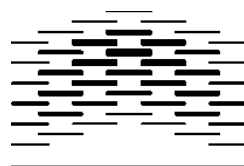
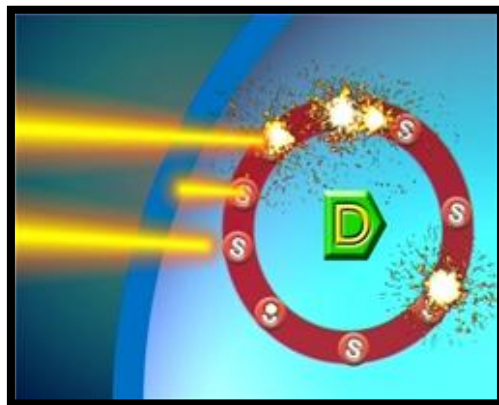


Fotokjemisk internalisering av immuntoksiner rettet mot kreftstamcellemarkørene CD44 og CD90 i karsinomer og sarkomer

Marianne Kausberg

2013



OSLO AND AKERSHUS
UNIVERSITY COLLEGE
OF APPLIED SCIENCES

Fotokjemisk internalisering av immuntoksiner rettet mot kreftstamcellemarkørene CD44 og CD90 i karsinomer og sarkomer

Av Marianne Kausberg

Masterstudium i Biomedisin

Fakultet for Helsefag

Masteroppgave, 60 studiepoeng

Utført ved Seksjon for Strålingsbiologi, Institutt for Kreftforskning, Radiumhospitalet

Hovedveileder: Dr. Pål Kristian Selbo

Biveileder: PhD-student Monica Bostad

21.05.2013



Forord

Arbeidet med denne masteroppaven er utført i perioden august 2012 til mai 2013 ved Seksjon for strålingsbiologi, Institutt for kreftforskning, Radiumhospitalet. Oppgaven er skrevet siste året av utdanningen for master i Biomedisin ved Høgskolen i Oslo og Akershus. Oppgaven er basert på et samarbeid mellom PCI Biotech AS og PCI-gruppen ved Seksjon for strålingsbiologi, og har inngått i Senter for forskningsdrevet innovasjon – Cancer Stem Cell Innovation Center (SFI-CAST).

Først og fremst ønsker jeg å rette en stor takk til mine veildere i PCI-gruppen, Dr. Pål Kristian Selbo og PhD-student Monica Bostad for god støtte og veiledning under hele prosjektet. Takk for gode tilbakemeldinger, innspill og et spennende prosjekt. Takk til Marius Strømbo Eng for innføring i det praktiske arbeidet, samt gode bidrag ved databehandling. Takk til Cathrine Elistabeth Olsen for alltid å være tilgjengelig og hjelpsom ved diverse spørsmål. Jeg ønsker også å takke resten av PCI-gruppen for at jeg har fått vært en del av et svært hyggelig og lærerikt miljø. Takk til Idun D. Rein og Kirsti S. Landsverk for hjelp med flowcytometrianalyser, samt Ellen Skarpen for analyse ved konfokalmikroskopi.

Jeg ønsker også å nevne masterstudentgjengen som jeg har vært så heldig å dele arbeidsplass med. Dere har bidratt til å gjøre hverdagen ekstra trivelig!

Til sist vil jeg rette en stor takk til familie, venner og min kjære Marius for støtte og oppmuntring til å gjennomføre dette prosjektet.

Radiumhospitalet, Oslo 21.05.2013

Marianne Kausberg

Sammendrag

Overflateproteinene CD44 og CD90 er identifisert som potensielle markører for kreftstamceller i flere typer kreft, og antas å være mulige terapeutiske mål for økt spesifikk behandling av kreftceller med stamcellelignende egenskaper. CD44 og CD90 ble i denne studien benyttet som målmarkører for spesifikk behandling med bruk av immuntoksiner (IT). Siden normale stamceller også uttrykker disse overflatemarkørene er det viktig at behandling med IT bare angriper populasjoner av kreftstamceller. Fotokjemisk internalisering (PCI) er en metode utviklet for frigjøring av makromolekyler til cytosol gjennom fotokjemisk ødeleggelse av endocytiske membraner, og ble benyttet i denne oppgaven for spesifikk levering av immuntoksinene IM7-SAP og OX7-SAP. Immuntoksinet IM7-SAP benyttet for CD44-targeting bestod av biotinyleret CD44 mAb bundet til det ribosom-inaktiverende proteinet saporin. Immuntoksinet OX7-SAP ble benyttet for CD90-targeting og var et ferdig konjugat av CD90 mAb og saporin. Det ble benyttet fire karsinomcellelinjer og tre liposarkomcellelinjer for å studere effekten av PCI-behandling med IT rettet mot CD44 og CD90. Resultatene demonstrerer at PCI øker den cytotoxiske effekten til immuntoksinene IM7-SAP og OX7-SAP signifikant i henholdsvis CD44⁺ og CD90⁺ cellelinjer. To cellelinjer var negative for markørene og ble benyttet som kontrollcellelinjer. Disse cellelinjene viste ingen økt cytotoxisk effekt ved behandling med IT. I tillegg ble effekten av immuntoksinet OX7-SAP sterkt redusert ved å blokkere reseptoren med overskudd av antistoff, som indikerer en spesifikk behandlingseffekt. Denne studien er den første til å demonstrere PCI-basert targeting av CD90 ved bruk av immuntoksin, og danner et grunnlag for videre prekliniske studier av PCI-behandling.

Abstract

The cell surface antigens CD44 and CD90 are identified as potential markers for cancer stem cells (CSC) in a number of different cancers, and assumed to be therapeutic targets for cancer cells with stem cell-like properties. CD44 and CD90 were in this thesis used as targets for a specific treatment with the use of immunotoxins (IT). Since also normal stem cells express these markers, it is of great importance that treatment with IT only attacks cell populations with CSC. Photochemical internalization (PCI) is a method developed for cytosolic release of macromolecules through photochemical disruption of endocytic membranes, and was applied in this thesis for specific delivery of the immunotoxins IM7-SAP and OX7-SAP. IM7-SAP used for CD44-targeting consisted of a biotinylated CD44 mAb bound to the ribosome-inactivating protein saporin. OX7-SAP used for CD90-targeting comprised of a chemical conjugate of CD90 mAb and saporin. Four carcinoma cell lines and three liposarcoma cell lines were used as models to study the effect of PCI treatment with IT targeting CD44 and CD90. The results demonstrates that PCI increases the cytotoxic effect of IM7-SAP and OX7-SAP significantly in CD44⁺ and CD90⁺ cell lines respectively. Two cell lines negative for the antigens were used as controls. These cell lines showed no increased cytotoxic response after PCI of IT compared to PCI of a non-targeting toxin control. In addition, the effect of OX7-SAP was strongly reduced after CD90 receptor blocking with an excess of the OX7 antibody, indicating specificity of the treatment. This study is the first of its kind to demonstrate PCI-based targeting of CD90 with the use of an IT, and provide a foundation for further pre-clinical studies of PCI-treatment.

Forkortelser

AML	Akutt myelogen leukemi
APC	Allophycocyanin
BCRP	Brystkreft resistensprotein
CCD	Cooled charge-coupled device
CD44	Cluster of differentiation 44
CD90	Cluster of differentiation 90
Chk1	Checkpoint kinase 1
Chk2	Checkpoint kinase 2
CSC	Cancer stamceller
DIC	Differensial interferenskontrast
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EMT	Epidermal til mesenchymal transisjon
FBS	Føtalt bovintserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
HAS 1-3	Hyaluronsyntase 1-3
IT	Immuntoksin
kDa	kilodalton
LAF	Laminar flow
LDL	Low density lipoprotein

mAb	Monoklonalt antistoff
MDR1	Multidrug resistensprotein 1
MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-defenyltetrazolium bromid
NPC	Nasofaryngeal karsinom
NT	No treatment
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCI	Fotokjemisk internalisering
PDT	Fotodynamisk terapi
PS	Fotosensitizer
RIP	Ribosom-inaktiverende protein
RME	Reseptormediert endocytose
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
rpm	Omdreiningar per minutt
TPCS _{2a}	Meso-tetrafenylklorin disulfonat
TPPS _{2a}	Disulfonert tetrafenylporfin

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	V
1. Introduksjon	- 1 -
1.1 Bakgrunn for oppgaven	- 1 -
1.2 Stamceller	- 1 -
1.3 Kreftstamceller	- 2 -
1.4 Identifisering av kreftstamceller	- 5 -
1.5 Overflatemarkører – CD44 og CD90	- 6 -
1.5.1 CD44	- 6 -
1.5.2 CD90	- 8 -
1.6 Fotodynamisk terapi og fotokjemisk internalisering	- 10 -
1.6.1 Fotodynamisk terapi (PDT)	- 10 -
1.6.2 Fotokjemisk internalisering (PCI)	- 13 -
1.7 Makromolekyler og internalisering	- 14 -
1.7.1 Ribosom-inaktiverende protein	- 14 -
1.7.2 Immuntoksiner.....	- 16 -
1.7.3 Internalisering av immuntoksiner	- 16 -
2. Materialer og metoder	- 18 -
2.1 Cellelinjer og dyrkingsmedium	- 18 -
2.1.1 Cellelinjer	- 18 -
2.1.2 Dyrkningsmedium	- 19 -
2.2 Standardprosedyrer for omsetting av celler i kultur	- 19 -
2.2.1 Trypsinering	- 19 -
2.2.2 Telling	- 20 -
2.3 PDT og PCI	- 21 -
2.3.1 Fotosensitizer og lyskilde	- 21 -
2.3.2 Cellekonsentrasjoner for PDT og PCI	- 22 -
2.3.3 PDT-behandling <i>in vitro</i>	- 23 -

2.3.4 PCI-behandling <i>in vitro</i>	- 24 -
2.3.5 Selektivitetsforsøk av CD90 antistoff ved PCI.....	- 24 -
2.3.6 Makromolekyler for PCI-behandling	- 25 -
2.4 Celleviabilitet og cytotoxissitets-assay.....	- 27 -
2.4.1 MTT.....	- 27 -
2.4.2 Klonogen overlevelse	- 28 -
2.5 Mikroskopi	- 30 -
2.5.1 Fluorescensmikroskopi.....	- 30 -
2.5.2 Konfokalmikroskopi.....	- 33 -
2.6 Flowcytometri	- 35 -
3. Resultater	- 37 -
3.1 Etablering av PCI-metoden	- 37 -
3.2 Ekspresjon av CD44 antigen	- 37 -
3.3 PCI med IT mot CD44	- 38 -
3.3.1 Celleviabilitet etter PCI-behandling med IT mot CD44.....	- 38 -
3.3.2 Cytotoxissitet etter PCI-behandling med IT mot CD44 på WiDr og DU145.....	- 40 -
3.4 Opptak av TPCS _{2a} og CD44 på WiDr cellelinje.....	- 41 -
3.5 Ekspresjon av CD90 antigen	- 42 -
3.6 PCI med IT mot CD90 i cellelinjene SA-4, SW872 og T778	- 43 -
3.6.1 Celleviabilitet etter PCI-behandling med IT mot CD90.....	- 43 -
3.6.2 Selektivitetsforsøk av CD90 antistoff ved PCI.....	- 45 -
3.7 Opptak av TPCS _{2a} og CD90-reseptor.....	- 46 -
3.8 T778 membranbinding - konfokalmikroskopi.....	- 48 -
3.9 SA-4 18 timers opptak.....	- 49 -
4 Diskusjon	- 50 -
5 Konklusjon	- 60 -
Vedlegg	- 61 -
Referanser.....	- 64 -

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn for oppgaven

Begrenset behandlingseffekt av etablerte kreftterapi, som strålebehandling og cellegift, har blitt tilskrevet subpopulasjoner av kreftceller innen ulike tumorvev med antatte stamcellelignende egenskaper, såkalte kreftstamceller (1). Kreftstamcellenes egenskaper er tenkt å motvirke tradisjonelle terapier gjennom blant annet nedregulert cellyklus og økt DNA-skade reparasjonssystem (1). Kreftstamceller er blitt identifisert gjennom ekspresjon av spesifikke overflatemarkører, som CD44 og CD90, og videre i transplantasjonsstudier i svært immunsvekkede mus. Måltrettet angrep av kreftstamceller ved bruk av immuntoksiner (IT) spesifikke mot slike overflatemarkører er tenkt å være en potensiell behandlingsmetode for økt spesifisitet innen kreftbehandling. Anvendelse av makromolekyler, som ribosom-inaktiverende proteiner og immuntoksiner, for behandling av kreft har fått en økende relevans de senere årene (2). Et stort hinder for terapeutisk effekt av disse makromolekylene er internalisering til cytosol. Fotokjemisk internalisering (PCI) er en metode som er utviklet for å overkomme dette hindret (2).

Hensikten med denne oppgaven var å etablere og evaluere måltrettet PCI-behandling av immuntoksiner rettet mot stamcellemerkørene CD44 og CD90 i cellelinjer fra karsinomer og sarkomer.

1.2 Stamceller

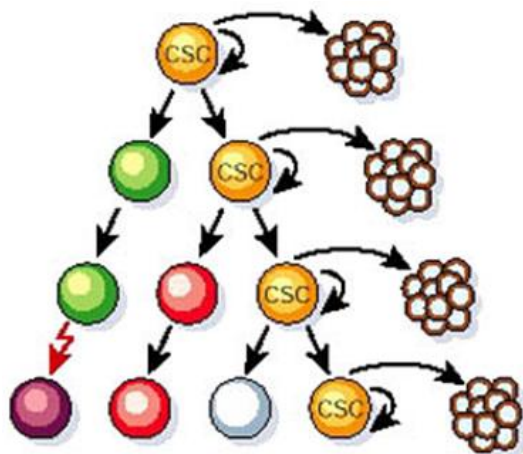
I 1963 demonstrerte fysikeren James Till og hematologen Ernest McCulloch eksperimentelt at normale stamceller har evne til både selvfornyelse og differensiering etter studier på transplanterte beinmargceller fra mus (3). Deres arbeid bygde på tidlige hypoteser og forskning på embryonale og hematopoietiske celler, utført av blant andre Ernst Haeckel, August Weismann, Theodor Boveri, Valentin Häcker, Artur Pappenheim, Alexander

Maximow, Wera Dantschakoff og Ernst Neumann (4). Stamceller er udifferensierte celler. De defineres på bakgrunn av sine egenskaper til selvfornyelse (evig liv) og differensiering. Embryonale stamceller gir opphav til nytt vev og nye organer under utviklingen. Somatiske stamceller vedlikeholder cellevevet gjennom differensiering av datterceller, og opprettholder samtidig en populasjon av stamceller gjennom selvfornyelse (5).

1.3 Kreftstamceller

Flere likhetstrekk mellom stamceller og visse typer kreftceller har ført til en alternativ forklaringsmodell for kreft som setter stamceller og kreft i sammenheng. Både normale stamceller og såkalte kreftstamceller (CSC) har evnen til selvfornyelse. Begge celletypene kan også gi opphav til en fenotypisk heterogen cellepopulasjon med en ulik grad av differensiering. Den vesentlige forskjellen mellom normale stamceller og kreftstamceller er at normale stamceller er nøye regulert og danner normalt vev og organer i kroppen, mens kreftstamceller mangler vekstkontroll og danner abnormalt vev som fører til tumordannelse. En tumor kan på denne måten tolkes som et abnormalt organ (6). Kreftstamceller antas imidlertid bare å være en subpopulasjon av kreftceller i et tumorvev, som innehar stamcellelignende egenskaper. Disse kreftcellene blir også kalt for tumorinitierende celler (6).

Den klonale evolusjonsmodellen har vært den dominerende forklaringsmodellen for karsinogenesen det siste århundret. Den tar utgangspunkt i at en eller flere normale celler gjennomgår en mutasjon som skaper ubalanse i homeostasen av celler, og som selektivt fører til en monoklonal utvikling av tumor (7). I følge den klonale evolusjonsmodellen består tumor av en relativt homogen cellepopulasjon, der alle kreftcellene har lik evne til å danne tumor. Teorien om kreftstamceller sier på den andre siden at tumor er hierarkisk organisert, med en heterogen cellepopulasjon. Kreftstamcellene er antatt å ha tumorinitierende egenskaper i tillegg til å ha evnen til å gi opphav til hele tumormassen ved asymmetrisk celledeling (figur 1.1) (8).



Figur 1.1: Illustrering av kreftstamceller (CSC) og deres egenskaper til selvfornyelse, differensiering og evne til å danne ny tumor. Figuren viser en hierarkisk og heterogen oppbygging av tumor. Modifisert fra (6).

Kreftstamceller har differensierende egenskaper. Oct-4 er en transkripsjonsfaktor som uttrykkes i den indre cellemassen av et embryo. Under utviklingen vil Oct-4 ekspresjon kun finne sted i gametene. Tap av Oct-4 ekspresjon er assosiert med differensiering av celler. En behandlingsmetode for embryonale karsinomer er retinoider som kan indusere differensiering. Ved differensiering av kreftcellene vil ekspresjon av Oct-4 minke. Oct-4 ekspresjon synes i denne sammenheng å være en faktor som opprettholder en udifferensiert tilstand til kreftstamceller (9).

Kreftstamceller har selvfornyende egenskaper. Mutasjoner som fører til feilregulering i signalveiene som kontrollerer normal selvfornyelse av stamceller, kan føre til flere ulike typer kreft. Det har blitt vist at flere spesifikke genprodukter som regulerer selvfornyelsen av normale somatiske stamceller også regulerer proliferasjonen til kreftstamceller. Signaleringsveiene WNT, sonic hedgehog (SHH), Notch, PTEN og BMI1 er alle vist å promotere selvfornyelse av somatiske stamceller, i tillegg til en neoplastisk proliferasjon i de samme vevene når de er dysregulerte (10).

Feil regulering av genene kan være et resultat av epigenetiske endringer. Epigenetikk kan defineres som arvelige endringer i genekspresjonen, som ikke skyldes endringer i den primære DNA-sekvensen (11). Epigenetiske avvik er funnet å være noen av de første

endringene i ulike kreftformer. I følge teorien om kreftstamceller er epigenetiske endringer i stamceller eller progenitorceller de første og bakenforliggende årsakene til initiering av kreft. Funn av kreftpasienter med endrede progenitorceller i normale vev støtter opp om denne hypotesen (11). Det har blitt gjort store gjennombrudd i karakteriseringen av epigenetiske endringer i kreft. Disse inkluderer globale endringer som hypometylering av DNA, hypoacetylering av kromatin, samt gen-spesifikke hypo- og hypermetyleringer. Global DNA hypometylering fører til kromosomal ustabilitet og økt tumorfrekvens. Dette har blitt vist både *in vitro* og *in vivo* i musemodeller (7).

Definisjonen av kreftstamceller avklarer ikke deres opphav, hvorvidt de stammer fra normale stamceller/progenitorceller eller fra mer differensierte celler (12). I mange typer vev der kreft ofte oppstår har cellene en relativ kort levetid. For at en celle skal bli tumorigen kreves det flere mutasjoner, noe som indikerer at kreftceller oppstår fra akkumulerte mutasjoner i stamceller (10). Det er likevel ikke utenkelig at differensierte kreftceller kan tilegne seg stamcellelignende egenskaper gjennom mutasjoner. Epidermal til mesenchymal transisjon (EMT) har blitt studert innen morfogenese på grunn av egenskaper til å omgjøre celler fra en tilstand til en annen. Utviklingsstudier har indikert at initiering av EMT under visse forutsetninger kan være en reversibel prosess (12). Det er foreslått at differensierte kreftceller kan gjennom spesifikke signaler reprogrammeres til udifferensierte kreftstamceller via en prosess relatert til EMT (12).

Kreftstamceller ser ut til å være mer resistent mot tradisjonelle behandlingsmetoder, som stråleterapi og cellegift, sammenlignet med mer differensierte kreftceller (13). Kreftstamceller har vist å ha en bedre evne til reparasjon av strålingsindusert DNA-skade gjennom en raskere aktivering av checkpoint-kinasene Chk1 og Chk2 (13). De fleste cytotoxiske terapier som brukes til kreftbehandling angriper og skader DNA, eller forstyrrer mitosen for å indusere celledød i hurtig prolifererende tumorceller. Både normale stamceller og kreftstamceller uttrykker ofte transportproteiner i ATP-bindingskasett (ABC)-familien, inklusive MDR1-transportprotein (multidrug resistance protein) og BCRP (brystkreft resistensprotein). Disse membranpumpene er i stand til å pumpe medikamenter ut av cytosol og hindrer deres effekt. I kombinasjon med at stamceller har en tregere cellyklus kan dette gi en svakere respons på cellegift (13). I tillegg er det vist at kreftceller med stamcellelignende egenskaper er mer

resistente mot reaktive oksygenforbindelser (reactive oxygen species, ROS) på grunn av forhøyet ekspresjon av enzymer eller antioksidanter som forhindrer eller quencher ROS. Dette er et problem ved stråleterapi, fotodynamisk terapi og ved anvendelse av cellegifter som er avhengig av tilstedeværelse av molekylært oksygen (O₂) for generering av ROS (14, 15).

1.4 Identifisering av kreftstamceller

For å kunne identifisere kreftstamceller må dere egenskaper overføres til en praktisk målbar metode. «Gullstandarden» for identifisering av kreftstamceller er å undersøke cellenes evne til å danne en fenotypisk kopi av den originale tumormassen i immunsvekkede mus. Dette utføres ved serietransplantasjoner av xenografter i immunsvekkede mus (16).

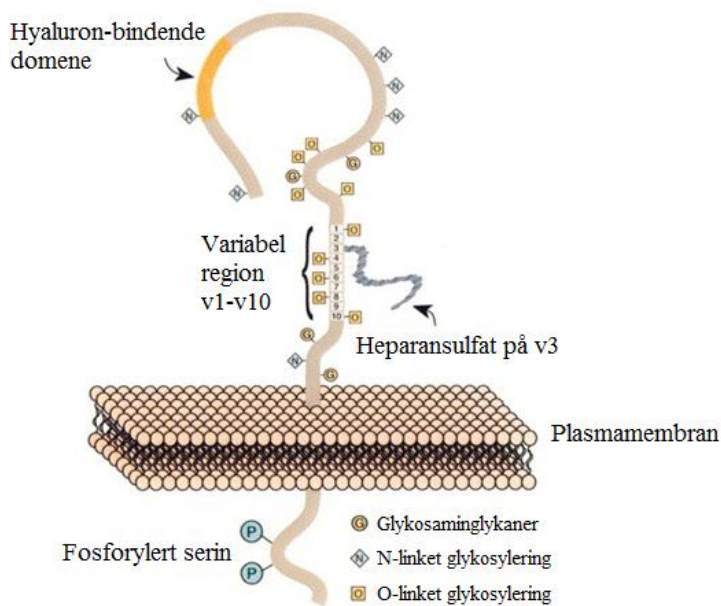
Kreftstamceller ble først isolert og karakterisert i 1997 av Bonnet *et al.* som demonstrerte at celler fra akutt myelogen leukemi (AML) hadde egenskaper til å danne leukemi-xenograft i immunsvekkede mus (1). Disse cellene hadde den spesifikke fenotypen CD34⁺/CD38⁻. Det har senere kommet bevis for kreftstamceller i solide tumorer, med spesifikke fenotyper som assosieres med stamcelle-egenskapene. I tillegg til tumordannelse *in vivo*, er prolifererende egenskaper i 2D (evne til å danne kloner) og 3D (evne til å danne sfæroider) og differensieringsstatus metoder som kan benyttes for identifisering og karakterisering av kreftstamceller. Ekspresjon av antigener uttrykt på celleoverflaten til normale stamceller blir ofte benyttet som markører for kreftstamceller, og er en effektiv metode for å isolere populasjoner av kreftstamceller (17).

1.5 Overflatemarkører – CD44 og CD90

1.5.1 CD44

CD44 er en transmembranreseptor kodet av et enkelt gen, lokalisert på den korte armen av kromosom 11 i mennesker (18-20). Genet består av 20 eksoner. Noen av disse er konstante og finnes i alle CD44 proteiner, mens noen er varianter og kan gjennomgå alternativ spleising. Den minste CD44-isoformen inneholder kun de konstante eksone og kalles standard CD44-isoform (CD44s). Alternativ spleising gir ulike varianter av CD44-proteinet (CD44v). CD44s er uttrykt i høy grad av både normale celler og kreftceller, mens de ulike CD44v isoformene uttrykkes hovedsakelig av kreftceller (21). Posttranslasjonelle modifikasjoner som N- og O-linket glykosylering bidrar også til at familien av CD44 proteiner er omfattende og allsidig (22, 23).

CD44-reseptoren har et ekstracellulært hyaluron-bindende domene (figur 1.2). Hyaluronsyre er et polysakkarid som finnes i den ekstracellulære matriks, med høyest konsentrasjoner i bindevev (24). Hyaluronsyre har en svært høy molekylvekt som rangerer fra 10^2 til 10^4 kDa. Hyaluronsyre syntetiseres i plasmamembranen av hyaluronansyntaser (HAS1-3) som er membranbundne proteiner (25). Denne produksjonen øker i prolifererende celler, i særlig grad under mitosen. Siden hyaluronsyre syntetiseres i plasmamembranen og vokser ut av celler er det foreslått at dette bidrar til å løsne prolifererende celler fra det støttende matriks, som gjør at de lettere kan dele seg (24). Det finnes i tillegg høye konsentrasjoner av hyaluronsyre i embryonisk vev som samsvarer med cellemigrasjon og proliferasjon. Likheter mellom embryonisk utvikling og tumorvev indikerer at hyaluronsyre har en viktig funksjon ved kreftutvikling (26). Binding mellom CD44 og hyaluronsyre aktiverer antiapoptotiske signalveier, samt overlevelse gjennom stabilisering MDR1-ekspressjon som er en membranpumpe som kan pumpe cytotoxiske medikamenter ut av celler (23).



Figur 1.2: Skjematisk fremstilling av CD44-reseptor med ekstracellulært hyaluron-bindende domene. Modifisert fra (27)

CD44 er den vanligste og mest hyppig observerte markøren for kreftstamceller (23). CD44 har blitt ansett som en markør for kreftstamceller i flere ulike kreftformer, som akutt myelogen leukemi, brystkreft, tykktarmskreft, leverkreft, kreft i bukspyttkjertelen og prostata (1). Omtrent 40 % av pasienter med lokalisert prostatatumor opplever tilbakefall etter innledende behandling. Utvikling og tilbakefall av prostatakreft har blitt assosiert med kreftstamceller med spesifikke celleoverflatemarkører (28). CD44 er identifisert som en sentral kreftstamcellemarkør for prostatakreft (21, 28). CD44⁺-kreftceller fra prostata er vist å være mer proliferative, klonogene, tumorigene og metastaserende enn CD44⁻ kreftceller (28).

CD44 er uttrykt på både normale celler og kreftceller, noe som kan skape komplikasjoner ved målrettet angrep på CD44⁺ kreftceller. Et klinisk fase I studie av immuntoksinet anti-CD44v6 Bivatuzumab Mertansine viste hudtoksisitet da CD44v6 uttrykkes på keratinocytter i huden. En pasient utviklet toksisk epidermal nekrose og døde, noe som førte til at det kliniske studiet ble avsluttet (29). Ved bruk av CD44-målrettede terapier er det derfor viktig å utvikle behandlingsformer som er mer spesifikke mot kreftceller og som skåner normale CD44-positive celler, spesielt normale stamceller.

1.5.2 CD90

CD90 (Thy-1) er et 25-37 kDa glykosylfosfatidylinositol (GPI)-ankret protein som uttrykkes av flere ulike celletyper. Proteinet er lokalisert i det ytre lipidlaget i plasmamembranen og kodes for på kromosom 11q22.3 i mennesker. CD90-ekspressjon er funnet i humane fibroblaster, neuroner, endoteliale celler og hematologiske stamceller (30). Den eksakte biologiske funksjonen til CD90 er fortsatt noe ukjent, men proteinet har blitt konserverv gjennom evolusjonen, noe som indikerer en viktig funksjon (31). CD90 er antatt å være involvert i cellulær gjenkjennelse, adhesjon og T-celle aktivering (32).

CD90 er funnet å være en markør for normale hematopoietiske stamceller (32, 33), keratinocytstamceller (34) og mesenchymale stamceller (35). Hematopoietiske stamceller har blitt isolert gjennom ekspressjon av CD90⁺/CD34⁺, og ekspressjon av CD90 minker ved økt differensiering. Dette kan indikere en viktig funksjon for CD90 under tidlig hematopoiese (32). Ved bruk av immunhistokjemi av normal hud er CD90-ekspressjon hovedsakelig funnet i basalcellelaget. CD90⁺ keratinocytter er også funnet å ha en høyere proliferasjonskapasitet, og evne til å danne kolonier (34).

CD90 er vist å være en potensiell markør for kreftstamceller i leverkreft (36), magekreft (37) og spiserørskreft (8). Isolerte kreftceller fra hepatocellulært karsinom med CD90-ekspressjon er vist å korrelere med tumorigenitet og metastaserende potensiale *in vivo* (36). CD90-ekspressjon er i tillegg korrelert med metastaser til lymfekjertler, økt evne til selvfornyelse og tumordannelse, og differensiering av celler isolert fra spiserørskreft (8). Ko-ekspressjon av ulike overflatemarkører for kreftstamceller har også blitt studert for deteksjon av subpopulasjoner av kreftstamceller. En slik multimarkør-hypotese for kreftstamceller har blitt foreslått for flere typer kreft (36). CD90-ekspressjon har blitt undersøkt i sammenheng med CD44-ekspressjon. Wang *et al.* viste at fenotypen CD90⁺/CD44⁺ hadde en økt resistens mot strålebehandling i cellelinjen LC006 fra lungekreft (38).

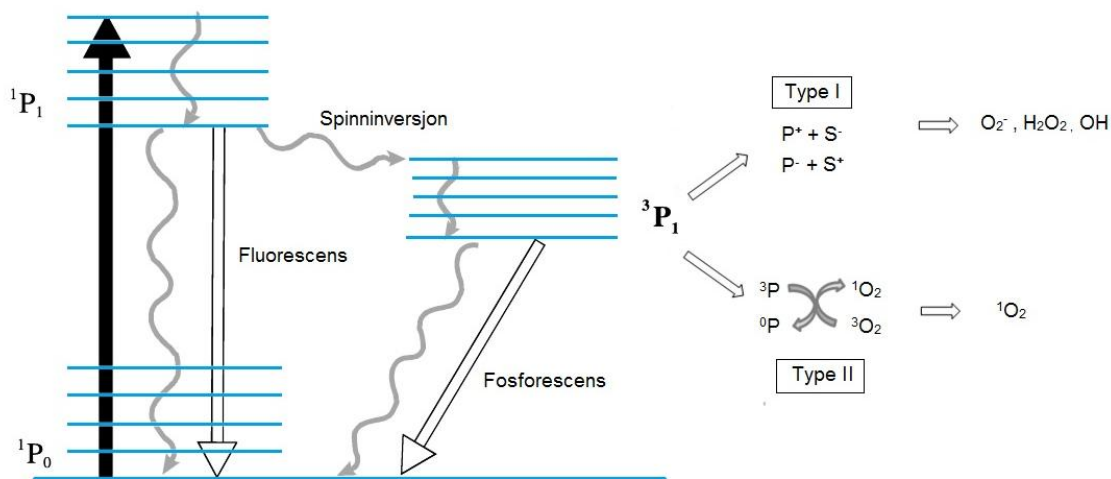
CD90 som markør for kreftstamceller møter imidlertid motstand da ekspresjon av CD90 indikerer en tumorsupressor-effekt i nasofaryngeal karsinom (NPC) og ovariekreft. Rollen til CD90 har blitt undersøkt i nasofaryngeal karsinom (NPC) og ovariekreft. Ekspresjon av CD90 var redusert eller fraværende i flere cellelinjer fra NPC, og gjenopprettelse av ekspresjonen førte til redusert evne til kolonidannelse. Immunsvekkede mus injisert med CD90-transfektete celler fra cellelinjen SKOV-3 viste dårligere prolifererende egenskaper og dannet mindre tumorer enn villtype SKOV-3 celler (30).

1.6 Fotodynamisk terapi og fotokjemisk internalisering

1.6.1 Fotodynamisk terapi (PDT)

For mer enn hundre år siden oppdaget medisinstudenten Oscar Raab at kombinasjonen av et kjemisk fargestoff og lys kunne føre til celledrap. Han antok at årsaken til dette var en energioverføring fra lyset til kjemikaliet, da hverken kjemikaliet eller lyset hadde samme effekt alene (39). Kjemikalier som har evnen til å absorbere lysenergi (fotoner) kalles fluorokromer. Den absorberte lysenergien kan overføre et elektron til et orbital med høyere energi, noe som gir et eksitert fluorokrom (40). Det eksiterte fluorokromet er ustabil og kan emitte energien i form av fluorescens eller varme (41). PDT benytter lysaktivering av fotosensitive stoffer, kalt fotosensitizere (PS) i kombinasjon med oksygen for å danne ROS (42).

En fotosensitizer er et fluorokrom som kan absorbere lys ved bestemte bølgelengder. Dette fører til eksitering til singlett tilstand, 1P_1 . Denne energirike tilstanden er ustabil, og 1P_1 vil gå tilbake til grunntilstand gjennom å avgi varme eller fluorescens, eller gjennomgå spinninversjon til triplett tilstand, 3P_1 . Triplett eksitert tilstand har en noe lengre levetid (μs vs ns) enn singlett eksitert tilstand, som gjør at den kan gjennomgå en av to fotokjemiske reaksjoner, type I og type II, eller avgi fosforescens for å returnere til grunntilstand (43). Ved type I fotokjemisk reaksjon går 3P_1 tilbake til 1P_0 gjennom elektronoverføring til et substrat, som danner frie radikaler. Frie radikaler kan reagere med oksygen og produsere ROS som hydrogenperoksid (H_2O_2), hydroksid (OH^\cdot) og superoksid anion (O_2^\cdot). Ved type II fotokjemisk reaksjon dannes singlett oksygen, $^1\text{O}_2$, via en energioverføringsprosess, der fotosensitizeren reagerer direkte med molekylært oksygen som eksiteres til singlett tilstand (figur 1.3) (43). Alle disse ROS kan forårsake skader på vitale deler av en celle.

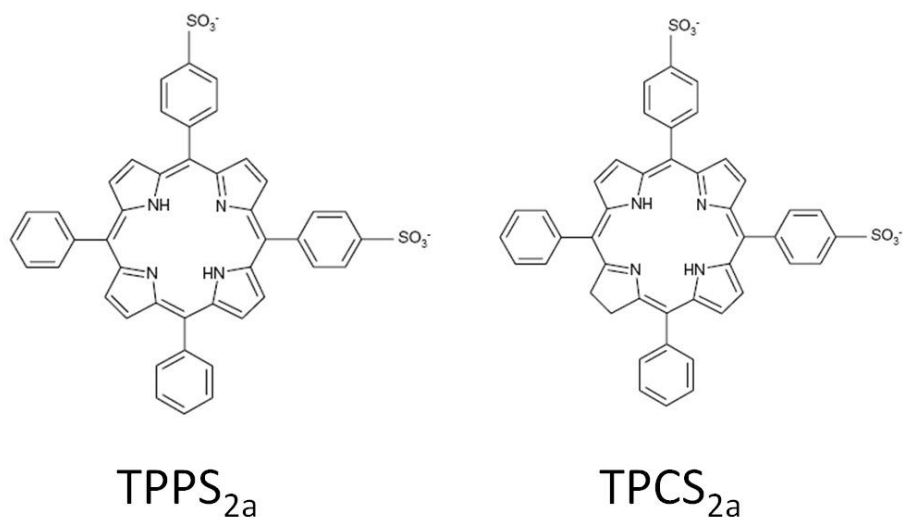


Figur 1.3: Forenklet Jablonski-diagram. Fotosensitizeren i grunntilstand (1P_0) vil ved bestråling av lys med en bestemt bølgelengde eksiteres til singlett tilstand (1P_1). Ved spinninversjon til triplett tilstand kan fotosensitizer gjennomgå type I eller type II fotokjemisk reaksjon. Modifisert figur fra (44).

Singlett oksygen antas å være den primære cytotoksiske forbindelsen (ROS) som er involvert i fotokjemisk skade i biologiske system (43, 45). Singlett oksygen reagerer raskt med umettede membranlipider og kolesterol, og denne reaksjonen danner lipidhydroperoksider. Lipidperoksidering er svært skadelig for cellenes membranstruktur og -funksjon, og vil hemme cellenes evne til å opprettholde vesikkelmembraner (45, 46). Levetiden til singlett oksygen avhenger av det molekylære mikromiljøet, og blir kortet ned i hydrofile miljø. Det er derfor avgjørende for den fotodynamiske skade-effekten at fotosensitizeren er godt integrert i den hydrofobe delen av membranen (45).

Fotosensitizere egnet til fotodynamisk terapi bør være stabile, kjemisk rene forbindelser med evne til å danne singlett oksygen. De bør ikke være cytotoksiske i mørke, og bør kunne absorbere rødt lys (620-750 nm) da lys med høyere bølgelengder penetrerer dypere i vevet. For å oppnå spesifisitet burde fotosensitizeren klareres raskt fra normalvevet, og akkumuleres i tumorvev (41). De fleste fotosensitizere som benyttes klinisk eller eksperimentelt er porfyriner eller kloriner (45). Kloriner er en del av porfyrinfamilien av fotosensitizere, og er basert på porfyrinstrukturen, med unntak av en enkelt mettet dobbeltbinding. Fotosensitizeren TPCS_{2a} er syntetisk fremstilt fra en fotokjemisk reduksjon av TPPS_{2a} (figur 1.4) (47). Kloriner

absorberer ti ganger mer lys i det terapeutiske området, som er gunstig ved *in vivo* behandling (43).



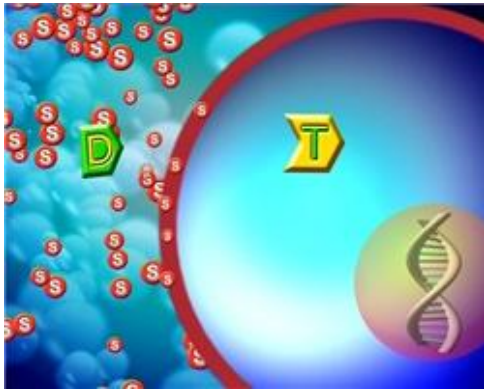
Figur 1.4: Strukturene til fotosensitizerene TPPS_{2a} og TPCS_{2a} som benyttes innen PCI. TPPS_{2a} er et porfyrin og TPCS_{2a} er et klorin. Modifisert fra (42) og (45) .

Det har blitt vist at fotosensitizerer fortrinnsvis vil akkumuleres i tumorvev (42). Mekanismen bak akkumulering av fotosensitizerer i tumorvev har bakgrunn i flere faktorer, der egenskaper til kreftsvulster bidrar til at fotosensitizerer akkumulerer i tumor. Lipoproteiner er viktige bærere av lipofile porfyriner i blodomløpet. Kreftceller er hurtig prolifererende celler og har økt behov for kolesterol for biosyntese av plasmamembraner. Oppregulering av low density lipoprotein (LDL) –reseptor kan tenkes å påvirke akkumulering av fotosensitizerer til tumorvev (48). I tillegg er vaskulaturen til kreftsvulster lekk, og generelt alt som er i blodsystemet kan passere gjennom endotelet. Lipofile PS vil derfor binde seg til plasmamembranen til kreftcellene og tas opp og beholdes i cellene over lengre tid (flere dager). I tillegg er lymfedrenasjen til tumor dårlig, noe som svekker tumors evne til å vaske ut den ekstracellulære matriks. En annen forklaring for økt akkumulering av PS kan skyldes at tumorer har høyere nivå av makrofager som endocytterer og holder på lipofile PS over flere dager (48) .

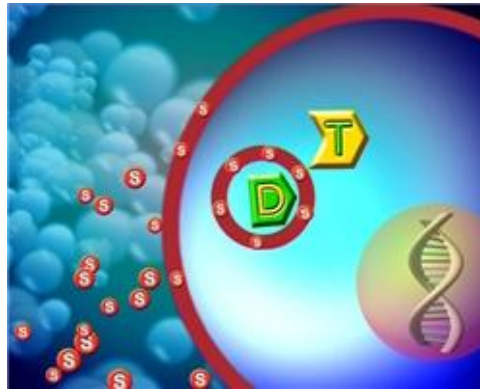
1.6.2 Fotokjemisk internalisering (PCI)

Makromolekyler utviklet til kreftterapi utøver ofte sin effekt intracellulært. Et stort hinder for disse medikamentene er penetrering av plasmamembranen (47). Plasmamembranen er ikke permeabel for molekyler større enn 1 kDa. Makromolekyler større enn 1 kDa kan tas opp i cellene gjennom en prosess som kalles endocytose. Gjennom denne transportmekanismen fanges og lagres markomolekylene i endolysosomale vesikler og utsettes for enzymatisk degradering (49). Fotokjemisk internalisering (PCI) er en metode som er utviklet for å overkomme dette hinderet (42). Prinsippet for fotokjemisk internalisering er bygget på fotodynamisk terapi. Ved PCI benyttes den fototoksiske effekten fra PDT til å introdusere markomolekyler til cytosol. Ved PCI benyttes fotosensitizerer som er amfifile, det vil si at de har en hydrofob og en hydrofil del. Fotosensitizeren vil inkorporeres i plasmamembranen og bli tatt opp ved endocytose. Makromolekyler introduseres sammen med fotosensitizer som ko-lokaliseres i endocytiske vesikler. Lysaktivering av fotosensitizeren fører til dannelse av ROS som fører til lipidperosidering og membranruptur i de endocytiske vesiklene slik at makromolekylene kan frigjøres og utføre sin effekt i cytosol (figur 1.5) (49).

1



2



3



4



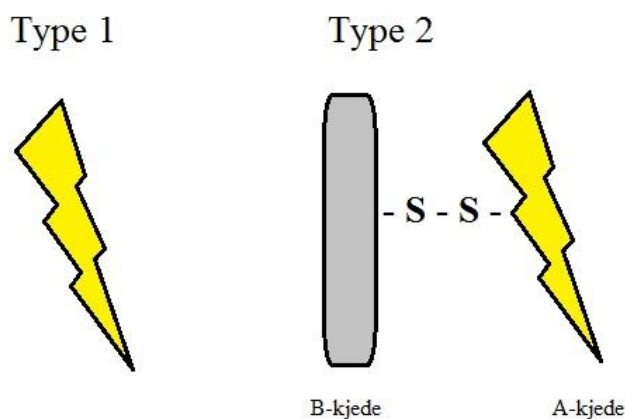
Figur 1.5: Skjematisk fremstilling av PCI. 1) Fotosensitizer (S) og terapeutisk makromolekyl (D) tilføres målceller. 2) Fotosensitizer vil inkorporeres i cellemembranen og tas opp sammen med makromolekyl ved endocytose. 3) Ved lyseksposering vil reaktive oksygenforbindelser føre til membranruptur. 4) Terapeutisk makromolekyl frigjøres til cytosol og kan utøve sin effekt (Target/T) (50).

1.7 Makromolekyler og internalisering

1.7.1 Ribosom-inaktiverende proteiner

Ribosom-inaktiverende proteiner (RIP) er en gruppe protein-toksiner som irreversibelt hemmer proteinsyntesen ved å fjerne en eller flere adeninfragmenter fra ribosomalt RNA (rRNA). Slike toksiner fra planter og bakterier er et av naturens mest potente cytotoxiske

midler. Ribosom-inaktiverende proteiner er utbredt i planteriket, og ble først oppdaget i planten *Ricinus communis* da proteinet ricin ble isolert og karakterisert (51). Proteinene kategoriseres i to hovedgrupper, type I og type II. Type I RIP består av en enkel peptidkjede på omlag 30 kDa. Type II RIP består av to ulike peptidkjeder, en enzymatisk aktiv A-kjede, lik type I RIP, som gjennom disulfidbindinger er linket sammen med en noe større B-kjede (≈ 35 kDa) som utgjør den funksjonelle forskjellen på type I og type II (figur 1.6) (52). B-kjeden er en lektinkjede som binder seg til cellemembranen, slik at type II RIP tas opp gjennom reseptormediert endocytose (51). På innsiden av cellene vil type II RIP følge en retrograd transportvei gjennom endosomene eller golgiapparatet til endoplasmatiske retikulum, og derfra ut til cytosol (53), eller fra sorterende endosomer til lysosomer der de i all hovedsak vil degraderes, eller bli utstøtt av cellene. Ulikheter i destinasjonene til RIP vil kunne påvirke cytotoxisteten (52). Saporin er en type I RIP fra såpeurten *Saponaria officinalis*. Type I RIP er mindre cytotoxiske da de har vanskeligheter med å internaliseres i celler, imidlertid vil de bli svært cytotoxiske dersom de linkes til antistoff som kan bindes til cellene (52). Det er vist at type I RIP har like stor RIP-aktivitet som A-kjeden til type II RIP i cellefritt system (54).



Figur 1.6: Skjematisk fremstilling av type 1 og type 2 ribosom-inaktiverende proteiner (RIP).

1.7.2 Immuntoksiner

RIP-toksiner, eller andre cytotoxiske forbindelser, kan konjugeres sammen med monoklonale antistoffer (mAb) for produksjon av målrettede cellegifter. Slike konjugat kalles gjerne for immuntoksiner (IT) (55). IT er designet for å binde seg til spesifikke epitoper på kreftceller og bli tatt opp av disse cellene gjennom reseptor-mediert endocytose (RME). Immuntoksinets affinitet til antigenet er avgjørende, og påvirker immuntoksinets evne til å drepe målcellen (55).

Muligheten for å målrettet angripe kreftceller ved bruk av IT vil teoretisk kunne minimere at normale celler blir angrepet, noe som vil gi færre bivirkninger. Det finnes imidlertid flere begrensninger ved bruk av IT *in vivo*. Dannelse av nøytraliserende antistoffer kan forekomme om lag to uker etter behandling (56). Det er også flere faktorer som hindrer levering av IT til tumor (55), blant annet abnormale blodårer omkring tumor og et manglende funksjonelt lymfesystem som fører til forhøyet trykk i tumor. IT må dermed komme frem til tumor gjennom diffusjon, som er en langsom og ineffektiv prosess, og som påvirkes av sterisk hindring på grunn av immuntoksinets store størrelse. Normale celler, som endotelceller, vil dermed eksponeres for IT som kan bli tatt opp gjennom pinocytose (55). Størrelsen til IT kan imidlertid reduseres gjennom produksjon av rekombinante IT (57).

1.7.3 Internalisering av immuntoksiner

Store og/eller polare makromolekyler kan tas opp i celler gjennom endocytose. Endocytose er en prosess der celler aktivt tar opp næring, makromolekyler og reseptorer ved at cellemembranen trekker seg innover og danner vesikler (58). Vesiklene internaliseres og transporterer molekyler og ekstracellulær væske inn i cellene. Ved ligandbinding av reseptor får man reseptormediert endocytose. Dersom makromolekyler tas opp i væskefase, uten reseptor-binding, kalles det for væskefase endocytose eller pinocytose, og gir uspesifikt opptak av molekyler. Den vesentlige forskjellen mellom endocytose med og uten reseptor-

binding er at reseptormediert endocytose har en betydelig raskere internalisering (58). clathrin-avhengig endocytose er en vanligste formen for endocytose. Makromolekyler som tas opp gjennom clathrin-avhengig RME vil vanligvis utsettes for degradering i lysosomene (58).

2. Materialer og metoder

2.1 Cellelinjer og dyrkingsmedium

2.1.1 Cellelinjer

I denne oppgaven ble det benyttet syv ulike cellelinjer (tabell 2.1). Cellelinjene BxPC3 (ATCC nr: CRL-1687), WiDr (ATCC nr: CCL-218), DU-145 (ATCC nr: HTB-81) og LNCaP (ATCC nr: CRL-1740) ble benyttet for CD44-targeting. Cellelinjene SW872 (ATCC nr: HTB92), SA-4 (ATCC nr: CRL-7938 (ikke lenger tilgjengelig i ATCCs cellebank)) og T778 ble benyttet for CD90-targeting. Disse liposarkomcellelinjene fikk vi utdelt fra Seksjon for tumorbiologi, Professor Ola Myklebosts gruppe, Institutt for kreftforskning, Radiumhospitalet. Arbeid med celler i kultur har blitt utført i sterile omgivelser i LAF-benk.

Tabell 2.1: Oversikt over cellelinjer benyttet i oppgaven.

Cellelinje	Opprinnelse	Organ	Celletype	Celleoverflate- markør
BxPC3	Human	Pankreas	Adenokarsinom	CD44
WiDr	Human	Colon	Adenokarsinom	CD44
DU-145	Human	Prostata	Karsinom	CD44
LNCaP	Human	Prostata	Karsinom	CD44 negativ kontroll
SW872	Human	Bindevev	Liposarkom	CD90
T778	Human	Bindevev	Liposarkom	CD90
SA-4	Human	Bindevev	Liposarkom	CD90 negativ kontroll

2.1.2 Dyrkningsmedium

Alle cellelinjene ble dyrket i RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) som ble tilsatt 10% Føtalt bovintserum (FBS) (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 100 µg/ml streptomycin og 100 U/ml penicillin (Sigma). Cellelinjene ble dyrket i monolag i 75 cm² vevskulturflasker (Nunclon, Nunc, , Roskilde, Danmark) i inkubator ved 37°C og 5 % v/v CO₂.

2.2 Standardprosedyrer for omsetting av celler i kultur

2.2.1 Trypsinering

De ulike cellelinjene har ulik vekstratio, men alle cellelinjene vil gjennomgå tre vekstfaser. I lag-fasen vil cellene feste seg til bunnen av vevskulturflasken før de begynner å proliferere eksponentielt i log-fasen helt til vekstkurven flater ut (platåfasen) hvor cellekulturen når konfluens. Cellene trives ikke ved konfluens, og blir derfor splittet når vevskulturflaskene er rundt 70 -80 % konfluente.

For å kunne omsette cellene må de løses fra vevskulturflasken. Det finnes flere måter å gjøre dette på. For cellelinjen LNCaP ble det tilsatt Accutase[®] (Sigma). For de resterende cellelinjene ble cellene løsnet ved å tilsette trypsin (Sigma). Trypsin er en serin endopeptidase som katalyserer spalting av peptidbindinger (59). Trypsinet vil kløyve bindingene mellom cellene og bunnen på vevskulturflasken slik at cellene løsner. Accutase er en patentert løsning som inneholder proteolytiske og kollagenolytiske enzymer som løsner celler i monolag. Accutase er kjent å være mindre skadelig mot overflateproteiner enn trypsin, og egner seg godt til bruk før flowcytometri (60).

Prosedyre

1. Fosfatbufret saltvann (PBS) (PAA Laboratories) og trypsin (Sigma) ble forvarmet ca 15 min i vannbad ved 37 °C.
2. Mediet i vevskulturflaskene ble sugd vekk. Det ble tilsatt 2 ml PBS for å vaske bort resterende medium. PBS ble sugd vekk og det ble tilsatt 2 ml trypsin. For cellelinjen LNCaP ble det benyttet 2 ml Accutase[®] for å løsne cellene.
3. Vevskulturflaskene (Nunc) ble plassert i inkubator i 2-5 minutter til cellene var løsnet fra bunnen. Det ble deretter tilsatt 8 ml medium for å inaktivere trypsinet.
4. Cellesuspensjonen ble blandet godt mot flaskeveggen med en 10 ml engangspipette. Ønsket mengde cellesuspensjon, avhengig av cellenes vekst, ble overført til ny vevskulturflaske med forvarmet medium.

2.2.2 Telling

Før eksperimentelle forsøk på de ulike cellelinjene ble cellekonsentrasjonen bestemt ved å telle cellene i et KOVA Glasstic[®] tellekammer (Hycor Biomedical, California, USA) under mikroskop. Tellekammeret inneholder ni store ruter, med ni mindre ruter innvendig. Hver store rute har et volum på 0,1 µl. Tre store ruter ble telt, og gjennomsnittet av disse ble multiplisert med 10⁴. Cellekonsentrasjonen ble på denne måten beregnet i antall celler/ml.

Prosedyre

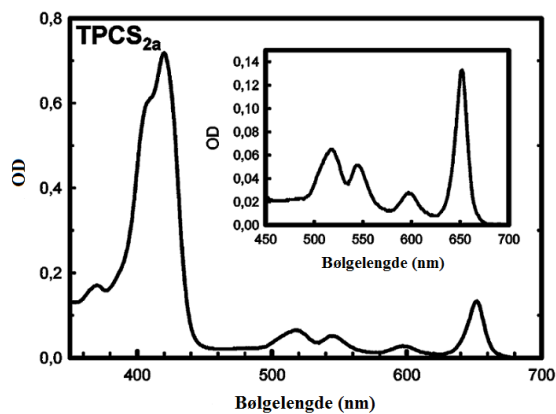
1. Vevskulturflaskene med celler ble først trypsinert (se kap. 2.2.1) og tilsatt medium. Cellesuspensjonen ble godt blandet med vortex og 10 µl ble overført til et KOVA Glasstic[®] tellekammer (Hycor).

2. Det ble telt tre diagonale ruter og cellekonsentrasjonen ble beregnet i antall celler/ml.

2.3 PDT og PCI

2.3.1 Fotosensitizer og lyskilde

Meso-tetrafenylklorin disulfonat (TPCS_{2a}, Amphinex™, PCI Biotech AS, Lysaker, Norge) er en fotosensitizer som tas opp i endocytiske vesikler. På bakgrunn av sine amfile egenskaper vil TPCS_{2a} inkorporeres i cellulære membraner, noe som gjør denne fotosensitizeren egnet for PCI (47). TPCS_{2a} ble benyttet som fotosensitizer i alle PDT- og PCI-forsøkene i denne oppgaven. Alt arbeid med fotosensitizer og andre lysømfintlige stoffer ble utført under lysbeskyttende omgivelser. TPCS_{2a} har to eksitasjonstopper (figur 2.1). Ved lyseksponering *in vitro* i denne oppgaven ble den første eksitasjonstoppen (ca. 420nm) benyttet, dvs. blått lys. Den andre eksitasjonstoppen absorberer lys i et såkalt optisk vindu (650 nm) dvs. rødt lys, som er gunstig for *in vivo* PCI-behandling siden rødt lys penetrer dypere i vev en lys med kortere bølgelengder (47). Konsentrasjonen av TPCS_{2a} som ble benyttet i denne oppgaven var 0,35 eller 0,4 µg/ml. Stock-løsningen (0,4 mg/ml) ble oppbevart ved 4°C i lysbeskyttet flaske. Konsentrasjonen av TPCS_{2a} ble valgt på bakgrunn av innledende forsøk, eller erfaringer fra gruppen.



Figur 2.1: Absorbsjonsspekter for TPCS_{2a}. Modifisert fra (47)

Lyskilden som ble benyttet under PDT- og PCI-forsøkene var lampen Lumisource® (PCI Biotech AS, Oslo, Norge). Lumisource® består av fire 18 W Osram L 18/67 standard lysrør og har et belyningsområde på 45 x 17 cm. Lampen er designet for å belyse celler *in vitro* med en optimalisert homogen lysspredning. Lampen beskytter cellene mot hypertermi gjennom avkjøling under belysning. Lyskilden gir et blått lys med emisjonsmaksimum på ca. 435 nm (61).

2.3.2 Cellekonsentrasjoner for PDT og PCI

Celler ble sådd ut i 96-brønnersbrett eller 6-brønnersbrett (Nunc). Cellekonsentrasjoner ble valgt på bakgrunn av tidligere erfaringer fra cellelinjene, og innledende tetthetsforsøk der det ble målt optisk tetthet (OD) på ubehandlede celler. Cellekonsentrasjonen som ble valgt varierte for de ulike cellelinjene (tabell 2.2).

Tabell 2.2: Oversikt over cellekonsentrasjoner som ble sådd ut for PCI-forsøk. Viabilitetsforsøk ble utført etter behandling. For MTT-assay ble det benyttet 96-brønnersbrett, og for klonogen overlevelse ble det benyttet 6-brønnersbrett.

Cellelinje	Cellekonsentrasjon		Cellekonsentrasjon	
	96-brønnersbrett	Volum cellesuspensjon	6-brønnersbrett	Volum cellesuspensjon
BxPC3	5000 celler/brønn	100 µl /brønn	-	-
WiDr	3000 celler/brønn	100 µl /brønn	500 celler/brønn	2 ml/brønn
DU-145	2500 celler/brønn	100 µl /brønn	200 celler/brønn	2 ml/brønn
LNCaP	8000 celler/brønn	100 µl /brønn	-	-
SW872	5000 celler/brønn	100 µl /brønn	-	-
T778	2500 celler/brønn	100 µl /brønn	-	-
SA-4	8000 celler/brønn	100 µl /brønn	-	-

2.3.3 PDT-behandling *in vitro*

Prosedyre

1. Celler ble sådd ut i 96-brønnersbrett eller 6-brønnersbrett (Nunc) i bestemte cellekonsentrasjoner (Tabell 2.2). For cellelinjen LNCaP ble 96-brønnersbrettene forbehandlet med poly-L-lysin (Sigma) da denne cellelinjen festet seg dårligere til brønnene (prosedyre nedenfor).
2. Cellene ble inkubert i ett døgn i varmeskap slik at de skulle feste seg godt i brønnene. Mediet i brønnene ble fjernet, og det ble tilsatt 50 µl TPCS_{2a} per brønn i 96-brønnersbrett, og 1 ml per brønn i 6-brønnersbrett.
3. Brettene ble inkubert 18 timer før brønnene ble vasket to ganger med 50 µl medium, og tilsatt 100 µl nytt medium til slutt. Brettene ble deretter satt tilbake i inkubator for fire timer chase.
4. Etter fire timer med chase ble cellene belyst med Lumisource® (PCI Biotech).

Prosedyre for forbehandling med poly-L-lysin

1. 30 µl poly-L-lysin (Sigma) ble tilsatt per brønn i 96-brønnersbrett, og brettene fikk stå i LAF-benk i to timer.
2. Brønnene ble vasket to ganger med 100 µl PBS (PAA Laboratories)
3. Brettene ble deretter stående i LAF-benk uten lokk ca 4 timer for å tørke, eller plassert i inkubator over natt.

2.3.4 PCI-behandling *in vitro*

PCI-behandling benytter prinsippet for PDT for å frigjøre makromolekyler til cytosol (42). Makromolekylene som er benyttet i denne oppgaven er proteintoksinet saporin og saporin-inneholdende immuntoksiner (se 2.3.6). Prosedyren for PCI-behandling er lik prosedyren for PDT-behandling (2.3.3), med unntak av makromolekylet som tilsettes sammen med TPCS_{2a} for inkubering i normalt 18 timer.

2.3.5 Selektivitetsforsøk av CD90 antistoff ved PCI

Det ble utført forsøk med overskudd av ukonjugert antistoff for å hemme opptak av immuntoksinet. Dette ble gjort for å påvise at antistoffet binder seg spesifikt til reseptor, og at det er denne bindingen mellom OX7-SAP og reseptor som fører til effektivt opptak og påfølgende celledrap etter PCI.

Prosedyre

1. Celler ble sådd ut i 96-brønnersbrett og plassert i inkubator i ett døgn slik at de fikk festet seg til bunnen av brønnene.
2. Det ble tilsatt 825 nM OX7 (Advanced Targeting Systems (ATS), San Diego, California, USA) i tre av brønnene, tilsvarende 100 ganger overskudd av antistoff, som ble inkubert i 30 minutter.
3. Overskuddet med antistoff ble ikke fjernet fra de tre brønnene, men det ble tilsatt TPCS_{2a} og makromolekyl etter vanlig prosedyre for PCI (se 2.3.3).

2.3.6 Makromolekyler for PCI-behandling

Streptavidin er et symmetrisk tetramer med fire bindingssteder for biotin. Streptavidin-biotin-bindingen er den sterkeste ikke-kovalente biologiske bindingen som er kjent, og består av mange hydrogenbindinger, samt van der Waals interaksjoner (62). Denne sterke bindingen ble benyttet for å danne immuntoksiner for PCI behandling med immuntoksin mot CD44. Streptavidin-ZAP (ATS) er et kjemisk konjugat av det ribosom-inaktiverende proteinet saporin og streptavidin, med en molekylvekt på 128 kDa. Streptavidin-ZAP (Strep-ZAP) (2,4 mg/ml) ble blandet sammen med et biotinylerert monoklonalt antistoff (mAb) fra mus, anti-human CD44 (klon IM7) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) for dannelsen av immuntoksin mot CD44, kalt IM7-SAP. Konsentrasjonen av Strep-ZAP ble omregnet til molar, og fortynnet i allikvoter på 200 nanomolar (nM) som ble oppbevart ved -20 °C. CD44 mAb ble oppbevart ved 2- 8 °C.

Konsentrasjonen av makromolekyler som ble benyttet under forsøkene ble funnet ved innledende forsøk med konsentrasjonsgradienter, eller etter tidligere erfaring fra gruppen. For Ab-kontroll ble det benyttet fire ganger høyere konsentrasjon ettersom immuntoksinet binder fire antistoff per molekyl i streptavidin-biotin-bindingen. For oppsett og tilsetning av makromolekyler til PCI-behandling mot CD44 overflatemarkør, se tabell 2.3.

Tabell 2.3: Oversikt over PDT/PCI- behandling for targeting av CD44 overflatemarkør. NT= no treatment kontroll.

	TPCS _{2a}	Strep-ZAP	IM7
NT	-	-	-
PDT	+	-	-
PCI	+	+	-
PCI IT	+	+	+
SAP Ktr	-	+	-
IT Ktr	-	+	+
Ab Ktr	-	-	+

For målrettet angrep av CD90 med immuntoksin ble det hovedsaklig benyttet et kit fra ATS som inkluderte immuntoksinet OX7-SAP (1,3 mg/ml), toksinet saporin SAP-25 (1,0 mg/ml) og ukonjugert antistoff OX7 (1,55 mg/ml) til kontroll. To av de første forsøkene med CD90-targeting ble utført med strep-ZAP og anti-human CD90 (Thy-1) biotin (klon 5E10) (BD Bioscience) på samme måte som ved CD44 targeting. For oppsett og tilsetning av de ulike stoffene, se tabell 2.4.

Tabell 2.4: Oversikt over PDT/PCI- behandling for targeting av CD90 overflatemarkør.

	TPCS _{2a}	OX7-SAP	SAP-25	Strep-ZAP	5E10	OX7
NT	-	-	-	-	-	-
PDT	+	-	-	-	-	-
PCI	+	-	+	(*)	-	-
PCI IT	+	+	-	(*)	(*)	-
SAP Ktr	-	-	+	(*)	-	-
IT Ktr	-	+	-	(*)	(*)	-
Ab Ktr	-	-	-	-	(*)	+

*Strep-ZAP + Biotinylert AbCD90 (5E10)

2.4 Celleviabilitet og cytotoxisitets-assay

Det ble benyttet to ulike metoder for å teste henholdsvis celleviabilitet og cytotoxisitet etter PCI-forsøk. 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-defenyltetrazolium bromid (MTT) assay ble utført for alle cellelinjene. Klonogen overlevelse ble utført for cellelinjene som var i stand til å danne kolonier.

2.4.1 MTT

De fleste levende celler har en relativt konstant mitokondriell aktivitet når det er tilgang til oksygen. Prinsippet for MTT-metoden tar utgangspunkt i cellenes mitokondrielle aktivitet som et indirekte mål på overlevelse/viabilitet, og benyttes ofte *in vitro* for å teste sensitivitet for nye medikamenter (63). MTT omdannes til formazankrystaller i mitokondriene til levende celler. Formazankrystallene kan løses opp med hjelp av ulike løsemidler som metanol, etanol og dimetyl sulfoksid (DMSO) (63). I denne oppgaven ble det brukt DMSO. Absorbansen (OD) på løsningen kan dermed måles med et spektrofotometer.

Prosedyre

1. MTT-assay ble gjennomført 48–120 timer etter lyseksponering, avhengig av cellelinje.
2. Mediet i brønnene ble sugd av, og det ble tilsatt 0,25 mg/ml MTT-løsning (Sigma) i hver brønn. Det ble i tillegg tilsatt MTT-løsning i åtte brønner uten celler for måling av blank.
3. Brettene ble plassert i inkubator i 2-4 timer avhengig av observervasjon av klar lilla krystalldannelse i ubehandlede kontrollceller.
4. MTT-løsningen ble sugd av og brønnene ble tilsatt 100 µl DMSO for å løse opp formazankrystallene.

5. Brettene ble satt på en platerister (Titramax 101, Heidolph Instruments, Schwabach, Tyskland) i ca. 15 minutter før absorbansen ble målt ved bruk av PowerWave XS2 spektrofotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Absorbansen ble målt ved 570 nm.
6. Optisk tetthet på ubehandlede celler ble sammenlignet med optisk tetthet på behandlede celler for å se på den relative viabiliteten. Absorbansen i blankprøvene ble trukket fra alle prøvene for å gi den reelle MTT-aktiviteten.

2.4.2 Klonogen overlevelse

Klonogen overlevelse er en metode som måler prolifererende egenskaper til enkeltceller gjennom cellenes evne til å danne kolonier (64). Klonogen overlevelse er allment ansett som det mest pålitelige assayet for måling av *in vitro* cytotoxissitet, da metoden måler cytotoxisk respons i stedet for reduksjon i celleviabilitet. Dette minsker usikkerheten som kan foreligge ved mer kortsiktige viabilitets-assays, som MTT. Assays som måler nedsatt celleviabilitet kort tid etter behandling vil ikke kunne ta høyde for reversible skader og proliferasjon av resistente celler. I tillegg kan slike metoder underestimere cytotoxissitet da døende celler også kan ha mitokondriell aktivitet (64).

Prosedyre

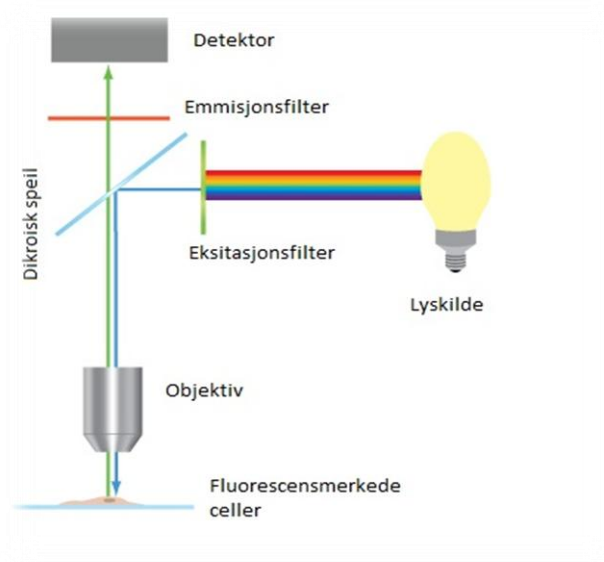
1. Etter PCI-behandling ble 6-brønnersbrettene (Nunc) inkubert i varmeskap i 10-14 dager. Nytt medium ble tilsatt to ganger i uken.
2. Når koloniene var store nok til å telles ble mediet fjernet og brønnene vasket med 1 ml NaCl (9 mg/ml). Koloniene ble deretter fiksert med 1 ml absolutt alkohol (96 % etanol) i 10 minutter. Etter fiksering ble koloniene farget med 1 ml metylblått-løsning (Sigma) i fem minutter.

3. Brønnene ble vasket forsiktig med vann og satt til lufttørring. Etter at 6-brønnersbrettene var tørket ble koloniene telt manuelt med et forstørrelsesglass og en eCountTM Colony Counter (Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA). Kolonidannelse etter behandling ble beregnet ut fra kontrollen med ubehandlede celler.

2.5 Mikroskopi

2.5.1 Fluorescensmikroskopi

Fluorescensmikroskopi er en metode som benyttes for å detektere fluorescerende stoffer i celler. Metoden benyttes som oftest for å detektere spesifikke proteiner eller andre molekyler (65). Oppbyggingen av et fluorescensmikroskop er illustrert i figur 2.2. Metoden ble benyttet for å visualisere opptaket av fotosensitizeren TPCS_{2a} og internalisering av overflatemarkørene CD44 og CD90.



Figur 2.2: Skjematisk oppbygging av et fluorescensmikroskop. Lyskilden filtreres av et eksitasjonsfilter som bare slipper gjennom lys med den spesifikke bølgelengden som kan eksitere fluorokromet i prøven. Det andre filteret er et emisjonsfilter som kun slipper gjennom lys med bølgelengden fra det emiterte lyset fra prøven. Mellom disse filtrene er det et dikroid speil som reflekterer bølgelengder i eksitasjonsspektret og passerer bølgelengder i emisjonsspektret (65). Figur tilpasset fra (66)

Intracellulær deteksjon av fotosensitizer og CD44 og CD90 reseptor

Prosedyre

1. Celler ble sådd ut i 4 brønnersbrett (Nunc) med en cellekonsentrasjon på 50 000 celler per brønn. I hver brønn var det på forhånd tilsatt ett dekkglass (Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Tyskland).
2. Cellene ble inkubert i omlag 48 timer for å feste seg til dekkglasset. Mediet ble fjernet og cellene ble inkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a} i 300 µl medium for intracellulær deteksjon av fotosensitizer. 0,5 µg/ml OX7 og 2 µg/ml Strept-ALEXA488 ble blandet sammen (OX7-Alexa488) og tilsatt cellene for intracellulær deteksjon av CD90 reseptor. 0,5 µg/ml IM7 og 2 µg/ml Strep-Alexa488 ble blandet sammen (IM7-Alexa488) og tilsatt cellene for intracellulær deteksjon av CD44 reseptor.
3. Etter 18 timer inkubasjon ble cellene vasket to ganger med 0,5 ml medium, og tilsatt 0,5 ml nytt medium til slutt. Cellene ble deretter inkubert 4 timer i inkubator. Dette ble gjort for å fjerne fotosensitizer fra cellemembranen.
4. Cellene ble vasket med iskald PBS tilsatt Ca²⁺ og Mg²⁺ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), og dekkglassene ble plassert på objektglass (Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Tyskland) for mikroskopering.
5. Det ble benyttet et Axioimager Z1ApoTome Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) med 63x olje immersjonsfilter for intracellulær deteksjon av fotosensitizer og fluorescensmerket CD44 og CD90 Ab. Eksitasjonsfilter for fotosensitizer: 395-440 nm, dikromatisk speil: 460 nm og et 650 nm langpass emisjonsfilter. Et 470 nm eksitasjonsfilter, dikromatisk speil 495 nm, og et 525 nm emisjonsfilter ble benyttet for deteksjon av Alexa488-merket mAb mot CD44 og CD90. For fluorescens- og fasekontrastbilder ble det benyttet et CCD-kamera (Astromed 3200, Astromed, Cambridge, UK). Bildeanalyse ble utført med Axiovision Software (Carls Zeiss).

Blokkering av overflatemarkøren CD90 med overskudd av antistoff

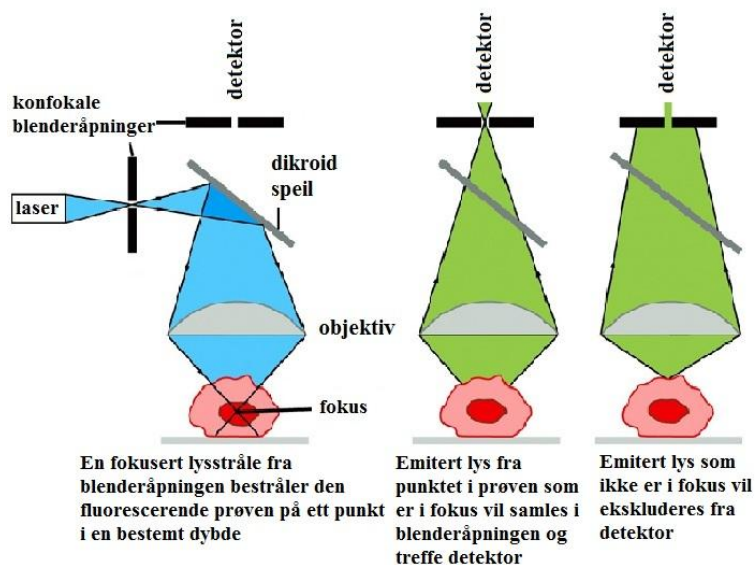
Cellelinjen T778 ble inkubert med et overskudd av ukonjugert OX7 Ab før mikroskopering for å vise at dette ville hindre internalisering av biotinyleret OX7 Ab og streptavidin Alexa488 ved utkonkurrering av reseptorsetene. Dette ble utført for å illustrere at opptaket av CD90-reseptor var spesifikt ved bruk av det fargede antistoff-komplekset.

Prosedyre

1. Cellelinjen T778 ble sådd ut med en cellekonsentrasjon på 50 000 celler per brønn på dekkglass i 4-brønnersbrett, og inkubert i 48 timer i varmeskap.
2. Det ble tilsatt 1 µg/ml TPCS_{2a}
3. Etter 18 timer inkubasjon ble brønnene vasket tre ganger med 300 µl medium.
4. Det ble tilsatt 78 µg/ml OX7 (Anti Thy-1) mus mAb (1,55 mg/ml) (ATS), som ble inkubert 30 minutter i varmeskap.
5. Det ble deretter tilsatt 0,75 µg/ml anti-OX7-Biotin (1,5 mg/ml) (ATS) og 2 µg/ml Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugat (2 mg/ml) (Life Technologies).
6. Cellene ble inkubert i 3,5 timer, og deretter vasket i kald PBS med Ca²⁺ og Mg²⁺ (for å hindre videre internalisering og at cellene løsnet fra dekkglasset) før mikroskopering.

2.5.2 Konfokalmikroskopi

Ved vanlig fluorescensmikroskopi (epi-fluorescensmikroskopi) vil hele prøvematerialet bli belyst og visualisert samtidig. Emitert lys fra prøven som ikke er i fokus vil danne bakgrunnsstøy. Konfokalmikroskopi er en tredimensjonal mikroskoperingsmetode som omgår dette problemet gjennom et optisk system som fokuserer lyset til ett bestemt punkt i prøven. Eksitasjonslyset ved fluorescens konfokalmikroskopi stammer vanligvis fra en laser. Laserlyset passerer gjennom en snever blenderåpning (67). Fluorescens emitteres fra prøven og samles i en lysdetektor. Foran detektoren er det plassert en blenderåpning som ligger konfokal med blenderåpningen fra laserlyset (figur 2.3). Denne vil eliminere signal fra prøven som er ute av fokus (67). Konfokalmikroskopi ble benyttet for å detektere membranbinding av CD90-Ab og opptak av CD90-reseptor på cellelinjen SA-4.



Figur 2.3: konfokalmikroskopi. Bildet er modifisert fra (65).

Prosedyre

1. 50 000 celler ble sådd ut på dekkglass i 4-brønnersbrett på samme måte som ved fluorescensmikroskopi (se 2.5.1)
2. Cellelinjen SA-4 ble inkubert med 2 µg/ml Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugat (Life Technologies) og 1,5 µg/ml anti-OX7-Biotin (ATS).
3. Etter 18 timer inkubasjon ble cellene vasket tre ganger med 300 µl medium.
4. For cellelinjen T778 ble det tilsatt 2 µg/ml Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugat og 1,5 µg/ml anti-OX7-Biotin for å detektere membranbinding, og 2 µg/ml Hoechst 33342 (Life Technologies) ble tilsatt i alle brønnene like før mikroskopering.
5. Prøvene ble satt på is, beskyttet mot lys frem til mikroskopering.

Prøvene ble mikroskopert med et Zeiss LSM 710 konfokalmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Tyskland) utstyrt med en argon-laser multiline (458/488/514 nm), en laserdiode 405-30 CW (405 nm), og emisjonsfilter for Alexa488 (493-552 nm) og Hoechst 33342 (425-493 nm). Dekkglass ble plassert i 35 mm glassbunns MatTek skåler (MatTek Corp. Ashland, MA, USA) og objektivet som ble benyttet var et Zeiss C-Apochromat 63xNA/1.4 oljeimmersjon DICII. Bildeanalyse ble utført med programvaren ZEN 2009.

2.6 Flowcytometri

Flowcytometri er en metode som kan måle fysiske og kjemiske egenskaper til enkeltceller i suspensjon. I et flowcytometer vil celler i suspensjon enkeltvis strømme gjennom et flow-kammer. I moderne flowcytometre vil cellene strømme gjennom en lysstråle. Mange ulike målinger kan kan gjøres utfra størrelsen og formen på lysstrålen, og på fargestoffene som er brukt for å merke komponentene i eller på cellene (68). Flowcytometri ble benyttet for å måle ekspresjonen av overflatemarkørene CD44 og CD90 i de ulike cellelinjene.

Prosedyre

1. Mediet i 75 cm² vevskulturflaskene ble sugd av og cellene ble vasket med 10 ml PBS (PAA Laboratories). PBS ble sugd av og cellene ble løsnet ved å tilsette 2 ml Accutase[®] (Sigma).
2. Det ble tilsatt 10 ml medium (Sigma) og celleduspensjonen ble overført til 15 ml falconrør. Rørene ble sentrifugert i tre minutter ved 1200 omdreininger per minutt (rpm) ved bruk av en Rottina 380 R sentrifuge (Hettlich Lab Technology, Tuttlingen, Tyskland).
3. Supernatanten ble sugd av og cellene ble resuspendert i 2 ml medium. Celleduspensjonen ble deretter filtrert gjennom et 5 ml rør med cellefiltreringskork (BD Falcon, CT, USA). Rørene ble igjen sentrifugert, og supernatanten sugd av.
4. Cellene ble resuspendert i 600 µl medium. Fra celleduspensjonen ble 100 µl overført til 5 ml flowrør (BD), to rør per cellelinje. Ett rør ble merket for fargede celler og ett rør ble merket for ufarget kontrollprøve.
5. For analyse av CD44-ekspresjon ble det tilsatt 20 µl FITC mus anti-human CD44 mAb (klon G44-26(C26)) per 10⁶ celler. For analyse av CD90-ekspresjon ble det

tilsatt 5 µl APC Mus Anti-Human CD90 (klon 5E10) per 10^6 celler (begge fra BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA).

6. Prøvene ble inkubert i 10 minutter i romtemperatur, beskyttet mot lys. Cellene ble deretter vasket med 2 ml medium (Sigma) for å fjerne overflødig fargestoff som ikke hadde bundet seg til reseptor. 2 ml medium ble tilsatt hvert rør som ble sentrifugert i tre minutter. Supernatanten ble sugd av, og vaskeprosedyren gjentatt en gang. Prøvene ble oppbevart på is for å hindre reseptormediert opptak av fluorescensmerket antistoff og beskyttet mot lys frem til flow-analyse.

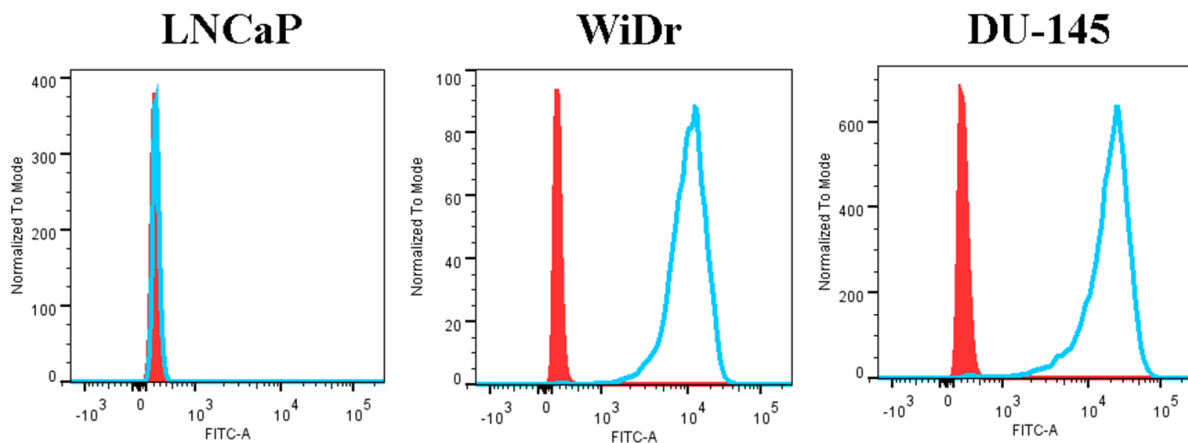
3. Resultater

3.1 Etablering av PCI-metoden

Det ble utført innledende forsøk for etablering av PCI-metoden for de ulike cellelinjene. Av disse innledende forsøkene ble cellekonsentrasjonen som skulle benyttes til forsøk estimert ved tetthetsforsøk. Det ble også utført konsentrasjonsrekker av fotosensitizer og immuntoksin for å avgjøre hvilke konsentrasjoner som egnet seg for de ulike cellelinjene. Tetthetsforsøk ble utført for å finne hvilke cellekonsentrasjoner som skulle benyttes for MTT forsøk, og disse er oppsummert i tabell 2.2. Ulike cellekonsentrasjoner ble sådd ut i 96-brønnersbrett og absorbansen av ubehandlede celler (NT= no treatment) ble målt ved MTT-assay. Optisk tetthet bør rangere mellom 0,75 til 1,25 OD i ubehandlede celler for bruk av MTT og er viktig å etablere for å sikre at man jobber i et dynamisk område og for å forhindre metning av MTT-signalene (63). Basert på tetthetskurver ble optisk tetthet målt for cellelinjene BxPC3 og LNCaP (figur V.1), samt SA-4 og T778 (figur V.2). I tillegg ble konsentrasjonen av fotosensitizer og immuntoksin målt gjennom konsentrasjonsrekker for optimalisering av metoden (figur V.3 og V.4). For cellelinjer som var benyttet tidligere i gruppen, og der disse faktorene allerede var kjent ble det ikke utført innledende forsøk.

3.2 Ekspresjon av CD44 antigen

Cellelinjene som skulle behandles med PCI av immuntoksin rettet mot overflatemarkøren CD44 ble analysert for ekspresjon av CD44. Ekspresjon av CD44 ble analysert ved flowcytometri etter inkubering med fluorescensmerket antistoff på cellelinjene LNCaP, WiDr og DU-145 (figur 3.1). Median fluorescensintensitet for ufargede kontrollceller og fargede celler i cellelinjen LNCaP viste liten endring fra henholdsvis 246 til 257. LNCaP ble på bakgrunn av dette benyttet som negativ kontroll for målrettet angrep på CD44. WiDr og DU-145 viste begge et høyt uttrykk av markøren, med en endring av median fluorescensintensitet fra 186 til 10 986 for WiDr-celler og fra 252 til 21 149 for DU-145. Cellelinjen BxPC3 har tidligere vist å være positiv for CD44-ekspresjon (69), og ble ikke analysert i dette eksperimentet.



Figur 3.1: Ekspresjon av CD44. LNCaP, WiDr og DU-145 ble farget med FITC anti-human CD44 mAb (G44-26 (C26)) og analysert ved flowcytometri for ekspresjon av overflatemarkøren CD44. Forsøket er utført en gang.

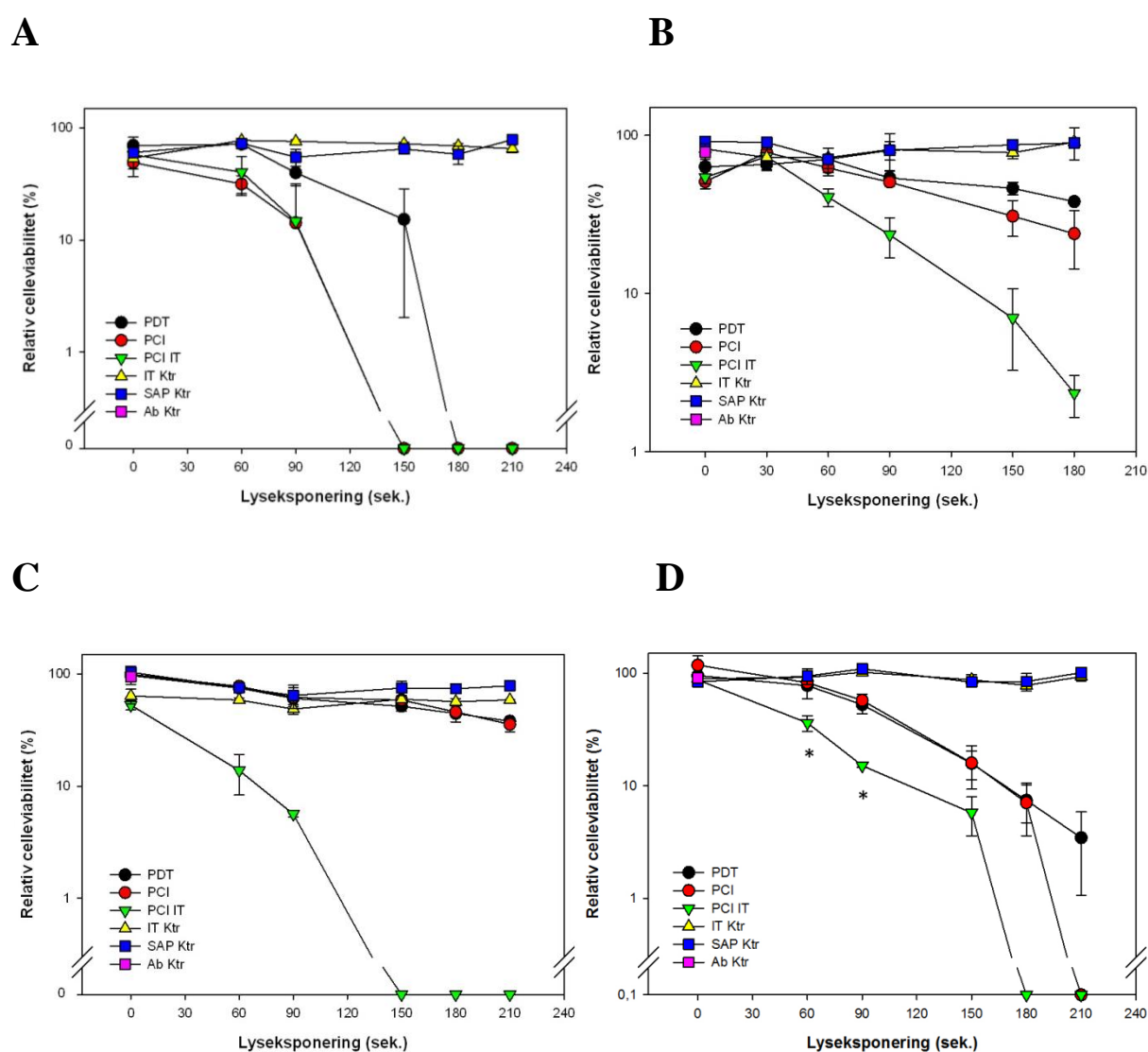
3.3 PCI med IT mot CD44

3.3.1 Celleviabilitet etter PCI-behandling med IT mot CD44

Cellelinjene LNCaP, BxPC3, WiDr og DU-145 ble behandlet med PCI av IT mot CD44, og celleviabilitet etter behandling ble analysert med MTT-assay (figur 3.2). Fotosensitizerkonsentrasjonen som ble benyttet var 0,4 $\mu\text{g/ml}$ for LNCaP, WiDr og DU-145, og 0,35 $\mu\text{g/ml}$ for cellelinjen BxPC3. Alle cellelinjene ble inkubert med samme konsentrasjon av saporin og immuntoksinet IM7-SAP (0,825 nM). Resultatene fra målrettet PCI-behandling med IT mot CD44 er vist i figur 3.2. Tap av celleviabilitet er beregnet i prosent i forhold til ubehandlede celler.

Resultatene viser at den cytotoksiske effekten av PDT alene er veldig varierende i de ulike cellelinjene. LNCaP ble benyttet som negativ kontroll da denne cellelinjen viste svært liten forskjell i fluorescensintensitet mellom ufarget og farget prøve ved flowcytometri. LNCaP-cellelinjene responderte effektivt på PDT og PCI-behandling, med 100 % tap av viabilitet etter henholdsvis 180 og 150 sekunder lyseksponering. Det ble ikke detektert forskjell i cytotoksisk respons ved PCI av saporin og PCI med IT (figur 3.2A). Den cytotoksiske effekten av PDT på

cellelinjen BxPC3 viste omlag 30 % tap av celleviabilitet, men PCI av saporin gav ingen eller liten økt effekt. Ved PCI-behandling med IT økte den cytotoksiske effekten og viste mer enn 90 % tap av viabilitet etter 180 sekunder lyseksponering (figur 3.2B). Cellelinjen DU-145 viste høyest grad av ekspresjon av overflatemarkøren CD44 ved flowcytometri. Cellene viser liten cytotoksisk respons mot PDT og PCI av saporin, men svært effektiv celledrap ved bruk av PCI av IT med 100 % tap av celleviabilitet ved 150 sekunder lyseksponering (figur 3.2C). For cellelinjen WiDr viser PDT og PCI av saporin sterk cytotoksisk respons. Ved PCI av IT er cytotoksiciteten økt signifikant etter 60 og 90 sekunder lyseksponering (figur 3.2D).

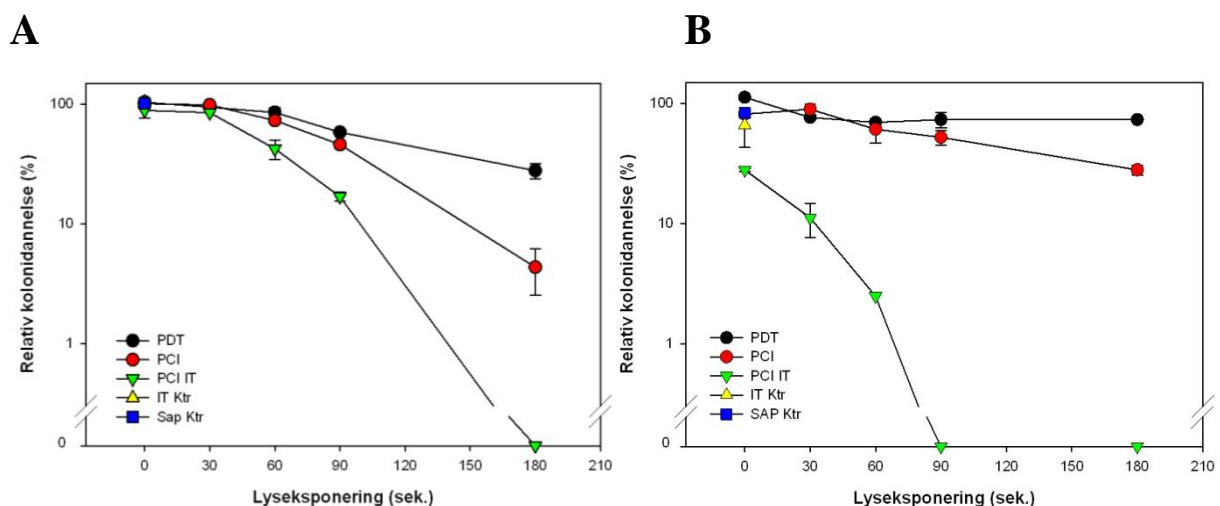


Figur 3.2: Celleviabilitet etter PCI-behandling med IT mot CD44 for cellelinjene A) LNCaP, B) BxPC3, C) DU-145 og D) WiDr. Figurene viser et representativt resultat fra reproduserte forsøk. Standardavviket (SD) fra tre paralleller er beregnet og ført på grafene. * indikerer $p = 0,001$.

Det ble tatt med ulike kontroller for å vise spesifikk cytotoksisitet av behandlingen. «SAP Ktr» er kontroll av strep-ZAP i medium uten tilsatt TPCS_{2a}, og viser lav cytotoksisitet alene og i kombinasjon med lyseksposering i alle forsøkene. Det samme gjelder for kontrollen av immuntoksinet. Kontrollen for antistoffet IM7 er tatt med for å vise at antistoffet alene ikke gir cytotoksisk effekt, men er kun tatt med uten lysdoser for å begrense forbruket. Konsentrasjonene i kontrollene samsvarer med konsentrasjonene i PCI-behandlingen.

3.3.2 Cytotoksisitet etter PCI-behandling med IT mot CD44 på WiDr og DU145

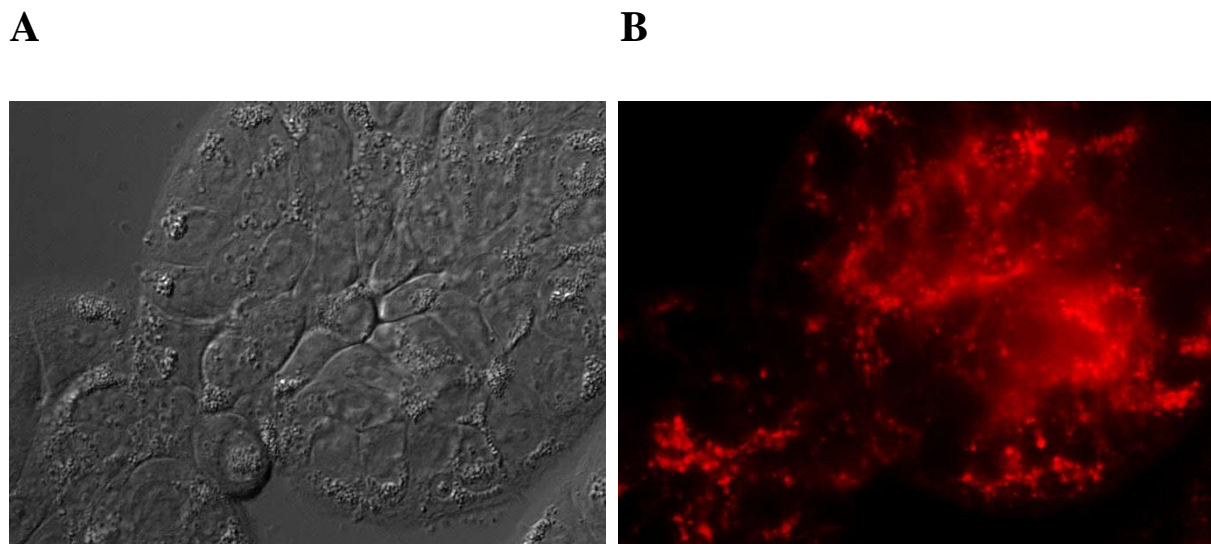
Klonogen overlevelse ble utført for cellelinjene WiDr og DU-145 etter PCI-behandling. Konsentrasjonene av TPCS_{2a}, saporin og IT er de samme som er benyttet ved viabilitetsforsøk med MTT. Kolonidannelse er beregnet i prosent av ubehandlede celler og resultatene er vist i figur 3.3. For cellelinjen WiDr viser resultatet at den cytotoksiske effekten av PDT og PCI av saporin er noe reversert sammenlignet med MTT-figuren, men viser at forskjellen mellom PDT og PCI av saporin er større. PCI-behandling med IT mot CD44 viser god effekt og gir 100 % celledrap etter 180 sekunder lyseksposering (figur 3.3A). For cellelinjen DU-145 er effekten av PCI-behandlingen relativt lik ved måling av klonogen overlevelse sammenlignet med MTT (figur 3.3B), men ved klonogen overlevelse gir 90 sekunder lyseksposering 100 % celledrap sammenlignet med 150 sekunder for MTT.



Figur 3.3: Klonogen overlevelse etter PCI-behandling. Figurene viser cellelinjene A) WiDr og B) DU-145. Standardavvik er beregnet fra to paralleller og ført på grafene. Figurene viser et representativt utvalg av tre uavhengige forsøk.

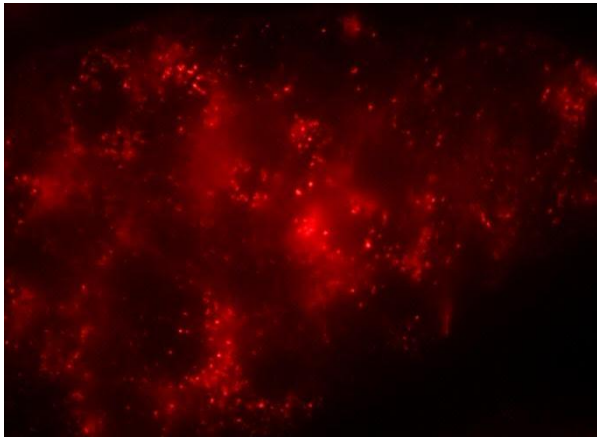
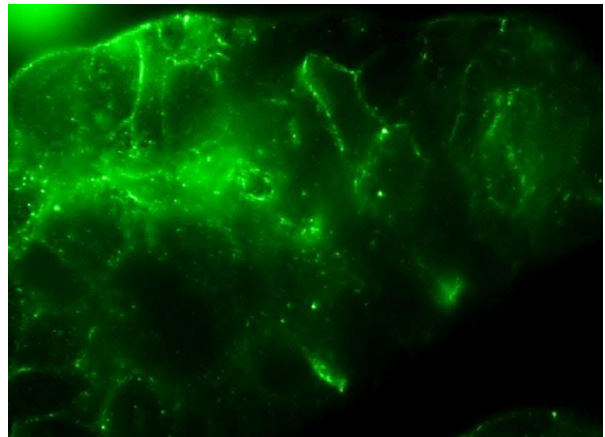
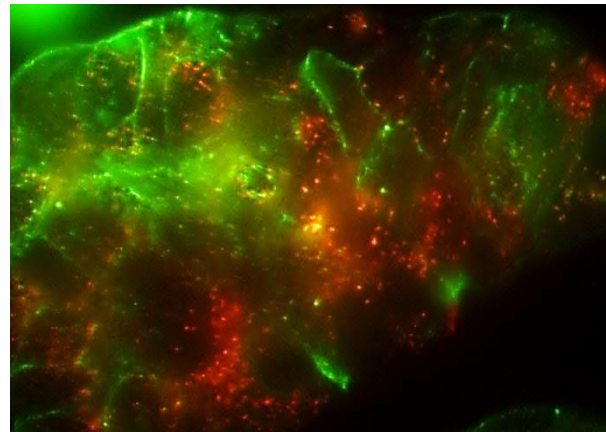
3.4 Opptak av TPCS_{2a} og CD44 på WiDr cellelinje

Fotosensitizerens lokalisering i endocytiske vesikler er avgjørende for fotokjemisk internalisering av terapeutiske makromolekyler. Cellelinjen WiDr ble inkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a} i 18 timer, etterfulgt av fire timer chase før mikroskopering. Resultatet fra fluorescensmikroskopering med TPCS_{2a} er vist i figur 3.4, med fasekontrast- (figur 3.4A) og fluorescensbilde (figur 3.4B) av WiDr-celler. Opptak av TPCS_{2a} ble observert som rød granulær fluorescens.



Figur 3.4: Intracellulært opptak av TPCS_{2a} i WiDr-cellelinjen. A) Fasekontrast. B) Fluorescens

For å studere om immuntoksinet og TPCS_{2a} kolokaliseres i endocytiske vesikler ble WiDr-celler inkubert med TPCS_{2a} og IM7-Alexa488 (figur 3.5). Opptak av TPCS_{2a} viste rød granulær fluorescens (figur 3.5A). IM7-Alexa488 vil binde seg til CD44 reseptor, og bli tatt opp gjennom reseptormediert endocytose. Grønn fluorescens fra Alexa488-merket antistoff viste hovedsakelig lokalisering rundt plasmamembranen, men noe granulært opptak kunne detekteres (figur 3.5B). Ved å fusjonere bildene vil gul/gul-orange farge angi overlapp av fluorescens. Det ble observert klar kolokalisering av TPCS_{2a} og fluorescensmerket antistoff (figur 3.5C), men det er også flere steder hvor det ikke er kolokalisering.

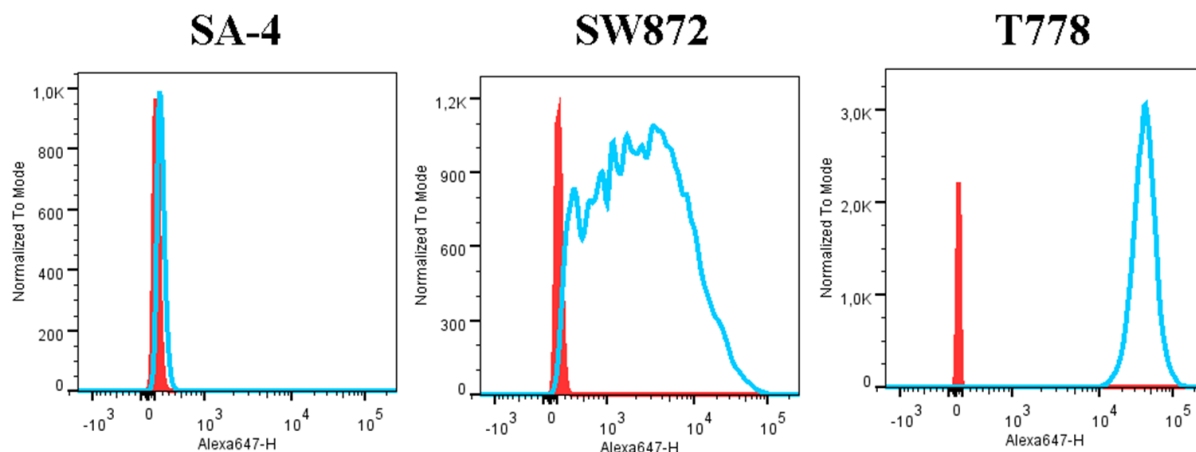
A**B****C**

Figur 3.5: Kolokalisering av TPCS_{2a} og IM7-Alexa488 i WiDr-cellelinjen. A) Opptak av TPCS_{2a} B) Opptak av IM7-Alexa488 C) Fusjonert fluorescens av TPCS_{2a} og IM7-Alexa488. Forsøket er utført en gang.

3.5 Ekspresjon av CD90 antigen

Liposarkomcellelinjene SA-4, SW872 og T778 ble alle merket med APC-anti-CD90 mAb (5E10) og analysert ved flowcytometri for å se på ekspresjon av overflatemarkøren CD90 (figur 3.6). Cellelinjen SA-4 ble benyttet som negativ kontroll for CD90 ekspresjon da denne cellelinjen viste liten økning i median fluorescensintensitet etter farging med APC-merket antistoff. Cellelinjen SW872 var sterkt positiv for ekspresjon av CD90, men viste en

heterogen populasjon med varierende grad av CD90 ekspresjon som strakk seg over 3 log. T778 var svært positiv, med en økning på mer enn 1000 ganger i fluorescensintensitet.



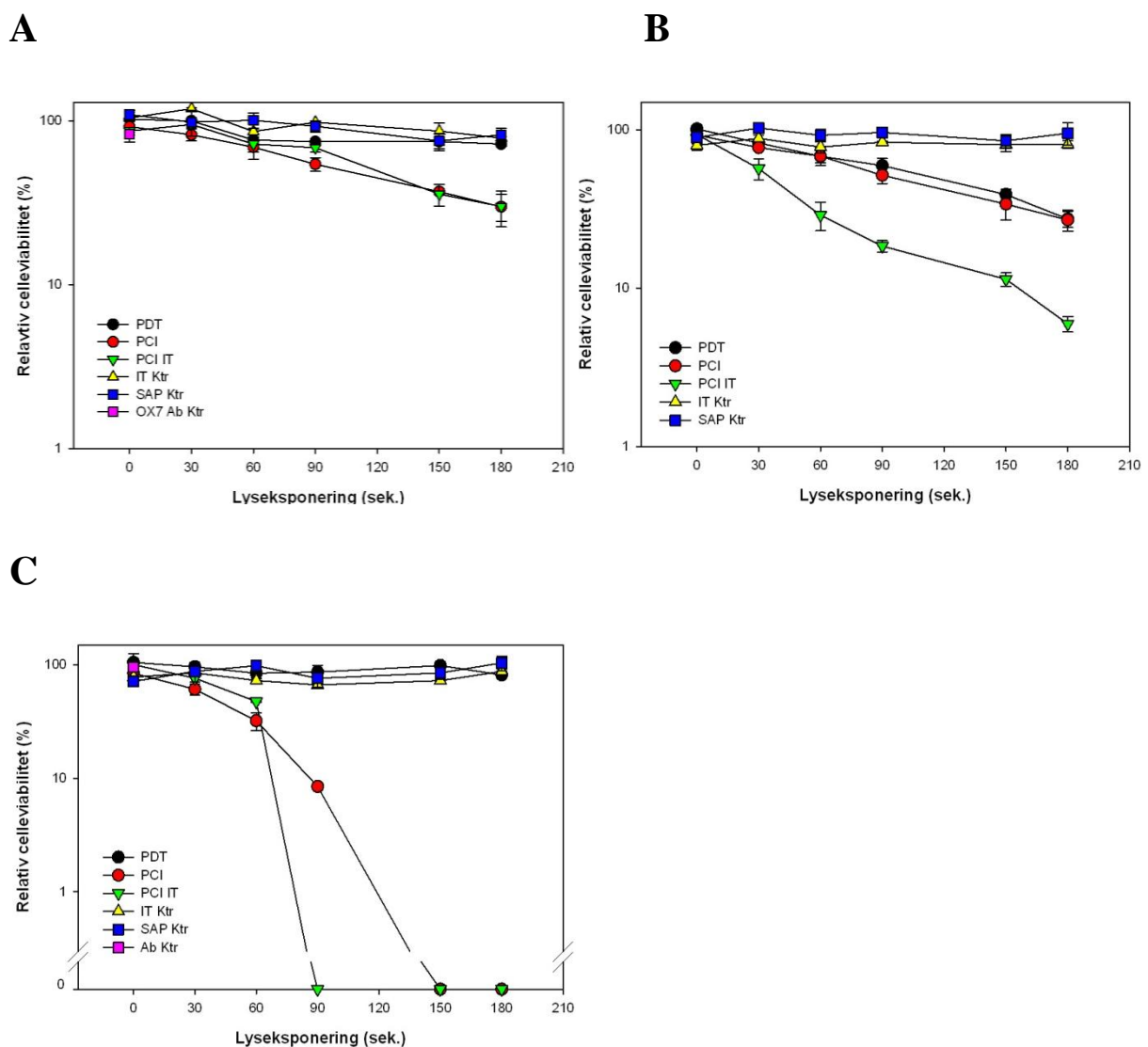
Figur 3.6: Ekspresjon av markør CD90 på liposarkomcellelinjene SA-4, SW872 og T778. Median fluorescensintensitet for ufargede kontrollprøver og fargede celler viste for SA-4 henholdsvis 147 til 275, for SW872 141 til 4124 og T778 16,7 til 74 869. Forsøket er utført en gang.

3.6 PCI med IT mot CD90 i cellelinjene SA-4, SW872 og T778

3.6.1 Celleviabilitet etter PCI-behandling med IT mot CD90

Celleviabiliteten etter PCI-forsøk med IT rettet mot CD90 ble utført på cellelinjene SA-4, SW872 og T778 (Figur 3.7). Cellelinjen SA-4 ble benyttet som negativ kontroll da denne cellelinjen viste lav ekspresjon av CD90 etter analysering med flowcytometri. Alle cellelinjene ble behandlet med $0,4 \mu\text{g/ml}$ TPCS_{2a}. Cellelinjen SA-4 ble behandlet med $0,825 \text{ nM}$ OX7-SAP, $1,65 \text{ nM}$ SAP-25 og $0,825 \text{ nM}$ OX7 for antistoffkontroll. SW872 og T778 ble begge behandlet med $8,25 \text{ nM}$ OX7-SAP, $16,5 \text{ nM}$ SAP-25 og $8,25 \text{ nM}$ OX7 for antistoffkontroll. Det ble benyttet lavere toksinkonsentrasjoner for SA-4 da denne cellelinjen viste høy mørketoksisitet ved en ti ganger høyere konsentrasjon. Celleviabiliteten ble målt med MTT 48 timer etter lyseksponering.

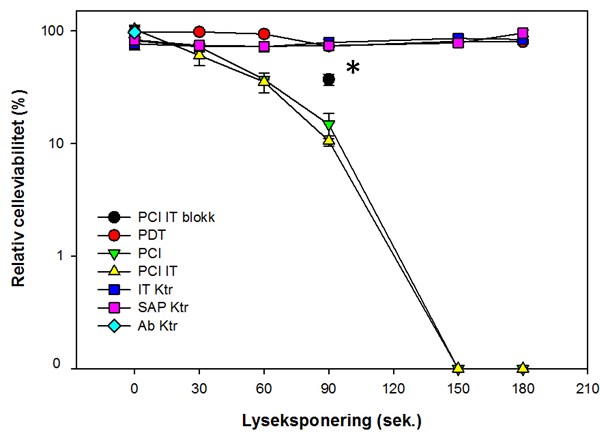
SA-4 cellene responderte lite etter PDT-behandlingen, men viste ca. 70 % tap av celleviabilitet ved PCI-behandling. Resultatene viser ingen forskjell i effekten av PCI av saporin og PCI med IT på SA-4 (Figur 3.7A). PDT-behandling av SW872-cellen viste en cytotoksisk effekt og > 70 % tap av celleviabilitet. PCI-behandling med saporin viste ingen økt effekt, men målrettet angrep på CD90 med IT induiserte > 90 % tap av viabilitet etter 180 sekunder lyseksponering (figur 3.7B). T778-cellen responderte dårlig på PDT-behandlingen. Ved PCI-behandling er effekten god og forskjellen ved 90 sekunder lyseksponering viser mer effektivt celledrap ved bruk av IT (figur 3.7C).



Figur 3.7: Celleviabilitet etter PCI-behandling for cellelinjene A) SA-4, B) SW872 og C) T778. Resultatet viser representative figurer fra reproduserte forsøk. Standardavvik (SD) er beregnet fra tre paralleller og ført på.

3.6.2 Selektivitetsforsøk av CD90 antistoff ved PCI

Cellelinjen T778 ble inkubert med overskudd av OX7 tilsvarende 100 ganger høyere konsentrasjon enn immuntoksinet OX7-SAP. Dette forsøket ble utført for å vise at cytotoxiciteten av OX7-SAP var grunnet spesifikt reseptormediert opptak av immuntoksinet. Resultatet viser at blokkering av reseptoren reduserte cytotoxiciteten av OX7-SAP signifikant med nesten 30 % ved 90 sekunder lyseksponering (figur 3.8). Resultatet viser imidlertid ingen forskjell mellom PCI-behandling med OX7-SAP og SAP-25.

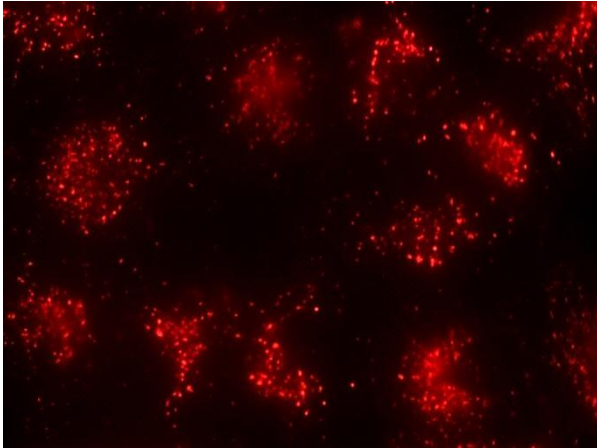
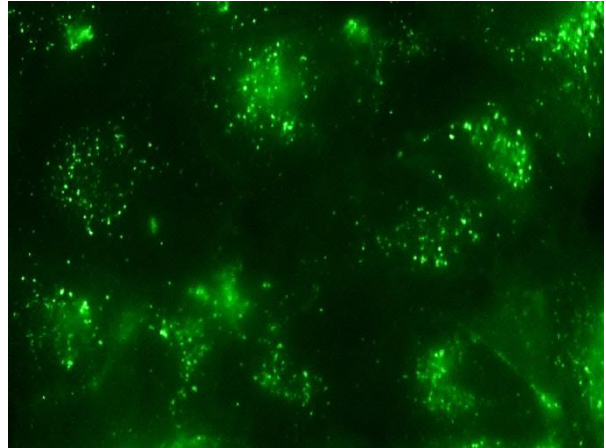
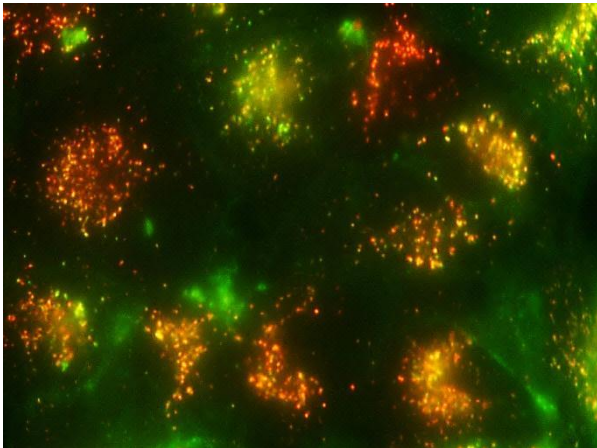
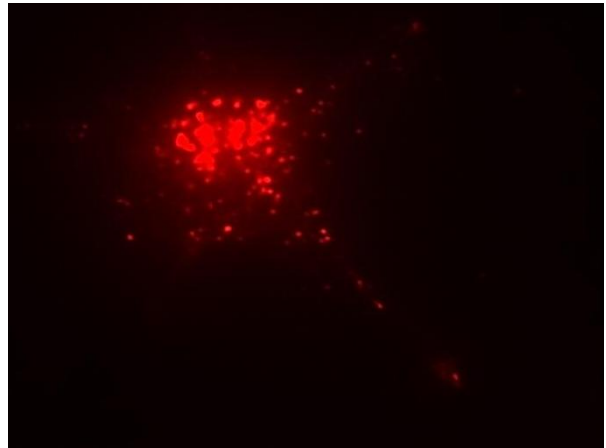


Figur 3.8: Blokkering av CD90 reseptor med overskudd av OX7 Ab. Forsøket er utført én gang. * indikerer $p = 0,001$.

3.7 Opptak av TPCS_{2a} og CD90-reseptor

Kolokalisering av TPCS_{2a} og CD90-reseptor ble studert ved fluorescensmikroskopi av cellelinjen T778. For å studere om immuntoksinet og TPCS_{2a} kolokaliseres i endocytiske vesikler ble T778-celler inkubert med TPCS_{2a} og OX7-Alexa488. For å demonstrere spesifisitet til immuntoksinet som ble benyttet til målrettet angrep på CD90 ble det utført et forsøk der reseptoren ble blokkert med overskudd av antistoff. OX7 er et ukonjugert CD90 antistoff som ble tilsatt med en 100 ganger høyere konsentrasjon enn OX7-Alexa488 for utkonkurrering av CD90 reseptorsetene. Dette ble utført for å illustrere at immuntoksinet ikke vil bli tatt opp i CD90⁺ celler dersom reseptorsetene er blokkerte. Resultatene fra fluorescensmikroskopering er vist i figur 3.9.

Opptak av TPCS_{2a} viste rød granulær fluorescens (figur 3.9A). OX7-Alexa488 vil binde seg til CD90 reseptor, og bli tatt opp gjennom reseptormediert endocytose. Grønn fluorescens fra Alexa488-merket antistoff viste en granulær fluorescens (figur 3.9B). Ved å fusjonere bildene vil gul farge angi overlapp av fluorescens. Det ble observert betydelig kolokalisering av TPCS_{2a} og OX7-Alexa488 (figur 3.9C), selv om det er områder hvor det ikke var samlokalisering. Resultatet viser også at T778-cellene ikke viste binding eller opptak av fluorescensmerket OX7-Alexa488 ved blokkering av reseptoren (figur 3.9D)

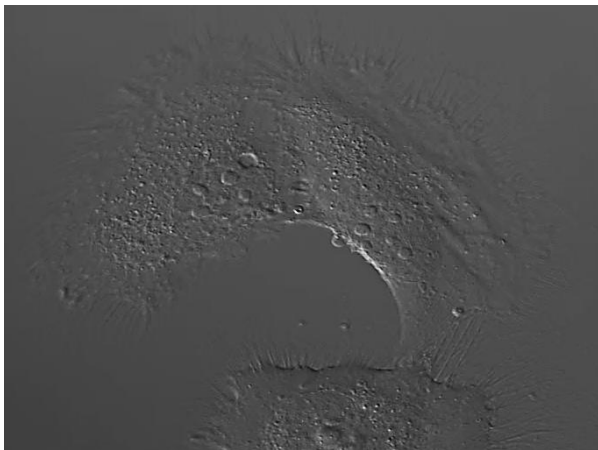
A**B****C****D**

Figur 3.9: Fluorescensbilder av TPCS_{2a} og OX7-Alexa488. Bildene viser A) fluorescens av TPCS_{2a}, B) fluorescens av OX7-Alexa488 og C) kolokalisering av TPCS_{2a} og OX7-Alexa488. Bildene er representative utvalg fra reproduuerte forsøk. D) blokkering av reseptoren med overskudd av OX7 Ab. Forsøket er utført én gang.

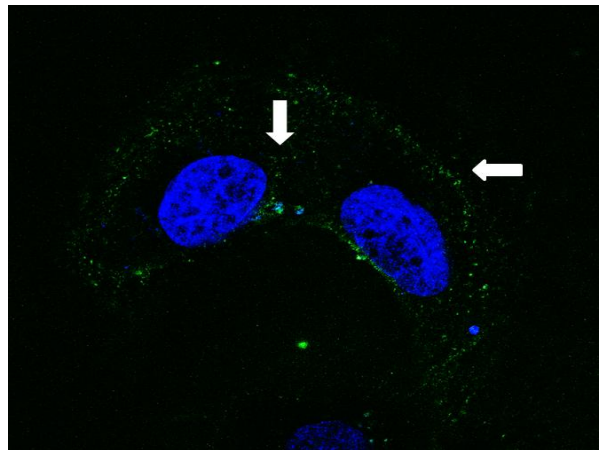
3.8 T778 membranbinding - konfokalmikroskopi

For å kvalitativt verifisere at OX7 antistoffet binder seg til reseptoren på plasmamembranen ble det utført et forsøk for å se på membranbindingen ved konfokalmikroskopi av cellelinjen T778. T778-celler ble inkubert med OX7-Alexa488 og Hoechst 33342, og oppbevart på is frem til mikroskopering. Resultatet fra forsøket er vist i figur 3.10, med fasekontrast- (figur 3.10A) og fluorescensbilde. Fluorescensbildet av T778 viser en svak, punktvis grønn fluorescens lokalisert på plasmamembranen til T778-cellene (horisontal pil). I tillegg er det antydning til at noe av antistoffet er internalisert ettersom noe fluorescens kan detekteres nært cellekjernen (vertikal pil) (figur 3.10B).

A



B



Figur 3.10: Membranbinding av OX7-Alexa488 på T778 cellelinje. Bildene viser A) fasekontrast og B) fluorescens av Hoechst-farget cellekjerne og Alexa-farget reseptorbinding. Forsøket er utført én gang.

3.9 SA-4 18 timers opptak

Cellelinjen SA-4 ble benyttet som negativ kontroll for PCI-forsøkene med IT rettet mot CD90 selv om denne cellelinjen viste en noe forhøyet fluorescensintensitet ved merking av CD90-reseptor (figur 3.6). Det ble utført et mikroskoperingsforsøk av denne cellelinjen for å se om cellene potensielt kan internalisere immuntoksinet OX7-SAP. SA-4 celler ble inkubert med OX7-Alexa488 i 18 timer, etterfulgt av vask og fire timer chase. Cellene ble analysert ved konfokalmikroskopering og resultatet er vist i figur 3.11. SA-4 cellene viser en veldig svak fluorescens lokalisert hovedsakelig i cellenes cytoplasma.



Figur 3.11: Opptak av OX7-Alexa488 i cellelinjen SA-4. Forsøket er utført én gang.

4 Diskusjon

Måltrettet behandling av kreftstamceller

Teorien om at det finnes kreftstamceller i mange krefttyper har vært emne for mye diskusjon. Motstand til denne teorien har blant annet blitt argumentert gjennom begrensninger i identifisering av kreftstamceller ved hjelp av xenotransplantasjoner i svært immunsvekkede mus. Selv om dette er selve gullstandarden for identifisering av kreftstamceller, finnes det imidlertid ingen direkte bevis for at cellulære egenskaper etter xenotransplantasjon vil reflektere egenskaper fra den opprinnelige tumor (70). Metoden tester cellenes evne til å danne tumor, uten å si noe om cellenes faktiske skjebne i den originale tumoren (71). Hvilke kreftceller som er i stand til å danne tumor vil være kontekstavhengig, og påvirkes av flere faktorer som vekstfaktorer og adhesjonsmolekyler i musevevet, samt immunresponser (71). Sortering av populasjoner med spesifikke fenotyper har imidlertid vist at så få som 100 antatte kreftstamceller kan være i stand til å initiere tumor, i motsetning til et signifikant høyere antall celler uten denne fenotypen (72). Det er i tillegg vist at transplanterte kreftstamceller er i stand til å bevare den hierarkiske organiseringen av den primære tumoren (73). Dette, kombinerte med tilbakefall av tumor etter behandling, og resistens mot etablerte behandlingsmetoder, skaper imidlertid validitet til teorien om kreftstamceller. Behandling av kreftstamceller vil være utfordrende da disse cellene ofte deler seg sakte og har et effektivt apparat for reparasjon av DNA-skade på grunn av anti-ROS mediatorer, dvs. økt nivå av antioksidanter eller overekspresjon av anti-ROS enzymer. Kreftstamceller innehar dermed større resistens mot strålebehandling og cellegift enn tumorens bulk-celler (1). Nye metoder for kreftbehandling med måltrettet angrep på kreftstamceller kan potensielt hindre tilbakefall av tumor, samt føre til økt overlevelse hos pasienter, og kan på bakgrunn av dette være en rasjonell strategi for å angripe «roten» til problemet.

Som beskrevet i kapittel 1.5 er CD44 og CD90 identifisert som potensielle markører for kreftstamceller i ulike typer kreft. I denne oppgaven ble cellelinjer fra henholdsvis karsinomer og sarkomer benyttet for måltrettet angrep på disse markørene ved PCI av IT. CD90-ekspresjon har ikke tidligere blitt linket til kreftstamceller i sarkomer (17), men som markør

for normale mesenchymale stamceller. Mesenchymale stamceller er tenkt å være et potensielt opphav til de fleste sarkomer (74). Kombinert med studien av Stratford *et al.* (17) der 6 av 9 liposarkomcellelinjer viste høy ekspresjon av CD90, kan det tenkes at CD90 kan være en potensiell markør for kreftstamceller i liposarkomer. I en annen studie av Stratford, Bostad *et al.* (75) ble det demonstrert at PCI av IT mot kreftstamcellemarkøren CD133 fører til tap av celleviabilitet i sarkomcellelinjer med CD133-ekspresjon. PCI av OX7-SAP IT mot CD90 har ikke tidligere blitt utprøvd. Figur 3.7 viser dokumentasjon på CD90-targeting. Tap av celleviabilitet etter PCI av OX7-SAP kan korreleres til grad av CD90-ekspresjon ved flowcytometri (figur 3.6). Spesifisiteten til immuntoksinet OX7-SAP er demonstrert gjennom selektivetsforsøk der blokkering av CD90-reseptoren signifikant reduserer cytotoxiciteten til OX7-SAP. Dette viser at OX7-SAP er spesifikk til målreseptoren. Spesifisiteten til OX7-SAP, kombinert med effektiv cytotoxicitet, danner et grunnlag for videre PCI-studier av dette immuntoksinet.

Overekspresjon av bestemte antigener blir ofte benyttet som markør for identifisering og isolering av kreftstamceller. Markører for kreftstamceller er imidlertid ikke universale da tumorer fra samme type kreft, samt ulike krefttyper, inneholder en fenotypisk variasjon som begrenser verdien av bruk av markører for isolering av kreftstamcelle-populasjoner (71). For å anvende markører for identifisering av kreftstamceller må stamcelleegenskapene derfor valideres for hvert individuelle studie (71). I studier utført av Stratford *et al.* er stamcellelignende egenskaper undersøkt i SA-4, SW872 og T778 gjennom blant annet differensieringspotensiale, stamcellemarkører og tumorigenitet. Samtlige cellelinjer viste høye prolifererende egenskaper, samt evne til å danne tumor *in vivo* (17). I denne oppgaven er ikke stamcellelignende egenskaper bestemt. For å avgjøre om cellelinjene som er benyttet i denne oppgaven innehar subpopulasjoner med stamcellelignende egenskaper linket til CD90-ekspresjon, er det behov for mer undersøkelser.

Fotokjemisk internalisering

Fotokjemisk internalisering (PCI) er en metode for frigjøring av endocyterte makromolekyler til cytosol (47). En viktig forutsetning for metoden er fotosensitizerens lokalisering i endocytiske vesikler. Som beskrevet i 2.3.1 er TPCS_{2a} en amfifil fotosensitizer, og vil kunne inkorporeres i cellulære membraner. Intracellulær lokalisering av TPCS_{2a} ble undersøkt ved fluorescensmikroskopi på cellelinjene WiDr og T778. I begge forsøkene ble celler inkubert med 1 µg/ml TPCS_{2a} i 18 timer, etterfulgt av vask og 4 timer chase. Granulær, intracellulær fluorescens fra TPCS_{2a} ble observert i begge cellelinjene og indikerer opptak i endocytiske vesikler. Disse resultatene samsvarer med tidligere funn som har indikert en endocytisk lokalisering av TPCS_{2a} (47). Det ble i tillegg utført mikroskopiforsøk med fluorescensmerkede antistoff mot overflatemarkørene CD44 og CD90 for å detektere kolokalisering av TPCS_{2a} og makromolekyl i de samme cellelinjene. Cellelinjen T778 viste at TPCS_{2a} og fluorescensmerket antistoff mot CD90, OX7-Alexa488, hadde god overlappning av fluorescens, og kan se ut til å kolokaliseres i intracellulære, endocytiske vesikler. Dersom man forutsetter at OX7-SAP internaliseres på tilsvarende måte som OX7-Alexa488 kan man anta at TPCS_{2a} og OX7-SAP i stor grad vil være kolokalisert under lyseksponering ved PCI-behandling. Støtte for dette kan man finne i cytotoksisitesdataene hvor man faktisk ser at lysaktivering av TPCS_{2a} fører til synergistisk cytotoksisitet mellom fotosensitizer og IT. Ettersom man vet at levetiden og diffusjonsavstanden til singlet oksygen er ekstremt kort, antyder dette at det er kolokalisering eller delvis kolokalisering av TPCS_{2a} og IT i kreftcellene. Spesifisitet til antistoffet ble undersøkt gjennom membranbinding og blokkering i T778 cellelinjen som er CD90^{høy}. Blokkering med overskudd av ukonjugert OX7 hindret binding og opptak av OX7-Alexa488 (figur 3.9D) og illustrerer i dette forsøket at opptak av OX7-Alexa488 skjer gjennom en spesifikk reseptormediert endocytose. Membranbinding av OX7-Alexa488 ble undersøkt ved konfokalmikroskopi, og viste en meget svak fluorescens lokalisert rundt cellemembranen på T778 (figur 3.10B). T778-cellene måtte stå på is over en time før fluorescens kunne observeres rundt cellemembranen. Det kan tenkes at reseptormediert endocytose allerede hadde internalisert en del av OX7-Alexa488 før cellene ble satt på is.

For cellelinjen WiDr viste kolokaliseringsforsøket at det fluorescensmerkede antistoffet (IM7-Alexa488) mot CD44 i stor grad var lokalisert rundt plasmamembranen. Kolokalisering av fotosensitizer og makromolekyl ved lyseksposering var tidligere tenkt å være avgjørende for levering av makromolekylet til cytosol. Det har derimot blitt vist at tilførsel av makromolekyler som ikke går inn i cellen ved reseptor-mediert endocytose, inntil 6-8 timer etter fotokjemisk behandling ikke påvirker den synergistiske effekten (42). Kolokaliseringsstudiet i WiDr ble bare gjennomført en gang. Begrenset kolokalisering av TPCS_{2a} og IM7-Alexa488 kan resultere fra feilkilder under forsøket, og man kan dermed ikke bekrefte, på bakgrunn av dette forsøket, at fotosensitizer og immuntoksin ikke vil være kolokalisert ved tidspunktet for lyseksposering under PCI-behandling. Resultatene fra PCI med IT mot CD44 på WiDr viser en økt effekt ved bruk av IT sammenlignet med saporin, som indikerer kolokalisering i endocytiske vesikler.

Cellelinjen SA-4 ble benyttet som negativ kontroll ved målrettet angrep på CD90. Det ble gjennomført konfokalmikroskopi av SA-4 for å undersøke om denne cellelinjen ville ta opp immuntoksinet OX7-SAP. SA-4 ble inkubert med OX7-Alexa488 og viser en svak intracellulær fluorescens (figur 3.11). SA-4 ser dermed ut til å internalisere noe av antistoffet. Det er imidlertid usikkert om dette er reseptormediert endocytose eller pinocytose. Internaliseringen ser likevel ikke ut til å ha noen merkbar økt cytotoxisk effekt ved PCI-behandling med IT på denne cellelinjen (figur 3.7A).

Den cytotoxiske effekten av PCI-behandling stammer fra toksinet som hemmer proteinsyntesen i kombinasjon med ROS som alene er skadelig for cellene. Cytoksisiteten av TPCS_{2a} uten lyseksposering var lav i alle forsøk, men økte i samsvar med lyseksposering. Cytoksisiteten til kontrollene for saporin og IT uten TPCS_{2a} var lav i samtlige forsøk, alene og kombinert med lyseksposering. Disse resultatene indikerer at kombinasjonen av TPCS_{2a}, makromolekyl og lyseksposering er avgjørende for den cytotoxiske effekten ved PCI-behandlingen. Denne observasjonen samsvarer med prinsippet for PCI og indikerer at metoden er pålitelig. Resultatene fra PCI-behandling viser at effekten av PDT er svært varierende i de ulike cellelinjene. Prostatacellelinjene LNCaP og DU-145 illustrerer dette i figur 3.2, med dramatisk forskjellig respons etter PDT. Årsaken til dette kan være ulike nivåer av ROS-scavengers som gjør cellene mer resistente mot PDT gjennom å forhindre ROS (15).

Pettazzoni *et al.* har faktisk demonstrert en større resisitens mot lipidperoksidering i cellelinjen DU-145 sammenlignet med LNCaP (76). Dette har initiert arbeid innen PCI-gruppen for å studere PDT-respons og ROS-scavengers i blant annet disse cellelinjene. Ulik effekt ble også observert ved PCI av saporin som kan være et resultat av varierende respons av PDT. Liten PDT-respons kan hindre at de endocytiske vesiklene sprekker og dermed hindre internalisering av toksinet.

Fotokjemisk internalisering av immuntoksiner

En av de mange utfordringene innen kreftbehandling er manglende spesifisitet for kreftceller. Med unntak av kirurgisk reseksjon av tumorvev, er etablerte metoder innen kreftbehandling, som stråleterapi og cellegift, lite selektive for kreftceller. Selektiviteten for kjemoterapeutiske medikamenter er hovedsakelig angrep av hurtig prolifererende celler (13). For strålebehandling oppnås en viss grad av spesifisitet gjennom lokalisert strålebehandling. Begge disse behandlingsmetodene er imidlertid begrenset av manglende diskriminering av normalvevet (77). Som forklart i kapittel 1.6.3 vil bruk av immuntoksiner (IT) kunne minimere angrep på normale celler gjennom gjenkjennelse av antigener på overflaten av kreftcellene. Klinisk respons ved bruk av IT har imidlertid vært begrenset. IT som ikke er kapable til å drepe rundt 80 – 90 % av målceller *in vitro* er antagelig ikke effektive nok til å benyttes *in vivo*, da de fleste tumorer vil danne resistens og tilbakefall (78). En stor begrensning for effektiv behandling med IT er intracellulær levering til cytosol (79). Tidligere studier har vist at PCI kan øke den cytosoliske frigjøringen og cytotoxiske effekten av immuntoksiner *in vitro* og *in vivo* (80). Bruk av immuntoksin for målrettet PCI-behandling av kreftstamceller med CD133⁺ fenotype har vist en sterk økning i cytotoxisitet sammenlignet med PCI av saporin (57), og cytotoxisiteten av EGF-saporin er vist å øke 1000 ganger som følge av levering med PCI (81).

Resultatet i denne oppgaven viser at CD44 og CD90 kan være potente markører for målrettet PCI-behandling med IT. Kontrollene av IT uten TPCS_{2a} viser en lav cytotoxisisk effekt, som indikerer at IT er blitt akkumulert i edosomer og/eller lysosomer for videre degradering før det får utøvet sin effekt i cytosol. Den økte effekten ved PCI av IT sammenlignet med PCI av

saporin indikerer at PCI av IT er en metode som kan øke terapeutisk effekt og spesifisitet av PCI-behandling. Dette kan medføre at man øker det terapeutiske vinduet til IT ved at det kan benyttes lavere konsentrasjoner av toksiner ved behandling, og på denne måten redusere eventuelle bivirkninger. Effektiv behandling kan også bidra til at det kreves færre behandlingsrunder, og dermed redusere dannelse av nøytraliserende antistoffer. Ved PCI-behandling av IT *in vivo* er det også viktig at IT klarer å diskriminere mellom normale celler og kreftceller med uttrykk av antigenet man spesifikt ønsker å angripe. De negative kontrollcellelinjene LNCaP og SA-4 ble benyttet for å demonstrere spesifisitet til metoden. Begge cellelinjene viste lik effekt etter PCI-behandling av IT sammenlignet med PCI av saporin. Det er imidlertid usikkerhet knyttet til kontrollen SA-4 da denne cellelinjen ble behandlet med en lavere konsentrasjon av toksiner sammenlignet med SW872 og T778. PCI av IT mot CD90 viste økt cytotoxissitet for SW872 og T778 som er CD90-positive cellelinjer. Ved innledende forsøk ble det benyttet en konsentrasjon på 0,825 nM IT. Denne konsentrasjonen resulterte ikke i økt effekt av IT sammenlignet med PCI av saporin alene. Det ble derfor benyttet 8,25 nM for videre forsøk. For cellelinjen SA-4 viste konsentrasjonen 8,25 nM en svært høy cytotoxissitet, både med og uten lys. Denne konsentrasjonen kunne derfor ikke benyttes for PCI-behandling av denne cellelinjen. Manglende forskjell mellom PCI av saporin sammenlignet med PCI av IT kan ha vært forårsaket av lav ekspresjon av CD90 antigen, men kan også være årsak på grunn av den lave konsentrasjonen av IT. Man kan på bakgrunn av dette ikke konkludere at SA-4 ikke viste økt effekt av PCI av IT på grunn av lav ekspresjon av CD90 antigen. SA-4 er på bakgrunn av dette ikke en optimal negativ kontrollcellelinje i denne studien. Likevel kan man hevde at man har en spesifisitet av anti-CD90 immuntoksinet siden PCI-effekten ble blokkert med overskudd av ukonjugert Ab. I tillegg viser fluorescensstudiet at binding av OX7-Alexa488 ble blokkert med overskudd av OX7 Ab. Og tilslutt, for både SW872 og T778 fikk man langt høyere cytotoxisk respons med PCI av OX7-saporin sammenlignet med PCI av saporin.

Måltrettet behandling av kreftstamceller vil være utfordrende da markører for kreftstamceller og normale stamceller ofte vil være samsvarende. PCI-teknologien kan potensielt løse dette problemet ved terapi av lokaliserte kreftsvulster. Gjennom PCI av IT oppnås spesifikk behandling *in vivo* ved flere faktorer: Akkumulering av fotosensitizer i tumorvev, lokal lyseksponering, samt måltrettet angrep av immuntoksinet. Dette medfører skjerming av normale stamceller som ligger utenfor det lyseksponerte feltet. Denne oppgaven danner derfor

et grunnlag for videre preklinisk evaluering PCI for målrettet angrep og drap av kreftstamceller med overekspressjon av CD44 og CD90.

Eksperimentelle feilkilder

Cellelinjer og markørene CD44 og CD90

Cellelinjene som er benyttet i denne oppgaven ble hovedsakelig valgt på bakgrunn av ekspresjon av overflatemarkørene CD44 og CD90. For målrettet angrep på overflatemarkøren CD44 ble cellelinjene WiDr, BxPC3, DU-145 og LNCaP benyttet. WiDr og BxPC3 ble valgt da disse cellelinjene tidligere har vist CD44-ekspresjon (Bostad *et al.* (ikke publisert)), samt på bakgrunn av tidligere erfaring i PCI-gruppen. Utfordringen var å finne en cellelinje som kunne benyttes som negativ kontroll. Cellelinjen DU-145 ble valgt på grunnlag av av Draffin *et al.* (82) som viste at denne cellelinjen er CD44⁻ v.h.a. flowcytometri, western blotting og immuncytokjemi. Analysering ved flowcytometri i denne oppgaven viste imidlertid at DU-145 hadde den høyeste CD44-ekspresjonen, som også er vist av blant annet Hurt *et al.* (83) og Yan *et al.* (84). Cellelinjen LNCaP ble presentert som en CD44⁻ cellelinje av Liu (20), og ble verifisert som negativ ved analysering ved flowcytometri i dette studiet. For målrettet angrep på overflatemarkøren CD90 ble cellelinjene SA-4, SW872 og T778 benyttet. Disse cellelinjene ble valgt på bakgrunn av karakteriseringsstudier av liposarkomcellelinjer utført av Stratford *et al.* (17), der overflatemarkøren CD90 ble målt ved flowcytometri. Som beskrevet tidligere er ikke CD90-ekspresjon funnet å være en markør for kreftstamceller i sarkomer. Anvendelsen av liposarkomcellelinjer var hovedsakelig grunnet lett tilgjengelige cellelinjer med varierende ekspresjon av CD90 gjennom samarbeid med Mylebost-gruppen i SFI-CAST, og ble derfor benyttet som modellcellelinjer for å vise PCI-basert angrep på CD90.

Flowcytometri

Ekspresjonen av CD44 og CD90 på de ulike cellelinjene ble analysert ved flowcytometri. I studiet utført av Draffin *et al.* ble det benyttet trypsin for å løse cellene før analysering ved flowcytometri. Det er sannsynlig at trypsinet degraderte CD44-reseptoren og DU145 ble derfor feilaktig valgt som CD44-negativ linje i dette studiet. I denne oppgaven ble det benyttet Accutase[®], som er en mildere enzymløsning og gir mindre skade på overflateproteiner enn

trypsin (60). Forskjellen mellom resultatene her illustrerer usikkerheten ved måling av proteiner på overflaten da ulike midler som benyttes for å løsne celler kan gi tap av overflateproteiner. Analysing av markørene CD44 og CD90 ved flowcytometri ble bare utført en gang, og man kan på bakgrunn av dette ikke bekrefte ekspresjonen av disse markørene i denne oppgaven. Resultatene fra Stratford *et. al.* (17), samt resultater fra Bostad *et. al.* bidrar likevel til å verifisere disse funnene. Ved måling av overflatemarkørene ble det benyttet ferdige fluorescensmerkede antistoffer (FITC CD44 mAb (G44-26) og APC CD90 (5E10)). Disse antistoffene var ikke de samme som ble benyttet ved PCI av IT (OX7-SAP og IM7-SAP), og det vil dermed være en viss usikkerhet rundt overføringsevnen av disse resultatene. Det kan for eksempel være ulik affinitet mellom antistoff og antigen, samt gjenkjennelse av ulike epitoper på antigenet.

PCI og viabilitetsassays

Innledende forsøk utført i begynnelsen av prosjektet kan ha vært mer unøyaktige på grunn av manglende praktisk erfaring i laboratoriearbeidet. Arbeid med celler i kultur vil også generelt kunne skape unøyaktigheter da dette er levende celler som kan endre egenskaper etter lange passasjer. Ekspresjon av kreftstamcellemarkørene CD44 og CD90 har blitt undersøkt ved økende cellepassasjer i primære kreftcellelinjer fra lungekreft, der ekspresjonen av CD44 økte med økende passasjer, mens ekspresjonen av CD90 minket (38). Potensielle fenotypiske endringer som dette kan bidra til usikkerhet i resultatene. Dette viser at det er viktig å ha kontroll på cellepassasjenummer. PCI-gruppen har derfor over lengre tid praktisert en generell maksimumpassasje på 25. Etter dette blir linjen kastet og ny blir tatt opp fra nitrogentanken.

Før eksperimentelle forsøk ble cellene telt ved hjelp av et tellekammer. Det var kun et lite volum fra celleduspensjonene som ble telt i tellekammeret, og dersom celleduspensjonen ikke var fullstendig blandet til en homogen løsning kan utvalget som telles i tellekammeret gi feil estimering av cellekonsentrasjon, og som videre kan påvirke resultatene i forsøkene. Arbeidet med TPCS_{2a} ble utført under lysbeskyttende omgivelser. Pipettering av små volum, samt behandling av materialer under begrenset tilgang til lys kan være en kilde til usikkerhet i hvert

enkelt forsøk. Uønsket eksponering av lys kan også bidra til usikkerhet da dette kan aktivere, samt føre til fotobleking, av TPCS_{2a}.

For å måle cellulær viabilitet etter PCI-behandling ble det benyttet MTT-assay. Det finnes flere begrensninger ved MTT-metoden som kan påvirke påliteligheten til resultatene. Ikke alle cellelinjer er egnet å benytte denne metoden på. For cellelinjer som ikke har en konstant mitokondriell aktivitet kan ikke denne metoden benyttes for å studere effekten av medikamenter (63). Metoden kan også være mindre sensitiv ved lave cellekonsentrasjoner (64). I tillegg finnes det usikkerhet ved denne metoden da den kan både underestimere og overestimere cytotoksiteten av et medikament som beskrevet i 2.4.2. Det er dermed viktig å vente lenge nok før måling av MTT. Det ble i denne oppgaven benyttet klonogen overlevelse på cellelinjene WiDr og DU-145 for å studere en mer langsiktig cytotoksitet etter PCI-behandling. Klonogen overlevelse er en mer tidkrevende metode enn MTT, og kan ikke alltid benyttes da ikke alle cellelinjer er kapable til å danne kolonier.

5 Konklusjon

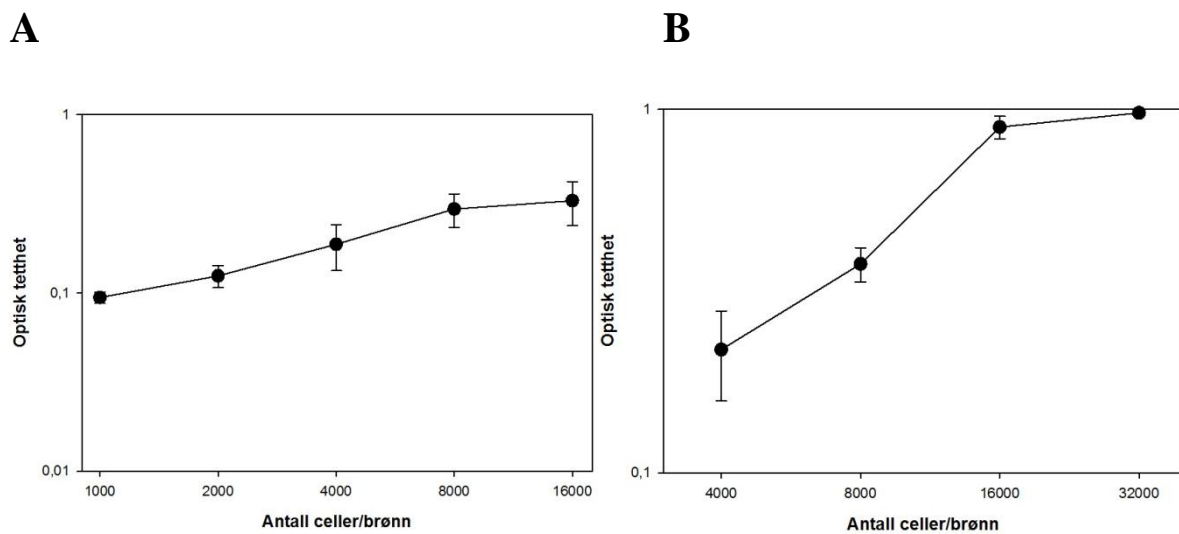
Fotosensitizeren, TPCS_{2a}, som er benyttet i denne studien viser opptak i endocytiske vesikler, noe som er en forutsetning for PCI-metoden. Denne studien er den første til å benytte kreftstamcellemarkøren CD90 for målrettet PCI-behandling med IT. Reproduserte data viser en økt cytotoxisk effekt av immuntoksinet OX7-SAP i de CD90⁺ cellelinjene SW872 og T778, gjennom intracellulær levering ved PCI. Immuntoksinet OX7-SAP viser spesifisitet til målmarkøren CD90, illustrert gjennom blokkering av reseptor ved fluorescensmikroskopi, membranbinding, samt selektivitetsforsøk ved PCI. Det er også demonstrert at immuntoksinet IM7-SAP gir en økt cytotoxisk effekt i de CD44⁺ cellelinjene BxPC3, WiDr og DU-145.

Denne studien har vist at fotokjemisk internalisering av immuntoksiner rettet mot kreftstamcellemarkørene CD44 og CD90 kan fungere som en selektiv og effektiv behandling *in vitro*, og danner grunnlag for videre studier av disse markørene for fremtidig PCI-behandling. For å kunne demonstrere målrettet angrep på kreftstamceller ved bruk av IM7-SAP og OX7-SAP er det nødvendig med videre undersøkelser gjennom studier i musemodeller for å fastslå om fenotypen CD44⁺ og CD90⁺ i virkeligheten innehar stamcellelignende egenskaper.

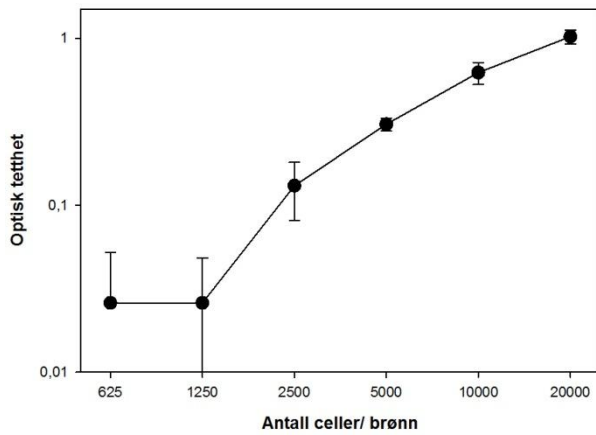
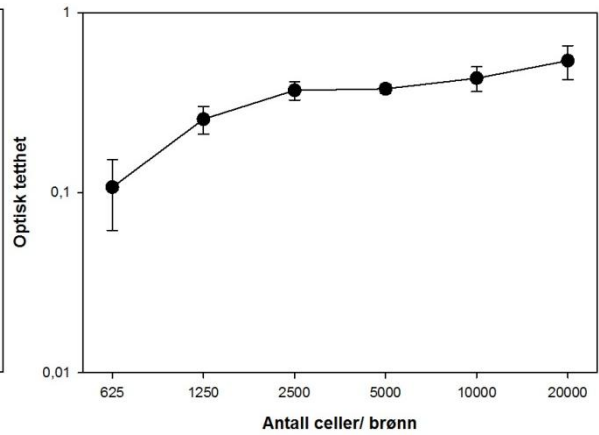
Vedlegg

Etablering av PCI-metoden

Innledende forsøk ble utført for etablering av PCI-metoden. Det ble utført tetthetsforsøk for cellelinjene BxPC3 og LNCaP som ble benyttet til målrettet angrep på CD44, samt cellelinjene SA-4 og T778 som ble benyttet til målrettet angrep på CD90. Cellekonsentrasjonene som ble benyttet for de resterende cellelinjene ble valgt på bakgrunn av tidligere erfaringer innen PCI-gruppen og Seksjon for tumorbiologi. Resultatene fra tetthetsforsøk er vist i figur V.1 og figur V.2, og benyttede cellekonsentrasjoner er oppsummert i tabell 2.2.

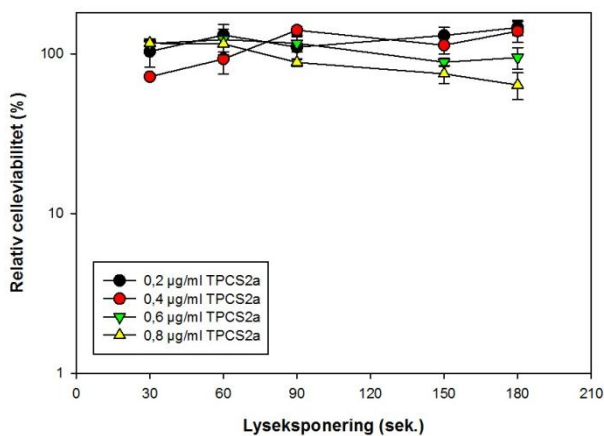
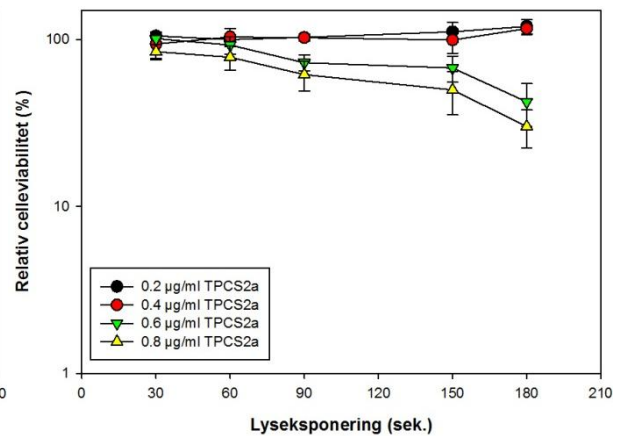


Figur V.1: Optisk tetthet ble målt ved MTT-assay i 96-brønnersbrett for ulike cellekonsentrasjoner i cellelinjene A) BxPC3 og B) LNCaP. Forsøket er utført en gang, og standardavvik fra tre paralleller er tegnet inn.

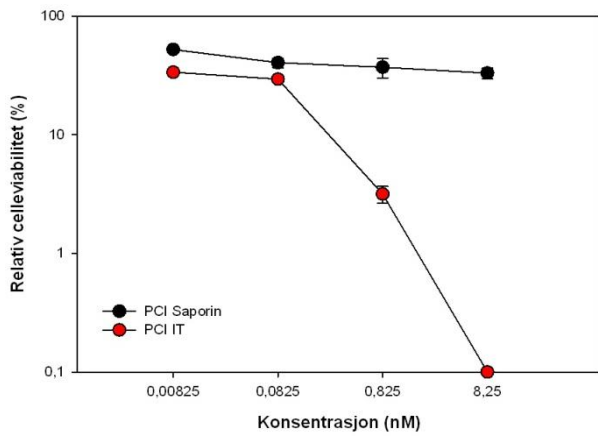
A**B**

Figur V.2: Optisk tetthet ble målt ved MTT-assay i 96-brønnersbrett for ulike cellekonsentrasjoner i cellelinjene A) SA-4 og B) T778. Forsøket er utført en gang, og standardavvik fra tre paralleller er tegnet inn.

Det ble utført forsøk med konsentrasjonsrekker av TPCS_{2a} på cellelinjene SA-4 og T778, samt konsentrasjonsrekker av immuntoksinet IM7-SAP for cellelinjen BxPC3 som en del av de innledende forsøkene for etablering av PCI-metoden. Resultatene er vist henholdsvis i figurene V.3 og V.4.

A**B**

Figur V.3: Cellelinjene A) SA-4 og B) T778 ble behandlet med ulike konsentrasjoner av fotosensitizeren TPCS_{2a} i kombinasjon med lyseksposering. Relativ celleviabilitet er analysert ved MTT-assay i 96-brønnersbrett. Forsøket er utført en gang, og standardavvik fra tre paralleller er tegnet inn.



Figur V.4: Konsentrasjonsrekke av immuntoksinet IM7-SAP. Figuren viser behandling av PCI av saporin og PCI av immuntoksinet IM7-SAP ved økende dosebehandling (lyseksponering 180 sek.). PS-konsentrasjon: 0,35 μ g/ml. Forsøket er utført to ganger, og standardavvik fra tre paralleller er tegnet inn.

Referanser

1. Shigdar S, Lin J, Li Y, Yang CJ, Wei M, Zhus Y, et al. Cancer stem cell targeting: the next generation of cancer therapy and molecular imaging. *Therapeutic delivery*. 2012;3(2):227-44. Epub 2012/07/28.
2. Selbo PK, Hogset A, Prasmickaite L, Berg K. Photochemical internalisation: a novel drug delivery system. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2002;23(2):103-12. Epub 2002/06/18.
3. Armstrong L, Lako M, Buckley N, Lappin TRJ, Murphy MJ, Nolte JA, et al. Our Top 10 Developments in Stem Cell Biology over the Last 30 Years. *Stem cells*. 2012;30(1):2-9.
4. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell stem cell*. 2007;1(1):35-8. Epub 2008/03/29.
5. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter Specialized Tissues, Stem Cells, and Tissue Renewal *Molecular biology of the cell* 2007.
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11. Epub 2001/11/02.
7. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(1):21-33. Epub 2005/12/22.
8. Tang KH, Dai Y, Tong M, Chan YP, Kwan PS, Fu L, et al. A CD90+ tumor-initiating cell population with an aggressive signature and metastatic capacity in esophageal cancer. *Cancer research*. 2013. Epub 2013/02/06.
9. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2004;51(1):1-28. Epub 2004/06/23.
10. Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(12):895-902. Epub 2004/01/23.
11. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36. Epub 2009/09/16.
12. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature medicine*. 2009;15(9):1010-2. Epub 2009/09/08.
13. Elyer CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(17):2839-45. Epub 2008/06/10.
14. Nagano O, Okazaki S, Saya H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene*. 2013. Epub 2013/01/22.

15. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):780-3. Epub 2009/02/06.
16. Ponnusamy MP, Batra SK. Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. *Journal of ovarian research*. 2008;1(1):4. Epub 2008/11/19.
17. Stratford EW, Castro R, Daffinrud J, Skarn M, Lauvrak S, Munthe E, et al. Characterization of liposarcoma cell lines for preclinical and biological studies. *Sarcoma*. 2012;2012:148614. Epub 2012/08/23.
18. Negi LM, Talegaonkar S, Jaggi M, Ahmad FJ, Iqbal Z, Khar RK. Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting. *J Drug Target*. 2012;20(7):561-73.
19. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Advances in immunology*. 1993;54:271-335. Epub 1993/01/01.
20. Liu AY. Expression of CD44 in prostate cancer cells. *Cancer letters*. 1994;76(1):63-9. Epub 1994/01/15.
21. Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *The FEBS journal*. 2011;278(9):1429-43. Epub 2011/03/03.
22. Kuniyasu H, Oue N, Tsutsumi M, Tahara E, Yasui W. Heparan sulfate enhances invasion by human colon carcinoma cell lines through expression of CD44 variant exon 3. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):4067-72.
23. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature reviews Cancer*. 2011;11(4):254-67. Epub 2011/03/11.
24. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1992;6(7):2397-404. Epub 1992/04/01.
25. Sironen RK, Tammi M, Tammi R, Auvinen PK, Anttila M, Kosma VM. Hyaluronan in human malignancies. *Experimental cell research*. 2011;317(4):383-91. Epub 2010/12/08.
26. Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Seminars in cancer biology*. 2008;18(4):288-95. Epub 2008/05/13.
27. Ponta H, Wainwright D, Herrlich P. The CD44 protein family. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998;30(3):299-305. Epub 1998/06/05.
28. Saini S, Majid S, Shahryari V, Arora S, Yamamura S, Chang I, et al. miRNA-708 control of CD44(+) prostate cancer-initiating cells. *Cancer research*. 2012;72(14):3618-30. Epub 2012/05/04.
29. Tijink BM, Buter J, de Bree R, Giaccone G, Lang MS, Staab A, et al. A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 Pt 1):6064-72. Epub 2006/10/26.

30. Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *Faseb Journal*. 2006;20(8):1045-54.
31. Haeryfar SM, Hoskin DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *Journal of immunology*. 2004;173(6):3581-8. Epub 2004/09/10.
32. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(5):1331-42. Epub 1993/05/01.
33. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell stem cell*. 2007;1(6):635-45. Epub 2008/03/29.
34. Nakamura Y, Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sakai D, Mochida J, et al. Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Brit J Dermatol*. 2006;154(6):1062-70.
35. Dennis JE, Esterly K, Awadallah A, Parrish CR, Poynter GM, Goltry KL. Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. *Stem cells*. 2007;25(10):2575-82. Epub 2007/06/23.
36. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer cell*. 2008;13(2):153-66. Epub 2008/02/05.
37. Jiang J, Zhang Y, Chuai S, Wang Z, Zheng D, Xu F, et al. Trastuzumab (herceptin) targets gastric cancer stem cells characterized by CD90 phenotype. *Oncogene*. 2012;31(6):671-82. Epub 2011/07/12.
38. Wang P, Gao Q, Suo Z, Munthe E, Solberg S, Ma L, et al. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PLoS one*. 2013;8(3):e57020. Epub 2013/03/08.
39. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2001;74(5):656-69. Epub 2001/11/29.
40. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nature methods*. 2005;2(12):910-9. Epub 2005/11/22.
41. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(4):250-81. Epub 2011/05/28.
42. Berg K, Folini M, Prasmickaite L, Selbo PK, Bonsted A, Engesaeter BO, et al. Photochemical internalization: a new tool for drug delivery. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2007;8(6):362-72. Epub 2008/02/22.
43. DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev*. 2002;233:351-71.
44. Berg K, Selbo PK, Weyergang A, Dietze A, Prasmickaite L, Bonsted A, et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *Journal of microscopy*. 2005;218(Pt 2):133-47. Epub 2005/04/29.

45. Mojzisova H, Bonneau S, Maillard P, Berg K, Brault D. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2009;8(6):778-87. Epub 2009/06/06.
46. Girotti AW. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem Photobiol*. 1990;51(4):497-509. Epub 1990/04/01.
47. Berg K, Nordstrand S, Selbo PK, Tran DT, Angell-Petersen E, Hogset A. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2011;10(10):1637-51. Epub 2011/07/21.
48. Hamblin MR, Newman EL. On the Mechanism of the Tumor-Localizing Effect in Photodynamic Therapy. *J Photoch Photobio B*. 1994;23(1):3-8.
49. Selbo PK, Weyergang A, Hogset A, Norum OJ, Berstad MB, Vikdal M, et al. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2010;148(1):2-12. Epub 2010/07/06.
50. AS PB. The basics of PCI. [cited 2013 15.05]; Available from: <http://www.pcibiotech.no/content/basics-pci>.
51. Puri M, Kaur I, Perugini MA, Gupta RC. Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug discovery today*. 2012;17(13-14):774-83. Epub 2012/04/10.
52. Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2004;44(4):371-83. Epub 2004/08/11.
53. Nielsen K, Boston RS. RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS: A Plant Perspective. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 2001;52:785-816. Epub 2001/05/05.
54. Singh RC, Alam A, Singh V. Purification, characterization and chemical modification studies on a translation inhibitor protein from *Luffa cylindrica*. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 2003;40(1):31-9.
55. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. *Annual review of medicine*. 2007;58:221-37. Epub 2006/10/25.
56. FitzGerald D, Pastan I. Targeted toxin therapy for the treatment of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(19):1455-63. Epub 1989/10/04.
57. Bostad M, Berg K, Hogset A, Skarpen E, Stenmark H, Selbo PK. Photochemical internalization (PCI) of immunotoxins targeting CD133 is specific and highly potent at femtomolar levels in cells with cancer stem cell properties. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2013;168(3):317-26. Epub 2013/04/10.
58. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(8):748-58. Epub 2007/07/31.

59. Burtis C.A. AER. Enzymes. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: Saunders; 2001. p. 352-90.
60. Sigma-Aldrich. Accutase® solution. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6964?lang=en®ion=NO>.
61. : PCI Biotech; [cited 2013 13.05]; Available from: <http://www.pcibiotech.no/content/lumisource-novel-light-source-vitro-research>
62. Stayton PS, Freitag S, Klumb LA, Chilkoti A, Chu V, Penzotti JE, et al. Streptavidin-biotin binding energetics. *Biomolecular engineering*. 1999;16(1-4):39-44. Epub 2000/05/05.
63. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in molecular biology*. 2011;731:237-45. Epub 2011/04/26.
64. Sumantran VN. Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods in molecular biology*. 2011;731:219-36. Epub 2011/04/26.
65. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter Visualizing Cells Molecular biology of the cell 2007.
66. imaging B. Fluorescence microscopy - a brief explanation. [cited 2013 13.05]; Available from: <http://www.scienceinyoureyes.com/index.php?id=79>.
67. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to Confocal Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(12):1-5.
68. Dean PN, Hoffman RA. Overview of flow cytometry instrumentation. *Current protocols in cytometry / editorial board, J Paul Robinson, managing editor [et al]*. 2007;Chapter 1:Unit1 Epub 2008/09/05.
69. Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clinical & experimental metastasis*. 2009;26(7):611-23. Epub 2009/05/08.
70. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*. 2011;17(3):313-9. Epub 2011/03/10.
71. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell*. 2012;21(3):283-96. Epub 2012/03/24.
72. Ebben JD, Treisman DM, Zorniak M, Kutty RG, Clark PA, Kuo JS. The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2010;14(6):621-32. Epub 2010/04/30.
73. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*. 2008;452(7187):650-3. Epub 2008/04/04.

74. Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Tsujiuchi T, Kido A, Tsukamoto S, et al. Comparison of gene expression profiling in sarcomas and mesenchymal stem cells identifies tumorigenic pathways in chemically induced rat sarcoma model. *ISRN oncology*. 2012;2012:909453. Epub 2012/08/02.
75. Stratford EW, Bostad M, Castro R, Skarpen E, Berg K, Hogset A, et al. Photochemical internalization of CD133-targeting immunotoxins efficiently depletes sarcoma cells with stem-like properties and reduces tumorigenicity. *Biochimica et biophysica acta*. 2013. Epub 2013/05/07.
76. Pettazzoni P, Ciamporcero E, Medana C, Pizzimenti S, Dal Bello F, Minero VG, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity controls 4-hydroxynonenal metabolism and activity in prostate cancer cells. *Free radical biology & medicine*. 2011;51(8):1610-8. Epub 2011/08/06.
77. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer research*. 1998;58(7):1408-16. Epub 1998/04/16.
78. Hertler AA, Frankel AE. Immunotoxins: a clinical review of their use in the treatment of malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1989;7(12):1932-42. Epub 1989/12/01.
79. Selbo PK, Sivam G, Fodstad O, Sandvig K, Berg K. Photochemical internalisation increases the cytotoxic effect of the immunotoxin MOC31-gelonin. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;87(6):853-9. Epub 2000/08/24.
80. Selbo PK, Rosenblum MG, Cheung LH, Zhang W, Berg K. Multi-modality therapeutics with potent anti-tumor effects: photochemical internalization enhances delivery of the fusion toxin scFvMEL/rGel. *PloS one*. 2009;4(8):e6691. Epub 2009/08/20.
81. Weyergang A, Selbo PK, Berg K. Photochemically stimulated drug delivery increases the cytotoxicity and specificity of EGF-saporin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006;111(1-2):165-73. Epub 2006/02/10.
82. Draffin JE, McFarlane S, Hill A, Johnston PG, Waugh DJ. CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Cancer research*. 2004;64(16):5702-11. Epub 2004/08/18.
83. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *British journal of cancer*. 2008;98(4):756-65. Epub 2008/02/13.
84. Yan H, Chen X, Zhang Q, Qin J, Li H, Liu C, et al. Drug-tolerant cancer cells show reduced tumor-initiating capacity: depletion of CD44 cells and evidence for epigenetic mechanisms. *PloS one*. 2011;6(9):e24397. Epub 2011/09/22.