

*Masteroppgave i farmakologi for graden Master of Pharmacy*

# **AMFIREGULIN I PROSTATAKREFT**

**-EN MULIG MARKØR FOR BEHANDLINGSRESISTENS MOT  
IRESSA® (GEFITINIB)?**

**Helene Hartvedt Grytli**

Mai 2008



Urologisk Forskningsinstitutt

Oslo Urologiske Universitetsklinikk

**Aker Universitetssykehus**

Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk- naturvitenskapelige fakultet

**Universitetet i Oslo**

## Forord

Oppgaven er blitt utført ved Urologisk Forskningsinstitutt, Oslo Urologiske Universitetsklinikk, Aker Universitetssykehus. Eksterne veiledere har vært Kristin Austlid Taskén og Turid Eide, og internveileder ved Farmasøytisk Institutt (FI) har vært Hege Thoresen.

Jeg vil rette en stor takk til hovedveileder Kristin Austlid Taskén for veldig god oppfølging underveis i arbeidet med oppgaven, både i forhold til forsøksplanlegging underveis og ferdigstilling av oppgaven. Medveileder Turid Eide skal også ha en stor takk for fantasisk oppfølging på laben og under skriveprosessen.

En stor takk rettes dessuten til internveileder Hege Thoresen fra FI, for gode innspill underveis i arbeidet med oppgaven. Tusen takk for gode og raske tilbakemeldinger under sluttspurten! Takk også for veldig god praktisk hjelp under proteinmålingsforsøket som ble analysert på FI.

Takk til forskningsgruppen til Heidi Kiil Blomhoff ved Avdeling for Medisinsk Biokjemi, Rikshospitalet for utlån av analysemateriell og apparatur til bruk under  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay.

Takk også til Håkon Ramberg og Olov Ögren for uvurderlig praktisk bistand på laben, og til Ranveig Røtterud for fruktbare samtaler rundt tekniske utfordringer ved skriving av oppgaven.

Samlet fortjener forskningsgruppen ved Urologisk Forskningsinstitutt en kjempetakk for at dere at gjort arbeidet med masteroppgaven lærerikt, utfordrende, spennende og ikke minst veldig hyggelig!

Aker Universitetssykehus

15 mai 2008

Helene Hartvedt Grytli

# Innhold

<b>INNHold .....</b>	<b>3</b>
<b>1. FORKORTELSER.....</b>	<b>8</b>
<b>2. SAMMENDRAG .....</b>	<b>9</b>
<b>3. BAKGRUNN.....</b>	<b>11</b>
3.1 PROSTATA.....	11
3.1.1 Mikrostruktur .....	12
3.1.2 Modning og vekst av prostatakjertelen .....	12
3.1.3 Benign prostatahyperplasi (BPH).....	13
3.2 PROSTATAKREFT .....	14
3.2.1 Symptomer .....	15
3.2.2 Diagnose .....	15
3.2.3 Hormonfølsom prostatakraft.....	18
3.2.4 Hormonrefraktær prostatakraft .....	20
3.3 ERBB-FAMILIEN .....	23
3.3.1 Ras/Raf/MAPK- signalveien .....	24
3.3.2 PI3K/Akt- signalveien .....	25
3.3.3 Fosfolipase C $\gamma$ - signalveien .....	25
3.3.4 Ligander til ErbB-familien.....	25
3.3.5 ErbB- reseptorer i prostatakraft .....	26
3.3.6 Terapi rettet mot ErbB- familien.....	26
3.4 IRESSA® .....	27
3.4.1 Effekter av Iressa® i prostatakraft.....	27

---

3.5	FORMÅL MED OPPGAVEN.....	29
<b>4.</b>	<b>MATERIALER.....</b>	<b>30</b>
4.1	REAGENSER.....	30
4.2	LØSNINGER .....	32
4.2.1	<i>TBS-T</i> .....	32
4.2.2	<i>RIPA- buffer</i> .....	32
4.2.3	<i>RIPA- buffer med fosfatase- og proteasehemmere</i> .....	32
4.2.4	<i>Transferbuffer</i> .....	32
4.2.5	<i>RPMI- medium</i> .....	33
4.2.6	<i>T- medium</i> .....	33
4.2.7	<i>Strippet serum (CSS)</i> .....	34
4.3	CELLELINJER .....	35
4.3.1	<i>LNCaP (Lymph Node Cancer Prostate) - celler</i> .....	35
4.3.2	<i>LNCaP C4-2- celler</i> .....	36
4.4	PRIMERE.....	37
4.5	UTSTYR.....	38
<b>5.</b>	<b>METODER.....</b>	<b>39</b>
5.1	CELLEDYR KING.....	39
5.2	PROTEINEKSTRAKSJON.....	39
5.2.1	<i>Cellestimulering til proteinekstraksjon</i> .....	39
5.2.2	<i>Høsting av proteiner</i> .....	39
5.2.3	<i>Proteinmåling</i> .....	40
5.3	WESTERNBLOTT .....	41
5.3.1	<i>Prinsipp</i> .....	41

---

5.3.2	<i>Prøveopparbeidelse</i> .....	41
5.3.3	<i>Elektroforese</i> .....	42
5.3.4	<i>Overføring til membran</i> .....	42
5.3.5	<i>Inkubering med antistoff</i> .....	43
5.3.6	<i>Fremkalling og deteksjon</i> .....	43
5.3.7	<i>Loadingkontroll</i> .....	43
5.4	RNA- EKSTRAKSJON .....	44
5.4.1	<i>Cellestimulering til RNA-ekstraksjon</i> .....	44
5.4.2	<i>RNA- høsting med Trizol</i> .....	44
5.4.3	<i>RNA- måling med NanoDrop (type ND-1000)</i> .....	45
5.5	ETT- TRINNS REAL-TIME RT-PCR .....	45
5.5.1	<i>Prinsipp</i> .....	45
5.5.2	<i>Komponenter i RT- PCR</i> .....	45
5.5.3	<i>Prøveopparbeidelse</i> .....	47
5.5.4	<i>RT-PCR reaksjonen</i> .....	48
5.5.5	<i>Analyse av resultater</i> .....	48
5.6	<sup>3</sup> H- TYMIDIN INKORPORERINGSASSAY .....	50
5.6.1	<i>Prinsipp</i> .....	50
5.6.2	<i>Cellestimulering</i> .....	51
5.6.3	<i>Prøveopparbeidelse</i> .....	51
5.6.4	<i>Analyse</i> .....	51
5.6.5	<i>Relativ kvantifisering</i> .....	51
5.7	DNA- EKSTRAKSJON .....	52
5.7.1	<i>Cellestimulering til DNA- ekstraksjon</i> .....	52

---

5.7.2	<i>DNA- høsting med Wizard SV Genomic DNA Purification System</i> .....	52
5.7.3	<i>DNA- måling med NanoDrop (type ND-1000)</i> .....	53
5.8	PROTEINMÅLING AV CELLER SÅDD UT I 96-BRØNNS PLATE.....	53
<b>6.</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>54</b>
6.1	SAMMENLIKNING AV <sup>3</sup> H- TYMIDIN INKORPORERING I LNCAP OG C4-2 CELLER.....	54
6.2	PROLIFERASJON AV LNCAP OG C4-2 CELLER INKUBERT I FBS VERSUS CSS .....	56
6.3	AREG- RESPONS I LNCAP- OG C4-2- CELLER .....	57
6.4	KONTROLL AV AREGS OG EGFs EGFR- STIMULERENDE EFFEKT .....	58
6.5	KONSENTRASJONSAVHENGIG EFFEKT AV IRESSA® I LNCAP OG C4-2 CELLER .....	59
6.5.1	<i>Konsentrasjonskurve for Iressa®s proliferasjonshemmende effekt</i> .....	59
6.5.2	<i>Normalisering av konsentrasjonskurvene med proteinmåling</i> .....	61
6.6	KONSENTRASJONSKURVE FOR IRESSA®S HEMMENDE EFFEKT MED AREG ELLER EFG TILSTEDE I MEDIET .....	64
6.7	KONSENTRASJONSAVHENGIG EFFEKT AV AREG PÅ IRESSA®-RESPONS.....	67
6.8	NIVÅER AV AREG mRNA I LNCAP- CELLER ETTER STIMULERING AV ULIKE SIGNALVEIER .	69
6.8.1	<i>AREG- uttrykk som følge av ulike vekstbetingelser</i> .....	69
6.8.2	<i>AREG- uttrykk som følge av stimulering med vekstfaktorer, hormoner og analoger</i>	70
<b>7.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>71</b>
7.1	VALG AV CELLELINJER .....	71
7.2	BRUK AV <sup>3</sup> H- TYMIDIN INKORPORERINGSASSAY.....	71
7.2.1	<i>DNA- måling</i> .....	72
7.3	PROLIFERASJON ETTER STIMULERING MED AREG OG EGF, OG HEMMING MED IRESSA® .....	72
7.3.1	<i>Proliferasjon av LNCaP- og C4-2- celler inkubert i FBS versus CSS</i> .....	72
7.3.2	<i>Kontroll av AREGs og EGFs EGFR- stimulerende effekt</i> .....	73

---

7.3.3	<i>AREG- respons i LNCaP- og C4-2 celler .....</i>	73
7.3.4	<i>Konsentrasjonsavhengig effekt av Iressa® i LNCaP- og C4-2- celler .....</i>	74
7.3.5	<i>Konsentrasjonskurve for Iressa®s hemmende effekt med AREG eller EGF tilstede i mediet .....</i>	75
7.3.6	<i>Konsentrasjonsavhengig effekt av AREG på Iressa®- respons .....</i>	76
7.4	NIVÅER AV AREG MRNA I LNCAP- CELLER ETTER STIMULERING AV ULIKE SIGNALVEIER..	76
7.5	KONKLUSJON .....	77
7.6	FREMTIDIGE STUDIER .....	78
<b>8.</b>	<b>REFERANSELISTE .....</b>	<b>79</b>

---

## 1. Forkortelser

AR	Androgen reseptor
AREG	Amfiregulin
BPH	Benign Prostata Hyperplasi
BSA	Bovint serum albumin
CSS	Charcoal stripped serum
dH <sub>2</sub> O	Destillert vann
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EGF	Epidermal vekstfaktor
EGFR	Epidermal vekstfaktor reseptor
ERK	Ekstracellulært regulert kinase
FBS	Føtalt bovint serum
FSH	Folikkel stimulerende hormon
G6PDH	Glukose- 6- fosfat dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin frigjørende hormon
HRP	Horse raddish peroxidase
IC <sub>50</sub>	Inhiberende konsentrasjon; ved 50 %
IGF-1	Insulin- liknende vekstfaktor 1
LDS	Lauryl Dodecyl Sulfat
LH	Luteiniserende hormon
MAPK	Mitogen- aktivert protein kinase
mRNA	Messenger RNA
NSCLC	Ikke- småcellet lungekreft
Pen/Strep	Penicillin og streptomycin
PI3-K	Phosphoinositid 3- kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5 bisphosfate
PSA	Prostata spesifikt antigen
RNA	Ribonukleinsyre
SDS	Natrium (Sodium) Dodecyl Sulfat
SOS	Son Of Sevenless
TBS-T	Trisbufret saltløsning med tween
TUR-P	Transuretral reseksjon av prostata
V	Volt



## 2. Sammendrag

Prostatakraft er en av de vanligste kreftformene blant menn i Norge, med tilnærmet 4000 nye tilfeller i året. Kun en andel av disse pasientene er kandidater for kurativ behandling ved fjerning av prostatakjertelen. Kirurgisk eller kjemisk kastrasjon er per i dag den eneste effektive systemiske behandling som kan tilbys øvrige pasienter. Imidlertid fører denne behandlingen i de fleste tilfeller til utvikling av hormonrefraktær prostatakraft, hvilket betyr bortfall av behandlingseffekt og påfølgende sykdomsprogresjon.

Epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR), en reseptor tyrosin kinase, er vist å være oppregulert i prostatakraft. Signalveier aktivert av EGF kan stimulere androgen reseptor (AR) i fravær av ligand, noe som vil kunne føre til kreftcellenes overlevelse i fravær av androgener. Iressa® (ZD 1839, gefitinib) er en lavmolekylær tyrosinkinase- inhibitor som viser relativ spesifisitet mot EGFR. Dette legemiddelet har vist klare antitumor- effekter i flere humane kreftformer. Legemiddelets effekter i prostatakraftpasienter er blant annet til utprøving ved en klinisk fase II- studie ved Oslo Urologiske Universitetsklinikk (Aker universitetssykehus) i kombinasjon med et anti- androgen, Casodex® (bicalutamid).

Resultater fra studier utført i pasienter med ikke- småcellet lungecancer (NSCLC) har vist at det er nødvendig å identifisere hvilke pasienter som vil kunne få effekt av Iressa®- behandling. EGFR- liganden amfiregulin (AREG) er foreslått som en mulig markør på ikke- responderer i NSCLC. Liganden er også vist å spille en rolle i prostatakraft, blant annet ved at den er oppregulert i androgenuavhengige prostatakraftceller *in vitro*. Samspillet mellom AREG og Iressa® er derfor undersøkt i denne oppgaven.

Ved bruk av den androgenfølsomme cellelinjen LNCaP og den androgenuavhengige cellelinjen C4-2, er det ved bruk av <sup>3</sup>H- tymidin inkorporeringsassay i denne oppgaven sett på effekten av økende konsentrasjoner av Iressa® på cellenes proliferasjon. Den proliferasjonshemmende effekten viste seg å være sterkt konsentrasjonsavhengig, og kraftigere i LNCaP- enn i C4-2- celler. Tilnærmet total hemming av cellenes proliferasjon ble imidlertid sett ved tilsetning av konsentrasjonen 50 µM i begge cellelinjene.

For å se nærmere på AREGs effekter på proliferasjon er også cellene stimulert med ulike konsentrasjoner av AREG. AREG utviste ingen proliferasjonsøkende effekt alene, og

påvirket heller ikke proliferasjonen til celler hemmet med 1  $\mu$ M Iressa®. Epidermal vekstfaktor (EGF), en annen EGFR- ligand som binder reseptoren med høyere affinitet enn AREG, er tatt med i forsøkene som positiv kontroll på reseptoraktivering. Heller ikke EGF hadde noen effekt på cellenes proliferasjon under de forsøksbetingelser som er benyttet i oppgaven.

Da AREG er vist å være oppregulert i androgenuavhengige cellelinjer, er det i denne oppgaven undersøkt hvilke mekanismer som ligger bak oppregulering av denne vekstfaktoren i androgenfølsomme celler. Dette er undersøkt i cellelinjen LNCaP, som er blitt forsøkt stimulert med flere ulike vekstfaktorer, steroidhormoner og analoger. Steroidhormonet  $17\beta$ - estradiol og dihydrotestosteron- analogen R1881 reduserte nivået av AREG på mRNA- nivå. Fravær av steroider i mediet ga i seg selv en liten induksjon av AREG mRNA, mens kun mindre effekter ble observert med de andre faktorene. Disse resultatene tyder på at AREG er regulert av steroidhormoner, og at bortfall av androgener ved kirurgisk eller kjemisk kastrasjon kan føre til oppregulering av AREG- nivåer i prostatakrefceller.

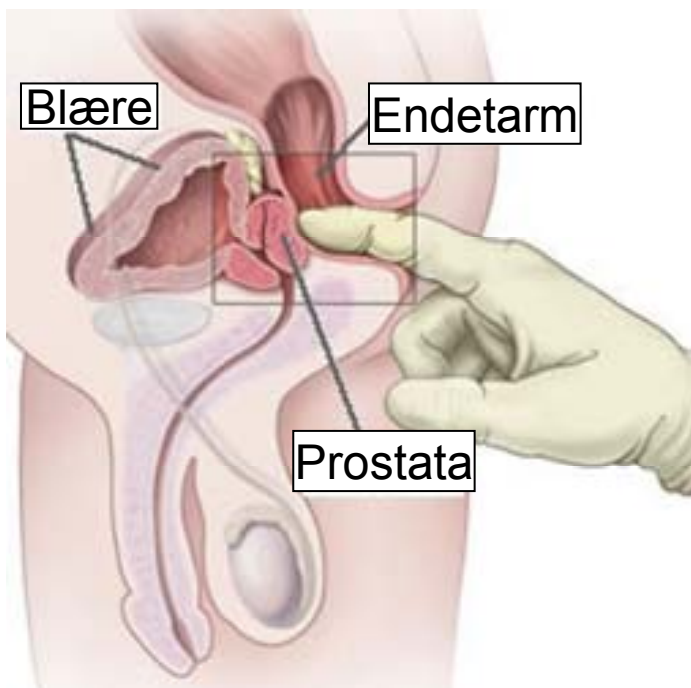
Det er i denne oppgaven ikke funnet resultater som tyder på at AREG er en markør for ikke-respondere på Iressa®. Dette må imidlertid undersøkes med flere andre metoder før en mulig sammenheng kan utelukkes. AREG er derimot identifisert som en mulig bidragsyter til utvikling av hormonrefraktær prostatakraft, og dermed som et potensielt mål for fremtidig kreftterapi.

## 3. Bakgrunn

### 3.1 Prostata

Prostatakjertelen, eller blærehalskjertelen, er en del av mannens reproduktive system. Det er en valnøttstor kjertel som omslutter øverste del av urinrøret. Kjertelen er lokalisert rett under blærehalsen og foran rektum, og er kun skilt fra endetarmen av et tynt lag med bindevev <sup>1</sup>.

Den kan derfor kjønn ved rektal eksaminasjon (figur 3.1). Prostatakjertelens funksjon er å skille ut seminal væske til urethra ved sædutløsning <sup>2</sup>. Denne væsken inneholder rikelig med sure fosfater og sitronsyre, og bidrar blant annet til å opprettholde et næringsrikt og stabiliserende miljø for sædcellene <sup>3</sup>.

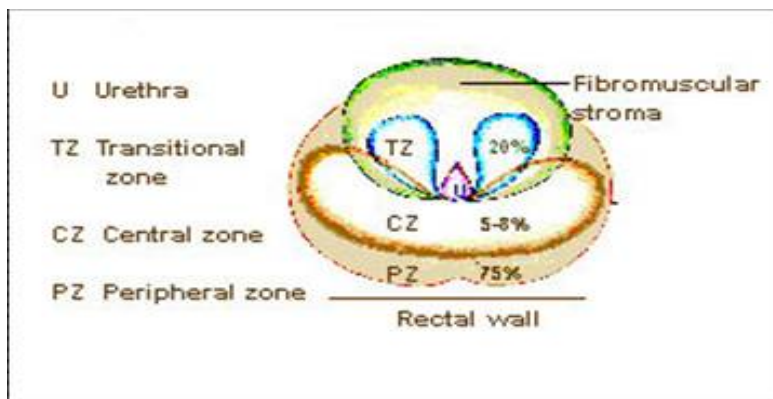


*Figur 3.1: Rektalundersøkelse av prostatakjertelen. Bildet er hentet fra <http://www.botavie-info.de/images/prostata/prostata-untersuchung.jpg>*

### 3.1.1 Mikrostruktur

Prostatakjertelen består både av kjertelvev og non- kjertelvev. Kjertelen kan deles inn på følgende måte <sup>4</sup> (Figur 3.2):

- Den fibromuskulære sonen; ligger på fremsiden av prostatakjertelen. Sonen består i stor grad av muskulært vev.
- Transisjons- sonen; den innerste delen av prostatakjertelen, som omringer urinrøret. Sonen begynner å vokse ved 40-års alderen, og er av den grunn ofte opphav til den godartede lidelsen benign prostata hyperplasi (BPH). Denne sonen opptar ca 5 % av kjertelvolumet, og ca 10 % av tilfellene av prostatakraft oppstår her.
- Den sentrale sonen; omringer transisjons-sonen, og opptar ca 25 % av volumet til non- kjertelvevet. Omtrent 5 % av alle prostatakrafttilfeller oppstår i denne sonen.
- Den perifere sonen; lokalisert på baksiden av prostatakjertelen, nærmest rektum. Denne sonen opptar ca 75-80% av prostatakjertelens volum, og ca 80 % av alle tilfeller av prostatakraft oppstår her.



*Figur 3.2: Oversikt over de ulike sonene i prostatakjertelen. Bildet er hentet fra [http://training.seer.cancer.gov/ss\\_module02\\_prostate/unit02\\_sec03\\_anatomy.html](http://training.seer.cancer.gov/ss_module02_prostate/unit02_sec03_anatomy.html)*

### 3.1.2 Modning og vekst av prostatakjertelen

I barndommen er prostatakjertelen relativt liten, og den begynner å vokse først i puberteten. Kjertelen når sin fulle størrelse rundt 20- års alder <sup>5</sup>.

Modning av prostatakjertelen avhenger av de mannlige kjønnshormonene testosteron og dihydrotestosteron (DHT), en mer potent metabolitt av testosteron. Disse hormonene stimulerer prostatacellene til vekst og modning ved å bindes til kjernereseptoren androgen

reseptor (AR). Ligandbinding til AR fører til homodimerisering og påfølgende binding til DNA responselementer, noe som initierer genekspressjon. Genene som aktiveres av AR er opphav til proteiner involvert i regulering av blant annet proliferasjon, apoptose og differensiering av prostatacellene <sup>6</sup>.

Prostatakjertelens normale funksjon og vekst er nøye regulert av hjernen, nærmere bestemt av hypofysen og hypothalamus <sup>7</sup>. Hypothalamus skiller ut hormonet gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH). En økning i GnRH- nivået i blodet stimulerer hypofysen til utskillelse av de gonadotrope hormonene luteiniserende hormon (LH) og folikkelstimulerende hormon (FSH) <sup>8</sup>. Disse hormonene stimulerer Leydigcellene i testiklene til produksjon av testosteron. Testosteron blir omdannet i prostata til sin mer potente metabolitt, DHT, via enzymet 5 $\alpha$ - reduktase. Regulering av hypothalamus- hypofyse-testikkel aksens foregår ved negativ feedback, ved at sirkulerende serumtestosteron forhindrer utskillelse av GnRH fra hypothalamus og av gonadotropinhormoner fra hypofysen <sup>8,9</sup>. Hormonaksen står for ca. 95 % av den daglige testosteronproduksjonen <sup>7</sup>.

Hypothalamus skiller også ut hormonet ACTH- frigjørende hormon, som stimulerer hypofysen til sekresjon av hormonet adrenokortikotrop hormon (ACTH). ACTH stimulerer binyrebarken til produksjon av blant annet androgener <sup>9</sup>. Binyrebarken står for omtrent 5 % av den daglige testosteronproduksjonen <sup>7</sup>.

### **3.1.3 Benign prostatahyperplasi (BPH)**

Benign prostatahyperplasi (BPH) er en godartet forstørrelse av prostata. BPH er en utbredt sykdom, og kan påvises hos menn helt ned i 30-års alderen <sup>1</sup>. Likevel er dette en lidelse som i stor grad rammer eldre menn, og skyldes antagelig kontinuerlig påvirkning av androgenene testosteron og DHT. Dette fører til stadige delinger av prostatacellene, slik at kjertelen i sin helhet forstørres <sup>10</sup>. Hos de fleste menn vil prostatakjertelen begynne å vokse rundt 40- 50-års alderen <sup>5</sup>. Dette fører til forsnevring av urinrøret, noe som vil gi symptomer som urinretensjon og vanskelig blæretømming. I tillegg vil det føre til en kompensatorisk vekst av muskulaturen i urinblæren, noe som vil kunne gi vanskeligheter med å kontrollere vannlatingen.

## *Diagnose*

BPH- diagnosen stilles gjerne klinisk, basert på pasientens symptomer og en eventuell rektal palpasjon av prostata<sup>10</sup>. Det er viktig å være oppmerksom på muligheten for at symptomene skyldes prostatakraft, da dette er en vanlig differensialdiagnose.

## *Behandling*

BPH kan behandles både kirurgisk og medikamentelt, avhengig av alvorlighetsgrad. Medikamentelt har man to alternativ: adrenerge  $\alpha$ 1-reseptorantagonister og  $5\alpha$ -reduktasehemmere<sup>11</sup>. Adrenerge  $\alpha$ 1-reseptorantagonister fører til avslapning av glatt muskulatur i prostata og i blærehals, og fører på denne måten til forenklet blæretømming.  $5\alpha$ -reduktasehemmere blokkerer omdannelsen av testosteron til DHT, slik at den stimulerende effekten på AR reduseres. Dette fører i sin tur til at prostatakjertelen minsker i størrelse. Kirurgisk behandling av BPH er aktuelt dersom plagene er alvorlige, eller dersom behandling med legemidler ikke har tilstrekkelig effekt. Den vanligste operasjonen er transuretral reseksjon av prostata (TUR), en prosedyre der prostatavevet nærmest urinrøret fjernes ved endoskopi<sup>10</sup>.

## **3.2 Prostatakraft**

Prostatakraft er blant de hyppigste kreftformene i Norge, og er den vanligste kreftformen blant menn med 3 817 nye tilfeller i 2006<sup>12</sup>. Antall diagnostiserte tilfeller har økt betydelig de siste årene, mye på grunn av forbedrede diagnostiske metoder. Spesielt serummålingen av prostataspesifikt antigen har hatt stor betydning for påvisningen av nye tilfeller<sup>13</sup>. I tillegg er den økende alderen i befolkningen en medvirkende årsak, da risikoen for å utvikle prostatakraft stiger betydelig med økt levealder. Halvparten av menn som diagnostiseres med prostatakraft er over 73 år, og prostatakraft anses å være en uvanlig diagnose for menn under 50 år<sup>12</sup>.

### 3.2.1 Symptomer

Tidlig i sykdommen gir prostatakraft få eller ingen symptomer <sup>14</sup>. Dersom tumoren vokser slik at den affiserer urinveiene, vil den kunne bli symptomgivende. Mange av symptomene på prostatakraft er til forveksling lik symptomene på BPH, derfor anbefales menn å gå til lege dersom de opplever noen av følgende symptomer <sup>15</sup>:

- Vanskeligheter med å tømme blæren.
- Hyppige toalettbesøk, spesielt om natten
- Smerte eller svie ved vannlating.
- Blod i urin eller sæd
- Smerter i ryggen, hoftene eller bekkenet
- Smertefull utløsning

Ved lokalisert sykdom vil man kun oppleve obstruksjonssymptomer, men dersom sykdommen går over i lokalavansert eller metastaserende kreft vil pasienten kunne oppleve til dels kraftige symptomer. Lokalavansert prostatakraft manifesterer seg ved blant annet hematuri, underlivssmerter, hematospermi og uremi, mens metastasert prostatakraft i tillegg kan gi symptomer som rygg- og skjelettsmerter, nevrologiske symptomer, tretthet og vekttap<sup>14</sup>.

### 3.2.2 Diagnose

Menn som diagnostiseres med prostatakraft oppsøker oftest legen på grunn av vannlatingproblemer. Ved slike symptomer skal det utføres en PSA (prostataspesifikt antigen)- måling, i tillegg til palpasjon av prostata <sup>13</sup>. Dersom funn fra disse testene viser tegn på prostatakraft, anbefales biopsi.

#### *PSA- måling*

PSA - prostataspesifikt antigen- er et enkeltkjedet glykoprotein som uttrykkes i prostatakjertelens epitelceller. PSA er et organspesifikt enzym, en serinprotease, som er en viktig komponent i sædvæsken <sup>16</sup>. Enzymets funksjon er å kløyve sædvæskens geldannende proteiner, slik at sædvæsken blir mer tyntflytende <sup>17</sup>. Normalt finnes det kun lave nivåer av PSA i blodet, men sykdommer i prostata vil kunne føre til økt lekkasje og dermed til høyere

serumverdier av PSA. Serum-PSA er forhøyet både ved benigne og maligne prostatalidelser, og er dermed ikke en spesifikk markør for prostatakraft. Andre tilstander som kan gi økt PSA er blant annet BPH, akutt prostatitt, cystitt og urinretensjon<sup>16;17</sup>. Dessuten vil en sædutløsning i løpet av de siste 72 timer før måling påvirke resultatet<sup>16</sup>. Enkelte undersøkelser, som prostatamassasje og cystoskopi, vil også kunne gi falskt forhøyede verdier<sup>17</sup>.

Etter norske retningslinjer anses PSA-nivået for å være forhøyet dersom verdien overstiger 4,0 ng/ml<sup>18</sup>. Omlag én av ti menn med PSA-verdier mellom 4,0 og 10 ng/ml får diagnosen prostatakraft<sup>17</sup>.

Da økt serum-PSA ikke er en særlig spesifikk markør for prostatakraft, er det utviklet flere undersøkelser som kan supplere funnet<sup>17;18</sup>:

- PSA- hastighet; økning i PSA-verdi per tidsenhet
- PSA- tetthet; PSA- verdien relateres til prostatavolum
- Aldersspesifikke referanseverdier; det tas hensyn til pasientens alder, da PSA verdien øker med økende levealder
- PSA- varianter; fritt PSA versus komplekst PSA. Det er vist at pasienter med prostatakraft har lavere verdier av fritt PSA i forhold til total PSA.

### **Fremtidige markører for prostatakraft**

I tillegg til PSA fokuseres det på å finne andre, gode diagnostiske markører som er spesifikke for prostatakraft. Mulige fremtidige kandidater er blant andre<sup>19</sup>:

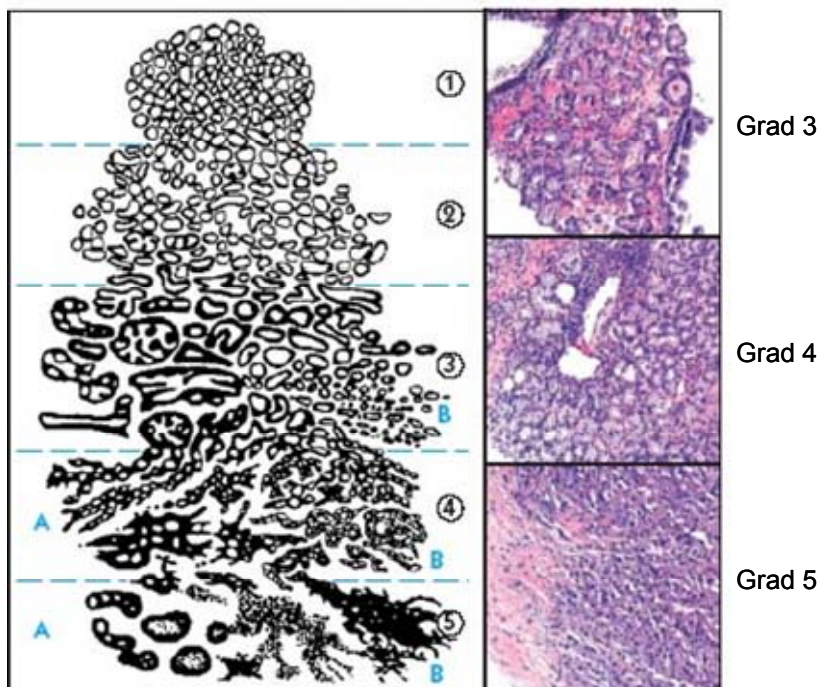
- AMACR; gen som koder for et enzym involvert i betaoksidasjon av forgrenede fettsyrer. Enzymets rolle i progresjon av prostatakraft er foreløpig ikke kjent, men nivåene er funnet å være økt i adenocarcinomvev og i premaligne lesjoner i prostata.
- GSTP1; glutationtransferase som er nedregulert hos 80 % av prostatakraftpasienter<sup>20</sup>. Enzymets oppgave i cellen er å beskytte mot oksidativ skade, og en nedregulering av enzymet vil av den grunn gjøre cellene mindre motstandsdyktige mot karsinogener.
- EZH2; gen som er vist å være oppregulert i hormonrefraktær prostatakraft<sup>21</sup>. Genet koder for en av bestanddelene i et polycomb- kompleks som regulerer kromatinstruktur. Studier tyder på at EZH2 kan brukes til å skille mellom metastaserende og lokaliserte tumorer.



- PCA3; antas å være en av de mest spesifikke markørene for prostatakraft. Ekspresjon av PCA3 er funnet å være økt både i primærtumor og i metastaser fra prostatakraft.

### *Gleasongrad og Gleasonscore*

For å vurdere histologien og prognosen til et gitt prostata adenocarcinom benyttes ofte Gleason graderingssystem. Graderingssystemet baserer seg på tap av prostatacellenes opprinnelige arkitektur, deriblant form, størrelse og differensieringsgrad<sup>22</sup>. Graderingen benyttes på nålbiopsier, TUR-P (transuretral reseksjon av prostata) og operasjonsresektat<sup>14</sup>. Systemet baserer seg på vurdering av kreftcellenes vekstmønster i forhold til fem ulike histologiske mønstre, der 1 er den minst aggressive formen (figur 3.3). De fem ulike histologiske mønstrene brukes for å gi en histologisk score, Gleasonscore. Denne kan variere fra 2 til 10, og regnes ut ved å addere Gleasongradene til de to mest dominerende mønstrene i vevsprøven<sup>23</sup>. Det er funnet å være stor overensstemmelse mellom Gleasonscore og sykdommens prognose<sup>14;23</sup>. Konstatering av Gleasonscore er viktig både for den videre utredningen og for å kunne vurdere pasientens behandlingsbehov.



*Figur 3.3: Dr. Gleasons opprinnelige, forenklete tegning av de ulike Gleasongradene. Figuren er hentet fra [http://www.prostate-cancer.org/education/staging/Dowd\\_GleasonScore.html](http://www.prostate-cancer.org/education/staging/Dowd_GleasonScore.html) 22.*

## Stadieinndeling av prostatatumorer

Dersom diagnosen prostatakreft stilles, skal tumoren stadieinndeles i forhold til TNM-systemet (tabell 3.1). T står for tumorutbredelse, N for forekomst av lymfekjertelmetastaser og M for forekomst av fjernmetastaser <sup>13</sup>.

**Tabell 3.1: Oversikt over ulike klassifiseringer av prostatatumorer.** Tabellen er hentet fra Legemiddelverkets terapianbefaling for prostatakreft, 2004 <sup>13</sup>.

TNM-KLASSIFIKASJON – UICC 2002	
T0	Primærtumor ikke påvist
Tx	Primærtumor ikke vurdert
T1	Tumor som ikke er palpabel eller påvisbar med ultralyd eller annen radiologisk metodikk
T1a	Tumor i <5 % av det undersøkte vevsmaterialet ved TUR-P
T1b	Tumor i >5 % av det undersøkte vevsmaterialet ved TUR-P
T1c	Tumor identifisert ved nålebiopsi (f.ex. utført pga. forhøyet PSA)
T2	<b>Palpabel eller synlig tumor begrenset til prostatakjertelen</b>
T2a	Tumor engasjerer halvparten eller mindre av en lobe
T2b	Tumor engasjerer mer enn halvparten av en lobe men ikke begge lobene
T2c	Tumor engasjerer begge lobene
T3	<b>Tumor som når utenfor prostatakapselen</b>
T3a	Ekstrakapsulær utbredelse
T3b	Tumor som invaderer den ene eller begge sædblæreene
T4	<b>Tumor fiksert til, eller som invaderer nærliggende strukturer andre enn sædblæreene: blærehalsen, analsfinkteren, rektum, levatormuskulaturen eller bekkenveggen</b>
<b>N- og M-kategori</b> angis med 1 eller 0 avhengig av om lymfekjertelmetastaser respektive fjernmetastaser er påvist eller ikke. Dersom man ikke har gjort undersøkelser for å kartlegge metastasering kategoriseres tumoren som Nx respektive Mx. Fjernmetastasering kan inndeles i M1a: ikke-regionale lymfekjertler, M1b: skjelett, M1c: andre metastaseområder.	

### 3.2.3 Hormonfølsom prostatakreft

Prostatakjertelen er i utgangspunktet avhengig av kjønns hormoner (androgener) for å vokse og for å fungere normalt. Dette gjelder også dersom celler i prostata utvikler seg til kreftceller, og den resulterende tumoren vil derfor være hormonavhengig, eller hormonfølsom. De aller fleste prostatatumorer er i utgangspunktet hormonfølsomme ved diagnosetidspunktet.

## ***Behandling av hormonfølsom prostatakraft***

Prostatakraft er en kreftform som ikke vil gi symptomer i alle tilfeller. Derfor er det viktig å gjøre en grundig redegjørelse for alvorlighetsgraden før en eventuell behandling påbegynnes. Dette er spesielt viktig med tanke på at flere menn vil dø av alderdom før sykdommen vil manifestere seg klinisk, og at behandling i disse tilfellene vil påføre pasienten unødvendige bivirkninger.

### **Kurativ behandling**

Pasienter med klinisk lokalisert sykdom er kandidater for radikal prostatektomi, en kirurgisk behandlingsform med kurasjon som mål. Dette er i stor grad et behandlingstilbud til menn under 70 år<sup>24</sup>, da disse har tilstrekkelig forventet levealder til at risiko ved operasjonen oppveies. Studier har vist at opptil 70 % av dem som behandles med radikal prostatektomi vil forbli tumor- frie i minimum 7-10 år etter operasjonen<sup>25</sup>. Likevel er det verdt å merke seg at en andel av pasientene med antatt lokalisert sykdom likevel kan ha spredning utenfor prostatakjertelen<sup>24</sup>. Disse vil ikke bli kurert ved en eventuell radikal prostatektomi.

Ulemper ved radikal prostatektomi er den relativt store faren for morbiditet som følge av operasjonen, for eksempel peroperative blødninger, rektal skade, urininkontinens og erektil dysfunksjon<sup>24</sup>. I den siste tiden er det imidlertid tatt i bruk nye og forbedrede operasjonsmetoder, som blant annet baserer seg på bruk av roboter. Dette bidrar til å øke nøyaktigheten ved denne typen operasjon, og derved redusere risikoen for de overnevnte skader.

### **Behandling med tanke på å bremse sykdomsforløpet**

På grunn av hormonfølsomme prostatatumorerers avhengighet av androgenstimulering for proliferasjon og vekst, er androgen deprivasjon et effektivt behandlingsalternativ ved denne kreftformen. Dette kan oppnås på flere ulike måter<sup>13</sup>:

- Orkiektomi; fjerning av testiklene. Denne behandlingen gir et svært raskt fall i androgennivåene i serum, og anbefales derfor til pasienter med neurologiske komplikasjoner som følge av metastaser. Bivirkninger av behandlingen skyldes i all hovedsak bortfall av de mannlige kjønnshormoner, og er uttalt ved hetetokter, svetting, bortfall av libido og ereksjonsevne samt økt risiko for anemi, osteoporose og muskelsvakhet.
- GnRH- agonister; over tid vil dette, på grunn av negativ feedback til hypofysen og hypothalamus, føre til redusert testosteronproduksjon. Med denne behandlingen vil serumtestosteron stige initialt. Dette kan gi forverrede

---

symptomer, og klinisk forverring dersom det foreligger metastaser. Effekten varer i ca to uker. Av denne grunn anbefales det å benytte et antiandrogen i oppstartsfasen. Behandling med GnRH- agonist kan forventes å gi kastrasjonsnivåer av testosteron i serum etter to til fire uker. Bivirkningene er de samme som ved orkiektomi, men på grunn av behandlingens ikke-endelige art foretrekker en del pasienter denne behandlingsformen.

- Østrogener; dette er et alternativ for pasienter som ikke ønsker kastrasjon. Behandlingen gir kastrasjonsnivåer av testosteron i serum etter ca fire uker. Fordelen med dette behandlingsalternativet er at risikoen for svetting og osteoporose reduseres, men en ulempe ved behandlingen er økt risiko for kardiovaskulære hendelser.
- Antiandrogener; AR- antagonister av ikke- steroid natur. Med dette behandlingsalternativet kan pasienten beholde normalt serumtestosteronnivå, samtidig som testosteronets effekt i prostatakrefcellene hemmes. Vanlige bivirkninger ved denne behandlingen er gynekomasti og brystømhet.

Ved valg av behandlingsalternativ er det viktig å ta både pasientens ønsker og forventede levealder i betraktning. En relativt stor andel av menn som diagnostiseres med prostatakraft vil dø *med* sin prostatakraft og ikke *av* den. På nasjonalt nivå er det derfor anbefalt at pasienter uten behandlingskrevende symptomer, med en forventet overlevelse på under 10 år, ikke får spesifikk behandling. Dette på grunn av den store risikoen for bivirkninger. Pasientene bør i slike tilfeller følges opp i allmennhelsetjenesten eller av spesialsykepleier ved en urologisk enhet <sup>13</sup>.

### 3.2.4 Hormonrefraktær prostatakraft

Hormonrefraktær prostatakraft defineres som progredierende sykdom til tross for kastrasjonsnivå av testosteron i serum <sup>13</sup>. Opprinnelig er prostatakraftceller avhengig av androgener for vekst, slik at kirurgisk eller kjemisk kastrasjon vil føre til klinisk remisjon. Gitt nok tid vil det imidlertid skje molekulære og cellulære endringer i de gjenværende kreftcellene som tillater fortsatt vekst <sup>26-28</sup>. Cellene har da blitt hormonuavhengige, eller hormonrefraktære. Seleksjon av eventuelle hormonuavhengige cellepopulasjoner tilstede i den opprinnelige tumoren er også en mulig forklaring på utviklingen av hormonrefraktær prostatakraft.

## **Behandling av hormonrefraktær prostatakraft**

Pasienter med hormonrefraktær prostatakraft kan oppleve å ha effekt av androgendeprivasjon, men kun i en begrenset overgangsfase. Det finnes per i dag ingen effektiv behandling av hormonrefraktær prostatakraft, og behandlingen av disse pasientene er derfor palliativt rettet. Følgende behandlingsalternativer kan forsøkes <sup>13</sup>:

### **Endokrint aktive substanser**

- Glukokortikoider kan brukes alene eller sammen med cytostatika. Disse gir sin effekt blant annet ved å hemme binyrenes utskillelse av kjønnshormoner. Glukokortikoider kan dessuten gi økt appetitt og økt velbefinnende.
- Antiandrogener kan forsøkes hos pasienter som tidligere ikke har fått denne behandlingen, da hormanfølsomme kreftceller fremdeles kan være tilstede i tumoren.
- Estramustinfosfat brukes i hovedsak sammen med cytostatika. Stoffet har både cytostatiske og hormonelle egenskaper, og virker både ved å hemme dannelsen av mikrotubuli og ved at metabolittene utviser østrogenlignende effekter <sup>29</sup>.

### **Cytostatika**

Studier har vist at mitoxantrone (en topoisomerase- hemmer) gir god palliativ effekt i kombinasjon med kortikosteroider. Dette manifesterer seg ved smertelindring og forbedret livskvalitet. Docetaxel (en mikrotubuli- hemmer) er også vist å være effektiv ved hormonrefraktær prostatakraft <sup>13</sup>, og er i dag mye brukt i klinikken.

### **Smertelindrende behandling**

Smertebehandling inngår som en viktig del av den palliative omsorgen ved hormonrefraktær prostatakraft, da spesielt skjelettmetastaser vil kunne gi opphav til sterke smerter. Hvilket preparat som velges avhenger av smertens alvorlighetsgrad, og paracetamol er førstevalg ved lette smerter. Ved forsterkede smertetilstander gis opioider av varierende styrke. Dersom smerten i all hovedsak er bevegelsesutløst, kan man forsøke NSAIDs istedenfor paracetamol. Tricykliske antidepressiva, gabapentin eller epidural morfin kan også forsøkes dersom smertene har neurogent opphav <sup>13</sup>.

Skjelettsmerter behandles effektivt med strålebehandling, og effekten er veldokumentert <sup>13</sup>.

## **Aktivering av androgen reseptor (AR) i hormonrefraktær prostatakreft**

Det er foreslått flere mekanismer for hvordan prostatakreftcellene unnslipper androgen blokkade og oppnår fortsatt vekst selv med kastrasjonsnivåer av testosteron i serum.

AR er vist å være uttrykt i alle varianter av prostatacancer, inkludert hormonrefraktære tumorer<sup>30</sup>. Det er derfor postulert at aktivering av AR fortsetter å være viktig for prostatacellenes vekst og deling, selv etter at kastrasjonsnivåer av testosteron er oppnådd<sup>28</sup>.

Det er postulert flere mekanismer for hvordan AR kan bidra til at kreftcellene blir hormonrefraktære<sup>27</sup>:

- **Økt uttrykk av AR- genet** Dette vil føre til at cellene evner å respondere på svært lave androgenkonsentrasjoner, tilsvarende konsentrasjonen ved kastrasjonsnivå. En mekanisme bak dette kan blant annet være at økt uttrykk av AR gir økt ligandbinding. Økt AR- uttrykk kan skyldes genamplifikasjon; enten som følge av mutasjoner, eller av seleksjon av de cellene i et androgendeprivert miljø som uttrykker mest AR. Enkelte studier har vist at hormonrefraktære tumorer har økt ekspresjon av AR i forhold til hormonavhengige tumorer. Funnet av at androgen- uavhengige celler kan vokse med 80 % lavere androgennivå i vekstmediet enn hva androgenavhengige celler kan<sup>31</sup>, støtter hypotesen om at økt uttrykk av AR bidrar til hormonuavhengighet.
- **Mutasjoner i AR- genet** De fleste mutasjoner som er påvist, befinner seg i reseptorens ligandbindende domene. Dette kan føre til endret ligandspesifisitet, slik at reseptoren vil aktiveres også av nonandrogene steroidmolekyler. I noen tilfeller vil mutasjoner kunne føre til at reseptoren også aktiveres av antiandrogener, noe som vil bidra til resistens mot denne behandlingsformen.
- **Økt produksjon av androgener** Prostatacellene selv antas å kunne bidra til økt androgenproduksjon. Dette foregår sannsynligvis ved at de øker hastigheten på omdanning av testosteron til DHT ved å øke aktiviteten til enzymet 5 $\alpha$ -reduktase. Denne hypotesen støttes av flere studier:
  - Etniske grupper med høy forekomst av prostatakreft har høyere nivåer av 5 $\alpha$ -reduktase aktivitet
  - Ved kastrasjonsbehandling reduseres serumtestosteron med opptil 95 %, mens nivåene av DHT i prostatavevet synker med kun 60 %
  - Det er påvist at gener involvert i steroid-biosyntesen er overuttrykt i tilbakevendende prostatatumorer
- **Liganduavhengig aktivering av AR** Studier har funnet at aktivering av signaler nedstrøms for AR kan aktiveres selv uten ligandbinding til AR. Dermed blir kreftcellenes vekst uavhengig av androgen kontroll. Blant annet er det vist at flere vekstfaktorer, inkludert IGF-1 og EGF, samt flere cytokiner, kan gi opphav til fosforylert og aktivert AR. B-2 adrenerg reseptor er også funnet å kunne aktivere AR<sup>32</sup>.

- **Endringer i balansen mellom koaktivatorer og korepressorer** Det er identifisert flere koaktivatorer og korepressorer som er involvert i reguleringen av AR- drevet transkripsjon. Det er blant annet funnet en økning av koaktivatorer i androgen- uavhengig sykdom. Koaktiverende proteiner er vist å øke ARs respons på alternative ligander, øke ARs sensitivitet for lave androgennivåer, samt åpne for ligand- uavhengig AR aktivering.

Det er også mulig at kreftcellene utvikler mekanismer for å forbigå AR- signalveien fullstendig. Den best kjente mekanismen for dette involverer apoptosemodulering: i hormonavhengige celler vil androgen deprivasjon føre til apoptose i cellene, mens det i androgen- uavhengige celler er funnet en oppregulering av antiapoptotiske molekyler<sup>27</sup>. En annen mulig mekanisme for omgåelse av AR- signalveien, er neuroendokrin differensiering av prostatakreftcellene<sup>26</sup>. Neuroendokrine celler har en lavere proliferasjonshastighet, noe som gir cellene økt overlevelse ved behandling med kjemoterapeutika, endokrine stoffer og stråleterapi. I tillegg skiller neuroendokrine celler ut neuropeptider som serotonin og bombesin, og bidrar på denne måten til økt proliferasjon hos nærliggende kreftceller<sup>26</sup>. Det er vist økt forekomst av neuroendokrine prostatakreftceller i hormonrefraktære tumorer sammenliknet med hormonfølsomme tumorer<sup>26</sup>. Dette har medført at forekomsten av neuroendokrine celler forbindes med dårligere prognose.

### 3.3 ErbB-familien

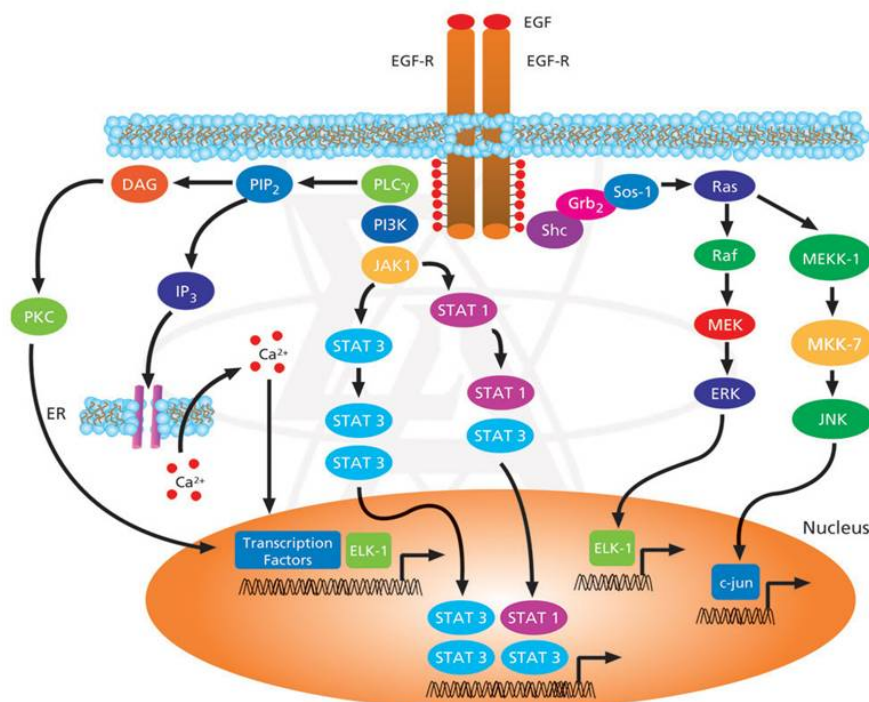
Epidermal vekstfaktor- reseptorfamilien er vist å spille en rolle i flere humane kreftformer<sup>33</sup>. Familien er en underklasse av gruppen tyrosin kinase- reseptorer, og inkluderer til sammen fire reseptorer: EGFR, erbB2/HER2/neu, erbB3/HER3 og erbB4/HER4<sup>34</sup>. Disse proteinene er uttrykt i både humant og animalsk vev, hovedsakelig i epitelceller og i celler av neuroendokrin natur<sup>35</sup>.

Reseptorene er transmembrane proteiner, og aktiveres ved at en ligand bindes til det ekstracellulære domenet. Ligandbinding gir endret konformasjon av det intracellulære domenet, og fører til at reseptorene danner homo- eller heterodimerer. Samtidig aktiveres det intracellulære tyrosin kinase- domenet. Aktivering fører til fosforylering av spesifikke tyrosinresiduer, slik at disse kan fungere som docking sites for proteiner med Src- homologi (SH2) og fosfotyrosin bindings seter (PTB). Rekruttering av slike proteiner fører til aktivering av intracellulære signalveier, blant annet Ras/Raf/MAPK- signalveien, PI3K/Akt-

signalveien og phospholipase C $\gamma$ - signalveien<sup>33;34</sup>. Flere av disse signalveiene kan initiere prosesser som gir tumorvekst; blant annet genekspressjon, proliferasjon, angiogenese og redusert apoptose<sup>36</sup>.

### 3.3.1 Ras/Raf/MAPK- signalveien

Den økte tyrosin kinase- aktiviteten til EGFR som følge av ligandbinding fører blant annet til rekruttering av adaptorproteinene vekstfaktor- reseptorbundet protein 2 (GRB2) og SOS. Rekruttering av disse adaptorproteinene fører igjen til aktivering av G- proteinene RAS og RAF<sup>37</sup>. Aktivering av RAF-1 vil i sin tur, via flere intermediære kinaser, føre til fosforylering og aktivering av MAP kinasene ERK-1 og ERK-2. ERK 1 og 2 vil translokere til cellekjernen, der de fosforylerer nukleære transkripsjonsfaktorer og dermed fører til endret genekspressjon<sup>38</sup> (figur 3.4).



*Figur 3.4: Skjematisk oversikt over ulike intracellulære signalveier som initieres av aktivert EGFR. Bildet er hentet fra [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)<sup>39</sup>.*



### 3.3.2 PI3K/Akt- signalveien

Ligandbinding til EGFR og andre tyrosin kinase- reseptorer kan også føre til fosforylering av phosphatidylinositol 3- kinase (PI3-K). En underklasse av PI3-K, klasse I PI3-K, fosforylerer phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), slik at det blir dannet phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> fungerer som et forankringssted for proteiner som innehar et pleckstrin- homologi (PH) domene, slik som for eksempel Akt og phosphoinositide- avhengig protein kinase- 1 (PDK-1)<sup>40</sup>. PDK-1 kan så fosforylere Akt, som er postulert å kunne fosforylere over 9000 intracellulære proteiner. Akt synes derfor å være en viktig bidragsyter til kontroll av cellevekst og celleproliferasjon<sup>40</sup>.

### 3.3.3 Fosfolipase C $\gamma$ - signalveien

Fosfolipase C $\gamma$  interagerer direkte med aktivert EGFR, og hydrolyserer PIP<sub>2</sub> til inositol 1,3,5- triphosphate (IP<sub>3</sub>) og 1,2 diacylglycerol (DAG)<sup>34</sup>. IP<sub>3</sub> er viktig for reguleringen av intracellulært kalsiumutslipp, og DAG fungerer som en kofaktor for aktivering av protein kinase C. Aktivering av protein kinase C kan i sin tur resultere i aktivering av MAPK<sup>34</sup>.

### 3.3.4 Ligander til ErbB-familien

Ligandene til reseptorene i denne familien kan deles inn i tre grupper, etter hvilke reseptorer de bindes til<sup>33</sup>:

1. EGF, TGF- $\alpha$  og amfiregulin (AREG): Bindes selektivt til EGFR
2. Betacellulin, HB-EGF og epiregulin: Bindes både til EGFR og til ErbB4
3. Neureguliner (NRG<sub>er</sub>), kan deles inn i to subgrupper:
  - a. NRG1 og NRG2: bindes til både ErbB3 og ErbB4
  - b. NRG3 og NRG4: bindes kun til ErbB4.

Hvilken ligand som bindes til ErbB- reseptorene kan være av betydning for videre signalering inn i cellen. Dette kan blant annet skyldes ulik stabilitet av ulike ligand- reseptor kompleks<sup>33</sup>.

### 3.3.5 ErbB- reseptorer i prostatakraft

Det er vist overekspresjon av både EGFR og ErbB3 i prostatakraft<sup>41</sup>. Harper et al. fant i 1998 at EGFR var kraftig uttrykt i premaligne lesjoner med høy PIN (prostatic interepithelial neoplasia)- verdi<sup>42</sup>. Androgenuavhengige prostatakraftceller har dessuten høyere ekspresjon av EGFR enn hva androgenavhengige kreftceller har<sup>43</sup>. Dette kan tyde på at EGFR- aktivering og – signalering spiller en rolle ved utviklingen av androgenuavhengig prostatakraft. Overekspresjon av reseptoren Her2/neu er vist å føre til aktivering av AR- signalveien, og bidrar på denne måten til prostatakraftcellenes overlevelse i et androgendeprivert miljø<sup>44</sup>.

### 3.3.6 Terapi rettet mot ErbB- familien

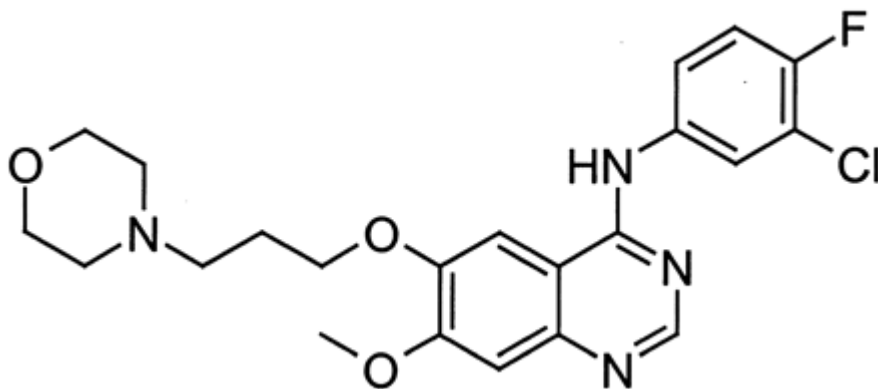
Med bakgrunn i ErbB- familiens antatte rolle i kreftutvikling er det rettet mye fokus mot å utvikle legemidler rettet mot EGFR og andre medlemmer i ErbB- familien. Håpet er at man ved å hemme deres signalveier kan redusere kreftcellenes vekst, proliferasjon og angiogenese, samt øke apoptoseraten.

Det er flere strategier som kan benyttes for å utnytte tyrosin- kinase reseptorene som legemiddeltarget, blant annet<sup>45</sup>:

- Monoklonale antistoffer, rettet mot det ekstracellulære domenet. Disse opptar bindingssetet og hindrer på denne måten ligandbinding til reseptoren. Et eksempel er trastuzumab, et antistoff rettet mot HER2<sup>46</sup>.
- Tyrosinkinase- hemmere, som bindes til det intracellulære ATP- bindende setet i reseptorene. Dermed vil ikke reseptorene kunne aktiveres, slik at signaloverføring innover i cellene forhindres. Gefitinib er en slik tyrosinkinase- hemmer<sup>47</sup>.
- Toksinkonjugater, der man forsøker å binde et toksin til ligander som er spesifikke for reseptoren. På denne måten ønsker man å oppnå spesifikk apoptose i kreftcellene.
- Antisense- behandling, som benytter seg av korte enkeltrådede DNA- fragmenter som bindes til sekvenser i det genet man ønsker å stilne. På denne måten kan genet for reseptoren skrues av, slik at reseptorproteinene ikke uttrykkes. Denne typen behandling er ennå ikke tatt i klinisk bruk.

### 3.4 Iressa®

Iressa® (gefitinib, ZD1839) er et lavmolekylært syntetisk anilinoquinazolin<sup>37</sup> (figur 3.5). Legemiddelet har god biologisk tilgjengelighet, og er effektivt ved oralt inntak<sup>48</sup>.



**Figur 3.5: Kjemisk strukturformel for Iressa® (gefitinib, ZD1839).** Figuren er hentet fra Report from the FDA: United States Food and Drug Administration Drug Approval Summary; Gefitinib (ZD1839; Iressa) Tablets<sup>49</sup>.

Iressa® er en non- kompetitiv tyrosinkinase- hemmer, som bindes til det ATP- bindende setet i reseptorens katalytiske domene<sup>50</sup>. Legemiddelet har vist relativt selektiv aktivitet rettet mot EGFR med en IC<sub>50</sub> på 0,04-0,079 µM. Iressa® har også en potensielt hemmende effekt rettet mot reseptoren HER2, men da i betydelig høyere konsentrasjon, med en IC<sub>50</sub> på 1,2-3,7 µM<sup>51</sup>. *In vivo*- studier har vist at Iressa® reduserer celleproliferasjon, induserer cellesyklus- arrest, øker apoptose og viser antiangiogene effekter i en rekke humane kreftformer<sup>36</sup>. Legemiddelet er per i dag godkjent som behandling av avansert ikke-småcellet lungecancer (NSCLC) i flere land, deriblant USA og Japan<sup>37</sup>.

Iressa® er vist å være et godt tolerert legemiddel, og de vanligste bivirkningene består av diarè, hudutslett og kvalme.<sup>52</sup>

#### 3.4.1 Effekter av Iressa® i prostatakreft

Studier i prostatacellelinjer har vist en tydelig effekt av Iressa® *in vitro*. Vicentini et al.<sup>53</sup> viste i 2003 at EGFR var tilstede, og fosforylert, i alle cellelinjene de studerte. Dette inkluderte både androgenavhengige og – uavhengige cellelinjer. Videre fant de at Iressa® hemmet EGFR fosforylering i alle cellelinjene, med en IC<sub>50</sub>-verdi på 0,46- 0,97 µM. Denne

og flere andre studier har konkludert med at Iressa® hemmer EGFR i både androgenavhengige og – uavhengige prostatakreftcellerlinjer, samt at legemiddelet hindrer celledeling ved å blokkere cellenes vekst i G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- fasen av cellyklus <sup>36</sup>.

I Norge er det ved Aker Universitetssykehus utført en klinisk fase II- studie på effektene av Iressa® i kombinasjon med antiandrogenet Casodex® i prostatakraft. Resultatene herfra er per mai 2008 ikke ferdig analysert.

### *Identifisering av respondenter på Iressa®*

Da Iressa® ble utviklet, var det store forventninger til legemiddelets effekt ved behandling av flere kreftformer. Studier har imidlertid vist at det er et tydelig behov for å kunne forutsi hvilke pasienter som vil respondere på behandlingen <sup>37;54</sup>. I kreftformen avansert ikke-småcellet lungecancer (NSCLC) er det foreslått at EGFR- liganden AREG kan være en prediktiv markør for feilsått behandling med Iressa®.

### **AREG**

AREG er en av ligandene til EGFR. Liganden viser lavere affinitet til reseptoren enn hva blant annet EGF gjør <sup>55</sup>.

Kakiuchi et al. fant i 2004 at amfiregulin var oppregulert hos pasienter som ikke responderte på Iressa®- behandling, samt at AREG induerte gefitinib- resistens hos NSCLC- celler *in vitro* <sup>56</sup>.

I prostatakreftceller er det blant annet vist at ekspresjonen av amfiregulin er oppregulert i androgenuavhengige cellerlinjer <sup>57</sup>, hvilket tyder på at AREG kan være en bidragsyter til utviklingen av hormonrefraktær prostatakraft. Upubliserte data fra Urologisk

Forskningsinstitutt (UFI) ved Aker Universitetssykehus, identifiserer AREG som et av 400 androgenregulerte gener i den androgenfølsomme prostatakreftcellerlinjen LNCaP (funnet ved LIMMA- analyse, false discovery rate = 5 %).

### 3.5 Formål med oppgaven

På bakgrunn av behovet for å identifisere markører for ikke-respondere på Iressa®, er det ønskelig å undersøke hypotesen om at AREG kan være en slik markør. I tillegg er det ønskelig å se nærmere på hva som påvirker prostatakreftecellers ekspresjon av AREG.

Følgende søkes undersøkt:

- Konsentrasjonskurve for Iressa® i androgenfølsomme versus androgenuavhengige cellelinjer
- AREGs effekter på proliferasjon i androgenfølsomme versus androgenavhengige cellelinjer
- Sammenlikne AREGs effekter på proliferasjon med EGFs effekter
- AREGs innvirkning på Iressa®- konsentrasjonskurvene
- Undersøke hva som skjer med ekspresjonen av AREG dersom androgenfølsomme LNCaP- celler inkuberes i steroidfattig medium
- Undersøke hvilken effekt ulike substanser har på cellenes uttrykk av AREG mRNA

## 4. Materialer

### 4.1 Reagenser

<u>Reagens:</u>	<u>Produsent:</u>	<u>Katalognummer:</u>
<sup>3</sup> H- thymidin	Amersham, GE Healthcare	TRA 120
Albumin, bovine serum (BSA)	Sigma	Cas 9048-46-8
Amphiregulin	Sigma	A 7080
Antirabbit IgG	Jackson Immuno Research	111-035-003
Apo-transferrin (Apo-T)	Sigma	T2252
Bio-rad protein assay	Bio Rad Laboratories, Inc.	500-0006
d-Biotin	Sigma	B- 4639
DMEM/F12 (1:1)	Gibco, Invitrogen <sup>TM</sup>	31330-095
DMEM/F12 u/ fenolrødt	Gibco, Invitrogen <sup>TM</sup>	11039021
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma	E 9644
Foetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen <sup>TM</sup>	10270106
Halt <sup>TM</sup> Phosphatase Inhibitor Cocktail	Pierce Biotechnology, Inc.	78420
Halt <sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free	Pierce Biotechnology, Inc.	78415
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore	WBKLS0500
Insulin (fra bovin pancreas)	Sigma	Cas 11070-73-8
Insulin- like growth factor-1	Sigma	I 3769
Isopropanol/ 2-propanol	Fluka Biochemika/ Sigma	EC 2006617
Isoproterenol	Sigma	I-5627
Kaliumklorid (KCl) pro analysi	Sigma	P9333
Leptin	Sigma	L4146
Magic Mark XP Western Standard	Invitrogen <sup>TM</sup>	LC5602
Methanol	VWR International	EC 200-659-6
Microscint <sup>TM</sup> 0 High Efficiency LSC	PerkinElmer, Boston, MA	6013611
Natriumazid	Amersham Pharmacia Biotech UK	Cas 26628-22-8
Natriumklorid (NaCl) pro analysi	Merck	1.06404.1000
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel, 1,5 mm	Invitrogen <sup>TM</sup>	NP0335BOX
NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel, 1,5 mm x 10 wells	Invitrogen <sup>TM</sup>	NP0315BOX
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen <sup>TM</sup>	NP0008
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen <sup>TM</sup>	NP0006-1

NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen™	NP0001-02
PBS (phosphate Buffered Saline) tablets	Gibco	18912-014
Penicillin	AlpharmaPanPharma	Vnr 505503
Phospho- p44/42 MAPK	Cell Signaling	9101
QIAGEN Quantitect SYBR-green RTPCR kit	Qiagen	204245
R1881	Roussel UCLAF	
RPMI 1640 + L-glutamin	Gibco, Invitrogen™	21875-091
RPMI 1640 uten fenolrødt	Gibco, Invitrogen™	11835-105
NatriumSodium fluoride, SigmaUltra	Sigma	S 7920
Streptomycin	X-Gen Pharmaceuticals	NDC 398220706-2
T3 (3,5,3'-L-trijodthyronin)	Sigma	T-2277
Trizma® base, SigmaUltra	Sigma	T- 6791
TRIZol Reagent	Invitrogen™	15596-026
Trypsin	Sigma	T4799
Tween 20	Sigma	P 1379
UltraPURE™ Distilled Water, DNase and RNase free	Gibco, InVitrogen™	1097703510977035

## 4.2 Løsninger

### 4.2.1 TBS-T

NaCl	80 g
KCl	2 g
Tris base	30 g
Tween	5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 10 liter

pH justeres til ca. 8.

### 4.2.2 RIPA- buffer

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

### 4.2.3 RIPA- buffer med fosfatase- og proteasehemmere

Rett før bruk tilsettes RIPA- bufferen (per ml)

Proteasehemmer (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free)	10 µl
Fosfatasehemmer (Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail)	10 µl

På grunn av kort holdbarhet må løsningen brukes umiddelbart etter tilsetning av fosfatase- og proteasehemmerne.

### 4.2.4 Transferbuffer

NuPAGE transferbuffer, 20 x	50 ml
Metanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1 liter



### 4.2.5 RPMI- medium

RPMI 1640 + L-glutamin tilsettes, per ml:

Penicillin	50 µg
Streptomycin	50 µg
FBS eller CSS	10 %

RPMI 1640 + L-glutamin inneholder fenolrødt som pH- indikator. Fargen endres fra rødlig ved høy pH til gulaktig når pH synker. Lavere pH i mediet tyder på redusert oksygeninnhold, og fargeendring brukes som en indikator på at cellene trenger mediumskift.

### 4.2.6 T- medium

DMEM/F12 (1:1) tilsettes, per ml:

Insulin	5 µg
T3	0,0136 ng
Apo- transferrin	5 µg
Biotin	0,25 µg
Adenin	25 µg
Streptomycin	50 µg
Penicillin	50 µg
FBS eller CSS	5 %

DMEM/F12- mediet inneholder fenolrødt som pH- indikator. Fargen endres fra rødlig til gulaktig når pH synker. Lavere pH i mediet tyder på redusert oksygeninnhold, og fargeendring brukes derfor som en indikator på at cellene trenger mediumskift.

### 4.2.7 Strippet serum (CSS)

I strippet serum er hydrofobe forbindelser fjernet ved hjelp av aktivt kull. Dette gjøres for å forhindre at steroider i serumet skal påvirke cellene under forsøk.

Først aktiveres 2,5 g kull i en buffer bestående av:

Dextran	0,0025 %
Tris- HCl	0,01M
dH <sub>2</sub> O	ad 1 liter

Aktivering fører til dannelse av porer i kullet overflate, noe som øker kullet overflateareal betraktelig. Den store overflaten sørger for at aktivert kull kan absorbere store mengder hydrofobe forbindelser.

Suspensjonen settes til røring ved 4 °C over natt, før det aktiverte kullet sentrifugeres i 10 minutter ved 3000 rpm. Supernatanten fjernes, og erstattes med 500 ml serum (FBS).

Blandingen får stå og rotere ved 4 °C i ca 12 timer. Under denne prosessen tiltrekker kullet de hydrofobe forbindelsene i serumet. Deretter sentrifugeres blandingen, og kullet synker til bunns. Supernatanten sterilfiltreres (porestørrelse 0,45 µm) ved hjelp av en vakuumpumpe, og fordeles i sterile rør à 50 ml. Det strippede serumet fryses ned og oppbevares ved – 20 °C.

Med denne metoden vil man ikke klare å fjerne steroider fullstendig. Likevel vil sluttkonsentrasjonen i medium tilsatt strippet serum tilsvare kastrasjonsnivåer av androgener *in vivo*, og det er dette det er ment å være en modell for. Vannløselige vekstfaktorer vil fremdeles være tilstede i serumet.

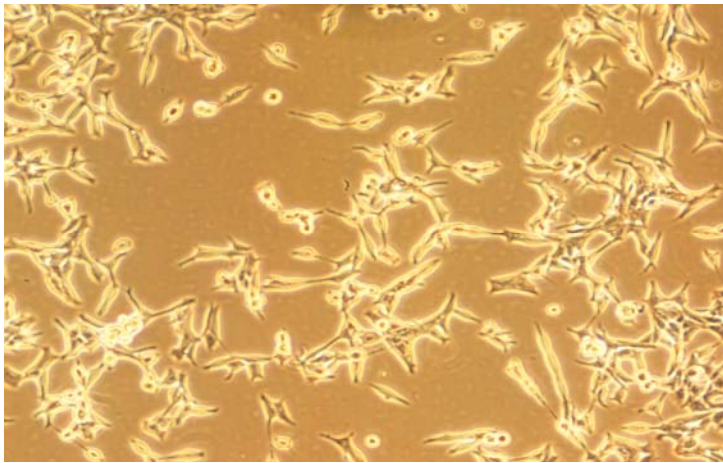
I denne oppgaven brukes betegnelsen CSS på medium tilsatt strippet serum. FBS brukes på samme måte som betegnelse på medium tilsatt vanlig serum, FBS.

## 4.3 Cellelinjer

### 4.3.1 LNCaP (Lymph Node Cancer Prostate) - celler

LNCaP cellene (figur 4.1) ble opprinnelig isolert i 1977, fra en 50 år gammel mann med bekreftet metastasert prostatacarcinom<sup>58;59</sup>. Cellene ble hentet ut ved nålbiopsi fra den venstre supraventrikulære lymfeknuten<sup>59</sup>. Cellene uttrykker høy-affinitets AR i cytosol og i cellekjernen, både i kultur og som xenograft. Cellemodellen er androgenresponsiv, og anses å være en god modell for androgenavhengig prostatakraft<sup>58;60</sup>. De responderer på 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron- stimulering med vekst og sur fosfatase produksjon<sup>59</sup>. Cellenes evne til å danne svulster ved injeksjon i forsøksdyr er opprettholdt, og utviklingen av tumorer er vist å korrelere med nivået av androgener i serum. Hvor hurtig tumorene vokser, er derimot uavhengig både av vertens kjønn og dens hormonelle status<sup>58</sup>.

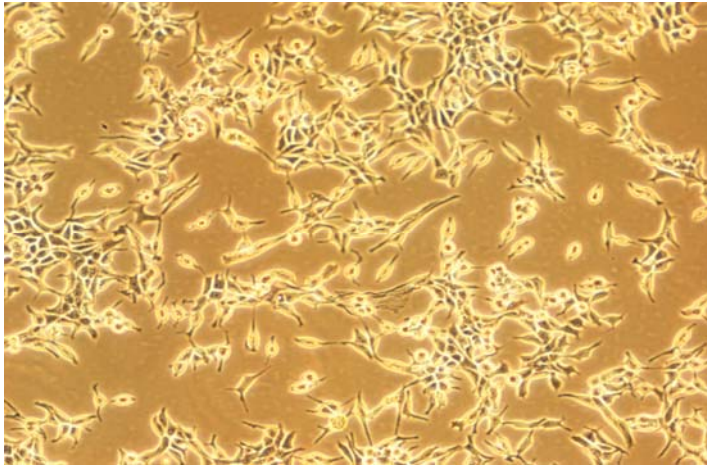
LNCaP-cellene vokser i RPMI – medium, som er beskrevet i punkt 4.2.5. I denne oppgaven er cellene brukt fra passasje 21 til passasje 34.



*Figur 4.1: LNCaP- celler i kultur*

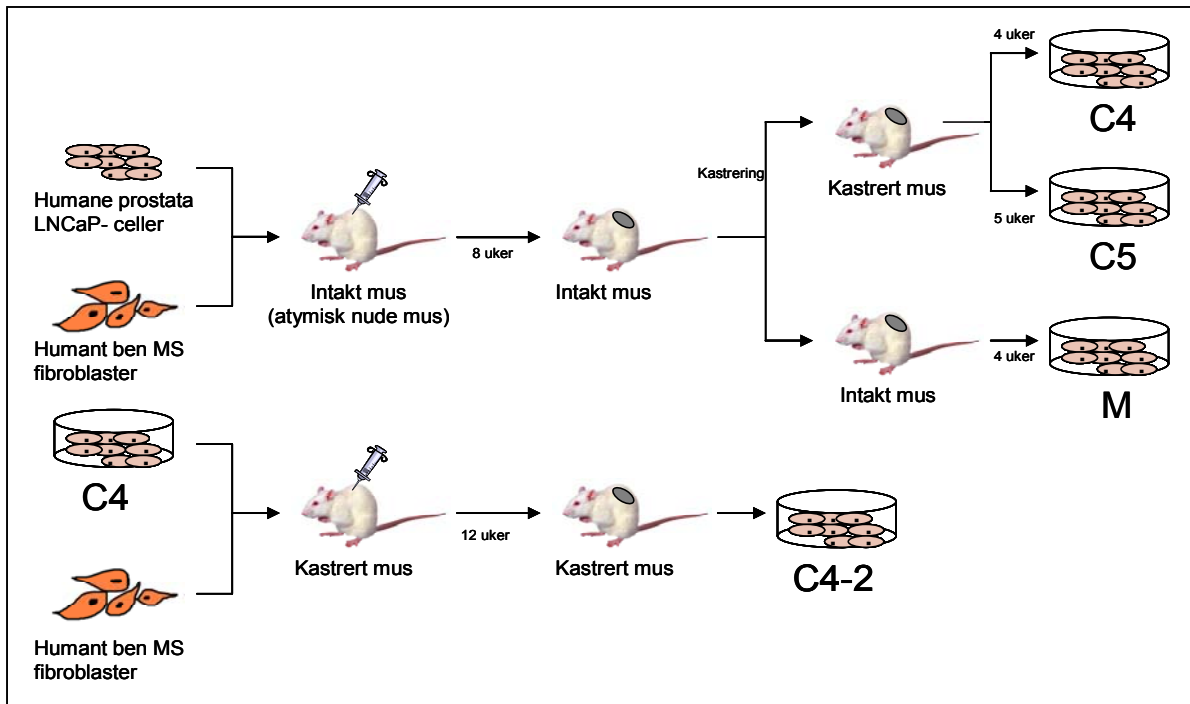
### 4.3.2 LNCaP C4-2- celler

LNCaP C4-2 cellene, eller C4-2 cellene (figur 4.2), er en andregenerasjons avledning av cellelinjen LNCaP.



*Figur 4.2: C4-2 celler i kultur*

Cellelinjen er gjort androgenuavhengig ved at LNCaP- celler ble koinjisert i mus sammen med den humane fibroblast cellelinjen MS. Etter 8 uker ble musene kastret, og tumorene fikk vokse i ytterligere 4 - 5 uker. Disse cellene er opphav til henholdsvis cellelinjene C4 og C5<sup>61</sup> (Figur 4.3). C4- cellene ble videre koinjisert sammen med MS celler inn i en kastert mus, og fikk vokse i ytterligere 12 uker<sup>61;62</sup>(Figur 4.3). Den resulterende cellelinjen, C4-2, har evnen til å danne tumorer ved injeksjon i kastrede mus selv uten MS-cellene, og til å danne kolonier selv når den sås ut i serumfritt medium. Cellelinjen anses derfor å være androgenuavhengig<sup>61;62</sup>.



**Figur 4.3:** Utvikling av den hormonrefraktære cellelinjen LNCaP C4-2. Tegningen er fritt etter et skjema hentet fra artikkelen "Androgen- independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer" <sup>62</sup>.

C4-2- cellene vokser i T-medium, som er beskrevet i punkt 4.2.6.

## 4.4 Primere

**Tabell 4.1:** Primersekvenser brukt i oppgaven

Primer	Left	Right
Amfiregulin	GAGCACCTGGAAGCAGTAACA	AACTACTGTCAATCATGCTGTGAGTTT
G6PDH	TGCATGAGCCAGATAGGC	ACAGGGAGGAGATGTGGTTG

Primerne er produsert av InVitrogen.

## 4.5 Utstyr

Immobilon PVDF transfer membranes

Microplate scintillation and luminescence counter (Packard)

ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.

NuPAGE blottekar

NuPAGE elektroforesekar

Opticon Monitor 3

Topcount, Packard Instrument, Perkin Elmer

Ultraspec 3300 (Amersham Biosciences)

## 5. Metoder

### 5.1 Celledyrking

Cellene oppbevares nedfrosset på flytende nitrogen, og tines opp ved behov. Tiningen foregår hurtigst mulig, ved at røret holdes i 37 °C vannbad til cellepelleten så vidt slipper kanten av oppbevaringsrøret. Deretter overføres cellene raskt til et 12 ml rør med 5 ml iskaldt vekstmedium tilsatt FBS og Pen/Strep. Cellesuspensjonen sentrifugeres så ved 2000 rpm i 5 minutter. Mediet fjernes, og cellepelleten resuspenderes i romtemperert vekstmedium. Cellene overføres til en 75 cm<sup>2</sup> Corning flaske og oppbevares i inkubatorskap som holder 37 °C, med 5 % CO<sub>2</sub>. Når cellene har festet seg til flasken, vanligvis etter 3 dager, skiftes mediet cellene er inkubert i. Dette gjøres deretter annenhver dag, og cellene splittes en gang per uke.

### 5.2 Proteinekstraksjon

#### 5.2.1 Cellestimulering til proteinekstraksjon

800 000 celler sås ut i 10 cm Corning skåler. De får vokse i tre døgn i FBS, før mediet skiftes ut med CSS. Cellene overføres til CSS for på denne måten å unngå påvirkning fra androgener i mediet mens forsøket pågår. En celleskål fortsetter i FBS som kontroll. Når cellene har gått i CSS i ca ett døgn, stimuleres cellene med de aktuelle forbindelsene.

#### 5.2.2 Høsting av proteiner

Cellene høstes når de har blitt stimulert i et bestemt antall minutter. Mediet i skålene suges av, og cellene vaskes to ganger i kald PBS. Deretter spyles cellene løs med PBS, og overføres til 12 ml sentrifugerør. Cellene sentrifugeres i kjølesentrifuge ved 2000 rpm og 4 °C i 5 minutter. Supernatanten fjernes. RIPA- buffer med fosfatase - og proteasehemmere tilsettes cellepelleten, og suspensjonen pipetteres opp og ned noen ganger for å sikre jevn suspensjon. Cellesuspensjonen snurres så i rotator i 30 minutter ved 4 °C. Dette fører til

ødeleggelse av cellene, slik at proteinene frigis og løses i RIPA bufferen. Når denne prosessen er ferdig sentrifugeres prøvene i kjølesentrifuge i 20 minutter, ved 12 000 rpm og 4 °C. Uløst materiale vil sementere og danne en pellet, og proteinene vil være å finne i supernatanten.

### 5.2.3 Proteinmåling

Til proteinmåling benyttes et spektrofotometer av typen Ultrospec 3300 pro UV/ Visible spectrophotometer (Amersham Biosciences). Kittet som brukes er Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate. Bakgrunnen for metoden er at fargeløsningen Coomassie® Brilliant Blue G-250 endrer sitt absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm når den bindes til proteiner.<sup>63</sup> Fargen og absorbansen i den endelige løsningen vil variere med proteinkonsentrasjonen i prøven. Absorbansen til prøven måles ved 595 nm, og absorbansen er direkte proporsjonal med proteinkonsentrasjonen innenfor et begrenset konsentrasjonsområde. Bakgrunn for omregningen fra absorbans til proteinkonsentrasjon er Beers lov, som sier at lysabsorpsjonen til en prøve er proporsjonal med konsentrasjonen av stoff i prøven.

Før konsentrasjonen i proteinprøvene kan måles, må det settes opp en standardkurve med kjente proteinkonsentrasjoner. Til dette brukes en løsning av BSA (bovine serum albumin). BSA tilsettes i konsentrasjoner fra 1 mg/ml til 10 mg/ml, da dette antas å dekke prøvenes konsentrasjonsområde. Ut fra den resulterende standardkurven beregnes proteinkonsentrasjonen i prøvene.

Prøveopparbeidelsen foregår ved at man tilsetter følgende i et eppendorfrør:

- 3 µl RIPA- buffer med protease - og fosfatasehemmere
- 1 µl proteinekstrakt
- 790 µl dH<sub>2</sub>O
- 200 µl Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

Prøven vortexes i noen sekunder for å sikre jevn fordeling av farge og protein. Etter 5 minutters inkubering i romtemperatur vortexes prøven på nytt, før den overføres til en kyvette og målingen kan begynne. Den første prøven skal være blank, da apparatet automatisk setter den første målingen til 0 mg/ml.



## 5.3 Westernblott

### 5.3.1 Prinsipp

Westernblotting er en metode for å detektere tilstedeværelsen til, eller relative mengder av, spesifikke proteiner i en prøve.

Den sterke anioniske detergenten Lauryl dodecyl sulfat (LDS) brukes i kombinasjon med et reduksjonsmiddel og varme for å dissosiere proteiner før de appliseres på gel. Bundet til Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) blir denaturerte polypeptider negativt ladet, og under elektroforese vandrer de gjennom gelen i overensstemmelse med sin størrelse. Standarder med kjent molekylvekt kjøres på gelen for å kunne si noe om molekylvekten og mobiliteten til det proteinet som studeres. Etter gelelektroforese benyttes strøm for å overføre proteinene til en proteinbindende membran, hvor de senere kan detekteres ved bruk av antistoff spesifikt rettet mot målproteinene<sup>64,65</sup>. Et sekundærtantistoff festet til enzymet horseradish peroxidase (HRP) bindes til primærtantistoffet. Under fremkalling vil dette enzymet katalysere produksjonen av peroksider i fremkallingsvæsken, noe som resulterer i utsending av synlig lys<sup>66</sup>. Utsendt lys kan detekteres ved hjelp av et CCD- kamera.

### 5.3.2 Prøveopparbeidelse

Proteinekstrakt tilsvarende 50 µg tilsettes buffer (i denne oppgaven er RIPA buffer med fosfatase – og proteasehemmere benyttet) ad 20 µl. I tillegg tilsettes 6,3 µl NuPAGE® Sample Buffer. Samplebufferen inneholder glyserol som øker blandingens viskositet, slik at den synker til bunns i brønnen på gelen ved applisering.

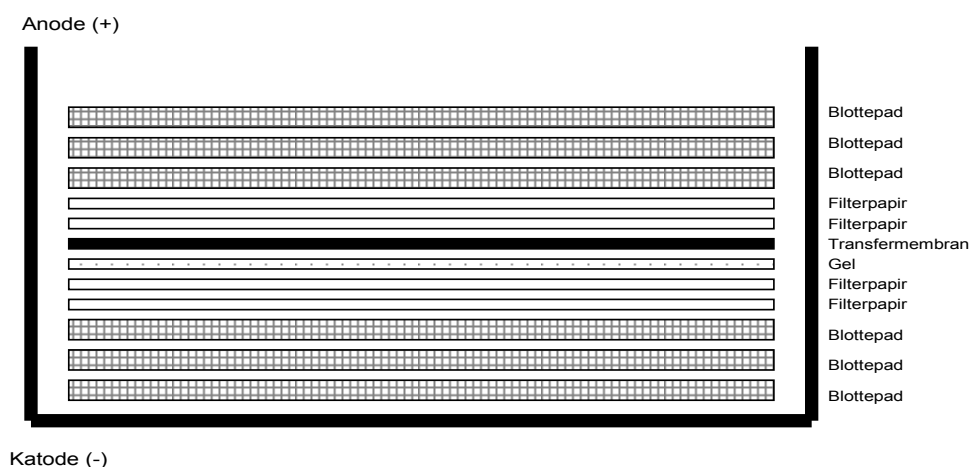
Før applisering på gel kokes blandingen i fem minutter ved 95 °C for å denaturere proteinene. Samplebufferen inneholder LDS, som bindes til proteinene. De resulterende LDS- proteinkomplekser med negativ ladning vil vandre mot den positive anoden under elektroforesen. Da proteinene nå er denaturert og kapslet inn i LDS, vil mobiliteten i hovedsak være bestemt av proteinenes molekylvekt og ikke av deres struktur.

### 5.3.3 Elektroforese

Gelen settes oppi karet, og karet fylles opp med NuPAGE SDS running buffer. I den første brønnen på gelen tilsettes 3  $\mu$ l MagicMark. Dette er en løsning av flere proteiner med ulik og kjent molekylmasse, som fungerer som en molekylvekts- standard for proteinprøvene. I de neste brønnene appliseres prøvene; 26  $\mu$ l av hver prøve. Strømmen over elektroforesekaret settes på 200 V, og proteinene vandrer nedover gelen mot anoden. SDS i bufferen bidrar til å holde proteinene denaturert, slik at separasjonen kun foregår på bakgrunn av proteinenes størrelse. Proteinene får vandre til den blå fargefronten fra samplebufferen når enden av gelen.

### 5.3.4 Overføring til membran

Når proteinene er separert på gelen, overføres de til en polyvinyliden fluorid (PVDF) membran. Til dette benyttes en NuPAGE® blottemodul. Først aktiveres membranen ett minutt i metanol. Deretter legges den i transferbuffer sammen med blottepad og filterpapir. Når alt er tilstrekkelig fuktet, legges blottepads, filterpapir, gel og membran ned i blottemodulen som vist på figur 5.1. Blottemodulen settes ned i NuPAGE® karet, og fylles opp med transferbuffer. Utenfor fylles karet opp med dH<sub>2</sub>O for å redusere temperaturstigning som følge av spenningen i karet. Strømmen settes på 35 V, og i løpet av en time vil de negativt ladde proteinene overføres til membranen, som ligger nærmest anoden. Membranen har egenskaper som gjør at den binder proteiner uspesifikt, slik at alle proteiner fra prøvene festes til membranens overflate under prosessen.



*Figur 5.1: Oppsett av blottepads, filterpapir, transfermembran og gel under proteinoverføring*

### 5.3.5 Inkubering med antistoff

Etter at proteinene er overført til PVDF- membran, blokkes membranen med en 5 % tørrmelksløsning i TBS-T. Karet med membranen og tørrmelksløsningen settes til vipping i to timer i romtemperatur. Proteinene i melken vil nå bindes til ledige bindings seter på membranen, og slik forhindre uspesifikk binding av antistoff. Etter blokking vaskes membranen i 3x5 minutter i TBS-T, før primærantistoffet tilsettes. Primærantistoffet fortynnes til optimal konsentrasjon i oppgitt løsning. I denne oppgaven er det benyttet antistoff rettet mot pERK, fortynnet 1:1000 i en 5 % BSA- løsning i TBS-T. Membranen settes til vipping ved 4 °C med antistoffløsningen over natt. Dag 2 vaskes membranen på nytt i 3x5 minutter med TBS-T. Deretter legges membranen over i en løsning med sekundærantistoff (fortynnet 1:10000 i TBS-T), og settes til vipping i én time i romtemperatur. Før membranen er klar til fremkalling må den vaskes nok en gang i 3x5 minutter i TBS-T for å fjerne ubundet sekundærantistoff.

### 5.3.6 Fremkalling og deteksjon

Membranen inkuberes i 5 minutter med Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). De to reagensene i kittet blandes 1:1 rett før bruk. Etter inkubering er membranen klar for fotografering med et CCD-kamera. Lukkertiden som er benyttet i denne oppgaven er 5 minutter, da dette er funnet å være optimalt for forholdet mellom signal og bakgrunn på bildet.

### 5.3.7 Loadingkontroll

Etter fremkallingen foretas en loadingkontroll for å kontrollere at applisert mengde av protein i hver enkelt brønn har vært lik. Det tilsettes primærantistoff mot et protein som antas å ha lik mengde i ekstrakter fra stimulerte og ustimulerte celler. I denne oppgaven er  $\alpha$ -tubulin, en byggestein i cellenes mikrotubuli, brukt som loadingkontroll (fortynnet 1:1000 i 5 % tørrmelksløsning i TBS-T).

## 5.4 RNA- ekstraksjon

### 5.4.1 Cellestimulering til RNA-ekstraksjon

150 000 celler sås ut i brønner på Corning 6- brønnsplater, med diameter 3,5 cm. Tre dager etter utsåing skiftes mediet på cellene til CSS. Dette gjøres for å unngå at steroidhormoner og andre hydrofobe forbindelser fra serumet skal påvirke cellenes mRNA nivåer. Cellene går i CSS i ett døgn før cellene stimuleres. Etter stimulering kultiveres cellene i ytterligere ett døgn før de høstes med Trizol.

### 5.4.2 RNA- høsting med Trizol

RNA- høsting er blitt utført etter protokoll fra InVitrogen Life Sciences <sup>67</sup>.

Cellene vaskes først med 1 ml kald PBS. Deretter tilsettes 1 ml trizol til hver brønn med celler. Trizol er en mono-fasisk løsning av fenol og guanidin isothiocyanat, og sørger for at RNAets struktur beholdes når cellemembraner og cellekomponenter brytes ned. Cellene skrapes løs, og blandingen overføres til eppendorfrør. Rørene inkuberes i romtemperatur i 5 minutter, før 200 µl kloroform tilsettes hver prøve. Kloroform sørger for god separasjon av fettfasen og vannfasen i løsningen. Prøvene vortexes for å oppnå en jevn suspensjon, før de inkuberes i romtemperatur i ytterligere 3 minutter. Når de to fasene så vidt har skilt seg, sentrifugeres prøvene i 15 minutter ved 12 000 rpm og 4 °C. Denne prosessen sørger for at de to fasene separeres fullstendig. RNA blir å finne i vannfasen, som vil ligge øverst.

Supernatanten overføres til et nytt eppendorfrør, og tilsettes 0,5 ml isopropanol. Dette sørger for utfelling av RNA. Blandingen vendes noen få ganger, før den inkuberes i romtemperatur i 10 minutter. Blandingen sentrifugeres på nytt i 10 minutter ved 12 000 rpm og 4 °C. Nå vil RNA gjenfinnes som pellet i bunnen av røret. Supernatanten fjernes, og 1 ml etanol 70% tilsettes. Prøvene vortexes, og sentrifugeres i 5 minutter ved 12 000 rpm og 4 °C. Etanolen fjernes, og RNA- pelleten tørkes i 10-20 minutter i romtemperatur til den er glassklar. Deretter løses pelleten i RNase- fritt vann. RNA og RNase-fritt vann inkuberes i romtemperatur i 30 minutter, for å sikre at RNA er fullstendig løst. RNA-ekstraktet er deretter klart til konsentrasjonsmåling, og kan siden oppbevares ved -80 °C.

### 5.4.3 RNA- måling med NanoDrop (type ND-1000)

Til dette brukes et spektrofotometer av typen ND-1000 (NanoDrop Technologies). 1 µl RNA- ekstrakt pipetteres ut på enden av en optisk fiber- kabel. En annen optisk fiber- kabel bringes i kontakt med prøven, slik at prøven fungerer som en bro mellom de to optiske fibrene. Absorbansen i prøven måles ved bruk av en xenonlampe som lyskilde, og prøvens RNA- konsentrasjon kalkuleres i henhold til Beers lov <sup>68</sup>.

## 5.5 Ett- trinns real-time RT-PCR

### 5.5.1 Prinsipp

PCR (polymerase kjedereaksjon) er en molekylærbiologisk metode for å oppamplifisere mange kopier av ett enkelt DNA- molekyl. Metoden baserer seg på enzymet DNA- polymerase, et enzym som katalyserer polymeriseringen av baser i DNA- tråden. DNA- polymerasen er avhengig av en komplementær tråd (templat) og av en startsekvens (primer) for å kunne replikere DNA. Den nye tråden som blir dannet blir komplementær til templat- tråden.

I RT-PCR (revers transcriptase- PCR) tilsettes enzymet revers transkriptase, et enzym som har evnen til å oversette mRNA- sekvenser til cDNA- sekvenser. Deretter kan PCR- reaksjonen foregå som normalt. Denne metoden gir mulighet for å sammenlikne RNA- uttrykk i flere prøver. I denne oppgaven er teknikken brukt for å se på hvordan ulike stimuleringer av celler påvirker genekspressjon på mRNA- nivå.

### 5.5.2 Komponenter i RT- PCR

#### *DNA- templat*

DNA- templatet er den gensekvensen man ønsker å få oppamplifisert. I prinsippet holder det med en enkelt kopi av denne DNA- sekvensen.

### *DNA- polymerase*

DNA- polymerase enzymet katalyserer replikasjonen av DNA. Enzymet er avhengig av et opprinnelig DNA- templat, og av at dette foreligger i enkelttrådet form. Polymerasen er også avhengig av en startsekvens som er komplementær til templattråden, en primer. Polymerasen adderer nukleotider til 3' OH- grupper, slik at primersekvensen forlenges i en bestemt retning langs templattråden.

### *Primere*

Primerne er forhåndsdesignede oligonukleotider på ca 20 basepar, som er komplementære til hver sin ende av den gensekvensen man ønsker å oppamplifisere. Primerne binder seg til hver sin komplementære tråd og fungerer som startsekvens for DNA- polymerase. De to primerne som brukes kalles 5' og 3' primer, forward og reverse primer eller left og right primer.

For at man skal få oppamplifisert den riktige gensekvensen er det viktig med god primerdesign. Man ønsker så spesifikke primere som mulig, slik at disse ikke bindes til andre sekvenser i genomet. Dessuten er det viktig at primerne ikke er komplementære til hverandre og at sekundærstrukturer ikke kan dannes internt i primerne, da man på denne måten vil kunne få oppamplifisert uspesifikke og uønskede DNA- sekvenser. Det finnes dataprogrammer som benyttes til primerdesign. Når man kjenner sekvensen av det genet man ønsker å analysere, legges dette inn i programmet, og programmet foreslår mulige primerpar som kan benyttes.

Primerne som er benyttet i denne oppgaven er designet slik at de ligger på hver sin side av en exon- intron overgang. Dette gjøres for å forhindre oppamplifisering av kontaminerende DNA. Ved transkripsjon av DNA vil exon-intron overganger spleises ut, slik at de resulterende RNA- sekvensene blir kortere enn de opprinnelige DNA-sekvensene. Disse RNA- sekvensene vil være av en passende lengde for amplifikasjon, mens eventuelle segmenter fra kontaminerende DNA i praksis vil være for lange til å oppamplifiseres ved de gitte PCR- betingelsene.

I denne oppgaven ble programmet Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) benyttet til primerdesign. Se tabell 4.1.

### *Buffer*

I hver enkelt RT-PCR-reaksjon er det viktig med korrekte betingelser for at revers transkriptase og DNA polymerase skal fungere optimalt. Bufferen sikrer optimale betingelser, og inneholder blant annet Tris-HCl, KCl og MgCl<sub>2</sub>.

### *Farge*

I real time RT-PCR kan man følge hvordan reaksjonen forløper, slik at man ikke bare baserer seg på sluttresultatet. Dette oppnås ved at det tilsettes en fluorescerende farge til reaksjonen. I denne oppgaven er fargen SYBR green I ® benyttet, en farge som inkorporeres i dobbelttrådet DNA og fluorescerer<sup>69</sup>. Mengden fluorescens er direkte proporsjonal med mengden cDNA i reaksjonen. Ved å måle fluorescensen fortløpende kan man dermed følge økningen av DNA- produkt i PCR- reaksjonen<sup>70</sup>.

### *Frie nukleotider*

For at DNA- polymerase skal kunne addere nukleotider til den voksende DNA- tråden, er polymerasen avhengig av et stort antall frie nukleotider. Derfor tilsettes frie nukleotider i et stort overskudd til reaksjonen.

Kitet QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) er benyttet til RT-PCR reaksjonene i denne oppgaven. Kitet inneholder enzymene Omniscript og Sensiscript revers transkriptaser, i tillegg til HotStarTaq DNA polymerase.

## **5.5.3 Prøveopparbeidelse**

Før tilsetning på RT-PCR platen lages en løsning av de ulike komponentene som trengs i reaksjonen. Ved tilsetning av løsningen til platen vil det bli følgende fordeling i hver brønn:

- 12,5 µl QuantiTect SYBR green 2X
- 1,25 µl 10 µM forward primer
- 1,25 µl 10 µM reverse primer
- 0,25 µl QuantiTect RT Mix
- 4,75 µl RNasefritt dH<sub>2</sub>O

Til hver brønn tilsettes også 250 ng RNA (5µl av løsning på 50 ng/µl).

---

Platen sentrifugeres lett før analysen settes i gang

### 5.5.4 RT-PCR reaksjonen

Selve reaksjonen består av følgende trinn:

1. Inkubering ved 50 °C i 30 minutter. 50 °C er optimal temperatur for revers transkribering, og man får dannet cDNA fra RNA.
2. Inkubering ved 94 °C i 15 minutter. Ved denne temperaturen vil revers transkriptasen inaktiveres, samtidig som DNA- polymerasen aktiveres
3. Inkubering ved 94 °C i 15 sekunder. Hydrogenbindinger i DNA- dobbelthelix brytes, og de to trådene separeres.
4. Inkubering ved 55 °C i 30 sekunder. Denne temperaturen ligger ca 5 °C over primerens smeltetemperatur, og primerene vil nå kunne binde seg til DNA- templatet.
5. Inkubering ved 72 °C i 30 sekunder. 72 °C er den optimale temperaturen for DNA- polymerase- enzymet. Den komplementære DNA- tråden syntetiseres.
6. Avlesning. Apparatet leser av fluorescensen fra SYBR green etter hver runde. På denne måten kan man følge reaksjonen underveis.
7. Reaksjonen (punkt 3-6) gjentas 39 ganger. Etter 40 runder vil DNA i teorien foreligge i  $2^{(40+1)}$  kopier (fordi man før første reaksjon allerede har to DNA- templatet).
8. Inkubering ved 72 °C i 5 minutter. Dette sikrer at DNA- polymerasen får tid til å ferdigstille eventuelle uferdige DNA- fragmenter.
9. Smeltepunktsanalyse. Dette gjøres for å kontrollere at det kun er dannet ett PCR- produkt. Dersom alt DNA som er oppamplifisert er av samme lengde, skal man kun få en topp på smeltekurven. Resultatet leses av automatisk av apparatet, ved hver 0,3 °C.
10. Inkubering ved 6 °C til reaksjonen stanses av operatør. Dette sikrer at det DNAet som er oppamplifisert ikke denaturerer.

Det at revers transkriptase inaktiveres ved samme temperatur som DNA- polymerase aktiveres, fører til at begge reaksjonene kan foregå i samme rør. Derav navnet ett- trinns RT-PCR.

### 5.5.5 Analyse av resultater

Som en kontroll på at primerne har virket som de skal, og at man kun har fått oppamplifisert ett enkelt genprodukt, foretas en smeltepunktsanalyse. Det skal kun være én topp i smeltepunktskurven, noe som tyder på at PCR- reaksjonen kun har dannet ett DNA- produkt.



---

Dersom det er flere topper i smeltepunktanalysen har ikke primerne fungert optimalt, og nye primere må designes.

Som et tillegg til smeltepunktanalysen kan man kjøre det oppamplifiserte DNA- produktet på gel, der DNA- fragmenter separeres etter størrelse. På den måten kan man sammenlikne med DNA- fragmenter av kjent størrelse, og på denne måten se om det er sannsynlig at rett produkt er oppamplifisert. Det ferdige produktet bør også sekvenseres, for å forsikre at reaksjonen har gitt korrekt PCR- produkt.

Analysering av resultatene har i denne oppgaven vært gjort ved hjelp av  $\Delta\Delta C_{(t)}$ - metoden.  $C_{(t)}$ - verdien til en prøve er det antall sykluser, eller runder, med DNA- amplifikasjon som må til for at fluorescensen skal nå en forhåndsbestemt terskelverdi. Mange DNA- molekyler i utgangsmaterialet vil kreve færre sykluser for å oppnå en bestemt fluorescens, og vil derfor gi en lav  $C_{(t)}$ - verdi.

For å ta høyde for mulige variasjoner i tilsatt mengde RNA/cDNA, analyseres mengden av et husholdningsgen i tillegg til det aktuelle målgenet. Uttrykket av husholdningsgenet antas å være upåvirket av ulike forsøksbetingelser, og kan dermed brukes som en normaliseringskontroll for de aktuelle prøvene. I denne oppgaven er det brukt glukose- 6- fosfat dehydrogenase (G6PDH), et enzym som deltar i Krebs' syklus (sitronsyresyklusen) i cellene.

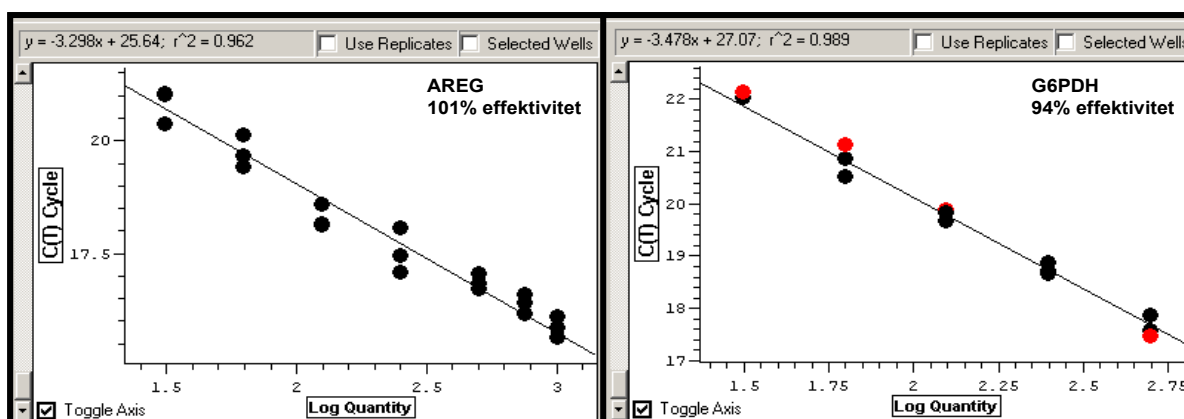
### *Relativ kvantifisering*

Når man ser på RNA- uttrykk, som i denne oppgaven, har man muligheten til å se på hvordan ulik behandling av celler fører til endret genekspressjon. Alle resultater i oppgaven er gjengitt som relative verdier i forhold til en kontroll. Celler som har gått i steroiddeprivert medium (CSS) er benyttet som kontroll i alle forsøkene.

Resultatene fra reaksjonen bearbeides i dataprogrammet Opticon Monitor 3. Programmet leser av fluorescensen for hver 0,3 °C, og bearbeider dataene slik at prøvenes  $C_{(t)}$ - verdier kan avleses.  $C_{(t)}$ - verdiene kan hentes ut og bearbeides videre, for eksempel i Microsoft Excel. Grunnen til at  $C_{(t)}$ - verdiene må bearbeides, er at  $C_{(t)}$ - verdiene er omvendt logaritmiske. Først trekker man fra  $C_{(t)}$ - verdien til husholdningsgenet (G6PDH), for å sørge for at alle  $C_{(t)}$ - verdiene er normalisert. Deretter trekker man fra den normaliserte  $C_{(t)}$ - verdien til kontrollen. Det er dette som blir  $\Delta\Delta C_{(t)}$ . For å få tallene over på normal form

(ikke- logaritmisk), benyttes formelen  $2^{-\Delta\Delta C(t)}$  for hver av prøvene. Kontrollen vil da få verdien 1, og alle de andre verdiene vil være relative til denne <sup>71</sup>.

For å forsikre seg om at denne formelen er gyldig i de aktuelle tilfellene, må det bevises at reaksjonene ved oppamplifisering av henholdsvis målgen og husholdningsgen har lik effektivitet <sup>72</sup>. Dette er et mål på om reaksjonen klarer å gi full uttelling for hver syklus, og dermed også en kontroll på om primerne fungerer som de skal ved de aktuelle betingelsene. For å regne ut de ulike reaksjonenes effektivitet ble det satt opp en standardkurve for hvert enkelt gen (figur 5.2). Effektiviteten kan regnes ut ved bruk av formelen  $E = 10^{-1/K} - 1$ , der E er effektiviteten og K er stigningstallet til standardkurven <sup>73</sup>. I teorien skal effektiviteten bli 1, eller 100 %, dersom antall DNA-kopier dobles effektivt ved hver syklus. Effektiviteten oppgis ofte som en prosentverdi, som regnes ut ved bruk av formelen  $E(\%) = E \times 100$ .



*Figur 5.2: Standardkurver for genene AREG og G6PDH Standardavviket mellom standardkurvenes effektivitet var 4.9, og ble ansett å være tilstrekkelig lite slik at  $\Delta\Delta C_{(t)}$ -metoden kunne benyttes.*

## 5.6 <sup>3</sup>H- tymidin inkorporeringsassay

### 5.6.1 Prinsipp

I et <sup>3</sup>H-tymidin inkorporeringsassay undersøkes cellenes vekst- og proliferasjonshastighet ved bruk av tymidin merket med den radioaktive isotopen <sup>3</sup>H. Tymidin er en forløper til basen tymin, en av de fire basene som inngår i DNA- molekylet. Når cellene replikerer sitt DNA, vil <sup>3</sup>H- tymidin inkorporeres i DNA-tråden. På denne måten vil mengden inkorporert <sup>3</sup>H- tymidin i cellene bli et mål på hvor hurtig cellene replikerer sitt DNA, og dermed på

hvor fort de prolifererer. Opptatt mengde  $^3\text{H}$ -tymidin kan så kvantifiseres på bakgrunn av den radioaktive strålingen fra  $^3\text{H}$ -isotopen.

### 5.6.2 Cellestimulering

Cellene sås ut i brønner på en 96-brønnsplate, med en tetthet på 2500 celler per brønn. Etter tre døgn skiftes mediet til cellene, og byttes eventuelt til CSS. Cellene går så i det nye mediet i 2 døgn før stimulering (dag 5). Cellene stimuleres i paralleller à 6 brønner. Etter stimulering kultiveres cellene i ett døgn, før radioaktivt  $^3\text{H}$ -merket tymidin tilsettes (dag 6). Cellene kultiveres så med  $^3\text{H}$ -tymidin i ett døgn, før brettet fryses ned ved  $-20^\circ\text{C}$ . Cellene holdes så nedfrosset frem til inkorporert  $^3\text{H}$ -tymidin skal kvantifiseres.

### 5.6.3 Prøveopparbeidelse

Cellene tines i inkubatorskap ved  $37^\circ\text{C}$ . Når cellene er tint, overføres de til en filterplate (UniFilter, Perkin Elmer, Boston, MA) ved hjelp av en vakuumpumpe (Packard Filtermate 196 Harvester, Unifilter-96). Overflødig væske suges opp i apparatet, slik at det kun er cellemateriale og dermed intracellulært  $^3\text{H}$ -tymidin som sitter igjen på platen. Platen inkuberes i ca 90 minutter ved  $45^\circ\text{C}$ , slik at den tørker fullstendig. Deretter tilsettes 20-25  $\mu\text{l}$  scintillasjonsvæske, Microscint<sup>TM</sup> 0 High Efficiency LSC Cocktail (PerkinElmer, Boston, MA) til hver enkelt brønn på filterplaten.

### 5.6.4 Analyse

Selve analysen foregår på en Microplate scintillation and luminescence counter (Packard). Apparatet teller radioaktiviteten som stråler ut fra hver enkelt brønn, og angir denne i form av et talletall. Tallene som oppgis kan enkelt overføres til et statistikkprogram og bearbeides videre.

### 5.6.5 Relativ kvantifisering

Datamaterialet fra  $^3\text{H}$ -tymidin overføres til dataprogrammet Microsoft Excel, der gjennomsnitt og standardavvik i prøvene beregnes. For å sammenligne data mellom separate plater normaliseres alle tallene til en kontroll, som er med på hver enkelt plate. Dette gjøres

for å ta høyde for mulige ulikheter i behandling av platene under hvert respektive forsøk. I denne oppgaven er celler kultivert i steroiddeprivert medium (CSS) valgt som kontroll, og telleverdien til disse er blitt tildelt verdien 1. Proliferasjon i alle andre prøver er oppgitt som en verdi relativ til denne.

## 5.7 DNA- ekstraksjon

DNA- ekstraksjon er blitt utført for å normalisere data fra  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay. Det antas at DNA- mengden er lik i LNCaP- og C4-2- celler, og måling av DNA- mengden i prøvene blir derfor brukt som et relativt mål på antall celler.

### 5.7.1 Cellestimulering til DNA- ekstraksjon

Celledyrking- og stimulering til DNA- ekstraksjon blir utført parallelt med, og etter prosedyre for, utsåing og stimulering til  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay (punkt 5.6.2). I stedet for å tilsette  $^3\text{H}$ - tymidin (dag 6), tilsettes cellene 50  $\mu\text{l}$  RPMI medium.

### 5.7.2 DNA- høsting med Wizard SV Genomic DNA Purification System

DNA høstes dag 7, det vil si samme dag som cellene til  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay fryses ned (punkt 5.6.2). Oppsettet følger protokollen til kitet Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) <sup>74</sup>.

Cellene vaskes først en gang med PBS. Deretter tilsettes 150  $\mu\text{l}$  Wizard® SV Lysis Buffer til hvert triplikat på platen, det vil si 50  $\mu\text{l}$  til hver brønn med celler. Lysatet pipetteres opp og ned for å sikre lysering av cellene. Lysatet fra ett triplikat overføres til en Wizard® SV Minikolonne. Denne kolonnen er plassert oppi et samlerør. Kolonnen sentrifugeres ved 13000 rpm i 3 minutter. Den overflødige væsken i samlerøret kastes, og kolonnen tilsettes 650  $\mu\text{l}$  Wizard® SV Wash Solution. Rørene sentrifugeres på nytt ved 13000 rpm i 1 minutt. Den overflødige væsken i samlerøret kastes. Vaskingen med Wizard® SV Wash Solution gjentas 3 ganger. Etter siste vasking sentrifugeres minikolonnen ved å ved 13000 rpm i 2 minutter, for å fjerne all vaskeløsning. Minikolonnen overføres til et eppendorffrør, og tilsettes 250  $\mu\text{l}$  romtemperert nukleasefritt vann. Det tilsettes også en RNase-løsning, for å

---

rense bort RNA som sitter på kolonnen. Eppendorffrøret med minikolonnen sentrifugeres ved 13000 rpm i 1 minutt. DNA vil nå elueres ut av kolonnen sammen med vannet.

### 5.7.3 DNA- måling med NanoDrop (type ND-1000)

Konsentrasjonsmåling av DNA i eluatet bestemmes etter samme prosedyre som for RNA-måling, se punkt 5.4.3

## 5.8 Proteinmåling av celler sådd ut i 96-brønns plate

Proteinmåling er blitt utført for å normalisere data fra  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay.

LNCaP celler sås ut og behandles slik som celler som skal til  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay, punkt 5.6.3. I stedet for tilsetning av  $^3\text{H}$ - tymidin (dag 6), tilsettes 50  $\mu\text{l}$  RPMI medium til hver brønn. Mediet fjernes og cellene fryses ned dag 7. På analysedagen tilsettes 200  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH til hver brønn, og cellene tines. Videre kvantifiseres proteinmengden etter protokoll som tidligere beskrevet av en hovedfagsstudent ved Farmasøytisk Institutt, UiO, avdeling for farmasøytisk biovitenskap<sup>75</sup>:

50  $\mu\text{l}$  fra hver enkelt brønn overføres til en 96-brønners mikrotiterplate. I tillegg tilsettes 2 x 50  $\mu\text{l}$  proteinstandard til hver rad på platen. Proteinstandardene består av BSA fortynnet i 0,1 M NaOH til kjent konsentrasjon. Hver brønn på platen tilsettes 200  $\mu\text{l}$  standard proteinfargingsreagens, som består av fargekonsentrat (Bio-rad) fortynnet 1:4 i  $\text{dH}_2\text{O}$ . Prøvene inkuberes 5 minutter i romtemperatur, før absorbansen måles ved 595 nm med en Victor mikroplateleser (Perkin Elmer). Utrekningen av proteinkonsentrasjonen i hver brønn gjøres ved sammenlikning mot standardkurven. Proteinkonsentrasjonen oppgis i  $\mu\text{g/ml}$ .

På grunn av volumet som analyseres (250  $\mu\text{l}$ ,  $\frac{1}{4}$  ml) og det benyttede volumet av den opprinnelige NaOH- løsningen (50  $\mu\text{l}$  av 200  $\mu\text{l}$ , 1:4), vil oppgitt proteinkonsentrasjon i  $\mu\text{g/ml}$  tilsvare  $\mu\text{g}$  protein opprinnelig tilstede i hver brønn.

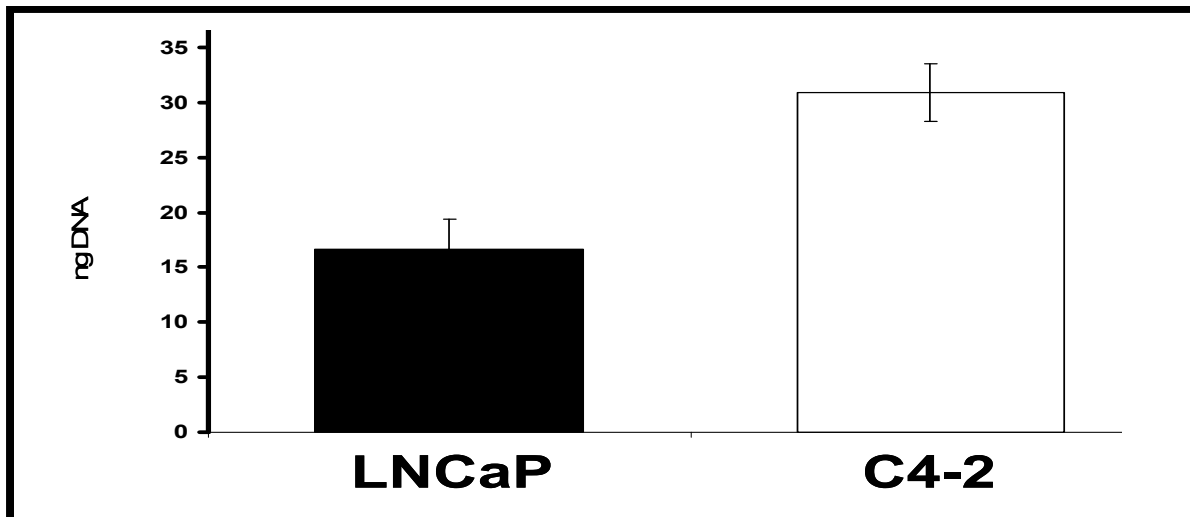
## 6. Resultater

### 6.1 Sammenlikning av $^3\text{H}$ -tymidin inkorporering i LNCaP og C4-2 celler

Vi ønsket å studere forskjeller i proliferasjonshastighet mellom de androgensensitive LNCaP- cellene og de androgenuavhengige C4-2- cellene. Dette ble gjort ved å sammenlikne mengde inkorporert  $^3\text{H}$ -tymidin med mengde DNA i cellelinjene som et mål på antall celler.

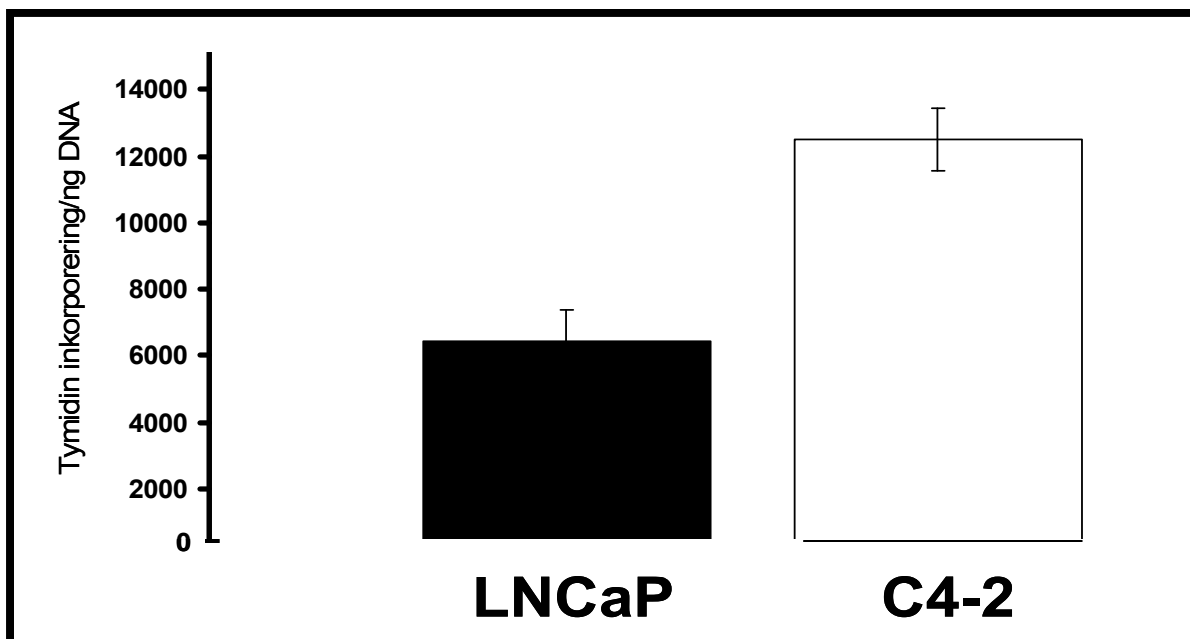
Forsøket ble utført ved å så ut to parallelle plater både med LNCaP- celler og C4-2- celler, som beskrevet i punkt 5.6.2. En plate fra hver cellelinje var beregnet til  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay, og en til DNA- måling. Samtlige prøver ble behandlet som ved et  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay, med unntak av tilsetning av RPMI 1640 i stedet for  $^3\text{H}$ -tymidin til prøvene der DNA skulle måles. Etter kvantifisering av inkorporert  $^3\text{H}$ -tymidin og DNA mengde i hver parallell, ble det regnet ut hvor mye  $^3\text{H}$ -tymidin som var inkorporert per ng DNA i hver prøve.

Det viste seg at det var betraktelig mer DNA i prøver fra C4-2- cellene enn i prøver fra LNCaP- cellene (figur 6-1).



**Figur 6.1:** DNA mengde i LNCaP- og C4-2- celler inkubert i 96- brønnsplate i 7 dager, vist ved DNA-ekstraksjon Wizard SV Genomic DNA Purification System ble brukt til å ekstrahere DNA fra LNCaP- og C4-2- celler etter at disse var behandlet som ved et  $^3\text{H}$ - tymidin proliferasjonsassay. Grafene viser snittverdi og standardavvik fra 15 prøver. Forsøket er utført èn gang.

Som vist på figur 6.2, inkorporerte C4- cellene nesten dobbelt så mye  $^3\text{H}$ - tymidin som LNCaP- cellene per ng DNA.

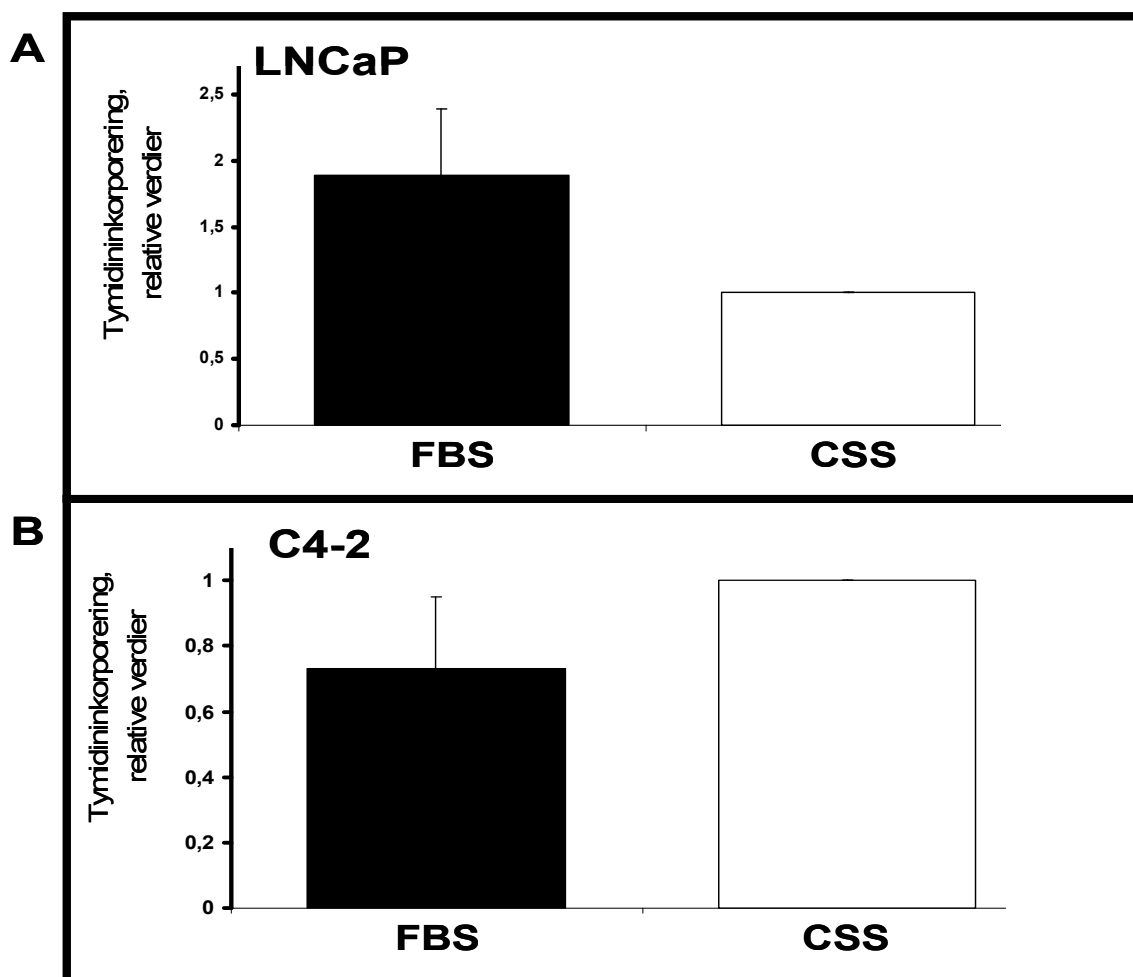


**Figur 6.2:** Tymidininkorporering per ng DNA i LNCaP og C4-2 celler kultivert i FBS Inkorporert  $^3\text{H}$ -tymidin i cellene, undersøkt med  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay, ble normalisert mot DNA- mengden i celler utsatt for de samme forsøksbetingelser. Normalisering ble utført ved at inkorporert  $^3\text{H}$ -tymidin i hver prøve ble delt på den gjennomsnittlige DNA- mengden fra totalt 15 prøver. Grafene viser snittverdi og standardavvik fra 15 normaliserte prøver. Forsøket er utført èn gang.

## 6.2 Proliferasjon av LNCaP og C4-2 celler inkubert i FBS versus CSS

For å undersøke effekten av et steroidfattig vekstmiljø på cellenes proliferasjon, ble LNCaP- og C4-2- celler overført til CSS. Dette ble gjort 3 dager etter utsåing. Cellene ble inkubert med dette mediet i 3 dager før tilsetning av  $^3\text{H}$ -tymidin, og frosset ned 24 timer etter tilsetning. Celler inkubert i FBS ble benyttet som kontroll.

De androgensensitive LNCaP- cellene viser som forventet proliferasjonsnedgang etter overføring til CSS (figur 6.3- A). De androgenuavhengige C4-2 cellene viser derimot en tendens til økt proliferasjon etter overføring til CSS (figur 6.3- B).



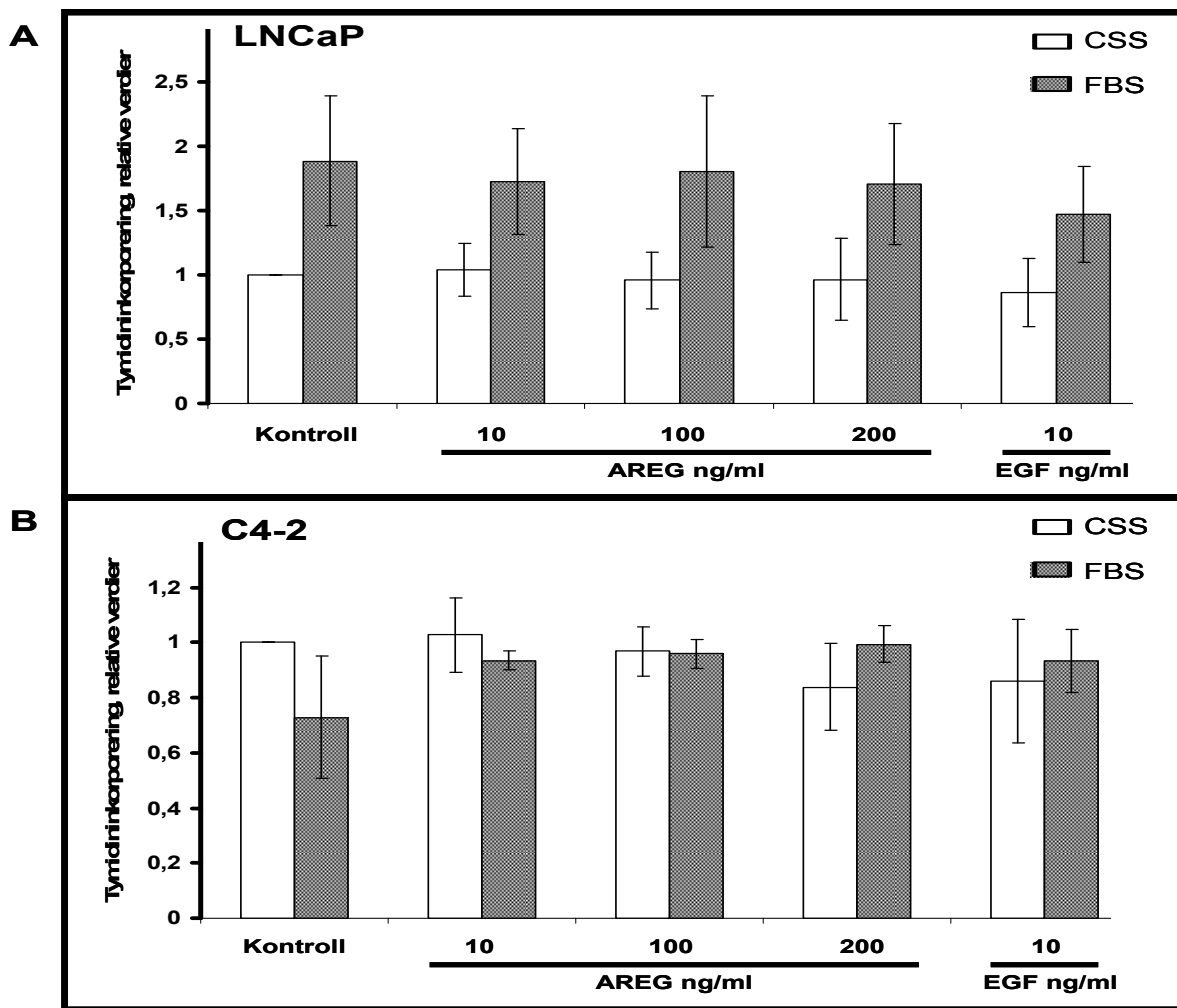
*Figur 6.3: Proliferasjon av LNCaP og C4-2 celler i ulike vekstbetingelser, undersøkt med  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay ble benyttet for å se på effekten av steroidfattig vekstmedium på cellenes proliferasjonshastighet. A) LNCaP- celler. B) C4-2-celler. Resultatene er vist relativt til  $^3\text{H}$ -tymidininkorporeringen i celler inkubert i CSS. Grafene viser gjennomsnitt og standardavvik fra 6 separate forsøk, alle utført med 6 paralleller.*



### 6.3 AREG- respons i LNCaP- og C4-2- celler

For å se på eventuelle effekter av EGFR- liganden AREG på cellenes proliferasjon, ble det satt opp  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay der cellene ble stimulert med økende konsentrasjoner av AREG. Stimuleringsforsøket ble utført både i FBS og i CSS. Stimulering med EGF 10 ng/ml er tatt med som positiv kontroll.

Verken i FBS eller i CSS hadde AREG noen effekt på proliferasjon (figur 6.4).

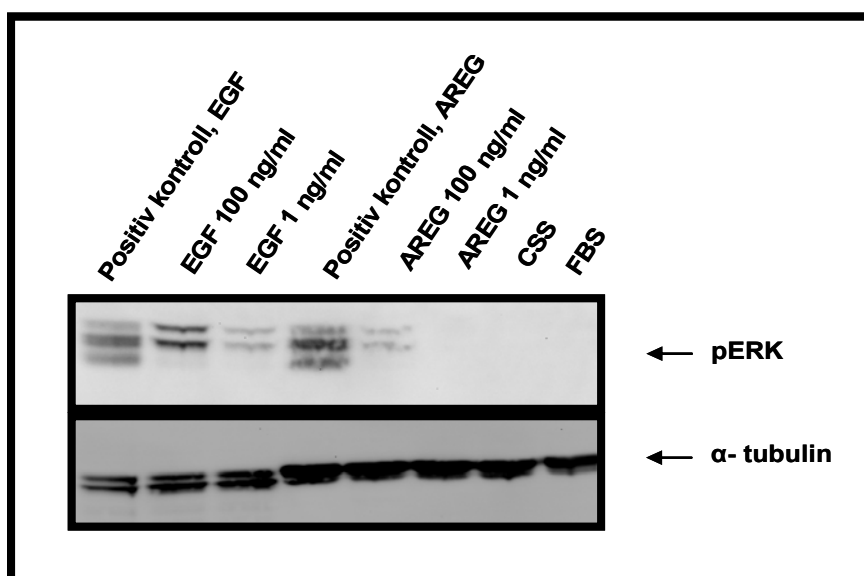


**Figur 6.4: Effekter av stimulering med AREG i LNCaP- og C4-2 – celler, undersøkt med  $^3\text{H}$ -tymidininkorporeringsassay**  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay ble benyttet for å bestemme effekten av AREG på cellenes proliferasjon. EGF i konsentrasjonen 10 ng/ml var inkludert i forsøket som positiv kontroll. A) Effekten av økende konsentrasjoner AREG på  $^3\text{H}$ -tymidininkorporering i LNCaP- celler. B) Effekten av økende konsentrasjoner AREG på  $^3\text{H}$ -tymidininkorporering i C4-2- celler. Resultatene er vist relativt til  $^3\text{H}$ -tymidininkorporeringen i celler inkubert i CSS. Grafene viser gjennomsnitt og standardavvik fra tre separate forsøk, alle utført med 6 paralleller.

## 6.4 Kontroll av AREGs og EGFs EGFR- stimulerende effekt

For å kontrollere kvaliteten på EGF- og AREG- løsningene ble det utført et stimuleringsforsøk for å se på ligandenes evne til å aktivere EGFR, her vist ved fosforylering av ERK (pERK, figur 6.5). Cellene ble stimulert med AREG og EGF som angitt på figur 6.5. Tilsvarende forsøk var tidligere utført på laboratoriet <sup>57</sup>, og ekstrakter fra et slikt forsøk ble her benyttet som positiv kontroll.

Som det fremgår av figur 6.5, hadde både AREG og EGF stimulerende effekt på EGFR, vist ved fosforylering av ERK. Kraftigst var effekten av EGF 100 ng/ml, men effekten var også synlig i prøver isolert fra celler stimulert med EGF 1 ng/ml eller AREG 100 ng/ml. Sammenliknet med kontrollprøvene, isolert fra celler inkubert i FBS eller CSS, var effekten svært tydelig. I prøven isolert fra celler stimulert med AREG 1 ng/ml var det derimot ingen synlig effekt.



**Figur 6.5: Aktivering av ERK som følge av stimulering av LNCaP- celler med AREG og EGF, vist ved Westernblott** LNCaP- celler ble stimulert med AREG og EGF i 30 minutter, i konsentrasjoner som anvist på figur. Proteiner isolert fra tidligere forsøk på laboratoriet ble tatt med som positiv kontroll. Konsentrasjonene av AREG og EGF benyttet til stimulering av kontrollene var 100 ng/ml. Proteinene α-tubulin ble benyttet som loadingkontroll. Forsøket er utført én gang.

De tidligere isolerte proteinekstraktene som ble benyttet som positiv kontroll var isolert fra celler stimulert med EGF og AREG i konsentrasjonen 100 ng/ml.

Sammenliknet med den positive kontrollen førte tilsetning av EGF 100 ng/ml til et noe sterkere signal. Signalet fra celler stimulert med AREG 100 ng/ml var imidlertid noe svakere enn i den positive kontrollen. Årsakene til dette ble ikke funnet.

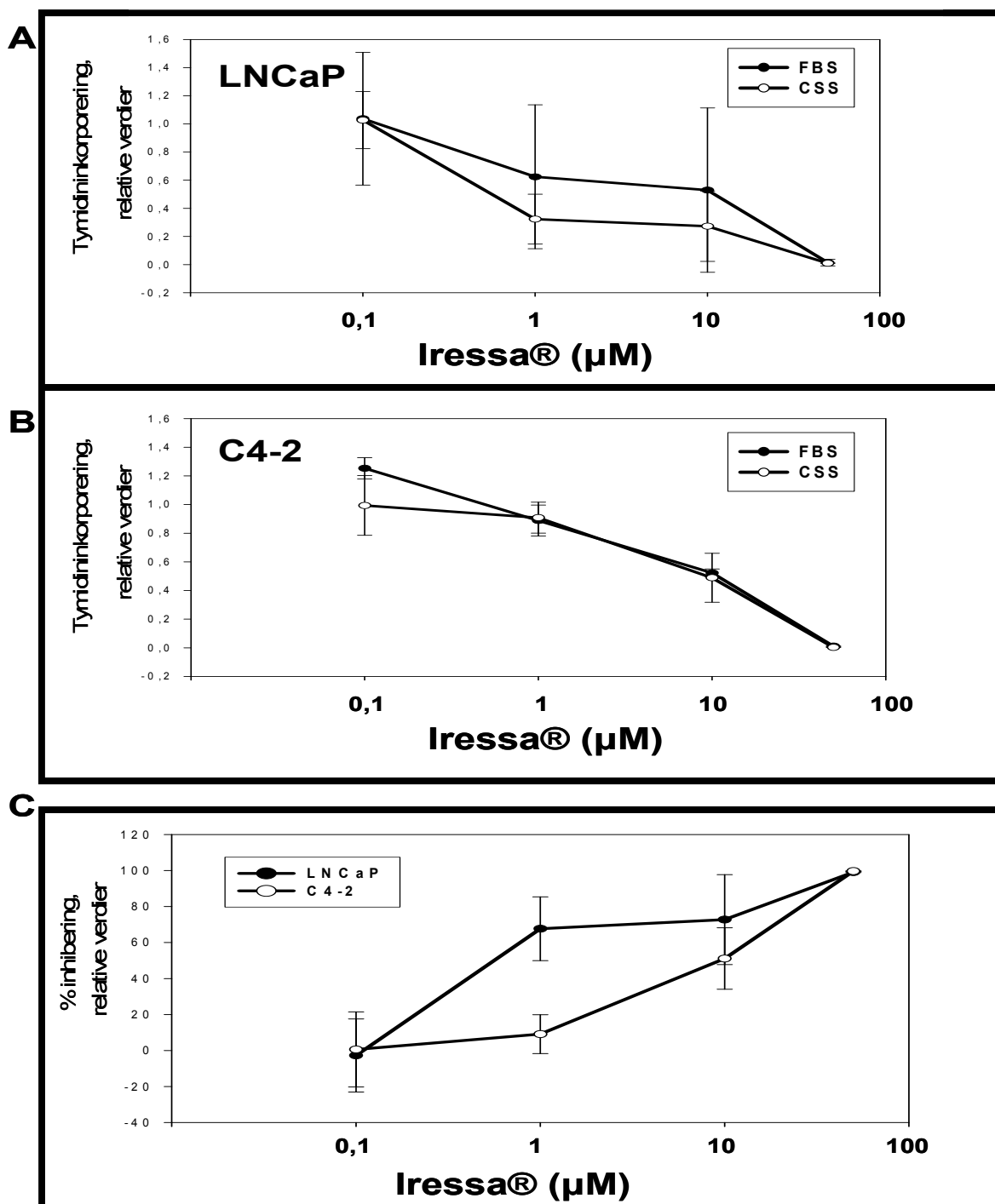
## **6.5 Konsentrasjonsavhengig effekt av Iressa® i LNCaP og C4-2 celler**

### **6.5.1 Konsentrasjonskurve for Iressa®s proliferasjonshemmende effekt**

For å kartlegge Iressa®s effekter på proliferasjon i de to cellelinjene, ble det satt opp konsentrasjonskurver for Iressa® både i LNCaP- og C4-2- celler. Det var også ønskelig å undersøke eventuelle forskjeller i effekten avhengig av cellenes vekstbetingelser. Derfor ble forsøkene utført både i FBS og i CSS.

Som det fremgår av figur 6.6, tyder resultatene på at den relative nedgangen i proliferasjon er tydeligere i LNCaP- celler inkubert i CSS enn i LNCaP- celler inkubert i FBS (figur 6.6- A). I C4-2- celler er det derimot liten forskjell på effekten av Iressa® under ulike vekstbetingelser. Et unntak er konsentrasjonen 0,1  $\mu\text{M}$ , der tilsetning av Iressa® faktisk ser ut til å ha hatt en proliferasjonsøkende effekt på celler inkubert i FBS (figur 6.6- B).

1  $\mu\text{M}$  Iressa® utviser en kraftigere proliferasjonshemmende effekt i LNCaP- celler enn i C4- celler, slik det fremgår av figur 6.6- C. 50 % hemming av proliferasjon ses ved tilsetning av i underkant av 1  $\mu\text{M}$  Iressa® i LNCaP- celler, og underkant av 10  $\mu\text{M}$  i C4-2- celler. Ved 50  $\mu\text{M}$  er den proliferasjonshemmende effekten tilnærmet total i begge cellelinjer.



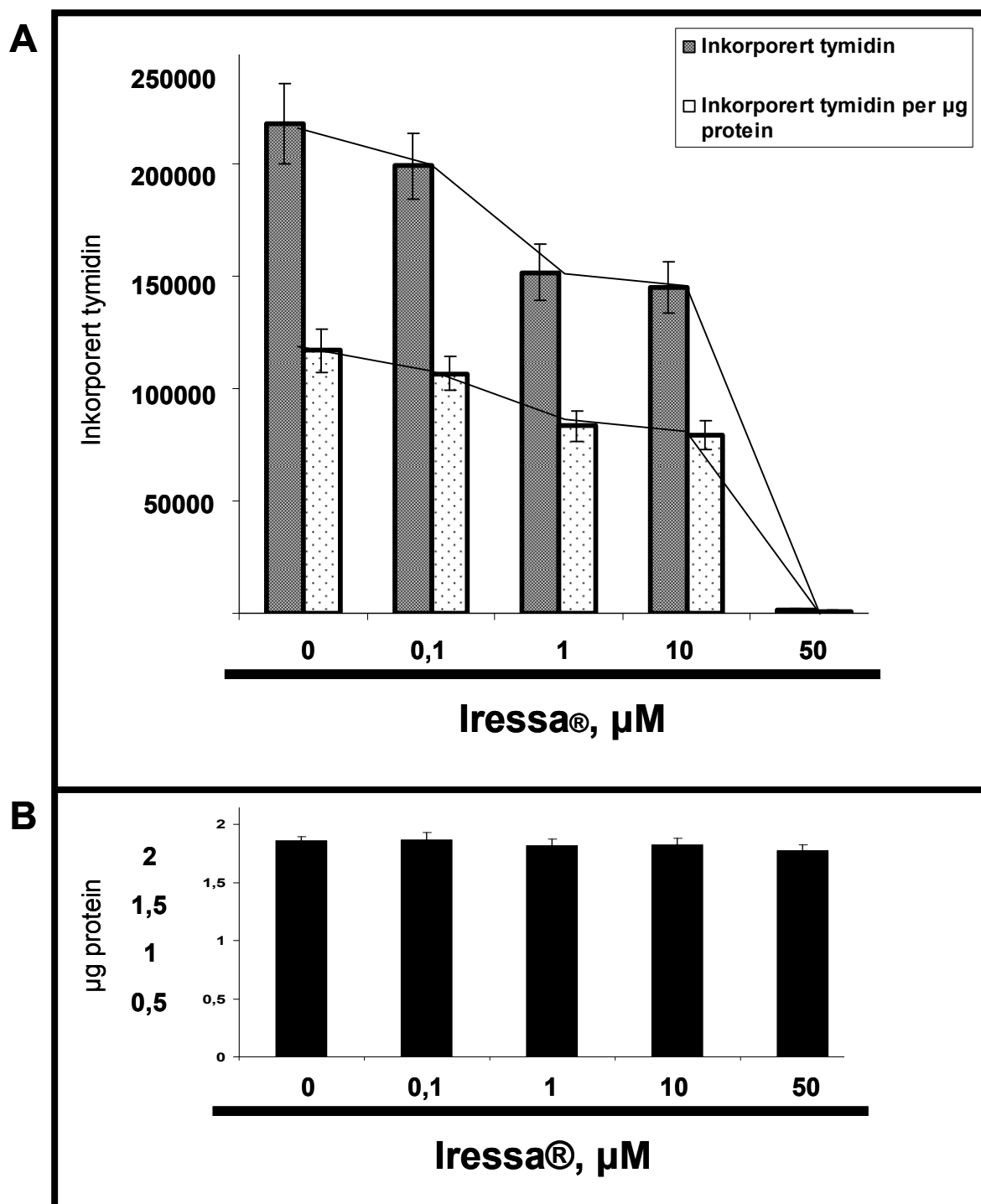
**Figur 6.6:** Konsentrasjonskurver for Iressa®s proliferasjonshemmende effekt i celledinjene LNCaP og C4-2, undersøkt med <sup>3</sup>H-tymidin inkorporeringsassay. Cellene ble tilsatt Iressa® i konsentrasjonene 0,1, 1, 10 og 50 µM. A) Hemmende effekt av Iressa® i LNCaP-celler, inkubert i FBS eller CSS. B) Hemmende effekt av Iressa® i C4-2-celler, inkubert i FBS eller CSS. Alle resultater er vist relativt til <sup>3</sup>H-tymidininkorporering i uhemmede celler (verdi 1, ikke vist). C) Oppsummering av Iressa®'s proliferasjonshemmende effekt i LNCaP og C4-2-celler inkubert i CSS). Tallene er oppgitt som prosentvis inhibering, og er relative til hemmingen av uhemmede celler (verdi 0, ikke vist). Grafene viser gjennomsnitt og standardavvik basert på tre separate forsøk, alle utført med 6 paralleller.

### **6.5.2 Normalisering av konsentrasjonskurvene med proteinmåling**

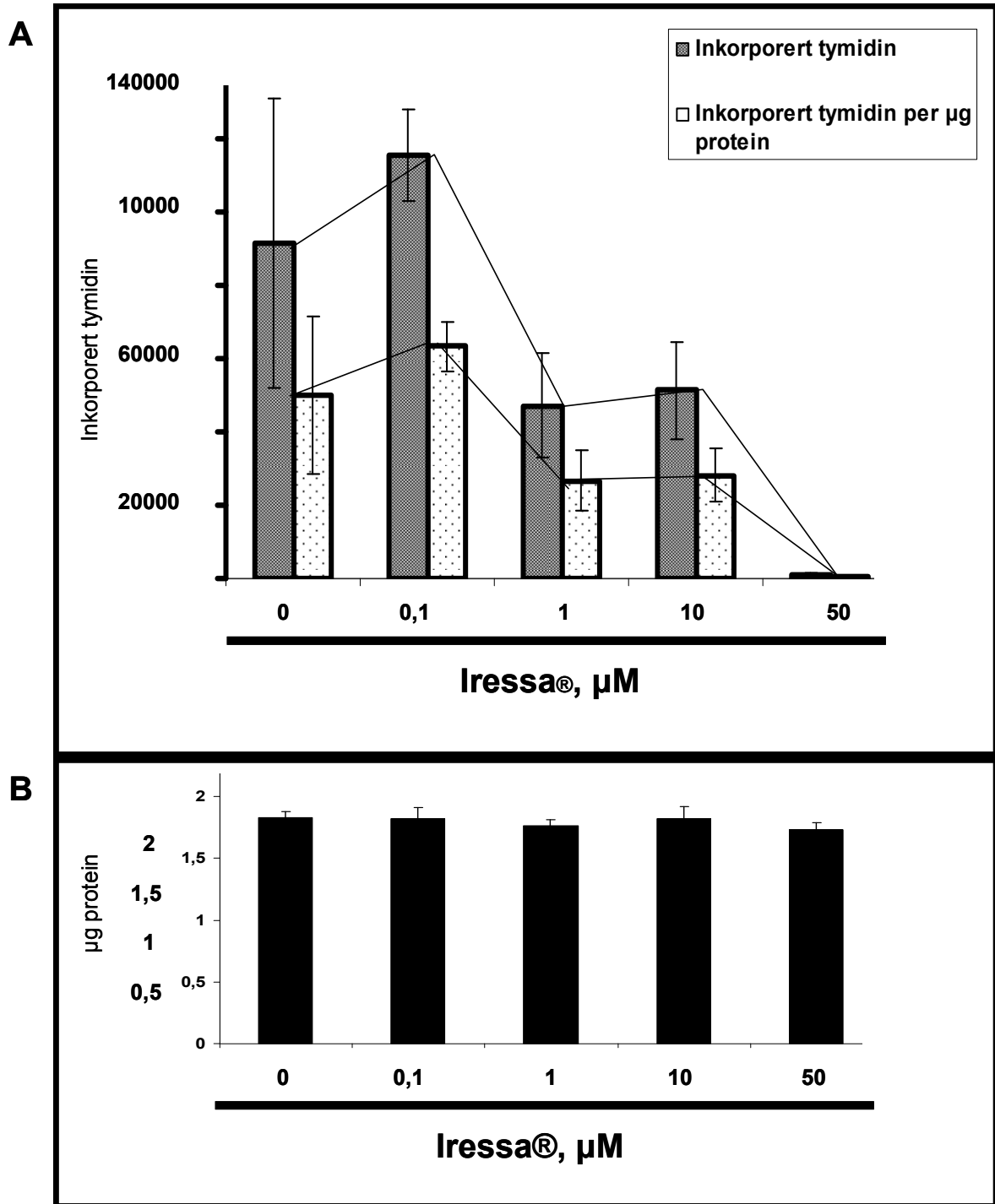
Proteinmåling ble utført for å forsikre at den kraftige nedgangen i inkorporert  $^3\text{H}$ -tymidin etter hemming med 50  $\mu\text{M}$  Iressa® ikke skyldtes tap av celler under forsøket. To parallelle konsentrasjonskurver ble satt opp i LNCaP- celler, sådd ut i hver sin 96-brønns plate som beskrevet i punkt 5.6.2. En plate ble analysert med  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay, og en med proteinmåling.

Forsøket ble utført både i FBS og i CSS. Dette ble gjort for fange opp eventuelle variasjoner i cellenes oppførsel under ulike vekstbetingelser.

Resultatene viser at nedgangen i inkorporert  $^3\text{H}$ -tymidin opprettholdes dersom inkorporert  $^3\text{H}$ -tymidin normaliseres mot proteinmengden i hver parallelle prøve (figur 6.7- A og figur 6.8- A). Resultatet fra proteinmålingen viser dessuten at proteinmengden i de ulike prøvene var relativt konstant (figur 6.6- B og figur 6.8- B).



*Figur 6.7: Inkorporering av  $^3\text{H}$ -tymidin per µg protein i LNCaP-celler inkubert i FBS Proteinmåling ble benyttet for å validere at nedgangen i proliferasjonstall etter hemming med Iressa® ikke skyldtes tap av celler under forsøket. A) Resultatene fra  $^3\text{H}$ -tymidininkorporering vises her alene (inkorporert tymidin) og normalisert mot proteinmengden i hver parallele prøve (inkorporert tymidin per µg protein) B) Søylediagram som viser proteinmengden i hver enkelt prøve. Grafene viser snittverdi og standardavvik basert på ett forsøk, utført med 6 paralleller.*



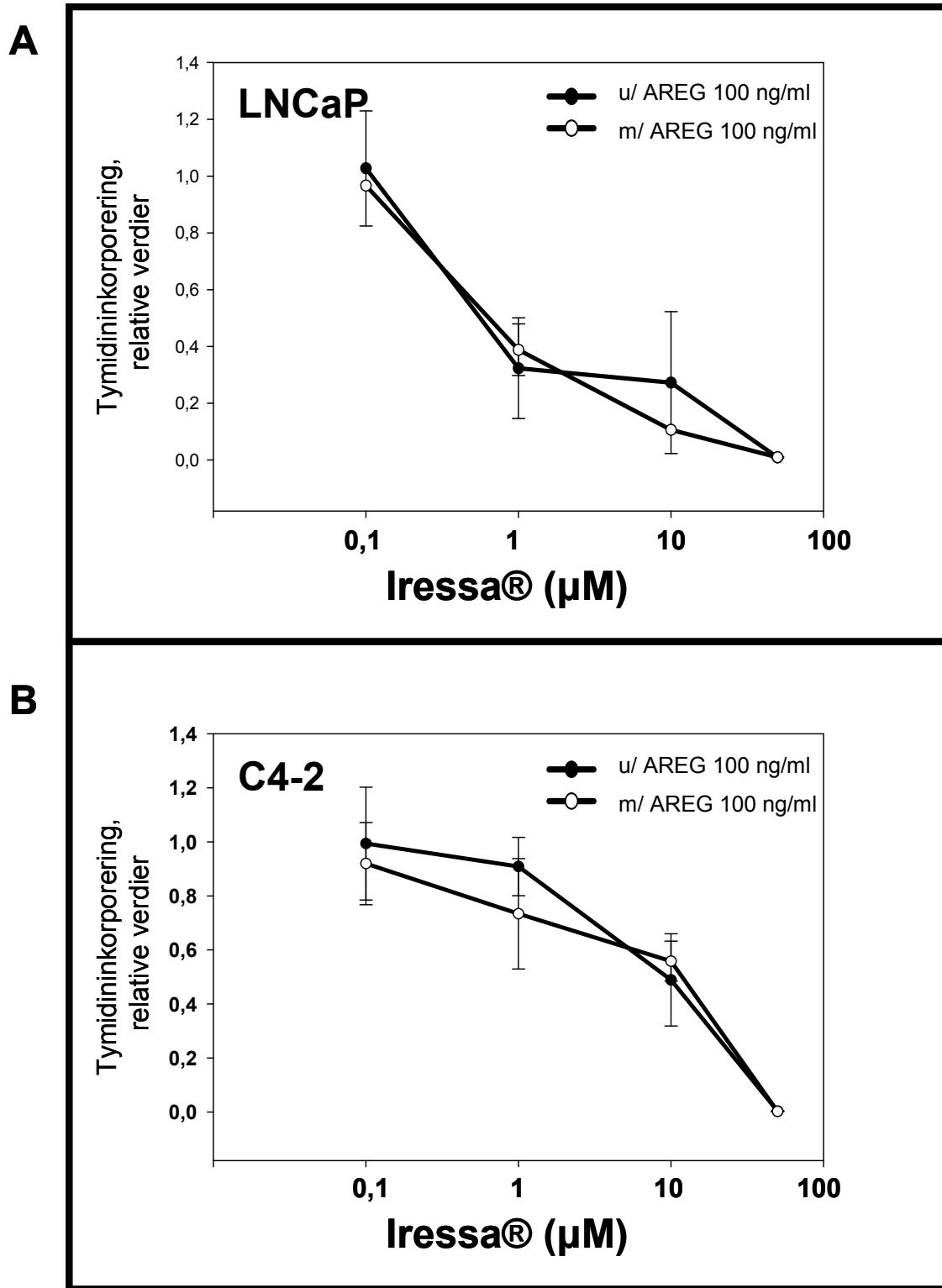
**Figur 6.8: Inkorporering av  $^3\text{H}$ -tymidin per  $\mu\text{g}$  protein i LNCaP- celler inkubert i CSS Proteinmåling ble benyttet for å validere at nedgangen i proliferasjonstall etter hemming med Iressa® ikke skyldtes tap av celler under forsøket. A) Resultatene fra  $^3\text{H}$ -tymidininkorporering vises her alene (inkorporert tymidin) og normalisert mot proteinmengden i hver parallelle prøve (inkorporert tymidin per  $\mu\text{g}$  protein). B) Søylediagram som viser proteinmengden i hver enkelt prøve. Grafene viser snittverdi og standardavvik basert på ett forsøk, utført med 6 paralleller.**

## **6.6 Konsentrasjonskurve for Iressa®s hemmende effekt med AREG eller EFG tilstede i mediet**

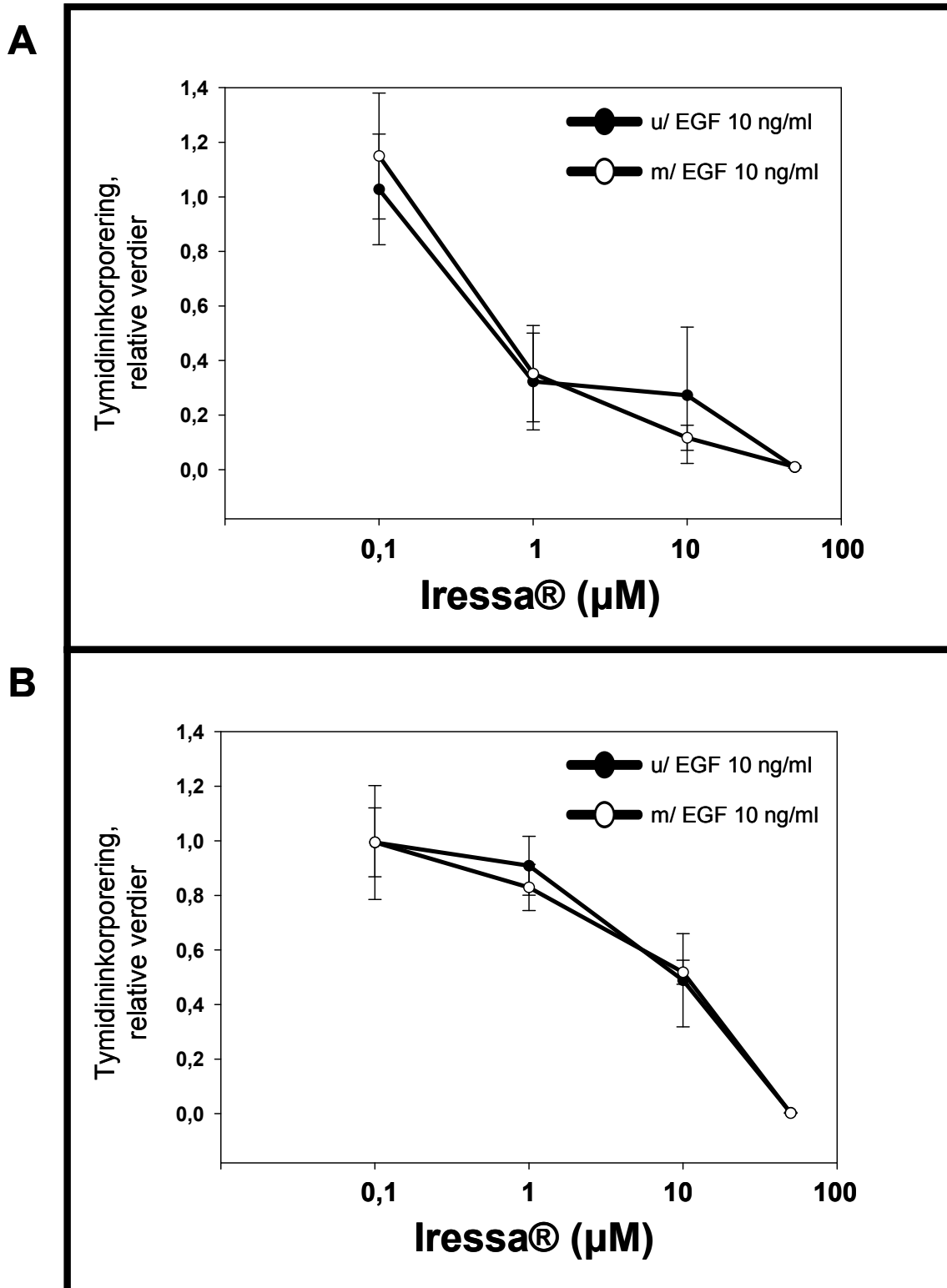
Det var ønskelig å undersøke om AREG har noen effekt på proliferasjonsnedgangen sett ved hemming med Iressa®. For å studere dette ble konsentrasjonskurven til Iressa® satt opp på nytt, denne gangen med AREG 100 ng/ml tilstede i mediet. Konsentrasjonskurven ble også gjentatt med EGF 10 ng/ml, ment som positiv kontroll. Forsøkene ble utført i CSS).

Resultatet viser at verken AREG eller EGF påvirker den proliferasjonsnedsettende effekten av Iressa® i særlig grad (figur 6.9 og 6.10). Ved de Iressa®- konsentrasjoner der tilstedeværelse av AREG eller EGF ser ut til å utgjøre en forskjell, er det cellene som er inkubert med Iressa® alene som viser høyest proliferasjonshastighet. Effektene er imidlertid små, og med overlappende standardavvik.





**Figur 6.9:** Effekter av AREG tilstede i mediet ved inhibering med Iressa® i CSS, vist ved  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay. Konsentrasjonskurver for Iressa® ble satt opp i nærvær av 100 ng/ml AREG. A) LNCaP- celler. B) C4-2- celler. Alle resultater er vist relativt til  $^3\text{H}$ -tymidininkorporering i celler inkubert i CSS (verdi 1, ikke vist). Grafene viser gjennomsnitt og standardavvik basert på tre separate forsøk, alle utført med 6 paralleller.

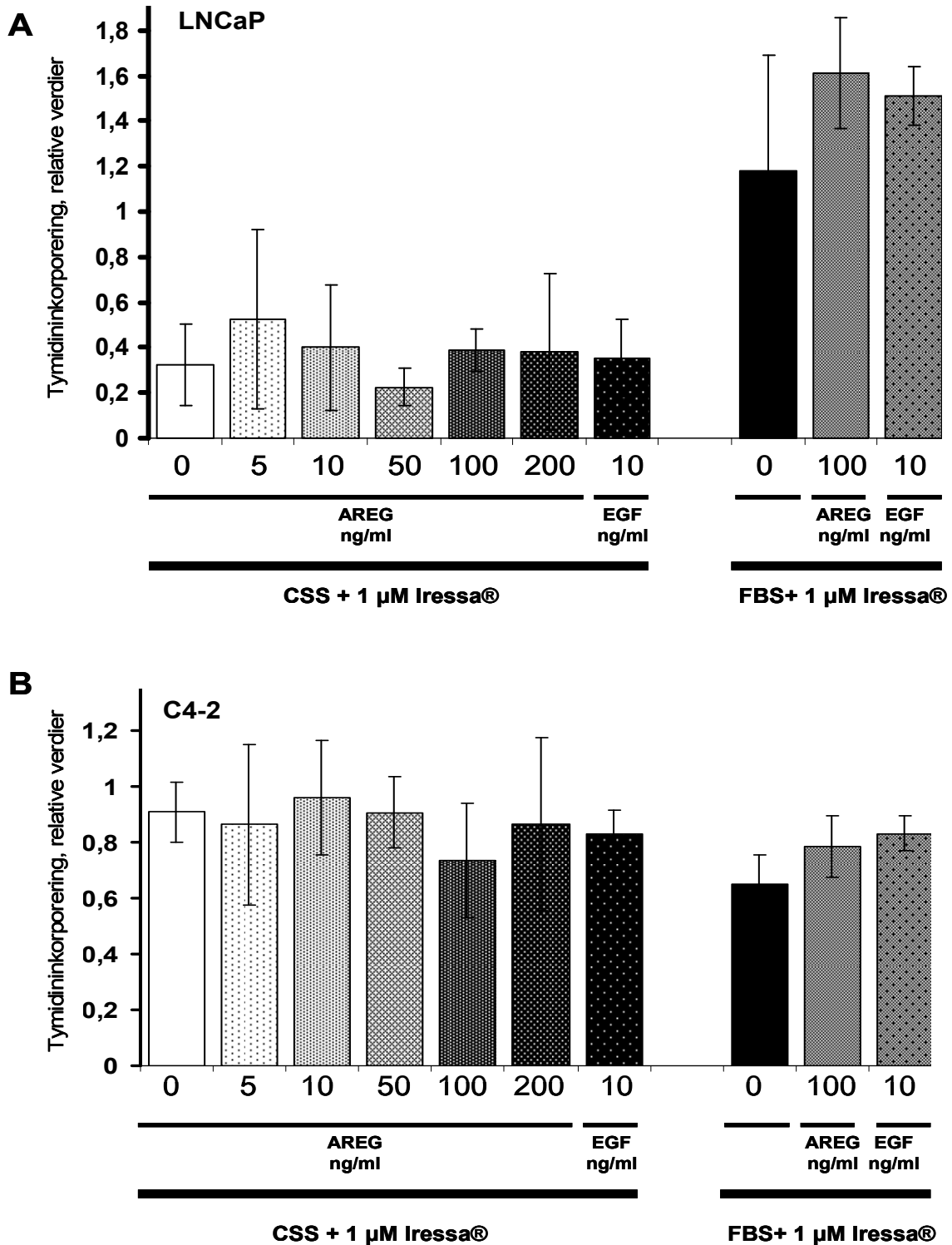


**Figur 6.10:** Effekter av EGF tilstede i mediet ved inhibering med Iressa® i CSS, vist ved  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay. Konsentrasjonskurver for Iressa® ble satt opp i nærvær av 10 ng/ml EGF. A) LNCaP-celler. B) C4-2 celler. Alle resultater er vist relativt til  $^3\text{H}$ -tymidininkorporering i celler inkubert i CSS (verdi 1, ikke vist). Grafene viser gjennomsnitt og standardavvik basert på tre separate forsøk, alle utført med 6 paralleller.

## 6.7 Konsentrasjonsavhengig effekt av AREG på Iressa®-respons

For å ta høyde for at AREG 100 ng/ml muligens ikke er optimal konsentrasjon for å påvirke effekten av Iressa®, ble celler hemmet med 1 µM Iressa® stimulert med økende konsentrasjoner AREG. Valget av Iressa®- konsentrasjonen 1 µM ble gjort på bakgrunn av flere tidligere studier, som alle har benyttet denne konsentrasjonen<sup>54;76;77</sup>. Denne konsentrasjonen ble ansett å være mest relevant i forhold til den kliniske bruken av Iressa®.

Resultatene (figur 6.11) viser at AREG i det studerte konsentrasjonsområdet ikke påvirker effekten av 1 µM Iressa®. I LNCaP- celler inkubert i CSS ser det ut til å være effekt av AREG 5 ng/ml, men denne effekten er beskjeden og ikke signifikant. Tilsvarende ser det ut til at AREG 100 ng/ml kan ha hatt en effekt på LNCaP- celler inkubert i FBS, men heller ikke denne effekten er signifikant.



**Figur 6.11:** Effekter av økende konsentrasjoner av AREG i mediet ved hemming med Iressa®, vist ved  $^3\text{H}$ -tymidin inkorporeringsassay. Cellene ble stimulert med økende konsentrasjoner av AREG i nærvær av Iressa® 1 µM. Stimulering med EGF 10 ng/ml i nærvær av Iressa® er tatt med som positiv kontroll. A) LNCaP-celler. B) C4-2-celler. Resultatene er vist relativt til  $^3\text{H}$ -tymidininkorporeringen i celler inkubert i CSS (verdi 1, ikke vist). Grafene viser gjennomsnitt og standardavvik fra tre separate forsøk, alle utført med 6 paralleller.

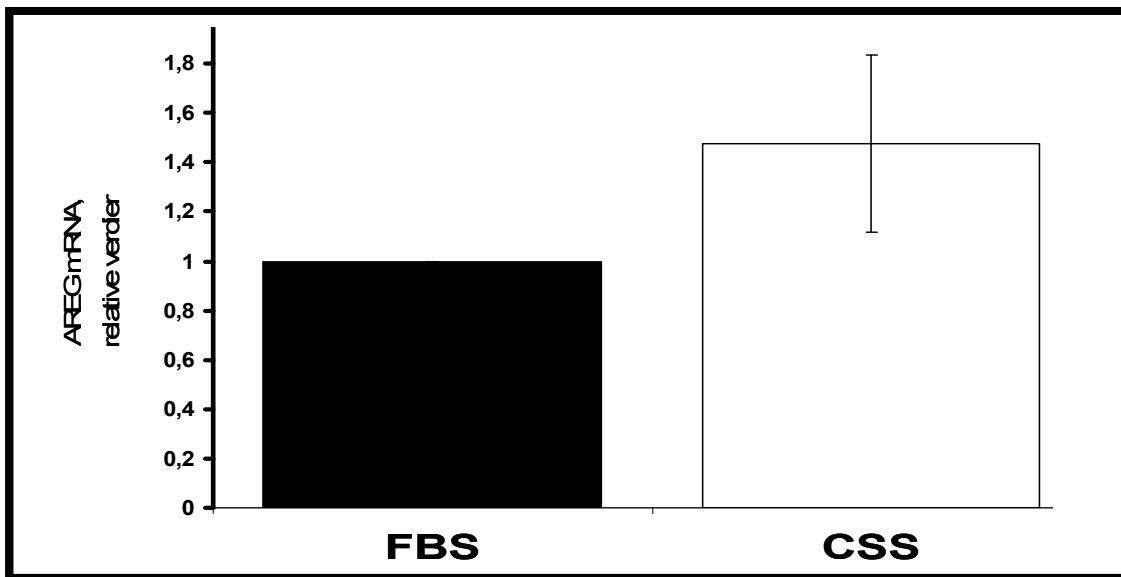
## 6.8 Nivåer av AREG mRNA i LNCaP- celler etter stimulering av ulike signalveier

Tidligere studier ved Urologisk Forskningsinstitutt har vist at nivåene av AREG er høyere i androgenuavhengige cellelinjer enn i androgenfølsomme cellelinjer<sup>57</sup>. Av denne grunn ble det undersøkt hvordan ulike vekstfaktorer og hormoner regulerer AREG- uttrykket i de androgenfølsomme LNCaP- cellene.

### 6.8.1 AREG- uttrykk som følge av ulike vekstbetingelser

Det ble først undersøkt om skifte av vekstbetingelser til CSS hadde noen betydning for cellenes ekspresjon av AREG.

Resultatene (figur 6.12) tyder på at LNCaP- cellene øker sin ekspresjon av AREG dersom de fratras vekstfremmende androgener og andre steroidhormoner. Økningen er imidlertid relativt beskjeden.

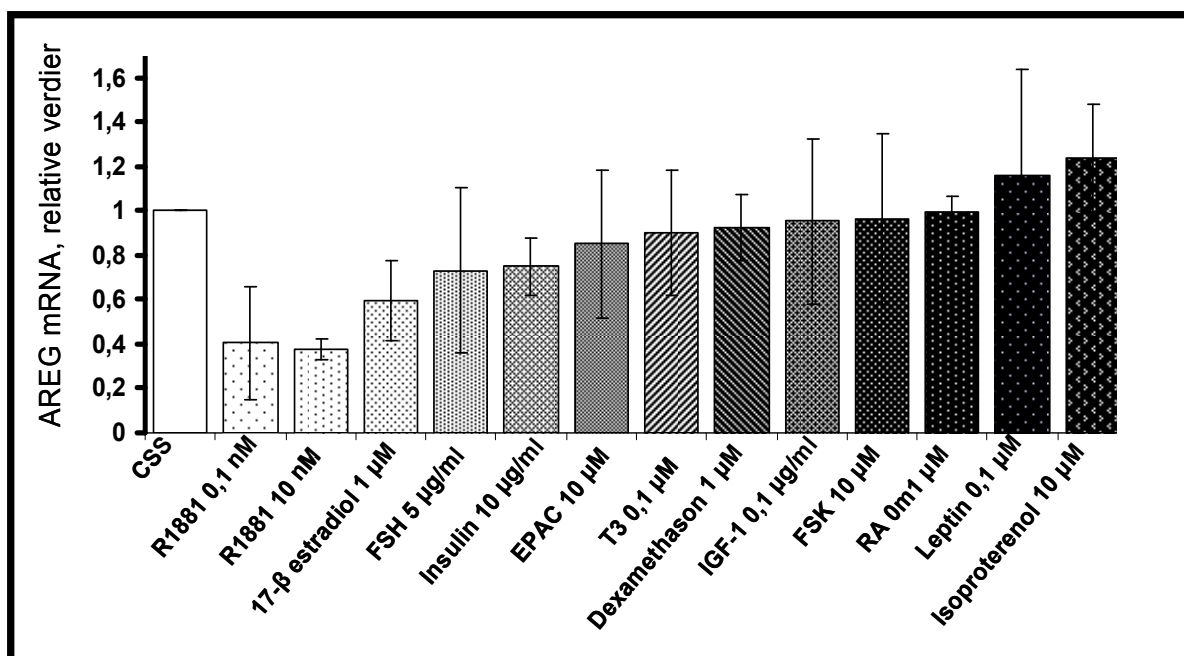


*Figur 6.12: Ekspresjon av AREG mRNA etter overføring av LNCaP celler til CSS, vist ved RT-PCR RNA fra cellene ble høstet 24 timer etter overføring til CSS. Enzymet G6PDH ble benyttet som endogen kontroll. Verdiene er relative til mengden AREG mRNA fra celler inkubert i FBS. Grafene er basert på gjennomsnitt og standardavvik fra totalt fem separate forsøk, alle utført med to paralleller.*

## 6.8.2 AREG- uttrykk som følge av stimulering med vekstfaktorer, hormoner og analoger

For å undersøke om noen vekstfaktorer, hormoner eller analoger stimulerer LNCaP- cellene til økt ekspresjon av AREG, ble cellene stimulert med flere ulike substanser. De benyttede substansene ble valgt på bakgrunn av sin relevans for vårt forskningsfokus, og sin tilgjengelighet i laboratoriet samt hos samarbeidspartnere.

Ingen av substansene ga signifikant økning av AREG- nivået (figur 6.13). Imidlertid viser resultatene at steroidhormonene R1881 (en syntetisk DHT- analog) og 17- $\beta$  estradiol reduserte nivået av AREG mRNA i cellene.



**Figur 6.13:** Ekspresjon av AREG mRNA etter stimulering av LNCaP- celler med ulike substanser, vist ved RT-PCR. Stimuleringene er utført i celler inkubert i CSS. RNA fra cellene ble høstet 24 timer etter stimulering. G6PDH er benyttet som endogen kontroll. Uttrykket av AREG mRNA i hver prøve er normalisert mot uttrykket av AREG mRNA i celler inkubert i CSS. Grafene viser gjennomsnitt og standardavvik basert på tre separate forsøk, alle utført i 2 paralleller. (FSH= folikkel stimulerende hormon; EPAC= 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyl-cAMP; T3= 3,3'-Triiodo-L-tyrosin; IGF-1= insulinlignende vekstfaktor 1; FSK= forskolin; RA= retinsyre)

## 7. Diskusjon

### 7.1 Valg av cellelinjer

I denne oppgaven er cellelinjene LNCaP og LNCaP C4-2 valgt som modeller for henholdsvis hormonavhengig og hormonrefraktær prostatakraft. Disse cellene anses å være gode modeller for utviklingen av hormonrefraktær prostatakraft, spesielt da de har samme genetiske opphav.

Likevel må det i tolkningen av resultatene tas hensyn til at dette kun er *in vitro*-modeller for prostatakraft. For bedre å kunne utrede AREGs rolle som en mulig markør for ikke-responderer på Iressa®, er det nødvendig å gjøre analyser også på pasientmateriale.

### 7.2 Bruk av <sup>3</sup>H- tymidin inkorporeringsassay

Metoden for <sup>3</sup>H- tymidin inkorporeringsassay var ikke tidligere benyttet ved Urologisk Forskningsinstitutt. Av den grunn var det i begynnelsen av arbeidet med denne oppgaven usikkerhet rundt metodens reproduserbarhet. Til tross for optimalisering av metoden underveis viser metoden fremdeles tendenser til store standardavvik. Dette har imidlertid ikke har noen avgjørende betydning for tolkning av resultater i denne oppgaven, da effektene i mange tilfeller har vært så små at overlappende standardavvik ville vært sannsynlig uansett valg av metode.

De relativt små standardavvikene sett innbyrdes mellom parallellene i enkeltforsøk, i denne oppgaven blant annet vist ved normalisering mot DNA (figur 6.2), ble ansett som en bekreftelse på at metoden var tilstrekkelig optimalisert. Likevel kunne det med fordel ha blitt brukt mer tid på optimalisering av metoden.

### **7.2.1 DNA- måling**

DNA- måling ble utført for å se på ulikheter i proliferasjon mellom LNCaP- celler og C4-2- celler. Metoden ble også benyttet til å kontrollere lik fordeling av celler i de ulike brønnene på 96- brønnsplatene etter mediumskift.

Resultatene viste at prøvene fra C4-2- cellene inneholdt betydelig mer DNA enn prøvene fra LNCaP- cellene. Dette kan skyldes mer DNA per celle, eller det kan skyldes at C4-2 cellene har proliferert hurtigere over hele forsøksperioden og at det derfor er flere av disse cellene ved analysetidspunktet. Det er ikke utført noen forsøk for å se på DNA- mengden i et kjent antall celler, og dette burde vært gjort for å kunne tolke disse resultatene med større sikkerhet. Likevel kan man si det er sannsynlig at forskjellen skyldes ulik proliferasjonshastighet under hele forsøket, spesielt da vi erfaringsmessig observerer raskere økning i celletall med C4-2 cellene enn med LNCaP- cellene. Dette er også i samsvar med andres observasjon av proliferasjon i C4-2 cellene <sup>78</sup>. Det anses som usannsynlig at celler fra samme genetiske opphav skal ha en såpass ulik DNA- profil at ulikheter i DNA- mengde per celle kan være årsaken.

## **7.3 Proliferasjon etter stimulering med AREG og EGF, og hemming med Iressa®**

### **7.3.1 Proliferasjon av LNCaP- og C4-2- celler inkubert i FBS versus CSS**

Resultatene illustrerer forskjellene på cellelinjene LNCaP og C4-2. Der LNCaP- cellene vokser og trives best i FBS, viser tallene at C4-2- cellene faktisk prolifererer hurtigst i CSS. Selv om C4-2 cellene er hormonuavhengige, er det ingen grunn til å tro at de skal ha vekstfordeler i medium tilsatt CSS. En mulig forklaring på resultatene kan være at disse cellene, etter inkubering i CSS i 3 dager før tilsetning av <sup>3</sup>H- tymidin, har bedre plass å vokse på enn cellene som har gått i FBS under hele forsøket. En annen mulighet er at det kan finnes hydrofobe forbindelser i FBS som utviser en proliferasjonshemmende effekt på C4-2- cellene. Denne eventuelt hemmende effekten vil være fraværende i CSS.



### 7.3.2 Kontroll av AREGs og EGFs EGFR- stimulerende effekt

For å være sikker på at den manglende proliferative effekten av AREG og EGF ikke var et resultat av dårlig kvalitet av ekstraktene, ble det satt opp forsøk for å se på ligandenes evne til å aktivere EGFR. Dette ble gjort med Westernblotting ved å se på mengden av pERK, da dette er et signalmolekyl som aktiveres nedstrøms for EGFR ved ligandbinding. Valget av konsentrasjonene 1 og 100 ng/ml av både EGF og AREG ble gjort på bakgrunn av forsøk tidligere utført i laboratoriet<sup>57</sup>. Resultatet fra dette forsøket viser tydelig at både EGF og AREG har en aktiverende effekt på EGFR. Det er likevel verdt å merke seg at til tross for like forsøksbetingelser, er mengden pERK etter stimulering med AREG mindre i prøvene fra forsøk gjort under arbeidet med denne oppgaven enn i prøvene fra tidligere forsøk. Dette kan tyde på at AREG- ekstraktet brukt i denne oppgaven muligens ikke har vært av optimal kvalitet. Noe som taler mot denne forklaringen er imidlertid at ekstraktet som ble benyttet til forsøkene var ferskt, og bestilt nettopp på grunn av det tidligere benyttede ekstraktets reduserte evne til å aktivere ERK. Det ble imidlertid ikke sett noen forskjell i ERK-aktivering mellom det nye og det gamle ekstraktet, noe som tyder på at den reduserte ERK-aktiveringen skyldes andre faktorer.

### 7.3.3 AREG- respons i LNCaP- og C4-2 celler

AREG og EGF er ligander til EGFR, en vekstfaktorreseptor som stimulerer cellene til vekst og deling. Det var derfor naturlig å forvente at tilsetning av disse ligandene til cellenes vekstmedium ville føre til økt proliferasjon. Samtidig er det verdt å merke seg at man i prostatakreftceller har sett at EGF både kan fremme proliferasjon<sup>79</sup> og differensiering<sup>80</sup> av cellene. Vi observerte imidlertid ingen effekt av EGF i våre <sup>3</sup>H- tymidin inkorporeringsassay.

Noe av forklaringen kan være at vekstmediet i seg selv inneholder vekstfaktorer, og at ekstra tilførsel av AREG eller EGF dermed ikke har noen betydning. Likevel kan man stille spørsmålstegn ved at den endrede balansen mellom disse to vekstfaktorene og andre vekstfaktorer tilstede i mediet ikke påvirket cellenes proliferasjon i noen grad, da økt aktivering av EGFR kan føre til et noe endret dimeriseringsmønster mellom ErbB-reseptorene i cellene.

Westernblotanalysen viste svakere aktivering av ERK ved tilsetning av AREG enn av EGF. Det kan være en forklaring på hvorfor det ikke fremkommer noen effekt av AREG på proliferasjon. Imidlertid er det heller ikke sett noen effekt av EGF, som gir en sterkere aktivering av ERK. Man har imidlertid ikke påvist noen korrelasjon mellom ERK- aktivitet og proliferasjon i prostatakrefteceller<sup>78</sup>. Dette gjør resultatene mer troverdige. Det er likevel viktig å være oppmerksom på at eventuelle effekter forårsaket av AREG ikke nødvendigvis vil være tilsvarende ved tilsetning av EGF, noe som begrenser EGFs rolle som positiv kontroll.

Resultatene fra disse forsøkene bør bekreftes med andre metoder før man kan utelukke at AREG har noen effekt på cellenes proliferasjon.

### **7.3.4 Konsentrasjonsavhengig effekt av Iressa® i LNCaP- og C4-2-celler**

Konsentrasjonskurvene viser en klar og konsentrasjonsavhengig proliferasjonshekkende effekt av Iressa®. Ved tilsetning av Iressa® 50 µM er den proliferasjonshekkende effekten tilnærmet total i begge de undersøkte cellelinjene.

Det må stilles spørsmålsteqn ved at proliferasjonen til cellene synker nedover mot null ved høy konsentrasjon av Iressa®. Opphøret i proliferasjon kan vanskelig forklares med hemming av EGFR alene, spesielt ikke i cellene som vokser i medium tilsatt FBS og dermed stimuleres av androgener. I konsentrasjonen 50 µM vil dessuten Iressa® også hemme reseptoren HER2, da denne har en IC50- verdi på 1,2- 3,7 µM<sup>51</sup>. Det er også mulig at andre reseptortyrosinkinaser vil kunne hemmes ved en såpass høy konsentrasjon som 50 µM.

Den proliferasjonshekkende effekten av Iressa® er høyere i LNCaP- celler enn i C4-2-celler. Dette tyder på at C4-2- celler er mindre avhengig av signalering fra EGFR enn hva LNCaP- celler er.

#### ***Proteinmåling***

Nedgangen i cellenes proliferasjon som følge av hemming med Iressa® kan skyldes toksiske effekter av Iressa®, som celledød og dermed tap av celler.

Valget av proteinmåling som kontroll for at alle brønnene under  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay inneholdt like mange celler, ble gjort på bakgrunn av funnet av at proliferasjonen til celler hemmet med Iressa® 50  $\mu\text{M}$  var tilnærmet lik null. Proteinmåling ble derfor brukt som en kontroll på at det fremdeles var celler tilstede i disse brønnene. Dette er også begrunnelsen for at dette forsøket ble foretatt på celler hemmet med Iressa®, og ikke kun celler inkubert i FBS og CSS. Resultatet fra proteinmålingen tilsier at celleantallet var jevnt, og at tap av celler ikke kan forklare den kraftige nedgangen i  $^3\text{H}$ - tymidin - inkorporering etter hemming med Iressa®.

Det kan argumenteres for at en nedgang i proliferasjon nødvendigvis vil føre til nedgang i prøvenes proteinmengde, da cellenes proliferasjon ved høsting har blitt hemmet i 2 dager før kvantifisering av inkorporert  $^3\text{H}$ - tymidin. Det vil dermed være en mulighet for at det vil være flere celler tilstede i brønner uten tilsatt Iressa® ved analysetidspunktet. Små endringer i proteinmengde mellom de ulike prøvene ville derfor være å forvente, men ble ikke sett under dette forsøket.

Forsøket ble kun utført én gang. Dette ble ansett å være tilstrekkelig, da forsøket kun var ment å bekrefte at celleantallet var jevnt i alle brønnene på platen etter mediumskift og hemming.

### **7.3.5 Konsentrasjonskurve for Iressa®s hemmende effekt med AREG eller EGF tilstede i mediet**

Her var det, på bakgrunn av resultater fra studier på NSCLC gjort av Kakiuchi et al. <sup>56</sup>, forventet at stimulering med AREG muligens kunne gi en viss beskyttende effekt mot den proliferasjonshemmende effekten til Iressa®. Dette viste seg å ikke være tilfelle i cellelinjene undersøkt i denne oppgaven. Vi benyttet konsentrasjoner av AREG som vi tidligere har vist gir en konsentrasjons- avhengig aktivering av ERK i disse cellelinjene <sup>57</sup>. Heller ikke EGF, som ble benyttet som positiv kontroll, hadde noen påvirkning på Iressa®s effekter (se punkt 7.3.6 for ytterligere diskusjon).

### 7.3.6 Konsentrasjonsavhengig effekt av AREG på Iressa®-respons

Valget av Iressa®- konsentrasjonen (1  $\mu\text{M}$ ) i dette forsøket ble gjort på bakgrunn av flere andre studier, som alle har benyttet denne konsentrasjonen i sine forsøk<sup>54;76;77</sup>.

Farmakokinetiske data fra fase I studier har dessuten vist at den maksimale serumkonsentrasjonen etter administrering av Iressa® ligger mellom 0,1 og 1,9  $\mu\text{M}$ <sup>48</sup>.

Resultatene i denne oppgaven indikerer at AREG i de undersøkte konsentrasjonene ikke har noen effekt på cellenes Iressa®- respons.

Iressa® er en nonkompetitiv hemmer av EGFR, og bindes til det intracellulære ATP-bindende setet på reseptoren. Derfor kan det anses logisk at en økning i ligandkonsentrasjon ikke medfører redusert effekt av Iressa®. Økt ligandbinding skal i teorien ikke ha noen betydning for aktivering av reseptoren dersom denne er hemmet.

Dersom Iressa® kun hadde vært bundet til en fraksjon av reseptorene, kunne man imidlertid forvente effekt av økt ligandkonsentrasjon. Resultatene i denne oppgaven viser imidlertid at effekten av AREG er fraværende selv ved moderate konsentrasjoner av Iressa®, noe som tyder på at fraksjonen av reseptorer hemmet av Iressa® ikke er av betydning.

Av denne grunn er det nærliggende å anta at den beskyttende effekten av AREG sett i NSCLC- celler medieres via andre mekanismer enn kun å aktivere reseptoren. En slik mekanisme kan for eksempel være at AREG endrer dimeriseringsmønsteret mellom EGFR og andre medlemmer i ErbB- familien i cellelinjer fra NSCLC, og på denne måten endrer signaloverføringen i cellene.

## 7.4 Nivåer av AREG mRNA i LNCaP- celler etter stimulering av ulike signalveier

På bakgrunn av tidligere studier som har vist økt uttrykk av AREG i androgenuavhengige cellelinjer<sup>57</sup>, var det ønskelig å studere ulike substansers evne til å stimulere AREG-uttrykket i de androgenavhengige LNCaP- cellene. På denne måten var det ønskelig å finne ut om det er noen endogene substanser som kan bidra til utvikling av hormonrefraktær prostatakreft. Valget av substanser ble gjort på bakgrunn av tilgjengelighet i laboratoriet på

---

det aktuelle tidspunkt, og valget av konsentrasjoner var basert på konsentrasjoner tidligere brukt under forsøk i LNCaP og andre prostatakreftecellerlinjer.

For å få konklusive data, burde det vært satt opp en konsentrasjonskurve og en tidskurve for hver enkelt substans som ble undersøkt. Dette var det imidlertid ikke mulig å utføre innenfor tidsrammen til denne oppgaven. En konsekvens er at mulige effekter av de undersøkte substansene på AREG- ekspressjonen kan ha blitt oversett, på grunn av valg av uhensiktsmessige konsentrasjoner og/eller stimuleringstider.

Resultatene som foreligger, viser at ingen av de undersøkte substansene i de angitte konsentrasjoner stimulerer til økt uttrykk av AREG mRNA innefor forsøkets tidsramme (24 timer). Derimot er det interessant at tilførsel av steroidhormonene  $17\beta$ - estradiol og R1881 førte til redusert nivå av AREG mRNA. Spesielt reduksjonen sett ved stimulering med R1881 kan tyde på at androgendeprivasjon vil gi økt AREG- uttrykk i prostatakreftecellene, fordi den mulig hemmende effekten vil bortfalle. Dette kan være med og forklare hvorfor cellelinjer som er gjort androgenuavhengige ved androgendeprivasjon uttrykker mer AREG enn hva androgenavhengige cellelinjer gjør.

Denne forklaringen stemmer også overens med økningen av AREG mRNA i celler inkubert i CSS. Resultatene kan tyde på at økt uttrykk av AREG er en viktig beskyttelsesmekanisme for cellene dersom de fratras vekstfremmende androgener.

## 7.5 Konklusjon

Iressa® utviser en tydelig proliferasjonshemmende effekt både i LNCaP- og i C4-2- celler, vist ved  $^3\text{H}$ - tymidin inkorporeringsassay. Den proliferasjonshemmende effekten av moderate konsentrasjoner (1-10  $\mu\text{M}$ ) er større i LNCaP- celler enn i C4-2- celler. Ved høyere konsentrasjon (50  $\mu\text{M}$ ) er imidlertid den proliferasjonshemmende effekten tilnærmet total i begge cellelinjer.

Den proliferasjonshemmende effekten av Iressa® påvirkes ikke ved tilførsel av EGFR- liganden AREG. På bakgrunn av funn gjort i denne oppgaven er det dermed ingenting som tyder på at AREG kan være en markør for ikke- respondenter på Iressa®- behandling.

Supplerende studier må imidlertid utføres før man fullstendig kan utelukke AREG som en slik markør.

Resultater fra RT-PCR tyder på at AREG- nivåene i LNCaP- celler er androgenregulert. Dette stemmer overens med tidligere funn, som viser at androgenuavhengige cellelinjer uttrykker høyere nivåer av AREG enn androgenfølsomme cellelinjer. Sammen med disse tidligere funnene tyder resultatene i denne oppgaven på at AREG kan være et mulig mål for fremtidig kreftterapi.

## **7.6 Fremtidige studier**

Ved Oslo Urologiske Universitetsklinikk er det opprettet en prostatabiobank, der vev fra et stort antall pasienter er samlet. Dessuten har det ved avdelingen vært foretatt en klinisk fase II studie på Iressa® i kombinasjon med antiandrogenet Casodex®. Resultatene fra denne studien er per mai 2008 ikke ferdig analysert.

For å studere effekten av høye nivåer av AREG på Iressa®- respons, kan det være aktuelt å kjøre RT-PCR på mRNA ekstrahert fra pasientprøver. Resultater herfra kan dermed sammenliknes med de kliniske effektene av Iressa® som eventuelt kommer frem av den kliniske fase II- studien.

---

## 8. Referanseliste

1. Kunnskapsforlaget (2004) *Store medisinske leksikon*. Prostata
2. Sanders,S. (2003) In Horton-Szar,D. (ed), *Crash Course: Endocrine and Reproductive Systems*. Mosby, Kent,pp. 152-153.
3. AstraZeneca Oncology. Prostate gland anatomy and physiology. AstraZeneca, Cancer Line . 2007. A. 23-4-2008.
4. [www.prostate-cancer.com](http://www.prostate-cancer.com) Prostate Cancer Treatment Guide and Prostate-cancer.com. The Prostate Gland's Anatomy, Function, and Location. . Oppdatert 2005. Besøkt 23-4-2008.
5. Kreftforeningen. Prostatakraft- til pasienter, pårørende og andre interesserte. Oppdater 2007. Besøkt 24-4-0008.
6. Culig,Z., Bartsch,G. (2006) Androgen axis in prostate cancer. *J.Cell Biochem.*, 99,373-381.
7. Drudge-Coates,L. (2005) Prostate cancer and the principles of hormone therapy. *Br.J.Nurs.*, 14,368-375.
8. Vander, Sherman, and Luciano (2004) *Human Physiology- The mechanisms of body function*. McGraw - Hill.
9. Sand,O., Sjaastad,Ø.V., and Haug,E. (2001) *Menneskets fysiologi*. Gyldendal Norsk Forlag AS.
10. Bruun Wyller,V. (2005) *Det friske og Det syke mennesket*, bind III. Akribe AS,p. 174.
11. Norsk legemiddelhandbok. (2008) Kapittel T.13.2.4, Prostatahyperplasi
12. Haukaas, Svein, Kvåle, Rune, and Melås, Elin Anita. *Kreftregisteret: Årsrapport 2006*. Kreftregisteret. Oppdatert 17-1-2008. Besøkt 21-4-2008.
13. Statens legemiddelverk (NO) and Lakemedelsverket (SE). *Terapianbefaling: Behandling av prostatakraft*. Nytt om legemidler 4. 2004.
14. [www.oncolex.no](http://www.oncolex.no), Wæhre, H. Om prostatakraft; Histologi. Rikshospitalet HF . Oppdatert 26-3-2008. Besøkt 21-4-2008.
15. National Cancer Institute, USA. Quade, G. *Prostate Cancer Treatment*.
16. Kirby,M.G. (1998) *New Perspectives in Prostate Cancer*. ISIS Medical Media,p. 139.
17. Eide, I and Angelsen, A. Prostataspesifikt antigen. *Tidsskrift for Den norske lægeforening* 2000; 120:2528-31(120), 2528-2531. 10-9-2000.

18. Gold,M.H., Brawer,M.K. (1998) New Perspectives in Prostata Cancer. ISIS Medical Media,pp. 117-125.
19. Taskén, K.A, Angelsen A., Svindland., Eide, T., Berge, V., Wahlquist, R., and Karlsen, S. Markører for påvisning av prostatakraft og prediksjon av prognose. Tidsskrift for Den norske legeförening 125(23), 3279-3282. 1-12-2005.
20. Bastian,P.J., Yegnasubramanian,S., Palapattu,G.S., Rogers,C.G., Lin,X., De Marzo,A.M., and Nelson,W.G. (2004) Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. Eur.Urol., 46,698-708.
21. Varambally,S., Dhanasekaran,S.M., Zhou,M., Barrette,T.R., Kumar-Sinha,C., Sanda,M.G., Ghosh,D., Pienta,K.J., Sewalt,R.G., Otte,A.P., Rubin,M.A., and Chinnaiyan,A.M. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature, 419,624-629.
22. Gerry J.O'Dowd, Robert W. Veltri M. Craig Miller. The Gleason Score: A Significant Biologic Manifestation of Prostate Cancer Aggressiveness On Biopsy. PCRI Insights **4.1**. 2001.
23. Humphrey,P.A. (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. Mod.Pathol., 17,292-306.
24. Abrahamsson, P-A. Radical prostatectomy and the role of hormonal therapy in early prostate cancer. 2003.
25. Savage,P., Bates,C., Abel,P., and Waxman,J. (1997) British urological surgery practice: 1. Prostate cancer. Br.J.Urol., 79,749-754.
26. Debes,J.D., Tindall,D.J. (2004) Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. N.Engl.J.Med., 351,1488-1490.
27. Pienta,K.J., Bradley,D. (2006) Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. Clin.Cancer Res., 12,1665-1671.
28. Taplin,M.E., Balk,S.P. (2004) Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. J.Cell Biochem., 91,483-490.
29. Pfizer. Preparatomtale for estramustin. Legemiddelverket . Oppdatert 30-3-2005. Besøkt 24-3-2008.
30. Ruizeveld de Winter,J.A., Trapman,J., Vermey,M., Mulder,E., Zegers,N.D., and van der Kwast,T.H. (1991) Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. J.Histochem.Cytochem., 39,927-936.
31. Chen,C.D., Welsbie,D.S., Tran,C., Baek,S.H., Chen,R., Vessella,R., Rosenfeld,M.G., and Sawyers,C.L. (2004) Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. Nat.Med., 10,33-39.
32. Ramberg,H., Eide,T., Krobert,K.A., Levy,F.O., Dizeyi,N., Bjartell,A.S., Abrahamsson,P.A., and Tasken,K.A. (2008) Hormonal regulation of beta(2)-adrenergic receptor level in prostate cancer. Prostate.



- 
33. Normanno,N., De,L.A., Bianco,C., Strizzi,L., Mancino,M., Maiello,M.R., Carotenuto,A., De,F.G., Caponigro,F., and Salomon,D.S. (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366,2-16.
  34. Scaltriti,M., Baselga,J. (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin.Cancer Res.*, 12,5268-5272.
  35. 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. *Arch.Androl*, 52,185-190.
  36. Bellezza,I., Bracarda,S., Caserta,C., and Minelli,A. (2006) Targeting of EGFR tyrosine kinase by ZD1839 ("Iressa") in androgen-responsive prostate cancer in vitro. *Mol.Genet.Metab*, 88,114-122.
  37. Herbst,R.S., Fukuoka,M., and Baselga,J. (2004) Gefitinib--a novel targeted approach to treating cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 4,956-965.
  38. Jorissen,R.N., Walker,F., Pouliot,N., Garrett,T.P., Ward,C.W., and Burgess,A.W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp.Cell Res.*, 284,31-53.
  39. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). EGFR signaling. Oppdatert 2008. Besøkt 05-05-08
  40. Steelman,L.S., Abrams,S.L., Whelan,J., Bertrand,F.E., Ludwig,D.E., Basecke,J., Libra,M., Stivala,F., Milella,M., Tafuri,A., Lunghi,P., Bonati,A., Martelli,A.M., and McCubrey,J.A. (2008) Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*, 22,686-707.
  41. Yarden,Y., Sliwkowski,M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2,127-137.
  42. Harper,M.E., Glynn-Jones,E., Goddard,L., Mathews,P., and Nicholson,R.I. (1998) Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate. *J.Pathol.*, 186,169-177.
  43. Sherwood,E.R., Lee,C. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate. *World J.Urol.*, 13,290-296.
  44. 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 Res.*, 66,5723-5728.
  45. Andersen, T. I. EGFR- Et angrepspunkt for kreftbehandling, Del 2. 18-3-2004.
  46. Olver,I.N. (2008) Trastuzumab as the lead monoclonal antibody in advanced breast cancer: choosing which patient and when. *Future.Oncol.*, 4,125-131.
  47. Penne,K., Bohlin,C., Schneider,S., and Allen,D. (2005) Gefitinib (Iressa, ZD1839) and tyrosine kinase inhibitors: the wave of the future in cancer therapy. *Cancer Nurs.*, 28,481-486.

- 
48. Baselga,J., Averbuch,S.D. (2000) ZD1839 ('Iressa') as an anticancer agent. *Drugs*, 60 Suppl 1,33-40.
  49. Cohen,M.H., Williams,G.A., Sridhara,R., Chen,G., McGuinn,W.D., Jr., Morse,D., Abraham,S., Rahman,A., Liang,C., Lostritto,R., Baird,A., and Pazdur,R. (2004) United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin.Cancer Res.*, 10,1212-1218.
  50. Fry,D.W. (2003) Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Exp.Cell Res.*, 284,131-139.
  51. Wakeling,A.E., Guy,S.P., Woodburn,J.R., Ashton,S.E., Curry,B.J., Barker,A.J., and Gibson,K.H. (2002) ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res.*, 62,5749-5754.
  52. Small,E.J., Fontana,J., Tannir,N., DiPaola,R.S., Wilding,G., Rubin,M., Iacona,R.B., and Kabbinavar,F.F. (2007) A phase II trial of gefitinib in patients with non-metastatic hormone-refractory prostate cancer. *BJU.Int.*, 100,765-769.
  53. 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. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 129,165-174.
  54. Festuccia,C., Muzi,P., Millimaggi,D., Biordi,L., Gravina,G.L., Specca,S., Angelucci,A., Dolo,V., Vicentini,C., and Bologna,M. (2005) Molecular aspects of gefitinib antiproliferative and pro-apoptotic effects in PTEN-positive and PTEN-negative prostate cancer cell lines. *Endocr.Relat Cancer*, 12,983-998.
  55. Bostwick,D.G., Qian,J., and Maihle,N.J. (2004) Amphiregulin expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 93 cases. *Prostate*, 58,164-168.
  56. Kakiuchi,S., Daigo,Y., Ishikawa,N., Furukawa,C., Tsunoda,T., Yano,S., Nakagawa,K., Tsuruo,T., Kohno,N., Fukuoka,M., Sone,S., and Nakamura,Y. (2004) Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum.Mol.Genet.*, 13,3029-3043.
  57. Bjertnes, H. Signalering fra epidermal vekstfaktor- reseptor i prostatakrefte. 2006. Hovedfagsoppgave
  58. 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 Res.*, 43,1809-1818.
  59. American Type Culture Collection. Cell Line Designation: LNCaP Clone FGC. 2004.

- 
60. Chen,Q., Watson,J.T., Marengo,S.R., Decker,K.S., Coleman,I., Nelson,P.S., and Sikes,R.A. (2006) Gene expression in the LNCaP human prostate cancer progression model: progression associated expression in vitro corresponds to expression changes associated with prostate cancer progression in vivo. *Cancer Lett.*, 244,274-288.
  61. 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. *Int.J.Cancer*, 57,406-412.
  62. Thalmann,G.N., Anezinis,P.E., Chang,S.M., Zhau,H.E., Kim,E.E., Hopwood,V.L., Pathak,S., von Eschenbach,A.C., and Chung,L.W. (1994) Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.*, 54,2577-2581.
  63. Bio-Rad. Bio-Rad Protein Assay. Oppdatert 1-1-2001.
  64. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680-685.
  65. Sambrook,J., Frisch,E.F., and Maniatis,T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
  66. [www.immobilon.com](http://www.immobilon.com). Western blotting. Oppdatert 2008. Besøkt 5-5-2008.
  67. Invitrogen™ life technologies. TRIzol® Reagent, datasheet. Oppdatert 12-6-2007.
  68. NanoDrop Technologies, Inc. ND-1000 Spectrophotometer, User's Manual. Oppdatert 2007.
  69. Quiagen. Quantitect SYBR green PCR Handbook. Oppdatert 2008.
  70. M J Research Incorporated. DNA Engine Opticon® 2 System, For Continuous Fluorescence Detection- Operations Manual. Oppdatert 2002.
  71. Livak,K.J., Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25,402-408.
  72. Applied Biosystems. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System; User Bulletin #2. 11-12-1997. Applied Biosystems.
  73. Ibekwe,A.M., Grieve,C.M. (2003) Detection and quantification of Escherichia coli O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *J.Appl.Microbiol.*, 94,421-431.
  74. Promega. Technical Bulletin: Wizard® SV Genomic DNA Purification System. (TB302). Oppdatert 2005.
  75. Mailkorrespondanse. Avsender Thoresen, G. H. Emne Proteinmåling på Blindern. Mottager Grytli, H. H. Kilde Tidligere hovedfagsstudent . Mottatt 1-2-2008.

76. Bonaccorsi,L., Marchiani,S., Muratori,M., Forti,G., and Baldi,E. (2004) Gefitinib ('IRESSA', ZD1839) inhibits EGF-induced invasion in prostate cancer cells by suppressing PI3 K/AKT activation. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 130,604-614.
77. Yano,S., Matsuyama,H., Hirata,H., Inoue,R., Matsumoto,H., Ohmi,C., Miura,K., Shirai,M., Iizuka,N., and Naito,K. (2006) Identification of genes linked to gefitinib treatment in prostate cancer cell lines with or without resistance to androgen: a clue to application of gefitinib to hormone-resistant prostate cancer. *Oncol.Rep.*, 15,1453-1460.
78. Ghosh,P.M., Malik,S.N., Bedolla,R.G., Wang,Y., Mikhailova,M., Prihoda,T.J., Troyer,D.A., and Kreisberg,J.I. (2005) Signal transduction pathways in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell proliferation. *Endocr.Relat Cancer*, 12,119-134.
79. El Sheikh,S.S., Domin,J., Abel,P., Stamp,G., and Lalani,e. (2004) Phosphorylation of both EGFR and ErbB2 is a reliable predictor of prostate cancer cell proliferation in response to EGF. *Neoplasia.*, 6,846-853.
80. Humez,S., Monet,M., Legrand,G., Lepage,G., Delcourt,P., and Prevarskaya,N. (2006) Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocr.Relat Cancer*, 13,181-195.