

Effekt av fotodynamisk terapi på cysteinproteasen legumain og hemmeren cystatin E/M

Kristine Løkke Olsen



Masteroppgave i farmasi

45 studiepoeng

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2020

Effekt av fotodynamisk terapi på cysteinproteasen legumain og hemmeren cystatin E/M

Kristine Løkke Olsen

Masteroppgave i farmasi

Veiledere:

Professor Kristian Berg

Professor Harald Thidemann Johansen

Professor Rigmor Solberg



Farmasøytisk institutt

Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap

UNIVERSITETET I OSLO



Seksjon for strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning,
OUS Radiumhospitalet

© Kristine Løkke Olsen

2020

Effekt av fotodynamisk terapi på cysteinproteasen legumain og hemmeren cystatin E/M

Kristine Løkke Olsen

<http://www.duo.uio.no/>

IV

Forord

Denne masteroppgaven ble utført i perioden august 2019 til mai 2020 ved Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo og ved Seksjon for strålingsbiologi ved Institutt for kreftforskning ved Oslo universitetssykehus, Radiumhospitalet.

Jeg vil først og fremst takke mine veiledere professor Rigmor Solberg, professor Harald Thidemann Johansen og professor Kristian Berg. Tusen takk for all veiledning, oppfølging, engasjement og støtte gjennom hele året. Takk for at dere alltid tok dere tid til å svare på spørsmålene mine, og for at dere alltid har vært tilgjengelig.

Jeg vil rette en stor takk til overingeniør Hilde Nilsen for god opplæring og veiledning i laboratoriearbeid, og for hennes støtte i denne perioden. Jeg vil også takke postdoktor Ngoc Nguyen Lunde for gode innspill og hjelp med analysemetodene. Takk til seksjonsingeniør Ane Sofie Viset Fremstedal for god opplæring i celloarbeid. Jeg vil i tillegg takke doktorgradsstipendiatene Judith Jing Wen Wong og Miriam Rosvold for god hjelp på laboratoriet på Radiumhospitalet.

Jeg vil også takke for muligheten jeg fikk til å presentere deler av min masteroppgave på Vintermøte 2020 for norsk selskap for farmakologi og toksikologi (NSFT).

Jeg er spesielt takknemlig for familien min som alltid har vært der for meg. En spesiell takk til Malin Sofie for all støtte gjennom hele farmasistudiet, og for at jeg fikk lov til å bruke huset ditt som lesesal i Corona-perioden. Tusen takk til verdens beste barndomsvenninner, Rina og Camilla, for gode samtaler og for at dere alltid har troen på at jeg klarer det. Sist vil jeg takke Andrea, Randi og Kimberly for deres gode selskap og støtte gjennom alle årene på farmasi. Studiet ville ikke vært det samme uten dere.

Mai 2020

Kristine Løkke Olsen

Sammendrag

Legumain (asparaginylindeopeptidase, AEP) er en lysosomal cysteinprotease som er vist å spille en rolle ved kreftutvikling. Økt forekomst av legumain i svulster assosieres med raskere vekst og økt metastasering. I tillegg omtales cystatin E/M, en potent endogen hemmer av legumain, som en tumorsuppressor, og hemming av cystatin E/M fører til økt metastasering.

Fotodynamisk terapi (PDT) er en noninvasiv behandlingsform som brukes mot ulike former for kreft. Behandlingen baserer seg på at en fotosensitizer (PS) akkumulerer i svulstvev, og ved belysning vil PS bli aktivert og føre til celledød ved dannelse av reaktive oksygenforbindelser. Ved bruk av amfifile PS, som lokaliseres til endocytiske vesikler, er det vist at lysosomale cysteinproteaser som cathepsiner har en sentral rolle ved indusering av celledød. En tidligere masteroppgave har indikert at økt nivå av cystatin E/M i kreftceller førte til redusert celledød etter PDT. Det var derfor av interesse å undersøke om legumain også påvirker effekten av PDT, og om PDT påvirker aktivitet eller molekylære former av legumain og cystatin E/M.

I denne oppgaven ble SKOV-3-celler (fra eggstokk-kreft) og HEK293-celler (embryonale nyreceller) brukt som cellemodeller. Det ble undersøkt hvordan PDT påvirker aktivitet og molekylære former av legumain og cystatin E/M i SKOV-3- og HEK293-celler, i tillegg til i stabilt transfekterte HEK293-celler som overuttrykker legumain (M38L) eller cystatin E/M (M4C). Det ble også undersøkt om opptak av prolegumain eller cystatin E/M påvirker celleviabiliteten etter PDT. Videre ble det sjekket om prolegumain eller cystatin E/M påvirker celleveksten til de ulike cellelinjene. Legumainaktivitet ble målt med et fluorescerende peptidsubstrat, uttrykk av molekylære former av legumain og cystatin E/M ble undersøkt ved immunoblotting, celleviabilitet etter PDT ble målt ved hjelp av MTT-assay og cellevekst ble målt ved IncuCyte.

Resultatene viste at kontrollceller (HEK293) internaliserte og prosesserte prolegumain til moden aktiv form, samt internaliserte cystatin E/M. SKOV-3-cellelinjene internaliserte cystatin E/M, men ikke prolegumain. Det ble vist en signifikant reduksjon i legumainaktivitet etter PDT i alle celletypene. I tillegg viste immunoblotting en signifikant reduksjon i aktiv moden form av legumain (36 kDa) etter PDT. Celledyrkning i nærvær av cystatin E/M førte ikke til endring i celleviabilitet etter PDT, sammenlignet med kontroll. Stabilt transfekterte celler som overuttrykker cystatin E/M (M4C) viste heller ingen forskjell i celleoverlevelse. Eksponering for prolegumain førte ikke til endring i celleviabiliteten til HEK293, men SKOV-3- og M38L-

celler fikk økt overlevelse sammenlignet med kontroll. Det ble også vist at både prolegumain og cystatin E/M førte til raskere cellevekst i alle cellelinjene som ble undersøkt.

Abstract

The lysosomal cysteine protease legumain (asparaginyl endopeptidase, AEP) has a role in the development of cancer. Increased levels of legumain in tumors are associated with increased growth and metastasis. Additionally, cystatin E/M, a potent endogenous inhibitor of legumain, is referred to as a tumor suppressor and inhibition of cystatin E/M leads to increased metastasis.

Photodynamic therapy (PDT) is a non-invasive therapeutic procedure that can be used against different forms of cancer. The procedure involves administration of a photosensitizer (PS) that accumulates in tumors, and upon activation it will generate reactive oxygen species, which will induce cell death. With the use of amphiphilic PS, which localizes to endocytic vesicles, it has been shown that lysosomal cysteine proteases, like cathepsins, have a central role in the induction of cell death. A previous master thesis has shown that high levels of cystatin E/M in cancer cells led to reduced cell death after PDT. Therefore, it was of interest to study how legumain affects the outcome after PDT, and how PDT effects the activity and molecular forms of legumain and cystatin E/M.

In this master thesis SKOV-3 cells (from ovarian cancer) and HEK293 cells (embryonic kidney cells) were used as cell models. The effect from PDT on the activity and molecular forms of legumain and cystatin E/M was examined in HEK293 and SKOV-3 cells, in addition to stably transfected HEK293 cells which overexpress legumain (M38L) or cystatin E/M (M4C). How internalization of prolegumain and cystatin E/M affected the cell viability after PDT was also examined. Additionally, it was analysed how prolegumain and cystatin E/M affected the cell proliferation of different cell lines. Legumain activity was measured using a fluorescent peptide substrate, the expression of legumain and cystatin E/M was analysed by immunoblotting and cell viability after PDT was measured using MTT-assay.

The results verified that control cells (HEK293) could internalize and process prolegumain to its mature active form, and also internalize cystatin E/M. SKOV-3 was on the other hand not able to internalize prolegumain, but it could internalize cystatin E/M. There was a significant reduction in the activity of legumain after PDT. Additionally, the immunoblot showed a reduction in the active mature form of legumain (36 kDa) after PDT. Cell cultivation in the presence of cystatin E/M did not lead to any difference in viability after PDT, compared with control. Cells stably transfected to overexpress cystatin E/M (M4C) did not show any difference

in cell viability either. Exposure of prolegumain did not lead to any difference in viability of HEK293 cells, but SKOV-3 and M38L cells showed an increased survival compared to control. It was also shown that both prolegumain and cystatin E/M lead to increased cell proliferation of all cell lines examined.

Innholdsfortegnelse

Forord	V
Sammendrag	VI
Abstract	VIII
Forkortelsesliste	XII
1 Introduksjon	1
1.1 Fotodynamisk terapi (PDT)	1
1.1.1 Fotosensitizerer (PS).....	1
1.1.2 Virkningsmekanismer bak PDT	3
1.2 Proteaser	5
1.2.1 Proteaser og PDT	7
1.3 Legumain	8
1.3.1 Syntese og aktivering av legumain.....	8
1.3.2 Legumain ved normalfysiologi og sykdomstilstander	10
1.3.3 Legumain og kreft	10
1.4 Cystatin E/M.....	11
2 Hensikt	13
3 Materialer og metoder	14
3.1 Materialer.....	14
3.1.1 Reagenser	14
3.1.2 Utstyrliste.....	16
3.2 Celledyrking	17
3.2.1 Cellelinjer	17
3.2.2 Frysing og tining av celler.....	18
3.2.3 Dyrking og splitting av celler.....	18
3.2.4 Celletelling	19
3.2.5 Produksjon av kondisjonert medium som reagens	20
3.2.6 Høsting av kondisjonert medium og cellelysat	20
3.2.7 Eksponering av SKOV-3- og HEK293-celler for kondisjonerte media.....	20
3.3 Fotodynamisk terapi <i>in vitro</i>	21
3.3.1 Fotosensitizer og belysning.....	21
3.3.2 Prosedyre for PDT.....	21
3.4 Måling av celleviabilitet ved MTT-assay	22
3.5 Måling av celleproliferasjon ved IncuCyte® FLR	23
3.6 Måling totalprotein	23

3.7	Måling av legumainaktivitet	24
3.8	Gelelektroforese og immunoblotting	25
3.8.1	Acetonfelling av totalprotein i cellelysat	25
3.8.2	Tillaging av gelelektroforeseprøver	25
3.8.3	Gelelektroforese	25
3.8.4	Immunoblotting	26
3.8.5	Reblotting	28
3.9	ELISA	28
3.10	Statistiske analyser	29
4	Resultater	30
4.1	Internalisering av prolegumain eller cystatin E/M i HEK293- og SKOV-3-celler ...	30
4.2	Effekten av PDT på legumain og cystatin E/M	33
4.2.1	Effekt av PDT på legumainaktivitet og molekylære former av legumain og cystatin E/M i HEK293- og SKOV-3-celler	33
4.2.2	Effekt av PDT på legumainaktivitet og molekylære former av legumain og cystatin E/M i M38L- og M4C-celler	36
4.3	Effekt av PDT på celleviabilitet etter internalisering av prolegumain eller cystatin E/M	38
4.4	Effekt av PDT på celleviabilitet av celler som overuttrykker prolegumain eller cystatin E/M	40
4.5	Effekt av legumain og cystatin E/M på celleproliferasjon	41
4.5.1	Celleproliferasjon i HEK293- og SKOV-3-celler etter dyrkning i nærvær av prolegumain eller cystatin E/M	41
4.5.2	Celleproliferasjon av M38L- og M4C-celler	43
5	Diskusjon	45
5.1	Ufullstendige analyser	53
6	Konklusjon	54
	Litteraturliste	55
	Vedlegg A: Sammensetning på løsninger brukt i oppgaven	61
	Vedlegg B: Proliferasjonsrate fra IncuCyte FLR®	64
	Vedlegg C: Poster	65

Forkortelsesliste

AEP	Asparaginyln endopeptidase
AMC	7-amino-4-metylkumarin
AP	Aktiveringspeptid
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATCC	«American Type Culture Collection»
BSL	«Biosafety level»
CBBG	«Coomassie Brilliant Blue G-250»
CO ₂	Karbondioksid
dF	Delta fluorescens
DMEM	«Dulbeccos's Modified Eagle Medium»
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DTT	Ditiotreitol
E64	Trans-epoksysuksinyl-L-leukylamido-(4-guanidino)-butan
ECM	Ekstracellulær matriks
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ELISA	«Enzyme-linked immunosorbent assay»
FBS	Føtalt kalveserum
G418	Geneticin [®]
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase
H ₂ O ₂	Hydrogenperoksid
HEK293	«Human Embryonic Kidney 293 cells»
kDa	Kilodalton
KM	Kondisjonert medium

LMP	«Lysosomal membrane permeabilization»
LSAM	Legumain stabilisering- og aktivitetsmodulerende-domene
M38L	Stabiltransfektet monoklonal HEK293 cellelinje som overuttrykker prolegumain
M4C	Stabiltransfektet monoklonal HEK293 cellelinje som overuttrykker cystatin E/M
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MHCII	«Major histocompatibility complex class II»
MMP	Matriksmetalloproteinase
MTT	3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid
$^1\text{O}_2$	Singlett oksygen
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoksidanion
PAGE	Polyakrylamidgelelektroforese
PBS	Fosfatbufret saltvann
PDT	Fotodynamisk terapi
$^1\text{PS}_0$	Fotosensitizer i grunntilstand
$^1\text{PS}_1^*$	Fotosensitizer eksitert til singlett tilstand
$^3\text{PS}_1^*$	Fotosensitizer eksitert til triplett tilstand
PS	Fotosensitizer
RD	«Reagent Dilution»
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
rpm	«Rounds per minute», omdreininger per minutt
STAT3	«Signal transducer and activator 3»
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	«Standard error of mean», standardfeil
siRNA	Small interfering RNA
TAMs	Tumor assosierte makrofager
TPCS _{2a}	Disulfonert tetrafenylklorin

Z-Ala-Ala-Asn-AMC

Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-amino-
4-metylkumarin

1 Introduksjon

1.1 Fotodynamisk terapi (PDT)

Fotodynamisk terapi (PDT) er en noninvasiv behandlingsform som kan brukes mot ulike former for kreft, som blant annet blærekreft og hudkreft [1]. Studier tyder også på at PDT kan brukes mot andre sykdommer som aktinisk keratose, akne og peridontitt [2, 3]. Behandlingen baserer seg på at ikke-toksiske komponenter kombineres for å indusere cellulære effekter som fører til celledød. PDT krever tre komponenter: en fotosensitizer (PS), lys og oksygen [1, 4]. Behandlingen er en to-trinns prosedyre hvor det først administreres PS som fordeler seg i kroppen og akkumulerer i svulstvev, slik at konsentrasjonen av PS blir høyere her sammenlignet med friskt vev. Deretter belyses området som skal behandles. Ved belysning vil PS bli aktivert, reagere med oksygen og det dannes reaktive oksygenforbindelser (ROS) som vil skade omkringliggende vev. Fotokjemiske reaksjoner er avhengig av oksygen, og i anoksisk vev vil ikke PDT ha en effekt [1, 5]. Ingen av komponentene som kreves for PDT er toksiske hver for seg, men ROS som dannes ved PDT behandling vil føre til celledød blant annet ved initiering av autofagi, apoptose og/eller nekrose [4]. PDT har også indirekte effekter ved å skade blodkarene rundt svulsten, og hindrer dermed kreftcellenes tilgang på næringsstoffer. Behandlingen vil i tillegg initiere en akutt immunrespons, som tiltrekker immunceller og kan være med på å skape hukommelsesceller og en langvarig beskyttelse mot kreftformen [6].

1.1.1 Fotosensitizere (PS)

Fotosensitizere (PS) er en av komponentene som kreves i PDT-behandling. PS er ikke-toksiske forbindelser som absorberer energien fra lys, og overfører denne energien til forbindelser i nærheten. Den absorberte energien vil ved PDT primært overføres til molekylært oksygen, og produsere ROS som singlett oksygen ($^1\text{O}_2$) og frie radikaler [7]. PS skal fortrinnsvis absorbere lys med bølgelengde 600-800 nm. Lys med denne bølgelengden kan trenge dypt ned i vevet, men samtidig absorberes det i liten grad av hudpigmenter (f.eks. melanin) og hemoglobin [8]. Dersom vevet som skal behandles er tynnere enn 2-3 mm kan kortere bølgelengder benyttes.

Effekten av PDT avhenger til en viss grad av hvor PS akkumulerer. Singlett oksygen som dannes ved aktivering av PS har en halveringstid på maksimalt 40 nanosekunder, og diffunderer ikke mer enn 10-20 nm [9, 10]. $^1\text{O}_2$ interagerer derfor bare med molekyler og strukturer i

umiddelbar nærhet, og hva slags celleskader som blir induisert avhenger av hvor singlett oksygen dannes [11].

Vevsdistribusjonen og lokaliseringen av PS i cellene, avhenger av hvordan den administreres og dens kjemiske egenskaper [12]. Det er observert at konsentrasjonen av PS er signifikant større i kreftceller enn i normale celler. Den selektive akkumuleringen kan komme av at blodkarene rundt svulster har økt permeabilitet slik at det er lettere for makromolekyler som PS å diffundere inn i svulstvev, sammenlignet med normalt vev. I tillegg har svulster redusert lymfatisk drenasje, noe som vil føre til økt retensjon av PS [13]. En annen forklaring på den selektive akkumuleringen i kreftceller er at PS har høy affinitet for serum komponenter som «low density lipoprotein» (LDL). Ved opptak av LDL i celler vil PS være bundet til LDL, og bli tatt opp fra blodbanen sammen med lipoproteinet. På grunn av forhøyet LDL reseptornivå i kreftceller vil disse ha et økt opptak av LDL, sammenlignet med celler fra frisk vev. Siden PS er bundet til LDL, vil kreftcellene også ha et økt opptak av PS [14].

Intracelluært kan PS være på membranoverflater, eller inne i subcellulære komponenter som lysosomer og endosomer. Hvor PS lokaliseres avhenger av stoffets kjemiske egenskaper [8]. Hydrofile PS klarer ikke å diffundere gjennom lipofile biomembraner, men tas opp via pinocytose og lokaliseres i matriks i endosomer og lysosomer. Effekten av hydrofile PS vil derfor hovedsakelig være på innholdet i lysosomene, som lysosomale enzymer, men ved større doser av hydrofil PS kan også membranene skades [15]. Lipofile PS kan diffundere gjennom membranene på ulike organeller, og vil akkumulere i for eksempel lysosomer, mitokondrier og endoplasmatiske retikulum. Amfifile PS, slik som TPCS_{2a} brukt i denne oppgaven, tas opp i cellen via adsorptiv endocytose og akkumulerer i det endolysosomale systemet [8, 15].

En ideell PS skal ha en lav toksisitet når den ikke er belyst, dette gjelder både fotosensitizeren og eventuelle metabolitter av denne ved nedbrytning. Den skal akkumulere i svulstvev, og i tillegg bør den ha en rask utskillelse fra normalt vev [4, 7]. Dette er for å hindre fototoksiske bivirkninger [4]. Den ideelle PS bør også være lett å syntetisere, og den må ha god holdbarhet ved lagring.

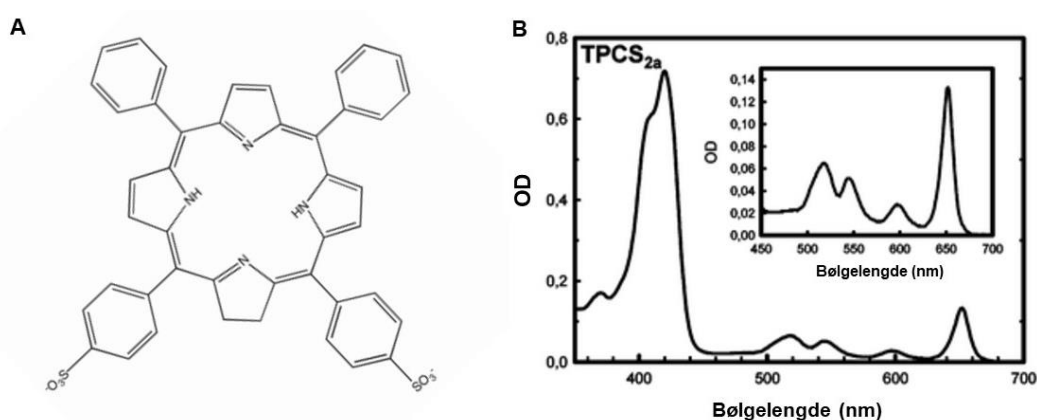
TPCS_{2a}

Fotosensitizeren (PS) brukt i denne oppgaven, disulfonert tetrafenylklorin (TPCS_{2a}), er en amfifil PS, som vil lokaliseres i membranen til endocytiske vesikler og lysosomer [16].

Forbindelsen inneholder negative ladninger (fig. 1.1, A) som hindrer at PS trenger igjennom membraner, og heller akkumulerer i endocytiske vesikler [16]

Som tidligere nevnt bør PS absorbere lys med bølgelengder rundt 600-800 nm. TPCS_{2a} absorbere lys både ved korte bølgelengder, rundt 420 nm, og ved lange bølgelengder rundt 650 nm. Absorpsjonsspekteret til fotosensitizeren viser et klart bånd rundt 400 nm (Soret-båndet), og i tillegg har den 4 små topper rundt 500-600 nm (Q-båndene, fig. 1.1, B) [16, 17]. Fotosensitizeren er derfor egnet til både *in vitro* forsøk, hvor man gjerne bruker blått lys rundt 400 nm, og til *in vivo* bruk hvor det brukes rødt lys rundt 650 nm. Ved belysning vil TPCS_{2a} absorbere energien fra lyset, og generere ROS, som hovedsakelig er singlett oksygen [17].

TPCS_{2a} syntetiseres ved hjelp av en di-imidreduksjon av en annen fotosensitizer kalt disulfonert tetrafenylporfin (TPPS_{2a}). Syntesen av TPCS_{2a} kan gi tre isomere forbindelser, men batch-til-batch variasjonen er likevel veldig lav. Syntesen har i tillegg et bra utbytte, og under 0,5 % av utgangsmaterialet, TPPS_{2a}, er igjen etter syntesen [16].

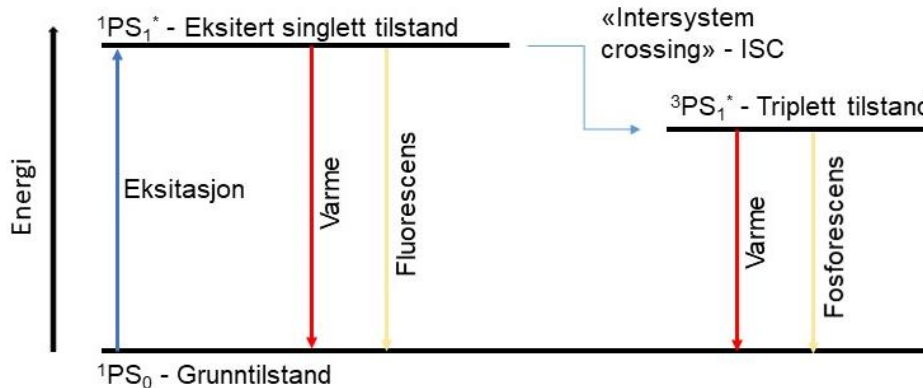


Figur 1.1: Strukturformel (A) og absorpsjonsspekter (B) for fotosensitizer TPCS_{2a}. Struktur for en isomer av disulfonert tetrafenylklorin (TPCS_{2a}) (A). Absorpsjonsspekteret for TPCS_{2a} løst i 10 % Cremophor ELP (B) viser at fotosensitizeren absorberer lys både ved korte og lange bølgelengder. Begge grafer viser absorpsjonsspekteret for TPCS_{2a}, den innfelte grafen er en forstørrelse av område fra 450-700 nm. Figurene er modifisert fra Berg et al. (2011) [16].

1.1.2 Virkningsmekanismer bak PDT

Før belysning eksisterer PS i en grunntilstand (¹PS₀). Når PS utsettes for lys ved en spesifikk bølgelengde, som kan absorberes av PS, blir den aktivert [18]. ¹PS₀ vil absorbere lyset, og gå

over til eksitert singlett tilstand ($^1PS_1^*$). Denne tilstanden er ustabil, og vil bare vare noen få nanosekunder. Fra den eksiterte tilstanden kan PS falle tilbake til grunntilstand ved å avgi energi ved en strålingsfri prosess, som for eksempel ved å avgi varme (fig. 1.2) [19, 20]. Eksitert PS kan også gjennomgå «intersystem crossing» (ISC), så den blir omgjort til en triplett-tilstand ($^3PS_1^*$) som er mer langvarig (mikro/millisekunder) enn singlet-tilstanden (nanosekunder) [20].

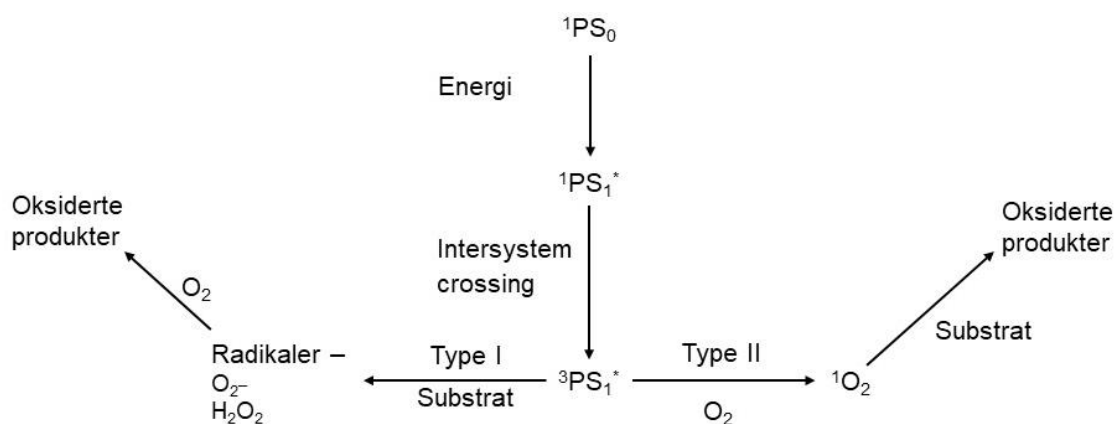


Figur 1.2: Forenklet Jablonski diagram. Ved tilføring av energi, i dette tilfellet i form av lys, blir fotosensitizer (PS) i grunntilstand (1PS_0) eksitert til singlett tilstand ($^1PS_1^*$). $^1PS_1^*$ kan avgi energi i form av varme eller fluorescens, og dermed gå tilbake til grunntilstanden. Den kan også gjennomgå «intersystem crossing», hvor man får en triplett tilstand ($^3PS_1^*$). Energien fra triplett tilstanden kan avgis som varme eller fosforescens, men den kan også reagere videre og danne ROS. Figuren er modifisert fra Craig et al. (2015) [20].

PS i $^3PS_1^*$ kan gjennomgå to typer fotokjemiske reaksjoner, kalt type I og type II reaksjoner [19]. Reaksjonene foregår samtidig, men hvilken reaksjon som dominerer avhenger blant annet av type fotosensitizer, konsentrasjon av substrat og mengde oksygen. I nærvær av oksygen er det som regel type II som dominerer [1].

Type I reaksjon

En type I reaksjon innebærer at eksitert PS i enten singlet ($^1PS_1^*$)- eller triplett-tilstand ($^3PS_1^*$) overfører et elektron eller et hydrogen til et substrat, slik at man får dannet radikaler (fig. 1.3) [21]. Radikalene kan reagere med oksygen, og danne ROS som blant annet superoksid anion ($O_2^{\cdot-}$) og hydrogenperoksid (H_2O_2). Radikalene vil skape oksidativt stress som induserer celledød [22]. Type I reaksjoner er med på å forsterke PDT-responsen, og kan være dominerende ved lave oksygenivåer [23].



Figur 1.3: Type I og type II reaksjoner. PS i triplett tilstand (${}^3PS_1^*$) kan enten overføre et elektron eller et hydrogen til et substrat (type I reaksjon) eller reagere direkte med oksygen (type II reaksjon). Ved en type I reaksjon blir et elektron eller et hydrogen overført til et substrat, slik at man får dannet radikaler. Ved en type II reaksjon vil ${}^3PS_1^*$ reagere direkte med oksygen, og danne singlett oksygen (1O_2). Singlett oksygen er en sterk ROS som kan oksidere f.eks. aminosyrer og umettede fettsyrer. Figuren er modifisert fra C. Foote (1991) [24].

Type II reaksjon

Ved type II reaksjoner overfører PS i triplett-tilstand energi direkte til oksygen, og produserer singlett oksygen (1O_2), som er en sterk ROS (fig. 1.3) [25]. ROS forårsaker skader på celler ved å oksidere aminosyrer, umettede fettsyrer og kolesterol [26]. Dette fører blant annet til skade på cellulære membraner og enzymer, og kan indusere celledød [27]. Type II reaksjoner er viktigst for effekten av PDT.

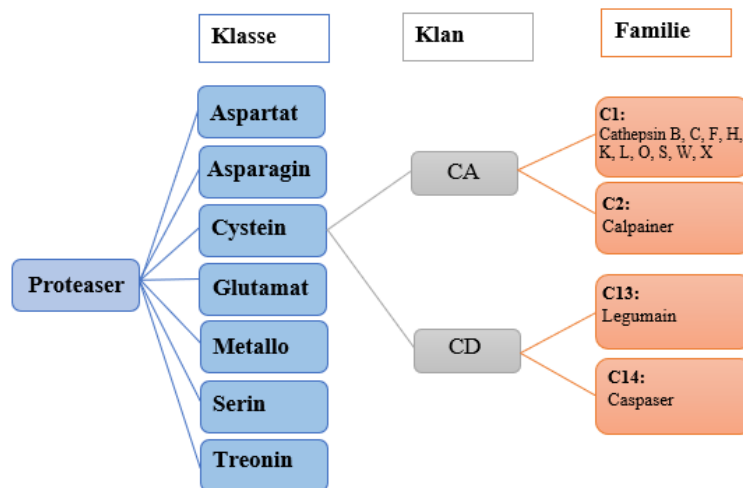
1.2 Proteaser

Proteaser, også kalt peptidaser, er proteolytiske enzymer som katalyserer nedbrytning av proteiner via hydrolyse av peptidbindinger. Avhengig av hvor i proteinet de spalter kan proteasene inndeles i eksopeptidaser eller endopeptidaser. Endopeptidaser spalter i midten av proteinet ved spesifikke aminosyrer, mens eksopeptidaser spalter enten i N- eller C-terminal ende. Rundt 2 % av det humane genomet koder for proteaser og det er funnet rundt 600 ulike proteaser i mennesket [28, 29]. Proteaser ble lenge sett på som enkle enzymer som kun var med på uspesifikk nedbrytning, og destruksjon av proteiner. Senere forskning har derimot vist at proteaser også deltar i spesifikke reaksjoner, og det er blitt demonstrert at de har en rekke viktige funksjoner i kroppen [30]. De er blant annet involvert i regulering av ulike signalveier og

kaskadesystemer, som for eksempel koagulasjonskaskaden. Koagulasjonskaskaden består av en rekke proteolytiske reaksjoner, som ender i dannelsen av fibrin [31]. Proteolytiske enzymer har også en viktig rolle ved aktivering og inaktivering av cytokiner, vekstfaktorer og andre proteaser, som for eksempel aktivering av proMMP-2 til MMP-2 [32]. Proteaser deltar i normalfysiologiske prosesser som cellyklus, apoptose, DNA-replikasjon og immunrespons [28, 29].

Ulike proteaser har ulike funksjoner, men felles for proteolytisk spaltning er at det er irreversibelt. Unormalt uttrykk av proteaser er forbundet med sykdom, og for høy proteolytisk aktivitet er forbundet med inflammatorisk, nevrodegenerativ og kardiovaskulær sykdom, samt tilstander som infeksjoner og kreft. Det er derfor viktig at den proteolytiske aktiviteten hele tiden reguleres, og holdes på et normalt nivå [29]. Regulering av proteaseaktiviteten gjøres blant annet ved å påvirke transkripsjon, syntetisere proteasene som inaktive enzymer og ved å hemme aktiv enzymer med endogene inhibitorer [28].

Proteaser er klassifisert i MEROPS databasen etter aminosyresekvensen i det aktive setet og formen på den tredimensjonale strukturen. Klassifiseringen i MEROPS er en hierarkisk klassifisering hvor proteasene deles inn i en av syv klasser basert på katalytisk type. De syv klassene er aspartat-, asparagin-, cystein-, glutamat-, metallo-, serin-, og treoninproteaser (fig. 1.4). De katalytiske klassene deles videre inn i klaner. Klanene består av proteaser med lignende tredimensjonal struktur som indikerer et felles opphav. Klanene beskrives med to bokstaver, hvor den første bokstaven indikerer katalytisk klasse. Klanene kan igjen deles inn i ulike familier. Familiene beskrives med en bokstav etterfulgt av et nummer, hvor bokstaven beskriver hvilken klan proteasen tilhører [33, 34].



Figur 1.4: Klassifisering av proteaser ifølge MEROPS databasen. Proteaser klassifiseres i en av syv klasser ut ifra katalytisk type. Klassene deles videre inn i klaner basert på likheter i den tredimensjonale strukturen til proteasene. Klanene inndeles i familier som er basert på likheter i aminosyresekvenser. Figur modifisert fra Rawlings et al. [33].

1.2.1 Proteaser og PDT

Studier indikerer at lysosomer og proteaser er involvert i mekanismer for celledød, enten ved å starte eller amplifisere mekanismer som fører til celledød [28]. Flere PS er kjent for å lokalisere i lysosomer og endosomer, og ved aktivering vil PS indusere skade og ødelegge membraner. Lysosomal ruptur, og påfølgende lekkasje av lysosomale enzymer, kan resultere i celledød. Det er ulike mekanismer som ligger bak induseringen av celledød, blant annet kan de lysosomale enzymene som blir frigjort skade cellulære komponenter slik at cellen dør. Ødeleggelse av endocytiske membraner er også vist å skape en opphopning av Ca^{2+} i cytosol, noe som fører til for høye nivåer av Ca^{2+} i mitokondriene, og dette vil indusere celledød [15].

De lysosomale enzymene har optimal aktivitet ved lav pH, men det er vist at visse cathepsiner, som for eksempel cathepsin B og L, fortsatt er aktive i cytosol hvor pH er rundt 7. Disse kan indusere celledød ved å aktivere pro-apoptotiske faktorer som Bax og Bid, og inaktivere anti-apoptotiske faktorer fra Bcl-2 familien. Cathepsiner kløyver bid til trunkert bid, som binder til mitokondriene og induserer frigjøring av cytokrom c. Cytokrom c vil aktivere apoptosomer og indusere apoptose [35]. Hvis en høy konsentrasjon av lysosomale enzymer blir frigjort skjer celledød via nekrose, men ved frigjøring av en moderat mengde enzymer er det apoptose som dominerer [36].

I hvor stor grad frigjøringen av lysosomale enzymer bidrar i den fototoksiske effekten av PDT er likevel usikker, da det er vist at PDT fører til hel eller delvis inaktivering av lysosomale enzymer [36, 37]. Inaktivering av lysosomale enzymer er vist ved bruk av fotosensitizere som blant annet «nile blue» derivater, TPPS₄ (meso-tetrafenylporfyrin), TPPS_{2a} og ALPcS_{2a} [37]. Hydrofile PS kan føre til fullstendig inaktivering av lysosomale enzymer, og ved bruk av hydrofile PS vil ikke enzymene påvirke den cytotoxiske effekten av PDT. Ved bruk av hydrofobe PS kan det kun bli en delvis inaktivering, og dermed kan cathepsiner som blir frigjort til cytosol bidra til cytotoxissiteten. Det er likevel vist at en delvis inaktivering av lysosomale enzymer ikke alltid er toksisk for cellene [37]. Kreftceller har ulik sensitivitet ovenfor PDT, og dette kan komme av den varierende mengden lysosomale enzymer, og den varierende graden av inaktivering ved lysosomal frigjøring. Det er også studier som tyder på at balansen mellom lysosomale enzymer, og deres inhibitorer kan påvirke den cytotoxiske effekten av PDT [36, 37].

1.3 Legumain

Legumain, også kalt asparaginyln endopeptidase (AEP), er en lysosomal cysteinprotease som spesifikt spalter peptidbindinger C-terminalt for aminosyren asparagin (Asn) [38]. Ved sure betingelser (pH<5) vil proteasen også spalte etter aspartat (Asp) [38, 39], og får dermed caspase-lignende effekt. Proteasen tilhører klan CD og familie C13, og er strukturelt beslektet med caspasene som tilhører klan CD og familie C14 (fig. 1.4) [40, 41]. Legumain skiller seg fra cathepsinene ved at den ikke inhiberes av E64 (trans-epoksysuksinyl-L-leukylamido-(4-guanidino)-butan), men den hemmes av inhibitoriske cystatiner som cystatin E/M og cystatin C [42, 43]. Proteasen ble først oppdaget i bønner på 1980-tallet, og i 1997 ble proteasen også funnet i pattedyr [41]. Legumain uttrykkes i de fleste vev i pattedyr, men finnes i spesielt høye nivåer i nyrer, placenta og testikler [40, 41]. I celler er proteasen hovedsakelig lokalisert i det endolysosomale systemet, hvor den blant annet er med på å degradere proteiner [40, 44].

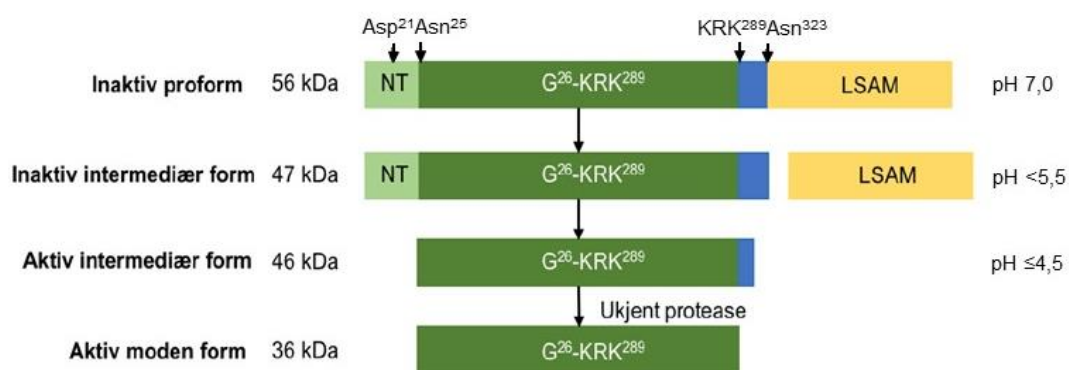
1.3.1 Syntese og aktivering av legumain

Legumain syntetiseres som et inaktivt proenzym (prolegumain; 56 kDa), som deretter autoaktiveres til en aktiv intermediær form (46 kDa), som videre prosesserer til aktiv moden form (legumain; 36 kDa) [40]. Prolegumain består av ulike domener, som er et N-terminalt propeptid (Val¹⁸-Asp²⁵), et katalytisk domene (Gly²⁶-Met²⁸⁶), og et C-terminalt prodomene som

deles inn i et aktiveringspeptid (AP; Lys²⁸⁷-Asn³²³) og et stabiliserings- og aktivitetsmodulerende-domene (LSAM; Asp³²⁴-Tyr⁴³³) (fig. 1.5). LSAM-domenet har en positiv ladning, mens det katalytiske setet er negativt ladet. LSAM stabiliserer prolegumain ved nøytral pH ved hjelp av elektrostatiske interaksjoner og blokkering av det aktive setet [40, 45, 46].

I det endolysosomale systemet hvor pH er lav (< 6,5) [47], vil prolegumain gjennomgå flere trinn av autoaktivering som fører til dannelsen av aktiv moden legumain (fig. 1.5) [46]. Den første autoaktiveringen skjer ved pH <5,5, hvor propeptidet fra C-terminal ende (LSAM) vil avspaltes ved Asn³²³ [45]. Det blir da dannet en inaktiv intermediær form av legumain på 47 kDa. Den intermediære formen er inaktiv fordi LSAM domene fortsatt er elektrostatisk bundet til enzymet. Ved enda lavere pH (pH < 4,5) vil det N-terminale propeptidet bli avspaltet ved Asp²¹ og Asn²⁵, og det blir dannet en aktiv intermediær form på 46 kDa. Ved avspalting av N-terminalt propeptid, vil også LSAM domene avspaltes, og enzymet blir da aktivt. Avspalting av LSAM domene er nødvendig for å oppnå full enzymatisk aktivitet [45].

Prosessering til moden, aktiv legumain (36 kDa) utføres ved proteolytisk spalting C-terminalt for KRK²⁸⁹. Hvilke proteaser det er som spalter enzymet er per i dag ikke kjent. Etter autoaktiveringen til moden aktiv legumain endres stabiliteten til enzymet. Prolegumain er stabil ved nøytral pH, men etter autoaktivering og prosessering til moden aktiv legumain er enzymet stabilt kun ved pH < 6. Ved høyere pH blir aktivt legumain irreversibelt denaturert [40].



Figur 1.5: Prosessering og aktivering av legumain. Inaktiv proform (56 kDa) blir ved pH <5,5 autoaktivert til en inaktiv intermediærform (47 kDa) ved avspalting av LSAM-domenet, C-terminalt for Asn³²³. Ved pH < 4,5 vil intermediær form (47 kDa) avspaltes N-terminalt for Asp²¹ og Asn²⁵, slik at det dannes en aktiv intermediær form (46 kDa). Den videre prosesseringen til moden aktiv legumain (36 kDa) gjøres av en eller flere ukjente proteaser. Figur modifisert fra Dall et al. (2016) [40].

1.3.2 Legumain ved normalfysiologi og sykdomstilstander

Legumain er hovedsakelig lokalisert intracellulært i endosomer og lysosomer, men enzymet har også blitt påvist i cellekjernen og ekstracellulært i for eksempel plasma [40, 48]. Legumain har en rekke ulike funksjoner i kroppen, både ved normalfysiologi og ved sykdomstilstander. Enzymet spiller en viktig rolle blant annet i immunsystemet, hvor det degraderer og prosesserer antigener for presentering for MHCII-komplekset [40, 49]. Legumain påvirker i tillegg den medfødte immunresponsen ved å aktivere «toll-like receptor 9» (TLR-9) i dendrittiske celler [50]. Det er også vist at enzymet er viktig for prosessering av andre cysteinproteaser som cathepsin B, H og L [42, 51]. Legumain prosesserer cathepsiner fra enkeltkjeder til dobbelkjeder [44]. I tillegg vil legumain aktivere matriks metalloproteinase (MMP) pro-MMP-2 [42].

Legumain spiller en rolle ved en rekke ulike sykdomstilstander som blant annet kreft (se kap. 1.3.3), aterosklerose, osteoporose og nevrodegenerative sykdommer [39, 40]. Ved aterosklerose vil proteaser som MMP-2 og cathepsin B, H og L bryte ned den ekstracellulære matriksen (ECM) og destabilisere det aterosklerotiske plakket. Ved å aktivere pro-MMP-2 er legumain med på å øke degradering av ECM [48]. I ustabile plakk er det vist et høyt nivå av legumain i områder rikt på fibrin [52], og det kan tyde på at enzymet også har en rolle ved direkte nedbrytning av ECM komponenter [48, 52]. Enzymet er også med og påvirker beinhomeostasen ved at legumain hemmer osteoblastdifferensieringen [40, 53]. Ved nevrodegenerative sykdommer som Alzheimer's sykdom, er det vist at pasienter rammet av sykdommen har et høyere nivå av aktivt legumain i hjernen (her kalt δ -sekretase) sammenlignet med friske. Legumain er med å kløyver både «amyloid precursor protein» (APP) og tau, og begge disse har en sentral rolle i sykdomsutviklingen ved Alzheimer's sykdom [54].

1.3.3 Legumain og kreft

Ved kreft er det en ubalanse mellom proteaser og deres inhibitor [55], og det er vist at høyt nivå av proteaser fremmer migrering av kreftceller, og gjør svulster mer invasive [56]. Ulike former for kreft, som brystkreft, tarmkreft og kreft i eggstokkene overuttrykker legumain [57], og mengden av enzymet er høyere i senere stadier av sykdommen [58]. Både *in vivo* og *in vitro* studier har vist at høyt nivå av legumain i svulster er forbundet med økt metastasering, mer invasiv form for kreft og dårligere prognoser [57, 59, 60].

Legumain finnes hovedsakelig i lysosomer og sene endosomer, men enzymet har også blitt funnet ekstracellulært [39]. I kreftceller er legumain lokalisert både i cellekjernen og cytosol [40], og i tillegg er enzymet blitt påvist utenfor kreftcellene i omkringliggende stromale celler og i tumor-assosierte makrofager (TAMs) [39]. Mikromiljøet rundt svulster er surt [61], og dermed kan prolegumain som skilles ut fra kreftcellene bli aktivert til moden legumain [39]. Legumain bidrar til kreftutvikling ved å aktivere proMMP-2 og prosessere ulike cathepsiner, som vil bryte ned ECM og bidra til metastasering og vekst inn i andre vev [57, 62].

Siden økt forekomst av legumain i kreftsvulster assosieres med økt metastasering og dårligere prognoser har enzymet blitt foreslått som en prognostisk faktor, og som et «legemiddeltarget» [60, 62]. Dyrestudier har vist at DNA vaksiner mot legumain kan brukes for å hemme vekst av brystkreftceller [63]. Egenskapene til legumain kan i tillegg utnyttes for å lage ulike «prodrugs», som aktiveres av ekstracellulært legumain i svulstens mikromiljø [60]. Det har blitt forsket på doksorubicin som et «prodrug». Ved å feste et substratpeptid på doksorubicin vil legemidlet være inaktivert, helt til legumain i svulstens mikromiljø spalter av den ekstra gruppen og gjør legemidlet aktivt igjen. På denne måten vil man redusere toksisitet og bivirkninger, fordi legemidlet kun aktiveres i nærheten av svulsten og ikke i friskt vev [64].

Som en lysosomal cysteinprotease kan legumain påvirke dødsmekanismene ved fotodynamisk terapi (PDT). Flere ulike fotosensitizere (PS) lokaliserer seg til endosomer og lysosomer, og ved belysning vil PS aktiveres og føre til at lekkasje i membranene [37]. De lysosomale cysteinproteasene vil da bli frigjort til cytosol, og dette kan være cytotoxisk for cellene [65, 66]. Hvilken rolle legumain har på effekten av PDT har det blitt forsket lite på.

1.4 Cystatin E/M

Cystatin E/M er en endogen inhibitor som tilhører cystatin-familien. Cystatiner deles inn i 3 grupper, det er type 1, type 2 og type 3 cystatiner [55]. Type 1 hemmer cathepsiner intracellulært, mens type 2 inneholder et signalpeptid som fører til sekresjon ut av cellen og disse virker derfor hovedsakelig ekstracellulært. Type 3 er intravaskulære kininogener [67]. Cystatin E/M tilhører type 2 cystatiner [68, 69], og inhibitoren hemmer både cathepsiner, og legumain. Flere type 2 cystatiner som cystatin C og cystatin F kan også hemme legumain, men cystatin E/M er mest potent. Cystatiner hemmer proteaser ved å danne reversible høy-affinitets komplekser som hindrer den proteolytiske aktiviteten til målenzymet [67]. Tap av den

hemmende effekten til cystatiner fører til uregulert protease aktivitet, og dette kan igjen føre til sykdommer [29].

Cystatin E/M har lenge blitt tenkt på som en tumorsuppressor, da det er vist at den hemmer vekst og metastasering ved brystkreft. Uttrykket av cystatin E/M er redusert i mange ulike kreftformer som brystkreft og prostatakreft, i tillegg observeres redusert uttrykk av inhibitoren i gliomaceller [55, 70]. Flere studier har vist at tap av den hemmende effekten til cystatin E/M fører til økt vekst av kreftceller, og mer metastasering [71].

2 Hensikt

Legumain er hovedsakelig en lysosomal cysteinprotease, som er vist å spille en rolle ved kreftutvikling. Økt forekomst av legumain er observert i flere former for kreft, og enzymet assosieres med økt metastasering og dårligere prognoser [59]. Det er i tillegg vist at cystatin E/M, en potent endogen hemmer av legumain, fungerer som en tumorsuppressor [71]. Fotodynamisk terapi (PDT) er en godkjent behandlingsmetode mot flere typer kreftformer. Fotosensitizerer brukt i PDT kan lokaliseres til lysosomale membraner. Ved belysning vil innholdet i lysosomene frigjøres til cytosol [37]. Målet med denne oppgaven er å videreføre tidligere observasjoner fra en masteroppgaven i farmasi (2018) [72] ved å:

- Studere og sammenligne internalisering av prolegumain eller cystatin E/M i ulike cellelinjer fra eggstokkreft eller normalvev.
- Studere cellulære effekter av PDT på legumain og cystatin E/M.
- Undersøke om legumain eller cystatin E/M påvirker celleviabiliteten etter PDT.
- Undersøke om legumain eller cystatin E/M påvirker celleproliferasjon av ulike cellelinjer.

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

3.1.1 Reagenser

Reagenser	Leverandør
5X stripping buffer	LI-COR Biosciences, Cambridge, England
Aceton, C ₃ H ₆ O	Merck, Darmstadt, Tyskland
Albuminstandard (23209)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Chameleon™ DUO Pre-stained Protein Ladder, proteinstandard (928-60000)	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
CHAPS C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S (C3023)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dinatrium-EDTA, Na ₂ C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ (00064)	Ferak, Berlin, Tyskland
DMSO, dimetylsulfoksid (CH ₃) ₂ SO (D8418)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DTT, ditiotreitoll, C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ (438117)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM), dyrkningsmedium (12-604F)	BioWhittaker®, Lonza Walkersville, Inc.
Etanol, rektifisert (96 %) C ₂ H ₅ OH (600051)	Antibac AS, Asker, Norge
Fosfatbufret saltvann (PBS) 1X, med kalsium og magnesium (D8662)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fosfatbufret saltvann (PBS) 1X, uten kalsium og magnesium (D8537)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Føtalt kalveserum, FBS (lot: 42G6195K)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
G418 disulfalt saltløsning, Gentamicin® aminoglykosidantibiotika, 50 mg/ml (G8168)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Geit anti-human polyklonalt antistoff mot cystatin E/M (AF1286)	R & D Systems, Minnesota, USA
Geit anti-human polyklonalt antistoff mot legumain (AF2199)	R & D Systems, Minnesota, USA
HEK-293 celler (CRL-1573)	American Type Culture Collection (ATCC), Virginia, USA

Human Total Legumain DuoSet ELISA (DY4769)	R&D systems, Minnesota, USA
Intercept® Blocking Buffer (927-60001)	LI-COR Biosciences, Cambridge, England
IRDye® 800 CW Esel anti-geit immunoglobulin (926-32214)	LI-COR Biosciences, Cambridge, England
IRDye® 800 CW Esel anti-mus immunoglobulin (926-32212)	LI-COR Biosciences, Cambridge, England
Kondisjonert medium fra HEK293-celler (kontroll)	Tillaget i laboratoriet av overingeniør Hilde Nilsen
Kondisjonert medium fra M38L-celler (rikt på prolegumain)	Tillaget i laboratoriet av overingeniør Hilde Nilsen
Kondisjonert medium fra M4C-celler (rikt på cystatin E/M)	Tillaget i laboratoriet av overingeniør Hilde Nilsen
McCoy's 5a Medium (M9309)	Sigma-Aldrich Life Science
MTT C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S	Sigma-Aldrich Life Science
Mus anti-human monoklonalt antistoff mot GAPDH (Sc-47724)	Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, USA
NewBlot™ Nitro Stripping Buffer, 5x (929-40030)	LI-COR Biosciences, Cambridge, England
NuPAGE® Antioksidant (NP0005)	Thermo Fisher Scientific Inc
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (NP0007)	Thermo Fisher Scientific Inc
NuPAGE® MOPS SDS Running buffer (20x) (NP0001)	Thermo Fisher Scientific Inc
Penicillin-Streptomycin (10 000 E/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin) (P4333)	Sigma-Aldrich Life Science
Ponceau S løsning C ₂₂ H ₁₂ N ₄ Na ₄ O ₁₃ S ₄ (P7170)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Reagent diluent (RD) concentrate (10X) (DY995)	R&D systems
SKOV-3-celler (HTB-77)	American Type Culture Collection (ATCC), Virginia, USA
Substrat Reagent Pack (DY999)	R&D systems
Svovelsyre H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Tyskland
TPSC _{2a} , fotosensitizer (Amphinex)	PCI Biotech AS, Oslo, Norge
Trypanblått 0,4 % (T10282)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Trypsin-EDTA (T3924)	Sigma-Aldrich
Tween® 20 (170-6531)	Bio-Rad Laboratories

Z-Ala-Ala-Asn-AMC, legumainsubstrat	Bachem, Bubendorf, Sveits
Zeocin™ 100 mg/ml (46-0509)	InVitrogen, Thermo Fisher Scientific

3.1.2 Utstysrliste

Utstyr	Leverandør
Bio-Rad PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
BioHit Optifit tip pipettespisser (10, 200 og 1000 µl)	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Finland
Costar® 5 ml pipette (4051)	Corning Inc., NY, USA
Costar® 10 ml pipette (4101)	Corning Inc., NY, USA
Costar® 25 ml pipette (4251)	Corning Inc., NY, USA
Costar® 96-brønners mikroplate (3598)	Corning Inc., NY, USA
Costar® 96-brønners mikroplate, svart (3915)	Corning Inc., NY, USA
Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen, Thermo Fisher Life Technologies
Eppendorfrør (1,5-, 2- og 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Finnpipette™	Thermo Fisher Scientific
Finnpipette™ F1 Multichannel	Thermo Fisher Scientific
Gen5™ Data Analysis Software	BioTek Instruments, Inc.
Glasstic Slide (87144E)	KOVA®, Garden Grove CA, USA
Heraeus™ Fresco™ 21 sentrifuge (75002426)	Thermo Fisher Scientific
LumiSource® (blått lys, 435 nm)	PCI Biotech AS, Oslo
Nunc™ EasYFlasks™ dyrkningsflaske (75 cm ² og 175 cm ²)	Thermo Fisher Scientific
Nunc™ MicroWell™ 96-brønners brett (167008)	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Danmark
Nunc™ Multidishes 6 brønners brett (140675)	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel Ferdigstøpt gradientgel til gelelektroforese (NP0322)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Odyssey® CLx Near-Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences
PowerWave™ XS2 Microplate Spectrophotometer	BioTek Instrumentes Inc., Winooski, VT, USA.
Rotina 380R Sentrifuge	Hettich, DJB Labcare Ltd
Sarstedt® sentrifugerør 15 ml (62.554.502)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Tyskland

Sarstedt® sentrifugerør 50 ml (62.547.254)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Tyskland
The Belly Dancer	Stovall Life Science, Greensboro, NC, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer system	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trans-Blot® Turbo RTA Transfer Kit, nitrocellulose, mini. Blottepapir, nitrocellulose membrane og 5x blottebuffer (1704270)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Victor™ X4 Multimode Plate Reader, mikroplateleser (2030-0050)	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA
XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System, elektroforesekar	Life Technologies, Paisley, Storbritannia

3.2 Celledyrking

3.2.1 Cellelinjer

HEK-293-celler

HEK293, humane embryonale nyreepitelceller, er en adherent cellelinje som er etablert fra et abortert foster. Cellene er permanent transformert ved eksponering for en del av DNA-et til adenovirus type 5 [73], og dette forhindrer cellene i å gå i apoptose. HEK293-celler er klassifisert som «biosafety level 2» (BSL-2). I denne masteroppgaven dyrkes cellene i DMEM med glukose (4,5 g/l) og L-glutamin (4 mM), som ble tilsatt føtalt kalveserum (FBS) til en sluttkonsentrasjon på 10 %, 100 E/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin (Vedlegg A, 1.1).

M38L-celler

M38L er en monoklonal cellelinje som overuttrykker legumain. Cellelinjen ble dannet ved å transfektere HEK293-celler med humant cDNA for legumain (*LGMN*) i en plasmidvektor (pcDNA3.1) [68]. Plasmidvektoren inneholder i tillegg et resistensgen for antibiotikumet gentamycin (G418), dette for å hindre oppvekst av ikke-transfektete celler [68]. Cellene dyrkes i HEK293-medium som ble tilsatt G418 til en sluttkonsentrasjon på 800 µg/ml.

M4C-celler

M4C er en monoklonal cellelinje som overuttrykker cystatin E/M, og cellene ble dannet ved å transfektere HEK293-celler med humant cDNA for cystatin E/M i en pTracer plasmidvektor

[68]. For å hindre oppvekst av ikke-transfektete celler inneholder plasmidvektoren et resistensgen for antibiotikumet phleomycin (ZeocinTM) [68]. Cellene dyrkes i HEK293-medium som ble tilsatt ZeocinTM til en sluttkonsentrasjon på 150 µg/ml.

SKOV-3-celler

SKOV-3 er en adherent epitelcellelinje fra adenokarsinom i eggstokk, som er etablert fra en 64 år gammel kvinne. Cellene er klassifisert som «biosafety level 1» (BSL1). I denne oppgaven blir cellene dyrket i McCoy's medium med L-glutamin (0,21 g/l) og bikarbonat (2,2 g/l), som ble tilsatt FBS til en sluttkonsentrasjon på 10 %, 100 E/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin (Vedlegg A, 1.2).

3.2.2 Frysing og tining av celler

Levende celler har enten blitt oppbevart på en nitrogentank ved -196 °C, eller i en dypfryser ved -80 °C. Ved nedfrysningen blir cellesuspensjonen tilsatt det kryobeskyttende stoffet dimetylsulfoksid (DMSO). Dette sørger for at vann trekkes ut av cellene ved nedfrysningen, slik at dannelsen av intracellulære iskrystaller blir hindret. Intracellulære iskrystaller kan føre til lysering av cellene, og dette må unngås. Frysing av cellene brukt i denne oppgaven ble utført av overingeniør Hilde Nilsen, eller seksjonsingeniør Ane Sofie Viset Fremstedal.

Ved tining av cellene tas cellebeholderen ut av fryseren og cellesuspensjonen tines raskt ved 37 °C. Cellesuspensjonen overføres til et rør med 15 ml dyrkningsmedium, og sentrifugeres ved 1000 rpm i 5 min. Sentrifugeringen gjennomføres for å fjerne rester av DMSO, som vil virke toksisk på celler i kultur. Etter sentrifugering suges supernatanten forsiktig av, og cellepelletten resuspenderes i 5 ml dyrkningsmedium. Cellesuspensjonen overføres deretter til en 75 eller 175 cm² celleflasken, som er fylt med henholdsvis 10 eller 30 ml oppvarmet dyrkningsmedium. Cellene står i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO₂ til de har nådd en tetthet rundt 70-80 %, og er klare for å splittes. Cellene bør splittes 2-3 ganger før de brukes i forsøk.

3.2.3 Dyrking og splitting av celler

Cellene blir splittet når tettheten i celleflasken er rundt 70-80 %, omtrent 2 ganger i uken. Ved splitting av cellene blir medium sugd av, før cellemonolaget vaskes med 3-5 ml fosfatbufret saltvann (PBS) uten kalsium og magnesium (Vedlegg A, 2.1). Dette gjøres fordi det er viktig å fjerne alle rester av serum, da dette inneholder proteaseinhibitorer som α1-

antitrypsin, som inaktiverer trypsin. Etter vask med PBS blir det tilsatt trypsin, og cellene blir inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i rundt 5 minutter for at trypsin skal virke og cellene løsne raskere. Mengden trypsin avhenger av flaskestørrelsen, for en flaske på 75 cm² blir det brukt 2-3 ml oppvarmet trypsin, mens for en 175 cm² blir det brukt rundt 4 ml. Cellene kontrolleres visuelt i mikroskopet for å undersøke om de har løsnet. Hvis cellene ikke har løsnet kan flasken bankes forsiktig et par ganger. Når cellene har løsnet tilsettes 5 ml medium med serum for å inaktivere trypsin. Cellene splittes i ønsket tetthet til forsøk, eller overføres til nye mediumflasker med nytt medium for videre dyrkning. Hvor mye medium det er i flaskene avhenger av størrelsen, for flaskene på 75 cm² ble det brukt 25 ml medium. Ved splitting for videre dyrking blir SKOV-3 cellene som regel splittet 1:8, mens HEK293 cellene splittes 1:10.

3.2.4 Celletelling

Celletelling blir utført ved hjelp av en automatisk celleteller, CountessTM II (Farmasøytisk institutt). Trypanblå blir tilsatt et uttak av cellekulturen for å skille mellom levende og døde celler. Trypanblå vil farge døde celler blå, mens levende celler forblir ufarget fordi fargestoffet ikke klarer å trenge gjennom en intakt cellemembran [13]. For celletellingen blandes 10 µl trypanblå og 10 µl cellesuspensjon, og 10 µl av denne blandingen overføres til et tellekammer. Tellekammeret plasseres i den automatiske celletelleren, som regner ut antall levende celler/ml.

Celletelling utføres i noen tilfeller ved bruk av et Glasstic® Slide tellekammer med hemocytometer tellegitter (Radiumhospitalet). For celletelling overføres 10 µl av cellesuspensjonen til et tellekammer som legges under et mikroskop. Tellegitteret har ni ruter, og antall celler i 3 diagonale ruter telles. For å finne konsentrasjonen i antall celler /ml cellesuspensjon bruker man formelen vist i figur 3.1.

$$\frac{\text{Antall celler}}{3} * 10\ 000 = \text{celler/ml}$$

Figur 3.1: Formel for beregning av antall celler/ml cellesuspensjon. Formelen brukes ved celletelling med Glasstic® Slide tellekammer med hemocytometer tellegitter. Antall celler i tre ruter telles, og gjennomsnittet av dette antallet ganges med 10 000.

3.2.5 Produksjon av kondisjonert medium som reagens

I denne oppgaven blir serumfritt kondisjonert medium (KM) fra HEK293-, M38L- og M4C-celler brukt for stimulering av SKOV-3- og HEK293-celler. Ved tillaging av KM sås det ut rundt 1 million celler per 75 cm² celleflasker. Cellene inkuberes i 4 dager eller til 75-90 % konfluens, og deretter byttes gammelt medium til serumfritt HEK293-medium. Cellene står i ytterligere 3 dager før KM høstes. KM sentrifugeres i 5 min ved 800 rpm. KM fordeles på flere rør, og fryses ned for senere bruk.

Tillagingen av kondisjonerte media ble utført av overingeniør Hilde Nilsen.

3.2.6 Høsting av kondisjonert medium og cellelysat

Før høsting av kondisjonert medium (KM) og cellelysat undersøkes cellene for morfologiske forandringer og adherens i mikroskop.

Høsting av kondisjonert medium

Medium suges forsiktig av cellene og overføres til 1,5 ml Eppendorfrør. Rørene sentrifugeres i 5 min ved 800 rpm. Etter sentrifugering overføres supernatanten til nye 1,5 ml Eppendorfrør, fryses og lagres ved -20 °C frem til analyser.

Høsting av cellelysat

Før høsting av cellelysat vaskes cellene forsiktig en gang med 1 ml 1X PBS, før det tilsettes 500 µl lysisbuffer (Vedlegg A, 2.3) i hver brønn. Cellene kontrolleres i mikroskop for å sjekke at de faktisk har løsnet. Cellelysat suges opp og overføres til 1,5 ml Eppendorfrør. Cellelysat fryses og tines 3 ganger, hvor det fryses ved -80 °C i 15 min og tines ved 30 °C på varmeblokk. Etter dette sentrifugeres lysatene i 5 min ved 10 000 g og 4 °C. Etter sentrifugering overføres supernatanten til nye Eppendorfrør, før det fryses og lagres ved -20 °C frem til analyser.

3.2.7 Eksponering av SKOV-3- og HEK293-celler for kondisjonerte media

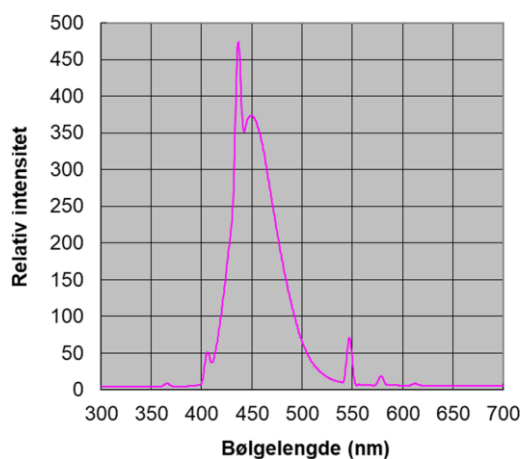
SKOV-3- og HEK293-celler ble i denne masteroppgaven eksponert for 75 % v/v kondisjonert medium fra enten HEK293-, M38L- eller M4C-celler i 48 timer. Siden KM er serumfritt ble dyrkningsmediet før bruk tilsatt ekstra serum (FBS). Kondisjonert medium fra M38L

inneholder sekretert prolegumain, mens kondisjonert medium fra M4C inneholder sekretert cystatin E/M. Kondisjonert medium fra HEK293 blir brukt som kontroll. Konsentrasjonen av legumain i M38L-mediet ble analysert ved hjelp av ELISA av overingeniør Hilde Nilsen.

3.3 Fotodynamisk terapi *in vitro*

3.3.1 Fotosensitizer og belysning

Fotosensitizeren (PS) brukt i denne oppgaven var disulfonert tetrafenylklorin (TPCS_{2a}, 0,35 mg/ml, Amphinex[®]). Dette er en lyssensitiv forbindelse, og alle forsøk som involverer TPCS_{2a} ble utført i dempet belysning. Fotodynamisk terapi (PDT) ble utført med lampen LumiSource[®] som består av fire 18 W Osram L 18/67 standard lysrør [74]. Lampen avgir blått lys med emisjonsmaksimum på 435 nm (fig. 3.2). Lyset avgir en homogen stråling over en belysningsoverflate på 45 x 17 cm. Lampen er utstyrt med en vifte for å hindre at lyseksponeerte celler utsettes for hypertermi. Viften sørger også for å opprettholde en konstant irradians. Lampen ble skrudd på minimum 15 minutter før belysning av behandlede celler, for å sikre en homogen belysning.



Figur 3.2: Emisjonsspektrum fra LumiSource[®]. Figur er produsert og gjort tilgjengelig av professor Kristian Berg.

3.3.2 Prosedyre for PDT

PDT-forsøk utføres enten i 96-brønners mikroplate eller 6-brønnersbrett. For HEK293- M38L- og M4C-celler blir det sådd ut 5000 celler/brønn ved bruk av 96-brønners mikroplate, og 500 000 celler/brønn for 6-brønnersbrett. Ved bruk av SKOV-3-celler ble det sådd ut 3000

celler/brønn til 96-brønners mikroplate, og 200 000 celler til 6-brønners brett. I denne oppgaven ble cellene eksponert for ulike kondisjonerte media før behandling med PDT. Prosedyren starter med utsåing av cellene, og 5-6 timer etter utsåing ble cellene eksponert for kondisjonert medium. Vanlig dyrkningsmedium suges av, og erstattes med 75 % v/v kondisjonert medium. Ett døgn etter ble cellene i tillegg inkubert med 0,4 µg/ml TPCS_{2a} i 18 timer. Cellene ble tilsatt kondisjonert medium med TPCS_{2a}, mens kontrollcellene ble tilsatt rent kondisjonert medium. Dagen etter ble brønnene vasket to ganger med 1X PBS med kalsium og magnesium (Vedlegg A, 2.2), før nytt 75 % v/v kondisjonert medium tilsettes. Cellene plasseres i inkubator i 4 timer for å vaske ut PS fra plasmamembranen. Etter 4 timer ble ønsket lysdose gitt ved hjelp av Lumisource[®], før cellene settes tilbake i inkubatoren ved 37 °C og 5 % CO₂. Etter 48 timer ble celleviabilitet målt ved MTT-assay. For måling av legumainaktivitet etter PDT ble cellene lysert 30 minutter etter belysning.

3.4 Måling av celleviabilitet ved MTT-assay

MTT-assay er en metode som brukes for å måle celleviabiliteten. Metoden baserer seg på at de fleste celler har konstant mitokondriell dehydrogenase-aktivitet, og en økning eller reduksjon i antall levende celler vil ha en direkte sammenheng med mitokondriell aktivitet i cellene. Ved tilsetning av MTT-reagens (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5 difenyl tetrazolium bromid) vil levende celler omdanne tetrazolium-saltet til uløselige formazankrystaller, som er fiolette. Konsentrasjonen av formazankrystaller finnes ved å løse opp krystallene og måle optisk tetthet. Konsentrasjonen av formazankrystaller gir et indirekte mål på viabiliteten av cellene. Høy celleviabilitet vil gi høy dannelse av formazankrystaller på grunn av høy mitokondriell aktivitet, og *vice versa* [75].

I denne oppgaven ble MTT-løsning tilsatt cellene 48 timer etter PDT. Cellemediet byttes ut med 0,25 mg/ml MTT-reagens, før cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 3-4 timer, avhengig av hvor raskt formazankrystallene dannes. Etter dette suges MTT-reagenset av med en mikropipette, og 100 µl DMSO tilsettes for å løse opp formazankrystallene. For å sikre at krystallene løses opp, settes brettet til risting i rundt 15 minutter. Når krystallene er oppløst måles den optiske tettheten ved 570 nm i et spektrofotometer (PowerWave[™] XS2). Som blindprøve brukes MTT-reagens tilsatt i tomme brønner og som følger hele prosedyren, og avlest verdi trekkes fra absorbansmålingene til prøvene.

3.5 Måling av celleproliferasjon ved IncuCyte® FLR

IncuCyte® FLR gir en mulighet for å observere cellevekst over tid ved å analysere fasekontrast bilder tatt ved gitte tidsintervaller. Et mikroskop er plassert inne i en inkubator, og alle bilder sendes til en ekstern datamaskin hvor bildene prosesseres. Celleproliferasjonen undersøkes ved å analysere konfluens i cellebrønnene over tid. Datamaskinen registrerer hvor mye av cellebrønnen som er dekket av celler, og økende konfluens kan brukes som et indirekte mål for proliferasjonen.

IncuCyte® FLR ble brukt for å sjekke celleproliferasjonen til HEK293-, M38L-, M4C- og SKOV-3-celler. HEK293-, M38L- og M4C-celler ble sådd ut i 96-brønners brett, med 3000 og 5000 celler/brønn, og plassert direkte i IncuCyte® FLR. HEK293- og SKOV-3-celler som skulle få tilsatt kondisjonert medium ble sådd ut i 96-brønnersbrett og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 4-5 timer slik at de festet seg. For HEK293-celler ble det sådd ut 3000 og 5000 celler/brønn, og for SKOV-3-celler ble det sådd ut 1500 og 3000 celler/brønn. Når cellene hadde festet seg ble dyrkningsmedium byttet ut med 75 % v/v kondisjonert medium. Etter tilsetning av kondisjonert medium ble cellene plassert i inkubatoren koblet til IncuCyte® FLR systemet. Det ble tatt et bilde av hver brønn hver tredje time, og cellene undersøkes over totalt 70 timer.

3.6 Måling totalprotein

For måling av totalprotein ble det benyttet en metoden beskrevet av Bradford [76]. Metoden baserer seg på at Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) i sur løsning vil binde seg til aminosyrer som arginin, tryptofan, tyrosin, histidin og fenylalanin i proteiner. Ved binding til proteiner vil CBBG endre farge fra brun til blå, og dette gir endring i absorpsjonsmaksimum fra 464 til 595 nm. Dannelse av CBBG-protein-kompleks vil gi økt absorbans, og konsentrasjonen av totalprotein bestemmes ved måling av absorbans ved 595 nm i en mikroplateleser.

Absorbans ved Bradfordmetoden er ikke lineær med konsentrasjonen av totalprotein, fordi absorpsjonsspektrene av fri og kompleksbundet CBBG overlapper. Det lages derfor en standardkurve med bovint serum albumin fortynnet i lysisbuffer i konsentrasjonene 0, 50, 100, 200, 300 og 400 µg/ml. Mengden totalprotein i en ukjent prøve vil beregnes ut ifra denne standardkurven.

Til en transparent 96-brønners mikroplate tilsettes 10 µl av hver standardkonsentrasjon og cellelysatprøve i triplikat. Til standarder og prøver tilsettes 200 µl fargereagens fortynnet 1:5 i destillert vann (Vedlegg A 3.1). Etter tilsetting av fargereagens står platen i romtemperatur i 5 minutter før den plasseres i mikroplateleseren for måling av absorbans ved 595 nm. Ved høy konsentrasjon av totalprotein kan det være nødvendig å fortynne cellelysaten, da konsentrasjonen må være innenfor standardkurven. Før totalproteinmåling i denne oppgaven ble prøvene fortynnet 1:3.

Måling av totalprotein blir utført for å korrigere legumainaktivitet med konsentrasjonen av totalprotein (kap 3.7), og for å beregne mengde cellelysat til acetonfelling før gelelektroforese og immunoblotting (kap 3.8).

3.7 Måling av legumainaktivitet

For å beregne aktivitet av legumain brukes metoden beskrevet av Chen et al. og Johansen et al. [41, 77]. Peptidsubstratet Z-Ala-Ala-Asn-AMC blir benyttet ved målingene, dette er ansett som et selektivt substrat for legumain som vil spalte av gruppen AMC (aminometylkumarin). AMC har høyere fluorescens når det er fritt enn når den er bundet, og ved avspaltning vil det produseres et fluorescerende signal som kan måles i en mikroplateleser. AMC har en eksitasjonsbølglengde på 342 nm og en emisjonsbølglengde på 460 nm. Økning i fluorescens er et mål på enzymaktiviteten i prøven. Siden hastigheten av enzymaktivetsreaksjoner er temperaturavhengige holdes temperaturen konstant på 30 °C ved måling av legumainaktivitet.

Legumainaktivitet ble målt i cellelysat fra HEK293-, M38L-, M4C- og SKOV-3-celler. Det ble ikke tilsatt noen proteasehemmer ved målingene av legumainaktivitet.

Til et svart 96-brønners brett tilsettes 20 µl blankprøve (lysisbuffer, vedlegg A 2.3) og 20 µl av lysatprøvene i triplikater. Brettet plasseres i en mikroplateleser (Victor™ X4). Til hver brønn vil det automatisk tilsettes 100 µl assaybuffer (Vedlegg A, 4.1), som er tilsatt ditiotreitoll (DTT) til en sluttkonsentrasjon på 1 mM. DTT er et reduksjonsmiddel som reduserer tiolgruppen i cysteinproteaser, og dette er nødvendig for å aktivere enzymet. Etter tilsetting av assaybuffer ventes det i 10 minutter før 50 µl substratopløsning (Z-Ala-Ala-Asn-AMC) automatisk tilsettes og fluorescensmålingene begynner. Enzymaktiviteten beregnes automatisk av mikroplateleseren som endring i fluorescens per sekund (dF/sek). Ved analyser av cellelysat fra

HEK293-, M4C- og SKOV-3-celler måles kinetikken over en time, mens ved analyse av M38L cellelysats måles kinetikken over 10 minutter.

3.8 Gelelektroforese og immunoblotting

3.8.1 Acetonfelling av totalprotein i cellelysats

Før gjennomføring av gelelektroforese er det nødvendig å måle totalprotein (kap. 3.6) og oppkonsentrere cellelysatsene til en forhåndsbestemt mengde protein. Dette for å sikre at lik mengde totalprotein ble applisert i hver brønn på gelen. I denne oppgaven ble cellelysatsene oppkonsentrert til 0,67 µg/µl.

Utfelling av proteiner ble gjort ved acetonfelling. Iskaldt aceton blandes med cellelysats i forholdet 80:20 før inkubering i 60 min ved -20 °C for å utfelle proteinene. Etter inkubering sentrifugeres prøvene i 20 min ved 15 000 g og 4 °C, før supernatanten avpippeteres og kastes. Proteinpelleten som er igjen tørkes i rundt 20 minutter, før tillaging av gelelektroforeseprøver (kap. 3.8.2).

3.8.2 Tillaging av gelelektroforeseprøver

For tillaging av gelelektroforeseprøver blir det benyttet destillert vann, DTT og «NuPAGE®LDS Sample Buffer 4X» (prøvebuffer). DTT er et reduksjonsmiddel som reduserer disulfidbindinger i proteiner. Prøvebufferen inneholder litiumdodecylsulfat, og vil sørge for at proteinene i prøven blir denaturert og får en uniform negativ ladning. Den uniforme negative ladningen vil sørge for at proteinene vandrer mot positivt ladet pol, og at separasjonen på gelen kun avhenger av molekylstørrelse (kDa).

Proteinpelleten fra acetonfellingen (kap. 3.8.1) løses i 13 µl destillert vann, 2 µl DTT (0,5 M) og 5 µl 4X prøvebuffer til et totalvolum på 20 µl. For å sørge for at proteinene er helt denaturert varmes prøvene i 10 min ved 70 °C.

3.8.3 Gelelektroforese

I denne oppgaven blir proteinene separert ved hjelp av en vertikal polyakrylamid-gelelektroforese (PAGE). Proteinprøvene blir applisert i brønner på gelen, og ved hjelp av

gelens porøsitet og elektrisk spenning vil proteinene vandre mot anoden og separeres basert på molekylstørrelse. Ved kjøring av elektroforese i denne oppgaven benyttes ferdigstøpt gradientgel av polyakrylamid (4-12 %) med 12 brønner. Gelen plasseres i et elektroforesekar som fylles med 800 ml elektroforesebuffer (Vedlegg A 5.2). Til én brønn tilsettes 5 µl av proteinstandard Chamleon™ Duo Pre-Stained Protein Ladder. Til de øvrige brønnene appliseres 15 µl proteinprøve (10 µg totalprotein). Før elektroforesen starter tilsettes 500 µl antioksidant (NuPAGE®) til det indre karet. Elektroforesen kjøres ved konstant spenning på 200 V i 50 min.

3.8.4 Immunoblotting

Immunoblotting brukes for å detektere proteiner som er separert ved gelelektroforesen. Proteiner separert på gelen overføres til en nitrocellulosemembran ved bruk av elektrisk strøm [78]. Detekteringen av proteinene er basert på en antigen-antistoffreaksjon, hvor det tilsettes et primærantistoff som binder til et spesifikt protein. Deretter tilsettes et sekundærantistoff som binder spesifikt til primærantistoffet. Sekundærantistoffet har en infrarød fluorescerende gruppe som kan detekteres ved 700 eller 800 nm ved skanning med Odyssey® CLx Near-Infrared Imaging System (LI-COR).

Etter gelelektroforese fuktes nitrocellulosemembran og filterpapir med blottebuffer (vedlegg A 5.2) i et par minutter før de legges sammen som en sandwich etter Hoefers metoden [79]. Godt fuktet filterpapir plasseres i bunnen, og nitrocellulosemembranen plasseres oppå denne. Deretter kan elektroforesegelen forsiktig løsnes fra elektroforeseplaten, stackingelen fjernes, og gelen plasseres oppå nitrocellulosemembranen. Et fuktet filterpapir legges forsiktig over gelen. Det er viktig å unngå luftbobler mellom de ulike lagene. Proteiner blir overført fra gelen til membranen ved å plassere sandwichen i en blottemaskin (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System) ved 25 V i 30 min.

Membranen farges i et minutt med Ponceau S for visualisering og fotografering av proteiner som er overført fra gel til membran. Fargen fjernes deretter ved skylling med først destillert vann, og så 1X TBS (Vedlegg A, 5.3).

Etter blotting er det viktig å blokkere membranen med blokkeringsbuffer, for å hindre uspesifikk binding av primærantistoff. Membranen legges i blokkeringsbuffer i 60 minutter ved romtemperatur og vipping. Løsningen helles så av og membranen plasseres i et 50 ml

sentrifugerør som inneholder primærantistoff fortynnet i en 1:2 blanding med blokkeringsbuffer og vaskebuffer (tabell 3.1). Sentrifugerøret med membranen settes i kjøleskap med vipping over natten.

Tabell 3.1: Oversikt over primærantistoffer brukt for immunoblotting

Protein	Primærantistoff	Fortynning
Legumain	Geit anti-human polyklonalt antistoff mot legumain	1:200
Cystatin E/M	Geit anti-human polyklonalt antistoff mot cystatin E/M	1:250
GAPDH	Mus anti-human monoklonalt antistoff mot GAPDH	1:10 000
β-aktin	Kanin monoklonalt antistoff mot beta-aktin	1:5000

Tabell 3.2: Oversikt over sekundærantistoffer brukt for immunoblotting

Sekundærantistoff	Fortynning
IRDye [®] 800CW Esel anti-geit	1:10 000
IRDye [®] 800 CW Esel anti-mus	1:10 000
IRDye [®] 800CW Esel anti-kanin	1:10 000

Etter inkubering over natt med primærantistoff vaskes membranen 3 ganger 5-15 minutter med vaskebuffer (vedlegg A 5.4) ved romtemperatur og vipping. Deretter inkuberes membranen i 10 ml sekundærantistoff fortynnet i 1:2 blanding av blokkeringsbuffer og vaskebuffer (tabell 3.2) i 60 minutter. Etter inkubering med sekundærantistoff vaskes membranen 3-4 ganger 5-15 minutter med vaskebuffer, før den skylles en gang med 1X TBS og tørkes mellom filterpapir. Etter tørking skannes membranen ved 800 nm med Odyssey[®] CLx Near-Infrared Imaging System (LI-COR) og infrarød fluorescerende gruppe detekteres som grønt signal.

3.8.5 Reblotting

En membran kan benyttes for deteksjon av flere proteiner, men da må primær- og sekundær antistoffene fra forrige deteksjon fjernes. Ved reblotting skylles membranen først en gang med 1X TBS, før den inkuberes med 10-15 ml strippebuffer (vedlegg A, 5.5) i 15 min. Etter inkubering vaskes membranen 3-4 ganger i 5-15 minutter med vaskebuffer (vedlegg A, 5.4), før den skylles en gang med 1X TBS. Etter vasking kan membranen blokkeres på nytt som beskrevet over (3.8.4), og deretter inkuberes med nytt primær- og sekundærantistoff.

3.9 ELISA

Konsentrasjonen av legumain i kondisjonert medium analyseres ved bruk av «Enzyme-linked immunosorbent assay» (ELISA). For analysen ble det brukt et kommersielt ELISA-kit, og metoden som ble benyttet er sandwich-ELISA. Metoden baserer seg på at et spesifikt antistoff adsorberes på en transparent 96-brønners mikroplate, og antigenet fra prøven som skal analyseres adsorberes til det spesifikke antistoffet [80].

Til en 96-brønners mikroplate tilsettes 100 µl «Capture Antibody», som er fortynnet til 2 µg/ml i 1X PBS. Platen dekkes med en plastfilm og inkuberes over natten ved romtemperatur. Neste dag suges antistoffet av og kastes, og brønnene vaskes tre ganger med 400 µl vaskebuffer (0,05 % Tween i 1X PBS). For å blokkere uspesifikke bindingssteder tilsettes deretter 300 µl «Reagent Dilution», som inneholder albumin, til hver brønn. Mikroplaten dekkes med en plastfilm og settes til inkubering i en time ved romtemperatur, før den igjen vaskes tre ganger med vaskebuffer. Etter vask tilsettes 100 µl av standard (0-2000 pg/ml fortynnet i RD) og prøver. Prøvene fra M38L fortynnes fra 1:250 til 1:2000. Platen dekkes igjen med en plastfilm og inkuberes i to timer ved romtemperatur. Legumain i prøvene vil binde seg til «Capture Antibody». Etter inkubering vaskes platen 3 ganger med vaskebuffer før det tilsettes 100 µl av «Detection antibody» fortynnet i RD til 0,05 µg/ml. Platen settes igjen til inkubering i to timer ved romtemperatur. «Detection antibody» vil binde seg til legumain, slik at det dannes en sandwich mellom «Capture antibody», legumain og «Detection antibody». Platen vaskes igjen som tidligere beskrevet, før det tilsettes 100 µl av streptavidin- «horseradish peroxidase» fortynnet 1:200 i RD. Platen settes til inkubering ved romtemperatur i 20 minutter, før den igjen vaskes tre ganger med 400 µl vaskebuffer. Etter vask tilsettes 100 µl substratløsning, og igjen settes platen til inkubering. Etter 20 minutter tilsettes 50 µl stoppløsning i hver brønn, og platen

dunkes forsiktig for å sikre god blanding. Absorbans måles ved 450 nm i en mikroplateleser (Victor™ x4).

Analysene av konsentrasjon av legumain i kondisjonert medium fra M38L-celler ble utført av overingeniør Hilde Nilsen.

3.10 Statistiske analyser

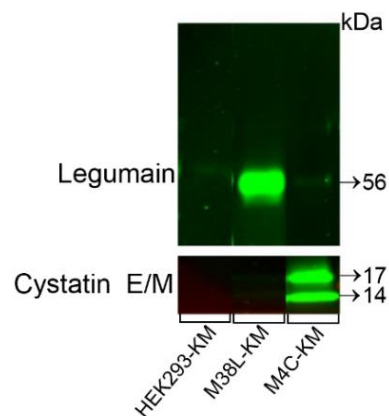
I denne oppgaven er talldata presentert som gjennomsnitt \pm standardfeil (SEM). Gjennomsnittet er beregnet ut ifra antall gjentakelser av forsøk, og antallet (n) varierer fra 1-3. Statistiske analyser ble kun utført hvis forsøket var repetert 3 ganger. Signifikansnivå ble valgt til $p < 0,05$. Tosidig uparet t-test er anvendt som statistisk metode. Noen av forsøkene ble analysert med en multippel tosidig uparet t-test, og disse er korrigerert med Bonferroni-Dunn korreksjon. Signifikante forskjeller er angitt i figurene med en stjerne (*) for $p < 0,05$, og to stjerner (**) ved $p < 0,01$. De statistiske analysene ble beregnet med GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., CA, USA).

4 Resultater

4.1 Internalisering av prolegumain eller cystatin E/M i HEK293- og SKOV-3-celler

I denne masteroppgaven ble det undersøkt om PDT påvirket aktiviteten til cysteinproteasen legumain. For å undersøke dette måtte det verifiseres at HEK293- og SKOV-3-celler klarte å ta opp og intracellulært prosessere prolegumain til aktiv form, i tillegg til å internalisere cystatin E/M. Opptak av legumain eller cystatin E/M ble undersøkt ved å eksponere cellene for kondisjonert medium som inneholdt enten prolegumain eller cystatin E/M i 48 timer. Kondisjonert medium ble høstet fra M38L- og M4C-celler, som er stabilt transfekterte HEK293 celledinjer som overuttrykker og sekreterer henholdsvis prolegumain eller cystatin E/M [68]. Innholdet i kondisjonert medium har blitt undersøkt ved immunoblotting. Resultatene viser at kondisjonert medium fra HEK293 (HEK293-KM) inneholdt verken prolegumain eller cystatin E/M (fig. 4.1). Kondisjonert medium fra M38L (M38L-KM) var rikt på prolegumain, og det ga et tydelig proteinbånd ved 56 kDa, men det inneholdt ikke cystatin E/M. Kondisjonert medium fra M4C (M4C-KM) ga derimot et sterkt utslag for cystatin E/M, og det observeres proteinbånd med sterk intensitet både ved 14 og 17 kDa. I M4C-KM er både den glykosylerte og den ikke-glykosylerte formen av cystatin E/M tilstede.

Mengden prolegumain i M38L-KM har blitt undersøkt ved hjelp av ELISA, og konsentrasjonen av prolegumain i M38L-KM brukt i denne oppgaven varierer fra 148 ng/ml til 384 ng/ml.



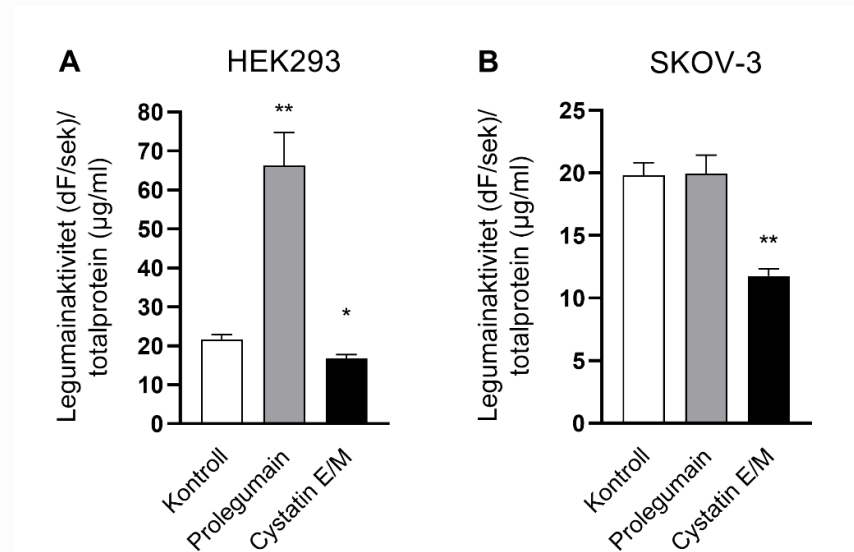
Figur 4.1: Molekylære former av prolegumain og cystatin E/M i kondisjonert medium fra HEK293-, M38L- og M4C-celler. Kondisjonert medium ble blandet med prøvebuffer og DTT. Etter

polyakrylamidgelelektroforese (PAGE) og immunoblotting ble prøvene analysert med antistoff mot legumain (øverste panel) og cystatin E/M (andre panel). Blottet ble skannet med Odyssey® CLx Near-Infrared Imaging System.

Etter eksponering for kondisjonert medium ble HEK293- og SKOV-3-cellelinjene lysert, og legumainaktivitet ble målt i cellelysate og korrigert for konsentrasjonen av totalprotein.

Det ble vist at legumainaktiviteten for ubehandlede celler lå rundt 20 dF/sek/ μ g totalprotein for begge cellelinjene. Eksponering for prolegumain førte til en signifikant økning i legumainaktiviteten til HEK293, og aktiviteten ble tredoblet sammenlignet med kontroll (fig. 4.2, A). HEK293 klarte å internalisere og prosessere prolegumain til aktiv form. SKOV-3 viste derimot ingen endring i legumainaktiviteten etter eksponering for prolegumain (fig. 4.2, B). Dette tydet på at denne celletypen enten ikke klarte å internalisere og/eller prosessere prolegumain til aktiv legumain.

Cellelysate fra både HEK293- og SKOV-3-celler viste signifikant redusert legumainaktivitet etter eksponering for cystatin E/M (fig. 4.2). Aktiviteten i HEK293 har blitt redusert med rundt 20 % sammenlignet med kontroll. Legumainaktiviteten i SKOV-3-celler ble nesten halvert, og var signifikant lavere enn kontroll. Reduksjonen i legumainaktivitet var betydelig større for SKOV-3, som ble redusert med nesten 50 % (fig. 4.2, B), sammenlignet med HEK293 som kun ble redusert med 20 % (fig. 4.2, A). Hemming av legumain tydet på at begge cellelinjene klarte å internalisere cystatin E/M.



Figur 4.2: Legumainaktivitet etter internalisering av prolegumain eller cystatin E/M i HEK293-celler (A) eller SKOV-3-celler (B). HEK293 (500 000 celler/brønn, A) og SKOV-3 (200 000 celler/brønn, B)

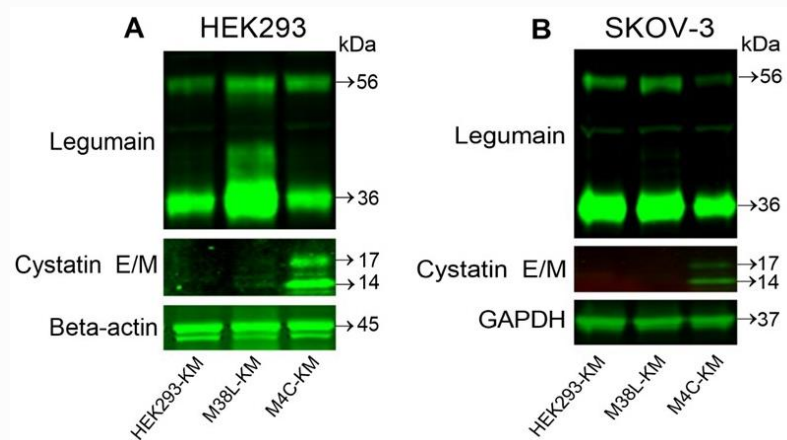
ble eksponert for kondisjonert medium med høyt innhold av prolegumain eller cystatin E/M ved 37 ° C og 5 % CO₂ i 48 timer. HEK293- (A) og SKOV-3- (B) celler eksponert for kondisjonert medium fra ikke-transfektete HEK293-celler ble brukt som kontroll. Legumainaktivitet ble målt i cellelysat, ved spaltning av et fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC). Enzymaktiviteten er korrigert for totalprotein og fremstilt som gjennomsnitt av dF/sek/ µg totalprotein ± SEM (n=3). *indikerer p<0,05 og **indikerer p<0,01 sammenlignet med kontroll (tosidig uparet t-test).

De molekylære formene av legumain og cystatin E/M ble deretter undersøkt ved immunoblotting. Inaktiv proform (56 kDa), intermediær form (46/47 kDa) og moden form (36 kDa) av legumain ble observert i begge cellelinjene (fig. 4.3). Legumain i cellelysat av HEK293-celler eksponert for prolegumain hadde en betydelig sterkere intensitet, sammenlignet med legumain i kontrollceller (fig. 4.3, A). Dette var i samsvar med observasjonene fra enzymaktivitetsmålingene (fig. 4.2, A). HEK293-celler eksponert for cystatin E/M hadde noe svakere intensitet av moden form av legumain (36 kDa) sammenlignet med kontroll, noe som samsvarte med redusert aktivitet (fig. 4.2, A). Opptak av cystatin E/M i HEK293-celler, både glykosylert (17 kDa) og ikke-glykosylert (14 kDa) form, ble bekreftet. Intermediær form av legumain (46/47 kDa) ble påvist både i kontrollceller, og i celler behandlet med M38L-KM og M4C-KM. Den intermediære formen ble ikke påvirket av kondisjonert medium, og intensiteten på båndene er veldig svake for både kontrollcellene og de behandlede cellene.

Immunoblotting av cellelysat fra SKOV-3 (fig. 4.3, B) samsvarte også med enzymaktivitetsmålingene (fig. 4.2, B). Proteinbåndene for moden legumain (36 kDa) viste omtrent lik intensitet mellom kontrollceller og celler eksponert for prolegumain, tilsvarende som for legumainaktivitet. Legumain (36 kDa) i SKOV-3-celler eksponert for cystatin E/M viste derimot en redusert intensitet. Begge formene av cystatin E/M ble også observert i SKOV-3 (fig. 4.3, B). Intermediære form av legumain (46/47 kDa) ble også påvist i SKOV-3-celler, men den ble ikke påvirket av eksponeringen for kondisjonert medium.

For å verifisere at lik mengde protein ble påsatt ved immunoblotting ble GAPDH og beta-actin (β-actin) brukt som «housekeeping»-kontroller. I HEK293-cellene ble det forsøkt med GAPDH som «housekeeping», men på grunn av problemer med blokkeringsbuffer og strippebuffer var det ikke mulig, og β-actin ble brukt istedenfor (fig. 4.3, A). Intensiteten av β-actin var tilnærmet lik for alle cellelysate, og dette tydet på jevn påsetting av µg totalprotein/brønn. Ved blotting av SKOV-3 var problemene med blokkeringsbuffer og strippebuffer løst, og i denne analysen

ble GAPDH brukt «housekeeping»-kontroll (fig. 4.3, B). GAPDH viste også jevn påsetting av μg totalprotein/brønn.



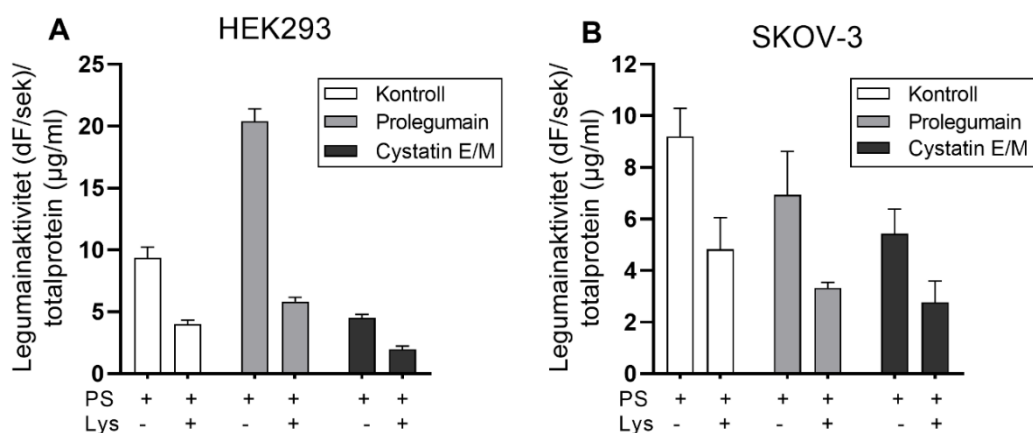
Figur. 4.3: Molekylære former av legumain og cystatin E/M i HEK293- (A) eller SKOV-3- (B) celler eksponert for prolegumain eller cystatin E/M. HEK293 (500 000 celler/brønn, A) eller SKOV-3 (200 000 celler/brønn, B) ble eksponert for kondisjonert medium med høyt innhold av prolegumain eller cystatin E/M ved 37°C og 5 % CO_2 i 48 timer. Etter lysering og acetonefelling av cellelysat ble det påsatt 10 μg totalprotein/brønn, som etter polyakrylamidgelelektroforese (PAGE) og immunoblotting ble analysert med antistoff mot legumain (øverste panel) og cystatin E/M (andre panel) og skannet med Odyssey[®] CLx Near-Infrared Imaging System. ($n=1$). β -actin ble brukt som «housekeeping» i HEK293-celle, og GAPDH ble brukt som «housekeeping» i SKOV-3.

4.2 Effekten av PDT på legumain og cystatin E/M

4.2.1 Effekt av PDT på legumainaktivitet og molekulære former av legumain og cystatin E/M i HEK293- og SKOV-3-celler

Fotosensitizeren brukt i denne oppgaven, TPCS_{2a}, lokaliserer seg til endocytiske membraner. Ved belysning vil membraner bli skadet og innholdet vil bli frigjort til cytosol [81]. Det var av interesse å finne ut hvordan dette påvirket legumainaktiviteten, og de molekulære formene av legumain.

HEK293- og SKOV-3-celler ble dyrket og eksponert for kondisjonert medium med prolegumain eller cystatin E/M sammen med fotosensitizer. Legumainaktivitet (dF/sek) ble målt i cellelysat etter eksponering uten og med lys i 60 sekunder (fig. 4.4).



Figur 4.4: Legumainaktivitet i HEK293 (A) og SKOV-3 (B) etter internalisering av prolegumain eller cystatin E/M, og behandling med PDT. HEK293 (500 000 celler/brønn; A) eller SKOV-3 (200 000 celler/brønn; B) ble først eksponert for prolegumain eller cystatin E/M i 24 timer før cellene i tillegg ble inkubert med fotosensitizer (PS; 0,4 µg/ml TPCS_{2a}) i 18 timer ved 37 ° C og 5 % CO₂. Cellene ble deretter vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium med prolegumain eller cystatin E/M før lyseksponering (blått lys; 435 nm) i enten 0 eller 60 sek. Cellene ble lysert 30 min etter belysning. HEK293- (A) og SKOV-3- (B) celler eksponert for kondisjonert medium fra ikke-transfektete HEK293-celler ble brukt som kontroll. Legumainaktivitet ble målt i cellelysat ved spalting av et fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC). Enzymaktiviteten ble korrigert for totalprotein (dF/sek/µg totalprotein) og presentert som gjennomsnittet ± SEM, (n=2).

Det var en tydelig forskjell mellom celler som kun ble behandlet med fotosensitizer og celler som ble behandlet med fotosensitizer og lys (PDT), både for HEK293- og SKOV-3-celler (fig. 4.4). PDT førte til at legumainaktivitet ble betydelig redusert, både i HEK293- og for SKOV-3-cellene. For HEK293 eksponert for prolegumain ble legumainaktiviteten redusert med ca. 50 % etter behandling med lys. Både i HEK293- og SKOV-3-celler eksponert for cystatin E/M var legumainaktiviteten lavere sammenlignet med kontrollceller både før og etter eksponering for lys. Den inhibitoriske effekten av cystatin E/M ble ikke påvirket av PDT.

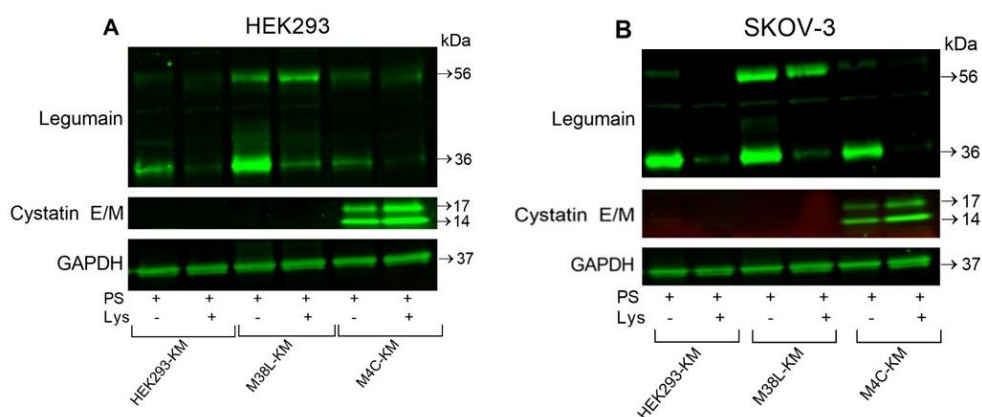
Det ble også observert at legumainaktiviteten ble redusert med 50 % etter eksponering for PS alene sammenlignet med kontrollceller (fig. 4.2 og 4.4). Ubehandlete kontrollceller hadde legumainaktivitet på rundt 20 dF/sek/µg totalprotein (fig. 4.2), mens aktiviteten i celler eksponert for PS var rundt 10 dF/sek/µg totalprotein (fig. 4.4). Redusert legumainaktivitet ble også observert for celler eksponert for prolegumain eller cystatin E/M. For HEK293-celler eksponert for kun prolegumain var legumainaktiviteten økt til rundt 60 dF/sek/µg totalprotein,

mens i celler eksponert for prolegumain og PS var aktiviteten rundt 20 dF/sek/ μ g totalprotein, omtrent som i kontrollceller uten lyseksposering.

For å undersøke om PDT påvirket molekulære former av legumain eller cystatin E/M ble det utført immunoblotting på de samme cellelysatsene fra celler eksponert for PS alene eller etter PDT (fig. 4.5). Det ble vist lignende uttrykk både i HEK293- (fig. 4.5, A) og SKOV-3- (fig. 4.5, B) celler. Kontrollceller fra begge cellelinjer viste at intensiteten på moden legumain (36 kDa) ble redusert etter behandling med PDT.

Eksponering for og internalisering av prolegumain (56 kDa) i HEK293 ga økt mengde av både proform og moden legumain (36 kDa), sammenlignet med kontroll (fig. 4.5, A). Etter PDT var intensitet på proteinbåndet for moden form (36 kDa) kraftig redusert, mens det var noe økt mengde av prolegumain, sammenlignet med celler eksponert for PS alene. Begge formene av cystatin E/M er tilstede både før og etter PDT behandling av HEK293. Det ble observert en noe sterkere intensitet på båndene for cystatin E/M, både ikke-glykosylert (14 kDa) og glykosylert (17 kDa), etter PDT.

I SKOV-3 ble det observert en økt mengde prolegumain etter eksponering for M38L-KM, men mengden moden aktiv legumain var ikke endret, sammenlignet med kontroll (fig. 4.5, B). Eksponering for M4C-KM ga noe redusert intensitet på proteinbåndet for moden legumain (36 kDa). Dette samsvarte med resultatene fra enzymaktivitetsmålingene (fig. 4.2, B). Det ble observert at PDT behandling førte til en reduksjon i intensiteten til proform (56 kDa) og moden legumain (36 kDa). I SKOV-3-celler ble det observert at båndene for cystatin E/M hadde en sterkere intensitet etter PDT behandling, på samme måte som i HEK293. GAPDH ble brukt som kontroll og viste jevnt proteininnhold i alle prøvene for begge cellelinjene.



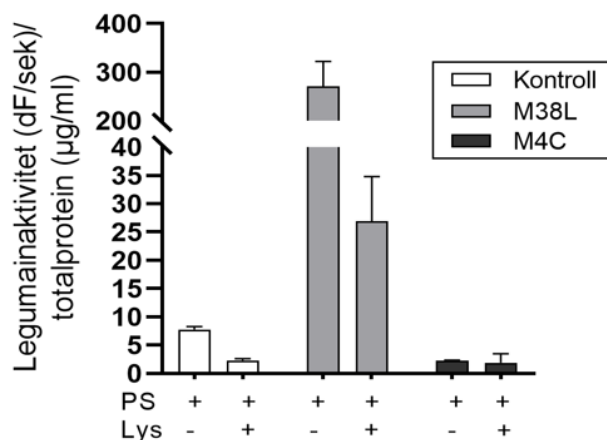
Figur 4.5: Molekulære former av legumain og cystatin E/M i HEK293- og SKOV-3-celler før og etter PDT behandling. HEK293 (500 000 celler/brønn, A) og SKOV-3 (200 000 celler/brønn, B) ble

eksponert for prolegumain eller cystatin E/M i 24 timer før cellene i tillegg ble eksponert for fotosensitizer (PS; 0,4 µg/ml TPCS_{2a}) i 18 timer ved 37 ° C og 5 % CO₂. Cellene ble deretter vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium med prolegumain eller cystatin E/M før lyseksponering (blått lys; 435 nm) i enten 0 eller 60 sek. Cellene ble lysert 30 min etter belysning, og etter lysering og acetonfelling av cellelysat ble det påsatt 10 µg totalprotein/brønn. Etter PAGE og immunoblotting ble prøvene analysert med antistoff mot legumain og cystatin E/M, og skanning med Odyssey® CLx Near-Infrared Imaging System (n=1). GAPDH ble brukt som «housekeeping».

4.2.2 Effekt av PDT på legumainaktivitet og molekylære former av legumain og cystatin E/M i M38L- og M4C-celler

Funn fra HEK293- og SKOV-3-celler tydet på at legumain ble påvirket av PDT behandling, mens cystatin E/M ikke ble det. Det var derfor av interesse å undersøke cellelinjer som stabilt overuttrykker legumain (M38L) eller cystatin E/M (M4C). HEK293-celler ble bruk som kontroll.

Enzymaktivitetsmålinger viste at eksponering for fotosensitizer alene ga legumainaktivitet på rundt 8 dF/sek/µg totalprotein i kontrollceller. M38L-celler hadde en legumainaktivitet som var rundt 35 ganger større, på nærmere 300 dF/sek/ µg totalprotein (fig. 4.6). Etter behandling med PDT ble det igjen observert et fall i legumainaktiviteten. PDT ga størst reduksjon i aktivitet i M38L cellene hvor aktiviteten var rundt 25 dF/sek/µg totalprotein etter en lysdose på 60 sekunder. For M4C cellene var legumainaktiviteten tilnærmet lik både før og etter PDT behandling.

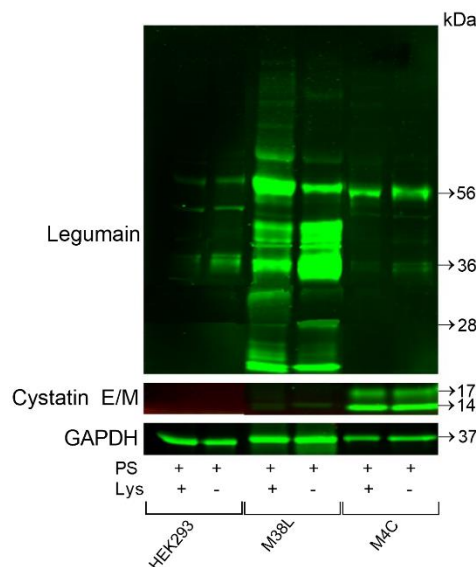


Figur 4.6: Legumainaktivitet i M38L- og M4C-celler før og etter PDT behandling. M38L-, M4C- og HEK293-celler (500 000 celler/brønn) ble sådd ut og inkubert ved 37 ° C og 5 % CO₂ i 24 timer, før de ble eksponert for fotosensitizer (PS; 0,4 µg/ml TPCS_{2a}) i 18 timer. Deretter ble de vasket og inkubert 4

timer i PS-fritt medium, før belysning (blått lys; 435 nm) i enten 0 eller 60 sek. Cellene ble lysert 30 min etter belysning. HEK293-celler, som ikke er transfektert, ble brukt som kontroll. Legumainaktivitet ble målt i cellelysats ved et fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC). Enzymaktiviteten ble korrigert for totalprotein (dF/sek/ μ g totalprotein). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM (n=2).

Immunoblotting av HEK293 cellelysater viste i liten grad uttrykk av legumain, men det ble observert svake bånd av både proform og moden form. M38L cellelysater viste derimot flere molekylære former av legumain (fig. 4.7). I tillegg til proform (56 kDa), intermediær form (46/47 kDa) og moden form (36 kDa), ble det observert legumainbånd rundt 28 kDa og 10 kDa. I M4C ble det kun observert en opphopning av prolegumain, sammenlignet med kontroll. Immunoblotting av cystatin E/M viste at begge former (14 og 17 kDa) var tilstede i M4C cellene.

PDT førte til en reduksjon av moden form av legumain (36 kDa) i alle celletypene, sammenlignet med behandling med PS alene (fig. 4.7). I HEK293 kontrollceller var uttrykket av alle former av legumain nesten borte. M38L-celler behandlet med PDT hadde økt uttrykk av prolegumain (56 kDa) sammenlignet med PS alene. Uttrykket av begge formene for cystatin E/M (14 og 17 kDa) var uavhengig av behandling med PDT (fig. 4.7).



Figur 4.7: Molekylære former av legumain og cystatin E/M i HEK293-, M38L og M4C-celler før og etter PDT behandling. HEK293-, M38L- og M4C-celler (500 000 celler/brønn) ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer, før de ble eksponert for fotosensitizer (0,4 μ g/ml TPCS_{2a}) i 18 timer. Deretter ble cellene vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium før belysning (blått lys; 435 nm) i 0 eller 60 sek. Cellene ble lysert 30 min etter belysning. Etter lysering og acetonfelling av cellelysats ble det påsatt 10

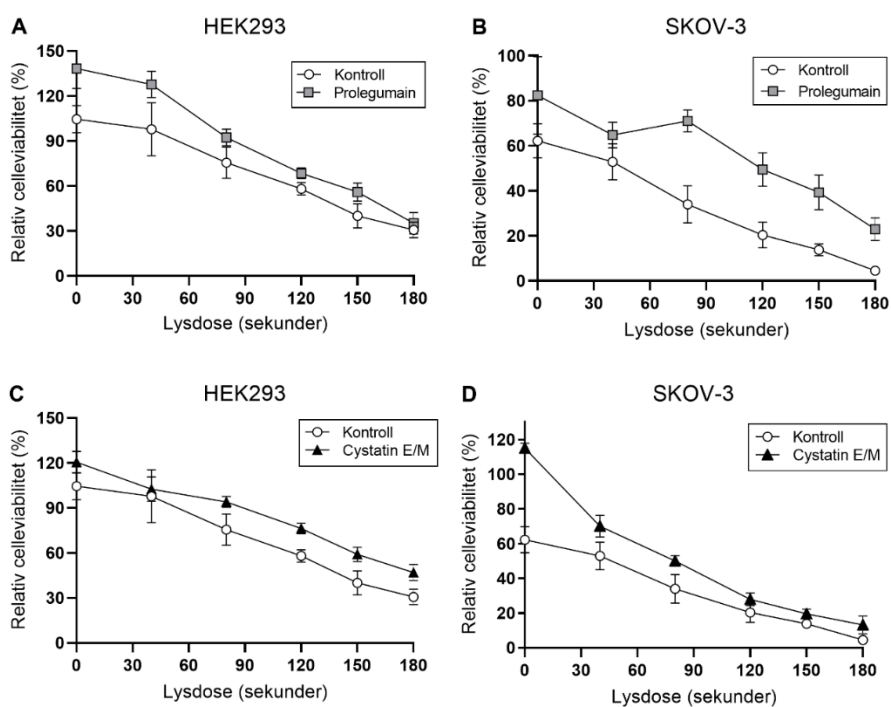
μg totalprotein/brønn, som etter PAGE og immunoblotting ble analysert med antistoff mot legumain og cystatin E/M og skanning med Odyssey® CLx Near-Infrared Imaging System. (n=1). GAPDH ble brukt som «housekeeping»-kontroll.

4.3 Effekt av PDT på celleviabilitet etter internalisering av prolegumain eller cystatin E/M

HEK293- og SKOV-3-celler ble eksponert for 75 % kondisjonert medium med enten prolegumain (M38L-KM) eller cystatin E/M (M4C-KM) i 48 timer før cellene ble behandlet med PDT. Cellene ble først eksponert for kondisjonert medium alene i 24 timer, deretter ble cellene inkubert i kondisjonert medium med fotosensitizer (PS) i 18 timer. Etter inkubering med PS ble cellene vasket, før nytt PS-fritt kondisjonert medium ble tilsatt. Etter 4 timer i PS-fritt medium ble cellene belyst med blått lys i 0-180 sekunder. Celleviabilitet ble målt 48 timer etter belysning ved hjelp av MTT-assay. I alle forsøkene ble kondisjonert medium fra HEK293-celler (HEK293-KM) brukt som kontroll.

PDT førte til celledrap ved alle lysdosene, både i kontrollceller og i behandlede celler, men celledrapet økte med økende lysoder (fig. 4.8). Generelt ble det observert varierende viabilitet ved start av forsøket (lysdose 0 sekunder), og inkubering med enten prolegumain (fig. 4.8, A-B) eller cystatin E/M (fig. 4.8, C-D) ga tendens til redusert celledrap i forhold til kontroll. I HEK293-celler var det størst forskjell etter 40 sekunder, hvor celleviabilitet etter inkubering med prolegumain var 30 % høyere sammenlignet med kontroll (fig. 4.8, A). For SKOV-3 cellene var det størst forskjell i celleviabilitet etter 80 sekunder, hvor viabilitet av celler eksponert for prolegumain var ca. 30 % høyere sammenlignet med kontroll (fig. 4.8, B).

For HEK293-celler eksponert for cystatin E/M (fig. 4.8, C) ble det vist at PS-behandlede celler hadde rundt 10-20 % høyere celleviabilitet ved alle lysdoser sammenlignet med kontroll. For SKOV-3-celler eksponert for cystatin E/M (fig. 4.8, D) var forskjellen i celleviabilitet størst ved de laveste lysdosene (0-90 sekunder).



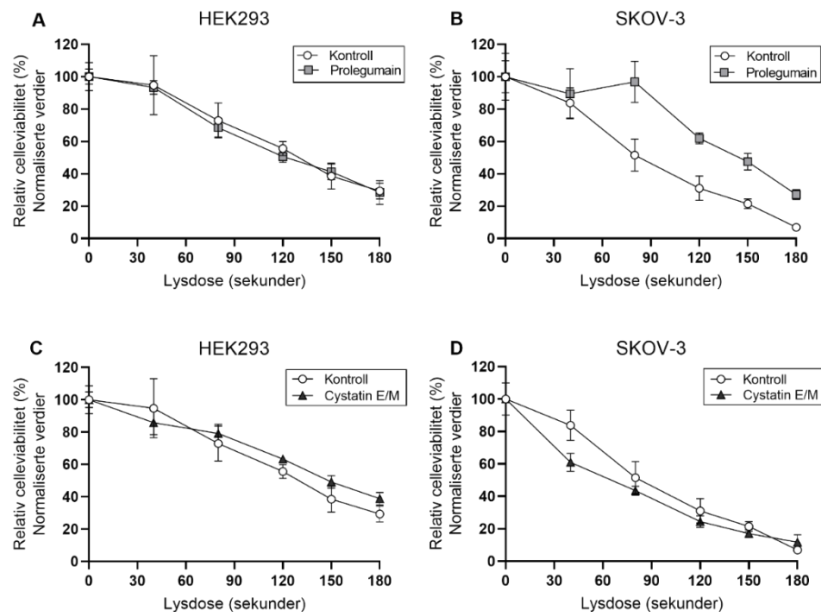
Figur 4.8: Celleviabilitet av HEK293- eller SKOV-3-celler etter eksponering for prolegumain (A-B) eller cystatin E/M (C-D) og behandling med PDT. HEK293 (5000 celler/brønn; A og C) eller SKOV-3 (3000 celler/brønn; B og D) ble først eksponert for prolegumain (A-B) eller cystatin E/M (C-D) i 24 timer før cellene i tillegg ble inkubert med fotosensitizer (0,4 µg/ml TPCS_{2a}) i 18 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Cellene ble deretter vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium med prolegumain eller cystatin E/M før lyseksponering med blått lys i 0-180 sek. Celleviabilitet ble målt ved MTT-assay 48 timer etter belysning. Viabiliteten er fremstilt som relativ celleviabilitet beregnet i forhold til kontroll som ikke ble lyseksponert. HEK293- (A og C) og SKOV-3- (B og D) celler eksponert for kondisjonert medium fra ikke-transfektete HEK293-celler ble brukt som kontroll. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM (n=2).

Ut fra verdiene for % overlevelse i figur 4.8 ble det observert at celleoverlevelsen varierte veldig ved lysdose 0. For å gjøre det enklere å sammenligne og observere eventuelle forskjeller mellom behandlingene ble dataene normalisert og presentert i figur 4.9, hvor overlevelsen ved lysdose 0 sekunder ble satt til 100 %.

Etter normalisering var det ingen forskjell i celleoverlevelse av HEK293-celler eksponert for prolegumain sammenlignet med kontroll (fig. 4.9, A). Det ble derimot observert en tendens til økt celleviabilitet av SKOV-3-celler som var eksponert for prolegumain (fig. 4.9, B). Ved lysdose 80 sekunder er celleviabiliteten for celler eksponert for prolegumain rundt 100 %, mens

for kontrollcellene ligger viabiliteten rundt 50 %. Denne forskjellen i celleviabilitet vedvarte også ved høyere lysdoser, og ved 180 sekunder er det rundt 30 % forskjell i celleoverlevelsen.

Etter normalisering ble det ikke observert noen betydelig forskjell i behandlingseffekten mellom kontrollceller og celler eksponert for cystatin E/M, verken for HEK293- (fig. 4.9, C) eller SKOV-3- (fig. 4.9, D) cellene.



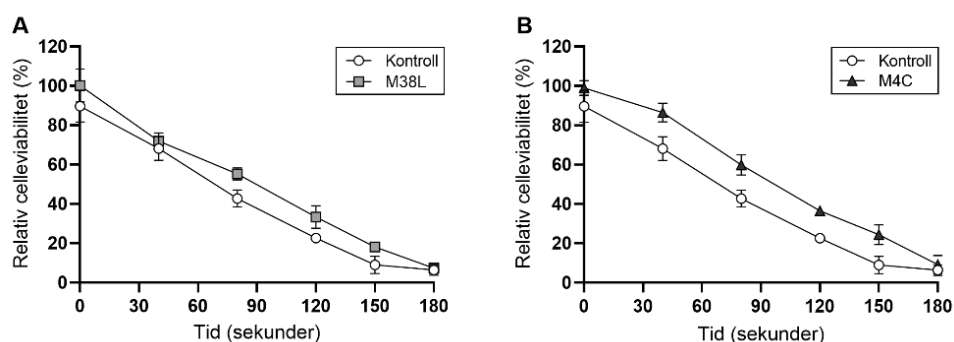
Figur 4.9: Celleviabilitet av HEK293- eller SKOV-3-celler etter eksponering for prolegumain (A-B) eller cystatin E/M (C-D) og behandling med PDT. HEK293 (5000 celler/brønn; A og C) eller SKOV-3 (3000 celler/brønn; B og D) ble først eksponert for prolegumain (A-B) eller cystatin E/M (C-D) i 24 timer før cellene i tillegg ble inkubert med fotosensitizer (0,4 µg/ml TPCS_{2a}) i 18 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Cellene ble deretter vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium med prolegumain eller cystatin E/M før lyseksponering med blått lys i 0-180 sek. Celleviabilitet ble målt ved MTT-assay 48 timer etter belysning. Viabiliteten er fremstilt som relativ celleviabilitet beregnet i forhold til kontroll, som ikke ble lyseksponert, og normalisert til 100 % viabilitet ved tid 0. HEK293- (A og C) og SKOV-3- (B og D) celler eksponert for kondisjonert medium fra ikke-transfektete HEK293-celler ble brukt som kontroll. Resultatene er presenter som gjennomsnitt ± SEM (n=2).

4.4 Effekt av PDT på celleviabilitet av celler som overuttrykker prolegumain eller cystatin E/M

PDT-forsøk ble også utført på M38L- og M4C-celler, som normalt overuttrykker henholdsvis legumain eller cystatin E/M, for å undersøke effektene av PDT på stabilt transfektete

cellelinjer. I disse forsøkene ble HEK293-celler brukt som kontroll. Cellene ble behandlet med en standard PDT-prosedyre, som er beskrevet tidligere.

Resultatene viste at både M38L- og M4C-celler hadde en liten økning i celleviabiliteten sammenlignet med kontrollcellene. Viabiliteten til M38L cellene lå rundt 10 % høyere sammenlignet med kontroll (fig. 4.10, A). Celleviabiliteten til M4C cellene var rundt 20 % høyere enn kontrollcellene, ved alle lysedoser unntatt lysedose 180 sekunder (fig. 4.10, B).



Figur 4.10: Celleviabilitet av M38L- eller M4C-celler etter behandling med PDT. M38L (5000 celler/brønn; A) og M4C (5000 celler/brønn; B) ble inkubert med fotosensitizer (0,4 $\mu\text{g/ml}$ TPCS_{2a}) i 18 timer ved 37 ° C og 5 % CO₂. Cellene ble deretter vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium før lyseksponering med blått lys 0-180 sekunder. Celleviabilitet er målt ved MTT-assay 48 timer etter belysning. Viabiliteten er fremstilt som relativ celleviabilitet beregnet i forhold til kontroll som ikke ble lyseksponert (A-B). HEK293-celler, som ikke er transfektert, ble brukt som kontroll. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, (n=2).

4.5 Effekt av legumain og cystatin E/M på celleproliferasjon

4.5.1 Celleproliferasjon i HEK293- og SKOV-3-celler etter dyrkning i nærvær av prolegumain eller cystatin E/M

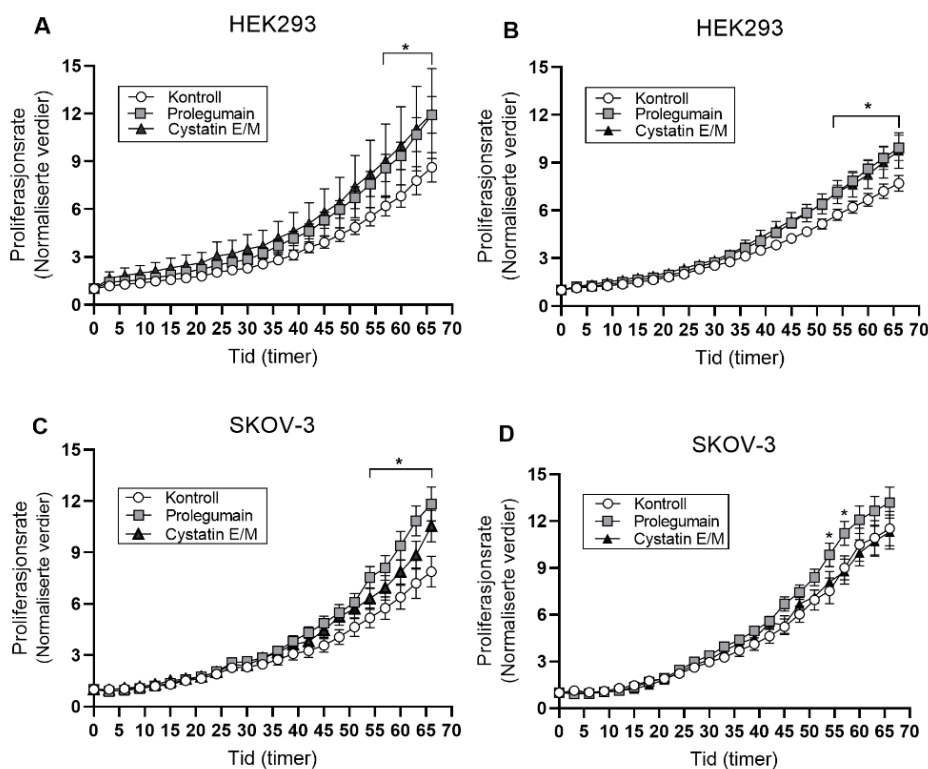
Observasjoner i mikroskopet under celledyrkning viste at celler som overuttrykker prolegumain (M38L-celler) vokser raskere, mens celler som overuttrykker cystatin E/M (M4C-celler) vokser saktere sammenlignet med HEK293-celler. Det var av interesse å undersøke om celleveksten ble påvirket hvis celler ble dyrket i nærvær av prolegumain eller cystatin E/M. SKOV-3- og

HEK293-celler ble dyrket i nærvær av kondisjonert medium med høyt innhold av prolegumain eller cystatin E/M, og celleproliferasjon ble målt ved hjelp av IncuCyte FLR®.

Fra resultatene ble det observert at varierende utsåingen av celler hadde ført til at antall celler innen hvert målområde ikke ble helt likt, selv om målarealet var identisk i alle forsøkene (Vedlegg B, 1.1). Resultatene ble da tolket som at verken prolegumain eller cystatin E/M førte til noen forskjell i cellevekst i HEK293-celler, mens for SKOV-3-celler var det kun prolegumain som ga en signifikant raskere cellevekst etter 50 timer.

På grunn av den varierende utsåingen ble resultatene normalisert (fig. 4.11). Ved normalisering ble det observert at celleveksten ble påvirket i både HEK293- og SKOV-3-celler eksponert for enten prolegumain eller cystatin E/M (fig. 4.11). HEK293 dyrket i nærvær av prolegumain hadde en signifikant raskere cellevekst enn kontroll etter 50 timer (fig. 4.11, A og B). SKOV-3-celler eksponert for prolegumain hadde også signifikant raskere cellevekst etter 50 timer (fig. 4.11, C og D). Forskjellene i cellevekst var størst etter rundt 50 timer for begge cellelinjene, unntaket er SKOV-3 cellene som ble sådd ut med 3000 celler/brønn. Her ble det kun observert en signifikant forskjell etter 54 og 57 timer (fig. 4.11, D).

HEK293-celler eksponert for cystatin E/M viste en raskere cellevekst sammenlignet med kontroll. Cellevekst av HEK293-celler eksponert for cystatin E/M var lignende celleveksten til celler eksponert for prolegumain (fig. 4.11, A-B). Det ble kun utført to proliferasjonsforsøk for celler eksponert for cystatin E/M, og statistikk kunne ikke beregnes. For SKOV-3-celler dyrket i nærvær av cystatin E/M var celleveksten høyere sammenlignet med kontroll, men litt lavere sammenlignet med cellene eksponert for prolegumain (fig. 4.11, C-D).



Figur 4.11: Normaliserte vekstkurver for HEK293 og SKOV-3-celler eksponert for enten prolegumain eller cystatin E/M. HEK293 (3000 celler/brønn; A, 5000 celler/brønn; B) og SKOV-3 (1500 celler/brønn; C, 3000 celler/brønn; D) ble eksponert for kondisjonert medium rikt på enten prolegumain eller cystatin E/M. Celleveksten ble målt ved hjelp av IncuCyte FLR[®]. Det ble tatt et bilde av hver brønn hver 3. time i 70 timer. HEK293- (A og B) og SKOV-3- (C og D) celler eksponert for kondisjonert medium fra ikke-transfektete HEK293-celler ble brukt som kontroll. Resultatene er normalisert til 1 ved tidspunkt 0, og fremstilt som gjennomsnitt \pm SEM ($n=2-3$). *indikerer $p < 0,05$ for prolegumain sammenlignet med kontroll (multipel tosidig uparet t-test, korrigert med Bonferroni-Dunn korreksjon).

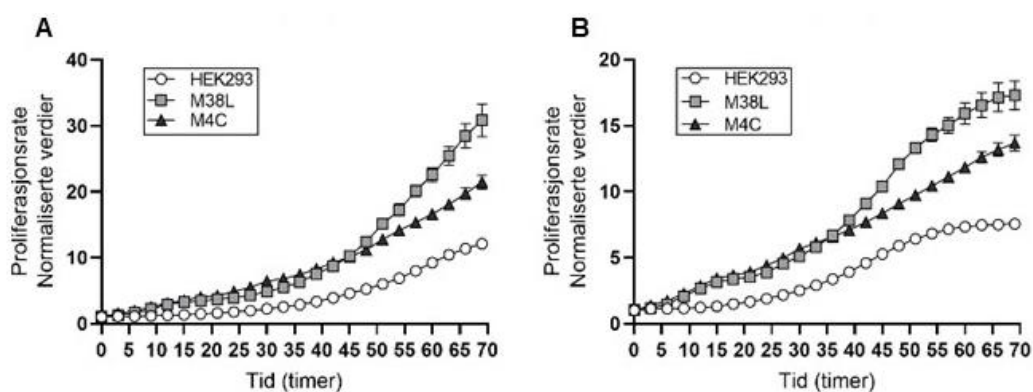
4.5.2 Celleproliferasjon av M38L- og M4C-celler

Forskningsgruppen hadde preliminnære data som tydet på at det var forskjeller i proliferasjonshastighet til M38L- og M4C-celler. For å verifisere observasjonene ble veksthastigheten til HEK293-, M38L- og M4C-celler undersøkt ved hjelp av IncuCyte FLR[®].

Igjen ble det observert at varierende utsåing har ført til at de ulike celletypene ikke hadde samme celleantall ved oppstart (Vedlegg B, 1.2). Ut ifra disse proliferasjonskurvene virket det som om M38L ikke hadde noe raskere proliferasjonsrate sammenlignet med HEK293. M4C-celler

hadde derimot en lavere veksthastighet sammenlignet med proliferasjonsraten til både kontroll og M38L-celler (Vedlegg B, 1.2).

På grunn av varierende utsåing ble resultatene normalisert. Fra normaliserte data ble det observert at både M38L og M4C vokser raskere enn HEK293. M38L hadde i tillegg en raskere proliferasjonsrate enn M4C. Ved siste måling etter rundt 70 timer har HEK293 nesten 10 ganger så mange celler som det var ved start, mens M38L hadde neste 20 ganger så mange. Denne tendensen observeres både ved tett utsåing av celler (fig. 4.12, A) og ved utsåing av få celler (fig. 4.12, B).



Figur 4.12: Normaliserte vekstkurver for HEK293- M38L- og M4C-celler. HEK293- M38L- og M4C (5000 celler/brønn; A, 3000 celler/brønn B) ble sådd ut og inkubert 70 timer i IncuCyte FLR®. Det ble tatt et bilde av hver brønn hver 3. time. Resultatene er fremstilt som gjennomsnitt \pm SEM ($n=2$).

Resultatene tydet på at prolegumain og cystatin E/M påvirket celleveksten, og førte til en raskere cellevekst hos M38L og M4C sammenlignet med HEK293. Disse resultatene samsvarte med vekstkurvene for HEK293-celler eksponert for ulike kondisjonerte medium (fig. 4.11, A-B).

5 Diskusjon

Proteaser deltar i mange ulike fysiologiske prosesser i kroppen, og det er vist at dårlig regulering av proteolytisk aktivitet er forbundet med mange ulike sykdommer. For høy proteolytiske aktivitet er blant annet forbundet med kreft [29], og det er vist at en rekke ulike kreftformer overuttrykker den lysosomale cysteinproteasen legumain [40, 59, 60].

Kreft er en samlebetegnelse for sykdom som kjennetegnes av rask cellevekst og unormal celledeling [82]. Det er et stort behov for utvikling av nye behandlingsformer mot kreft, da eksisterende behandlinger begrenses av utvikling av resistens, mangel på selektivitet og mange bivirkninger. PDT er en selektiv kreftbehandlingsmetode som baserer seg på at en fotosensitizer (PS) aktiveres ved bestråling med lys, og danner ROS som starter signalkaskader som fører til celledød blant annet ved apoptose eller nekrose [4].

Bakgrunnen for denne oppgaven er en tidligere masteroppgave i farmasi ved Mandana Yadollahi, som viste tendens til at cystatin E/M har effekt på celleviabiliteten til SKOV-3-celler etter behandling med PDT [72]. I denne oppgaven ble derfor effekten av legumain og cystatin E/M på celleviabiliteten etter PDT undersøkt og sammenlignet, og det ble også sett på hvordan PDT påvirker de molekylære formene av legumain og cystatin E/M. I tillegg ble det undersøkt om legumain eller cystatin E/M påvirket celleveksten til ulike cellelinjer.

I denne oppgaven ble HEK293- og SKOV-3-celler valgt som cellemodeller. M38L- og M4C-celler ble også brukt for å undersøke om HEK293-celler som er stabilt transfektert til å overuttrykke henholdsvis legumain eller cystatin E/M, ga de samme resultatene som celler eksponert for kondisjonert medium inneholdende prolegumain (56 kDa) eller cystatin E/M (14/17 kDa). HEK293-celler (kontroll) har lavt basaluttrykk av legumain, men det er tidligere vist at cellene klarer å internalisere prolegumain og cystatin E/M etter eksponering for kondisjonert medium fra henholdsvis M38L- (overuttrykker prolegumain) eller M4C- (overuttrykker cystatin E/M) celler [68]. Resultatene i denne oppgaven samsvarer med funnene gjort av Smith *et al.* [68], og det ble vist at ved å eksponere HEK293-celler for M38L-kondisjonert medium i 48 timer ble legumainaktiviteten signifikant økt. I motsetning ble det etter eksponering for M4C-kondisjonert medium (cystatin E/M) observert en signifikant reduksjon i legumainaktivitet. Dette tyder på at cystatin E/M var blitt tatt opp i cellene og hemmet legumain. Immunoblotting viste at både glykosylert (17 kDa) og ikke-glykosylert (14

kDa) form av cystatin E/M ble internalisert i HEK293-celler. Eggstokk-kreftceller (SKOV-3) eksponert for cystatin E/M viste også en signifikant reduksjon i legumainaktiviteten, mens dyrkning i medium rikt på prolegumain ikke førte til endring av legumainaktiviteten i kreftcellene. Dette tyder på at prolegumain enten ikke ble internalisert i SKOV-3-celler, eller så klarte ikke SKOV-3-celler å prosessere prolegumain til moden aktiv legumain. Resultater fra immunoblotting tyder på førstnevnte, at SKOV-3 ikke klarer å internalisere prolegumain. Det at begge cellelinjene klarte å internalisere cystatin E/M, men kun HEK293 klarte å ta opp prolegumain kan komme av at cystatin E/M og prolegumain har ulike opptaksmekanismer i cellene. Ekström *et al.* har vist at opptak av cystatin C, en annen cysteinproteasehemmer, er en aktiv prosess, som mest sannsynlig skjer via reseptormediert opptak [83]. Cystatin E/M er, i motsetning til cystatin C, glykosylert, så det er ikke sikkert opptaket av cystatin E/M skjer på samme måte som for cystatin C. I en tidligere masteroppgaven fra forskningsgruppen ProTarg ble det vist at opptaket av cystatin E/M mest sannsynlig ikke skjer via klatrin-mediert endocytose [84]. Mekanismene bak opptak av prolegumain er det forsket lite på, men flere lysosomale cysteinacathepsiner har et mannose-6-fosfatmotiv som kan binde til en mannose-6-fosfat-reseptor på celleoverflaten og stimulere til klatrin-mediert endocytose [85]. Legumain har mannose-6-fosfatmotivet, men Lunde *et al.* har vist at internalisering av legumain ikke foregår via klatrin-mediert endocytose [86].

Legumain syntetiseres som en inaktiv proform (56 kDa), som ved lav pH i lysosomene autoaktiveres til en aktiv intermediær form (46 kDa), som videre prosesseres til en moden aktiv form på 36 kDa. Berg og Moan har forsket på lysosomer som mål for fotodynamisk terapi [37]. En amfifil PS som TPCS_{2a} vil lokaliseres til lysosomer og endosomer, og ved belysning vil PS bli aktivert og føre til lekkasje fra membranene. Cytosol kan dermed komme inn i lysosomene eller innholdet i lysosomene, som lysosomale cysteinproteaser, kan frigjøres til cytosol. Det var av interesse å undersøke hvordan PDT påvirker den lysosomale cysteinprotease legumain, og hvilke effekter enzymet kan ha på celleviabiliteten etter PDT. I denne oppgaven ble det vist at fotodynamisk terapi påvirker både aktiviteten og de molekylære formene av legumain. Resultatene viste at PDT førte til et kraftig fall i legumainaktiviteten i HEK293-celler eksponert for kondisjonert medium rikt på prolegumain og for M38L-celler som stabilt overuttrykker prolegumain. For M38L-celler ble legumainaktiviteten redusert med nesten 90 % etter PDT, men det var stor variasjon mellom forsøkene. Legumainaktiviteten i kontrollceller ble også redusert etter PDT. Immunoblotting samsvarte med legumainaktivitetsmålingene og viste at PDT førte til en betydelig redusert mengde moden aktiv legumain (36 kDa).

Samlet sett indikerer resultatene at PDT fører til inaktivering eller nedbrytning av legumain. Dette samsvarer med studier gjort av Berg og Moan, som viste at PDT kan inaktivere lysosomale enzymer i celler [36, 37]. Ulike studier har senere vist det samme, og blant annet Nagaoka *et al.* har vist at singlett oksygen dannet ved PDT inaktiverer visse cathepsiner, som cathepsin B og L [87]. Hva det er som fører til inaktiveringen av de lysosomale enzymene er derimot ikke kjent. PDT vil føre til oksidering av aminosyrer som cystein, histidin, metionin, tryptofan og tyrosin [15]. Både cystein og histidin er viktig for den katalytiske effekten til legumain [40], og reduksjon av cystein i det aktive setet er viktig for enzymaktiviteten. Oksidasjon av cystein kan ha ført til at enzymet har blitt inaktivert, eller at aktiviteten har blitt sterkt redusert. Oksidering av aminosyrene kan også ha ført til konformasjonsendringer i legumain som gjør at det aktive setet blir utilgjengelig, slik at enzymet mister sin aktivitet. På immunoblottene ble det vist at PDT førte til en betydelig reduksjon i intensiteten på immunobåndene for aktiv legumain. Dette kan ha kommet av at oksidering av aminosyrer påvirker affiniteten av det polyklonale antistoffet brukt i immunoblottingen.

Inaktivering av enzymet kan også komme av at moden aktiv legumain er sensitiv for nøytral pH, og vil bli denaturert ved pH over 6 [40]. Ved lysosomal frigjøring kan det være mulig at enzymet lekker ut i cytosol, hvor pH normalt ligger rundt 7, og dette kan ha ført til at enzymet har blitt denaturert. En annen mulighet er at PDT har ført til at pH i lysosomene endres. Den lysosomale protonpumpen H^+ -ATPase kan oksideres og skades av PDT [35], i tillegg vil høye lysdoser føre til at membranen til lysosomene blir lekk slik at cytosol kan trenge inn i lysosomene. Dette kan føre til en økt pH, og dermed føre til at enzymet blir inaktivert i lysosomene. Legumain befinner seg til vanlig i det endolysosomale systemet, men Haugen *et al.* har vist at enzymet også finnes i cellekjernen, i tillegg til at det er påvist veldig lave nivåer av enzymet i cytosol [62, 86]. Hvor legumain var lokalisert etter PDT ble ikke studert i denne oppgaven, men det kunne vært interessant å utføre subcellulær fraksjonering for å studere dette, men tiden strakk ikke til. Nøytral pH vil i tillegg hindre autoaktivering av prolegumain, slik at man ikke får dannet aktiv legumain [40]. En annen mulig forklaring på reduksjonen av aktiv legumain etter PDT kan være at enzymet blir inaktivert av endogene inhibitorer (cystatiner) som finnes i cytosol [36], som for eksempel cystatin E/M [68]. Reduksjonen i uttrykk av legumain (36 kDa) i alle cellelinjene tyder på at reduksjon i aktivitet skyldes at enzymet er denaturert, enten på grunn av oksidering eller på grunn av for høy pH.

I denne oppgaven ble det observert økt mengde prolegumain i M38L-celler etter PDT. Dette ble også observert i HEK293-celler eksponert for kondisjonert medium rikt på prolegumain. Dette kan tyde på at PDT hindrer prosessering av prolegumain til moden aktiv legumain, slik at det blir en opphopning av proformen. Det er indikasjoner som tyder på at ved endocytose etter en fotokjemisk skade, så vil endosomene fusjonere med skadede lysosomer. Proteinene som har blitt tatt opp, vil derfor bli direkte frigjort til cytosol [88, 89]. Prolegumain som internaliseres i cellen etter belysning, vil dermed mest sannsynlig bare bli frigjort til cytosol, og prolegumain vil dermed aldri bli aktivert. Dette kan ha ført til en opphopning av prolegumain i cellenes cytosol. Tendensen til økt prolegumain ble ikke observert i SKOV-3-celler, noe som stemmer overens med at cellene ikke internaliserer prolegumain.

Det polyklonale antistoffet mot legumain brukt til immunoblotting viste at det i M38L-cellelysats også ble observert immunobånd på rundt 25 og 10 kDa. Legumainformen på 25 kDa er tidligere beskrevet i litteraturen av Lunde *et al.* som viste at denne formen er aktiv, og mest sannsynlig et prosessert produkt av moden aktiv form (36 kDa) [39, 86]. Formen på rundt 10 kDa er ikke tidligere beskrevet i litteraturen, men forskningsgruppen ProTarg og deres samarbeidspartnere i Danmark har tidligere observert denne formen i osteoblaster differensiert fra stamceller i beinmargen (upubliserte data). Formen rundt 10 kDa kan være et nedbrytningsprodukt av legumain, men fra hvilken del av molekylet vites ikke. Ingen av de småmolekylære formene ble påvirket av PDT.

Selv om legumainaktiviteten blir kraftig redusert etter PDT, er fortsatt litt legumainaktivitet igjen etter behandlingen. Dette kan komme av at enkelte endosomer og lysosomer fortsatt er intakte etter PDT. Ved PDT-metoden gjennomføres det en 4 timers vask, slik at PS blir fjernet fra plasmamembranen. Endosomer som blir laget under eller etter vasking vil derfor ha lite PS i seg, og de utsettes derfor ikke for fotokjemisk skade. Prolegumain som har blitt tatt opp og befinner seg i disse tidlige endosomene vil dermed forbli intakt, og kan bli prosessert til moden aktiv legumain.

I litteraturen er det vist at frigjøring av lysosomale enzymer ut i cytosol kan føre til celledød. Ved frigjøring av en stor mengde lysosomale enzymer skjer celledød via nekrose, men frigjøres det kun en moderat mengde enzymer er det apoptose som dominerer [35]. På grunn av høy pH vil lysosomale cysteinproteaser bli inaktivert eller få en sterk redusert aktivitet i cytosol. Det er likevel vist at enkelte cathepsiner fortsatt er aktive i cytosol. Disse enzymene kan dermed bidra til celledøds mekanismer ved å inaktivere anti-apoptotiske faktorer fra Bcl-2 familien, og

aktivere pro-apoptotiske faktorer som Bax [35, 90]. Litteraturen tyder på at legumain er med og prosesserer cathepsiner i cytosol [39, 42], og kan muligens bidra til induksjon av celledød etter behandling med PDT. Stoffer som gir permeabilisering av lysosomale membraner, som for eksempel L-leucyl-leucin metylester, har lignende virkningsmekanisme som PDT. Induseringen av celledød er fortsatt dårlig forstått, men det er blitt vist at lysosomal membranpermeabilisering (LMP) starter en kaskade som blant annet fører til frigjøring av lysosomale enzymer til cytosol [91, 92]. Studier har vist at cathepsiner bidrar i induseringen av celledød ved LMP, på samme måte som ved PDT. Cathepsin C, B og L er viktige for effekten av LMP, og hemming av cathepsin C er vist å hindre LMP-indusert celledød [93]. Legumain prosesserer både cathepsin B og L, så det er mulig at den også har en rolle ved induksjonen av celledød etter LMP, men dette er ikke studert.

Resultater i denne oppgaven viste at SKOV-3 celler eksponert for prolegumain hadde en høyere cellelevabilitet sammenlignet med kontroll, og den samme tendensen ble observert i celler som stabilt overuttrykker prolegumain (M38L-celler). En årsak til økt celleoverlevelse kan være at høyere konsentrasjon av legumain fører til økt prosessering av cathepsiner, slik at det blir en økt forekomst av dobbelkjedete cathepsiner. Det kan ha påvirket celleoverlevelsen, og bør studeres. For enkelte cathepsiner, som cathepsin B, har studier vist at dobbelkjedet form er mer ustabil enn enkeltkjedet [94]. Det kan tenkes at dette fører til en raskere inaktivering eller nedbrytning av cathepsiner, slik at dobbelkjedete cathepsiner ikke får indusert apoptose i like stor grad. Det er også mulig at de to ulike formene av cathepsiner har ulik substratspesifisitet [94], noe som igjen kanskje kan påvirke hva de spalter og aktiverer eller inaktiverer i cytosol. En annen forklaring på den økte celleoverlevelsen i M38L-celler kan være at legumain i cytosol degraderer substrater som fremmer apoptose. Per i dag er det ingen kjente cytosoliske substrater for legumain, og dette er noe som må studeres nærmere.

Studier indikerer at legumain er med å aktivere transkripsjonsfaktoren STAT3. Det er blant annet vist at endotelceller eksponert for kondisjonert medium rikt på legumain har en økt fosforylering av STAT3 [95], som påvirker gentranskripsjon og er involvert i regulering av for eksempel celleproliferasjon og apoptose [96]. PDT fører også til aktivering og økt nukleær translokasjon av STAT3 [97]. Dette påvirker celleoverlevelsen etter behandlingen, og det er vist at toksisiteten av PDT øker ved å hemme STAT3. Ved å føre til økt fosforyleringen av STAT3 kan altså prolegumain ha påvirket celleoverlevelsen etter PDT. Det vil derfor være interessant å studere uttrykk og fosforyleringsgrad av STAT3. Eksponering for prolegumain

førte derimot ikke til en forskjell i celleoverlevelsen til HEK293-celler. Dette kan komme av at legumain har blitt inaktivert av PDT, og får dermed ikke utøvet en eventuell effekt på celleoverlevelsen.

Det ble vist at eksponering av SKOV-3-celler for prolegumain ikke førte til endring i legumainaktiviteten, og mengden moden legumain (36 kDa) var relativ lik mellom celler eksponert for prolegumain og kontrollceller. Resultatene indikerer at SKOV-3-celler ikke klarte å internalisere prolegumain, og derfor var det heller ikke forventet å finne forskjell i effekten av PDT. Likevel ble det observert en høyere celleoverlevelse etter eksponering for prolegumain. Dette kan skyldes ekstracellulære effekter av legumain. Det er blitt vist at legumain kolokaliserer med integriner på celleoverflaten, blant annet til $\alpha\beta3$ -integrin på brystkreftceller [60, 98]. En studie gjort av Cannistra *et al.* i 1995, viste at SKOV-3-celler har et høyt uttrykk av $\alpha\beta3$ -integrin [99]. Effekten på celleviabilitet etter PDT kan også ha kommet av at prolegumain har bundet seg til reseptorer på celleoverflaten, som gjør cellene mindre sensitive for lys.

Cystatin E/M, som i ulike studier refereres til som en tumorsuppressor [55, 71], kan hemme legumain og andre cysteinproteaser intracellulært både i lysosomer, cytosol og cellekjernen [68]. Inhibitoren sekreseres hovedsakelig og kan hemme også ekstracellulært, men normalt er aktiv legumain hovedsakelig lokalisert i endosomer og lysosomer. I mikromiljøet til svulster, hvor pH er lavere enn normalfysiologisk pH og ofte rundt 5,5, kan det derimot tenkes at legumain kan være aktiv i det ekstracellulære miljøet. Cystatin E/M kan hemme lysosomale cysteinproteaser som frigjøres til cytosol etter PDT, og dette kan igjen hemme celledød induisert av PDT. Resultatene fra masteroppgaven til Mandana Yadollahi viste at eksponering for cystatin E/M førte til redusert celledød av SKOV-3-celler etter PDT [72]. Dette indikerte at cystatin E/M hemmet legumain eller cathepsiner, og dermed hemmet induksjonen av apoptose og celledød. Resultatene fra denne masteroppgaven viste derimot at eksponering for cystatin E/M ikke hadde noe effekt på celledød etter PDT, og samsvarte ikke med observasjonene til Yadollahi [72]. Det ble heller ikke observert forskjell i celleviabilitet mellom M4C-celler som overuttrykker cystatin E/M og kontrollceller etter PDT.

Grunner til at resultatene i denne oppgaven ikke samsvarer med tidligere resultater i forskningsgruppen kan være ulike feilkilder. En feilkilde ved PDT-forsøkene er at celleoverlevelsen varierte veldig ved start av belysning (lysdose 0), og dette gjør det vanskelig å tolke resultatene og trekke konklusjoner. Det varierende utgangspunktet kan komme av at

celler har løsnet underveis i forsøket, for eksempel ved bytte av cellemedium, og fører til at antall celler ved måling av celleoverlevelsen er mindre enn det skulle være. Hvis celler løsner i kontrollbrønnene kan det derimot føre til at den relative celleoverlevelsen overestimeres. Det ble underveis observert at spesielt HEK293-celler hadde tendens til å løsne ved vask av celler. En annen feilkilde er at krystallene dannet ved MTT-assay kan ha løsnet ved avsugning av MTT-reagens, og dette kan også ha ført til at celledøden ble overestimert. Undersøkelsene av effekten av prolegumain eller cystatin E/M på celleviabiliteten etter PDT ble i denne oppgaven kun utført 2 ganger, mens Yadollahi utførte forsøkene kun 1 gang [72]. Statistiske analyser kan dermed ikke bli utført, og det er vanskelig å si om eventuelle forskjeller er reelle eller om det skyldes tilfeldigheter. Forsøkene ble heller ikke utført med samme metoden. Yadollahi eksponerte cellene for kondisjonert medium i kun 18 timer, mens i denne oppgaven ble cellene eksponert for kondisjonert medium under hele forsøket.

Flere studier viser at høye nivåer av legumain i svulster forbindes med økt metastasering og raskere cellevekst [57, 60, 62]. Wang *et al.* har vist at tumor-assosierte makrofager (TAMs) som overuttrykker legumain vokser raskere enn kontrollceller [100]. De viste også at i TAMs hvor legumain var slått ned (legumain «knock down») ble celleveksten signifikant lavere. I tillegg tydet denne studien på at TAMs med lavt uttrykk av legumain førte til redusert vekst av svulsten *in vivo* [100]. En metaanalyse gjennomført av Ye *et al.* har også vist at legumain «knock down» fører til redusert svulstvekst [58]. Ved eksponering av celler for kondisjonert medium rikt på prolegumain eller cystatin E/M ble det observert endret celleproliferasjon. Resultatene viste at legumain førte til en signifikant raskere cellevekst både i HEK293- og SKOV-3-celler, og dette samsvarer med litteraturen. Det ble også vist at celler eksponert for cystatin E/M hadde en raskere vekst enn kontrollcellene, men at de vokste saktere enn celler eksponert for prolegumain. Den samme tendensen ble sett i stabilt transfekterte monokonale cellelinjer hvor både M38L- (overuttrykker legumain) og M4C- (overuttrykker cystatin E/M) celler hadde raskere cellevekst enn HEK293-celler, men M4C vokste saktere enn M38L. Dette tydet på at både legumain og cystatin E/M har en rolle ved celleproliferasjonen. Til tross for at en rekke studier har vist at legumain påvirker celleproliferasjon er mekanismene bak fortsatt ukjente. Det er blitt vist at legumain spalter histone 3.1 *in vitro*, noe som tyder på at enzymet er involvert i DNA replikasjon [62]. Cui *et al.* har vist at «knock down» av legumain i magekreftceller fører til redusert fosforylering i signalveier som inkluderer AKT og mitogenaktivert proteinkinase (MAPK) [101]. AKT og MAPK har begge viktige roller i flere biologiske funksjoner blant annet i celleproliferasjon. Som tidligere nevnt viser studier at

legumain fører til økt fosforylering av transkripsjonsfaktoren STAT3 [95]. En mulig mekanisme bak den økte proliferasjon i celler eksponert for prolegumain kan være at enzymet fører til aktivering av STAT3 som kan påvirke genuttrykket, og føre til økt celleproliferasjon. Det er utført studier som viser at den proliferative effekten av legumain kan være uavhengig av enzymaktiviteten [102]. Proliferasjonen av SKOV-3-celler ble også påvirket og dette kan tyde at effekten av legumain på celleproliferasjonen er ekstracellulær, siden resultatene fra denne oppgaven indikerer at SKOV-3 ikke internaliserer prolegumain. Effekten av legumain og cystatin E/M på celleproliferasjonen kan ha påvirket MTT-målingene, og ført til feilaktige svar, slik at celleviabilitet burde studeres ved hjelp av måling av klonogen overlevelse.

Den økte proliferasjonen etter eksponeringen for prolegumain eller cystatin E/M kan ha påvirket cellenes sensitivitet ovenfor PDT. Det er tidligere blitt vist at cellers sensitivitet ovenfor strålebehandling blir påvirket av i hvilken fase i cellyklus cellene befinner seg i [103], og dette kan også gjelde ved PDT. Hemming av legumain med siRNA reduserer fraksjonen av celler i G₂ [102], og dette kan ha ført til endret sensitivitet ovenfor PDT. Christensen *et al.* publiserte en studie i 1981, som viste at celler som er i S-fase av cellyklus er mer sensitive ovenfor PDT med hematoporfyrin-derivater enn celler i de andre fasene [104].

Det at legumain er forbundet med blant annet økt celleproliferasjon og økt metastasering, har gjort enzymet til et attraktivt målmolekyl for legemiddelbehandling [58, 60]. Det er blant annet blitt lagd potente hemmere mot legumain fra ulike specier, blant annet mot legumain fra gris og mot rekombinant legumain fra mus [105]. Den høye aktiviteten av legumain i svulster kan også utnyttes ved dannelsen av prodrugs av cytotoxiske stoffer, som spaltes av legumain der legemidlet skal virke. Det er blitt lagd legumainbaserte cytotoxiske prodrugs av blant annet auristatin [106], doksorubicin [60] og kolkisin [107].

Poreba har skrevet en oversiktsartikkel som undersøker bruken av prodrugs ved PDT [108]. Ved å feste en quencher til fotosensitizeren via en peptidbinding vil PS bli inaktiv, og kan ikke aktiveres av lys. Ved proteolytisk spaltning vil PS bli frigjort, og kan dermed aktiveres av lys. Til nå er det laget prodrugs av PS som blir aktivert av MMP-7 og caspase-3 [108]. Resultatene i denne oppgaven tyder på at legumain også kan utnyttes for å aktivere et PS-prodrug. Legumain er aktivt i cellene før belysning, og kan være med på å spalte fotosensitizeren. Ved bruk av et prodrug som selektivt spaltes av legumain vil PS i stor grad bli aktivert i svulstens celler eller

dets mikromiljø, som er rikt på legumain. Med denne metoden kan man redusere fototoksiske bivirkninger som oppstår når PS blir aktivert andre steder enn i svulsten.

5.1 Ufullstendige analyser

Noen forsøk eller analyser i denne studien burde vært repetert, men på grunn av situasjonen rundt pandemien med covid-19 ble lokalene på Universitetet i Oslo stengt 12. mars 2020 og det ble ikke tid eller anledning til dette. Blant annet burde immunoblottet av HEK293-cellelysat (fig. 4.3, A), vært reblottet med GAPDH i stedet for β -actin, slik at alle immunoblottene i oppgaven hadde samme «housekeeping»-kontroll. Undersøkelsen av proliferasjonshastigheten til HEK293- og SKOV-3-celler eksponert for kondisjonert medium med cystatin E/M burde vært gjentatt minst en gang til slik at statistiske analyser kunne blitt utført.

I tillegg ville det også vært interessant å se hvordan andre endogene inhibitorer av legumain ble påvirket av PDT, for eksempel cystatin C, samt å subfraksjonere cellene etter PDT for å se hvor legumain og/eller cystatin E/M befant seg.

6 Konklusjon

Denne studien har vist at

- Både normale (HEK293-) og kreft (SKOV-3)-celler har evne til å internalisere cystatin E/M, men kun HEK293-celler internaliserte og prosesserte prolegumain (56 kDa) til moden aktiv legumain (36 kDa).
- PDT førte til en reduksjon i mengden aktiv legumain (36 kDa) både i HEK293- og SKOV-3-celler. Stabilt legumain-transfektete M38L-celler viste også redusert nivå av moden aktiv legumain.
- PDT førte til økt mengde prolegumain (56 kDa) og redusert prosessering i HEK293-celler eksponert for prolegumain, samt i M38L-celler.
- PDT påvirket ikke ekspresjonen av cystatin E/M, og både glykosylert (17 kDa) og ikke-glykosylert (14 kDa) form var tilstede både før og etter PDT av HEK293- og SKOV-3-celler eksponert for kondisjonert medium rikt på cystatin E/M, samt i M4C-celler.
- Verken tilførsel av prolegumain eller cystatin E/M førte til endret celleviabilitet etter PDT av HEK293-celler, mens for SKOV-3-celler førte tilførsel av prolegumain til redusert celledød.
- Både legumain og cystatin E/M førte til økt celleproliferasjon i alle cellelinjer undersøkt i denne oppgaven.

Litteraturliste

1. Dolmans, D., Fukumura, D., and Jain, R.K., *Photodynamic therapy for cancer*. Nature reviews cancer, 2003. **3**(5): p. 380-387.
2. Rkein, A.M. and Ozog, D.M., *Photodynamic Therapy*. Dermatologic Clinics, 2014. **32**(3): p. 415-425.
3. Salvi, G.E., et al., *Adjunctive laser or antimicrobial photodynamic therapy to non-surgical mechanical instrumentation in patients with untreated periodontitis. A systematic review and meta-analysis*. Journal of clinical periodontology, 2019.
4. Agostinis, P., et al., *Photodynamic Therapy of Cancer: An Update*, in *CA-Cancer J. Clin.* 2011. p. 250-281.
5. Henderson, B.W. and Fingar, V.H., *Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor*. Cancer research, 1987. **47**(12): p. 3110-3114.
6. Chilakamarthi, U. and Giribabu, L., *Photodynamic Therapy: Past, Present and Future*. The Chemical Record, 2017. **17**: p. 775-802.
7. Ormond, A.B. and Freeman, H.S., *Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy*. Materials (Basel, Switzerland), 2013. **6**(3): p. 817-840.
8. Uzdensky, A., *The biophysical aspects of photodynamic therapy*. Biophysics, 2016. **61**(3): p. 461-469.
9. Moan, J. and Berg, K., *The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen* Photochemistry and Photobiology, 1991. **53**(4): p. 549-553.
10. Sharman, W.M., Allen, C.M., and van Lier, J.E., *Role of activated oxygen species in photodynamic therapy*, in *Methods in enzymology*. 2000, Elsevier. p. 376-400.
11. Sternberg, E.D., Dolphin, D., and Brückner, C., *Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy*. Tetrahedron, 1998. **54**(17): p. 4151-4202.
12. Rosenkranz, A., Jans, D., and Sobolev, A., *Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency*. Immunology and Cell Biology, 2000. **78**(4): p. 452.
13. Castano, A.P., Demidova, T.N., and Hamblin, M.R., *Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2005. **2**(2): p. 91-106.
14. Kwiatkowski, S., et al., *Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018. **106**: p. 1098-1107.
15. Jerjes, W., et al., *Photochemical Internalization for Intracellular Drug Delivery. From Basic Mechanisms to Clinical Research*. Journal of clinical medicine, 2020. **9**(2).
16. Berg, K., et al., *Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization*. Photochem. Photobiol. Sci., 2011. **10**(10): p. 1637-1651.
17. Lilletvedt, M., et al., *Evaluation of physicochemical properties and aggregation of the photosensitizers TPCS2a and TPPS2a in aqueous media*. Die Pharmazie, 2011. **66**(5): p. 325-333.
18. Hamblin, M.R. and Huang, Y., *Handbook of photomedicine*. 2013: Taylor & Francis.
19. Berg, K., et al., *Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications*. Journal of Microscopy, 2005. **218**(2): p. 133-147.
20. Craig, R.A., et al., *Photosensitisers—the progression from photodynamic therapy to anti-infective surfaces*. Expert opinion on drug delivery, 2015. **12**(1): p. 85-101.

21. Josefsen, L.B. and Boyle, R.W., *Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers*. Metal-based drugs, 2008. **2008**: p. 276109-276109.
22. Dąbrowski, J.M. and Arnaut, L.G., *Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment*. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 2015. **14**(10): p. 1765-1780.
23. Ding, H., et al., *Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia*. Journal of controlled release, 2011. **156**(3): p. 276-280.
24. Foote, C.S., *Definition of type I and type II photosensitized oxidation*. Photochemistry and Photobiology, 1991. **54**(5): p. 659-659.
25. Allison, R.R. and Sibata, C.H., *Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review*. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2010. **7**(2): p. 61-75.
26. Bonnett, R., *Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy*. Chemical Society Reviews, 1995. **24**(1): p. 19-33.
27. Ochsner, M., *Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1997. **39**: p. 1-18.
28. Turk, B., Turk, D., and Turk, V., *Protease signalling: the cutting edge*. Embo, 2012. **31**(7): p. 1630-43.
29. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**(9): p. 785.
30. López-Otín, C. and Bond, J.S., *Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease*. Journal of biological chemistry, 2008. **283**(45): p. 30433-30437.
31. Neurath, H. and Walsh, K.A., *Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976. **73**(11): p. 3825.
32. López-Otín, C. and Overall, C.M., *Protease degradomics: A new challenge for proteomics*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(7): p. 509.
33. Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Finn, R., *Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D343-50.
34. Rawlings, N.D. and Barrett, A.J., *Evolutionary families of peptidases*. Biochemical Journal, 1993. **290**(1): p. 205-218.
35. Berg, K. and Selbo, P.K., *Photochemical Internalization (PCI)—A Technology for Intracellular Drug Delivery*, in *Handbook of Porphyrin Science: with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*. 2016, World Scientific. p. 245-300.
36. Berg, K. and Moan, J., *Lysosomes as photochemical targets*. International Journal of Cancer, 1994. **59**(6): p. 814-822.
37. Berg, K. and Moan, J., *Lysosomes and Microtubules as Targets for Photochemotherapy of Cancer*. Photochemistry and Photobiology, 1997. **65**(3): p. 403-409.
38. Halfon, S., et al., *Autocatalytic activation of human legumain at aspartic acid residues*. FEBS Lett, 1998. **438**(1-2): p. 114-8.
39. Lunde, N.N., et al., *Mammalian legumain – A lysosomal cysteine protease with extracellular functions?* Biochimie, 2019. **166**: p. 77-83.
40. Dall, E. and Brandstetter, H., *Structure and function of legumain in health and disease*. Biochimie, 2016. **122**: p. 126-150.

41. Chen, J.-M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(12): p. 8090-8098.
42. Dall, E. and Brandstetter, H., *Activation of legumain involves proteolytic and conformational events, resulting in a context- and substrate-dependent activity profile*. Acta Crystallographica Section F, 2012. **68**(1): p. 24-31.
43. Chen, J.M., et al., *Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase*. The Biochemical journal, 1998. **335** (Pt 1): p. 111.
44. Shirahama-Noda, K., et al., *Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(35): p. 33194-33199.
45. Dall, E. and Brandstetter, H., *Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(27): p. 10940.
46. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(40): p. 38980-38990.
47. Hu, Y.-B., et al., *The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration*. Translational Neurodegeneration, 2015. **4**(1).
48. Lunde, N.N., et al., *Increased levels of legumain in plasma and plaques from patients with carotid atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2017. **257**: p. 216-223.
49. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 695.
50. Sepulveda, F.E., et al., *Critical Role for Asparagine Endopeptidase in Endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 737-748.
51. Chen, J.-M., et al., *Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase*. Biological chemistry, 2001. **382**(5): p. 777-784.
52. Mattock, K.L., et al., *Legumain and cathepsin-L expression in human unstable carotid plaque*. Atherosclerosis, 2010. **208**(1): p. 83-89.
53. Jafari, A., et al., *Legumain Regulates Differentiation Fate of Human Bone Marrow Stromal Cells and Is Altered in Postmenopausal Osteoporosis*. Stem Cell Reports, 2017. **8**(2): p. 373-386.
54. Zhang, Z., Xie, M., and Ye, K., *Asparagine endopeptidase is an innovative therapeutic target for neurodegenerative diseases*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2016. **20**(10): p. 1237-1245.
55. Wallin, H., et al., *Low-level internalization of cystatin E/M affects legumain activity and migration of melanoma cells*. The Journal of biological chemistry, 2017. **292**(35): p. 14413-14424.
56. Gora, J. and Latajka, R., *Involvement of cysteine proteases in cancer*. Current medicinal chemistry, 2015. **22**(8): p. 944-957.
57. Murthy, R.V., et al., *Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(6): p. 2293-2299.
58. Ye, Z., et al., *Clinicopathologic significance of legumain overexpression in cancer: a systematic review and meta-analysis*. Scientific Reports, 2015. **5**(1).
59. Mai, C.-W., Chung, F.F.-L., and Leong, C.-O., *Targeting Legumain as a novel therapeutic strategy in cancers*. Current drug targets, 2017. **18**(11): p. 1259-1268.
60. Liu, C., et al., *Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2957-64.

61. Estrella, V., et al., *Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion*. *Cancer research*, 2013. **73**(5): p. 1524-1535.
62. Haugen, M.H., et al., *Nuclear Legumain Activity in Colorectal Cancer*. 2013: San Francisco. p. e52980.
63. Lewēn, S., et al., *A Legumain-based minigene vaccine targets the tumor stroma and suppresses breast cancer growth and angiogenesis*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2008. **57**(4): p. 507-515.
64. Wu, W., et al., *Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms*. *Cancer research*, 2006. **66**(2): p. 970-980.
65. Wilson, P.D., et al., *The role of lysosomal enzymes in killing of mammalian cells by the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazole*. *The Journal of cell biology*, 1987. **104**(5): p. 1223-1229.
66. Oleinick, N.L. and Evans, H.H., *The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms*. *Radiation research*, 1998. **150**(5): p. S146-S156.
67. Turk, V., Stoka, V., and Turk, D., *Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance*. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2008. **13**: p. 5406.
68. Smith, R., et al., *Intra- and extracellular regulation of activity and processing of legumain by cystatin E/M*. *Biochimie*, 2012. **94**(12): p. 2590-2599.
69. Wallin, H., et al., *Cystatins – Extra- and intracellular cysteine protease inhibitors: High-level secretion and uptake of cystatin C in human neuroblastoma cells*. *Biochimie*, 2010. **92**(11): p. 1625-1634.
70. Ai, L., et al., *Epigenetic silencing of the tumor suppressor cystatin M occurs during breast cancer progression*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 7899-909.
71. Briggs, J.J., et al., *Cystatin E/M suppresses legumain activity and invasion of human melanoma*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 17.
72. Yadollahi, M., *Hemming av lysosomale cysteinproteaser ved fotodynamisk terapi (PDT)*. 2018, Universitetet i Oslo.
73. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, 1977. **36**(1): p. 59-74.
74. PCI Biotech AS. *LumiSource - novel light source for 'in vitro' research*. 2009 09.02.2020]; Available from: <http://pcibiotech.no/lumisource-novel-light-source-for-in-vitro-research/>.
75. Van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L., and Cloos, J., *Cell sensitivity assays: The MTT assay*. *Methods in Molecular Biology*, 2011. **731**: p. 237-245.
76. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**(1): p. 248-254.
77. Johansen, H.T., Knight, C.G., and Barrett, A.J., *Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis*. *Anal Biochem*, 1999. **273**(2): p. 278-83.
78. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
79. Gallagher, S., et al., *Immunoblotting and immunodetection*. *Current protocols in cell biology*, 2011. **chapter 6**(1): p. Unit6.2-Unit6.2.
80. Clark, M.F. and Adams, A.N., *Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses*. *The Journal of general virology*, 1977. **34**(3): p. 475-483.

81. Bostad, M., et al., *Light-controlled endosomal escape of the novel CD133-targeting immunotoxin AC133-saporin by photochemical internalization — A minimally invasive cancer stem cell-targeting strategy*. *Journal of Controlled Release*, 2015. **206**: p. 37-48.
82. Roy, P.S. and Saikia, B., *Cancer and cure: A critical analysis*. *Indian Journal of Cancer*, 2016. **53**(3).
83. Ekström, U., et al., *Internalization of cystatin C in human cell lines*. *FEBS Journal*, 2008. **275**(18): p. 4571-4582.
84. Larsen, K.B.B., *Glykosylering er nødvendig for internalisering og prosessering av prolegumain*. 2016, Universitetet i Oslo.
85. Brix, K., et al., *Proteolysis mediated by cysteine cathepsins and legumain—recent advances and cell biological challenges*. *An International Journal of Cell Biology*, 2015. **252**(3): p. 755-774.
86. Lunde, N.N., et al., *Glycosylation is important for legumain localization and processing to active forms but not for cystatin E/M inhibitory functions*. *Biochimie*, 2017. **139**: p. 27-37.
87. Nagaoka, Y., et al., *Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **331**(1): p. 215-223.
88. Høgset, A., et al., *Photochemical internalisation in drug and gene delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. **56**(1): p. 95-115.
89. Prasmickaite, L., et al., *Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy*. *British Journal of Cancer*, 2002. **86**(4): p. 652.
90. Liu, L., Zhang, Z., and Xing, D., *Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011. **51**(1): p. 53-68.
91. Lima Jr, H., et al., *Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(12): p. 1868-1878.
92. Brojatsch, J., et al., *A proteolytic cascade controls lysosome rupture and necrotic cell death mediated by lysosome-destabilizing adjuvants*. *PloS one*, 2014. **9**(6).
93. Kavčič, N., et al., *Intracellular cathepsin C levels determine sensitivity of cells to leucyl-leucine methyl ester-triggered apoptosis*. *The FEBS Journal*, 2020.
94. Erickson, A.H., et al., *Cathepsins: Getting in Shape for Lysosomal Proteolysis*, in *Proteases: Structure and Function*, Brix, K. and Stöcker, W., Editors. 2013, Springer Vienna: Vienna.
95. Kang, L., et al., *Asparaginyl endopeptidase induces endothelial permeability and tumor metastasis via downregulating zonula occludens protein ZO-1*. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 2019. **1865**(9): p. 2267-2275.
96. Xiong, A., et al., *Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention*. *Cancers*, 2014. **6**(2): p. 926-957.
97. Edmonds, C., et al., *Photodynamic therapy activated signaling from epidermal growth factor receptor and STAT3: Targeting survival pathways to increase PDT efficacy in ovarian and lung cancer*. *Cancer Biology & Therapy*, 2012. **13**(14): p. 1463-1470.
98. Liu, Y., et al., *Targeting Cell Surface Alpha(v)beta(3) Integrin Increases Therapeutic Efficacies of a Legumain Protease-Activated Auristatin Prodrug*. *Molecular Pharmaceutics*, 2012. **9**(1): p. 168-175.
99. Cannistra, S.A., et al., *Expression and Function of β 1 and α β 3 Integrins in Ovarian Cancer*. *Gynecologic Oncology*, 1995. **58**(2): p. 216-225.

100. Wang, H., et al., *Legumain Promotes Gastric Cancer Progression Through Tumor-associated Macrophages In vitro and In vivo*. International Journal of Biological Sciences, 2020. **16**(1): p. 172-180.
101. Cui, Y., et al., *Asparaginyl endopeptidase promotes the invasion and metastasis of gastric cancer through modulating epithelial-to-mesenchymal transition*. Oncotarget, 2016. **7**(23): p. 34356.
102. Andrade, V., et al., *Nucleoplasmic calcium regulates cell proliferation through legumain*. Journal of Hepatology, 2011. **55**(3): p. 626-635.
103. Pawlik, T.M. and Keyomarsi, K., *Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy*. 2004. p. 928-942.
104. Christensen, T., et al., *Photodynamic effects of haematoporphyrin derivative on synchronized and asynchronous cells of different origin*. British Journal of Cancer, 1981. **44**(5): p. 717.
105. D'Costa, Z.C., et al., *TBX2 represses CST6 resulting in uncontrolled legumain activity to sustain breast cancer proliferation: a novel cancer-selective target pathway with therapeutic opportunities*. Oncotarget, 2014. **5**(6): p. 1609-1620.
106. Bajjuri, K.M., et al., *The legumain protease-activated auristatin prodrugs suppress tumor growth and metastasis without toxicity*. ChemMedChem, 2011. **6**(1): p. 54-59.
107. Smith, R.L., et al., *Synthesis of a novel legumain-cleavable colchicine prodrug with cell-specific toxicity*. Bioorganic medicinal chemistry, 2014. **22**(13): p. 3309-3315.
108. Poreba, M., *Protease-activated prodrugs: strategies, challenges, and future directions*. The FEBS journal, 2020.

Vedlegg A: Sammensetning på løsninger brukt i oppgaven

1 Dyrking av celler

1.1 Serumholdig DMEM

450 ml	DMEM medium med L-glutamin (4 mM) og glukose (4,5 g/l)
50 ml	Føtalt kalveserum
5 ml	Penicillin (100 E/ml)- Streptomycin (100 µl/ml)

1.2 Serumholdig McCoy's 5A medium

450 ml	McCoy's 5A medium med L-glutamin (0,21 g/l) og natriumbikarbonat (2,2 g/l).
50 ml	Føtalt kalveserum
5 ml	Penicillin (100 E/ml)- Streptomycin (100 µl/ml)

1.3 Serumfritt DMEM medium

450 ml	DMEM medium med L-glutamin (4mM) og glukose (4,5 g/l)
5 ml	Penicillin (100 E/ml)- Streptomycin (100 µl/ml)
5 ml	Natriumpyrovat (100 mM)
2,5 ml	Fungizone (250 µg/ml)

2 Behandling av celler

2.1 1X PBS uten kalsium og magnesium

8 g/l	Natriumklorid
1,15 g/l	Dinatriumhydrogenfosfat
0,2 g/l	Kaliumdihydrogenfosfat
0,2 g/l	Kaliumklorid

2.2 1X PBS med kalsium og magnesium

8 g/l	Natriumklorid
1,15 g/l	Dinatriumhydrogenfosfat
0,2 g/l	Kaliumdihydrogenfosfat
0,2 g/l	Kaliumklorid

0,133 g/l Kalsiumklorid
0,1 g/l Magnesiumklorid

2.3 Lysisbuffer

14,71 g Natriumcitrat (100 mM)
5 g N-oktyl- β -D-glukopyranosid (1 %)
0,19 g Dinatrium-EDTA (1 mM)
Hydrogenklorid for pH-justering
Ad 0,5 l dH₂O

3 Totalproteinmåling

3.1 Fortynning av fargereagens 1:5

10 ml Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate
ad 50 ml dH₂O

Blandes godt og inspiseres for bunnfall

4 Måling av legumainaktivitet

4.1 Legumain assaybuffer, pH 5,8

21,54 g Dinatriumhydrogenfosfat
8,3 g Sitronsyre
0,37 g Dinatrium-EDTA
0,1 g CHAPS
ad 1,0 l dH₂O

200 μ l DTT (200 mM) tilsettes 40 ml legumain assaybuffer rett før bruk.

4.2 Legumain substratopløsning (34 μ M)

200 μ l Z-Ala-Ala-Asn-AMC stamløsning (2,5 mM i DMSO)
14,5 ml Legumain assaybuffer (Vedlegg A 4.1)

5 Gelelektroforese og immunoblotting

5.1 Fortynning av elektroforesebuffer (1:20)

Fortynnes 1:20

40 ml NuPAGE[®] MOPS SDS Running buffer (20X)

ad 800 ml dH₂O

500 µl NuPAGE® Antioksidant tilsettes direkte i blottebuffer i elektroforesekaret

5.2 Blottebuffer (1X)

200 ml 5X blottebuffer

200 ml Etanol

ad 1L dH₂O

5.3 TBS (10X)

48,4 g Tris (20 nM)

220,2 g Natriumklorid

Hydrogenklorid for pH-justering

ad 2,0 l dH₂O

Løsningen fortynnes 1:10 med dH₂O til bruksløsning (1X) før bruk

5.5 Vaskebuffer 0,1 % TTBS

100 ml 10X TBS

900 ml dH₂O

1 ml 20 % Tween

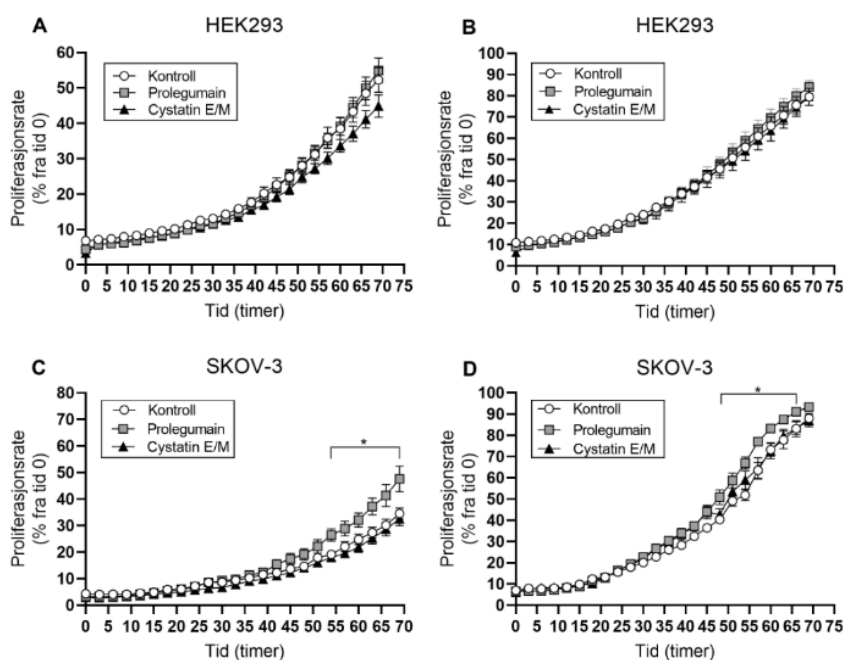
5.6 Strippe buffer

2 ml NewBlot™ Nitro Stripping Buffer, 5X

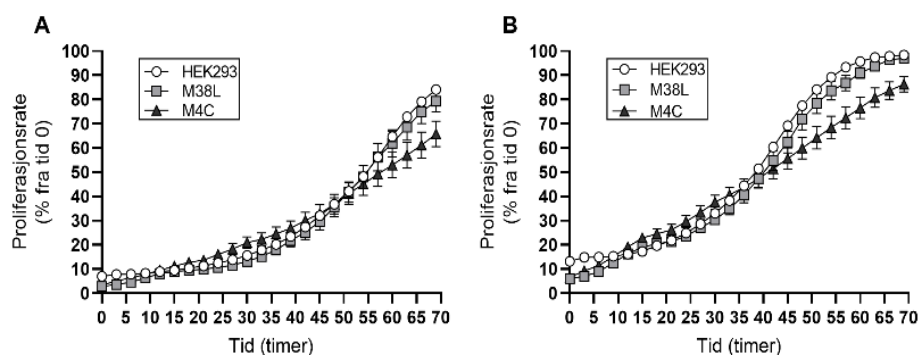
8 ml dH₂O

Vedlegg B: Proliferasjonsrate fra IncuCyte FLR[®]

1.1 Vekstkurver for HEK293-, og SKOV-3-celler eksponert for prolegumain eller cystatin E/M



1.2 Vekstkurver for HEK293-, M38L- og M4C-celler



Vedlegg C: Poster

Poster presenter på Vintermøte 2020 for norsk selskap for farmakologi og toksikologi (NSFT). «Effekt av cysteinproteasen legumain på celleviabilitet etter fotodynamisk terapi»



Effekt av cysteinproteasen legumain på celleviabilitet etter fotodynamisk terapi

Kristine Løkke Olsen^{1,2}, Harald Thidemann Johansen¹, Hilde Nilsen¹, Rigmor Solberg¹, og Kristian Berg^{1,2}
¹Seksjon for farmakologi og farmasøytisk bioteknologi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo,
²Seksjon for strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning, OUS Radiumhospitalet, Oslo
 krols@student.farmasi.uio.no

Bakgrunn

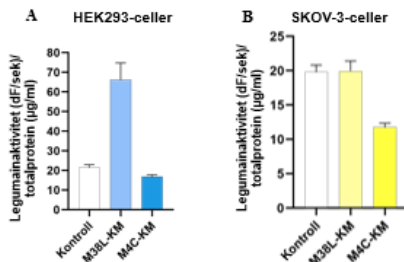
Legumain (asparaginylindepeptidase, AEP) er en lysosomal cysteinprotease som er vist å spille en rolle ved kreftutvikling. Økt forekomst av legumain i svingler assosieres med raskere vekst og økt metastasering. Cystatin E/M, en endogen hemmer av legumain, omtales som en tumorsuppressor. Hemming av cystatin E/M fører til økt metastasering, blant annet ved brystkreft. Fotodynamisk terapi (PDT) er en behandling ved kreft som baserer seg på at en fotosensitizer vil akkumulere i tumorvev, aktiveres ved lyseksponering og fører til celledød. Enkelte fotosensitizere akkumulerer i endocytiske vesikler som skades etter lysbehandling. Forskningsgruppen har preliminære data som kan tyde på at legumain påvirker celleviabiliteten, og det er av interesse å undersøke hvordan legumain og cystatin E/M påvirker celleviabilitet etter PDT.

Metoder

Cellelinjene HEK293 og SKOV-3 ble benyttet. HEK293 er humane embryonale nyreepitelceller, og SKOV-3 celler er epitelceller fra adenokarsinom i eggstokk. Cellene ble sådd ut og eksponert for 75 % v/v kondisjonert medium med høyt innhold av prolegumain eller cystatin E/M fra henholdsvis M38L-celler (overuttrykker legumain) eller M4C-celler (overuttrykker cystatin E/M). Cellene ble lysert etter 48 timer og internalisering av prolegumain og cystatin E/M ble målt i cellelysaten ved legumainaktivitetsmåling og immunoblotting. For PDT ble cellene i de siste 18 timene eksponert for fotosensitizeren TPCS_{2.1}. Deretter ble cellene vasket 2 ganger med PBS, før belysning med blått lys (435 nm). Celleviabiliteten ble målt ved hjelp av MTT-assay 48 timer etter lyseksponeringen.

Resultater

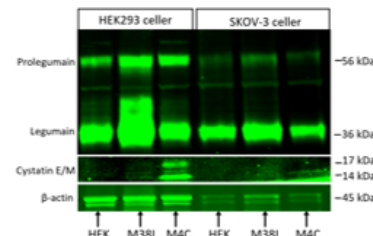
Internalisering av prolegumain eller cystatin E/M endrer legumainaktiviteten



Figur 1: Legumainaktivitet etter internalisering av prolegumain eller cystatin E/M i HEK293 celler (A) og SKOV-3 celler (B). Cellene ble eksponert for kondisjonert medium med høyt innhold av henholdsvis prolegumain (M38L-KM) eller cystatin E/M (M4C-KM) i 48 timer. Legumainaktiviteten ble målt i cellelysat, korrigert for totalprotein og fremstilt som dF/sek/µg totalprotein ± SEM (n=3).

- Prolegumain ble internalisert og aktivert i HEK293 celler, men ikke i SKOV-3 celler.
- Cystatin E/M ble internalisert og hemmet legumainaktiviteten både i HEK293 og SKOV-3 celler, men hovedsakelig i SKOV-3 celler.

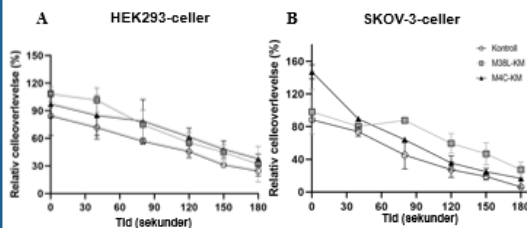
Internalisering og prosessering av prolegumain og cystatin E/M



Figur 2: Immunoblot av cellelysater fra SKOV-3 og HEK293 celler eksponert for prolegumain eller cystatin E/M. Celler ble dyrket med kondisjonert medium rikt på prolegumain (M38L) eller cystatin E/M (M4C), samt kontrollmedium (HEK) i 48 timer. β-actin ble brukt som «housekeeping» kontroll.

- HEK293 celler tar opp og prosesserer prolegumain (56 kDa) til moden legumain (36 kDa), men ikke SKOV-3 celler.
- Både SKOV-3 og HEK293 internaliserer cystatin E/M (14 og/eller 17 kDa).

Effekt av internalisert prolegumain eller cystatin E/M på celleviabilitet etter PDT



Figur 3: Celleviabilitet etter inkubering med prolegumain eller cystatin E/M og fotodynamisk terapi av HEK293 (A) og SKOV-3 (B) celler. Cellene ble sådd ut og eksponert for prolegumain eller cystatin E/M i 48 timer. I de siste 18 timene ble cellene også eksponert for fotosensitizeren TPCS_{2.1} (0,4 µg/ml) før lyseksponering (0-180 sek). Resultatene er fremstilt som prosent celleoverlevelse ± SEM (n=2).

- Det var ingen signifikant forskjell i celleoverlevelse etter eksponering av HEK293 og SKOV-3 celler for prolegumain eller cystatin E/M og PDT.

Konklusjon

- HEK293, men ikke SKOV-3, internaliserer prolegumain (56 kDa), som prosesserer til moden aktiv form (36 kDa) intracellulært.
- SKOV-3 og HEK293 internaliserer cystatin E/M og hemmer legumainaktiviteten.
- Foreløpige resultater tyder ikke på at verken legumain eller cystatin E/M påvirker celleviabiliteten etter fotodynamisk terapi.