forskjell i mRNA-nivå av Snail i ustimulerte- versus ISO-stimulerte i LNCaP-celler etter angitte timer utført ved parett-test.

Nullhypotese (H ₀)	Stimuleringstid (antall timer)	Antall observasjoner i hver gruppe (n)	Statistisk test	p-verdi
$m_U - m_S = 0$	0,5	3	Parett-test	0,60
$m_U - m_S = 0$	1	3	Parett-test	0,67
$m_U - m_S = 0$	2	3	Parett-test	0,99
$m_U - m_S = 0$	24	3	Parett-test	0,02*
$m_U - m_S = 0$	48	3	Parett-test	0,52
$m_U - m_S = 0$	72	3	Parett-test	0,53

m_U – middelveidien av ustimulerte celler

m_S – middelveidien av stimulerte celler

*indikerer statistisk signifikans på 5 % signifikansnivå ($p < 0,05$)

Tabell 10: Oversikt over signifikanstesting av forskjellen i migrasjon mellom ustimulerte- og ISO-stimulerte LNCaP-celler og mellom ustimulerte- og PROP-stimulerte LNCaP-celler utført ved parett-test.

Nullhypotese (H ₀)	Antall observasjoner i hver gruppe (n=2)	Statistisk test	P-verdi
$m_U - m_{ISO} = 0$	2	Parett-test	0,16
$m_U - m_{PROP} = 0$	2	Parett-test	0,39

m_U – middelveidien av ustimulerte celler

m_{ISO} – middelveidien av ISO-stimulerte celler

Tabell 11: Oversikt over signifikanstesting av forskjell i inkorporert ³H-tymidin mellom LNCaP-celler transfektert med kontroll siRNA versus siRNA mot ADRB2 ved ulike stimuleringer utført ved parett t-test.

Nullhypotese (H ₀)	Stimulering (kons)	Antall observasjoner i hver gruppe(n)	Statistisk test	p-verdi
$m_K - m_{ADRB2} = 0$	Ingen (FCS)	4	Parett t-test	0,61
$m_K - m_{ADRB2} = 0$	ISO (10 μM)	4	Parett t-test	0,30
$m_K - m_{ADRB2} = 0$	ICI 118.551 (10 μM)	3	Parett t-test	0,28
$m_K - m_{ADRB2} = 0$	ICI 118.551 (100 μM)	4	Parett t-test	0,55
$m_K - m_{ADRB2} = 0$	Karvedilol (10 μM)	3	Parett t-test	0,05*
$m_K - m_{ADRB2} = 0$	Karvedilol (25 μM)	3	Parett t-test	0,64

m_K – middelerdien av celler transfektert med kontroll siRNA

m_{ADRB2} - middelerdien av celler transfektert med siRNA mot ADRB2

*indikerer statistisk signifikans på 5 % signifikansnivå ($p < 0,05$)