

*HOVEDOPPGAVE I FARMAKOLOGI FOR  
GRADEN CAND. PHARM*

**SIGNALERING FRA EPIDERMAL  
VEKSTFAKTOR -RESEPTOR I  
PROSTATAKREFT**



**Hilde Bjertnes**

**Høsten 2006**

Urologisk Forskningsinstitutt  
Oslo Urologiske Universitetsklinikk  
**Aker Universitetssykehus**

Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
**Universitetet i Oslo**

## FORORD

Denne oppgaven er utført ved Urologisk Forskningsinstitutt på Hormonlaboratoriet, Aker Universitetssykehus i perioden november 2005-oktober 2006. Veiledere har vært Hege Thoresen, Kristin Austlid Taskén og Turid Eide, med Hege Thoresen som intern veileder fra Farmasøytisk institutt, og Kristin Austlid Taskén som hovedveileder på Aker.

Jeg vil takke hovedveileder Kristin Austlid Taskén for god hjelp og oppfølging både under forsøksplanlegging og skriveprosess. Samtidig rettes også en stor takk til medveileder Turid Eide for god hjelp og godt samarbeid under hele hovedfagsåret. I tillegg vil jeg også takke Håkon Ramberg for uvurderlig hjelp på labben.

Takk også til internveileder Hege Thoresen for interesse og innspill underveis.

Tilslutt vil jeg få takke alle i fjerde etasje ved hormonlaboratoriet for at dere har vært med på å gjøre hovedfagsåret mitt interessant, lærerikt og koselig.

Aker Universitetssykehus

30.oktober 2006

---

Hilde Bjertnes

# INNHALDSFORTEGNELSE

1	<b>FORKORTELSER</b> .....	5
2	<b>SAMMENDRAG</b> .....	7
3	<b>INNLEDNING</b> .....	9
3.1	<b>Prostata</b> .....	9
3.1.1	<i>Hormonregulering av prostata</i> .....	10
3.2	<b>Prostatakraft</b> .....	11
3.2.1	<i>PSA</i> .....	11
3.2.2	<i>Gleasongrad og Gleasonscore</i> .....	12
3.2.3	<i>EGFR familien</i> .....	12
3.2.3.1	<i>EGFR</i> .....	14
3.2.3.2	<i>ErbB2</i> .....	14
3.2.3.3	<i>ErbB3</i> .....	15
3.2.3.4	<i>ErbB4</i> .....	15
3.2.4	<i>Ligander til EGFR-familien</i> .....	15
3.2.5	<i>Hormonfølsom prostatakraft</i> .....	16
3.2.6	<i>Hormonrefraktær prostatakraft</i> .....	17
3.2.6.1	<i>Behandling av hormonrefraktær prostatakraft</i> .....	19
3.3	<b>Iressa®</b> .....	20
4	<b>PROBLEMSTILLING</b> .....	23
5	<b>MATERIALER</b> .....	24
5.1	<b>Reagenser</b> .....	24
5.1.1	<i>Løsninger</i> .....	25
5.1.1.1	<i>RIPA</i> .....	25
5.1.1.2	<i>TBS-T</i> .....	25
5.1.1.3	<i>RIPA med fosfatasehemmere</i> .....	26
5.1.1.4	<i>Transferbuffer</i> .....	26
5.1.1.5	<i>RPMI medium</i> .....	26
5.1.1.6	<i>T-medium</i> .....	27
5.1.1.7	<i>Strippet serum</i> .....	27
5.2	<b>Cellelinjer</b> .....	28
5.2.1	<i>LNCaP</i> .....	28
5.2.2	<i>LNCaP-Rf (Rf)</i> .....	28
5.2.3	<i>LNCaP-C4 (C4)</i> .....	29
5.2.4	<i>LNCaP-C4-2 (C4-2)</i> .....	29
5.2.5	<i>PC-3</i> .....	30
5.2.6	<i>PC-3 Neo</i> .....	31
5.2.7	<i>PC-3AR</i> .....	31
5.2.8	<i>DU-145</i> .....	31
5.3	<b>Primere</b> .....	32
5.4	<b>Utstyr</b> .....	32
6	<b>METODER</b> .....	33
6.1	<b>Celledyrking</b> .....	33
6.2	<b>Cellestimuleringer</b> .....	33
6.3	<b>Proteinmåling</b> .....	34
6.4	<b>Western Blot</b> .....	34
6.4.1	<i>Prinsipp</i> .....	34
6.4.2	<i>Proveopparbeidelse</i> .....	35
6.4.3	<i>Elektroforese</i> .....	35

6.4.4	<i>Blotting</i> .....	36
6.4.5	<i>Immunodeteksjon</i> .....	37
6.4.6	<i>Framkalling og deteksjon</i> .....	37
6.4.7	<i>Loadingkontroll</i> .....	37
6.4.8	<i>Kvantifisering</i> .....	37
6.5	<b>Kvantitativ ett trinns Real-time RT-PCR</b> .....	38
6.5.1	<i>Prinsipp</i> .....	38
6.5.2	<i>Primerdesign</i> .....	38
6.5.3	<i>Prøveopparbeidelse</i> .....	38
6.5.4	<i>RT-PCR reaksjonen</i> .....	39
6.5.5	<i>Deteksjon og analyse</i> .....	40
6.5.6	<i>Resultatframstilling</i> .....	41
7	<b>RESULTATER</b> .....	44
7.1	<b>Ekspresjon av ErbB-familien i ulike cellelinjer fra prostatakraft</b> .....	44
7.2	<b>Konsentrasjonsavhengig ERK-aktivering induisert av EGF i cellelinjene fra prostatakraft</b> .....	46
7.3	<b>Tidsavhengig ERK-aktivering induisert av EGF i cellelinjene fra prostatakraft</b> ..	48
7.4	<b>Iressa®-hemming av EGF-aktiverte LNCaP-C4-2 celler.</b> ....	50
7.5	<b>Screening for potensielt regulerte vekstfaktorer i prostatacellelinjene</b> .....	50
7.6	<b>Proteinekspresjon av amfiregulin i prostatacellelinjene</b> .....	52
7.7	<b>Konsentrasjonsavhengig ERK-aktivering induisert av amfiregulin i cellelinjer fra prostatakraft</b> .....	53
7.8	<b>Tidsavhengig ERK-aktivering induisert av amfiregulin i prostatacellelinjene</b> ...	55
7.9	<b>ERK aktivitet er høyere i ustimulerte og stimulerte DU-145 celler enn i korresponderende LNCaP-C4-2 celler</b> .....	57
7.10	<b>Stimulering med EGF og økende mengder Amfiregulin i prostatacellelinjene</b> ..	58
8	<b>DISKUSJON</b> .....	60
8.1	<b>Cellelinjer</b> .....	60
8.2	<b>Western blot</b> .....	60
8.3	<b>Real-time RT-PCR</b> .....	61
8.4	<b>Ekspresjon av ErbB-familien i ulike cellelinjer fra prostatakraft</b> .....	61
8.4.1	<i>EGFR</i> .....	61
8.4.2	<i>ErbB2</i> .....	62
8.4.3	<i>ErbB3</i> .....	63
8.4.4	<i>ErbB4</i> .....	63
8.5	<b>Konsentrasjonsavhengig ERK-aktivering induisert av EGF og amfiregulin i prostatacellelinjene</b> .....	64
8.6	<b>Tidsavhengig ERK-aktivering induisert av EGF og amfiregulin i prostatacellelinjene</b> .....	65
8.7	<b>Iressa®-hemming av EGF-aktiverte LNCaP-C4-2 celler</b> .....	65
8.8	<b>Screening for potensielt regulerte vekstfaktorer i prostatacellelinjene</b> .....	66
8.8.1	<i>Amfiregulin</i> .....	66
8.8.2	<i>Midkine</i> .....	67
8.9	<b>ERK aktivitet er høyere i ustimulerte og stimulerte du-145 celler enn i korresponderende LNCaP-C4-2 celler</b> .....	67
8.10	<b>Stimulering med EGF og økende mengder amfiregulin</b> .....	67
8.11	<b>Framtidig behandling av prostatakraft</b> .....	68
9	<b>REFERANSELISTE</b> .....	69

## 1 FORKORTELSER

ACTH	Adrenokortikotropt Hormon
AR	Androgenreseptor
AREG	Amfiregulin
ATP	Adenosin Trifosfat
BPH	Benign Prostata Hyperplasi
BSA	Bovint Serum Albumin
CDK	Cyklinavhengig Kinase
cDNA	Komplement DNA
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Deoksyribonukleinsyre
Ebp1	ErbB3 Bindende Protein
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGF	Epidermal Vekstfaktor
EGFR	Epidermal Vekstfaktor Reseptor
EGFRvIII	Epidermal Vekstfaktor Reseptor Versjon 3
ERK	Ekstracellulær Signalregulert Kinase
FBS	Føtalt Bovinserum
FGF	Fibroblast Vekstfaktor
G6PDH	Glukose-6-fosfatdehydrogenase (G6)
HB-EGF	Heparinbindende Epidermal Vekstfaktor
HER	Human Epidermal Vekstfaktor Reseptor
GHF	Hepatocyt Vekstfaktor
HRP	Horseradish Peroksidase
IC <sub>50</sub>	Inhibiting Concentration 50 %
IGF	Insulinlignende Vekstfaktor
kDa	Kilo Dalton
LDS	Litium Dodecyl Sulfat
LH	Luteiniserende Hormon
LH-RH	Luteiniserende Hormon Frigjørende Hormon
MAPK	Mitogen Aktivert Protein Kinase
mRNA	Messenger RNA

NGF	Nerve Vekstfaktor
PDGF	Platederivert Vekstfaktor
PenStrep	Penicillin og Streptomycin
pERK	Fosforylert ERK (MAP kinase)
PMSF	Fenyl Metyl Sulfonyl Fluorid
PSA	Prostata Spesifikt Antigen
PSAV	Prostata Spesifikt Antigen Velositet
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsyre
RT-PCR	Revers Transkriptase Polymerase Kjede Reaksjon
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
TBP	TATA Bindende Protein
TBS-T	Trisbufret Saltløsning med Tween
TGF $\alpha$	Transformerende Vekstfaktor $\alpha$
TGF $\beta$	Transformerende Vekstfaktor $\beta$
TK	Tyrosin Kinase
V	Volt
VEGF	Vaskulær Endotelial Vekstfaktor

## 2 SAMMENDRAG

Aktivering av epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR) spiller en viktig rolle ved utvikling av prostatakraft. Mange av de nye terapeutiske tilnærmingene til prostatakraft som nå gjennomgår kliniske utprøvnings, er rettet mot signalveiene for vekstfaktorer, deriblant EGFR. Gefitinib (Iressa®, ZD1839) er en aktiv EGFR tyrosin kinase inhibitor som tas oralt. Den har vist antiproliferativ-, proapoptotisk- og antiinvasjons-aktivitet i cellelinjer fra prostatakraft. De kliniske studiene har så langt vist hvor viktig det er å identifisere pasientgruppen som responderer på terapi med gefitinib. Amfiregulin (AREG) har vært foreslått som en mulig biomarkør for nonresponsive pasienter. Derfor har de molekylære mekanismene bak amfiregulin-mediert aktivering av EGFR signalering blitt undersøkt i denne oppgaven.

Ekspressjonen av ErbB reseptorer i ulike cellelinjer fra prostatakraft ble undersøkt ved hjelp av real-time revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (real-time RT-PCR). Ekspressjonen av de 4 medlemmene i EGFR familien (EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2, Neu), ErbB3 (HER3) og ErbB4 (HER4)) ble undersøkt på mRNA-nivå i androgenavhengige (LNCaP) og androgenuavhengige (LNCaP-Rf, LNCaP-C4, LNCaP C4-2, PC-3 og DU145) cellelinjer fra prostatakraft. Det ble observert lavere ekspressjon av ErbB2 og ErbB3 i PC-3 og DU145 celler som mangler androgenreseptor. ErbB4 var høyest uttrykt i LNCaP-Rf-celler, og EGFR verdien var høyest i LNCaP-C4-2.

Selv om epidermal vekst faktor (EGF) og transformerende vekst faktor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) er de foretrukne EGFR ligandene, kan også andre ligander binde og aktivere EGFR. Blant disse er amfiregulin, heparinbindende EGF og betacellulin. Fordi amfiregulin er foreslått som en mulig biomarkør for nonresponsivitet til Iressa®, ble denne sett spesielt på. Ekspressjonen av amfiregulin i de ulike cellelinjene ble undersøkt ved hjelp av real-time RT-PCR, og i motsetning til de andre cellelinjene vi studerte, uttrykte PC-3 og DU-145 cellene høye verdier av amfiregulin. På proteinnivå ble det observert en stor forskjell i amfiregulinekspressjonen mellom PC-3Neo og PC-3AR, noe som bekrefter at amfiregulin er androgenregulert.

Optimal konsentrasjon og tid for ekstracellulær signalregulert kinase (ERK) -aktivering ble bestemt ved stimulering med både EGF og amfiregulin i tre av cellelinjene. Konsentrasjonen

som ga maksimal effekt på ERK-aktivering ble for EGF bestemt til 10 ng/ml i LNCaP-C4-2, 5 ng/ml i PC-3 og 50 ng/ml i DU-145. Konsentrasjonen som ga maksimal effekt på ERK-aktivering ble for amfiregulin bestemt til 100 ng/ml i LNCaP-C4-2 og DU-145 og 200 ng/ml i PC-3. Optimal stimuleringsstid for EGF ble bestemt til 30 minutter i LNCaP-C4-2 og fem minutter i PC-3 og DU-145. Optimal stimuleringsstid for amfiregulin ble bestemt til 120 minutter i C4-2 og 5 minutter i PC-3 og DU-145.

Det ble også forsøkt å hemme en EGF-aktivert cellelinje med Iressa®, noe som viste at Iressa® effektivt hemmer EGFR-aktiveringen i cellelinjen LNCaP-C4-2.

For å avgjøre om amfiregulin kan påvirke EGF-aktivert ERK-aktivitet, ble cellelinjene LNCaP-C4-2, PC-3 og DU-145 stimulert med EGF og økende mengder amfiregulin. Proteinene ble ekstrahert og kjørt på gel. Resultatet tyder på at det kan foreligge en konsentrasjonsavhengig effekt av amfiregulin på EGF-aktivert ERK-aktivitet.

Kunnskapen som har kommet i etterkant av kartleggingen av det humane genom har medført en betydelig økt forståelse for tumorens biologi og hvilke mekanismer som er involvert. Det økende omfanget av molekylærbiologiske terapier under utvikling, gir håp om mer effektiv og bedre tilpasset terapi i framtida. Dette kan for eksempel bety at hver undergruppe av pasienter med prostatakraft kan få en "skreddersydd" behandling. Denne behandlingen er ikke nødvendigvis rettet mot bare ett mål, men en kombinasjon av flere.

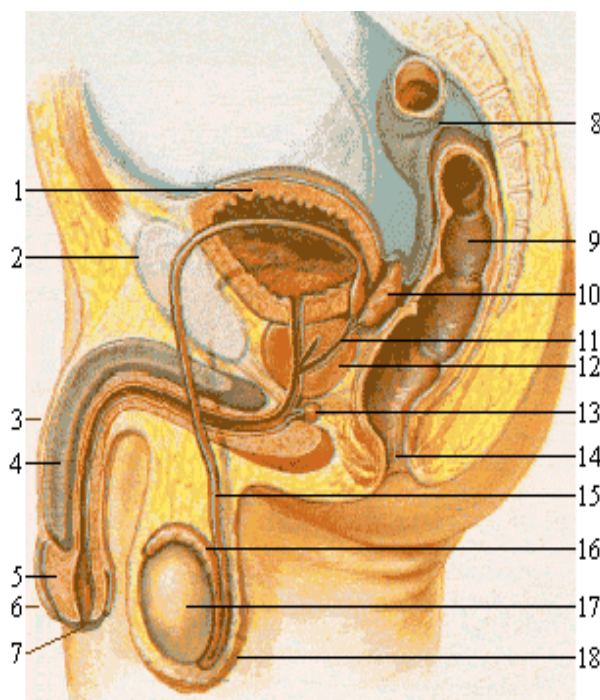
Ut ifra resultatene i denne oppgaven kan både EGFR, ErbB2, midkine og amfiregulin foreslås som mulige mål for terapi, og kanskje også i kombinasjon med hverandre.



### 3 INNLEDNING

#### 3.1 PROSTATA

Prostata er en av mannens seksualkjertler. Den produserer en klar basisk væske som inneholder blant annet ulike typer sukker, proteolytiske enzymer, sur fosfatase, prostata spesifikt antigen (PSA), sink og sitronsyre. Væsken fra prostata bidrar med opp mot 1/3 av sædvolumet. Kjertelen ligger rett under urinblæren, og omgir øverste del av urinrøret (Figur 1). Prostata er liten i barndommen, vokser i ungdommen og har full størrelse (valnøttstørrelse) en gang i tyveårsalderen. Hos de fleste menn begynner den indre delen av kjertelen å vokse igjen rundt 50 års alder, og mange utvikler benign prostatahyperplasi (BPH). Dette er en helt ufarlig vekst av prostatakjertelen, men kan gi ubehagelige symptomer som hyppig vannlating og redusert eller vanskelig tømning [2,3].



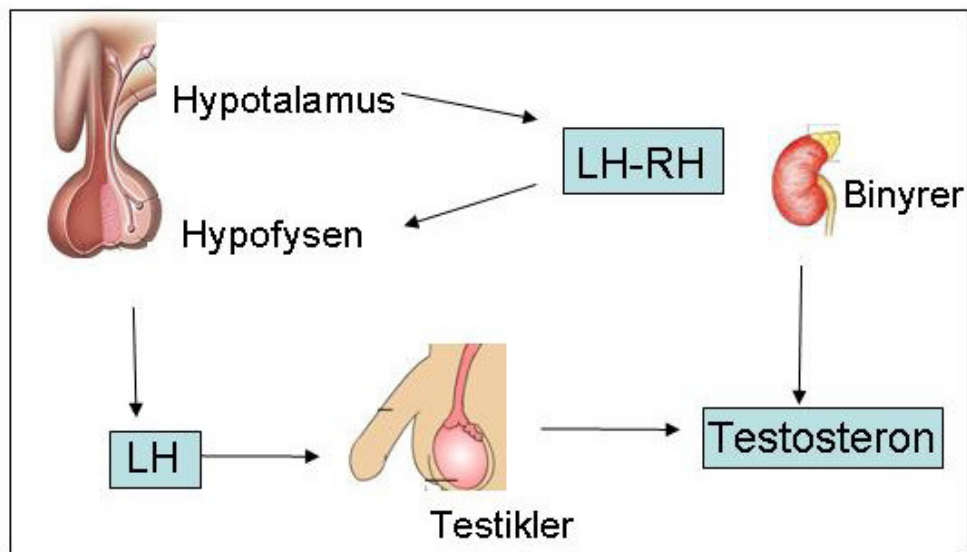
**Figur 1** Oversikt over mannens kjønnsorganer

- |                     |                          |                     |
|---------------------|--------------------------|---------------------|
| 1- Urinblære        | 8- Colon Sigmoidium      | 13- Cowpers kjertel |
| 2- Kjønnbeinet      | 9- Endetarm              | 14- Endetarmsåpning |
| 3- Penis            | 10- Sædblære             | 15- Sædleder        |
| 4- Svampegemet      | 11- Ductus ejaculatorius | 16- Bitestikkel     |
| 5- Penisglans       | 12- <b>Prostata</b>      | 17- Testiklene      |
| 6- Forhuden         |                          | 18- Pungen          |
| 7- Urinrørsåpningen |                          |                     |

### 3.1.1 Hormonregulering av prostata

Prostata er under konstant påvirkning av mannlige kjønnshormoner som stimulerer aktiviteten til prostata [4]. Dihydrotestosteron (DHT) er en mer potent metabolitt av testosteron som syntetiseres fra testosteron via enzymet  $5\alpha$ -reduktase [5]. Testosteron og DHT er viktig for prostata, men i tillegg er også andre androgene hormoner viktige for modning og vekst av prostata. Hormonproduksjonen blir styrt fra hjernen, nærmere bestemt hypothalamus og hypofysen. Hypotalamus skiller ut luteiniserende hormon-frigjørende hormon (LH-RH) som stimulerer utskillelsen av luteiniserende hormon (LH) og adrenokortikotrop hormon (ACTH) fra hypofysen. LH stimulerer Leydig-cellene i testiklene til å produsere testosteron, mens ACTH stimulerer binyrene til det samme. Testosteron har igjen negativ feedback på både hypothalamus og hypofysen [5,6] (Figur 2).

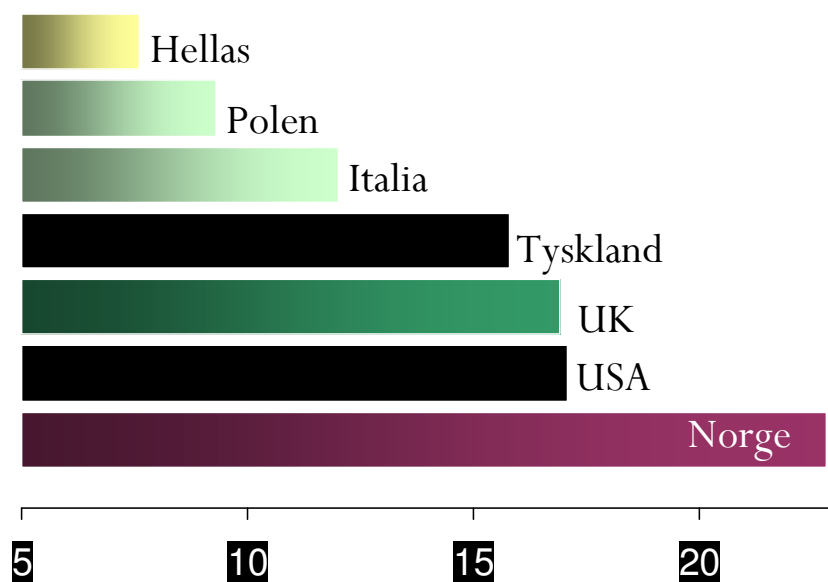
Rundt 50 års alder har mannen sin "overgangsalder", og det er sannsynligvis hormonendringer i denne perioden som fører til vekst av prostatakjertelen og utvikling av BPH [2].



**Figur 2** Hormonregulering av prostata.

## 3.2 PROSTATAKREFT

Prostatakraft er den vanligste kreftformen blant menn i Norden, og insidensen har økt markant de siste årene. Det er flere årsaker til den økte insidensen, blant annet en økt diagnostisk aktivitet ved at man kan teste for forhøyet prostataspesifikt antigen (PSA) i serum. I tillegg er det et økende antall eldre menn i befolkningen [1]. Norge er et av de landene hvor det dør flest personer av prostatakraft (Figur 3) [7].



**Figur 3** Aldersjustert dødelighet av prostatakraft per 100 000 innbyggere [8].

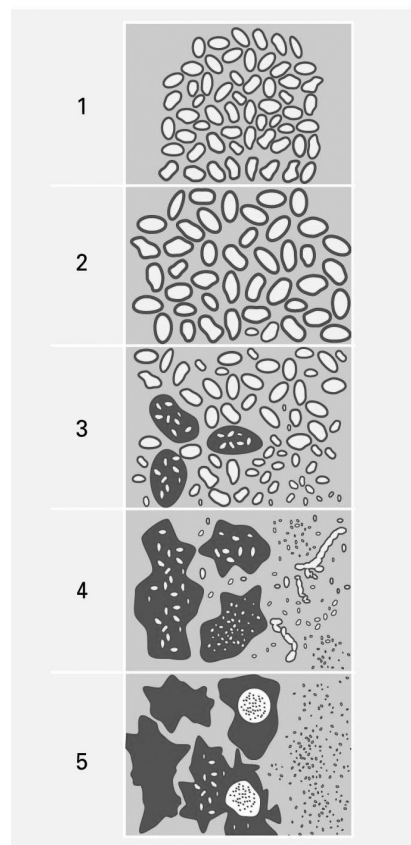
### 3.2.1 PSA

PSA (prostata spesifikt antigen) er et glykoprotein som gjør sæden flytende. PSA brukes i tillegg som markør for sykdom i prostata. Proteinet finnes i små mengder i serum hos menn, og det er i serum man kan måle verdiene [9]. Ca 20 % av alle menn med forhøyet serum-PSA ( $\geq 4$  ng/ml), har prostatakraft. Risikoen for utvikling av prostatakraft øker når PSA øker, og ved verdier over 10 ng/ml har risikoen økt til 60 %. I tillegg til direktemålinger av PSA, benyttes i tillegg PSA-Velocity (PSAV), som er målinger av PSA-økning per år. Målinger av PSA er foreløpig den mest effektive metoden for å oppdage prostatakraft tidlig. I tillegg til å være en markør for prostatakraft, brukes PSA også som et hjelpemiddel til å avgjøre hvilket stadium kreften er i, og for å evaluere respons på behandling [5].

Selv om PSA er en følsom serummarkør ved sykdom i prostata, korrelerer nivået av PSA relativt dårlig med grad og stadium ved prostatakrefte. Det er derfor et stort behov for å finne en mer pålitelig markør for påvisning av prostatakrefte [10].

### 3.2.2 Gleasongrad og Gleasonscore

Gleasongrad er en type gradering som brukes for å si noe om alvorligheten av prostatasykdommen. Ettersom sykdommen forverres, reduseres prostatacellenes differensieringsgrad. Tumorens utseende angis i en skala fra en til fem, der en er høyest og fem er lavest differensieringsgrad (Figur 4). Prostatakrefte har ikke et homogent utseende gjennom hele tumoren, og man ser derfor kun på de to mest dominerende områdene. Disse områdene gis hvert sitt differensieringsgradtall, som adderes til en sum, Gleason Score. Gleason Score kan dermed variere fra to til ti, der ti er mest alvorlig. Gleason Score er viktig i beskrivelsen av prostatabiopsier[1].



**Figur 4**  
Skjematisk framstilling av prostatacellenes utseende ved de 5 ulike Gleasongradene.

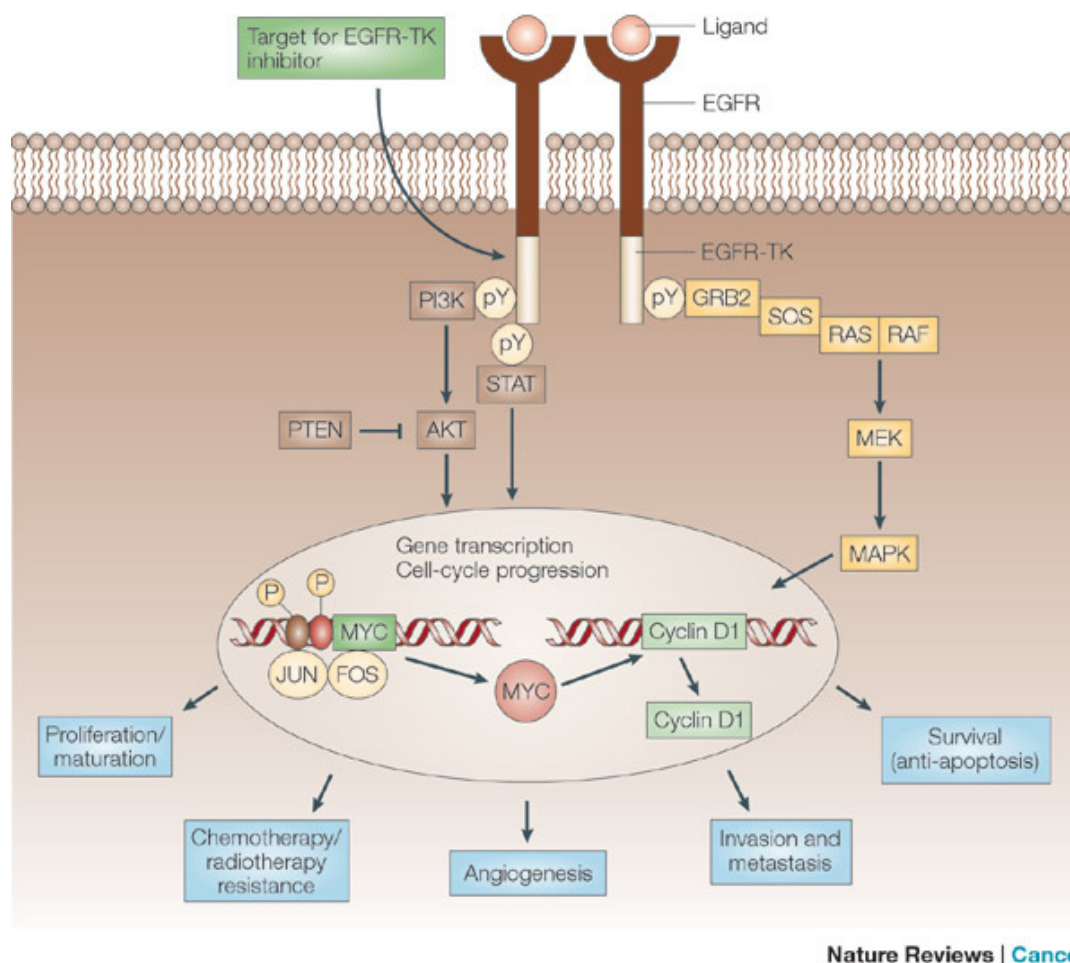
### 3.2.3 EGFR familien

Epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR)-familien har vist seg å være viktig for cellers utvikling, vekst og egenskaper. Reseptorfamilien knyttes opp mot flere krefttyper, deriblant prostatakrefte [11,12]. EGFR er et 170 kDa glykoprotein som uttrykkes i de fleste humane vev, og som overuttrykkes i mange solide tumorer. I tillegg uttrykker de basale lagene av epidermis i huden høye verdier av aktivert EGFR [13].

EGFR familien er en reseptorfamilie som består av 4 medlemmer:

- EGFR (ErbB1, HER),
- ErbB2 (HER2/neu)
- ErbB3 (HER3)
- ErbB4 (HER4)

Disse reseptorene er membranbundet med et ekstracellulært ligandbindende domene, et transmembran domene og et intracellulært tyrosin kinase domene. Når ligander bindes til det ekstracellulære domenet, fører dette til dannelse av homo- og heterodimere av reseptorene. Dette aktiverer det intracellulære domenet, som begynner å fosforylere tyrosinrester i cytoplasma og starte en signalkaskade. Denne kaskaden fører etter hvert til cellulær proliferasjon, redusert apoptose, celledmobilitet, adhesjon og invasjon. Alle disse prosessene er med på å legge til rette for tumorvekst (Figur 5) [11].



**Figur 5**

De viktigste signalveiene nedstrøms fra EGFR [13]. ERK (MAPK) aktiveres gjennom fosforylering av GRB2, SOS, RAS/RAF og MEK, og aktivert ERK benyttes som et mål på EGFR-aktivering.

Signalveiene nedstrøms fra EGFR-familien regulerer flere viktige prosesser ved å påvirke transkripsjonen av ulike gener. Noen av prosessene som påvirkes er:

- Cellemobilitet
- Celleadhesjon
- Tumorinvasjon/metastasering
- Celleoverlevelse
- Celleproliferasjon
- Angiogenese
- Resistens mot kjemoterapi og radioterapi

### 3.2.3.1 EGFR

Utvikling av hormonrefraktær prostatakreft ser ut til å være assosiert med en økning i EGFR-ekspresjon, selv om noen studier også viser at det ikke forekommer målbare endringer. Ifølge studier er det ingen andre reseptorer i gruppen som endrer ekspresjonen i vesentlig grad [14,15]. Det er uenighet om ekspresjonen av EGFR øker med økende Gleason Score [11].

Overekspresjon av EGFR kan være en indikasjon på en mer aggressiv sykdom, og som kan være vanskeligere å behandle [12]. Overekspresjon av reseptoren ses på som den viktigste mekanismen for økt EGFR-mediert signalering, men sannsynligvis er også andre mekanismer involvert i den økte aktiviteten. Økt mengde ligand og reseptormutasjon er andre mulige forklaringer. En kjent mutasjon er EGFR versjon III (EGFRvIII) som fører til at reseptoren er konstitutivt aktiv uten binding av ligand [16]. Denne reseptormutasjonen er en potensielt tumorspesifikk reseptor, som ikke uttrykkes i normale vev. Studier gir sprikende resultater om hvorvidt mutasjonen virkelig uttrykkes i tumorvev, og den synes vanskelig å detektere [17,18].

### 3.2.3.2 ErbB2

ErbB2 overuttrykkes hos kun en liten del av pasientene, og det er ikke vist noen signifikant forskjell i ekspresjonen mellom hormonresponive og hormonrefraktære tumorer [15,19].

Overekspresjon av ErbB2 kan være en indikasjon på en mer aggressiv sykdom, og som kan være vanskeligere å behandle [12]. I senere tid har man klart å vise at overekspresjon av ErbB2 aktiverer androgenreseptor-respons, og gir økt overlevelse og vekst i fravær av androgener [20]. Noen studier viser at ErbB2-ekspresjonen korrelerer mer med dårlig prognose enn EGFR-ekspresjonen [21].

Rundt 30 % av pasienter med brystkreft overuttrykker ErbB2, og dette er assosiert med økt angiogenese, redusert respons på cytotoxisk behandling og redusert overlevelse. Trastuzumab (Herceptin®) er et monoklonalt antistoff rettet mot det ekstracellulære domenet av ErbB2, og som benyttes ved behandling av brystkreft hos de som overuttrykker reseptoren [22].

### 3.2.3.3 ErbB3

Ekspresjonen av ErbB3 har i studier vist seg å være stabil, og endres ikke når tumoren utvikles til hormonrefraktær [14,15].

### 3.2.3.4 ErbB4

ErbB4 uttrykkes i liten grad i prostatakraft, men det er vist at ekspresjonen er dobbelt så høy i hormonresponsive tumorer som i hormonrefraktære [19]. Økt ekspresjon av ErbB4 kan også se ut til å være forbundet med økt pasientoverlevelse [14] på grunn av økt tendens til differensiering, veksthemming og tumorsuppresjon [23].

## 3.2.4 Ligander til EGFR-familien

EGFR-familien har flere ligander som kan binde og aktivere reseptorene. Åtte ulike ligander er identifisert [24]:

- Epidermal vekstfaktor (EGF)
- Transformerende vekstfaktor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )
- Epigen
- Epiregulin
- Betacellulin
- Heparin Bindende EGF-lignende vekstfaktor (HB-EGF)
- Amfiregulin (AREG)
- Neuregulin 1-4

Binding av ligand til en monomer i EGFR-familien, fører til at reseptorene kan homo- eller heterodimerisere. Dette aktiverer reseptoren, og den nedstrøms signalveien initieres (Figur 5). Hver ligand kan aktivere flere ulike dimeriseringer. Dimerene ErbB3-ErbB4 og ErbB3-ErbB3 aktiveres kun av Neuregulin, mens ErbB2-ErbB2 ikke har noen ligand [24].

Mange tumorer som uttrykker EGFR, produserer også en eller flere ligander til reseptoren. På denne måten har tumoren en autokrin vekst i tillegg til den eksokrine veksten fra blant annet hormoner [13].

### 3.2.5 Hormonfølsom prostatakraft

En normal prostata modnes og vokser med testosteronnivåer fire ganger høyere enn kastrasjonsnivå [25]. Siden prostatakjertelen er avhengig av androgener for å vokse og utvikle seg, er et viktig behandlingsalternativ å fjerne androgentilgangen og oppnå kastrasjonsnivå av hormonene. Det finnes flere ulike metoder å oppnå den ønskede effekten på:

#### **Orkiektomi** (Kirurgisk kastrasjon) [1]

- Fjerning av testiklene.
- Reduserer testosteronproduksjonen med ca 80 %.
- Effekten inntreer raskt, men overskygges av bivirkningene. (Psykologiske belastninger, hetetokter, svetting, bortfall av libido og ereksjonsevne, anemi, muskelsvakhet og osteoporose.)

#### **Gonadotropin-frihørende hormon (GnRH)-agonister** (Medisinsk kastrasjon) (Goserelin, Zoladex®) [1,26]

- Hemmer sekresjon av LH (Luteiniserende hormon) fra hypofysen.
- De første to ukene øker sekresjonen av LH, og dermed testosteron, men etter 2-4 uker oppnås kastrasjonsnivå for serumtestosteron.
- Gir de samme bivirkninger som ved orkiektomi.

#### **Østrogenbehandling** (Medisinsk kastrasjon) [1]

- Et alternativ til de som ikke ønsker kjemisk eller kirurgisk kastrasjon.
- Reduserer plasmatestosteron til kastrasjonsnivå etter fire uker.
- Ser ut til å gi samme overlevelse som androgen kastrasjon.
- Gir økt risiko for kardiovaskulære sykdommer

#### **Antiandrogenbehandling** [1]

- Fører til at pasienten har normale serumtestosteronnivåer, samtidig som virkningene av testosteron reduseres i prostatakraftcellene. Behandlingen er likeverdig med kastrasjon ved lokal avansert tumor uten fjernmetastaser.

Dersom tumoren er lokal uten metastaser, kan det gis behandling med kurasjon som mål. Ved kurasjonsbehandling behandles tumoren direkte:

#### **Radikal prostatektomi** [1]

- Kirurgisk fjerning av prostatakjertelen.



- Gir permanent inkontinens hos ca 10 % av pasientene, og ereksjonsproblemer hos mer enn 50 %.
- Hormonbehandling bør gis etter inngrepet, i minst 3-6 måneder.

### **Strålebehandling [1]**

- Stråling direkte på prostatakjertelen.
- Gir mindre sannsynlighet for ereksjonsproblemer enn ved radikal prostatektomi.
- Hormonbehandling kan med fordel gis både før og etter strålebehandlingen.

En annen strategi for behandling av pasienter med lokalisert sykdom, er aktiv monitorering av prostatakjertelen og hyppige PSA-målinger. Da kan man følge progresjonen av sykdommen, og eventuelt begynne å behandle ved økt sykdomsprogresjon [1].

## **3.2.6 Hormonrefraktær prostatakraft**

I nesten alle tilfeller av avansert prostatakraft som behandles med en eller annen form for androgendeprivasjon, vil tumoren begynne å vokse igjen [27]. Tumoren har da blitt hormonrefraktær, som vil si at prostatatumoren vokser selv ved kastrasjonsnivå av androgener. Det vil igjen si at androgendeprivasjon ikke lenger er en effektiv behandling, ettersom tumoren vokser og metastaserer uavhengig av androgenkonsentrasjonen. Det er vist at hormonrefraktære celler trenger 80 % lavere androgenkonsentrasjon enn hormonresponsive for å vokse [27].

Endringen fra hormonresponsiv til hormonrefraktær tumor kan skyldes flere ulike faktorer. Klonal seleksjon av hormonrefraktære cellelinjer kan være en forklaring [5], men andre faktorer som involverer androgenreseptoren (AR) er sannsynligvis mer aktuelle [27]. AR er en intracellulær steroidreseptor som binder testosteron og dihydrotestosteron. Reseptoren aktiveres når ligand (androgener) bindes til bindingssetene på reseptoren, og AR medierer derfor effekter av androgenhormonene.

AR kan medvirke til at tumoren blir hormonrefraktær på flere ulike måter:

### **Oppamplifisering av AR**

Dette fører til økt ligandbinding, og økt effekt av androgener som er tilstede ved normalt kastrasjonsnivå. Denne teorien støttes av at det i hormonrefraktære tumorer er målt høyere ekspresjon av AR enn i hormonfølsomme tumorer [27].

### **Mutasjoner i genet som koder for androgenreseptor**

Mutasjoner i AR-genet kan føre til blant annet økt genekspresjon og endrede reseptoregenskaper. En normal AR uten mutasjoner har kun testosteron og dihydrotestosteron som ligander, men mutasjonene har vist å kunne endre reseptorens ligandspesifisitet. Reseptoren kan dermed også aktiveres av andre ikke-androgene ligander [27]. Ved å undersøke cellelinjen LNCaP som har en mutert AR, har man påvist høy ekspresjon, økt stabilitet og økt kjernelokalisasjon av AR. Alt dette er assosiert med en økt sensitivitet for den vekstfremmende effekten av dihydrotestosteron. Androgenkonsentrasjonen som trengs for å stimulere til vekst i androgenuavhengige celler er fire ganger mindre enn i LNCaP celler [27].

### **Økt lokal produksjon av androgener i prostataceller**

En økning av enzymet 5 $\alpha$ -reduktase som omdanner testosteron til dihydrotestosteron er den mest sannsynlige årsaken til økt lokal produksjon av androgener i prostataceller [27]. Forskningsresultater som støtter dette:

- Man har vist at etniske grupper med økt 5 $\alpha$ -reduktase aktivitet har flere tilfeller av prostatakreft enn andre.
- Pasienter som er behandlet med antiandrogener har redusert serumtestosteron med 95 %, men konsentrasjonen av dihydrotestosteron i prostata er bare redusert med 60 %.
- Man har funnet overekspressjon av gener som er involvert i biosyntesen av steroider i prostatatumorer.

### **Koregulatorer**

Et stort antall koaktivatorer og korepressorer involvert i regulering av AR-drevet transkripsjon fungerer som mellomsignaler mellom AR og det generelle transkripsjonsmaskineriet. Man kjenner ikke den spesifikke mekanismen, men endringer i balansen mellom aktivatorer og repressorer kan påvirke aktiveringen av AR. Ved androgenuavhengig prostatakreft har man vist en økning i nivået av koaktivatorer. Koaktivatorene har vist seg å øke ARs aktivitet ved aktivering med alternative ligander, sensitivisering av reseptoren for små mengder ligand og økning av den liganduavhengige aktiveringen [27].

### **Liganduavhengig aktivering av androgenreseptor**

AR-effekter kan aktiveres via andre signalveier. Man har blant annet vist at overekspressjon av ErbB2 kan aktivere AR-avhengige gener uavhengig av om AR har ligand bundet til seg [27]. AR-avhengig transkripsjon mediert av ErbB2 skjer dermed

også etter at kastrasjonsnivå er oppnådd, og dette fører til fortsatt tumorvekst. Dette viser at ErbB2 kan spille en viktig rolle i utviklingen av hormonrefraktær prostatakreft, og at de pasientene som overuttrykker ErbB2 bør behandles med en ErbB2-hemmer i tillegg til androgendeprivasjon [20].

### **Oppregulering av vekstfaktorer og bypassmekanismer**

De glatte muskelcellene i prostata er de viktigste med hensyn på lokal produksjon av vekstfaktorer. De produserer blant annet epidermal vekstfaktor (EGF), fibroblast vekstfaktor (FGF), transformerende vekstfaktor- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), transformerende vekstfaktor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), insulinlignende vekstfaktor-1 (IGF-1), vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF), nerve vekstfaktor (NGF), platederivert vekstfaktor (PDGF) og hepatocyt vekstfaktor (HGF). I noen tilfeller utvikler prostatakreftcellene egenskapen til å kunne overleve helt uten AR-aktivering. Mekanismer for dette involverer modulering av apoptose ved en oppregulering av antiapoptotiske molekyler, inaktivering av tumorsuppressorgener, oppregulering av vekstfaktorproduksjon og neuroendokrin differensiering av prostatakreftcellene. Den neuroendokrine differensieringen er først og fremst viktig fordi det skjer en økt produksjon av neuropeptider som virker som vekstfaktorer [27]. De neuroendokrine cellene i prostata kan produsere og sekreere ulike nevronale markører. I tillegg har man registrert en sekresjon av andre vekstmodulerende hormoner i en subgruppe av neuroendokrine celler. Disse mitogene peptidene har blitt foreslått å spille en rolle i progresjon av prostatakreft.

### **Tumor stamceller**

En modell hvor man ser for seg at kun en liten subgruppe av kreftcellene er potensielt tumorinitierende. Disse uttrykker ikke AR, og kalles prostatakreftstamceller.

#### **3.2.6.1 Behandling av hormonrefraktær prostatakreft.**

Behandling av hormonrefraktær prostatakreft er mye vanskeligere enn behandling av hormonresponsiv. Behandlingen har i følge dagens retningslinjer kun en palliativ målsetting fordi det ikke finnes beviser for at noen behandling kan forlenge overlevelsen [1].

Behandlingsalternativer som likevel kan prøves for effekt er:

#### **Cytostatika**

Mitoxantrone kan gi smertelindring og forbedring av livskvalitet i kombinasjon med kortikosteroider. I tillegg har docetaxel vist seg å være effektiv [1].

**Østrogenbehandling**

Kan hemme gonadotropinsekresjonen fra hypofysen, og ha en direkte cytotoxisk effekt på tumoren. Bruken begrenses av bivirkninger [5].

**Glukokortikoider**

Hemmer utskillelse av kjønnshormoner fra binyrene i tillegg til at de gir økt appetitt, redusert utilpasshet og økt velbefinnende [1].

**Strålebehandling**

Brukes for effektivt å lindre smerter som skyldes metastaser i skjelettet [1].

**Hemming av vekstfaktorer**

En del vekstfaktorer har vist seg å være involvert i utvikling og progresjon av hormonrefraktær prostatakreft. Insulin lignende vekstfaktor (IGF), platederivert vekstfaktor (PDGF), fibroblast vekstfaktor (FGF), endotelin og epidermal vekstfaktor (EGF), er de vekstfaktorene som har utpekt seg [5]. Ved å hemme disse, kan man også hemme vekst og videre utvikling av tumoren.

I tillegg til disse behandlingsalternativene, bør alle pasienter fortsette med kastrasjonsbehandling. Grunnen til dette er at det fortsatt kan finnes igjen noen hormonfølsomme celler [1,5].

**3.3 IRESSA®**

I desember 2004 fantes det mer enn 20 anti-EGFR preparater under utvikling, og flere tilgjengelige for klinisk bruk [13]. Disse kan deles inn i to hovedklasser.

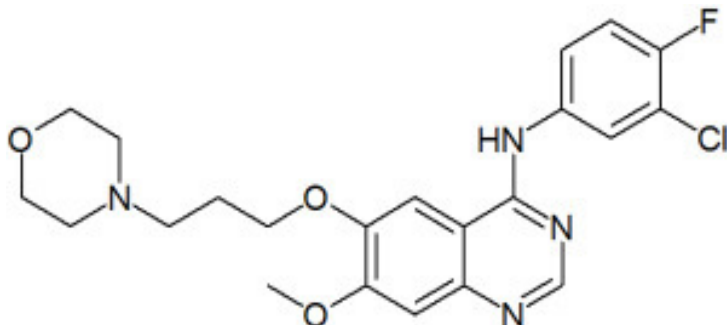
**Småmolekylære EGFR tyrosinkinase (TK) hemmere**

Disse konkurrerer med adenosin-trifosfat (ATP) om bindingssetet på tyrosinkinasedelen av reseptoren. Når stoffene bindes til tyrosinkinasen hemmes aktiviteten, og signalene nedstrøms fra reseptoren blokkeres (Figur 5).

**Monoklonale antistoffer**

Dette er antistoffer rettet mot den ekstracellulære delen av EGFR, og som kompetitivt hemmer binding av ligand til reseptoren. Dersom ligandbindingen blokkeres, blokkeres også signaltransduksjonen fra reseptoren.

Iressa® (ZD1839, Gefitinib) (Figur 6) tilhører den første klassen. Den er en potent hemmer av tyrosinkinase, og dermed en potent hemmer av EGFR-aktiviteten. Iressa® hemmer kun i liten grad andre strukturelt like reseptorer som de andre reseptorene i EGFR-familien (ErbB2, ErbB3 og ErbB4) og reseptoren for vaskulær endotelcelle vekstfaktor (VEGF) [13]. Iressa® er derfor en selektiv og potent hemmer av EGFR-TK, noe som vil redusere bivirkningene av preparatet [16].



**Figur 6** Gefitinib (Iressa®) - kjemisk strukturformel

Fordi huden uttrykker høye verdier av aktivert EGFR, har effekten av Iressa® blant annet blitt testet i hudbiopsier. Her har Iressa® vist seg å fullstendig hemme EGFR-fosforylering, redusere aktiviteten til mitogenaktivert proteinkinase, gi økt apoptose og øke verdiene av p27 som ser ut til å hemme cellyklus [13]. Iressa® er i tillegg testet og har gitt forsinkelse av cellyklus i humane kreftceller fra hode og nakke. Denne forsinkelsen skyldes endret regulering av cyklin avhengig kinase 2 (CDK2) som er en nedstrømskomponent i signalveien fra EGFR [16].

To store utprøvnings av Iressa®, IDEAL 1 (Europa og Japan), og IDEAL 2 (USA) har testet Iressa®s effekt mot ikke-småcellet lungekreft (NSCLC). Resultatene fra disse viste at 9-19 % av pasientene responderte på behandlingen med symptomforbedring og økt livskvalitet. Behandlingen var relativt godt tolerert som monoterapi, og de viktigste registrerte bivirkningene var hudutslett og diarè. De tidlige resultatene fra utprøvnings av Iressa® viser at de som responderer på behandlingen har noen fellestrekk; de fleste er japanske, ikke-røykende kvinner med adenokarsinom [28].

En pågående fase II studie i Norge undersøker effekten av Iressa® mot prostatakreft ved å teste Iressa® alene mot Iressa® i kombinasjon med antiandrogenet Casodex®. De første resultatene fra denne studien er forventet i slutten av 2006.

Bivirkningene av Iressa® ser ut til å ha sammenheng med hvor EGFR uttrykkes i størst grad i kroppen. Hudbivirkningene er en av de viktigste bivirkningene som kan oppstå ved lengre tids bruk av Iressa®. I tillegg til å være plagsomt ser hudutslettet også ut til å være en markør for behandlingseffekt. Hudutslett kan gi en indikasjon på at behandlingen faktisk har effekt [28].

## 4 PROBLEMSTILLING

Halvparten av pasientene som diagnostiseres med prostatakraft har lokalavansert eller metastasert sykdom. Hormonrefraktær prostatakraft er en kreftform der det i dag ikke finnes kurativ behandling. En rekke nye legemidler er imidlertid under utprøving. De nye legemidlene som har vært forsøkt mot kreftformen har til nå vist seg å gi relativt dårlig effekt. Iressa® er et av legemidlene som er under utprøving mot hormonrefraktær prostatakraft. Den er en potent hemmer av EGFR som har vist god hemmende effekt i prostatakraftcellelinjer [29], men som har vist seg å gi lite eller ingen effekt i kliniske utprøvinger på mennesker [30]. Likevel kan det se ut som Iressa® i kombinasjon med andre stoffer mot kreft, kan gi en forbedret behandlingsstrategi [31].

Bakgrunnen for denne oppgaven er en fase II studie som pågår i Norge, der effekten av Iressa® testes i kombinasjon med antiandrogenbehandling, mot behandling med bare antiandrogener på pasienter med lokalavanserte prostatakraft.

Siden Iressa® er en selektiv hemmer av EGFR, skal denne oppgaven konsentreres om å undersøke signalveien nedstrøms for EGFR og hvordan ulike vekstfaktorer påvirker denne.

Målet med oppgaven er å undersøke EGFR-signalveien og dermed finne årsaker som kan forklare, eller være med på å avdekke respons/nonrespons hos pasienter med hormonrefraktær prostatakraft.

Ekspresjon av ErbB-familiemedlemmene på mRNA-nivå i ulike prostatakraftcellelinjer skal kartlegges. Videre skal det studeres hvordan de forskjellige cellelinjene responderer på EGF-stimulering og hvordan Iressa® hemmer EGF-indusert ERK aktivering. For å øke forståelsen av Iressa®s virkning *in vivo*, skal det også undersøkes hvordan en annen vekstfaktor, amfiregulin, påvirker effekten av EGF på ERK-aktivitet.

## 5 MATERIALER

### 5.1 REAGENSER

REAGENS	PRODUSENT
3,3',5-Triiodo-L-Thyronine (T <sub>3</sub> )	Sigma
Adenine hemisulfate salt	Sigma
Albumin, bovine serum (BSA)	Sigma
Amersham ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
Amphiregulin	Sigma
Amphiregulin Antibody	Chemicon
Apo-Transferrin (Apo-T)	Sigma
Bio-Rad Protein Assay	Bio Rad
d-Biotin	Sigma
Complete Mini, EDTA-free. Protease inhibitor cocktail tablets.	Roche
DMEM/F-12 (1:1)	Gibco, Invitrogen
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma
Foetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Invitrogen
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore
Insulin, From Bovine Pancreas	Sigma
Kaliumchlorid, pro analysi (KCl)	Merck
Magic Mark™ XP Western Standard	Invitrogen
Methanol	VWR
Natriumazid reinst	Merck
Natriumclorid, pro analysi (NaCl)	Merck
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1,5mm x 10 well	Invitrogen
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen



REAGENS	PRODUSENT
PBS (Phosphate Buffered Saline) Tablets	Gibco
Penicillin	Alpharma
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	ImmunoResearch
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Sigma
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Antibody	Cell Signaling
Antirabbit IgG	Jackson ImmunoResearch
RPMI 1640 + L-Glutamin	Gibco, Invitrogen
RPMI 1640 + L-Glutamin uten fenolrødt	Gibco, Invitrogen
Sodium fluoride, SigmaUltra	Sigma
Sodium Orthovanadate	Sigma
Sodium Pyrophosphate dibasic	Fluka, BioChemika
Streptomycin	Pharma-Tec
Trizma® base, SigmaUltra	Sigma
Trypsin	Sigma
Tween 20	Sigma
ultraPURE™ Distilled water, DNase, RNase free	Gibco, Invitrogen
Quantitect SYBR-Green RT-PCR kit	Qiagen

### 5.1.1 Løsninger

#### 5.1.1.1 RIPA

- NaCl                      150 mM
- NP-40                    1 %
- SDS                        0,10 %
- Tris-HCl                  50 mM
- dH<sub>2</sub>O

#### 5.1.1.2 TBS-T

- NaCl                                      80 g
- KCl                                        2 g
- Tris base                                30 g
- Tween                                     5 ml

Fortynnes med dH<sub>2</sub>O til 10 liter. pH ~ 8

**5.1.1.3 RIPA med fosfatasehemmere**

• RIPA	10 ml	
• Complete Mini EDTA Free Protease inhibitor	1 tablett	
• PMSF 0,1 M	100 µl	
• Natriumortovanadat 1mM	100 µl	] Fosfatasehemmere
• Natriumfluorid 50 mM	10 µl	
• Natriumpyrofosfat 0,2 mM	10 µl	

**5.1.1.4 Transferbuffer**

• NuPAGE 20x transferbuffer	50 ml
• Metanol	200 ml
• Vann	750 ml

**5.1.1.5 RPMI medium**

Cellelinjene LNCaP, LNCaP-Rf, PC-3 og DU-145 går i RPMI 1640 + L-Glutamin (Gibco, Invitrogen. Cat.no: 21875-042) medium tilsatt:

- 10 % FBS (Gibco, Invitrogen. Cat.no: 10270106)
- 50 µg/ml streptomycin
- 50 µg/ml penicillin

Dette mediet inneholder fenolrødt som fungerer som en pH-indikator. Den blir gulere ved lav pH, og mørkere rød ved høy pH. Når cellene har vokst lenge i mediet, blir fargen gulere.

Cellelinjene LNCaP, LNCaP-Rf, PC-3 og DU-145 overføres til RPMI 1640 + L-Glutamin uten fenolrødt (Gibco, Invitrogen. Cat.no: 11835-063) med strippet serum dagen før forsøk med cellostimuleringer. Dette mediet inneholder CSS i stedet for FBS. Medium med strippet serum inneholder ikke fenolrødt, siden dette kan ha østrogenlignende effekter. Mediet må beskyttes for lys.

#### 5.1.1.6 T-medium

T-medium lages ved at DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen. Cat.no: 31330-038) medium tilsettes:

- 5 µg/ml insulin
- 0,0136 ng/ml T3
- 5 µg/ml apo-transferrin
- 0,25 µg/ml biotin
- 25 µg/ml adenin
- 50 µg/ml streptomycin
- 50 µg/ml penicillin
- 5 % FBS (Gibco, Invitrogen. Cat.no: 10270106)

Dette mediet inneholder fenolrødt som fungerer som en pH-indikator.

Cellelinjen LNCaP-C4-2 overføres til DMEM/F12 uten fenolrødt (Gibco, Invitrogen. Cat.no:11039-021) med strippet serum dagen før forsøk med cellestimuleringer. Dette mediet inneholder CSS i stedet for FBS. Mediet med strippet serum inneholder ikke fenolrødt. Mediet må beskyttes for lys.

#### 5.1.1.7 Strippet serum

Strippet serum lages ved at kull først aktiveres i en buffer av dextran, Tris/HCl og vann. Suspensjonen sentrifugeres, og det aktive kullet tilsettes til det vanlige serumet. Dette blandes ved 4°C i 12 timer. Kullet vil da suge til seg hydrofobe forbindelser. Etter 12 timer sentrifugeres blandingen og supernatanten filtreres og beholdes. Strippet serum er deprivert for androgener/steroider, men inneholder bl.a. vannløselige vekstfaktorer.

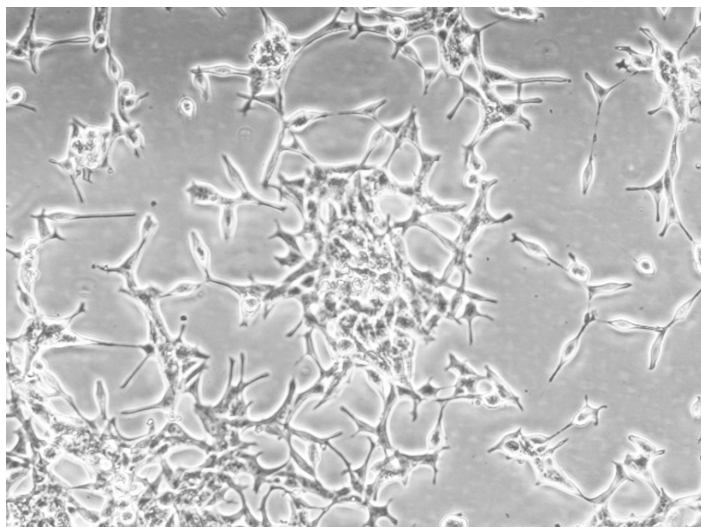
## 5.2 CELLELINJER

### 5.2.1 LNCaP

(Figur 7) (ATCC Cat.no: CRL-1740™)

Cellene ble isolert i 1977 fra en lymfeknute hos en 50 år gammel mann med bekreftet metastaserende prostatakraft [32]. Cellene uttrykker både androgen- og østrogenreseptor, og responderer på stimulering med  $5\alpha$ -dihydrotestosteron både med hensyn på vekst og surfosfataseproduksjon. Cellelinjen har en mutasjon i genet for androgenreseptor, som fører til at reseptoren har bredere ligandspesifisitet og aktiveres av flere ulike ligander.

LNCaP-celler vokser i RPMI-medium tilsatt 10 % FBS og Penicillin/Streptomycin (PenStrep).

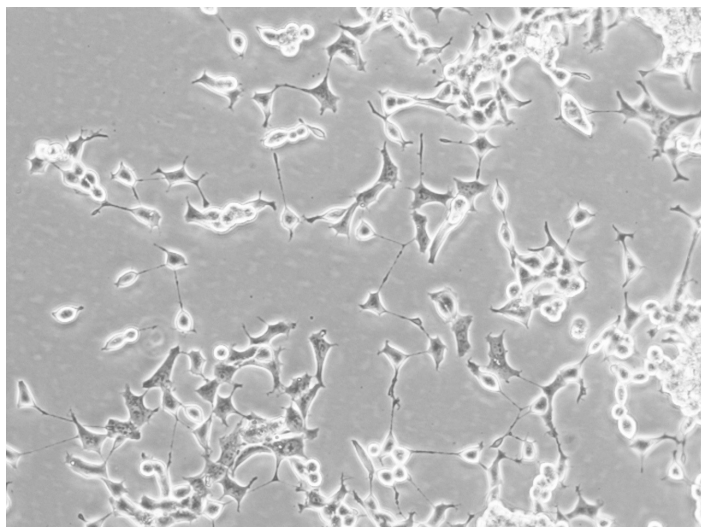


**Figur 7** Levende LNCaP celler.

### 5.2.2 LNCaP-Rf (Rf)

(Figur 8)

LNCaP-Rf er en androgenrefraktær LNCaP-derivert cellelinje [33]. Cellelinjen ble til ved at LNCaP celler fikk vokse over lang tid (ca 10 uker) i medium med strippet serum. Rf uttrykker lave nivåer av AR, og udetekterbare verdier av PSA. LNCaP-Rf-celler vokser i RPMI-medium tilsatt 10 % CSS.



**Figur 8** Levende LNCaP-Rf celler

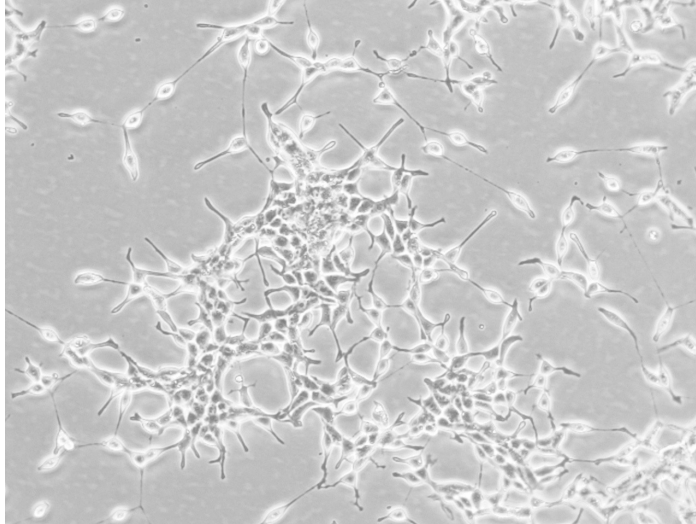
### 5.2.3 LNCaP-C4 (C4)

Cellelinjen LNCaP-C4 er hentet ut fra et xenograft hvor LNCaP-celler hadde vokst i 4 uker i en kastrert vert [34]. Cellene er androgenuavhengige og uttrykker 5-10 ganger høyere steady-state konsentrasjon av PSA enn LNCaP-celler [34]. Av utseende er LNCaP-C4-cellene lik LNCaP-C4-2 cellene (Figur 9). LNCaP-C4-celler vokser i T-medium.

### 5.2.4 LNCaP-C4-2 (C4-2)

(Figur 9)

LNCaP-C4-2 cellene er andregenerasjons LNCaP-deriverte celler [34]. De er direkte avledet fra LNCaP-C4, ved at LNCaP-C4 ble implantert i en kastrert vert og høstet igjen etter åtte uker. Cellene uttrykker, i likhet med LNCaP-C4 og LNCaP-Rf, fem til ti ganger høyere steady-state konsentrasjon av PSA enn LNCaP-celler. Derimot er ekspresjonen av AR redusert i forhold til LNCaP, og androgenresponsiviteten er derfor endret. Cellelinjen er androgenuavhengig [34]. LNCaP-C4-2-celler vokser i T-medium.

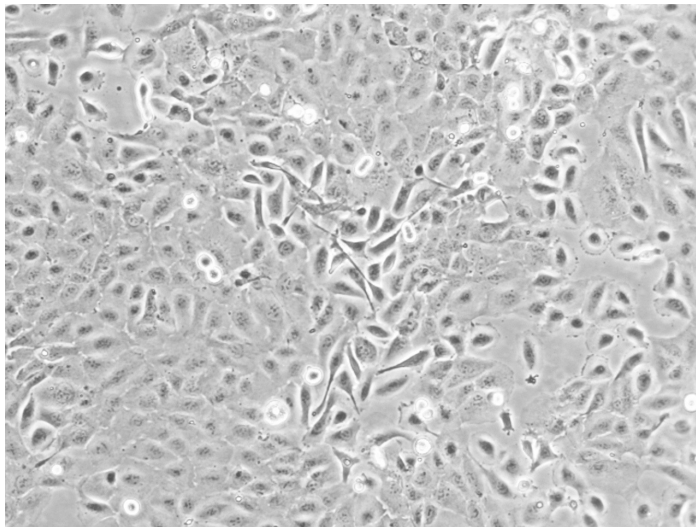


**Figur 9** Levende LNCaP-C4-2 celler.

### 5.2.5 PC-3

(Figur 10) (ATCC Cat.no: CRL-1435™)

Cellene er isolert fra en benmetastase hos en 62 år gammel mann med adenokarsinom i prostata. Cellelinjen er androgenuavhengig. PC-3-celler vokser i RPMI-medium tilsatt 10 % FBS og Pen-Strep.



**Figur 10** Levende PC-3 celler

### 5.2.6 PC-3 Neo

PC-3 Neo er en subcellelinje av PC-3, som er transfektert med en tom vektor (Jiale Dai, Burnstein Lab). Cellelinjen er ment å fungere som en kontroll for PC-3AR. Egenskapene til PC-3 celler er i utgangspunktet de samme som vanlige PC-3 celler, men PC-3Neo er resistent mot geneticin. For å selektere for transfekterte celler tilsettes derfor mediet geneticin. PC-3Neo-cellene vokser i RPMI-medium tilsatt 10 % serum, PenStrep og geneticin.

### 5.2.7 PC-3AR

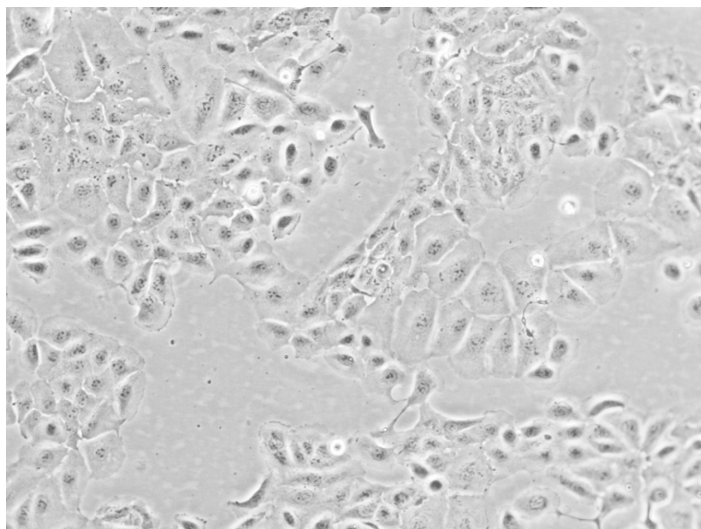
PC-3AR er en subcellelinje av PC-3, som er transfektert med androgenreseptor (Jiale Dai, Burnstein Lab). Man ser mindre autofosforylering av EGFR i PC-3AR enn i vanlige PC-3-celler. AR fører, gjennom en direkte interaksjon med EGFR, til en reduksjon i EGF-mediert signalering, og en mindre malign fenotype [35]. PC-3AR-cellene vokser i RPMI-medium tilsatt 10 % serum og PenStrep.

### 5.2.8 DU-145

(Figur 11) (ATCC Cat.no: HTB-81™)

Cellene ble isolert fra en hjernemetastase hos en 69 år gammel mann med metastatisk prostatakreft, og en 3 års historie med lymfocytisk leukemi. Cellene er ikke hormonsensitive, og er kun svakt positive for sur fosfatase.

DU-145-celler vokser i RPMI-medium tilsatt 10 % serum og PenStrep.



**Figur 11** Levende DU-145 celler

### 5.3 PRIMERE

Tabell 1 Sekvenser for primerene brukt i oppgaven

Primernavn	Left	Right
Amphiregulin	GAGCACCTGGAAGCAGTAACA	AACTACTGTCAATCATGCTGTGAGTTT
BMP1	ACATTGCCCTGGACGAAGAG	TGGAAGTGCAGCTTTGATGG
EGFR	GAGTCGGGCTCTGGAGGAA	CATCCTCTGGAGGCTGAGAAA
ErbB2	GTGTGAGAAGTGCAGCAAGC	TCCTGGATATTGGCACTGGT
ErbB3	GGCAACCTGGACTTTCTGAT	CCGTACTGTCCGGAAGACAT
ErbB4	GCAACCTGGAGATAACCAGCA	TCTCCAGAGGCAGGTAACGAA
G6	TGCATGAGCCAGATAGGC	ACAGGGAGGAGATGTGGTTG
HDGF	CCGTGAAATCAACAGCCAAC	GGGCTTGCCAAACTTCTCCT
Midkine	GGAGCCGACTGCAAGTACAA	ATGGTCTCCTGGCACTGAGC
VEGFB	CTGGCCACCAGAGGAAAGT	CATGAGCTCCACAGTCAAGG

### 5.4 UTSTYR

NuPAGE® Elektroforesekar	Invitrogen
NuPAGE® Blottekar	Invitrogen
Immobilon™ PVDF Transfer Membranes	Millipore
DNA Engine Opticon® 2 System	VWR
Opticon Monitor 3	VWR
Syngene Chemi Genius Bio Imaging System	VWR
GeneSnap fra Syngene	VWR
GeneTools fra Syngene	VWR



## 6 METODER

### 6.1 CELLEDYR KING

Cellelinjene oppbevares i frysemedium på flytende nitrogen, og tines opp ved behov. Cellene tines raskt opp i vannbad ved 37°C til cellepelleten begynner å løsne rundt kanten av røret. Deretter overføres cellepelleten til et 12 ml rør og resuspenderes i iskaldt cellemedium. Cellesuspensjonen sentrifugeres, og cellepelleten resuspenderes igjen i romtemperert medium. Denne suspensjonen helles over i en celleflaske, og settes i inkubatorskap ved 37°C. Når cellene har festet seg til flasken (etter 1-2 dager), skiftes medium på cellene. Medium skiftes deretter hver 2.-3. dag, og cellene splittes en gang hver uke.

### 6.2 CELLESTIMULERINGER

1 million celler sås ut i 10 cm Corning skåler i fullverdig medium med tilsatt serum. Cellene får vokse til de er 70-80 % konfluente. En dag før forsøket settes i gang overføres cellene til medium tilsatt strippet serum. Dette gjøres for å ikke ha stoffer som kan påvirke stimuleringen i skåla når forsøket settes i gang. På forsøksdagen tilsettes stoffet det skal stimuleres med til mediet, og får virke et gitt antall minutter. Etter endt stimulering suges mediet av, cellene skrapes i 1 ml PBS tilsatt fosfatasehemmeren natriumortovanadat og settes på is. Cellesuspensjonen sentrifugeres i kjølesentrifuge ved 4°C ved 6000 rpm i fem minutter. Deretter suges supernatanten av, og cellepelleten resuspenderes i RIPA-buffer med fosfatasehemmere. Blandingen settes så i rotator på kjølerom i 30 minutter slik at cellene ødelegges og proteinene løses i RIPA bufferen. Blandingen sentrifugeres igjen i kjølesentrifuge ved 4°C ved 12000 rpm i 20 minutter, for å bli kvitt uløst materiale. Supernatanten suges av og beholdes.

Ved stimulering av cellelinjene med EGF og økende konsentrasjoner amfiregulin, ble følgende konsentrasjoner og tider benyttet:

- Stimuleringskonsentrasjon EGF som er benyttet er for LNCaP-C4-2: 10 ng/ml, PC-3: 5 ng/ml og DU-145: 50 ng/ml
- Stimuleringskonsentrasjon amfiregulin som er benyttet er for LNCaP-C4-2: 100 ng/ml, PC-3: 200 ng/ml og DU-145: 100 ng/ml.

- LNCaP-C4-2 ble stimulert med EGF i 30 min, PC-3 og DU-145 i 5 minutter.
- LNCaP-C4-2 ble stimulert med amfiregulin i 120 minutter, PC-3 og DU-145 i 5 minutter.

## 6.3 PROTEINMÅLING

Til proteinmåling benyttes Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate. Proteinmåling med dette reagenset er basert på Bradford dye-binding prosedyren, som er en spektroskopisk prosedyre for å måle proteinkonsentrasjonen i en løsning. Prinsippet bygger på at fargen Coomassie Brilliant Blå endrer farge når den bindes til arginin og hydrofobe aminosyrerester i proteinene. Fargen endres fra rød/grønn til blå når den bindes til proteiner, og blåfargen absorberer UV ved 595 nm. Proteinkonsentrasjonen måles ved at man i et UV-spektrofotometer måler absorpsjonen ved 595 nm. Absorpsjonen øker proporsjonalt med proteinkonsentrasjonen i det lineære området.

Ved å først måle absorpsjonen av flere proteinprøver med kjent konsentrasjon, kan man sette opp en standardkurve. Ut ifra denne, kan man beregne eksakt proteinkonsentrasjon i prøvene. Prøveopparbeidelsen foregår ved at 1 µl proteinprøve tilsettes 3 µl RIPA-buffer og 790 µl dH<sub>2</sub>O. Tilslutt tilsettes hver prøve 200 µl Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, og det hele inkuberes i romtemperatur i fem minutter før proteinmålingen kan utføres. Før selve målingen begynner, må måleapparatet nullstilles ved at en prøve uten tilsatt protein måles. Resultatet fra denne målingen settes til 0 µg/µl.

## 6.4 WESTERN BLOT

### 6.4.1 Prinsipp

Western blot (Immunoblot) er en molekylærbiologisk metode for å måle relative mengder av et protein i ulike prøver. Elektroforese er separasjon av ladde partikler i et elektrisk felt, og det er dette prinsippet som utnyttes ved en western blot analyse. Metoden benytter gelelektroforese på en polyakrylamidgel for å separere denaturerte proteiner etter masse. Proteinene overføres så fra gelen til en polyvinylidfluorid (PVDF) -membran ved hjelp av elektroforese. Når proteinene er overført til membranen, tilsettes et antistoff mot det proteinet som skal analyseres. Deretter tilsettes et sekundært antistoff rettet mot det primære antistoffet. På det sekundære antistoffet henger også enzymet horseradish peroxidase (HRP). Blottet

framkalles ved å bruke enzymatisk chemiluminescense (ECL), og reaksjonen som da skjer mellom HRP og ECL vil sende ut et lys som kan detekteres ved hjelp av kamera eller film. Lysintensiteten er proporsjonal med mengden bundet antistoff.

ERK (MAP-Kinase) er en kinase som aktiveres nedstrøms fra EGFR. Fosforylert ERK (pERK) er den aktiverte formen av kinasen, og den har vist seg å være en god markør for aktivering av EGFR. pERK er i denne oppgaven brukt som markør for aktivert EGFR.

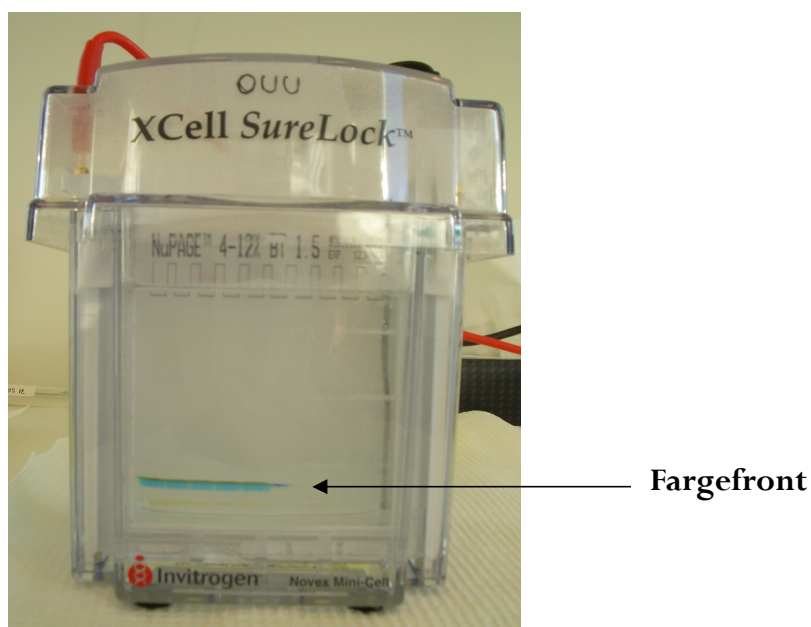
### 6.4.2 Prøveopparbeidelse

50µg protein tilsettes buffer (her: RIPA med fosfatasehemmere) opp til 20µl og 6µl NuPAGE® LDS Sample Buffer. Blandingen kokes i fem minutter. Både samplebufferen og kokingen er med på å sikre at proteinene er denaturert tilstrekkelig, så de effektivt kan separeres på gel. Glycerol i samplebufferen sørger for at blandingen er viskøs nok til å synke til bunns i gelbrønnen. LDS fra samplebufferen fester seg til proteinene slik at det dannes LDS-proteinkomplekser som er like store og negativt ladet. Kompleksene vil derfor vandre etter størrelse mot anoden i elektroforesen.

### 6.4.3 Elektroforese

Gelene festes i elektroforesekaret og karet fylles opp med runningbuffer. Brønnene i gelene skylles med runningbuffer før 26 µl prøve tilsettes. I den første brønnen på hver gel tilsettes 4µl western standard i stedet for prøve. Denne standarden inneholder ulike proteiner med kjent molekylmasse, sånn at man kan sammenligne proteinprøvene mot en kjent standard. Strømmen i elektroforesekaret settes på 200V, og proteinprøvene vandrer gjennom polyakrylamidgelen mot anoden. Strømmen skrus av når blåfargen fra samplebufferen når enden av gelen. Prøvene har da vandret og blitt separert etter størrelse på gelen.

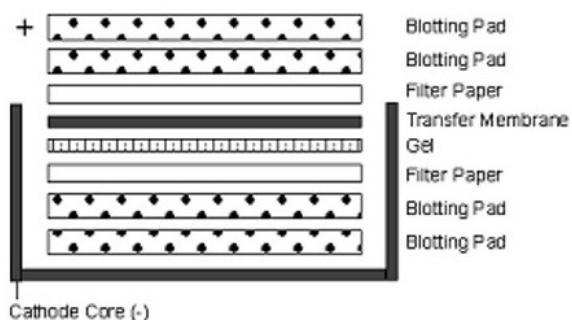
Ved å benytte en gradientgel (4-12 %) i stedet for en enfase-gel, oppnås en bedre separasjon av proteinene. På denne måten kan store proteiner letter separeres fra små.



**Figur 12** Oppsett av gelelektroforese med NuPAGE™ gel i XCell SureLock™ elektroforesekar.

#### 6.4.4 Blotting

Etter at proteinene er separert på gelen, overføres de til en membran. Dette gjøres i en NuPAGE® blottemodul. Membranen av PVDF aktiveres ved å ligge 30 sekunder i metanol, før den overføres til et kar med transferbuffer. Svamper og filterpapir fuktes også i transferbuffer. Svamper, filterpapir, membran og gel stables så i blottemodulen (Figur 13).



**Figur 13** Rekkefølge av svamper, filterpapir, gel og membran i blottemodulen [36].

Blottemodulen festes i NuPAGE® karet og fylles opp med transferbuffer. Ytterkaret fylles opp med  $\text{dH}_2\text{O}$ . Proteinene overføres til membranen ved å kjøre blottingen ved 35V i en time. Når strømmen settes på vil de negativt ladde proteinene igjen gå mot anoden, det vil si fra gelen, og fanges opp i membranen som ligger nærmere anoden enn membranen gjør.

### 6.4.5 Immunodeteksjon

PVDF membranen med proteiner settes på vippebrett i en 5 % løsning med tørrmelk i en time. Proteinene i melka fester seg da til membranen, og blokkerer uspesifikk binding mellom antistoff og membran. Etter dette vaskes membranen 3x5 minutter i TBS-T. Det primære antistoffet fortynnes til optimal konsentrasjon i oppgitt fortynningsmedium (1:1000 i 5 % BSA i TBS-T for pERK), og membranen legges i antistoffløsningen over natt ved 4°C. Dagen etter gjentas vaskeprosedyren i TBS-T. Det sekundære antistoffet fortynnes i 5 % tørrmelk, (fortynning 1:10 000) og membranen inkuberes i sekundært antistoff i 1 time. Membranen vaskes 3x5 minutter i TBS-T før den er klar til framkalling.

Primære antistoffer som er fortynnet i 5 % tørrmelk, kan benyttes flere ganger ved at løsningen tilsettes natriumazid som konserveringsmiddel, og oppbevares i kjøleskap.

### 6.4.6 Framkalling og deteksjon

Membranen inkuberes fem minutter i enhanced chemiluminescence (ECL) (Millipore eller Amersham Advanced). Like deler reagens 1 og 2 blandes rett før inkubasjonen. Etter inkubasjonen legges membranen på en glassplate i et mørkeskap, og bilde tas av membranen med et CCD-kamera. Bildet behandles videre i Syngene GeneSNAP og GeneTOOLS.

### 6.4.7 Loadingkontroll

For å kontrollere lik loading av proteinprøvene på gelen, probes membranen med et primært antistoff mot et protein man antar det er like store mengder av i alle prøvene. Prosedyren videre følger kapittel. 6.4.5 og 6.4.6. Som loadingkontroll kan bl.a. ERK og  $\alpha$ -tubulin benyttes.

### 6.4.8 Kvantifisering

Etter at blottet er ferdig framkalt og bilde er tatt, overføres bildet digitalt til GeneTOOLS. GeneTOOLS er et dataprogram som kan måle relativ lysintensitet til de ulike båndene på blottet. Resultatene kan deretter settes opp grafisk.

## 6.5 KVANTITATIV ETT TRINNS REAL-TIME RT-PCR

### 6.5.1 Prinsipp

Dette er en teknikk som benyttes for å relativt kunne bestemme mengden av et RNA transkript i en celle. I en ett trinns real-time RT-PCR vil en revers transkripsjon av RNA finne sted slik at man får laget cDNA før selve polymerase kjede reaksjonen av et gen av interesse finner sted i det samme røret. Dette er mulig ved at man benytter en blanding av enzymer som både inneholder en revers transkriptase og en DNA polymerase.

### 6.5.2 Primerdesign

For å kunne oppkonsentrere det genet man ønsker å analysere trengs det spesifikke primere. En primer består av en enkelttrådet oligonukleotid på rundt 20 baser som er komplementær til et område fra det genet man ønsker å analysere. For å analysere et gen i en polymerase kjede reaksjon trenger man to primere (et primerpar) som flankerer det aktuelle genet ( gjerne kalt 5' og 3' eller Left og Right) og som binder hver sin komplementære tråd. I en kvantitativ real time RT-PCR er det også ønskelig at lengden på PCR produktet som skal analyseres ikke er lengre enn rundt 150 basepar, dette for å oppnå høyest mulig effektivitet i RT-PCR reaksjonen.

Primerne i oppgaven ble designet i programmet Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) (Tabell 1).

### 6.5.3 Prøveopparbeidelse

I hver brønn på RT-PCR plata tilsettes:

- 250 ng RNA
- 12,5 µl SYBR Green
- 2,5 µl 5 µM Primer L
- 2,5 µl 5 µM Primer R
- 0,25 µl Quantitect RT-Mix
- 2,25 µl dH<sub>2</sub>O

RNA fra alle cellelinjene fantes i laboratoriet, og var tidligere isolert vha Trizolprosedyren for RNA-ekstraksjon.

#### 6.5.4 RT-PCR reaksjonen

I denne oppgaven er det benyttet et kit fra Qiagen (QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit). Det inneholder en blanding av enzymene Omniscript og Sensiscript Revers Transkriptaser. Den reverse transkripsjonen finner sted ved 50°C som er den optimale temperaturen for enzymene. Etter at cDNA så er blitt laget høynes temperaturen til 94°C i 15 min. Den reverse transkriptasen vil da bli inaktivert samtidig som DNA polymerasen som hittil har vært fullstendig inaktiv, blir aktivert og en polymerase kjedereaksjon kan starte. Hotstart av DNA polymerasen samt inaktivering av de reverse transkriptasene gjør at begge reaksjonene kan finne sted i ett og samme rør.

RT-PCR reaksjonen skjer i ti trinn:

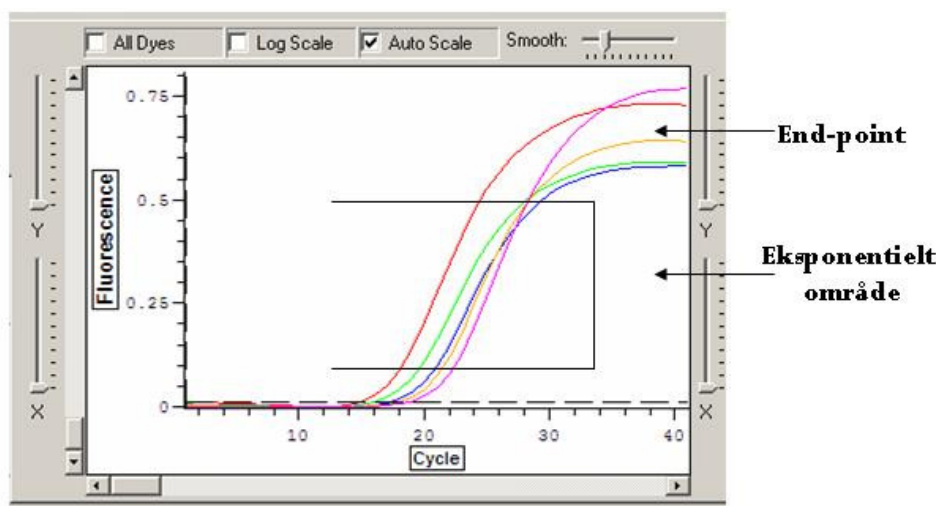
1. **Prøvene inkuberes ved 50°C i 30 minutter.** Denne temperaturen er optimal for den reverse transkriptasen, og i dette trinnet dannes cDNA fra mRNA.
2. **Prøvene inkuberes ved 94°C i 15 minutter.** Den reverse transkriptasen inaktiveres, mens DNA-polymerasen aktiveres.
3. **Prøvene inkuberes ved 94°C i 15 sekunder.** Dobbeltrådet DNA smeltes og danner enkeltråder.
4. **Prøvene inkuberes ved 55°C i 30 sekunder.** Primerene fester seg på DNA-trådene.
5. **Prøvene inkuberes ved 72°C i 30 sekunder.** Optimal temperatur for DNA-polymerasen. DNA syntetiseres.
6. **Platen leses av.** De foreløpige resultatene kan leses av gjennom hele reaksjonen.
7. **Punkt 3-6 gjentas 39 ganger til.** Reaksjonen kjøres til sammen i 40 sykler.
8. **Prøvene inkuberes ved 72°C i 5 minutter.** DNA-syntesen ferdigstilles. Sikrer at alt DNA er ferdig syntetisert.
9. **Smeltekurve.** Resultatet leses av hver 0,3°C.
10. **Prøvene inkuberes ved 6°C til reaksjonen stoppes.**

### 6.5.5 Deteksjon og analyse

I selve QuantiTect SYBR Green RT-PCR finnes en optimal konsentrasjon av den fluoriserende fargen SYBR Green I. Den binder til alle dobbeltrådede DNA molekyler og utskiller et lys ved binding. Den kan derfor benyttes til kvantifisering av ulike målgen av interesse uten behov for sekvensspesifikke fluoriserende prober.

$C_T$ -verdi er en terskelverdi som sier hvor mange sykluser en PCR-reaksjon må opp i før fluorescensen når et visst nivå.  $C_T$ -verdien til en prøve gir derfor uttrykk for det antallet sykluser som skal til før en gitt mengde PCR-produkt har akkumulert som følge av PCR-reaksjonen. Jo mer templat som i utgangspunktet er til stede i en prøve, jo færre PCR-sykluser skal det til før det lages påviselige mengder av PCR-produkt, og desto lavere vil  $C_T$ -verdien for denne prøven være.

En real-time analyse skiller seg fra end-point analyse ved metoden for resultatavlesning. "Real-time" aspektet ved reaksjonen er at DNA-mengden avleses etter hver syklus, sånn at man kan følge DNA-syntesen gjennom hele reaksjonen. Kvantifiseringen og amplifiseringen foregår samtidig. På denne måten kan man avlese resultatene i den eksponensielle fasen av reaksjonen, og ikke bare sluttresultatet. Sannsynligvis gir dette er mer riktig resultat (Figur 14).



**Figur 14** Utsnitt av resultatgraf for en real-time RT-PCR reaksjon.



For å kontrollere for lik loading i de ulike brønnene på plata, analyseres et normaliseringsgen i tillegg til det aktuelle genet. Et normaliseringsgen er et gen som man antar har lik ekspresjon i alle cellelinjene. Dersom loadingen viser seg å være ulik, kan man korrigere for dette. I denne oppgaven er Glukose-6-fosfatdehydrogenase (G6PDH) benyttet som normaliseringsgen.

For å bekrefte at primeren har fungert godt, og at det kun er oppamplifisert ett produkt foretas en smeltepunktsanalyse etter at selve PCR-reaksjonen er ferdig. Dersom resultatet fra denne analysen viser at det kun er en topp i smeltepunktsgrafene, betyr det at primeren har fungert og at produktet etter all sannsynlighet er det som skulle blitt oppamplifisert. I tillegg til dette separeres det ferdige produktet på gel, og sekvenseres. Dette gjøres henholdsvis for å kontrollere størrelse og at det er riktig produkt som er oppamplifisert.

### 6.5.6 Resultatframstilling

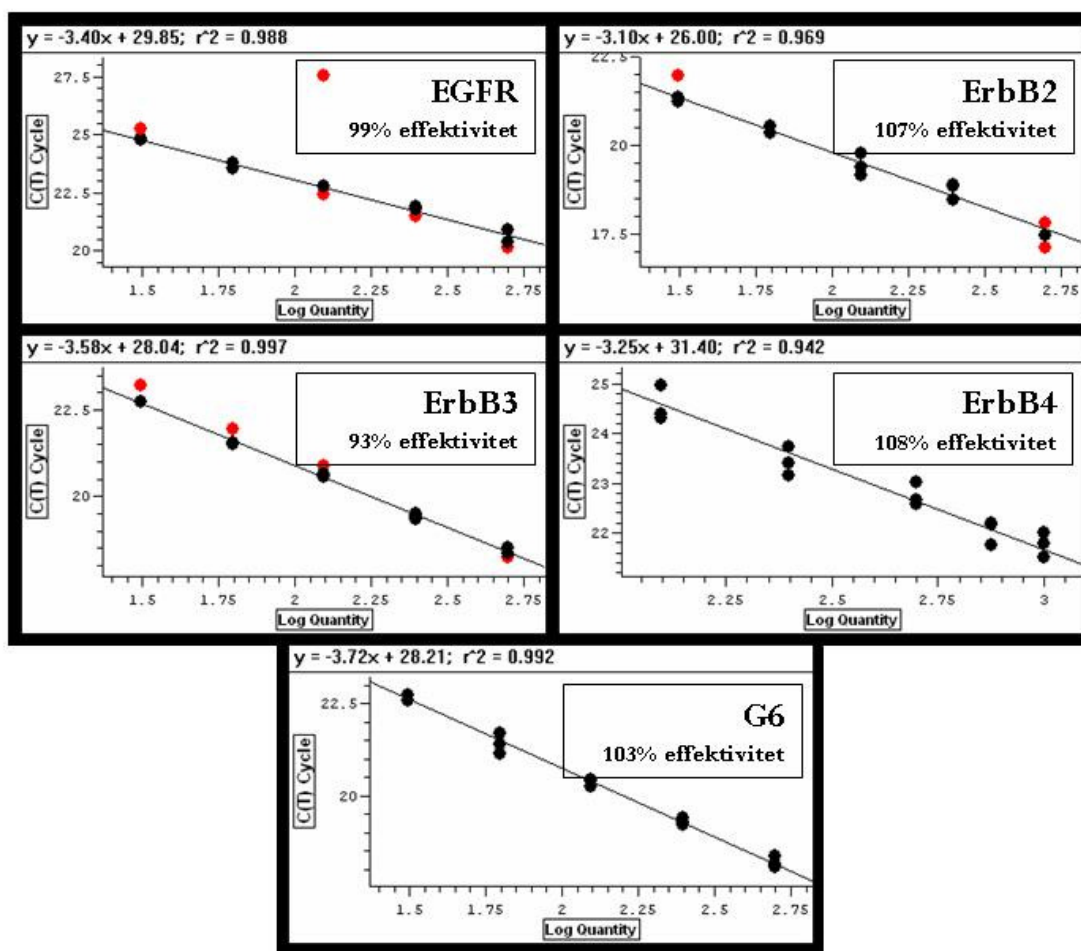
Resultatene fra RT-PCR forsøkene gjengis i denne oppgaven som relative verdier til henholdsvis EGFR, LNCaP eller CSS.

Real-time RT-PCR resultatene som er benyttet i denne oppgaven er analysert ved hjelp av programmet Opticon Monitor 3.  $C_t$ -verdien for prøvene ble hentet ut og analysert videre.  $C_t$ -verdiene må bearbeides før de kan benyttes fordi  $C_t$  – skalaen er omvendt logaritmisk. Resultatene her er bearbeidet ved å benytte formelen  $\Delta\Delta C_t$ . Forutsetningen for å kunne bruke denne formelen, er at standardkurvene for de analyserte genene har lik effektivitet. Det ble derfor satt opp forsøk hvor standardkurvene til hvert enkelt gen ble laget, og effektiviteten for disse ble regnet ut vha formelen  $E=10^{-1/K}-1$ , der K er stigningstallet til standardkurven (Tabell 2, Figur 15). Standardkurven for ErbB4 viste seg vanskelig å sette opp på grunn av veldig lav ekspresjon i alle cellelinjene. Ved lav ekspresjon blir det oppamplifisert så lite PCR-produkt at  $C_t$ -verdiene blir veldig høye. Det ble derfor besluttet å lage standardkurven for ErbB4 med LNCaP-Rf-celler, mens alle de andre standardkurvene er framstilt med LNCaP-celler.

Tabell 2 Effektivitet til standardkurvene fra RT-PCR

Undersøkt gen	Effektivitet til standardkurven
EGFR	0,99
ErbB2	1,07
ErbB3	0,93
ErbB4	1,08
G6	1,03

Standardavvik: 6,2 %



Figur 15 Standardkurver for de analyserte genene, med effektivitet.

Siden effektiviteten var såpass lik for alle standardkurvene, og standardavviket ikke var større enn 6,2 %, ble det besluttet at  $\Delta\Delta C_i$  kunne benyttes ved utregningene.

G6PDH som normaliseringsgen ble bare kjørt en gang per primer, og alle kjøringene ble normalisert mot denne. Optimalt burde G6 vært med på hver individuelle kjøring, slik at loadingkontroll hadde blitt utført ved hvert forsøk. I alle cellelinjene unntatt DU-145, var ekspresjonen av G6PDH relativt lik. For å analysere resultatene i denne oppgaven er det gått ut ifra lik loading i alle forsøk.

I de forsøkene hvor det foreligger flere resultater, er det beregnet gjennomsnitt og standardavvik. Dette gjelder av ulike grunner ikke alle, og der er kun resultatene fra ett forsøk med i resultatframstillingen. Dette gjelder resultatene fra både real-time RT-PCR og western blot.

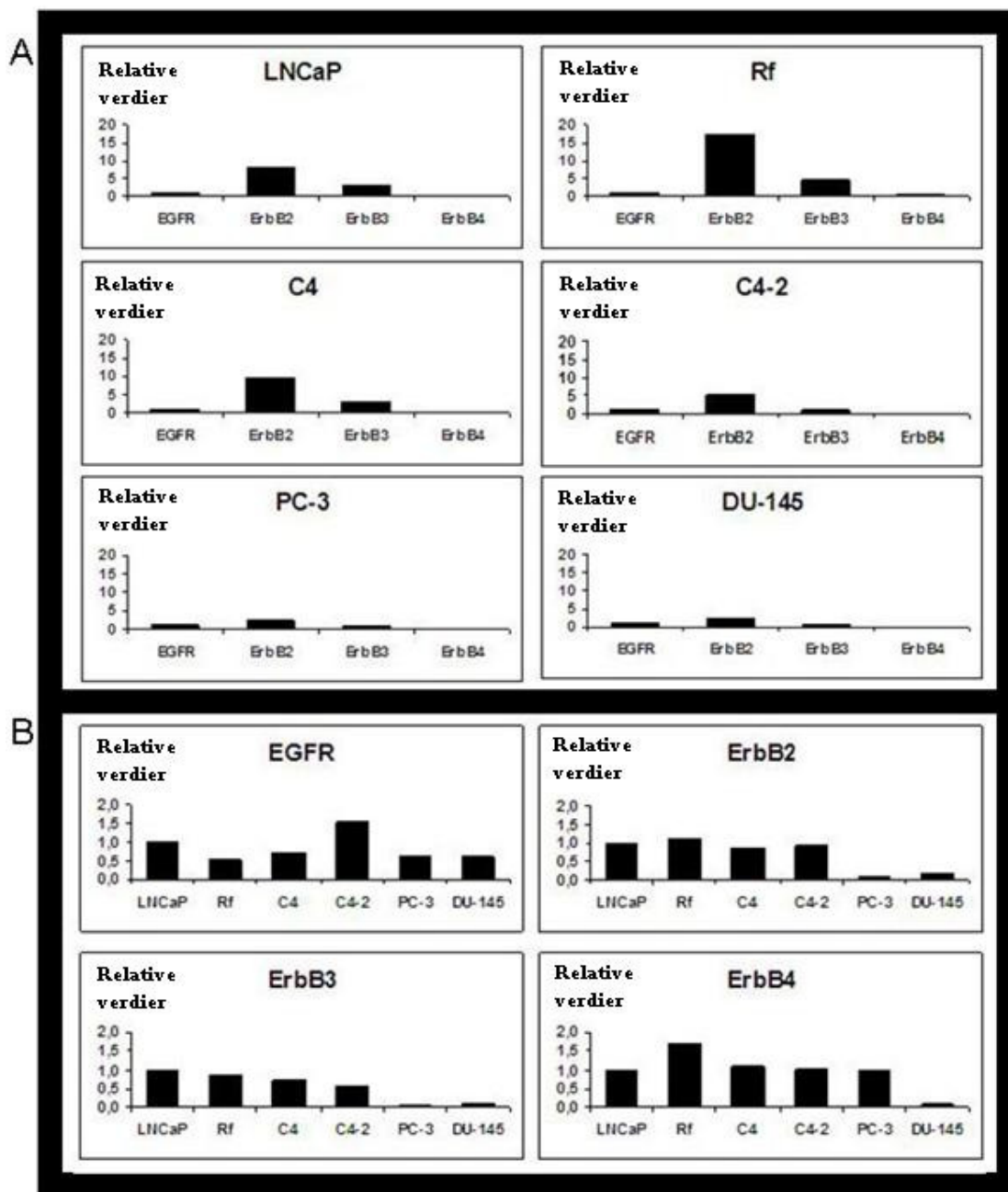
## 7 RESULTATER

Parallelt med at man startet opp en klinisk studie på avdelingen med en hemmer av EGFR-signalveien, var det ønskelig å kartlegge EGFR-signalveien i prostatakreft i detalj. For å undersøke dette ble det benyttet ulike cellelinjer i laboratoriet som dekker alt fra hormonavhengige til hormonuavhengige prostatakreftcellelinjer.

### 7.1 EKSPRESJON AV ErbB-FAMILIEN I ULIKE CELLELINJER FRA PROSTATAKREFT

Det første som ble gjort var å kartlegge ekspresjonen av reseptorene i EGFR-familien i de ulike cellelinjene fra prostatakreft.

Ved å bruke real-time RT-PCR og reseptorspesifikke primere (Tabell 1, s 30), ble RNA fra cellelinjene LNCaP, LNCaP-Rf, LNCaP-C4, LNCaP-C4-2, PC-3 og DU-145 undersøkt for innhold av gener som koder for reseptorene i EGFR-familien. Resultatene viste at EGFR ble høyest uttrykt i cellelinjen LNCaP-C4-2 (Figur 16B). ErbB2 er den reseptoren med lavest  $C_T$ -verdi og dermed er den reseptoren det er mest av i alle cellelinjene. (Figur 16A). Det er imidlertid verd å merke seg at mRNA-nivået av ErbB2 er lavere i PC-3 og DU145 cellene enn i LNCaP-cellene og subcellelinjer av LNCaP. Det ble også vist en lavere ekspresjon av ErbB3 i PC-3- og DU-145-cellene som mangler androgenreseptor. En vesentlig forskjell mellom PC-3 og DU-145 cellene, er likevel at PC-3 uttrykker ti ganger mer ErbB4 enn DU-145. ErbB4 uttrykkes kun i veldig liten grad i alle cellelinjer, men hadde høyest ekspresjon i LNCaP-Rf-celler (Figur 16B).

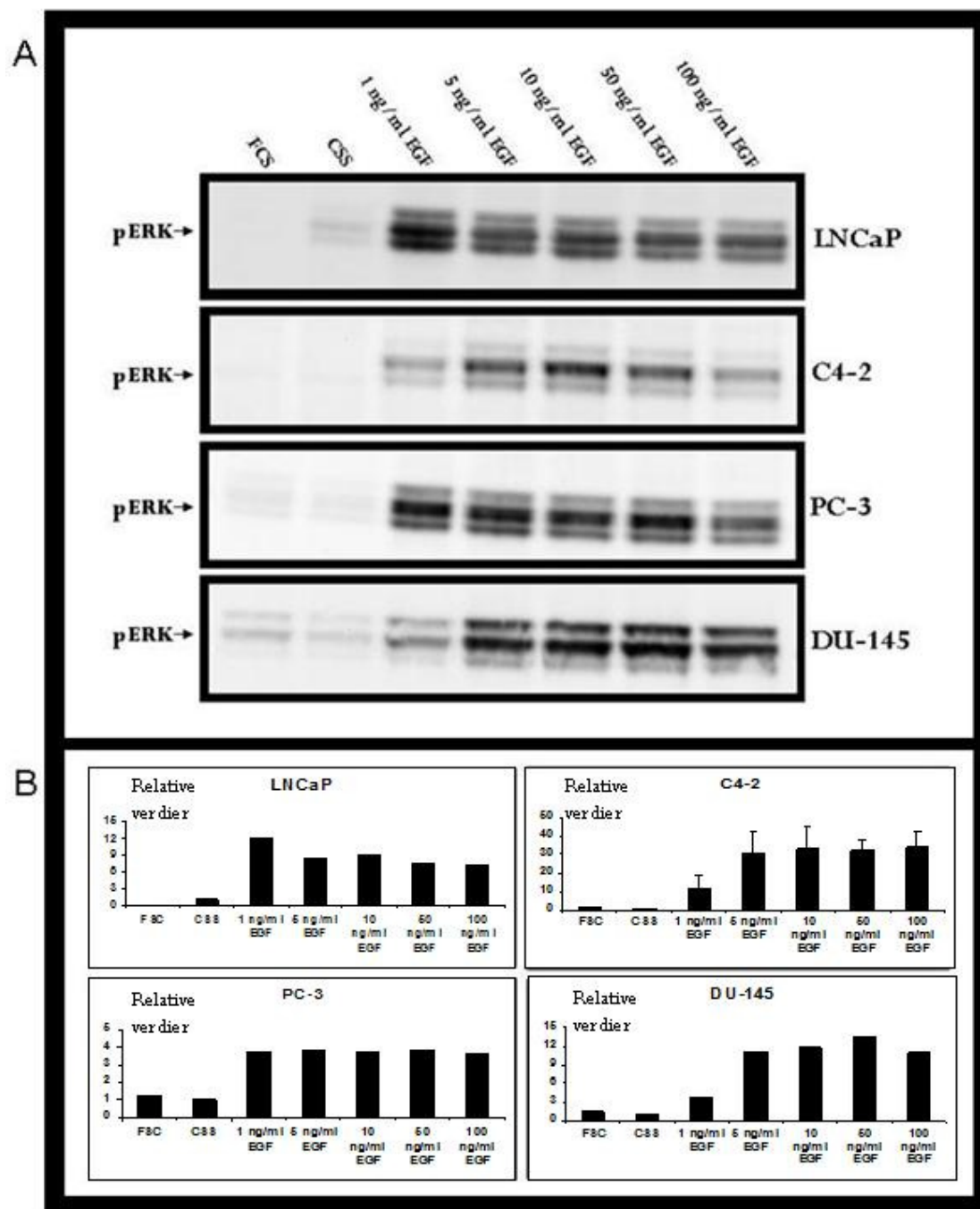


Figur 16 Ekspresjon av EGFR, ErbB2, ErbB3 og ErbB4 mRNA i ulike prostatakreftecellelinjer. Real-time RT-PCR ble benyttet til å kartlegge mRNA-nivået til ulike ErbB-isoformer i LNCaP, LNCaP-Rf (Rf), LNCaP-C4 (C4), LNCaP-C4-2 (C4-2), PC-3 og DU-145 celler. Forsøkene er utført en gang.

## **7.2 KONSENTRASJONSAVHENGIG ERK-AKTIVERING INDUSERT AV EGF I CELLELINJENE FRA PROSTATAKREFT**

Ved å stimulere cellelinjene med økende konsentrasjon EGF, ble den konsentrasjonen som ga maksimal EGFR-aktivering hos cellene bestemt. Aktiveringen ble bestemt på bakgrunn av ERK-aktivering ved hjelp av et fosfo-spesifikt antistoff.

Det ble observert maksimal effekt av EGF allerede ved 1 ng/ml i LNCaP og PC-3 cellene, mens DU-145 og LNCaP-C4-2 er mindre responsive og trenger 5 ng/ml for å oppnå maksimal respons. Mens vi ser en tydelig transient effekt i LNCaP-C4-2 cellene, synes det som effekten holder seg, eller går litt ned opp mot 100 ng/ml EGF for de andre cellelinjene (Figur 17, A. Figur 17, B).



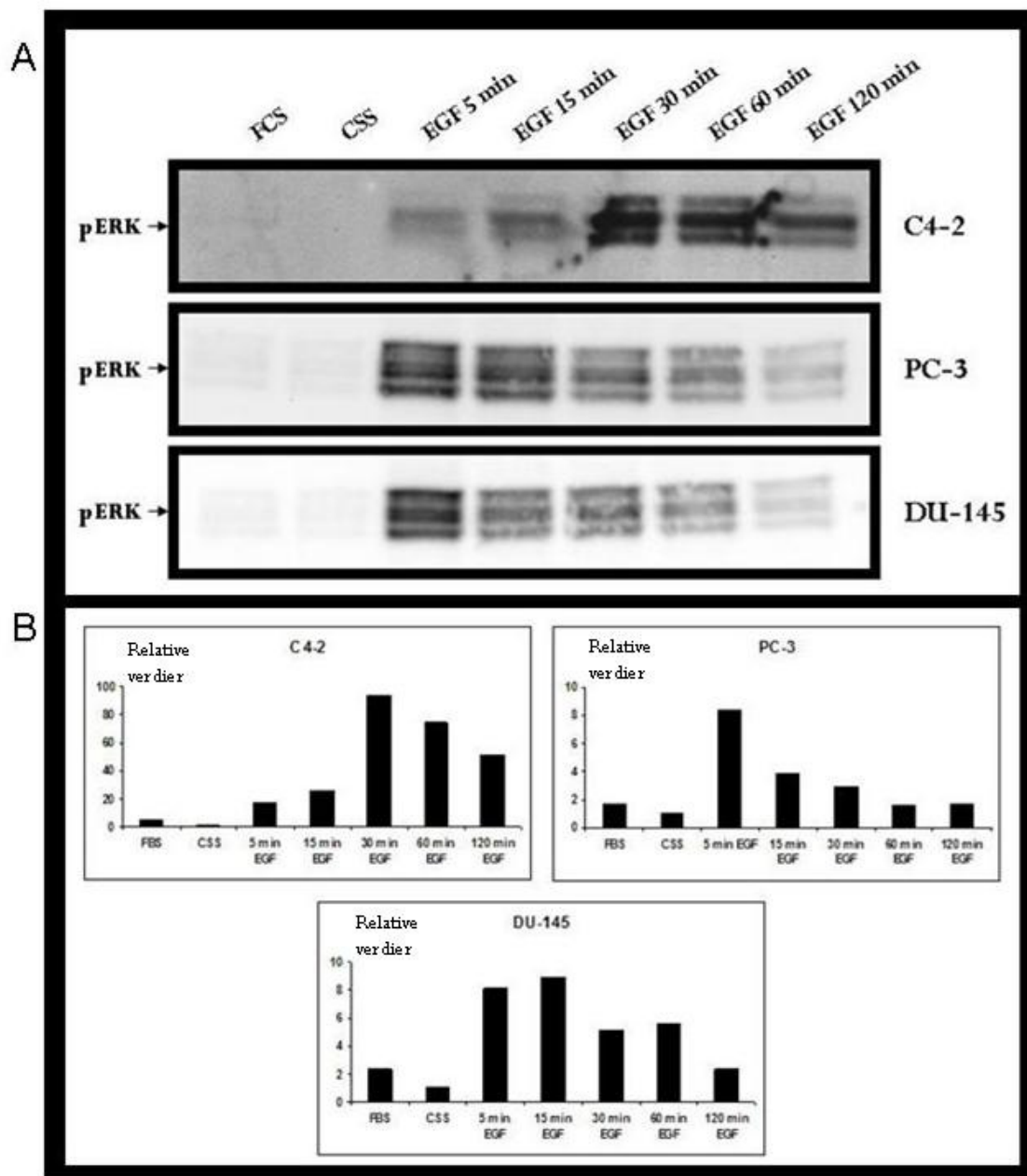
**Figur 17** Konsentrasjonsavhengig aktivering av ERK som følge av EGF-stimulering av ulike prostatakreftcellelinjer. Cellene ble stimulert med ulike konsentrasjoner EGF i 30 minutter. A) Autoradiogram av Western blot probet med antistoff mot fosfo-ERK. B) Resultat av densitometrisk skanning av autoradiogrammene vist relativt til nivået av fosfo-ERK i ustimulerte celler (CSS). Forsøkene med LNCaP, PC-3 og DU-145 er utført en gang. Forsøket med LNCaP-C4-2 er utført med 4 paralleller.

### **7.3 TIDSAVHENGIG ERK-AKTIVERING INDUSERT AV EGF I CELLELINJENE FRA PROSTATAKREFT**

Cellelinjene ble stimulert med EGF i 5, 15, 30, 60 og 120 minutter for å finne den stimulerings tiden som ga maksimal EGFR-aktivering. Konsentrasjonen av EGF som ble brukt var den konsentrasjonen som ble funnet å gi maksimal respons i konsentrasjonsresponsforsøket tidligere (Figur 17).

Responser i LNCaP-C4-2 cellene var detekterbar etter 5 minutter, men nådde maksimum etter 30 minutter. Både i PC-3 og DU-145 var det 5 minutter som ga sterkest respons, og deretter ble responsen svakere med økende stimulerings tid (Figur 18).

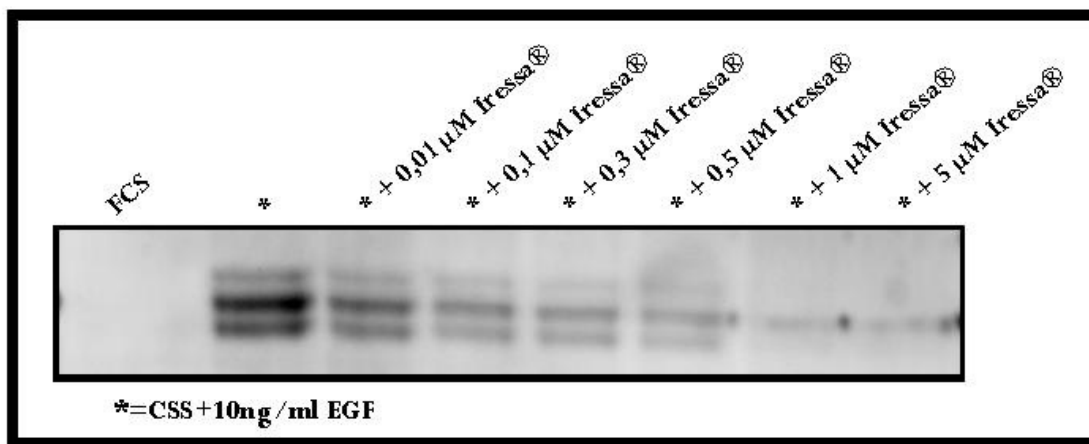




**Figur 18** Tidsavhengig aktivering av ERK som følge av EGF-stimulering av ulike prostatakreftcellerlinjer. A) Autodiagram av western blot probet med antistoff mot pERK. B) Resultat av densitometrisk skanning av autodiagrammene vist relativt til nivået av pERK i ustimulerte celler (CSS). EGF-konsentrasjonen som er benyttet er for LNCaP- C4-2: 10 ng/ml, PC-3: 5 ng/ml og DU-145: 50 ng/ml. Forsøkene er utført en gang.

## 7.4 IRESSA®-HEMMING AV EGF-AKTIVERTE LNCaP-C4-2 CELLER.

Cellelinjen LNCaP-C4-2 ble stimulert med EGF og hemmet med Iressa® for å finne IC<sub>50</sub>-verdien til Iressa®. Hemming av EGFR-signaleringsen ser ut til å skje i området mellom 0,5 og 1 µM Iressa® (Figur 19).



**Figur 19** Konsentrasjonsavhengig hemming av EGF-indusert ERK-aktivitet ved hjelp av Iressa i LNCaP-C4-2 celler. LNCaP-C4-2 celler ble stimulert med 10 ng/ml EGF og økende mengder Iressa®. Autodiagram av western blot probet med antistoff mot fosfo-ERK. Cellene ble først stimulert med Iressa® i 15 minutter, deretter med EGF og Iressa® i 15 minutter. Forsøket er utført en gang.

## 7.5 SCREENING FOR POTENSIELT REGULERTE VEKSTFAKTORER I PROSTATACELLELINJENE

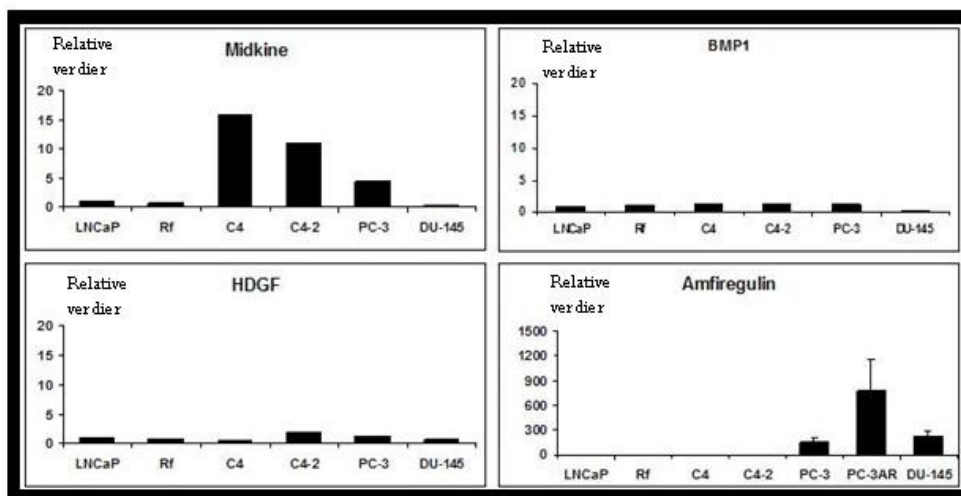
Iressa® virker i alle cellelinjer, men synes å ha dårligere effekt *in vivo*. Kan dette skyldes at andre vekstfaktorer påvirker EGFR-signalveien? Det har tidligere i laboratoriet blitt undersøkt hvilke gener som er regulert tidlig i utviklingen av androgenuavhengig prostatakreft ved å bestemme genekspressionsprofilen til LNCaP-celler som er inkubert i henholdsvis androgendeprivert (CSS) medium i fire dager og vanlig medium (FBS). Blant genene som viste seg å være signifikant regulert befant det seg en rekke vekstfaktorer. Ettersom vekstfaktorer kan ha betydning for autokrin vekst og tumorprogresjon, ble det derfor undersøkt om ekspresjon av disse genene varierte mellom de ulike prostatakreftcellelinjene.

Det ble kjørt real-time RT-PCR med flere forskjellige primere på cellelinjene LNCaP, LNCaP-Rf, LNCaP-C4, LNCaP-C4-2, PC-3 og DU-145. Av de primerparene som ble studert, var det Midkine, Amfiregulin (AREG), Hepatom Derivert vekstfaktor (HDGF) og Ben Morfogent Protein 1 (BMP1) som ga resultater som kunne benyttes.

Blant resultatene var det en vekstfaktor som skilte seg ut; Amfiregulin hadde henholdsvis 150, 800 og 200 ganger høyere ekspresjon i de androgenuavhengige cellelinjene PC-3, PC-3AR og DU-145 enn i den androgenavhengige cellelinjen LNCaP. De andre vekstfaktorene var regulert i mye mindre grad. Midkine var den vekstfaktoren med nest mest regulering, med 16 ganger høyere ekspresjon i LNCaP-C4 enn i LNCaP (Figur 20).

Amfiregulin er en ligand til EGFR [24], og kan interagere med EGFR-signalveien.

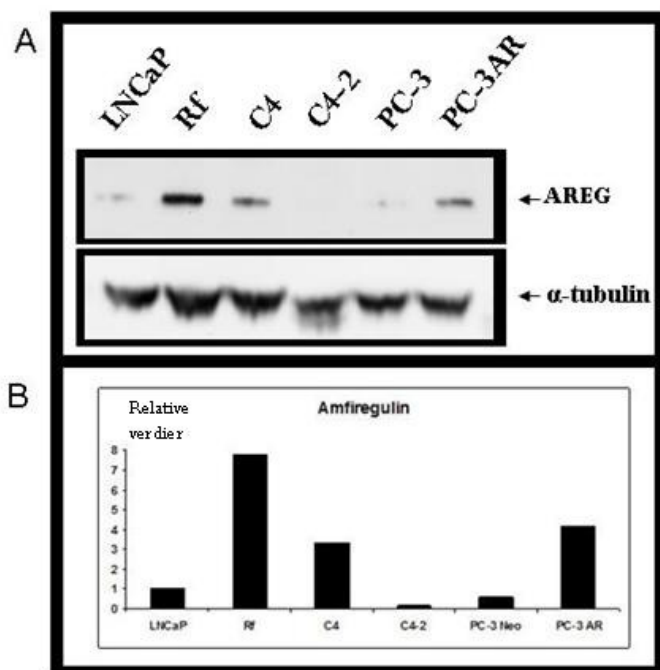
Vekstfaktoren har også blitt foreslått som en mulig biomarkør for de som ikke responderer på behandling med Iressa® [37], og det ble derfor besluttet å studere amfiregulin videre.



**Figur 20 Ekspresjon av ulike vekstfaktorer i prostatakreftcellelinjer.** Real-time RT-PCR ble benyttet til å bestemme nivået av "Midkine" (MDK), "Bone Morphogene Protein" (BMP), "Hepatoma-derived Growth Factor" (HDGF) og amfiregulin i LNCaP-Rf (Rf), LNCaP-C4 (C4), LNCaP-C4-2 (C4-2), PC-3 og DU-145 celler relativt til mRNA-nivået i LNCaP-celler. Forsøket med midkine, BMP1 og HDGF er utført en gang. Forsøket med amfiregulin er utført med tre paralleller.

## 7.6 PROTEINEKSPRESJON AV AMFIREGULIN I PROSTATACELLELINJENE

Siden amfiregulin var sterkt regulert på mRNA nivå vist ved RT-PCR, var det ønskelig å kontrollere om resultatet var reproducerbart på proteinnivå. Det ble derfor kjørt western blot med amfiregulin antistoff (Figur 21A). Amfiregulin produseres i lave nivåer av LNCaP og PC-3 celler. I motsetning til resultatene fra real-time RT-PCR observeres det høyeste nivået av amfiregulin i LNCaP-Rf cellene hvor nivået er åtte ganger høyere enn i LNCaP cellene. Amfiregulinnivået er også høyere i LNCaP-C4 cellene enn i LNCaP-cellene, mens det laveste nivået av amfiregulin ble observert i LNCaP-C4-2 (Figur 21).



**Figur 21 Proteinekspressjon av amfiregulin (AREG) i kreftcellelinjer fra prostata.** A) Proteinekstrakt fra LNCaP, LNCaP-Rf (Rf), LNCaP-C4 (C4), LNCaP-C4-2 (C4-2), PC-3 neo og PC-3 AR er analysert med Western blot analyse. A) Autoradiogram av Western blot probet med antistoff mot amfiregulin og  $\alpha$ -tubulin som loading kontroll. B) Autoradiogrammet ble skannet densitometrisk og resultatene er korrigert for loadingkontrollen og er vist relativt til amfiregulin-nivået i LNCaP-celler.  $\alpha$ -tubulin ble benyttet som loadingkontroll. Forsøket er utført en gang.

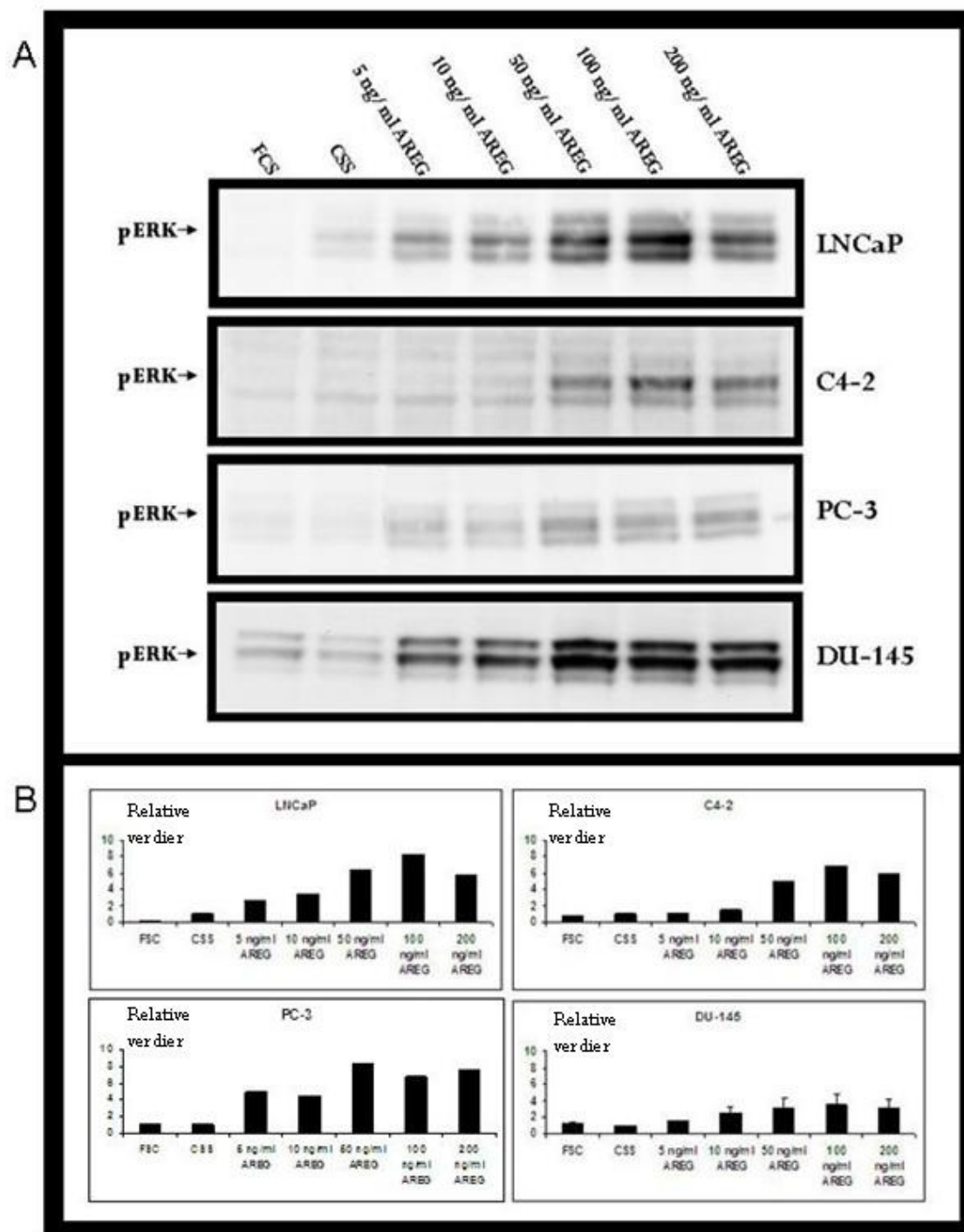
Også på proteinnivå var det stor ekspressionsforskjell av amfiregulin mellom PC-3Neo og PC-3AR. PC-3AR som har fått transfektert inn androgenreseptor viste sju ganger mer proteinekspressjon enn PC-3Neo (Figur 21).

## **7.7 KONSENTRASJONSAVHENGIG ERK-AKTIVERING INDUSERT AV AMFIREGULIN I CELLELINJER FRA PROSTATAKREFT**

Ved å stimulere cellelinjene med amfiregulin i forskjellige konsentrasjoner i 30 minutter, ble den konsentrasjonen som ga maksimal EGFR-aktivering hos cellene bestemt.

Cellelinjen PC-3 nådde maksimal respons ved 50 ng/ml amfiregulin, og responsen ved høyere konsentrasjoner av amfiregulin forhold seg relativt konstant. Hos DU-145 cellene måtte konsentrasjonen opp i 100 ng/ml før maksimalrespons ble observert, men responsen fra 10-200 ng/ml var relativt konstant. De to andre cellelinjene (LNCaP og LNCaP-C4-2) viste en klarere tendens til økning i responsen opp mot 100 ng/ml, med lavere respons ved høyere konsentrasjon (Figur 22).

Den totale ERK-aktiviteten er generelt veldig lav i både LNCaP-C4-2 og PC-3-cellene.

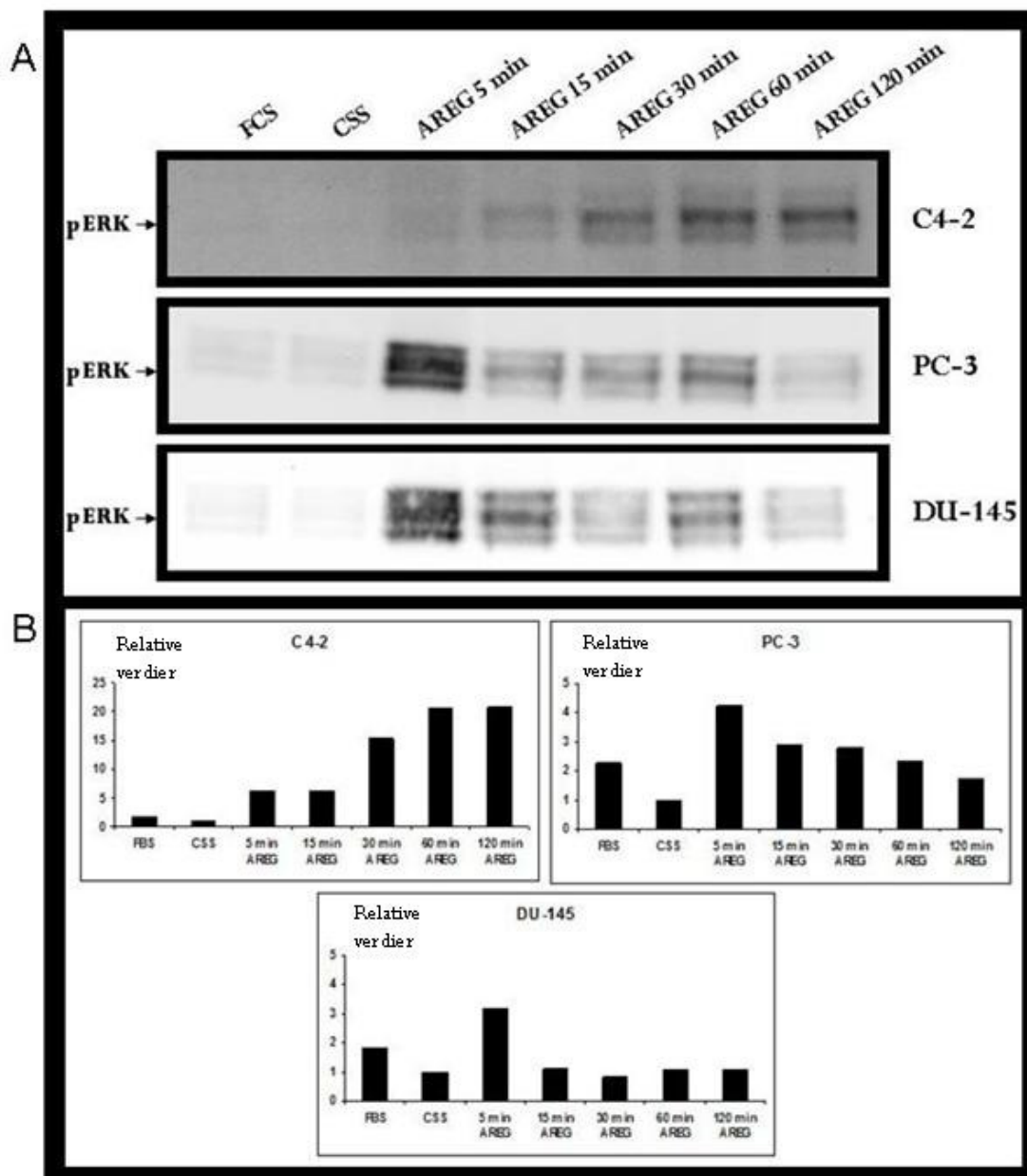


**Figur 22** Konsentrasjonsavhengig aktivering av ERK som følge av amfiregulinstimulering av ulike prostatakraftcellelinjer. Cellene ble stimulert med ulike konsentrasjoner amfiregulin i 30 minutter. A) Autodiagram av western blot probet med antistoff mot pERK. B) Resultat av densitometrisk skanning av autodiagrammene vist relativt til nivået av pERK i ustimulerte celler (CSS). Forsøkene med LNCaP, LNCaP-C4-2 og PC-3 er utført en gang. Forsøket med DU-145 er utført med 2 paralleller.

## **7.8 TIDSAVHENGIG ERK-AKTIVERING INDUSERT AV AMFIREGULIN I PROSTATACELLELINJENE**

Cellelinjene ble stimulert med amfiregulin i 5, 15, 30, 60 og 120 minutter for å finne den stimulerings tiden som ga maksimal EGFR-aktivering. Konsentrasjonen av amfiregulin som ble brukt var den konsentrasjonen som ble funnet å gi maksimal respons i konsentrasjon-responsforsøket tidligere (Figur 22).

Responser i PC-3 og DU-145 viste likheter med tidskurven for EGF i de samme cellelinjene. Stimulering i kun 5 minutter ga sterkest respons, med avtagende respons fra 15 minutter og oppover. LNCaP-C4-2 cellene derimot, ga sterkere respons med økende tid, med tendens til utflating fra 60-120 minutter (Figur 23).



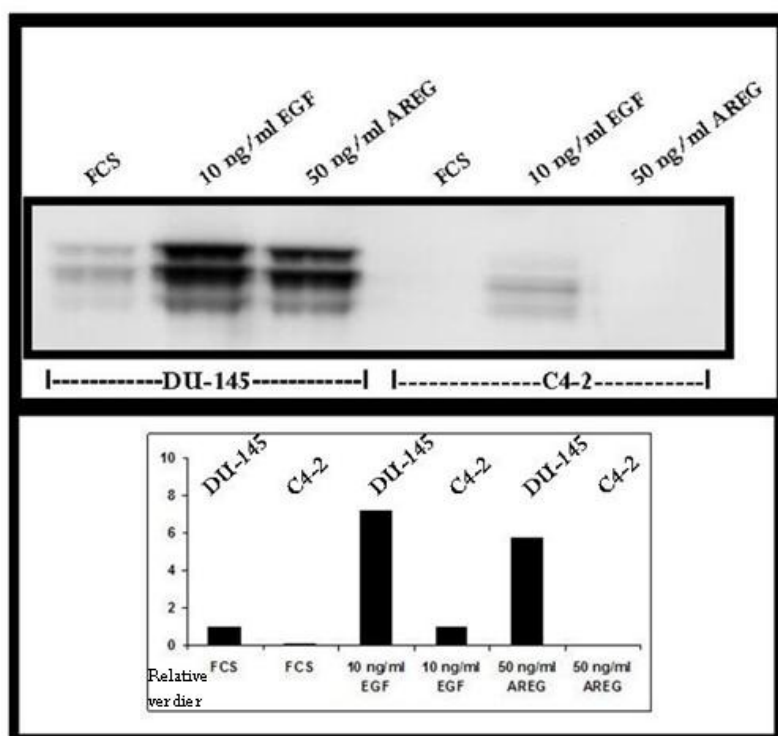
**Figur 23** Tidsavhengig aktivering av ERK som følge av amfiregulin -stimulering av ulike prostatakreftecellelinjer. A) Autodiagram av western blot probet med antistoff mot pERK. B) Resultat av densitometrisk skanning av autodiagrammene vist relativt til nivået av pERK i ustimulerte celler (CSS). Amfiregulin konsentrasjonen som er benyttet er for LNCaP-C4-2: 100 ng/ml, PC-3: 200 ng/ml og DU-145: 100 ng/ml. Forsøkene er utført en gang.



## 7.9 ERK AKTIVITET ER HØYERE I USTIMULERTE OG STIMULERTE DU-145 CELLER ENN I KORRESPONDERENDE LNCaP-C4-2 CELLER

DU-145 og LNCaP-C4-2 celler ble stimulert med 10 ng/ml EGF eller 50 ng/ml amfiregulin i 30 minutter. Totalt protein ble ekstrahert og analysert ved hjelp av western blot.

DU-145 cellene viste en høyere basalaktivitet av ERK enn LNCaP-C4-2 cellene, og maksimalresponsen ved EGF-stimulering er åtte ganger høyere i DU-145 enn i LNCaP-C4-2. Likevel viser begge cellelinjene en kraftig økt ERK-aktivitet etter stimulering med EGF. Amfiregulin gir en klar økning i ERK-aktiviteten hos DU-145, mens LNCaP-C4-2 cellene ikke påvirkes i beviselig grad (Figur 24).



**Figur 24** ERK-aktivitet er høyere i ustimulerte og stimulerede DU-145 veller enn i korresponderende C4-2 celler. Cellelinjene LNCaP-C4-2 (C4-2) og DU-145 ble begge stimulert i 30 minutter med EGF og amfiregulin. Forskjellene er målt på nivå av ERK-aktivering. Forsøket er utført en gang.

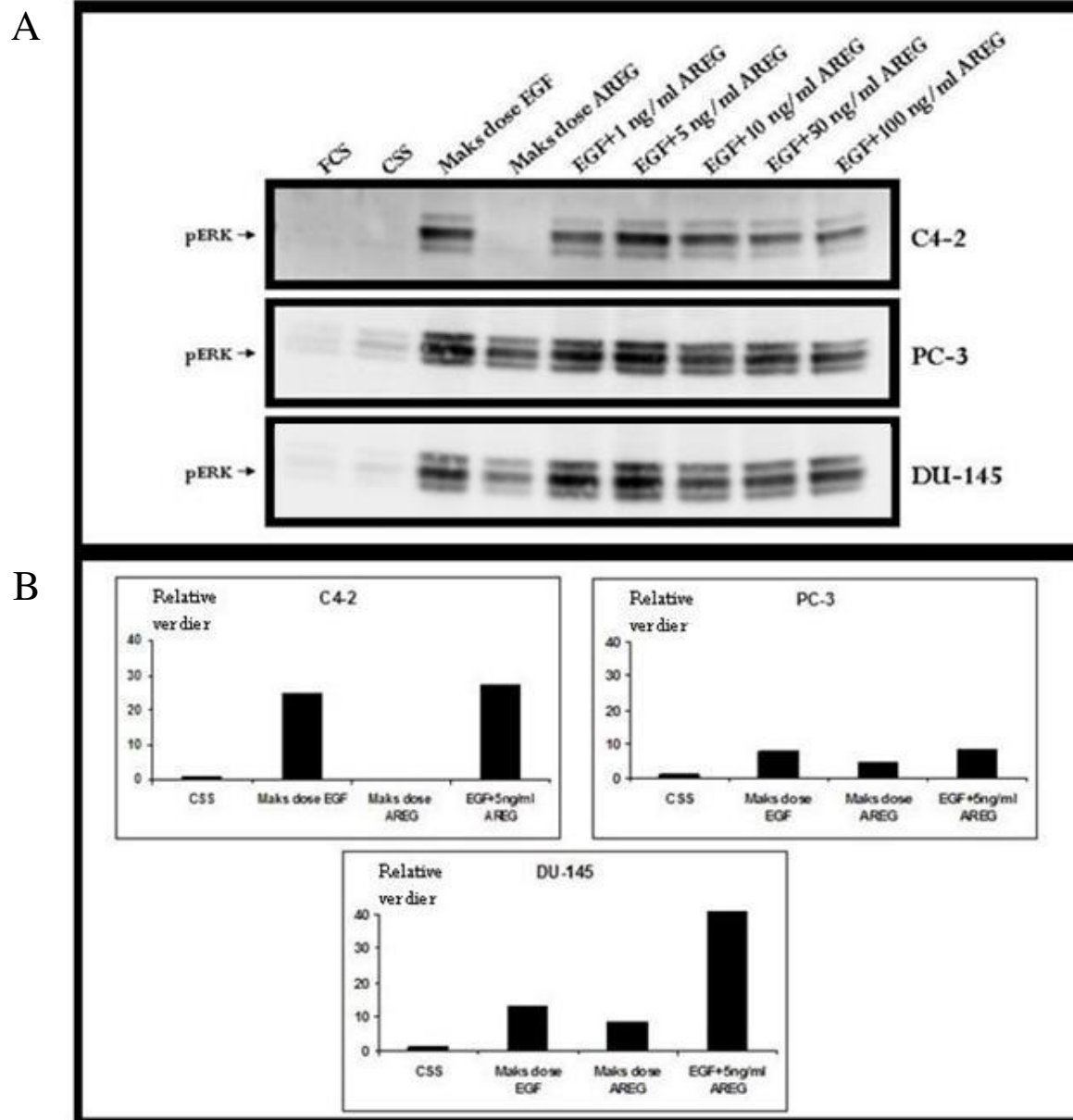
## 7.10 STIMULERING MED EGF OG ØKENDE MENGDER AMFIREGULIN I PROSTATACELLELINJENE

For å studere hvordan amfiregulin påvirket den maksimale EGF-responsen, ble det utført stimuleringsforsøk hvor hver cellelinje ble stimulert med den konsentrasjonen EGF som ga maksimalrespons i tidligere forsøk (Figur 17). I tillegg til EGF, ble det stimulert med økende konsentrasjoner amfiregulin for å se hvordan dette påvirket den totale ERK-aktivering (Figur 25).

Resultatene indikerer at det kan foreligge en konsentrasjonsavhengig effekt av amfiregulin på EGF-aktivert ERK-aktivitet. EGFR-aktiviteten ser ut til å øke i LNCaP-C4-2, PC-3 og DU-145 ved 5 ng/ml amfiregulin tilsatt.

Membranen i Figur 25 har ingen brønn med 200 ng/ml amfiregulin. Siden maksimal konsentrasjon amfiregulin i PC-3 er 200 ng/ml, burde også denne brønnen vært tatt med i resultatene. Denne konsentrasjonen var med i forsøket, men pga plassproblemer ble konsentrasjonen avbildet på en annen membran. Det kunne ikke observeres noen forskjell mellom brønnen med 100 ng/ml og brønnen med 200 ng/ml.

Resultatene i forsøket over er foreløpige resultater. Siden effektene som ses er så små, kan en ikke gå ut ifra at resultatene viser hele sannheten. Det må utføres flere forsøk, slik at gjennomsnitt og standardavvik kan regnes ut for å få bekreftet resultatene. De foreløpige resultatene viser at det kan være en konsentrasjonsavhengig effekt av amfiregulin på EGFR-aktivering.



**Figur 25 Amfiregulin kan påvirke EGFR-avhengig ERK-stimulering.** Cellelinjene LNCaP C4-2 (C4-2), PC-3 og DU-145 stimulert med EGF og økende mengder amfiregulin. A) Autodiagram av western blot probet med antistoff mot pERK. B) Densitometrisk scanning av autodiagrammene vist relativt til nivået av pERK i ustimulerte celler (CSS). Maksimaldose EGF som er benyttet er for C4-2: 10 ng/ml, PC-3: 5 ng/ml og DU-145: 50 ng/ml. C4-2 ble stimulert med EGF i 30 min, PC-3 og DU-145 i 5 minutter. C4-2 ble stimulert med amfiregulin i 120 minutter, PC-3 og DU-145 i 5 minutter. Maksimaldose amfiregulin som er benyttet er for C4-2: 100 ng/ml, PC-3: 200 ng/ml og DU-145: 100 ng/ml. Forsøkene er utført en gang.

## 8 DISKUSJON

### 8.1 CELLELINJER

For å studere EGFR-signalveien i prostatakraft, ble det valgt cellelinjer i denne oppgaven ut ifra et ønske om å dekke utviklingen av androgenavhengig prostatakraft til androgenuavhengig prostatakraft. Det må imidlertid tas hensyn til at cellelinjene bare er et lite utvalg av tumortyper, og at de kun fungerer som modeller for prostatakraft. Hver enkelt tumor vil ha egne særegenheter, og vil derfor sannsynligvis avvike fra alle disse cellelinjene.

Ved Urologisk forskningsinstitutt er det nå opprettet en prostatabiobank. Der vil det etter hvert bli tilgang til et stort pasientmateriale. Et alternativ til å analysere cellelinjer, blir derfor å analysere pasientmateriale ved å lage et tissuearray. Det kan da analyseres prøver fra mange pasienter samtidig ved å gjøre en immunhistokjemisk farging med reseptorspesifikke antistoff. I dette tilfellet vil det for eksempel være aktuelt å farge med antistoffer mot de ulike isoformene av ErbB.

### 8.2 WESTERN BLOT

Antistoffet mot pERK skal i utgangspunktet gjenkjenne pERK1 (MAPK3) og pERK2 (MAPK1) på hhv 42 og 44 kDa. I western blotforsøk med pERK som antistoff, har det gjennom hele oppgaven blitt observert tre bånd, der det egentlig bare skulle vært observert to. I tillegg til båndene ved 42 og 44 kDa, observeres det et bånd til på rundt 38 kDa. Ved litteratursøk rundt dette, ble det funnet informasjon om at ERK2 tidligere har hatt flere kallenavn, deriblant p38. Dette kan tyde på at også andre har observert et bånd rundt 38 kDa tidligere, og at det er en isoform av ERK som dukker opp her.

På mange av western blotene ble det observert en økt pERK-signalering hos cellene som har gått i CSS ett døgn i forhold til cellene som bare har gått i FBS. Dette kan tyde på at EGFR aktiveres av CSS.

### 8.3 REAL-TIME RT-PCR

G6PDH (G6) er et enzym som er med i glykolysen som omdanner glukose til pyruvat. G6-verdien i DU-145 har vist seg å være høyere enn i de andre cellelinjene, noe som tyder på at DU-145 har en økt glukosemetabolisme i forhold til de andre cellene. Fordi verdien er forhøyet i DU-145 er ikke G6 det optimale normaliseringsgen for denne cellelinjen. Likevel er det benyttet i denne oppgaven fordi alternativet (TBP) viste seg å gi et mer variert resultat i alle cellelinjene.

Smeltepunktsanalysen for VEGFB ga to topper, dette kan skyldes at det finnes flere mulige spleisevarianter av vekstfaktoren. For å analysere dette nærmere, må man lage mer spesifikke primere for spleisevarianten. Primerpar for neuregulin, FGF7 og cat eye syndrome ble også forsøkt, men ga bare uspesifikke signaler. Primerene må forbedres og designes på nytt for å eventuelt få gode resultater.

### 8.4 EKSPRESJON AV ErbB-FAMILIEN I ULIKE CELLELINJER FRA PROSTATAKREFT

Alle ErbB-reseptorene uttrykkes i små mengder i flere ulike normale vev og celler. Reseptorene er med og utfører mange ulike biologiske funksjoner, blant annet organutvikling, celleproliferasjon og differensiering. I prostatavev uttrykkes alle ErbB-proteinene, spesielt i basalceller og hyperplastiske kjertler [38].

#### 8.4.1 EGFR

Hernes et.al. publiserte i 2004 en artikkel som viser at utviklingen av hormonrefraktær prostatakreft er signifikant assosiert med en økning i EGFR-ekspresjonen [11]. Resultatene i denne oppgaven kan verken bekrefte eller avkrefte dette. Det er kun den androgenuavhengige cellelinjen LNCaP-C4-2 som viser en høyere ekspresjon enn LNCaP, mens alle de andre hormonuavhengige cellelinjene viser en lavere ekspresjon. Det må tas til etterretning at forsøket i denne oppgaven kun er utført en gang, og det må beregnes i hvert fall 3 parallelle forsøk for å kunne bekrefte resultatet. I tillegg er forsøkene til Hernes et.al. utført på pasienter mens forsøkene her er utført på cellelinjer. Som tidligere nevnt, kan pasientmateriale avvike mye fra cellelinjer, og det kan også være en av årsakene til de ulike resultatene. Det må gjøres

flere forsøk for eventuelt å kunne se noen klare tendenser, ettersom forskjellene ser ut til å være små.

Det ble også forsøkt å analysere EGFR på proteinnivå ved bruk av antistoff mot EGFR, men dette viste seg å fungere dårlig. Dette kan skyldes flere faktorer, blant annet at blottetingsbetingelsene ikke var optimalisert for å overføre proteiner av denne størrelsen (ca 170 Da) til membranen. Betingelsene kan optimaliseres ved å immunopresipitere EGFR, for deretter å benytte et bedre antistoff som gjenkjenner aktivert reseptor i western blot (fosfotyrosin). Ulempen med denne framgangsmåten er at den ikke skiller mellom de ulike isoformene av ErbB. I tillegg kan det dårlige resultatet skyldes at antistoffet kan ha dårlig affinitet for proteinet eller at antistoffet er uspesifikt.

#### 8.4.2 ErbB2

Real-time RT-PCR resultatene viste at det er ErbB2 som har høyest RNA-ekspresjon i samtlige cellelinjer. Proteinekspressjonen trenger ikke nødvendigvis korrelere med RNA-ekspresjonen. Dersom proteinekspressjonen av ErbB2 også er forhøyet er dette en dårlig prognostisk faktor, siden en økt ErbB2-reseptorekspresjon ser ut til å korrelere med dårlig prognose for sykdommen [12].

Normalprostata uttrykker ErbB2 i små mengder, mens de fleste tumorer uttrykker reseptoren [38].

Fordi det er vist at overekspressjon av ErbB2 aktiverer androgenreseptor-signalveien [20], kan det virke som om nettopp den høye ekspresjonen av ErbB2 kan være en av hovedårsakene til at så mange tumorer utvikler seg til hormonrefraktære selv i fravær av androgener. For å finne ut om dette virkelig er årsaken, bør cellelinjer fra normalprostata analyseres mhp ErbB2 ekspresjon, og deretter følge pasientene for å se hvem som vil utvikle prostatakreft, og hvilke tumorer som blir hormonrefraktære.

Tidligere studier har konkludert med både økning og stabilitet i ekspresjonen av ErbB2 ved utvikling av hormonrefraktær prostatakreft [11]. Ekspresjonen av ErbB2 i cellelinjene er i dette tilfellet jevn bortsett fra i PC-3 og DU-145 som har en markert lavere ekspresjon av reseptoren. Dette stemmer overens med andre tidligere studier som påviser en høyere

ekspresjon i godt differensierte tumorer enn i dårlig differensierte [38]. Likevel er det en viktig forskjell mellom PC-3 og DU-145, ved at PC-3 uttrykker nesten dobbelt så mye av reseptoren ErbB4 som DU-145. Dette kan tyde på at PC-3 har en mindre malign fenotype enn DU-145. For å bekrefte eller avkrefte dette kan det kjøres invasjonssassay og proliferasjonsassay. Begge disse to metodene kan brukes til å måle en cellelinjes malignitet.

I tillegg til dette kan cellelinjene behandles med ulike legemidler mot kreft, for så å finne  $IC_{50}$ -verdien til de ulike stoffene i de forskjellige cellelinjene. Dersom PC-3 er en cellelinje som responderer bedre på terapi enn DU-145, vil dette gi utslag i en lavere  $IC_{50}$ -verdi for PC-3 enn DU-145.

ErbB2 har også blitt foreslått som en markør for respons av Iressa® [11].

### 8.4.3 ErbB3

Ebp1 (ErbB3 Bindende Protein1) er et protein som er identifisert via sin interaksjon med ErbB3 og som nedregulerer ekspresjon av AR og AR-regulerte gener. ErbB3 kan via Ebp1 hemme androgenreseptormediert gentranskripsjon [39], og kan derfor se ut til å være en markør for god diagnose.

Resultatene i denne oppgaven viser en reduksjon i ErbB3-ekspresjonen i de hormonrefraktære cellelinjene, og samsvarer derfor ikke med tidligere publiserte resultater [23]. Dette kan blant annet skyldes forsøksoppsettet, og resultatene bør derfor verifiseres ved å kjøre flere forsøk der man bruker flere ulike batcher av ekstrahert RNA. I tillegg kan forskjellene skyldes at ekspresjonen er ulik på RNA- og proteinnivå. Koumakpayi et.al har sett en økning av kjerne-ErbB3 i tumor i forhold til normalvev, og i hormonrefraktær i forhold til hormonsensitiv prostatakreft [23]. Samtidig er det publisert lite om ErbB3s rolle i prostatakreft, og man bør avvente flere studier før en endelig konklusjon om ErbB3s rolle kan trekkes.

### 8.4.4 ErbB4

ErbB4-signalering er forbundet med differensiering, veksthemming og tumorsuppresjon i prostataceller. Overekspresjon av denne reseptoren kan derfor øke overlevelsen ved

prostatakraft [40]. Nesten alle cellelinjene i forsøket viser en svært liten ekspresjon av ErbB4, noe som vitner om at kreften i utgangspunktet er aggressiv.

## **8.5 KONSENTRASJONSAVHENGIG ERK-AKTIVERING INDUSERT AV EGF OG AMFIREGULIN I PROSTATACELLELINJENE**

Konsentrasjon-responsforsøkene med EGF og amfiregulin ble utført for å se i hvor stor grad de ulike cellene responderte på stimulering og for å bestemme optimal stimuleringskonsentrasjon til senere forsøk.

Det er viktig å merke seg at cellelinjene kan ha en egenekspresjon av EGF og amfiregulin, noe som kan påvirke dette resultatet. LNCaP-C4-2 cellene som ikke uttrykker målbare verdier av amfiregulin, er den cellelinjen som trenger høyest konsentrasjon av amfiregulin for å oppnå maksimalrespons. PC-3 har en liten egenekspresjon av amfiregulin, og trenger litt mindre amfiregulin enn LNCaP-C4-2 for å oppnå maksimalrespons.

Cellenes egenekspresjon av EGF er ikke målt i denne oppgaven.

Det kan tenkes flere ulike mekanismer for sammenhengen mellom egenekspresjon og maksimalrespons av amfiregulin:

- Dersom cellelinjen uttrykker høye verdier av vekstfaktorer, kan en tenke seg desensitivisering av responsen fordi cellene stimuleres kontinuerlig.
- Ved høy egenekspresjon kan en også se for seg en forskyvning av konsentrasjon-responskurven fordi cellene trenger mindre stimuli for å nå den konsentrasjonen som gir maksimal effekt.

Siden konsentrasjon-respons forsøkene ble kjørt før tidskurvene, er ikke tiden cellene ble stimulert med optimal. Maksimalresponsen ville sannsynligvis vært høyere hvis cellene hadde blitt stimulert i optimalt antall minutter. Likevel ville forholdet mellom båndene blitt det samme, og tiden har derfor høyst sannsynlig ingenting å si for sluttresultatet.

Resultatene, slik de er framstilt i Figur 17 og Figur 22, gir en gal framstilling av virkeligheten. pERK antistoffet ga en mye sterkere respons i cellelinjen DU-145 enn i cellelinjen LNCaP-



C4-2. I Figur 17B kan det se ut som om det er LNCaP-C4-2 som gir høyest respons, mens den i virkeligheten er den som gir lavest respons av alle cellelinjene. Forklaringen på dette er den store forskjellen i basalnivået av pERK, og en mye svakere basal ERK aktivering i LNCaP-C4-2 enn i DU-145. Dette medfører at signalene i brønn 1 og 2 på LNCaP-C4-2 blottet som er svake i utgangspunktet nesten blir borte, og siden resultatene er framstilt som relative verdier til brønn 2, vil signalene i de andre brønnene dermed bli tilsvarende sterkere ved resultatframstillingen. DU-145 har en mye sterkere basal ERK-aktivering, og båndene i brønn 1 og 2 på DU-145 blottet er mye sterkere. Problemet kunne vært løst ved at blottet med LNCaP-C4-2 hadde fått en lengre eksponeringstid i kameraet. Da ville de svake signalene i brønn 1 og 2 kommet tydeligere frem, og den relative framstillingen ville vært nærmere sannheten. Sannsynligvis ville det ikke blitt noe problem med overeksponering på de andre båndene, siden de er relativt svake fra før.

Det samme problemet går igjen på flere bilder i oppgaven, og det må legges til grunn ved tolkning av resultatene.

## **8.6 TIDSAVHENGIG ERK-AKTIVERING INDUSERT AV EGF OG AMFIREGULIN I PROSTATACELLELINJENE**

Tidskurvene med stimulering med EGF og amfiregulin ble utført for å finne den optimale stimulerings tiden for EGF og amfiregulin i cellelinjene. Også her er det sannsynlig at det er en sammenheng mellom cellelinjenes egenekspresjon av vekstfaktorene, og deres respons. PC-3 og DU-145 gir tidlig respons på EGF-stimulering, mens LNCaP-C4-2 gir en senere respons. Det kan derfor virke nærliggende å tro at PC-3 og DU-145 har en sterkere egenekspresjon av EGF enn LNCaP-C4-2. Det samme mønsteret gjentas ved tidskurven for amfiregulin, der PC-3 og DU-145 gir tidlig respons, mens LNCaP-C4-2 henger etter. Disse resultatene stemmer overens med resultatene som viser at LNCaP-C4-2 ikke uttrykker amfiregulinprotein i målbar mengde, mens PC-3 uttrykker noe mer.

## **8.7 IRESSA®-HEMMING AV EGF-AKTIVERTE LNCaP-C4-2 CELLER**

Resultatene fra dette forsøket viser at Iressa® hemmer kreftcellene effektivt, noe som stemmer overens med andre publikasjoner som også har vist god hemmende effekt i cellelinjer fra prostatakreft [29]. Årsaken til at effekten er så klar i cellelinjer, men er veldig

liten ved kliniske utprøvinger på mennesker er uklar, men andre faktorer må tydeligvis også virke inn på EGFR-signalveien. Denne interaksjonen kan enten skje direkte gjennom stimulering av reseptoren, eller indirekte via interaksjon med signalveien. Blant annet vil amfiregulin ha innvirkning på EGFR, og forsøket bør derfor gjentas der det stimuleres med både EGF og amfiregulin for å se om amfiregulin er med på å nedsette effekten av Iressa®.

## **8.8 SCREENING FOR POTENSIELT REGULERTE VEKSTFAKTORER I PROSTATACELLELINJENE**

### **8.8.1 Amfiregulin**

I jakten på andre vekstfaktorer enn EGF som på en eller annen måte interagerer med EGFR signalveien, ble det funnet samme resultat for amfiregulin i PC-3 og DU-145 som tidligere publikasjoner [41]. Amfiregulin er oppregulert på mRNA-nivå i androgenuavhengige cellelinjer, men ikke i androgenavhengige. Denne oppreguleringen kan være en viktig del i utviklingen fra hormonavhengig til hormonuavhengig prostatakreft, og kan ses på som et framtidig mål for terapi. Amfiregulin uttrykkes også i godartet vev, men i enda mindre grad enn i hormonavhengige tumorer [42]. Tidligere studier har også vist at amfiregulin er en biomarkør for de som ikke responderer på Iressa® [37].

En interessant observasjon var den store forskjellen i proteinekspressjonen av amfiregulin mellom PC-3Neo og PC-3AR i Figur 21. Fordi forskjellen mellom disse cellelinjene kun er at den siste har transfektert inn androgenreseptor, må forskjellen i ekspresjon tilskrives dette. LNCaP uttrykker amfiregulin både på mRNA og proteinnivå, og det er vist at denne ekspresjonen økes ved androgenstimulering. Samtidig blir amfiregulinekspressjonen induert av ligandavhengig EGFR-stimulering, og androgene effekter på amfiregulinsyntesen medieres gjennom EGFR-signalveien [43]. Til sammen kan dette være mulige forklaringer på den store forskjellen i amfiregulinekspressjon mellom PC-3Neo og PC-3AR både på RNA- og proteinnivå. Det er vist at PC-3Neo har mindre autofosforylering av EGFR enn PC-3, og at innføring av AR i genomet fører til en reduksjon i EGF-mediert signalering. Dette skjer sannsynligvis gjennom en direkte interaksjon med EGFR, og gjør PC-3AR til en mindre malign fenotype enn PC-3Neo [35]. På RNA-nivå er det kun de androgenuavhengige cellelinjene PC-3 og DU-145 i tillegg til den androgenfølsomme cellelinjen PC-3AR som uttrykker målbare mengder av amfiregulin. På proteinnivå er det kun de androgenuavhengige cellene LNCaP-Rf som har høyere ekspresjon.

DU-145 var også med i studien, men manglende  $\alpha$ -tubulinsignal viste av prøven sannsynligvis var degradert.

### **8.8.2 Midkine**

Oppreguleringen som ses av midkine (Figur 20) er også observert tidligere. Takei et.al. publiserte i juli 2006 en artikkel hvor de transfekterte PC-3 celler med midkine siRNA, slik at gentranskripsjonen av midkine ble sterkt redusert. Dette førte til en signifikant hemming av celleveksten, og det kan derfor være et aktuelt mål for terapi i framtida [44]. I denne oppgaven ble overekspresjon av midkine registrert i LNCaP-C4, LNCaP-C4-2 og PC-3 celler, med tredobbelt så høy ekspresjon i LNCaP-C4 som i PC-3. Det kan derfor se ut som en betydelig andel av de hormonrefraktære tumorene overuttrykker midkine, og det er disse tumorene som kan være aktuell for denne terapien.

## **8.9 ERK AKTIVITET ER HØYERE I USTIMULERTE OG STIMULERTE DU-145 CELLER ENN I KORRESPONDERENDE LNCaP-C4-2 CELLER**

DU-145 viser en mye høyere basalaktivitet av ERK enn LNCaP-C4-2. Dette stemmer overens med tidligere publikasjoner som viser at DU-145 har en konstitutiv aktiv basal ERK2-aktivitet [45]. En forklaring på dette kan være cellelinjenes egenproduksjon av vekstfaktorer som EGF, TGF $\alpha$  og amfiregulin. I cellelinjer som selv uttrykker høye verdier av vekstfaktorene, kan man tenke seg en desensitivisering av responsen på stimuli på grunn av kontinuerlig stimulering. Figur 20 viser at DU-145 har en høyere egenekspresjon av amfiregulin på RNA-nivå, slik at egenekspresjonen av amfiregulin sannsynligvis ikke kan forklare forskjellen i basal ERK-aktivering.

## **8.10 STIMULERING MED EGF OG ØKENDE MENGDER AMFIREGULIN**

Selv om EGFR-signalveien er oppregulert i prostatakraft ser man liten effekt av Iressa®. For å undersøke om dette skyldtes at andre vekstfaktorer motvirker effekten av EGFR-hemmingen, ble det bestemt å undersøke hvordan de oppregulerte vekstfaktorene påvirket EGFR-signalveien. Amfiregulin var et naturlig valg, ettersom denne viste høyest regulering i

screeningen. Resultatene fra forsøket med stimulering med EGF og økende mengder amfiregulin viser en liten økning initialt, før en tendens til hemming ses ved høyere amfiregulin-konsentrasjoner. Siden signalet øker, selv om dette er lite, kan det tyde på en økt aktivitet i EGFR-signalveien når det stimuleres med lave konsentrasjoner amfiregulin i tillegg til EGF. Dette kan tyde på at amfiregulin faktisk påvirker EGFR-signalveien, men via en annen reseptor enn EGFR.

## **8.11 FRAMTIDIG BEHANDLING AV PROSTATAKREFT**

Kunnskapen som har kommet i etterkant av kartleggingen av det humane genom har medført en betydelig økt forståelse for tumorens biologi og hvilke mekanismer som er involvert. Det økende omfanget av molekylærbiologiske terapier under utvikling, gir håp om mer effektiv og bedre tilpasset terapi i framtida. Dette kan for eksempel bety at hver undergruppe av pasienter med prostatakreft kan få en "skreddersydd" behandling. Denne behandlingen er ikke nødvendigvis rettet mot bare ett mål, men en kombinasjon av flere.

Ettersom overekspresjon av både ErbB2 og EGFR ser ut til å forverre prognosen ved prostatakreft, kan man tenke seg at en kombinasjonsbehandling med Iressa® og Herceptin® kan gi god effekt. Dette har vært forsøkt tidligere i tykktarmskreft [46]. Eventuelt kan også kombinasjonen prøves sammen med midkine siRNA.

I tillegg kan kanskje amfiregulin være et mål for behandling, ettersom denne aktiverer EGFR-signalveien og ser ut til å være en dårlig prognostisk faktor ved behandling med Iressa®.

## 9 REFERANSELISTE

1. Statens legemiddelverk. 2004. **Terapianbefaling: Behandling av prostatakrefte**.
2. Internett. **Kreftforeningens nettsider**.  
[http://www.kreftforeningen.no/dt\\_singlearticle.asp?gid=2237&aid=910860&amid=650416](http://www.kreftforeningen.no/dt_singlearticle.asp?gid=2237&aid=910860&amid=650416) . Sist besøkt 02.01.2005.
3. Internett. **Wikipedia-Prostate**. <http://en.wikipedia.org/wiki/Prostate> Sist besøkt 02.10.2006.
4. Internett. **AstraZenecas internettsider - Prostatakrefte**.  
<http://www.astrazeneca.no/sykdommer/prostatakrefte/index.html> . Sist besøkt 02.01.2006.
5. Kirby,R.S., Brawer,M.K., and Denis,L.J. 2001. **Fast Facts - Prostate Cancer**. Third edition .Health Press.
6. Angelsen,A. 2003. **Kjemisk og kirurgisk kastrasjon ved prostatacancer - effekt og bivirkninger**. *Information från Läkemiddelsverket*, 6-7: 52-54.
7. Hernes,E., Harvei,S., Glatte,E., Gjertsen,F., and Fossa,S.D. 2005. **High prostate cancer mortality in Norway: influence of Cancer Registry information?** *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 113(7-8): 542-549.
8. Quinn,M. and Babb,P. 2002. **Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: individual countries**. *BJU International*, 90(2): 174-184.
9. Internett. **Wikipedia- Prostate Specific Antigen**.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Prostate\\_specific\\_antigen](http://en.wikipedia.org/wiki/Prostate_specific_antigen) Sist besøkt 03.10.2006.
10. Tasken,K.A., Angelsen,A., Svindland,A., Eide,T., Berge,V., Wahlquist,R., and Karlsen,S. 2005. **[Markers for diagnosis, prediction and prognosis of prostate cancer]**. *Tidsskrift for Den Norske Laegeforening*, 125(23): 3279-3282.
11. Hernes,E., Fossa,S.D., Berner,A., Otnes,B., and Nesland,J.M. 2004. **Expression of the epidermal growth factor receptor family in prostate carcinoma before and during androgen-independence**. *British Journal of Cancer*, 90(2): 449-454.
12. Holbro,T. and Hynes,N.E. 2004. **ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life**. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 44: 195-217.
13. Herbst,R.S., Fukuoka,M., and Baselga,J. 2004. **Gefitinib--a novel targeted approach to treating cancer**. *Nature reviews.Cancer*, 4(12): 956-965.
14. Edwards,J., Traynor,P., Munro,A.F., Pirret,C.F., Dunne,B., and Bartlett,J.M. 2006. **The Role of HER1-HER4 and EGFRvIII in Hormone-Refractory Prostate Cancer**. *Clinical Cancer Research*, 12(1): 123-130.

15. Hernes,E., Fossa,S.D., and Skovlund,E. 2003. **Androgen-independent prostate cancer--the clinical problem of a growing pelvic tumour.** *Acta Oncologica*, 42(7): 749-755.
16. Baselga,J. and Averbuch,S.D. 2000. **ZD1839 ('Iressa') as an anticancer agent.** *Drugs*, 60 Suppl 1: 33-40.
17. Rae,J.M., Scheys,J.O., Clark,K.M., Chadwick,R.B., Kiefer,M.C., and Lippman,M.E. 2004. **EGFR and EGFRvIII expression in primary breast cancer and cell lines.** *Breast Cancer Research and Treatment*, 87(1): 87-95.
18. Sok,J.C., Coppelli,F.M., Thomas,S.M., Lango,M.N., Xi,S., Hunt,J.L., Freilino,M.L., Graner,M.W., Wikstrand,C.J., Bigner,D.D., Gooding,W.E., Furnari,F.B., and Grandis,J.R. 2006. **Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting.** *Clinical Cancer Research*, 12(17): 5064-5073.
19. Anonymous2001. **Tumor Focus: The epidermal growth factor receptor in prostate cancer.** *Signal*, 2(3): 12-16.
20. Berger,R., Lin,D.I., Nieto,M., Sicinska,E., Garraway,L.A., Adams,H., Signoretti,S., Hahn,W.C., and Loda,M. 2006. **Androgen-dependent regulation of Her-2/neu in prostate cancer cells.** *Cancer Research*, 66(11): 5723-5728.
21. Fox,S.B., Persad,R.A., Coleman,N., Day,C.A., Silcocks,P.B., and Collins,C.C. 1994. **Prognostic value of c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor in stage A1 (T1a) prostatic adenocarcinoma.** *British Journal of Urology*, 74(2): 214-220.
22. Orlando,L., Cardillo,A., Ghisini,R., Rocca,A., Balduzzi,A., Torrisi,R., Peruzzotti,G., Goldhirsch,A., Pietri,E., and Colleoni,M. 2006. **Trastuzumab in combination with metronomic cyclophosphamide and methotrexate in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer.** *BMC.Cancer*, 6: 225.
23. Koumakpayi,I.H., Diallo,J.S., Le,P.C., Lessard,L., Gleave,M., Begin,L.R., Mes-Masson,A.M., and Saad,F. 2006. **Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer.** *Clinical Cancer Research*, 12(9): 2730-2737.
24. Dr Vince Miller. **EGFR Signal Transduction 2003-Poster.** *Signal* March 2003.
25. Kirk,D. 1999. **International Handbook of Prostate Cancer.** First edition .Euromed Communications Ltd.
26. Internett. **Felleskatalogens internettsider.** [www.felleskatalogen.no](http://www.felleskatalogen.no) Sist besøkt 12.1.2006.
27. Pienta,K.J. and Bradley,D. 2006. **Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer.** *Clinical Cancer Research*, 12(6): 1665-1671.
28. Mohamed,M.K., Ramalingam,S., Lin,Y., Gooding,W., and Belani,C.P. 2005. **Skin rash and good performance status predict improved survival with gefitinib in**

- patients with advanced non-small cell lung cancer.** *Annals of Oncology*, 16(5): 780-785.
29. Vicentini,C., Festuccia,C., Gravina,G.L., Angelucci,A., Marronaro,A., and Bologna,M. 2003. **Prostate cancer cell proliferation is strongly reduced by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in vitro on human cell lines and primary cultures.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 129(3): 165-174.
  30. Canil,C.M., Moore,M.J., Winquist,E., Baetz,T., Pollak,M., Chi,K.N., Berry,S., Ernst,D.S., Douglas,L., Brundage,M., Fisher,B., McKenna,A., and Seymour,L. 2005. **Randomized phase II study of two doses of gefitinib in hormone-refractory prostate cancer: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group.** *Journal of Clinical Oncology*, 23(3): 455-460.
  31. Mimeault,M., Venkatraman,G., Johansson,S.L., Moore,E., Henichart,J.P., Depreux,P., Lin,M.F., and Batra,S.K. 2006. **Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide.** *International Journal of Cancer*,
  32. Horoszewicz,J.S., Leong,S.S., Kawinski,E., Karr,J.P., Rosenthal,H., Chu,T.M., Mirand,E.A., and Murphy,G.P. 1983. **LNCaP model of human prostatic carcinoma.** *Cancer Research*, 43(4): 1809-1818.
  33. Huang,H., Cheville,J.C., Pan,Y., Roche,P.C., Schmidt,L.J., and Tindall,D.J. 2001. **PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression.** *Journal of Biological Chemistry*, 276(42): 38830-38836.
  34. Wu,H.C., Hsieh,J.T., Gleave,M.E., Brown,N.M., Pathak,S., and Chung,L.W. 1994. **Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells.** *International Journal of Cancer*, 57(3): 406-412.
  35. Bonaccorsi,L., Muratori,M., Marchiani,S., Forti,G., and Baldi,E. 2006. **The androgen receptor and prostate cancer invasion.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246(1-2): 157-162.
  36. Internett. **Invitrogens hjemmesider.**  
<https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=iProtocol.unitSectionTree&objectId=463FC458B54B8FE758E0C960061BF8F7&treeNodeId=A2C5758BC7C3438B01378A0940376C8E> Sist besøkt 05.10.2006.
  37. Katoh,Y. and Katoh,M. 2006. **Canonical WNT signaling pathway and human AREG.** *International Journal of Molecular Medicine*, 17(6): 1163-1166.
  38. Nasu,K., Tanji,N., Nishioka,R., Wang,J., Yanagihara,Y., Ozawa,A., Yokoyama,M., and Sakayama,K. 2006. **EXpression of ErbB proteins in human prostate.** *Archives of Andrology*, 52(3): 185-190.
  39. Zhang,Y., Wang,X.W., Jelovac,D., Nakanishi,T., Yu,M.H., Akinmade,D., Goloubeva,O., Ross,D.D., Brodie,A., and Hamburger,A.W. 2005. **The ErbB3-**

- binding protein Ebp1 suppresses androgen receptor-mediated gene transcription and tumorigenesis of prostate cancer cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28): 9890-9895.
40. Williams,E.E., Trout,L.J., Gallo,R.M., Pitfield,S.E., Bryant,I., Penington,D.J., and Riese,D.J. 2003. **A constitutively active ErbB4 mutant inhibits drug-resistant colony formation by the DU-145 and PC-3 human prostate tumor cell lines.** *Cancer Letters*, 192(1): 67-74.
41. Torring,N., Jorgensen,P.E., Sorensen,B.S., and Nexø,E. 2000. **Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines.** *Anticancer Research*, 20(1A): 91-95.
42. Bostwick,D.G., Qian,J., and Maihle,N.J. 2004. **Amphiregulin expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 93 cases.** *Prostate*, 58(2): 164-168.
43. Sehgal,I., Bailey,J., Hitzemann,K., Pittelkow,M.R., and Maihle,N.J. 1994. **Epidermal growth factor receptor-dependent stimulation of amphiregulin expression in androgen-stimulated human prostate cancer cells.** *Molecular Biology of the Cell*, 5(3): 339-347.
44. Takei,Y., Kadomatsu,K., Goto,T., and Muramatsu,T. 2006. **Combinational antitumor effect of siRNA against midkine and paclitaxel on growth of human prostate cancer xenografts.** *Cancer*, 107(4): 864-873.
45. Putz,T., Culig,Z., Eder,I.E., Nessler-Menardi,C., Bartsch,G., Grunicke,H., Uberall,F., and Klocker,H. 1999. **Epidermal growth factor (EGF) receptor blockade inhibits the action of EGF, insulin-like growth factor I, and a protein kinase A activator on the mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cell lines.** *Cancer Research*, 59(1): 227-233.
46. Zhou,Y., Li,S., Hu,Y.P., Wang,J., Hauser,J., Conway,A.N., Vinci,M.A., Humphrey,L., Zborowska,E., Willson,J.K., and Brattain,M.G. 2006. **Blockade of EGFR and ErbB2 by the novel dual EGFR and ErbB2 tyrosine kinase inhibitor GW572016 sensitizes human colon carcinoma GEO cells to apoptosis.** *Cancer Research*, 66(1): 404-411.