

Fotokjemisk Internalisering (PCI) av HER2-rettet immunotoksin; trastuzumab-saporin

Masteroppgave i galenisk farmasi

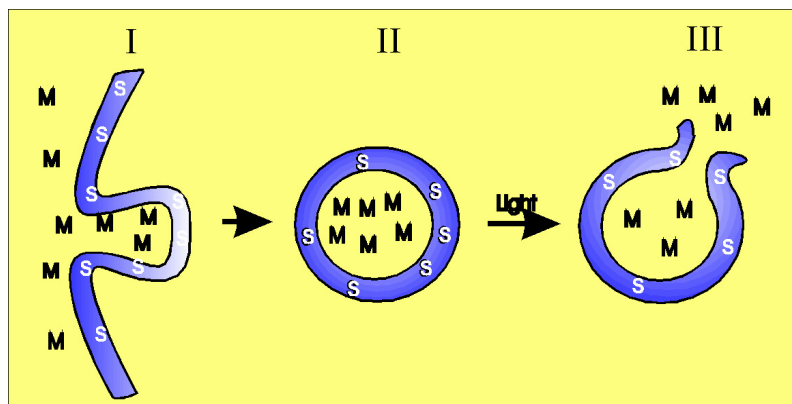
av

Maria Elisabeth Brandal Berstad

Senter for farmasi

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Bergen



Avdeling for strålingsbiologi

Institutt for kreftforskning

Rikshospitalet HF, avd. Radiumhospitalet

Oslo, Mai 2009

FORORD

Denne masteroppgaven ble utarbeidet i perioden august 2008 - mai 2009 ved Avd. for strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning, Radiumhospitalet. Oppgaven er siste del av det femårige profesjonsstudiet i farmasi ved Universitetet i Bergen. Å jobbe med oppgaven har vært en utfordrende og lærerik erfaring. Det har økt min interesse for forskning og gitt meg et større innblikk i bredden av jobbmuligheter for farmasøyer.

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til mine to veiledere, Dr. Kristian Berg og Dr. Anette Weyergang, for et interessant prosjekt og for trygg og god oppfølging. Takk for deres store engasjement og kompetanse, og deres interesse for å gjøre prosjektet best mulig. Dere har vist meg tillit til å jobbe selvstendig, men samtidig vært tilgjengelige når jeg har trengt hjelp. Denne måten å jobbe på har jeg lært mye av.

Takk til Marie-Therese Strand Larsen for opplæring i det praktiske arbeidet, en hjelpende hånd og fine stunder på kontoret. Takk til Dr. Pål Kristian Selbo for veiledning med mikroskoperingen.

Det har vært en glede å få være en del av både det sosiale og faglige miljøet i PCI-gruppa. Dere er en herlig gjeng som jeg har trivdes sammen med helt fra første stund og rukket å bli veldig glad i. Maalim og Monica; det har vært godt å ha noen i samme situasjon og året hadde definitivt ikke blitt det samme uten dere! Takk også til alle andre på avdelingen som har bidratt til et godt og varmt arbeidsmiljø.

Takk til familie og venner for omsorg og støtte. Takk til kjære Einar som stadig har oppmuntret meg og hjulpet meg til å koble av.

En takk rettes også til Svein Haavik, min interne veileder ved Det matematiske naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Bergen

Norske Radiumhospital, Oslo, 10.mai 2009

INNHold

FORKORTELSER.....	9
HENSIKTEN MED OPPGAVEN.....	11
KAPITTEL 1: INNLEDNING.....	12
1.1 Fotodynamisk Terapi (PDT).....	12
1.1.1 Fotosensitive forbindelser og fotoreaksjoner.....	12
1.1.2 Selektivitet av PDT	16
1.1.3 Terapeutiske effekter av PDT på tumorvev.....	20
1.1.4 Klinisk nytte av PDT.....	23
1.2 Fotokjemisk Internalisering (PCI)	24
1.2.1 Prinsipper bak PCI	24
1.2.2 To strategier for legemiddellevering med PCI: ”Lys før” eller ”Lys etter” 26	
1.2.3 Fotosensitizere brukt i PCI	27
1.2.4 Terapeutisk potensiale av PCI	29
1.3 Epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR) familien	30
1.3.1 Aktivering av EGF-reseptorene	31
1.3.2 Intracellulære signalveier.....	32
1.3.3 Terminering av EGFR/HER signalisering.....	34
1.3.4 EGF-reseptorenes rolle i kreft.....	34
1.3.5 EGFR-familien som mål i kreftterapi.....	36
1.4 Immunotoksiner	40
1.4.1 Plantetoksiner.....	40
1.4.2 Terapeutiske immunotoksiner.....	42
KAPITTEL 2: MATERIALER OG METODER	46
2.1 Cellelinjer og dyrkningsmedium	46
2.2 Standardprosedyrer	47
2.2.1 Omsetting av celler.....	47
2.2.2 Telling av celler.....	47
2.2.3 Utsåing av celler.....	48

2.3 PDT og PCI in vitro.....	48
2.3.1 Lyskilde og fotosensitizer	48
2.3.2 Prinsipp for behandling av celler med PDT.....	49
2.3.3 Prinsipp for behandling av celler med PCI.....	49
2.4 Viabilitetsmåling med MTT-assay.....	50
2.4.1 Prinsipp for MTT-metoden.....	50
2.4.2 Prosedyre for behandling av celler med PDT	51
2.4.3 Prosedyre for behandling av celler med PCI	51
2.4.4 Prosedyre for MTT-assay	52
2.5 Tillaging av trastuzumab-saporin immunotoksin.....	53
2.5.1 Biotinylering av Trastuzumab.....	54
2.5.2 Prosedyre for biotinylering av trastuzumab.....	55
2.5.3 Rensing av biotin-trastuzumab ved gelfiltrasjonskromatografi	55
2.5.4 Kvantifisering av biotinylert trastuzumab	56
2.5.5 Kompleksering av biotinylert Trastuzumab til Streptavidin-Saporin	57
2.5.6 Blokkering av HER2 med trastuzumab før PCI av trastuzumab-saporin... 58	
2.6 Western blotting.....	58
2.6.1 Prøveopparbeidelse	59
2.6.2 Spektrofotometrisk bestemmelse av relativ proteinmengde i prøvene	60
2.6.3 Gelelektroforese (SDS-PAGE)	61
2.6.4 Overføring av proteiner til membran (blotting)	63
2.6.5 Inkubering med antistoffer.....	64
2.6.6 Inkubasjon med chemiluminescent substrat og analyse av membran.....	66
2.7 Fluorescensmikroskopi	66
2.7.1 Intracellulær lokalisering av TPCS _{2a}	67
2.7.2 Intracellulært opptak av trastuzumab etter PCI behandling ("lys før").....	68
KAPITTEL 3: RESULTATER.....	71
3.1 Ekspresjon av HER2 og EGFR i ulike cellelinjer	71
3.1.1 Ekspresjon av HER2	71
3.1.2 Ekspresjon av EGFR	72
3.2 Etablering av tetthetskurver for ubehandlede celler	72
3.2.1 Celletetthetskurve for Zr-75-1 celler.....	73
3.2.2 Celletetthetskurve for MDA-MB231 celler.....	73

3.3	Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}	74
3.3.1	Lokalisering av TPCS _{2a} i Zr-75-1 celler.....	74
3.3.2	Lokalisering av TPCS _{2a} i MDA-MB231 celler.....	75
3.4	PDT med TPCS_{2a}	76
3.5	PCI av saporin	77
3.5.1	PCI av saporin med ”lys etter” – strategi i Zr-75-1 celler	78
3.5.2	PCI av saporin med ”lys etter” – strategi i MDA-MB231 celler	78
3.6	Etablering av trastuzumab-saporin immunotoksin	79
3.6.1	Gelfiltrasjonskromatografi av biotinyleret trastuzumab	79
3.6.2	Kvantitativ bestemmelse av biotinyleret trastuzumab	80
3.8	Cytotoksiske effekter av streptavidin-saporin	82
3.8.1	PCI av saporin og streptavidin-saporin i Zr-75-1 celler	82
3.8.2	PCI av saporin og streptavidin-saporin i MDA-MB231 celler.....	83
3.9	Studier av immunotoksinet trastuzumab-saporin	83
3.9.1	Cytotoksiske effekter av trastuzumab-saporin i Zr-75-1 celler	84
3.9.2	PCI av trastuzumab-saporin i HER2-positive Zr-75-1 celler	84
3.9.3	PCI av trastuzumab-saporin i HER2-negative MDA-MB231 celler	85
3.9.4	PCI av trastuzumab-saporin i Zr-75-1 celler etter blokkering av HER2 med fritt trastuzumab	86
3.9.5	PCI av trastuzumab-saporin med ”lys først” – prinsippet	87
3.10	Fotokjemisk skade på HER2 og EGFR etter PDT	88
3.10.1	Fotokjemisk skade på HE2 i Zr-75-1 celler etter PDT.....	89
3.10.2	Fotokjemisk skade på EGFR i MDA-MB231 celler etter PDT	90
3.11	Fluorescensmikroskopi av trastuzumab-opptak ved PCI med ”lys først”. 92	
KAPITTEL 4: DISKUSJON		94
4.1	HER2-målrettet behandling	94
4.2	Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}	95
4.2.1	Konsekvenser av lokalisering av PS på plasmamembranen for PCI	95
4.3	Cytotoksiske effekter av PDT og PCI av saporin i Zr-75-1 og MDA-MB231 celler	96
4.4	Cytotoksiske effekter av streptavidin-saporin	97
4.5	Studier av immunotoksinet trastuzumab-saporin	98
4.5.1	PCI av trastuzumab-saporin.....	98

4.5.2	HER2-spesifisitet av trastuzumab-saporin	98
4.6	Sammenligning av PCI med ”Lys før” og ”lys etter” strategi.....	99
4.6.1	Fotokjemisk skade av EGFR og HER2 etter PDT	99
4.6.2	Opptak av trastuzumab-saporin etter fotokjemisk behandling	100
4.7	Potensielle fordeler og begrensninger ved behandling av brystkreft med PCI av trastuzumab-saporin.....	101
4.8	Ekperimentelle feilkilder	102
4.8.1	Telling og utsåing av celler.....	102
4.8.2	Beskyttelse mot lys ved arbeid med TPCS _{2a}	102
4.8.3	Etablering av immunotoksinet trastuzumab-saporin.....	103
4.8.4	MTT-assay vs. Klonogen overlevelse-assay	103
KAPITTEL 5: REFERANSER.....		104
APPENDIKS		114

FORKORTELSER

ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
5-ALA	5-aminolevulinsyre
AlPcS _{2a}	disulfonert aluminiumftalocyanin med sulfonatgruppene på sidestilte ftalater
AlPcS ₄	tetrasulfonert aluminiumftalocyanin
AMD	aldersrelatert makulær degenerasjon
APS	ammonium persulfate
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BSA	bovine serum albumin
CD4/CD8	cluster of differentiation 4/ cluster of differentiation 8
CDC	complement-dependent cytotoxicity
CHS	contact hypersensitivity
dH ₂ O	destillert vann
DLI	drug-light interval
DMSO	dimetyl sulfoksid
DTH	delayed type hypersensitivity
EC ₅₀	median effektiv konsentrasjon (induserer 50 % effekt)
EDTA	etylendiamintetraacetat
EF	elongation factor
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	ekstracellulært signalregulerte kinaser
Fc	fragment crystallizable
Fv	fragment variable
GDP	guanosin difosfat
GTP	guanosin trifosfat
H ₂ O ₂	hydrogenperoksid
HABA	4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
HAMA	human anti-mouse antibody
HDL	high density lipoprotein
HER	human epidermal growth factor receptor
HPD	hematoporfyrin derivate
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
IL	interleukin
IT	immunotoksin
Jak	janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	kilodalton
LAF	laminar air flow
LC ₅₀	median letal konsentrasjon (induserer 50 % drap)
LDL	low density lipoprotein
mAb	monoklonalt antistoff
M-ALA	metyl 5-aminolevulinate

MAPK	mitogenaktivert protein kinase
MHC II	major histocompatibility class II
MOC31	antistoff mot human pancarsinoma-assosiated epithelial glycoprotein
mTHPC	tetra(<i>meta</i> -hydroksyfenyl)klorin
MTT	3-[4,5-dimetyltiazol-2-y]-2,5-difenyltetrazolium bromide
MW	molekylvekt
O ₂ ⁻	superoksid anion
¹ O ₂	singlett oksygen
³ O ₂	molekylært oksygen
OH [·]	hydroksylradikal
PAP	pokeweed antiviral protein
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	fosfat bufret saline
PCI	fotokjemisk internalisering
PDT	fotodynamisk terapi
PEG	polyetylen glykol
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinase
PKC	protein kinase C
PS	fotosensitizer
PTB	fosfotyrosinbindende
PVDF	polyvinylidene difluoride
RIP	ribosominaktiverende protein
ROS	reaktive oksygenforbindelser
SD	standard deviation (standardavvik)
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamid gelelektroforese
SH2	Src Homology 2
STAT	signal transducers and activators of transcription
NHS	N-hydroxysuccinimide
TEMED	tetrametyletylendiamin
TGF- α	transforming growth factor alpha
3THPP	tetra(3-hydroksyfenyl)porfyrin
TKI	tyrosinkinasehemmer
TPCS _{2a}	disulfonert tetrafenylklorin med sulfonatgruppene på sidestilte fenyrlinger
TPPS _{2a}	disulfonert meso-tetrafenylporfin med sulfonatgruppene på sidestilte fenyrlinger
TPPS ₄	tetrasulfonert meso-tetrafenylporfin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLS	vascular leak syndrome

HENSIKTEN MED OPPGAVEN

Kreft er en sykdom de fleste vil berøres av i løpet av livet, enten som pårørende eller ved at de selv rammes av sykdommen. I Norge vil hele 1 av 3 få kreft, og rundt 174 000 personer lever med en kreftdiagnose. Kreft karakteriseres av celler i ukontrollert vekst, og dette i kombinasjonen med invasjon av nytt vev gjør dem potensielt letale [1]. Dagens kreftbehandling består hovedsakelig av kirurgi, stråling og kjemoterapi. Tradisjonelle kjemoterapeutika (cytostatika) er i stor grad basert på hemming av proliferasjon og induksjon av celledød som følge av skade på DNA. Begrensninger i behandlingens selektivitet er generelt et problem ved at toksisiteten også rammer normale celler. Dette gir utslag i bivirkninger, som skader på normalvev (f.eks lever), dose-begrensende toksisitet (f.eks leverenzymmer i blod) håravfall, kvalme og brekninger, smerter etc. En måte å øke selektiviteten av kreftbehandling på er å utnytte egenskaper hos kreftcellene som skiller dem fra normale celler.

Moderne legemidler, som tyrosinkinasehemmere og monoklonale antistoffer, tilbyr en mer målrettet kreftbehandling sammenlignet med konvensjonell krefterapi. Disse har bidratt til fremskritt i behandling av utbredte krefttyper som brystkreft, lungekreft og tykktarmskreft. En begrensning for terapeutisk nytte av makromolekyler som utøver sin effekt intracellulært er at de etter opptak ved endocytose degraderes lysosomalt før de når sitt terapeutiske mål i cytosol. Fotokjemisk internalisering (PCI) er en ny metode for levering av terapeutiske molekyler fra endocytiske vesikler til cytosol. Metoden er basert på lysdirigert aktivering av fotosensitive forbindelser (fotosensitizer) lokalisert i membranen av endocytiske vesikler. Aktiveringen genererer fotokjemiske reaksjoner som fører til skade på endosom/lysosommembranen slik at de endocyterte molekylerne frigjøres til cytosol. Målet med oppgaven er å lage et målrettet immunotoksin mot HER2, en reseptor som er overuttrykket i en rekke krefttyper, for så å teste dette for levering med PCI. Immunotoksinet lages ved å kombinere det anti-HER2 antistoffet trastuzumab og plantetoksinet saporin og vil testes *in vitro* på cellelinjer med ulik ekspresjon av HER2. Tidligere studier har vist at cytotoxissiteten av EGF-saporin [2] og cetuximab-saporin [3] kan økes ved levering med PCI. Begge konjugatene er immunotoksiner rettet mot EGFR.

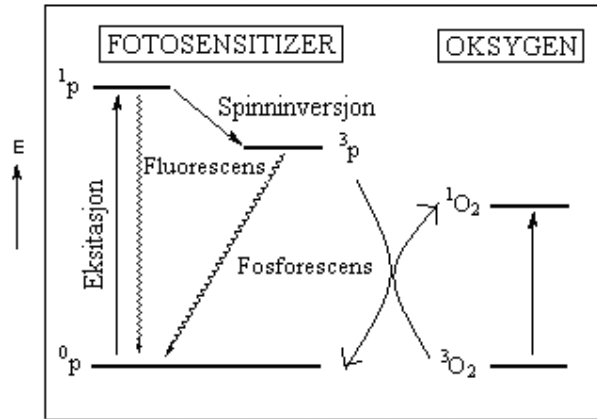
KAPITTEL 1: INNLEDNING

1.1 Fotodynamisk Terapi (PDT)

Det er over hundre år siden man først oppdaget at lys kombinert med visse kjemikalier kan fremkalle celledød [4]. Forsøk med ulike kombinasjoner av disse to komponentene har ledet frem til dagens fotodynamiske terapi (PDT). PDT er en metode hvor en lysømfintlig forbindelse (fotosensitizer, PS) eller dets forløper administreres enten lokalt (topisk) eller systemisk til pasienten. PS vil preferensielt akkumuleres i tumorvev og aktiveres ved bestråling av lys med bestemte bølgelengder. Aktivering forårsaker fotokjemiske og -biologiske prosesser som gir irreversibel ødeleggelse av tumorvevet.

1.1.1 Fotosensitive forbindelser og fotoreaksjoner

En PS er en kjemisk forbindelse som kan eksiteres av lys med bestemte bølgelengder og som igjen kan overføre denne energien til andre forbindelser [5]. Absorpsjon av energi i form av et foton gjør at et elektron eksiteres fra grunntilstand (0p) til et høyere energinivå og PS går over i en kortlivet eksitert singlett tilstand (1p) (Figur 1.1). Fra singlett tilstand kan energi avgis som varme (internal conversion) eller fluorescens. Fluorescensen kan brukes til deteksjon av kreft (f.eks diagnostisering av blærekreft ved bruk av Hexvix®) [6]. Alternativt kan PS gå over i en mer stabil triplett tilstand (3p) ved å gjennomgå en spinninversjon (intersystem crossing) slik at de to uparede elektronene har samme spinn. Når PS vender tilbake til grunntilstanden frigjøres energi [4]. Energien kan på samme måte som fra singlett tilstand avgis som varme eller fluorescens (kalles da fosforescens). Alternativt kan energien overføres i form av et elektron eller hydrogenatom til et substrat og danne et radikal eller overføres til molekylært oksygen (3O_2) slik at eksitert singlett oksygen (1O_2) dannes. De to fotokjemiske reaksjonene kalles henholdsvis type I og II reaksjoner.



Figur 1.1: Forenklet Jablonski diagram av energioverføringer ved PDT.

PS eksiteres fra grunntilstanden 0p til en kortlivet singlett tilstand 1p . Ved elektron spinninversjon går PS over i en triplett tilstand 3p . Figuren illustrerer type II fotoreaksjon hvor den eksiterte triplett tilstanden (3p) omdanner molekylært oksygen, 3O_2 , til singlett oksygen, 1O_2 .

1.1.1.1 Type I fotoreaksjoner

I type I reaksjoner overfører den eksiterte tripletttilstanden av PS først elektron eller hydrogen til et substrat slik at radikaler dannes [4]. Radikalene reagerer så videre med oksygen og danner oksygenradikaler som superoksid anion (O_2^-), hydroksylradikal (OH^\cdot), hydrogenperoksid (H_2O_2) eller andre peroksider som kan indusere oksidativ skade. Tumorvev har ofte områder med hypoksi eller anoksi hvor type I fotoreaksjoner (radikale mekanismer) foregår i høyere grad enn i normoksiske områder [5]. Dersom molekylært oksygen er til stede er imidlertid det så reaktivt at det vil være foretrukket å reagere direkte med tripletttilstanden (type II reaksjon).

1.1.1.2 Type II fotoreaksjoner

PDT virker hovedsakelig via type II fotoreaksjon, som gir dannelse av singlett oksygen (1O_2) i oksygenrikt miljø [5]. Dette skjer ved at den eksiterte PS (i triplett tilstand) overfører sin energi direkte til molekylært oksygen i triplett grunntilstand (3O_2) som derved eksiteres til en singlett tilstand. 1O_2 er en meget potent og toksisk

reaktiv oksygenforbindelse (ROS) som har evne til å oksidere flere typer biomolekyler, som umettede triacyl glyseroler (fettsyrer), kolesterol, umettede fosfolipider, aminosyrer (tryptofan, histidin, cystein, tyrosin og methionin) og nukleinsyrebasen guanin [7]. Oksidasjon av cellekomponentene aktiverer mekanismer som forårsaker celledød og tumorødeleggelse [8]. PDT er avhengig av oksygennivået i tumorvev og kan ikke drepe celler i anoksiske områder av tumor [5].

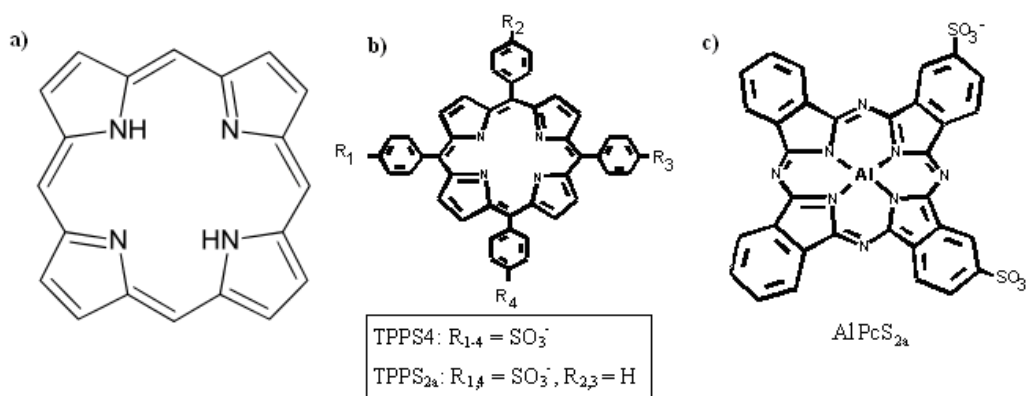
Både type I og II fotoreaksjoner fører til oksidasjon av biomolekyler, men av de reaktive oksygenforbindelsene som genereres i reaksjonene regnes $^1\text{O}_2$ regnes som den viktigste [7]. Dominansen av type II over type I reaksjoner avhenger av flere faktorer, som type PS, dens affinitet for substratene, samt oksygennivået i vevet [4].

1.1.1.3 Fotosensitive forbindelser

Det var først på starten av 1900-tallet at kombinasjonen av lys og fotosensitive forbindelser i behandling av ulike tilstander ble vitenskapelig undersøkt av Raab, von Tappeiner og Jesionek [9]. I 1955 renses Dr. Samuel Schwartz ut hematoporfyrin derivat (HPD), som er en blanding bestående av ulike porfyrinforbindelser [5]. HPD ble evaluert for tumordeteksjon av Lipson et al. i 1960-årene [10]. Det var imidlertid først i 1970-årene at utviklingen av moderne PDT skjøt fart som følge av innsatsen til Dr. Thomas Dougherty et al. [11;12]. De gjennomførte studier med kombinasjoner av HPD og rødt lys på større pasientgrupper og renses ut Photofrin (porfimer sodium) fra HPD [13]. Photofrin er per i dag den mest brukte PS i klinisk PDT [14].

Dersom en PS skal kunne nyttiggjøres klinisk bør den ideelt sett tilfredsstillende en rekke krav. Den bør produsere ROS effektivt, vanligvis absorbere lys med høye bølgelengder (600-800 nm), akkumuleres i tumorvev, gi minimal toksisitet i seg selv, være kjemisk ren, stabil og kunne administreres i klinisk anvendbare formuleringer [5]. Man har hittil ikke funnet fotosensitive forbindelser som optimalt tilfredsstillende alle disse kravene. Mange av porfyrinene og deres derivater har imidlertid vist seg å være de mest velegnede for klinisk bruk. Porfyrinene er basert på den sykliske grunnstrukturen av porfin, bestående av fire pyrrolringer som er bundet sammen via metylen (Figur 1.2) [15]. Kjemisk modifisering av grunnstrukturen gir opphav til en

rekke nye fotosensitizere med ulike egenskaper. Eksempler på PS'e i porfyrinfamilien er Photofrin® (porfimer sodium), Visudyne® (verteporfin, et benzoporfyrin derivat), meso-substituert klorin, tetra(*meta*-hydroksyfenyl)klorin (mTHPC), tetrafenylsulfonater (TPPS_n) og aluminium ftalocyaninsulfonater (AlPcS_n). Porfyrinene kan produseres med et varierende antall sulfonatgrupper (fra 1 til 4 grupper) bundet til den aromatiske ringstrukturen, noe som resulterer i varierende vannløselighet. PS'e basert på tetrapyrrolstrukturen administreres intravenøst på grunn av manglende evne til å penetrere huden ved topisk (lokal) administrasjon [7]. 5-aminolevulinsyre (5-ALA, Levulan®), metyl 5-aminolevulinat (M-ALA, Metvix®) og hexaminolevulinat (ALA hexyl ester, Hexvix®) er precursors som omdannes til porfyriner ved metabolisme. De to sistnevnte administreres kun lokalt (topisk).



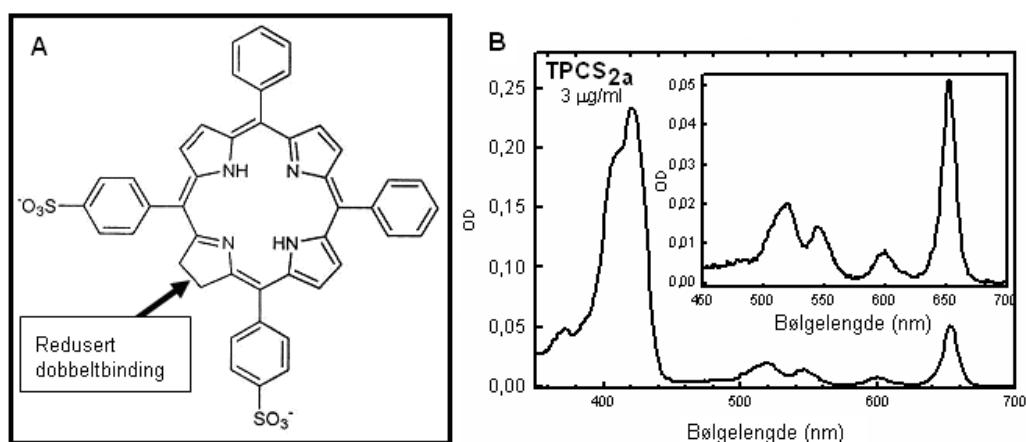
Figur 1.2: Forbindelser med kjemisk struktur basert på tetrapyrrol.

a) Porfins grunnstruktur bestående av fire pyrrolringer bundet sammen via metylenbindinger. b) To sulfonerte meso-tetrafenylporfyriner, TPPS₄ og TPPS_{2a}. c) Disulfonert aluminiumftalocyanin, AlPcS_{2a}.

De fire nitrogenatomene i porfyrinenes kjerne kan binde til metaller og danne stabile metallkomplekser [5]. Metalloporfyriner har endret absorpsjonsspekter, fotodynamisk stabilitet og evne til å produsere ¹O₂. Porfyriner og metalloporfyriner har en tendens til å danne aggregater i løsning. Inkorporering av paramagnetiske metaller, f. eks Fe³⁺, øker sannsynligheten for non-radiative decay (dvs. energien avgis som varme), noe som fører til deaktivering av den eksiterte singlett tilstanden uten produksjon av ROS. Dette gjør at slike forbindelser ikke er egnet som PS'e i PDT. Binding av

diamagnetiske metaller (Zn^{2+} , Al^{3+}) vil på den andre siden generelt øke stabiliteten av den tripletteksiterte tilstanden og effektivisere produksjonen av ROS [16].

TPCS_{2a} (disulfonert tetrafenylklorin), som benyttes i denne studien, er en ny, patentert PS utviklet for klinisk bruk av PCI Biotech (Oslo). Kjemiske struktur av TPCS_{2a} (Figur 1.3) er basert på tetrapyrrol ringstruktur, men redusert dobbeltbinding i en av pyrrolringene gjør at forbindelsen karakteriseres som et klorin [7]. Klorinene absorberer lys med bølgelengder godt inn i den røde delen av fargespekteret (~ 625-740 nm) og har vanligvis en absorpsjonstopp rundt 652-660 nm (Figur 1.3 B).



Figur 1.3: Kjemisk struktur og eksitasjons- og emisjonsspekter for disulfonert tetrafenylklorin (TPCS_{2a}).

A) Struktur av TPCS_{2s}. TPCS_{2s} inkluderer tre isomerer hvor redusert dobbeltbinding finnes på de andre pyrrolene. B) Eksitasjonsspekter (stort diagram) og emisjonsspekter (lite diagram) for TPCS_{2s} formulert i Cremophor ELP (Amphinex).

1.1.2 Selektivitet av PDT

Selv om de fleste PS'e administreres systemisk er effekten av PDT primært lokal [8]. Preferensiell akkumulering av PS i målvev og lokal administrering av lys gjør at effekten kan begrenses til målområdene.

1.1.2.1 Distribusjon av fotosensitizer

PS'e som benyttes i PDT akkumuleres preferensielt i tumorvev, enten i kreftcellene eller i stroma rundt [5]. Mekanismene er ikke fullt ut forstått enda, men det er flere biologiske og anatomiske egenskaper ved tumorvev som skiller dem fra normalt vev og som kan bidra til den selektive fordelingen [8]. De fleste PS'e oppfører seg som makromolekyler etter systemisk administrasjon, enten fordi de binder til serum proteiner, som albumin, HDL, LDL etc., eller fordi de danner intermolekulære aggregater [17]. Økt vaskulær permeabilitet i tumor bidrar til at makromolekyler tas opp i større grad enn i normalt vev. Dette, kombinert med preferensiell retensjon av makromolekyler som følge av dårlig utviklet lymfesystem, bidrar til selektiv akkumulering i tumorvev. HDL (high-density lipoproteiner) leverer PS til celler via en uspesifikk utveksling med plasmamembranen. PS bundet til LDL (low-density lipoproteiner) kan tas opp intracellulært via reseptormediert endocytose [18]. Tumorceller er vist å ha økt antall LDL-reseptorer sammenlignet med normalt vev, og dette kan bidra til økt opptak av PS. I tumorvev er det vanligvis lavere ekstracellulær pH enn i normalt vev [5]. PS som er anioniske i normalt vev kan bli mer nøytrale og lipofile i tumorvev. Opptak av PS direkte gjennom plasmamembranen vil generelt øke med lipofilisiteten til PS, og lipofilisiteten øker generelt med synkende pH. Andre faktorer som kan bidra til selektiv akkumulering er høyt nivå av kollagen i tumorstroma, som binder porfyriner, høyt nivå av lipider i tumor, som binder hydrofobe PS og tumorassosierte makrofager som akkumulerer PS selektivt [19]. Opptak av topisk administrerte PS er selektiv på grunn av at stratum corneum over tumorvev eller inflammatorisk vev reduseres i tykkelse [7].

PS akkumuleres preferensielt i tumorvev til en viss grad. Porphyriner og sulfonerte ftalocyaniner er rapportert å ha en ratio på henholdsvis 1-3:1 og 2-7:1 mellom tumor og omkringliggende vev [20]. Selektiviteten for tumorvev kan økes ytterligere ved målrettet levering med ligander eller antistoffer eller vha passive bærere, som liposomer, miceller og polymerer. PS-mAb (monoklonalt antistoff) konjugater rettet mot spesifikke antigener på overflaten av tumorceller [21] og konjugering av PS til serumbaserte proteiner (som LDL) [22] representerer ulike strategier for økt

selektivitet. Økt orientering av PS til LDL kan oppnås ved inkorporering i liposomer eller miceller [23] eller ved å danne en emulsjon av PS i Chremophor EL [24].

1.1.2.2 Intracellulær lokalisering av fotosensitizeren

PS's fysikalsk-kjemiske egenskaper påvirker ikke bare det cellulære opptaket, men også den subcellulære lokaliseringen [7]. Hydrofobe PS'e, som Photofrin og tetra(3-hydroksyfenyl)porfyrin (3THPP), tas primært opp i cellene ved penetrasjon av plasmamembranen og lokaliseres i intracellulære membraner [25]. PS'e som ikke er i stand til å penetrere plasmamembranen tas opp ved endocytose. Endocytose skjer ved at deler av plasmamembranen invagineres, frigjøres og danner en endocytisk vesikkel som inneholder det endocyterte materialet [26]. Hydrofile PS'e, som AlPcS₄ og TPPS₄, tas opp ved pinocytose og lokaliseres i intracellulære granula, primært i endosomer og lysosomer [16;25]. Pinocytose involverer opptak av væske og løst materiale og er generelt en lite effektiv opptaksmekanisme. Amfifile PS'e, som TPPS_{2a} og TPCS_{2a}, kan med sine hydrofobe deler binde til plasmamembranen, men de hydrofile delene kan hemme penetrasjon gjennom membranen. Slike PS'e tas opp via adsorptiv endocytose, som er en mer effektiv opptaksmekanisme enn pinocytose, og lokaliseres i endosomer og lysosomer med sine hydrofobe deler forankret i vesikkelmembranen, mens de hydrofile delene vender innover i lumen [27;28].

De fleste PS'e som benyttes klinisk har en hydrofob del som gjør at de kan akkumuleres i organellemembraner. Photofrin er vist å lokaliseres til mitokondriemembraner, samt Golgi apparatet og endoplasmatisk reticulum [25]. Lokalisering av PS vil avhenge av inkubasjonstiden før belysning (drug-light interval) siden akkumulering av PS etter administrasjon er en dynamisk prosess. Subcellulære lokaliseringer som har blitt identifisert for PS er mitokondriene, lysosomer, endoplasmatisk reticulum (ER), Golgi apparatet og plasmamembranen [5]. De færreste PS'e, og ingen av de som benyttes klinisk, akkumuleres i nukleus, noe som gjør at PDT har et lavt potensiale for å forårsake ødeleggelse av DNA, mutasjoner og fremvekst av kreft [29]. Siden PS fluorescerer kan intracellulær lokalisering evalueres ved fluorescensmikroskopi. Nye PS'e er i motsetning til Photofrin helst rene forbindelser, ikke blandinger, noe som gjør det enklere å bestemme lokaliseringen,

både på vevs- og cellenivå. Det primære cytotoxiske produktet, $^1\text{O}_2$, kan etter dannelse ikke vandre lengre enn 10-20 nm før det deeksiteres, noe som tilsvarer en levetid på 10-40 ns [30]. Det området som skades vil derfor gjenspeile lokalisering av PS under belysning, en sammenheng som er verifisert ved bl.a. å undersøke ødeleggelse av ekstralysosomalt lokalisert Photofrin og lysosomalt lokaliserte ftalocyaniner [31].

1.1.2.3 Lokal administrasjon av lys

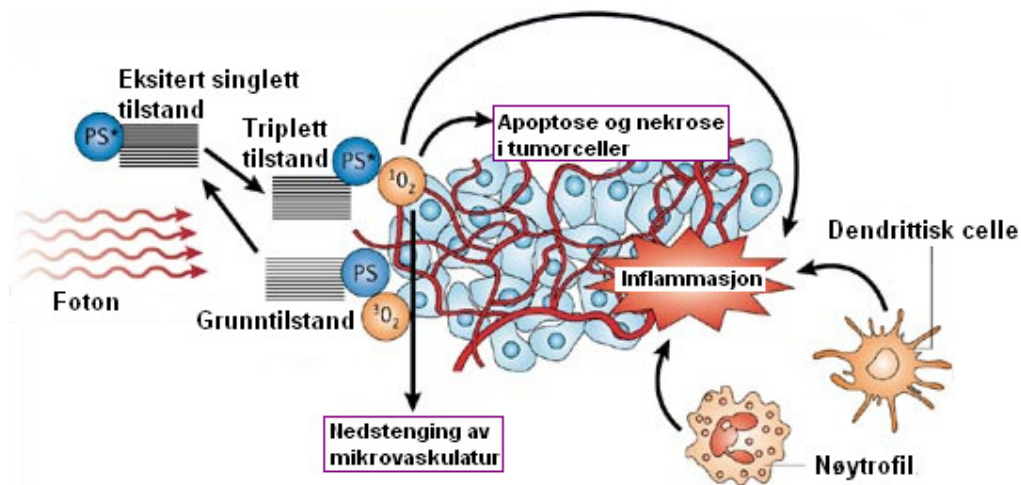
I tillegg til at PS akkumuleres preferensielt i tumorvev bidrar lokal administrering av lys til økt spesifisitet ved at PS kun aktiveres i det området som eksponeres for lys. For å aktivere PS må lysets (fotonenes) energi tilsvare differansen mellom to energibaner, dvs. mellom den eksiterte tilstanden og grunntilstanden [5]. Lyskildens emisjonsspektrum må derfor korrespondere med PS's absorpsjonsspektrum. PS'e som brukes i PDT absorberer lys mellom 400 og 800 nm. Penetrasjon av lys gjennom vev avhenger av lysets bølgelengde, og dårlig penetrasjon ved lave bølgelengder (< 600 nm) gjør vanligvis disse uegnet for klinisk bruk. Lys absorberes av kromoforer i vev. Melanin og heme er de viktigste kromoforene i kroppen [32]. Begge absorberer i høy grad lys i den ultrafiolette og synlige regionen av fargespekteret, og i liten grad lys nær det infrarøde området (> 600 nm). Penetrasjon gjennom vev er vist å øke fra 5-10 mm for lys med bølgelengder rundt 630 nm til opp mot 20 mm for lys nær den infrarøde regionen [7]. Det vil imidlertid være en øvre grense på ca. 850 nm dersom lyset skal benyttes klinisk i PDT. Dette skyldes at fotoner med høyere bølgelengder ikke vil ha nok energi til å eksitere O_2 for dannelse av $^1\text{O}_2$.

Dagens teknologi med bruk av moderne fiberoptiske systemer og endoskopiske metoder gjør at lys kan leveres i kontrollerte doser til de fleste områder av kroppen, både internt og eksternt [8]. Ved behandling av indre organer kreves vanligvis bruk av laser [7]. Lasere leverer kollimert lys med spesifikke bølgelengder og høy irradians. Dette reduserer påvirkning av tilstøtende vev. Til kutan eller subkutan behandling benyttes vanligvis lyskilder som ikke er laserbaserte, enten lamper med filter som kun slipper gjennom lys med bestemte bølgelengder eller lysemitterende dioder. Innen

klinisk PDT brukes synlig lys i doser som ikke er skadelig i seg selv. Behandlingstid er vanligvis kun 5-30 minutter.

1.1.3 Terapeutiske effekter av PDT på tumorvev

PDT utøver sine toksiske effekter på tumor gjennom dannelsen av reaktive oksygenforbindelser (ROS) som oksiderer ulike typer biomolekyler (Avsnitt 1.1.1.2). Vevet skades via tre hovedmekanismer. ROS sørger for en direkte toksisk effekt på tumorcellene gjennom aktivering av celledød [33]. I tillegg kan ROS forårsake indirekte skade ved at blodforsyningen til tumoren stenges av og ved aktivering av en immunrespons mot tumorcellene (Figur 1.4) [4]. I hvilken grad hver av mekanismene aktiveres avhenger av flere faktorer, som fysikalsk-kjemiske egenskaper hos PS, tid mellom administrering av PS og lysbehandling (drug-light interval, DLI), lysdosen, vevstypen og konsentrasjon av oksygen i vevet [19;34]. For langsiktig kontroll av tumor etter PDT kreves det muligens en kombinasjon av alle tre mekanismene [17].



Figur 1.4: Effekter av PDT i tumorvev.

Reaktive oksygenforbindelser (ROS) forårsaker skade på vev gjennom aktivering av apoptose og/eller nekrose i tumorceller, nedstenging av mikrovaskulatur i tumor og stimulering av en antitumor immunrespons[33].

1.1.3.1 Direkte cytotoksiske effekter

PDT-indusert dannelse av ROS initierer hovedsakelig apoptose og nekrose, men er også vist å igangsette autofagi [5]. Omfanget av de primære skadene etter aktivering av PS er vist å være en avgjørende faktor for hvilke mekanismer for celledød som aktiveres [7]. Ved høye fotodynamiske doser dominerer nekrose fremfor apoptose, mens man ved mer moderate doser ser en større andel apoptotisk celledød [25].

Subcellulær lokalisering av PS avgjør hvilke organeller og intracellulære molekyler som først skades ved belysning, og dette vil ha betydning for hvilke mekanismer som aktiveres eller inaktiveres og fører til celledød. Noodt et al. viste at ulike PS'e induerte apoptose i ulik grad og via forskjellige signalveier, avhengig av område med primær skade [25]. PS'e som lokaliseres i mitokondriene kan indusere apoptose direkte gjennom frigjøring av cytokrom c og kaspaseaktivering [7;35]. PS'e lokalisert i plasmamembranen kan gjennom dannelsen av ROS oksidere membrankomponenter og aktivere nekrose med lekkasje av cellulært innhold til det ekstracellulære rom. Frigjøringen kan aktivere en inflammatorisk respons (omtalt i Avsnitt 1.1.3.2) [35]. PS lokalisert i lysosomene kan indusere celledød enten ved frigjøring av lysosomale enzymer til cytosol eller ved at PS selv relokaliseres til cytosol og cytoplasmiske membransystemer, som mitokondriene og endoplasmatiske reticulum [16;19;36]. Studier har vist at fotokjemisk ødeleggelse av lysosomer kan føre til frigjøring av lysosomale proteaser (i.e. cathepsiner) som kløyver Bid til tBid (pro-apoptotisk medlem av Bcl-2 familien) [37]. tBid aktiverer en mitokondriell apoptotisk signalvei med frigjøring av cytokrom c og påfølgende aktivering av pro-kaspase-9 og -3. Tetrafenylporfyrinene TPPS_{2a} og TPPS₄ tas opp ved endocytose og lokaliseres endolysosomal, men er vist å redistribueres til henholdsvis cytosol og endoplasmatiske reticulum etter lyseksonering [25;38]. PDT med TPPS_{2a} har vist å gi en rask aktivering av tre kinaser i MAPK familien; ekstracellulær signalregulert kinase (ERK), stressaktivert protein kinase/c-Jun NH₂ terminal kinase (JNK) og p38 [39]. MAPK signalveien spiller en viktig rolle for proliferasjon, overlevelse, angiogenese og metastase.

Autofagi er en viktig proteindegraderingsmekanisme som sørger for resirkulering av cellekomponenter når tilgangen på næringsstoffer er begrenset og degradering av ødelagte organeller for å fremme celleoverlevelse [5]. Autofagi skjer ved at deler av cytoplasma lukkes inn i vakuoler (autofagosomer) som transporteres til lysosomer hvor innholdet tømmes og degraderes. På denne måten kan cellen skaffe aminosyrer og andre essensielle næringsstoffer under langvarig sult. Ved lave PDT-doser og liten grad av skade kan autofagi assosieres med økt celleoverlevelse [40]. Dersom skadene er mer omfattende slik at resirkulering av skadde komponenter overgår cellens kapasitet kan autofagi sørge for celledrap.

1.1.3.2 Indirekte effekter av PDT

Vaskulære effekter

PDT kan indirekte mediere celledrap ved å indusere vaskulære skader [5]. Slike vaskulære effekter ble påvist allerede i 1989 for Photofrin-basert PDT [4]. Skadene hemmer leveringen av oksygen og næringsstoffer, og kan føre til en vedvarende hypoksi/anoksi i tumor [17]. Mekanismer bak vaskulære ødeleggelser etter PDT varierer i stor grad med type PS som benyttes [29]. Ved systemisk administrasjon av PS skjer redistribusjon fra blod til vev først etter et visst tidsintervall, og intervallet øker generelt med hydrofilisiteten av PS. Kort inkubasjonstid før belysning gir høyere konsentrasjon av PS i blod og dermed større vaskulære skader.

Immunologiske effekter

I tillegg til de cytotoxiske og vaskulære effektene induserer PDT også en kompleks immunrespons. Denne responsen involverer rekruttering av inflammatoriske celler, som makrofager/monocyttter og nøtrophiler [34], og generering av en langvarig immunrespons, som kan resultere i en antitumor immunitet [29]. Oksidasjon av biomolekyler i plasmamembranen og membranen av cellulære organeller kan gi aktivering av fosfolipaser som degraderer fosfolipider og induserer frigjøring av inflammatoriske mediatorer [17]. Den inflammatoriske signaliseringen fører til rekruttering av nøtrophiler, mastceller og monocyttter/makrofager. Makrofager kan fagocyttere drepte og skadede tumorceller, og gjennom uttrykk av MHC klasse II-

molekyler på overflaten som binder tumorspesifikke peptider gjenkjennes de av CD4⁺-celler (hjelper T-lymfocytter) [41]. CD4⁺-cellene aktiveres og gjør CD8⁺-celler (cytotoksiske T-lymfocytter) mer sensitive for tumorspesifikke epitoper [29]. CD8⁺-celler kan også aktiveres av tumorspesifikke peptider bundet til MHC klasse I-molekyler på overflaten av dendrittiske celler. Ekspansjon og aktivering av CD4⁺ og CD8⁺ T-cellekloner som gjenkjenner tumorceller som sine mål kan føre til utvikling av en langvarig immunitet mot de samme tumorcellene (i.e. forsinket type hypersensitivitet, DTH).

Flere rapporter forteller at PDT kan indusere ulike former for immunosuppresjon [42]. I nesten alle tilfellene assosieres immunosuppresjonen med hemming av kontakt hypersensitivitet (CHS), en type T-celle-mediert immunitet, i mus [43]. CHS initieres gjennom eksponering av et haptent, som binder til et celleassosiert eller ekstracellulært protein. Haptent-proteinet presenteres på overflaten av antigenpresenterende celler (e.g. dendrittiske celler) ved hjelp av MHC-molekyler. I motsetning til DTH, som er en MHC klasse II-mediert prosess, antas CHS å medieres av MHC klasse I-molekyler [5]. MHC-molekylene gjenkjennes av CD4⁺ og CD8⁺ T-lymfocytter, som rekrutterer flere inflammatoriske celler. Ved systemisk PDT (i.e. lyset penetrerer huden) ser den PDT-medierte suppresjonen av CHS ut til å involvere systemisk frigjøring av IL-10, et anti-inflammatorisk cytokin [44]. Immunsuppressiv respons av kutan PDT (i.e. blått lys) ser imidlertid ut til å være uavhengig av IL-10 [45].

1.1.4 Klinisk nytte av PDT

Kirurgi, stråleterapi og kjemoterapi er de vanligste metodene som benyttes i kreftbehandling. Alle tre metodene begrenses imidlertid av mangel på spesifisitet, som fører til skade på friskt vev og påfølgende bivirkninger. Sammenlignet med konvensjonelle terapier kan PDT tilby flere fordeler, som økt spesifisitet gjennom lokal og lysdirigert aktivering av PS, lavt mutagen potensial, lav systemisk toksisitet, gode kosmetiske resultater og ingen kryssresistens med kjemoterapi eller radioterapi [8]. Og mens de tradisjonelle terapiene hovedsakelig fremkaller en immunosuppressiv respons, forårsaker PDT en sterk lokal inflammasjon som kan aktivere immunsystemet systemisk [46]. Men utfordringer gjenstår, da PDT har sine

begrensninger i form av hudfototoksisitet, begrenset selektiv akkumulering i målvev, samt begrenset evne til å kurere metastaserende kreft. PDT benyttes i dag til behandling av aldersrelatert makulær degenerering (AMD), samt flere ulike kreftformer, inkludert hudkreft [4]. PS'e godkjent for behandling av kreft med PDT er Photofrin® (porfimer sodium) og Foscan® (temoporfin) til systemisk administrasjon og precursorene Levulan® (aminolevulinsyre, ALA) og Metvix® (metylamino-levulinat, M-ALA) til lokal administrasjon [8]. Visudyne® (verteporfin, et benzoporfyryn derivat) er godkjent for behandling av AMD. Kombinasjonen av preferensiell akkumulering i tumorvev og fluorescerende egenskaper gjør at PS'e som brukes i PDT også kan utnyttes innen diagnostisering for deteksjon av tumorvev. Hexvix® (ALA hexyl ester) er godkjent for deteksjon av blærecancer.

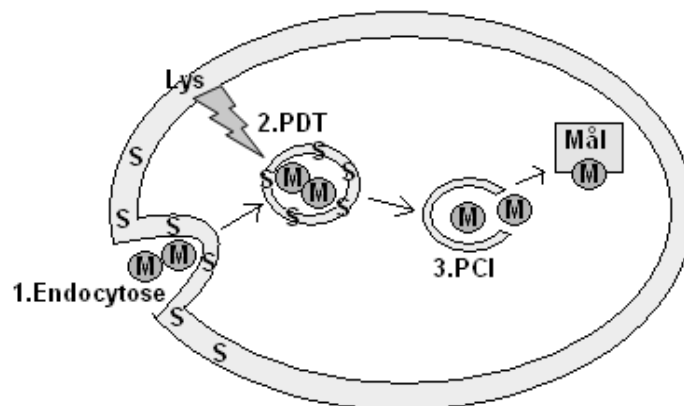
1.2 Fotokjemisk Internalisering (PCI)

Fotokjemisk internalisering (PCI) bygger på de samme prinsippene som PDT og er en metode for målrettet levering av makromolekyler til cytosol. Lysmediert aktivering av PS lokalisert i membranen av endocytiske vesikler fører til skade på membranene og frigjøring av endocyterte makromolekyler til cytosol. PCI har siden den første publikasjonen i 1999 [47] blitt evaluert både in vitro og in vivo for levering av en rekke ulike makromolekyler. PCI er vist å gi en mer effektiv levering av blant annet ribosominaktiverende proteiner (RIPs) [48;49], RIP-baserte immunotoksiner [2;3;50], gener [51] og noen kjemoterapeutiske legemidler [52].

1.2.1 Prinsipper bak PCI

Plasmamembranen er naturlig impermeabel for molekyler større enn ca. 1 kDa [53]. Membranimpermeable molekyler kan tas opp intracellulært ved endocytose, enten ved væskefase-pinocytose, gjennom indirekte assosiasjon med membranstrukturer eller spesifikk interaksjon med reseptorer i plasmamembranen. De endocyterte molekylerne transporteres til tidlige endosomer, hvorfra de enten resirkuleres til plasmamembranen eller fraktes til lysosomer [26]. Lysosomene har lav pH (5.0) og inneholder aktive

sure hydrolaser som sørger for kontrollert nedbrytning av makromolekyler. Makromolekyler, som proteiner og nukleinsyrer, har stort potensiale som legemidler i behandling av kreft, og flere er allerede klinisk godkjent. Mange makromolekyler utøver sin effekt intracellulært, men degraderes i endosomer/lysosomer før de når sitt intracellulære mål. Dette er en viktig årsak til lav terapeutisk effekt av denne type legemidler [54]. PCI er en metode for frigjøring av endocyterte makromolekyler til cytosol og baseres på lokalisering av PS i membranen til endocytiske vesikler [47]. Lysmediert aktivering av PS gir dannelse av ROS, primært singlett oksygen (1O_2), som oksiderer fosfolipider og andre membrankomponenter (Figur 1.5) [7]. Membranen skades og de endocytiske vesiklene skades slik at innholdet lekker ut. PCI kan kombinere fordelene ved PDT og utviklede, mer tumorspesifikke makromolekyler (f.eks immunotoksiner) til behandling av kreft. Metoden kan tilby en treveis spesifisitet gjennom preferensiell akkumulering av PS i solide tumorer, lokal administrasjon av lys og konjugering av makromolekyler til en målrettet del som fremmer reseptormediert endocytose. PCI er gjennom dannelse av ROS vist å mediere de samme direkte cytotoksiske, vaskulære og immunologiske effekter som PDT (Avsnitt 1.1.3) [55].



Figur 1.5: Skjematisk illustrasjon av PCI prosessen.

1) Makromolekylene (M) og fotosensitizeren (S) tas opp ved endocytose. Makromolekylene lokaliseres i lumen av endocytiske vesikler, mens fotosensitizeren lokaliseres i membranen til vesiklene. 2) Når fotosensitizeren eksponeres for lys med bestemte bølgelengder dannes reaktive oksygenforbindelser (ROS), hovedsakelig singlett oksygen (1O_2). 3) Membrankomponenter oksideres, membranstrukturen skades og makromolekylene frigjøres til cytosol hvor de kan virke på sitt intracellulære mål [54].

1.2.2 To strategier for legemiddellevering med PCI: ”Lys før” eller ”Lys etter”

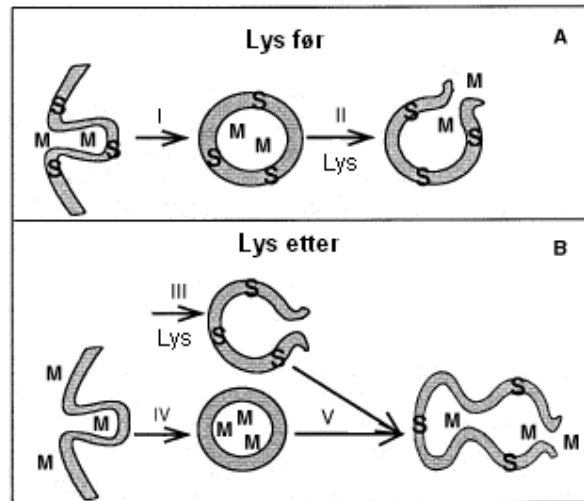
PCI kan gjennomføres etter to prinsipper: administrasjon av lys før og etter opptak av makromolekyler til cellene (Figur 1.6)

1.2.2.1 ”Lys etter” - strategi

”Lys etter” - strategien baserer seg på opptak og lokalisering av PS og makromolekyl i de samme endolysosomale vesiklene (Figur 1.6 A). Når PS eksponeres for lys med bestemte bølgelengder aktiveres fotokjemiske reaksjoner som gir skade på vesikkelmembranen med påfølgende frigjøring av makromolekylene til cytosol. ”Lys etter” er den originale strategien for PCI [56]. Potensielle ulemper med metoden er risikoen for endolysosomal enzymatisk degradering av makromolekylene før frigjøring og fotokjemisk skade på makromolekyler som befinner seg nær PS ved lyseksponering.

1.2.2.2 ”Lys før” - strategi

Ved ”lys før” - strategi administreres makromolekylene først etter lysdirigert aktivering av PS (Figur 1.6 B) [56]. Ved denne strategien gjennomføres først PDT som gjennom dannelsen av ROS forårsaker skade på endosom/lysosommembranene. Makromolekylene tas opp i intakte vesikler som dannes etter den fotokjemiske behandlingen og som fusjonerer med de skadede vesiklene, og dermed frigjøres makromolekylene. Strategien er vist å være effektiv ved fotokjemisk behandling opptil 6-8 timer før levering av makromolekylet [57].



Figur 1.6: PCI basert på "lys før" og "lys etter"-strategi.

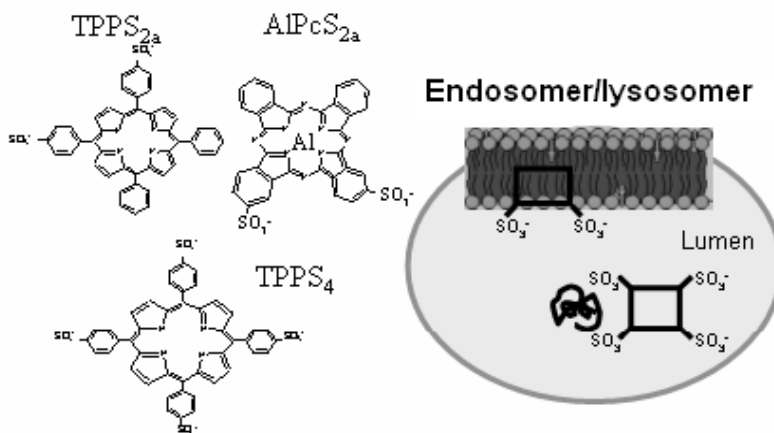
A) Ved "lys etter"-strategi endocytoses og lokaliseres både makromolekylet (M) og fotosensitizeren (S) i de samme vesiklene (I). Ved lyseksponering aktiveres fotosensitizeren og makromolekylet frigjøres til cytosol (II). B) Ved "lys før"-strategi endocytoses og aktiveres fotosensitizeren med lys (III) før makromolekylet endocytoses og lokaliseres i intakte vesikler (IV). Fusjon mellom intakte vesikler med makromolekyl og skadede vesikler med fotosensitizer fører til frigjøring av makromolekylet [56].

Både behandling med "lys før" og "lys etter" strategi er vist å effektivisere levering av makromolekyler til cytosol. Hvilken av strategiene som er mest effektiv varierer med typen makromolekyl. "Lys før" er vist å være mest effektivt for levering av det type 1 ribosominaktiverende proteinet, gelonin [56], mens "lys etter" viste seg å være mye mer effektivt for konjugatet EGF-saporin [2]. Dersom makromolekylet som skal leveres er koblet til en målrettet del er det essensielt for det reseptormediatede opptaket at antigenet på cellens overflate er intakt. I tilfeller hvor antigenet skades av PDT vil "lys etter" strategien være mer hensiktsmessig.

1.2.3 Fotosensitizere brukt i PCI

Membranimpermeable molekyler tas opp i cellene ved endocytose og lokaliseres i lumen av endocytiske vesikler med en størrelse på ~100 nm i diameter. For å unngå fotokjemisk skade på makromolekylene ved belysning må PS lokaliseres i

membranen av vesiklene, ikke i lumen [58]. ROS oksiderer biomolekyler i nær omkrets i selve membranen og $^1\text{O}_2$ (singlett oksygen), som regnes som den viktigste av de reaktive oksygenforbindelsene, kan kun vandre 10-20 nm før den deeksiteres. Dette, kombinert med større aktivitet av $^1\text{O}_2$ i membraner enn i vandig miljø, vil gi minimal skade på molekyler i lumen og disse kan frigjøres med sin biologiske aktivitet i behold [47]. Lokalisering av PS i membranen av endosomer/lysosomer krever amfifile egenskaper [57], som hos to av de mest brukte PS'e i PCI; TPPS_{2a} (disulfonert tetrafenylporfyrin) og aluminium ftalocyanin (AlPcS_{2a}) (Figur 1.7). Som følge av sine lysabsorpsjonsegenskaper brukes TPPS_{2a} in vitro og AlPcS_{2a} in vivo [58]. AlPcS_{2a} eksiteres av lys med bølgelengder i området rundt 675 nm, hvor vevspenetrasjonen er nærmest optimal, mens TPPS_{2a} har maksimal absorpsjon rundt 415-420 nm. Tetrasulfonerte hydrofile versjoner av de samme forbindelsene lokaliseres etter opptak ved pinocytose i lumen av endocytiske vesikler, og kan derfor ikke nyttiggjøres i PCI [26].



Figur 1.7: Lokalisering av sulfonerte fotosensitizere i endocytiske vesikler.

TPPS_{2a} og AlPcS_{2a} er disulfonerte fotosensitizere som lokaliseres i membranen av endocytiske vesikler. De er begge mye brukt i PCI, henholdsvis in vitro og in vivo. Tetrasulfonert TPPS₄ lokaliseres i lumen av endocytiske vesikler og kan derfor ikke utnyttes i PCI [57;59].

1.2.4 Terapeutisk potensiale av PCI

Behandling av kreft med tradisjonelle legemidler har generelt vært begrenset av alvorlige bivirkninger som følge av mangel på tumorspesifisitet [1]. Dette har dannet grunnlag for en ny generasjon av legemidler som utnytter egenskaper hos tumorceller som skiller dem fra normale celler og som tilbyr økt spesifisitet mot kreftceller sammenlignet med tradisjonelle legemidler. Ineffektiv levering til cytosol som følge av molekylenes størrelse, ladning og/eller hydrofilisitet gjør legemidlene til aktuelle kandidater for levering med PCI.

1.2.4.1 PCI av terapeutiske agenter

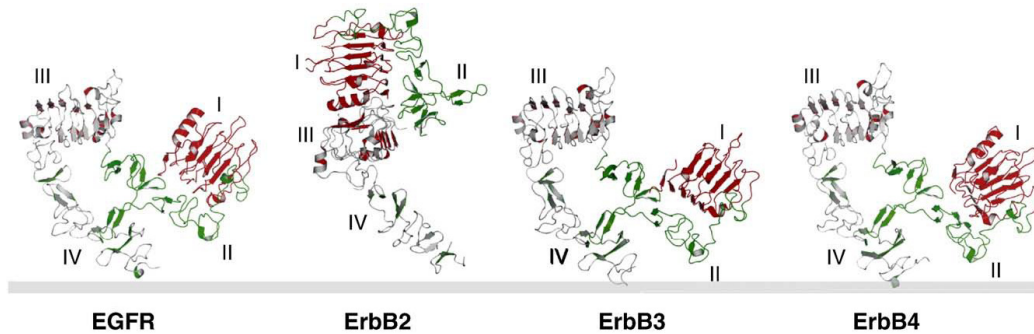
Levering av gelonin, saporin, gener og bleomycin med PCI har blitt vist i over 30 ulike cellelinjer og er dokumentert også in vivo [57]. Metoden setter ingen begrensninger for størrelsen på molekylene utover at de må kunne akkumuleres i endocytiske vesikler [47]. Hvor effektivt molekylene frigjøres i intakt form kan avhenge av den hydrolytiske aktiviteten i de endocytiske vesiklene, molekylenes sensitivitet for oksidasjon av ROS og cellenes endocytoseaktivitet. Alle mammalske celler, bortsett fra modne erythrocytter, har endocytisk aktivitet. Dette gjør at levering med PCI ikke begrenses til visse vevstyper, men har potensiale for behandling av en rekke maligne og non-maligne tilstander. PCI er vist å øke den cytotoxiske effekten av bleomycin, et kjemoterapeutika på ca 1,4 kDa som akkumuleres i endocytiske vesikler. Dette tyder på at ikke kun makromolekyler, men også membranimpermeable molekyler med mindre størrelse kan leveres med PCI [52]. PCI muliggjør reduksjon av legemiddeldosen ved at flere av de terapeutiske molekylene når sitt mål, og dette kan bidra til påfølgende reduksjon i doserelaterte bivirkninger. PCI har potensiale for behandling av en rekke sykdommer, som kreft, kardiovaskulære sykdommer, genetiske sykdommer, autoimmune sykdommer, revmatoid artritt og for levering av DNA vaksiner.

1.2.4.2 Levering av proteiner og immunotoksiner

Proteintoksiner fra bakterier eller planter er blant de mest potente cytotoxiske stoffene i naturen og 1-10 toksinmolekyler kan være tilstrekkelig for å drepe én celle [59]. Ribosominaktiverende proteiner (RIPs) fra planter utøver sin terapeutiske effekt ved å hemme proteinsyntesen i ribosomene. Type 1 RIPs tas opp ved pinocytose, men har minimal terapeutisk effekt på grunn av liten translokalisering fra endosomer og lysosomer til cytosol [60]. Dette er også vist å være en begrensning for nytten av type 1 RIPs som del av immunotoksiner (IT'er) for behandling av kreft [59]. Type 1 RIPs høye cytotoxiske potensiale kombinert med opptak ved endocytose og ineffektiv levering til cytosol gjør dem til ideelle kandidater for levering med PCI. PCI er vist å øke den terapeutiske effekten av både saporin og gelonin (30 kDa type 1 RIPs). Saporin har også vært forsøkt innkapslet i målrettede liposomer for å øke endocytosegraden, og deretter blitt levert til cytosol med PCI [49]. Gelonin har alene og som del av IT (MOC31-gelonin) vist synergistiske toksiske effekter i kombinasjon med PCI, både in vitro [48;50] og in vivo [61]. PCI er også vist å øke cytotoxisheten av affinitetstoksinet EGF-saporin [2] og IT'et cetuximab-saporin [3]. RIPs og IT'er er mer detaljert beskrevet i Avsnitt 1.4; Immunotoksiner.

1.3 Epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR) familien

EGFR (epidermal growth factor receptor) familien eller ErbB protein familien består av fire tyrosin kinase reseptorer: EGFR (HER1,erbB-1), HER2 (neu/erbB-2), HER3 (erbB-3) og HER4 (erbB-4) (Figur 1.8). Reseptorene er uttrykt i en rekke vev med epitelialt, mesenchymalt og neuronalt opphav [62] og medierer signaler som er viktige for proliferasjon, differensiering og overlevelse av normale celler [63]. Oppregulerte nivåer av ErbB reseptorer sees i forbindelse med organ morfogenese, vedlikehold og reparasjon [64]. Strukturelt består alle fire reseptorene av et stort ekstracellulært ligandbindende domene, en transmembran α -helix og et intracellulært domene med tyrosinkinaseaktivitet.

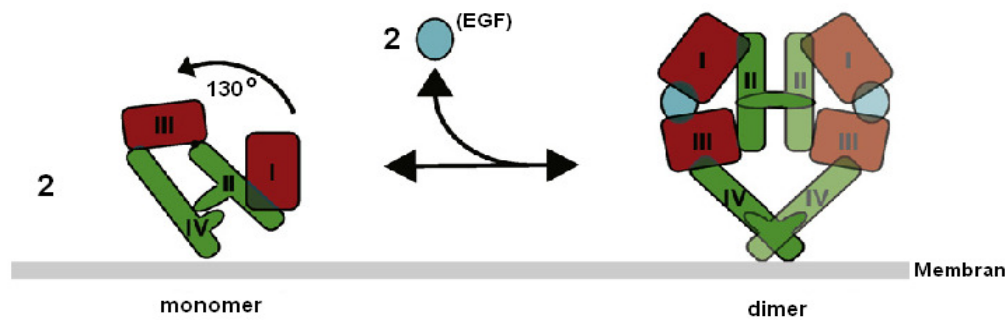


Figur 1.8: EGF/ErbB-reseptorenes ekstracellulære strukturer ved fravær av ligand.

Hver struktur er inndelt i fire domener. Domene I og III er leucinrike regioner ansvarlige for ligandbinding. Domene II og IV er cysteinrike regioner bundet sammen av disulfidbindinger. HER2 (ErbB-2) har en annen konformasjon enn de tre andre reseptorene [65].

1.3.1 Aktivering av EGF-reseptorene

EGF-reseptorene aktiveres ved binding av ekstracellulære ligander. Det er identifisert en rekke ligander med ulik affinitet for hver av de fire reseptorene [66]. Blant de mest kjente er EGF, TGF- α og neuregulinene. Ligandbinding fremkaller en konformasjonsendring fra inaktiv til aktiv konformasjon ved at de ligandbindende domene I og III dras mot hverandre (Figur 1.9) [65;67]. Disulfidbindinger mellom domene II og IV brytes slik at domenene eksponeres og kan interagere med tilsvarende domener på naboreseptorer. Resultatet er dannelse av homodimer (kompleks av to identiske reseptorer) eller heterodimer (kompleks av to ulike EGF-reseptorer). EGFR/HER1 og HER2 er autonome og kan gjennomgå dimerisering og generere intracellulære signaler. HER3 kan binde ligander, men er ikke i stand til å generere signaler på egen hånd på grunn av manglende kinasefunksjon, og må derfor aktivere kinasene til de tre andre reseptorsubtypene [68;69]. HER2 har ingen kjente endogene ligander og har i motsetning til de tre andre reseptorene konstant aktiv konformasjon. Dette gjør at den kan kryssaktiveres ved at den blir del av en heterodimer sammen med HER1, HER3 eller HER4 [70]. En annen mulighet for aktivering som er unik for HER2 er dannelse av homodimer uten ligandbinding. Homodimerisering forekommer spontant ved overuttrykk av reseptoren og vil bli nærmere omtalt i Avsnitt 1.3.4; EGF-reseptorenes rolle i kreft.



Figur 1.9: Konformasjonsendring i ekstracellulær del av EGFR/HER1 og påfølgende dimerisering ved binding av EGF.

Binding av EGF til domene I og III gir konformasjonsendring med rotasjon av domene I og II rundt aksene (markert med svart buet pil). Domene II og IV eksponeres og kan interagere med annen monomer [65].

Ved reseptordimerisering autofosforyleres de intracellulære tyrosindomenene og tyrosinkinaseaktiviteten stimuleres [71]. Dette igangsetter et komplekst intracellulært nettverk av signalkaskader som formidler informasjon om flere fundamentale cellulære prosesser som proliferasjon, vekst, differensiering, invasjon, angiogenese, metastasering, overlevelse og apoptose.

1.3.2 Intracellulære signalveier

Fosforylerte tyrosiner på reseptorenes intracellulære domener fungerer som bindingssteder for en rekke signalproteiner. Proteinene har enten Src homologi (SH2) eller fosfotyrosinbindende (PTB) domener og fungerer som adaptore som kobler tyrosinkinasereseptorene til intracellulære signalveier [72].

1.3.2.1 Mitogenaktivert proteinkinase (MAPK) signalvei

MAPK-signalveien, også kalt Ras-raf-MEK-ERK signalveien, går gjennom mitogen aktiverte protein kinaser og er en felles nedstrøms signalkaskade etter stimulering av

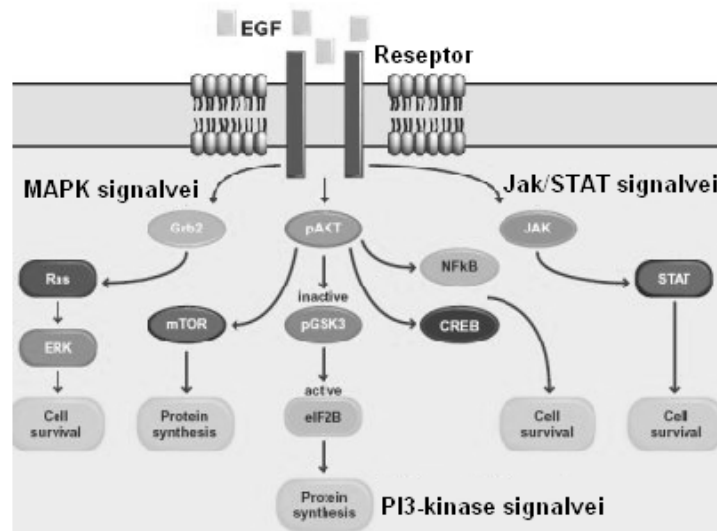
EGF-reseptorer med alle typer ErbB-ligander [73]. Aktivering av Ras setter i gang en fosforyleringskaskade av serin/treonin kinaser, kalt MAPK kaskaden (Figur 1.10) [66]. Denne frakter signalene fra plasmamembranen til cellekjernen hvor transkripsjonsfaktorer stimulerer genekspressjon som fører til celleproliferasjon, angiogenese, metastasering og økt overlevelse. Det eksakte utfallet vil være avhengig av hvilke andre gener som er aktive i cellen og hvilke andre signaler cellen mottar.

1.3.2.2 Akt/Fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K) signalvei

Aktivering av Ras fremmer også aktivering av PI3-kinase [66]. Aktivert PI3-kinase gir rekruttering av Akt (også kalt protein kinase B) til plasmamembranen hvor Akt fosforyleres (Figur 1.10). Aktivert Akt kan fosforylere en rekke substrater og stimulere ulike cellulære prosesser, som økt celleoverlevelse og vekst [73].

1.3.2.3 Stress-aktivert protein kinase signalvei

Et annet mål for EGFR/HER signaliseringen er protein kinase C (PKC) og Jak/STAT (Figur 1.10) [74]. EGF-reseptorenes tyrosinkinaser fosforylerer og aktiverer STAT (Signal transducers and activators of transcription) proteiner, en familie av transkripsjonsfaktorer som er lokalisert i cytoplasma [75]. Ved aktivering danner STAT-proteinene homodimerer eller heterodimerer og translokaliseres deretter relativt raskt til cellekjernen, hvor de interagerer med andre transkripsjonsfaktorer og induserer genekspressjon. STAT signalisering regulerer differensiering, vekst og apoptose.



Figur 1.10: EGFR signaltransduksjon.

Ligandbinding til EGFR aktiverer MAP-kinase, PI3-kinase og Stat/Jak signalveier som resulterer i gentranskripsjon, modulering av celledyklus, angiogenese, vekst og apoptose [76].

1.3.3 Terminering av EGFR/HER signalisering

EGFR/HER signaliseringen termineres ved at reseptordimeren internaliseres og degraderes av lysosomale enzymer [62]. Ligandbinding stimulerer endocytose av ligand-reseptor komplekset i clathrin-coatede vesikler, etterfulgt av enten degradering i lysosomer eller dissosiering av liganden og resirkulering av reseptorene tilbake til celleoverflaten. Om reseptorene degraderes eller resirkuleres avhenger av dimersammensetningen, tyrosinkinaseaktiviteten og type ligand. HER2 heterodimerer er vist å være de mest stabile ved at en redusert dissosiasjonsrate gir et lengre og kraftigere signal.

1.3.4 EGF-reseptorenes rolle i kreft

Kreftceller har sitt opphav i normale celler, men gjennom mutasjoner og epigenetiske forandringer har de ervervet egenskaper som gjør at de unnslipper normale regulatoriske mekanismer [1;77]. Karakteristiske egenskaper hos kreftceller er genetisk ustabilitet, ignorering av eksterne og interne signaler som regulerer

proliferasjon, unngåelse av apoptose og invasjon av, overlevelse og proliferasjon i ukjent vev. Dysregulering eller overaktivering av ErbB signaliseringen er identifisert for en rekke ulike krefttyper [73]. Årsaker kan være genamplifisering, forhøyet nivå av reseptor eller ligand, muterte reseptorutgaver eller defekt reseptorinternalisering [63;70].

EGFR/ERbB-1

Overekspresjon av EGFR/ErbB-1 er funnet i flere typer cancerceller og assosieres med en mer aggressiv sykdomsform [70]. De aller fleste carcinomer og ca.30 % av humane typer brystkreft har forhøyede nivåer av EGFR [68]. Reseptoren antas å ha betydning i senere faser av utviklingen og for metastasering.

HER2/ERbB-2

Overekspresjon av HER2 sees i en rekke ulike typer kreft, som bryst, lunge, pancreas, colon øsofagus, endometrium og cervix [73]. Korrelasjonen mellom forhøyede nivåer av HER2 og forekomst av kreft er best studert for brystkreft, hvor et overuttrykk av HER2 sees hos rundt 25 % av kvinnene med diagnosen tidlig brystcancer. Forhøyede nivåer av HER2 er assosiert med aggressivt sykdomsforløp, økt sannsynlighet for tilbakefall og dårlige prognoser [78]. HER2 homodimerer kan dannes spontant ved overuttrykk av reseptoren og signalene resulterer i dysregulert cellevekst og onkogene transformasjoner (i.e. som gir opphav til kreft). HER2 er foretrukket dimeriseringspartner for de tre andre erbB-reseptorene. Heterodimerer med HER2 er mer stabile og viser redusert dissosieringsrate for ligand, lav endocytiseringsrate, forlenget reseptorstimulering og raskere resirkulering av reseptorene fra endocytiske vesikler tilbake til celleoverflaten. Resultatet er at de intracellulære signalene av reseptoraktivering forlenges og forsterkes. HER2 er uttrykket i relativt lave nivåer i normalt vev, noe som burde være fordelaktig med tanke på toksisitetsprofilen til HER2-rettede terapeutika. Overuttrykk av HER2 er funnet i både primærtumorer og i metastaser, som tyder på at anti-HER2 behandling kan ha effekt i alt tumorvev [79].

Genmutasjoner

Mutasjoner i signalkaskadene som aktiveres av ErbB kan også bidra til utvikling av kreft. Det skjer enten ved aktivering av proto-onkogener til onkogener eller inhibering av tumor suppressor gener [1]. Muterte versjoner av proto-onkogenet Ras finnes hos ca 30% av de humane kreftformene [66]. Ved permanent aktivering av Ras vil cellen oppføre seg som om den konstant stimuleres av proliferasjonsstimulerende ekstracellulære signaler (mitogener). Dette kan bidra til utvikling av kreft. Ras-ERK signalveien antas å være en av de viktigste signalveiene for malign transformasjon [80].

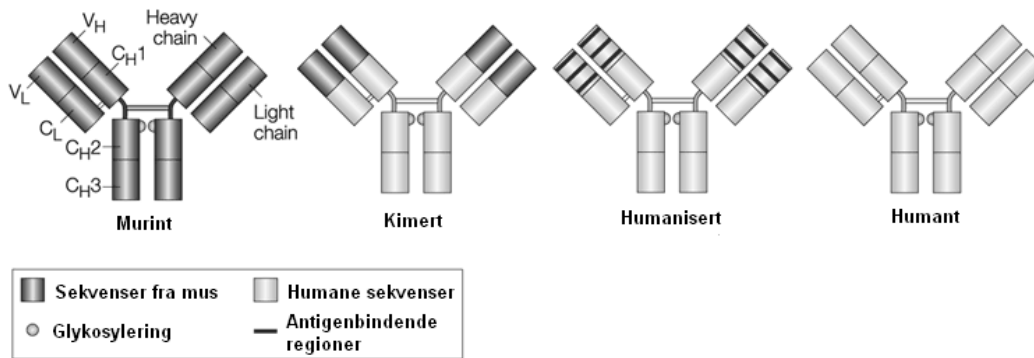
1.3.5 EGFR-familien som mål i kreftterapi

Ved behandling av kreft søker man å begrense graden av systemisk toksisitet ved å gjøre behandlingen så selektiv som mulig. Selektiviteten kan økes ved å utnytte egenskaper hos kreftcellene som normale celler mangler eller i mindre grad besitter, for eksempel overekspressjon av EGF-reseptorer på overflaten av cellene [1]. Målrettede terapier som anti-EGFR/HER monoklonale antistoffer (mAb), syntetiske tyrosinkinasehemmere (TKI), konjugater av toksiner og anti-EGFR/HER antistoffer (dvs. immunotoksiner) eller EGFR/HER ligander (dvs. affinitetstoksiner) og antisense terapi mot EGF-reseptorer kan gi økt selektivitet for kreftceller sammenlignet med konvensjonelle terapier [63]. Det vil her bli fokusert på monoklonale antistoffer og tyrosinkinasehemmere. Immunotoksiner er beskrevet i Avsnitt 1.4.

1.3.5.1 Monoklonale antistoffer (mAbs)

Monoklonale antistoffer (mAbs) rettet mot EGF-reseptorer gjenkjenner og binder spesifikt til reseptorenes ekstracellulære domene [76]. Antistoffbindingen stimulerer dimerisering, internalisering og nedregulering av reseptoren samtidig som ligandstimulert tyrosinkinaseaktivitet og intracellulære signalkaskader hemmes [62]. Flere blokkerende mAbs har blitt utviklet mot EGFR/HER1 og HER2. De mest benyttede er henholdsvis cetuximab (IMC-C225, Erbitux®) og trastuzumab (Herceptin®) som begge er godkjente for klinisk bruk.

Monoklonale antistoffer av samme type produseres fra samme B-celle klon. Dette gir homogenitet og veldefinert spesifisitet som gir lite kryssreaksjon med andre antigener [41]. De fleste mAbs er av typen IgG (immunoglobulin G) [81]. IgG er homodimerer av to lette kjeder og to tunge kjeder, hver med variable og konstante domener. Alle mAbs består av proteinkjeder fra enten mus eller mennesker, eller en kombinasjon av disse. Human anti-mus antistoff (HAMA) immunrespons gir begrenset terapeutisk nytte av murine antistoffer (fra mus), og teknikker har blitt utviklet for å humanisere mAbs (Figur 1.11) [63]. IgG binder til antigen og kan aktivere komplement som fører til lysering av antigenpresenterende celler (Figur 1.12) [41]. IgG viser også en opsoniserende effekt gjennom binding til Fc-reseptorer på makrofager og nøytrofile granulocytter som fører til en effektiv reseptormediert endocytose av antistoff-antigen komplekset. Antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC) og komplementavhengig cytotoxicitet (CDC) kan bidra til tumorregresjon og dette kan være en forklaring på hvorfor en del mAbs er vist å være mer effektive *in vivo* enn *in vitro* [63].



Figur 1.11: Monoklonale antistoffer (mAbs) med ulikt opphav.

Murine mAbs består utelukkende av antistoffgener fra mus. Hos kimere mAbs er de variable regionene hentet fra mus, mens de konstante regionene er humane. Humaniserte mAbs har kun antigenbindende region fra mus, og hos humane mAbs er hele antistoffgenet humant. Immunogenisiteten vil generelt reduseres med økende andel humanderiverte proteinsekvenser [81].

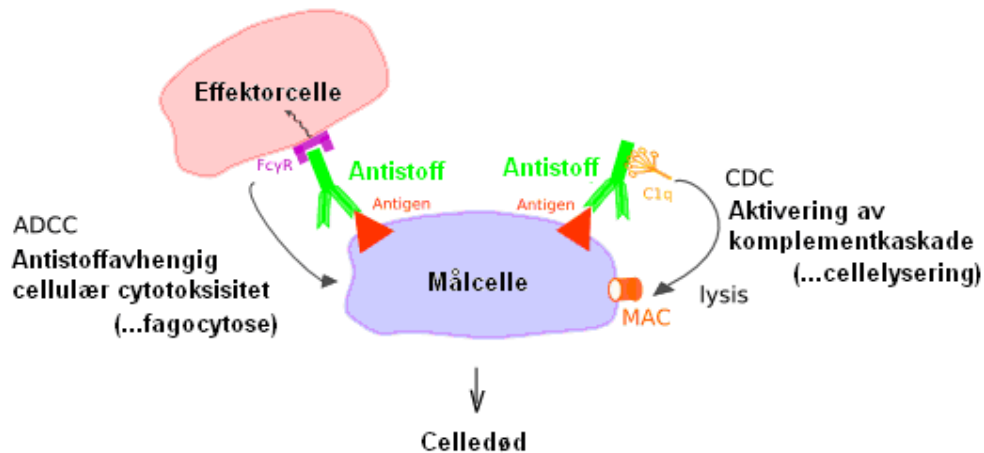
Cetuximab

Cetuximab (IMC-C225) er et kimert IgG1 antistoff rettet mot det ekstracellulære ligandbindende domenet av EGFR (HER1) [3]. Antistoffets affinitet for reseptoren overgår endogene ligander som EGF og TGF- α , og ved binding hindrer cetuximab ligandbinding og reseptoraktivering [82]. Cetuximab oppregulerer nivået av Cdk hemmeren p27^{Kip1}, noe som gir stans av cellyklusen i G1 fasen slik at progresjon i S-fasen, hvor DNA-replikasjon foregår, hemmes [83]. Cetuximab hemmer også angiogenese, invasjon og metastasering, samt at nivå og aktivering av pro-apoptotiske molekyler økes. *In vivo* bidrar ADCC og CDC til tumorregresjon [74]. Cetuximab viser synergisme i kombinasjon med kjemoterapi, stråleterapi og erbB2-rettede monoklonale antistoffer [63]. Cetuximab er godkjent for behandling av colon cancer og head and neck cancer i kombinasjon med henholdsvis kjemoterapi og stråleterapi.

Trastuzumab

Trastuzumab er et humanisert IgG1 monoklonalt antistoff (mAb) rettet mot det ekstracellulære domenet av HER2 [79]. Trastuzumab stimulerer internalisering og degradering av HER2, hindrer dimerisering og induserer apoptose [70]. I tillegg sees en doseavhengig reduksjon av antall celler i S-fasen (den delen av cellyklusen hvor DNA replikeres og proteiner syntetiseres), hemming av angiogenese (ekspresjon av vascular endothelial growth factor, VEGF, reduseres), samt at aktivering av ADCC og CDC bidrar til ytterligere antitumoraktivitet [84]. Trastuzumab er et klinisk godkjent og mye utnyttet terapeutikum under handelsnavnet Herceptin®. I kombinasjon med kjemoterapi har trastuzumab vist å øke livskvaliteten og overlevelsen hos kvinner med HER2-positiv metastaserende brystcancer sammenlignet med samme kjemoterapi alene [85].

Behandling av kreft med antistoffer alene er sjelden kurativt i seg selv [86]. Binding til en cytotoxisk forbindelse er en måte å øke den terapeutiske effekten på, noe IT'er med konjugering av antistoffet til et proteintoksin er et eksempel på (Avsnitt 1.4). Andre strategier som har blitt brukt for å øke den terapeutiske effekten av antistoff-baserte legemidler er kombinasjon med kjemoterapeutika og rekonstruering for å forbedre antistoffenes effektorfunksjoner, farmakokinetikk og signaliserende aktivitet [87].



Figur 1.12: Aktivering av ADCC og CDC med mAbs.

Monoklonale antistoffer (mAbs) binder til antigen på målcellens overflate. C1q-delen av komplementkomponenten C1 binder til Fc-regionen av mAb og starter en komplementaktiveringsprosess som ender med at det terminale komplementkomplekset (MAC) danner porer i celledommen slik at cellen lyses. Fc reseptorer på overflaten av fagocytter og nøytrofiler binder til mAb og medierer effektiv reseptormediert endocytose (fagocytose) [41]. Av IgG mAbs viser subtypene IgG1 og IgG3 størst evne til å aktivere ADCC og CDC [81].

1.3.5.2 Tyrosinkinasehemmere (TKI)

Tyrosinkinasehemmere (TKI) rettet mot erbB-reseptorer er små syntetiske molekyler som virker direkte på reseptorenes intracellulære tyrosinkinase domener [62]. Her konkurrerer de med adenosinbasen på ATP om å binde til en smal hydrofob lomme. Bindingen forhindrer ATP-mediert fosforylering av tyrosingrupeer i reseptoren og i målproteinene som medierer de cellulære effektene. Dermed hemmes signalveier som leder til proliferasjon, invasjon, angiogenese og metastasering av cellene, samt at apoptose induseres. Tyrosinkinasehemmere påvirker ikke reseptorekspressjonen slik mAbs gjør [76]. Lapatinib hemmer tyrosinkinasedomener på både EGFR og HER2 og benyttes i kombinasjonsbehandling av pasienter med avansert eller metastatisk brystkreft med overekspressjon av HER2 [88]. Gefitinib (Iressa®, ZD-1839) og erlotinib (Tarceva®, OSI-774) er selektive hemmere av EGFR/HER1 tyrosinkinasen og benyttes begge innen behandling av blant annet ikke-småcellet lungecancer.

Gjennom blokkering av tyrosinkinasedomenet på EGFR kan de også blokkere fosforylering ved heterodimerisering av dimeriseringspartnerne HER2 og HER3 [63].

1.4 Immunotoksiner

Terapeutiske immunotoksiner (IT'er) består av et antistoff eller antistoffragment koblet til et toksin (Figur 1.13) [89]. Antistoffet leder toksinet til målcellene ved gjenkjennelse av og selektiv binding til antigen i cellemembranen. IT tas opp intracellulært ved endocytose og lokaliseres i endocytiske vesikler, men for å utøve sin effekt må toksindelen translokaliseres til cytosol [90]. Før utnyttet man hele proteintoksiner og murine mAbs i produksjon av IT'er, mens det nå utvikles rekombinante IT'er som består av Fv-fragment av et humant/humanisert mAb og toksin uten cellebindende del [91]. IT'er har flere potensielle bruksområder, men hovedfokuset har hittil vært på behandling av kreft [60].



Figur 1.13: Forenklet framstilling av immunotoksin.

Antistoffet eller et fragment av dette sørger for målrettet levering av toksin til målcellen hvor toksinet kan utøve sin cytotoxissitet.

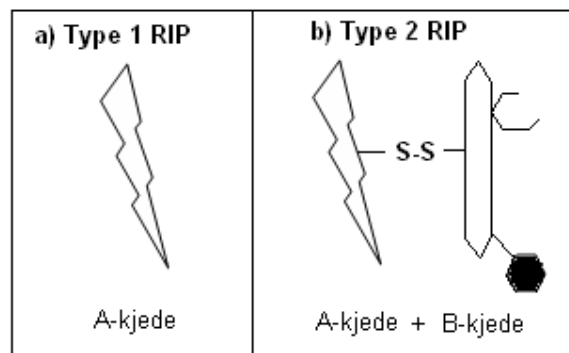
1.4.1 Plantetoksiner

Ribosominaktiverende proteiner (RIPs) er toksiske enzymer som produseres i planter og bakterier [92]. Proteintoksiner utøver vanligvis sin cytotoxissitet gjennom inaktivering av elongeringsfaktor 2 (EF-2) eller det EF-2 bindende setet på 28S ribosomsubenheten. Endo og hans kollegaer fant ut at den enzymatiske aktiviteten av RIPs fra planter var kløyving av *N*-glykosid-bindingen på adenin₄₃₂₄ i eukaryot 28S rRNA [93;94]. Kløyvingen gjør at den store subenheten (60S) i ribosomene fratas

evnen til å binde til elongeringsfaktorer, og dermed stanses proteinsyntesen. RIPs forårsaker ved denne mekanismen katalytisk og irreversibel inaktivering av eukaryote ribosomer. RIPs har også blitt observert å fjerne adenin fra ADP-ribose kjeden av aktivert poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), som er involvert i reparering av DNA [60]. Resultatene indikerer tidlig direkte ødeleggelse av DNA, uavhengig av RIPs ribosominhiberende aktivitet, noe som tyder på at toksinene kan komme seg inn i cellekjernen. RIPs kan forårsake apoptose, nekrose og cytokinproduksjon med påfølgende inflammasjon [60]. I tillegg har de fleste RIPs allergene og antivirale egenskaper.

1.4.1.1 Type 1 og 2 ribosominaktiverende proteiner (RIPs)

Det finnes to hovedtyper ribosominaktiverende proteiner fra planter; type 1 og 2. Type 1 RIPs består av en enkelt polypeptidkjede (A-kjede) med N-glykosidaseaktivitet (Figur 1.14 a). Type 2 RIPs består av to eller fire polypeptidkjeder, hvorav minimum én A-kjede og én B-kjede som er bundet sammen via disulfidbroer og hydrofobe bindinger (Figur 1.14 b) [92;95]. B-kjeden har galaktosespesifikk lektinaktivitet som gjør at den binder til reseptorer i plasmamembranen og fremmer opptak av A-kjeden inn i cellen via endocytose. Type 1 og 2 RIPs har de samme ribosominaktiverende egenskapene (A-kjeden), men ineffektivt opptak og lite effektiv transport til cytosol som følge av mangel på lektin gjør at type 1 RIPs er mindre toksiske mot celler i kultur [59].



Figur 1.14: Struktur av type 1 og 2 ribosominaktiverende proteiner.

a) Type 1 RIPs består av en polypeptidkjede med N-glykosidaseaktivitet (A-kjede), mens b) type 2 RIPs består av en A-kjede bundet til en polypeptidkjede med lektinaktivitet (B-kjede). For B-kjeden i figuren er det kun vist ett karbohydratbindende sete.

Type 2 RIPs

Ricin, abrin og modeccin er eksempler på type 2 RIPs. Etter opptak ved reseptor-mediert endocytose og lokalisering til endosomer kan de ved retrograd transport fraktes via Golgi og endoplasmatiske retikulum til cytosol hvor de utøver sin effekt [61]. Mangel på spesifisitet kombinert med høy cytotoxicitet begrenser deres terapeutiske potensiale.

Type 1 RIPs

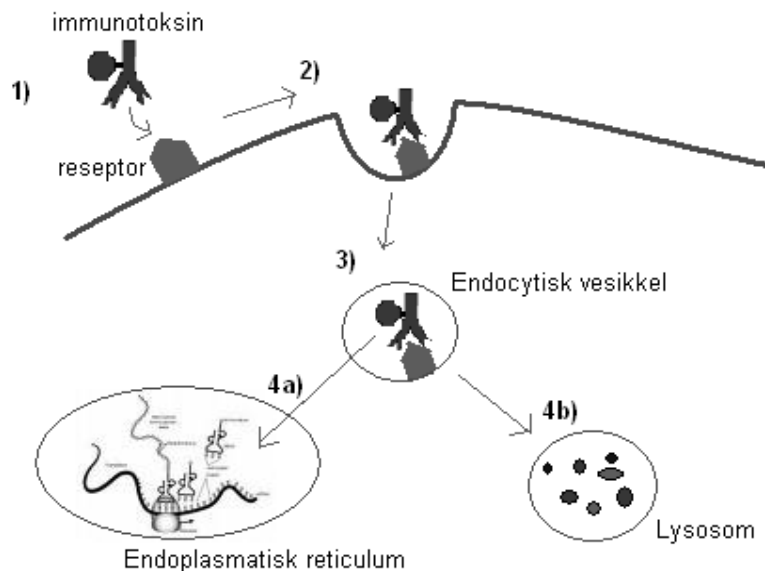
Saporin, gelonin og pokeweed antiviral protein (PAP) er eksempler på type 1 RIPs. Type 1 RIPs tas opp intracellulært ved pinocytose og transporteres hovedsakelig til lysosomer hvor de degraderes [59]. Opptaksmekanismen er altså mindre effektiv enn for type 2 RIPs. For å øke grad av reseptor-mediert opptak av type 1 RIPs kan de kobles til molekyler med evne til å binde til cellemembranen eller de kan fraktes vha andre leveringsmetoder. I teorien kan bærerene være både hormoner, lektiner, vekstfaktorer, liposomer, antistoffer og vitaminbindende proteiner. Den mest brukte bæreren er imidlertid monoklonale antistoffer (mAbs) (dvs. IT'er).

Blant de type 1 RIPs vi kjenner til i dag har saporin vist seg å være det generelt mest toksiske mot celler. I tillegg til å inaktivere ribosomer er saporin vist å inducere apoptose gjennom mitokondriell kaskade helt uavhengig av hemming av proteinsyntesen [96]. Saporin, som har en molekylvekt på ca 30 kDa, finnes i flere former i alle vev av *Saponaria Officinalis* (soapwort), i både frø, blader og roten [92]. I motsetning til de fleste andre RIPs inneholder saporin ikke karbohydrater [2]. Cellulært opptak av saporin er vist å medieres av α_2 -makroglobulin reseptorer, men observasjoner tyder på at saporin også har en reseptor-uavhengig opptaksmekanisme [60].

1.4.2 Terapeutiske immunotoksiner

Type 2 RIPs binder til alle typer celler og kan ikke nyttiggjøres i IT'er [60]. Type 1 RIPs og isolerte A-kjeder fra type 2 RIPs derimot mangler cellebindende domene og

ved å konjugere disse til målrettede ligander kan man oppnå økt cellulært opptak av toksinet, samt at toksinet kun tas opp selektivt i celler som uttrykker visse overflateproteiner [61]. Antistoffet/antistoffragmentet binder til spesifikke reseptorer som sitter i cellens plasmamembran og IT-reseptor komplekset tas opp intracellulært ved reseptormediert endocytose (Figur 1.15). Fra endocytiske vesikler må toksinet translokiseres til cytosol for å utøve sin effekt på ribosomene. Liganden og toksinet kan bindes til hverandre både gjennom kovalente (e.g. disulfidbindinger) og nonkovalente (e.g. biotin-avidin eller biotin-streptavidin binding) interaksjoner. Konjureringsmetoden er kritisk for å bevare toksinets aktivitet [2]. I tilfeller hvor liganden hindrer toksinets aktive sete må bindingen mellom dem brytes for at toksinet skal kunne hemme proteinsyntesen. IT'et fungerer da som et prodrug.



Figur 1.15: Reseptormediert opptak av terapeutisk immunotoksin.

Immunotoksinets målrettede del (antistoff) binder til reseptor i plasmamembranen (1). IT-reseptor komplekset internaliseres (2) og lokaliseres i endocytisk vesikkel (3). Toksinet må relokiseres til cytosol for å kunne utøve sin effekt på ribosomene (4a), ellers vil det degraderes av lysosomale hydrolaser (4b).

1.4.2.1 utfordringer med immunotoksiner i kreftterapi

Som tidligere nevnt har hovedfokuset ved utvikling og testing av IT'er vært på behandling av kreft. Sammenlignet med kjemoterapi burde IT'er vise fordeler i form av høy potens og toksisk effekt på både prolifererende og hvilende celler [60]. På tross av dette har behandling av solide tumorer med immunotoksiner så langt ikke vært særlig vellykket [59]. Dette skyldes delvis tumorfysiologi med stor avstand fra vaskulatur til målcellene og høyt interstitielt trykk som gir dårlig opptak og penetrasjon inn i tumorvev. Andre sentrale utfordringer er vist å være blant annet immunogenisitet, kort halveringstid og uspesifikk toksisitet [90]. Pasienter med solide tumorer som har intakt immunsystem danner antistoffer mot proteintoksiner fra bakterier og planter [89]. De immunologiske reaksjonene begrenser antall sykluser av behandlingen. En forutsetning for klinisk nytte av IT'er er høy spesifisitet for målcellene [92]. Vascular leak syndrome (VLS), hepatotoksitet og nyretoksitet er vanlige former for uønsket toksisitet av IT'er og skyldes henholdsvis IT's transport gjennom endotelceller, binding til hepatocytter og renal ekskresjon [90]. Uønsket toksisitet kan potensielt reduseres ved inkorporering av IT i biologisk nedbrytbare polymerer slik at toksinet unngår kontakt med reseptorer i normalt vev [97].

Bruk av rekombinante IT'er (produsert i bakterier) gir fordeler i form av økt homogenisitet, redusert molekylvekt, som potensielt kan øke tumorpenetrasjonen, og redusert immunogenisitet [98]. En ulempe ved bruk av rekombinante mAbs er at de mangler evne til å generere ADCC og CDC fordi Fc-delen mangler. En annen strategi for reduksjon av IT's immunogenisitet er kovalent binding til polyetylen glykol (PEG), som kan hindre at IT gjenkjennes av immunforsvaret, samtidig som at halveringstiden økes som følge av nedsatt renal ekskresjon [90]. Manglende frigjøring av toksinet fra endocytiske vesikler til cytosol med påfølgende degradering i lysosomer kan være en hindring for terapeutisk nytte og kreve høye doser av IT. I slike tilfeller vil levering av IT med PCI kunne gi økt selektivitet, potensielle effekten og tillate dosereduksjon med påfølgende reduksjon av dose-relaterte bivirkninger. Som følge av høy effektivitet kan antall behandlingssykluser reduseres, noe som kan

minske problemet med immunogenisitet. For økt cytotoxicitet av IT'er med PCI er det viktig at den målrettede liganden endocytoses effektivt i tumorceller [2].

KAPITTEL 2: MATERIALER OG METODER

2.1 Cellelinjer og dyrkningsmedium

Forsøkene i studien ble i hovedsak utført på to cancer mamma cellelinjer fra American Type Culture Collection med ulik ekspresjonsgrad av HER2 og EGFR1 (Tabell 2.1). Zr-75-1 (ATCC no.CRL-1500, epithelial ductal carcinom) er en HER2-positiv cellelinje med lav ekspresjon av EGFR. MDA-MB231 (ATCC no.HTB-26, human epithelial adenocarcinom) har lav ekspresjon av HER2 og ble derfor inkludert som negativ kontroll. Alt arbeid med celler i kultur ble utført med aseptiske arbeidsteknikker under sterile omgivelser i LAF-benk.

Tabell 2.1: Oversikt over cellelinjene som ble benyttet i studien

Cellelinje	Reseptorekspresjon		Medium	Splitt ratio	Opprinnelse	Type
	HER2	EGFR1				
Zr-75-1	+	Lav	RPMI 1640	1:2- 1:3	Human	Epithelial ductal carcinom
MDA- MB231	Lav	+	RPMI 1640	1:10- 2:10	Human	Epithelial adenocarcinom

Både Zr-75-1 og MDA-MB231 ble dyrket i RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplert med 10% føtalt kalveserum (GIBCO), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Penicillin-Streptomycin solution, Sigma-Aldrich) og 2mM glutamin (Sigma-Aldrich). Cellene ble dyrket i monolagkultur i 75 cm² vevskulturflasker (Nunclon) i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % v/v CO₂. All inkubasjon av celler ble også gjort under disse betingelsene. For å sikre adekvat tilførsel av næringsstoffer og vekstfaktorer ble medium skiftet jevnlig (ca hver andre dag).

2.2 Standardprosedyrer

2.2.1 Omsetting av celler

Ved omsetting av Zr-75-1 ble dyrkningsmediet sugd av, cellene ble vasket med 1 ml trypsin-EDTA løsning (Sigma-Aldrich) og behandlet med 1,5 ml trypsin-EDTA løsning i 2 minutter før de ble løst fra bunnen ved å slå på flasken. Trypsin bryter cellematrixforbindelser ved sin proteaseaktivitet, mens EDTA binder Ca^{2+} og bryter Ca^{2+} avhengige celle-celle adhesjoner. Dermed løsner cellene både fra hverandre og fra underlaget. Trypsin ble nøytralisert ved å tilsette 8,5 ml dyrkningsmedium og løsningen ble spylt noen ganger mot bakveggen vha en 10 ml-engangspipette. Cellesuspensjonen ble fordelt i nye 75 cm² flasker sammen med 18 ml medium i hver flaske. Tilsvarende prosedyre ble gjennomført for MDA-MB231, men disse cellene ble kun vasket én gang med 1 ml trypsin-EDTA og behandlet med 1,5 ml trypsin-EDTA i 1 minutt. Begge cellelinjene ble omsatt to ganger per uke med splitt ratio gitt i Tabell 2.1. Splitt ratio refererer til hvilken grad cellesuspensjonen fortynnes for hver passasje. Splitt ratio 1:3 betyr at cellesuspensjonen fra én flaske fordeles i tre nye flasker med samme størrelse som originalflasken.

2.2.2 Telling av celler

Celler i suspensjon etter trypsin-EDTA behandling ble overført til et 10 ml-rør og sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm (rates per minute). Cellene ble resuspendert vha en pasteurpipette og en dråpe ble overført til et tellekammer bestående av et rutenett med ni ruter (Glasstic®slide 10 with grids, HYPOR). Vha mikroskop ble cellene i tre diagonale ruter telt og gjennomsnittlig antall celler per rute ble multiplisert med 10^4 for å finne antall celler per ml suspensjon (hver av de ni rutene har et volum på 0,1 μl).

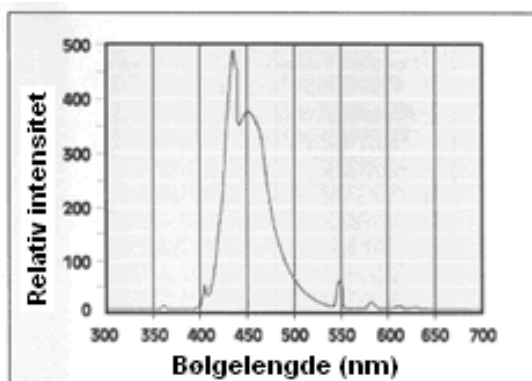
2.2.3 Utsåing av celler

Cellene ble sådd ut i 96 brønners-brett (Nunclon) i 100µl næringsmedium for viabilitetsmåling med MTT-assay. På bakgrunn av tetthetsforsøk ble det sådd ut 12 000 celler per brønn av Zr-75-1 og 20 000 celler per brønn av MDA-MB231. For høsting til Western blotting og parallelle kontroller til MTT-måling ble cellene sådd ut i 6-brønners brett (Nunclon) i 1,5ml næringsmedium. Celleantall per brønn var da 600 000 av Zr-75-1 og 400 000 av MDA-MB231. Begge cellelinjene ble inkubert i ca. 6 timer for at de skulle feste seg før videre behandling.

2.3 PDT og PCI in vitro

2.3.1 Lyskilde og fotosensitizer

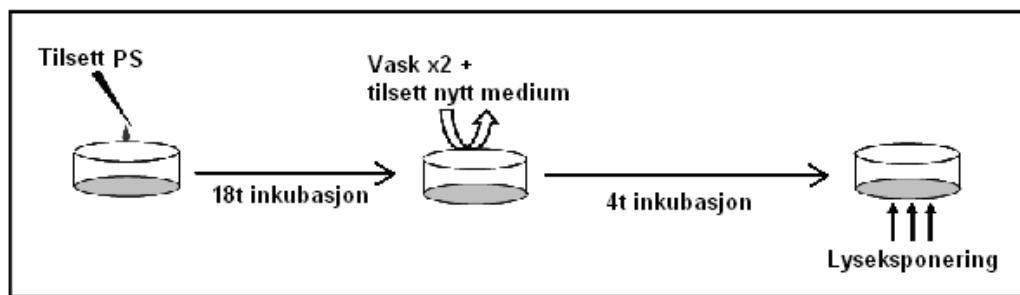
Lyskilden som ble benyttet i forsøkene (LumiSource®, PCI Biotech AS, Oslo) består av fire lysrør (18 W/rør, Osram L 18/67) som emitterer blått lys med en topp på ca. 435 nm (Figur 2.1). Lyskilden luftkjøles for å sikre stabil stråling og forhindre at cellene utsettes for hypertermi [3]. TPCS_{2a} (tetraphenylchlorin disulfonate) er en ny, patentert fotosensitizer (PS) utviklet av PCI Biotech (Oslo) (Avsnitt 1.1.1.3) som ble benyttet i alle PDT og PCI forsøkene (eksitasjons- og emisjonsspekter i Figur 1.3). TPCS_{2a} er formulert i Cremophor® ELP (BASF) i konsentrasjonen 30 mg/ml. Bruksskonsentrasjonen ble satt til 0,2 µg/ml på bakgrunn av tidligere forsøk. Alt arbeid med PS ble gjort under dempet belysning. Ved inkubasjon med PS ble brettene pakket inn i aluminiumsfolie.



Figur 2.1: Emisjonsspekter for LumiSource® (PCI Biotech AS, Oslo).

2.3.2 Prinsipp for behandling av celler med PDT

Etter at cellene som er sådd ut har festet seg tilsettes de PS i medium og inkuberes over natt i 18 timer (Figur 2.2). Dagen etter suges mediet av og cellene vaskes to ganger med friskt medium før de tilsettes nytt medium. Dette gjøres for å vaske bort PS som er bundet til plasmamembranen. Cellene inkuberes i 4 timer før de belyses med lampe som emitterer lys med riktig bølgelengde, tilsvarende PS's eksitasjonsspektrum.

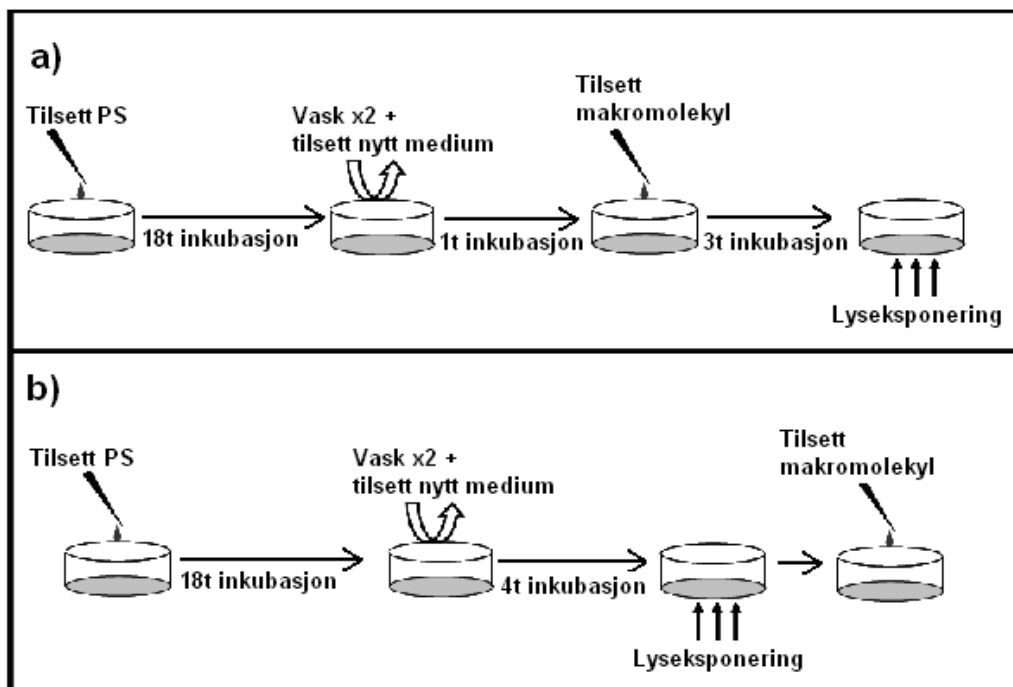


Figur 2.2: Generell prosedyre for PDT

2.3.3 Prinsipp for behandling av celler med PCI

PCI kan gjennomføres etter to strategier: ”Lys før” eller ”Lys etter” (beskrevet i Avsnitt 1.2.1). De fleste forsøkene i studien ble gjennomført med ”lys etter” strategi. Ved ”lys etter” strategi inkuberes cellene med en PS som lokaliseres i membranen av endocytiske vesikler og et makromolekyl som tas opp i de samme vesiklene (Figur 2.3 a). Cellene inkuberes med PS i 18 timer, før de vaskes to ganger med rent medium og nytt medium tilsettes. Cellene inkuberes så i fire nye timer før belysning.

Makromolekylet administreres til cellene før belysning, men kan tilsettes samtidig som PS eller ved et senere tidspunkt, avhengig av ønsket inkubasjonstid. Ved belysning aktiveres PS og skade på membranen gjør at det toksiske molekylet frigjøres til cytosol. Hovedprinsippet for ”lys før” strategien er at makromolekylet tilsettes først etter belysning (Figur 2.3 b). Behandling av cellene med PS, vask og inkubasjon i PS-fritt medium og belysning skjer imidlertid etter samme prosedyre som ved ”lys etter”.



Figur 2.3: Generell prosedyre for PCI.

a) illustrerer behandling av celler med "lys etter" strategi. Tidspunkt for tilsetting av makromolekylet varierer avhengig av ønsket inkubasjonstid. I dette eksempelet er inkubasjonstid for makromolekylet 3 timer. b) illustrerer behandling av celler etter "lys før" prinsippet. Tidsintervall fra lyseksponering til tilsetting av makromolekyl kan varieres.

I forsøkene ble flere toksiske molekyler evaluert for levering med PCI: Saporin (3 mg/ml, Sigma-Aldrich), Streptavidin-Saporin (1,3 mg/ml, Advanced Targeting Systems) og Trastuzumab-Saporin (immunotoksin av biotinylerert trastuzumab og streptavidin-saporin, Avsnitt 2.5).

2.4 Viabilitetsmåling med MTT-assay

2.4.1 Prinsipp for MTT-metoden

MTT er en kvantitativ kolorimetrisk test for måling av mitokondriell enzymaktivitet [99]. MTT, 3-[4,5-dimetyltiazol-2-y]-2,5-difenyltetrazolium bromid, er et vannløselig tetrazolium salt med svakt gul farge. Ved inkubasjon med levende, metabolsk aktive celler vil mitokondrielle enzymer redusere tetrazolium saltet og danne uløselige fiolette formazankrystaller. Det mitokondrielle enzymet succinat dehydrogenase er

ansvarlig for reduksjon av MTT. Ved tilsetning av DMSO (dimethyl sulfoxide) løses krystallene og en homogen løsning dannes. Også andre organiske løsninger kan benyttes. Et spektrofotometer måler den optiske tettheten i løsningen. Den målte absorbanse som funksjon av konsentrasjonen av formazankrystaller i løsningen korrelerer med antall metabolsk aktive celler.

2.4.2 Prosedyre for behandling av celler med PDT

96 brønners-brett

- Medium ble sugd av ca.6 timer etter utsåing av cellene.
- Brønnene med ubehandlede celler ble tilsatt 50 µl næringsmedium, mens brønnene hvor cellene skulle behandles med PDT ble tilsatt 50 µl av en løsning med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i næringsmedium.
- Cellene ble satt i inkubatorskap over natt i 18 timer.
- Dag 2 ble cellene ble vasket to omganger med 100 µl næringsmedium for å vaske bort overskudd av TPCS_{2a}, samt TPCS_{2a} på plasmamembranen.
- Nytt medium (100 µl) ble tilsatt og cellene ble inkubert i 4 timer.
- Cellene ble utsatt for varierende lysdoser fra LumiSource®.
- Cellene ble inkubert frem til celleviabiliteten ble målt ved MTT-assay ca. 48 timer etter belysning (Avsnitt 2.4.4).

Samme prosedyre ble brukt for behandling av celler i 6 brønners-brett med samme brukskonsentrasjon av TPCS_{2a}. Volum av medium for inkubasjon og vask var 1,5 ml.

2.4.3 Prosedyre for behandling av celler med PCI

2.4.3.1 PCI med "lys etter" strategi

- Medium ble sugd av ca.6 timer etter utsåing av celler i 96 brønners-brett.
- 50 µl løsning med aktuelle konsentrasjoner av TPCS_{2a} og makromolekyl ble tilsatt til cellene skulle behandles med PCI. I tillegg ble kontroller inkludert,

hvor brønnene kun ble tilsatt næringsmedium (ubehandlede celler), TPCS_{2a} (i henhold til prosedyre for PDT i Avsnitt 2.3.1) eller makromolekyl.

- Cellene ble inkubert over natt i 18 timer.
- Cellene ble vasket to ganger med 100 µl medium og inkubert 4 timer i 100 µl medium.
- Etter fire timer ble cellene eksponert for lys fra LumiSource®.
- 48 timer etter belysning ble celleviabiliteten målt vha MTT-assay (Avsnitt 2.4.4).

2.4.3.2 PCI etter ”lys først” prinsipp

- Medium ble sugd av ca.6 timer etter utsåing av celler i 96 brønners-brett.
- Cellene ble tilsatt 50 µl 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i medium. Noen av brønnene ble kun tilsatt medium (ubehandlede celler).
- Cellene ble inkubert i 18 timer.
- Cellene ble vasket to ganger med 100 µl medium og inkubert 4 timer i 100 µl medium.
- Etter fire timer ble cellene eksponert for lys fra LumiSource®.
- Mediet ble sugd av rett etter lyseksponering og medium med makromolekyl ble tilsatt.
- Celleviabiliteten ble målt vha MTT-assay 48 timer etter belysning (Avsnitt 2.4.4).

2.4.4 Prosedyre for MTT-assay

MTT-assay ble gjennomført 48 timer etter belysning for både Zr-75-1 og MDA-MB231 cellene.

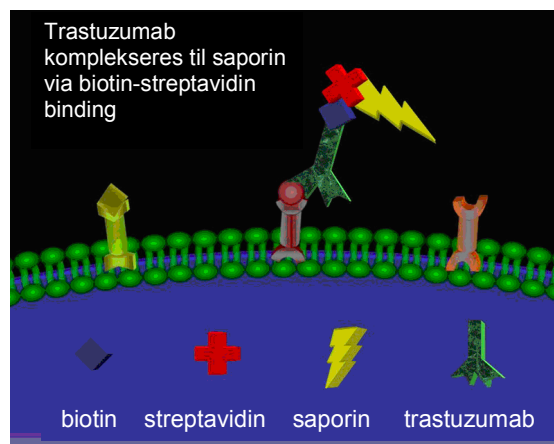
- Medium ble sugd av i 96 brønners-brett og 100 µl 0,25mg/ml MTT (Sigma-Aldrich) i medium ble tilsatt i hver brønn.
- I tillegg ble MTT-løsningen tilsatt i en hel kolonne som ”blank” referanse.

- Cellene ble inkubert i 1-3,5 timer avhengig av hvor raskt formazankrystallene ble dannet.
- MTT-løsningen ble sugd av og 100 µl dimetyl sulfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich) ble tilsatt i hver av brønnene.
- Platene ble ristet i 5 min for å gi en homogen løsning.
- Absorbansen ble målt med multibrønn spektrofotometer scanner, enten ved 570 nm med Original Multiscan EX Labsystems (Global Medical Instrumentation) eller ved 595 nm med Sunrise™ (Tecan). Ved bruk av Sunrise™ ble resultatene behandlet i softwareprogrammet Magellan™ (Tecan).
- Celleviabiliteten ble beregnet ved å måle absorbans relativt til de ubehandlede cellene.

I forsøk der MTT-assay ble kjørt parallelt med Western blotting som kontroll for celleviabilitet ble cellene sådd ut i 6 brønners-brett. Volum av både 0,25 mg/ml MTT i medium og DMSO ble da økt til 1,5 ml. 50 µl fra hver brønn ble pipettert ut til et 96-brønners brett som så ble analysert spektrofotometrisk.

2.5 Tillaging av trastuzumab-saporin immunotoksin

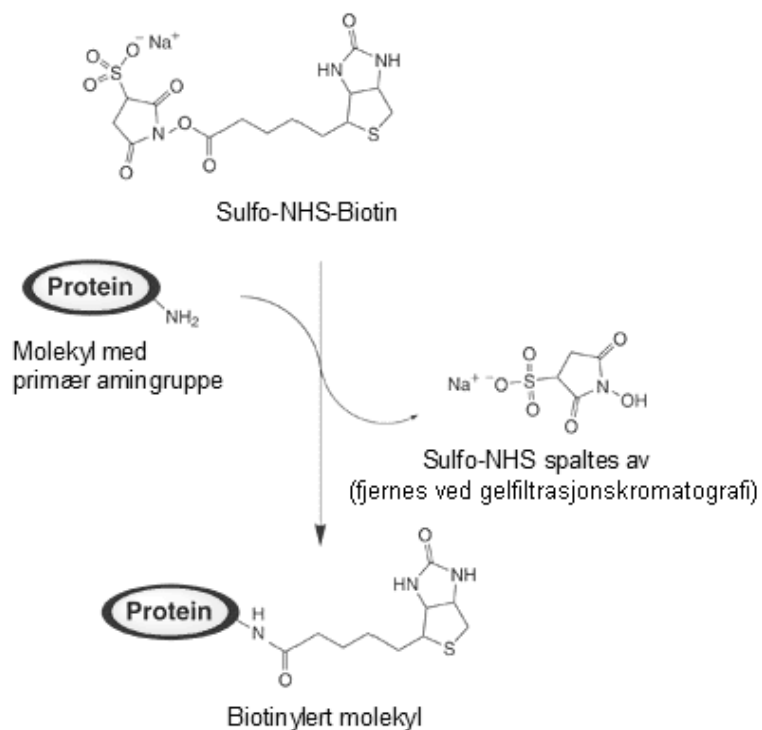
Hovedmålet for oppgaven er å lage et målrettet immunotoksin (IT) mot HER2 som skal evalueres for intracellulær levering med PCI. Immunotoksinet etableres ved å kompleksere trastuzumab (Herceptin®), et HER2-rettet mAb, til saporin, et type 1 RIP, via biotin-streptavidin binding (Figur 2.4).



Figur 2.4: Kompleksering av trastuzumab til saporin via biotin-streptavidin binding[100].

2.5.1 Biotinylering av Trastuzumab

Konjugering av biotin til antistoffet er første steg i tillaging av immunotoksinet. Biotin (også kjent som vitamin H) er et lite molekyl (244 Da) som vanligvis ikke endrer egenskapene til makromolekylene som biotinyleres[101]. Til biotinyleringen benyttes sulfo-NHS-biotin (EZ-Link Sulfo-NHS-biotin, Pierce). NHS-aktiverte biotiner reagerer med primære aminer og danner stabile amidbindinger (Figur 2.5). Primære aminer finnes i sidekjeden av lysin og på den N-terminale enden av proteiner. Prosedyren som ble fulgt var utarbeidet av M. Roederer og basert på en protokoll av Aaron Kantor[102].



Figur 2.5: Prinsipp for biotinylering av trastuzumab.

NHS-aktivert biotin reagerer med et primært amin og danner amidbinding[103].

2.5.2 Prosedyre for biotinylering av trastuzumab

- 0,190 ml (tilsvarende 4mg trastuzumab) ble pipettert ut av et hetteglass Herceptin® (Roche) med konsentrasjonen 21 mg/ml og fortynnet til 2 mg/ml med 1,810 ml destillert vann.
- 2 mg sulfo-NHS-biotin ble løst i 200 µl DMSO 99,9% anhydrat.
- 32 µl av løsningen med sulfo-NHS-biotin i DMSO ble tilsatt til 2 ml av løsningen med 2 mg/ml trastuzumab (tilsvarende 80 µg biotin per mg trastuzumab)
- Blandingen ble inkubert på vippe ved romtemperatur i ca.2,5 timer.

2.5.3 Rensing av biotin-trastuzumab ved gelfiltrasjonskromatografi

En kolonne av typen Sephadex G-25M (Amersham) ble brukt til å fjerne ikke-konjugert sulfo-NHS-biotin fra løsningen av biotin-trastuzumab.

- 25 ml storagebuffer (oppskrift; Appendiks) ble brukt for kondisjonering av kolonnen.
- Før filtrering gjennom kolonnen ble røret med trastuzumab og biotin tilsatt 0,468 ml storagebuffer til et totalt prøvevolum på 2,5 ml.
- Prøven ble applisert i kolonnen.
- Nye 3,5 ml storagebuffer ble tilsatt i mindre porsjoner som elueringsbuffer. Fraksjoner på 15 dråper ble samlet i 1,8ml-Eppendorfrør (Eppendorf).
- Absorbans av fraksjonene ble målt ved 280 nm ved å fortynne 100 µl prøve med 100 µl storagebuffer.
- For å eluere ut alt tilsatt antistoff ble mer storagebuffer tilsatt til kolonnen. Fraksjonene ble samlet opp på tilsvarende måte som de første rørene og absorbans ble målt.

2.5.4 Kvantifisering av biotinylert trastuzumab

Konsentrasjon av trastuzumab i de sammenslåtte elueringsfraksjonene ble bestemt vha spektrofotometri.

Prosedyre for kvantifisering av trastuzumab:

- Det ble laget en fortynningsrekke av trastuzumab (Herceptin®) i destillert vann. Dette gav standardløsninger med konsentrasjoner fra 0,75 μM til 12 μM .
- Destillert vann ble benyttet som blankprøve. Så ble absorbans målt for alle løsningene med tre paralleller av hver.
- En standardkurve ble laget med absorbans plottet mot konsentrasjon av trastuzumab.
- Absorbans av løsningen med de sammenslåtte elueringsfraksjonene ble målt. Konsentrasjon av trastuzumab i løsningen ble bestemt ut fra standardkurven.

Det ble antatt at alt trastuzumab var biotinylert. For å bestemme mengde biotin per mol trastuzumab i biotinyleringsproduktet ble Pierce biotinylation quantitation kit (Pierce) benyttet[104]. Kitet inneholder en ferdig reagens med en blanding av HABA (4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid) og avidin. HABA-avidin komplekset absorberer lys med en bølgelengde på 500 nm. Hvert biotin kan binde ett molekyl avidin. Når biotin tilsettes vil det fortrenge HABA og binde til avidin. Absorbansen synker da proporsjonalt, dvs. endring i absorbans korrelerer med mengde biotin.

Prosedyre for kvantifisering av biotin:

- No-Weigh™ HABA/Avidin Premix ble varmet til romtemperatur. Et mikrorør med No-Weigh HABA/Avidin Premix ble tilsatt 100 μl destillert vann og løsningen ble blandet vha en automatpipette.
- 800 μl PBS ble tilsatt i en 1 ml kyvette og brukt som blankprøve for absorbansmåling med Ultrospec™ 2100 *pro* UV/Visible Spectrophotometer (GE Healthcare).
- 100 μl av løsningen med No-Weigh HABA/Avidin Premix og vann ble tilsatt til kyvetten og blandet godt med PBS.
- Absorbans av blandingen ble målt ved 500 nm (gir A_{500} HABA/Avidin).

- 100 μl prøve (biotinylert trastuzumab) ble tilsatt til kyvetten og blandet godt.
- Absorbans ble målt ved 500 nm i flere omganger til verdien hadde stabilisert seg i minst 15 sekunder (gir A_{500} HABA/Avidin/Biotin prøve).
- Tilsvarende prosedyre ble gjennomført som positiv kontroll med tilsetning av 100 μl biotinylert HRP (ImmunoPure® Biotinylated Horseradish Peroxidase (40 kDa), 5 mg) i stedet for biotinylert trastuzumab.
- Antall mol biotin per mol trastuzumab ble kalkulert basert på Beer-Lamberts lov: $A = \epsilon l C$, hvor A er absorbansen, ϵ er molar ekstinksjonskoeffisient (for HABA/Avidin-prøver ved 500 nm og pH 7,0 er denne $34\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), l er lengden av lysveien (cm) og C er konsentrasjon av løsningen (M).
- Det biotinylerte antistoffet ble lagret i kjøleskap frem til videre kompleksering til streptavidin-saporin.

2.5.5 Kompleksring av biotinylert Trastuzumab til Streptavidin-Saporin

Streptavidin, isolert fra *Streptomyces avidinii*, er en ikke-glykosylert tetramer med molekylær vekt på 53 kDa. Hver av de fire subenhetene har ett bindingssete for biotin. Affinitetskonstanten for binding mellom biotin og streptavidin er meget høy ($10^{15}\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) og komplekset som dannes er derfor svært stabilt[101]. Streptavidin-ZAP (Advanced Targeting Systems), et konjugat som består av to saporin per streptavidin, ble benyttet. Konjugatet har en molekylær vekt på 128 kDa og er løst i PBS i konsentrasjonen 1,3 mg/ml, som tilsvarer $1,0 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

Prosedyre:

- 43,3 μl av prøven med biotinylert trastuzumab ble blandet med 6,68 μl streptavidin-ZAP. Dette gir mol ratio 4:1 (hvert molekyl av streptavidin har fire bindingsseter for biotin) og totalvolum 50 μl .
- Løsningen ble vortexet i 3 minutter og fordelt i fem Eppendorfrør med 10 μl i hvert av rørene.
- På grunn av den høye bindingsaffiniteten mellom biotin og streptavidin antas reaksjonen å være fullstendig og danner et immunotoksin bestående av 1 molekyl streptavidin, 2 molekyler saporin og 4 molekyler biotin-trastuzumab.

- Det ble også tilberedt en kontrolløsning av streptavidin-saporin hvor 43,3 μl PBS ble tilsatt til 6,68 μl Streptavidin-ZAP. Kontrolløsningen ble fordelt i fem Eppendorfrør.
- Løsningene ble lagret ved -80°C .

2.5.6 Blokkering av HER2 med trastuzumab før PCI av trastuzumab-saporin

Fritt trastuzumab ble administrert til cellene i forkant av behandling med trastuzumab-saporin. Trastuzumab binder til HER2 og kan blokkere påfølgende binding av immunotoksinet til samme reseptor. Redusert celledrap med immunotoksin som følge av blokkeringen kan si noe om viktigheten av immunotoksinets HER2-spesifisitet.

Prosedyre:

- Cellene ble telt, sådd ut og inkubert med 50 μl 0,2 $\mu\text{g/ml}$ TPCS_{2a} i 18 timer som beskrevet i Avsnitt 2.4.2.
- Etter to ganger vask med 100 μl medium ble cellene tilsatt 50 μl $2,72 \cdot 10^{-8}$ M trastuzumab i medium. En kontrollserie ble tilsatt rent medium.
- Etter 1 time inkubasjon ble cellene tilsatt 50 μl $1,36 \cdot 10^{-9}$ M trastuzumab-saporin (eller streptavidin-streptavidin) i medium. I brønnene hvor trastuzumab og immunotoksin ble koinkubert var mol ratio 1:20 med overskudd av fritt trastuzumab.
- Cellene ble inkubert i nye 3 timer før de ble belyst med LumiSource®, dvs. 4 timer totalt fra vask til belysning.
- Celleviabiliteten ble målt vha. MTT-assay 48 timer etter belysning.

2.6 Western blotting

Western blotting er en metode for deteksjon av spesifikke proteiner i celleprøver. Den kan benyttes både til kvalitativ og kvantitativ analyse. Metoden inkluderer separasjon av proteinene ved gelelektroforese (Avsnitt 2.6.3) og overføring av proteinene til

membran (blotting, Avsnitt 2.6.4) hvor de kan detekteres vha antistoffer som er spesifikke for de enkelte proteinene. Western blotting ble i oppgaven brukt til å analysere reseptornivå i behandlede og ubehandlede celler.

De ulike stegene ved utførelse av metoden:

- 1) Prøveopparbeidelse (Avsnitt 2.6.1)
- 2) Spektrofotometrisk bestemmelse av relativ proteinmengde i cellelysatsene (Avsnitt 2.6.2)
- 3) Gelelektroforese (Avsnitt 2.6.3)
- 4) Overføring av proteiner til membran (blotting, Avsnitt 2.6.4)
- 5) Inkubasjon med antistoffer (Avsnitt 2.6.5)
- 6) Inkubasjon med chemiluminescent substrat og analyse av membran (Avsnitt 2.6.6)

2.6.1 Prøveopparbeidelse

Cellene ble lysert vha en lysesbuffer (oppskrift; Appendiks). Denne inneholder blant annet protease- og fosfatasehemmere som forhindrer at enzymer i prøven kløyver eller defosforylerer proteinene. Prøveopparbeidelsen ble gjort med cellene på is for å stanse cellulære prosesser.

Prosedyre:

- Cellene ble sådd ut i 6-brønners brett og behandlet som beskrevet andre steder i Kapittel 2; Materialer og metoder. Antall celler sådd ut per brønn var 600 000 for Zr-75-1, 300 000 for MDA-MB231 og 400 000 for BT-20 og A-431 (de to siste ble inkludert som kontroller). Volum per brønn var 1,5 ml.
- I de cellene hvor man skulle se på fosforylert form av EGFR (Y1068) ble cellene stimulert med EGF i konsentrasjonen 100 ng/ml i 2 minutter før høsting av cellene. Dette ble gjort ved å fortynne 2 µg/ml EGF i medium i forholdet 1:100 og overføre 7,5 µl til hver av brønnene med 1,5 ml medium.

Væsken ble så sugd opp og skylt ut forsiktig to ganger med en 1ml-automatpipette for å gi en mest mulig homogen løsning.

- Skålene ble satt på is for å stanse cellulære prosesser.
- Mediet ble sugd av og cellene ble vasket med 1 ml iskald PBS per brønn.
- PBS ble sugd av og 50 µl lyseringsbuffer (oppskrift; Appendiks) ble tilsatt i hver av brønnene. Brettet ble vendt på til en seig masse av celler kunne sees.
- Cellene ble overført til 1,8 ml Eppendorfrør vha celledraske og pipette.
- 0,3 µl benzonase ble tilsatt til røret før det ble satt på is i noen minutter.
- Etter vortex og nedspinning ble cellelysaten fordelt i 1,8 ml Eppendorfrør; 10 µl til ett rør for DNA-måling og 50 µl til de resterende rørene.
- Cellelysaten ble lagret ved -80°C.

2.6.2 Spektrofotometrisk bestemmelse av relativ proteinmengde i prøvene

For å kunne sammenligne proteinmengden i de ulike prøvene i samme gel ble mengde DNA kvantifisert på forhånd.

Prosedyre:

- Rørene som inneholdt 10 µl lysat ble tilsatt 490 µl dH₂O (gir fortynningsfaktor 50), vortexet og spunnet ned.
- Ultrospec™ 2100 *pro* UV/Visible Spectrophotometer (GE Healthcare) ble brukt til å måle DNA.
- Måleapparatet ble først nullstilt med en blankprøve (dH₂O).
- Kyvetten ble vasket to ganger med prøve før analyse og det ble gjort tre målinger à 100 µl for hver av prøvene.
- Gjennomsnittlig DNA ble regnet ut og appliseringsvolum for hvert av lysatene ble beregnet slik at det relativt sett ble applisert samme DNA-mengde i hver brønn. Dette ble gjort ved å dividere max appliseringsvolum (satt til 45 µl) på gjennomsnittlig målte DNA-verdi for den aktuelle prøven, og multiplisere med gjennomsnittlig DNA-verdi for den minst konsentrerte prøven.

Eksempel: To prøver med gjennomsnittsmålingene 93 og 105,5. Maks. volum settes til 45 μl (for prøven med lavest gjennomsnittsverdi). Appliseringsvolum for prøven med høyest gjennomsnittsverdi blir da $(45 \mu\text{l} / 105,5) \cdot 93 = 39,7 \mu\text{l}$.

2.6.3 Gelelektroforese (SDS-PAGE)

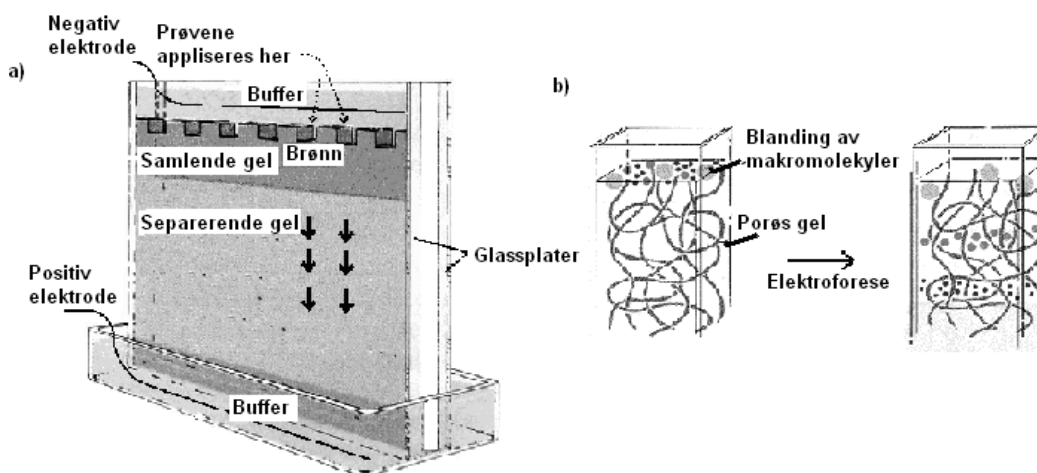
SDS-PAGE (SDS polyacrylamide-gel electrophoresis) er en teknikk for separasjon av proteiner under påvirkning av et elektrisk felt. Proteinene vandrer gjennom en gel av polyakrylamid (oppskrift; Appendiks). Gelen dannes ved polymerisering av akrylamid monomerer, en prosess som katalyseres av ammonium persulfate (APS, GE Healthcare) og tetrametyletylendiamin (TEMED, Bio-Rad). Størrelsen på porene i gelen reduseres med økende konsentrasjon av akrylamid, og denne justeres etter størrelsen på proteinene man ønsker å separere (Tabell 2.2). SDS (sodium dodecyl sulfat), som er sterkt negativt ladet, binder til hydrofobe deler av proteinene. Dette fører til at proteinene foldes ut og frigjøres fra andre proteiner eller fettmolekyler, samt at denaturerte polypeptider får en negativ ladning.

Tabell 2.2: Akrylamidinnhold i separating gel bestemmes ut fra proteinenes molekylvekt

Protein molekylvekt (kDa)	Innhold av akrylamid
< 40	15 %
40-175	12 %
> 175	7,5 %

Systemet består av to geler som begge er bufret med Tris-HCl. Den øvre gelen (samlende gel, oppskrift; Appendiks) har lavere innhold av akrylamid og pH som ligger to enheter lavere enn i den nedre gelen (separerende gel, oppskrift; Appendiks). Prøvene appliseres i brønner og forholdene i den samlende gelen gjør at de konsentreres i smale bånd før de kommer til separeringsgelen hvor proteinene separeres. Når de negativt ladede proteinene utsettes for et elektrisk felt vil de vandre mot den positive elektroden (Figur 2.6 a). Proteiner med samme størrelse vil vandre med samme hastighet, fordi de er foldet ut (gir lik form) og binder samme mengde SDS (gir lik negativ ladning) [105]. Mindre proteiner vil vandre raskere gjennom

gelen (Figur 2.6 b). Større proteiner utsettes for større elektriske krefter, men retardasjon som følge av porestørrelsen gjør at de mindre proteinene likevel migrerer lengst. Proteinene vises som bånd i gelen inndelt etter molekylvekt. En molekylvektstandard appliseres i en av brønnene og vha denne kan man bestemme størrelsen på proteinene som detekteres.



Figur 2.6: Gelelektroforese.

a) Forenklet illustrasjon av oppsett for SDS-PAGE, b) Proteiner med ulik størrelse vandrer med ulik hastighet gjennom polyakrylamid gel[106;107].

Utstyr i serien Mini PROTEAN® System (Bio-Rad) ble brukt til gelelektroforese. Gelen har størrelsen 7,5 x 10 cm.

Prosedyre:

- Ytterglass og dekkglass (Bio-Rad) ble vasket med 70 % etanol og satt sammen i stativ (casting stand, Bio-Rad). Separerende og samlende gel ble laget etter ”hjemmelaget” oppskrift (Appendiks). Prosentinnhold av polyakrylamid ble bestemt ut fra molekylvekten av proteinene som skulle undersøkes (Tabell 2.6.1).
- Separerende gel (8,3 x 4,7 cm) ble støpt først og ble stående for polymerisering i minst 30 minutter med 1 ml iso-butanol applisert forsiktig over den separerende gelen.
- Iso-butanol ble helt av og gelen ble vasket 4-5 ganger med dH₂O. Overflødig dH₂O ble tørket bort forsiktig med et filterpapir.

- Samlende gel ble helt over helt opp til kanten av glassplatene (til total høyde 8,2 cm) og en gel-kam (som gir 10 brønner) ble satt på forsiktig slik at luftbobler ikke oppsto. Gelen ble stående for polymerisering i 15-20 minutter.
- 1x elektroforesebuffer (oppskrift; Appendiks) ble laget i mellomtiden.
- Prøvene ble kokt i 5 minutter ved 95 °C på varmeblokk, nedkjølt på is, vortexet og spunnet ned.
- Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) ble satt sammen og fylt opp med 1x elektroforesebuffer (helt fullt i indre kammer, 30% i ytre kammer).
- Gel-kammene ble tatt forsiktig opp av brønnene og brønnene ble skylt med 1x elektroforesebuffer vha en 1ml-pipette.
- Prøvene ble applisert med volum i henhold til relativ proteinmengde (Avsnitt 2.6.2). 8 µl Precision Plus Protein Western C Standards (Bio-Rad) ble applisert i en av brønnene som molekylvektstandard. I de tomme brønnene ble 30 µl lyseringsbuffer (1:2 fortykning) applisert.
- Lokk ble satt på elektroforesecellene og karet rundt beholderen ble fylt opp med is. Gelelektroforese ble gjennomført ved 200 V (400 mA) i 45 min eller til man kunne se at prøvebåndene hadde vandret hele veien gjennom gelen. PowerPac HC power supply (Bio-Rad) ble brukt som strømkilde.

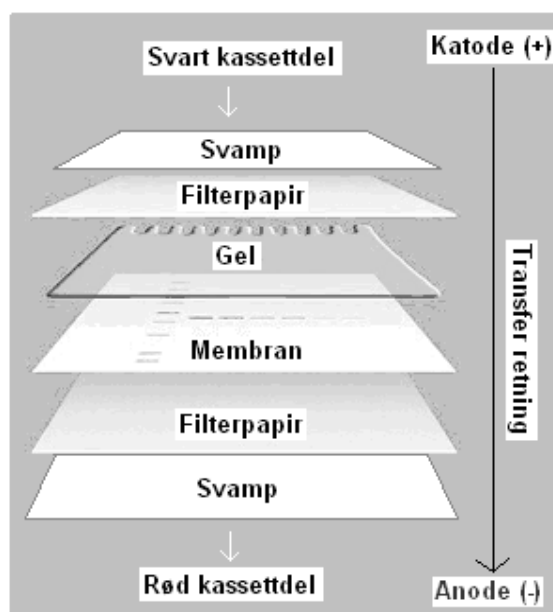
2.6.4 Overføring av proteiner til membran (blotting)

Etter separasjon overføres proteinene fra gelen til en PVDF (polyvinylidene difluoride) HybondTM-P transfermembran (GE Healthcare) vha elektrisk spenning. Membranen er hydrofob med en porestørrelse på 0,45 µm og binder like effektivt til alle proteiner. Utstyret som brukt var Mini Trans-Blot Celle eller Trans-Blot Celle (Bio-Rad), som hver kan blotte henholdsvis to eller fire geler à 7,5 x 10 cm over til membran.

Prosedyre:

- PVDF membranene ble klippet i øvre høyre hjørne (for å markere brønn nr.1), dynket i metanol og lagt i transferbuffer (oppskrift; Appendiks) på vippe.

- Glassplatene ble skilt og den samlende gelen ble separert fra den separerende gelen som ble lagt i transferbuffer på vippe.
- Absorberende filterpapir (7,5 x 10 cm) og svamper ble dynket i transferbuffer. Transfercellen ble satt sammen i denne rekkefølgen: Svart kassettdel-svamp-filterpapir-gel-membran-filterpapir-svamp (2x i stor kassettdel)-rød kassettdel (Figur 2.7).
- En pipette ble rullet over det øverste filterpapiret for å fjerne luftbobler.
- Temperaturen under blottingen ble regulert med Bio-Ice cooling unit (Bio-Rad). Overføring til membran ble gjennomført med magnet i kammeret ved ~100V (400mA) i 60 min for lite kammer eller ~50V (400 mA) i 120 min for stort kammer. PowerPac HC power supply (Bio-Rad) ble brukt som strømkilde.



Figur 2.7: Sammensetning av transfercellen ved blotting.

2.6.5 Inkubering med antistoffer

Proteinene detekteres vha binding til spesifikke antistoffer. Prosessen foregår i to steg. Første steg er inkubasjon med et primært antistoff som er spesifikt for det aktuelle proteinet. Andre steg er inkubasjon med et sekundært antistoff (spesifikt for arten som

det primære antistoffet er hentet fra) som er merket med enzymet horse radish peroxidase (HRP). For å forhindre uspesifikke interaksjoner mellom membranen og antistoffene blokkeres uspesifikk binding til membranen på forhånd. Dette gjøres med en løsning av 5 % tørrmelk i TTBS (oppskrift; Appendiks).

Prosedyre:

- Membranene ble skilt fra gelen og tatt over i 50ml-rør hvor de ble skylt kjapt med ca 5 ml TTBS (oppskrift; Appendiks).
- 15 ml 5 % tørrmelk i TTBS ble tilsatt for blokkering i 1 time ved romtemperatur.
- Membranene ble inkubert med primært antistoff over natt ved 4 °C. Oversikt over konsentrasjon og inkuberingsbuffer for antistoffene som ble brukt er gitt i Tabell 2.3. Ved inkubasjon i BSA (bovine serum albumin, 5% BSA i TTBS) ble membranene skylt kjapt i TTBS før tilsetning av løsning med antistoff.
- Dagen etter ble membranene vasket tre omganger à 5 minutter med 20 ml TTBS.
- Membranene ble inkubert med sekundært antistoff (konsentrasjon gitt i Tabell 2.3) og 1 µl precision-protein StrepTactin HRP conjugate (Bio-Rad) i 10 ml melk i 1 time ved romtemperatur.

Tabell 2.3: Oversikt over primære antistoffer*og sekundære antistoffer brukt i forsøket**

Primært Antistoff	M_w	Konsentrasjon (volum / 5ml)	Inkuberings-buffer	Sekundært antistoff	Konsentrasjon (volum / 10ml)
EGFR-total	175 kDa	1:2000 (2,5 µl)	BSA	Anti-kanin	1:2000 (5 µl)
EGFR-P (Y1068)	175 kDa	1:2000 (2,5 µl)	Melk	Anti-mus	1:1000 (10 µl)
HER2-total	185 kDa	1:1000 (5 µl)	BSA	Anti-kanin	1:2000 (5 µl)
HER2-P (Y1221/1222)	185 kDa	1:1000 (5 µl)	BSA	Anti-kanin	1:2000 (5 µl)

(*, ** fra Cell Signaling Technology)

2.6.6 Inkubasjon med chemiluminescent substrat og analyse av membran

For deteksjon av signalene benyttes luminol, et chemiluminescent substrat. I reaksjon med horse radish peroxidase (HRP) produseres luminescence proporsjonalt med mengden av protein på membranen. Dette danner grunnlag for semikvantitativ analyse av resultatet (dvs. et begrenset antall svarmuligheter foreligger langs en ikke-kontinuerlig skala). Proteinene analyseres kvalitativt ved å sammenligne med båndene i molekylvektstandarden med kjent molekylvekt.

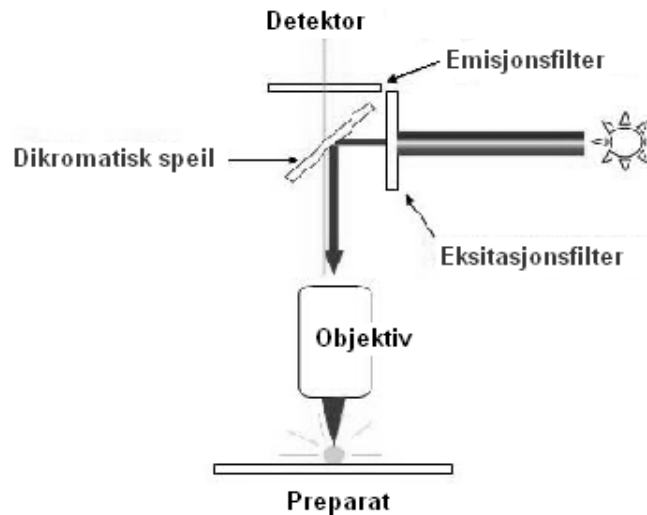
Prosedyre:

- Membranene ble vasket fem omganger à 5 minutter med 10-15 ml TTBS.
- Membranene ble så inkubert i 5 minutter med en løsning av 1,5 ml Luminol/Enhancer Solution + 1,5 ml Peroxide Buffer, som utgjør Immun-Star™ Western C™ Kit (Bio-Rad).
- Etter inkubering ble membranene lagt mellom to transparente ark, luftboblene ble tørket forsiktig bort og membranene ble plassert i en Phosphor Screen for å beskytte dem mot lys.
- Membranene ble analysert vha av et cooled charge-coupled device (CCD) kamera i ChemiDoc-It™ Imaging System (Bio-Rad), et instrument som detekterer luminescens. Resultatene ble analysert og bearbeidet i softwareprogrammet Quantity One (Bio-Rad).

2.7 Fluorescensmikroskopi

Til fluorescensmålingene ble det brukt et Zeiss Axioplan epifluorescens og fasekontrastmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Tyskland). Mikroskopet er blant annet utstyrt med eksitasjonskilde, eksitasjonsfilter, dikromatisk speil og emisjonsfilter som sørger for at kun lys med ønsket bølgelengde slippes gjennom objektivet til preparatet og herfra opp til detektoren (Figur 2.8). Filtrene ble tilpasset eksitasjons- og emisjonsspekteret til forbindelsen som skulle undersøkes. Eksitasjonskilden i

mikroskopet er en kvikksølvlampe (HBO 100W) og denne må etter tenning være på i minst 20 minutter før den skrues av igjen. Fluorescens- og fasekontrastbilder ble tatt med et cooled charge-coupled device (CCD) kamera (Astromed 3200, Astromed, Cambridge, UK) og resultatene ble analysert og bearbeidet ved bruk av AnalySIS^D Soft Imaging System (Olympus, Hamburg, Tyskland). Mikroskoperingen ble gjennomført med lyset i rommet avskrudd.



Figur 2.8: Forenklet framstilling av epifluorescens- og fasekontrastmikroskop.

Eksitasjonsfilteret er et bandpassfilter som filtrerer lyset fra lyskilden (kvikksølvlampe) slik at kun lys mellom to bølgelengder slippes gjennom. Bølgelengdeområdet som brukes tilpasses den fluorescerende forbindelsens eksitasjonsspekter. Et dikromatisk speil (beam splitter) spalter lyset slik at noe lys slippes gjennom, mens andre deler av lysspekteret speiles videre. Emisjonsfilteret filtrerer lyset som kommer fra preparatet og skal sendes til detektoren slik at det emitterte lyset separeres fra eksitasjonslys med lavere bølgelengde. Emisjonsfilteret kan være et langpassfilter som slipper gjennom alt lys over en viss bølgelengde.

2.7.1 Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}

Fluorescensmikroskopi ble brukt til å studere intracellulær lokalisering av TPCS_{2a} (struktur; Figur 1.3), TPCS_{2a} karakteriseres som en fluorescerende forbindelse ved at den opptar energi i form av lys med bestemte bølgelengder (eksitasjon) og avgir energi som lys med en høyere bølgelengde (emisjon) (spekter; Figur 1.3).

Fotosensitizerens lokalisering ble studert etter inkubasjon i 18 timer og etter påfølgende vask og inkubering i rent medium i 4 timer.

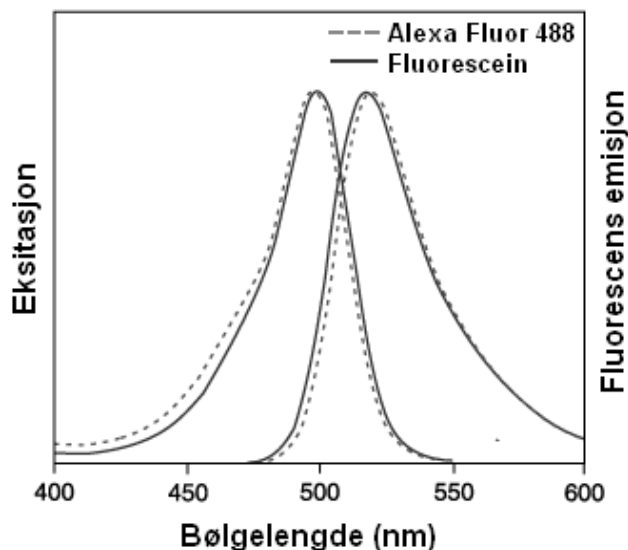
Prosedyre:

- 2 ml cellesuspensjon ble sådd ut i tre Falcon 3001 skåler ettermiddag dag 1 (BD). Tetthet ved utsåing var 100 000 celler per brønn ($\sim 10\,000$ celler/cm²).
- Ettermiddag dag 3 ble medium sugd av. Skål 1 og 2 ble tilsatt 2 ml 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i medium, mens den tredje ble tilsatt 2 ml friskt medium. Cellene ble inkubert i 18 timer over natt.
- Dag 4: Cellene som skulle studeres uten behandling (skål 3) og etter 18 timer inkubasjon med TPCS_{2a} (skål 2) ble vasket to ganger med 1 ml kald 1x løsning av PBS (oppskrift; Appendiks) før nye 1 ml av samme løsning ble tilsatt. Cellene i skål 1 ble vasket to ganger med 1 ml friskt medium og tilsatt 2 ml medium for inkubering i 4 timer. Samme prosedyre for vask med PBS ble fulgt for disse cellene etter at de fire timene var gått.
- Den overflødige væsken i skålene ble sugd av med en pasteurpipette og et dekkglass ble lagt forsiktig opp i skålen.
- Cellene ble undersøkt vha et 40x nonimmersjonsobjektiv supplert med 2,5x forstørrelse.
- Et 395-440 nm eksitasjonsfilter, 460 nm dikromatisk speil (beam splitter) og 610 nm emisjonsfilter ble brukt ved fluorescensmikroskopering av TPCS_{2a}.
- Fluorescens- og fasekontrastbilder ble tatt med fokuseringstiden satt til 1 sekund ved deteksjon av fluorescens og 0,1 sekund for fasekontrast.

2.7.2 Intracellulært opptak av trastuzumab etter PCI behandling ("lys før")

Lokalisering av trastuzumab ble undersøkt i ubehandlede celler og celler behandlet med PCI etter "lys før"-strategi. Siden trastuzumab ikke selv fluorescerer ble biotinyllert trastuzumab kompleksert med fluorescensmerket streptavidin (Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Molecular Probes) for å kunne undersøke lokalisering i cellene vha fluorescensmikroskopi. Alexa488 har nesten

sammenfallende spektralegenskaper med fluorescein (Figur 2.9), men sammenlignet med fluorescein har konjugater med Alexa488 flere fordeler, som intens fluorescens, høy fotostabilitet og lav pH-sensitivitet. Alexa488-merket trastuzumab-biotin-streptavidin viser maksimal eksitasjon ved ca. 495 nm og maksimal emisjon ved ca. 519 nm.



Figur 2.9: Eksitasjons- og emisjonsspekter for fluorescein IgG antistoff (—) og Alexa fluor 488 IgG antistoff (---) [108].

Prosedyre:

- Zr-75-1 celler ble sådd ut i 8 well Permanox® Slides (Lab-Tek® Chamber Slide™ System, Nalge Nunc) med 10 000 celler per brønn i 200 µl RPMI 1640 medium.
- Etter 6 timer ble cellene tilsatt 50 µl 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i medium og inkubert over natt i 18 timer.
- Dagen etter ble cellene ble vasket to ganger med 200 µl medium og inkubert i 200 µl medium i 4 timer.
- Cellene ble eksponert i 4,5 minutter med lys fra LumiSource®.
- Umiddelbart etter belysning ble medium i alle brønnene sugd av og både de behandlede og de ubehandlede cellene ble tilsatt 100 µl 100 nM Alexa488-merket trastuzumab-biotin-streptavidin i medium.

- Cellene ble inkubert i 3 timer.
- Etter inkubasjon ble cellene vasket 3x med kald 1x løsning av PBS og kammerene og rutenettet av silikon ble fjernet fra bunnplaten. Et dekkglass ble forsiktig lagt over bunnplaten med cellene på.
- Cellene ble undersøkt vha et 40x nonimmersjonsobjektiv supplert med 2,5x forstørrelse.
- Et 450-490 nm eksitasjonsfilter, 510 nm dikromatisk speil (beam splitter) og 520 nm emisjonsfilter ble brukt ved fluorescensmikroskopering av Alexa488-trastuzumab-streptavidin.
- Fluorescens- og fasekontrastbilder ble tatt med fokuseringstiden satt til 5 sekunder ved deteksjon av fluorescens og 0,1 sekund for fasekontrast.

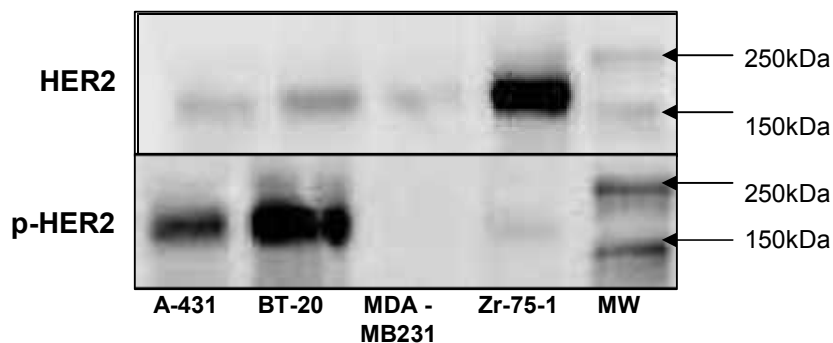
KAPITTEL 3: RESULTATER

3.1 Ekspresjon av HER2 og EGFR i ulike cellelinjer

To cellelinjer ble benyttet i oppgaven; Zr-75-1 og MDA-MB231. Cellelinjene ble valgt blant annet på bakgrunn av deres ekspresjon av HER2, siden dette er avgjørende for selektiv levering av proteintoksin med trastuzumab. Ekspresjon av total mengde og fosforylert (aktiv) form av EGFR og HER2 ble analysert med Western blotting. To cellelinjer ble inkludert som referanser; A-431, som er kjent for et høyt ekspresjonsnivå av EGFR, og BT-20, som uttrykker både EGFR og HER2. Prøvene som ble applisert i brønnene ved elektroforese ble justert med hensyn på proteinmengde for å kunne sammenligne ekspresjonsnivået av HER2 og EGFR i forskjellige celler.

3.1.1 Ekspresjon av HER2

Resultatene indikerer sterk ekspresjon av HER2 i Zr-75-1 og meget svak ekspresjon i MDA-MB231 (Figur 3.1). Dette er i samsvar med tidligere publikasjoner[109-111]. Figur 3.1 indikerer videre at HER2 i liten eller ingen grad er aktivert i Zr-75-1 cellene under standard inkubasjonsbetingelser sammenlignet med signalene for A-431 og BT-20. I MDA-MB231 cellene ble det ikke detektert noen aktivering av HER2.

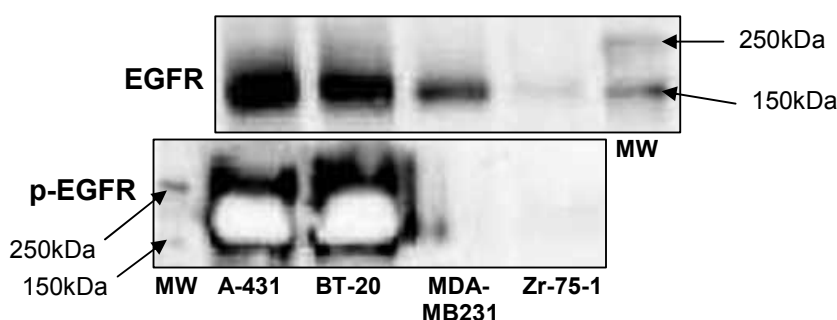


Figur 3.1: Ekspresjon av HER2 i ubehandlede celler.

Ekspresjon av total mengde (HER2) og fosforylert (p-HER2, Y1221/Y1222) form av HER2 i A-431, BT-20, MDA-MB231 og Zr-75-1 celler. HER2 og p-HER2 har molekylvekt 185 kDa. "MW" viser molekylvektstandard.

3.1.2 Ekspresjon av EGFR

Ved undersøkelse av ekspresjon av fosforylert EGFR ble cellene inkubert med 100 ng/ml EGF i 2 minutter rett før cellehøsting for å stimulere tyrosinfosforylering av EGFR. Resultatene indikerer ekspresjon av EGFR i MDA-MB231 cellene, men ikke i like sterk grad som i A-431 og BT-20 cellene (Figur 3.2). Ekspresjonen av EGFR er meget lav i Zr-75-1 cellene. Resultatene indikerer at etter behandling med EGF er EGFR aktivert i A-431 og BT-20 cellene, men ikke i hverken MDA-MB231 eller Zr-75-1 cellene (Figur 3.2).



Figur 3.2: Ekspresjon av EGFR i ubehandlede celler.

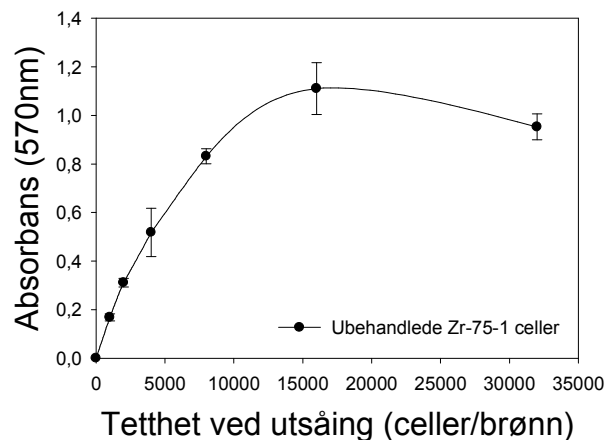
Ekspresjon av total mengde (EGFR) og fosforylert (p-EGFR, Y1068) form av EGFR i A-431, BT-20, MDA-MB231 og Zr-75-1 celler behandlet med EGF som beskrevet i teksten. EGFR og p-EGFR har molekylvekt 175 kDa. "MW" viser molekylvektstandarden.

3.2 Etablering av tetthetskurver for ubehandlede celler

Celler som vokser i kultur får næringsstoffer og vekstfaktorer fra næringsmediet de vokser i. Cellene vil vokse eksponentielt inntil et konfluent lag (monolag) dannes og veksthastigheten avtar. Når cellene nærmer seg konfluens reduseres veksthastigheten og cellene kan dø. Det ble derfor initielt undersøkt hvor tett cellene kunne såes ut for å unngå at cellene nærmet seg konfluens under forsøkene. Tetthetskurver ble derfor etablert ved at cellene ble sådd ut i 96 brønners-brett med $1-32 \cdot 10^3$ celler per brønn (areal per brønn $\sim 0,3 \text{ cm}^2$). Tetthetskurvene ble etablert 96 timer etter utsåing siden både PDT- og PCI-forsøkene foregår over 4 dager. Celletettheten ble målt med MTT-assay.

3.2.1 Celletetthetskurve for Zr-75-1 celler

Forsøkene viser en positiv korrelasjon mellom antall celler sådd ut per brønn og antall celler i brønnen 96 timer senere i et område opp til 15 000 celler/brønn (Figur 3.3). Ved celletetthetsuavhengig vekst vil denne korrelasjonen være lineær. Figur 3.3 viser en svakt avtagende celletetthet ved forsøkets slutt som følge av økende celletetthet ved utsåingstidspunktet, og ingen ytterligere fortetting over 15 000 celler/brønn. Resultatet indikerer at celletettheten influerer på cellevekst i hele måleområdet, men velger i de videre forsøkene å så ut 12 000 celler/brønn da dette gir optimale måleverdier i MTT-assayet uten at cellene oppnår konfluens ved utsåing av forsøket.



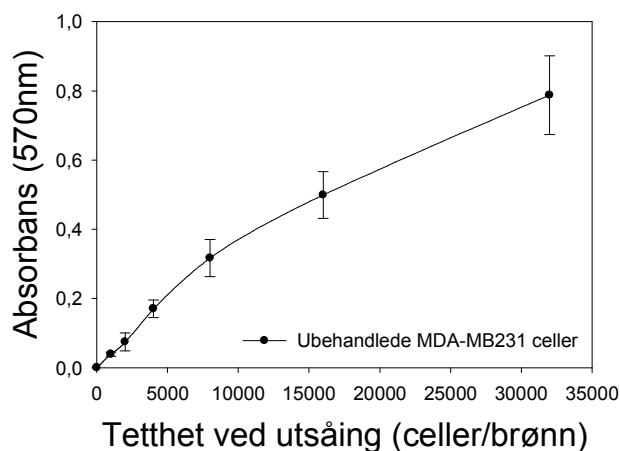
Figur 3.3: Celletetthetskurve for ubehandlede Zr-75-1 celler.

Celletetthet målt med MTT-assay er plottet mot antall celler som ble sådd ut per brønn i 96 brønners-brett 96 timer tidligere. Resultatene er middelerverdier av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.2.2 Celletetthetskurve for MDA-MB231 celler

Figur 3.4 indikerer en positiv korrelasjon mellom antall celler sådd ut per brønn og antall celler i brønnen 96 timer senere i hele måleområdet opp til 32 000 celler/brønn ($\sim 10^5$ celler/cm²). Resultatet kan tyde på at utsåingseffektiviteten (plating efficiency), dvs. antall celler som er opphav til kolonier, er relativt lav for MDA-MB231 cellene. I følge Figur 3.4 sees en svakt avtagende celletetthet ved forsøkets slutt ettersom tetthet ved utsåingstidspunktet økes. Celletetthet ved utsåing i de videre forsøkene velges slik

at optimale måleverdier oppnås i MTT-assayet uten at cellene oppnår konfluens ved avslutning av forsøket, og settes derfor til 20 000 celler/brønn.



Figur 3.4: Celletetthetskurve for ubehandlede MDA-MB231 celler.

Celletetthet målt med MTT-assay er plottet mot antall celler som ble sådd ut per brønn i 96 brønners-brett 96 timer tidligere. Resultatene er middelerdier av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

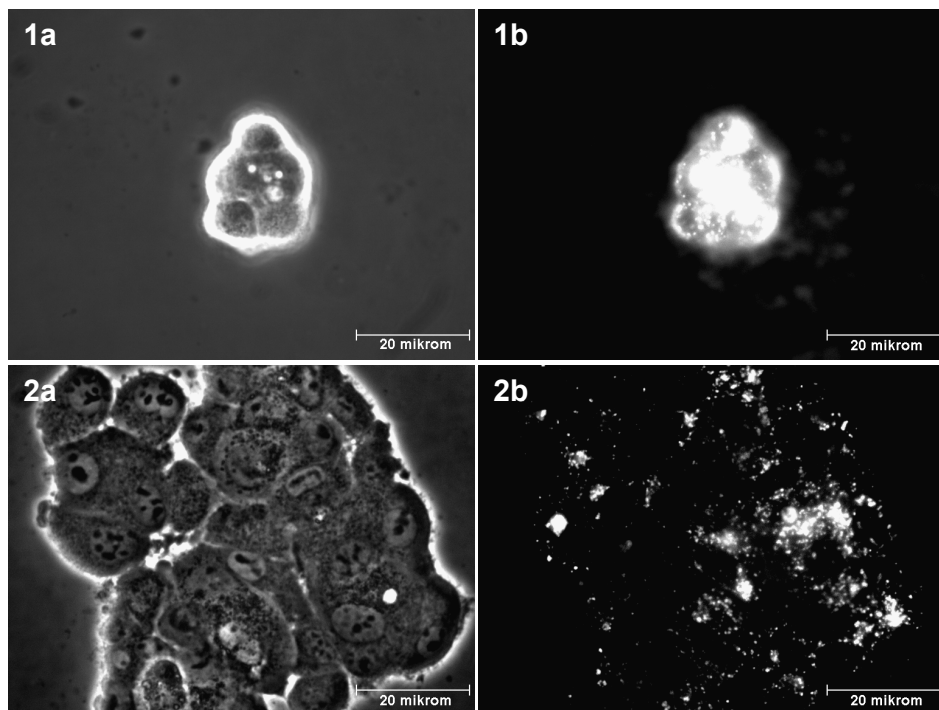
3.3 Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}

Levering av endocyterte makromolekyler til cytosol med PCI forutsetter lokalisering av fotosensitizeren (PS) i membranen til endocytiske vesikler. TPCS_{2a} vil som følge av sine amfifile egenskaper assosieres til membranstrukturer og forventes å være lokalisert i endosom/lysosommembraner etter opptak ved adsorptiv endocytose, men forventes å også kunne detekteres på plasmamembranen. TPCS_{2a} fluorescerer og den intracellulære lokaliseringen ble undersøkt med fluorescensmikroskopi. Cellene ble inkubert med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i 18 timer. Lokalisering av TPCS_{2a} ble studert både før og etter vask og 4 timer inkubasjon i PS-fritt medium.

3.3.1 Lokalisering av TPCS_{2a} i Zr-75-1 celler

I de ubehandlede cellene detekteres ingen fluorescens. I Zr-75-1 celler behandlet med TPCS_{2a} i 18 timer er TPCS_{2a}, basert på fluorescensmikroskopi, lokalisert i granula og

som en diffus fluorescens over hele cellen (Figur 3.5, bilde 1b). Erfaring fra tidligere studier indikerer at TPCS_{2a} er lokalisert i endocytiske vesikler og plasmamembranen ved de beskrevne inkubasjonsbetingelsene[28;48]. Etter påfølgende vask og 4 timer inkubasjon i PS-fritt medium sees et granulært fluorescensmønster, samt at den diffuse fluorescensen, som antas å være fra TPCS_{2a} lokalisert på plasmamembranen, ikke lenger kan detekteres (figur 3.5, bilde 2b).



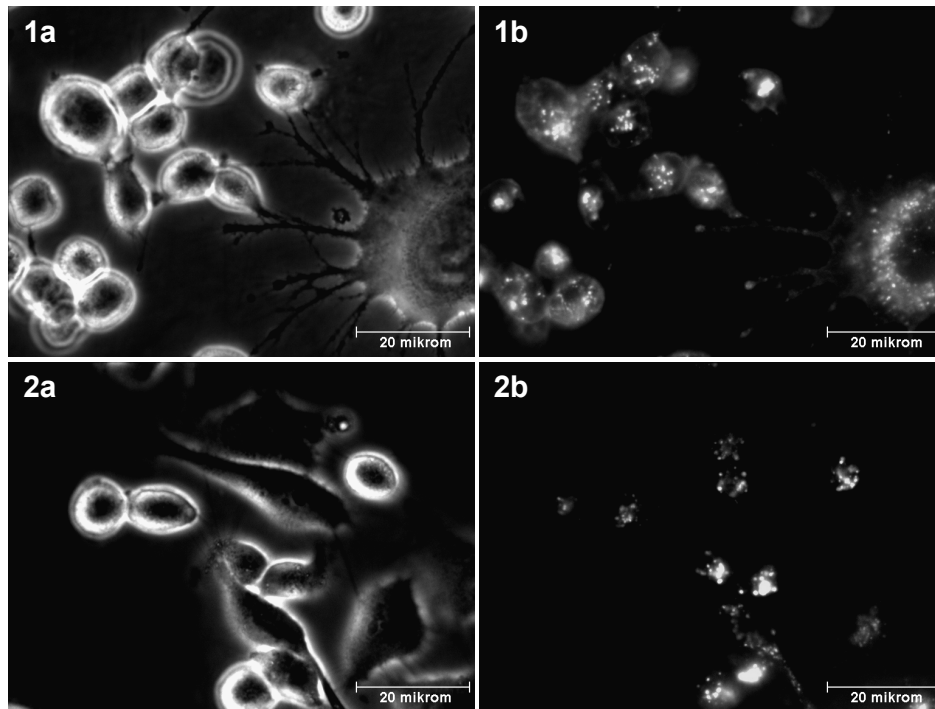
Figur 3.5: Fasekontrast- og fluorescensbilder av TPCS_{2a} i Zr-75-1 celler.

Bildene viser celler etter 1) inkubasjon med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i 18 timer og 2) påfølgende vask og inkubasjon i PS-fritt medium i 4 timer. a) viser fasekontrast av Zr-75-1 cellenes morfologi, mens b) viser TPCS_{2a} fluorescens. Bildene er tatt med 40x objektiv supplert med 2,5x forstørrelse. Intensiteten i bildene er justert for å kunne sammenligne fluorescensen etter de ulike behandlingene.

3.3.2 Lokalisering av TPCS_{2a} i MDA-MB231 celler

Ved fluorescensmikroskopi av MDA-MB231 celler behandlet med TPCS_{2a} i 18 timer detekteres en granulær fluorescens kombinert med en mer diffus fluorescens over hele cellen (Figur 3.6, bilde 1b). Den diffuse fluorescensen, som antas å være TPCS_{2a} på

plasmamembranen, detekteres i mindre grad etter 4 timer inkubasjon i PS-fritt medium, mens fluorescensen i granula detekteres i samme grad (Figur 3.6, bilde 2b). I de ubehandlede cellene detekteres ingen fluorescens.



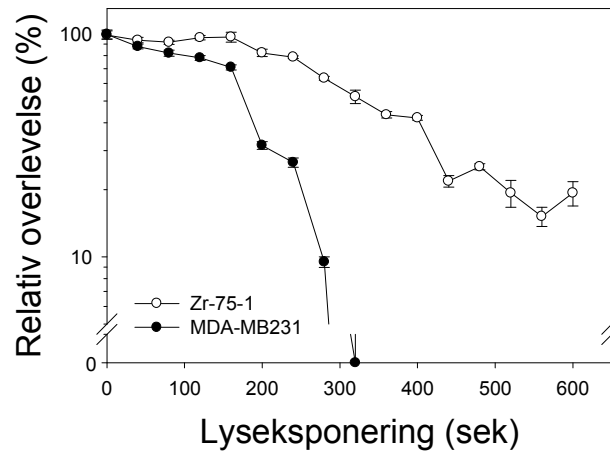
Figur 3.6: Fasekontrast- og fluorescensbilder av $TPCS_{2a}$ i MDA-MB231 celler.

Bildene viser celler etter 1) inkubasjon med $0,2 \mu\text{g/ml}$ $TPCS_{2a}$ i 18 timer og 2) påfølgende vask og inkubasjon i PS-fritt medium i 4 timer. a) viser fasekontrast av MDA-MB231 cellenes morfologi, mens b) viser $TPCS_{2a}$ fluorescens. Bildene er tatt med 40x objektiv supplert med 2,5x forstørrelse. Intensiteten i bildene er justert for å kunne sammenligne fluorescensen etter de ulike behandlingene.

3.4 PDT med $TPCS_{2a}$

Zr-75-1 og MDA-MB231 celler ble behandlet med PDT og overlevelseskurver etter eksponering for økende lysdoser ble etablert. Cellene ble behandlet med $0,2 \mu\text{g/ml}$ $TPCS_{2a}$ i 18 timer, vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium før lyseksponering. Celleoverlevelsen ble målt med MTT 48 timer etter belysning. Resultatene indikerer at PDT med $TPCS_{2a}$ gir større celledrap i MDA-MB231 enn i Zr-75-1 med tilsvarende lysdoser (Figur 3.7). Sammenligning av lysdosene som resulterer i 20 %

celleoverlevelse indikerer at MDA-MB231 cellene er $\sim 1,7$ ganger så sensitive som Zr-75-1 cellene for PDT med $0,2 \mu\text{g/ml}$ TPCS_{2a}. Toksisitet av TPCS_{2a} uten lys er i følge figur 3.7 minimal vist ved $\sim 0,5\%$ celledrap i MDA-MB231 cellene og $\sim 1\%$ celledrap i Zr-75-1 cellene. Toksisitet av lys alene uten PS ble ikke undersøkt.



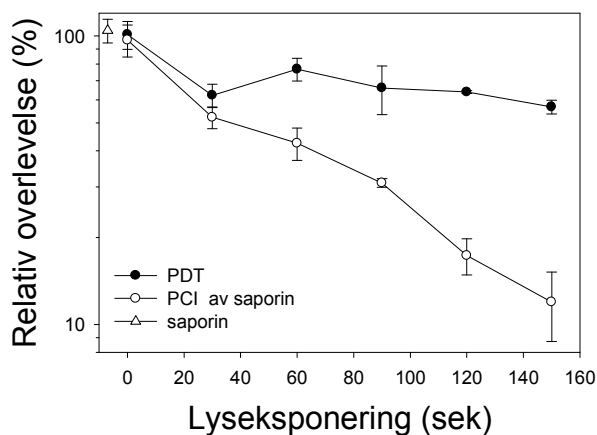
Figur 3.7: Overlevelse av Zr-75-1 og MDA-MB231 celler etter PDT med TPCS_{2a}.
 Celleoverlevelsen beregnes i forhold til ubehandlede kontrollceller og er plottet mot lysdosen. Resultatene representerer middelerverdier av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.5 PCI av saporin

Saporin (type 1 RIP) utøver sin effekt på ribosomer i cytoplasma gjennom hemming av proteinsyntesen (Avsnitt 1.4.1.1). Saporin er potensielt meget cytotoxisk, men blir etter opptak ved endocytose i stor grad degraderert i lysosomer og tas derfor i liten grad opp i cytosol på egen hånd. Dette gjør at saporin er egnet for levering med PCI, enten alene eller som del av et konjugat. PCI frigjør saporin fra endosomer/lysosomer og fører til en synergistisk effekt av å kombinere fotokjemisk behandling (PDT) med behandling med plantetoksinet [2;48;112]. PCI av saporin er imidlertid ikke tidligere undersøkt, og effekten av PDT, PCI av saporin og saporin alene ble derfor undersøkt i Zr-75-1 og MDA-MB231 cellene. Cellene ble inkubert med $0,2 \mu\text{g/ml}$ TPCS_{2a} og/eller $0,5 \mu\text{g/ml}$ saporin i 18 timer før inkubasjon i medium fritt for PS og saporin i 4 timer fulgt av lyseksponeering.

3.5.1 PCI av saporin med ”lys etter” – strategi i Zr-75-1 celler

”Lys før”- strategi hvor toksinet administreres først i etterkant av lysbehandlingen er vist å være den mest effektive metoden for levering av gelonin (30 kDa type 1 RIP) med PCI[56]. PCI av saporin ble imidlertid kun undersøkt med ”lys etter”- strategi hvor PS og toksinet lokaliseres i de samme vesiklene i forkant av lyseksponering. Resultatene indikerer økt toksisk effekt av saporin som følge av levering med PCI (Figur 3.8). I følge figuren er ikke saporin alene cytotoxisk i den konsentrasjonen som ble undersøkt. PCI av saporin med 150 sekunder lyseksponering gir nesten 90 % celledrap. Ved 55 % celleoverlevelse er PCI av saporin ~ 5 ganger mer effektivt enn PDT.



Figur 3.8: Behandling av Zr-75-1 celler med PCI av saporin med ”lys etter” - strategi.

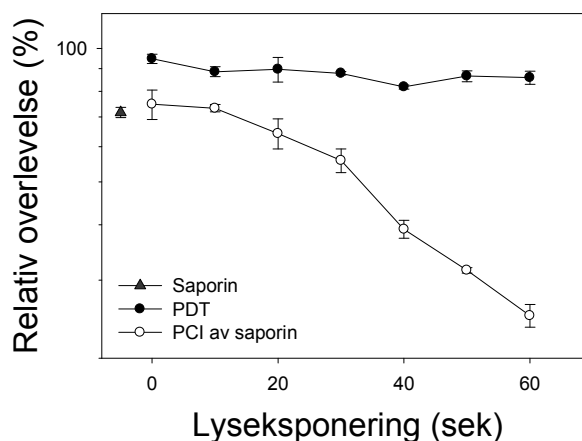
Celleoverlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede celler og plottet mot lysdosen.

Resultatene representerer middelveier av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.5.2 PCI av saporin med ”lys etter” – strategi i MDA-MB231 celler

Resultatene indikerer at PCI i stor grad øker den cytotoxiske effekten av saporin (Figur 3.9). Toksisiteten av saporin alene er imidlertid relativt høy og resulterer i hele 30 % celledrap. PDT induserer < 20 % celledrap og det sees ingen dose-respons sammenheng. Ved PCI av saporin sees hele 75 % celledrap etter 60 sekunder, noe

som betyr at PCI-effekten er større enn den samlede effekten av PDT og saporin alene.



Figur 3.9: Behandling av MDA-MB231 celler med PCI av saporin med "lys etter"-strategi.

Celleoverlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede celler og plottet mot lysdosen. Hvert punkt representerer middelveien av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

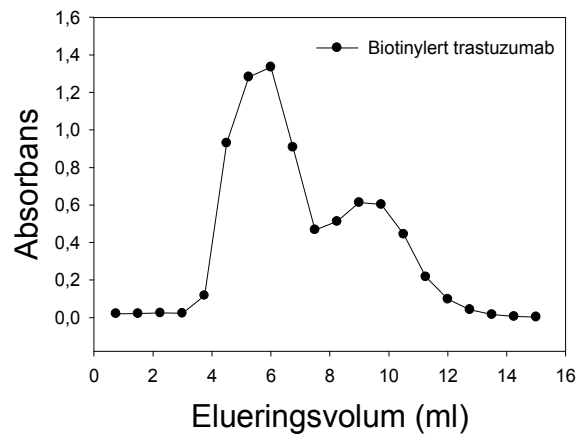
3.6 Etablering av trastuzumab-saporin immunotoksin

Det HER2-målrettede immunotoksinet trastuzumab-saporin ble konstruert ved først å biotinylere trastuzumab for så å kompleksere trastuzumab med streptavidin-konjugert saporin som beskrevet i Avsnitt 2.5. Biotin binder til streptavidin med høy affinitet og bindingen som dannes er meget stabil.

3.6.1 Gelfiltrasjonskromatografi av biotinykert trastuzumab

Ved biotinylering av trastuzumab ble det tilsatt et overskudd av biotin. For å forhindre binding av fritt biotin til streptavidin-saporin ble reaksjonsløsningen rensert vha gelfiltrasjonskromatografi. Kolonnen, som var pakket med porøse Sephadex G-25 kuler, lar molekyler større enn 50 kDa (f.eks biotinykert trastuzumab) vandre gjennom kolonnen uten å trenge inn i kulene, mens mindre molekyler (f.eks ubundet biotin) vandrer inn i kulene og trenger derfor et større elueringsvolum for å komme gjennom kolonnen. Eluatet ble samlet i rør med 15 dråper per rør (tilsvarer ca. 0,75 ml) og

absorbans av elueringsfraksjonene (fortynnet 1:2) ble målt spektrofotometrisk ved 280 nm. Kurven som gjengir absorbans plottet mot volum av eluatet har et toppunkt ved ca. 6 ml og en mindre topp rundt 10 ml (Figur 3.10). Den siste toppen kan skyldes at noe av prøven ble virvlet opp i kolonnen og derfor ble hengende etter som en hale. En annen mulighet er at de lette kjedene i antistoffet på 25 kDa ble spaltet av og at disse trengte et større elueringsvolum. Resultatene tyder på at kun fraksjonene i rør 5-16 (som tilsvarer elueringsvolum \sim 3,75-12 ml) inneholdt biotinylert trastuzumab. Derfor ble disse slått sammen til ett rør og benyttet til videre etablering av IT.



Figur 3.10: Gelfiltrasjonskromatografi av biotinylert trastuzumab.

Absorbans i elueringsfraksjonene (1:2 fortynning) ved 280 nm er plottet mot akkumulert volum av eluatet. Absorbans ved 280 nm korrelerer med konsentrasjon av trastuzumab i løsningen.

3.6.2 Kvantitativ bestemmelse av biotinylert trastuzumab

Biotinylert trastuzumab ble kvantifisert vha spektrofotometri. En standardkurve for trastuzumab ble etablert ved å måle absorpsjon ved 280 nm i referanseløsninger med kjent konsentrasjon. Standardløsningene inneholdt fra 0,5-12 μ M trastuzumab. Ved hjelp av regresjon ble en funksjon for standardkurven bestemt (Figur 3.11) og denne ble brukt til å regne ut konsentrasjon av trastuzumab i elueringsproduktet. Absorbans i løsningen med biotinylert trastuzumab ble målt til $1,37 \pm 0,02$, som tilsvarte 6,3 μ M trastuzumab. Biotin ble kvantifisert vha Pierce EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit

(prosedyre; Avsnitt 2.5.4). Antall mol biotin per mol trastuzumab ble kalkulert basert på Beer-Lamberts lov. Utregningene kan sammenfattes slik:

$$\frac{((0,9 \times A_{500} \text{ H/A}) - A_{500} \text{ H/A/B}) \times M_w(\text{trastuzumab}) \times 10}{C(\text{trastuzumab}) \times \epsilon \times l} =$$

$$\frac{((0,9 \times 0,814) - 0,595) \times 145531 \text{ g/mol} \times 10}{2 \text{ mg/ml} \times 34\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = \underline{\underline{2,9 \text{ mol biotin per mol trastuzumab}}}$$

Hvor: $A_{500} \text{ H/A}$ = absorbans av HABA/avidin-løsningen før tilsetting av biotin

$A_{500} \text{ H/A/B}$ = absorbans av HABA/avidin-løsningen etter tilsetting av biotin

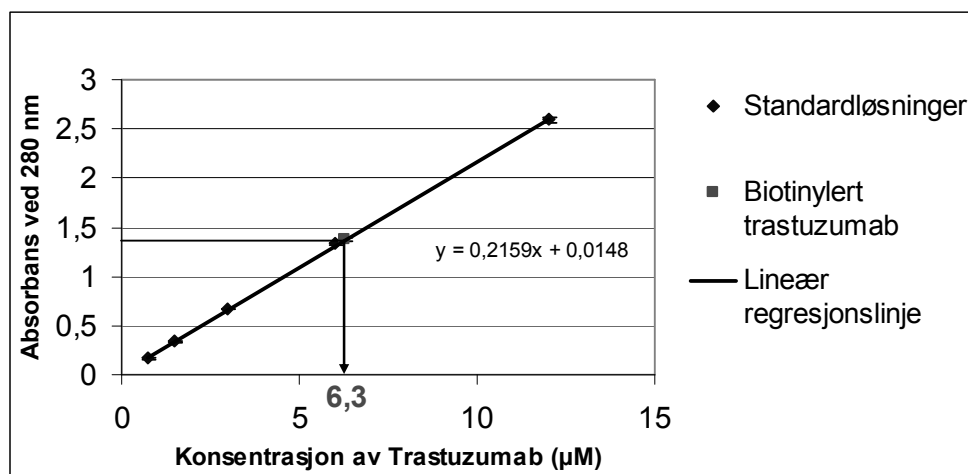
$M_w(\text{trastuzumab})$ = molekylvekt av trastuzumab (g/mol)

$C(\text{trastuzumab})$ = konsentrasjon av trastuzumab (mg/ml)

ϵ = molar ekstinksjonskoeffisient for HABA/avidin ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l = lengden av lysveien (cm)

Utregningene gav et resultat på 2,9 mol biotin per mol trastuzumab i det biotinylerede produktet, dvs. opp mot 3 molekyler biotin per molekyl trastuzumab.



Figur 3.11: Kvantitativ bestemmelse av biotinyleret trastuzumab.

Absorbans ved 280 nm er plottet mot konsentrasjon av trastuzumab i standardløsninger.

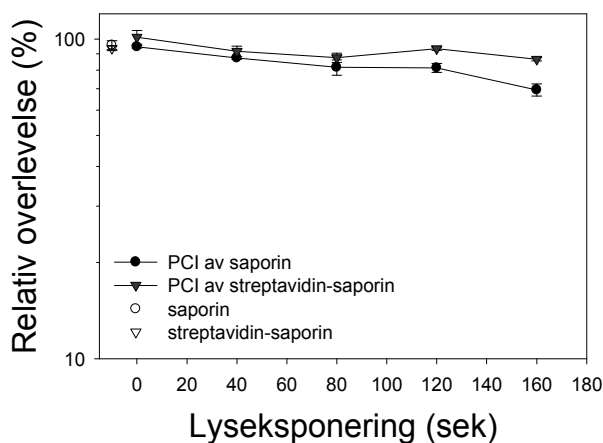
Funksjon for kurven er bestemt ved regresjon. Hvert punkt representerer middelverdien av tre paralleller og standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.8 Cytotoksiske effekter av streptavidin-saporin

IT av trastuzumab og saporin ble etablert vha biotin-streptavidin binding. For å undersøke om konjugeringen til streptavidin endret saporins opptak og/eller cytotoxicitet ble effekten av streptavidin-saporin og saporin sammenlignet. Cellene ble behandlet med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} og 1,36 nM saporin eller streptavidin-saporin i 18 timer, før vask og 4 timer inkubasjon i medium fritt for PS og saporin fulgt av lyseksponering.

3.8.1 PCI av saporin og streptavidin-saporin i Zr-75-1 celler

Resultatene indikerer at den cytotoxicke effekten av streptavidin-saporin og saporin alene er relativt lik (Figur 3.12). Resultatene kan videre tyde på at streptavidin-saporin gir noe lavere effekt enn saporin ved levering med PCI, men den cytotoxicke effekten er for liten til å kunne trekke noen konklusjoner.

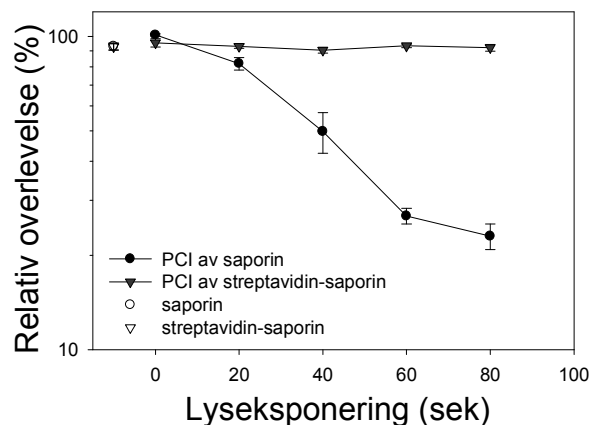


Figur 3.13: Behandling av Zr-75-1 celler med saporin og streptavidin-saporin med og uten PCI.

Celleoverlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede kontrollceller. Resultatene er middelerverdier av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.8.2 PCI av saporin og streptavidin-saporin i MDA-MB231 celler

Resultatene indikerer at streptavidin-saporin og saporin alene induserer omtrent samme cytotoksiske effekt (Figur 3.13). PCI av streptavidin-saporin induserer ingen økt cytotoksisitet sammenlignet med streptavidin-saporin alene, mens PCI gir en klart økt effekt av ukonjugert saporin.



Figur 3.13: Behandling av MDA-MB231celler med saporin og streptavidin-saporin med og uten PCI.

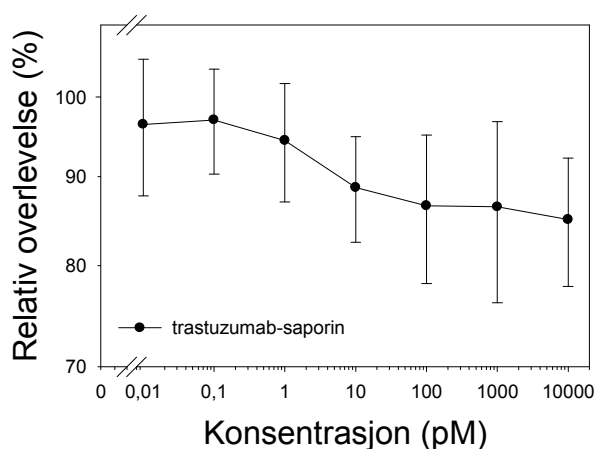
Celleoverlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede kontrollceller. Resultatene er middelerverdier av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.9 Studier av immunotoksinet trastuzumab-saporin

Trastuzumab-saporin er et HER2-målrettet IT. Binding av trastuzumab til HER2 på celleoverflaten fremmer opptak av toksinet ved reseptormediert endocytose. Den terapeutiske nytten av IT'et vil imidlertid begrenses av begrenset translokasjon til cytosol og lysosomal degradering av toksinet. Trastuzumab-saporin ble derfor evaluert for levering med PCI. Undersøkelser ble gjort i både HER2-positive og HER2-negative cellelinjer for å vurdere trastuzumab-saporins HER2-selektivitet og viktigheten av HER2 for opptak av IT'et i cellene.

3.9.1 Cytotoksiske effekter av trastuzumab-saporin i Zr-75-1 celler

Toksisk effekt av økende konsentrasjoner av trastuzumab-saporin ble undersøkt i HER2-positive Zr-75-1 celler. Cellene ble behandlet med varierende konsentrasjoner av trastuzumab-saporin i 18 timer før de ble vasket og inkubert i medium i 4 timer fulgt av lyseksposering. Resultatene indikerer at effekten av trastuzumab-saporin i Zr-75-1 celler øker svakt med konsentrasjonen opp til ca. 10 nM (Figur 3.14). Kurven viser at trastuzumab-saporin ikke reduserer cellelevabiliteten med mer enn 15 % med de konsentrasjonene som ble undersøkt.

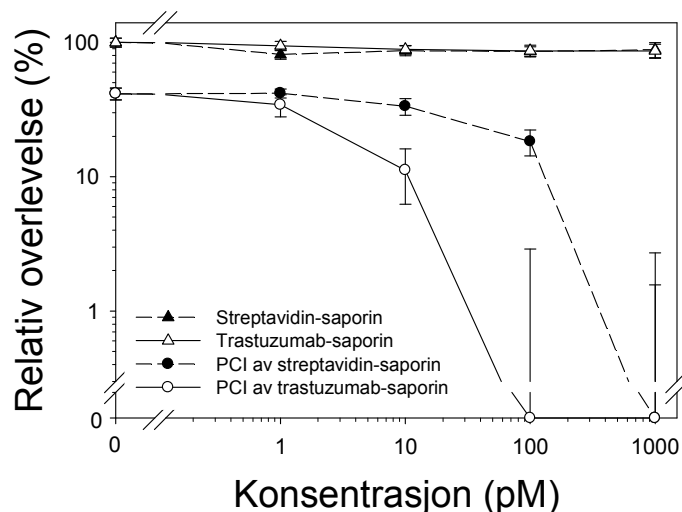


Figur 3.14: Cytotoksisitet av trastuzumab-saporin i HER2-positive Zr-75-1 celler. Overlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede kontrollceller. Resultatene er middelerverdier av tre parallelle målinger. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.9.2 PCI av trastuzumab-saporin i HER2-positive Zr-75-1 celler

Trastuzumab-saporin ble testet ut i HER2-positive Zr-75-1 celler med levering med PCI. PCI av streptavidin-saporin ble inkludert som kontroll for å studere betydningen av trastuzumab for opptak og toksisitet av trastuzumab-saporin. På bakgrunn av resultatene i Figur 3.14 ble trastuzumab-saporin testet i konsentrasjonsområdet 1-1000 pM. Cellene ble behandlet med 0,2 $\mu\text{g/ml}$ TPCS_{2a} og/eller varierende konsentrasjoner av trastuzumab-saporin eller streptavidin-saporin i 18 timer, vasket og inkubert 4 timer i medium før 180 sekunder lyseksposering. Resultatene indikerer at

streptavidin-saporin og trastuzumab-saporin alene gir minimal toksisitet i Zr-75-1 (Figur 3.15). Effekten økes ved kombinasjon med PCI for alle konsentrasjoner av trastuzumab-saporin og streptavidin-saporin, men trastuzumab-saporin er ca. 10 ganger mer cytotoxisk enn streptavidin-saporin ved kombinasjon med PCI i Zr-75-1 cellene.



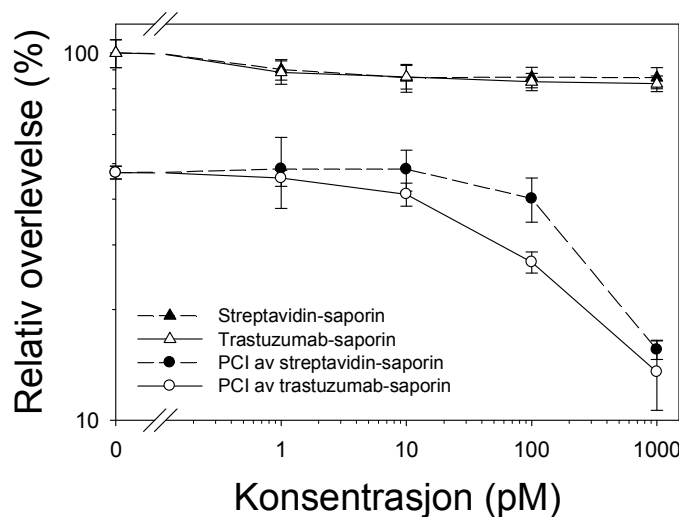
Figur 3.15: Behandling av Zr-75-1 med varierende konsentrasjoner av trastuzumab-saporin og streptavidin-saporin med og uten PCI.

Cellene som ble behandlet med PCI ble eksponert for lys i 180 sekunder, mens de andre cellene ikke fikk lysbehandling. Overlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede kontrollceller. Resultat for PCI uten trastuzumab-saporin eller streptavidin-saporin tilsvarer overlevelse etter fotokjemisk behandling (PDT). Resultatene er middelerverdier av tre parallelle målinger. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.9.3 PCI av trastuzumab-saporin i HER2-negative MDA-MB231 celler

Effekt av trastuzumab-saporin ble også undersøkt i HER2-negative MDA-MB231 celler for å studere betydningen av HER2 for den behandlende effekten av immunitoksinet i cellene. Cellene ble behandlet med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} og/eller varierende konsentrasjoner av trastuzumab-saporin eller streptavidin-saporin i 18 timer, vasket og inkubert 4 timer i medium før 180 sekunder lyseksponering. Resultatene indikerer at både streptavidin-saporin og trastuzumab-saporin alene utøver minimal toksisitet i MDA-MB231 cellene (Figur 3.16), men at den toksiske effekten øker i kombinasjon

med PCI ved konsentrasjoner av trastuzumab-saporin og streptavidin-saporin over 10 pM. Det er ingen signifikant forskjell i cytotoksisitet av streptavidin-saporin og trastuzumab-saporin i kombinasjon med PCI.



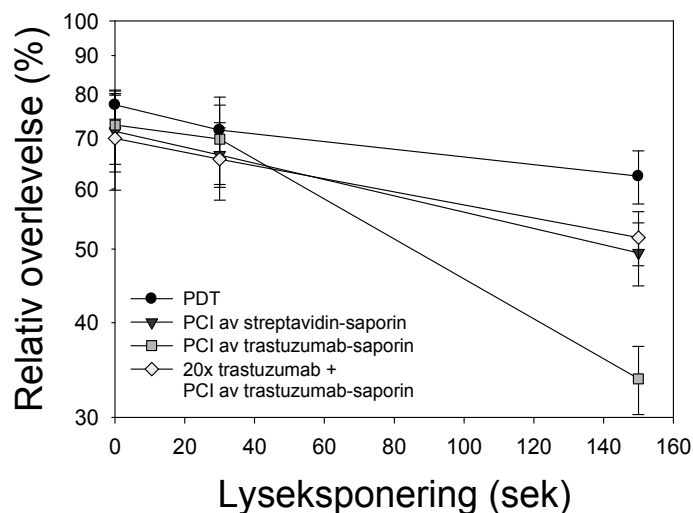
Figur 3.16: Behandling av MDA-MB231 med varierende konsentrasjoner av trastuzumab-saporin og streptavidin-saporin med og uten PCI.

Cellene som ble behandlet med PCI ble eksponert for lys i 180 sekunder, mens de andre cellene ikke fikk lysbehandling. Overlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede kontrollceller. Resultat for PCI uten trastuzumab-saporin eller streptavidin-saporin tilsvarer overlevelse etter fotokjemisk behandling (PDT). Resultatene er middelerverdier av tre parallelle målinger. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.9.4 PCI av trastuzumab-saporin i Zr-75-1 celler etter blokkering av HER2 med fritt trastuzumab

Cellulært opptak av trastuzumab-saporin ble forsøkt blokkert med et overskudd av fritt trastuzumab i forkant av levering av trastuzumab-saporin med PCI. Dette ble gjort for å dokumentere betydningen av HER2 for behandlende effekt av trastuzumab-saporin i HER2-positive celler. Cellene ble inkubert med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i 18 timer før de ble vasket tre ganger med medium. Noen av cellene ble tilsatt 27 nM trastuzumab (20x overskudd), mens andre ble tilsatt medium. Etter inkubasjon i 1 time ble cellene tilsatt 1,36 nM trastuzumab-saporin eller streptavidin-saporin og inkubert i nye 3 timer i fortsatt nærvær av trastuzumab. Cellene ble eksponert for

varierende lysdoser. Resultatene i Figur 3.17 er i samsvar med tidligere forsøk som viser at trastuzumab-saporin er mer toksisk i Zr-75-1 cellene enn streptavidin-saporin ved levering med PCI (Figur 3.15). Ved blokkering av HER2 med trastuzumab før behandling med trastuzumab-saporin fulgt av PCI induseres ikke større effekt enn ved PCI av streptavidin-saporin.



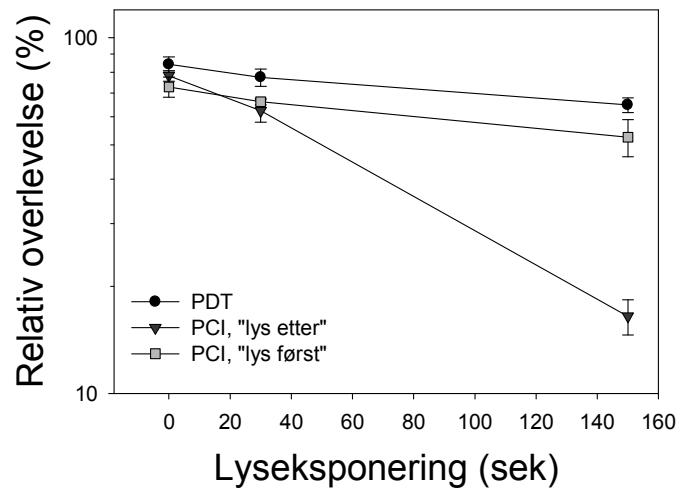
Figur 3.17: Blokkering av HER2 med fritt trastuzumab.

Cellene ble behandlet med TPCS_{2a} før inkubering med streptavidin-saporin, IT eller blokkering av HER2 i forkant av trastuzumab-saporin. Overlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede kontrollceller. Resultatene er middelerverdier av tre parallelle målinger. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.9.5 PCI av trastuzumab-saporin med ”lys først” – prinsippet

Ved behandling av celler med PCI etter ”lys først” - strategi gjennomføres den fotokjemiske behandlingen i forkant av administrasjon av de terapeutiske molekylene (Avsnitt 2.3.3). Tidligere studier av saporin-konjugater har vist at PCI med ”lys først” ikke gir noen større effekt enn den fotokjemiske behandlingen alene [2;3]. Effekt av PDT, PCI av saporin med ”lys etter” og ”lys først” ble undersøkt i Zr-75-1 celler. Alle cellene ble behandlet med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i 18 timer, vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium før lyseksponering. Cellene som skulle behandles med PCI med ”lys etter” ble inkubert med 0,14 nM IT i 18 timer (samtidig med TPCS_{2a}), mens de som

skulle behandles med PCI med ”lys først” ble tilsatt 0,14 nM trastuzumab-saporin rett etter belysning. Resultatene indikerer at effekten av PCI av saporin i stor grad reduseres ved behandling med ”lys først” sammenlignet med ”lys etter” (Figur 3.18). Forskjellen i effekt mellom PDT og PCI med ”lys først” er relativt konstant uavhengig av om lysdosen økes. Ved PCI med ”lys etter” oppnås en synergistisk effekt mellom den fotokjemiske behandlingen og effekten av IT.



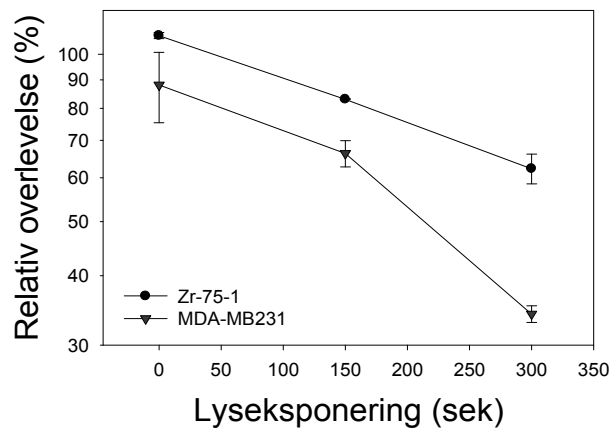
Figur 3.18: Behandling av Zr-75-1 med PCI av trastuzumab-saporin med ”lys etter” og ”lys først”-strategi.

Cellene ble inkubert med trastuzumab-saporin i forkant eller etterkant av fotokjemisk behandling med varierende lysdoser. Overlevelsen er beregnet i forhold til ubehandlede kontrollceller. Resultatene er middelerverdier av tre parallelle målinger. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.10 Fotokjemisk skade på HER2 og EGFR etter PDT

Siden effekt av trastuzumab-saporin ble redusert ved levering med PCI med ”lys først” i forhold til ”lys etter” (Figur 3.18) var det av interesse å undersøke om PDT påvirket reseptormediert opptak av immunotoksinet. Fotokjemisk skade på EGFR og HER2 etter behandling med PDT ble studert vha Western blotting. Cellene ble behandlet med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} i 18 timer, vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium før lyseksponering. Cellene ble høstet 5 minutter etter belysning (prosedyre;

Avsnitt 2.6.1). Prøvene som ble applisert i brønnene ved elektroforese ble justert med hensyn på proteinmengde for å kunne sammenligne ekspressionsnivået av HER2 og EGFR etter ulik lyseksponering. Overlevelsesstudier med MTT-assay ble utført 48 timer etter belysning for celler som ble behandlet identisk og parallelt med cellene som skulle undersøkes med Western blotting. Resultatene indikerer at 150 og 300 sekunder lyseksponering drepte hhv. 17 og 38 % av Zr-75-1 cellene og 34 og 66 % av MDA-MB231 cellene (Figur 3.19).

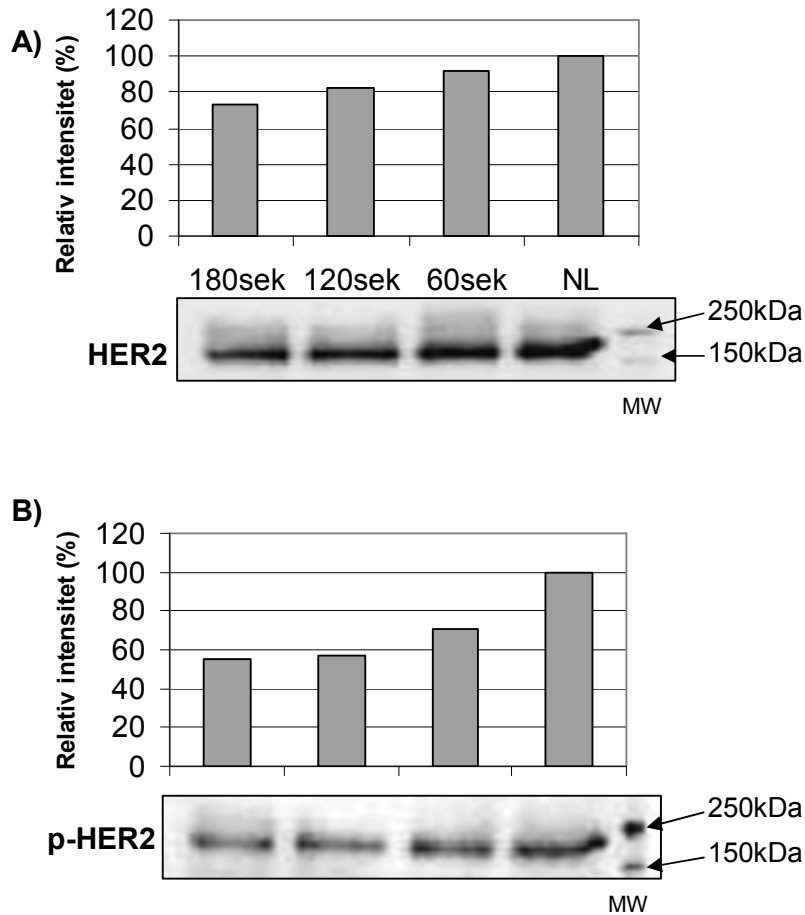


Figur 3.19: Celleoverlevelse etter PDT.

Celleoverlevelsen er plottet mot lysdosen. Resultatene er middelerverdier av tre paralleller. Standardavvik (SD) er tegnet inn.

3.10.1 Fotokjemisk skade på HE2 i Zr-75-1 celler etter PDT

Resultatene indikerer en nedgang i både total mengde og aktiv (fosforylert) form av HER2 i Zr-75-1 celler etter PDT med økende lysdoser (Figur 3.20). Nedreguleringen ser ut til å være størst for den fosforylerte formen av HER2.

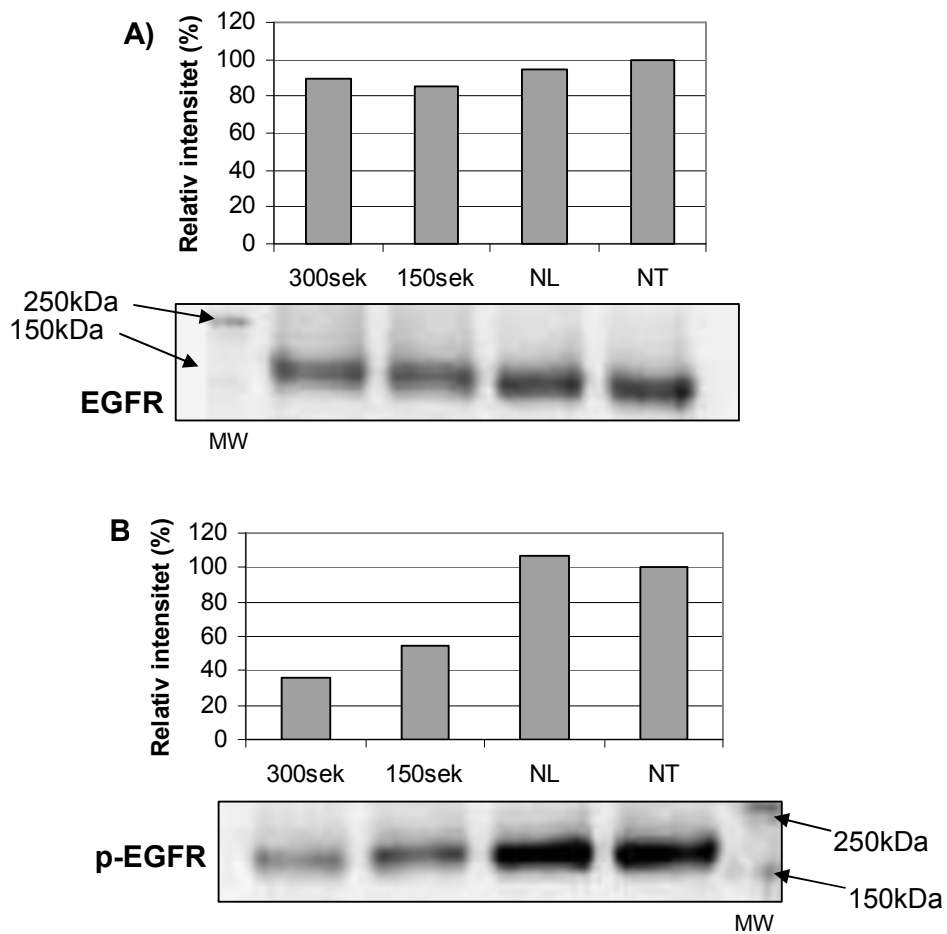


Figur 3.20: Ekspresjon av HER2 og p-HER2 i Zr-75-1 celler etter PDT-behandling.

Figuren viser ekspresjon av A) total mengde HER2 og B) fosforylert HER2 i Zr-75-1 celler. Cellene ble belyst med oppgitte lysdoser (hhv. 60, 120 og 180 sekunder) og høstet 5 minutter etter belysning. 180 sekunder belysning tilsvarer ca. 20 % celledrap. Intensiteten er beregnet relativt til "NL", dvs. celler behandlet med PS uten lys. Ved applisering av prøver til elektroforese ble det justert for relativ proteinmengde. "MW" viser molekylvektstandard.

3.10.2 Fotokjemisk skade på EGFR i MDA-MB231 celler etter PDT

Ved undersøkelse av ekspresjon av fosforylert EGFR ble cellene inkubert med 100 ng/ml EGF i 2 minutter rett før cellehøsting for å stimulere tyrosinfosforylering av EGFR. Resultatene viser en tydelig nedregulering av p-EGFR i MDA-MB231 celler etter PDT med økende lysdoser (Figur 3.21). Resultatene viser liten eller ingen nedregulering av total mengde EGFR.



Figur 3.21: Ekspresjon av EGFR og p-EGFR i MDA-MB231 celler etter PDT-behandling.

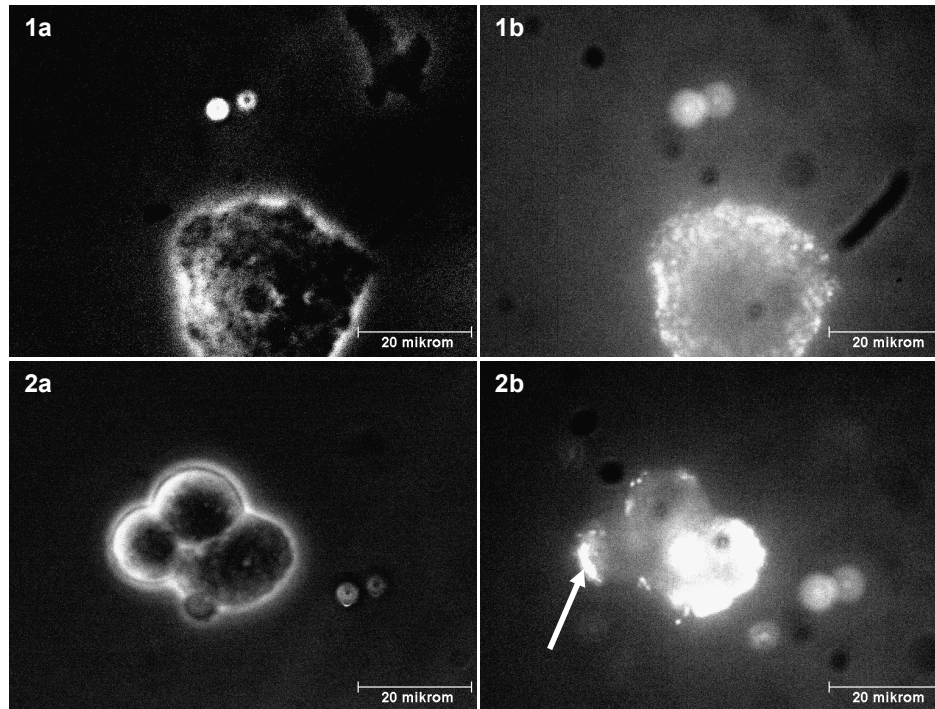
Figuren viser ekspresjon av A) total mengde EGFR og B) fosforylert EGFR i MDA-MB231 celler. Cellene ble belyst med oppgitte lysdoser (hvh. 150 og 300 sekunder) og høstet 5 minutter etter belysning. 300 sekunder belysning tilsvarer ca. 66 % celledrap. Intensiteten er beregnet relativt til "NT", dvs. ubehandlede kontrollceller. "NL" viser celler behandlet med PS uten lys. Ved applisering av prøver til elektroforese ble det justert for relativ proteinmengde. "MW" viser molekylvektstandarden.

3.11 Fluorescensmikroskopi av trastuzumab-opptak ved PCI med ”lys først”

På bakgrunn av resultatene i Avsnitt 3.9.5 og 3.10.1 var det av interesse å studere cellulært opptak av trastuzumab ved PCI med ”lys først”. Trastuzumab utgjør den cellebindende delen av trastuzumab-saporin og er ansvarlig for opptak av saporin i cellene. Biotinylerert trastuzumab ble kompleksert med fluorescensmerket streptavidin (konjugert til Alexa Fluor® 488) og cellulært opptak ble studert vha fluorescensmikroskopi i HER2-positive Zr-75-1 celler for å undersøke om PDT hemmer opptak av antistoffet. Zr-75-1 celler ble inkubert med 0,2 µg/ml TPCS_{2a} eller PS-fritt medium i 18 timer, vasket og inkubert 4 timer i PS-fritt medium før lyseksposering.

Umiddelbart etter belysning ble cellene tilsatt 100 nM alexa488-merket trastuzumab-biotin-streptavidin og inkubert i 3 timer. Cellene ble studert med en filterkombinasjon som var tilpasset absorpsjons- og emisjonsegenskapene til alexa488 (Figur 2.9). Det ble undersøkt at fluorescens fra TPCS_{2a} ikke ble detektert med denne filterkombinasjonen.

Mikroskopibildene indikerer et granulært fluorescensmønster i de ubehandlede Zr-75-1 cellene (Figur 3.22, bilde 1b). Dette tyder på internalisering av trastuzumab. Det sees ingen fluorescens i cellekjernen. Etter behandling av cellene med PDT som i ”lys først”-behandlingsregimet sees fluorescensen som større klynger i forbindelse med plasmamembranen. Bildene gjengir fluorescens i cellen som helhet, ikke bare i et tverrsnitt. Dette gjør at det er vanskelig å vurdere hvorvidt klyngen av fluorescens inne i midten av cellen i Figur 3.22, bilde 2b reflekterer fluorescens inne i cellen eller på plasmamembranen på cellens overside. Trastuzumab-lokaliseringen som indikert med pil i Figur 3.22, bilde 2b indikerer imidlertid at trastuzumab-bindingen klynges sammen i et område på overflaten av cellen.



Figur 3.22: Fluorescensmikroskopi av alexa488-merket trastuzumab-biotin-streptavidin i Zr-75-1 celler.

1) viser ubehandlede Zr-75-1 celler og 2) viser celler behandlet med PCI av alexa488-merket trastuzumab-biotin-streptavidin med "lys først". a) viser fasekontrast av Zr-75-1 cellene, mens b) viser fluorescens av alexa488-merket trastuzumab-biotin-streptavidin. Bildene er tatt med 40x objektiv supplert med 2,5x forstørrelse. Bakgrunnsfluorescens er trukket fra og intensiteten i bildene er justert for å kunne sammenligne fluorescensen etter de ulike behandlingene.

KAPITTEL 4: DISKUSJON

4.1 HER2-målrettet behandling

Målrettet behandling av brystkreft har i flere tiår dreiet seg rundt hormonrettet terapi, som tamoxifen og aromatasehemmere. I de senere årene har en rekke nye målrettede terapier blitt utviklet som følge av bedre kjennskap til gener og signaliseringsveier som er involverte i utvikling av kreft [113]. Overekspresjon av HER2 er identifisert hos nesten 25 % av pasienter med brystkreft, og dette kombinert med mangfoldet av cellulære funksjoner som reguleres via EGFR/HER-familien gjør HER2 til et aktuelt angrepspunkt for målrettet krefterapi [114]. To legemidler er så langt godkjente for behandling av HER2-positiv brystkreft; trastuzumab (Herceptin®), introdusert i 1998, og lapatinib (Tykerb/Tyverb®), i 2007 [115].

Trastuzumab brukes i behandling av brystkreft i kombinasjon med tradisjonelle kjemoterapeutika, som taxaner og vinorelbine [113]. En stor andel av pasientene med overekspresjon av HER2 vil imidlertid ikke respondere på trastuzumab, og tilbakefall og utvikling av resistens mot trastuzumab i tumor er et velkjent problem i klinisk sammenheng. Resistensutvikling kan tenkes å skyldes endret interaksjon mellom antistoff og reseptor, kompensatorisk aktivering av andre reseptorer (f.eks andre EGF-reseptorer eller østrogenreseptorer) eller konstant aktivering av signalkaskader nedstrøms for HER2 [113]. Kun 1 av 3 pasienter med HER2-positiv metastaserende brystkreft responderer på trastuzumab monoterapi, og de fleste av dem vil utvikle resistens innen et år [116]. Dette har ført til et behov for utvikling av nye, mer potente HER2-målrettede terapier, som f.eks trastuzumab-MCC-DM1 [115]. Trastuzumab bundet via tioeter (MCC) til mikrotubuli-hemmeren DM1 er i fase 1-studier vist å gi doseavhengig veksthemming av HER2-positiv brystkreftceller som er resistente mot trastuzumab monoterapi [117]. Trastuzumab-MCC-DM1 internaliseres ved binding til HER2-positiv celler og DM1 antas å frigjøres i aktiv form etter lysosomal degradering av komplekset [118].

Målet med denne oppgaven var å etablere et HER2-målrettet immunotoksin (IT) for så å evaluere dette for levering med PCI. Et trastuzumab-konjugat ble konstruert vha biotin-streptavidin med sikte på målrettet levering av plantetoksinet saporin til HER2-positiv kreftceller. På bakgrunn av tidligere publikasjoner [109] og proteindeteksjon med Western blotting (Figur 3.1) ble Zr-75-1 benyttet som HER2-positiv cellelinje i forsøkene, mens MDA-MB231 ble inkludert som HER2-negativ kontrollcellelinje. Begge er humane cancer mamma cellelinjer.

4.2 Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a}

Intracellulær lokalisering av fotosensitizeren (PS) ble undersøkt, fordi endolysosomal lokalisering er en forutsetning for frigjøring av endocyterte molekyler med PCI. Fluorescensmikroskopi av Zr-75-1 og MDA-MB231 celler etter 18 timer inkubasjon med TPCS_{2a}, vask og 4 timer inkubasjon i PS-fritt medium viste granulær fluorescens, som trolig reflekterer endolysosomal lokalisering av TPCS_{2a} (Figur 3.5 og 3.6, bilde 2b). Bilder tatt før vask og 4 timer inkubasjon i PS-fritt medium viste i tillegg en diffus fluorescens over hele cellene (Figur 3.5 og 3.6, bilde 1b). På grunn av sin amfifile struktur vil TPCS_{2a} penetrere inn i, men ikke gjennom cellulære membraner. Den diffuse fluorescensen etter 18 timer inkubasjon med TPCS_{2a} skyldes derfor trolig binding av TPCS_{2a} til plasmamembranen, og ikke lokalisering i cytoplasma. Dette kunne imidlertid vært dokumentert bedre med konfokal mikroskopi. Mangel på deteksjon av fluorescens på plasmamembranen etter 4 timer vask med medium tyder på at TPCS_{2a} vaskes bort fra plasmamembranen. Observasjonene er i samsvar med resultater av forsøk med andre amfifile PS'e (AIPcS_{2a} og TPPS_{2a}) [28;48].

4.2.1 Konsekvenser av lokalisering av PS på plasmamembranen for PCI

I PCI-behandlingen vil man i tillegg til den fotokjemisk induerte leveringen av terapeutiske molekyler også indusere direkte cytotoxiske effekter av den fotokjemiske behandlingen. Lokalisering av PS på plasmamembranen ved belysnings-tidspunktet vil kunne medføre oksidering av membrankomponenter, som umettede fettsyrer og kolesterol, og gi skade på plasmamembranen. Skadene kan indusere

nekrotiske prosesser som, avhengig av hvor raskt de inntreffer, kan innvirke på den cytotoksiske effekten av fotokjemisk frigjøring av makromolekylet. Ved PCI med "lys før"-strategi kan oksidativ skade på plasmamembranen føre til endret opptak av makromolekylet (Figur 3.18). Mikroskopistudier av intracellulær lokalisering av TPCS_{2a} (Figur 3.5 og 3.6) tyder på at det meste av PS er borte fra plasmamembranen etter 4 timer vask i PS-fritt medium. Det kan imidlertid ikke utelukkes at små mengder PS fortsatt er gjenværende på plasmamembranen. Alternativt kan PS relokaliseres under lysbehandlingen fra de endocytiske vesiklene til plasmamembranen.

4.3 Cytotoksiske effekter av PDT og PCI av saporin i Zr-75-1 og MDA-MB231 celler

Cytotoksisiteten som medieres ved levering av toksiner med PCI er et resultat av den fotokjemiske behandlingen og behandling med toksinet. Saporin (type 1 RIP) er alene lite toksisk mot celler grunnet ineffektivt opptak ved pinocytose etterfulgt av degradering i lysosomer, som gir liten grad av translokalisering til cytosol [60]. *In vitro* studier har vist at cytotoksisiteten av type 1 RIPs kan økes mer enn 100 ganger i kombinasjon med fotokjemisk behandling [119].

Forsøk hvor saporin alene, PDT og PCI av saporin ble studert viser en synergistisk toksisk effekt ved kombinasjon av saporin og fotokjemisk behandling (Figur 3.8 og 3.9). Den observerte kombinerte effekten av PDT og saporin er større enn additiv effekt ved alle lysdoser i både Zr-75-1 og MDA-MB231 cellene. Større cytotoksisitet av PCI av saporin i MDA-MB231 enn i Zr-75-1 cellene ved tilsvarende lysdoser kan skyldes forskjeller i cellelinjenes endocytoserate eller cellenes sensitivitet overfor den fotokjemiske behandlingen eller saporin. MDA-MB231 cellene var mer sensitive overfor både PDT og saporin (Figur 3.7 og 3.9), noe som kan skyldes både høyere endocytoserate og høyere generell behandlingssensitivitet. Imidlertid indikerer den sterkere cytotoksiske effekten av den fotokjemiske frigjøring av endocyttert saporin at endocytoseraten er høyere i MDA-MB231 cellene enn i Zr-75-1 cellene. Dette bør imidlertid verifiseres med cellulære opptaksstudier av endocytosemarkører og TPCS_{2a}.

4.4 Cytotoksiske effekter av streptavidin-saporin

En potensiell begrensning med bruk av konjugater av saporin sammenlignet med fritt saporin er at den toksiske aktiviteten kan bli redusert som følge av den kjemiske konjugeringen. Trastuzumab ble kompleksert til saporin via biotin-streptavidin binding. Bindingen ansees som en enkel metode for konstruering av målrettede konjugater og er vist å bevare spesifisiteten av både EGF-saporin og cetuximab-saporin [2]. Den cytotoksiske effekten av saporin og streptavidin-saporin med og uten PCI har imidlertid ikke blitt sammenlignet tidligere. Dosene som ble undersøkt av saporin og streptavidin-saporin alene i Zr-75-1 og MDA-MB231 cellene var for lave til å kunne trekke bastante slutninger angående deres relative cytotoxicitet (Figur 3.12 og 3.13). Ved levering med PCI var det imidlertid en klart større effekt av saporin enn streptavidin-saporin i MDA-MB231 cellene (Figur 3.13), noe som også kunne indikeres ut fra resultatene med Zr-75-1 cellene selv om dosene i disse studiene var for lave til å trekke klare konklusjoner (Figur 3.12). Den observerte effekten av behandlingene vil være en sum av cellulært opptak, frigjøring til cytosol og direkte cytotoxic effekt av saporin. Studier gjort av Hess et al. viste at EC_{50} -verdien (dvs. 50 % av maksimal effektiv konsentrasjon) av saporin i et cellefritt reticulocyt lysat system var 6,4 pM sammenlignet med 190 pM for streptavidin-saporin, noe som tilsvarer ~ 30 ganger reduksjon i den direkte cytotoxic effekten som følge av konjugeringen [120]. Ved kompleksing av streptavidin-saporin til gpC9M (en høy-aviditetstetramer) ble EC_{50} -verdien redusert til 43,8 pM. Resultatet tyder på at saporins enzymatiske aktivitet hemmes ved binding av saporin til streptavidin, men at aktiviteten delvis reetableres når streptavidin binder til tetrameren gpC9M. En mulig forklaring på fenomenet er at konformasjonsendringer finner sted ved binding av streptavidin-saporin som fører til at streptavidin stenger for saporins aktive sete. Ved binding av streptavidin til gpC9M skjer igjen en konformasjonsendring som gjør at det aktive setet eksponeres. Det kan tenkes at dette er årsak til den reduserte effekten av PCI av streptavidin-saporin sammenlignet med PCI av saporin som er vist i Figur 3.12 og 3.13.

4.5 Studier av immunotoksinet trastuzumab-saporin

Studier viste at trastuzumab-saporin alene utøvde lav cytotoxicitet i både HER2-positive Zr-75-1 celler og HER2-negative MDA-MB231 celler (Figur 3.15 og 3.16). Den lave cytotoxiciske effekten av trastuzumab-saporin i Zr-75-1 og MDA-MB231 cellene kan blant annet skyldes ineffektivt opptak og lav translokalisering av saporin til cytosol. At hverken det HER2-spesifikke IT'et eller streptavidin-saporin inducerer signifikant cytotoxicitet i de HER2-positive cellene kan tyde på at manglende endolysosomal frigjøring av toksinet er en begrensning for terapeutisk effekt.

4.5.1 PCI av trastuzumab-saporin

PCI er i flere studier vist å potensierte effekten av målrettede toksiner, både affinitetstoksiner [2] og IT'er [3]. Blant annet er cytotoxiciteten av MOC31-gelonin og EGF-saporin vist å økes hhv. >100 ganger og > 1000 ganger som følge av levering med PCI [2;50]. Trastuzumab-saporin og streptavidin-saporin ble evaluert for levering med PCI. Levering med PCI med "lys etter" strategi resulterte i en synergistisk toksisk effekt sammenlignet med effekt av fotokjemisk behandling og trastuzumab-saporin/streptavidin-saporin alene i både Zr-75-1 og MDA-MB231 cellene (Figur 3.15 og 3.16). Resultatet indikerer at den fotokjemiske behandlingen fører til frigjøring av toksinet fra endosomer og lysosomer før det blir proteolytisk degradert.

4.5.2 HER2-spesifisitet av trastuzumab-saporin

Trastuzumab-saporin induserte betydelig høyere toksisitet enn streptavidin-saporin ved levering med PCI i HER2-positive Zr-75-1 celler (Figur 3.15). Den cytotoxiciske effekten i Zr-75-1 cellene var ca. 10 ganger større etter PCI av trastuzumab-saporin enn PCI av streptavidin-saporin ved en lysdose som gav ca. 41 % celleoverlevelse etter PDT. I de HER2-negative MDA-MB231 cellene var det derimot ingen tilsvarende forskjell på PCI-effekt av trastuzumab-saporin og streptavidin-saporin (Figur 3.16). Observasjonene bekrefter at trastuzumab-saporin leveres spesifikt til celler som overuttrykker HER2. Resultatene samsvarer med publikasjoner som

omhandler IT'er, hvor spesifikke mAb-antigen interaksjoner rapporteres å inducere internalisering av IT'ene [89;90]. Trastuzumab-saporins HER2-spesifisitet ble også dokumentert ved å inkubere Zr-75-1 celler med ukonjugert trastuzumab i forkant av administrasjon av trastuzumab-saporin (Figur 3.17). Trastuzumab ble tilsatt i overskudd for å oppnå metning av HER2-reseptoren og derved forhindre interaksjon mellom trastuzumab-saporin og HER2. HER2-blokkering førte til at trastuzumab-saporin ikke utøvde større cytotoxiskitet enn streptavidin-saporin ved levering med PCI. Det indikerer at binding av trastuzumab til saporin øker opptaket av saporin primært via binding til HER2 i Zr-75-1 cellene.

4.6 Sammenligning av PCI med "Lys før" og "lys etter" strategi

Trastuzumab-saporin induerte større cytotoxisk effekt med PCI med "lys etter"-strategi enn med "lys før" (Figur 3.18). Resultatene samsvarer med PCI-studier av andre målrettede toksiner [2;3]. Studier av den cytotoxiske effekten av trastuzumab-saporin (Figur 3.15 og 3.16) tyder på at antistoffbinding til HER2 er avgjørende for opptaket av IT'et. Redusert effekt av trastuzumab-saporin ved administrering til cellene etter PDT kan derfor tenkes å skyldes fotokjemisk skade på reseptoren.

4.6.1 Fotokjemisk skade av EGFR og HER2 etter PDT

PDT med TPPS_{2a} har i tidligere studier blitt vist å hemme EGF-stimulert fosforylering av EGFR i flere cellelinjer både med og uten 4 timer inkubasjon PS-fritt medium i forkant av belysning [28]. Effekt på total EGFR har kun blitt påvist direkte etter 18 timer inkubasjon med TPPS_{2a}. Ekspresjon av EGFR og HER2 etter behandling av celler med PDT ble studert med Western blotting. Studiene viste at ekspresjon av både total mengde og aktivert (fosforylert) form av reseptorene var nedregulert 5 minutter etter fotokjemisk behandling i både MDA-MB231 og Zr-75-1 cellene (Figur 3.20 og 3.21). Dette kan skyldes at EGFR og HER2 ble skadet som følge av relokalisering av PS ved belysning [16] eller at små mengder av PS var gjenværende på plasmamembranen etter vaskeprosedyren.

4.6.2 Opptak av trastuzumab-saporin etter fotokjemisk behandling

Intracellulært opptak av trastuzumab-saporin i HER2-positive Zr-75-1 celler som i forkant var blitt behandlet med PDT ble studert vha fluorescensmikroskopi. Alexa488-merket trastuzumab-biotin-streptavidin ble brukt for å studere opptak av trastuzumab-saporin, da det ble antatt at saporin ikke er av betydning for opptak av IT'et. I Zr-75-1 cellene som ikke var behandlet med PDT var konjugatet lokalisert i granula, noe som indikerte at det hadde blitt internalisert og tatt opp i endocytiske vesikler (Figur 3.22, bilde 1b). Ved inkubering av Zr-75-1 celler med konjugatet etter PDT ble fluorescensen detektert som store felt i forbindelse med plasmamembranen (Figur 3.22, bilde 2b). Dette kunne tyde på at trastuzumab hadde bundet til HER2 uten at komplekset ble internalisert. Mulige årsaker til klyngevis lokalisering av fluorescensen og manglende internalisering bør diskuteres.

Det er tidligere rapportert at PDT ikke inhiberer endocytose generelt, siden gelonin inducerer større cytotoxicitet ved PCI med "lys før" enn "lys etter"-strategi [56]. Studier tyder imidlertid på at PDT kan inhibere reseptormediert endocytose [2;3]. PDT med lipofile og amfifile PS'e kan indusere oksidasjon av umettede lipider, som fosfolipider og kolesterol, i cellulære membraner [121]. Lipidsammensetningen i plasmamembranen er vist å påvirke assosieringsegenskaper og biologiske funksjoner hos reseptorene i EGFR/HER-familien [122]. Kolesterol utgjør ~ 45 mol% av det totale lipidinnholdet i plasmamembranen [123] og sfingolipider og kolesterol finnes i særlig høy konsentrasjon i lipid rafts hvor HER2 og EGFR er funnet å ko-lokaliseres [122]. Oksidasjon av umettede lipider gir dannelse av lipidperoksider, som brytes ned til produkter som endrer lipid raftenes egenskaper dramatisk [124]. PDT inducerer dannelse av ceramid som er vist å indusere en spontan assosiering av lipid rafts i nanometer-skala til større domener i mikrometer-skala [125]. Dannelse av slike store rafts er en fundamental prosess for reseptor clustering, rekruttering av intracellulære molekyler eller eksklusjon av inhiberende signalfaktorer, som initierer signaltransduksjon [126]. Studier tyder på at kolesterol sørger for et dynamisk miljø i lipid rafts, muligens gjennom F-actin polymerisering, og at oksidasjon av kolesterol vil kunne endre mobiliteten av HER2 og EGFR i plasmamembranen [127]. PDT kan derfor gjennom induksjon av fotooksidativ skade på membranlipider ha indirekte

innvirkning på reseptorenes mobilitet, dimeriseringsegenskaper og evnen til å mediere signalisering [128].

4.7 Potensielle fordeler og begrensninger ved behandling av brystkreft med PCI av trastuzumab-saporin

IT'er kan potensielt tilby en mer effektiv og spesifikk kreftbehandling sammenlignet med konvensjonelle terapier. Til nå har imidlertid kun et IT blitt godkjent; et konjugat av IL-2 og modifisert difteria toksin for behandling av kutant T-celle lymfom [129]. Trastuzumab-saporin kan potensielt utnyttes i målrettet behandling av kreftceller med overekspressjon av HER2. Ved behandling med PCI benyttes ikke antistoffet primært som et legemiddel, men som et middel for levering av et legemiddel, i dette tilfellet saporin. Trastuzumab kan likevel hemme cellevekst gjennom inhibering av vekstfremmende signalveier, samt indusering av ADCC og CDC *in vivo*.

Generelle utfordringer med behandling med IT'er er opptak i normale celler som fører til uønsket toksisitet og immunogenisitet. I tillegg begrenses behandling av solide tumorer av dårlig penetrasjon av IT'er inn i tumorvev [130]. HER2 uttrykkes til en viss grad i normale celler, noe som kan redusere spesifisiteten av trastuzumab-saporin behandlingen. Trastuzumabs lange halveringstid (3-4 uker) kan gi opphav til uønskede bivirkninger, blant annet hepatotoksisitet, kardiotoxikisitet og vascular leak syndrome (VLS) [114]. VLS kan reduseres ved å bruke små konjugater med kort halveringstid i plasma og leveringsmetoder som hindrer binding av toksinet til endotelceller [129]. Lang halveringstid i plasma kan imidlertid ha sine fordeler ved at større konsentrasjonsgradient over cellulære barrierer øker penetrasjon inn i tumor [87;113]. Størrelsen av trastuzumab-saporin (>240 kDa) kan være en begrensning, både pga begrenset penetrasjon inn i tumorvev og immunogenisitet. Størrelsen kunne vært redusert ved å utnytte kun Fv-delen av antistoffet, men trastuzumab mister da evnen til å mediere ADCC og CDC, som er vist å være viktig for effekt av trastuzumab *in vivo* [131]. Immunogenisiteten mot selve antistoffet antas å være minimal, siden trastuzumab er et humanisert antistoff. Produksjon av nøytraliserende

antistoffer mot saporin derimot er ikke usannsynlig, siden toksinet er produsert i planter.

PCI kan bidra til å overkomme flere av utfordringene og øke det terapeutiske potensialet av IT'er. PCI kan gi økt selektivitet og redusert toksisitet ved at toksinet kun frigjøres i celler hvor PS aktiveres. PS akkumuleres som kjent preferensielt i tumorvev og belysning skjer lokalt. Toksiner som tas opp i normale celler uten PS vil degraderes lysosomalt. PCI kan videre bidra til redusert immunogenisitet og resistensutvikling, siden høy effektivitet gjør at antall behandlingssykluser kan reduseres.

4.8 Eksperimentelle feilkilder

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

4.8.1 Telling og utsåing av celler

Telling av celler ble gjort ved å pipettere ut en dråpe av cellesuspensjonen til et tellekammer og telle cellene vha mikroskop. Det kan tenkes at løsningen ikke var homogen og at uttaket av suspensjonen derfor ikke var representativ for resten av løsningen. Unøyaktighet hos operatør under telleprosessen kan heller ikke utelukkes.

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

Arbeid med PS ble konsekvent utført under dempet belysning. Det kan imidlertid tenkes at PS har blitt aktivert som følge av utilsiktet lyseksponering. Celler som skulle ha ulike lysdose ble sådd ut og belyst i samme brett. Det kan derfor tenkes at cellene ble utsatt for mer lys enn de skulle ha blitt.

4.8.3 Etablering av immunotoksinet trastuzumab-saporin

Biotinylert trastuzumab ble kompleksert med et streptavidin-saporin konjugat med ratio 2:1 av saporin og streptavidin og fire bindingssteder for biotin per streptavidin-molekyl. Biotin-trastuzumab og streptavidin-saporin ble derfor blandet i molforholdet 4:1. Biotin binder til streptavidin med meget høy affinitetskonstant, men muligheten for dannelse av flere produkter med ulik ratio mellom trastuzumab og saporin var likevel til stede. Dette kan ha resultert i konjugater med høy molekylvekt (> 700 kDa) som vil ha vanskeligheter med å bli tatt opp i solide tumorer *in vivo*. Studien var ment som en ”proof of concept”- studie, og det ble derfor ikke gjort noe forsøk på å optimalisere komplekseringen.

4.8.4 MTT-assay vs. Klonogen overlevelse-assay

MTT-assay måler viabilitet ved å benytte et substrat som modifiseres av celler med mitokondriell enzymaktivitet. Celler som er døende kan imidlertid fortsatt kan ha en viss mitokondrieaktivitet og derfor er varighet mellom behandling av cellene og cytotoxissitets-assay en viktig faktor. Dersom cytotoxissitets-assayet gjennomføres for kort tid etter behandlingen kan dette resultere i en overestimering av LC_{50} (konsentrasjonen som gir 50% drap) ved at antall døende celler underestimeres. Klonogen overlevelse-assay beregner antall celler som er opphav til nye kolonier og regnes som gullstandarden for bestemmelse av celleviabilitet *in vitro* [132]. Dannelse av celleaggregater, lang tid mellom behandling og cytotoxissitets-assay og lav utsåingseffektivitet (plating efficiency) kan imidlertid begrense nytten av klonogene assays.

KAPITTEL 5: REFERANSER

- [1] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Cancer; in Gibbs S, et al (eds): Molecular biology of the cell. New York, Garland Science, 2001, pp 1313-1362.
- [2] Weyergang A, Selbo PK, Berg K: Photochemically stimulated drug delivery increases the cytotoxicity and specificity of EGF-saporin. *J Control Release* 10-3-2006;111:165-173.
- [3] Yip WL, Weyergang A, Berg K, Tonnesen HH, Selbo PK: Targeted delivery and enhanced cytotoxicity of cetuximab-saporin by photochemical internalization in EGFR-positive cancer cells. *Mol Pharm* 2007;4:241-251.
- [4] Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK: Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:380-387.
- [5] Hamblin MR, Mroz P: *Advances In Photodynamic Therapy*. 2008.
- [6] Geavlete B, Multescu R, Georgescu D, Geavlete P: [Hexvix induced fluorescence blue light cystoscopy--a new perspective in superficial bladder tumors diagnosis]. *Chirurgia (Bucur)* 2008;103:559-564.
- [7] Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R: Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:293-302.
- [8] Brown SB, Brown EA, Walker I: The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2004;5:497-508.
- [9] Von Tappeiner H, Jesionek A: Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Muench Med Wochenschr* 1903;47:2042-2044.
- [10] LIPSON RL, BALDES EJ, OLSEN AM: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst* 1961;26:1-11.:1-11.
- [11] Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG: Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* 1975;55:115-121.
- [12] Dougherty TJ: Activated dyes as antitumor agents. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:1333-1336.
- [13] Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978;38:2628-2635.
- [14] Moan J, Peng Q: An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res* 2003;23:3591-3600.

- [15] Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X, Childs C, Sibata CH: Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004.
- [16] Wood SR, Holroyd JA, Brown SB: The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. *Photochem Photobiol* 1997;65:397-402.
- [17] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR: Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005;91-106.
- [18] Allison BA, Pritchard PH, Levy JG: Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Br J Cancer* 1994;69:833-839.
- [19] Solban N, Rizvi I, Hasan T: Targeted photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2006;38:522-531.
- [20] Henderson BW, Bellnier DA: Tissue localization of photosensitizers and the mechanism of photodynamic tissue destruction. *Ciba Found Symp* 1989;146:112-25; discussion 125-30.:112-125.
- [21] van Dongen GA, Visser GW, Vrouwenraets MB: Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 13-1-2004;56:31-52.
- [22] Sharman WM, van Lier JE, Allen CM: Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 13-1-2004;56:53-76.
- [23] Park S: [Delivery of photosensitizers for photodynamic therapy]. *Korean J Gastroenterol* 2007;49:300-313.
- [24] Soncin M, Buseti A, Reddi E, Jori G, Rither BD, Kenney ME, Rodgers MA: Pharmacokinetic and phototherapeutic properties of axially substituted Si(IV)-tetradibenzobarreleno-octabutoxyphthalocyanines. *J Photochem Photobiol B* 1997;40:163-167.
- [25] Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM: Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. *Br J Cancer* 1999;79:72-81.
- [26] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Intracellular vesicular traffic; in *Molecular Biology of the Cell*: 2002, pp 711-766.
- [27] Berg K, Western A, Bommer JC, Moan J: Intracellular localization of sulfonated meso-tetraphenylporphines in a human carcinoma cell line. *Photochem Photobiol* 1990;52:481-487.
- [28] Weyergang A, Selbo PK, Berg K: Y1068 phosphorylation is the most sensitive target of disulfonated tetraphenylporphyrin-based photodynamic

- therapy on epidermal growth factor receptor. *Biochem Pharmacol* 15-7-2007;74:226-235.
- [29] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q: Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 17-6-1998;90:889-905.
- [30] Moan J, Berg K: The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991;53:549-553.
- [31] Moan J: On the diffusion of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photochem Photobiol B* 1990.
- [32] Zonios G, Bykowski J, Kollias N: Skin melanin, hemoglobin, and light scattering properties can be quantitatively assessed in vivo using diffuse reflectance spectroscopy. *J Invest Dermatol* 2001;117:1452-1457.
- [33] Castano AP, Mroz P, Hamblin MR: Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 2006;6:535-545.
- [34] Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule JY, Habraken Y, Agostinis P: Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol* 15-10-2003;66:1651-1659.
- [35] Kessel D, Luo Y: Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B* 1998;42:89-95.
- [36] Moor AC: Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2000;57:1-13.
- [37] Reiners JJ, Jr., Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D: Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 2002;9:934-944.
- [38] Berg K, Madslie K, Bommer JC, Oftebro R, Winkelman JW, Moan J: Light induced relocalization of sulfonated meso-tetraphenylporphines in NHIK 3025 cells and effects of dose fractionation. *Photochem Photobiol* 1991;53:203-210.
- [39] Weyergang A, Kaalhus O, Berg K: Photodynamic therapy with an endocytically located photosensitizer cause a rapid activation of the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase, p38, and c-Jun NH2 terminal kinase with opposing effects on cell survival. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1740-1750.
- [40] Kessel D, Oleinick NL: Initiation of autophagy by photodynamic therapy. *Methods Enzymol* 2009;453:1-16.:1-16.
- [41] Bogen B, Munthe LA: *Immunologi*, ed 2nd. 2000.

- [42] Hunt DW, Levy JG: Immunomodulatory aspects of photodynamic therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 1998;7:57-64.
- [43] Musser DA, Camacho SH, Manderscheid PA, Oseroff AR: The anatomic site of photodynamic therapy is a determinant for immunosuppression in a murine model. *Photochem Photobiol* 1999;69:222-225.
- [44] Simkin GO, Tao JS, Levy JG, Hunt DW: IL-10 contributes to the inhibition of contact hypersensitivity in mice treated with photodynamic therapy. *J Immunol* 1-3-2000;164:2457-2462.
- [45] Gollnick SO, Musser DA, Oseroff AR, Vaughan L, Owczarczak B, Henderson BW: IL-10 does not play a role in cutaneous Photofrin photodynamic therapy-induced suppression of the contact hypersensitivity response. *Photochem Photobiol* 2001;74:811-816.
- [46] Korbelik M: PDT-associated host response and its role in the therapy outcome. *Lasers Surg Med* 2006;38:500-508.
- [47] Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Tjelle TE, Sandvig K, Moan J, Gaudernack G, Fodstad O, Kjolsrud S, Anholt H, Rodal GH, Rodal SK, Hogset A: Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res* 15-3-1999;59:1180-1183.
- [48] Selbo PK, Sandvig K, Kirveliëne V, Berg K: Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization. *Biochim Biophys Acta* 26-7-2000;1475:307-313.
- [49] Fretz MM, Hogset A, Koning GA, Jiskoot W, Storm G: Cytosolic delivery of liposomally targeted proteins induced by photochemical internalization. *Pharm Res* 2007;24:2040-2047.
- [50] Selbo PK, Sivam G, Fodstad O, Sandvig K, Berg K: Photochemical internalisation increases the cytotoxic effect of the immunotoxin MOC31-gelonin. *Int J Cancer* 15-9-2000;87:853-859.
- [51] Hogset A, Prasmickaite L, Engesaeter BO, Hellum M, Selbo PK, Olsen VM, Maelandsmo GM, Berg K: Light directed gene transfer by photochemical internalisation. *Curr Gene Ther* 2003;3:89-112.
- [52] Berg K, Dietze A, Kaalhus O, Hogset A: Site-specific drug delivery by photochemical internalization enhances the antitumor effect of bleomycin. *Clin Cancer Res* 1-12-2005;11:8476-8485.
- [53] Bareford LM, Swaan PW: Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 10-8-2007;59:748-758.
- [54] Selbo PK, Weyergang A, Bonsted A, Bown SG, Berg K: Photochemical internalization of therapeutic macromolecular agents: a novel strategy to kill multidrug-resistant cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:604-612.

- [55] Norum OJ, Selbo PK, Weyergang A, Giercksky KE, Berg K. Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy; from bench towards bedside medicine. 2009.
Ref Type: Unpublished Work
- [56] 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* 12-2-2002;86:652-657.
- [57] Dietze A, Selbo PK, Prasmickaite L, Weyergang A, Bonsted A, Engesaeter B, Hogset A, Berg K: Photochemical internalization (PCI): a new modality for light activation of endocytosed therapeutics. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006;25:521-536.
- [58] Selbo PK, Hogset A, Prasmickaite L, Berg K: Photochemical internalisation: a novel drug delivery system. *Tumour Biol* 2002;23:103-112.
- [59] Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Hogset A: Photochemical drug and gene delivery. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6:279-287.
- [60] Stirpe F, Battelli MG: Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1850-1866.
- [61] Selbo PK, Sivam G, Fodstad O, Sandvig K, Berg K: In vivo documentation of photochemical internalization, a novel approach to site specific cancer therapy. *Int J Cancer* 1-6-2001;92:761-766.
- [62] Rowinsky EK: The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med* 2004;55:433-57.:433-457.
- [63] de Bono JS, Rowinsky EK: The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med* 2002;8:S19-S26.
- [64] Wells A: EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:637-643.
- [65] Lemmon MA: Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res* 31-10-2008.
- [66] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Cell Communication; in *Molecular Biology of the Cell*: Garland Science, 2002.
- [67] Klein P, Mattoon D, Lemmon MA, Schlessinger J: A structure-based model for ligand binding and dimerization of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 27-1-2004;101:929-934.
- [68] Bublil EM, Yarden Y: The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:124-134.
- [69] Burgess AW: EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors* 2008;26:263-274.

- [70] Schaefer NG, Pestalozzi BC, Knuth A, Renner C: Potential use of humanized antibodies in the treatment of breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6:1065-1074.
- [71] Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 3-7-2000;19:3159-3167.
- [72] Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 13-10-2000;103:211-225.
- [73] Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-137.
- [74] Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G: The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68:93-106.
- [75] Buettner R, Mora LB, Jove R: Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002;8:945-954.
- [76] El-Rayes BF, LoRusso PM: Targeting the epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 2-8-2004;91:418-424.
- [77] Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 7-1-2000;100:57-70.
- [78] Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R: Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist* 2006;11 Suppl 1:4-12.:4-12.
- [79] Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M: Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2007;18:977-984.
- [80] Sebolt-Leopold JS: Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 27-12-2000;19:6594-6599.
- [81] Carter P: Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1:118-129.
- [82] Baselga J: The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001;37 Suppl 4:S16-22.:S16-S22.
- [83] Arteaga CL: ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 10-3-2003;284:122-130.
- [84] Leonard DS, Hill AD, Kelly L, Dijkstra B, McDermott E, O'Higgins NJ: Anti-human epidermal growth factor receptor 2 monoclonal antibody therapy for breast cancer. *Br J Surg* 2002;89:262-271.
- [85] Horton J: Her2 and trastuzumab in breast cancer. *Cancer Control* 2001;8:103-110.

- [86] Carter PJ, Senter PD: Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J* 2008;14:154-169.
- [87] Liu XY, Pop LM, Vitetta ES: Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol Rev* 2008;222:9-27.:9-27.
- [88] Felleskatalogen 2009. www.felleskatalogen.no . 11-3-2008.
Ref Type: Internet Communication
- [89] Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ: Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med* 2007;58:221-37.:221-237.
- [90] Kreitman RJ: Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J* 18-8-2006;8:E532-E551.
- [91] FitzGerald DJ, Kreitman R, Wilson W, Squires D, Pastan I: Recombinant immunotoxins for treating cancer. *Int J Med Microbiol* 2004;293:577-582.
- [92] Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F: Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta* 21-12-1993;1154:237-282.
- [93] Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K: The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* 25-4-1987;262:5908-5912.
- [94] Endo Y, Tsurugi K: RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem* 15-6-1987;262:8128-8130.
- [95] Nielsen K, Boston RS: RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS: A Plant Perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001;52:785-816.:785-816.
- [96] Sikriwal D, Ghosh P, Batra JK: Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2880-2888.
- [97] Chen H, Gao J, Lu Y, Kou G, Zhang H, Fan L, Sun Z, Guo Y, Zhong Y: Preparation and characterization of PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles for targeted cancer therapy. *J Control Release* 24-6-2008;128:209-216.
- [98] Weisser NE, Hall JC: Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol Adv* 14-4-2009.
- [99] Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 16-12-1983;65:55-63.

- [100] Advanced Targeting Systems. Evaluate Potential Targeting Molecules. <http://www.nature.com> . 30-5-2006. 22-4-2009.
Ref Type: Internet Communication
- [101] Diamandis EP, Christopoulos TK: The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 1991;37:625-636.
- [102] Roederer.M. Biotinylation of Antibodies. <http://www.drmmr.com/abcon/Biotin.html> . 2004. 30-3-2009.
Ref Type: Internet Communication
- [103] Thermo Fisher Scientific Inc. Sulfo-NHS biotinylation. www.piercenet.com . 22-4-2009.
Ref Type: Internet Communication
- [104] Thermo Fischer Scientific Inc. Pierce Biotin Quantitation Kit. www.piercenet.com . 2008. 30-3-2009.
Ref Type: Internet Communication
- [105] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Manipulating Proteins, DNA, and RNA; in Gibbs S, Anderson MS, Dilermia B, Goatly B (eds): *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science, 2001, pp 485-487.
- [106] Gelelectrophoresis. <http://web.chemistry.gatech.edu> . 2009.
Ref Type: Internet Communication
- [107] Protein separation. <http://www.cas.vanderbilt.edu> . 2009.
Ref Type: Internet Communication
- [108] Invitrogen. Absorption and fluorescence emission spectra. www.invitrogen.com . 2009. 22-4-2009.
Ref Type: Internet Communication
- [109] Shiu LY, Liang CH, Huang YS, Sheu HM, Kuo KW: Downregulation of HER2/neu receptor by solamargine enhances anticancer drug-mediated cytotoxicity in breast cancer cells with high-expressing HER2/neu. *Cell Biol Toxicol* 2008;24:1-10.
- [110] Contessa JN, Abell A, Valerie K, Lin PS, Schmidt-Ullrich RK: ErbB receptor tyrosine kinase network inhibition radiosensitizes carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1-7-2006;65:851-858.
- [111] Warnberg F, White D, Anderson E, Knox F, Clarke RB, Morris J, Bundred NJ: Effect of a farnesyl transferase inhibitor (R115777) on ductal carcinoma in situ of the breast in a human xenograft model and on breast and ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res* 2006;8:R21.
- [112] Dietze A, Bonsted A, Hogset A, Berg K: Photochemical internalization enhances the cytotoxic effect of the protein toxin gelonin and transgene expression in sarcoma cells. *Photochem Photobiol* 2003;78:283-289.

- [113] Nielsen DL, Andersson M, Kamby C: HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* 2009;35:121-136.
- [114] an-Colomb W, Esteva FJ: Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer* 2008;44:2806-2812.
- [115] Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blattler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, Wong WL, Jacobson FS, Koeppe H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX: Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 15-11-2008;68:9280-9290.
- [116] Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M: Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1-2-2002;20:719-726.
- [117] Morris PG, Fornier MN: Novel anti-tubulin cytotoxic agents for breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:175-185.
- [118] Erickson HK, Park PU, Widdison WC, Kovtun YV, Garrett LM, Hoffman K, Lutz RJ, Goldmacher VS, Blattler WA: Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res* 15-4-2006;66:4426-4433.
- [119] Hogset A, Prasmickaite L, Selbo PK, Hellum M, Engesaeter BO, Bonsted A, Berg K: Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 13-1-2004;56:95-115.
- [120] Hess PR, Barnes C, Woolard MD, Johnson MD, Cullen JM, Collins EJ, Frelinger JA: Selective deletion of antigen-specific CD8+ T cells by MHC class I tetramers coupled to the type I ribosome-inactivating protein saporin. *Blood* 15-4-2007;109:3300-3307.
- [121] Girotti AW: Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 2001;63:103-113.
- [122] Menendez JA, Vellon L, Lupu R: Targeting fatty acid synthase-driven lipid rafts: a novel strategy to overcome trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Med Hypotheses* 2005;64:997-1001.
- [123] Bloch KE: Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* 1983;14:47-92.
- [124] Ayuyan AG, Cohen FS: Lipid peroxides promote large rafts: effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation. *Biophys J* 15-9-2006;91:2172-2183.

- [125] Schieke SM, von MC, Buchczyk DP, Timmer A, Grether-Beck S, Krutmann J, Holbrook NJ, Klotz LO: Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. *Free Radic Res* 2004;38:729-737.
- [126] Bionda C, Hadchity E, Alphonse G, Chapet O, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D: Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering. *Free Radic Biol Med* 1-9-2007;43:681-694.
- [127] Orr G, Hu D, Ozcelik S, Opresko LK, Wiley HS, Colson SD: Cholesterol dictates the freedom of EGF receptors and HER2 in the plane of the membrane. *Biophys J* 2005;89:1362-1373.
- [128] Simons K, Toomre D: Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:31-39.
- [129] Potala S, Sahoo SK, Verma RS: Targeted therapy of cancer using diphtheria toxin-derived immunotoxins. *Drug Discov Today* 2008;13:807-815.
- [130] Fukumura D, Jain RK: Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res* 2007;74:72-84.
- [131] Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ: Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:269-280.
- [132] Komissarova EV, Saha SK, Rossman TG: Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicol Appl Pharmacol* 1-1-2005;202:99-107.

APPENDIKS

A1 Kjemikalier

Acrylamid/Bis solution	(Bio-Rad)
Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate	(Molecular Probes)
Ammonium persulfate	(GE Healthcare)
Benzonase	(Merck)
BSA, bovine serum albumin	(Sigma-Aldrich)
DMSO, dimethyl sulfoxide	(Sigma-Aldrich)
EGF, epidermal growth factor	(Sigma-Aldrich)
Føtalt kalveserum, FCS	(GIBCO)
Glutamin	(Sigma-Aldrich)
Glycin	(Bio-Rad)
Herceptin® (trastuzumab)	(Roche)
Metanol	(Sigma-Aldrich)
MTT-løsning	(Sigma-Aldrich)
PBS, phosphate buffered saline	(Sigma-Aldrich)
Penicillin-streptomycin	(Sigma-Aldrich)
Phosphatase inhibitor cocktail I	(Sigma-Aldrich)
Phosphatase inhibitor cocktail II	(Sigma-Aldrich)
Protease inhibitor cocktail	(Sigma-Aldrich)
RPMI 1640 vekstmedium	(Sigma-Aldrich)
Saporin	(Sigma-Aldrich)
Strep-ZAP, Streptavidin-saporin	(ATS)
TEMED	(Bio-Rad)
Trypsin-EDTA-løsning (1x)	(Sigma-Aldrich)

A2 Leverandører

Advanced Targeting Systems (ATS), San Diego, CA, USA

American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Amersham Biosciences, Amershamplace, UK

BASF Corporation, Mount Olive, NJ

BD Biosciences, CA, USA

Bio-Rad Laboratories, CA, USA

Cell Signaling Technology,

Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland

GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sverige

GIBCO BRL, Paisley, UK

Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN, USA

HYCOR Biomedical Inc, CA, USA

Merck KgaA, Darmstadt, Tyskland

Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

Nalge Nunc International Corp., Naperville, IL

Nunclon, NuncTM, Roskilde, Danmark

Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL

Roche AG, Basel, Sveits

Sigma-Aldrich Corp, St.Louis, MO, USA

Tecan Trading AG, Sveits

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

A3 Løsninger**Lyseringsbuffer**

Lyserings-stock	945 µl
Protease inhibitor cocktail	10 µl
Phosphatase inhibitor cocktail I	10 µl
Phosphatase inhibitor cocktail II	10 µl
PMSF	5 µl
NaVO ₄	5 µl
NaF	5 µl
B-glycerol-P	10 µl

Separerende gel med 7,5 % acrylamid

dH ₂ O	4,35 ml
0,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml
40 % Acrylamid/Bis solution (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia PA)	1,9 ml
10 % ammonium persulfat	50 µl
TEMED	5 µl

Samlende gel

dH ₂ O	6,4 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl
40 % Acrylamid/Bis solution (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia PA)	1,9 ml
10 % ammonium persulfat	50 µl
TEMED	5 µl

10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

SDS	10 g
dH ₂ O	fortynnet til 100ml

0,5M Tris HCl med pH 6,8

Tris-HCl	17,5 g
Tris-base	1,7 g
dH ₂ O	fortynnet til 250 ml

1,5M Tris-HCl med pH 8,8

Tris-HCl	9,23 g
Tris-base	38,5 g
dH ₂ O	fortynnet til 250 ml

10x elektroforesebuffer

Tris-Base	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
dH ₂ O	fortynnet til 1L

1x elektroforesebuffer

10x elektroforesebuffer	100ml
dH ₂ O	fortynnet til 1L

10x transferbuffer

Tris-Base	30,3 g
Glycine	144 g
dH ₂ O	fortynnet til 1L

1x transferbuffer

10x transferbuffer	100 ml
Metanol	200 ml
dH ₂ O	fortynnet til 1L

TTBS

dH ₂ O	890 ml
10x TBS	100 ml
10 % Tween 20	10 ml

5 % tørrmelk i TTBS

Skim Milk Powder	5 g
TTBS	100 ml

5 % BSA i TTBS

BSA	5 g
TTBS	100 ml