

Mekanismer involvert i TPCS_{2a}- PDT-resistens i en doxorubicin- resistent cellelinje

Hvordan kan PCI omgå resistensen?

Cathrine Elisabeth Olsen



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for galenisk farmasi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2012

UNIVERSITETET I OSLO
Farmasøytisk Institutt

**Mekanismer
involvert i TPCS_{2a}-
PDT-resistens i en
doxorubicin-
resistent cellelinje**
*Hvordan kan PCI
omgå resistensen?*

Masteroppgave for graden Master i
farmasi ved Avdeling for
strålingsbiologi, Institutt for
kreftforskning, Radiumhospitalet

Cathrine Elisabeth Olsen

Veiledere: Dr. Anette Weyergang, Prof.
Kristian Berg og Dr. Pål Kristian
Selbo

15. mai 2012



Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning ved Radiumhospitalet i perioden august 2011 - mai 2012. Masteroppgaven ble skrevet under veiledning av Dr. Anette Weyergang og Prof. Kristian Berg, og er en del av annen avdeling i profesjonsstudiet farmasi ved Universitetet i Oslo. Arbeidet med oppgaven har gitt meg et meget godt innblikk i forskning og utvikling og har økt interessen min betydelig for dette feltet.

En stor takk rettes til mine veiledere, Dr. Weyergang og Prof. Berg, for en spennende og lærerik masteroppgave og for å få være en del av PCI-gruppen. Deres engasjement og kompetanse har økt min forståelse for forskning. Dere har gitt meg gode kritiske tilbakemeldinger på arbeidet, og gitt meg muligheten til å arbeide selvstendig. Dette har jeg lært svært mye av.

Jeg vil også takke Dr. Pål Kristian Selbo for all hjelp og for å være tilgjengelig som biveileder, Maria Elisabeth Berstad for veiledning med Western blotting, Victoria Edwards for utsåing av MA11-celler og Monica Bostad for opplæring i fluorescensmikroskopering.

Gjennom arbeidet på avdelingen i PCI-gruppen har jeg også fått ta del i det sosiale miljøet, og blitt kjent med en svært dyktig, omsorgsfull og morsom gjeng. Jeg vil derfor takke dere alle sammen for et trivelig opphold.

Til slutt vil jeg nevne masterstudentene Marius Strømbo Eng og Svein Roger Angel i PCI-gruppen. Takk for alle faglige og ikke-faglige diskusjoner, som har bidratt til en hyggelig periode. Jeg ønsker dere lykke til videre.

Radiumhospitalet, Oslo, 15. mai 2012

Innhold

Forkortelser	6
Sammendrag	9
Abstract	10
Hensikt med oppgaven	11
1 Innledning	13
1.1 Resistens	13
1.1.1 Generelle mekanismer bak resistens	13
1.2 Fotodynamisk terapi	14
1.2.1 Virkningsmekanismer bak PDT	14
1.2.2 Lys i PDT-behandling	17
1.2.3 Fotosensitizere og klinisk bruk av PDT	17
1.2.4 PDT-resistens	19
1.3 Fotokjemisk internalisering	21
1.3.1 Virkningsmekanismer bak PCI	22
1.3.2 Fotosensitizere og klinisk bruk av PCI	23
1.3.3 Makromolekyler i PCI	26
1.4 Dødsmekanismer relatert til PDT og PCI	27
1.4.1 Regulering av apoptose	27
1.4.2 Regulering av autofagi	33
2 Materialer og metode	37
2.1 Cellelinjer og dyrkningsmedium	37
2.2 Standardprosedyrer	38
2.2.1 Splitting av celler	38
2.2.2 Telling av celler	39
2.3 Etablering av tetthetskurve	39
2.3.1 Utsåing av celler	39
2.4 Etablering av vekstkurve	40
2.5 Doxorubicin-sensitivitet	40

2.6	Fluorescensmikroskopi	40
2.7	Fotosensitizer-opptak	42
2.8	Fotodynamisk terapi <i>in vitro</i>	43
2.8.1	Belysing og aktivering av fotosensitizere	44
2.9	Fotokjemisk internalisering <i>in vitro</i>	44
2.9.1	Makromolekyl	45
2.10	Viabilitetsmåling med MTT-assay	45
2.11	Analyser av proteinuttrykk	46
2.11.1	SDS-PAGE, Western blott og immundeteksjon	46
2.11.2	Enzchek caspase-3-assay	51
2.11.3	Bestemmelse av relativ proteinmengde med Lowry-assay	53
2.12	Inhibering av cellesignalveier	54
2.13	Statistisk vurdering av resultater	56
3	Resultater	57
3.1	Etablering av vekstkurver og tetthetskurver for ubehandlede celler	57
3.1.1	Cellettetthetskurver for MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler	57
3.1.2	Cellevekstkurver for MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler	58
3.2	Doxorubicin-sensitivitet	59
3.3	PDT og PCI med TPCS _{2a} og TPPS _{2a}	60
3.3.1	PDT med TPCS _{2a}	60
3.3.2	PCI med rGelonin og TPCS _{2a}	60
3.3.3	PDT og PCI med TPPS _{2a}	64
3.4	Intracellulær lokalisering og opptak av fotosensitizer	64
3.4.1	Intracellulær lokalisering av TPCS _{2a}	64
3.4.2	Opptak av TPCS _{2a}	65
3.5	Analyser av proteinuttrykk	66
3.5.1	Caspase-3	66
3.5.2	PARP	67
3.5.3	LC3	68
3.5.4	Fosforylering av p38	69
3.6	Cellulær viabilitet ved behandling med inhibitorer	71

3.6.1	SB203580	71
3.6.2	PD98059	73
3.6.3	3-MA	74
4	Diskusjon	75
4.1	Diskusjon av resultater	75
4.2	Diskusjon av materialer og metoder	83
5	Konklusjon	85
	Referanser	87
	Vedlegg	99

Forkortelser

3-MA	3-metyladenin.
ABC	ATP-bindingskassett.
ALA	aminolevuleninsyre.
AlPcS _{2a}	aluminium-ftalocyanin-disulfonat.
AMD	aldersrelatert makular degenerering.
ATP	adenosin-5'-trifosfat.
BCRP	brystcancer-resistens-protein.
BPD	benzo-porfyrin-derivat.
BSA	bovint serumalbumin.
DISC	dødsindusert signaleringskompleks.
DMSO	dimetylsulfoksid.
DOX	doxorubicin.
DTT	dithiotreitol.
EDTA	etylendiamintetraacetat.
ER	endoplasmatisk retikulum.
ERK	ekstracellulær signalregulert kinase.
GI	gastrointestinal.
HpD	hematoporfyrin-derivat.
ISC	<i>inter system crossing</i> .
JNK	c-Jun N-terminal proteinkinase.
LC3B	lett-kjede 3B.
LD	letal dose.

LDL	<i>low-density lipoprotein.</i>
LFS	Li-Fraumeni-syndrom.
m-THPC	meso-tetra(3-hydroksyfenyl)klorin.
m-THPP	meso-tetra(3-hydroksyfenyl)porfin.
MAPK	mitogen-aktivert proteinkinase.
MAPKAPK	MAP-kinase-aktivert proteinkinase.
MDR	multilegemiddel-resistens.
MEK	mitogen-aktivert proteinkinasekinase.
MRP	MDR-relatert protein.
MTT	3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyl-tetrazolium-bromid.
NCT	The National Center for Tumor Diseases.
NHF	normale humane fibroblast.
PARP	poly(ADP-ribose)polymerase.
PBS	fosfat-bufret saltvann.
PCI	fotokjemisk internalisering.
PDD	fotodynamisk diagnostikk.
PDT	fotodynamisk terapi.
PEI	polyetylenimin.
PGP	P-glykoprotein.
PORF-TEG	tetrakis-meso-(4-etylenglykol-2,3,5,6-tetrafluorofenyl)-porfyrin.
Pp38	fosforylert p38.
PpIX	protoporfyrin-IX.
PSS	<i>protonation, sequestration og secretion.</i>
PVDF	polyvinyliden-difluorid.
RIF	strålingsinduserte fibrosarcoma.
RIP	ribosominaktiverende protein.

ROS	reaktive oksygenforbindelser.
rpm	omdreininger per minutt.
SB203580	4-(4-fluorofenyl)-2-(4-metylsulfinylfenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazol.
SDS	sodium-dodecyl-sulfat.
SDS-PAGE	sodium-dodecyl-sulfat-polyakrylamid-gel-elektroforese.
TPCS _{2a}	disulfonert tetrafenylklorin.
TPPS _{2a}	disulfonert tetrafenylporfin.
TRAIL	TNF-relatert apoptoseinduserende ligand.
WT	villtype.

Sammendrag

Den doxorubicin (DOX)-resistente sarcomcellelinjen MES-SA/Dx5 ble i denne studien vist å være kryssresistent mot fotodynamisk terapi (PDT) med den amfifile fotosensitizeren disulfonert tetrafenylklorin (TPCS_{2a}). Resistensen ble vist å ikke skyldes forskjeller i opptak eller lokalisering av TPCS_{2a} i forhold til den PDT-sensitive moderlinjen MES-SA. Den nye strategien fotokjemisk internalisering (PCI) ble imidlertid vist å kunne omgå PDT-resistensen, og ble antatt å skyldes den sterke toksisiteten etter internalisering av makromolekylet rGelonin. Studering av cellulære overlevelsesmekanismer avslørte at en forskjell i apoptotisk signalering kunne stå bak den ulike sensitiviteten for PDT mellom cellelinjene, og utpekte p38 som et dødssignal i MES-SA. Aktivisering av p38 ble vist å være oppregulert ved PDT i MES-SA. Dette ble ikke observert i MES-SA/Dx5. Nedsatt fosforylering av substratet MAP-kinase-aktivert proteinkinase 2 (MAPKAPK-2) etter behandling med en p38-inhibitor i MES-SA bekreftet disse resultatene. Konvertering av autofagosom-proteinet lettkjede 3B (LC3B) viste seg også å være ulikt mellom cellelinjene, og avdekket at autofagi kan ha en viktig plass i resistensmekanismen. MES-SA/Dx5 konverterte LC3B I til LC3B II i lavere grad enn MES-SA ved både PDT- og PCI-behandling. Resultatene fra studien indikerer viktigheten av MAPK i TPCS_{2a}-PDT-indusert cytotoxiskitet, og dokumenterer god effekt av PCI på resistente MES-SA/Dx5-celler.

Abstract

The doxorubicin (DOX) resistant sarcoma cell line MES-SA/Dx5 was in the present study shown to be cross-resistant to photodynamic therapy (PDT) using the amphiphilic photosensitizer disulfonated tetraphenyl chlorine (TPCS_{2a}). The resistance was shown to not be caused by differences in accumulation nor localization of TPCS_{2a} compared to the PDT sensitive mother line MES-SA. The new strategy, photochemical internalization (PCI), was however shown to circumvent the PDT resistance, and this was assumed to be due to the strong toxicity after internalization of the macromolecule rGelonin. A thoroughly study of the surviving mechanisms revealed apoptotic signaling to stand behind the differences in sensitivity to PDT between the cell lines, and assigned p38 as a death signal in MES-SA. The activation of p38 was demonstrated to be upregulated in PDT treated MES-SA cells. This was not observed in MES-SA/Dx5. Impaired phosphorylation of the substrate MAP kinase activated protein kinase 2 (MAPKAPK-2) after treatment with a p38 inhibitor in MES-SA confirmed these results. Conversion of the autophagosome protein, light chain 3B (LC3B), appeared also to be different between the cell lines, and uncovered autophagy to plausibly have a role in the mechanisms of PDT resistance. MES-SA/Dx5 converted LC3B I to LC3B II in a lower manner than MES-SA after both PDT and PCI treatment. The results from this study demonstrate the importance of MAPK in TPCS_{2a}-PDT induced cytotoxicity, and document the effectiveness of PCI treatment of resistant MES-SA/Dx5 cells.

Hensikt med oppgaven

Kirurgi, stråleterapi og kjemoterapi er de viktigste behandlingsformene mot kreft i dag. Til tross for de senere års utvikling av mange anticancerterapeutika med økende selektivitet for cancerceller, er medikamentell kreftbehandling fremdeles ikke god nok. Medfødt eller ervervet resistens mot cytotoksiske legemidler er en av de største utfordringene for å oppnå komplett og varig remisjon av kreft med konvensjonelle så vel som nyere legemidler [1, 2].

MES-SA/Dx5 er en sarcomcellelinje med ervervet resistens mot doxorubicin (DOX). P-glykoprotein (PGP) er vist å stå bak resistensen ved å pumpe DOX ut av cellene [3]. MES-SA/Dx5 er videre vist å være kryssresistent mot flere andre kjemoterapeutika [4]. I 2006 ble det vist av Selbo *et al.* at MES-SA/Dx5 også er resistent mot fotodynamisk terapi (PDT) med fotosensitizeren disulfonert tetrafenylporfin (TPPS_{2a}), men at PGP ikke kunne forklare resistensen [5]. Årsakene til resistensen ble ikke videre studert, men det ble indikert at fotokjemisk internalisering (PCI), som baserer seg på PDT, kunne omgå resistensen i MES-SA/Dx5.

Denne masteroppgaven har til hensikt å studere mekanismer involvert i PDT-resistens i MES-SA/Dx5 og hvordan PCI kan virke på disse mekanismene.

I oppgaven er disulfonert tetrafenylklorin (TPCS_{2a}) benyttet som fotosensitizer. Denne er fotokjemisk og strukturelt svært lik TPPS_{2a}.

1 Innledning

1.1 Resistens

1.1.1 Generelle mekanismer bak resistens

Fordi solide tumorer ofte er svært heterogene, kan enkelte populasjoner være mer resistente mot kjemoterapi enn andre [4]. Tilstedeværelsen eller utvikling av resistens er blant de viktigste årsakene til terapivikt i dagens anticancer-behandling [6, 7].

Transportproteiner i ATP-bindingskassett (ABC)-familien er vist å ha en viktig rolle i resistente tumorceller [8]. Proteinene kan deles inn i 7 subfamilier avhengig av domeneorganisering; ABC(A-G), der ABCB-familien er assosiert med multilegemiddel-resistens (MDR), og ofte også kalles MDR [8]. PGP (ABCB1) er en adenosin-5'-trifosfat (ATP)-drevet efflukspumpe som kan transportere hundrevis av strukturelt ulike hydrofobe amfifatiske forbindelser [9]. Proteinet spiller en kritisk rolle i beskyttelse av cellen fra toksiske forbindelser og endogene metabolitter, og er det proteinet som er vist å transportere flest legemidler i anticancerbehandling [9, 8]. MDR-relatert protein (MRP) har i den senere tid også blitt assosiert med MDR, og er, som PGP, et protein som er medlem av ABC-familien [3].

Det er i tillegg vist at redusert intracellulær legemiddelakkumulering er enda en mekanisme i MDR, og at dette er forårsaket av en lavere transmembran pH-gradient eller elektrisk potensiale, noe som gjør at legemidlene ikke akkumulerer like lett [3, 10]. En annen modell involverer endomembranvesikler [3]. Deponering av legemidler i slike vesikler er vist å beskytte cellene fra legemidlenes cytotoxiske effekter ved at legemidlene eksocytertes ut eller brytes ned [3]. Den vesikulære akkumuleringen avhenger også av en transmembran pH-gradient, og da mange cytotoxiske legemidler er basiske vil de, i deres nøytrale hydrofobe form, diffundere fritt over lipidbilaget [3]. I de sure områdene, vil legemidlene protoneres, bli hydrofile og fanges [3, 11]. Dette fenomenet kalles *protonation, sequestration* og *secretion* (PSS)-modellen [3]. I samsvar med dette, har vesikler som legemidlene akkumuleres i blitt identifisert som lysosomer, endosomer og vesikler i golgi-området [3]. Man har

også sett at en økning i pH i endomembran-områdene blokkerer vesikulær akkumulering av legemidler og blokkerer cellulær legemiddeffluks [3].

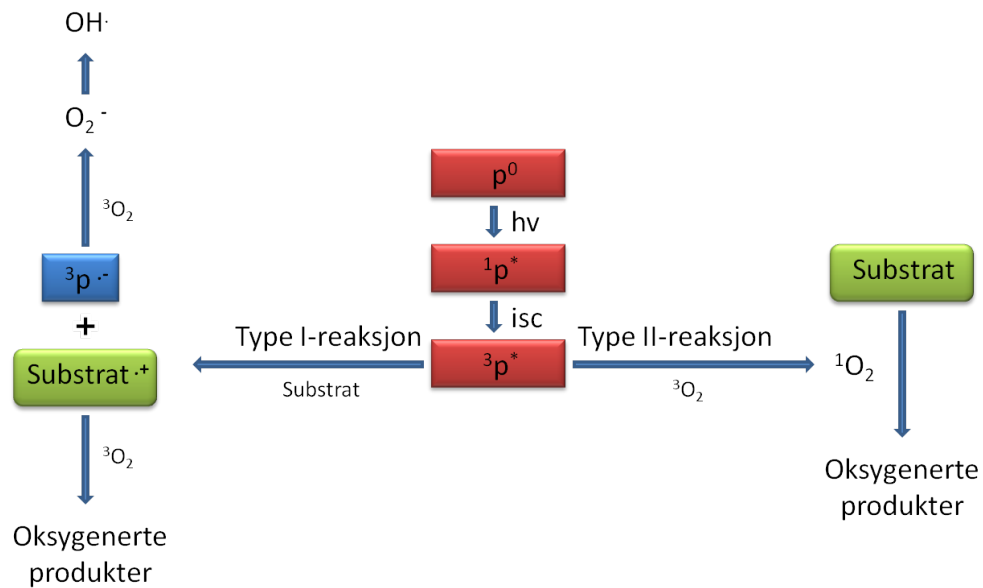
Det er mange måter MDR-celler kan utnytte den pH-avhengige vesikulære akkumuleringen av legemidler på [3]. Deponering av legemiddel kan i resistente celler være økt på grunn av økte volumer av endosomer og lysosomer, eller legemiddeffluks kan være økt grunnet forhøyede eksocytoserater [3, 12].

1.2 Fotodynamisk terapi

1.2.1 Virkningsmekanismer bak PDT

I 1972 foreslo Diamond *et al.* at fotosensiterende stoffers evne til å lokaliseres i tumor og reagere toksisk kunne gjøre dem effektive i kreftbehandling [13]. Dagens PDT-behandling er et resultat av slike forsøk og involverer to individuelle ikke-toksiske komponenter. Disse kombineres for å indusere oksygenavhengige effekter i celler og vev; en fotosensitizer og lys [14]. Den aktive fotosensitizeren reagerer med oksygen eller et annet substrat, og danner reaktive oksygenforbindelser (ROS) som videre gir irreversibel skade på tumorvevet [15, 16]. Dette skjer i umiddelbar nærhet til den lysabsorberende fotosensitizeren [14].

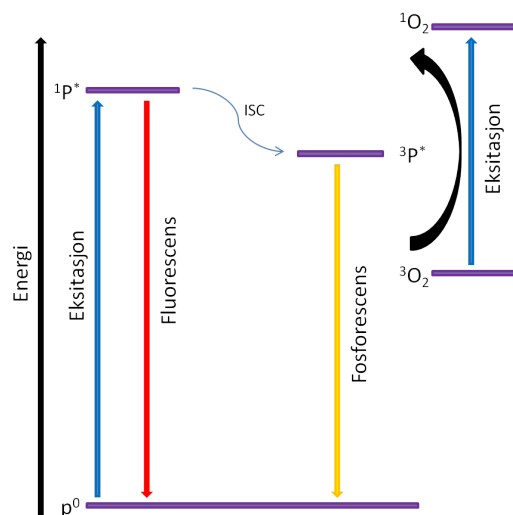
Type I- og II-reaksjoner Bestråling av fotosensitizeren med lys med en bestemt bølgelengde eksiterer den fra grunntilstanden p^0 til eksitert tilstand, $^1p^*$ [17]. Fotosensitizeren kan falle tilbake til grunntilstanden ved å emitte et fluorescerende foton eller avgi varme [17, 14]. Alternativt kan den eksiterte tilstanden gjennomgå *inter system crossing* (ISC) til den lengrelevende tripletttilstanden, $^3p^*$ [17, 14]. $^3p^*$ kan reagere videre på to måter; type I- og type II-reaksjon, der type I i større grad inntreffer i fravær av oksygen (figur 1).



Figur 1: **Type I-reaksjon:** Under anaerobe forhold kan den eksiterte fotosensitizeren, $^3p^*$ reagere direkte med organiske substrater ved oksydering [17]. Den kan da overføre et elektron til substratet slik at det dannes radikaler [14]. Disse radikalerne interagerer med oksygen (eller andre substrater) og fører til en kjedereaksjon og dannelsen av oksygenerte produkter [14]. Redusert fotosensitizer kan reagere videre med oksygen og produsere superoksyd-anioner, O_2^- , som videre kan danne svært reaktive hydroxyl-radikaler, OH^\bullet [17, 14]. Disse reaksjonene avhenger av substratkonsentrasjonen, og kalles en type-I-reaksjon [17, 14]. **Type II-reaksjon:** Alternativt kan fotosensitizertriplekten overføre energien sin direkte til molekylært oksygen under aerobe forhold, og det dannes oksygenerte produkter som igjen kan reagere med fotosensitizer-radikalet (type II-reaksjon) [14]. Ved en slik reaksjon dannes singlettoksygen [14]. Tilpasset figur fra Dolmans et al. [14].

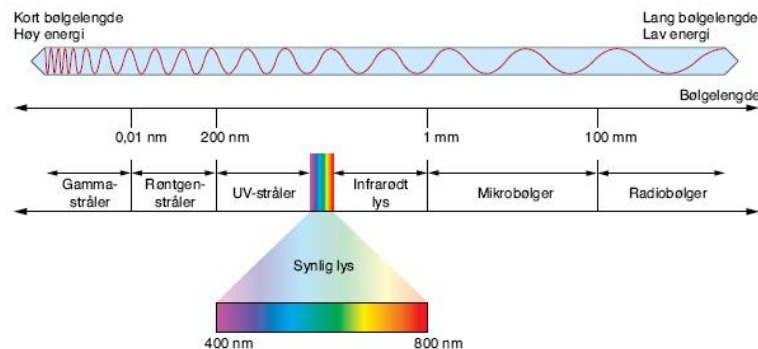
Dannelsen av singlettoksygen ved en type-II-reaksjon er antatt å være den viktigste forbindelsen som genereres ved PDT [14]. Singlettoksygen blir dannet når den aktiverte fotosensitizeren overfører energi til molekylært oksygen. Dette kan illustreres med et Jablonski-diagram (figur 2). I celler reagerer singlettoksygenet med aminosyrer, fettsyrer og kolesterol [18]. Hvor i cellen singlettoksygenet vil reagere avhenger av subcellulær lokalisering av fotosensitizeren [18]. Umettede membranlipider er spesielt utsatt for singlettoksygenreaksjoner og frie radikalreaksjoner [18]. Disse reaksjonene resulterer i dannelsen av lipidhydroperoksider og lipiddegraderingsprodukter [18]. Dette

har konsekvenser for den biologiske funksjonen til membranene, spesielt deres evne til å opprettholde strukturen til cellen [18].



Figur 2: **Forenklet Jablonski-diagram:** En fotosensitizer eksiteres fra grunntilstanden p^0 til singlettilstanden $^1p^*$. $^1p^*$ er en kortlevd tilstand som enten kan falle tilbake til grunntilstand og emitte fluorescens eller, ved ISC, gå over til tripletttilstanden $^3p^*$. Fra tripletttilstanden kan fotosensitizeren enten gå tilbake til sin grunntilstand og emitte et fosforescent-foton, eller overføre energien sin til et annet molekyl, feks triplettoksygen og danne singlettoksygen [17]. For å overføre energi til triplettoksygen kreves det imidlertid en endring i elektronspinn i oksygenet [17]. Energinivåene i figuren er kun ment som en illustrasjon. Tilpasset figur fra Dolmans et al. [14]

Både type I- og type-II-reaksjoner opptrer samtidig, og forholdet mellom disse prosessene avhenger av hvilken fotosensitizer som brukes, konsentrasjon av substrat og oksygen, og bindingsaffiniteten av sensitizeren til substratet [14]. Halveringstiden til singlettoksygen i biologiske systemer kan være ned til $0,04 \mu\text{s}$, og diffusjonsradiusen under $0,02 \mu\text{m}$ [14]. Graden av fotoskade og cytotoxissitet avhenger av type sensitizer, intracellulær lokalisasjon, administrasjonsdose, lysdose, fluencerate, oksygentilgjengelighet og tidsintervallet mellom administrasjon av sensitizer og lyseksposering [14].



Figur 3: *Lysspekter*. Tilpasset figur fra <http://nkiforlaget.no>, mai 2012.

1.2.2 Lys i PDT-behandling

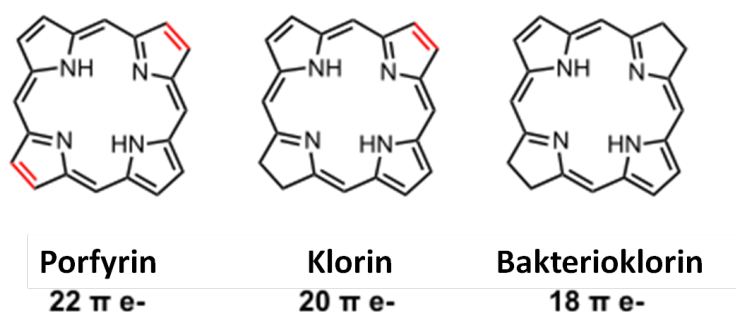
Lys er en form for elektromagnetisk stråling som strekker seg over en lang rekke bølglengder (γ) [19]. Mellom radiobølgene i meterområdet og gammabølgene med bølglengder omkring 10-11 meter, ligger synlig lys relevant for PDT mellom 400 og 700 nm [19]. Energiinnholdet, E , i lys er relatert til bølglengden til absorpsjonen med formelen $E = hv = hc/\gamma$, der h er Plancks konstant ($6,63 \times 10^{-34}$ J), v er frekvensen, c er lysets hastighet i vakuum ($3,0 \times 10^8$ m/s), og γ er bølglengden [19]. Når lyset absorberes av et molekyl, forårsaker energien til de absorberte fotonene blant annet at det absorberende molekylet eksiteres [19]. Rødt lys er den delen av spektret som har evne til å penetrere dypt inn i vev, og er derfor svært godt egnet til *in vivo*-behandling av solide tumorer med PDT (figur 3) [17].

1.2.3 Fotosensitizere og klinisk bruk av PDT

Flere hundre nye fotosensitizere har blitt utviklet de siste 20 årene i håp om å finne en optimal fotosensitizer for PDT-behandling [20]. Av porfyrinoidene finnes porfyriner, kloriner, bakteriokloriner, ftalocyaniner og texafyriner, men det er porfyrinene som er de mest studerte fotosensitizerene så langt [17, 14]. Porfyriner, kloriner og bakteriokloriner (figur 4) har absorpsjonsmaksimum i det synlige røde området i det elektromagnetiske spekteret og genererer singlettoksygen effektivt [17]. Disse strukturene er derfor blant de mest brukte i *in vivo* behandling med PDT [17]. Komponentene består av en porfin-

struktur - fire pyrrolringer bundet sammen av metinbruer i en syklisk konfigurasjon - sammen med en sidekjede som vanligvis er metallisk [14]. I tillegg finnes de porfyrinliknende komponentene. Disse har imidlertid absorpsjonsmaksimum i det blå området, og PDT dypt inn i vev vil ikke være effektivt [17].

Mekanismene bak hvorfor fotosensitizerer selektivt akkumulerer i tumorer er kompleks og var lenge ikke fullt ut forstått [14]. Man antok at det var på grunn av den høye vaskulære permeabiliteten til disse stoffene, deres affinitet til prolifererende endotel og mangel på lymfatisk drenering i tumorer [14]. Nå vet man at *low-density lipoprotein* (LDL) kan øke selektiviteten av tumor-målretting med fotosensitizerer, på grunn av den høye ekspresjonen av spesifikke LDL-reseptorer i mange typer cancerceller [21].



Figur 4: *Porfinstrukturer: Porfyriner, kloriner og bakteriokloriner*. Tilpasset figur fra MacDonald *et al.* [17]

I 1975 skjedde det et gjennombrudd, da Dougherty *et al.* kunne rapportere at administrasjon av hematoporfyrin-derivat (HpD) og rødt lys førte til komplett bekjempelse av brystkreft i mus [14]. HpD og den rensede versjonen Photofrin® var de første fotosensitizerene som ble studert klinisk med PDT, og siden 1993 har PDT med Photofrin® vært regulatorisk godkjent til bruk i pasienter med tidlig og avansert kreft i lunge, tarm og urinveier [13, 15]. Photofrin® var lenge den eneste fotosensitizeren som var kommersielt tilgjengelig på markedet [17]. Den er derfor mest brukt og best studert blant fotosensitizerene. Photofrin® består av mange porfyrinoligomere med ulike lengder, bindinger og stereokjemi, og man antar at kun noen av disse

oligomerene står for virkningen [17].

Mange nye forbindelser er blitt syntetisert i et forsøk på å lage en bedre fotosensitizer enn Photofrin®. Photofrin® har kun et svakt absorpsjonsbånd ved 630 nm og er derfor ikke optimal i forhold til lyspenetrering [17]. Siden har benzo-porfyrin-derivat (BPD) blitt syntetisert fra protoporfyrin [17]. BPD-kromoforene har absorpsjonsmaksimum rundt 650 nm, men fordi BPD har rask *clearance* fra det systemiske kretsløpet er det flere kreftformer den ikke er egnet for [17]. I 2000 ble Visudyne® (verteporfin) godkjent for behandling av aldersrelatert makular degenerering (AMD), der laserlys fokuseres på neovaskulaturen som vokser nær makula og forårsaker blindhet, og i 2009 ble porfyrinderivatene Metvix® (metylaminolevulinat eller metyl-aminolevuleninsyre (ALA)) og Foscan® (temoporfin) godkjent for henholdsvis behandling av overflatisk og/eller nodulær basalcellekreft og behandling av plateepitelkreft i hode og hals [17]. ALA er et prodrug og er en forløper til hem [17]. Overskudd av ALA fører til produksjon av protoporfyrin-IX (PpIX) (en fotosensitizer) raskere enn jern-ferrochelataase kan konvertere PpIX til hem (ikke en fotosensitizer) [17].

PDT er også vist å fungere som et effektivt diagnostisk verktøy (fotodynamisk diagnostikk (PDD)) [22, 23]. PDD utnytter da fluorescens til å oppdage lesjoner, fordi fluorokromet selektivt akkumulerer i tumor [23]. Et eksempel er Hexvix® (hexaminolevulinat) i deteksjon av blærekreft, der belysning med blått lys eksiterer fluorokromet slik at det emitterer rødt lys (<http://www.photocure.com>).

1.2.4 PDT-resistens

Som for andre konvensjonelle anticancerbehandlinger kan det også oppstå resistens mot PDT [24]. Graden av resistens er imidlertid ofte av lavere omfang enn for de fleste andre terapiformer, og hittil er PDT-resistente celler kun isolert *in vitro* [24]. I 1991 isolerte Luna og Gomer *et al.* strålingsinduserte fibrosarcoma (RIF)-celler med ervervet resistens mot Photofrin®-PDT [24]. Samme år isolerte og karakteriserte Singh *et al.* to kloner med opphav fra samme cellelinje [24]. Disse var eksponert for 8 sykluser med Photofrin®-

PDT, og gav opphav til cellelinjen RIF-8A som var 100 ganger mer resistent enn moderlinjen [24]. Da de resistente cellene ble injisert i mus, ble også PDT-resistens *in vivo* registrert [24]. Siden har resistens mot flere andre fotosensitizerer også blitt observert, men graden av resistens har imidlertid vært varierende [25, 24].

Mange forsøk demonstrerer at årsaken til PDT-resistens avhenger av celleoppav og hvilken fotosensitizer som benyttes, men forsøkene har ikke gitt svar på hvilke cellulære mekanismer som kan stå bak [24]. Man antar at mekanismene kan være tilsvarende mekanismene bak generell legemiddelresistens, og at disse kan være relatert til ulik opptaksrate eller effluks, endret intracellulær distribusjon av legemidlet, dårligere legemiddelaktivering eller økt inaktivering av legemiddel [24]. Men i 1993 viste Sharkey *et al.* at PDT-resistens i RIF-8A ikke var et resultat av ulikt legemiddelopptak [26]. Det ble også vist at resistensen ikke skyldtes typiske MDR-mekanismer [26]. De PDT-resistente cellene isolert av Luna og Glomer utviste heller ikke en MDR-fenotype, og man så ingen overekspresjon av PGP [24].

Strukturen til fotosensitizeren er imidlertid vist å ha en nøkkelfunksjon i utviklingen av resistens, og at resistensen er relatert til den spesifikke subcellulære lokalisasjonen av fotosensitizeren [24]. Det primære angrepspunktet i PDT er for enkelte fotosensitizerer vist å være mitokondriene [26]. Man har sett at de tidligste skadene etter porfyrin-PDT skjer i mitokondriene, og at skadene er assosiert med mitokondrielle enzymer involvert i oksidativ fosforlyring [26]. Distinkte forskjeller i mitokondrier er blitt vist mellom ubehandlede RIF-celler og RIF-8A av Singh og Sharkey *et al.* [26]. Tilsvarende resultater ble observert i cisplatinresistente carcinomaceller som også var kryssresistente med Photofrin®-mediert PDT [26]. I ALA-PDT-resistente kloner har man sett et økt antall mitokondrier, men sammenliknet med totalprotein var derimot cellelinjene like [24].

RIF-8A-cellelinjen ble av Moorehead *et al.* vist å være kryssresistent mot cisplatinbehandling, men man har også observert at MDR-celler kan være resistente mot PDT [24]. Interessante funn av Tsai *et al.* viste at den DOX-resistente brystcancerlinjen MCF-7/DXR hadde lavere akkumulering av PpIX fra produget ALA enn den ubehandlede MCF-7, men selv der like

mengder PpIX ble akkumulert, var MCF-7/DXR mindre sensitiv for PDT [24]. Resistensen mot ALA-PDT kunne derfor ikke bare være på grunn av økt effluks av PpIX. Tilsvarende resultater ble observert av Selbo *et al.* i 2006 [5]. Den DOX-resistente cellelinjen MES-SA/Dx5 ble vist å være resistent mot TPPS_{2a}-PDT, men prosessen kunne ikke være mediert av PGP, da det ikke var relevant forskjell i opptak av TPPS_{2a} mellom MES-SA/Dx5 og moderlinjen [5].

I tillegg til PGP, er en annen ABC-transportør beskrevet i litteraturen [24]. Overekspresjon av et nytt medlem av G-subfamilien i ABC-familien har blitt beskrevet i cellelinjen MCF-7/AdrVp [24]. Transportøren betegnes som et brystcancer-resistens-protein (BCRP), og tilhører ABCG2 [24]. Funksjonen til BCRP er assosiert med organismens forsvar mot genotoksiner fra gastrointestinal (GI)-traktus og *clearance* av toksiske metabolitter *via* galle eller urin [24]. Studier utført på en ABCG2-*knockout*-mus har gitt bevis for transportørens evne til å pumpe ut PpIX og beskytte cellene mot fototoksisitet [24]. Hypoksi er funnet å oppregulere ekspresjon av ABCG2 og å øke celleoverlevelse ved å minke intracellulær akkumulering av hem og andre porfyriner [24]. På den måten kan hypoksi hemme PDT-effekten, ikke bare fordi prosessen krever oksygen, men også gjennom ABCG2-mediert minking i intracellulære fotosensitizer-nivåer [24]. Tsunoda *et al.* har også demonstrert korrelasjon mellom ekspresjon av ABCG2 og resistens mot PDT, men ABCG2 har kun evne til å transportere enkelte fotosensitizere [24]. Hematoporfyrin IX, meso-tetra(3-hydroksyfenyl)porfin (m-THPP) og meso-tetra(3-hydroksyfenyl)klorin (m-THPC) er noen av fotosensitizerene som ikke transporteres av BCRP [24].

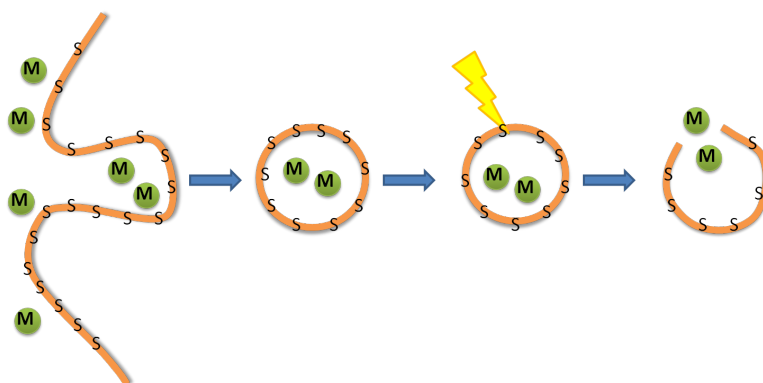
1.3 Fotokjemisk internalisering

I tillegg til kirurgi, stråleterapi og behandling med småmolekylære forbindelser benyttes ofte også makromolekyler i cancerterapi. For å oppnå ønsket biologisk effekt av makromolekyler med intracellulært angrepspunkt er internalisering inn i cellecytosol kritisk. Ved endocytose tas imidlertid makromolekylene opp i cellene og fraktes til lysosomer, der de i stor grad degraderes før

de får utført sin effekt. Membranen i de endocytiske vesiklene kan derfor betraktes som den viktigste hindringen for cytosolisk levering i cellene [20].

1.3.1 Virkningsmekanismer bak PCI

Den norskutviklede metoden, PCI, er en metode for å frigjøre makromolekylære legemidler fra endosomer og lysosomer ved lysaktivering (figur 5) [27, 28]. PCI er basert på fotosensitizere som lokaliseres i endolysosomale membraner og genererer ROS ved lyseksposering [27]. Metoden kan derfor betraktes som en kombinasjonsbehandling av PDT rettet mot disse membranene, og legemidlet som frigjøres.



Figur 5: *Prinsipp bak PCI: Makromolekylet M tas opp i endosytiske vesikler. Fotosensitizeren S akkumulerer i endosommembranen og aktiveres av lys og membranen ødelegges. Makromolekylet slippes ut i cytosol.* Tilpasset figur fra Prasmickaite *et al.* [29].

PCI er vist å øke den biologiske effekten til en stor mengde makromolekyler og andre molekyler som penetrerer plasmamembranen dårlig, inkludert type I-ribosominaktiverende protein (RIP) (egenskapene til RIP er beskrevet i mer detalj i 1.3.3) [20]. Retensjonen av fotosensitizer i tumorvev i kombinasjon med kontrollert lyslevering gjør PCI relativt selektivt for cancervev [30]. Prosessen fører til at endosomale og lysosomale membraner ødelegges, men mekanismen er ikke fullt ut forstått [31]. Man antar at den kan skyldes dannelsen av porer i membranene [18]. I en membran-liknende modell som ble benyttet av Mojzisoava *et al.* i 2009 ble poredannelsen trigget av peroksidering

av lipidene som førte til hydroperoksiddannelse [18]. Det ble her blant annet benyttet TPCS_{2a} [18]. Man antok at hydroperoksiddannelsen førte til brudd i lipidkjedene [18]. Idet en pore ble dannet, lakk vesiklenes innhold ut [18].

1.3.2 Fotosensitizere og klinisk bruk av PCI

Både porfyriner og kloriner er strukturer i fotosensitizere som brukes i PCI. De opptrer i naturen, som hem i erytrocytter, og som klorofyll i grønne blader [32]. Fotosensitizere til PCI-bruk må lokaliseres til endolysosomale membraner og de må derfor være amfile [20]. Dette er mulig ved å inkludere én eller to karboksylgrupper på den ene siden av molekylet, og la resten av molekylet forbli hydrofobt [20]. Fotosensitizere som har to sulfonatgrupper i stedet for karboksylgrupper kan ikke penetrere cellulære membraner [20]. Disse er godt egnet i PCI. Sulfonatgrupper har lave pK_a -verdier, og protoneres selv ikke i de sure lysosomene [20].

Absorpsjonsspektrene til frie baser av kloriner og porfyriner er karakterisert av et intenst bånd omkring 400 nm [33]. Dette båndet kalles *Soretbåndet* [33]. Fire andre svakere absorpsjonsbånd er også tilstede i den synlige regionen, såkalte *Q-bånd* [33]. Klorinene har et karakteristisk Q-bånd i det røde området i absorpsjonsspektret [33], og er mer intenst enn korresponderende bånd i porfyriner [32]. Dette kan utnyttes i PDT og PCI [32, 33]. Porfyriner og kloriner kan effektivt undergå ISC til sine triplettilstander, og føre til produksjon av ROS [33]. Dette gjør porfyrin-relaterte komponenter egnet for PCI i anticancerbehandling [32].

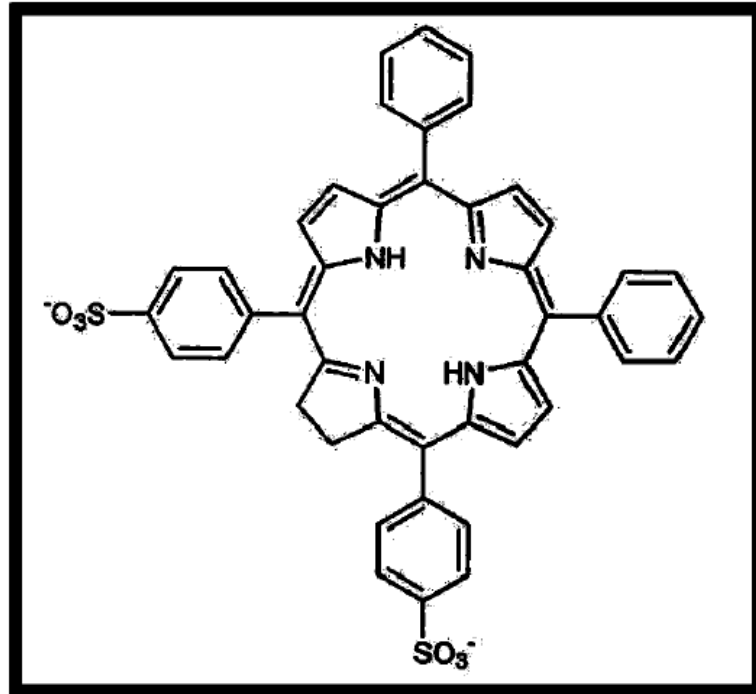
Prekliniske studier av PCI har blitt utført med fotosensitizerene TPPS_{2a}, TPCS_{2a} og aluminium-ftalocyanin-disulfonat (AlPcS_{2a}) [20]. PCI Biotech undersøker nå TPCS_{2a} i en I/II-studie på University Hospital i London, UK [34]. The National Center for Tumor Diseases (NCT), University Hospital Heidelberg, og Ludwig Maximilian University Munich, Tyskland, har startet *screening* av pasienter for videre studier av TPCS_{2a} i hode- og nakke-cancer (<http://www.pcibiotech.com>, mai 2012).

TPPS_{2a} har porfyrinstruktur og dermed lav absorpsjon i det optiske vinduet (der lyspenetrasjon gjennom vev krever 600-800 nm) [20]. TPPS_{2a}

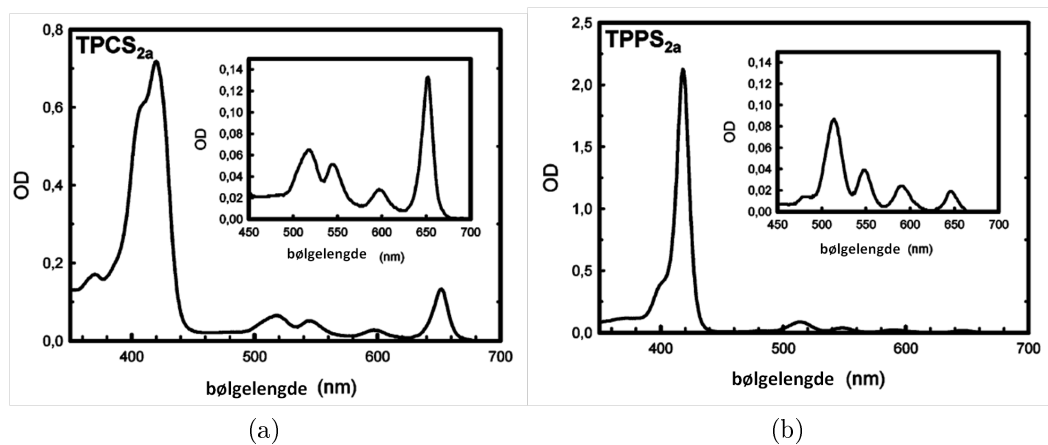
benyttes derfor *in vitro* [20]. AlPcS_{2a} har et sterkt absorpsjonsbånd omkring 670 nm og har derfor vært brukt i *in vivo*-studier [20], men er heller ikke en optimal fotosensitizer [20]. På grunn av dens mange isomere har den store batch-til-batch-variasjoner [20]. TPCS_{2a} ble spesielt utviklet til PCI, og har en effektiv evne til å sitte godt i membranbilag [18]. Dette er på grunn av molekylets sulfonerte grupper som bærer non-nøytraliserbare negative ladninger [18]. De polare kjedene lokaliserer seg på fosfolipid-vann-interfasen av membranen, og den hydrofobe makroringen orienterer seg innvendig i lipidene [18].

TPCS_{2a} TPCS_{2a} (Amfinex®) (figur 6) har sitt utgangspunkt i TPPS_{2a}, og er et resultat av en di-imidreduksjon [20]. Den eneste forskjellen mellom de to komponentene er dobbeltbindingen i kjernen til TPPS_{2a}. Dette er generelt en forskjell mellom porfyriner og kloriner (figur 4) [32]. TPCS_{2a} absorberer lys ved både 415 nm og 652 nm (figur 7), og er derfor mer relevant for klinisk bruk i PCI enn TPPS_{2a} som kun har absorpsjonsmaksimum i det blå området (415 nm) [20].

Syntetisert TPCS_{2a} består av tre isomere og har lav batch-til-batch-variasjon [20]. Mindre enn 0,5 % av utgangsmaterialet, TPPS_{2a}, er tilstedet [20]. Sammenliknet med TPPS_{2a}, har TPCS_{2a} en annen romlig struktur. Alle tre isomere i TPCS_{2a} er bøyd omkring kjernen, og elektronene kan derfor ha lavere mobilitet sammenliknet med elektronene i TPPS_{2a} [32]. Den spesielle strukturen til TPCS_{2a} gjør at man kan forvente en annen aggregeringstype enn den som opptrer i TPPS_{2a} [33]. De fluorescerende egenskapene er derfor forskjellige [33].



Figur 6: *En av isoformene til TPCS_{2a}* Figur fra Berg *et al.* [20].



Figur 7: *Absorpsjonsspektre: Absorpsjonsspektret til a) TPCS_{2a} og b) TPPS_{2a} løst i 10 % Cremophor ELP.* Tilpasset figur fra Berg *et al.* [20].

I 2011 ble det vist av Berg *et al.* at TPCS_{2a} lokaliseres i intracellulære granuler i cellelinjen CT26.CL25 [20]. Disse granulene ble vist å være endocytotiske vesikler [20]. TPCS_{2a}s amfifile egenskaper med log D-verdi nær 0, gjør denne fotosensitizeren ideell for PCI, og tillater den å lokalisere seg i membranene til disse vesiklene [33]. Ved tumorbelysing vil TPCS_{2a} absorbere rødt lys og generere ROS, som primært er singlettoksygen [33].

1.3.3 Makromolekyler i PCI

Makromolekyler har et stort potensiale som terapeutiske forbindelser, men terapeutisk bruk av makromolekyler, som feks i genterapi, er ofte begrenset fordi makromolekylet ikke har evne til å nå cytosol, samt at molekylet mangler vevsspesifikk målretting [35]. Intracellulær levering av makromolekyler har lenge vært ansett å være en stor teknologisk utfordring [35]. I 1999 ble det vist at PCI effektivt kan indusere lysrettet levering av makromolekyler til cytosol, noe som indikerer at PCI kan benyttes for stedsspesifikk målretting i for eksempel genterapi, vaksinerings og i kreftbehandling [35]. PCI er siden vist å øke biologisk aktivitet til mange makromolekyler og andre molekyler som ikke har evne til å penetrere plasmamembranen, inkludert type I-RIP, immunotoksiner, plasmider, adenovirus, ulike oligonukleotider, dendrimerbaserte kjemoterapeutika og ukonjugerte kjemoterapeutika som bleomycin og DOX [36, 37]. Muligheten for spesifikk målretting av makromolekyler til spesielle celler, organer eller vev kan med andre ord være svært fordelaktig i en rekke terapier [35]. Med PCI av type I-RIP, er det oppnådd en kurativ rate på 60-80 % i dyremodeller [38].

Gelonin I denne oppgaven er PCI benyttet for å levere gelonin til cytosol. Gelonin er et klasse I-RIP fra planten *Gelonium multiforum* [39]. Proteinet induserer celledød ved å fjerne basen A4324 i 28 s rRNA som hindrer assosiering av elongasjonsfaktorene faktor-1 og -2 (EF-1 og EF-2) med subenheten 60 s [40]. Den potente cytotoxiciteten gjør den til en egnet kandidat for bruk i immunotoksin- eller ligandtoksin-syntese [41]. Fordi gelonin virker enzymatisk, kreves det svært få molekyler til å drepe en celle, men da toksinet

ikke kan krysse plasmamembraner har det svært begrenset toksisitet [40]. Gelonin har ingen cellebindende kjede, og mangler derfor evne til å binde seg til celleoverflater og penetrere cellemembraner [39].

1.4 Dødsmekanismer relatert til PDT og PCI

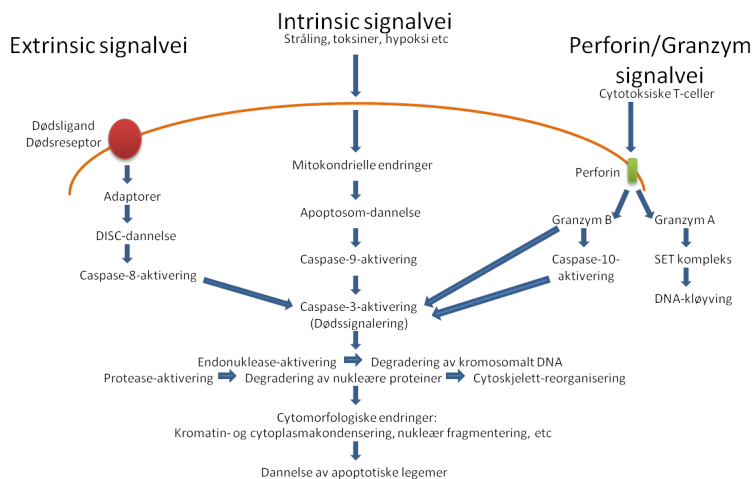
I respons på skade og stress har celler ulike mekanismer for å overleve eller dø. Celler som dør etter akutte skader vil typisk svulle og sprekke, og forårsake en potensielt ødeleggende inflammatorisk respons på sine naboceller [42]. Denne prosessen kalles cellenekrose og er en ukontrollert prosess [42]. Apoptose og autofagi er, i kontrast til cellenekrose, kontrollerte dødsmekanismer og overlevelsesmekanismer i celler, som kan oppreguleres eller nedreguleres av ulike typer stress.

1.4.1 Regulering av apoptose

Apoptotisk celledød er den best studerte formen for kontrollert celledød, og er en normal prosess i homeostasen for å regulere cellepopulasjonen i vev [43, 44]. Apoptose kan også fungere som en beskyttelsesmekanisme, som i en immunreaksjon eller der celler er skadet av sykdom [44]. Den er ATP-krevende, og karakteriseres morfologisk av kromatin-kondensering, cellekrymping, dannelse av apoptotiske legemer, og fagocytose av naboceller [43]. I tillegg er den karakterisert av kløyving av kromosomalt DNA og eksponering av fosfatidylserin på plasmamembranen [43].

En rekke stimuli, både fysiologiske og patologiske, kan trigge apoptose, men ikke alle celler vil nødvendigvis dø i respons på den samme stimulusen [44]. Stråling eller kjemoterapi kan resultere i DNA-skade på noen typer celler, noe som kan lede til apoptotisk celledød *via* en p53-avhengig signalvei [44]. I andre celler kan hormoner, som kortikosteroider, føre til apoptotisk død [44]. Celler som uttrykker Fas- eller TNF-reseptorer kan ved ligandbinding og protein-kryss-linking føre til apoptose [44]. Andre celler har en standard dødssignalvei som må blokkeres av overlevelsesfaktorer som hormoner eller vekstfaktorer [44].

Apoptosesignalering går gjennom flere uavhengige katabolske signaleringsveier (figur 8 og 9) som kan trigges av faktorer i og utenfor cellen [45, 46, 44]. Det er blitt vist at det finnes to hovedsignalveier i apoptosen; dødsreseptor-signalveien (*extrinsic*) og den mitokondrielle signalveien (*intrinsic*) [44]. Det foreligger bevis for at disse signalveiene er knyttet sammen og at molekyler i én signalvei kan påvirke den andre [44]. I tillegg finnes det en tredje signalvei som involverer T-cellemediert cytotoxiskitet og perforin/granzym-avhengig dreping av cellen [44]. Perforin/granzym-signalveien kan indukere apoptose *via* enten granzym A eller granzym B [44]. *Extrinsic*-, *intrinsic*- og granzym B-signalveiene fører sammen til et felles maskineri som ødelegger cellen [45]. Dette maskineriet settes i gang av kløyving av caspase-3, og resulterer i DNA-fragmentering, degradering av cytoskjelettet, og de andre stereotypiske morfologiske og biokjemiske endringene observert gjennom apoptosen ved at vitale substrater kløyves [44, 43]. Granzym A-signalveien aktiverer en parallell, caspase-uavhengig celledødsignalvei *via* enkelttrådig DNA-ødeleggelse [44].

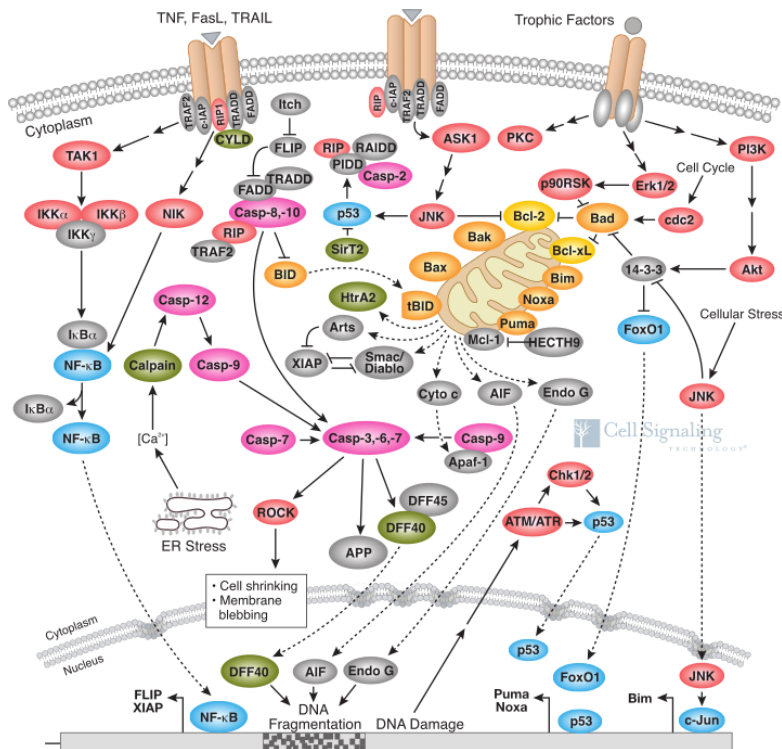


Figur 8: *Skjematisk representasjon av apoptotiske signalveier*: De to hovedsignalveiene i apoptose er *extrinsic* og *intrinsic* signalvei. I tillegg finnes perforin/granzym-signalveien. Hver av disse krever spesifikke trigger-signaler slik at en energiavhengig kaskade kan settes i gang. Hver signalvei aktiverer sine egne initiator-caspaser (8, 9 og 10) som deretter vil aktivere caspase-3. Granzym A er i motsetning til dette en caspase-uavhengig prosess. Tilpasset figur fra Elmore *et al.* [44].

Man har identifisert flere hovedgrupper av molekyler som er involvert i triggering og regulering av den apoptotiske prosessen [45]. Aktivering av initiator-pro-caspaser krever at adaptorproteiner og pro-caspaser dimeriserer og aktiverer proteaser [47]. *Extrinsic* signaleringsvei avhenger av binding av dødsligander som FasL, TNF- α og TNF-relatert apoptoseinduserende ligand (TRAIL) til sine respektive celleoverflatereseptorer [47]. Dette fører til klustering og den intracellulære dannelsen av dødsindusert signaleringskompleks (DISC), der pro-caspase-8 og -10 aktiveres [47]. De aktiverte caspasene kan deretter kløyve og aktivere pro-caspase-3 og -7 [47].

Intrinsic signaleringsvei trigges av diverse ekstracellulære og intracellulære stress og krever permeabilisering av den ytre mitokondrielle membranen slik at apoptotiske molekyler som cytokrom-c kan frigjøres [47]. Cytokrom-c binder til Apaf-1 som igjen kan aktivere pro-caspase-9 i et kompleks kalt apoptosom [47, 48]. Caspase-9 kløyver og aktiverer nedstrøms caspaser inkludert pro-caspase-3, og induserer på den måten apoptose [47].

Noen av de aktiverte caspasene kløyver nøkkelproteiner i cellen [42]. Enkelte caspaser kløyver nukleære membraner, mens andre kløyver et protein som vanligvis holder et DNA-degraderingsenzym, DNase, i en inaktiv form [42]. Kløyvingen vil føre til at DNAsen kutter opp DNAet i cellekjernen [42]. På denne måten dør cellen raskt og kontrollert, og de ødelagte cellene kan fagocytteres [42]. Denne type celledød defineres ofte som en type-I-prosess [46].



Figur 9: *Apoptose*signalering Figur fra <http://www.cellsignal.com>, april 2012.

Apoptose fra oksidativt stress Flere kjemiske og fysiske behandlinger som induserer apoptose er også vist å indusere oksidativt stress [49]. Et eksempel er ioniserende og ultrafiolett stråling som både induserer apoptose, og genererer ROS som H_2O_2 og OH^\bullet [49]. Eksponering for lave doser H_2O_2 induserer apoptose i flere ulike celletyper, og oksidativt stress kan betraktes som en direkte mediator av apoptose [49].

Enkelte forbindelser som induserer apoptose er forbindelser som kan utløse dannelsen av ROS [49]. Eksempler på slike i tillegg til fotosensitizere som aktiveres av lys er DOX, cisplatin og eter-linkede lipider, som er neoplastiske forbindelser som både induserer apoptose og oksidativ ødeleggelse i sensitive celler [49]. Hvordan oksidativt stress kan føre til celledød, er vist å være framprovosert av ROS-mediert DNA-skade som følge av aktivering av poly-ADP-ribose-transferase og akkumulering av p53 (som begge er involvert i apoptose) [49]. I tillegg kan oksidativt stress føre til dannelsen av oksiderte lipider i cellemembraner [49]. ROS reagerer lett med polyumettete fettsyrer

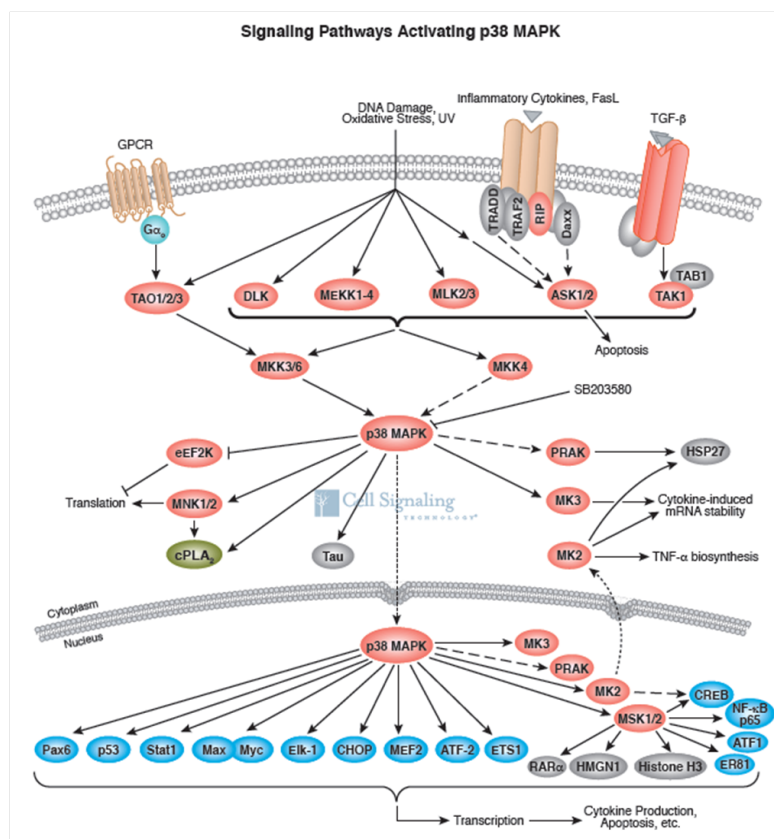
og kolesterol som finnes i cellemembranene, og kan på den måten resultere i oksiderte lipider som induserer apoptose [49].

ROS-medierte mekanismer i cancerceller I normale celler har ROS en essensiell funksjon i regulering av signaltransduksjon, cellevekst og celledifferensiering [50]. I flere studier er det blitt foreslått at mange typer cancerceller har økte nivåer av ROS sammenliknet med normale celler, og det er vist at en moderat økning i ROS kan promotere celleproliferasjon og celledifferensiering [50]. For høye mengder ROS kan imidlertid forårsake oksidative ødeleggelser i lipider, proteiner og DNA, slik at en balansering av ROS-homeostasen er helt avgjørende for normal cellevekst og -overlevelse [50]. En større økning i ROS er assosiert med unormal cancercellevekst og reflekterer en forstyrrelse i redoks-homeostasen som enten kan være grunnet økt ROS-produksjon eller en minking i ROS-*clearance* [50]. En slik tilstand kalles oksidativt stress, og er assosiert med progresjon av kreft [50]. Etersom for store mengder ROS kan være toksisk for cellene, kan man anta at cancerceller, som allerede har høye ROS-mengder, vil være mer sensitive for en ytterligere økning i ROS-nivåer enn normale celler [50].

Cancerceller som er blitt resistente mot økt oksidativt stress, ser man for seg at har satt i gang mekanismer som, ikke bare aktiverer ROS-*clearance*, men som også hemmer apoptose [50]. Enkelte cancerceller utvikler også resistensmekanismer mot flere anticancerbehandlinger [50]. Dette kan være fordi cellene tolerer eksogent stress bedre, oppregulerer overlevelsesmolekyler eller øker legemiddelinaktivering [50]. Det er blitt foreslått at resistens mot forbindelser som induserer intracellulær ROS-produksjon, som DOX, paclitaxel og platina-baserte legemidler, er korrelert med økt antioksidantkapasitet [50].

MAP-kinase-aktivert proteinkinase (MAPKAPK) er en gruppe proteiner som regulerer celleproliferasjon, differensiering, motilitet og overlevelse, og kan aktiveres av stressinduserende signaler som oksidativt stress [51, 52, 53]. Disse er serin/treonin-kinaser som responderer gjennom en prolinrettet fosoforylering av kinasedomenet fra ekstracellulære kinaser som kinase 1, 2 og p38 mitogen-aktivert proteinkinase (MAPK) [51]. p38 er vist

å aktivere MAPKAPK-2 og flere andre pro-inflammatoriske cytokiner [52]. MAPKAPK-2 regulerer på den måten apoptosen (figur 10) [54, 55, 52]. Flere proteiner som potensielt sett kan nedregulere aktiviteten til p38 er vist å være overuttrykt i humane tumorer, men p38 er også vist å hemme cancerprogresjon ved å modulere cellulære prosesser som cellemigrasjon og -invasjon [56]. Dette betyr at p38-aktivering både kan assosieres med dårlig prognose og med tumorsuppresjon [56].



Figur 10: *Signalveier som aktiverer p38-MAPK: p38 kan aktiveres av flere kinaser. Fosforylert p38 kan videre fosforylere og aktivere MAPKAPK-2 (MK2) som er involvert i videre transkripsjon og induksjon av apoptose.* Figur fra <http://www.cellsignal.com>, april 2012.

Aktivering av apoptose med PDT Mange signaleringskaskader aktiveres samtidig i cancerceller som utsettes for fotodynamisk stress [43]. Mye tyder på at disse apoptotiske hendelsene bestemmes av flere faktorer inkludert

type fotosensitizer som benyttes, dens intracellulære distribusjon og konsentrasjon, og lysdose [47]. Studier utført de siste årene indikerer at PDT kan drepe kreftceller direkte ved apoptose eller ved andre non-apoptotiske signalveier [43]. Karakteren til det fotooksiderte målet i PDT har stor påvirkning på signaleringsveiene og celledødsåttene [43]. Generelt vil fotosensitizerer som lokaliseres i cellenes mitokondrier eller endoplasmatisk retikulum (ER) promotere apoptose, mens PDT som er rettet mot enten plasmamembranen eller lysosomer, enten kan forsinke eller blokkere programmert apoptose som disponerer cellene for nekrose [43]. Disse effektene er vist å være doseavhengige [57].

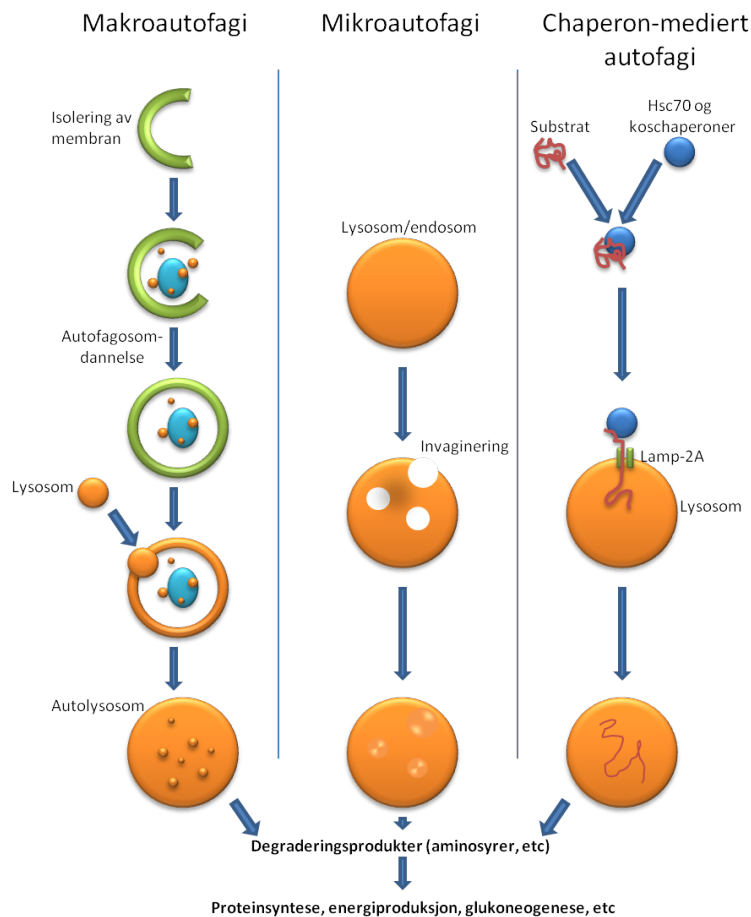
For fotosensitizerer som utviser svakere assosiasjon med mitokondrielle membraner vet man fremdeles lite om rollen til apoptose, men for komponenter som lokaliseres i plasmamembranen kan balansen raskt forskyves mot nekrotisk celledød, mest trolig på grunn av tap av membranintegritet og tap av ATP [43, 47]. PDT med slike fotosensitizerer er imidlertid vist å raskt øke apoptose i fibroblaster [58]. For PDT med fotosensitizerer med affinitet til lysosomer er det vist en treg induksjon av apoptose [58]. Apoptose etter behandling med TPPS_{2a}-PDT er blant annet vist å være karakterisert av cellefragmentering [58]. Behandling med høye konsentrasjoner ALPcS_{2a} er vist å føre til mindre apoptose og en oppregulering av nekrotisk celledød [31].

1.4.2 Regulering av autofagi

Autofagi er en katabolsk prosess som man antar fjerner ødelagte proteiner og organeller i celler som er skadet [59]. Autofagi kan være en cytoprotektiv mekanisme for å øke tumorcelleoverlevelse når cellene er under forhold som metabolsk stress, hypoksi og kjemoterapi [60]. Prosessen er godt regulert, og involverer at deler av cytoplasma og organeller brytes ned i autofagosomer og lysosomer [46]. På den måten virker autofagi som et dynamisk gjenvinnings-system som produserer nye byggesteiner og energi for cellulær renovering og homeostase [61]. Avhengig av hvilke organeller som elimineres, kan autofagi også betraktes som en dødsmechanisme (type II-celledød), og under visse betingelser kan den autofagiske signaleringsveien hindre aktivering av apop-

tose [46].

Grovt sett finnes det tre former for autofagi (figur 11). Makroautofagi er en prosess der en del av cytoplasma, inkludert organeller, isoleres fra membranen (også kalt fagofor) og danner et autofagosom, der Atg16L1-komplekset og LC3 er kritiske for lukkingen og isolering av membranen [61]. Den ytre membranen til autofagosomet fusjonerer med lysosomet, og materialet degraderes i autolysosomet [61]. Makroautofagi er den mest studerte autofagiprosessen, og regnes også som den viktigste [61].



Figur 11: *Tre former for autofagi: Makroautofagi, mikroautofagi og chaperon-mediert autofagi.* Tilpasset figur fra Mizushima *et al.* [61].

Mikroautofagi er en annen prosess der små deler av cytoplasma tas opp ved invaginasjon av den lysosomale eller endosomale membranen [61]. Den

tredje prosessen kalles chaperon-mediert autofagi, og involverer substratproteiner som inneholder en KFERQ-liknende pentapeptidsekvens [61]. Chaperon-mediert autofagi baserer seg på gjenkjenning av KFERQ-relaterte sekvenser [59]. Gjenkjenning av disse sekvensene av det cytosoliske chaperonet hsc70 og dets kochaperoner, fører til translokasjon av substratet inn i den lysosomale lumen for degradering etter binding med lysosomal Lamp-2A [59, 61].

Degraderingsproduktene som resulterer fra alle disse tre formene for autofagi kan brukes av cellene til ulike formål, slik som ny proteinsyntese, energiproduksjon og glukoneogenese [61].

Aktivering av autofagi fra oksidativt stress og PDT PDT er vist å indusere autofagi i en rekke studier [62, 63, 64]. Dewaele *et al.* viste i 2011 at ROS generert av PDT, med en ER-assosiert fotosensitizer, stimulerer til makroautofagi i normale celler og i cancerceller [59]. Med Western blotting ble det vist at LC3-I ble konvertert til LC3-II - en spesifikk biomarkør for makroautofagi [59]. Hemmeren 3-metyladenin ble vist å redusere *clearance* av oksidativt ødelagte proteiner og økte apoptosen [59]. Man konkluderte derfor med at makroautofagi hadde en cytoprotektiv rolle i PDT [59]. Et paradoks var imidlertid at genetisk tap av makroautofagi økte *clearance* av oksiderte proteiner og reduserte fototoksisitet [59]. Det ble funnet at oppregulering av chaperon-mediert autofagi kompenserte for den genetiske mangelen, og økte cellulær resistens mot PDT [59]. Celler som manglet chaperon-mediert autofagi var mer sensitive for fototoksisitet [59]. Man konkluderte dermed med at chaperon-mediert autofagi er den mest dominerende beskyttelsesmekanismen mot PDT [59].

2 Materialer og metode

2.1 Cellelinjer og dyrkningsmedium

I denne studien er alle forsøk utført på to sarcom-cellelinjer med ulik sensitivitet for antracyclin-antibiotikumet DOX; MES-SA og MES-SA/Dx5, og to brystcancerlinjer; MA11 og MA11 (3 x 3 PDT) med ulik sensitivitet for PDT.

MES-SA er en cellelinje fra en blandet livmor-sarcom som er sensitiv for DOX, og har i studien blitt brukt til å vise forskjeller mellom denne cellelinjen og datterlinjen MES-SA/Dx5. MES-SA/Dx5 er en DOX-resistent variant av moderlinjen, som har vært behandlet med $5,0 \times 10^{-7}$ M DOX over lengre tid [4]. DOX-resistensen er stabil etter lange perioder med vekst i DOX-fritt medium [4]. MA11 (3 x 3 PDT)-cellene er gjort resistente mot TPCS_{2a}-PDT ved behandling med tre gangers inkubasjon med 0,3 - 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCS_{2a} over tre uker. Behandlingen ble utført med standard PDT-prosedyre (2.8) i 3 minutter.

En økning i resistens mot DOX har blitt assosiert med en økning i kryssresistens mot flere andre legemidler [4]. MES-SA/Dx5-linjen utviser kryssresistens mot daunorubicin, dactinomycin, mitoxantron, colchicin, vinkristin, vinblastin, og etoposid og moderat resistens mot mitomycin C og melfalan [4]. Man har korrelert kryssresistensen med ekspresjon av PGP, men ikke med MRP [3]. DOX-akkumulering i MES-SA/Dx5 er vist å være redusert med 50 % sammenliknet med MES-SA [4]. Årsaken er økt effluks av DOX *via* PGP [4]. Hvorfor MES-SA/Dx5 i tillegg er resistent mot TPPS_{2a}-PDT er ikke kjent, og man vet heller ikke om det samme gjelder for andre fotosensitizere.

MA11 er brystcarcinomceller med opphav fra beinmargsmetastaser. PDT-resistente MA11-celler har, i motsetning til MES-SA/Dx5, direkte blitt resistente mot PDT etter gjentatt eksponering for PDT i tre sykluser á 3 minutter. Cellene er blitt dyrket i RPMI-medium og splittet ukentlig.

MES-SA og MES-SA/Dx5 har i denne studien blitt dyrket i mediumet McCoy's 5a med 10 % føtalt kalveserum, 100 U/mL penicillin (P0781), og

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Mediumet ble byttet annenhver til hver tredje dag for å sikre optimale vekstbetingelser. Cellene ble dyrket i 75 cm^2 eller 175 cm^2 vevskulturflasker og inkubert i inkubatorskap ved 37°C og 5 % v/v CO_2 . Ingen celler ble brukt etter 25 splittings.

Under alt arbeid med celler i kultur er det benyttet aseptiske arbeidsteknikker, og arbeidet har foregått i LAF-benk.

2.2 Standardprosedyrer

2.2.1 Splitting av celler

For å sikre at cellene ikke ble konfluente før utførelsen av forsøkene, ble celleflaskene splittet jevnlig. Det er viktig at cellene er i et delingsstadium når forsøkene utføres. Splitting ble derfor foretatt ved 80 % konfluens. Når splitt nummer 25 var oppnådd, ble nye celler hentet fra nitrogenfryseren, og cellene fikk gå en uke før de ble benyttet i forsøk.

Splitting av MES-SA Ved splitting av MES-SA ble medium sugd av og cellemonolaget vasket med 2 eller 3 mL fosfat-bufret saltvann (PBS), avhengig av om det ble benyttet 75 cm^2 eller 175 cm^2 vevskulturflasker. Cellene ble behandlet med 2 eller 3 mL trypsin et par minutter i inkubatorskap (37°C) og løsnet med lette slag mot flaskesiden. Trypsin har proteaseaktivitet, og løsner cellene ved at cellematrixforbindelser brytes. Trypsin består i tillegg av etylendiamintetraacetat (EDTA) og kan derfor bryte Ca^{2+} -avhengige celle-celle-adhesjoner fordi Ca^{2+} bindes opp. Etter at cellene var studert i mikroskop for å sikre at alle celler var løsnet fra underlaget og hverandre, ble 8 eller 17 mL dyrkningsmedium tilsatt for å nøytralisere trypsinet. Cellesuspensjonen ble spylt nedover flaskeveggen med en pipette, og ønsket mengde ble overført til nye 75 cm^2 eller 175 cm^2 -flasker med 20 eller 40 mL dyrkningsmedium.

Splitting av MES-SA/Dx5 Splitting av MES-SA/Dx5 ble utført med EDTA-buffer (se Vedlegg A for oppskrift). EDTA har den egenskapen at den binder Ca^{2+} og dermed bryter Ca^{2+} -avhengige celle-celle-adhesjoner.

Splitting av MES-SA/Dx5 ble utført sjeldnere enn for MES-SA på grunn av tregere vekst før oppnådd konfluens.

2.2.2 Telling av celler

Før utsåing av celler, ble cellekonsentrasjonen målt ved hjelp av et niruters Glasstic® slide 10 with grids-tellekammer (HYCOR). Tre diagonale ruter ble talt gjennom mikroskop. Gjennomsnittlig antall ble multiplisert med 10^4 da hver av de ni rutene hadde et volum på $0,1 \mu\text{L}$. Dermed ble konsentrasjonen funnet i antall celler per mL.

2.3 Etablering av tetthetskurve

For å kunne beregne utsåingsantall til forsøkene var det nødvendig å etablere en tetthetskurve for cellelinjene. På dag 1 ble det sådd ut 2000, 4000, 6000, 8000, 10 000 og 12 000 celler per brønn i et 96 brønnersbrett. På dag 2 ble vekstmedium skiftet ut, og cellene satt til inkubasjon i 18 timer. På dag 3 ble brønnene vasket to ganger med $100 \mu\text{L}$ vekstmedium, og tilsatt $100 \mu\text{L}$ vekstmedium for å etterlikne prosedyren i de andre forsøkene utført i denne masteroppgaven. På dag 5 ble celleviabilitet målt med 3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyl-tetrazolium-bromid (MTT)-assay.

2.3.1 Utsåing av celler

For viabilitetsmåling med MTT-assay ble det sådd ut 6000 celler per brønn for begge cellelinjer der forsøk ble utført i 96-brønnersbrett ($0,33 \text{ cm}^2$). For viabilitetsmåling og proteindeteksjon som ble målt i 6-brønnersbrett eller 3001-skåler ($9,6 \text{ cm}^2$), ble det sådd ut 350 000 celler per brønn. Til mikroskopiforsøk ble det sådd ut 50 000 celler per brønn i 4-brønnersbrett ($1,9 \text{ cm}^2$). For at cellene skulle feste seg, ble begge cellelinjer inkubert i ett døgn før videre forsøk.

2.4 Etablering av vekstkurve

For å beregne doblingstiden til cellelinjene, ble det etablert vekstkurver. På dag 1 ble det sådd ut 150 000 celler per skål i 3001-skåler. Etter 24, 48, 72 og 96 timer ble medium sugd av. Det ble vasket med 300 μL PBS, og tilsatt 300 μL trypsin eller EDTA-buffer for henholdsvis MES-SA og MES-SA/Dx5 slik at cellene skulle løsne. Etter noen minutters inkubering i varmeskap ble 700 μL McCoy's 5a tilsatt. 1, 0,5, 0,250 og 0,125 mL celsuspensjon ble overført til 9, 9,5, 9,75 og 9,88 mL counterbuffer etter henholdsvis 24, 48, 72 og 96 timer. Suspensjonene ble blandet godt før celleantallet ble talt med en Coulter Counter. Det ble gjort tre paralleller for hver måling.

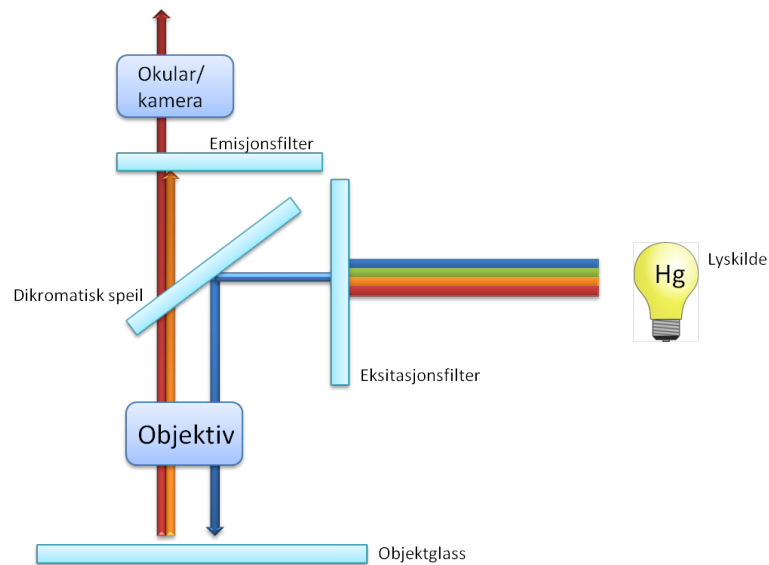
2.5 Doxorubicin-sensitivitet

For å bekrefte at MES-SA/Dx5 har ervervet resistens mot DOX ble det utført en sensitivitetsstudie. På dag 1 ble det sådd ut 6000 celler per brønn i et 96-brønnersbrett for begge cellelinjer. På dag 2 ble det tilsatt tre paralleller med 100 μL 0,01, 0,1, 1, 10, 100 og 1000 nM DOX. På dag 5 ble relativ viabilitet målt med MTT-assay som beskrevet i 2.10.

2.6 Fluorescensmikroskopi

Prinsipp

Det ble benyttet fluorescensmikroskopi for å studere cellulær lokalisasjon av TPCS_{2a}. Prinsippet for fluorescensmikroskopi går ut på en selektiv deteksjon av fluorescensen til en forbindelse, og involverer bruk av et eksitasjonsfilter, et dikromatisk speil og et emisjonsfilter (figur 12).



Figur 12: *Skjematisk figur av fluorescensmikroskopi:* Ved eksitasjonen filtreres lys gjennom eksitasjonsfilteret og går inn i filterblokken. Det dikromatiske speilet med en karakteristisk bølglengde reflekterer lys med lavere bølglengde. Ved emisjon slipper det dikromatiske speilet gjennom mer langbølget emisjonslys. Et emisjonsfilter filtrerer lyset som slippes ut av filterblokken. Dette lyset kan detekteres av et kamera eller studeres med øyet gjennom okularet.

Prosedyre

- På dag 1 ble 50 000 celler ble sådd ut per brønn i 4-brønnersbrett med dekkglass i bunn.
- På dag 2 ble enkelte av brønnene behandlet med $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ TPCS_{2a}, mens de resterende ble det skiftet vekstmedium på.
- Dag 3 ble det vasket to ganger med $300 \mu\text{L}$ vekstmedium for å *chase* eller "jage" fotosensitizeren vekk fra cellemembranen og inn i cellene. Cellene ble inkubert videre ved 37°C i 4 timer. Til noen av de ubehandlede og TPCS_{2a}-behandlede brønnene ble det minst 20 minutter før mikroskopering tilsatt $0,3 \mu\text{L}$ LysoTrackerGreen®.
- Cellene ble vasket 2 ganger med $500 \mu\text{L}$ iskald PBS med Ca^{2+} og Mg^{2+} , og $500 \mu\text{L}$ ble tilsatt tilslutt.

- PBS ble sugd av og dekkglasset ble dyppet i iskald PBS før det ble lagt over et objektglass. Overflødig væske ble trukket vekk med filterpapir.
- For intracellulær deteksjon av fotosensitizer ble det benyttet et Zeiss Axioplan 1 epi-fluorescens –og fasekontrastmikroskop (Zeiss, Obercochen, Tyskland). En HBO/100 W kvikksølvlampe ble benyttet som eksitasjonskilde. Følgende eksitasjonsfilter ble benyttet for TPCS_{2a}: 395-440 nm, dikromatisk speil: 460 nm, og emisjonsfilter: 610 nm. For LysoTrackerGreen® ble det benyttet eksitasjonsfilter: 470/40 (HE), dikromatisk speil: 495 (HE), og emisjonsfilter: 525/50 (HE).
- For fluorescens- og fasekontrastbilder ble det brukt et CCD (cooled charge-coupled device)-kamera (Astromed, Cambridge, UK), og Axio-Vision Analysis software ble benyttet for prosessering av bildene. I alle mikroskopiforsøk ble det tatt negative kontrollbilder for å bekrefte at fluorescensen ikke skyldtes annet enn fluorokromene som var tilsatt.

2.7 Fotosensitizer-opptak

Prinsipp

Analyse av sensitizeropptak kan utføres etter et prinsipp som baserer seg på forbindelsens evne til å fluorescere. Ved å tilsette kjente konsentrasjoner fotosensitizer til cellelysat, lages en standardkurve med fluorescens per mengde fotosensitizer per mengde protein. Dermed kan målt fluorescens i TPCS_{2a}-behandlede celler relateres til mengde fotosensitizer per mengde protein.

Prosedyrer

Prosedyre for høsting av celler

- 350 000 celler ble sådd ut i 3001-skåler. Noen celler ble behandlet med 1000 μL 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCS_{2a}, mens andre ble det skiftet vekstmedium på.
- Etter 5 minutter, 1 time, 18 timer, og 18 timer og *chase* ble cellene høstet med følgende prosedyre:

- Cellene ble vasket to ganger med iskald PBS, og lysert med 1 mL 0,1 M NaOH. Celler som skulle benyttes til proteinmåling ble lysert med 100 μ L 0,1 M NaOH.
- For å etablere en standardkurve med TPCS_{2a}-konsentrasjon per mengde protein, ble det til ubehandlede cellelysater lysert med 1 mL 0,1 M NaOH tilsatt 0, 5, 10, 20 og 40 ng/mL TPCS_{2a}.
- Cellelysaten ble skrapet sammen med celleskrape og overført til eppendorfrør. Det ble gjort to paralleller for hvert tidspunkt, og proteinmengde ble målt med Lowry-basert assay beskrevet i 2.11.3. Alt arbeid foregikk beskyttet mot lys.

Prosedyre for måling av fotosensitizeropptak

- 1 mL cellelysat ble tatt ut til fluorescensmåling med Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer fra Holger Teknologi.
- Fotosensitizeren i cellelysatet ble eksitert ved 420 nm, og emisjon ble målt ved 650 nm ved hjelp av programmet Cary Eclipse.
- Det ble korrigert for bakgrunn.

2.8 Fotodynamisk terapi *in vitro*

Prinsipp

Fotodynamisk terapi er, som beskrevet i 1.2.1, et prinsipp som involverer et fotosensiterende molekyl, lys ved en bestemt bølgelengde og oksygen. Ved å inkubere celler med en fotosensitizer over en viss tid, og deretter eksitere fotosensitizeren, vil den, *via* ISC, reagere med molekylært oksygen og generere ROS som kan gjøre irreversibel skade på cellene.

Prosedyre for PDT *in vitro*

- Ett døgn etter utsåing av celler, ble medium sugd av med en mikropipette.

- 0,05 eller 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCS_{2a} eller TPPS_{2a} i vekstmedium ble tilsatt cellebrønnene som skulle behandles, og det ble tilsatt 100 eller 1000 μL vekstmedium i brønner til kontroll for henholdsvis 96- eller 6-brønnersbrett/3001-skåler, før cellene ble satt til 18 timers inkubasjon i varmeskap.
- Neste dag ble alle cellebrønner vasket to ganger med 100 eller 1000 μL og tilsatt 100 eller 1000 μL vekstmedium.
- Cellene ble satt til 4 timers inkubasjon i varmeskap for å *chase* fotosensitizeren inn i cellene og vekk fra plasmamembranen.
- Ønsket lysdose ble gitt ved hjelp av LumiSource® før cellene ble satt til inkubasjon.
- Etter 48 timer ble celleviabilitet målt ved MTT-assy (2.10).

2.8.1 Belysing og aktivering av fotosensitizere

I denne oppgaven er fotosensitizerene TPCS_{2a} og TPPS_{2a} benyttet. TPCS_{2a} er syntetisert fra en di-imidreduksjon av TPPS_{2a} [20]. Syntetisert TPCS_{2a} inneholder 3 isomere, og absorberer lys ved 415 og 652 nm [20]. TPPS_{2a} absorberer lys ved 415 nm [20]. Belysing av fotosensitizer-behandlede celler ble utført med lampen LumiSource® (PCI Biotech ASA) som består av fire 18 W Osram L 18/67 standard lysrør. Lampen leverer blått lys med emisjonsmaksium på ca 435 nm. Irradiansen varierer $< 10\%$ i hele belysningsområdet (45 x 17 cm), og har en effekt på 11,5 mW/cm². Lampen er utstyrt med vifte for å hindre at lyseksonerte celler utsettes for hypertermi. 15 minutter før belysning av behandlede celler ble lampen skrudd på for å sikre stabil irradians. 100 sekunder lysdose tilsvarer 1,33 J/cm².

2.9 Fotokjemisk internalisering *in vitro*

Prinsipp

PCI baserer seg på PDT, men involverer i tillegg et makromolekyl (2.9.1). Målet er å drive makromolekylet inn i cellenes cytosol, der det kan utøve sin

effekt. Som beskrevet i avsnitt 1.3.1 vil ROS som genereres av fotosensitizeren skade de endolysosomale vesiklene som omslutter makromolekylet, slik at makromolekylene slipper ut i cytosol.

Prosedyre for PCI *in vitro*

- Ett døgn etter utsåing av celler, ble medium sugd av med en mikropipette.
- 0,05 eller 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCS_{2a} eller TPPS_{2a} i vekstmedium og 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rGelonin i vekstmedium ble tilsatt cellebrønnene som skulle behandles med PCI, og det ble tilsatt 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rGelonin i vekstmedium i brønner til kontroll, før cellene ble satt til 18 timers inkubasjon i inkubator. I PCI-forsøk med økende geloninkonsentrasjon ble det tilsatt rGelonin med konsentrasjonene 0,1, 0,3, 1, 3, 10 og 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Neste dag ble alle cellebrønner vasket to ganger med 100 eller 1000 μL og tilsatt 100 eller 1000 μL vekstmedium.
- Cellene ble satt til 4 timers inkubasjon i inkubator for å *chase* fotosensitizeren inn i cellene og vekk fra plasmamembranen.
- Ønsket lysdose ble gitt ved hjelp av LumiSource® før cellene ble satt til inkubasjon igjen.
- Etter 48 timer ble celleviabiliteten målt ved MTT-assay (2.10).

2.9.1 Makromolekyl

I alle forsøk er rekombinant gelonin benyttet som makromolekyl, og forkortes i oppgaven med *rGelonin* eller *rGel*.

2.10 Viabilitetsmåling med MTT-assay

Prinsipp for MTT-assay

Dette assayet benyttes for å måle viabilitet etter behandling av en cellelinje. MTT-assay baserer seg på omdannelsen av MTT til formazankrystaller

i levende celler, og bestemmer mitokondriell aktivitet [65]. En økning eller minking i antall levende celler kan detekteres ved å måle formazankonsentrasjonen ved hjelp av optisk tetthet ved en gitt bølgelengde [65].

Prosedyre for MTT-assay

- 48 timer etter belysning ble medium i cellebrønnene sugd av med mikropipette. For DOX-sensitivitetsforsøk ble medium sugd av 72 timer etter tilsetning av DOX.
- 50 og 500 μL 0,4 mg/mL MTT ble tilsatt cellebrønnene i henholdsvis 96- og 6-brønnersbrett, samt en blank rad på hvert brett, og deretter satt til inkubasjon i 2-4 timer.
- Deretter ble MTT sugd av med mikropipette, og 100 og 1000 μL dimetylsulfoksid (DMSO) tilsatt hver MTT-brønn, og brettet satt på risteinkubator i 5 minutter.
- Absorbans ble målt ved 570 nm i PowerWave™ XS2 Microplate Spectrophotometer fra BioTek ved hjelp av programvaren Gen5, og det ble foretatt korrigering med blanke brønner.
- I alle figurer er dataene normalisert i forhold til ubehandlede celler.

2.11 Analyser av proteinuttrykk

2.11.1 SDS-PAGE, Western blott og immundeteksjon

Prøveopparbeidelse til SDS-PAGE og Western blott

Prosedyre for prøveopparbeidelse

- Celler ble ved dag 1 sådd ut i 6-brønnersbrett som beskrevet i 2.3.1.
- Ved dag 2 ble cellene behandlet med PDT og/eller PCI som beskrevet i 2.8 og 2.9.
- Etter 18 timer ble cellene vasket og tilsatt 1 mL vekstmedium.

- Fire timer etter vask ble brettene belyst i 300 sekunder. Alle forsøk inkluderte ubehandlede kontroller og negative kontroller.
- Ved ønsket tidspunkt ble cellene satt på is for å stoppe videre cellulære prosesser.
- Cellebrønnene ble vasket med 1 mL iskald 1 x PBS uten Mg^{2+} eller Ca^{2+} og lysert med 70 μL lysesbuffer (Vedlegg A).
- Lysatet ble skrapet sammen med celleskraper og overført til eppendorfrør, og 0,3 μl benzonase tilsatt.

Bestemmelse av relativ proteinmengde med DNA-måling

Prinsipp for DNA-måling Prinsippet benyttet for DNA-måling går ut på å måle absorbans ved 260/230 nm (DNA). Absorbansen som måles kan relateres direkte til DNA-konsentrasjonen i prøvene, men da bromfenolblått i lysesbufferen absorberer lys ved den samme bølgelengden, må instrumentet blankes.

Prosedyre for DNA-måling

- 20 μL Samplebuffer (Vedlegg A) ble fortynnet 1:50 med dH_2O og ble benyttet som blank. 20 μL prøve ble fortynnet 1:25.
- En kyvette ble vasket to ganger med blank før spektrofotometeret (Ultraspes 2100 *pro* UV/Visible) ble nullstilt med 90 μL blank.
- Før hver måling ble kyvetten vasket to ganger med prøve, og det ble for hver måling gjort tre paralleller med 90 μL prøve.
- Gjennomsnittelig DNA ble regnet ut for 3 paralleller slik at appliseringsvolum kunne beregnes. Ettersom maksimalt appliseringsvolum for gelene er 15 μL per brønn, ble prøven med laveste måling applisert som 15 μL .

SDS-PAGE og Western blott

Prinsipp for SDS-PAGE Sodium-dodecyl-sulfat-polyakrylamid-gel-elektroforese (SDS-PAGE) baserer seg på migrering av ladede molekyler i en gelmatrix i respons på et elektrisk felt [66]. Teknikken fasiliterer separasjonen av en blanding av proteiner etter molekylvekt [66]. SDS-PAGE involverer dissosiering av inter- og intrakjede-disulfidbindinger, som oppnås ved å varme opp proteinprøven i kokende vannbad i nærvær av en reduserende forbindelse, som dithiotreitol (DTT) [66]. Proteinene *coates* også med en negativ ladning i nærvær av den anioniske detergenten sodium-dodecyl-sulfat (SDS) [66]. Proteinene kan dermed separeres og vises som bånd ettersom de migrerer i et elektrisk felt gjennom gelmatrixen [66].

Gelen består av to lag, der den øverste delen er en *stacking*-gel og resten er en separerende gel [66]. Meningen med *stacking*-gelen er å oppkonsentrere proteinene i prøven i ett lag før de vandrer inn i den separerende gelen [66]. Parallelt bør en standard protein-stige separeres sammen med proteinprøven.

Prosedyre for SDS-PAGE

- Stige ble tillaget av 6 μL Samplebuffer, 3 μL Kaleidoskop (Bio-Rad) og 3 μL Biotinylated ladder (Cell Signaling) (Vedlegg B).
- Det ble stukket hull på eppendorfrør med cellelysat, og rørene ble kokt ved 95°C i 5 minutter. Stigen ble behandlet på samme måte.
- Eppendorfrørene ble satt noen minutter på is, vortexet og spunnet ned.
- Geloppsats ble satt sammen på isbad, og det ble helt 1 x Runningbuffer (Se Vedlegg A for oppskrift) i kammeret opp til målestrek.
- 10 μL stige ble applisert i første gelbrønn.
- Like proteinmengder ble applisert i hver sin brønn på gelen.
- Gelelektroforese ble kjørt ved 200 V og 400 mA til fronten hadde gått ned.

Gel Til gel-elektroforese ble det benyttet Ready Gel® 4-20 % Tris-HCl med 15 brønner á 15 μ L fra Bio-Rad.

Prinsipp for Western blotting For at proteinene skal kunne detekteres med antistoffer, må de overføres til en nitrocellulose- eller polyvinyliden-difluorid (PVDF)-membran. En metode som kan benyttes kalles elektroblotting eller Western blotting, og involverer en elektrisk spenning som dytter proteinene fra gelen over på membranen. Proteinene overføres til membranen i samme mønster som i gelen. På denne måten blir proteinene eksponert for deteksjon på en tynn overflate. Proteinbindingen baserer seg på hydrofobe interaksjoner og ioneinteraksjoner mellom membranen og proteinet.

Prosedyre for Western blotting

- Gelen benyttet i SDS-PAGE ble lagt under en PVDF-membran kalibrert med metanol og dynket i Transferbuffer (se Vedlegg A for oppskrift). Gelen og membranen ble lagt mellom filter og svamper, og eventuelle luftbobler ble rullet ut.
- Oppsatsen ble satt i et blottetekammer fylt med Transferbuffer og en isblokk, og satt på magnetrører.
- Proteinblotting ble kjørt ved 100 V og 400 mA i 2 timer ved 4°C.

Immundeteksjon

Prinsipp for inkubering med primært antistoff Primære antistoffer genereres når en vert eller immuncellekultur eksponeres for et protein eller en del av proteinet. I mennesker og dyr er dette en del av immunresponsen, men i dette tilfellet høstes antistoffene og kan benyttes som et deteksjonsverktøy som binder til proteinene på membranen direkte. Etter blokkering av membranen for å hindre uspesifikk binding av antistoff, inkuberes den med primært antistoff over ønsket tid.

Prosedyre for inkubering med primært antistoff

- Membranen ble, etter Western Blotting, vasket 3 ganger á 5 minutter med 12 mL 1 x TTBS (Vedlegg A) i et 50 mL-rør.
- Deretter ble membranens blokkert med 5 mL 5 % tørrmelk i 1 x TTBS i 1 time ved romtemperatur.
- Primært antistoff (Vedlegg B) ble tilsatt 5 mL 5 % tørrmelk i 1 x TTBS eller 5 % bovint serumalbumin (BSA), og tilsatt 50 mL-røret. Der BSA ble brukt, ble membranens først skylt med 12 mL 1 x TTBS. Inkubasjon med primært antistoff gikk over natt ved 4°C på rulle.

Prinsipp for inkubering med sekundært antistoff Etter vasking av membranens for å fjerne ubundet primært antistoff, eksponeres membranens for et antistoff med affinitet for den specie-spesifikke delen til det primære antistoffet. De primære antistoffene kommer fra animale eller animale hybridoma-kulturer. Et anti-mus sekundært antistoff vil binde til nesten alle primære antistoffer som kommer fra mus.

Prosedyre for inkubering med sekundært antistoff

- Morgenen etter inkubering med primært antistoff, ble membranens vasket 3 ganger á 5 minutter med 12 mL 1 x TTBS.
- Deretter ble membranens inkubert i 2 timer ved romtemperatur med sekundært antistoff og antistoff mot biotin for å detektere stigen.

Fremkalling av Western blott

Prinsipp for fremkalling Det sekundære antistoffet er ofte linket til et enzym. Enzymet kan være pepperrot-peroksidase og har evne til å kløyve en kjemiluminescent forbindelse, og reaksjonen produserer luminescens i forhold til mengde protein. En film plasseres mot membranens og eksponeres for lys som produseres i reaksjonen. Lyset skaper et bilde på filmen tilsvarende mønstret og mengden protein som er tilstede på membranens.

Prosedyre for fremkalling

- Membranen ble vasket 3 ganger á 5 minutter med 1 x TTBS.
- 1-1,5 mL LumiGlo A og LumiGlo B (KPL) (1:1) ble dryppet over membranen. Inkuberte i 5 minutter i romtemperatur.
- Membranen ble lagt mellom to transparente ark, og teipet fast i en fremkallingskassett.
- En film ble lagt over membranen i kassetten på mørkerom, og fremkalt.

Kvantifisering av Western blott

Prinsipp for kvantifisering av Western blott Proteinuttrykk kan kvantifiseres ved å se på det relative uttrykket i forhold til total proteinmengde.

Prosedyre for kvantifisering av Western blott

- Det ble tatt utgangspunkt i det største båndet på blottet og tegnet et rektangel rundt dette.
- Rektanget ble kopiert i størrelse og tegnet omkring de andre båndene man ønsket å kvantifisere, samt tegnet inn på et bakgrunnsområde uten ujevnheter.
- Dataprogrammet Quantity One ble benyttet for å beregne relative volumer av båndene i forhold til bakgrunn.
- De relative verdiene ble deretter normalisert i forhold til loading-kontrollbånd fra gamma-tubulin. Det ble gjort tre paralleller for hvert rektangel.

2.11.2 Enzchek caspase-3-assay

Prøveopparbeidelse til Enzchek caspase-3-assay

Prosedyre for prøveopparbeidelse

- 350 000 celler ble sådd ut i 6-brønnersbrett.
- 24 timer etter PDT og PCI (2.8 og 2.9) ble mediet overført til eppendorfrør.
- Cellene ble trypsinert eller løsnet med EDTA-buffer. Mediet som var blitt tatt vare på i eppendorfrørene ble brukt til å nøytralisere trypsinet og EDTA-bufferen.
- Cellesuspensjonen ble deretter sentrifugert i 3 minutter ved 1000 omdreininger per minutt (rpm).
- Supernatanten ble sugd av, og cellepelleten ble resuspendert i PBS og sentrifugert på nytt for å fjerne mediumrester.
- Cellepelleten ble resuspendert i 60 μL 1 x luseringsbuffer fra kitet (Vedlegg A) og inkubert 30 minutter på is.
- De lyserte cellene ble sentrifugert i 5 minutter ved 5000 rpm.
- 50 μL supernatant ble overført til 96-brønnersbrett for proteindeteksjon, og 5 μL ble overført til et 96-brønnersbrett for proteinmåling.

Bestemmelse av relativ proteinmengde til Enzchek caspase-3-assay

Det ble benyttet Lowry-basert assay (2.11.3) til bestemmelse av relativ proteinmengde i EnzChek-assayet.

Proteindeteksjon med caspase-3-assay

Prinsipp for proteindeteksjon med caspase-3-assay Prinsippet bak deteksjon av caspase-3 med EnzChek Caspase-3 Assay Kit #1 involverer substratet 7-amino-4-metylkumarin-derivert Z-DEVD-AMC (der Z representerer en benzyloksykarbonylgruppe) som fluorescerer svakt i UV-lys (eksitasjon/emisjon 330/390), men som gir en sterk blå fluroescens (eksitasjon/emisjon 342/441) ved proteolytisk kløyvning av caspase-3.

Kitet kan benyttes til å detektere caspase-3-aktivitet og nært relaterte proteaser i celleekstrakter ved å bruke en fluorescens-mikroplate-leser eller et fluorometer.

Prosedyre for proteindeteksjon med caspase-3-assay

- 50 μL 2 x substrat working-løsning (Vedlegg A) ble tilsatt hver prøve og blank.
- Prøvene ble inkubert tildekket i 30 minutter ved romtemperatur.
- Fluorescens ble målt (eksitasjon/emisjon 365/410-460).

2.11.3 Bestemmelse av relativ proteinmengde med Lowry-assay

Lowry-basert assay

Prinsipp for Lowry-assay Lowry-assay er en metode som kvantifiserer farge etter en reaksjon med Folin-Ciocalteu-fenol med tyrosylresiduer i et ukjent protein. Fargeverdien sammenliknes med fargeverdien til en standardkurve av et standardprotein. Ofte benyttes BSA som standardprotein. Metoden er designet for å kvantifisere 1 - 20 μg protein. Ønskes proteinbestemmelse i et annet område, kan volumene i assayet økes med en lik faktor [67].

Prosedyre for Lowry-basert assay For bestemmelse av relativ proteinmengde ble det benyttet et Lowry-basert assay og reagenser fra Lowry-assay-kit (Bio-Rad) (Vedlegg C).

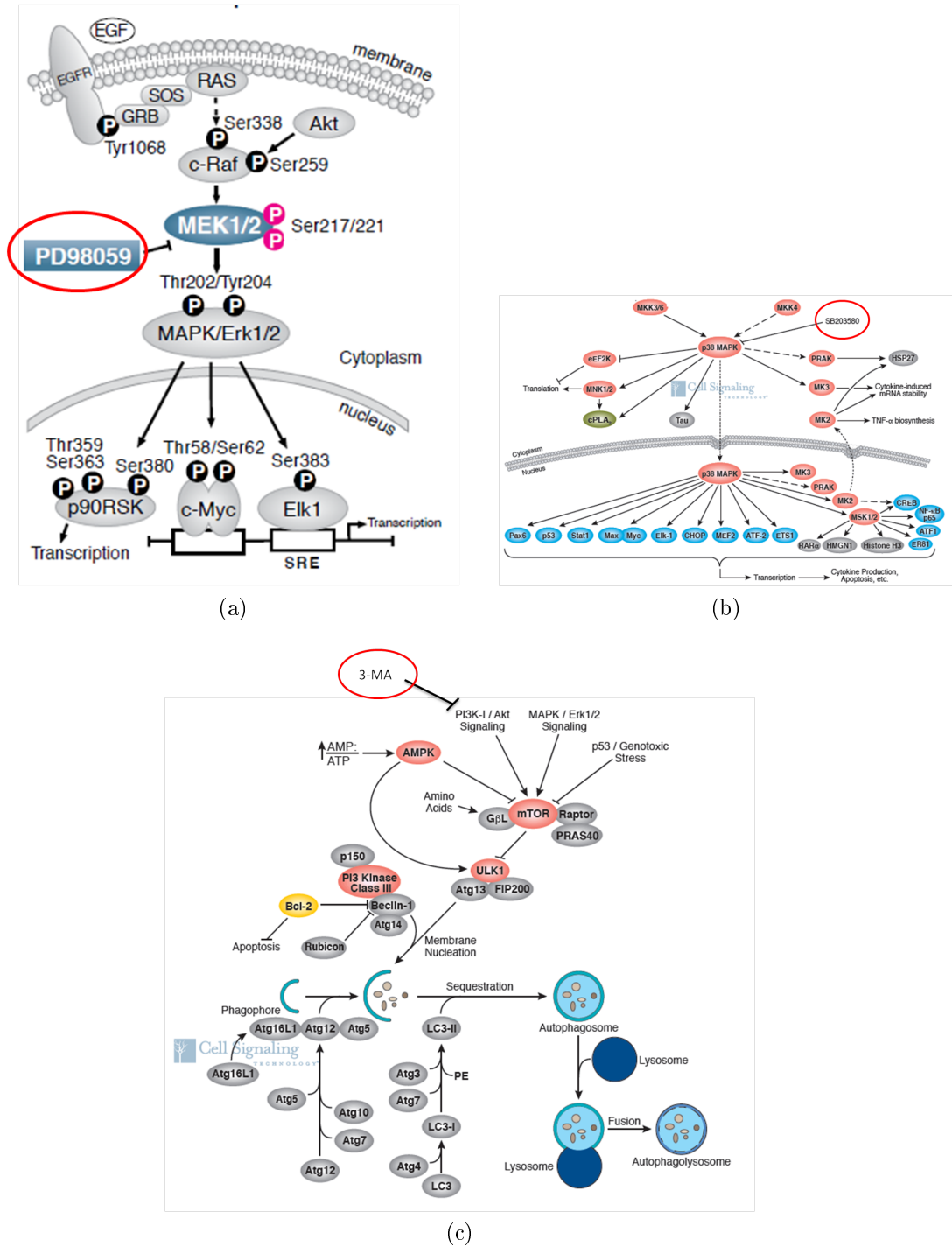
- Standard ble tillaget av BSA og lyseringsbuffer i konsentrasjonene 0, 0,25, 0,4, 0,5, 0,71, 1 og 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
- Reagens S og reagens A fra kitet ble blandet i forholdet 1:50.
- 25 μL S+A ble tilsatt brønner i et 96-brønnersbrett.
- 5 μL prøve og 5 μL standard ble tilsatt hver sine brønner med S+A.

- 200 μL reagens B ble tilsatt alle brønner det skulle måles på, inkludert en rad med blanke brønner tilsatt kun lyseringsbuffer.
- Brettet ble satt på svak risting i 15 minutter.
- Absorbans ble målt ved 750 nm i PowerWave™ XS2 Microplate Spectrophotometer fra BioTek ved hjelp av programvaren Gen5, og det ble foretatt korrigerings med blanke brønner.

2.12 Inhibering av celsignalveier

Prinsipp for inhibering av apoptose og autofagi

I figur 13 er prinsipp for inhibering av celsignalveiene apoptose og autofagi vist.



Figur 13: *Inhibering med PD98059, SB203580 og 3-MA: Prinsipp for inhibering av a) ERK med PD98059, b) p38 med SB203580 og c) LC3B med 3-MA.* Figur fra <http://www.cellsignal.com>, april 2012.

Prosedyre for inhibering av celledesignaler

- PDT- og PCI-behandling ble gitt som beskrevet i 2.8 og 2.9.
- 0,05 mM PD98059 (mitogen-aktivert proteinkinasekinase (MEK)-inhibitor), 0,02 mM SB203580 (fosforylert p38 (Pp38)-inhibitor) og 10 mM 3-metyladenin (3-MA) (autofagi-inhibitor) ble gitt henholdsvis 2 timer, 2 timer og 30 minutter før lys.
- Hemmerene ble fjernet 2-3 timer (PD98059), 2-3 timer (SB203580) og 24 timer (3-MA) etter lys, og brønnene ble vasket 2 ganger med McCoy's 5a før nytt vekstmedium ble tilsatt.
- Etter ønsket tidspunkt etter lys ble celler høstet som beskrevet i prosedyren for prøveopparbeidelse til SDS-PAGE, og proteinuttrykk analysert med Western blott (2.11).
- 48 timer etter lys ble cellelevabilitet målt med MTT-assay (2.10).

2.13 Statistisk vurdering av resultater

I alle forsøk er t-test benyttet for vurdering av forskjeller mellom gjennomsnittsverdier i to datasett. Programmet SigmaPlot 11.0 med integrert SigmaStat er benyttet som statistisk verktøy for alle data.

3 Resultater

3.1 Etablering av vekstkurver og tetthetskurver for ubehandlede celler

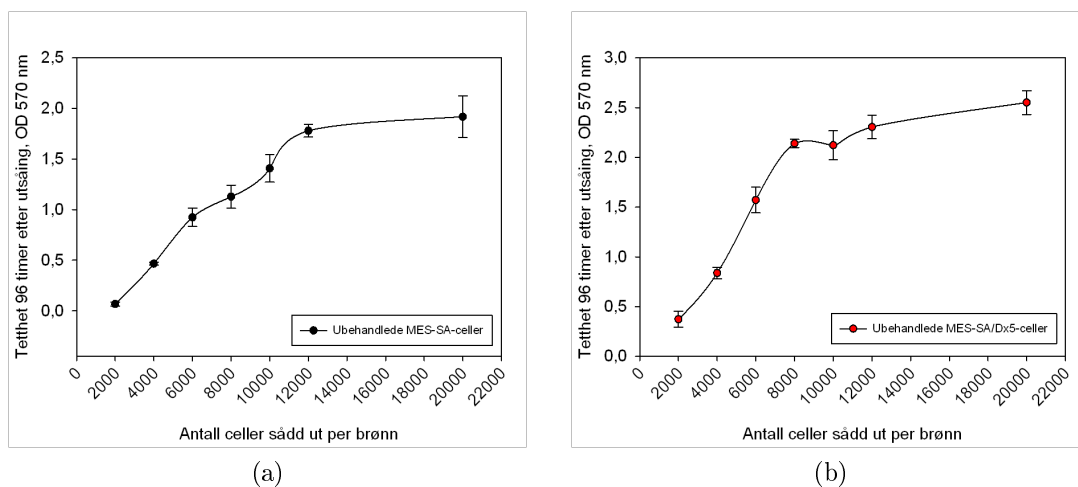
For ubehandlede celler ble det initielt etablert vekstkurver for å ha et bilde på veksthastighetsforskjeller mellom linjene. Tetthetskurver ble etablert for å bestemme et utsåingsantall for forsøkene. For at resultatene skal være representative fra gang til gang, er det viktig at cellene ikke blir konfluente i løpet av forsøkene. Celler som er konfluente har redusert veksthastighet og kan lettere dø.

3.1.1 Celletetthetskurver for MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler

Resultater fra tetthetsforsøk er vist i figur 14a og 14b. Tetthetsforsøket viser at MES-SA-cellene har en lineær vekst opptil 12 000 utsådde celler per brønn. Det betyr at cellene ikke blir konfluente ved disse utsåingskonsentrasjonene. Kurven flater ut etter 12 000 utsådde celler per brønn hvilket indikerer at brønnene blir for tette for optimale vekstbetingelser etter dette punktet. I videre forsøk ble det benyttet 6000 celler per brønn i 96-brønnersbrett.

Tetthetsforsøket for MES-SA/Dx5-cellene viser en lineær vekst opp til 8000 utsådde celler per brønn. MES-SA kan derfor vokse tettere enn MES-SA/Dx5, men for enkelthetsskyld settes utsåingsantallet likt for begge cellelinjer. I videre forsøk ble det derfor benyttet 6000 celler per brønn i 96-brønnersbrett da dette gir optimale måleverdier i MTT-assayet uten at cellene blir konfluente.

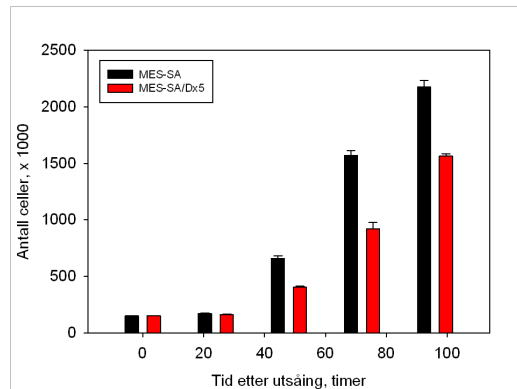
3 RESULTATER



Figur 14: *Celle tetthetskurver*: Optisk tetthet av a) MES-SA og b) MES-SA/Dx5 er plottet mot antall celler sådd ut per brønn i 96 brønnersbrett 96 timer før vitalitetsmåling med MTT. Resultatet er middelværdier av tre paralleller, og er et representativt resultat av tre forsøk. Standardavvik er tegnet inn.

3.1.2 Cellevekstkurver for MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler

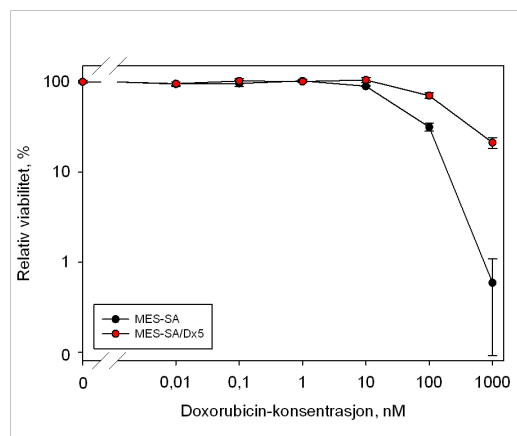
Resultater fra cellevekststudier er vist i figur 15. Veksforsøket viser eksponentiell vekst av begge cellelinjer 0 til 96 timer etter utsåing. Forsøket viser også at MES-SA deler seg raskere enn MES-SA/Dx5. Doblingstid ble for MES-SA estimert å være 28 timer, og for MES-SA/Dx5 35 timer.



Figur 15: *Cellevekst for ubehandlede MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler: Celleantall er plottet mot tid etter utsåing i 3001-brønner. Resultatet er middelverdier av tre paralleller, og er et representativt resultat fra tre forsøk målt med Coulter Counter. Standardavvik er tegnet inn.*

3.2 Doxorubicin-sensitivitet

Resultater av DOX-sensitivitet er vist i figur 16. MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler ble behandlet med ulike konsentrasjoner DOX (0 - 1000 nM) i 72 timer. Viabilitet målt med MTT-assay viste at MES-SA/Dx5-cellene var 36 ganger mindre sensitive for 1000 nM DOX enn moderlinjen MES-SA ($P = < 0,001$). Dette korrelerer med Harker *et al.s* og Selbo *et al.s* resultater fra 1985 og 2006 [4, 5].

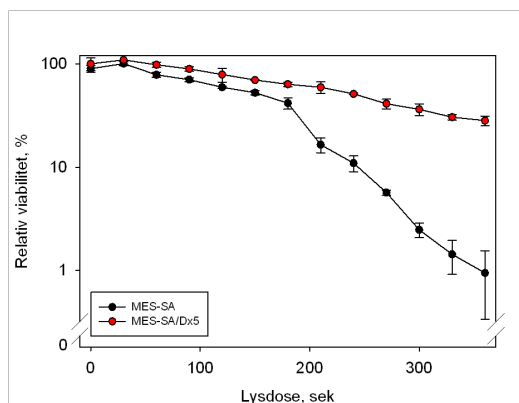


Figur 16: *Doxorubicin-sensitivitet i MES-SA og MES-SA/Dx5: Relativt viabilitet som funksjon av DOX-konsentrasjon. Resultatet er målt med MTT-assay. Standardavvik er tegnet inn.*

3.3 PDT og PCI med TPCS_{2a} og TPPS_{2a}

3.3.1 PDT med TPCS_{2a}

Resultatene etter PDT-behandling av MES-SA og MES-SA/Dx5 med $0,05 \mu\text{g/mL}$ TPCS_{2a} er vist i figur 17. Viabilitet (MTT) av celler behandlet med $0,05 \mu\text{g/mL}$ TPCS_{2a} -PDT er plottet som funksjon av lysdose i sekunder. Begge cellelinjer ble behandlet med TPCS_{2a} i 18 timer, og hadde en *chase*-periode på fire timer før belysning. PDT-behandlede MES-SA/Dx5-celler var signifikant mindre sensitive for behandlingen enn moderlinjen MES-SA. Ved 330 sekunder lys ble viabiliteten til MES-SA målt til å være ca 1/20 av viabiliteten i MES-SA/Dx5-cellene. Forskjell i viabilitet hadde ved dette punktet en P-verdi $< 0,001$.

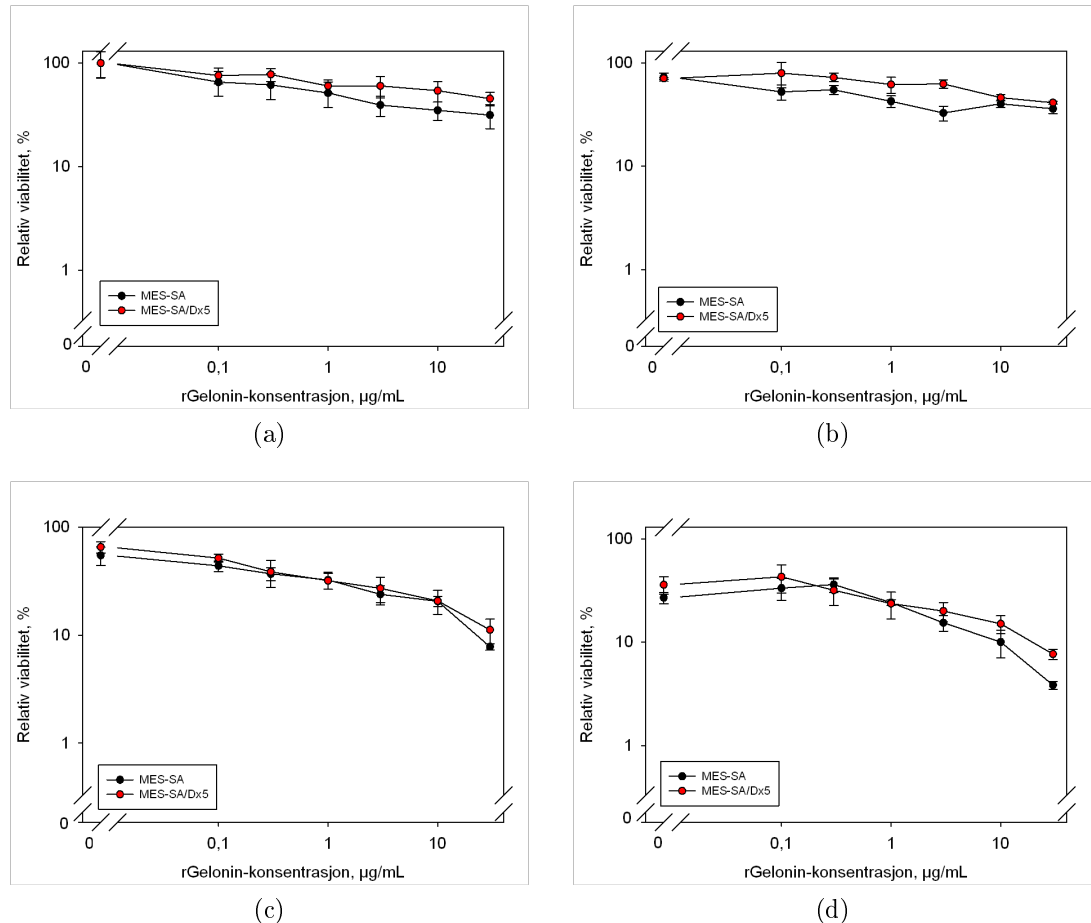


Figur 17: *Viabilitet etter TPCS_{2a} -PDT med økende lysdose i MES-SA og MES-SA/Dx5: Relativt viabilitet er plottet som funksjon av lysdose. Resultatene er middelerverdier basert på tre paralleller, og er et representativt resultat av tre forsøk. Standardavvik er tegnet inn.*

3.3.2 PCI med rGelonin og TPCS_{2a}

For PCI-behandlede MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler ble det initielt etablert konsentrasjonskurver med rGelonin alene og som makromolekyl i PCI (figur 18). Det ble benyttet ulike konsentrasjoner rGelonin (0 - $30 \mu\text{g/mL}$) og tre ulike lysdoser (0, 150 og 300 sekunder). I videre forsøk ble det benyttet $3 \mu\text{g/mL}$ rGelonin og 150 sekunder lys i 96-brønnersbrett. I 6-brønnersbrett

og 3001-skåler ble det benyttet 300 sekunder lys.



Figur 18: *Viabilitet ved økende rGelonin-konsentrasjon i MES-SA og MES-SA/Dx5: Grafen viser viabilitet som funksjon av a) økende rGelonin-konsentrasjon b) PCI med økende rGelonin-konsentrasjon ved 0 sekunder lys, c) PCI med økende rGelonin-konsentrasjon ved 150 sekunder lys, og d) PCI med økende rGelonin-konsentrasjon ved 300 sekunder lys. I alle PCI-grafene er 0,05 µg/mL TPCS_{2a} benyttet. Resultatene er middelerverdier basert på tre paralleller, og er et representativt resultat av tre forsøk. Standardavvik er tegnet inn.*

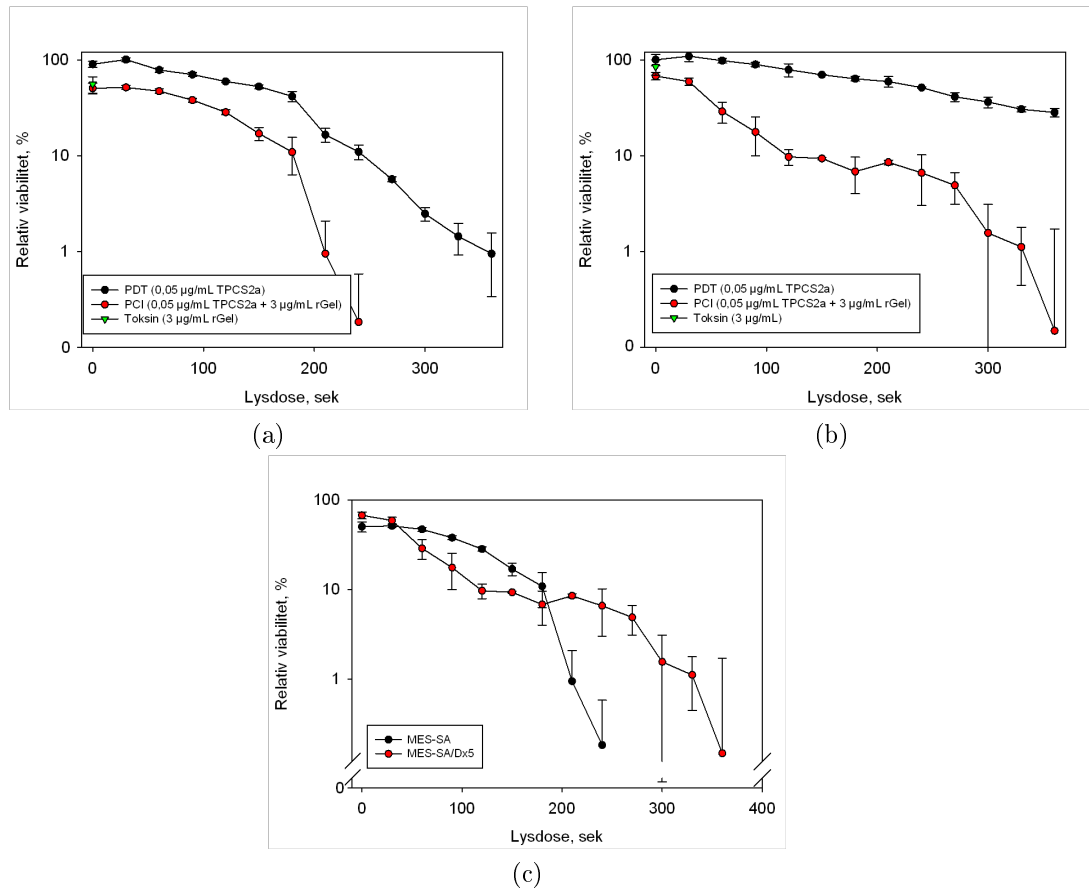
Resultatene fra PCI-behandling av rGelonin med TPCS_{2a} med økende lysdose er vist i figur 19 og er sammenliknet med PDT-effektene.

Ved en lysdose som i PDT gav ca 50 % drap i MES-SA, gav effekten av PCI en viabilitet på ca 17 % sammenliknet med ubehandlede celler. Forskjellene i dette punktet hadde P-verdi < 0,001. I MES-SA/Dx5 gav en PDT-dose

3 RESULTATER

som gav 50 % drap en PCI-effekt på ca 7 % overlevelse. P-verdi for forskjellene var $< 0,001$. Dette viser at PCI sammenliknet med PDT er mest effektiv i MES-SA/Dx5.

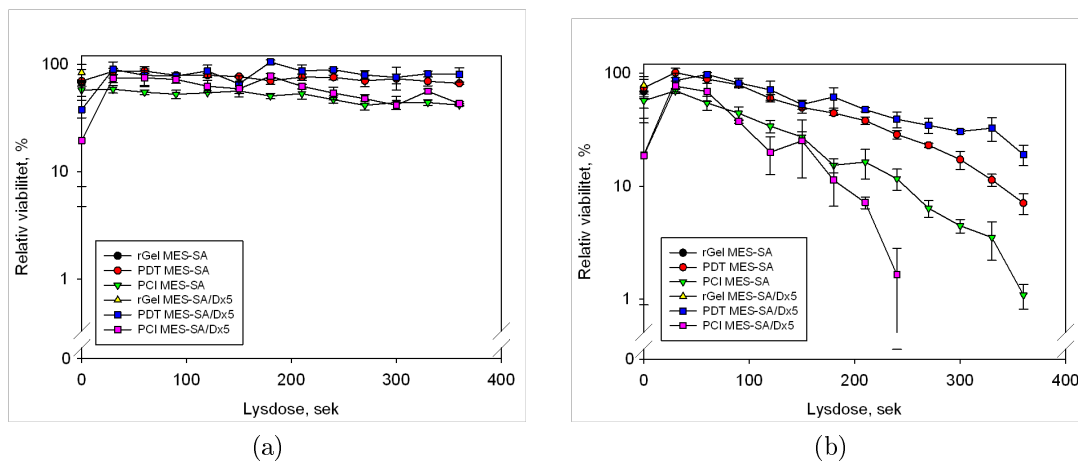
Sammenlikning av effekt av PCI i forhold til ubehandlede celler indikerte imidlertid i alle forsøk økt effekt i MES-SA ved tilstrekkelige lysdoser (< 210 sek) sammenliknet med MES-SA/Dx5. Forskjellen kunne imidlertid variere fra forsøk til forsøk. Den dramatiske forskjellen i figur 19c er ikke reprodusert. PCI sammenliknet med rGelonin-behandling var signifikant mer effektivt i MES-SA ($P < 0,05$) og MES-SA/Dx5 ($P < 0,05$) ved lysdoser over 60 sekunder, men det ble ikke vist signifikante forskjeller i effekt av rGelonin alene mellom cellelinjene.



Figur 19: *PDT og PCI med 0,05 µg/mL TPCS_{2a}, 3 µg/mL rGelonin og økende lysdose i MES-SA og MES-SA/Dx5: Relativ viabilitet etter a) PDT og PCI i MES-SA, b) PDT og PCI i MES-SA/Dx5, og c) PCI i MES-SA og MES-SA/Dx5 er plottet som funksjon av lysdose og målt med MTT-assay. Resultatene er middelverdier basert på tre paralleller, og er et representativt resultat av tre forsøk. Standardavvik er tegnet inn.*

3.3.3 PDT og PCI med TPPS_{2a}

Resultatene fra PDT-behandling med TPPS_{2a} i MES-SA og MES-SA/Dx5 er vist i figur 20. Celler behandlet med 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPPS_{2a}-PDT hadde ingen effekt på viabilitet ved noen lysdoser. Først ved konsentrasjoner fra 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPPS_{2a} ble effekt på viabilitet observert med PDT. Selbo *et al.* observerte noe sterkere effekt av 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPPS_{2a} enn observert i denne masteroppgaven [5]. PDT med TPPS_{2a} var, som vist av Selbo *et al.*, mest effektivt i MES-SA, mens effekt av PCI var relativt lik mellom cellelinjene [5]. Punktet som viser PCI med 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPPS_{2a} ved 0 sekunder lys i MES-SA/Dx5 er antageligvis feil.



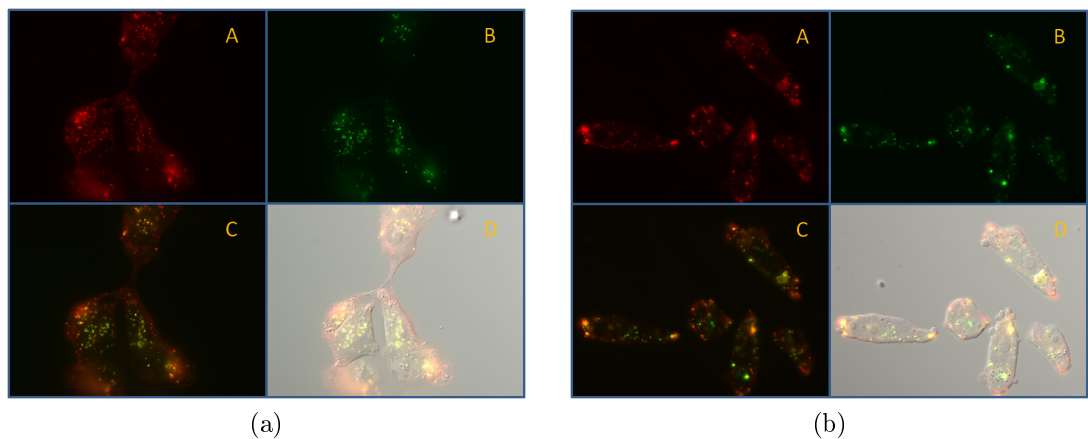
Figur 20: *PDT og PCI med TPPS_{2a} i MES-SA og MES-SA/Dx5: Viabiliteten etter behandling med a) 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og b) 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPPS_{2a} er plottet mot lysdosen, og målt med MTT. Resultatene er middelerverdier basert på tre paralleller, og er et resultat av ett forsøk. Standardavvik er tegnet inn*

3.4 Intracellulær lokalisering og opptak av fotosensitizer

3.4.1 Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}

TPCS_{2a} fluorescerer etter eksitering med synlig lys. Dette gjør det mulig å undersøke intracellulær lokalisering med fluorescensmikroskopi. Cellene ble inkubert med 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCS_{2a} i 18 timer og studert 4 timer etter *chase*. 20 minutter før mikroskopering ble cellene inkubert med LysoTrackerGreen®.

Resultatene fra fluorescensmikroskopering med TPCS_{2a} er vist i figur 21. Granulær, intracellulær fluorescens fra TPCS_{2a} ble observert i begge cellelinjer. Bilder som var tatt etter inkubering av cellene med LysoTrackerGreen®[®], som lokaliseres til endocytotiske vesikler, viste også en sterk, granulær, intracellulær fluorescens. Fluorescensen fra TPCS_{2a} og LysoTrackerGreen®[®] var delvis overlappende i begge cellelinjer. Distribusjonen av den granulære fluorescensen ble imidlertid vist å være noe ulik mellom cellelinjene, der MES-SA indikerte lokalisering i små vesikler, mens MES-SA/Dx5 indikerte lokalisering i større. I ubehandlede celler ble det ikke detektert fluorescens ved benyttet eksponeringstid, og det ble kontrollert for at filtrene kun slapp gjennom lys fra sine respektive fluorokromer.



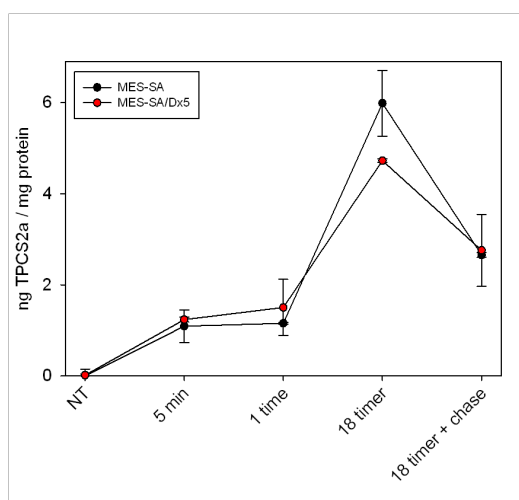
Figur 21: *Fasekontrast- og fluorescensbilder av TPCS_{2a} i MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler: Bildene viser A TPCS_{2a} -fluorescens, B LysoTrackerGreen®-fluorescens, C et fusjonert bilde av TPCS_{2a} -fluorescens og LysoTrackerGreen®-fluorescens, og D et fusjonert bilde av TPCS_{2a} - og LysoTrackerGreen®-fluorescens sammen med fasekontrast i a) MES-SA og b) MES-SA/Dx5. Det er benyttet 40x objektiv sammen med 2,5x supplerende forstørrelse.*

3.4.2 Opptak av TPCS_{2a}

Resultater av opptaksstudier av $0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$ TPCS_{2a} i MES-SA og MES-SA/Dx5 er vist i figur 22. Det var et raskt opptak av TPCS_{2a} i løpet av de første 5 minuttene i begge cellelinjer (MES-SA: $13,1 \text{ ng } \text{TPCS}_{2a}/\text{mg}$ pro-

3 RESULTATER

tein/time, MES-SA/Dx5: 14,8 ng TPCS_{2a}/mg protein/time). Hastigheten av opptak minket etter dette. Opptaket mellom 1 og 18 timer hadde en hastighet på 0,28 ng TPCS_{2a}/mg protein/time i MES-SA, og 0,19 ng TPCS_{2a}/mg protein/time i MES-SA/Dx5. TPCS_{2a}-akkumulering mellom cellelinjene etter 18 timer + *chase* viste ingen signifikant forskjell.



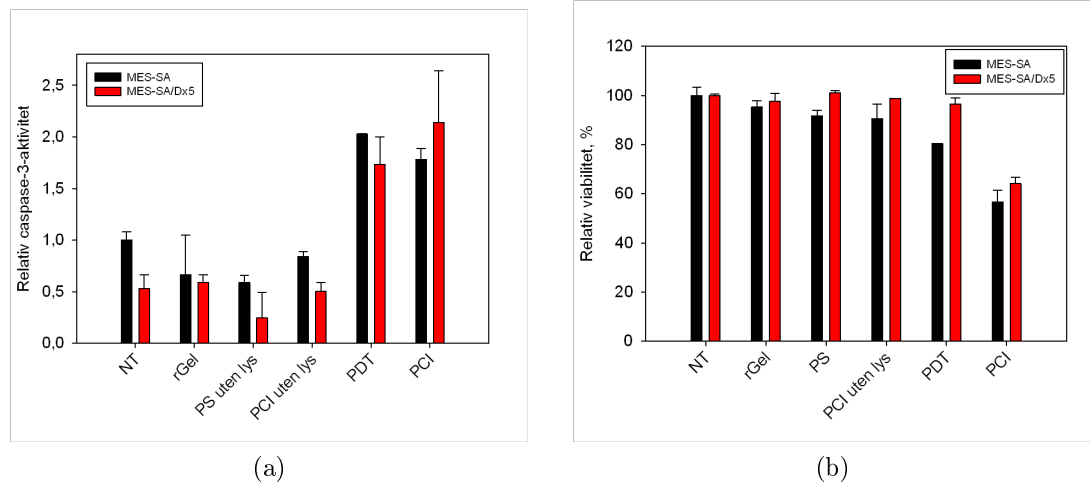
Figur 22: **TPCS_{2a}-opptak:** Opptak av TPCS_{2a}, målt per mg protein, i MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler som funksjon av inkubasjonstid med TPCS_{2a}. Ubehandlede (NT) celler er tegnet inn. Resultatet er middelerverdier av to paralleller, og er et representativt resultat fra tre forsøk målt med fluorospektrometer. Standardavvik er tegnet inn.

3.5 Analyser av proteinuttrykk

3.5.1 Caspase-3

Caspase-3-aktivitet ble forsøkt målt med SDS-PAGE, Western blott og immun-deteksjon, men gav ingen målbare resultater. Et sensitivt caspase-3-kit ble derfor benyttet. Resultater av caspase-3-aktivitet 24 timer etter PDT og PCI er vist i figur 23. Etter PDT- og PCI-behandling med 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCS_{2a} og 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rGelonin ved 300 sek lys ble caspase-3-aktivitet målt med fluorometer. I to av tre forsøk viste resultatene en økning i caspase-3-aktivitet ved PDT- og PCI-behandling i begge cellelinjer, men ingen forskjell mellom behandlingene. PDT- og PCI-behandling indikerte en dobling av

caspase-3-aktivitet sammenliknet med ubehandlede MES-SA-celler, og 3,5 ganger økning sammenliknet med ubehandlede MES-SA/Dx5-celler.



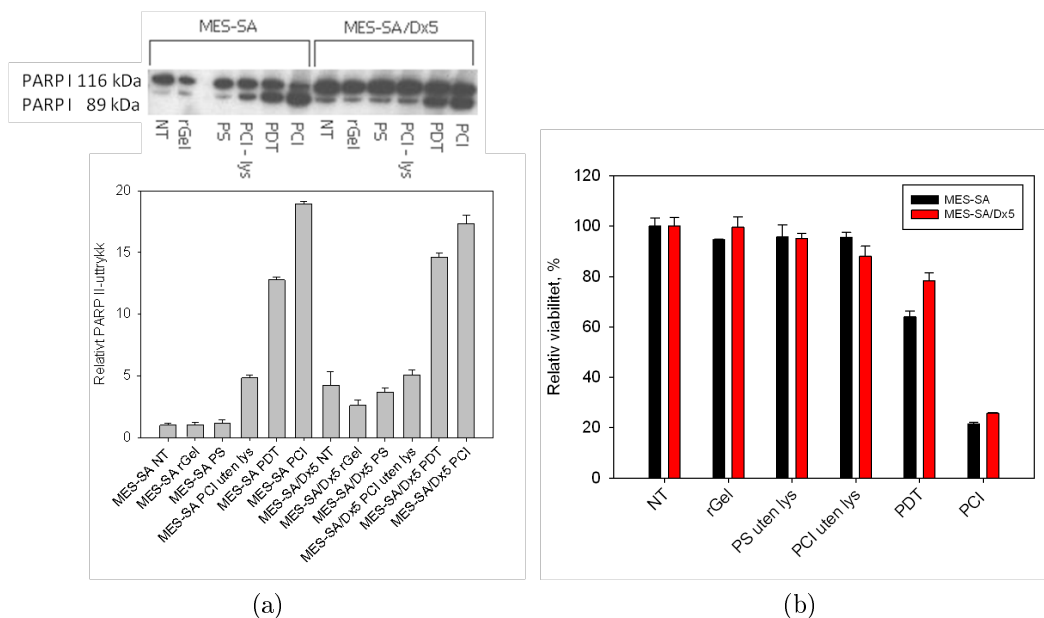
Figur 23: *Caspaseaktivitet 24 timer etter PDT og PCI i MES-SA og MES-SA/Dx5: a) viser relativ caspase-3-aktivitet i ubehandlede (NT), rGelolin-behandlede (rGel), TPCS_{2a} uten lys-behandlede (PS), PCI uten lys-behandlede, PDT-behandlede og PCI-behandlede celler. b) viser viabilitet målt med MTT 48 timer etter behandling. Resultatene er snitt av to paralleller og grafene er representative for 2 av 3 forsøk. Standardavvik er tegnet inn.*

3.5.2 PARP

Resultater av Western blott av poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-kløyving er vist i figur 24. Mellom 18 og 20 timer etter belysning ble ubehandlede og PDT- og PCI-behandlede MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler høstet. Det ble observert signifikant sterkere PARP II-uttrykk i både PDT- og PCI-behandlede celler sammenliknet med ubehandlede (NT) celler ($P < 0,001$). I MES-SA var det en forskjell på ca 12 ganger mellom PDT-behandlede og ubehandlede celler, og ca 19 ganger mellom PCI-behandlede og ubehandlede celler. I MES-SA/Dx5 var denne forskjellen henholdsvis ca 3,5 ganger og 4 ganger. I MES-SA-celler viste denne forskjellen 1,5 ganger sterkere PARP-II-uttrykk ved PDT sammenliknet med PCI ($P < 0,001$). I MES-SA/Dx5 var denne forskjellen 1,2 ($P = 0,003$). MES-SA/Dx5 ble imidlertid observert

3 RESULTATER

å ha et sterkere basaluttrykk av PARP II (ca 4 ganger), sammenliknet med MES-SA (P = 0,007).

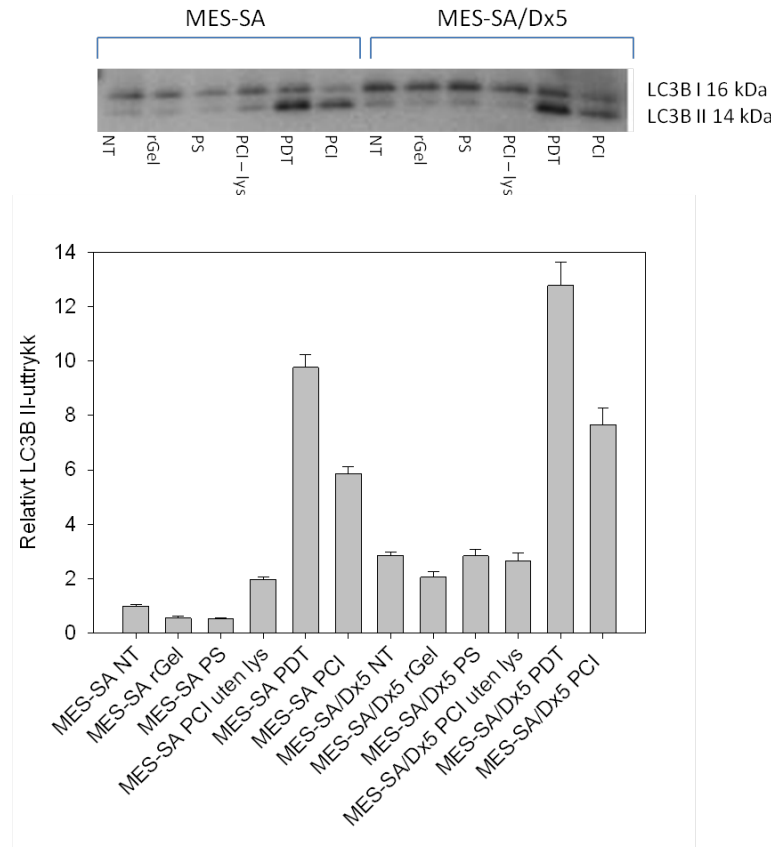


Figur 24: **Kløyving av PARP etter PDT og PCI i MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler:** Figuren viser i a) blott av PARP I og PARP II i MES-SA og MES-SA/Dx5 for ubehandlede (NT), TPCS_{2a}-behandlede (PS), TPCS_{2a}- og rGelonin-behandlede (PCI - lys), PDT-behandlede og PCI-behandlede celler 18-20 timer etter lys. Nedenfor blottet er PARP II-quantifisering vist, normalisert mot ubehandlede MES-SA-celler. Blottet er et representativt resultat fra tre forsøk. I b) vises viabilitet målt med MTT 48 timer etter behandling. Resultatet er et representativt blott fra tre forsøk. Standardavvik er tegnet inn.

3.5.3 LC3

Mellom 18 og 20 timer etter belysning ble PDT- og PCI-behandlede MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler høstet, og lett-kjede 3B (LC3B)-kløyvning målt med SDS-PAGE, Western blotting og immunteteksjon. Det ble observert signifikant sterkere LC3B II-uttrykk i både PDT- og PCI-behandlede celler sammenliknet med ubehandlede (NT) i begge cellelinjer (P < 0,001). I MES-SA-celler var forskjellen mellom PDT-behandlede og ubehandlede celler ca 10 ganger, mens det mellom PCI-behandlede og ubehandlede celler var ca 6 ganger. Tilsvarende for MES-SA/Dx5 var henholdsvis ca 4,5 og 2,5 ganger.

MES-SA/Dx5 ble imidlertid observert å ha et sterkere basaluttrykk av LC3B II (ca 2,8 ganger), sammenliknet med MES-SA ($P < 0,001$).



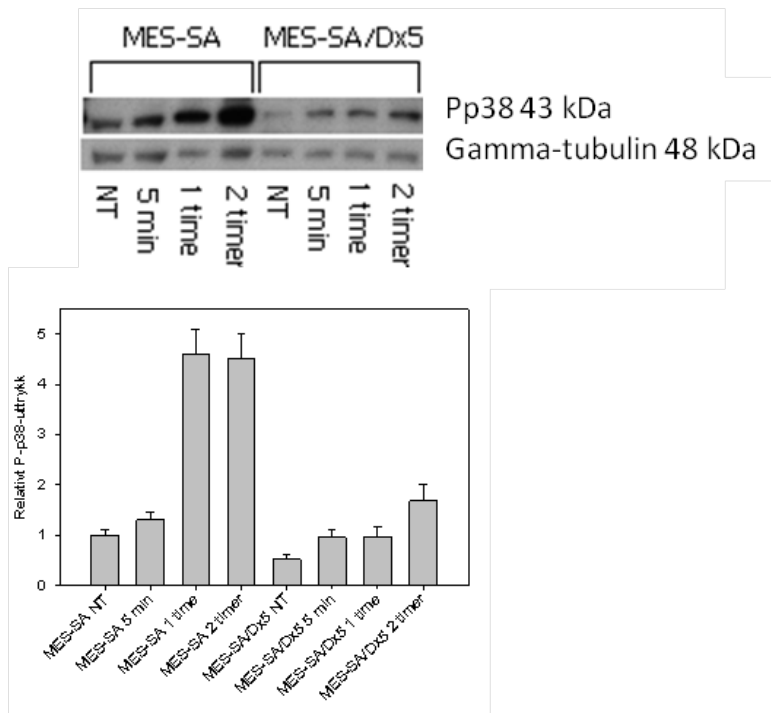
Figur 25: **Kløyving av LC3B etter PDT og PCI i MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler:** Figuren viser blott av LC3B-kløyving i MES-SA og MES-SA/Dx5 for ubehandlede (NT), TPCS_{2a}-behandlede (PS), TPCS_{2a}- og rGelonin-behandlede (PCI - lys), PDT-behandlede og PCI-behandlede celler 18-20 timer etter lys. Nedenfor blottet er LC3B II-quantifisering vist, normalisert mot ubehandlede MES-SA-celler. Blottet er et representativt resultat fra tre forsøk. Viabilitet målt med MTT 48 timer etter behandling er vist i figur 24 sammen med PARP-kløyving. Resultatet er et representativt blott fra tre forsøk. Standardavvik er tegnet inn.

3.5.4 Fosforylering av p38

Pp38 i MES-SA og MES-SA/Dx5 Resultater av Western blott av p38-fosforylering er vist i figur 26. Ubehandlede og PDT-behandlede MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler ble høstet 5 minutter, 1 time og 2 timer etter lys. Økt

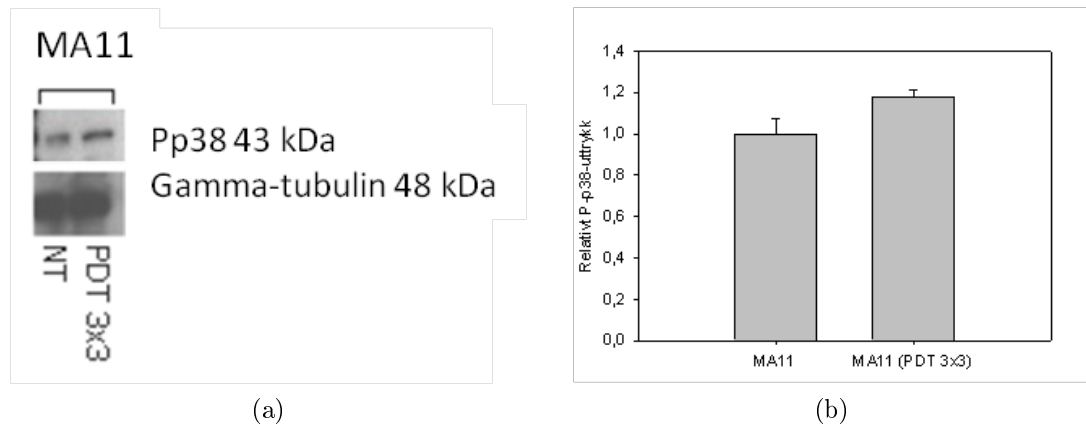
3 RESULTATER

p38-fosforylering ble observert 5 minutter etter PDT i begge celledinjer, og fosforyleringen økte 4,5 ganger for MES-SA ($P < 0,001$) og 3 ganger for MES-SA/Dx5 ($P = 0,004$) i forhold til ubehandlede prøver ved 2 timer. Fosforylert p38 i MES-SA var ca 2,5 ganger høyere enn for MES-SA/Dx5 2 timer etter PDT ($P = 0,001$). MES-SA ble observert å ha et sterkere basaluttrykk av Pp38 (ca 2 ganger), sammenliknet med MES-SA/Dx5 ($P = 0,004$).



Figur 26: **Aktivering av p38 etter PDT i MES-SA og MES-SA/Dx5:** Blottet viser Pp38-uttrykk i MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler 5 minutter, 1 time og 2 timer etter lys, og kvantifisering av Pp38 normalisert til total protein med gamma-tubulin, presentert som relative verdier i forhold til ubehandlede MES-SA-celler. Blottet er et resultat fra ett slikt forsøk.

Pp38 i MA11 Resultater av Western blott av p38-fosforylering i MA11 er vist i figur 27. Ubehandlete MA11-celler og PDT-resistente MA11-celler etter behandling med 3 x 3 minutter PDT ble høstet uten behandling. Det ble ikke funnet økning i p38-fosforylering i MA11-celler sammenliknet med PDT-resistente MA11-celler.



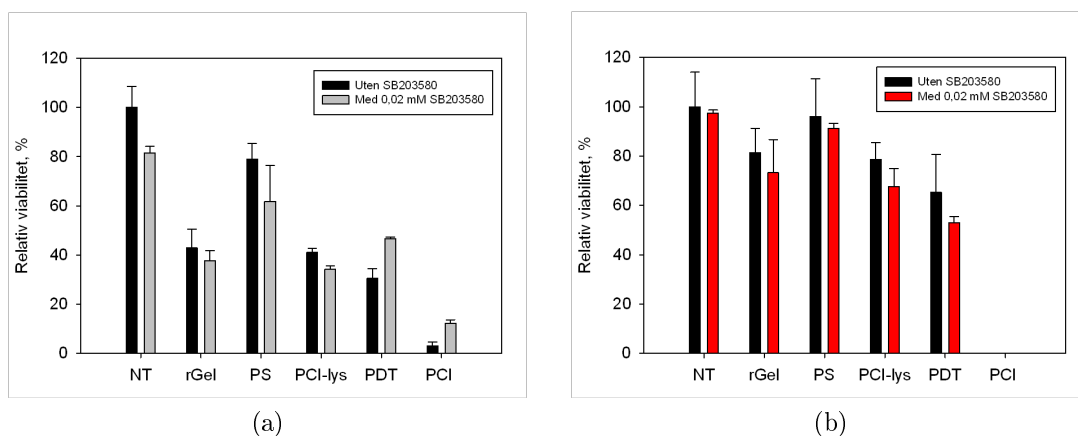
Figur 27: *Fosforylering av p38 i MA11-celler og PDT-resistente MA11-celler: Grafen viser a) Western blott av p38-fosforylering i brystcancerlinjene MA11 og PDT-resistent MA11, og b) kvantifisering av Pp38 normalisert til totalt protein (gamma-tubulin), presentert som relative verdier. Standardavvik er tegnet inn. Blottet er et resultat av ett slikt forsøk.*

3.6 Cellulær viabilitet ved behandling med inhibitorer

3.6.1 SB203580

Fosforylert p38s evne til å fosforylere og aktivere MAPKAPK-2 etter PDT og PCI ble i denne studien hemmet ved å bruke inhibitoren 4-(4-fluorofenyl)-2-(4-metylsulfinylfenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazol (SB203580) (figur 28). 0,02 mM SB203580 ble tilsatt to timer før og vasket vekk to - tre timer etter 150 sekunder lyseksponering. SB203580 økte overlevelsen i PDT-behandlede MES-SA-celler fra 30 % til 45 % ($P = 0,002$). I PCI-behandlede MES-SA-celler økte overlevelsen fra 3 % til 12 % ($P = 0,002$). Ingen økning i overlevelse ble observert når SB203580 ble administrert til PDT- eller PCI-behandlede MES-SA/Dx5.

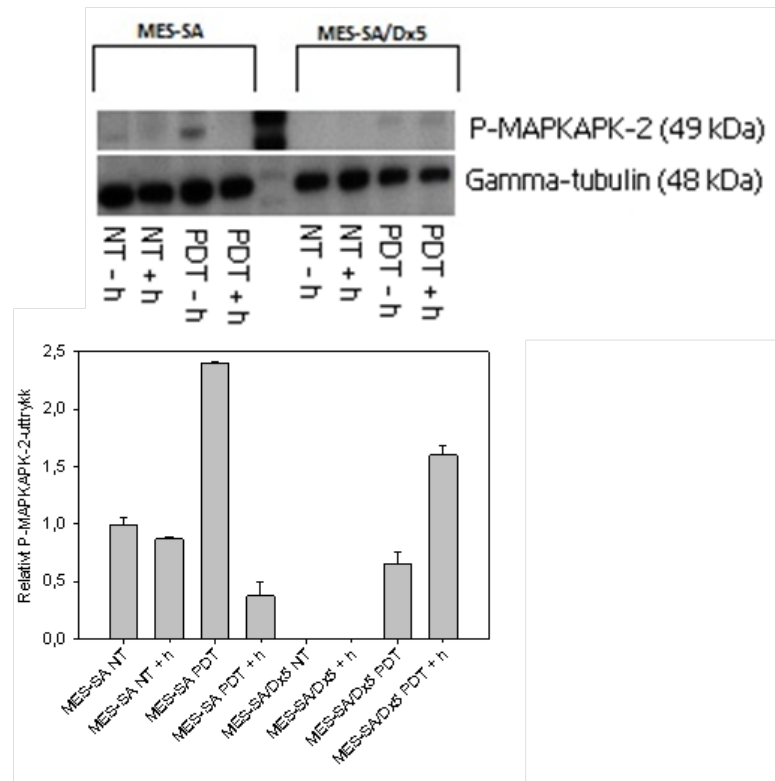
3 RESULTATER



Figur 28: *Viabilitet etter inhibering av Pp38*: Grafen viser effekt av inhibering av fosforylert p38 med SB203580 i a) MES-SA- og b) MES-SA/Dx5-celler. Resultatet er middelverdier fra tre paralleller, og er et representativt resultat fra tre forsøk. Standardavvik er tegnet inn. Resultatet er målt med MTT-assay.

Kontroll på inhibering med SB203580 - Fosforylering av MAPKAPK-2

Ubehandlede og PDT-behandlede MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler ble behandlet med 0 eller 0,02 mM SB203580 fra 2 timer før lys til 2 - 3 timer etter, og høstet som beskrevet i prosedyre for prøveopparbeidelse for SDS-PAGE. Fosforylert MAPKAPK-2, P-MAPKAPK-2, som er et substrat for p38, ble målt ved hjelp av SDS-PAGE, Western blotting og immunteteksjon. Resultatene viser at fosforylering av MAPKAPK-2 er oppregulert 2,4 ganger i PDT-behandlede MES-SA-celler sammenliknet med ubehandlede ($P < 0,001$), og at hemmeren SB203580 nedregulerer fosforyleringen til ca 1/6 ($P < 0,001$) (figur 29). Inhiberingen korrelerer med den relative overlevelsen ved PDT-behandling (28a og 28b). Det ble også observert signifikant fosforylering av MAPKAPK-2 i PDT-behandlet MES-SA/Dx5 ($P < 0,001$), men fosforyleringen var ca 1/4 av fosforyleringen av i PDT-behandlede MES-SA. Ingen minking i P-MAPKAPK-2 etter behandling med inhibitor ble observert. Det ble imidlertid observert en 2,4 ganger økning ($P < 0,001$). Dette er ikke reproduisert.



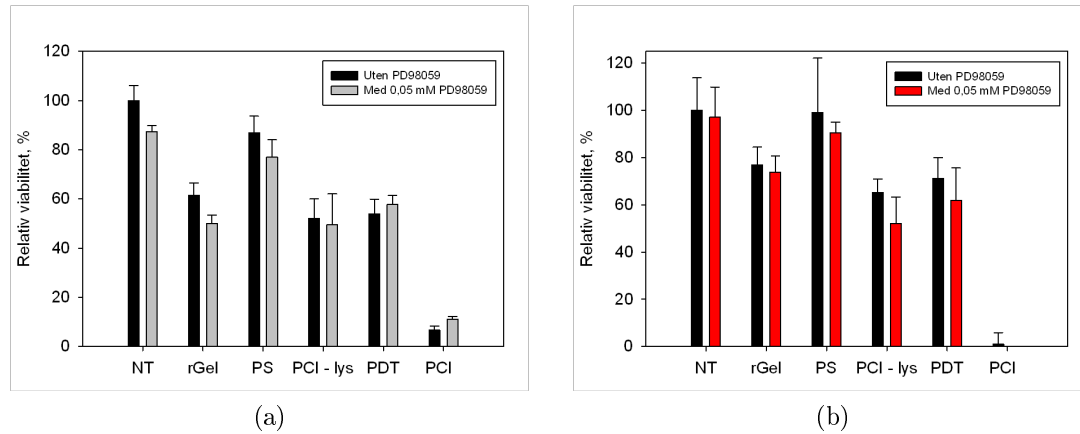
Figur 29: *MAPKAPK-2*-fosforylering i *MES-SA* og *MES-SA/Dx5*: Figurene viser *P-MAPKAPK-2*-uttrykk i ubehandlede og PDT-behandlede celler (NT og PDT) uten og med SB203580 (- h og + h), og kvantifisering av *P-MAPKAPK-2* normalisert til totalt protein med gamma-tubulin, relativt til ubehandlede *MES-SA*-celler. Standardavvik er tegnet inn. Blottet er et resultat av ett slikt forsøk .

3.6.2 PD98059

MEKs evne til å fosforylere og aktivere ekstracellulær signalregulert kinase (ERK) etter PDT og PCI ble i denne studien hemmet ved å bruke inhibitoren PD98059 (figur 30). 0,05 mM PD98059 ble tilsatt to timer før og vasket vekk to - tre timer etter 150 sekunder lyseksponering. I PCI-behandlede *MES-SA*-celler ble det observert en svak økning i viabilitet der inhibitor var tilsatt ($P = 0,023$). Resultatene er imidlertid ikke reproduisert. Det ble ikke observert signifikante forskjeller i viabilitet for PDT-behandlede *MES-SA*-celler og PDT- og PCI-behandlede *MES-SA/Dx5*-celler eksponert for PD98059 sammenliknet med celler uten hemmer. I ubehandlede *MES-SA*-celler ble det

3 RESULTATER

imidlertid vist at inhibitoren forårsaker 10 % toksisitet alene ($P = 0,028$).



Figur 30: *Viabilitet etter inhibering av ERK: Grafen viser effekt av inhibering av ERK via MEK med PD98059 i a) MES-SA og b) MES-SA/Dx5-celler. Resultatet er middelverdier av tre paralleller i ett prelimenært forsøk. Standardavvik er tegnet inn. Resultatet er målt med MTT-assay.*

3.6.3 3-MA

MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler ble behandlet med 30 mM 3-MA (autofagi-inhibitor *via* LC3B) fra 30 minutter før lys til 24 timer etter lys. Det ble ikke observert målbare resultater da 3-MA viste seg å være svært toksisk for cellene (figur ikke vist).

4 Diskusjon

4.1 Diskusjon av resultater

For å omgå eller oppheve resistensmekanismer i dagens etablerte cancerbehandling er det et behov for bedre kjennskap til hvilke mekanismer som står bak resistensen. Dette kan gjøre at nye og bedre terapeutiske metoder utvikles. PCI av makromolekylære terapeutiske forbindelser er en relativt ny strategi som er vist å drepe MDR-cancerceller. Denne oppgaven viser at nedregulering av p38-signalveien i den DOX-resistente cellelinjen MES-SA/Dx5 bidrar til en PGP-uavhengig resistensmekanisme mot TPCS_{2a}-PDT. Til tross for at PCI bygger på PDT-prinsippet, er det i denne masteroppgaven vist at PCI kan omgå denne PDT-resistensen.

Effekt av og resistens mot TPPS_{2a} og TPCS_{2a}

PDT med TPCS_{2a} er ikke tidligere undersøkt i MES-SA og MES-SA/Dx5, men effekten av modersubstansen, TPPS_{2a}, har blitt studert i disse sarcomacellelinjene av Selbo *et al.* [5]. Det ble da vist at den DOX-resistente MES-SA/Dx5-linjen er kryssresistent mot TPPS_{2a}-PDT. Da TPCS_{2a} er strukturelt svært lik TPPS_{2a} var det nærliggende å anta tilsvarende resistens mot denne. PGP er vist å stå bak DOX-resistensen i MES-SA/Dx5, men kan ikke forklare PDT-resistensen med hverken TPPS_{2a} eller TPCS_{2a} som fotosensitizer siden opptaket av disse ved belysningstidspunktet er likt i begge linjene (figur 22) [5]. Det er også nærliggende å anta at mekanismen bak DOX-resistensen kan henge sammen med mekanismen bak PDT-resistensen. DOX er vist å generere ROS, og det er tidligere blitt vist at DOX-resistente myelogene leukemi-celler også er resistente mot strålingsindusert ROS [49, 68]. I denne masteroppgaven ble det observert at MES-SA/Dx5 er 36 ganger mindre sensitiv for 1000 nM DOX enn moderlinjen (figur 16), og at denne lave sensitiviteten korrelerer med TPPS_{2a}-PDT-resistensen vist av Selbo *et al.* Selbo *et al.* har imidlertid også vist at PGP, som er ansvarlig for resistensen mot DOX, ikke kan forklare PDT-insensitiviteten i MES-SA/Dx5 [5].

PDT med TPCS_{2a} viste seg i denne masteroppgaven å være en effektiv

behandlingsform i MES-SA-celler (figur 17). Tilsvarende effekter med andre fotosensitizere er vist i flere andre studier på disse cellene [69, 70]. MES-SA/Dx5 ble, som forventet, vist å være resistent mot både PDT-behandling med fotosensitizeren TPCS_{2a} (figur 17) og TPPS_{2a} (figur 20). Slike resultater er også indikert for ALA-indusert PpIX i MES-SA/Dx5 av Chu *et al.* [71]. I denne masteroppgaven krevdes det over dobbelt så høy konsentrasjon av TPPS_{2a} som TPCS_{2a} for å oppnå effekt ved de samme lysdosene. Mekanismene bak den store forskjellen i toksisitet kan henge sammen med de konformasjonelle forskjellene i fotosensitizerene. Den romlige strukturen til TPCS_{2a} gjør at man, i tillegg til andre fluorescerende egenskaper, kan forvente en annen mobilitet av elektronene [32]. Aggregeringstypen kan dermed være forskjellig fra den som opptrer i TPPS_{2a}, og føre til forskjeller i reaktivitet [33]. Det er derfor nærliggende å anta at dette kan påvirke genereringen av ROS .

Aktiviteten av ABCG2 i enkelte kreftceller kan forklare at noen tumorer har medfødt eller ervervet resistens mot en rekke anticancerterapeutika inkludert PDT med fotosensitizere som ALA-indusert PpIX og BPD [72]. Opptaksstudier utført av Chu *et al.* i 2012 viste at det cellulære opptaket av PpIX var lavere i MES-SA/Dx5 enn i MES-SA, 24 og 32 timer etter behandling [71].

Lokalisering og opptak av TPCS_{2a}

Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a} i MES-SA og MES-SA/Dx5 ble undersøkt da fotosensitizereffekten har en begrenset rekkevidde, og forskjeller i lokalisering kan forklare forskjeller i PDT-mediert toksisitet. Det ble ikke observert forskjeller i TPCS_{2a}-lokalisering mellom cellelinjene før lysbehandling. Resultater som viste overlapp mellom LysoTrackerGreen® og TPCS_{2a} (figur 21) bekreftet lokalisering til endocytotiske vesikler, da LysoTrackerGreen® har spesifikk lokalisering i disse. Man kan konkludere med at TPCS_{2a} penetrerer inn i cellulære membraner i disse endolysosomene og utøver sin effekt der. Resultatene korrelerer med observasjoner av andre amfile fotosensitizeres lokalisering (TPPS_{2a} og AlPcS_{2a}), men kan ikke fork-

lare TPCS_{2a}-PDT-resistensen i MES-SA/Dx5 observert her [73]. Resultatene kunne imidlertid indikere en forskjell i type vesikler TPCS_{2a} lokaliseres i. I MES-SA kunne vesiklene synes å være mindre enn vesiklene observert i MES-SA/Dx5. Dette ble ikke studert nærmere. Eventuell forskjell i relokalisering av fotosensitizeren mellom cellelinjene etter lys ble heller ikke studert og kan derfor ikke utelukkes som resistensmekanisme.

Opptaksstudiene i denne masteroppgaven viste ingen signifikante forskjeller i TPCS_{2a}-opptak mellom cellelinjene (figur 22). Opptaket korrelerer i tillegg med studier som viser at TPCS_{2a}, sammen med TPPS_{2a}, ikke er substrater av BCRP i ABCG2-familien [72]. Dette kan forklares med forbindelsenes amfifile egenskaper, siden ABCG2 først og fremst transporterer ikke-amfifile substrater [72].

Effekt av PCI med TPCS_{2a}

Da Lou *et al.* reverserte MDR-fenotypen i den DOX-resistente brystcancerlinjen MCF-7/ADR med PCI av DOX med fotosensitizeren TPPS_{2a}, antok man at PCI var en lovende metode for å slå ned MDR-resistens [74]. Her var PSS, som baserer seg på at basiske legemidler protoneres og fanges i sure vesikler (1.1.1), den dominerende resistensmekanismen [5]. I motsetning til MCF-7/ADR-cellene akkumuleres ikke DOX i MES-SA og MES-SA/Dx5 etter PSS-modellen, og det har blitt vist at PCI av DOX i MES-SA og MES-SA/Dx5 er ineffektivt [3, 5]. I 2006 ble det imidlertid indikert at TPPS_{2a}-PCI av toksinet rGelonin kunne omgå mekanismene bak den DOX-induserte PDT-resistensen i MES-SA/Dx5 [5]. rGelonin tas opp ved endocytose [30].

Til tross for den ervervede kryssresistensen mot TPPS_{2a}- og TPCS_{2a}-PDT i MES-SA/Dx5 ble det, i denne masteroppgaven, vist at PCI av rGelonin med fotosensitizeren TPCS_{2a} også omgikk resistensen (figur 19b). Dette er generelt overraskende resultater da PCI bygger på PDT-prinsippet og da det ikke ble vist signifikante forskjeller i effekt av rGelonin alene (0,1 - 30 mg/mL) mellom cellelinjene (figur 18a). En mulig forklaring kan være at toksisiteten av PCI først og fremst er mediert av rGelonin. Siden det kreves få internaliserte molekyler for å drepe en celle kan det tenkes at PCI-effekten

sammenliknet med toksinet alene er relativt lik i de to cellelinjene, selv om PDT-sensitiviteten er forskjellig. Dersom man sammenlikner PCI-effekten med PDT, er PCI mer effektivt i MES-SA/Dx5 enn i MES-SA med TPCS_{2a}.

Effekt på apoptose

Resultatene i denne masteroppgaven indikerte oppregulering av caspase-3 i MES-SA og MES-SA/Dx5 ved behandling med PDT og PCI, og viste at de to behandlingene gav et apoptotisk signal i cellelinjene (figur 23a). Det ble imidlertid ikke observert signifikante forskjeller mellom cellelinjene med hensyn på caspase-3. Ingen ytterligere økning av caspase-3 ved PCI i forhold til PDT indikerte at det i tillegg foreligger en annen mekanisme for celledrap ved denne behandlingen. På en annen side viste resultatene ulik farmakologi med hensyn på PARP etter PCI i de to linjene.

PARP-kløyving, som i denne studien ble observert mellom 18 og 20 timer etter lys (figur 24), er også vist å være induert i flere cellelinjer som følge av PDT-behandling [75, 76]. PARP-kløyving, som skyldes caspase-3, og kjernekonkondensering har tidligere blitt observert etter PDT med TPCS_{2a} i ZR-75-celler [77]. Apoptoseassosiert caspase-3-aktivitet har også i ZR-75-celler blitt observert etter PDT med den samme fotosensitizeren [77]. I denne masteroppgaven ble det, i tillegg som vist av Faraj *et al.*, imidlertid også vist å være en forskjell i grad av PARP-kløyving mellom cellelinjene, der MES-SA kløyvet mer PARP ved PDT (12 ganger) og PCI (19 ganger) sammenliknet med ubehandlede celler, enn det som ble vist i MES-SA/Dx5 (3,5 og 4 ganger). Resultatene fra PARP-kløyvingen viste at MES-SA/Dx5 har en mindre uttalt apoptosesignalerings *via* caspase-3 ved PDT- og PCI-behandling med TPCS_{2a} enn MES-SA. Dette er forventet for PDT. En interessant observasjon er at PARP ble vist å øke ytterligere for PCI i forhold til PDT, spesielt i MES-SA. Dette ble ikke vist for caspase-3, til tross for at caspase-3 ligger oppstrøms for PARP. En mindre forskjell i PARP-uttrykk mellom PDT- og PCI-behandling i MES-SA/Dx5 indikerte at en annen mekanisme enn apoptose står bak det dramatiske celledrapet ved PCI-behandlingen. Basaluttrykket av PARP var imidlertid generelt høyere i MES-SA/Dx5. Disse

resultatene korrelerer med resistensen mot PDT-behandling i MES-SA/Dx5. Resultatene forklarer imidlertid ikke at MES-SA/Dx5 er like sensitiv for PCI, i forhold til ubehandlede celler, som moderlinjen. Ingen observerte forskjeller i caspase-3 mellom MES-SA og MES-SA/Dx5, kunne indikere at en defekt i apoptose-signaleringsen mellom caspase-3 og PARP er ansvarlig for PDT-resistensen.

At resultatene kun indikerte oppregulering av caspase-3 i to av tre forsøk i PDT- og PCI-behandlede celler kan skyldes den omstendige høsteprosessen for EnzChek Caspase-3 Assay Kit #1, og det faktum at det kun ble benyttet to paralleller i hvert forsøk.

Induksjon av apoptose er tidligere vist å avhenge av hvilken fotosensitizer som benyttes og type celler [36]. Som andre triggere av apoptose, aktiverer PDT caspase-signalveien gjennom kløyving av flere proteiner [36]. Cytokrom c kan frigjøres fra mitokondriene og binde til APAF-1 og procaspase-9 slik at resten av caspase-kaskaden aktiveres [36]. Apoptose ved HpD-PDT er for ASTC-a-1-celler vist å være hovedsakelig gjennom den mitokondrielle (*intrinsic*) signalveien, og være initiert av caspase-9 [78]. Frigjøringen av cytokrom c fra mitokondriene er da forårsaket av direkte skade på mitokondriene, men indirekte aktivering *via* stimulering av Fas-reseptoren er også blitt dokumentert [36]. PDT-skader på lysosomer er vist å kunne frigjøre lysosomlokalisert cathepsin, som dermed kan aktivere caspase-3 [36]. Flere studier har imidlertid foreslått at cathepsin i stedet kløyver og aktiverer bcl-2-proteiner som binder til mitokondriene og frigjør cytokrom c [36, 79, 80]. Da TPCS_{2a} er en fotosensitizer med affinitet til lysosomer, kan man tenke seg at den aktiverer cytokrom c-frigjøringen på denne måten.

Effekter på autofagi

Induksjon av autofagi er et vanlig utfall etter PDT, og kan inntreffe i ulike celletyper [81, 63, 64]. Uavhengig av hvor i cellen fotosensitizeren akkumulerer kan autofagi oppreguleres [81]. I denne masteroppgaven ble autofagi påvist ved at det ble observert konvertering av LC3B I til LC3B II i TPCS_{2a}-PDT-behandlede celler (figur 25). Både Kessel *et al.* og Faraj *et al.* har

observert tilsvarende konvertering i andre celletyper [82, 77]. I denne studien ble det, interessant nok, også observert en forskjell i grad av LC3B-konvertering mellom cellelinjene. MES-SA ble vist å uttrykke LC3B II 10 og 6 ganger mer ved PDT og PCI sammenliknet med ubehandlede celler. I MES-SA/Dx5 var disse uttrykkene henholdsvis 4,5 og 2,5 i forhold til ubehandlede celler. Disse resultatene viste at autofagi er mer oppregulert i MES-SA enn i MES-SA/Dx5 sammenliknet med ubehandlede celler ved de to behandlingene. Mindre LC3B II-uttrykk ved PCI sammenliknet med PDT viste at en annen mekanisme enn autofagi også er involvert. Som vist for PARP var også basaluttrykket av LC3B II sterkere i den resistente linjen.

Autofagi kan fungere som både en overlevelses- og en dødsmechanisme i ulike typer celler og etter ulik type stress [83]. Xue *et al.* viste i 2010 at autofagi i MCF-7-celler er en dødsmechanisme ved PDT-behandling med ftalocyanin 4 [83]. Ved å inhibere LC3, som er viktig i autofagosomdannelsen, hemmet de autofagi etter PDT [83]. De viste også at celler med mangel på apoptosesignalering var avhengig av autofagi for å dø med ftalocyanin 4-PDT [84, 83]. Autofagihemmeren 3-MA, som ble benyttet i denne masteroppgaven, var imidlertid så toksisk at det var vanskelig å trekke noen konklusjoner om hvorvidt LC3B er et overlevelsessignal eller dødssignal i cellene. Videre studier med andre hemmere må gjennomføres.

Effekt på MAP-kinaser

I denne masteroppgaven ble det observert en fosforylering og aktivering av p38 i PDT-behandlede sarcomceller (4 J/cm²) (figur 26). p38 er vist å være involvert i reguleringen av apoptose, og er en sentral mediator for overlevelse og celledødsmechanismer [85, 86, 76]. p38-mediert nedregulering av Bcl og oppregulering av p53 er for eksempel vist å spille en viktig rolle i oksidant-indusert apoptose i endotelceller [86]. Fosforylering av p38 i ubehandlede MES-SA/Dx5 ble her vist å være halvparten av den i MES-SA. 2 timer etter PDT var Pp38-uttrykket 2,5 ganger sterkere i MES-SA enn i MES-SA/Dx5. p38-signalveien så derfor ut til å være mindre uttalt i disse resistente cellene. Forskjellen betyr at mekanismene bak PDT-responsen er

forskjellig mellom cellelinjene. En inhibering av Pp38 med SB203580 hindret i MES-SA fosforylering av p38-substratet MAPKAPK-2, og økte viabiliteten (figur 28a). Den økte viabiliteten indikerte at p38 i dette tilfellet er et dødssignal i MES-SA-linjen. Ingen signifikant forskjell i overlevelse ble observert da SB203580 ble administrert til PDT- eller PCI-behandlede MES-SA/Dx5, som indikerte at p38-signalveien i disse cellene ikke bare er mindre uttalt, men mulig også defekt. Det ble også vist at MES-SA/Dx5 har lavere fosforylering av MAPKAPK-2 ved PDT-behandling med TPCS_{2a} sammenliknet med MES-SA (figur 29). Dette er i samsvar med at MAPKAPK-2 er et substrat av Pp38 og at MES-SA/Dx5 fosforylerer p38 i relativt liten grad. Observasjonene korrelerer også med at cellene undergår apoptose i ulik grad (figur 24). p38-aktivitet har imidlertid blitt vist å øke etter Photofrin®-PDT av resistente Li-Fraumeni-syndrom (LFS)-celler sammenliknet med normale humane fibroblast (NHF)-celler [87]. Inhibering hadde, som vist i de resistente MES-SA/Dx5-cellene, heller ikke her noen effekt på celleoverlevelsen [87].

Inhibering av p38 i myelogene leukemi-celler etter stråling utført av Choi *et al.* i 2007 viste økt viabilitet i villtype (WT)-celler, men ikke i DOX-resistente [68]. Dette indikerer at p38 aktiveres etter stråling i WT-celler og ikke i DOX-resistente [68]. Slike resultater viser at p38 kan ha sterkere tilknytning til DOX-indusert PDT-resistens. Til sammenlikning ble det i MA11-celler, ikke vist økt Pp38-uttrykk i den PDT-sensitive varianten (figur 27). Disse cellene er ikke vist å ha ulik sensitivitet overfor DOX (upublisert data fra forskningsgruppen). En annen resistensmekanisme er derfor ansvarlig for PDT-resistensen i disse cellene.

Rollen til MAPK-aktivering i PDT-drap er de siste årene blitt undersøkt i en rekke studier med ulike fotosensitizerer og tumorceller, og resultatene har i stor grad vært motstridende [76, 86, 87, 88, 89]. Hypericinmediert PDT har blitt vist av Hendrickx *et al.* å føre til vedvarende aktivering av p38-MAPK i T24-celler, og man antok at p38 hadde en beskyttende rolle mot PDT-indusert apoptose [85]. I motsetning til disse observasjonene viste Weyergang *et al.* i 2008 at p38 også kunne fungere som et dødssignal i enkelte kreftceller, og at funksjonen til MAPK etter fotokjemisk behandling avhenger av celletype, fotosensitizer, cellulær lokalisasjon og lysdose [90]. Kralova *et*

al. bekreftet dette samme år [88].

Kralova viste i tillegg i 2008 at oppregulering av Pp38 kunne assosieres med mitokondrie-drevet apoptose, selv der fotosentizeren tetrakis-meso-(4-etylenglykol-2,3,5,6-tetrafluorofenyl)-porfyrin (PORF-TEG), som har affinitet til lysosomer, ble benyttet [88]. Da TPCS_{2a} også har affinitet til lysosomale membraner, kan man ikke utelukke en tilsvarende assosiasjon i MES-SA og MES-SA/Dx5 med TPCS_{2a}-PDT.

I 2012 viste Chu *et al.* oppregulering av fosforylert p38 og c-Jun N-terminal proteinkinase (JNK) etter behandling med hexyl-ALA-PDT i både MES-SA (30 μ M, 1 J/cm²) og MES-SA/Dx5-celler (30 μ M, 2 J/cm²) som benyttet i denne masteroppgaven [71]. Tre av hoved-MAPK-signalveiene i pattedyr inkluderer JNK, p38 og ERK [85]. Den fototoksiske effekten av hexyl-ALA-PDT ble vist å skyldes denne fosforyleringen, og føre til apoptose [71]. Da de respektive lysdosene Chu *et al.* benyttet indikerer ulik PDT-sensitivitet mellom cellelinjene, korrelerer disse resultatene med observasjonene i denne masteroppgaven, og viser resistens i MES-SA/Dx5.

En økt JNK/p38:ERK-ratio har blitt assosiert med tendensen til å undergå apoptose [91]. Dette er vist for ALA-PDT og behandling med ¹O₂ [92]. Da Pp38-uttrykket i denne masteroppgaven generelt var høyere i ubehandlede MES-SA-celler sammenliknet med MES-SA/Dx5, kan det være interessant å studere ratioen mellom p38 og ERK i cellelinjene nærmere. Dersom man antar at det ikke er forskjell i ERK-uttrykk mellom cellelinjene, kan ratioen være økt for MES-SA.

Mange ulike observasjoner mellom fotosensitizerer og cellelinjer i tillegg til denne masteroppgaven bekrefter at MAPK-signaleringen er kompleks. Det er imidlertid liten tvil om at MAPK har en sentral plass i PDT med ulike fotosensitizerer, og resultatene fra denne masteroppgaven indikerte at nedreguleringen av Pp38 er mekanismen bak resistensen mot TPCS_{2a}-PDT i MES-SA/Dx5.

PCI og resistens

I denne masteroppgaven ble det foreslått at PCI ikke opphever PDT-resistens, men mest trolig induserer akutt celledød ved internalisering av det toksiske proteinet rGelonin i MES-SA/Dx5, og på den måten omgår resistensen. PCI ble vist oppheve resistens mot rGelonin i cellelinjene, noe som er vist i flere PCI-forsøk i MDR-celler [74, 93, 94]. Effekten har da vært grunnet økt internalisering av et legemiddel inn i cytosol.

Forsøk med PCI av genmateriale har også blitt utført for å oppheve mekanismer som fører til motstandsdyktighet mot behandling [95, 96]. Et eksempel er PCI av WT-p53 for å oppheve mutasjonen som er assosiert med dårlig prognose i mange kreftformer [95]. PCI av den non-virale vektoren polyetylenimin (PEI) ble rapportert å transfektere WT-p53 med svært høy effektivitet i FaDu-celler, og demonstrerte kurasjon [95]. PCI-effekt av non-virale vektorer er vist å være svært effektivt [97, 98, 99]. PCI av rGelonin med TPCS_{2a} i MES-SA og MES-SA/Dx5 demonstrerte i denne masteroppgaven at et internaliseringsprinsipp fungerer med disse parametrene. Det er derfor nærliggende å også anta en god effekt av transfeksjon. Et interessant forsøk ville inkludert transfeksjon av et gen som koder for p38 i MES-SA/Dx5. Man kan tenke seg at dette genet ville gjøre cellene mer utsatt for apoptose. Prinsippet kan tenkes overført til resistente tumorer dersom resistensmekanismene identifiseres på forhånd.

4.2 Diskusjon av materialer og metoder

Cellelinjer

Valg av cellelinjer for studering av MDR kan ha innflytelse på resultatene [100]. MES-SA og MES-SA/Dx5 benyttet i denne masteroppgaven er vist å være svært egnede cellelinjer til dette formål [100]. MES-SA og MES-SA/Dx5 har utgangspunkt i samme tumor, og studering av cellene gjør at man kan spore forskjeller i proteinuttrykk tilbake til det som kan ha forårsaket resistensen på gennivå. MA11-celler med ervervet PDT-resistens ble inkludert i studien for å se om de samme mekanismene var ansvarlig for PDT-resistens

som i MES-SA/Dx5.

Applisering av lys i PDT og PCI

I denne masteroppgaven er identisk behandling av celler tilstrebet i alle forsøk. Det har derfor blitt benyttet like lysdoser i form av like lang lyseksponering mellom cellelinjene. Effekt av behandling kan også sammenliknes ved å studere letal dose (LD). LD50 kan for eksempel bestemmes matematisk, men kan være vanskelig å oppnå praktisk. Ved å beregne et gjennomsnitt av flere LD, der for eksempel LD50 er tilstrebet, kan dette gi usikkerhet i dataene.

Viabilitetsmåling

For beregning av cellulær viabilitet ble metoden MTT benyttet. Fordi en MDR-fenotype er assosiert med potensiell effluks av ulike forbindelser, er det blitt undersøkt hvorvidt en slik fenotype kan interferere med MTT-assay. En sammenlikning av MTT-assay med andre celleviabilitets-assay har vist en signifikant variasjon i IC50 mellom sensitive og legemiddelresistente undergrupper av samme cellelinje [101]. Da det i denne masteroppgaven ble benyttet relative viabilitetsverdier i forhold til ubehandlede celler, har ikke denne variasjonen hatt relevans for målingene. En kontroll av viabilitetsresultatene etter behandling med TPPS_{2a} er utført av Selbo *et al.* i MES-SA- og MES-SA/Dx5-celler [5]. Resultatene fra klonal celleoverlevelse bekreftet MTT-resultatene [5]. En potensiell begrensning med MTT-assay er imidlertid at eventuell mikrobiell kontaminasjon vil kunne bidra til kløyving av MTT og dannelsen av MTT-formazan (<http://sigmaaldrich.com>, april 2012). Inkubering med MTT ble derfor utført med aseptiske arbeidsteknikker.

5 Konklusjon

TPCS_{2a} ble i denne masteroppgaven vist å være en svært effektiv fotosensitizer i PDT-sensitive celler som MES-SA. Sensitizeren var flere ganger mer effektiv enn modersubstansen TPPS_{2a}, og viste også svært gode effekter i PCI-behandling. I studien ble det vist at MES-SA/Dx5 er resistent mot DOX og PDT med TPCS_{2a}. Begge cellelinjer ble vist å ha lav sensitivitet for toksinet rGelonin, og PCI av rGelonin ble vist å være en effektiv måte å oppheve rGelonin-resistens på. Det ble også konkludert med at PCI kan omgå PDT-resistens i MES-SA/Dx5, og at det mulig er rGelonins toksisitet som står for effekten.

Lokalisering av TPCS_{2a} i endolysosomale vesikler viste at angrepspunktene i cellelinjene er de samme for PDT, og opptaksstudiene gjorde at man kunne konkludere med at andre mekanismer enn forskjell i akkumulering og utpumping *via* PGP står bak resistensen. Det ble vist at dødsmechanismene i MES-SA skyldes apoptose ved PDT- og PCI-behandling, men at en slik mekanisme ikke er like sterkt uttrykt i MES-SA/Dx5 eller at det foreligger en defekt i deler av apoptose-signaleringsveien. Et svakere uttrykk ble også observert for autofagi i MES-SA/Dx5 behandlet med PDT og PCI. Disse observasjonene er basert på resultater som viser forskjeller i kløyving av apoptose-indikatoren PARP mellom cellelinjene, og konvertering av autofagi-indikatoren LC3B I til LC3B II. Et dypere dykk inn i apoptose-mekanismene avslørte at p38 er et dødssignal i MES-SA behandlet med TPCS_{2a}-PDT. Et slikt signal kunne ikke i like stor grad observeres i MES-SA/Dx5. Selv om PCI-effekten i MES-SA/Dx5 ble vist å være mer effektiv enn i MES-SA sammenliknet med TPCS_{2a}-PDT, ble ikke mekanismen som forårsaker det dramatiske celledrapet ved PCI i MES-SA/Dx5 avslørt. PCI av genet som koder for p38 ble imidlertid foreslått å være en potensiell behandling for å oppheve TPCS_{2a}-PDT-resistensen i MES-SA/Dx5. Da det ble vist at det ikke er mindre p38-uttrykk i PDT-resistente MA11-celler sammenliknet med PDT-sensitive, kunne man konkludere med at lave uttrykk av p38 ikke er en spesifikk markør for generell PDT-resistens, men at den er knyttet tettere til DOX-indusert PDT-resistens, eller at den er celleavhengig. Dette betyr

5 KONKLUSJON

at det er et behov for identifisering av resistensmekanismer i flere former for PDT-resistens.

Referanser

- [1] Franks ME, Macpherson GR, Lepper ER, Figg WD, Sparreboom A. New directions in cancer research 2003: technological advances in biology, drug resistance, and molecular pharmacology. *Drug Resist Updat.* 2003;6(6):301–312.
- [2] Turner JG, Dawson J, Sullivan DM. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol.* 2011;.
- [3] Wang E, Lee MD, Dunn KW. Lysosomal accumulation of drugs in drug-sensitive MES-SA but not multidrug-resistant MES-SA/Dx5 uterine sarcoma cells. *J Cell Physiol.* 2000;184(2):263–274.
- [4] Harker WG, Sikic BI. Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line MES-SA. *Cancer Res.* 1985;45(9):4091–4096.
- [5] Selbo PK, Weyergang A, Bonsted A, Bown SG, Berg K. Photochemical internalization of therapeutic macromolecular agents: a novel strategy to kill multidrug-resistant cancer cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2006;319(2):604–612.
- [6] Giaccone G PH. Drug Resistance. *The Oncologist.* 1996;1(1 & 2):82–87.
- [7] Alexander S, Friedl P. Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends Mol Med.* 2012;18(1):13–26.
- [8] Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc).* 2008;73(5):592–604.
- [9] Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 2011;50(1):161–178.

- [10] Simon S, Roy D, Schindler M. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(3):1128–1132.
- [11] Altan N, Chen Y, Schindler M, Simon SM. Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *J Exp Med*. 1998;187(10):1583–1598.
- [12] Adar Y, Stark M, Bram EE, Nowak-Sliwinska P, van den Bergh H, Szewczyk G, et al. Imidazoacridinone-dependent lysosomal photodestruction: a pharmacological Trojan horse approach to eradicate multidrug-resistant cancers. *Cell Death Dis*. 2012;3:e293.
- [13] Hamblin MR, Mróz P. *Advances in Photodynamic Therapy*. Hamblin MR, Mróz P, editors. Artech House; 2008.
- [14] Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3:380–387.
- [15] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(12):889–905.
- [16] Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, Yanushevich YG, Staroverov DB, Chepurnykh TV, et al. A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol*. 2006;24(1):95–99.
- [17] MacDonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2001;5:105–129.
- [18] Mojzisova H, Bonneau S, Maillard P, Berg K, Brault D. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. *Photochem Photobiol Sci*. 2009;8(6):778–787.
- [19] DW K, RE P, RR W. *Holland-Frei Cancer Medicine Basics of Light and PDT-Related Photochemistry*. DW K, RE P, RR W, editors. BC Decker; 2003.

-
- [20] Berg K, Nordstrand S, Selbo PK, Tran DTT, Angell-Petersen E, Høgset A. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10(10):1637–1651.
- [21] Polo L, Valduga G, Jori G, Reddi E. Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(1):10–23.
- [22] O’Brien T, Thomas K. Bladder cancer: Photodynamic diagnosis can improve surgical outcome. *Nat Rev Urol.* 2010;7(11):598–599.
- [23] Somani BK, Moseley H, Eljamel MS, Nabi G, Kata SG. Photodynamic diagnosis (PDD) for upper urinary tract transitional cell carcinoma (UT-TCC): evolution of a new technique. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010;7(1):39–43.
- [24] Casas A, Venosa GD, Hasan T, Batlle A. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem.* 2011;18(16):2486–2515.
- [25] Usuda J, Tsunoda Y, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Maehara S, et al. Breast cancer resistant protein (BCRP) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (PDT) for centrally located early lung cancer. *Lung Cancer.* 2010;67(2):198–204.
- [26] Sharkey SM, Wilson BC, Moorehead R, Singh G. Mitochondrial alterations in photodynamic therapy-resistant cells. *Cancer Res.* 1993;53(20):4994–4999.
- [27] Selbo PK, Weyergang A, Høgset A, Norum OJ, Berstad MB, Vikdal M, et al. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *Journal of Controlled Release.* 2010;148:2–12.
- [28] Berg K, Weyergang A, Prasmickaite L, Bonsted A, Høgset A, Strand MTR, et al. Photochemical internalization (PCI): a technology for drug delivery. *Methods Mol Biol.* 2010;635:133–145.

- [29] Prasmickaite L, Høgset A, Selbo PK, Engesaeter B, Hellum M, Berg K. Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2002;86(4):652–657.
- [30] Weyergang A, Selbo PK, Berstad MEB, Bostad M, Berg K. Photochemical internalization of tumor-targeted protein toxins. *Lasers Surg Med*. 2011;43(7):721–733.
- [31] Andrzejak M, Santiago M, Kessel D. Effects of endosomal photodamage on membrane recycling and endocytosis. *Photochem Photobiol*. 2011;87(3):699–706.
- [32] Lilletvedt M, Tønnesen HH, Høgset A, Nardo L, Kristensen S. Physicochemical characterization of the photosensitizers TPCS2a and TPPS2a 1. Spectroscopic evaluation of drug–solvent interactions. *Pharmazie*. 2010;65(8):588–595.
- [33] Lilletvedt M, Tønnesen HH, Høgset A, Sande SA, Kristensen S. Evaluation of physicochemical properties and aggregation of the photosensitizers TPCS2a and TPPS2a in aqueous media. *Pharmazie*. 2011;66(5):325–333.
- [34] Norum OJ, Giercksky KE, Berg K. Photochemical internalization (PCI) as an adjunct to intralesional surgery in a human sarcoma model. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94-B (SUPP XIV):17.
- [35] Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Tjelle TE, Sandvig K, Moan J, et al. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res*. 1999;59(6):1180–1183.
- [36] Berg K, Berstad M, Prasmickaite L, Weyergang A, Selbo PK, Hedfors I, et al. Photochemical internalization: a new tool for gene and oligonucleotide delivery. *Top Curr Chem*. 2010;296:251–281.
- [37] Prasmickaite L, Høgset A, Tjelle TE, Olsen VM, Berg K. Role of endosomes in gene transfection mediated by photochemical internalisation (PCI). *J Gene Med*. 2000;2(6):477–488.

- [38] Norum OJ, Selbo PK, Weyergang A, Giercksky KE, Berg K. Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine. *J Photochem Photobiol B*. 2009;96(2):83–92.
- [39] Stirpe F, Olsnes S, Pihl A. Gelonin, a New Inhibitor of Protein Synthesis, Nontoxic to Intact Cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1980;255:6947–6953.
- [40] Yuan X, Lin X, Manorek G, Howell SB. Challenges associated with the targeted delivery of gelonin to claudin-expressing cancer cells with the use of activatable cell penetrating peptides to enhance potency. *BioMedCentral Cancer*. 2011;11(61):1471–2407.
- [41] Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10(4):405–412.
- [42] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Alberts B, editor. Garland Science; 2002.
- [43] Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1776(1):86–107.
- [44] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
- [45] Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:217–245.
- [46] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews*. 2007;8:741–752.
- [47] Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(8):721–729.

REFERANSER

- [48] Weinberg RA. The biology of cancer. Jeffcock E, editor. Garland Science; 2007.
- [49] Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*. 1994;15(1):7–10.
- [50] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):579–591.
- [51] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):320–344.
- [52] Cai B, Chang SH, Becker EBE, Bonni A, Xia Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25215–25222.
- [53] Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2007;11(2):191–205.
- [54] Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994;78(6):1027–1037.
- [55] Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7420–7426.
- [56] Dolado I, Nebreda A. Regulation of Tumorigenesis by p38alpha; MAP Kinase. Posas F, Nebreda A, editors. *Stress-Activated Protein Kinases*. vol. 20 of *Topics in Current Genetics*. Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 99–128.

- [57] Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(8):1167–1176.
- [58] Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM. Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. *Br J Cancer.* 1999;79(1):72–81.
- [59] Dewaele M, Martinet W, Rubio N, Verfaillie T, de Witte PA, Piette J, et al. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *J Cell Mol Med.* 2011;15(6):1402–1414.
- [60] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PLoS One.* 2009;4(7):e6251.
- [61] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011;147(4):728–741.
- [62] Kessel D, Oleinick NL. Photodynamic therapy and cell death pathways. *Methods Mol Biol.* 2010;635:35–46.
- [63] Coupienne I, Fettweis G, Piette J. RIP3 expression induces a death profile change in U2OS osteosarcoma cells after 5-ALA-PDT. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):557–564.
- [64] Dini L, Inguscio V, Tenuzzo B, Panzarini E. Rose bengal acetate photodynamic therapy-induced autophagy. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(10):1048–1055.
- [65] van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237–245.
- [66] Osborne, Chloe, Brooks, A S. SDS-PAGE and Western Blotting to Detect Proteins and Glycoproteins of Interest in Breast Cancer Research.

- Brooks SA, Harris A, Walker JM, editors. Breast Cancer Research Protocols. vol. 120 of Methods in Molecular Medicine. Humana Press; 2006. p. 217–229. 10.1385/1-59259-969-9:217.
- [67] Simonian MH, Smith JA. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. *Curr Protoc Mol Biol.* 2006;Chapter 10:Unit 10.1A.
- [68] Choi CH, Xu H, Bark H, Lee TB, Yun J, Kang SI, et al. Balance of NF-kappaB and p38 MAPK is a determinant of radiosensitivity of the AML-2 and its doxorubicin-resistant cell lines. *Leuk Res.* 2007;31(9):1267–1276.
- [69] Chu ESM, Yow CMN, Shi M, Ho RJY. Effects of photoactivated 5-aminolevulinic acid hexyl ester on MDR1 over-expressing human uterine sarcoma cells. *Toxicol Lett.* 2008;181(1):7–12.
- [70] Tang PMK, Liu XZ, Zhang DM, Fong WP, Fung KP. Pheophorbide a based photodynamic therapy induces apoptosis via mitochondrial-mediated pathway in human uterine carcinosarcoma. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(6).
- [71] Chu ESM YC. Modulation of telomerase and signal transduction proteins by Hexyl-ALA-Photodynamic Therapy (PDT) in human doxorubicin resistant cancer cell models. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2012;In press.
- [72] Selbo PK, Weyergang A, Eng MS, Bostad M, Mælandsmo GM, Høgset A, et al. Strongly amphiphilic photosensitizers are not substrates of the cancer stem cell marker ABCG2 and provides specific and efficient light-triggered drug delivery of an EGFR-targeted cytotoxic drug. *J Control Release.* 2012;.
- [73] Selbo PK, Sandvig K, Kirveliene V, Berg K. Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1475(3):307–313.

- [74] Lou PJ, Lai PS, Shieh MJ, MacRobert AJ, Berg K, Bown SG. Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer cells by photochemical internalization. *Int J Cancer*. 2006;119(11):2692–2698.
- [75] He J, Whitacre CM, Xue LY, Berger NA, Oleinick NL. Protease activation and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment. *Cancer Res*. 1998;58(5):940–946.
- [76] Assefa Z, Vantieghem A, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR, Merlevede W, et al. The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem*. 1999;274(13):8788–8796.
- [77] Faraj MN. Cellesignalering etter PDT : betydning av nekrose, apoptose og autofagi. Høgskolen i Oslo, Avdeling for helsefag; 2009.
- [78] Wu Y, Xing D, Luo S, Tang Y, Chen Q. Detection of caspase-3 activation in single cells by fluorescence resonance energy transfer during photodynamic therapy induced apoptosis. *Cancer Lett*. 2006;235(2):239–247.
- [79] Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not procaspases, is the most likely route. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3149–3157.
- [80] Cirman T, Oresić K, Mazovec GD, Turk V, Reed JC, Myers RM, et al. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem*. 2004;279(5):3578–3587.
- [81] Reiners JJ Jr, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*. 2010;6(1):7–18.

- [82] Kessel D, Vicente MGH, Reiners JJ Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Autophagy*. 2006;2(4):289–290.
- [83] Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy. *Autophagy*. 2010;6(2):248–255.
- [84] Xue LY, Chiu Sm, Azizuddin K, Joseph S, Oleinick NL. Protection by Bcl-2 against apoptotic but not autophagic cell death after photodynamic therapy. *Autophagy*. 2008;4(1):125–127.
- [85] Hendrickx N, Volanti C, Moens U, Seternes OM, de Witte P, Vandenheede JR, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *J Biol Chem*. 2003;278(52):52231–52239.
- [86] Bhowmick R, Girotti AW. Signaling events in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells: inhibitory effects of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(6):731–740.
- [87] Tong Z, Singh G, Valerie K, Rainbow AJ. Activation of the stress-activated JNK and p38 MAP kinases in human cells by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2003;71(1-3):77–85.
- [88] Kralova J, Dvorak M, Koc M, Kral V. p38 MAPK plays an essential role in apoptosis induced by photoactivation of a novel ethylene glycol porphyrin derivative. *Oncogene*. 2008;27(21):3010–3020.
- [89] Chan PS, Koon HK, Wu ZG, Wong RNS, Lung ML, Chang CK, et al. Role of p38 MAPKs in hypericin photodynamic therapy-induced apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells. *Photochem Photobiol*. 2009;85(5):1207–1217.
- [90] Weyergang A, Kaalhus O, Berg K. Photodynamic therapy with an endocytically located photosensitizer cause a rapid activation of the

mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase, p38, and c-Jun NH2 terminal kinase with opposing effects on cell survival. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(6):1740–1750.

- [91] Klotz LO, Fritsch C, Briviba K, Tsacmacidis N, Schliess F, Sie H. Activation of JNK and p38 but not ERK MAP Kinases in Human Skin Cells by 5-Aminolevulinate-Photodynamic Therapy. *Cancer Research.* 1998;58:4297–4300.
- [92] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995;270(5240):1326–1331.
- [93] Adigbli DK, Wilson DGG, Farooqui N, Sousi E, Risley P, Taylor I, et al. Photochemical internalisation of chemotherapy potentiates killing of multidrug-resistant breast and bladder cancer cells. *Br J Cancer.* 2007;97(4):502–512.
- [94] Lu HL, Syu WJ, Nishiyama N, Kataoka K, Lai PS. Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance in vivo. *J Control Release.* 2011;155(3):458–464.
- [95] Ndoye A, Bouali S, Dolivet G, Leroux A, Erbacher P, Behr JP, et al. Sustained gene transfer and enhanced cell death following glucosylated-PEI-mediated p53 gene transfer with photochemical internalisation in p53-mutated head and neck carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2004;25(6):1575–1581.
- [96] Nishiyama N, Iriyama A, Jang WD, Miyata K, Itaka K, Inoue Y, et al. Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat Mater.* 2005;4(12):934–941.
- [97] Prasmickaite L, Høgset A, Berg K. Evaluation of different photosensi-

REFERANSER

- tizers for use in photochemical gene transfection. *Photochem Photobiol.* 2001;73(4):388–395.
- [98] Dietze A, Bonsted A, Høgset A, Berg K. Photochemical internalization enhances the cytotoxic effect of the protein toxin gelonin and transgene expression in sarcoma cells. *Photochem Photobiol.* 2003;78(3):283–289.
- [99] Bonsted A, Høgset A, Hoover F, Berg K. Photochemical enhancement of gene delivery to glioblastoma cells is dependent on the vector applied. *Anticancer Res.* 2005;25(1A):291–297.
- [100] Wesolowska O, Paprocka M, Kozlak J, Motohashi N, Dus D, Michalak K. Human sarcoma cell lines MES-SA and MES-SA/Dx5 as a model for multidrug resistance modulators screening. *Anticancer Res.* 2005;25(1A):383–389.
- [101] Marks DC, Belov L, Davey MW, Davey RA, Kidman AD. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells. *Leuk Res.* 1992;16(12):1165–1173.

Vedlegg

Vedlegg A

EDTA-buffer til splitting av MES-SA/Dx5

0,15 g disodium EDTA

0,2 g KCl

0,28 g sodium bicarbonate

0,5 g dextrose

4,0 g NaCl

ad 500 mL Aqua purificata

Buffere til SDS-PAGE og Western Blotting:

Lyseringsbuffer til SDS-PAGE

10 μ L NaF 200 mM i dH₂O

10 μ L PMSF 200 mM i isopropanol

10 μ L aktivert Na₂VO₄

20 μ L β -glycerolfosfat 2 M i dH₂O

20 μ L fosfatasehemmer-cocktail I

20 μ L fosfatasehemmer-cocktail II

20 μ L proteasehemmer-cocktail

ad 2 mL Samplebuffer

Samplebuffer

6,2 mM Tris HCl

2 % w/v SDS

10 % w/v glycerol

50 mM DTT

0,01 % bromfenolbått

10 x Runningbuffer

10 g SDS

30 g Trisbase

144 g glycin

ad 1 L dH₂O

pH 8,3

1 x Runningbuffer

100 mL 10 x Runningbuffer

ad 1 L dH₂O

Transferbuffer

3,75 g SDS

15,1 g Trisbase

71,4 g glycin

1 L metanol

ad 5 L dH₂O

10 x TBS

12,11 g Trisbase

87,66 g NaCl

ad 1 L dH₂O

pH 7,6

1 x TTBS

100 mL 10 x TBS

100 mL Tween 20

ad 1 L dH₂O

Komponenter til EnzChek Caspase-3 Assay Kit #1:

10 mM Z-DEVD-AMC-substrat

4 mg Z-DEVD-AMC-substrat (MW = 767,7 kDa)

250 μ L DMSO

20 X cellelyseringsbuffer

200 mM TRIS

2 M NaCl

20 mM EDTA

0,2 % TRITON™ X-100

pH 7,5

5 x reaksjonsbuffer

50 mM PIPES

10 mM EDTA

0,5 % CHAPS

pH 7,4

1 M DTT

100 mg Dithiotreitol (MW = 502,5)

650 μ L dH₂O

1 x Lyseringsbuffer

50 μ L 20 x cellelyseringsbuffer

950 μ L dH₂O

2 x reaksjonsbuffer

400 μ L 5 x reaksjonsbuffer

10 μ L 1 M DTT

590 μ L dH₂O

2 x substrat working-løsning

20 μ L 10 mM Z-DEVD-AMC-substrat

980 μ L 2 x reaksjonsbuffer

Vedlegg B

Stige benyttet i SDS-PAGE

Stoff:	Produsent:	Fortynnet i:	Fortynning:	2 ^o antistoff
Kaleidoskop (161-0375)	Bio-Rad	Samplebuffer	1:4	
Biotinylated ladder (7727)	Cell Signaling	Samplebuffer	1:4	Anti-biotin

Primære antistoffer benyttet i immundeteksjon for Western blotting

1 ^o antistoff:	Produsent:	Fortynnet i:	Fortynning:	2 ^o antistoff
Anti-PARP (9542)	Cell Signaling	5 % melk	1:1000	Anti-kanin
Anti-LC3B (2775s)	Cell Signaling	5 % melk	1:1000	Anti-kanin
Anti-Pp38 (9216s)	Cell Signaling	5 % melk	1:1000	Anti-mus
Anti-P-MAPKAPK-2 (3007s)	Cell Signaling	5 % BSA	1:1000	Anti-kanin
Anti-gammatubulin (T6557)	Sigma Aldrich	5 % melk	1:5000	Anti-kanin

Sekundære antistoffer benyttet i immundeteksjon for Western blotting

2 ^o antistoff	Produsent:	Fortynnet i:	Fortynning:
Anti-biotin (7075)	Cell Signaling	5 % melk	1:1000
Anti-kanin (7074s)	Cell Signaling	5 % melk	1:5000
Anti-mus (7076)	Cell Signaling	5 % melk	1:5000

Vedlegg C

Reagenser i Lowry-basert assay

Reagens A: Alkalisk kobber-tartrat-løsning

Reagens B: Fortynnet folin-reagens

Reagens S: Surfaktant-løsning