

Cellulære effekter av et kolkisin-prodrug som spaltes av legumain

Tina Elvestrand



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2013

Cellulære effekter av et kolkisin-prodrug som spaltes av legumain

Tina Elvestrand



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2013

Veiledere:

Professor Harald Thidemann Johansen
Professor Rigmor Solberg
Stipendiat Robert Smith

© Tina Elvestrand

2013

Cellulære effekter av et kolkisin-prodrug som spaltes av legumain

Tina Elvestrand

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2012 til mai 2013.

Jeg ønsker å rette en stor takk til mine hovedveiledere professor Harald Thidemann Johansen og professor Rigmor Solberg for god veiledning, støtte og hjelp i labarbeidet og ikke minst god hjelp i skriveprosessen.

Tusen takk til stipendiat Robert Smith for god hjelp i forsøksplanlegging, skriveprosessen og for din evne til å se løsninger på alle problemer som har dukket opp. Tusen takk til overingeniør Hilde Nilsen for god opplæring i det det praktiske arbeidet og all hjelp til celloarbeid og gjennomføring av forsøk på laben. Takk til førsteamanuensis Pål Rongved og stipendiat O. Alexander H. Åstrand for gode innspill fra Avdeling for farmasøytisk kjemi.

En stor takk til alle i 4.etasje for bidrag til det gode arbeidsmiljøet og tusen takk til gjengen på "masterstudent-kontoret" for latter, sang og oppmuntrende ord.

Sist, men ikke minst, tusen takk til familie, Lars Olav og gode venner for all støtte, forståelse, tålmodighet og oppmuntring i denne perioden!

Blindern, mai 2013

Tina Elvestrand

Sammendrag

Legumain er en lysosomal endopeptidase som normalt er uttrykt i mange humane vev. Studier har imidlertid vist at uttrykket av legumain er oppregulert i kreftsvulster, og at legumain kan være involvert i metastasering og invasivitet ved kreft. Grunnet substratspesifisiteten legumain har for å spalte peptidbindinger karboksyterminalt for asparagin (Asn), kan legumain være et interessant enzymatisk mål innen kreftbehandling.

Kolkisin er et trisyklisk alkaloid som ekstraheres fra planten *Colchicum autumnale*. Planten har vært brukt som medisin i århundrer, blant annet i behandlingen av urinsyregikt. I de senere årene har virkningsmekanismen av kolkisin vært i fokus, og bruk innen flere forskjellige terapeutiske områder har vært vurdert. Grunnet evnen kolkisin har til å binde mikrotubuli og dermed hemme mitose, har kolkisin vist et potensiale innen kreftterapi. For å unngå den generelle toksisiteten har et prodrug (Suc-Ala-Ala-Asn-Val-kolkisin) som spaltes av legumain blitt syntetisert. I denne studien ble effektene av dette prodruset undersøkt og sammenlignet med kolkisin og kolkisin-valin (-Val)

Humane nyreceller fra embryo (HEK293-celler), en monoklonal stabil legumaintransfektet HEK293-cellelinje (M38L) og tykktarmskreftcellelinjen HCT-116 ble brukt som cellemodeller. Celleviabilitet etter behandling med kolkisin, kolkisin-valin og kolkisin-prodrug ble målt ved hjelp av tetrazoliumsaltet MTS. For å verifisere at effekten av prodruset kommer av prodrug-spaltning utført av legumain, ble cellene inkubert med legumainhemmeren cystatin E/M ved behandling med kolkisin-prodrug. I tillegg ble cellene behandlet med endocytosehemmeren Dyno4a for å undersøke om kolkisin-prodrug ble tatt opp i cellene ved endocytose. Caspasehemmeren biotin-VAD-fmk ble tilsatt for å undersøke om denne kunne beskytte mot effektene av kolkisin-prodrug. Aktivitet av legumain ble målt ved bruk av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat og proteinuttrykk av legumain og caspase-3 ble undersøkt ved immunoblotting.

Celleviabilitetsmålinger viste at konjugering med den aktuelle peptidsekvensen reduserte effekten av kolkisin i HEK293. Celler som overuttrykte legumain (M38L) viste seg derimot å være sensitive for behandling med kolkisin-prodrug, mens tilsetning av cystatin E/M beskyttet cellene mot kolkisin-prodrusetts effekter. Dette bekrefter teorien om at spaltning av prodruset ble utført av legumain og styrker muligheten for målstyring av cytostatika til kreftsvulster

med høyt uttrykk av enzymet. Legumainaktiviteten ble redusert ved behandling med de forskjellige kolkisinformidelsene hvor kolkisin ga størst og kolkisin-prodrug minst effekt. I tillegg kan det se ut til at endocytose spiller en rolle i opptaket av kolkisin-prodrug i celler.

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Sammendrag	2
Innholdsfortegnelse	4
Forkortelser	6
1 Innledning.....	8
1.1 Kreft.....	8
1.2 Proteaser	9
1.3 Legumain	10
1.3.1 Aktivering.....	11
1.3.2 Funksjoner	11
1.3.3 Legumain i kreft	12
1.3.4 Cystatiner hemmer legumain	13
1.4 Kolkisin	13
1.4.1 Virkningsmekanisme og farmakologi	14
1.4.2 Bruk i dag	16
1.4.3 Andre mulige bruksområder for kolkisin	17
1.4.4 Kolkisin som kreftlegemiddel?	18
1.5 Legumainspesifikke prodrugs innen kreftmedisin	19
1.6 Kolkisin-prodrug	21
1.6.1 Hvorfor lage prodrug av kolkisin?	21
1.6.2 Kolkisinforbindelsenes struktur	21
1.7 Mål med oppgaven	22
2 Materialer og metoder	23
2.1 Kjemikalier og reagenser	23
2.2 Utstyrliste	24
2.3 Celletyper, dyrking og høsting	25
2.3.1 HEK293-celler	25
2.3.2 M38L-celler.....	25
2.3.3 HCT-116-celler	25
2.3.4 Tining og utsåing av celler	25
2.3.5 Splitting, telling og utsåing av celler til forsøk	26

2.3.6	Høsting av HEK293-, M38L- og HCT-116-celler	26
2.4	Celleforsøk.....	26
2.4.1	Celleforsøk med HEK293 og M38L behandlet med ulike konsentrasjoner av kolkisin, kolkisin-valin og kolkisin-prodrug	26
2.5	Totalproteinmåling	27
2.6	Legumainaktivitetsmåling	27
2.7	Celleviabilitetsmåling.....	28
2.8	Elektroforese og immunoblotting.....	29
2.9	Statistiske analyser	31
3	Resultater.....	32
3.1	Kolkisinforbindelser reduserer celleviabilitet til HEK293- og M38L-celler	32
3.2	Ulik effekt av kolkisinforbindelser på celleviabilitet til HCT-116-celler	34
3.3	Cystatin E/M beskytter mot den toksiske effekten av kolkisin-prodrug	35
3.4	Endocytosehemmeren Dyngo4a reduserer den toksiske effekten av 10 μ M kolkisin-prodrug	36
3.5	Immunoblott av M38L-cellelysater viser tilstedeværelsen av procaspase-3.....	37
3.6	Kolkisinforbindelser hemmer legumainaktivitet i HEK293- og M38L-celler	39
3.7	Caspasehemmeren biotin-VAD-fmk reduserer legumainaktivitet i HEK293, M38L og HCT-116.....	42
3.8	Effekt av biotin-VAD-fmk på celleviabilitet til HEK293- og HCT-116-celler etter behandling med kolkisin-prodrug	44
4	Diskusjon.....	45
4.1	Valg av cellemodeller.....	46
4.2	Celleviabilitet.....	46
4.3	Endocytose.....	49
4.4	Biotin-VAD-fmk som legumainhemmer	50
4.5	Caspase-3.....	51
4.6	Legumainaktivitet.....	52
5	Konklusjon	53
	Litteraturliste	54
	Vedlegg	58

Forkortelser

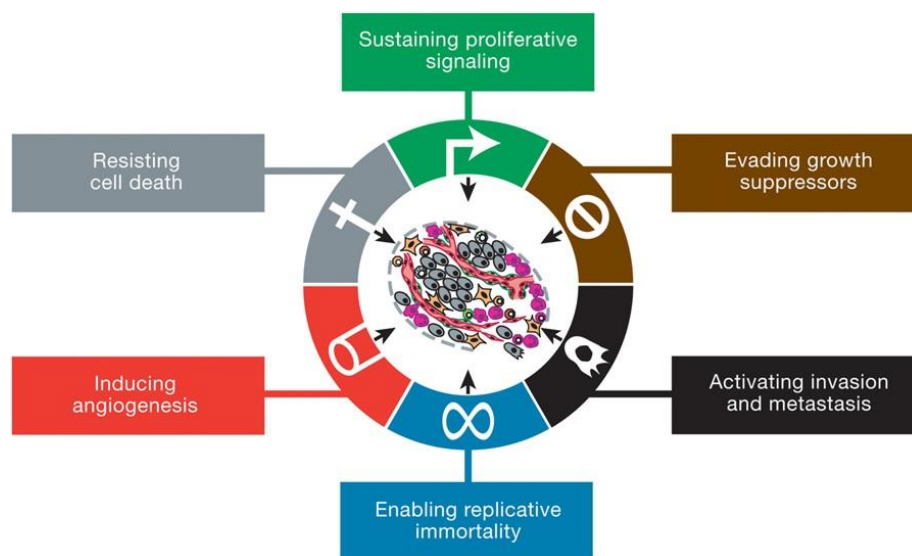
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintrifosfat
Boc	<i>Tert</i> -butyloksykarbonyl
CBZ	Karboksybenzyl
CYP	Cytokrom P450
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonnukleinsyre
DTT	Ditiotreitol
EC ₅₀	"half maximum effective concentration"
ECM	Ekstracellulær matriks
FBS	"Fetal Bovine serum", føtalt kalveserum
FDA	"Food and Drug Administration"
GAPDH	Glyseraldehyd-3 fosfatdehydrogenase
GDP	Guanosin-difosfat
GTP	Guanosin-trifosfat
G418	Geneticin®
HCT	Human colorectal adenocarcinoma cells
HEK	"Human Embryonic Kidney"
HRP	"Horseradish" peroksidase
IC ₅₀	"half maximum inhibitory concentration"
IC ₇₅	"inhibitory concentration 75 %"
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin

MHC	"Major histocompatibility complex"
MMP-2	Metalloproteinase gelatinase A
mPMS	1-metoksy-5-metyl-fenazinium metylsulfat
MTS	([3-(4-,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium) indre salt)
MTT	2-(4,5-dimetyl-2-tiazolyl)-3,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid
NADH	Nikotinamid adenindinukleotid
PBS	Fosfatbufret saltvann
PGP	Permeabilitetsglykoprotein
rpm	"rounds pr minute", runder per minutt
SDS	Natriumdodekylsulfat
SEM	"Standard error of the mean", standardfeil
Suc	Succinat (ravsyresalt)
Val	Valin
WST-1	Natrium 5-(2,4-disulfofenyl)-2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium indre salt
Z-Ala-Ala-Asn-AMC	Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-amino-4-metylkumarin

1 Innledning

1.1 Kreft

Kreft er en samlebetegnelse på sykdommer som starter med ukontrollert celledeling. I cellene finnes det gener som hele tiden styrer vekstprosessene slik at celler som skades eller dør blir erstattet av nye friske celler. I genene kan det oppstå mutasjoner som fører til at cellenes delingshastighet kommer ut av kontroll, og cellene mister sin opprinnelige funksjon. Ettersom delingen fortsetter vil det bli en opphopning av kreftceller i det organet delingen startet, og dette gir opphav til en kreftsvulst. Kreftceller kan så løsrive seg fra primærsvulsten og føres med lymfe- eller blodårer til andre deler og organer i kroppen. Dette gir opphav til nye svulster som kalles metastaser [1].



Figur 1.1. Inndeling av kjennetegn på kreftutvikling. Figuren viser inndeling av seks biologiske muligheter for kreftutvikling [2].

Kjennetegnene på kreftutvikling er mange og komplekse, men det er forsøkt å lage en inndeling med seks biologiske muligheter for utvikling av kreft (Fig. 1.1) [2]. Svulster er komplekse vev hvor mange forskjellige celletyper deltar i utallige ulike funksjoner. Blant annet har kreftceller evnen til å opprettholde kronisk proliferasjon ved å nedregulere signaler som skal påvirke normalhomeostasen i en celle. I tillegg unngår kreftcellene å gå inn i

apoptose ved å øke uttrykket av antiapoptotiske regulatorer eller nedregulere proapoptotiske faktorer.

Kreftsvulster må, som normalt vev, ha tilgang på oksygen og næringsstoffer så vel som muligheten til å kvitte seg med avfallsstoffer. Derfor må det dannes nye blodårer til en voksende svulst. Nydannelse av blodårer kalles angiogenese og i kreftsvulster er angiogenesen nesten alltid aktivert [2].

Invasjon og metastasering av kreftceller starter først med en lokal invasjon hvor makrofager i tumorperiferien gir tilgang på matriks-nedbrytende enzymer som matriksmetalloproteinaser (MMP) og cystein-cathepsiner. Deretter går kreftceller inn i nærliggende blod- og lymfeårer og så ut i vev andre steder i kroppen. Her dannes små mikrometastaser som til slutt blir til større svulster [2].

Ulike proteaser kan bidra til tumorcelleprogresjon gjennom prosessering av signalmolekyler og deres reseptorer. I tillegg kan disse effektene også resultere i en nedgang i apoptotiske funksjoner [3]. Spesielt serinproteaser og matriksmetalloproteinase gelatinase A (MMP-2) har vist seg å være involvert i angiogenese og metastasedannelse ved nedbrytning av ekstracellulær matriks (ECM) [4].

1.2 Proteaser

Proteaser blir også kalt peptidaser, proteinaser eller proteolytiske enzymer. De er en gruppe enzymer som bryter ned eller aktiverer proteiner og polypeptider ved å kløve peptidbindinger ved hydrolyse. Proteaser deles inn i seks ulike klasser etter katalytisk sete; aspartat-, cystein-, glutamat-, metallo-, serin- og treonin-proteaser. Disse er igjen delt inn i klaner basert på sin tertiære struktur, og proteaser i samme klan antas å komme fra samme evolusjonære utgangspunkt. Proteasene kan deles inn i familier etter likhet i aminosyresekvens, noe som betyr at en klan kan bestå av mange ulike familier [5]. Når spaltningen skjer i midten av proteinmolekylet kalles enzymene endopeptidaser. Spaltningen kan også skje fra enten N-terminal eller C-terminal ende av proteinet hvor enzymene kalles henholdsvis aminopeptidaser, karboksypeptidaser, eller samlebetegnelsen eksopeptidaser [6].

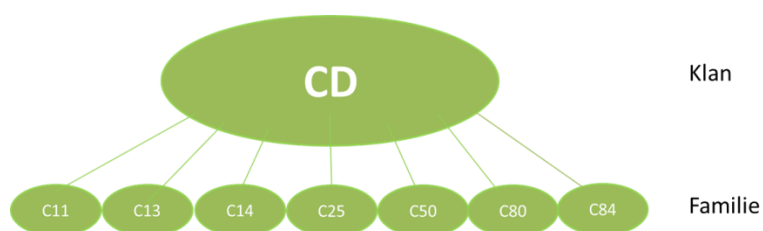
Det har blitt vist at proteaser har en viktig rolle som regulatorer i mange viktige prosesser i kroppen. Proteaser fører til irreversible spaltning av proteiner som kan være involvert i

celledeling, DNA-replikasjon, vevsdannelse, immunrespons og hemostase. Et eksempel på sistnevnte er den proteolytiske kaskaden i blodkoagulasjon. Her aktiveres serinproteaser trinnvis frem til aktivering av trombin, slik at fibrinogen aktiveres til fibrin og blodkoagulasjon skjer. Feil i proteaseaktivering kan føre til flere ulike patologiske tilstander som for eksempel osteoporose, kreft og kardiovaskulære sykdommer inkludert trombedannelse [6].

1.3 Legumain

Legumain er en lysosomal endopeptidase tilhørende C13-familien innenfor CD-klanen av cysteinproteasene (Figur 1.2). Enzymet er strukturelt beslektet med caspaser (C14) og de bakterielle proteasene clostripain (C11) og gingipain (C25) fra de patogene bakteriene *Clostridium histolyticum* og *Porphyromonas gingivalis*. I likhet med andre familier innenfor CD-klanen, viser legumain strenge krav til aminosyren i P1-posisjon i et proteinsubstrat for at kløyvning skal skje. Legumain er hittil det eneste kjente enzymet som spalter karboksyterminalt for aminosyren asparagin (Asn) [7]. Samtidig er det vist at ved sure betingelser kan legumain også spalte etter aminosyren aspartat (Asp). Ved pH 3 vil aspartat være i protonert form og dermed være funksjonelt liknende asparagin [8].

Tidligere var legumain kun kjent fra planter og parasitten *Shistosoma mansoni*. I 1997 ble legumain påvist også i pattedyr, og det ble klart at enzymet hos pattedyr var homologt til legumain fra planter og *Shistosoma* [9]. Studier har vist at legumain er uttrykt i mange mammalske vev som lever, milt og tymus, og med høyest nivå i nyrer og placenta [10].

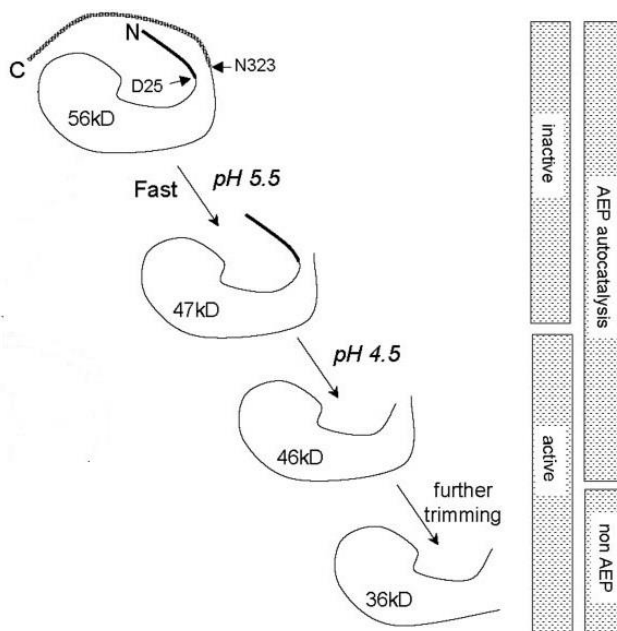


Figur 1.2. Klan CD av cysteinproteasene med tilhørende familier. Eksempler på proteaser i de ulike familiene er clostripain i C11, caspaser i C14 og gingipain R i C25, sammen med legumain som tilhører familie C13 i denne inndelingen.

1.3.1 Aktivering

Legumain dannes som et 56 kDa inaktivt proenzym kalt prolegumain. Videre prosessering er en autokatalytisk prosess som gjøres av legumain selv. Ved pH 5,5 dannes et 47 kDa inaktivt mellomprodukt ved prosessering ved Asn³²³ fra C-terminal ende (figur 1.3) Videre senkning av pH til 4,5 vil resultere i 46 kDa aktivt mellomprodukt hvor den aktiverende kløyvningen skjer ved Asp²⁵ [11].

Siste steg til den modne 36 kDa-formen av legumain skjer ikke autokatalytisk, men er mediert av andre enzymer i det sure miljøet i lysosomene. Den optimale pH for aktivering av prolegumain er vist til å være 4,5, noe som stemmer med pH-verdier målt i lysosomer fra makrofager, nyreceller og fibroblaster [12].



Figur 1.3 Aktivering av legumain. Inaktivt prolegumain (56 kDa) omdannes til 47 kDa og ved senkning av pH videre til 46 kDa, henholdsvis inaktiv og aktiv form av legumain.. Fra 46 kDa aktiv form skjer en videre prosessering gjort av andre lysosomale enzymer og sluttproduktet er 36 kDa modent legumain [11].

1.3.2 Funksjoner

Legumain har vist seg å ha flere ulike funksjoner både som et proteolytisk enzym, men også via andre mekanismer. Et eksempel på det siste gjelder i hemmingen av osteoklastdannelse og beinresorpsjon. Her er det et 17 kDa C-terminal fragment av legumain som har effekt på osteoklastdannelsen, og ikke det aktive enzymet i seg selv [13, 14]. Legumain er også

involvert i prosesseringen av mikrobielle antigener for klasse II vevstypemolekylpresentasjon (MHC-presentasjon). Proteinantigener brytes ned og danner komplekser med vevstypemolekylene på overflaten av de profesjonelle antigenpresenterende cellene for presentasjon til T-celler i immunforsvaret. At legumain er involvert ble vist etter studier med tetanustoksin-antigen hvor ingen av de kjente lysosomale cathepsinene viste seg å være ansvarlige for prosesseringen [15]. Videre er det vist at legumain er involvert i destabilisering av aterosklerotiske plakk. Økte nivåer av legumain korrelerer med økt akkumulering av inflammatoriske celler i aterosklerotiske skader. Clerin et al. har vist at monocytter/makrofager og skumceller er hovedcelletypene som uttrykker legumain i aterosklerotisk vev. En hypotese er at prolegumain kan sekreseres ekstracellulært og muligens kan gjennomgå autokalatyisk aktivering i det sure miljøet. Den aktive formen av legumain kan deretter aktivere andre sekretede lysosomale proteaser som cathepsin L og S, eller gelatinase A (MMP-2), som er involvert i aterosklerose [16].

Legumain er nødvendig for normal nyrefunksjon ved at det bryter ned proteiner og aktiverer proteaser i proksimale tubulære celler i nefronene. Knock-out-mus for legumain har vist en akkumulering av proteiner som resulterer i forstørrede lysosomer og celler [17, 18]. I tillegg kan det tenkes at legumain spiller en rolle i remodelleringen av ECM ved degradering av fibronektin, som er en av hovedbestanddelene i ECM [19].

1.3.3 Legumain i kreft

Legumain er overuttrykt i flere typer kreftsvulster, blant annet tykktarm-, bryst- og prostatakreft. Mye tyder på en induksjon av genekspresjonen *in vivo* i tumormiljøet og studier har vist at celler med et høyt uttrykk av legumain har en økt migrasjonsevne og invasive egenskaper [3]. Det er vist en korrelasjon mellom tumorinvasjon, metastasering og tilstedeværelsen av cysteinendopeptidaser (spesielt cathepsin B og L). Legumain kan prosessere cysteinproteaser, i tillegg til pro-gelatinase A (pro-MMP-2) til deres aktive former, og på denne måten bidra til svulstens kapasitet til invasivitet og metastase. Pasienter med lavt legumainuttrykk i kreftsvulster har generelt vist seg å ha en bedre prognose [20].

1.3.4 Cystatiner hemmer legumain

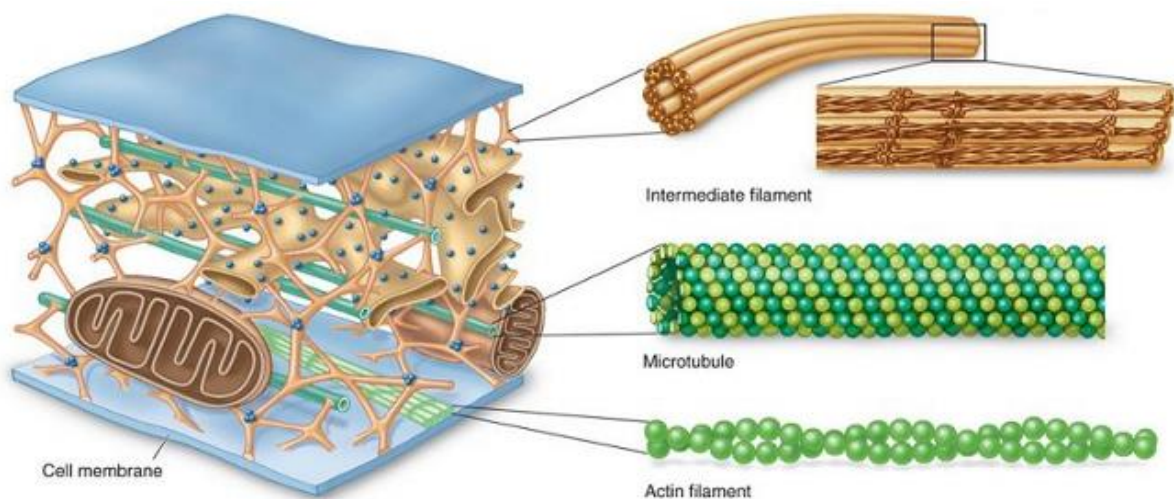
I kroppen reguleres cysteinproteaser av endogene hemmere kalt cystatiner. Ved å kontrollere aktiviteten og uttrykket av cysteinproteasene opprettholdes normale kroppsprosesser slik at sykdommer som kan oppstå ved overuttrykk unngås. Cystatiner kan deles inn i tre hovedfamilier funnet i pattedyr: type 1 (cystatin A og B), type 2 (cystatin C, D, E/M, F, G, S, SA og SN) og type 3 (L- og H-kinogener) [21]. Type 1-cystatiner er primært intracellulære proteiner uten disulfidbindinger, mens type 2 hovedsakelig er ekstracellulære sekreterte proteiner med disulfidbindinger. Molekylvekten ligger på henholdsvis ~11 og ~13-15 kDa. Type 3-cystatinene er i motsetning store glykoproteiner som i lang tid har vært kjent som forløpere for blant annet vasodilatoren bradykinin [22]. Enkelte cystatiner innen type 2-gruppen (cystatin C, E/M og F) kan hemme legumain, men cystatin E/M er den med høyest inhibitorisk kapasitet (K_i -verdi på 1,6 pM) [21]. Cystatin E/M har vært rapportert til å være sterkt involvert i ulike krefttyper ved å nedregulere invasiviteten til kreftceller. Dette skjer antagelig ved hemming av legumain og/eller cathepsin B og L, som alle muligens er involvert i metastaseringen og invasjonen av tumorceller. Av denne grunn blir cystatin E/M omtalt som en tumorsuppressor [23].

1.4 Kolkisin

Kolkisin er et trisyklisk alkaloid som ekstraheres fra planten *Colchicum autumnale* tilhørende liljefamilien. Kolkisin ble først isolert i 1820, men planten har vært i bruk innen medisinen i mange århundrer, spesielt i behandling mot urinsyregikt [24]. Kolkisin er fortsatt i bruk mot urinsyregikt i tillegg til som behandling for familiær middelhavsfeber og Beçhets sykdom. I 2009 godkjente FDA (Food and Drug Administration, USA) kolkisin som monoterapi for akutt urinsyregikt og familiær middelhavsfeber [25]. I Norge finnes kolkisin i tablettform (0,5 mg kolkisin) og brukes både profylaktisk og ved akutte anfall av urinsyregikt. Profylaktisk brukes kolkisin ofte i kombinasjon med midler som øker utskillelsen eller hemmer dannelsen av urinsyre, spesielt i oppstart av denne behandlingen [26]. Det har vært et økende forbruk av kolkisin i Norge de siste årene. Fra 2004 til 2012 var det en 3 ganger økning [27] og forbruket er størst blant menn.

1.4.1 Virkningsmekanisme og farmakologi

Cytoskjelettet i eukaryote celler består av et stort nettverk av proteinfilamenter som strekker seg utover i hele cytoplasma og er ansvarlig for intracellulær transport, segregering av kromosomene og selve delingen av cellen. Cytoskjelettet består av tre typer proteinfilamenter: intermediære filamenter, mikrotubuli og aktinfilamenter (figur 1.4), og hver av disse har ulike mekaniske egenskaper.

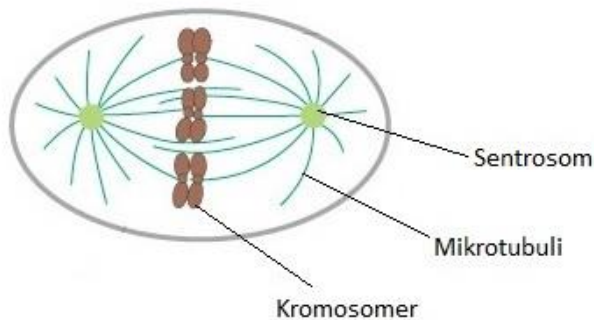


Figur 1.4 De tre typene av proteinfilamenter i cytoskjelettet til en eukaryot celle [28].

Mikrotubuli organiserer innholdet i cellen. Det består av en dimer av α - og β -tubulin bundet sammen ved non-kovalent binding. Denne dimeren stables utover fra ringer bestående av 13 γ -tubulin-molekyler plassert på ulike steder av cellens sentrosom. Sammen danner disse lange hule rør av proteiner som innehar en dynamisk ustabilitet. Dette betyr at de kjapt kan vokse, eller krympe tilbake til sentrosomet, før nye hule rør kan bygges opp igjen. Denne dynamiske ustabiliteten kommer av tubulins evne til å hydrolysere GTP til GDP etter binding til en voksende mikrotubuli. Dersom proteinfilamentet vokser kjappere enn tubulin kan hydrolysere GTP, vil filamentet fortsette å vokse helt til GTP blir hydrolysert. Deretter kan tubulin depolymerisere fra enden. Dynamisk ustabilitet er viktig for mikrotubulis funksjon som transportør og organisator i cellen, og den er spesielt viktig i den mitotiske spindelen under mitose.

Eukaryote cellers cellyklus består en interfase og en M-fase [29]. Interfasen deles opp i G_1 -, G_2 -, og S-fase hvor henholdsvis vekst og kromosomduplikasjon skjer. I M-fasen skjer selve delingen av kjernen (mitose) og deling av cytoplasma (cytokinese). Før M-fasen kan begynne

må DNA være fullstendig replikert og sentrosomet duplisert. Etter dette, når cellen er på vei inn i mitose, dannes den mitotiske spindelen som har ansvaret for fordelingen av kromosomene til de to dattercellene (figur 1.5) [29].



Figur 1.5. En celle i M-fase. Sentrosomet er duplisert, mikrotubuli vokser ut fra sentrosomene og kromosomene separeres til hver sin nye celle [29].

Kolkisin binder til β -tubulin slik at dimeren mister sin opprinnelige struktur, og dermed ikke kan brukes i mikrotubulidannelse. Når kolkisinbehandling motvirker polymeriseringen av mikrotubuli stanses den dynamiske ustabiliteten midt i mitosen og den mitotiske spindelen forsvinner [25, 29]. Når det mitotiske apparatet endres på denne måten startes en kaskade av fosforylerings- og caspaseavhengige hendelser som aktiverer apoptose [30].

Det har vært rapportert at kolkisin i tillegg kan binde til γ -tubulin, noe som også vil føre til at mikrotubuli ikke kan dannes fra sentrosomet og blant annet mitose vil hemmes. Siden γ -tubulin er overuttrykt i humane glioblastomer (ondartet hjernesvulst) og endret i brystkreftceller [31], styrkes muligheten for kolkisins plass i krefterapien.

Videre har kolkisin vist effekt på leukocytter ved å endre deres adhesjon, mobilitet og cytokinproduksjon. Sammen med endring av aktiviteten til cyclooxygenasene COX-1 og COX-2, kan dette forklare mye av de antiinflammatoriske effektene av kolkisin [32]. Den raske effekten kolkisin har i akutte anfall av urinsyregikt kan være relatert til antioksidantegenskaper, blant annet ved å hemme dannelsen av et superoksidderivat [32].

Kolkisin er en lipofil forbindelse som absorberes raskt fra ileum og jejunum. Den orale biotilgjengeligheten ligger på rundt 45 %, men med store individuelle variasjoner. Kolkisin blir metabolisert i lever ved hjelp av cytokrom P450 (CYP)-3A4 og utskillelsen via galle er

avhengig av P-glykoprotein [24]. Dette, i tillegg til at kolkisin kan forårsake diaré og oppkast, kan forklare de store interindividuelle variasjonene i responsen til kolkisin [32]. Det er også rapportert at kolkisin kan indusere CYP2C9, CYP2E1 og CYP3A4 [33]. Kolkisin har et relativt smalt terapeutisk vindu før gastrointestinale, eller mer alvorlige, bivirkninger kan oppstå. Ved en kolkisinforgiftning vil det være en latenstid på 2-6 timer før symptomene oppstår. Symptomene varierer fra brennende følelse i munn, magesmerter og oppkast til store skader på nyrer, karsystemet og respirasjonssvikt [24, 26]. Dødelig dose av kolkisin ligger på 0,8 mg/kg [32].

1.4.2 Bruk i dag

Urinsyregikt

Urinsyregikt er en betennelsessykdom i ledd som kommer av en ubalanse mellom produksjonen og utskillelsen av urinsyre i kroppen. Sykdommen rammer flest menn og andelen øker med alderen. Symptomene kommer ofte fra stortåleddet og sykdommen kalles derfor også podagra eller Kaptein Voms sykdom, men andre ledd som ankel, albue, håndledd og kne kan også rammes. Urinsyre dannes fra metabolisme av puriner og skilles normalt hovedsakelig ut av nyrer, men også noe gjennom tarm. I de fleste tilfeller er det nedsatt utskillelse gjennom nyrene som er årsak til ubalansen. Når en slik ubalanse oppstår vil urinsyre/urat (ionisert form av urinsyre) akkumuleres i blod og vev. Når vevet blir overmettet felles uratsalter ut og krystaller akkumuleres i ledd. Dermed utvikles en inflammatorisk respons ved at utfellingen av krystaller stimulerer til fagocytose av nøytrofiler. Anfallene kan trigges av fettholdige kjøttprodukter, alkohol, generelt høyt purininntak gjennom maten eller ved bruk av acetylsalisylsyre eller tiazid-diuretika. Anfallene behandles som regel med ikke-steroide antiinflammatoriske midler (NSAIDs), men kolkisin er et alternativt preparat dersom pasienten ikke tåler NSAIDs. Ved gjentatte anfall vurderes behandling med legemidler som enten hemmer produksjon av urinsyre (allopurinol) eller øker utskillelsen gjennom nyrene (probenecid), eventuelt med kolkisin i tillegg [34].

Behçets sykdom

Behçets sykdom er en kronisk inflammatorisk sykdom som rammer flere organer. Sykdommen kjennetegnes av tilbakevendende sår i munn og underliv, forskjellige hudsymptomer og øyebetennelser. De kliniske manifestasjonene antas i stor grad å skyldes vaskulitt (betennelse i åreveggen som kan svekke blodforsyningen), og i Behçets sykdom involveres alle typer blodkar, både på den arterielle og venøse siden. Diagnosen stilles etter kliniske kriterier deriblant gjentatte sår i munnhulen. Årsaken er ukjent, men i tillegg til bakterie- og virusinfeksjoner spiller både immunologi og arv en rolle. Behandlingen er symptomatisk med lokale steroider, tetrasyklin mot orale sår eller NSAIDs, kolkisin eller immunosuppressiva som systemisk behandling. Sykdommen er utbredt i Tyrkia og deler av Midtøsten, men er svært sjelden i Norge [35].

Familiær middelhavsfeber

Familiær middelhavsfeber er en sjelden sykdom i Norge, men finnes hos enkelte grupper i Midtøsten. Symptomene er feberanfall sammen med betennelse i bukhinnen, i lungehinnen eller i synovialhinnen i ledd. Anfallene varer ofte noen få dager, og pasienten er ellers helt frisk mellom anfallene. Familiær middelhavsfeber er en autosomal recessiv arvelig sykdom hvor genet som er ansvarlig for sykdommen koder for proteinet pyrin. Pyrin interagerer med mikrotubuli, og det er derfor kolkisin har blitt anvendt i behandlingen av sykdommen. En daglig dose på 1-2 mg kolkisin holder de fleste pasienter symptomfrie eller reduserer frekvensen av anfallene [36].

1.4.3 Andre mulige bruksområder for kolkisin

Residiv av perikarditt

Etter et anfall med akutt perikarditt (betennelse i hjerteposen) vil residiv kunne opptre i 10-30 % av pasientene, og dette blir ansett som den vanligste komplikasjonen [37]. Kolkisin har i flere studier vist positive effekter ved å motvirke tilbakefall av perikarditt [37, 38]. Behandling med kolkisin, i tillegg til konvensjonell behandling med antiinflammatoriske legemidler (acetylsalisylsyre eller ibuprofen), halverte tilbakefallsraten etter 18 måneder i en studie med 120 pasienter fra fire italienske sykehus [37].

I tillegg ble symptomvarigheten og antall residiver redusert med tilleggsbehandling med kolkisin mot kun den konvensjonelle behandlingen. Den farmakologiske effekten av kolkisin på perikarditt ser ut til å være relatert til dets evne til å stoppe mikrotubulidannelse og dets oppkonsentrering i leukocytter, for dermed å kunne gi en antiinflammatorisk effekt [37].

Hindre tilbakefall av kardiovaskulær sykdom

Pasienter som behandles med statiner og plateaggregasjonshekkere ved kardiovaskulær sykdom har likevel en risiko for kardiovaskulære hendelser. Årsaken kan være at den tradisjonelle behandlingen ikke behandler den inflammatoriske delen av sykdommen. Tilstedeværelse av aktiverte nøytrofiler i aterosklerotiske plakk gir mulighet for at ved å hemme deres funksjon kan risikoen for sykdomsprogresjon reduseres. Nylig har en klinisk studie vist at kolkisin ga gode resultater i hemmingen av kardiovaskulære hendelser hos pasienter med kardiovaskulær sykdom [39]. Studien var en randomisert blindet studie hvor 532 pasienter med etablert stabil kardiovaskulær sykdom ble inkludert. Kolkisin (0,5 mg) eller placebo ble gitt daglig, i tillegg til annen standardterapi (statiner, clopidogrel og/eller acetylsalisylsyre). Resultatene viste at pasienter som fikk kolkisinbehandling hadde en signifikant redusert risiko for kardiovaskulære hendelser som hjerteinfarkt, hjertestans og slag. [39].

1.4.4 Kolkisin som kreftlegemiddel?

Flere antimitotiske legemidler blir i dag brukt innenfor kreftterapien. Disse kan deles inn i fire ulike klasser etter bindingssete for legemiddelet: laulimalide-, taksan-, vinka-alkaloid- og kolkisin-bindingssetet. Taksanene, inkludert paklitaksel, binder til polymeriserte mikrotubuli på den indre overflaten av β -tubulin og hindrer dermed depolymerisering. Vinka-alkaloidene fremmer depolymerisering ved binding mellom to $\alpha\beta$ -dimere [25]. Resultatet av behandling med disse forbindelsene er det samme som for kolkisin; stans i celledelingen. Siden kreftceller gjennomgår mitose ved en raskere hastighet enn normale celler, betyr dette at kreftceller er mer sensitive for antimitotiske legemidler.

I motsetning til de fleste andre celler er endotelceller i blodårer i en svulst avhengig av tubulin og ikke aktinfilamenter for å opprettholde sin cellemorfologi [40]. Kolkisinformidlinger kan av den grunn motvirke dannelsen av nye blodårer (angiogenesehekkere) [25, 40], ødelegge

eksisterende blodårer ved at endotelcellene mister sin opprinnelige form, og på denne måten forårsake blodkoagulasjon og nedsatt perfusjon. Dermed får ikke cellene i svulstens nærmiljø nok oksygen og næringsstoffer, noe som igjen leder til vevsnekrose. Likevel finnes det hittil ingen legemidler innen kreftbehandling som binder til bindingssetet for kolkisin på mikrotubuli [40].

1.5 Legumainspesifikke prodrugs innen kreftmedisin

Fellestrekk for forbindelser brukt i kreftmedisin er at de er toksiske både for kreftceller og normale celler. Dette gjør at de ofte må gis i lavere doser for å begrense bivirkninger, noe som nedsetter deres effektivitet som antitumorlegemiddel. For å unngå den store påvirkningen av normalvevet har det blitt undersøkt om tumormiljøet har noen spesielle egenskaper som kan brukes til målstyring av legemidlene.

Det finnes litteratur som tar for seg den proteolytiske substratspesifisiteten til legumain og dets rolle og overuttrykk i tumormiljø. Flere ulike prodrugs med legumain som enzymatisk mål har blitt designet og felles for disse er tanken om en redusert toksisitet overfor normalvev.

Toksisiteten til doksorubicin blir ikke endret ved addisjon av et leucin-molekyl på aminogruppen i molekylet, men ved videre addisjon av aminosyrer reduseres den cytotoxiske aktiviteten [3]. Ut i fra disse funnene har det blant annet blitt syntetisert et prodrug kalt LEG-3/Legubicin [3, 41]. LEG-3/Legubicin ble syntetisert ved addisjon av ravsyre/butoksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-leucin (Suc/Boc-Ala-Ala-Asn-Leu). Boc brukes som beskyttelsesgruppe på N-terminal ende under syntesen, men fjernes i noen tilfeller for addisjon av Suc [42]. I tillegg vil tilstedeværelse av Boc [3] eller Suc beskytte peptidsekvensen mot hydrolyse av aminopeptidaser. På grunn av forbindelsens peptidsekvens antas den å kunne bli spaltet av legumain [3, 41].

Studiene viste at LEG-3/Legubicin var lite toksisk for kontrollceller som ikke uttrykker legumain [3, 41]. For celler transfektert med legumain-cDNA og som uttrykker legumain på celleoverflaten viste LEG-3 en EC₅₀-verdi (halvparten av maksimum effektiv konsentrasjon) på omtrent samme nivå som for doksorubicin. Doksorubicin tilsatt cellekulturer ble kjøpt tatt opp i cellene mens LEG-3 forble ekstracellulært, noe som stemmer overens med den reduserte

toksisiteten. Ved tilsetning av LEG-3 til legumain-overuttrykkende celler i kultur ble endeproduktet doksorubicin funnet i cellene, og dette bekreftet teorien om ekstracellulær spaltning [41]. Den cytotoxiske effekten av Legubicin var mindre enn 1 % av effekten doksorubicin har på kontrollceller, mens Legubicin i legumain-overuttrykkende celler viste en fremtredende toksisitet [3]. Med dette ble det konkludert at doksorubicin-prodrugs har signifikant forbedret terapeutisk sikkerhet og tilsvarende effekter sammenlignet med doksorubicin [3, 41].

Etoposid er et annet mye brukt kreftlegemiddel, men bruken begrenses av mange bivirkninger, lav vannløselighet og den induerte legemiddelresistensen som oppstår etter gjentatte behandlinger. Et etoposid-prodrug vil kunne unngå disse begrensningene og øke effektiviteten og sikkerheten av etoposid som et kreftlegemiddel. Prodruset ble syntetisert ved addisjon av karbobenylloxy-alanin-alanin-asparagin-etylendiamin til etoposid (CBZ-Ala-Ala-Asn-etylendiamin-etoposid) [43]. CBZ brukes som beskyttelsesgruppe under peptidsyntese tilsvarende Boc i tidligere eksempel. Prodruset er designet for å spaltes av legumain til etylendiamin-etoposid, før denne videre frisetter etoposid ved fysiologisk pH. Legumain-overuttrykkende HEK293-celler viste spaltning av prodruset, men ingen effekt på proliferasjonen ble vist. Teoriene for dette var blant annet at etylendiamin-etoposid ikke gikk ut av lysosomene etter spaltning eller at fritt etoposid ikke ble frigjort i cytoplasma. I tillegg kunne det tenkes at prodruset enten ikke ble tatt opp i lysosomene eller tatt opp i cellene i det hele tatt [43].

Auristatin er et mye mer potent kreftlegemiddel enn for eksempel doksorubicin og taksol, selv om virkningsmekanismen ligner taksols, begge via hemming av mikrotubuli. Auristatin har også en ikke-selektiv toksisitet ovenfor normalvev og av den grunn har en prodrugstrategi for substratspesifisiteten til legumain også blitt utviklet for auristatin. Flere forbindelser ble undersøkt og prodrug av auristatin-analogene DDAE og MMAE viste høyere toksisitet i celler med høyt innhold av legumain. Forsøk har vist at disse auristatin-prodrugene kan hindre tumorvekst og metastase uten toksisitet [44]

1.6 Kolkisin-prodrug

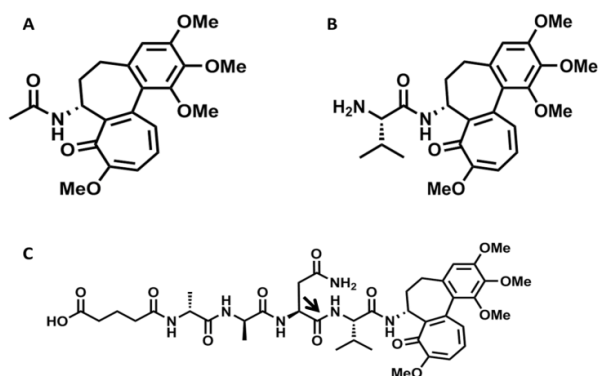
1.6.1 Hvorfor lage prodrug av kolkisin?

Grunnet virkningsmekanismen til kolkisin som mitosehemmer og dens likhet med andre antimitotiske legemidler allerede på markedet, har kolkisin eller kolkisin-liknende forbindelser vært i søkelyset for bruk innen kreftterapi. På grunn av den generelle toksisiteten av kolkisin på normalvev har ikke kolkisin hittil fått en plass innen dette området. Det ble vurdert at ved å syntetisere et prodrug som kan unngå den generelle toksisiteten, kunne kolkisin ha en mulig plass innen kreftterapi. Tanken var at prodruset skal spaltes og frigjøre aktivt kolkisin i kreftsvulster ved å utnytte substratspesifisiteten og tilstedeværelsen av legumain i tumormiljø. På denne måten tenkes det at den generelle toksisiteten av kolkisin kan unngås.

Det aktuelle prodruset ble syntetisert ved Avdeling for farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk institutt, UiO. Syntesen var del av masteroppgaven "Syntese og biologisk evaluering av nye legumainsubstrater med antineoplastisk effekt, som mulige selektive hemmere av tumorvekst" til Luan Minh Nguyen (2012).

1.6.2 Kolkisinforbindingenes struktur

Figur 1.6 viser struktur av kolkisin (A), kolkisin-valin (B) og kolkisin-prodrug (C) brukt i denne oppgaven. Kolkisin-prodrug forventes spaltet av legumain (angitt ved pil) slik at produktet blir kolkisin-valin.



Figur 1.6 A. Kolkisin B. Kolkisin-valin C. Kolkisin-prodrug (N-Suc-Ala-Ala-Asn-Val-Kolkisin) (O. Alexander H. Åstrand, personlig meddelelse)

1.7 Mål med oppgaven

Målene med denne oppgaven er å:

- Undersøke om det å konjugere kolkisin med valin (Val) eller Ala-Ala-Asn-Val reduserer den generelle toksisiteten av kolkisin som en prodrugstrategi innen kreftterapi.
- Undersøke om den cytotoksiske effekten av prodrug er større i celler som overuttrykker legumain i forhold til celler med lite endogent uttrykk av legumain.
- Bekrefte betydningen av legumain for effekten av kolkisin-prodrug ved å bruke hemmere av legumain (cystatin E/M eller caspasehemmeren biotin-VAD-fmk) i tillegg til å undersøke om prodruset tas opp i cellene ved endocytose ved hjelp av en endocytosehemmer (Dyngo4a).
- Studere om kolkisin og kolkisinforsbindelsene har effekt på legumainaktivitet i ulike celletyper.

2 Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier og reagenser

10 X Tris/Glycine Buffer (#161-0771)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Albuminstandard (23209)	Thermo Scientific, USA
Anti-biotin HRP- antistoff (#7727)	Cell Signaling Technology®
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad Laboratories Inc
Biotin-VAD-fmk	Merck, Darmstadt, Tyskland
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (G3580)	Promega Corporation, Madison, USA
Colchicine (C9754)	SIGMA ALDRICH™, Missouri, USA
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, gibco® (42430-025)	Life Technologies, Carlsbad California, USA
DMSO- Dimetylsulfoksid, (CH ₃) ₂ SO (D2650)	SIGMA ALDRICH™
DTT, ditiotreitol (438117)	SIGMA ALDRICH™
Fetal Bovine Serum Gold (A15-151)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Østerrike
G418 disulfate salt solution (060M0812)	SIGMA ALDRICH™
Geit anti-human polyklonalt antistoff mot Caspase-3 (AF-605-NA)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Geit anti-mus- IgG (H+L)-HRP Konjugat (#170-6516)	Bio-Rad Laboratories Inc
Geit anti-human polyklonalt antistoff mot legumain (AF-2199)	R&D Systems
Kolkisin-prodrug	Pål Rongved, O. Alexander H. Åstrand, Luan Minh Nguyen, Farmasøytisk insitutt, UiO, Oslo
Kolkisin-valin	
Mus anti-human monoklonalt antistoff mot GAPDH (F0111)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Texas, USA
Natriumklorid, NaCl (1.06404.1000)	Merck
NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel, Novex® (NP0322)	Life Technologies
NuPAGE® Antioxidant, Invitrogen™ (NP0005)	
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) (NP0001)	
Penicillin/Streptomycin (100X) (P11-010)	PAA Laboratories GmbH
Polyklonal kanin anti-geit immunoglobulin (P0160)	Dakocytomation, Glostrup, Danmark
Ponceau løsning (P71701L)	SIGMA ALDRICH™
Precision Plus Protein™ All Blue Standards (161-0373)	Bio-Rad Laboratories Inc
Restore™ Western Blot Stripping Buffer (21059)	Thermo Scientific, USA
rhLegumain recombinant human (2199-cy)	R&D Systems
Sodium Pyruvate Solution (100 mM) (S11-003)	PAA Laboratories GmbH
Streptavidin Horseradish peroxidase conjugated (#21126)	Thermo Scientific
Supersignal® West Dura Extended Duration Substrate (34076)	

Tørrmelk	Normilk, Levanger, Norge
Tris (base), (T1503)	SIGMA ALDRICH™
Trypan blue stain 0,4 % (T10282)	Life Technologies
Trypsin-EDTA 0,25%, GIBCO® (25200-056)	
Tween 20 (170-6531)	Bio-Rad Laboratories Inc
Z-Ala-Ala-Asn-AMC, legumainsubstrat	Bachem, Budendorf Sveits Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK

2.2 Utstyrliste

Amersham™ Hybond™-ECL membran	GE Healthcare,
BioHit Optifit tip pipettspisser, 10, 200, 1000 µl	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Finland
ECL Semi-dry blotters Blottemaskin	Amersham Biosciences, Storbritannia
Class II type A2-LAF-benk	ESCO, Singapore
Corning® 15 ml Sentrifugerør (430791)	Corning Incorporated, NY, USA
Corning® 50 ml Sentrifugerør (430829)	
Corning® 50 ml Sentrifugerør (430921)	
Corning® 75 cm ² Celleflaske (3276)	
Corning® 96-brønnersbrett (3598)	
Costar® 6-brønnersbrett (3506)	
Costar® 5 ml pipette (4051)	
Costar® 10 ml pipette (4101)	
Costar® 25 ml pipette (4251)	
Countess automated cell counter	
Digital Dry Bath	Labnet international Inc. , USA
Dri-Block DB-2A	Techne, Storbritannia
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific
Holten LaminAir LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Inkubatorskap- Galaxy 170S	Eppendorf, Connecticut, USA
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Nunc 96- brønners Mikrotiterplate	Nunc, Roskilde Danmark
Olympus CKX41 Mikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
SUB Aqua 12 vannbad	Grant, Cambrigde, England
The Belly Dancer	Stovall Life Science Greensboro, NC, USA
Wallac Victor 3 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer, USA
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Life Technologies, USA

2.3 Celletyper, dyrking og høsting

2.3.1 HEK293-celler

HEK293, Human Embryonic Kidney 293, (American Type Culture Collection: ATCC: CRL-1573TM) kommer fra en HEK-cellelinje stabilt transformert med venstre arm av adenovirus 5-DNA i kromosom 19 av vertsgenomet [45]. HEK293-cellelinjen har egenskaper som gjør at de er lette å transfektere og gir gode muligheter til å produsere funksjonelle proteiner. De vokser godt og er enkle å vedlikeholde, noe som sammen med den effektive proteinproduksjonen gjør disse cellene ideelle for mange typer celleforsøk [45].

2.3.2 M38L-celler

M38L er en monoklonal stabil HEK293-cellelinje som er transfektert med humant cDNA for legumain og som derfor overuttrykker legumain [46]. Plasmidvektoren som bærer legumain cDNA inneholder også resistensgener mot antibiotikumet Geneticin® (G418). Dette innebærer at celler som eventuelt ikke har blitt transfektert selekteres ut ved behandling med G418.

2.3.3 HCT-116-celler

HCT-116, human colorectal adenocarcinoma cells (ATCC: CCL-247TM) er en kreftcellelinje fra tykktarmskarsinom av human opprinnelse. De er adherente i vekst og vokser godt ved skift av medium hver 2.-3. dag.

2.3.4 Tining og utsåing av celler

Celler og vev kan fryses ned og oppbevares i flytende nitrogen (-196 °C) for deretter å kunne tines opp til bruk i forskning [47]. Ved tining og utsåing av HEK293-, M38L-, og HCT-116-celler varmes 10 ml HEK-medium (vedlegg) til 37 °C. Celleampullen tas ut av nitrogentanken og tines raskt under omdreining på vannbad i 40-60 sekunder, før ampullen tørkes med 70 % etanol og det tinte cellematerialet overføres til mediet. Deretter dyrkes cellene i celleflasker ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.3.5 Splitting, telling og utsåing av celler til forsøk

HEK293-, M38L-, og HCT-116-cellene splittes og såes ut på samme måte. Mediet suges av og cellene vaskes én gang med DMEM uten tilsetninger. Deretter tilsettes 2 ml trypsin-EDTA for å løsne cellene fra celleflasken. Etter fem minutter inkubering i varmeskap med trypsin-EDTA, tilsettes 10 ml nytt HEK-medium med serum. Serum brukes for å inaktivere trypsin-EDTA og suspensjonen overføres til et 50 ml sentrifugerør før sentrifugering ved 800 rpm i fem minutter. Medium suges av og cellepelletten resuspenderes i nytt medium før celletettheten bestemmes. Dette gjøres ved at 10 µl celledensitasjon og 10 µl trypanblått blandes før 10 µl måles med automatisk celledetektor (Countess™). Nye løsninger av medium og celledensitasjon lages ut fra ønsket konsentrasjon til forsøk og informasjon fra celledetektor. Nye stamflasker blir opprettet og M38L får i tillegg 160 µl av antibiotikumet G418 til 10 ml HEK-medium.

2.3.6 Høsting av HEK293-, M38L- og HCT-116-celler

Høsting av celler i 6-brønnersbrett gjøres etter følgende prosedyre: Medium suges av og kastes eller overføres i eppendorfrør, ettersom hva som er ønskelig av eventuelle analyser. Dersom medium fra brønnene ble tatt vare på, sentrifugeres disse på 800 rpm i fem minutter slik at pellet dannes. Denne resuspenderes i 250 µl lysisbuffer (vedlegg). Cellene vaskes forsiktig med 1 ml 1 x PBS (vedlegg) før løsningen suges av og kastes. Til hver brønn tilsettes 0,5 ml lysisbuffer og cellene spyles og skraper løse, før lysatet overføres til merkede eppendorfrør. Deretter frysetines alle rørene ved henholdsvis -70 °C og varmeblokk 30 °C, totalt tre ganger før rørene sentrifugeres ved 10 000 G i fem minutter og supernatanten overføres til nye rør, klare til analyse.

2.4 Celleforsøk

2.4.1 Celleforsøk med HEK293 og M38L behandlet med ulike konsentrasjoner av kolkisin, kolkisin-valin og kolkisin-prodrug

HEK293 og M38L ble splittet og sådd ut (2.3.5) i 6-brønnersbrett, $2,5 \times 10^5$ celler per brønn. Brettene ble inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Deretter ble 10 µl av ulike

konsentrasjoner av kolkisin, kolkisin-valin eller kolkisin-prodrug tilsatt før brettene inkuberes i nye 24 timer før høsting (2.3.6) og analyser.

2.5 Totalproteinmåling

Totalproteinmåling utføres etter prosedyre beskrevet av Bradford [48]. Konsentrasjon av protein måles ved tilsetning av et fargestoff, Coomassie Plus Protein Assay Reagent. Fargestoffet binder proteiner i prøvene og det skjer et skift i absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm. Bindingen mellom fargestoffet og proteiner er en rask prosess og etter cirka to minutter er prosessen komplett slik at økningen i absorbans ved 595 nm kan måles [48].

Albuminstandard (0, 50, 100, 200, 300 og 400 µg/ml) tilsettes i to paralleller og lysat fra forsøk (10 µl) i tre paralleller til en klar mikrotiterplate. Deretter tilsettes 200 µl av en 1:5-fortynning av Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate Reagent til alle brønner. Platen står i fem minutter før absorbansmåling ved 595 nm i mikroplateleser (Wallac Victor³ 1420 Multilabel Counter). Konsentrasjonene av albuminstandard brukes til å etablere en standardkurve som brukes til utregning av totalprotein.

2.6 Legumainaktivitetsmåling

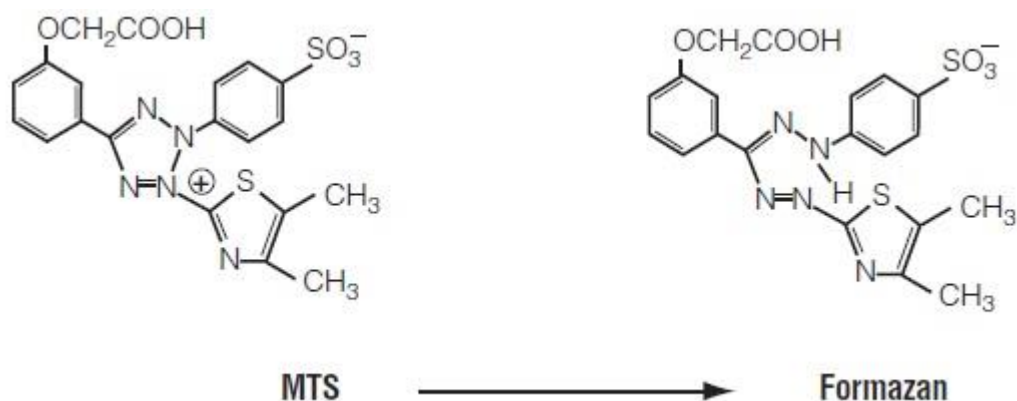
Legumainaktivitet måles ved hjelp av et spesifikt fluorescerende peptidsubstrat, Z-Ala-Ala-Asn-AMC, beskrevet av Chen et al. [9] og Johansen et al. [49]. Substratet spaltes av legumain og AMC (4-metyl-7-kumaryl-amid) er "leaving group". AMC har høyere fluorescens når det er fritt, enn når det er bundet til resten av peptidet.

Prøvene (20 µl) og blindprøve (20 µl lysisbuffer) tilsettes i triplikater i et svart 96-brønners-brett. Brettet settes inn mikroplateleser (Wallac Victor³ 1420 Multilabel Counter) hvor 100 µl assaybuffer (vedlegg) med reduksjonsmiddel (ditiotreitol, DTT) tilsettes hver brønn slik at cysteinproteasen blir aktiv. Rett før målingen tilsettes 50 µl substratoppløsning (vedlegg) slik at sluttkonsentrasjon i brønnen blir 10 µM. Brettet ristes i ti sekunder etter hver av tilsetningene og i tre sekunder før målinger. Repeterte målinger ved 360 nm for eksitasjon og 460 nm for emisjon måler økningen i fluorescens over tid og økningen i fluorescens pr. sekund ($\Delta F/sek$) blir kalkulert [49].

2.7 Celleviabilitetsmåling

Tetrazoliumsalter er av de mest brukte verktøy for å måle metabolsk aktivitet i ulike celletyper innen cellebiologi. Tetrazoliumsalter har en positivt ladet kvarternær tetrazolring med fire nitrogenatomer. Denne ringen er omringet av tre aromatringer med ulike substitusjonsgrupper. Når disse forbindelsene reduseres, brytes tetrazolringen, og det dannes fargete produkter kalt formazaner. Fra en tidlig prototypeforbindelse har det, med mange modifiseringer, blitt produsert flere forskjellige tetrazoliumforbindelser med ulike egenskaper.

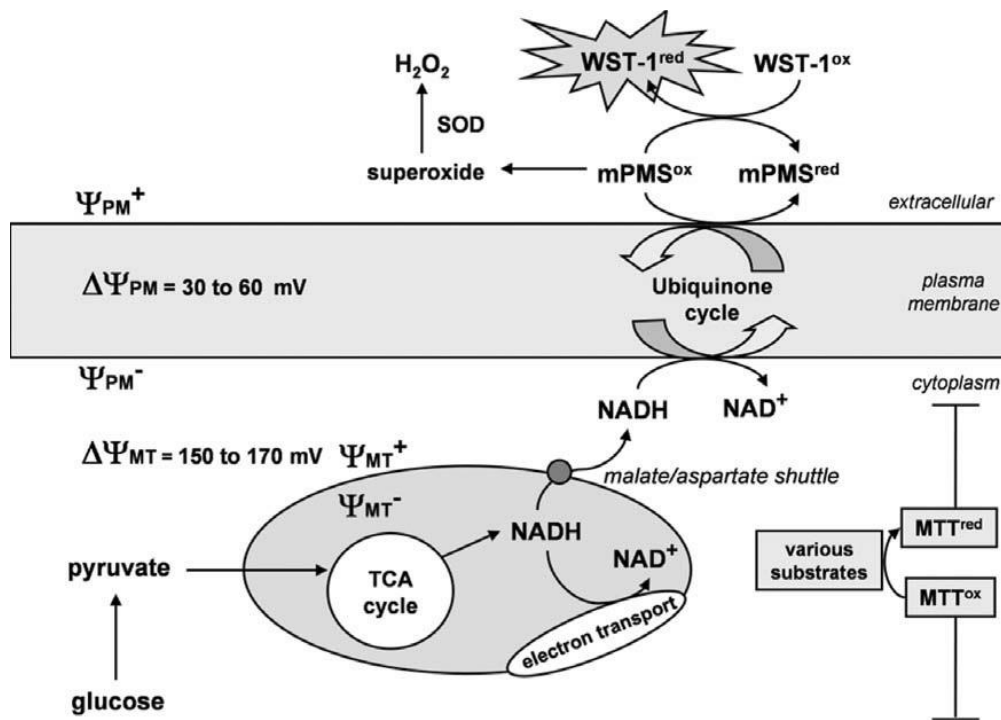
MTT (2-(4,5-dimetyl-2-tiazolyl)-3,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid), en forløper for MTS ([3-(4-,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium)), har en positiv ladning på tetrazolringen som muliggjør overføring over plasmamembranen til levende celler på grunn av cellens negative membranpotensial på innsiden. MTS (figur 2.1) har derimot en negativt ladet sulfonatgruppe på en av fenylingene som motvirker denne positive ladningen, og det dannes et "indre salt". Sammen med den svakt sure karboksygruppen blir overføring over plasmamembranen vanskelig. Likevel er det vist at MTS i en viss grad kan krysse plasmamembranen, noe som kan komme av at de generelle lipofile egenskapene til dels kan motvirke noe av den svake negative ladningen [50].



Figur 2.1. Struktur av MTS-reagens og dens omdanning til farget formazanprodukt.

Figur 2.2 viser intracellulær og ekstracellulær reduksjon av tetrazoliumsalter representert ved MTT og den løselige, negativt ladede WST-1 (natrium 5-(2,4-disulfofenyl)-2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-2H-tetrazolium indre salt). Intracellulær reduksjon av MTT skjer ved hjelp av flere ulike reduserende forbindelser, men NADH har vist seg å være den favoriserte forbindelsen som elektrondonor. WST-1 reduseres ekstracellulært og krever en intermediær

elektronakseptor, i dette tilfelle representert ved mPMS, som plukker opp elektroner ved celleoverflaten, danner et radikal-intermediat og videre kan redusere tetrazoliumforbindelsen. På grunn av sin struktur reduseres MTS-reagenset i størst grad ekstracellulært ved hjelp av en intermediær elektronakseptor og elektroner fra intracellulær NADH, men noe intracellulær reduksjon kan også være mulig [50].



Figur 2.2. Foreslåtte mekanismer for ulike tetrazoliumforbindelser. MTT reduseres intracellulært, hovedsakelig av elektrondonoren NADH. WST-1 reduseres ekstracellulært ved hjelp av en intermediær elektronakseptor mPMS [50].

Celleviabilitet i disse forsøkene er målt ved hjelp av MTS hvor 20 μ l MTS-reagens tilsettes cellene i et 96-brønnersbrett. Cellene inkuberes i varmeskap og absorban måles ved 490 nm i mikroplateleser én gang per time i fire timer. Alle brett inneholder blindprøver, det vil si brønner med kun cellemedium og MTS-reagens, for å kunne korrigere for absorban fra uomdannet MTS-reagens i mediet.

2.8 Elektroforese og immunoblotting

Cellelysater fra celleforsøk ble forberedt for elektroforese og immunoblotting. Grunnet høyt legumaininnhold i M38L-cellelinjen ble det valgt kun 1,5 μ g som proteinmengde til hver brønn i elektroforesegelen. Utrengnet fra totalproteinmålinger, fortynnes riktig volum av

lysatsen i lysisbuffer slik at totalvolum blir 13 μ l. Dette tilsettes 5 μ l av 4 x Sample Buffer og 2 μ l av 0,5 M DTT, blandes på vortex og varmes i 10 minutter ved 70 °C (elektroforeseprøve; vedlegg) før prøvene er klare for applikasjon på polyakrylamidgelen (NuPAGE® 4–12 % Bis-Tris Gels). Varming med DTT tilstede denaturerer proteinene ved at disulfidbindingene i proteinstrukturen brytes.

Gelen settes på forhånd i et elektroforesekar som fylles med 800 ml elektroforesebuffer (vedlegg) og 500 μ l antioksidant (NuPAGE® Antioxidant) før prøve (15 μ l), proteinstandard eller rekombinant legumain tilsettes brønnene. Natriumdodekylsulfat (SDS) denaturerer proteinene ytterligere og gir dem en uniform negativ ladning, slik at de vandrer etter størrelse og ikke den primære ladningen. Antioksidant tilsettes for å holde proteinene i redusert tilstand. Elektroforesen går med 200 volt i 50 minutter og proteinene separeres ved at de minste proteinene vandrer lengst.

Proteinene overføres til en nitrocellulosemembran ved hjelp av blottebuffer (vedlegg) og en blottemaskin med 32 mA per gel i cirka 90 minutter. Membranen blokkes så i blotto (vedlegg) for å blokkere ikke-spesifikk binding til membranen. Membranen har en stor evne til å binde proteiner og siden antistoffene i seg selv er proteiner, må denne interaksjonen blokkeres slik at antistoff kun bindes til målprotein. Membranen inkuberes med primærantistoff over natt på kjølerom og i 1 time med sekundærantistoff neste dag. Tabell 2.3 viser oversikt over primær- og sekundærantistoff som ble brukt. Primærantistoff er spesifikt for det proteinet vi ønsker å detektere og sekundærantistoff er spesifikt for primærantistoffet. Sekundærantistoff er konjugert med enzymet horseradish peroxidase (HRP) som i kompleks med "Supersignal® West Dura Extended Duration"-reagens detekteres av Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS⁺.

Stripping og reblotting av membranene ble gjort slik at deteksjon for caspase-3, legumain og GAPDH ble gjort på de samme membranene. Membranene ble kvantifisert og korrigert for "loading" ved hjelp av GAPDH som "housekeeping-kontroll".

I de ulike forsøkene med biotin-VAD-fmk (hele celler og cellelysatforsøk) ble det ikke korrigert for totalprotein før prøvene ble forberedt til elektroforese. Dette betyr at 13 μ l lysat uten fortykning i lysisbuffer ble brukt til å lage elektroforeseprøvene (vedlegg), før samme prosedyre som tidligere ble fulgt videre. Disse membranene ble fremkalt direkte med sekundærantistoff anti-biotin HRP-antistoff, og reblottet med Streptavidin-HRP-antistoff uten

inkubering med primærantistoff. Deretter ble disse membranene reblottet for deteksjon av legumain på vanlig måte.

Tabell 2.1. Oversikt over primær- og tilhørende sekundærantistoffer.

Protein	Primærantistoff	Fortynning	Sekundærantistoff	Fortynning
Legumain	Geit anti-human polyklonalt antistoff mot legumain	1:1000	Kanin anti-geit immunoglobulin/HRP	1:5000
GAPDH	Mus anti-human monoklonalt antistoff mot GAPDH	1:10000	Geit anti-mus IgG (H+L)-HRP-Konjugat	1:1500
Caspase-3	Geit anti-human polyklonalt antistoff mot caspase-3	1:400	Kanin anti-geit immunoglobulin/HRP	1:5000
Streptavidin		-	Streptavidin Horseradish peroxidase (HRP) conjugated	1:1000
Biotin-VAD-fmk		-	Anti-biotin HRP- antistoff	1:1000

2.9 Statistiske analyser

Resultatene i denne oppgaven er oppgitt som gjennomsnitt \pm standardfeil (SEM) eller relative gjennomsnitt \pm SEM sammenlignet med kontroll. Gjennomsnittsverdiene er beregnet fra parallellene i forsøkene og antall forsøk (n) varierer fra 1-6.

I celleviabilitetsmålingene er to-utvalgs t-test (paret t-test) brukt for å undersøke om de observerte forskjellene mellom celletyper, kolkisforbindelser og/eller tilsetninger er statistisk signifikante. To-utvalgs t-test (uparet t-test) ble benyttet der antall paralleller ikke var likt mellom de to utvalgene som ble sammenlignet. Signifikansnivå er definert som $p < 0,05$ og alle de statistiske analysene ble utført ved hjelp av GraphPad Prism.

For å beregne IC_{75} - og IC_{50} -verdier ved hjelp av GraphPad Prism ble ikke-lineær regresjonsanalyse benyttet siden dataene ikke viste en lineær sammenheng.

3 Resultater

3.1 Kolkisinformbindelser reduserer celleviabilitet til HEK293- og M38L-celler

Forskjellige studier har undersøkt om en prodrug-strategi kan gi en mindre generell toksisitet av flere legemidler mot kreft. I denne studien ble det undersøkt om et prodrug av kolkisin som spaltes av legumain kunne inkluderes i en slik strategi. Her har det blitt studert forskjellen mellom ulike kolkisinformbindelser på de to cellelinjene HEK293 og M38L (legumain-overuttrykkende HEK293 celler).

Celleviabiliteten til de tre aktuelle substansene kolkisin, kolkisin-valin og kolkisin-prodrug ble målt ved tilsetning av MTS-reagens og absorbansmåling (2.7). Etter stimulering med forskjellige konsentrasjoner av kolkisin ble det observert at kolkisinbehandling ga en redusert viabilitet ved lave konsentrasjoner, og uten signifikant forskjell mellom de to celletypene (figur 3.1A). En IC_{75} -verdi (75 % celleviabilitet) på 0,017 og 0,022 μM for henholdsvis HEK293- og M38L-celler viste at dette er et toksisk stoff i lave konsentrasjoner for begge celletypene (tabell 3.1). IC_{75} ble brukt som mål for lettere å kunne skille mellom effekten forbindelsene hadde ved lave konsentrasjoner på de to celletypene.

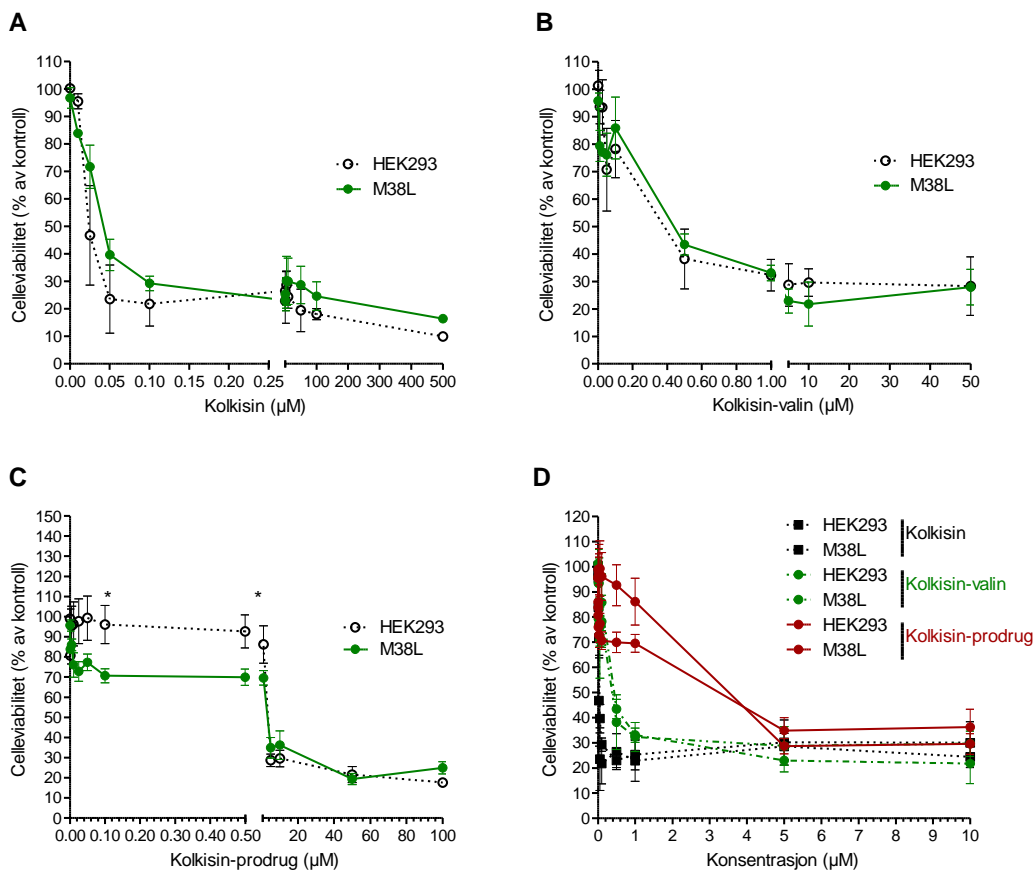
Tabell 3.1. Celleviabilitet oppgitt som IC_{75} - og IC_{50} -verdier for ulike kolkisinformbindelser. For de tre kolkisinformbindelsene ble henholdsvis IC_{75} - og IC_{50} -verdier beregnet for begge celletypene ved hjelp av fire-parametrisk metode i GraphPad Prism. Tabellen angir beregnede verdier basert på gjennomsnittsverdier fra parallelle målinger innad i hvert forsøk. Ratioberegningene viser endringene i konsentrasjon av kolkisinformbindelsene for 75 % eller 50 % celleviabilitet i forhold til kolkisinbehandling (kontroll).

	HEK293		M38L		HEK293		M38L	
	IC_{50} (μM)	IC_{75} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{75} (μM)	IC_{50} (ratio)	IC_{75} (ratio)	IC_{50} (ratio)	IC_{75} (ratio)
Kolkisin	0,0240	0,017	0,040	0,022	1,0	1,0	1,0	1,0
Kolkisin-valin	0,267	0,080	0,435	0,199	11,2	4,7	10,9	9,0
Kolkisin-prodrug	2,56	1,44	2,73	0,215	107	85,1	68,4	9,8

Stimulering med ulike konsentrasjoner av kolkisin-valin og tilsvarende inkuberingsbetingelser som for kolkisin, ga en toksisk effekt ved en høyere konsentrasjon enn kolkisin, og de to

celletypene responderte på samme måte (figur 3.1B). En IC_{75} -verdi på 0,08 og 0,20 μM for de to celletypene (tabell 3.1) viste at når kolkisin ble konjugert med valin ble toksisiteten redusert med henholdsvis fem og ti ganger.

Tilsvarende forsøk ble gjort for kolkisin-prodrug og det ble observert en ytterligere reduksjon i toksisitet for de to celletypene (figur 3.1C). En IC_{75} -verdi på 1,44 μM for HEK293- og 0,20 μM for M38L-celler (tabell 3.1) viste at kolkisin-prodrug var syv ganger mer toksisk for celletypen som overuttrykker legumain. Ved konsentrasjonene 0,1 og 0,5 μM kolkisin-prodrug var forskjellene i viabilitet signifikante. IC_{50} -verdier ble også kalkulert, og disse viste at kolkisin-prodrug ga en 107 ganger høyere IC_{50} -verdi enn kolkisin i HEK293 og 68 ganger høyere verdi i M38L (tabell 3.1).

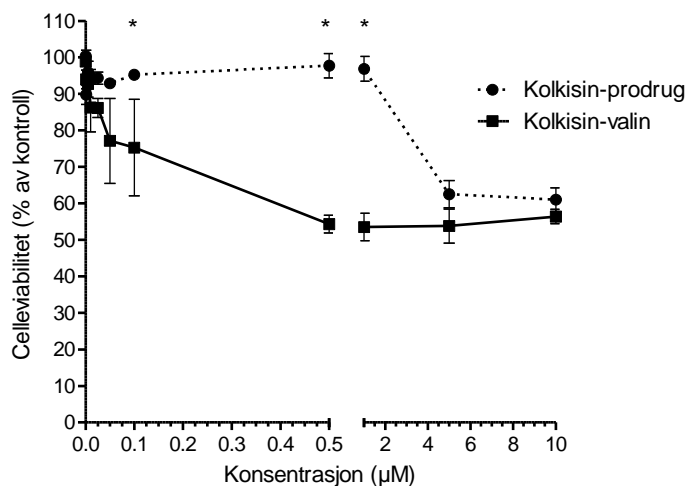


Figur

3.1. Effekt av kolkisinforbindinger på celleviabiliteten til HEK293- og M38L-celler. HEK293 og M38L (20 000 celler/brønn) ble dyrket i 96-brønnersbrett i 24 timer og deretter inkubert i 48 timer med ulike konsentrasjoner av enten kolkisin (A; 0-500 μM ; n=3), kolkisin-valin (B; 0-50 μM ; n=3) eller kolkisin-prodrug (C; 0-100 μM ; n=6; * $p < 0,05$ vs. M38L, t-test). D) Kolkisin, kolkisin-valin og kolkisin-prodrug (0-10 μM). MTS-reagens ble tilsatt hver brønn og absorbans ble målt ved 490 nm etter 4 timer. Figuren viser gjennomsnittlig celleviabilitet \pm SEM i prosent av ustimulert kontroll.

3.2 Ulik effekt av kolkisinforbindelser på celleviabilitet til HCT-116-celler

Det var ønskelig å teste kolkisinforbindelsene i flere celletyper for å få et bredere bilde av forbindelsenes toksiske effekter. Derfor ble det også utført forsøk på celleviabiliteten til tykktarmskreftcellelinjen HCT-116 etter behandling med kolkisin-valin og kolkisin-prodrug. Inkuberingsbetingelsene var tilsvarende som ved forsøk med HEK293-cellelinjene og konsentrasjonene som ble brukt var 0-10 μM av begge forbindelsene. Ved konsentrasjonene 0,1 μM , 0,5 μM og 1,0 μM var forskjellene mellom kolkisin-valin og kolkisin-prodrug signifikante (figur 3.2)

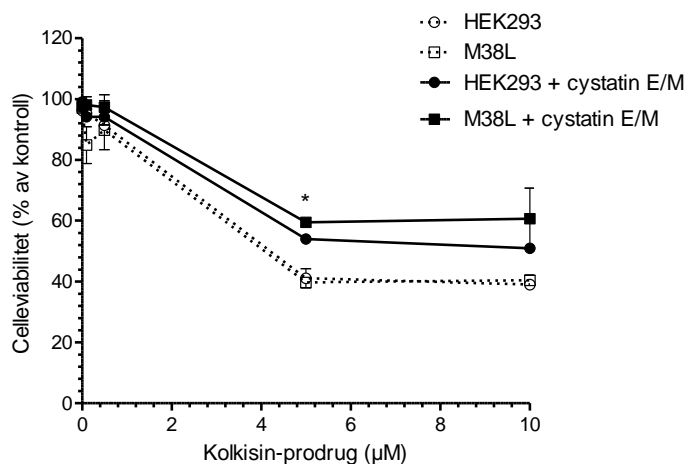


Figur 3.2 Effekt av kolkisin-valin og kolkisin-prodrug på cellelinjen HCT-116. HCT-116-celler (20 000 celler/brønn) ble dyrket i 96-brønnersbrett i 24 timer og deretter inkubert i 48 timer med ulike konsentrasjoner av enten kolkisin-valin eller kolkisin-prodrug. MTS-reagens ble tilsatt hver brønn og absorbans ble målt ved 490 nm etter 4 timer. Figuren viser gjennomsnittlig celleviabilitet \pm SEM i prosent av ustimulert kontroll (n=3; * $p < 0,05$ vs. kolkisin-valin, t-test).

Det ble beregnet IC_{75} -verdier for de to kolkisinforbindelsene. Disse viste at en 25 % reduksjon i celleviabilitet fant sted ved 0,074 μM for kolkisin-valin og ved 3,81 μM for kolkisin-prodrug, noe som bekreftet at også i denne celletypen var kolkisin-prodrug betydelig mindre toksisk enn kolkisin-valin.

3.3 Cystatin E/M beskytter mot den toksiske effekten av kolkisin-prodrug

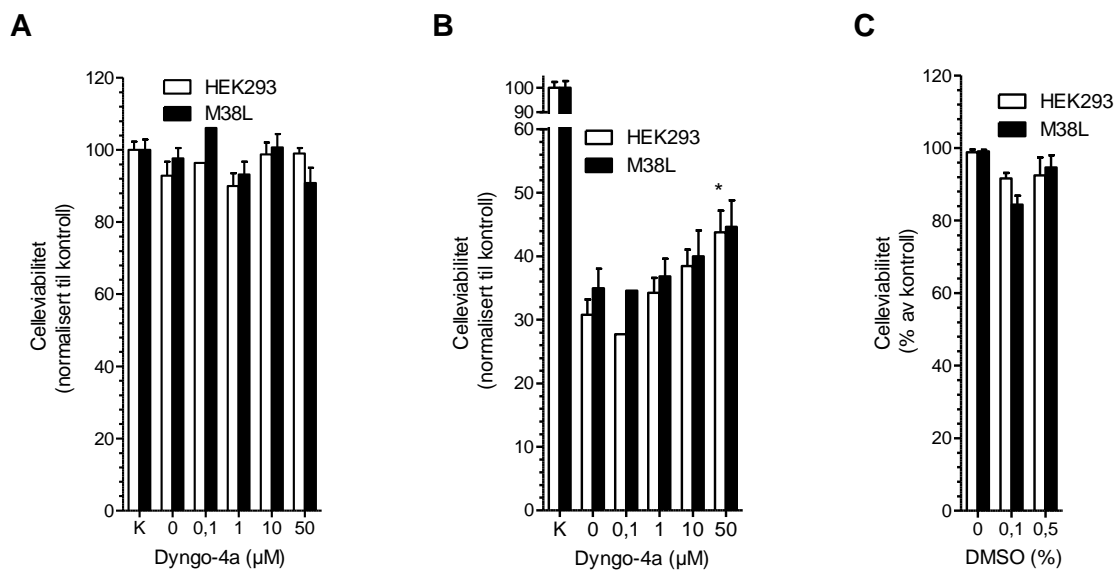
Endogene hemmere av legumain er type 2-cystatinene. Av type 2-cystatinene er cystatin E/M den mest potente med en K_i -verdi på 1,6 pM, mens cystatin F og C har en K_i -verdi på henholdsvis 0,2 og 10 nM [21]. Det var derfor interessant å finne ut om tilsetning av cystatin E/M til HEK293- og M38L-celler ga mindre toksisitet av prodruset som spaltes av legumain. HEK293- og M38L-celler ble inkubert med ulike konsentrasjoner av kolkisin-prodrug (0-10 μ M) med eller uten 50 % kondisjonert medium fra M4C-celler (HEK 293 celler som overuttrykker og sekreterer cystatin E/M) eller tilsvarende medium fra HEK293-celler. Det ble observert en beskyttende effekt mot prodrugets toksiske effekter ved bruk av medium som inneholdt cystatin E/M (figur 3.3). Konsentrasjonene 5 og 10 μ M kolkisin-prodrug viste at den toksiske effekten var lavere hos celletypene som mottok cystatin E/M og ved 5 μ M kolkisin-prodrug var forskjellen mellom M38L-celler med og uten tilsetning av cystatin E/M signifikant.



Figur 3.3. Effekt av tilsetning av cystatin E/M på cellelevabilitet til HEK293- og M38L-celler behandlet med kolkisin-prodrug. HEK293 og M38L (20 000 celler/brønn) ble dyrket i 96-brønnersbrett i 24 timer og deretter inkubert med ulike konsentrasjoner av kolkisin-prodrug \pm 50 % kondisjonert medium fra M4C-celler (cystatin E/M) i 48 timer eller tilsvarende medium fra HEK293. Absorbans ved 490 nm ble målt 4 timer etter tilsetning av MTS-reagens til hver brønn (n=3; * p <0,05 mot M38L-celler med vs uten cystatin E/M, t-test). Figuren viser gjennomsnittlig cellelevabilitet \pm SEM i prosent av ustimulert kontroll.

3.4 Endocytosehemmeren Dyngo4a reduserer den toksiske effekten av 10 μM kolkisin-prodrug

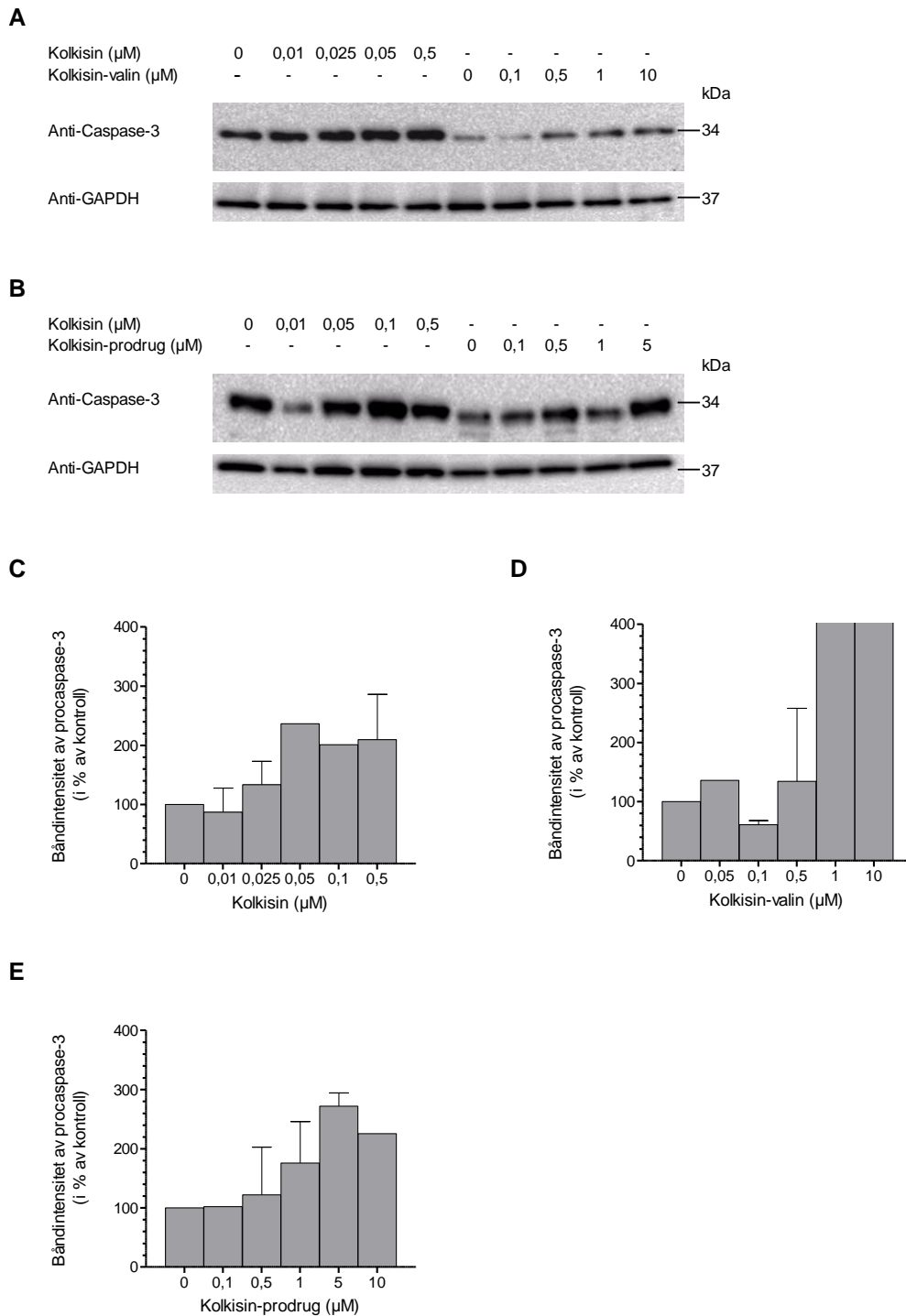
Videre ble det undersøkt om endocytosehemmeren Dyngo4a kunne påvirke celledød som kolkisin-prodrug forårsaket. Siden det har blitt etablert at kolkisin-prodrug i høyere konsentrasjoner påvirket begge celletypene likt, ville tilsetning av Dyngo4a kunne undersøke en mulig mekanisme for kolkisin-prodrugets eventuelle opptak i cellene. Cellene ble behandlet med enten 0,1 eller 10 μM kolkisin-prodrug sammen med Dyngo4a. En reduksjon i toksisitet ble vist hos cellene behandlet med 10 μM kolkisin-prodrug etter tilsetning av økende konsentrasjoner av Dyngo4a (figur 3.4B). Tilsetning av 10 μM kolkisin-prodrug og 50 μM Dyngo4a viste signifikant forskjell fra kontroll (K) i HEK293. Forsøkene viste også at 0,1 og 0,5 % DMSO (løsningsmiddel for Dyngo4a) ikke var toksisk for de to celletypene (figur 3.4C).



Figur 3.4. Effekt av endocytosehemmeren Dyngo4a på HEK293- og M38L-celler behandlet med 0,1 og 10 μM kolkisin-prodrug. HEK293 og M38L (20 000 celler/brønn) ble dyrket i 96-brønnersbrett i 24 timer før inkubering i 48 timer med 0,1 μM (A; n=6) eller 10 μM kolkisin-prodrug (B; n=6; *p< 0,05 vs 0 μM Dyngo4a, uparet t-test) og økende konsentrasjoner Dyngo4a (0-50 μM). MTS-reagens ble tilsatt hver brønn og absorbans ble målt ved 490 nm etter 4 timer. Kontroll (K) ble kun tilsatt 0,1 eller 0,5 % DMSO (A og B). C) 0,1 % vs 0,5 % DMSO. Figuren viser gjennomsnittlig cellelevabilitet \pm SEM i prosent av kontroll.

3.5 Immunoblott av M38L-cellelysater viser tilstedeværelsen av procaspase-3

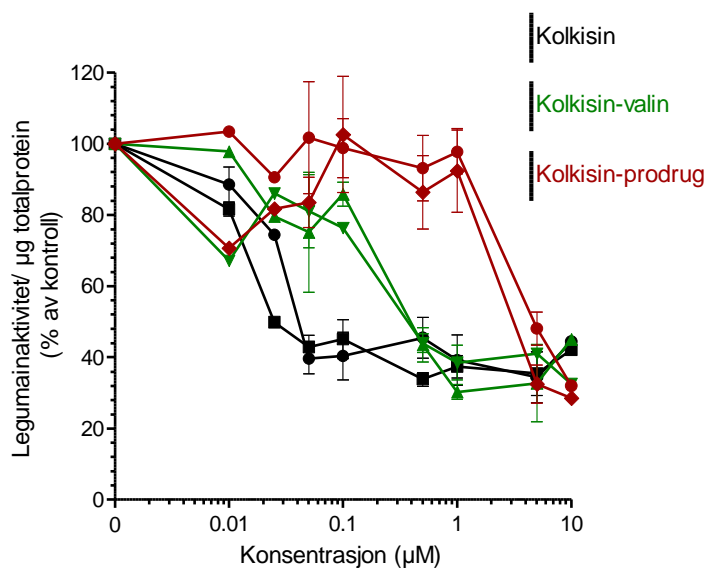
Caspasene er involvert i mekanismen for apoptose og caspase-3 tilhører effektorcaspasene (caspase-3,-6 og -7). Disse spalter et stort antall cellulære proteiner som trengs for å drive apoptose fremover. Initiatorcaspasene (blant annet caspase-8, og -9) spalter de inaktive effektorcaspasene til deres aktive former. Slik aktiveres procaspase-3 til caspase-3 av caspase-8 [51]. Det var ønskelig å undersøke om behandling med kolkisinformbindelser påvirket caspase-3-uttrykk hos M38L. Spesifikke antistoffer for deteksjon av caspase-3 ble benyttet og deteksjon ved 34 kDa ble vist. Dette stemmer overens med størrelsen for procaspase-3 og ikke den aktive formen av caspase-3 som har størrelsen 18 kDa (figur 3.5A og 3.5B). Det ble observert en svak tendens til akkumulering av proformen av caspase-3 etter behandling med økende konsentrasjoner av kolkisinformbindelsene (figur 3.5A-E). Samtidig ble det vist noe forskjellig uttrykk av procaspase-3 etter behandling med kolkisin, kolkisin-valin eller kolkisin-prodrug. Kolkisin-prodrug viste lavere båndintensitet enn både kolkisin-valin og kolkisin ved flere av de tilsvarende konsentrasjonene. I lysatene av celler behandlet med kolkisin-prodrug ble det også vist klare antydninger til bånd under 34 kDa, men dette ble ikke vist for kolkisin-, eller kolkisin-valin-behandling (Figur 3.5B).



Figur 3.5. Immunoblott av procaspase-3 i M38L-lysater etter behandling med ulike konsentrasjoner av kolkisinforbindinger. M38L-lysater ble forberedt for elektroforese og 1,5 μg totalprotein ble applisert til hver brønn. Blottene ble analysert med primærantistoff mot caspase-3 og GAPDH. Representative blott er vist for deteksjon av caspase-3 etter behandling med kolkisin (**A** og **B**; 0-0,5 μM ; n=2), kolkisin-valin (**A**; 0-10 μM ; n=2) og kolkisin-prodrug (**B**; 0-5 μM ; n=2). Båndintensitet (i prosent av kontroll \pm SEM) ble kvantifisert og relatert til "housekeeping"-kontroll GAPDH for kolkisin (**C**), kolkisin-valin (**D**) og kolkisin-prodrug (**E**).

3.6 Kolkisinforbindelser hemmer legumainaktivitet i HEK293- og M38L-celler

HEK293 og M38L ble stimulert med ulike konsentrasjoner av kolkisin i 24 timer før høsting og måling av legumainaktivitet i cellelysatsene. Det ble observert en nedgang i legumainaktivitet etter behandling med lave konsentrasjoner av kolkisin (figur 3.6). En IC_{50} -verdi på $0,028 \mu\text{M}$ for HEK293 og $0,031 \mu\text{M}$ for M38L viste at kolkisin hadde lik effekt på legumainaktiviteten i de to celletypene (tabell 3.2).



Figur 3.6 Legumainaktivitet i cellelysater til HEK293 og M38L etter inkubering med økende konsentrasjoner av kolkisinforbindelser. HEK293 og M38L (250 000 celler/brønn) ble sådd ut i 6-brønnersbrett 24 timer før cellene ble inkubert i 24 timer med økende konsentrasjoner av kolkisin, kolkisin-valin eller kolkisin-prodrug (0-10 μM). Cellene ble deretter tilsatt lysisbuffer (pH 5,8) før legumainaktivitet ble målt ved hjelp av et fluorescerende peptidsubstrat (Z-Ala-Ala-Asn-AMC). Figuren viser gjennomsnittlig legumainaktivitet/ μg totalprotein \pm SEM i prosent av ustimulert kontroll (n=3-4).

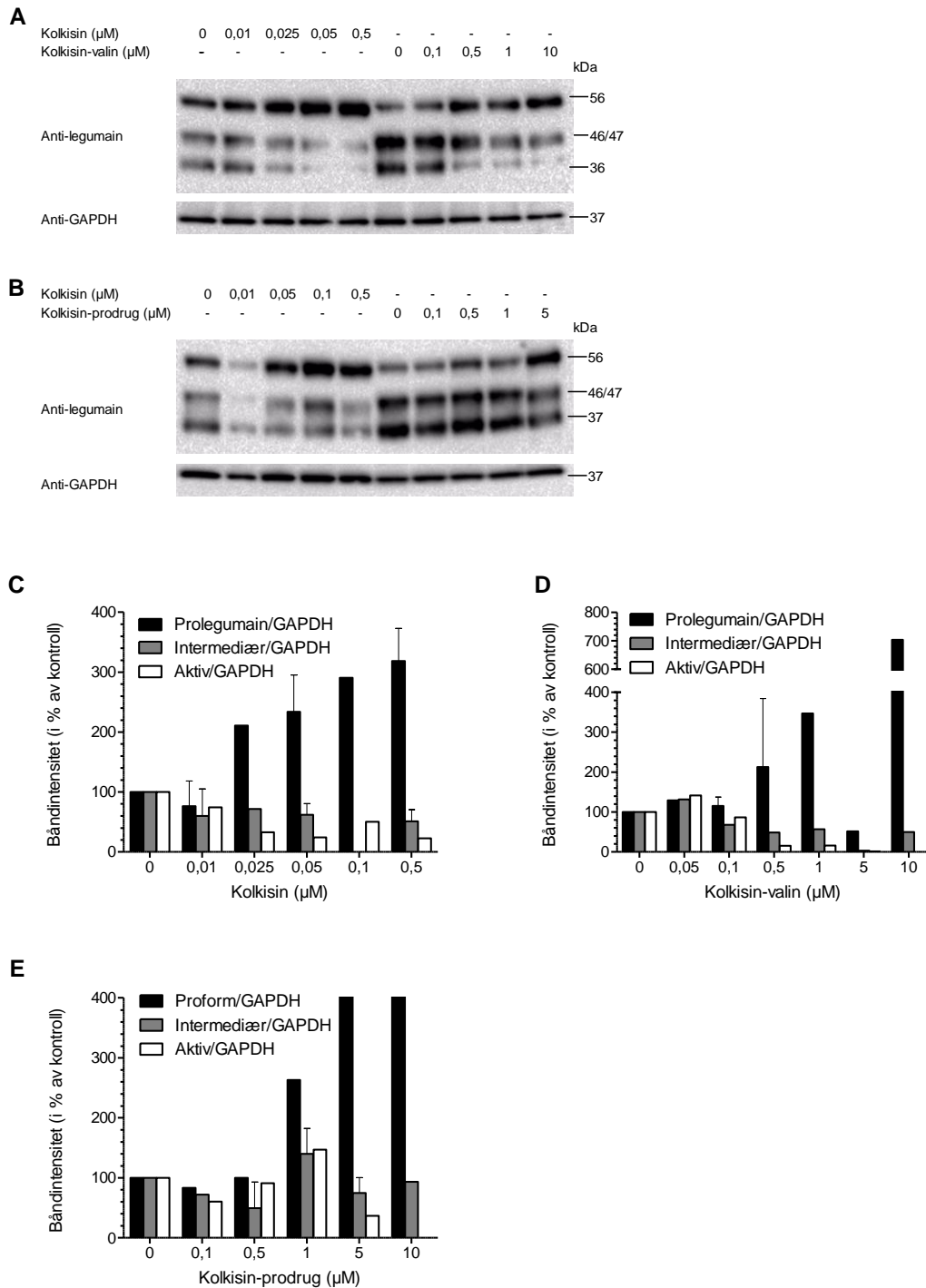
Tilsvarende forsøk ble utført med kolkisin-valin og kolkisin-prodrug. Det ble observert 10-20 ganger økning i IC_{50} -verdiene for kolkisin-valin i forhold til kolkisin med IC_{50} -verdier på henholdsvis $0,48 \mu\text{M}$ og $0,37 \mu\text{M}$ for HEK293 og M38L (figur 3.6 og tabell 3.2). Tilsvarende verdier etter behandling med kolkisin-prodrug ga IC_{50} -verdier på henholdsvis $4,0$ og $4,8 \mu\text{M}$. Samlet viste disse eksperimentene at de to celletypene responderte ganske likt med hensyn til

reduksjon av legumainaktivitet, men at konjugering av kolkisin med valin og et tripeptid (prodrug) dramatisk reduserte evnen til å påvirke cellenes legumainaktivitet.

Tabell 3.2. IC₅₀-verdier for kolkisinforsbindelsenes effekt på legumainaktivitet i HEK293 og M38L. Verdiene ble utregnet ved hjelp av fire-parametrisk fremstilling i GraphPad Prism. Ratioberegningene viser endringene i konsentrasjon av kolkisinforsbindelsene for 50 % legumainaktivitet i forhold til kolkisinbehandling (kontroll).

	HEK293	M38L	HEK293	M38L
	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (ratio)	IC ₅₀ (ratio)
Kolkisin	0,028	0,031	1,0	1,0
Kolkisin-valin	0,48	0,37	17,0	11,9
Kolkisin-prodrug	4,00	4,80	143	155

M38L-celler ble behandlet med de ulike kolkisinforsbindelsene og høstet til immunoblotting. Det ble vist en akkumulering av prolegumain (56 kDa) og en nedgang både i de intermedieære formene (46/47 kDa) og den modne formen av legumain (36 kDa) ved økende konsentrasjoner av alle kolkisinforsbindelsene (fig. 3.7A og 3.7B). Båndintensitetsanalysene viste samme tendens (figur 3.7C, D og E for behandling med henholdsvis kolkisin, kolkisin-valin og kolkisin-prodrug).

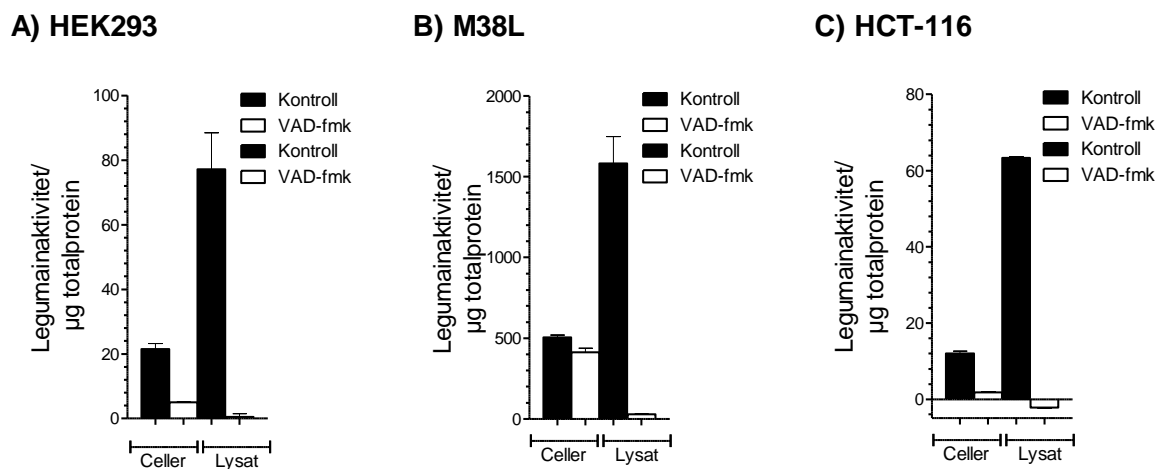


Figur 3.7 Immunoblott viste at nedgangen i legumainaktivitet skyldtes redusert dannelse av aktiv form. M38L-cellelysater ble forberedt for elektroforese og 1,5 μg totalprotein ble applisert til hver brønn. Blottene ble analysert med primærantistoffer mot legumain og GAPDH. Representative blott for deteksjon av legumain etter behandling med kolkisin (**A** og **B**; 0-0,5 μM ; n=2), kolkisin-valin (**A**; 0-10 μM ; n=2) og kolkisin-prodrug (**B**; 0-5 μM ; n=2). Båndintensitet (i prosent av kontroll \pm SEM) ble kvantifisert ved å relatere intensiteten til "housekeeping"-kontroll GAPDH for **C**) kolkisin, **D**) kolkisin-valin og **E**) kolkisin-prodrug.

3.7 Caspasehemmeren biotin-VAD-fmk reduserer legumainaktivitet i HEK293, M38L og HCT-116

Det var ønskelig å undersøke om biotin-VAD-fmk, en irreversibel caspasehemmer, også hemmet legumainaktivitet hos HEK293, M38L og HCT-116. Cellene ble splittet og sådd ut (2.3.5) tilsvarende tidligere forsøk. Etter inkubering i 24 timer ble brønnene tilsatt 0,1 % DMSO (løsningsmiddel) eller 10 μ M av biotin-VAD-fmk. Etter 24 timer ble cellene høstet etter prosedyre (2.3.6).

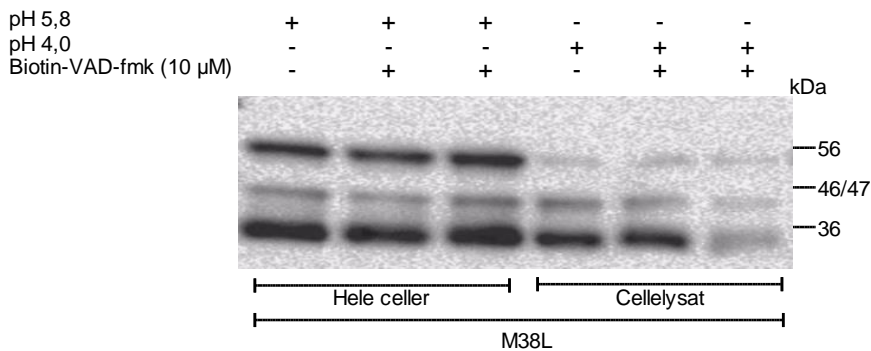
I alle tre celletypene ble det vist en redusert legumainaktivitet i forhold til kontroll, både for celleforsøket, hvor behandlingen med biotin-VAD-fmk ble gjort i hele celler, og i cellelysatforsøket, hvor behandlingen ble gjort etter høsting ved pH 4,0 (figur 3.9 A, B og C). Reduksjonen i legumainaktivitet var størst i cellelysatforsøkene for alle celletypene. Nedgangen av legumainaktivitet i cellelysatforsøkene hos HEK293, M38L og HCT-116 var henholdsvis 100, 98 og 103 % mot 76, 18 og 85 % i forsøkene med hele celler.



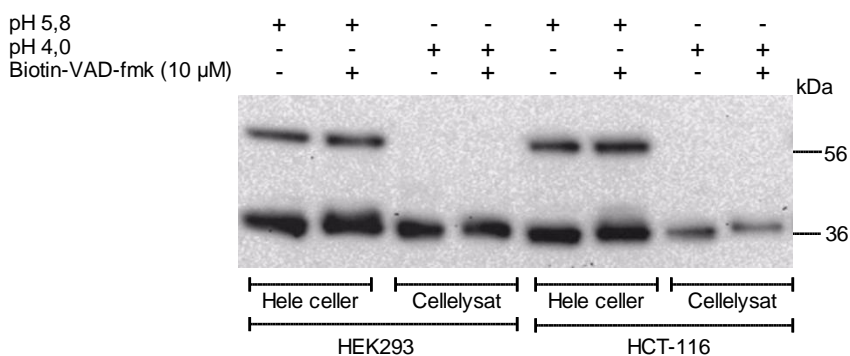
Figur 3.9 Legumainaktivitet etter tilsetning av biotin-VAD-fmk til hele celler eller cellelysater. Til celleforsøket (celler) ble HEK293, M38L og HCT-116 (250 000 celler/brønn) dyrket i 6-brønnersbrett i 24 timer før inkubering i 24 timer med 10 μ M biotin-VAD-fmk eller 0,1 % DMSO (kontroll). Deretter ble cellene høstet i lysisbuffer pH 5,8 før måling av legumainaktivitet. Til cellelysatforsøket (lysat) ble celler dyrket i 0,1 % DMSO og høstet i lysisbuffer pH 4,0. Deretter ble cellelysaterne inkubert med 10 μ M biotin-VAD-fmk ved 37 °C i 1 time og legumainaktivitet ble målt. Figuren viser legumainaktivitet/μg totalprotein for HEK293-celler (A; n=2), M38L-celler (B; n=2) og HCT-116-celler (C; n=1).

Cellelysaten fra både celleforsøket og cellelysatsforsøket ble videre brukt til immunoblotting for å undersøke hva nedgangen i legumainaktivitet kunne skyldes. Streptavidin har høy affinitet for biotin og ble derfor forsøkt til deteksjon av biotin-VAD-fmk bundet til legumain. Av ukjente grunner ble det ikke detektert noen bånd i fremkallingen (figur ikke vist). Deretter ble deteksjon med antistoff mot biotin forsøkt, men også dette uten resultat. Ved reblotting med antistoff mot legumain viste både figur 3.10A og 3.10B svakere eller fraværende bånd for prolegumain etter høsting ved pH 4,0 (cellelysate) mot pH 5,8 (hele celler). Celleforsøkene viste ingen tendens til at biotin-VAD-fmk hemmet autoaktivering av prolegumain til aktivt legumain. I figur 3.10 B ble det også observert at de intermediære formene av legumain (46/47 kDa) forsvant helt hos både HEK293 og HCT-116, noe som ikke var tilfelle hos M38L (figur 3.10A). Blottene viste altså fullstendig omdanning av prolegumain til den modne formen ved 36 kDa i cellelysatsforsøkene for HEK293 og HCT-116, men ikke for M38L.

A



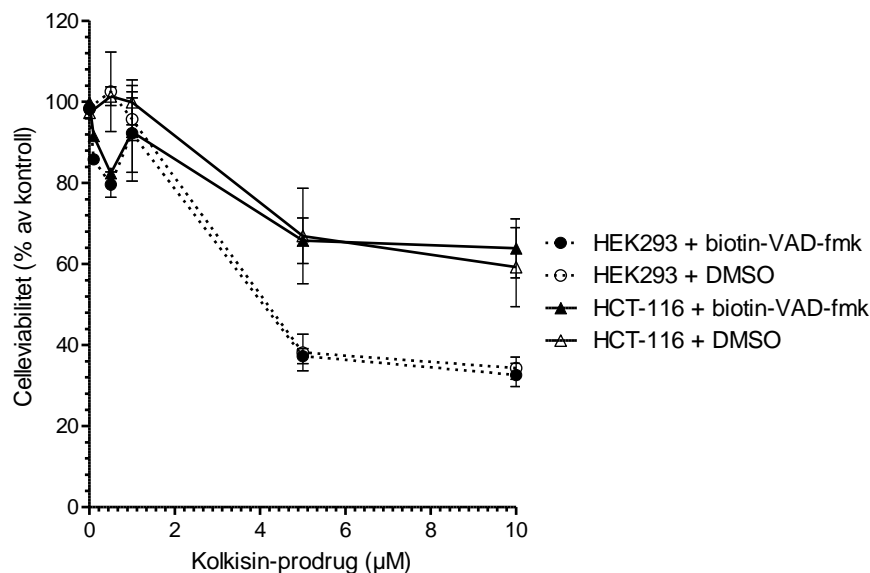
B



Figur 3.10 Immunoblott av cellelysate fra HEK293, M38L og HCT-116 tilsatt biotin-VAD-fmk. Prøver av HEK293, M38L og HCT-116 (Fig. 3.9) ble forberedt for elektroforese. Blottene ble analysert med primærantistoff mot legumain. Deteksjon av legumain etter behandling med 10 µM biotin-VAD-fmk i hele celler og i cellelysate fra M38L (A), HEK293 og HCT-116 (B).

3.8 Effekt av biotin-VAD-fmk på celleviabilitet til HEK293- og HCT-116-celler etter behandling med kolkisin-prodrug

Biotin-VAD-fmk reduserte legumainaktivitet hos HEK293, M38L og HCT-116. Derfor ble det undersøkt om denne irreversible caspasehemmeren også kunne påvirke toksisiteten av kolkisin-prodrug på HEK293 og HCT-116. Etter stimulering og inkubering i 48 timer med kolkisin-prodrug med eller uten biotin-VAD-fmk eller 0,1 % DMSO (kontroll) ble viabiliteten målt. Forbehandling av cellene med biotin-VAD-fmk så ikke ut til å beskytte de to celletypene mot toksisiteten av kolkisin-prodrug i forhold til kontroll (figur 3.8), men for få forsøk har blitt utført til å gjøre statistiske analyser.



Figur 3.8 Effekt av biotin-VAD-fmk tilsatt HEK293 og HCT-116 sammen med økende konsentrasjoner kolkisin-prodrug. HEK293 og HCT-116 (20 000 celler/brønn) ble dyrket i 96-brønnersbrett i 24 timer sammen med enten 10 µM biotin-VAD-fmk eller 0,1 % DMSO. Deretter ble cellene inkubert i 48 timer med ulike konsentrasjoner av kolkisin-prodrug i tillegg til 10 µM biotin-VAD-fmk eller 0,1 % DMSO. MTS-reagens ble tilsatt hver brønn og absorbans ble målt ved 490 nm etter 4 timer. Kontroll (0 µM prodrug) ble tilsatt kun 10 µM biotin-VAD-fmk eller 0,1 % DMSO. Figuren viser gjennomsnittlig celleviabilitet ± SEM i prosent av kontroll (n=2).

4 Diskusjon

Kreft er den vanligste dødsårsaken etter hjerte- og karsykdommer i Norge, og de vanligste kreftformene er prostata hos menn, brystkreft hos kvinner, lungekreft, tykktarm- og endetarmkreft hos begge kjønn [52]. Nye legemidler og strategier er hele tiden i søkelyset for å forbedre kreftbehandlingen. Virkningen av legemidler på markedet i dag begrenses av sin generelle toksisitet overfor normalvev [41, 43], resistensutvikling [41] og noen også av fysikalsk-kjemiske egenskaper som for eksempel dårlig vannløselighet [43].

Økt uttrykk av proteaser og nedregulering av proteaseinhibitorer observeres ofte i kreftsvulster. Flere studier har vist overuttrykk av cysteinproteasen legumain i krefttyper som bryst- [3], prostata- [3, 20] og tykktarmssvulster [3, 53], samtidig som økt legumainuttrykk korrelerer med svulstinvasjon og metastase *in vivo*. Blant annet kan legumain spalte pro-MMP-2 til aktiv MMP-2 etter spaltning ved aminosyren asparagin (Asn). MMP-2 kan bryte ned ekstracellulær matriks (ECM)-proteiner og dermed fremme vevsinvasjon [54]. Studier har vist at pasienter med lavt legumainuttrykk i kreftsvulster generelt har en bedre prognose [20].

Mikrotubuli er en av hovedkomponentene i cytoskjelettet i eukaryote celler, og de har en viktig rolle i organisering av cellulære prosesser som bevegelse, signalering, celledeling og intracellulær transport. Den dynamiske ustabiliteten til mikrotubuli er viktig for disse funksjonene, spesielt under mitose når datterkromosomene fordeles. Taksanene og vinka-alkaloidene er legemidler som binder til β -tubulin, og de er mye brukt i onkologien i dag. Men som ved annen kjemoterapi er resistens via P-glykoprotein et problem [55]. På grunn av både suksessen, men også begrensningene antimitotiske legemidler har i kreftterapi, har søkelyset vært rettet mot nye antimitotiske legemidler. Et fokus er muligheten for binding til β -tubulin og spesielt til kolkisins bindingssete [25, 55, 56].

Det er tidligere undersøkt om det kan syntetiseres forbindelser som binder til samme sete som kolkisin på β -tubulin, men som vil gi lavere generell toksisitet i normalvev. En slik forbindelse er Combretastatin A-4 (CA4)-prodrug og dens fosforylerte form CA4P som hydrolyseres av fosfataser *in vivo*. På denne måten frigis aktivt stoff som virker ved å ødelegge blodårer i svulsten [25, 57]. Derivater av kolkisin og ulike prodrugs av kolkisinformbindelser har også blitt undersøkt [25, 40]. Et eksempel er ZD6126, et vannløselig fosfatprodrug av *N*-acetylcolchinol som spaltes av fosfataser og frigir aktiv forbindelse, også

med virkning mot mikrotubuli i blodårer [58]. ZD6126 kom til fase II i klinisk utprøving, men studien måtte avsluttes på grunn av toksisk effekt på hjerte- og karsystemet ved terapeutiske doser [25].

Som tidligere nevnt har flere studier også undersøkt mulighetene for bruk av legumain som enzymatisk mål i en prodrug-strategi ved kreftbehandling. I denne oppgaven var det interessant å studere et kolkisin-prodrug med en peptidsekvens (Suc-Ala-Ala-Asn-Val) som antas å bli spaltet av legumain *in vivo*. Oppgaven ble gjennomført som et samarbeid mellom vår forskningsgruppe (ProTarg), førsteamanuensis Pål Rongved og doktorgradsstipendiat O. Alexander H. Åstrand ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Syntesen av kolkisin-valin og det aktuelle produget er beskrevet i masteroppgaven "Syntese og biologisk evaluering av nye legumainsubstrater med antineoplastisk effekt, som mulige selektive hemmere av tumorvekst" utført av Luan Minh Nguyen (2012).

4.1 Valg av cellemodeller

I oppgaven ble det valgt en monoklonalt transfektert HEK293-cellelinje som overuttrykker legumain (M38L). I tillegg ble det brukt kondisjonert medium fra en cystatin E/M-overuttrykkende HEK293-cellelinje (M4C). Kontroll-cellelinjen var utransfektete HEK293-celler. HEK293-cellelinjen er lett å vedlikeholde, er rask i vekst og har evne til å produsere modne og funksjonelle proteiner [45]. Sammen med utransfektert HEK293 som kontroll utgjør M38L en velegnet cellemodell for å studere effekter av legumain ved behandling med kolkisin-prodrug.

4.2 Celleviabilitet

Kolkisin har et smalt terapeutisk vindu og på grunn av store individuelle variasjoner i biotilgjengelighet, er det vanskelig å oppgi absolutte verdier for ikke-toksiske, toksiske og dødelige doser [59]. Litteraturen oppgir likevel en generell toksisk dose på rundt 0,5 mg/kg [40, 59] og dødelig dose på 0,8 mg/kg av kolkisin [32, 59]. Det oppgis i prekliniske data fra kreftmodeller at det kreves kolkisindoser på over 5 mg/kg for en signifikant reduksjon i blodperfusjonen til svulster [40].

I denne oppgaven ble det undersøkt hvordan kolkisin påvirker celleviabiliteten til HEK293- og M38L-celler i forhold til et kolkisin-prodrug (Suc-Ala-Ala-Asn-Val-kolkisin). I prodruget er en peptidsekvens koblet på kolkisin og denne peptidsekvensen gjenkjennes av og spaltes av legumain [42]. Hypotesen var derfor at M38L er mer følsom enn HEK293 for kolkisin-prodrug, siden M38L overuttrykker legumain. Grunnet substratspesifisiteten legumain har for spaltning karboksyterminalt for asparagin (Asn) vil aminosyren valin (Val) fortsatt være bundet til kolkisin etter spaltning. Kolkisin-valin er derfor også inkludert i studien.

IC_{75} (75 % celleviabilitet) ble valgt som beste mål for å sammenligne forskjellen mellom de to celletypene etter behandling med kolkisinformbindelsene. IC_{75} -verdier på 1,44 μM prodrug i HEK293 og 0,215 μM prodrug i M38L viser at kolkisin-prodrug er omtrent syv ganger mer toksisk for cellene som overuttrykker legumain. Med tanke på peptidsekvensen (Suc-Ala-Ala-Asn-Val) i prodruget og substratspesifisiteten til legumain, er det nærliggende å tenke at prodruget har blitt spaltet til kolkisin-valin i større grad i M38L enn i HEK293.

Andre studier oppgir oftest IC_{50} -verdier for forbindelser som undersøkes. Det er her valgt å også oppgi IC_{50} -verdier da disse bedre illustrerer forskjellen mellom de ulike kolkisinformbindelsene. IC_{50} -verdier oppgitt som ratioberegninger i forhold til kolkisin som kontroll, viser at kolkisin-prodrug er 107 ganger mindre toksisk enn kolkisin i HEK293 og 68 ganger mindre toksisk enn kolkisin i M38L. I motsetning viser kolkisin-valin bare 10-11 ganger lavere toksisitet i forhold til kolkisin. Disse beregningene viser en lavere toksisitet av kolkisin-prodrug i forhold til kolkisin, noe som var den ønskede effekten.

Nedgang i viabilitet etter behandling med kolkisin-valin kom ved en høyere konsentrasjon enn ved behandling med kolkisin. Dette viser at kolkisin-valin er mindre toksisk enn kolkisin. En teori kan være at kolkisin-valin er substrat for eksopeptidaser i cellene, og ved avspaltning av valin kan kolkisin frigjøres og utøve sin toksiske virkning. I det lave konsentrasjonsområdet vil lite kolkisin ha blitt frigjort, men ved høyere konsentrasjoner vil mer ha blitt dannet. Derfor vil effektene etter hvert nå samme nivå for kolkisin-valin som for kolkisin.

Cellepermeabilitet av de tre forbindelsene er viktig i denne sammenhengen. Kolkisin-valin er mest lipofil, deretter kommer kolkisin og til slutt kolkisin-prodrug som er en hydrofil forbindelse. Dersom dette betyr at kolkisin-valin går lettest over cellemembranen, tyder også dette på at kolkisin-valin enten er en mindre potent forbindelse med tanke på interaksjon med

β -tubulin og effekt på celleviabilitet eller at det først må spaltes til kolkisin intracellulært før den toksiske effekten inntreffer.

I litteraturen er det tidligere blitt beskrevet legumainbaserte-prodrugs av doksorubicin, etoposid og auristatin som alle tre spaltes til aktive forbindelser av legumain [3, 41, 43, 44]. Både i studiene for doksorubicin og etoposid ble også HEK293 og legumain-overuttrykkende HEK293-celler brukt som cellemodeller og tetrazoliumssalter brukt til viabilitetsmålinger, slik som i denne Masteroppgaven. Likheter i resultatene som kan sammenlignes er den generelt lavere toksisiteten prodrugene viser i HEK293 sammenlignet med legumain-overuttrykkende celler. Talleksempel viste en IC_{50} -verdi på $>100 \mu\text{M}$ mot $3,2 \mu\text{M}$ for doksorubicin-prodrug og $>100 \mu\text{M}$ mot $0,7 \mu\text{M}$ for etoposid-prodrug. I tillegg er det i litteraturen bekreftende resultater for denne prodrug-strategien *in vivo* i mus [41, 44].

Ved lave konsentrasjoner under $1 \mu\text{M}$ av kolkisin-prodrug er effekten på celleviabilitet tilnærmet stabil før nedgangen vises mellom 1 og $5 \mu\text{M}$. Det kan spekuleres i om det er en heterogenitet innad i cellepopulasjonen slik at cellene kan ha noe ulike egenskaper. I celledelingen fordeles endosomer og lysosomer mellom to datterceller og Bergeland et al. har vist at antallet endosomer/lysosomer i dattercellene blir omtrent halvert etter celledeling [60]. Studien viste at antallet tidlige endosomer økte i dattercellen når endocytose ble gjenopptatt etter cytokinesen (siste stadium av celledeling; fordeling av cytoplasma), og at disse sannsynligvis modnes videre til sene endosomer og lysosomer. En hypotese kan være at når cellene befinner seg i ulike stadier av cellyklus kan muligens dattercellene fra en celle som nettopp var i celledelingsfasen ha færre lysosomer, ha lavere aktivitet av legumain, og dermed en dårligere evne til å spalte kolkisin-prodrug til aktiv forbindelse. På denne måten vil disse cellene kunne bli mindre påvirket av kolkisin-prodrug enn cellene som er i en annen del av cellyklus og mulig har flere lysosomer. En annen hypotese for denne heterogeniteten er at siden HEK293 og M38L er adherente celler kan det være at det dannes sure mikrodomener mellom tettvokste celler i direkte kontakt med hverandre eller mot plastbunnen i dyrkningsbrettet slik som tidligere vist for adherente osteoklaster i kontaktsonen mot dyrkningsskåler [61]. På denne måten dannes det områder med lav pH ekstracellulært som fremmer spaltning av sekretet prolegumain.

Det var i tillegg ønskelig å studere effektene av kolkisin-prodrug i en kreftcellelinje. Dette ble gjort for å undersøke om effektene var sammenlignbare mellom ikke-kreftcellelinjer

(HEK293 og M38L) og tykktarmskreft-cellelinjen HCT-116. Det ble kun beregnet IC_{75} -verdier for HCT-116 ettersom IC_{50} ikke ble oppnådd. IC_{75} -verdier på 0,074 og 3,80 μM for henholdsvis kolkisin-valin og kolkisin-prodrug er sammenlignbare med verdiene for HEK293 (henholdsvis 0,080 og 1,44 μM).

Dersom det er slik at legumainaktivitet er nødvendig for kolkisin-prodrugets effekt var det interessant å undersøke om hemming av legumain ville beskytte cellene mot den toksiske effekten. Som den mest potente endogene hemmeren av legumain, med en K_i -verdi på 1,6 pM [21], ble cystatin E/M valgt. Resultatene viste at ved 5 μM prodrug var forskjellene mellom med og uten tilsetning av cystatin E/M signifikante i M38L. For 10 μM prodrug ble det ikke utført statistisk analyse grunnet for få paralleller, men de observerte effektene styrker tanken om at legumainaktivitet er nødvendig for prodrugets effekt. I tillegg ble det utført celleviabilitetsforsøk med kolkisin-prodrug på M4C-cellelinjen (HEK293-celler som overuttrykker cystatin E/M) i sammenligning med HEK293 (utført av Hilde Nilsen). En klar tendens til forskjell i celleviabilitet mellom celletypene, hvor M4C var minst følsom, styrker også teorien om at legumain er involvert i prodrugets spaltning og effekt.

4.3 Endocytose

Endocytose er en samlebetegnelse på mekanismer for opptak i en celle. Dette skjer ved at cellemembranen danner en innbuktning som etter hvert avsnøres [62]. Endocytose kan skje via flere ulike mekanismer og deles ofte inn i clathrin-avhengige og clathrin-uavhengige mekanismer [63]. Den clathrin-avhengige endocytosen tar opp materiale til cellen fra overflaten ved å bruke clathrin-dekkede vesikler og denne typen endocytose brukes av alle eukaryote celler [64]. Mekanismen er blant annet avhengig av GTPasen dynamin for avsnøring av vesiklene [63, 64], men dynamin er også involvert i flere former for cellulær endocytose enn den clathrin-avhengige [64].

Dyngo4a er en potent dynamin-hemmer som har vist seg blant annet å kunne hemme botulinumtoksin type A-endocytose i neuroner [65]. Kolkisin-prodrug er en hydrofil forbindelse og sett i sammenheng med den toksiske effekten, var det derfor interessant å undersøke om opptaket i celler skyldtes endocytose. Økende konsentrasjoner av Dyngo4a ble tilsatt HEK293 og M38L samtidig som disse ble behandlet med kolkisin-prodrug. Resultatene etter behandling med Dyngo4a ga en klar indikasjon på at endocytose er involvert i opptaket

av og dermed effekten av prodrugget i både HEK293 og M38L. Dette tyder på at spaltningen, eller i det minste noe av spaltningen av kolkisin-prodrug, skjer intracellulært. Ved 50 μM Dyngo4a og 10 μM kolkisin-prodrug var forskjellen i forhold til kontroll signifikant i HEK293.

4.4 Biotin-VAD-fmk som legumainhemmer

Rozman-Pungerčar et al. har vist at flere caspasehemmere man tidligere trodde var spesifikke, også kan hemme aktiviteten av enkelte cathepsiner og legumain [66]. Biotin-VAD-fmk (biotin-Val-Ala-Asp(Ome)-fluormetylketon) er et slikt eksempel. Konjugeringen med biotin gir muligheten for deteksjon med for eksempel streptavidin, et biotin-bindende protein. Fluormetylketon gir fordeler som lipofilisitet og god penetrering av membraner [67], samtidig som den danner en irreversibel og kovalent binding med det aktive setet til enzymet. Som en parallell til forsøk med cystatin E/M var det interessant å undersøke om biotin-VAD-fmk kunne hemme legumain og dermed motvirke spaltningen og toksisiteten av kolkisin-prodrug. Først måtte det undersøkes om caspasehemmeren faktisk hemmet legumain og dette ble utført i HEK293, M38L og HCT-116. Tilsetningen av biotin-VAD-fmk ble enten gitt til celler i kultur eller direkte til cellelysat etter høsting ved pH 4. Tidligere studier har vist at legumain også kan spalte karboksyterminalt for aminosyren aspartat (Asp) ved sur pH [8]. Dette kommer av at ved sur pH vil Asp være i protonert form og dermed likne på asparagin (Asn). Siden biotin-VAD-fmk inneholder Asp ble en lavere pH-verdi enn ved tidligere cellehøsting (pH 5,8) valgt for å gjøre hemmeren mer favorisert for legumain. Resultatene viste en klar hemming av legumain, men i større grad i cellelysat enn i hele celler og dette støtter at legumain kan spalte karboksyterminalt for protonert Asp.

Immunoblott fra de samme forsøkene med biotin-VAD-fmk ble forsøkt fremkalt med streptavidin som har høy affinitet for biotin og med antistoff mot biotin. Av ukjente årsaker ble begge disse uten resultat. Fremkalling med antistoff mot legumain viste derimot at for HEK293 og HCT-116 høstet i pH 4 forsvant proformen (56 kDa) av legumain. Forklaringen kan være at ved den sure pH-verdien fremmes prosesseringen av prolegumain. For M38L ble deteksjonen av proformen kun svakere. Dette kan komme av det høye uttrykket av legumain i M38L slik at ikke all prolegumain ble prosessert i tidsintervallet (24 timer) for forsøkene. I HEK293 og HCT-116 ble det i tillegg observert at størrelsen på aktivt modent legumain (36 kDa) hadde noe høyere molekylvekt (37 kDa) i cellene og lysatene som ble behandlet med

caspasehemmeren, i forhold til de som ikke ble det. En teori for dette er at biotin-VAD-fmk er bundet til modent legumain slik at molekylvekten øker. En annen teori kan være at biotin-VAD-fmk har hemmet legumain og dermed den autokatalytiske aktiviteten. På denne måten vil den Asp-baserte kløyvningen ved Asp²⁵ (fra 47 til 46 kDa) ikke skje. Dette vil føre til at den videre prosesseringen fra C-terminal ende blir gjort på 47 kDa- til 37 kDa-legumain, og ikke fra 46-kDa til 36 kDa-legumain. Ettersom inkubering med streptavidin og antistoff mot biotin ikke ga noe resultat er det vanskelig å trekke en konklusjon angående hvilken av teoriene som er mest sannsynlig.

Celleviabilitet ble analysert for HEK293 og HCT-116 etter behandling med kolkisin-prodrug med eller uten tilsetning av biotin-VAD-fmk. Beskyttelse mot prodrugets toksiske effekter var forventet, men av ukjente årsaker så ikke tilsetning av biotin-VAD-fmk ut til å beskytte de to celletypene. Kun to forsøk ble utført, men resultatene var like. Det kan vurderes om biotin-VAD-fmk i stedet burde vært undersøkt i M38L som var mest følsom for kolkisin-prodrug.

4.5 Caspase-3

Det er tidligere beskrevet at kolkisinbehandling av celler fører til celledød via apoptose [30]. Caspase-3 er svært sentral i denne dødsmekanismen, og det var derfor ønskelig å undersøke caspase-3-uttrykket i M38L. Det ble kun detektert procaspase-3 (34 kDa), og det var forventet at uttrykket ble svakere etter behandling av cellene med økende konsentrasjoner av kolkisinforsbindelsene. Resultatene viste imidlertid en akkumulering av procaspase-3.

Chen et al. har vist at kolkisin induserer caspase-3 og caspase-9-aktivering i humane leverceller [68]. Studien viste at kolkisinaktivert apoptose følger den mitokondriemedierte og ikke den eksogene veien for apoptose via dødsreseptorer. Mitokondriene er generatorene av kjemisk energi til cellene, og de har gjennom flere mekanismer en sentral rolle i kontrollen av celledød [69]. Våre resultater viste at kolkisinforsbindelsene hemmer celleviabilitet, samtidig som immunoblottene viste akkumulering av procaspase-3. Dersom det er slik at en akkumulering av procaspase-3 betyr mindre grad av aktivering til aktiv form, må det diskuteres hva dette kan komme av. I lang tid har forstyrrelse i elektrontransportkjeden vært kjent som et tidlig ledd i celledød [69]. Celleviabilitetsmålinger ved reduksjon av MTS-reagens er avhengig av elektrontransportkjeden som tidligere beskrevet. Selv om celleviabilitetsmålinger ved reduksjon av tetrazoliumsalter er mye i bruk, kan det være at ved

tidspunktet for MTS-tilsetning og målingene ble utført, var cellene kun påvirket i elektrontransportkjeden og ikke på caspasenivå. Med tanke på at cellene analysert ved immunoblotting var inkubert med kolkisinforbindelsene i en kortere tidsperiode (24 timer) enn cellene til viabilitetsmålinger (48 timer), kan det være at caspaseaktivering ikke var startet.

I tillegg må det også vurderes om akkumulering av procaspase-3 ikke har en sammenheng med nedgang av den aktive formen av caspase-3, siden vi ikke detekterte aktiv caspase-3 som kan bekrefte dette. Det bør derfor kjøres caspaseaktivitetsmålinger før en eventuell konklusjon kan trekkes.

4.6 Legumainaktivitet

Det ble observert en reduksjon av legumainaktivitet i både HEK293 og M38L etter behandling med de tre kolkisinforbindelsene. Samtidig viser forbindelsene forskjellig grad av legumainhemming som i stor grad samsvarer med effektene de har på celleviabilitet. Det kan spekuleres i om kolkisinforbindelsene i seg selv har direkte effekt på legumainaktiviteten, eller om nedgangen kommer av at cellenes mitokondrier påvirkes og at cellene deretter dør. Det har blitt vist at kolkisin rammer den mitokondrielle veien i apoptosemekanismen [68]. I den lysosomale membranen sitter det en adenosintrifosfat(ATP)-drevet protonpumpe som pumper protoner inn i lysosomene for å opprettholde en sur pH [29]. Ved forstyrrelse av elektrontransportkjeden vil ATP-produksjonen reduseres og man kan tenke seg at lysosomenes protonpumpe påvirkes slik at det sure miljøet inne i lysosomene dermed ikke opprettholdes. Uten det sure miljøet vil ikke prolegumain autoaktiveres, og dette kan forklare akkumuleringen av prolegumain og nedgangen i aktiv moden form av legumain sett ved immunoblotting.

5 Konklusjon

Data fra denne Masteroppgaven viser at:

- Toksisiteten av kolkisin reduseres ved konjugering med aminosyren valin, og en ytterligere reduksjon vises ved konjugering med peptidsekvensen Suc-Ala-Ala-Asn-Val (kolkisin-prodrug).
- M38L celler (overuttrykker legumain) er mer sensitive enn HEK293 celler (kontroll) for behandling med kolkisin-prodrug. Dette tyder på at kolkisin-prodrug blir spaltet til aktiv forbindelse av legumain i cellene.
- I HCT-116 celler (fra tykktarmskreft) har kolkisin-prodrug en generelt lavere toksisitet enn kolkisin-valin. Denne cellelinjen viser at konjugering med den aktuelle peptidsekvensen reduserer den generelle toksisiteten til kolkisin.
- Tilsetning av legumainhemmeren cystatin E/M beskytter cellene mot prodrugets toksiske effekter og dette viser at cellene er avhengig av legumain for spaltning av kolkisin-prodrug.
- Effektene etter tilsetning av endocytosehemmeren Dyngo4a indikerer at endocytose er involvert i opptaket av kolkisin-prodrug i cellene.
- Kolkisinforbindingene reduserer legumainaktiviteten i HEK293 og M38L, men i ulik grad. Elektroforese og immunoblott av cellelysatene viser en akkumulering av prolegumain (56 kDa) og reduksjon i aktiv moden form av legumain (36 kDa).
- Caspasehemmeren biotin-VAD-fmk reduserer legumainaktivitet i HEK293, M38L og HCT-116, men viser ikke effekt på celleviabilitet etter behandling med kolkisin-prodrug i HEK293 og HCT-116.

Litteraturliste

1. Norsk-Elektronisk-Legehåndbok. *Kreft*. 2009 [cited 2013 04.04]; Available from: <http://legehandboka.no/kreft/pasientinformasjon/om-kreft/kreft-1808.html>.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Liu, C., et al., *Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy*. *Cancer Research*, 2003. **63**(11): p. 2957-2964.
4. Mohamed, M.M. and B.F. Sloane, *Cysteine cathepsins: Multifunctional enzymes in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2006. **6**(10): p. 764-775.
5. Rawlings, N.D., A.J. Barrett, and A. Bateman. *MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. 2012; Available from: <http://merops.sanger.ac.uk/>.
6. Turk, B., *Targeting proteases: Successes, failures and future prospects*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006. **5**(9): p. 785-799.
7. Chen, J.M., et al., *Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases*. *FEBS Letters*, 1998. **441**(3): p. 361-365.
8. Halfon, S., et al., *Autocatalytic activation of human legumain at aspartic acid residues*. *FEBS Letters*, 1998. **438**(1-2): p. 114-118.
9. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(12): p. 8090-8098.
10. Yamane, T., et al., *Legumain from bovine kidney: its purification, molecular cloning, immunohistochemical localization and degradation of annexin II and vitamin D-binding protein*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1596**(1): p. 108-20.
11. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(40): p. 38980-38990.
12. Chen, J.M., M. Fortunato, and A.J. Barrett, *Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue*. *Biochemical Journal*, 2000. **352**(2): p. 327-334.
13. Choi, S.J., et al., *Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(39): p. 27747-27753.
14. Choi, S.J., et al., *Osteoclast inhibitory peptide 2 inhibits osteoclast formation via its C-terminal fragment*. *J Bone Miner Res*, 2001. **16**(10): p. 1804-11.
15. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. *Nature*, 1998. **396**(6712): p. 695-699.
16. Clerin, V., et al., *Expression of the cysteine protease legumain in vascular lesions and functional implications in atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2008. **201**(1): p. 53-66.
17. Miller, G., et al., *Asparagine endopeptidase is required for normal kidney physiology and homeostasis*. *FASEB Journal*, 2011. **25**(5): p. 1606-1617.
18. Shirahama-Noda, K., et al., *Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(35): p. 33194-33199.

19. Morita, Y., et al., *Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells*. FEBS Letters, 2007. **581**(7): p. 1417-1424.
20. Ohno, Y., et al., *Association of legumain expression pattern with prostate cancer invasiveness and aggressiveness*. World Journal of Urology, 2012: p. 1-6.
21. Johansen, H.T. and R. Solberg, *Extracellular functions of cysteine proteases*. 239-260.
22. Turk, V., V. Stoka, and D. Turk, *Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance*. Frontiers in Bioscience, 2008. **13**(14): p. 5406-5420.
23. Briggs, J.J., et al., *Cystatin E/M suppresses legumain activity and invasion of human melanoma*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 17.
24. Cocco, G., D.C. Chu, and S. Pandolfi, *Colchicine in clinical medicine. A guide for internists*. Eur J Intern Med, 2010. **21**(6): p. 503-8.
25. Lu, Y., et al., *An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site*. Pharmaceutical Research, 2012. **29**(11): p. 2943-2971.
26. Apotekforeningen, *Apotekinfo Kolkisin NAF 0,5 mg tablett*, 2012.
27. Reseptregisteret, *Kolkisin*, 2013.
28. BiotechLand. [cited 2013 04.04]; Available from: http://www.biotechland.it/appunti_biologia%20gen_2_citoscheletro.html.
29. Alberts, B., et al., *essential cell biology*. 2004.
30. Massarotti, A., et al., *Identification of novel antitubulin agents by using a virtual screening approach based on a 7-point pharmacophore model of the tubulin colchicine site*. Chemical Biology and Drug Design, 2011. **78**(6): p. 913-922.
31. Friesen, D.E., et al., *Discovery of Small Molecule Inhibitors that Interact with γ -Tubulin*. Chemical Biology and Drug Design, 2012. **79**(5): p. 639-652.
32. Niel, E. and J.M. Scherrmann, *Colchicine today*. Joint Bone Spine, 2006. **73**(6): p. 672-8.
33. Lexicomp, *Colchicine*, 2012.
34. Norsk-Elektronisk-Legehåndbok. *Arthritis urica*. 2013 [cited 2013 04.04]; Available from: <http://legehandboka.no/revmatologi/tilstander-og-sykdommer/artritter/arthritis-urica-3227.html>.
35. Norsk-Elektronisk-Legehåndbok. *Behcets sykdom*. 2012 [cited 2013 04.04]; Available from: <http://legehandboka.no/hud/tilstander-og-sykdommer/systemiske-sykdommer/behcets-sykdom-17797.html>.
36. Norsk-Elektronisk-Legehåndbok. *Familiær Middelhavsfeber*. 2010 [cited 2013 04.04]; Available from: <http://legehandboka.no/sjeldne-tilstander/sjeldne-tilstander-net/familier-middelhavsfeber-35728.html>.
37. Imazio, M., et al., *Colchicine for recurrent pericarditis (CORP): a randomized trial*. Ann Intern Med, 2011. **155**(7): p. 409-14.
38. Adler, Y., et al., *Usefulness of colchicine in preventing recurrences of pericarditis*. American Journal of Cardiology, 1994. **73**(12): p. 916-917.
39. Nidorf, S.M., et al., *Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2013. **61**(4): p. 404-406.
40. Crielaard, B.J., et al., *A polymeric colchicinoid prodrug with reduced toxicity and improved efficacy for vascular disruption in cancer therapy*. International journal of nanomedicine, 2011. **6**: p. 2697-2703.
41. Wu, W., et al., *Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms*. Cancer Research, 2006. **66**(2): p. 970-980.

42. Nguyen, L.M., *Syntese og biologisk evaluering av nye legumainsubstrater med antineoplastisk effekt, som mulige selektive hemmere av tumorvekst*, in *Det matematisk-naturvitenskapelige fakulter* 2011/2012, Universitetet i Oslo: Oslo.
43. Stern, L., et al., *A novel antitumor prodrug platform designed to be cleaved by the endoprotease legumain*. *Bioconjugate Chemistry*, 2009. **20**(3): p. 500-510.
44. Bajjuri, K.M., et al., *The Legumain Protease-Activated Auristatin Prodrugs Suppress Tumor Growth and Metastasis without Toxicity*. *ChemMedChem*, 2011. **6**(1): p. 54-59.
45. Thomas, P. and T.G. Smart, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005. **51**(3): p. 187-200.
46. Smith, R., et al., *Intra- and extracellular regulation of activity and processing of legumain by cystatin E/M*. *Biochimie*, 2012. **94**(12): p. 2590-2599.
47. Solberg, S. and O.D. Lærum, *Cryobiology: Freeze preservation and storage of living cells and tissues*. *Kryobiologi - Nedfrysing og oppbevaring av levende celler og vev*, 2004. **124**(20): p. 2607-2609.
48. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
49. Johansen, H.T., C.G. Knight, and A.J. Barrett, *Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis*. *Analytical Biochemistry*, 1999. **273**(2): p. 278-283.
50. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction*, 2005. p. 127-152.
51. Repnik, U. and B. Turk, *Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death*. *Mitochondrion*, 2010. **10**(6): p. 662-669.
52. Kreftforeningen. *Hva er kreft?* 2013; Available from: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/hva-er-kreft/>.
53. Haugen, M.H., et al., *Nuclear Legumain Activity in Colorectal Cancer*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(1).
54. Chen, J.M., et al., *Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase*. *Biol Chem*, 2001. **382**(5): p. 777-83.
55. Li, Q. and H.L. Sham, *Discovery and development of antimetabolic agents that inhibit tubulin polymerisation for the treatment of cancer*. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2002. **12**(11): p. 1663-1702.
56. Varzhabetian, L.R., D.V. Glazachev, and K.B. Nazarian, *[Molecular dynamics simulation of the tubulin dimer with cytostatics]*. *Mol Biol (Mosk)*, 2012. **46**(2): p. 348-53.
57. Nabha, S.M., et al., *Evaluation of combretastatin A-4 prodrug in a non-Hodgkin's lymphoma xenograft model: Preclinical efficacy*. *Anti-Cancer Drugs*, 2001. **12**(1): p. 57-63.
58. Goto, H., et al., *Activity of a new vascular targeting agent, ZD6126, in pulmonary metastases by human lung adenocarcinoma in nude mice*. *Cancer Res*, 2002. **62**(13): p. 3711-5.
59. Finkelstein, Y., et al., *Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug*. *Clin Toxicol (Phila)*, 2010. **48**(5): p. 407-14.
60. Bergeland, T., et al., *Mitotic partitioning of endosomes and lysosomes*. *Curr Biol*, 2001. **11**(9): p. 644-51.

61. Silver, I.A., R.J. Murrills, and D.J. Etherington, *Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts*. Experimental Cell Research, 1988. **175**(2): p. 266-276.
62. Store-Norske-Leksikon. *Endocytose*. 2013 [cited 2013 27.04]; Available from: http://snl.no/sml_artikkel/endocytose.
63. Grant, B.D. and J.G. Donaldson, *Pathways and mechanisms of endocytic recycling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 597-608.
64. McMahon, H.T. and E. Boucrot, *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(8): p. 517-33.
65. Harper, C.B., et al., *Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism*. J Biol Chem, 2011. **286**(41): p. 35966-76.
66. Rozman-Pungerčar, J., et al., *Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: When reaction mechanism is more important than specificity*. Cell Death and Differentiation, 2003. **10**(8): p. 881-888.
67. Company, K.B. *Product data sheet-biotin-VAD-fmk*. 2007 [cited 2013 27.04]; Available from: <http://www.kamiyabiomedical.com/pdf/AB-014.pdf>.
68. Chen, X.M., et al., *Colchicine-induced apoptosis in human normal liver L-02 cells by mitochondrial mediated pathways*. Toxicology in Vitro, 2012. **26**(5): p. 649-655.
69. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.

Vedlegg

Celledyrking og høsting

Dyrkningsmedium for HEK293, M38L og HCT-116 (HEK-medium)

440 ml DMEM med 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukose

50 ml Føtalt kalveserum (FBS)

5 ml Natriumpyrovat

5 ml Penicillin (100U/ml)- Streptomycin (100 µg/ml)

1X PBS

0,2 g NaH₂PO₄xH₂O

1 g NaH₂PO₄x2H₂O

6 g Na₂ C₆H₅O₇x2H₂O

8 g NaCl

dH₂O til **1,0 L**

Lysisbuffer (pH 5,8)

14,71 g Natriumcitrat (Na₃C₆H₅O₇x2H₂O)

0,19 g Na₂-EDTA

5 g N-oktyl-β-D-glukopyranosid

HCl/NaOH for justering av pH til 5,8

dH₂O til **500 ml**

Lysisbuffer (pH 4,0)

14,71 g Natriumcitrat (Na₃C₆H₅O₇x2H₂O)

0,19 g Na₂- EDTA

5 g N-oktyl-β-D-glukopyranosid

HCl/NaOH for justering av pH til 4,0

dH₂O til **500 ml**

Totalproteinmåling

Fortynnet Coomassiereagens 1:5

10 ml Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

40 ml dH₂O

Legumainmåling

Legumain-assaybuffer (pH 5,8)

8,3005 g Sitronsyre ($C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$)

21,537 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

0,37224 g Na_2EDTA

0,1 g CHAPS

dH₂O til **1,0 L**

200 µl 200mM ditiontreitol (DTT) tilsettes 40 ml assaybuffer rett før bruk

Legumain-substratoppløsning (34 µM)

200 µl av stamløsning Z-Ala-Ala-Asn-AMC (2,5 mM i DMSO) til sluttkonsentrasjon 34 µM

14,5 ml Assaybuffer

Immunoblotting (Westernblotting)

Blottebuffer

400 ml 10 X Tris/Glycine-buffer (Bio-Rad)

800 ml Metanol (MeOH),

2,8 L dH₂O

Blotto 5 % 100ml

5 g Fettfri tørrmelk,

1 X T-TBS til **100 ml**

Elektroforesebuffer

Fortynnes 1:20

40 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)

dH₂O til **800 ml**

500 µl NuPAGE® Antioksidant direkte i elektroforesekaret

10 X T-TBS 2L

24,2 g Tris

146,8 g NaCl

10 ml Tween 20®

dH₂O til **2 L**

HCl/NaOH for pH-justering til pH 7,5

Fortynnes til 1 X med dH₂O ved bruk.

10 X T-TBS 2L- ny oppskrift

48,4 g Tris

220,2 g NaCl

20 ml Tween 20®

dH₂O til **2 L**

HCl/NaOH for pH-justering til pH 7,5

Fortynnes til 1 X med dH₂O ved bruk

Forberedelse av prøver for elektroforese

Etter målt totalproteinmengde beregnes volum lysat fra prøven (for å gi ønsket totalproteinmengde) + volum lysisbuffer for at disse skal bli 13 µl totalt.

X µl lysat fra forsøk

+ X µl lysisbuffer

= 13 µl totalvolum

+ 5 µl 4 X LDS Sample Buffer

+ 2 µl 0,5M DTT

= 20 µl totalvolum

Vortex og varmes i 10 minutter ved 70 °C

Poster

Poster presentert på Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi (NSFT) Vintermøte
24-27. januar 2013

"Cellular effects of a colchicine-prodrug cleaved by legumain"

(neste side)



Cellular effects of a colchicine-prodrug cleaved by legumain

Tina Elvestrand^a, Ove Alexander Hogmoen Åstrand^b, Robert Smith^a, Pål Rongved^b, Hilde Nilsen^a, Rigmor Solberg^a, and Harald Thidemann Johansen^a
^aDepartment of Pharmaceutical Bioscience, and ^bDepartment of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Oslo, PO Box 1068 Blindern, 0316 Oslo. tinael@student.farmasi.uio.no

INTRODUCTION

Legumain is an asparaginyl endopeptidase expressed in most human tissues. Malignant tumors have shown increased expression of legumain, and it has been suggested that this could be an indicator of tumor invasiveness and ability to form metastases. Because of the substrate specificity of legumain restricted to cleavage of peptide bonds carboxyterminally to asparagine (Asn), legumain could be an interesting target in cancer treatment.

The drug colchicine has been used for the treatment of gout and familial Mediterranean fever. Since this drug and its derivatives have the ability to bind to tubulin in the mitotic spindle and therefore inhibit mitosis, colchicine has a potential also in cancer therapy. To avoid the general toxicity of colchicine, a prodrug (Ala-Ala-Asn-Val-colchicine) that is cleaved by legumain has been developed. In this study, the cellular effects of colchicine versus the prodrug will be investigated.

METHODS

A human embryonic kidney (HEK293; ATCC, CRL-1573) and a stably monoclonal legumain over-expressing HEK293 (M38L) cell lines have been used as cell models. Cell viability after treatment with colchicine, colchicine-valine (-Val) and colchicine-prodrug (-prodrug) was measured by MTS analysis. Concentration and activity of legumain was analyzed by immunoblotting and a specific fluorogenic legumain-specific peptide substrate.

Abbreviations: MTS, tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfonylphenyl)-2H-tetrazolium, inner salt.

RESULTS

Colchicine and conjugates caused reduced cell viability

- Cell viability was reduced after treatment with all three compounds, but to a different extent by the same concentrations.
- 70 % viability was reached by 0.025 μ M colchicine and 0.3 μ M colchicine-valine in both HEK293 and legumain over-expressing (M38L) cells. However, the two cell lines responded differently when exposed to colchicine-prodrug. While 70 % viability of HEK293 required approx. 1.5 μ M prodrug, M38L cells was affected at similar concentrations as colchicine alone (0.025 μ M).

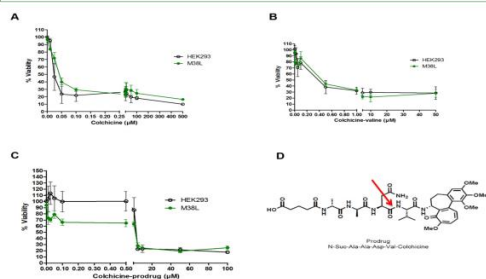


Figure 1. Cell viability measured 48 hours after stimulation with colchicine (A), colchicine-valine (B) and colchicine-prodrug (C; structure (D)). HEK293 and M38L cells were treated with 0 to 500 μ M of each compound, respectively, and cell viability was measured by MTS (n=3). Red arrow indicates expected cleavage point for legumain.

- Preliminary results indicated accumulation of procaspase-3 (34 kDa) after cell treatment with increasing concentrations of either colchicine or conjugates.

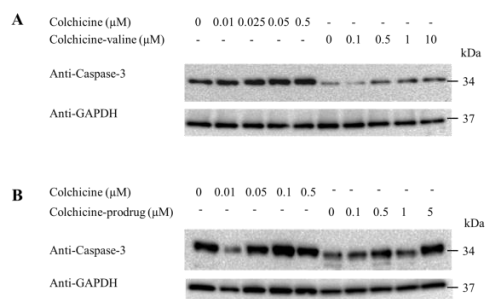


Figure 2. Immunoblots showing caspase-3 expression in M38L cells after treatment with different concentrations of colchicine (A and B), colchicine-valine (A) or colchicine-prodrug (B) as indicated. A human/mouse caspase-3 antibody (R&D Systems) was used for detection. (n=2)

Legumain activity was inhibited by both colchicine and -prodrug

- Colchicine, -valine or -prodrug all decreased legumain activity in both HEK293 and M38L (legumain over-expressing) cells, but to various extent.
- Colchicine-valine and colchicine-prodrug reduced legumain activity by a 10- or 100-fold higher concentration, respectively, compared to colchicine.
- Both cell types responded similar to the three experimental substances.

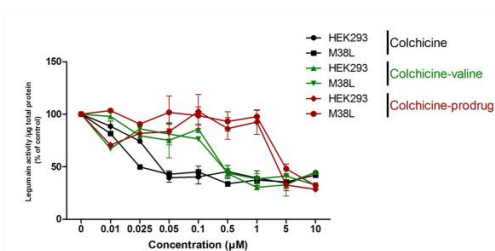


Figure 3. Legumain activity in HEK293 and M38L cells treated with colchicine (black), colchicine-valine (green) and colchicine-prodrug (red). Legumain activity was measured in cell lysates after 24 hours of incubation with the experimental compounds and is expressed as mean +/- S.E.M (n=3).

Decreased processing of legumain by colchicine or -prodrug

- Immunoblots showed an accumulation of prolegumain (56 kDa) with increasing concentrations of colchicine or conjugates. This was accompanied with reduced mature (active) form (36 kDa).
- Both colchicine-valine and colchicine-prodrug required a higher concentration than colchicine before accumulation of prolegumain became apparent.
- These observations were consistent with the observed decrease in legumain activity.

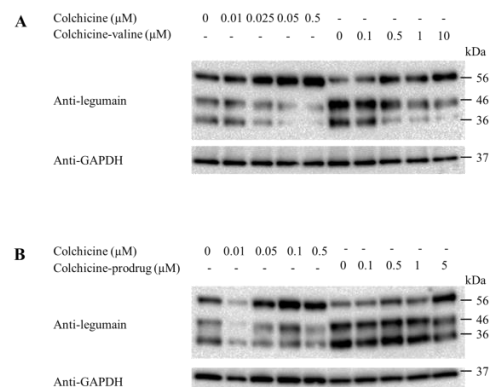


Figure 4. Immunoblots showing legumain expression in M38L cells after treatment with colchicine (A and B), colchicine-valine (A), and colchicine-prodrug (B) as indicated. For detection of legumain bands, a polyclonal human legumain antibody (R&D Systems) was used. One representative blot is shown (n=2).

CONCLUSIONS

- Colchicine-prodrug was more toxic to cells over-expressing legumain (M38L) than control (Fig. 1), indicating cell-specific targeting, resulting from cleavage of the prodrug and possibly toxicity by colchicine-val.
- No differences in cell viability of HEK293 and M38L were observed after treatment with colchicine or colchicine-valine (Fig. 1).
- Legumain activity decreased with increasing concentrations of the three compounds (Fig. 3), reflected in accumulation of prolegumain (Fig. 4).