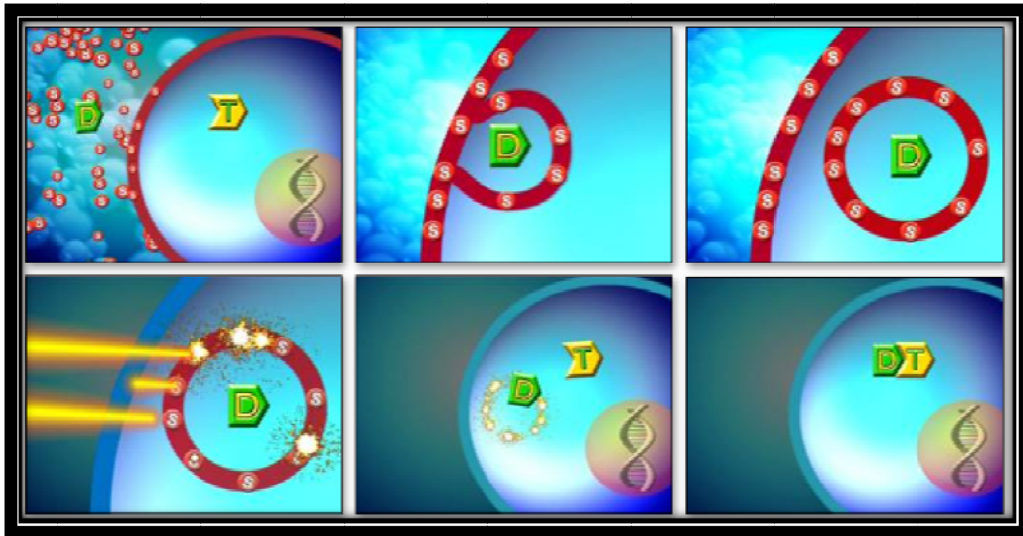


Målrettet behandling av cancerceller med stamcellelignende egenskaper ved fotokjemisk internalisering (PCI) av immuntoksiner rettet mot CSPG4 og CD271 i malignt melanom og brystkreft



Jagdip Kaur
2013

Målrettet behandling av cancerceller med stamcellelignende egenskaper ved fotokjemisk internalisering (PCI) av immuntoksiner rettet mot CSPG4 og CD271 i malignt melanom og brystkreft

Av

Jagdip Kaur

Masterstudium i Biomedisin

Fakultet for helsefag

Vår 2013

Masteroppgave, 60 studiepoeng

Seksjon for strålingsbiologi

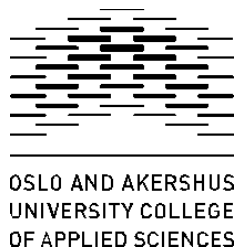
Institutt for kreftforskning

Oslo Universitetssykehus

Radiumhospitalet

Veileder: Dr. Pål Kristian Selbo

Biveileder: M. Pharm. Marius Strømbo Eng



© Jagdip Kaur

2013

Målrettet behandling av cancerceller med stamcellelignende egenskaper ved fotokjemisk internalisering (PCI) av immuntoksiner rettet mot CSPG4 og CD271 i malignt melanom og brystkreft

Jagdip Kaur

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført i perioden august 2012 til mai 2013 ved Seksjon for strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning ved Radiumhospitalet. Prosjektet har inngått i Senter for forskningsdrevet innovasjon - Cancer Stem Cell Innovation Center (SFI-CAST) som er et konsortium som består av samarbeidspartnere fra industri og academia, og er utnevnt av Forskningsrådet.

En stor takk rettes til min veileder Dr. Pål Kristian Selbo for en spennende og lærerik masteroppgave og for å få være en del av PCI-gruppen. Tusen takk for all veiledning, gode faglige diskusjoner, tillitt og oppmuntring jeg har fått underveis ved utførelsen av oppgaven.

Jeg vil også takke stipendiat Marius Strømbo Eng som har vært min biveileder. Tusen takk for all praktisk veiledning og for at du alltid har hatt tid til å svare på spørsmål, og gitt meg gode tilbakemeldinger. Jeg vil også takke stipendiat Monica Bostad for all hjelp og opplæring på laboratoriet. En stor takk rettes også til Professor Kristian Berg og PCI-gruppen for en varm velkomst, faglig stimulerende miljø og hjelp under det eksperimentelle arbeidet.

Jeg vil også takke Idun D. Rein og Kirsti S. Landsverk ved kjernefasiliteten for flowcytometri og Ellen Skarpen ved kjernefasiliteten for konfokalmikroskopi for deres ekspertise og assistanse.

Til slutt vil jeg takke masterstudentene Marianne Kausberg, Camilla Lavoll, Sissel Hauge og Lise Sandquist. Takk for faglige og ikke-faglige diskusjoner som har bidratt til en hyggelig periode.

Radiumhospitalet, Oslo 21.mai 2013

Jagdip Kaur

Sammendrag

I løpet av de siste årene har et stort antall makromolekyler blitt undersøkt med hensyn på å kunne behandle kreft og andre sykdommer, men mange av makromolekylene som blir tatt opp av cellen ved endocytose blir degradert i endocytiske vesikler noe som hindrer deres terapeutiske virkning. Fotokjemisk internalisering (PCI) er en ny metode som gir en stedsspesifikk overføring av legemidler som normalt ikke kan nå deres mål innenfor cellen.

I denne studien ble PCI benyttet for å øke den cytotoksiske effekten av immuntoksiner (IT) målrettet mot de mulige cancer stamcellemarkørene CSPG4 og CD271 i brystkreft- og malignt melanom cellelinjer. Immuntoksinene består av mAb CD271 (ME20.4-saporin) eller mAb CSPG4 (225.28-saporin) bundet til det ribosominaktiverende plantetoksinet saporin. I denne studien demonstreres det at PCI øker den cytotoksiske effekten av immuntoksinet ME20.4-saporin i brystkreft cellelinjene (MCF-7 og MDA-MB-435) som uttrykker CD271 og immuntoksinet 225.28-saporin i trippel negative brystkreftcellelinjene (SUM149 og MDA-MB-231) og malignt melanom cellelinjen (MelMet 5) som uttrykker CSPG4. Spesifikk binding og opptak av CD271 og kolokalisering med fotosensitizeren TPCS_{2a} ble vist med konfokalmikroskopi, mens opptak av TPCS_{2a} i endosomene/lysosomene ble vist med epi-fluorescensmikroskopi. MCF-7 celler som var CD271⁺ ble isolert med fluorescens aktivert celledatering og hadde 4 ganger økt kapasitet til å danne sfæroider enn CD271⁻ celler.

Denne studien demonstrerer at brystkreft og malignt melanom kan effektivt og selektivt bli målrettet *in vitro* ved PCI av immuntoksiner spesifikke for CSPG4 og CD271, og er den første PCI-studien hvor målrettet drap av brystkreftceller via CD271-reseptoren er utført. Denne studien danner et viktig grunnlag for videre PCI-basert terapi målrettet mot CSPG4 og CD271 *in vivo*.

Abstract

During the last years, a large number of macromolecules have been investigated to treat cancer and other diseases. However, a major obstacle for macromolecules are the plasma membrane or that they are taken up by the cell by endocytosis and are degraded in endocytic vesicles which prevent their therapeutic effect. Photochemical internalization (PCI) is a novel drug delivery technology that provides a site-specific delivery of drug that is normally unable to reach their targets within cells.

In this study, PCI was used to increase the cytotoxic effects of immunotoxins (IT) targeting the putative cancer stem cell markers CD271 and CSPG4 in breast cancer and malignant melanoma cell lines. The immunotoxins consisted of the mAb CD271 (ME20.4-saporin) or mAb CSPG4 (225.28-saporin) bound to the ribosome inactivating plant toxin saporin. This study demonstrate that PCI increases the cytotoxic effects of the immunotoxin ME20.4-saporin targeting CD271-expressing cancer cells of breast (MCF-7 and MDA-MB-435) origin and immunotoxin 225.28-saporin targeting CSPG4-expressing cancer cells of triple-negative breast (SUM149 and MDA-MB-231) and malignant melanoma (MelMet 5) origin. Specific binding and uptake of CD271, and co-localization with the photosensitizer TPCS_{2a} was shown by confocal microscopy, and uptake of TPCS_{2a} in endosomes/lysosomes was determined by fluorescence microscopy. CD271⁺ MCF-7 cells, isolated by fluorescence activated cell sorting, had a 4-fold higher capacity to initiate spheroids than CD271⁻ cells.

This study demonstrates that breast cancer and malignant melanoma can be efficiently and selectively targeted *in vitro* using PCI of immunotoxins specific for CSPG4 and CD271, and is the first of its kind to demonstrate targeting of CD271 by PCI-induced delivery of ME20.4-saporin in breast cancer. This study is an important foundation for further PCI-based therapies targeting CSPG4 and CD271 *in vivo*.

Forkortelser

225.28-saporin	Anti-CSPG4 immuntoksin
CD271	Cluster of Differentiation 271
CSC	Cancer stamceller
CSPG4	Chondroitin sulfat proteoglykan 4
DMSO	Dimethyl sulfoksid
EDTA	Etylen-diamin-tetra-eddikesyre
EMT	Epitelial-mesenchymal transformasjon
EpCAM	Epitelial-celle adhesjonsmolekyl
ER	Østrogen reseptor
FACS	Fluorescens aktivert cellesortering
FBS	Føkal kalveserum
FSC	Forward scatter
HDL	High density lipoprotein
HER2	Human epidermal vekstfaktor reseptor 2
HEScm	Human embryonal stamcellemedium
IT	Immuntoksin
kDa	kilo Dalton
LAF	Laminar flow
LDL	Low density lipoprotein
mAb	Monoklonalt antistoff
MAPK	Mitogen-aktivert proteinkinase
ME20.4-saporin	Anti-CD271 immuntoksin
MTT	3-(4, 5-dimetylthiazol-2-yl)-2, 5-difenyltetrazolium bromide
$^1\text{O}_2$	Singlett oksygen
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCI	Fotokjemisk internalisering
PDT	Fotodynamisk terapi

PE	Phycoerythrin fluorokrom
PR	Progesteron reseptor
PS	Fotosensitizer
RIP	Ribosominaktiverende protein
ROS	Reaktive oksygenarter
SSC	Side scatter
TIC	Tumor-initierende celler
TNBC	Trippel-negative brystkreft
TPCS _{2a}	Disulfonert meso-tetrafenyl-chlorin
TPPS _{2a}	Disulfonert tetrafenyl phorfin

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	1
1.1 Bakgrunn for oppgaven.....	1
1.2 Kreft	2
1.2.1 Evne til proliferasjon i fravær av ytre stimuli	2
1.2.2 Manglende sensitivitet for vekstinhiberende regulering	2
1.2.3 Evne til å unngå apoptose.....	3
1.2.4 Ubegrenset replikativt potensial.....	3
1.2.5 Vedvarende stimulering av angiogenese.....	3
1.2.6 Evne til invasjon og metastasering.....	3
1.3 Stamceller og cancerstamceller	4
1.3.1 Stamceller.....	4
1.3.2 Cancer stamceller	5
1.3.2.1 Cancer stamcelleteorien.....	5
1.4 Brystkreft og CSC	7
1.5 Maligne melanomer og CSC	9
1.6 Måltrettet behandling av kreft med Ab	10
1.6.1 Chondroitin sulfat proteoglykan 4 (CSPG4).....	10
1.6.2 Cluster of differentiation 271 (CD271).....	12
1.7 Fotodynamisk terapi.....	13
1.7.1 Akkumulering av fotosensitizer i tumorvev.....	14
1.7.2 Terapeutiske effekter av PDT på tumorvev	15
1.8 Fotokjemisk internalisering (PCI).....	15
1.8.1 PCI av immuntoksiner.....	17
1.8.2 Fordeler og begrensninger ved PCI.....	19
2. Materialer og metoder	21
2.1 Celledyrkning.....	21
2.1.1 Cellelinjer.....	21
2.1.2 Dyrkningsmedium.....	22
2.1.3 Dyrkning og omsetting av celler	22
2.2 PDT og PCI behandling	23
2.2.1 Fotosensitizer og lyskilde.....	23

2.2.2	Toksiner, mAb og immuntoksiner	23
2.2.3	PDT og PCI	24
2.3	Cytotoksisitetsmålinger	25
2.3.1	MTT	25
2.3.2	Klonogen overlevelse	26
2.4	Fluorescens mikroskopi	26
2.4.1	Epi-fluorescensmikroskopi	26
2.4.2	Konfokal mikroskopi	27
2.4.3	Ko-lokaliseringsstudier	28
2.4.4	Blokkering av CD271 reseptoren	29
2.5	Flowcytometri og Fluorescens aktivert cellesortering (FACS)	29
2.5.1	Flowcytometri	29
2.5.2	Antigen analyse	29
2.5.3	Fluorescens aktivert cellesortering (FACS)	30
2.6	Sfæroide dannelse i Methocult	31
3.	Resultater	33
3.1	Tetthetskurver	33
3.2	CSPG4- og CD271 "targeting" i melanomer	34
3.2.1	Plasmamembran ekspresjon av CSPG4 og CD271	34
3.2.2	Intracellulær lokalisering av TPCS _{2a}	34
3.2.3	Intracellulær lokalisering av anti-CD271 mAb	35
3.2.4	PCI behandling av melanom cellelinjen ved immuntoksiner rettet mot CSPG4 og CD271	35
3.3	CSPG4- og CD271 "targeting" i brystkreft	37
3.3.1	Intracellulær lokalisering av TPCS _{2a}	37
3.3.2	CSPG4 "targeting" i brystkreft	38
3.3.3	CD271 "targeting" i brystkreft	42
3.4	Sortering av MCF-7 celler for sfæroidedannelse ved FACS og dyrkning i stamcellemedium	50

4. Diskusjon	51
4.1 CSPG4 og CD271 som "target" for kreftbehandling og deres rolle i CSCc	51
4.1.1 Cellelinjer	51
4.1.2 Plasmamembran ekspresjon av CSPG4	51
4.1.3 Plasmamembran ekspresjon av CD271	52
4.1.4 Bruk av kjemiske forbindelser for disaggregering av celler til flowcytometri ..	53
4.2 Lokalisering av TPCS _{2a} og anti-CD271 mAb	54
4.3 Effektivitet og spesifisitet av PCI behandling	55
4.3.1 PCI av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28-saporin)	55
4.3.2 PCI av anti-CD271 immuntoksin (ME.20.4-saporin)	56
4.4 Stamcellemarkøren CD271	57
4.4.1 Studier av selvfornyelse ved sorterting av høyt uttrykte CD271-positive celler	57
4.5 MDA-MB-435, melanom eller trippel negativ brystcancer-cellelinje?	58
4.6 Mulige eksperimentelle feilkilder	59
4.6.1 Telling og utsåing av celler	59
4.6.2 Beskyttelse mot lys ved arbeid med TPCS _{2a}	59
4.6.3 Behandling med PCI og tillaging av immuntoksin	59
4.6.4 MTT- versus klonogen overlevelsess-assay	59
4.6.5 Cellepassasje og kultivering av cellelinjer	60
5. Konklusjon	61
6. Referanser	63
Vedlegg A	73
Prosedyrer	73
A.1 Cellekultur og behandlinger	73
A.2 Overlevelsess-assay	75
A.3 Immuntoksin	75
A.4 Fluorescens mikroskopi	76
A.5 Merke celler til flowcytometri	77
A.6 Sfæroide dannelse i Methocult	77
Vedlegg B	79
Utstyr og leverandører	79

1. Innledning

1.1 Bakgrunn for oppgaven

Behandling av kreft skjer hovedsakelig ved kirurgi, strålebehandling, og kjemoterapi. De to sistnevnte metodene er i stor grad basert på hemming av proliferasjon og induksjon av celledød som følge av skade på DNA (1). Siden kreftbehandling ikke er spesifikk vil det føre til skade på normale celler og vev, og en rekke andre bivirkninger er også et problem ved tradisjonell kreftbehandling.

I løpet av de siste årene har et stort antall makromolekyler blitt undersøkt med hensyn på å kunne behandle kreft og andre sykdommer. Selv om makromolekylene er spesifikke for kreftceller, så er penetrering gjennom membranen til de endocytiske vesiklene og degradering av makromolekylene av lysosomale enzymer store begrensinger (2, 3). Mange av makromolekylene som blir tatt opp av cellen ved endocytose blir degradert i de endocytiske vesiklene som hindrer deres terapeutiske virkning (4). Fotokjemisk internalisering er en ny metode som gir en stedsspesifikk overføring av legemidler. PCI-teknologien øker det terapeutiske vinduet til medikamenter som akkumuleres i endocytiske organeller. Ved hjelp av PCI-teknologien kan doseringen og behandlingstiden reduseres slik at potensielle alvorlige bivirkninger blir redusert (5).

Formålet med oppgaven er å etablere og evaluere målrettet behandling av kreftstamceller ved hjelp av PCI-teknologien. Selv om det er stor utvikling av medikamenter finnes det ingen kurativ terapi for sene stadier av trippel-negative brystkreft og maligne melanomer. Hensikten med oppgaven er derfor å bruke immuntoksiner mot overflateantigener CSPG4 og CD271 sammen med den nye behandlingsformen fotokjemisk internalisering til behandling av kreftstamceller innenfor brystkreft og maligne melanomer.

1.2 Kreft

Kreft er en sykdom som er svært utbredt i verden, og kan i utgangspunktet oppstå i enhver cellype og alle organer som inngår i menneskekroppen. Kreft karakteriseres av celler som har ukontrollert cellevekst og som har evnen til å invadere og metastasere nytt vev.

Kombinasjonen av disse egenskapene gjør at kreft er potensielt letalt (6). Brystkreft er en av de mest forekomne kreftformene i Norge (1).

En tumor blir kalt for benign så lenge de neoplastiske kreftcellene forblir innkapslet, og de er lokalisert til det vevet de utgår fra, ligner morforlogisk og fungerer omtrent som normale celler. De godartede svulstene kan bli patologiske hvis de overproduserer hormoner eller faktorer som forstyrrer normal homeostase i kroppen. Tumoren (svulsten) blir kalt for malign dersom kreftcellene invaderer omkringliggende vev og metastaserer (danner sekundære tumorer i andre vev og organer). Maligne celler er vanligvis lite differensierte, vokser uorganisert og deler seg hurtigere og/eller dør mindre enn normale celler (6).

I følge Hanahan og Weinberg (2011) finnes det 6 grunnleggende egenskaper hos maligne celler og svulster:

1.2.1 Evne til proliferasjon i fravær av ytre stimuli

Kreftceller trenger ikke stimulering fra eksterne signaler (i form av vekstfaktorer) for å dele seg, slik som normale celler gjør. Kreftcellene kan produsere vekstfaktorligander selv, som de selv reagerer på ved å uttrykke reseptorer for disse vekstfaktorene. Dette kalles autokrin proliferasjonsstimulering. Kreftceller kan også sende signaler til normale celler for å stimulere disse til å levere varierende vekstfaktorer til kreftcellene (7).

1.2.2 Manglende sensitivitet for vekstinhiberende regulering

Kreftcellene er generelt motstandsdyktige mot vekstinhiberende signaler. Normale celler kontrolleres av tumorsuppressor genene RB (retinoblastomgenet) og TP53. Rb-proteinet kontrollerer cellesyklusen ved at den mottar ekstracellulære og intracellulære signaler, og bestemmer om cellen kan fullføre cellesyklusen eller ikke. Kreftceller har ofte defekt i RB-genet, som gjør at cellene kan fullføre cellesyklus selv om de er skadet. TP53 proteinet mottar signaler fra utsiden av cellen og kan trigge stopp i cellesyklus og apoptose dersom cellen er skadet. Kreftceller har ofte defekt i p53-genet (7).

1.2.3 Evne til å unngå apoptose

Apoptose er en form for programmert celledød (selvmord), og dersom cellen blir skadet vil den begå celledød. Kreftceller har evnen til å unngå apoptose, siden de ofte har defekt i p53-genet. P53-genet er et viktig gen som trigger apoptose når cellen er skadet. Apoptose-maskineriet består av oppstrøms- og nedstrøms regulatorer. Kreftceller har evnen til å øke ekspresjon av anti-apoptotiske regulatorer (Bcl-2, Bcl-x_L) eller overlevelsessignaler (Igf1/2) ved å nedregulere pro-apoptotiske faktorer (Bax, Bim, Puma) (7).

1.2.4 Ubegrenset replikativt potensial

Normale celler vil slutte å dele seg etter et viss antall ganger med cellesyklus, og gå inn i en fase som kalles senescence. Kreftceller overlever senescence og blir udødelige og kan derfor vokse og dele seg uendelig. Enzymet telomerase, som forlenger telomerlengdene, er aktivt i kreftceller og er en viktig faktor for å gjøre dem udødelige. Høy telomerase aktivitet gjør at kreftcellene blir resistente mot både senescence og apoptose.

1.2.5 Vedvarende stimulering av angiogenese

Kreftceller har evne til å stimulere angiogenese (prosessen når nye blodårer dannes) slik at cellen mottar en kontinuerlig tilførsel av oksygen og andre næringsstoffer. Tumor trenger næring i form av næringsstoffer og oksygen, og trenger å kvitte seg med metabolske avfallsstoffer og karbondioksid (7). Dannelse av blodårer er ikke bare viktig for å forsyne tumoren med næringsstoffer og oksygen, men også for videre spredning og metastase (6).

1.2.6 Evne til invasjon og metastasering

Kreftceller har evnen til å invadere omkringliggende vev og spre seg direkte. Dette skjer ved at kreftcellene har evne til å trenge inn i lymfe- og blodårer, sirkulere blodstrømmen og invadere normalt vev andre steder i kroppen, det er dette som kalles metastasering. Metastaser er ansvarlig for 90 % av kreftrelatert død. I kreftceller er det tap av eller svekket funksjon av E-cadherin. E-cadherin er et molekyl som er viktig for celle-til-celle adhesjon. Tap av E-cadherin vil føre til at bindingen mellom epitelcellene svekkes slik at cellene mister sin polaritet, og da kan kreftcellene migrere og trenge inn i lymfe- og blodårer (7).

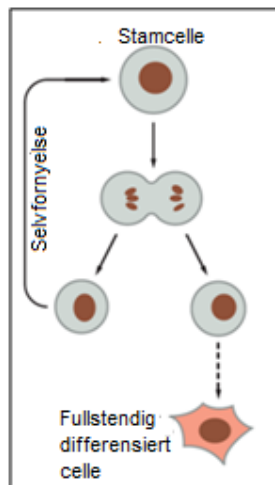
1.3 Stamceller og cancerstamceller

1.3.1 Stamceller

Stamceller finnes i de fleste multicellulære organismer, og blir karakterisert etter deres evne til proliferasjon, selvfornyelse, differensieringskapasitet og regenerering av vev. Stamceller kan gjennomgå selvfornyende celledeling og gi opphav til mer spesialiserte differensierte celler (6, 8).

Stamceller defineres ved tre egenskaper:

1. Stamcellene er udifferensierte.
2. Stamcellen kan dele seg ubegrenset.
3. Når en stamcelle deler seg, kan den ene dattercellen forbli en stamcelle og den andre bli til en fullstendig differensiert celle (asymmetrisk celledeling, figur 1.2).



Figur 1.2: Definisjonen av en stamcelle

Hver dattercelle som produseres når en stamcelle deler seg, kan enten forbli en stamcelle eller bli en fullstendig differensiert celle. Tilpasset figur fra Molecular biology of the cell, 2008 (6).

Alternativt kan to datterceller forbli stamceller (symmetrisk celledeling) eller, i noen sjeldne tilfeller to differensierte celler (symmetrisk celledeling som medfører tap av stamcelleegenskap) (6).

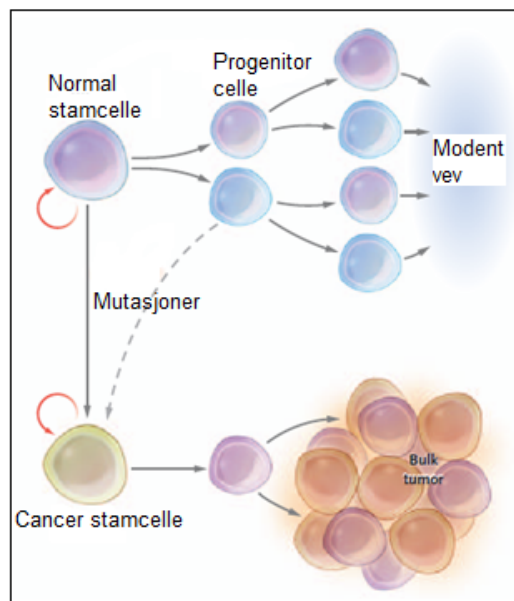
Det finnes hovedsakelig to typer stamceller: embryonale stamceller og somatiske stamceller. Embryonale stamceller isoleres fra den indre cellebestanddelen av blastocytter, og disse stamcellene er pluripotente siden disse kan differensieres til alle celletyper. Mens somatiske stamceller finnes i somatisk vev, og disse er multipotente siden deres evne til å differensiere er mer begrenset (8).

1.3.2 Cancer stamceller

Cancer stamceller (CSC), også kalt tumor-initierende celler (TIC), blir klassifisert på bakgrunn av sine stamcellelignende egenskaper. CSC kan slik som normale stamceller dele seg uendelig og gi opphav til flere CSC og progenitorceller som kan differensieres til ulike celletyper som tumoren består av (9, 10).

1.3.2.1 Cancer stamcelleteorien

Cancer stamcelleteorien postulerer at i en tumor er det en liten populasjon av cancerceller, cancer stamceller, som kan dele seg uendelig og opprettholde tumoren. Cancer stamcellene har evnen til å både dele seg og differensiere til ulike ikke-tumor-initierende celletyper som bidrar til bulkpopulasjonen og heterogeniteten i tumoren. Cancer stamcelleteorien, som er omdiskutert, indikerer at CSC oppstår ved mutasjoner i normale stamceller eller muterte progenitorceller. Progenitorcellene har stor evne til replikasjon, men de mangler evnen til selvfornyelse. For å bli en cancer stamcelle må en progenitor celle gjennomgå mutasjoner slik at den får evnen til selvfornyelse (10).

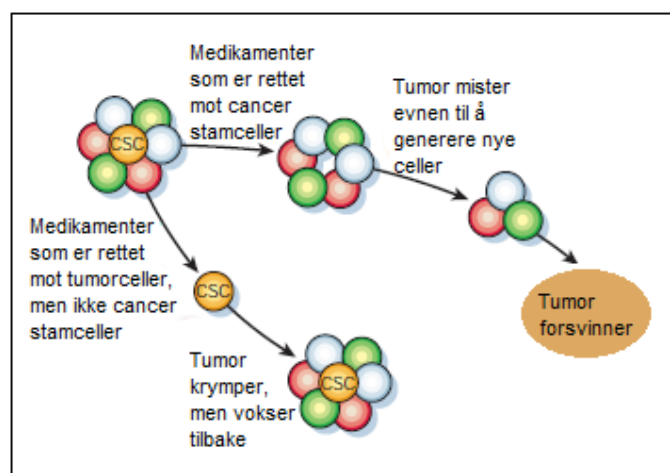


Figur 1.3: Stamcelle systemet

Normalt vev oppstår fra en sentral stamcelle som vokser og differensierer til progenitor og modne cellepopulasjoner. Normale stamceller har evnen til selvfornyelse, differensiering og enorm proliferasjonskapasitet. CSC kan oppstå ved mutasjoner i normale stamceller eller progenitor celler, som kan vokse og differensiere til primære tumorer. Slik som normale stamceller har CSC evnen til selvfornyelse, gi opphav til heterogene populasjoner av datterceller og proliferere enormt. Tilpasset figur fra Jordan *et al.* 2006 (10).

Kreftstamcelle teorien baserer seg på at bare en liten andel av cellene (CSC) i tumor er i stand til å gjenskape tumoren. CSC kan være opphavet til de maligne cellene i primær tumor, de deler seg normalt sakte og overuttrykker overflatemarkører som finnes på normale celler. I følge kreftstamcelle teorien gir CSC opphav til celler som er stråle- og legemiddel-resistente og som forårsaker tilbakefall etter terapi eller former metastaser (10).

Eksisterende behandlinger av kreft er rettet mot bulkpopulasjonen av tumorceller, siden dette fører til at tumoren krymper. Det virker som at normale stamceller fra ulike vev er mer resistente for kjemoterapi enn de modne celletypene fra samme vev. Dersom dette er tilfellet for cancer stamceller vil en predikere at disse cellene vil være mer resistente for stråle- eller kjemoterapi enn tumorceller med begrenset proliferasjonspotensial. Selv om terapi forårsaker fravær av tumor vil det være igjen nok cancer stamceller til gjenvekst av tumoren. Terapi som er mer spesifikt rettet mot cancer stamceller vil i følge kreftstamcellemodellen resultere i bedre respons og eventuelt kurere kreft (11).



Figur 1.4: Behandling av kreftceller og kreftstamceller.

Vanlig terapi forårsaker krymping av tumoren ved å drepe celler med begrenset proliferasjonspotensial. Hvis cancer stamcellene er mindre sensitive mot disse behandlingene vil de forbli levende etter terapi, og resistens og tilbakefall vil oppstå. Dersom terapi kan rettes mot cancer stamceller, vil de kanskje mer effektivt drepe cancer stamcellene, slik at tumoren ikke kan gjenopprettes. Tilpasset figur fra Reya *et al.* 2001 (11).

CSC ble først isolert og karakterisert av Bonnet *et al.* i 1997 fra akutt myelogen leukemi (AML) celler som var $CD34^+/CD38^-$, og disse hadde evne til å generere leukemi xenografts i immunosupprimerte mus (12). Flere år senere ble det utført en studie av Al-Hajj *et al.* som påviste at cancer stamceller som var isolert fra brystkreft hadde evne til å danne tumorer *in vivo* (12, 13).

Stamcellemarkører er ofte celleoverflatereseptorer som har intracellulær ekspresjon, og disse benyttes for isolering og identifisering av stamceller (9). Selv om flere overflateantigener er assosiert med evne til å fremkalle svulster innenfor en spesiell type kreft, finnes det ingen universale cancer stamcellemarkører (14, 15). Overflatemarkører blir vanligvis selektert ved deres heterogenitet innenfor tumorpopulasjonen og evne til å bli separert ved bruk av FACS (fluorescens aktivert celledatering) (14). CSC bør kunne identifiseres ved bruk av funksjonelle assays slik som klonogene assays, både i 2D og 3D, *in vitro* og ved å studere ekspresjon av gener og proteiner involvert i normal stamcellebiologi. Men, det viktigste endepunktet for å identifisere cancer stamceller er ved bruk av tumor-initierende assays i dyremodeller. Celler må igjen sorteres ut fra tumor, og initiere ny tumor i ny runde (selvfornyelse) (15).

1.4 Brystkreft og CSC

Hvert år er det mer enn 1,3 millioner nye tilfeller av brystkreft som blir diagnostisert i hele verden. Til tross for forbedret diagnose, forebygging og nye former for kirurgi, strålebehandling og kjemoterapi så er det estimert at omtrent 450.000 kvinner vil dø av denne sykdommen globalt hvert år (16).

Brystkreft er en type kreft som oppstår i brystvevet, og deles inn i to hovedtyper:

- Duktale *carcinoma*, oppstår i melkegangene som fjerner melk fra brystet til brystvorten. De fleste tilfeller av brystkreft er av denne typen.
- Lobulære *carcinoma*, som oppstår i den delen av brystet, kalt lobulene, som produserer melk.

Betegnelsen *carcinoma* blir brukt om svulster som har opphav i epitelceller. Ved sjeldne tilfeller kan brystkreft oppstå i andre deler av brystet. Brystkreft kan være invasivt eller ikke-invasivt. Med invasiv menes det at kreften har spredt seg fra melkegangene eller lobulene til annet vev i brystet. Ikke-invasiv brystkreft er når svulsten ikke har spredt seg til annet brystvev og er innkapslet, dette kalles også for *in situ*. Duktalt *carcinoma in situ* (DCIS) er brystkreft i melkegangsystemet som ikke har spredt seg til nærliggende vev. Dersom det ikke behandles kan det utvikle seg til invasiv kreft. Lobulært *carcinoma in situ* (LCIS) er en markør for økt risiko for invasiv kreft i samme eller begge brystene (17). Brystkreft metastaserer primært til lungene, skjelettet, regionale lymfeknuter, lever og hjernen (18).

Brystkreft blir gruppert etter deres molekylære undergrupper; (i) Luminal A og (ii) luminal B, (iii) Human epidermal vekstfaktor reseptor 2 (HER2)-overuttrykt og (iv) basal-liknende. Luminal brystkreft er positive for østrogen reseptor (ER) og progesteron reseptor (PR), mens luminal B undergruppen skilles fra luminal A ved at den overuttrykker HER2. HER2 overuttrykt brystkreft er ER⁻/PR⁻, men de overuttrykker HER2 (19). Den basal-liknende undergruppen domineres av trippel-negative brystkreft (TNBC). TNBC mangler uttrykk av ER, PR og HER2, og utgjør 15 % av alle typer brystkreft. TNBC er en aggressiv form for brystkreft og i tillegg mangler den målrettet terapi. Pasienter med TNBC utvikler lunge eller hjerne metastaser (16). TNBC oppstår hovedsakelig hos yngre pasienter, og er mer hyppig blant afroamerikanske kvinner. TNBC-tumorer er stort sett større i størrelse og biologisk mer aggressive enn ved vanlig brystkreft. TNBC-pasienter får i større grad tilbakefall og dårligere prognose enn kvinner med andre typer brystkreft. Mindre enn 30 % av kvinnene med TNBC overlever mer enn 5 år, og de fleste dør som følge av sykdommen selv om de får kjemoterapi, som er hovedbehandlingen (20).

Noen av de mest effektive behandlingene for brystkreft er blant annet anti-HER2 mAb *trastuzumab* og østrogenreseptor antagonisten *tamoxifen*. TNBC er ikke sensitive mot disse behandlingene siden de ikke uttrykker reseptorene som medisinene er rettet mot (21).

Tilstedeværelse av cancerstamceller er en mulig forklaring på dårlig prognose for TNBC (22). Al-Hajj *et al.* hadde hypotese om at kun en liten andel av disse cellene i metastatisk brystkreft ville ha tumorinitierende egenskaper. De påviste at tumorfremkallende brystkreftceller var høyt uttrykt blant CD44⁺/CD24⁻ subpopulasjonen (13). Filmore *et al.* studerte flere cellelinjer, inkludert trippel-negative cellelinjene SUM149 og MDA-MB-231. De fant ut at cellene som var CD44⁺/CD24⁻/EpCAM⁺ hadde forhøyet evne til tumor-initiering, delte seg sakte og var resistente mot kjemoterapi (23). I tillegg ble det utført en studie av Hwang-Versleus *et al.* hvor de fikk isolert svulstfremkallende celler ved å isolere celler som var positive for endotelial protein C reseptor (PROCR) og EpCAM i MDA-MB-231 cellelinjen (24). En annen egnet markør for brystkreftstamceller er enzymet aldehyd dehydrogenase (ALDH), som har vist å korrelere med aggressiv brystkreft (25).

1.5 Maligne melanomer og CSC

Hvert år er det mer enn 160 000 nye tilfeller av malignt melanom som blir diagnostisert på verdensbasis (26). Malignt melanom er den mest aggressive formen for hudkreft, som oppstår i melanocytene, som danner pigmenter i huden (27). Det er en stor økning i nye tilfeller av malignt melanom, spesielt i Norge og Sverige (28).

De maligne melanomene deles inn i 3 hovedtyper:

- Superfisielt malignt melanom: Vokser overflatisk og er tynt og flatt.
- Nodulært malignt melanom: Vokser knuteaktig og mer i dybden.
- Lentigo malignt melanom: Mørk pigmenterte, overflatiske flekker på sterkt solesponerte partier (oftest i ansiktet) hos eldre mennesker (29).

Flere faktorer er antatt å øke risikoen for å utvikle melanomer, blant annet overeksponering av sol, lys hud, tilstedeværelse av fødselsmerker eller fregner og forekomst av melanomer i familien (28).

Tidlige stadier av melanomer er ikke-invasive og kan kureres ved kirurgi i mer en 80 % av tilfellene, dette er standardbehandling. På senere stadier blir de maligne cellene invasive, som gir en dårligere klinisk prognose (30). Maligne melanomer som metastaserer er vanskelige å behandle, og pasienter med metastaserende melanom er kjent å ha en veldig dårlig prognose (31). Median overlevelse for pasienter med metastaserende melanom er 6 til 9 måneder. Malignt melanom metastaserer til vev som lunge eller lever, men ved senere stadier er metastaser til hjernen mest vanlig (30). Metastaser kan veldig sjeldent blir kurert, men tilstanden kan forbedres med BRAF-inhibitor *vemurafenib* eller anti-CTLA4-mAb *ipilimumab* (32).

Tilstedeværelse av cancer stamceller har vært foreslått som en mulig forklaring på melanomenes aggressivitet (33). Tidligere studier påviste mulige cancer stamceller ved å sortere celler for markørene CD20, CD133 og ABCB5 (34). Nye studier utført av både Civenni *et al.* (35) og Boiko *et al.* (36) har påvist at svulstfremkallende subpopulasjoner kan isoleres ved overflatemarkøren CD271. CSC-modellen er veldig omstridt for maligne melanomer og studier utført av Quintana *et al.* og Held *et al.* påviste at CD271 ikke anriker melanom CSC, men de fant ut at en stor andel av melanomen har tumor-initierende kapasitet (37, 38).

Civenni *et al.* og Shakova *et al.* har demonstrert at årsaken til konflikten om CD271 som stamcellemarkør, er at det benyttes ulike metoder og definisjoner av cancerstamceller blant forskere (35, 39).

1.6 Målrettet behandling av kreft med Ab

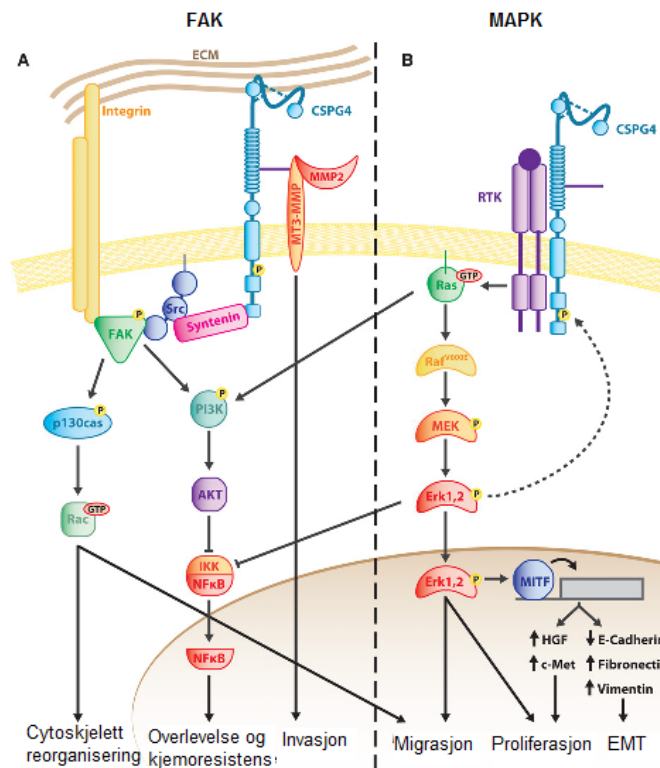
De senere årene har det blitt en økning i monoklonale antistoffer som brukes til behandling av kreft. Antistoffer kombineres med forskjellige cytotoksiske medikamenter/kjemoterapi og gir en forbedret effekt av medikamentet. For eksempel Herceptin (trastuzumab), som er rettet mot antigenet ERBB2, har vist å gi en forbedret effekt av behandling i kombinasjon med cytotoksisk kjemoterapi i ERBB2-overuttrykt metastatisk brystkreft (40).

1.6.1 Chondroitin sulfat proteoglykan 4 (CSPG4)

Chondroitin sulfat proteoglykan 4 (CSPG4), også kjent som høy molekylærvækt-melanom assosiert antigen (HMW-MAA), eller melanom kondroitin sulfat proteoglykan (MCSP), er et transmembrant chondroitin sulfat proteoglykan. Molekylvekten til CSPG4 er 450 kDa.

CSPG4 ble opprinnelig detektert i melanocytter, endotelceller og pericytter, men de senere årene har det vist seg at CSPG4 uttrykkes i flere normale og maligne celler. CSPG4 uttrykkes i 90 % av tilfellene med melanomer. I tillegg uttrykkes CSPG4 i andre krefttyper, blant annet gliomer, trippel-negative brystkreft og plateepitelkarsinom (41).

CSPG4 kan aktivere signaleringsveier som mitogen-aktivert proteinkinase (MAPK) og fokal adhesjon kinase (FAK). Aktivering av disse signaleringsveiene resulterer i tumorprogresjon ved økning i overlevelse, kjemoresistens, invasjon, migrasjon, proliferasjon og epitelial-mesenkymal transformasjon (EMT) (Figur 1.5) (41). EMT er en prosess der epitelceller mister sin polaritet og celle-celle adhesjon på grunn av tap av E-cadherin. Dette fører til at cellene får høyere evne til migrasjon og invasjon, som er viktige egenskaper for metastasering (42). Celler som uttrykker CSPG4 vil derfor ha selektiv fordel i forhold til celler som ikke uttrykker CSPG4 (41).



Figur 1.5: CSPG4 kan aktivere FAK og MAPK-kaskader. Tilpasset figur fra Price *et al.* 2011 (41).

En studie av Wang *et al.* viste overuttrykk av CSPG4 i 44 primære TNBC lesjoner, og CSPG4 ble funnet å være uttrykt i 32 av de 44 (72,7 %) TNBC lesjonene. I tillegg demonstrerte de at anti-CSPG4 mAb 225.28 inhiberte tumorvekst og migrasjon *in vitro* (43).

I melanomer har CSPG4 vist å ha en viktig rolle i celleproliferasjon og invasjon, og dette ble vist i melanom cellelinjen M14. I forhold til ubehandlet celler, hadde celler tranfektet med CSPG4 cDNA høyere evne til migrasjon, og migrasjonen ble inhibert med CSPG4-spesifikt mAb (44).

1.6.2 Cluster of differentiation 271 (CD271)

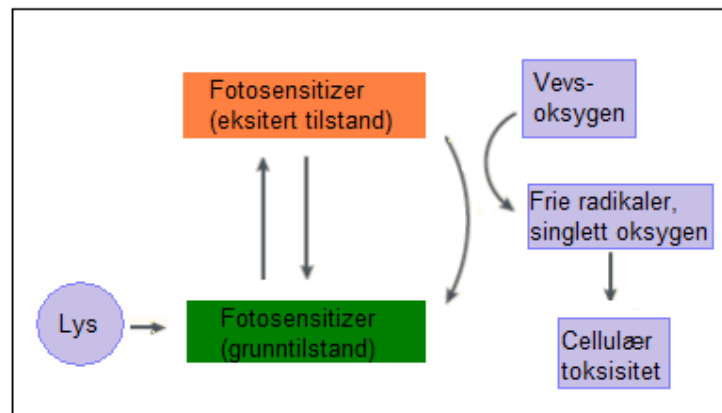
Cluster of differentiation 271 (CD271), også kjent som nervevekstfaktor reseptor (NGFR), lav affinitets nervevekstfaktor reseptor (LNGFR) eller p75 neurotrophin reseptor (p75 NTR) er en 75 kDa transmembran reseptor og medlem av tumornekrose-faktor superfamilien (45). CD271 er uttrykt i vev som er under utvikling, blant annet nervevev, myoblaster, fibroblaster, nyrer, lunger og testikler. I modent vev er CD271 uttrykt i endotelceller, prostata epitelceller og immune B-celler. Selv om CD271 er høyt uttrykt i celler som er under utvikling, er den nedregulert i mange celler hos en voksen og blir bare re-uttrykt i tilstander hvor det er nerveskade. CD271 har to motstridende funksjoner: å fremme celleoverlevelse eller indusere celledød. Disse motstridende effektene utføres ved at CD271 kan assosiere med forskjellige reseptorer. Ved fravær av tyrosin kinase (Trk) neurotrophin reseptor, kan CD271 indusere apoptose og celledød. Når CD271 er i kompleks med TrkA, vil CD271 forårsake cellevekst ved å styrke TrkA nedstrøms signalering som er indusert av nervevekst faktor (NGF)-binding (46).

Ekspresjon av CD271 i ulike krefttyper har blitt studert, og den ble funnet å være nyttig markør for ikke-nevralt mesenchymale tumorer. I prostata- og blærekreft har det vist seg at CD271 fungerer som tumor suppressor (46). Vanhecke *et al.*, Dolle *et al* og Descamps *et al.* har detektert uttrykk av CD271 reseptor i human brystkreft (47-49).

Kim *et al.* har identifisert CD271 som en mulig stamcellemarkør i primære brystkarsinomer (50). I tillegg har CD271 blitt identifisert som stamcellemarkør i maligne melanomer av Civenni *et al.* (35) og Boiko *et al.* (36).

1.7 Fotodynamisk terapi

Fotodynamisk terapi (PDT) brukes i behandling av lokalisert kreft. Terapien resulterer i irreversibel skade på tumorvev (51). PDT baserer seg på bruk av tre ikke-toksiske komponenter: en fotosensitizer (PS), oksygen og lys. Fotosensitizeren er et fotosensitivt molekyl som akkumulerer i tumorvev. Fotosensitizerne er spesialdesignet slik at de ved eksponering av lys vil eksiteres (oppnår høyere energetiske tilstander) og deretter reagere med molekylært oksygen (O_2). Dette vil føre til generering av reaktive oksygen forbindelser (ROS), hovedsaklig singlett oksygen, men også frie radikaler. Singlett oksygen har evne til å ødelegge en rekke komponenter i cellen, som fører til celledød i form av apoptose eller nekrose (52) (figur 1.6).



Figur 1.6: Mekanismene ved fotodynamisk terapi.

Når fotosensitizeren blir utsatt for lys av bestemt bølgelengde, vil den bli aktivert fra en grunntilstand til en eksitert tilstand. Fotosensitizeren frigjør energi når den faller tilbake til grunntilstanden. Den frigjorte energien overføres til oksygen for å generere reaktive oksygen arter (ROS), slik som singlett oksygen og frie radikaler. ROS medierer cellulær toksisitet. Tilpasset figur fra Dolmans *et al.* 2003 (52).

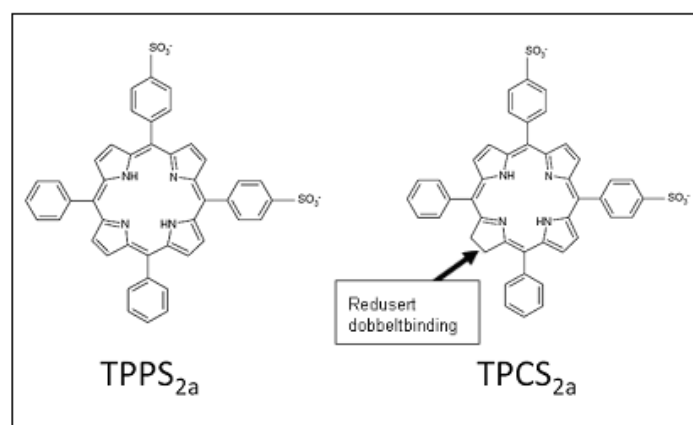
Fotosensitizeren som er eksitert kan føre til to type reaksjoner:

Type 1 reaksjon: Fotosensitizeren kan reagere direkte med et substrat, slik som cellemembranen eller et molekyl, og overføre hydrogen atomer (elektroner) som fører til dannelse av frie radikaler. De frie radikalene kan interagere med oksygen som fører til dannelse av oksiderte produkter.

Type 2 reaksjon: Fotosensitizeren kan overføre energien direkte til oksygen, og danne singlett oksygen (1O_2)

Det er hovedsaklig type II reaksjoner som forårsaker toksisitetsresponsen etter PDT, siden effekten av nesten alle aktive forbindelser ved PDT er oksygenavhengige (52).

Noen av de mest brukte fotosensitizerne i klinisk PDT er porfyriner, chloriner og bacteriochloriner. Disse gruppene av fotosensitizerer absorberer rødt lys med bestemte bølgelengder som brukes klinisk siden rødt lys er best for penetrasjon i vev, men alle porfyrinene har et sterkt bånd av absorpsjon av blått lys rundt 400-430 nm som brukes eksperimentelt i *in vitro* forsøk (53). Disulfonert tetrafenyl-chlorin (TPCS_{2a}) er en ny fotosensitizer. TPCS_{2a} har blitt utviklet ved di-imide reduksjon av disulfonerte tetrafenylporfyriner (TPPS_{2a}), og denne fotosensitizeren absorberer lys ved 652 nm (54). Lokalisering av fotosensitizerne i cellene avhenger av deres struktur, ladning, syre-base-egenskaper og lipofilisitet. Amfile fotosensitizerer som TPPS_{2a} og TPCS_{2a} vil på grunn av de lipofile delene av molekylet holde seg delvis i plasmamembranen, og dette medfører at de går inn i cellene via endocytose og lokaliseres i endocytiske vesikler (53).



Figur 1.7: Kjemisk struktur av fotosensitizerne TPPS_{2a} og TPCS_{2a}. TPCS_{2a} inkluderer tre isomerer hvor redusert dobbeltbinding finnes på de andre pyrrolene. Figur hentet fra Berg *et al.* 2011 (54).

1.7.1 Akkumulering av fotosensitizer i tumorvev

Fotosensitizerer som benyttes i PDT akkumuleres i større grad til tumorvev enn i normalvev. Kjemiske syntetiserte fotosensitizerer er rapportert å ha en ratio på henholdsvis 2-3: 1 mellom tumor og normalvev (55). De fleste fotosensitizerer går inn i makromolekylkomplekser siden de kan binde seg til serum proteiner, som albumin, high density lipoprotein (HDL) og low density lipoprotein (LDL) i plasma. Økt mengde av LDL-reseptorer vil binde de lipofile fotosensitizerer i større grad. Tumorvev har økt vaskulær permeabilitet og dette gjør at fotosensitizerer tas opp i større grad i kreftsvulster enn i normalt vev. I tillegg har tumorvev dårlig utviklet lymfesystem som gjør at fotosensitizerer ikke blir fjernet fra tumorvevet. Dette bidrar til selektiv akkumulering i tumorvev. I tillegg til dette har ekstracellulære matriser lavere pH enn normalceller, som vil gjøre at PS som er anioniske i normalt vev vil bli mer

nøytrale og lipofile i tumorvev. Andre faktorer som kan bidra til selektiv akkumulering av fotosensitizeren er høyt nivå av kollagen i tumor som binder porfyriner, høyt nivå av lipider i tumor som binder hydrofobe PS og tumorassosierte makrofager som akkumulerer fotosensitizerne.

Preferensiell akkumulering av fotosensitizer i tumorvev og lokal administrering av lys gjør at effekten av behandlingen kan begrenses til målområdene (56).

1.7.2 Terapeutiske effekter av PDT på tumorvev

PDT kan inaktivere tumor ved tre mekanismer:

1. ROS som genereres ved PDT kan drepe tumorcellen direkte (52). PDT kan føre til død på 3 ulike måter: apoptose, nekrose og autofagi-assosiert celledød (57).
2. PDT fører til skade på vaskulaturen til tumor. Dette hindrer blodtilførsel til området, og fører til at tumorcellene dør.
3. PDT kan aktivere immunrespons som fører til cytotoxisk T-celle mediert angrep mot tumorcellen (5, 52).

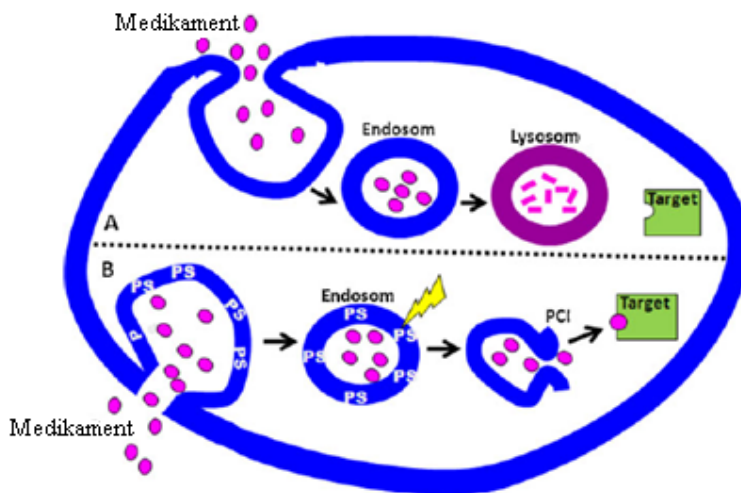
1.8 Fotokjemisk internalisering (PCI)

PCI er en ny metode for intracellulær levering av makromolekyler og basert på samme prinsipper som fotodynamisk terapi (PDT). PCI er en teknologi for å frigjøre endocyterte makromolekyler til cytosol (3), hvor lys benyttes for å aktivere legemidler inn i cellen (5). PCI ble utviklet som metode for å kunne levere legemidler og gener inn til cellen, som ellers ble degradert i lysosomene. Ribosom-inaktiverende protein (RIP) toksiner som saporin og gelonin (30 kDa) kan ikke passere cellemembranen og er ofte brukt som modellmedikamenter for etablering av PCI-metoden. Disse toksinene tas opp i celler ved endocytose, men blir degradert i lysosomene, og når derfor ikke deres mål (ribosomene) i cytosol. Ved PCI kan disse toksinene i kombinasjon med fotosensitizeren passere hull i membranen, og ved lysaktivering av fotosensitizeren vil den endocytiske membranen ødelegges, slik at toksinene kan nå sine mål i cytosol (58).

Ved PCI benyttes det fotosensitizerer som er amfifile, og som dermed binder seg til plasmamembranen. Dette fører til at de transporteres inn vha. ikke-reseptor-mediert endocytose og forblir lokalisert til membranen av endocytiske vesikler, dvs. endosomer og lysosomer. PCI utføres ved lokal og kontrollert lys-aktivering av fotosensitizeren som

kolokaliserer med legemiddelet i endocytiske vesikler hos kreftcellene (5). Legemiddelet er som regel hydrofilt og lokaliseres i lumen av endosomer og lysosomer. Når fotosensitizeren eksiteres ved lys blir den endolysosomale membranen ødelagt, og dette fører til at legemiddelet frigjøres i cytosol (5, 58).

I kombinasjon med lys vil fotosensitizeren danne reaktive oksygenforbindelser, hovedsaklig singlett oksygen (O_2). Lysaktivering vil føre til at membrankomponenter oksideres og membranstrukturen skades slik at makromolekylene frigjøres til cytosol og evt. cellekjernen, hvor de kan interagere med sitt mål (58). Prinsippet for PCI har blitt demonstrert i > 80 forskjellige cellelinjer og 10 forskjellige xenograft modeller ved forskjellige laboratorier (5). PCI av bleomycin ved bruk av fotosensitizeren Amphinex er i klinisk utprøving (59).



Figur 1.8: Prinsippet for PCI.

A: Medikamenter tas opp i cellen ved endocytose, og blir transportert til endosomene og lysosomene. I lysosomene blir medikamentene degradert før de får utført sin effekt. **B:** PCI er basert på at fotosensitizeren (PS) lokaliseres til plasmamembranen og makromolekyl av interesse (giftstoffet) tas opp i cellen ved endocytose. Fotosensitizer og makromolekylet kolokaliseres i endocytiske vesikler. Lyseksponering gir fotokjemisk skade og ruptur av den endocytiske membranen som gjør at giftstoffet blir frigitt i cytosol hvor den kan utøve effekt. Figur hentet fra Weyergang *et al.* 2011 (60).

1.8.1 PCI av immuntoksiner

1.8.1.1 Ribosominaktiverende proteiner (RIPs)

Toksiner som benyttes ved PCI er ribosominaktiverende proteiner (RIPs). RIPs, hovedsakelig fra planter eller bakterier er enzymer med meget høy hydrolyserende aktivitet som påfører irreversibel skade på ribosomene ved å fjerne et eller flere adenin fra subenheten 28S rRNA. Dette fører til hemming av proteinsyntesen og induksjon av apoptose eller nekrose (61, 62).

RIPs deles inn i 2 grupper basert på deres strukturelle forskjeller. Type 1 RIPs er enkelt-kjedet proteiner med en molekylvekt på ca. 30 kDa, mens type 2 RIPs har en molekylvekt på 56-65 kDa og består av en enzymatisk aktivt A-kjede og en B-kjede. Begge typer av RIPs er lokalisert enten på plante blader, frø eller røtter, men er mest konsentrert i frø (63). Type 2 RIPs har et lektin plasmamembran bindende domene i B-kjeden. Siden type 1 RIPs mangler membranbindende subenhet er de lavt toksiske før de blir internalisert til cytosol. Saporin er isolert fra frøene til plantearten såpeurt *Saponaria officinalis*, og tilhører type 1 RIPs. Saporin er kjent for å katalysere *in vitro* depurinerings av en spesifikk adenin rest i store ribosomale RNA (62).

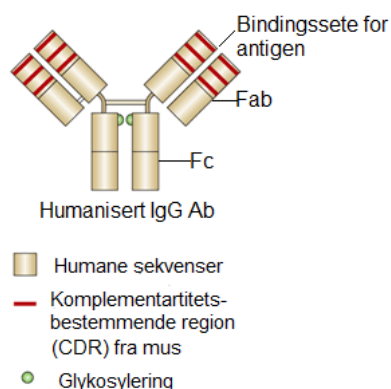
RIPs er veldig nyttige ved bruk i medisin siden de har en antiviral aktivitet, og at de kan konjugeres med antistoffer (immuntoksiner) som gjør dem spesifikke rettet mot målcellen (61).

1.8.1.2 Antistoff

Antistoff er immunglobulin-proteiner der en del av molekylet binder seg til et antigen. Begrepet antigen brukes om alle forbindelser eller strukturer som er i stand til å bli gjenkjent av et antistoff. Antigener er vanligvis proteiner, men det kan også være lipider, hormoner og nukleinsyrer. Et antigen er betydelig større enn bindingssetet på et antistoffmolekyl, og derfor vil antistoffet binde seg til en liten del av antigenet. Antistoffer blir gruppert etter deres opprinnelse og immunglobulinklasse. Hver type antistoff har forskjellige strukturer og biologiske aktiviteter, og antistoffer som gjenkjenner samme antigen vil bindes til ulike epitoper på målet (64).

Antistoffer er en viktig del av det adaptive immunsystemet, og deres evne til å gjenkjenne spesifikke antigen gjør dem egnet til bruk ved målrettet behandling. IgG benyttes ofte i kreftbehandling på grunn av sin molekylvekt, stabilitet *in vivo* og fordi den er enkel å produsere (65). Et antistoff består av to identiske tunge kjeder (~50 kDa) og to identiske lette kjeder (~25 kDa).

Disse kan videre deles inn i variable regioner og konstante regioner. Fab og Fc delen på IgG molekylet er de to gruppene på antistoffet som bidrar til effektiviteten ved kreftbehandling (66).

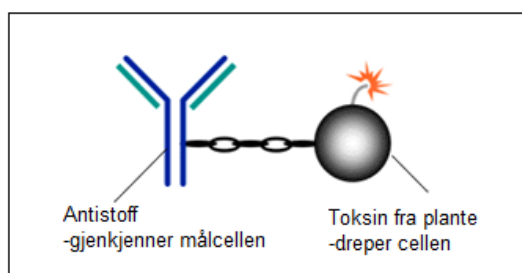


Figur 1.9: Humanisert antistoff

IgG-molekylet består av to funksjonelle domener, Fc og Fab. Fc området interagerer med cellulære Fc reseptorer og komplement, mens Fab området består av antigen bindende sete. Antistoffer humaniseres for å gjøre de mindre antigenene i klinisk bruk. Et humant IgG mAb får byttet de antigen bindende "loops" med komplementaritets-bestemmende regioner (CDRs) fra mus. Figur hentet fra Carter, 2001 (40).

1.8.1.3 Immuntoksiner

Immuntoksiner er proteiner som består av et toksin koblet sammen med et antistoff eller en vekstfaktor som bindes spesifikt til målceller (67). Siden immuntoksinet vil bindes spesifikt til målceller på grunn av antistoff spesifisitet er det kun sykdomscellene som vil bli skadet, mens de friske cellene ikke vil bli påvirket av toksinet (68). Nesten alle proteintoksiner virker ved enzymatisk inhibering av proteinsyntesen. For at immuntoksinet skal ha effekt er det viktig at den kan bindes og internaliseres til målcellen, og toksinet må translokaliseres til cytosol (67).



Figur 1.10: Forenklet framstilling av et immuntoksin

Antistoffet sørger for målrettet levering av toksin til målcellen hvor toksinet kan utøve sin cytotoxicitet. Antistoff og toksin kan bindes sammen ved for eksempel streptavidin-biotin bindinger. Tilpasset figur fra Brookscale.com (69).

Målrettede immuntoksiner er ofte store (>> 60 kDa) og blir derfor sakte skilt ut (60).

Immuntoksiner blir vanligvis internalisert ved spesifikk binding til deres "mål" celleoverflatereseptor. Ved binding blir signaleringskaskade aktivert slik at reseptorligand-komplekset kan internaliseres. Komplekset blir tatt opp i cellen ved endocytose, som er en

cellulær prosess for å ta opp molekyler ved innvaginering av cellemembranen. Når komplekset er tatt opp i cellen vil den enten blir resirkulert til celleoverflaten eller degradert i lysosomene (70). Dette gjør at immuntoksinet ikke får utført sin effekt, siden målet ofte er i cytosol.

Målrettet proteintoksiner er ideelle medikamenter for levering ved PCI. Dette har flere fordeler, blant annet at fotosensitizer vil akkumuleres i tumorvev, immuntoksinet vil akkumuleres i målcellene og lysbelysning vil gi stedsspesifisitet. Levering av immuntoksiner med PCI har vært vellykket i flere *in vitro* forsøk. Epidermal vekstfaktor reseptor 1 (EGFR) ble suksessfullt målrettet med PCI av cetuximab-saporin i kreftcellelinjer fra kolon, prostata og epidermoid *carcinoma*. PCI med immuntoksiner har også vært benyttet til ”targeting” av stamcellemarkørene EpCAM, HMW-MAA/ CSPG4/gp240 (60).

1.8.2 Fordeler og begrensninger ved PCI

En stor fordel ved bruk av PCI er at det kan benyttes lave doser av lys og medikamenter samtidig som det beholdes en høy tumor-spesifisitet. Siden det benyttes lave konsentrasjoner av medikamenter er det få bivirkninger som forekommer i prekliniske modeller.

Sammenlignet med kjemoterapi er fotosensitizere ikke-toksiske medikamenter som bare blir aktivert av lys med en spesifikk bølgelengde. Siden de fleste fotosensitizerer som brukes klinisk ikke lokaliserer til kjernen av cellen, er det liten mulighet for at den skal forårsake mutagene effekter etter behandling. En annen fordel ved bruk av PCI er å unngå multi-medikament-resistens (5). PCI er en behandling som krever lite invasivt inngrep hos pasienten, og vil det forårsake mindre smerte i forhold til kirurgi. For å etablere PCI i klinikken er det ikke behov for å investere i dyrt utstyr, det trengs kun en laser eller filterlampe for å aktivere medikamentene. Ny generasjonslasere er ikke så kostbare, og er enkle å benytte. En annen viktig faktor er at medikamentdosen reduseres ved PCI siden man får høy tumorspesifisitet (5).

Bruken av PCI og PDT er begrenset ved penetrasjonsdybden av lyset i vev på grunn av spredning og absorpsjon av lys. Nyere utvikling har gjort det mulig å belyse tumorvev ved hjelp av fiberoptikk og laserteknologi. Fotosensitivitet av hud og øyne er den mest forekomne bivirkningen etter PDT, men slik toksisitet kan hindres ved å unngå å utsette pasienten for eksponering av direkte sollys (5).

2. Materialer og metoder

2.1 Celledyrkning

2.1.1 Cellelinjer

Brystkreft-cellelinjene MDA-MB-231 (HTB-26TM), MDA-MB-435 (HTB-129TM) og MCF-7 (HTB-22TM) ble kjøpt fra American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

Metastaserende melanom cellelinje MelMet 5 ble mottatt fra Avdeling for tumorbiologi, Radiumhospitalet, Oslo Universitetssykehus (OUS). SUM149 cellelinjen ble mottatt fra avdeling for medisinsk genetik, Ullevål sykehus (OUS). Detaljer angående cellelinjenes opphav, subtyper og relevant proteinekspresjon er angitt i tabell 2.1. Alle cellelinjene ble rutinemessig testet for *Mykoplasma*. Alt arbeid med celler i kultur ble utført med aseptiske arbeidsteknikker under sterile omgivelser i LAF-benk.

Cellelinje	Type	Subtype	ER/PR/HER2	CSPG4	CD271	Tetthet ved utsåing (celler/brønn)
MDA-MB-231	Brystkreft adenokarcinom	Mesenchymal stamcelle-lignende	-/-/-	+	+	MTT*:13000 Klonogen**:1000
MDA-MB-435***	Brystkreft ductal carcinom	(Basal/mesenchymal)	-/-/-	+	+	MTT*:6000 Klonogen:1000
SUM149	Primær brystkreft	Basal-lignende	-/-/-	+	-	MTT:10000 Klonogen: 2000
MCF-7	Brystkreft adenokarcinom	Luminal	+/+/-	-	+	MTT:10000 Klonogen: 2000
MelMet 5	Metastaserende melanom	-	-	+	-	MTT: 8000 Klonogen: 2000

Tabell 2.1: Oversikt over cellelinjene benyttet i denne studien.

* Celler ble sådd ut i 96-brønners brett

** Celler ble sådd ut i 6-brønners brett

*** Konflikt i litteraturen om dette er en bryst eller melanom-cellelinje (71).

2.1.2 Dyrkningsmedium

MDA-MB-231, MDA-MB-435 og MelMet 5 ble dyrket i RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) medium med L-glutamin, tilsatt 10 % føtalt kalveserum (FCS) (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 100 IU/mL penicillin (Sigma-Aldrich) og 100 µg/ mL streptomycin (Sigma-Aldrich). SUM 149 cellelinjen ble dyrket i Ham's F12 nutrient mixture medium L-glutamin (Sigma-Aldrich), som ble tilsatt 5 % FCS, 100 IU/mL penicillin/100 µg/ mL streptomycin, 1 µg/ml hydrokortison (Sigma-Aldrich) og 5 µg/ml insulin (Sigma Aldrich). MCF-7 cellelinjen ble dyrket i MEM with Earle's salts medium med L-glutamin (PAA Laboratories), tilsatt 10 % FCS, 100 IU/mL penicillin/100 µg/ mL streptomycin og 10 µg/ml insulin.

Stock-løsninger for hydrokortison ble laget ved å løse 1 mg hydrokortison pulver per 1 ml absolutt etanol (Kemetyl Norge AS, Vestby, Norge) og lagret ved -20 °C. Alle cellelinjene ble dyrket i monolagkultur. Cellene ble dyrket i 75 cm² vevskulturflasker (NUNC A/S, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Danmark) i inkubatorskap ved 37 °C med 5 % (v/v) CO₂. Medium ble skiftet 2-3 ganger i uka for å sikre adekvat tilførsel av næringsstoffer og vekstfaktorer.

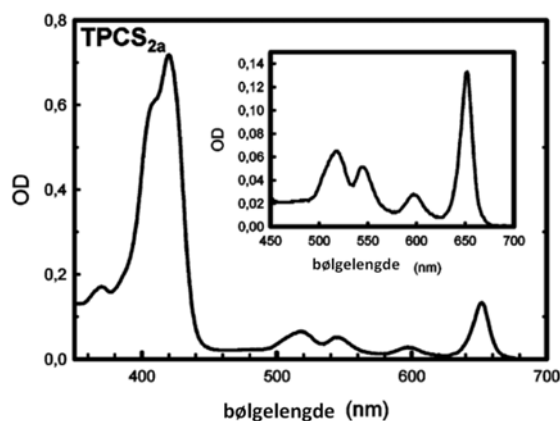
2.1.3 Dyrkning og omsetting av celler

Alle brystcancer-cellelinjene var adherente og ble løst v.h.a. en 0,025-0,5 % trypsin/0,53 mM EDTA løsning (Sigma-Aldrich). Malign melanom cellelinjen, MelMet 5, var også en adherent cellelinje, og ble løst v.h.a. 0,54 mM etylen-diamin-tetra-eddikesyre (EDTA)-løsning. EDTA-løsningen ble tillaget ved å løse EDTA disodium pulver (Sigma-Aldrich) i Dulbecco's fosfatbufret saltvann (PBS) (PAA Laboratories). Før cellene ble løst fra celleflasken ble monolaget skylt med Dulbecco's PBS for å fjerne enzymer fra serum som kunne deaktivere trypsin. Trypsin bryter cellematrixforbindelser ved sin proteaseaktivitet, mens EDTA binder Ca²⁺, og bryter Ca²⁺ avhengige celle-celle adhesjoner. Cellene ble dyrket til maksimum 80-90 % konfluens og maksimum 25 passasjer for å hindre forandringer i vekst, morfologi og genetisk drift som kunne påvirke reproduserbarheten til resultatene. For å finne cellekonsentrasjonen i celleflasken før et forsøk ble cellene telt manuelt ved bruk av en KOVA® Glastic slide engangstellekammer i plastikk (Hycor Biomedical, Indianapolis, IN, USA).

2.2 PDT og PCI behandling

2.2.1 Fotosensitizer og lyskilde

Fotosensitizeren som ble benyttet i forsøkene var disulfonert meso-tetrafenyl-chlorin (TPCS_{2a}/AmphinexTM, PCI Biotech ASA, Lysaker, Norge). TPCS_{2a} er en amfifil fotosensitizer som lokaliseres til endocytiske vesikler og egner seg derfor til PCI. TPCS_{2a} eksiteres best av blått lys ved ≈ 400 -434 nm, men absorberer også relativt godt av det terapeutiske relevante røde lyset ved ≈ 650 nm (figur 2.1) (54). Celler ble derfor behandlet med lys ved bruk av LumiSource® lampen (PCI Biotech ASA). Denne lyskilden består av et brett med fire lysrør som emitterer blått lys med en maksimal topp på ca. 435 nm. Lysrørene (Osram L) har effekt på 18 W, og er optimalisert til å gi en homogen spredning av lys på tvers av hele lyseksponeeringsfeltet. Brettene med prøver ble plassert direkte på lyskilden, og bestrålt i ønsket tidsperiode. Lysdoser og konsentrasjoner av TPCS_{2a} som ble benyttet var basert på tidligere forsøk eller satt til den dosen som ved PDT gav rundt 50 % celledød.



Figur 2.1: Absorpsjonsspekter for TPCS_{2a}.

Eksitasjonsspekter (stort diagram) og emisjonsspekter (lite diagram) for TPCS_{2a} Figur hentet fra Berg *et al.* 2011 (54).

2.2.2 Toksiner, mAb og immuntoksiner

Toksinet som ble benyttet i denne studien er det ribosominaktiverende proteinet (RIP) saporin (30 kDa) som er isolert fra frøene til plantearten *Saponaria officinalis* (se avsnitt 1.9.1.1 Ribosominaktiverende proteiner). For dannelse av immuntoksinet mot CSPG4 ble et kjemisk konjugat av streptavidin-saporin (Streptavidin-ZAP, med 2,5 molekyler saporin per streptavidin, molekylvekt på 128 kDa) (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) blandet med det biotinylerte monoklonale antistoffet (mAb) 225.28 (fra Dr. Solando Ferrone, Massachusetts General Hospital, Boston, USA) rettet mot CSPG4. Rekombinant streptavidin er et 53 kDa protein med ekstrem høy affinitet ($K_a=10^{15} M^{-1}$) for vitaminet biotin. Biotin-

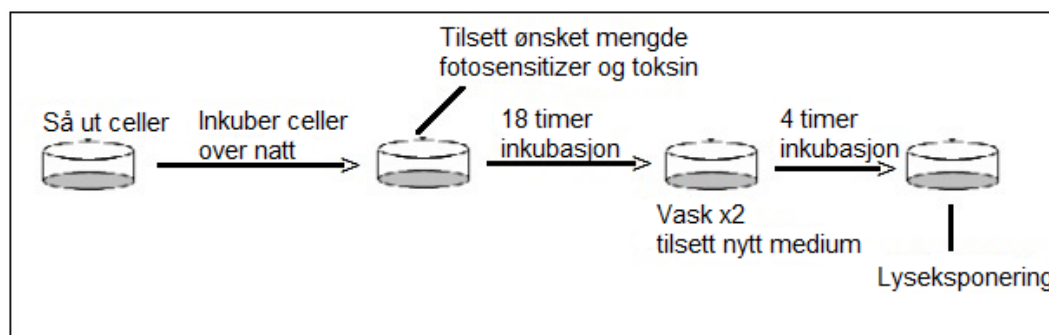
streptavidin interaksjonen er en av de sterkeste non-kovalente kjemiske interaksjoner som er kjent i naturen (72). Stock-løsninger av streptavidin-saporin ble fortynnet til 200 nM i PBS, og lagret ved -20 °C.

CSPG4 målrettet immuntoksin 225.28 saporin ble dannet ved å blande streptavidin-ZAP og biotinyleret 225.28 (mus anti-CSPG4, IgG2a) i et forhold på 1:4 i PBS. Reaksjonen mellom streptavidin-ZAP og biotin ble beregnet å være ferdig innen 20 minutter på grunn av den høye affinitet mellom streptavidin og biotin. Løsninger på 200 nM 225.28-saporin ble lagret ved -20 °C.

ME20.4-SAP (Advanced Targeting Systems) er et 210 kDA kjemisk konjugat av ME20.4 (et anti-CD271 mAb) og saporin. Stock-løsninger ble fortynnet til konsentrasjon på 200 nM i PBS og lagret ved -20 °C. Konsentrasjonen av immuntoksin (IT) og saporin som ble benyttet i oppgaven var basert på prøve- og feilemetoden.

2.2.3 PDT og PCI

Alle PDT- og PCI-forsøkene ble utført ved beskyttelse mot direkte lys (lys i tak og i LAF-benk ble slått av før celler ble tatt ut av inkubatoren). For et typisk PDT- og PCI-forsøk ble cellene sådd ut i 96- eller 6-brønners brett (NUNC, Thermo Fisher Scientific), og ble inkubert til cellene hadde festet seg til bunnen av brønnene. For oversikt over celleantallet som ble sådd ut, se tabell 2.1. Etter at cellene hadde festet seg til brønnene ble de inkubert med cellemedium som bestod av kun TPCS_{2a} for PDT forsøk. Cellene som skulle få PCI behandling ble inkubert med medium med TPCS_{2a} og ønsket mengde toksin eller immuntoksin som beskrevet i Figur 2.2.



Figur 2.2: Prosedyre for PCI

Cellene blir først sådd ut og inkubert over natt for å feste seg til plastikken. Dagen etter blir cellene inkubert med TPCS_{2a}, med eller uten toksin/immuntoksin, over natt i ca. 18 timer. Videre blir cellene vasket to ganger med nytt medium og deretter inkubert i medikamentfritt medium i 4 timer slik at fotosensitizeren kunne bli internalisert og fjernet fra cellemembranen. Etter inkuberingen ble prøvene belyst med LumiSource® lampe.

2.2.3.1 Test av mAb-selektivitet. Blokkering av CD271 reseptoren med ukonjugert anti-CD271 mAb før PCI av anti-CD271 immuntoksin

Ukonjugert anti-CD271 ble administrert til cellene i forkant av behandling med anti-CD271 immuntoksin. Anti-CD271 binder til CD271 reseptoren og kan blokkere for påfølgende binding av immuntoksinet til samme reseptor. Redusert celledrap med immuntoksinet som følge av blokkeringen kan si noe om viktigheten av immuntoksinets spesifisitet. Etter at cellene hadde festet seg til brønnene, ble de inkubert med medium som var tilsatt 20x mer ukonjugert anti-CD271 ab i ca. 30 minutter, dette for å blokkere reseptoren. Deretter ble celler koinkubert med ønsket mengde TPCS_{2a} og immuntoksin, og det ble benyttet samme protokoll som ved PCI.

2.3 Cytotoksisitetsmålinger

For å studere viabilitet og celleoverlevelse etter PDT- og PCI-behandlinger ble det benyttet to metoder: MTT-metoden (viabilitet) og klonogen overlevelse (celleoverlevelse)

2.3.1 MTT

Celleviabilitet ble målt 48 timer etter belysning for MDA-MB-231, SUM149 og MelMet 5 cellelinjen og 96 timer etter belysning for MCF-7 og MDA-MB-435 cellelinjen ved bruk av 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromide (MTT) assayet. MTT proliferasjonsassayet er et kvantitativt kolorimetrisk assay for måling av viabilitet. Assayet er basert på spalting av et gult tetrazoliumsalt (MTT), som danner vannløselige, formazan-krystaller i levende celler. Spaltingen skjer kun i levende celler av det mitokondrielle enzymet succinate-dehydrogenase. Formazan krystallene kan løses i organiske løsninger, som vil gi en blå-lilla løsning og kan måles v.h.a. et spektrofotometer (73). MTT assayet er enkelt, raskt og godt egnet for analyse av et stort antall prøver, men den har også noen begrensinger som vil bli diskutert senere.

Celler ble inkubert i ferskt medium tilsatt 0,25 mg/ml MTT-reagens (Sigma-Aldrich) for ca. 2-4 timer, siden tiden for inkubasjon av MTT er celleavhengig. I tillegg ble seks tomme brønner inkubert med MTT-løsning for å kunne fungere som blank kontroller, som kunne benyttes for å finne reell MTT-aktivitet. Forsøket ble stoppet når det var en klar lilla farge i bunnen av brønnene. MTT-løsningen ble sugd av, og deretter ble det tilsatt Dimethyl sulfoksid (DMSO) til hver brønn slik at formazan-krystallene ble løst opp. Optisk tetthet (OD) av hver brønn ble målt ved bruk av Powerwave XS2 mikroplate spektrofotometer (BioTek, Winooski, VT, USA) ved 570 nm. Reell MTT-aktivitet ble funnet ved: MTT-aktiviteten minus blankverdi.

Det ble utført tetthetsforsøk i 96-brønnersbrett ved MTT for å finne antall celler/brønn som er mest hensiktsmessig å benytte ved PCI-/PDT-behandling. Det ble da benyttet samme protokoll som for PCI, bare uten tilsetning av fotosensitizer og immuntoksin.

2.3.2 Klonogen overlevelse

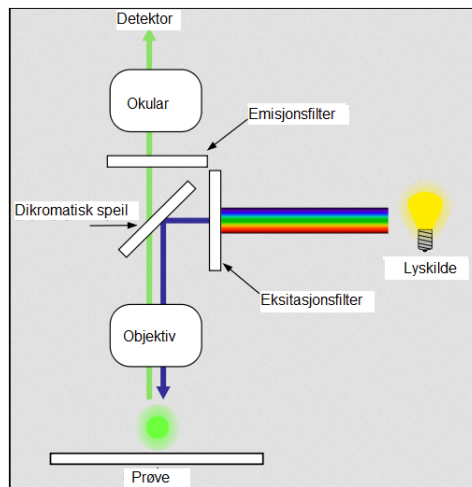
Denne metoden er basert på evnen til en celle til å proliferere og å etablere en koloni (klon). En koloni ble definert som eksisterende ved minimum 50 celler tilstede. I denne studien ble det benyttet en modifisert versjon av "Clonogenic assay of cells *in vitro*" (74). Celler ble sådd ut i 6-brønnersbrett og behandlet i forhold til PCI protokollen. Medium ble byttet 2 ganger i uka. Etter 9-14 dager, ble kolonier vasket 1 gang i 0,9 % NaCl (Fresenius Kabi, Halden, Norge) og deretter fiksert med absolutt etanol (Kemetyl) i 10 minutter. Koloniene ble deretter farget med metylblått i 5 minutter før brønnene ble vasket og overskudd av metylblått ble fjernet med kaldt vann fra springen. Koloniene ble telt manuelt (Count™, Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA) ved hjelp av et telleapparat med forstørrelsesglass, og overlevelsen ble beregnet i forhold til ubehandlet kontroll.

Det ble utført testforsøk med ulike celleantall i hver brønn før PDT/PCI-forsøk for å finne et optimalt antall celler/brønn. Det ble sådd ut 250, 500, 1000 og 2000 celler i to 6-brønnersbrett. Det ble besluttet å bruke det celleantallet som gav rundt 150-200 kolonier, slik at det gikk greit å telle uten at koloniene ble vanskelig å skille fra hverandre.

2.4 Fluorescens mikroskopi

2.4.1 Epi-fluorescensmikroskopi

Epi-fluorescensmikroskopi ble benyttet for å studere cellulær lokalisering av TPCS_{2a} og anti-CD271 mAb. Prinsippet for fluorescens mikroskopi er basert på selektiv deteksjon av fluorescensen til en forbindelse, og til dette trengs det en lyskilde, et eksitasjonsfilter, et emisjonsfilter og et dikromatisk speil. Fluorescens er en egenskap hos noen molekyler (fluorokromer) som eksiteres av lys ved en spesiell bølgelengde, og etter kort tid vil en mengde av energien som er absorbert bli emittert. Forskjellen i maksimal bølgelengde mellom absorpsjon og emisjon er kjent som "Stokes shift". Ved eksitasjon av fluorokromet i prøven blir lyset filtrert gjennom eksitasjonsfilteret og går inn i filterblokken. Det dikromatiske speilet med en karakterisk bølgelengde vil reflektere lys med lavere bølgelengde. Når fluorokromet emitterer lys vil det dikromatiske speilet slippe gjennom mer langbølget emisjonslys. Deretter kan det langbølgete lyset detekteres av et kamera eller studeres med øyet gjennom okularet (se figur 2.3) (75).



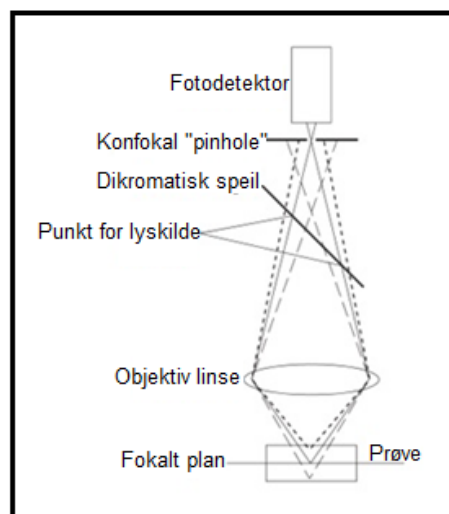
Figur 2.3: Skjematisk fremstilling av et fluorescens mikroskop. Tilpasset figur fra Wikipedia.org (76).

Celler ble studert ved bruk av et Zeiss Axio mikroskop (Zeiss, Obercochen, Tyskland) med et 63x olje objektiv (Zeiss). Mikroskopibilder ble prosessert ved bruk av Zeiss AxioVision software. Celler ble sådd ut og behandlet direkte på 0,17 mm tykke coverslips i 4-brønnersbrett (NUNC, Thermo Fisher Scientific). Før mikroskopering ble coverslipsene vasket i iskaldt PBS med $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) og deretter lagt over et objektglass (Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Tyskland). Som eksitasjonskilde ble det benyttet en HBO/100 W kvikksølvlampe. For avbildning av TPCS_{2a}-fluorescens ble det benyttet følgende filterkombinasjoner: eksitasjonsfilter: 395-440 nm, dikromatisk speil: 460 nm og emisjonsfilter: 610 nm. For LysoTrackerGreen® ble det benyttet eksitasjonsfilter 450-490 nm, dikromatisk speil: 495 nm og emisjonsfilter: 500-550nm. I alle mikroskopiforsøk ble det tatt negative kontrollbilder, dvs. bilder av nærliggende områder uten celler, for å bekrefte at fluorescensen ikke skyldes annet enn de fluorokromene som var tilsatt. Mikroskoperingen ble utført med lyset avskrudd i rommet.

2.4.2 Konfokal mikroskopi

Ved epi-fluorescensmikroskopi blir celler belyst og fluorescenssignaler detekteres ikke bare fra den vertikale planen i fokus, men fra hele dybden i cellen. Dette kan føre til at prøven blir uklart og ute av fokus. I tillegg kan det være en usikkerhet om hvor fluorescenssignalet egentlig er lokalisert: kjerne, cytosol eller plasmamembran? Konfokal mikroskopi derimot har evnen til å samle fluorescenssignaler fra et enkelt fokusplan, ved å dele cellen vertikalt i optiske snitt på 1 μm . Ved konfokal mikroskopi fjernes lys som er ute av fokus, siden fluorescenssignaler som emitteres av prøven passerer et ”pinhole” før de når detektoren. Eksitasjonslyset treffer et enkelt punkt på prøven. Fluorokromer gjennom hele dybden i

prøven blir belyst og emitterer lys, som kommer mot detektoren i flere retninger. En "pinhole" er plassert foran detektoren for å hindre at lys om er ute av fokus blir detektert (se figur 2.4) (77). Konfokal mikroskopi ble benyttet for å studere cellulær lokalisasjon av CD271.



Figur 2.4: Fremstilling av et konfokalmikroskop. Tilpasset figur fra Smith, 2008 (77).

Prøver ble studert i samarbeid med personalet ved kjernefasiliteten for konfokal mikroskopi ved bruk av et Zeiss LSM 780/710 konfokal mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Tyskland). Objektivet som ble benyttet var Zeiss PlanApochromat 63x/1.40 oljeobjektiv og bilder ble prosessert ved bruk av ZEN 2008 software (Carl Zeiss). For TPCS_{2a} ble det benyttet en 405 nm laser for eksitasjon og emisjonsfilter 640-670 nm. For CD271-Alexa 488 ble det benyttet 488 nm laser for eksitasjon og emisjonsfilter 493-552 nm.

2.4.3 Ko-lokaliseringsstudier

For å studere TPCS_{2a} opptak i cellene ble celler inkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a} i medium. Etter 18 timer ble celler vasket to ganger i medium og inkubert ("chased") i 4 timer før mikroskopering. Endocytiske bestanddeler i cellen ble farget med LysoTracker®Green (Life Technologies). LysoTracker®Green tas opp i det sure miljøet i endosomene og lysosomene. LysoTracker® prober består av fluorofor bundet til en svak base som blir protonert i sure miljøer som endosomer og lysosomer, mens mesteparten er deprotonert ved cytosolisk pH (78). Celler ble inkubert med 1µM LysoTracker®Green i ca. 1 time før mikroskopering for å kunne studere kolokalisering av TPCS_{2a} og LysoTracker.

For å studere cellulær lokalisering av CD271, ble det benyttet biotinylerert antistoff merket med streptavidin-Alexa Fluor® 488 konjugat (Life Technologies). Løsningen ble laget ved å blande 10 µl biotinylerert CD271-ab 0,011 mg/ml og 1 µl streptavidin-Alexa Fluor® 488 2 mg/ml i 1 ml medium TPCS_{2a} og anti-CD271 mAb-Alexa 488 ble koinkubert for å se på kolokalisering av disse. Celler ble inkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a} og 200 µl av CD271-Alexa Fluor 488 løsningen. Etter 18 timer ble cellene vasket tok ganger i medium og inkubert ("chased") i medikament-fritt medium i 4 timer før mikroskopering.

2.4.4 Blokkering av CD271 reseptoren

For å studere spesifisiteten til CD271-Alexa Fluor® 488 ble CD271-reseptoren blokkert med ukonjugert anti-CD271 mAb. Celler ble inkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a} i medium over natt (ca. 18 timer). Celler ble vasket to ganger i medium, og deretter inkubert med 100x ukonjugert anti-CD271 mAb i ca. 30 minutter, og deretter ble det tilsatt ønsket mengde biotinylerert-CD271 konjugert med streptavidin-Alexa Fluor® 488 i 3,5 timer før mikroskopering.

2.5 Flowcytometri og Fluorescens aktivert cellesortering (FACS)

2.5.1 Flowcytometri

Flowcytometri er en hurtig og kvantitativ metode for analyse og sortering av celler i løsning. Cellene merkes med fluorescerende molekyler som binder seg til den komponenten i cellen man ønsker å undersøke, for eksempel DNA eller en reseptor. Prinsippet baseres på at enkelt celler må være i suspensjon og føres i en væskestrøm forbi en lysstråle (laser med bestemt bølgelengde) (79). Her vil hver celle sende pulser av spredt lys og fluorescens. FSC (forward scatter) angir cellenes størrelse, og kan også brukes for å se forskjell på levende og døde celler. Mens SSC (side scatter) gir informasjon om det granulære innholdet i en celle. Både FSC og SSC er unike for hver celle, og brukes for å differensiere forskjellige celletyper i en heterogen prøve (64).

Dersom et fluorescerende fargestoff er bundet spesifikt og proporsjonalt til en bestemt komponent i eller på overflaten av cellen, for eksempel et antistoff som er fluorescensmerket og bundet til reseptor av interesse, vil den målte fluorescenspulsen representerer mengden av reseptoren (79).

2.5.2 Antigen analyse

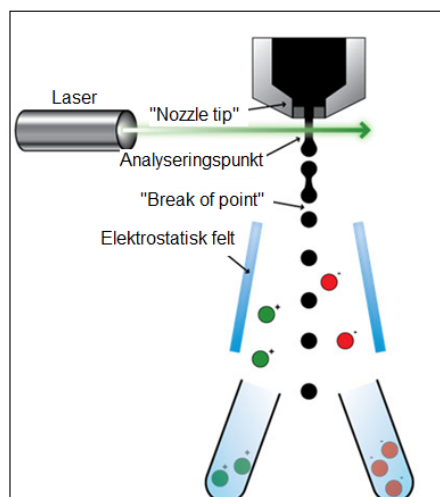
Uttrykk av CSPG4 og CD271 ble undersøkt ved bruk av flowcytometri. Til fluorescensmerking av CSPG4 ble det benyttet Alexa 488 konjugert streptavidin, som ble koblet til biotinylerert anti-CSPG4 mAb 225.28 v.h.a. biotin-streptavidin bindingen. I noen

forsøk ble det benyttet et kjemisk konjugat av anti-CSPG4 som direkte var konjugert med Alexa Fluor 647. Til fluorescensmerking av overflatemarkøren CD271 ble det benyttet ferdig merket mAb med fluorokromet phycoerythrin som eksiteres ved 488 nm og emitterer ved 578 nm. Celler i monolag ble løsnet ved bruk av Accutase™ (Sigma-Aldrich), en enzymatisk løsning som løsner celler og bevarer intakte plasmamembran proteiner sammenlignet med trypsin. I noen forsøk ble det benyttet EDTA-løsning i stedet for accutase.

Celler ble suspendert til en konsentrasjon av 0,5-5 million celler per ml. For å studere uttrykk av CSPG ble celler inkubert i 30 minutter med 10 µg/ml 225.28-biotin, og deretter inkubert i 4 µg/ml Alexa Fluor® 488-streptavidin (Life Technologies) i 20 minutter. Til noen forsøk ble det benyttet ferdig konjugert anti-CSPG4 9.2.27 som var direkte konjugert med Alexa Fluor® 647. Celler ble da inkubert med 5 µl mAb (0,09 µg/µl) i 30 minutter. For å studere uttrykk av CD271, ble 5 µl ME20.4-PE (ferdigmerket antistoff) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Tyskland) tilsatt per 100 µl prøve og koinkubert med 225.28-biotin (i tilfeller der begge markører ble studert samtidig). Alle inkuberinger ble utført på is eller i kjølerom for å hindre reseptor internalisering. For å fjerne aggregater, ble celler filtrert i BD Falcon™ rør (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) gjennom en 35 µm nylon nett (BD Biosciences). Prøvene ble deretter analysert med en gang i samarbeid med personell i kjernefasiliteten for flowcytometri ved bruk av et BD LSR II flowcytometer (BD Biosciences). Døde celler ble eliminert basert på side/forward scatter eller Hoechst farging.

2.5.3 Fluorescens aktivert cellesortering (FACS)

Fluorescens aktivert cellesortering (FACS) sorterer levende celler i separate populasjoner basert på fluorescensmerking. Prøven utsettes for hydrodynamisk fokusering, og deretter blir hver celle belyst av en laser. Fluorescenssignalet og scatter blir sammenlignet basert på kriterier satt på forhånd. Når cellene forlater ”nozzle tip”, vil dråpen få elektronisk ladning, avhengig av fluorescensen i cellen. Celler som matcher seleksjonskriteriene som er satt på forhånd vil få positiv ladning når den forlater ”nozzle” i væskesystemet. Elektrostatisk ladning oppstår ved ”break off point”, som er det tidspunktet når dråpen som inneholder celler av interesse blir separert fra væskestrømmen. Dråpene vil deretter passere gjennom et sterkt elektrostatisk felt, og blir plassert til høyre eller venstre avhengig av ladning. Celler som er sortert kan deretter dyrkes videre (figur 2.5) (80).



Figur 2.5: Oversikt over bestanddelene som er involvert i FACS analyse. Tilpasset figur fra Abcam.com (81).

FACS-metoden ble benyttet for sortering av CD271+ celler i MCF-7 cellelinjen. Samme protokoll for disaggregering og farging av celler ble benyttet som ved antigen analyse ved flowcytometri, bortsett fra at her ble cellene kun merket med anti-CD271-PE.

2.6 Sfæroide dannelse i Methocult

Det ble benyttet en modifisert versjon av human embryonal stamcelle (HESC)-medium for å studere brystkreftcellelinjen MCF-7 sin evne til å danne sfæroider (mammospheres). HESC-mediumet bestod av 40 % methyl cellulose basert Methocult® H4100- (STEMCELL Technologies SARL, Grenoble, Frankrike), 38 % KnockOut™ DMEM/F12, 20 % KnockOut Serum Replacer, 0,1 mM ikke-essensielle aminosyrer, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol (Life Technologies), 4 ng/ml bFGF, 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich) og penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich). Celler ble sortert i lav uttrykk CD271, høy uttrykk CD271 og bulk (usorterte) populasjoner. Celler ble deretter farget med trypanblått for å beregne antall levende celler. Trypanblått er et ladet molekyl som ikke kan passere cellens intakte plasmamembran, mens det vil tas opp i celler som er skadet/døde (82). Cellesuspensjon ble blandet 1:4 med en 0,4 % trypanblå løsning bestående av 0,81 % natriumklorid og 0,61 % kaliumfosfat (Sigma-Aldrich), og etter 3-5 minutter ble ufargede celler telt i et hemocytometer for å beregne konsentrasjonen av levende celler.

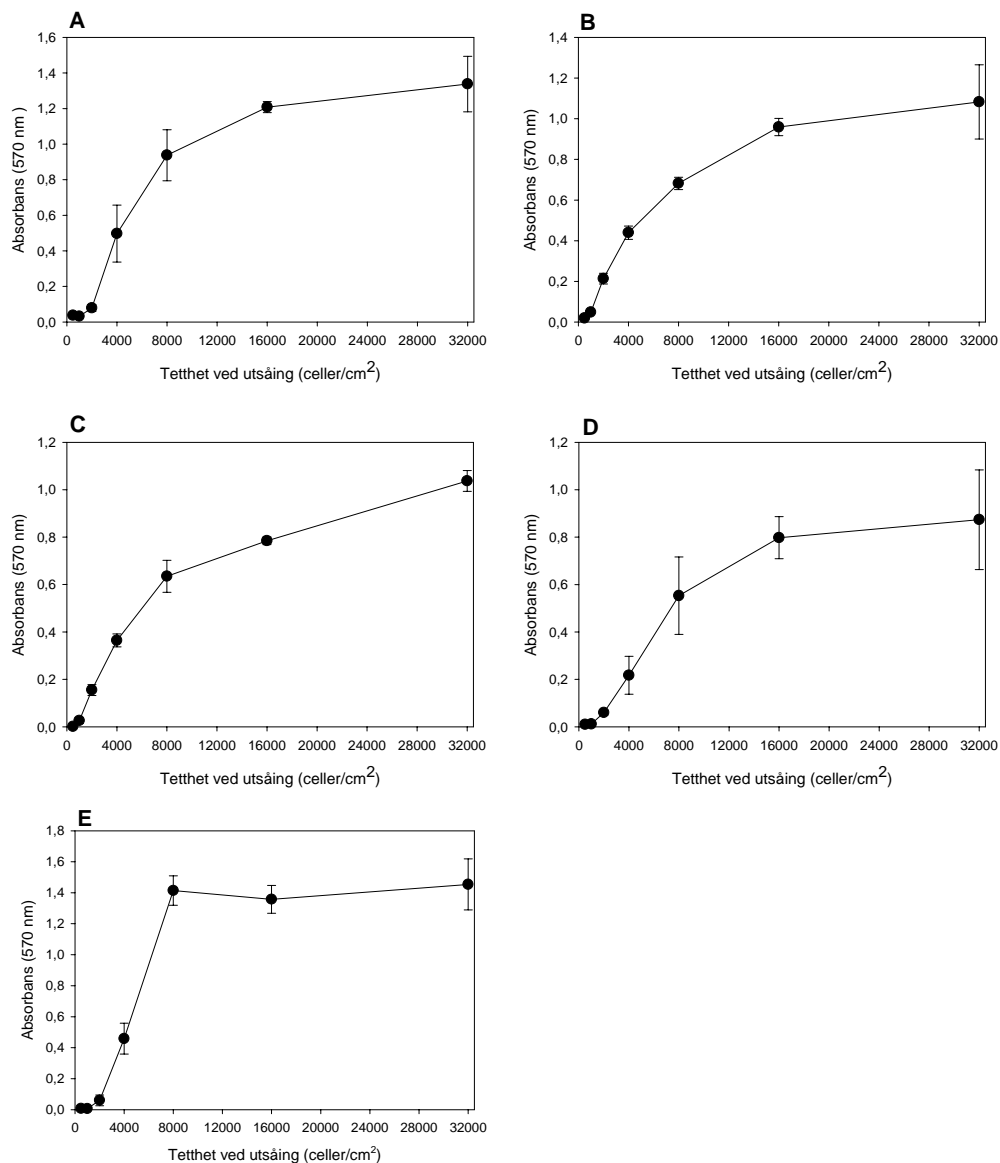
Levende celler ble deretter suspendert i 300 µl stamcellemedium og overført til 3 ml av HEScm/Methocult®. Plastikk sprøyte (BD Medical, Franklin Lakes, NJ, USA) med en 16 G nål (BD Medical) ble benyttet til å overføre 1,5 ml HEScm/Methocult® til hver brønn i 6-

brønnersbrett fra Costar® med ultra lav affinitet for å forhindre binding til plastikken (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA). Ferskt HESCM-medium ble tilsatt til brønnene ca. 1 gang i uka. Etter 5 uker ble sfæroidene farget med 0,5 mg/ml MTT løsning, og deretter detektert og telt med GelCounter™ (Oxford Optronix, Oxford, UK).

3. Resultater

3.1 Tetthetskurver

For å bestemme optimal utsåingstetthet av celler i 96-brønnersbrett til MTT-assay, ble celler sådd ut i forskjellige konsentrasjoner og behandlet slik som i PCI- (uten fotosensitizer og toksiner) og MTT-protokollen. Tettheten av celler bør være lavere enn ved konfluens, mens det bør være nok celler til at de kan detekteres av MTT-assayet. Optimal celletall ved utsåing ble målt for hver cellelinje, og til forsøk ble celler sådd ut i henhold til celleantall angitt i tabell 2.1.

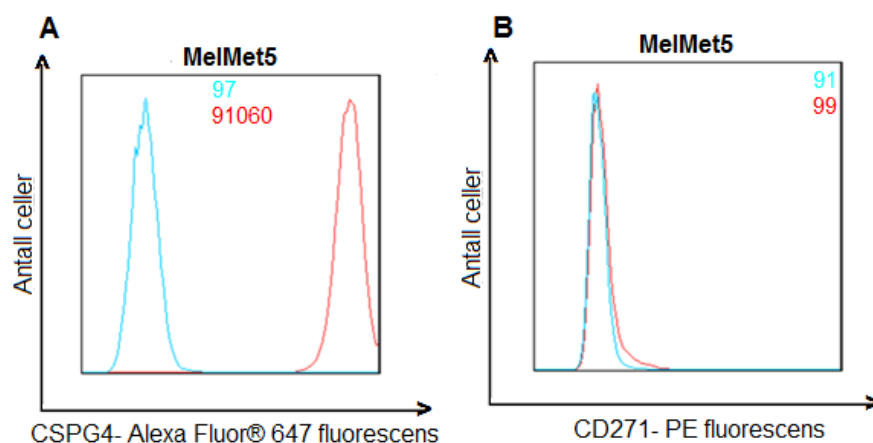


Figur 3.1: Celletetthetskurve for ubehandlede celler (A) MelMet 5, (B) SUM149, (C) MDA-MB-231, (D) MCF-7 og (E) MDA-MB-435. Alle figurene viser et representativt resultat fra et enkelt forsøk, hvor hvert målepunkt er middelverdien av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.2 CSPG4- og CD271 "targeting" i melanomer

3.2.1 Plasmamembran ekspresjon av CSPG4 og CD271

CSPG4 overflateekspresjon ble studert ved bruk av flowcytometri etter inkubering med 5 μ l anti-CSPG4 9.2.27 (0,09 μ g/ μ l) som var direkte konjugert med Alexa Fluor® 647. MelMet 5 cellelinjen var sterkt farget i forhold til ufarget prøve (figur 3.2 A). Overflateekspresjon av CD271 ble studert etter inkubering med 5 μ l anti-CD271 (0,011 mg/ml) som var merket med PE. For markøren CD271 var det ingen eller lite endring i fluorescens signal mellom farget og ufarget prøve (figur 3.2 B).



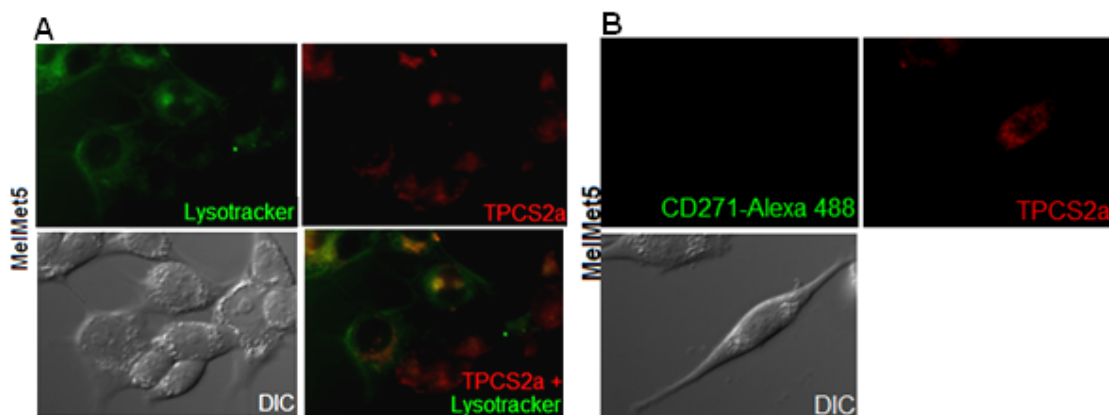
Figur 3.2: Overflateekspresjon av markørene CSPG4 (A) og CD271 (B) evaluert med flowcytometri. Celler ble inkubert i 30 minutter med (A) anti-CSPG4 (9.2.27)-Alexa Fluor® 647 og (B) anti-CD271- PE. Blå linje representerer ufarget celler, mens rød linje representerer farget celler. Tallene representerer medianverdiene for fluorescensintensiteten.

3.2.2 Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}

Levering av endocyterte makromolekyler til cytosol med PCI forutsetter at fotosensitizeren (PS) er lokalisert i membranen til endocytiske vesikler. TPCS_{2a} fluorescerer og den intracellulære lokaliseringen ble derfor undersøkt med epi-fluorescensmikroskopi. MelMet 5 ble inkubert med 1,0 μ g/ml TPCS_{2a} i 18 timer, vasket 2 ganger med medium og inkubert ("chased") 4 timer i medium før mikroskopering. 0,1 μ M LysoTracker® Green ble tilsatt ca. 1 time før mikroskopering. Granulært rød fluorescens ble observert fra TPCS_{2a} og granulært grønn fluorescens fra LysoTracker® Green. Når begge fluorokrombildene ble lagt over hverandre (merge), ble gult signal observert hvor begge fluorokromene overlappet, dvs. kolokaliserte (figur 3.3 A).

3.2.3 Intracellulær lokalisering av anti-CD271 mAb.

For å studere binding og opptak av anti-CD271 i MelMet 5 cellelinjen, ble celler inkubert med biotinylerert anti-CD271 mAb koblet til streptavidin-Alexa Fluor®488 i ca. 18 timer, vasket to ganger i medikament-fritt medium og "chased" i 4 timer før epi-fluorescensmikroskopering. Anti-CD271 ble koinkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a}. Det ble ikke detektert noe fluorescenssignal fra anti-CD271 mAb-Alexa Fluor®488 (figur 3.3 B). MelMet 5 cellelinjen fungerte derfor som negativ kontroll for CD271 i videre forsøk (figur 3.3 B).



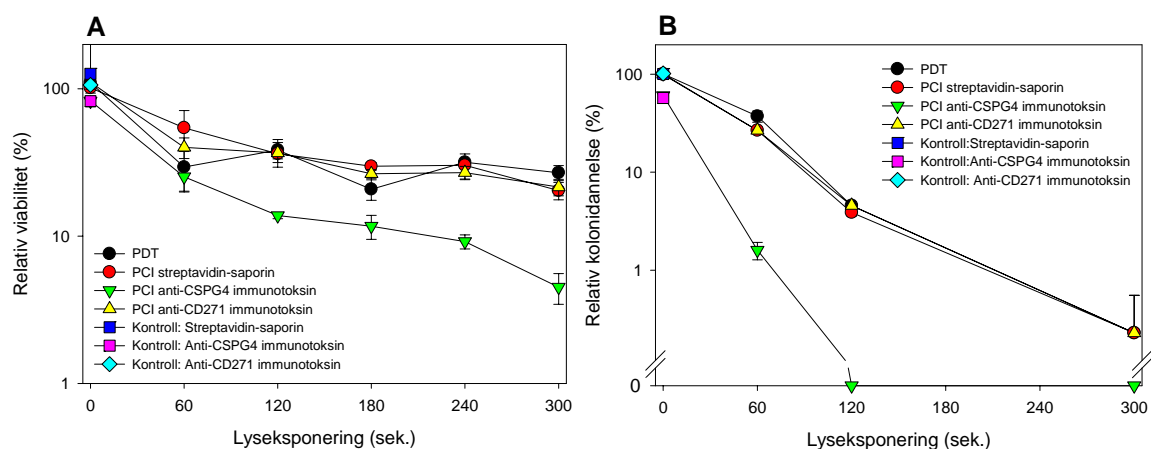
Figur 3.3: Epi-fluorescensmikroskopi av MelMet 5 cellelinjen. A) Viser kolokalisering (gult) av LysoTracker® Green og TPCS_{2a} (rød). B) MelMet 5 ble ikke farget etter 18 timer inkubering med anti- CD271- Alexa Fluor® 488.

3.2.4 PCI behandling av melanom cellelinjen ved immuntoksiner rettet mot CSPG4 og CD271

MelMet 5-celler ble behandlet med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} og 0,1 nM toksin/immuntoksin i 18 timer, vasket 2 ganger og inkubert 4 timer i medikament-fritt medium. Celleviabilitet ble målt med MTT 48 timer etter belysning (figur 3.4 A). PCI av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28-saporin) induiserte ca. 95 % nedgang i viabilitet med en lysdose på 300 sekunder. PDT og PCI av streptavidin-saporin flatet ut når lysdosen økte, og induiserte ca. 74 % nedgang i viabilitet etter en lysdose på 300 sekunder. MelMet 5 cellelinjen fungerte som negativ kontroll for markøren CD271. Det var ingen fordel med PCI av anti-CD71 immuntoksin (ME.20.4-saporin) i forhold til PCI av streptavidin-saporin. Kontrollene for toksinet og immuntoksinene viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.4 A).

For å studere langsiktig overlevelse og tap i klonogen overlevelse, ble MelMet 5 cellelinjen sådd ut i forhold til klonogen overlevelsesprotokoll. Celler ble behandlet med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} og 0,1 nM toksin/immuntoksin i 18 timer, vasket 2 ganger og inkubert 4 timer i

medikament-fritt medium. 9 dager etter belysning ble kolonier farget og telt manuelt. Ubehandlet celler formet opptil 200 kolonier. Etter 120 sekunder belysning, var det ingen kolonier igjen etter behandling med PCI av anti- CSPG4 immuntoksin. Celler som hadde fått PDT-behandling og PCI med streptavidin-saporin reduserte celleoverlevelsen til ca. 0,5 % (ved høyeste lysdose). Ved klonogen overlevelse var det ingen fordel med PCI av anti-CD271 immuntoksin. Kontrollene for toksinet og immuntoksinene viste ikke tap i klonogen overlevelse ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.4 B).

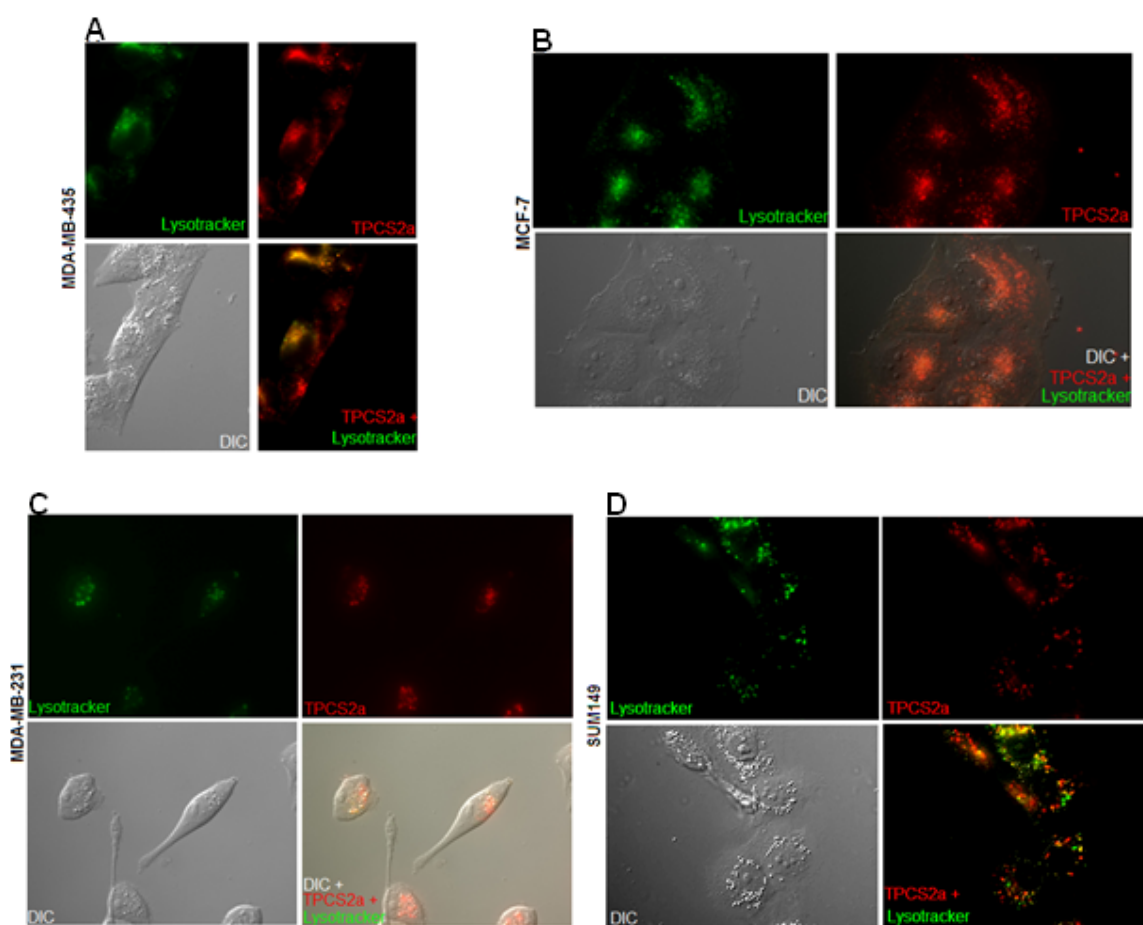


Figur 3.4: PDT- og PCI-behandling av MelMet 5 cellelinjen ved økende lysdoser. PCI av anti-CSPG4 immuntoksin viser en spesifikk og effektiv cytotoxisk respons, mens PCI av anti-CD271 immuntoksin ikke inducerer spesifikk cytotoxisk effekt A) MTT-assayet og B) Klonongen overlevelsesassayet. Viabilitet og kolonidannelse beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller. Alle figurene viser representativt resultat fra et enkelt forsøk (totalt ble det utført tre lignende forsøk). Resultatene representerer middelverdier av tre paralleller, og standardavvik (SD) er også tegnet inn.

3.3 CSPG4- og CD271 "targeting" i brystkreft

3.3.1 Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}

For brystkreftcellelinjene, MDA-MB-231, SUM149, MCF-7 og MDA-MB-435 ble intracellulær lokalisering av TPCS_{2a} undersøkt v.h.a. epi-fluorescensmikroskopi (figur 3.5). Det ble benyttet samme fremgangsmåte og konsentrasjoner som ved malign melanom cellelinjen, MelMet 5 (se avsnitt 3.2.2 Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}). Granulært rødt fluorescens ble observert fra TPCS_{2a} og granulært grønn fluorescens fra LysoTracker® Green. Når begge fluorokrombildene ble lagt over hverandre (merge), ble gult/oransj signal observert hvor begge fluorokromene overlappet, dvs. kolokaliserte (figur 3.5).



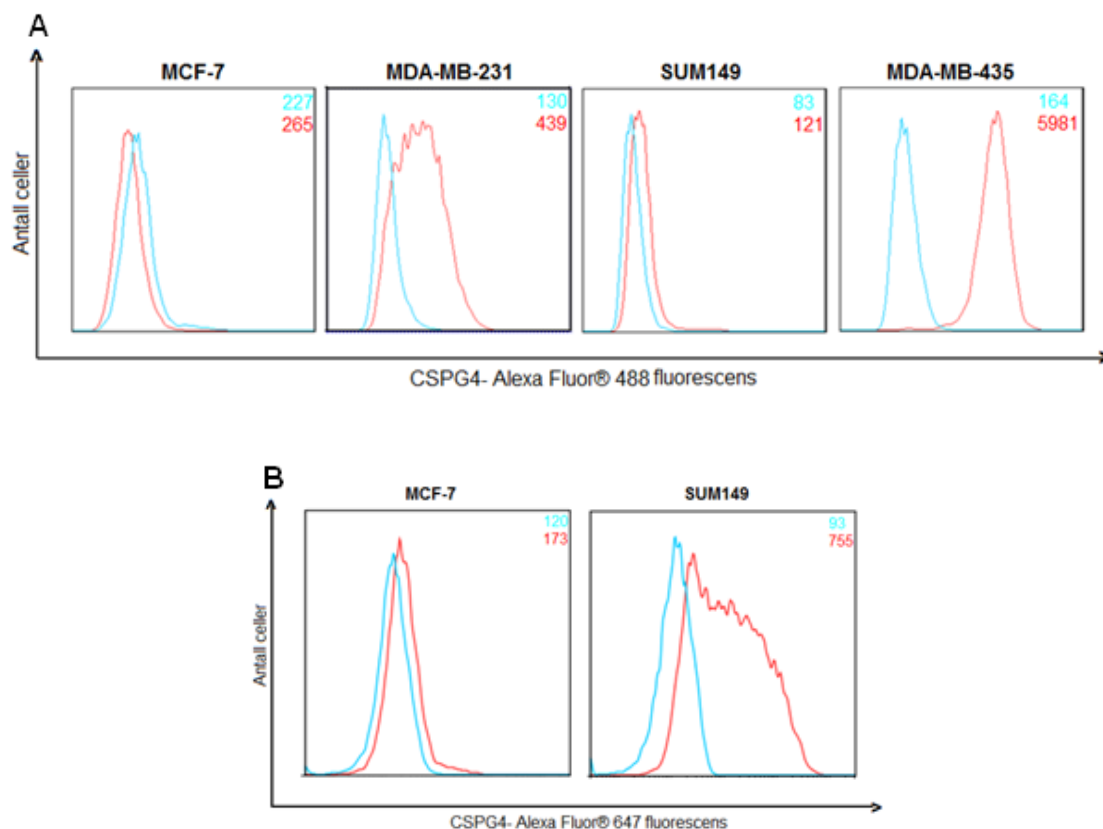
Figur 3.5: Epi-fluorescensmikroskopi viser kolokalisering (gul-oransj farget ved overlapp) av LysoTracker®Green og TPCS_{2a} (rød) i A) MDA-MB-435, B) MCF-7, C) MDA-MB-231 og D) SUM149. DIC bildet er vist for hver cellelinje for å demonstrere vitalitet hos cellene.

3.3.2 CSPG4 "targeting" i brystkreft

3.3.2.1 Plasmamembran ekspresjon av CSPG4

Overflate ekspresjon av CSPG4 ble studert ved flowcytometri etter inkubering med 10 µg/ml anti-CSPG4 (225.28-biotin) og Alexa Fluor® 488- streptavidin. I MCF-7 var det ingen forskjell i fluorescens mellom farget og ufarget prøve. MDA-MB-435 var sterkt farget, mens farget MDA-MB-231 hadde en økning på 3-4 ganger i fluorescensintensiteten. I SUM149 var det svært liten forskjell i fluorescens mellom farget og ufarget prøve (figur 3.6 A).

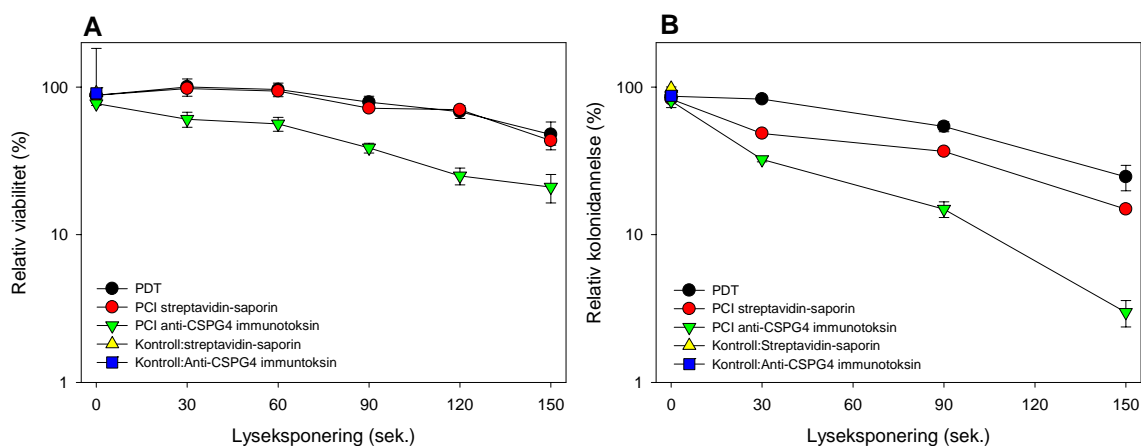
Siden flowresultatene viste liten økning i fluorescenssignalet i SUM149, ble celler disaggregert med EDTA-løsning i stedet for accutase før flowcytometri. CSPG4 overflateekspresjon ble studert etter inkubering med 5µl anti-CSPG4 9.2.27 (0,09 µg/µl) som var direkte konjugert med Alexa Fluor® 647. I MCF-7 var det fortsatt ingen forskjell i fluorescens mellom farget og ufarget prøve, mens SUM149 hadde klar økning i fluorescenssignalet (figur 3.6 B).



Figur 3.6: Overflateekspresjon av CSPG4 ble evaluert med flowcytometri. A) Celler ble disaggregert med accutase og farget med 225.28-biotin/streptavidin-Alexa Fluor® 488, og B) celler ble disaggregert med EDTA-løsning og farget med anti-CSPG4 (9.2.27)-Alexa Fluor®647. Blå linje representerer ufarget celler, mens rød linje representerer farget celler. Tallene representerer medianverdiene for fluorescensintensiteten.

3.3.2.2 PCI behandling av brystkreftcellelinjer med immuntoksiner rettet mot CSPG4
MDA-MB-231 cellelinjen ble inkubert med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} og 0,1 nM toksin/immuntoksin i 18 timer, og behandlet i forhold til PCI protokollen (avsnitt 2.2 PDT og PCI). Resultater ble avlest med MTT 48 timer etter belysning. MDA-MB-231 er en mesenchymal stamcelle-lignende brystkreftcellelinje med moderat ekspresjon av CSPG4-reseptoren (43). PCI av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28-saporin) induuerte ca. 80 % nedgang i viabilitet med en lysdose på 150 sekunder. PDT og PCI av streptavidin-saporin induuerte ca. 55 % nedgang i viabilitet med en lysdose på 150 sekunder. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.7 A).

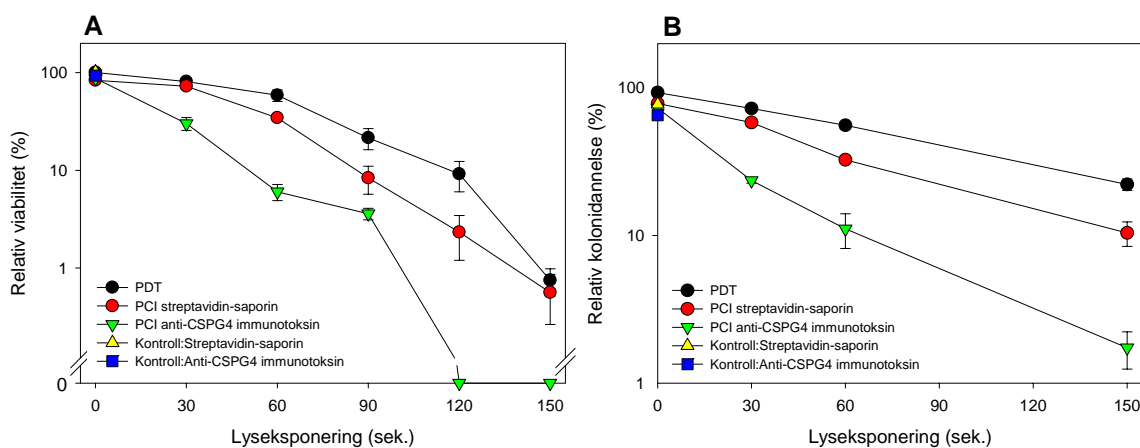
MDA-MB-231 cellelinjen ble også behandlet i forhold til klonogen overlevelses-assayet for å studere effekten av anti-CSPG4 immuntoksin på cellenes evne til å danne kolonier. Det ble benyttet samme konsentrasjon av fotosensitizer og immuntoksin, og kolonier ble farget 10 dager etter lyseksponering. PCI behandling med anti-CSPG4 immuntoksinet viste bedre effekt av behandlingen i forhold til PDT og PCI av streptavidin-saporin. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.7 B).



Figur 3.7: PDT- og PCI-behandling av MDA-MB-231 cellelinjen ved økende lysdoser. PCI av anti-CSPG4 immuntoksin viser at metoden er både spesifikk og effektiv ved måling med både A) MTT- assayet og B) Klonongen overlevelsesassayet. Viabilitet og kolonidannelse beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller. Alle figurene viser representativt resultat fra et enkelt forsøk (totalt ble det utført tre lignende forsøk). Resultatene representerer middelerverdier av tre paralleller, og standardavvik (SD) er også tegnet inn.

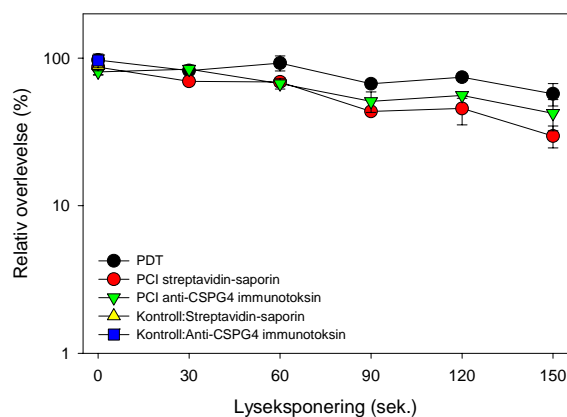
SUM149 cellelinjen ble inkubert med 0,05 µg/ml TPCS_{2a} og 1 nM toksin/immuntoksin, og behandlet i forhold til PCI protokollen (avsnitt 2.2 PDT og PCI). Celleviabilitet ble målt med MTT 48 timer etter belysning. SUM149 er en basal-lignende brystkreftcellelinje med moderat ekspresjon av CSPG4-reseptoren. PCI av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28-saporin) induverte 100 % nedgang i viabilitet med en lysdose på 120 sekunder, mens PDT og PCI av streptavidin-saporin induverte ca. 90 % nedgang i viabilitet ved samme lysdose. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.8 A).

Evaluering av klonogen overlevelse for SUM149 ble utført med samme konsentrasjon av fotosensitizer og immuntoksin, og kolonier ble farget etter 10 dager som beskrevet i avsnitt 2. Materialer og metoder. PCI behandling med anti-CSPG4 immuntoksinet viste økt cytotoksisk effekt av behandlingen i forhold til PDT og PCI av streptavidin-saporin. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.8 B).



Figur 3.8: PDT- og PCI-behandling av SUM149 cellelinjen ved økende lysdoser. PCI av anti-CSPG4 immuntoksin viser en spesifikk og effektiv effekt A) MTT-assay og B) Klonongen overlevelsesassay. Viabilitet og kolonidannelse beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller. Alle figurene viser representativt resultat fra et enkelt forsøk (for A og B er det utført totalt tre lignende forsøk). Resultatene representerer middelerverdier av tre paralleller, og standardavvik (SD) er også tegnet inn.

Luminal og CSPG4⁻-cellelinjen **MCF-7** ble inkludert som en negativ kontroll. Celler ble inkubert med 0,4 µg/ml TPCS_{2a} og 1 nM toksin/immuntoksin, behandlet og undersøkt med MTT-assayet 48 timer etter belysning. Cellene responderte dårlig på PDT-behandling, hvor kun 40 % nedgang i viabilitet etter en lysdose på 150 sekunder ble oppnådd. Det var ingen fordel ved bruk av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28- saporin) i forhold til streptavidin-saporin. PCI av streptavidin-saporin induserte større cytotoxisk effekt i forhold til PCI av immuntoksinet. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.9).



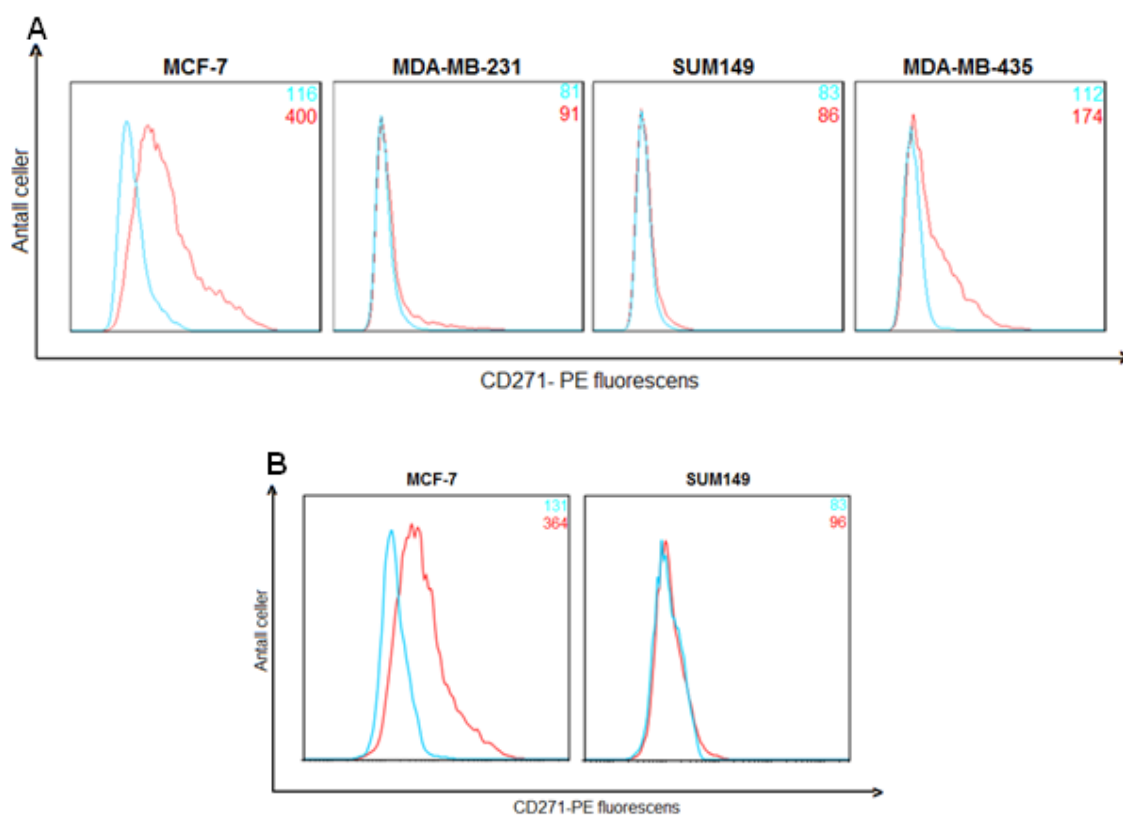
Figur 3.9: PDT- og PCI-behandling av MCF-7 (CSPG4⁻) cellelinjen ved økende lysdoser. PCI av anti-CSPG4 immuntoksin viser ingen spesifikk og effektiv effekt ved MTT-assayet. Viabilitet og kolonidannelse beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller. Alle figurene viser representativt resultat fra et enkelt forsøk (totalt ble det utført tre lignende forsøk). Resultatene representerer middelerverdier av tre paralleller, standardavvik (SD) er også tegnet inn.

3.3.3 CD271 "targeting" i brystkreft

3.3.3.1 Plasmamembran ekspresjon av CD271

Overflateekspresjon av CD271 ble studert med flowcytometri etter inkubering med 5 μ l (0,011 mg/ml) anti-CD271-PE. I SUM149 var det liten forskjell i fluorescens mellom farget og ufarget prøve. MDA-MB-435 og MCF-7 hadde moderat økning i fluorescensintensiteten for farget prøve. MDA-MB-231 hadde en liten økning i fluorescensintensiteten i forhold til ufarget prøve (Figur 3.10 A).

Ekspresjon av CD271 ble i tillegg studert etter at de ble disaggregert med EDTA-løsning i stedet for accutase før flowcytometri. CD271 overflateekspresjon ble studert etter inkubering med 5 μ l anti-CD271-PE. MCF-7 hadde fortsatt moderat økning i fluorescens i forhold til ufarget prøve, mens SUM149 fortsatt hadde liten forskjell i fluorescensintensitet mellom farget og ufarget prøve (figur 3.10 B).



Figur 3.10: Overflateekspresjon av CD271 ble farget med anti-CD271-PE og evaluert med flowcytometri. A) Celler ble disaggregert med accutase og B) celler ble disaggregert med EDTA-løsning. Blå linje representerer ufarget celler, mens rød linje representerer farget celler. Tallene representerer medianverdiene for fluorescensintensiteten.

3.3.3.2 Intracellulær lokalisering av anti-CD271 mAb

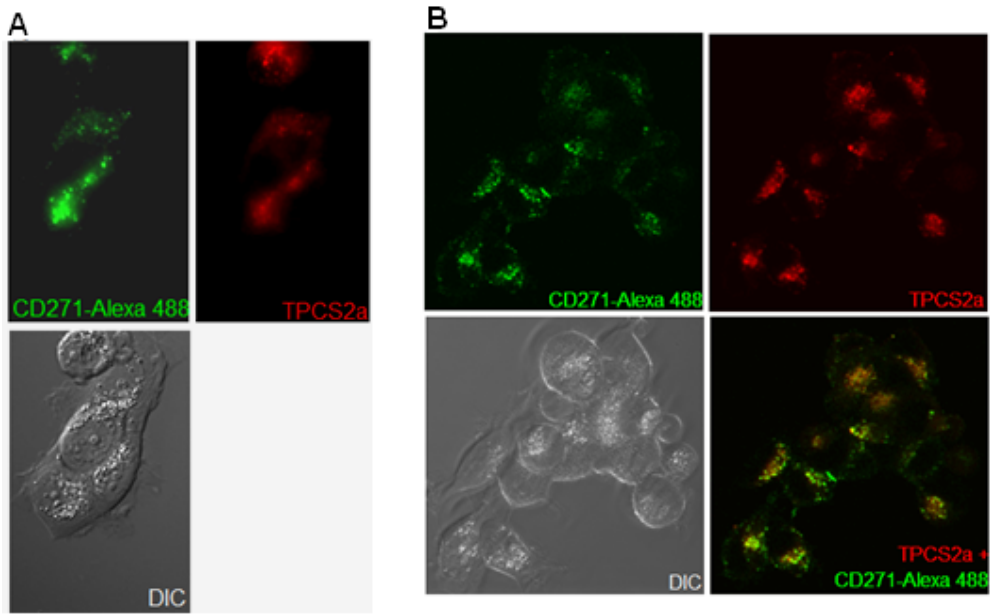
For å studere lokalisering av anti-CD271 (ME20.4-biotin) i MCF-7 og MDA-MB-435, ble celler inkubert med anti-CD271-Alexa Fluor® 488, og studert med epifluorescens- og konfokalmikroskopi. Det ble i tillegg studert kolokalisering av fotosensitizer og anti-CD271 mAb.

MCF-7

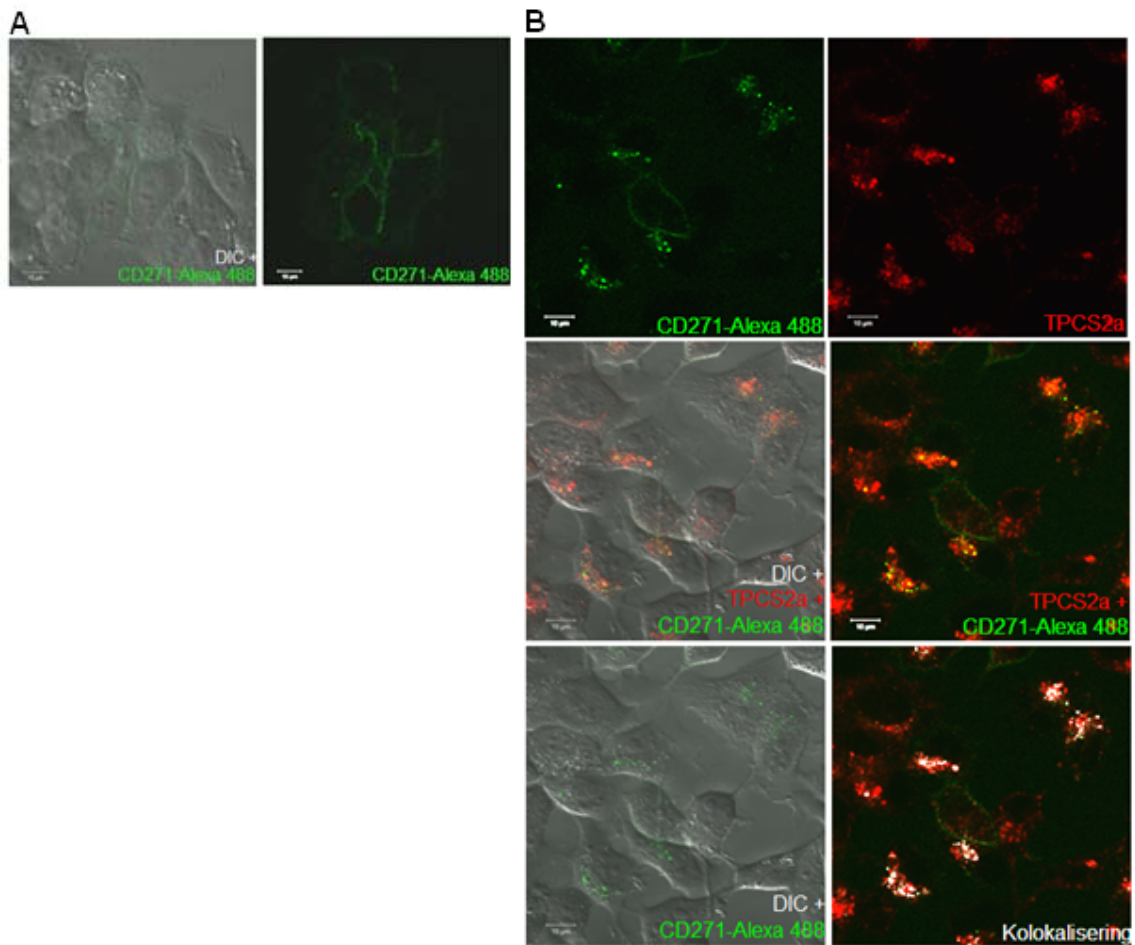
I MCF-7 celledinjen ble det etter 18 timer inkubering med anti-CD271-Alexa Fluor® 488, vasket 2 ganger i medikamentfritt medium og "chased" i 4 timer før mikroskopering, detektert grønn, granulært fluorescens fra CD271 mAb og rød granulært fluorescens fra TPCS_{2a}. Når begge fluorokrombildene ble fusjonert, ble gult signal observert hvor begge fluorokromene overlappet, dvs. kolokaliserte. (Figur 3.11A og B).

Etter 30 minutter inkubering med anti-CD271-Alexa Fluor® 488 ble det detektert diffust, grønt opptak langs membranen i MCF-7 celler med konfokalmikroskopi (figur 3.12A). Celler ble inkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a} i ca. 18 timer, vasket 2 ganger i medikamentfritt-medium, tilsatt anti-CD271-Alexa Fluor®488 og inkubert i 4 timer før mikroskopering. Det ble da detektert grønn fluorescens på plasmamembranen, og betydelige mengder grønn granulær fluorescens fra anti-CD271-Alexa Fluor® 488 og rød granulær fluorescens fra TPCS_{2a}. Ved hjelp av Imaris software ble det detektert ca. 40 % kolokalisering av Alexa Fluor®488 og TPCS_{2a} (hvitt signal, defineres av softwaren) ved konfokalmikroskopi (figur 3.12 B).

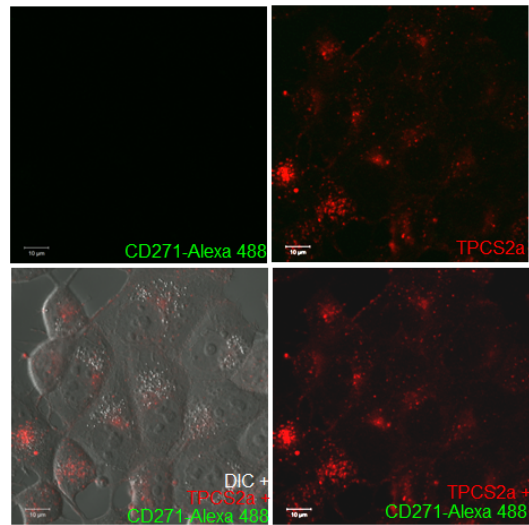
For å undersøke spesifisiteten til anti-CD271-Alexa 488, ble celler inkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a} i ca. 18 timer, vasket 2 ganger i medikamentfritt medium, tilsatt 100x ukonjugert anti-CD271 mAb i ca. 30 minutter for å blokkere reseptoren. Deretter ble celler inkubert med anti-CD271-Alexa 488 i ca. 3,5 timer før mikroskopering. Det ble ikke detektert noe grønn fluorescens fra Alexa 488 med konfokalmikroskopi (figur 3.13).



Figur 3.11: Lokalisering av anti-CD271-Alexa Fluor®488 og TPCS_{2a} etter 18 timer inkubering i MCF-7 cellelinjen A) Epifluorescens- og B) konfokalmikroskopi.



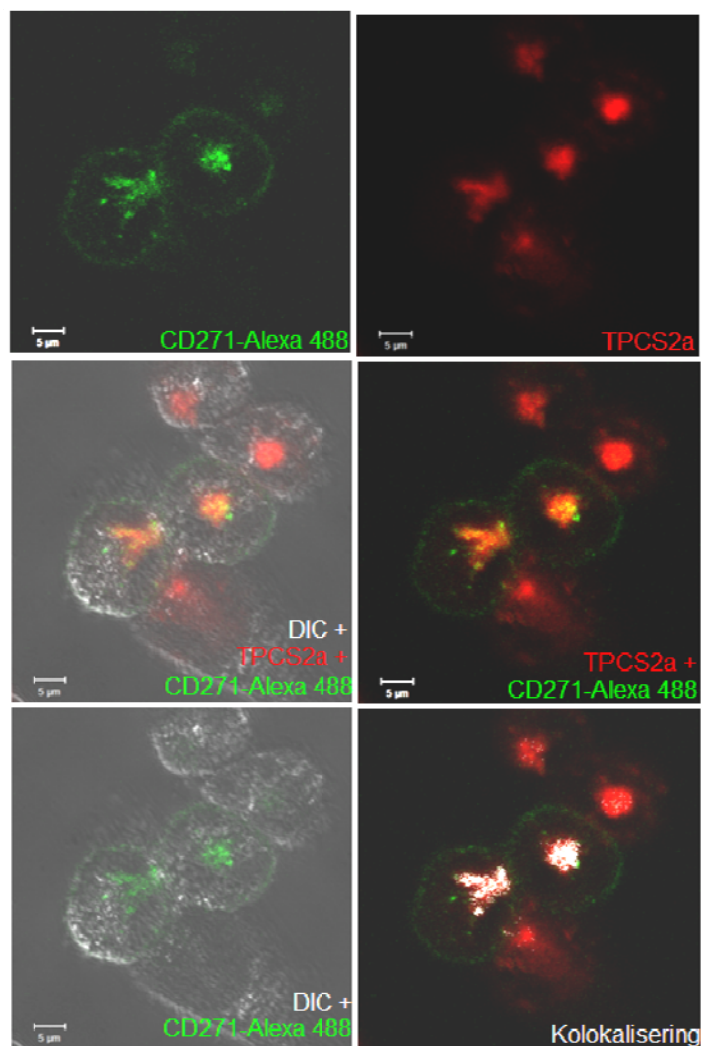
Figur 3.12: Lokalisering av anti-CD271-Alexa Fluor med konfokalmikroskopi i MCF-7. A) Det er diffust, grønn fluorescens på plasmamembranen etter 30 minutter inkubering. B) Etter 4 timer inkubering med ab er det mye granulært grønn fluorescens, men fortsatt en del binding på plasmamembranen. Gult viser kolokalisering av anti-CD271-Alexa Fluor 488 og TPCS_{2a}.



Figur 3.13:Konfokalmikroskopering etter blokkering av CD271-reseptoren i MCF-7 celledinjen. 100x blokkering med ukonjugert ab i 30 minutter førte til at det ikke ble detektert noe signal etter inkubering med anti-CD271-Alexa 488.

MDA-MB-435

I MDA-MB-435 celledinjen, ble det etter 18 timer inkubering med anti-CD271-Alexa Fluor® 488 og 1 µg/ml TPCS_{2a}, vasket 2 ganger i medikament-fritt medium og chase-periode på 4 timer, detektert grønn, granulær fluorescens og diffust rød granulært fluorescens av TPCS_{2a}. Når begge fluorokrombildene ble fusjonert, ble gult signal observert hvor begge fluorokromene overlappet. Ved hjelp av Imaris software ble det detektert ca. 64 % kolokalisering av Alexa Fluor®488 og TPCS_{2a} (hvitt signal, defineres av softwaren) ved konfokalmikroskopi (figur 3.14).



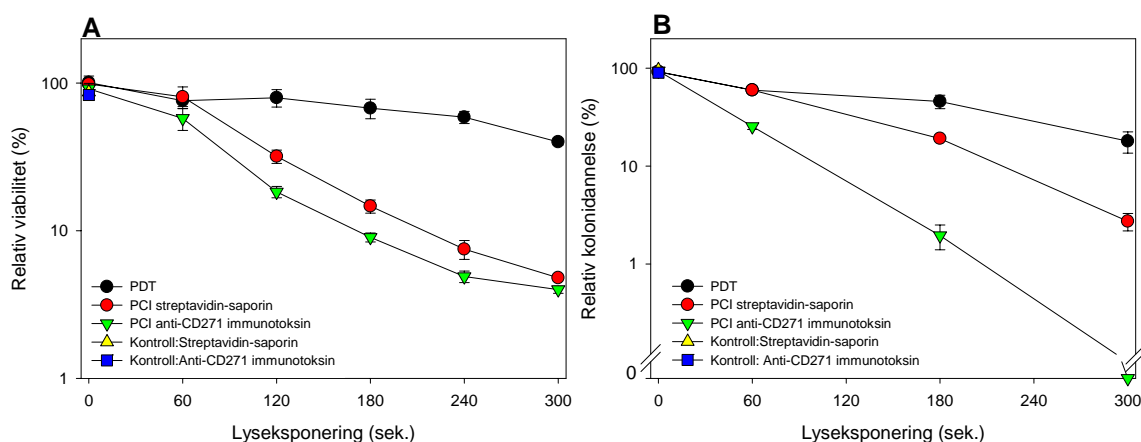
Figur 3.14: Kolokalisering av anti-CD271-Alexa 488 og TPCS_{2a} ved konfokalmikroskopering. Preliminært resultat.

3.3.3.3 PCI behandling av brystkreftcellelinjer med immuntoksiner rettet mot CD271

Brystkreftcellelinjene, MDA-MB-435 og MCF-7 ble behandlet med 0,4 µg/ml TPCS_{2a} og 1 nM toksin/immuntoksin i henhold til PCI-prosedyren (avsnitt 2.2.3 PDT og PCI), og celleoverlevelse ble målt 96 timer med MTT etter behandling.

MTT-resultatet for **MCF-7** viser at PCI av anti-CD271 immuntoksin (20.4ME-SAP) induiserte ca. 96 % nedgang i viabilitet med en lysdose på 300 sekunder, mens PCI av streptavidin-saporin induiserte ca. 93 % nedgang i viabilitet med samme lysdose. Tendensen er at PCI av immuntoksinet gir en svakt bedre cytotoxisk respons over hele lysdosespektret enn PCI av toksinet. MCF-7 cellelinjen responderte dårlig på PDT-behandling, etter en lysdose på 150 sekunder var viabilitet redusert til 60 %. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.15 A).

Klonogen overlevelse for MCF-7 ble utført og kolonier ble farget 9 dager etter behandling. Klonogen overlevelses-assayet viser derimot enda bedre effekt med PCI av anti-CD271 immuntoksin i MCF-7 cellelinjen, hvor viabiliteten ble redusert 100 % etter en lysdose på 300 sekunder. PDT-behandling induiserte ca. 80 % nedgang i viabilitet og PCI av streptavidin-saporin induiserte ca. 90 % nedgang i viabilitet ved samme lysdose. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.15 B).

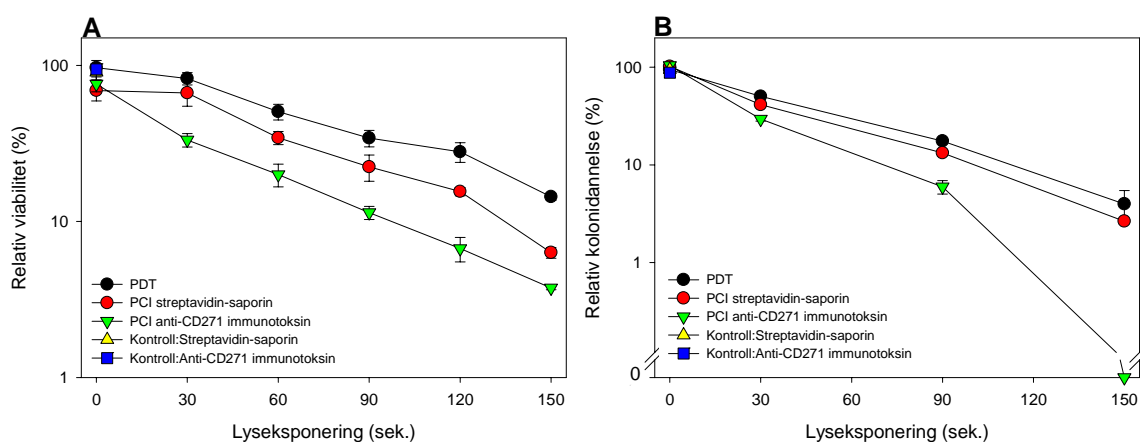


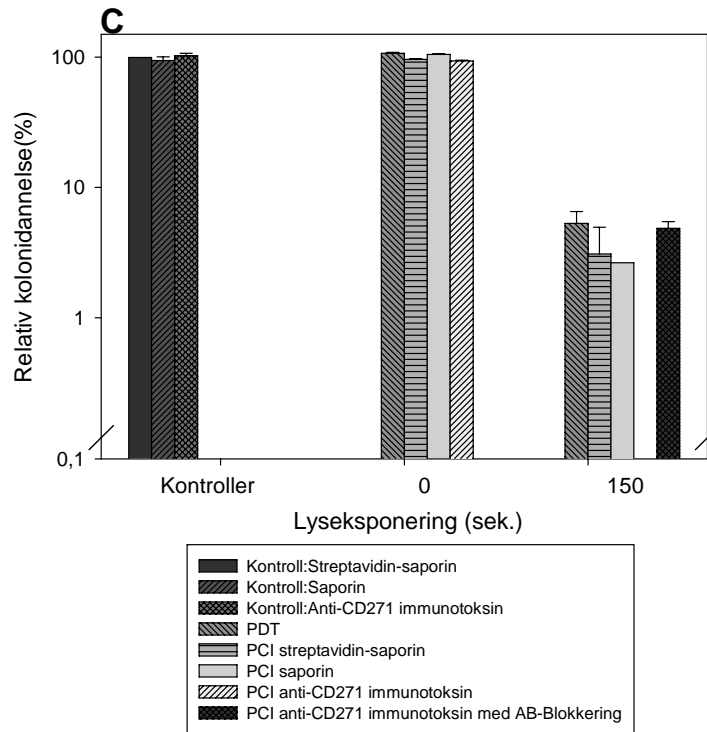
Figur 3.15: PDT- og PCI-behandling av MCF-7 cellelinjen ved økende lysdoser. PCI av anti-CD271 immuntoksin viser en spesifikk og effektiv cytotoxisk respons A) MTT-assayet og B) Klonongen overlevelsesassayet. Viabilitet og kolonidannelse beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller. Alle figurene viser representativt resultat fra et enkelt forsøk (totalt ble det utført tre lignende forsøk). Resultatene representerer middelverdier av tre paralleller, og standardavvik (SD) er også tegnet inn.

MDA-MB-435 ble behandlet på samme måte som MCF-7 cellelinjen. MTT-resultatet viser at PCI av anti-CD271 immuntoksin induerte ca. 97 % nedgang i viabilitet med en lysdose på 150 sekunder, mens PCI av streptavidin-saporin induerte ca. 90 % nedgang i viabilitet ved samme lysdose. Celler responderte godt på PDT-behandlingen, siden viabiliteten var redusert til ca. 85 % med en lysdose på ca. 150 sekunder. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.16 A).

Klonogen overlevelse for MDA-MB-435 ble utført og kolonier ble farget 12 dager etter behandling. Klonogen-assayet viser derimot enda bedre effekt med PCI av anti-CD271 immuntoksin i MDA-MB-435 cellelinjen, hvor viabiliteten ble redusert 100 % etter en lysdose på 150 sekunder. Kontrollene for toksinet og immuntoksinet viste ikke nedgang i viabilitet ved fravær av lys. Lignende resultater ble sett i to andre, individuelle forsøk (figur 3.16 B).

For å studere spesifisiteten av immuntoksinet, ble det ko-inkubert med 20x ukonjugert anti-CD271 mAb for å kompetitivt inhibere reseptorbinding. Celler ble inkubert i ca. 30 minutter med ukonjugert mAb før immuntoksinet ble tilsatt og inkubert i ca. 18 timer, vasket med medikament-fritt medium og "chased" i 4 timer før lyseksponering. Det ble ikke observert noe forskjell i cytotoxicitet mellom PDT, PCI av streptavidin-saporin, PCI av saporin og PCI av immuntoksinet med et overskudd av mAb, mens immuntoksin som ikke var inhibert viste større cytotoxicisk effekt (figur 3.16 C).

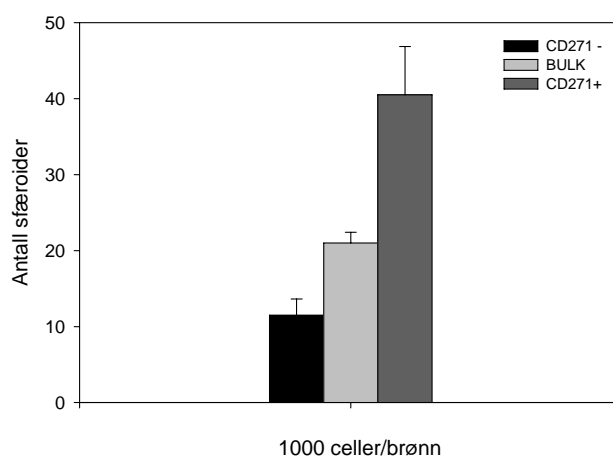




Figur 3.16: PDT- og PCI-behandling av MDA-MB-435 cellelinjen ved økende lysdoser. PCI av anti-CD271 immuntoksin viser en spesifikk og effektiv effekt A) MTT-assayet og B) Klonongen overlevelsesassayet. C) Etter 20x blokkering med ukonjugert anti-CD271 mAb ble effekten av anti-CD271 immuntoksin inhibert ved klonogen overlevelsesassayet. Viabilitet og kolonidannelse beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller. Alle figurene viser representativt resultat fra et enkelt forsøk (totalt ble det utført tre lignende forsøk). Resultatene representerer middelerverdi av tre paralleller, og standardavvik (SD) er også tegnet inn.

3.4 Sortering av MCF-7 celler for sfæroidedannelse ved FACS og dyrkning i stamcellemedium

MCF-7-cellenes egenskaper til å danne sfæroider ble undersøkt ved sortering v.h.a. FACS og dyrkning i stamcellemedium Methocult. Cellene ble delt inn i følgende sorteringsgrupper: 1) Høy ekspresjon av CD271 (CD271⁺), 2) lav ekspresjon av CD271 (CD271⁻) og 3) bulk (CD271⁺/CD271⁻), og ble behandlet i henhold til fremgangsmåte beskrevet i avsnitt 2.6 sfæroidedannelse i Methocult. Det ble dannet små sfæroider i alle populasjonene. Celler som hadde høy ekspresjon av CD271 hadde 4x høyere evne til å danne sfæroider enn CD271⁻ celler (figur 3.17).



Figur 3.17: Sfæroidedannelse i MCF-7 cellene etter sortering v.h.a. FACS for markøren CD271. Celler som hadde høy ekspresjon av CD271 hadde større evne til å danne sfæroider enn CD271⁻. Resultatene representerer middelerverdier av to paralleller, og standardavvik (SD) er også tegnet inn. Preliminært resultat.

4. Diskusjon

4.1 CSPG4 og CD271 som "target" for kreftbehandling og deres rolle i CSCc

4.1.1 Cellelinjer

Seleksjon av TNBC cellelinjer som ble benyttet til CSPG4-targeting i denne studien var basert på arbeidet til Eng *et al.* (ikke publisert) og Wang *et al.* (43). MDA-MB-231 cellelinjen er en vanlig modell for brystkreft og har moderat til lav ekspresjon av CSPG4 (43). Mens SUM149 er en blandet cellelinje med både basal-lignende og luminal-lignende egenskaper, og har en moderat ekspresjon av CSPG4 (23). Luminal cellelinjen MCF-7 er CSPG4⁻, og ble derfor inkludert som negativ kontroll for CSPG4 (43). Kim *et al.* detekterte uttrykk av CD271 i MCF-7 cellelinjen (50), og denne cellelinjen ble derfor benyttet for targeting av ME20.4-saporin. MDA-MB-435 cellelinjen har moderat til høy ekspresjon av CSPG4 og PCI av 225.28.sap ble vellykket i studien utført av Eng *et al.* (ikke publisert). I tillegg ble CD271 ekspresjon detektert ved flowcytometri, og MDA-MB-435 cellelinjen ble derfor valgt å gå videre med for å etablere målrettet behandling ved PCI av immuntoksin rettet mot CD271.

MelMet 5 cellelinjen fungerte som malignt melanom modell. Denne cellelinjen ble først etablert fra lymfeknute metastaser fra en pasient med aggressiv melanom, og ble isolert ved hjelp av CSPG4-spesifikke magnetkuler på det Norske Radiumhospitalet (83). MelMet 5 er positiv for markøren CSPG4, og negativ for markøren CD271.

4.1.2 Plasmamembran ekspresjon av CSPG4

For å kunne utføre målrettet behandling av kreftceller er det viktig å identifisere mulige antigener som uttrykkes på plasmamembranen. Flowcytometri-dataene viser ekspresjon av CSPG4 på plasmamembranen til cellelinjene MDA-MB-231, MDA-MB-435, SUM149 og MelMet 5. Cellelinjen MCF-7 viste seg å ikke ha uttrykk av CSPG4 på plasmamembranen, og fungerte derfor som negativ kontroll for CSPG4 i studien (figur 3.2 A og 3.6 A, B).

Basis for målrettet behandling av CSPG4 i trippel-negative brystkreft var basert på studie utført av Eng *et al.* (ikke publisert) og Wang *et al.* (43). Studien utført av Eng *et al.* (ikke publisert) viste plasmamembran ekspresjon av CSPG4 ved hjelp av flowcytometri i MDA-MB-435 og MDA-MB-231 cellelinjen, og at disse kan benyttes som "target" ved kreftbehandling.

I studien utført av Wang *et al.* ble det undersøkt uttrykk av CSPG4 ved hjelp av flowcytometri i trippel negative brystkreft-cellelinjene MDA-MB-231, MDA-MB-435 og SUM149, og i luminal brystkreftcellelinjen MCF-7. Resultatene viste at klar ekspresjon av CSPG4 i alle tre trippel negative brystkreftcellelinjene, mens luminal brystkreftcellelinjen viste å være negativ for markøren CSPG4. Wang *et al.* observerte positiv assosiasjon mellom CSPG4 ekspresjon og frekvens av CD44⁺/CD24⁻ fenotype. Celler med CD44⁺/CD24⁻ fenotype har blitt assosiert med tumorgenitet når de ble injisert i mus (43). Filmore *et al.* studerte flere cellelinjer, inkludert trippel-negative cellelinjene SUM149 og MDA-MB-231. De fant ut at cellene som var CD44⁺/CD24⁻/EpCAM⁺ hadde forhøyet evne til tumor-initiering, delte seg sakte og var resistente mot kjemoterapi. Selv om det er korrelasjon mellom CSPG4 og CD44/CD24 status er ikke dette nok til å bekrefte at CSPG4 er en markør for cancer stamceller i TNBC (23). CSPG4s evne til å aktivere signaleringsveier resulterer i tumorprogresjon ved økning i overlevelse, kjemoresistens, invasjon, migrasjon, proliferasjon og epitelial-mesenchymal transformasjon (EMT) (41), og dette indikerer at CSPG4 kan ha en viktig rolle for cancer stamceller.

I malignt melanom, er CSPG4 uttrykt i mer enn 90 % av ondartede føflekker og ikke-metastaserende lesjoner som fjernes med kirurgi, og målrettet behandling med antistoff mot CSPG4 har blitt utført med varierende suksess (44). CSPG4 har viktige roller i melanomer, slik som proliferasjon, migrasjon og invasjon (41). I en studie utført av Yang *et al.* ble CSPG4-negative celler transfektert med CSPG4 og det ble observert økt tumorinitiering i NOD-SCID mus i forhold til CSPG4-negative celler, noe som indikerer at CSPG4 har en viktig rolle i melanom-initiering (44).

4.1.3 Plasmamembran ekspresjon av CD271

Flowcytometri-dataene viste ekspresjon av CD271 på plasmamembranen i MCF-7, MDA-MB-435 og MDA-MB-231 cellelinjene. SUM149 og MelMet 5 cellelinjene viste seg å ikke ha uttrykk av CD271 på plasmamembranen, og MelMet 5 fungerte derfor som negativ kontroll for CD271 i studien (figur 3.2 B og 3.10 A, B).

I denne studien var basis for målrettet behandling av CD271 i brystkreft basert på en studie utført av Kim *et al.* som identifiserte CD271 som en mulig stamcellemarkør for primære brystkarsinomer, blant annet i MCF-7 cellelinjen. I tillegg er det utført studier av Vanhecke *et al.* og Dolle *et al.* hvor de har detektert ekspresjon av CD271 (p75^{NTR}) i MCF-7 cellelinjen ved hjelp av Western Blott (47, 48).

Når det gjelder maligne melanomer er det i litteraturen strid om CD271 er en reell stamcellemarkør. I to uavhengige studier, Boiko *et al.* og Civenni *et al.* har CD271 blitt identifisert som stamcellemarkør i maligne melanomer (35, 36). Boiko *et al.* implanterte melanom-pasientprøver i immunsupprimerte mus, og observerte høyere melanom-initiering etter transplantasjon av CD271⁺ celler i forhold til CD271⁻ eller bulk- celler (36). Lignende studie ble utført av Civenni *et al.* hvor de observerte at CD271⁺ celler reproduserte heterogeniteten i primær tumor når de ble injisert i NOD/SCID mus, og at tilstedeværelse av CD271⁺ celler var nødvendig for vekst av tumoren (35).

Men, to andre uavhengige studier utført av Quintana *et al.* og Held *et al.* påviste at CD271 ikke anriker melanom CSC (37, 38), men Quintana *et al.* fant derimot at en stor andel av melanomer har tumor-initierende kapasitet (37), noe som utfordret den opprinnelige CSC-hypotesen som sier at CSC utgjør kun en liten andel av den totale kreftpopulasjonen til en pasient. Dette er også senere vist i et annet studium utført ved Radiumhospitalet (83). Civenni *et al.* har senere foreslått en mulig forklaring for denne striden, blant annet at bruken av trypsin, som ble brukt i studiet til Quintana, for å disaggregere celler kan gi opphav til falske negative resultater ved assay som benyttes for å identifisere mulige cancer stamceller i melanomer (35). Viktigheten av riktig disaggregeringsstrategi ble erfart i dette studiet og blir i detalj diskutert under.

4.1.4 Bruk av kjemiske forbindelser for disaggregering av celler til flowcytometri

Flowcytometri av SUM149 celledinjen for deteksjon av CSPG4 på plasmamembranen etter disaggregering av celler med accutase, viste liten forskjell mellom farget og ufarget prøve (figur 3.6 A). Når celler ble disaggregert med EDTA-løsning i stedet for accutase ble det detektert klar forskjell mellom farget og ufarget prøve ved flowcytometri (figur 3.6 B). Det ble også benyttet 9.2.27 i stedet for 225.28 antistoff, men siden begge antistoffene er rettet mot CSPG4 bør ikke dette være hovedårsaken til forskjellen. I studien utført av Eng *et al.* (ikke publisert) ble det benyttet EDTA-løsning til disaggregering av celler og 225.28 antistoff til merking av celler, og det ble detektert samme resultater som i figur 3.6 B. Dette tyder på at forskjellen i resultatet mest sannsynlig skyldes bruken av EDTA-løsning til disaggregering av celler.

Accutase brukes vanligvis i stedet for EDTA/Trypsin-behandling av celler, siden den er mer skånsom mot reseptoren (84, 85). Mest sannsynlig er årsaken til dette at accutase skader CSPG4-reseptorene på SUM149-cellelinjen. Siden SUM149 ble langvarig behandlet med accutase ved 37 °C før flowcytometri, så kan enzymene ha begynt å ødelegge CSPG4-reseptoren (86). Dette illustrerer viktigheten for riktig bruk av kjemiske forbindelser for disaggregering av celler til flowcytometri. Dette er i samsvar med det Civenni *et al.* har påpekt ved bruk av trypsin (35).

4.2 Lokalisering av TPCS_{2a} og anti-CD271 mAb

I flere studier er det vist at fotosensitizeren lokaliseres til endosomer og lysosomer. Det er derfor en forutsetning for PCI-teknologien at det er en viss grad av kolokalisering av fotosensitizeren og legemiddel som ønskes frigjort til cytosol (5, 87). Epi-fluorescensmikroskopering av MDA-MB-231, MDA-MB-435, SUM149, MCF-7 og MelMet 5 celler etter 18 timer inkubasjon med TPCS_{2a}, vask og 4 timer inkubasjon i PS-fritt medium viste rød granulær fluorescens, med en form som ligner på endosomer og lysosomer. Celler ble i tillegg koinkubert med LysoTracker®Green, som tas opp i sure organeller slik som sene endosomer og lysosomer, og det detektert en grønn granulær fluorescens fra LysoTracker®Green. Når begge fluorokrombildene ble lagt over hverandre (merge), ble gult signal observert, dvs. indikasjon på kolokalisering av fluorokromene (figur 3.3 A og 3.5) noe som sterkt antyder endolysosomal lokalisering av TPCS_{2a}. Fravær av fluorescens på plasmamembranen etter 4 timer vask med medikamentfritt medium tyder på at TPCS_{2a} vaskes bort fra plasmamembranen, noe som er ønskelig for å forhindre høy cytotoxisitet etter belysning. Dette mimikerer også en *in vivo* situasjon hvor TPCS_{2a} over flere dager (48-72 timer) vil bli vasket bort fra kreftcellenes overflate (88). Observasjonene er i samsvar med resultater fra forsøk med andre amfifile fotosensitizere (AlPcS_{2a} og TPPS_{2a}) (89, 90). I en studie utført av Eng *et al.* (ikke publisert) ble det også detektert kolokalisering av TPCS_{2a} og LysoTracker®Green i MDA-MB-231, MDA-MB-435 og MCF-7.

Konfokalmikroskopi av MCF-7 og MDA-MB-435 viste binding av anti-CD271 antistoff både på plasmamembranen og intracellulært i granulære organeller, og delvis kolokalisert med TPCS_{2a} (figur 3.11 og figur 3.14). Disse resultatene viser med sikkerhet at Ab-Alexa 488 bindes og tas opp og kolokaliserer med TPCS_{2a} og dette antyder at fotosensitizer og immuntoksinet lokaliserer på en slik måte at det er mulig å indusere cytosolisk frigjøring ved PCI.

Etter 30 minutter inkubering med anti-CD271-Alexa 488 i MCF-7 cellelinjen ble det detektert binding av antistoff på plasmamembranen og ikke intracellulært i cellen. Etter 4 timers inkubering med antistoff ble noe granulær fluorescens fra antistoff detektert i tillegg til binding på plasmamembranen. Dette indikerer at over natt inkubering med antistoff er en forutsetning for tilstrekkelig intracellulært opptak i cellelinjen (figur 3.11 B).

4.3 Effektivitet og spesifisitet av PCI behandling

Fotosensitizeren TPCS_{2a} var ikke-toksisk ved fravær av lys, dvs. at den har lav "mørke toksisitet". Cytotoksitet av streptavidin-saporin uten tilsetning av fotosensitizer var lav, men når det ble utført koinkubering med TPCS_{2a} og lys var kombinasjonen mer toksisk enn hver komponent for seg selv. Denne observasjonen er i samsvar med tidligere observasjoner med PCI av streptavidin-saporin (91). Toksisiteten av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28-saporin) og anti-CD271 immuntoksin (ME20.4-saporin) uten fotosensitizer tilstede var minimal. Disse resultatene indikerer at PCI-indusert targeting ikke bare er spesifikk for mål-antigen, men også lys-spesifikk. PCI teknologien vil derfor gi høy selektivitet *in vivo* på grunn av: 1) Høyere akkumulering av fotosensitizer i tumorvev enn i normalvev (57), 2) antistoffdelen av immuntoksinet sørger for mål-spesifisitet ovenfor kreftcelleantigen (68) og 3) tid-rom spesifisitet (spatiotemporal kontroll) på grunn av lys-kontrollert aktivering (5).

4.3.1 PCI av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28-saporin)

Studien utført av Eng *et al.* (ikke publisert) viste effektiv og spesifikk cytotoksisk effekt med PCI av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28-saporin) i trippel negative brystkreftceller og malignt melanom. Det var behov for å reproducere disse data, og å verifisere de MTT-baserte resultatene ved hjelp av assayet klonogen overlevelse. Anti-CSPG4 immuntoksin induerte betydelig høyere toksisitet enn streptavidin-saporin ved levering med PCI i CSPG4-positive MelMet 5, SUM149 og MDA-MB-231 celler (figur 3.4, 3.7 og 3.8). I den CSPG4-negative cellelinjen MCF-7 var det derimot ingen tilsvarende forskjell på PCI-effekt av 225.28-saporin og streptavidin-saporin (figur 3.9). Disse observasjonene bekrefter at anti-CSPG4 immuntoksinet leveres spesifikt til celler som overuttrykker CSPG4 og disse resultatene er i samsvar med studien utført av Eng *et al.* (ikke publisert).

4.3.1.1 Kontrollstudier med antistoff mot CSPG4

Det ble utført kontrollforsøk for antistoff mot CSPG4, for å undersøke antistoffets affinitet for reseptoren. MCF-7 cellelinjen fungerte som negativ kontroll for CSPG4, siden denne cellelinjen ikke har plasmamembran ekspresjon av CSPG4 (figur 3.6 A). Det ble utført PCI forsøk med anti-CSPG4 immuntoksin, og det var ingen fordel med PCI av anti-CSPG4 immuntoksin (225.28-saporin) i forhold til PCI av streptavidin-saporin. I studien utført av Eng *et al.* (ikke publisert) har det blitt utført selektivitetsforsøk av antistoff mot CSPG4. Resultatet viste at effekten ved PCI av anti-CSPG4 immuntoksin ble redusert etter blokkering med anti-CSPG4 mAb og ble lik PDT-effekten og PCI av streptavidin-saporin.

Disse selektivitetsforsøkene viste at den cytotoksiske effekten av anti-CSPG4 immuntoksin var svært spesifikk.

4.3.2 PCI av anti-CD271 immuntoksin (ME.20.4-saporin)

Denne oppgaven er det første studiet som anvender PCI for målrettet inaktivering av kreftceller som har overekspresjon av CD271. Anti-CD271 immuntoksinet ME.20.4-saporin induerte høyere toksisitet enn streptavidin-saporin etter levering med PCI i CD271-positive MCF-7 og MDA-MB-435 celler (figur 3.15 og 3.16 A, B). I den CD271-negative cellelinjen MelMet 5 var det derimot ingen tilsvarende forskjell på PCI-effekt av ME20.4-saporin og streptavidin-saporin (figur 3.4). Disse observasjonene bekrefter at anti-CD271 immuntoksin leveres spesifikt til celler som overuttrykker CD271.

4.3.2.1 Kontrollstudier med antistoff mot CD271

Det ble utført kontrollforsøk på MCF-7 og MDA-MB-435 cellelinjen, mens MelMet 5 cellelinjen fungerte som negativ kontroll. Det er viktig å utføre kontrollforsøk av antistoffene for å undersøke antistoffenes selektivitet og affinitet for reseptoren, og dermed effektivitet ved PCI-behandling.

Selektivitetsforsøk av antistoffet mot CD271 ble utført ved fluorescensmikroskopi for MCF-7 cellelinjen. Forsøket ble utført ved å blokkere reseptoren for overflatemarkøren CD271 ved å benytte stort overskudd ukonjugert antistoff, og deretter ble det tilsatt anti-CD271-Alexa Fluor 488 før konfokalmikroskopi. Etter blokkering med antistoff, ble det ikke detektert noe grønn fluorescens fra Alexa 488.

Selektivitetsforsøk av antistoffet mot CD271 ble i tillegg utført ved PCI behandling for MDA-MB-435 cellelinjen. Forsøket ble utført ved å blokkere reseptoren for overflatemarkøren CD271 ved å benytte et ukonjugert antistoff, og deretter ble det tilsatt anti-CD271 immuntoksin for PCI behandling. Resultatet viste at effekten ved PCI av anti-CD271 immuntoksin ble redusert etter blokkering og ble lik PDT-effekten og PCI av streptavidin-saporin.

MelMet 5 cellelinjen fungerte som negativ kontroll for CD271, siden denne cellelinjen ikke har plasmamembran ekspresjon av CD271 (figur 3.2 B). Etter 18 timer inkubering med anti-CD271-Alexa Fluor 488, ble det ikke detektert noe grønn fluorescens fra Alexa 488 med epi-fluorescensmikroskopi. I tillegg ble det utført PCI forsøk med anti-CD271 immuntoksin, og det var ingen fordel med PCI av anti-CD271 immuntoksin (ME.20.4-saporin) i forhold til PCI av streptavidin-saporin. Disse selektivitetsforsøkene viste at den cytotoksiske effekten av anti-CD271 immuntoksin var svært spesifikk.

4.4 Stamcellemarkøren CD271

I følge cancerstamcelleteorien er det en liten populasjon av kreftcellene som er CSC, og som dermed har evnen til selvfornyelse, dele seg uendelig og dermed evne til å opprettholde tumoren (10). CSC identifiseres bl.a. ved bruk av overflatemarkører og CD271 er en markør som er blitt benyttet til dette. Kim *et al.* har identifisert CD271 som en stamcellemarkør i primære brystkarsinomer (50). Det var derfor et mål i denne oppgaven å utføre et assay for å sammenligne CD271⁺, CD271⁻ og bulk-cellers evne til å initiere mikrotumores *in vitro*, dvs. sfæroider/3D-kolonier.

4.4.1 Studier av selvfornyelse ved sorterting av høyt uttrykte CD271-positive celler

Sfæroider ble dannet ved å sorterte ut MCF-7 celler som var sterkt positive, negative og bulk populasjoner basert på CD271-ekspresjon. Cellepopulasjonene ble deretter inokulert i serumfritt stamcellemedium i Methocult. Populasjonen som hadde høy uttrykk av CD271 hadde 4 ganger høyere evne til å danne sfæroider enn lav-uttrykk CD271 celler, og oppfylte dermed kravene til selvfornyelse i et 3D-system (figur 3.17). Siden dette forsøket kun ble utført en gang, må dataene tolkes med forsiktighet. *In vivo* forsøk ble ikke utført i denne oppgaven pga. tidsbegrensing, siden serietransplantasjoner *in vivo* kan ta opptil 6 måneder. Eksperimentene må derfor reproduseres to ganger for å trekke endelig konklusjon.

4.5 MDA-MB-435, melanom eller trippel negativ brystcancer-cellelinje?

I litteraturen er det konflikt om MDA-MB-435 cellelinjen er en bryst eller melanom-cellelinje (71). Det ser ut til at nyere litteratur er splittet i to, på den ene siden blir den fortsatt anvendt som brystkreftlinje, mens andre bruker den nå som en melanomlinje. En studie utført av Rae *et al.* hevder at MDA-MB-435 cellelinjen har blitt kontaminert av melanom cellelinjen M14 (92). I en oversiktsartikkel av Chambers henvises det til at MDA-MB-435 og M14 er identiske, men er ikke av melanom-opprinnelse. Chamber beskriver at MDA-MB-435 har både brystkreft egenskaper, samtidig som den har ekspresjon av klassiske melanom proteiner. Videre blir det henvist til at melanocytmarkører er blitt detektert i brystkreftprøver. Et viktig poeng i denne artikkelen er at MDA-MB-435 har et kvinnelig opphav (basert på karyotyping), mens M14 opprinnelig var rapportert å ha blitt isolert fra en mannlig pasient (71). Det er påvist at uttrykk av CSPG4 er signifikant forskjellig mellom MDA-MB-425 og M14 (93).

Det er derfor plausibelt å hevde at det må eksistere flere utgaver av M14-linjen ettersom det på den ene siden er vist at de er identiske, noe som antyder MDA-MB-435 kontaminering av M14, og på den andre siden at det er forskjellig proteinekspresjon av CSPG4. Dette til sammen forsterker bevisene om at MDA-MB-435 er en brystkreftcellelinje, dog med melanombiologi, og forsvarer bruk av modellene som en TNBC i denne studien. Det viktige i denne studien var å ha flere modeller for CSPG4-targeting og å etablere målrettet PCI-basert behandling av celler som uttrykker CD271.

4.6 Mulige eksperimentelle feilkilder

Metodene benyttet i denne studien er beheftet med flere potensielle feilkilder som kan ha hatt innvirkning på resultatene.

4.6.1 Telling og utsåing av celler

Telling av celler i tellekammer kan forårsake feil. Dersom celleløsningen ikke er blandet godt nok og ikke er homogen kan det gi uriktig cellekonsentrasjon noe som kan forårsake feil i antall celler som ble sådd ut. Unøyaktighet hos operatøren under telleprosessen kan heller ikke utelukkes. Celler ble sådd ut ved hjelp av en multipipette og celler kan aggregere under utsåingen, noe som kan føre til varierende celletetthet per brønn. Utsåing av celler i Methocult® ved bruk av en plastikk sprøyte er en vanskelig oppgave og kan forårsake feil. I tillegg til pipettering av celler kan unøyaktighet til hver enkelt pipette ved oppmåling av medikamenter eller kjemikalier være en mulig feilkilde.

4.6.2 Beskyttelse mot lys ved arbeid med TPCS_{2a}

Alle forsøk med fotosensitizer ble utført under dempet belysning, men det kan ha inntruffet nok lys til å aktivere fotosensitizeren som kan ha påvirket resultatet. Celler som skulle ha ulike lysdoser ble sådd ut og belyst i samme brett, og det kan derfor tenkes at cellene i nabobrønner ble utsatt for mer lys enn de skulle ha fått.

4.6.3 Behandling med PCI og tillaging av immuntoksin

Ved PCI av streptavidin-saporin og tillaging av immuntoksin ble streptavidin-saporin tint og fryst noen ganger, dette kan bidra til nedsatt effekt av det ribosominaktiverende proteinet. Men, reproduksjoner som ble utført i studien ingen klare forskjeller i henhold til effektivitet.

4.6.4 MTT- versus klonogen overlevelses-assay

MTT-assayet måler viabilitet ved å benytte et substrat som modifiseres av celler med mitokondriell enzymaktivitet. Celler som er døende kan fortsatt ha en viss mitokondrieaktivitet, og derfor er varighet mellom behandling av cellene og start av cytotoxistets-assayet en viktig faktor. I tillegg blir MTT-assayet mindre sensitivt når celleantallet er lavt. Klonogen overlevelsesassayet beregner antall celler som er opphav til kolonier, og regnes som gullstandarden for bestemmelse av overlevelse *in vitro* (94). Klonogen overlevelses-assayet er begrenset til celler som har evne til å danne kolonier og er mer tidskrevende i forhold til MTT-assayet.

I denne studien har det blitt påvist best effekt ved PCI av CSPG4- og CD271-immuntoksinet ved klonogen overlevelses-assayet, spesielt for MCF-7 og MDA-MB-435 cellelinjene.

4.6.5 Cellepassasje og kultivering av cellelinjer

Eksperimentering med celler *in vitro* fordrer kontroll med passasjenummer til hver cellelinje.

Celler som oppnår konfluens eller går i for mange passasjer kan medføre forandring av fenotype. Dette ble unngått ved at celler ble omsatt før de nådde konfluens og PCI-gruppens regel om å stoppe bruken av cellelinjen ved passasje 25.

5. Konklusjon

Denne oppgaven ble utført for å evaluere målrettet behandling av cancerceller med stamcelle lignende egenskaper i brystkreft og malignt melanom. PCI ble benyttet for å øke effekten av anti-CSPG4- og anti-CD271 immuntoksiner. PCI av immuntoksinet viste seg å være en spesifikk og effektiv, cytotoxisk metode for målrettet behandling av CSPG4- og CD271-positive celler ved *in vitro* forsøk. Begge immuntoksinene viste seg å være lys-spesifikke levert ved PCI, og dette indikerer at den målrettede behandlingen ikke bare er antigen-spesifikk, men kan også begrenses ved området som belyses. Dette er den første studien som demonstrerer PCI-indusert, CD271-spesifikk cytotoxisk effekt ved bruk av ME20.4-saporin i brystkreftcellelinjer.

I følge cancer stamcelleteorien er ett av kriteriene for å definere stamcelleegenskaper, evnen til selvfornyelse. I denne studien ble det vist at CD271⁺ celler har høyere evne til å danne sfæroider enn CD271⁻ celler, og dette antyder at disse cellene har stamcellelignende egenskap som selvfornyelse.

I denne studien har PCI vist seg å være en potent metode for selektiv og effektiv behandling av kreftceller som uttrykker overflatemarkørene CSPG4 og CD271, og dette danner et viktig grunnlag for å utføre prekliniske forsøk for å behandle kreft med PCI av immuntoksiner rettet mot CSPG4 og CD271.

6. Referanser

1. kreft – behandling: Store Norske leksikon; 2012 [updated 12.01.2012; cited 30.08.2012]. Available from: <http://snl.no/kreft/behandling>.
2. Berg K, Dietze A, Kaalhus O, Hogset A. Site-specific drug delivery by photochemical internalization enhances the antitumor effect of bleomycin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005 Dec 1;11(23):8476-85.
3. Berg K, Folini M, Prasmickaite L, Selbo PK, Bonsted A, Engesaeter BO, et al. Photochemical internalization: a new tool for drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2007 Dec;8(6):362-72.
4. Prasmickaite L, Hogset A, Selbo PK, Engesaeter BO, Hellum M, Berg K. Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2002 Feb 12;86(4):652-7.
5. Selbo PK, Weyergang A, Hogset A, Norum OJ, Berstad MB, Vikdal M, et al. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010 Nov 20;148(1):2-12.
6. Alberts B JA, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P., editors. *Molecular biology of the cell*. 5 th ed. New York, NY, USA: Garland Science; 2008. Chapter 20. Cancer.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
8. Tuch BE. Stem cells--a clinical update. *Australian family physician*. 2006 Sep;35(9):719-21.
9. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research*. 2006 Oct 1;66(19):9339-44.
10. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *The New England journal of medicine*. 2006 Sep 21;355(12):1253-61.

11. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
12. Shigdar S, Lin J, Li Y, Yang CJ, Wei M, Zhus Y, et al. Cancer stem cell targeting: the next generation of cancer therapy and molecular imaging. *Therapeutic delivery*. 2012 Feb;3(2):227-44.
13. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8.
14. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*. 2011 Mar;17(3):313-9.
15. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell*. 2012 Mar 20;21(3):283-96.
16. Gucalp A, Traina TA. Triple-negative breast cancer: adjuvant therapeutic options. *Chemotherapy research and practice*. 2011;2011:696208.
17. Breast cancer A.D.A.M. *Medical Encyclopedia: PubMed Health*; 2011 [cited 15.11.2012]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0001911/>.
18. Metastatic breast cancer: *Wikipedia*; 2012 [cited 15.11.2012]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Metastatic_breast_cancer.
19. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *Journal of clinical pathology*. 2011 Nov;64(11):937-46.
20. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Jul;121(7):2750-67.

21. Breast Cancer Treatment: Triple-Negative Breast Cancer Online: National Cancer Institute 2012 [updated 29.10.12; cited 29.10.2012]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/healthprofessional/page8>.
22. Idowu MO, Kmiecik M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, et al. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Human pathology*. 2012 Mar;43(3):364-73.
23. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(2):R25.
24. Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, et al. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PloS one*. 2009;4(12):e8377.
25. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010 Jan 1;16(1):45-55.
26. Skin cancer incidence statistics: Cancer Research UK; 2011 [updated 22.07.11; cited 02.04.2013]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/skin/incidence/>.
27. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2006 Jul 6;355(1):51-65.
28. Geller AC, Swetter SM, Brooks K, Demierre MF, Yaroch AL. Screening, early detection, and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2007 Oct;57(4):555-72; quiz 73-6.
29. hudkreft: Store Norske leksikon; 2013 [updated 28.02.13; cited 02.04.2013]. Available from: http://snl.no/.sml_artikkel/hudkreft
30. Tuong W, Cheng LS, Armstrong AW. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatologic clinics*. 2012 Jan;30(1):113-24, ix.

31. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):851-7.
32. Melanoma Treatment: Treatment Option Overview Online: National Cancer Institute; 2012 [cited 05.04.2013]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/HealthProfessional/page4>.
33. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer research*. 2005 Oct 15;65(20):9328-37.
34. Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2011 May;91(5):647-64.
35. Civenni G, Walter A, Kobert N, Mihic-Probst D, Zipser M, Belloni B, et al. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer research*. 2011 Apr 15;71(8):3098-109.
36. Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*. 2010 Jul 1;466(7302):133-7.
37. Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer cell*. 2010 Nov 16;18(5):510-23.
38. Held MA, Curley DP, Dankort D, McMahon M, Muthusamy V, Bosenberg MW. Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell. *Cancer research*. 2010 Jan 1;70(1):388-97.
39. Shakhova O, Sommer L. Testing the cancer stem cell hypothesis in melanoma: The clinics will tell. *Cancer letters*. 2012 Oct 13.
40. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature reviews Cancer*. 2001 Nov;1(2):118-29.

41. Price MA, Colvin Wanshura LE, Yang J, Carlson J, Xiang B, Li G, et al. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2011 Dec;24(6):1148-57.
42. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.
43. Wang X, Osada T, Wang Y, Yu L, Sakakura K, Katayama A, et al. CSPG4 protein as a new target for the antibody-based immunotherapy of triple-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010 Oct 6;102(19):1496-512.
44. Campoli M, Ferrone S, Wang X. Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Advances in cancer research*. 2010;109:73-121.
45. Underwood CK, Coulson EJ. The p75 neurotrophin receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(9):1664-8.
46. Rogers ML, Beare A, Zola H, Rush RA. CD 271 (P75 neurotrophin receptor). *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2008 Jan-Mar;22(1):1-6.
47. Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N, et al. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011 Apr 1;17(7):1741-52.
48. Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene*. 2003 Aug 28;22(36):5592-601.
49. Descamps S, Pawlowski V, Revillion F, Hornez L, Hebbar M, Boilly B, et al. Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer research*. 2001 Jun 1;61(11):4337-40.
50. Kim J, Villadsen R, Sorlie T, Fogh L, Gronlund SZ, Fridriksdottir AJ, et al. Tumor initiating but differentiated luminal-like breast cancer cells are highly invasive in the absence of basal-like activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Apr 17;109(16):6124-9.

51. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998 Jun 17;90(12):889-905.
52. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003 May;3(5):380-7.
53. MacDonald IJ, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2001;5:105-29.
54. Berg K, Nordstrand S, Selbo PK, Tran DT, Angell-Petersen E, Hogset A. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2011 Oct;10(10):1637-51.
55. Henderson BW, Bellnier DA. Tissue localization of photosensitizers and the mechanism of photodynamic tissue destruction. *Ciba Foundation symposium*. 1989;146:112-25; discussion 25-30.
56. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology*. 2004 Aug;5(8):497-508.
57. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011 Jul-Aug;61(4):250-81.
58. Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Tjelle TE, Sandvig K, Moan J, et al. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer research*. 1999 Mar 15;59(6):1180-3.
59. Head and Neck cancer: Amphinex® in combination with bleomycin, Head & Neck cancer: PCI Biotech; [cited 07.05.13]. Available from: <http://www.pcibiotech.no/content/head-and-neck-cancer>.
60. Weyergang A, Selbo PK, Berstad ME, Bostad M, Berg K. Photochemical internalization of tumor-targeted protein toxins. *Lasers in surgery and medicine*. 2011 Sep;43(7):721-33.

61. Stirpe F, Battelli MG. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006 Aug;63(16):1850-66.
62. Lai PS, Pai CL, Peng CL, Shieh MJ, Berg K, Lou PJ. Enhanced cytotoxicity of saporin by polyamidoamine dendrimer conjugation and photochemical internalization. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008 Oct;87(1):147-55.
63. Puri M, Kaur I, Perugini MA, Gupta RC. Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug discovery today*. 2012 Jul;17(13-14):774-83.
64. Lea T. *Immunologi og immunologiske teknikker*. Bergen: Fagbokforl.; 2006. 400 s.
65. Liu XY, Pop LM, Vitetta ES. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunological reviews*. 2008 Apr;222:9-27.
66. Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature reviews Drug discovery*. 2003 Jan;2(1):52-62.
67. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *The AAPS journal*. 2006;8(3):E532-51.
68. Madhumathi J, Verma RS. Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins. *Current opinion in microbiology*. 2012 Jun;15(3):300-9.
69. Immunotoxin: Brookscoble.com; [cited 08.04. 13]. Available from: http://www.brookscoble.com/chemistry_d/templates/student_resources/0030973694_garrettgrisham/images/hottopics/Immunotoxin.gif.
70. Rihova B. Receptor-mediated targeted drug or toxin delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 1998 Feb 2;29(3):273-89.
71. Chambers AF. MDA-MB-435 and M14 cell lines: identical but not M14 melanoma? *Cancer research*. 2009 Jul 1;69(13):5292-3.
72. Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeberg J, Uhlen M. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*. 2005 Feb;26(3):501-10.
73. Meerloo J, GJL. K, J. C. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: IA C, editor. *Methods in Molecular Biology. Cancer Cell Culture*: Humana Press; 2011. p. 237-45.

74. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006;1(5):2315-9.
75. Herman B. *Fluorescence Microscopy*. 2001. *Current Protocols in Cell Biology*: John Wiley and Sons; [4.5.1-4.5.12].
76. Fluorescence microscope: Wikipedia; 2013 [cited 25.03.2013]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope.
77. Smith CL. *Basic Confocal Microscopy*. 2008. In: *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons.
78. Molecular Probes Inc. *LysoTracker and LysoSensor probes 2007* [cited 02.05.2013]. Available from: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp07525.pdf>.
79. flowcytometri: Store norske leksikon; 2011 [cited 07.12.2012]. Available from: http://snl.no/.sml_artikkel/flowcytometri.
80. Dean PN, Hoffman RA. Overview of Flow Cytometri Instrumentation. 2007. In: *Current Protocols in Cytometry*: John Wiley & Sons.
81. Fluorescence activated cell sorting of live cells: abcam®; [cited 25.03.2013]. Available from: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=12803>.
82. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. In: *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan. 2001 May;Appendix 3:Appendix 3B.
83. Prasmickaite L, Skrbo N, Hoifodt HK, Suo Z, Engebraten O, Gullestad HP, et al. Human malignant melanoma harbours a large fraction of highly clonogenic cells that do not express markers associated with cancer stem cells. *Pigment cell & melanoma research*. 2010 Jun;23(3):449-51.
84. Sigma-Aldrich. *Accutase solution 2012* [cited 02.04.2013]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6964?lang=en®ion=NO>.
85. Bajpai R, Lesperance J, Kim M, Terskikh AV. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Molecular reproduction and development*. 2008 May;75(5):818-27.

86. Thermo Scientific. Accutase™: Cell Detachment Solution 2005 [cited 02.04.2013]. Available from:
http://www.thermo.com.cn/Resources/200802/productPDF_26369.pdf.
87. Hogset A, Prasmickaite L, Selbo PK, Hellum M, Engesaeter BO, Bonsted A, et al. Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2004 Jan 13;56(1):95-115.
88. Selbo PK, Brustad T, Voss T, Moan J, Berg K. In-situ localization of a photosensitizer as evaluated by vital microscopy. *SPIE Proceedings*. 1997:25-32.
89. Selbo PK, Sandvig K, Kirveliene V, Berg K. Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization. *Biochimica et biophysica acta*. 2000 Jul 26;1475(3):307-13.
90. Weyergang A, Selbo PK, Berg K. Y1068 phosphorylation is the most sensitive target of disulfonated tetraphenylporphyrin-based photodynamic therapy on epidermal growth factor receptor. *Biochemical pharmacology*. 2007 Jul 15;74(2):226-35.
91. Weyergang A, Selbo PK, Berg K. Photochemically stimulated drug delivery increases the cytotoxicity and specificity of EGF-saporin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006 Mar 10;111(1-2):165-73.
92. Rae JM, Creighton CJ, Meck JM, Haddad BR, Johnson MD. MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells--a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast cancer research and treatment*. 2007 Jul;104(1):13-9.
93. Wang X, Katayama A, Wang Y, Yu L, Favoino E, Sakakura K, et al. Functional characterization of an scFv-Fc antibody that immunotherapeutically targets the common cancer cell surface proteoglycan CSPG4. *Cancer research*. 2011 Dec 15;71(24):7410-22.
94. Komissarova EV, Saha SK, Rossman TG. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005 Jan 1;202(1):99-107.

Vedlegg A

Prosedyrer

A.1 Cellekultur og behandlinger

A.1.1 Ta opp celler

1. Forvarm cellemedium
2. Cellene blir tatt opp fra fryseren og transporteres på is.
3. Røret med celler settes i vannbadet (37 °C) for at de skal tine raskt.
4. Røret med celler sentrifugeres i 3 minutter ved 3000 RPMI slik at DMSO kan fjernes fra cellene.
5. 20 ml medium fylles i en T₇₅ flaske.
6. Cellene overføres til flasken så raskt som mulig.
7. Cellene settes i varmeskap, slik at de kan feste seg. Medium byttes innen 24 timer.

A.1.2 Fryse ned celler

1. Celler trypsineres og sentrifugeres. Pelleten løses i en løsning av medium og FCS i forholdet 1:1. Bland 5 ml medium med 5 ml FCS. Det bør helst være 5-6 millioner celler per fryserør. Det er lurt å ha 4 stk T₁₇₅ flasker som er 80 % konfluente.
2. Lag 20 % DMSO-løsning i medium ved å blande 2 ml DMSO+8 ml medium. Tilsett deretter 20 % DMSO løsningen, løsningen må tilsettes gradvis.
3. Fordel cellene i sterile fryserør med skrukork.
4. La rørene stå noen minutter på benken for å omstille seg.
5. Frys ned i -80 °C fryseren i minimum 30 minutter (maks 6 måneder).
6. Cellene fryses til slutt ned i nitrogentanken.

Tiden for preparering fra punkt 2-4 skal ikke overstige 15 minutter.

A.1.3 Prosedyre for splitting av celler

I T₇₅-flasker:

1. Forvarm medium, trypsin/EDTA og PBS til 37°C.
2. Sug av medium og tilsett ~2ml PBS langs monolaget. Vipp litt på flasken så hele monolaget blir vasket.
3. Sug av PBS og tilsett ~2ml trypsin. Vipp på flasken slik at hele monolaget kommer i kontakt med løsningen.

4. Sett flasken i inkubatorskap 1-6 min avhengig av cellelinje. Dunk på flasken slik at cellene løsner. Sjekk gjerne i mikroskop.
5. Tilsett ~8 ml medium. Sug opp og "flush" cellene mot flaskeveggen med en 10 ml engangspipette.
6. Tilsett 18ml medium i ny T₇₅-flaske og overfør ønsket mengde cellesuspensjon. (Dette avhenger av celletype.)

A.1.4 Telle celler til utsåing

1. Trypsiner flasken som vanlig, og overfør celleløsningen til et 50 ml rør.
2. Overfør en homogen celleløsning til bürkerkammeret.
3. Tellekammeret er delt inn i 9 store ruter, som videre er delt i 9 mindre ruter. Tell celler i 3 store ruter.
4. Multipliser antallet med 10000 og divider på 3 for å finne konsentrasjon av celler per ml.

A.1.5 PCI

For inkubering i 96 brønners brett:

1. Dag 1: Trypsiner celler, tell og fortyynn celleløsningen. Så ut 100 µl suspensjon i hver brønn, og la feste til dagen etter.
2. Dag 2: Sug av medium og tilsett 50 µl medium med fotosensitizer, streptavidin-saporin og immuntoksinet til hver brønn. Inkuber over natt i 18 timer.
3. Dag 3: Vask to ganger med 100 µl medium og inkuber ("chase") i 4 timer. Belys deretter brettene.
4. Dag 4 eller dag 7 (avhengig av cellelinje): Utfør overlevelsesassay.

Antigen blokkering i 6-brønnersbrett

1. Dag 1: Trypsiner celler, tell og fortyynn celleløsningen. Så ut 2000 µl suspensjon i hver brønn, og la feste til dagen etter.
2. Dag 2: Sug av medium, og tilsett 20x ukonjugert anti- CD271 antistoff og inkuber i 30 minutter slik at reseptoren blir blokkert.
3. Tilsett deretter PS og immuntoksinet direkte i brønnen, uten å suge av mediumet. Inkuber i 18 timer.
4. Dag 3: Vask 2 ganger med 1000 µl medium og inkuber med 2000 µl medium ("chase") i 4 timer.

5. Belys brettene i ønsket tidsperiode.
6. Utfør klonogen overlevelsesassay etter 9-14 dager.

A.2 Overlevelses-assay

A.2.1 MTT

1. Fortynn 5 mg/ml MTT løsning i medium til en konsentrasjon på 0,25 mg/ml.
2. Sug av medium og tilsett 50 µl MTT-løsning til hver brønn. For hver plate tilsettes det MTT-løsning til 8 tomme brønner (blank).
3. Inkuber brettene i 2-4 timer ved 37 °C.
4. Sug av MTT-løsningen og tilsett 100 µl DMSO.
5. Sett brettene på ristebrett i 5-10 minutter slik at formazon krystallene kan løses opp.
6. Mål absorbansen ved 570 nm.

A.2.2 Klonogen overlevelse

1. Cellene gis ønsket behandling i 6 brønners Brett.
2. Etter endt behandling inkuberes cellene med 2 ml medium ved 37 °C. Medium skiftes to ganger per uke.
3. 7-14 dager etter behandling (eller når koloniene er tellbare), sug av medium og vask med 1 ml 9mg/ml NaCl.
4. Fikser koloniene med absolutt alkohol i ca. 10 minutter.
5. Sug av absolutt alkohol og tilsett 1 ml fortynnet metylblått- løsning i ca. 5 minutter.
6. Brønnene vaskes forsiktig under springen og settes til lufttørking.
7. Tell koloniene manuelt og ekskluder kolonier som har mindre enn 50 celler.

A.3 Immuntoksin

Molar ratio mellom streptavidin-saporin og biotinyleret antistoff bør være 1:4. For å lage en 200 nM stock-løsning benyttes følgende oppskrift:

1. Bland 9,85 µl Streptavidin-ZAP 1,3 mg/ml, 10,7 µl 225.28-biotin (Biotinyleret-CSPG4) 5,6 mg/ml og 479,45 µl PBS.
2. Vortex løsningen og la stå i minimum 20 minutter.
3. Fordel løsningen i alikvoter på 50 µl og frys ned ved - 20 °C.

A.4 Fluorescens mikroskopi

A.4.1 TPCS_{2a} og LysoTracker

1. Dag 1: Trypsiner celler, tell og fortynn celleløsningen. Så ut 50000-100000 celler/brønn i 4-brønnerbrett med coverslips.
2. Dag 2 eller 3: Tilsett 1 µg/ml TPCS_{2a} i medium.
3. Inkuber ved 37 °C over natt.
4. Vask 2 ganger med medium og inkuber ("chase") i 4 timer.
5. Tilsett 0,1 µM grønn LysoTracker i medium 1 time før mikroskopering.
6. Vask 2 ganger i iskald PBS (Ca²⁺, Mg²⁺), og overfør coverslipsen til et objektglass. Overflødig væske ble tørket bort med filterpapir.

A.4.2 TPCS_{2a} og CD271- Alexa Fluor® 488

1. Lag en løsning av CD271- Alexa Fluor® 488 ved å blande 10 µl biotinyleret ab CD271 0,011 mg/ml og 1 µl streptavidin-Alexa Fluor® 488 2 mg/ml i 1 ml medium. Vortex og inkuber løsningen i 10 minutter.
2. Så ut celler og la cellene feste seg over natt.
3. Dag 2 eller 3: Tilsett 1 µg/ml TPCS_{2a} i medium og 200 µl av CD271- Alexa Fluor 488 løsningen.
4. Inkuber over natt ved 37 °C.
5. Vask 2 ganger med medium og inkuber ("chase") i 4 timer.
6. Vask 2 ganger i iskald PBS.

4 timer inkubering med antigen blokkering

1. Dag 1: Trypsiner celler, tell og fortynn celleløsningen. Så ut 50000-100000 celler/brønn i 4-brønnerbrett med coverslips.
2. Dag 2 eller 3: Tilsett 1 µg/ml TPCS_{2a} i medium.
3. Inkuber ved 37 °C over natt.
4. Vask 2 ganger med medium, og tilsett 100x ukonjugert anti- CD271 antistoff i 200 µl medium. Inkuber i 30 minutter.
5. Tilsett CD271- Alexa Fluor® 488 løsningen direkte i brønnen uten å suge av mediumet med antigen blokkering.
6. Inkuber i 4 timer før mikroskopering.
7. Vask 2 ganger i iskald PBS.

A.5 Merke celler til flowcytometri

1. Vask monolaget med PBS, og tilsett 3 ml Accutase™ /EDTA-løsning og vent til cellene løsner.
2. Overfør cellene til et sentrifugerør, og sentrifuger ved 350 g i 3 minutter.
3. Følgende bør utføres på is:
Resuspender i 250 µl iskald 10 % FBS i PBS.
4. Overfør 100 µl til hver flowrør.
5. Prøver som ikke skal merkes, settes i kjøleskap.

For CSPG4 merking:

6. Tilsett 10 µl av primært antistoff (CSPG4—biotinyler) (100 µg/ml).
7. Inkuber i kjøleskap 2-8 °C) i ca. 30 minutter.
8. Vask 3 ganger med iskald 10 % FBS i PBS (Sentrifuger ved 350 g i 3 minutter mellom hver vask)
9. Resuspender i 100 µl streptavidin-Alexa Fluor® 488 (4 µg/ml i PBS).
10. Inkuber i ca. 20 minutter i kjøleskap.

For CD271 merking:

6. Tilsett 5 µl av CD271-PE merket antistoff.
7. Inkuber i 30 minutter
11. Vask 3 ganger med iskald 10 % FBS i PBS.
12. Resuspender i 500 µl iskald 10 % FBS i PBS, og filtrer celleduspensjonen i flowrør for analyse.

A.6 Sfæroide dannelse i Methocult

En suspensjon av human embryonal stamcellemedium (HESCM) i Methocult® H4100 må lages før denne prosedyren.

1. Merk celler med anti-CD271- PE merket antistoff til flowcytometri som ved vanlig prosedyre. Bruk medium i stedet for PBS og utfør inkuberingene i romtemperatur. Lever celleduspensjonen til kjernefasiliteten for flowcytometri, slik at cellene kan separeres ved FACS i lav uttrykk CD271. høy uttrykk CD271 og bulk populasjoner.
2. Varm opp alikvotene av Methocult til 37 °C.

3. Etter at cellene er sortert ferdig, bland 2 μ l trypanblått med 8 μ l cellesuspensjon. Tell ufarget (levende) celler og bestem konsentrasjonen av levende celler ved hjelp av tellekammeret.
4. Overfør 2000 levende celler til en alikvote på 3 ml Methocult.
5. Vortex og vent til boblene forsvinner.
6. Bruk en sprøyte på 2 ml/ 16 G nål til å overføre 1,5 ml Methocult løsning til en brønn i en 6-brønnersbrett med "ultra low attachment".
7. Fyll alle brønnene med Methocult løsning.
8. Tilsett 300 μ l stamcellemedium til brønnene ca. 1 gang i uka.
9. Etter 5-6 uker, farg sfæroidene med 0,5 mg/ml MTT løsning og les av med GelCounter.

Vedlegg B

Utstyr og leverandører

Utstyr	Leverandør
Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate	Molecular Probes, Eugene, Orgeon, USA
DMSO, dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
Accutase™	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
Glutamin	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
MTT-løsning	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
PBS, phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
Penicillin-streptomycin	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
RPMI 1640 vekstmedium	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-løsning (1x)	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
EDTA disodium pulver	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
Insulin	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
Hydrokortison	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
Ham's F12 nutrient mixture vekstmedium	Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA
Strep-ZAP, Streptavidin-saporin	Advanced Targeting Systems (ATS), San Diego, CA, USA
ME20.4-SAP	Advanced Targeting Systems (ATS), San Diego, CA, USA
Føkalt kalveserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Østerrike

MEM with Earle`s salts vekstmedium	PAA Laboratories, Pasching, Østerrike
Cellelinjene MCF-7, MDA-MB-231 og MDA-MB-435	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
Absolutt alkohol	Kemetyl Norge AS, Vestby, Norge
75 cm ² vevskulturflasker	Nunclon, Nunc™, Roskilde, Danmark
Nunc 96-, 4- og 6-brønnersbrett	Nunclon, Nunc™, Roskilde, Danmark
6-brønnersbrett fra Costar® med ultra lav affinitet	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
Engangstellekammer i plastikk	HYCOR Biomedical Inc, CA, USA
Disulfonert meso-tetrafenyl-chlorin (TPCS _{2a})	Amphinex™, PCI Biotech ASA, Lysaker, Norge
LumiSource® lampe	PCI Biotech ASA, Lysaker, Norge
PE- CD271	Miltenyi Biotec (MACS), Bergisch Gladbach, Tyskland
Biotin-CD271	Miltenyi Biotec (MACS), Bergisch Gladbach, Tyskland
0,9 % NaCl	Fresenius Kabi, Halden, Norge
Methocult® H4100	Technologies SARL, Grenoble, Frankrike
Objektglass	(Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Tyskland
Zeiss Axio mikroskop	Zeiss. Obercochen, Tyskland
Zeiss LSM 780-710 konfokal mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Tyskland

