

Labøvelse i FYS 3710 på Cellelabben

Nina Jeppesen Edin

Effekt av røntgenstråling på cellesyklusregulering hos humane tarmkreftceller (HT-29).

Når våre humane celler bestråles setter de i gang beskyttelsesmekanismer. Hos normale celler i vev i kroppen består disse mekanismene dels av reparasjon av DNA-skader dels av skånsom fjerning av skadede celler. Det er altså ikke slik at kroppen forsøker å redde alle skadede celler ved å reparere skadene. Det kan ofte være bedre å la de skadede cellene begå selvmord ved såkalt apoptose, og omdanne seg til små matpakker for nabocellene enn å reparere skader og dermed risikere feilreparasjon i DNA og senere mulighet for levende muterte celler med mulig kreftutvikling. Å skifte ut utslitte celler med nye er en prosess som pågår hele tiden uavhengig av om cellene bestråles og er derfor en effektiv prosess. De cellene som lager nye celler kalles stamceller.

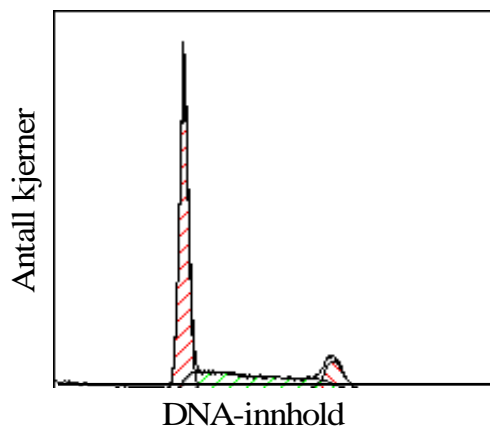
For å velge hvilken strategi som skal benyttes for hver enkelt bestrålt celle, samt gi mulighet for eventuell reparasjon er det nødvendig å vinne tid. Problemet er nemlig at dersom cellene rekker frem til mitosefasen med sine strålingsinduserte skader i DNA har de ikke lenger noe valg: Da er faren for at de dør meget stor. Og da dør de ikke på noen skånsom måte for kroppen, da gjennomgår de såkalt mitosedød, og det er ikke en form for død hvor de omdannes til matpakker for nabocellene. Tvert imot medfører det nekrose, cellesprekking, med derav følgende fare for toksiske produkter i vevsvæsken.

Altså, som vi forstår er cellenes første respons på bestråling at de stanser sin cellesyklusgjennomgang. Dette er en forsvarsmekanisme som er nedarvet gjennom en milliard år for eukaryote celler. Og mekanismene for hvordan dette skjer er stort sett bevart over hele denne lange perioden. Vi mennesker har altså arvet denne beskyttelsen gjennom talløse evolusjonstrinn fra gjærcellene som vi faktisk er ganske nære slektinger av på dette området.

Cellesyklus reguleres i noen bestemte punkter og reguleringen skjer ved noen bestemte enzymer som aktiveres eller deaktiveres i disse punktene, Cdk/sykliner. De viktigste punktene ligger litt før starten på S-fase og ved inngangen i mitose. Når man bestråler tusenvis av celler som er fordelt over hele cellesyklus vil man noen timer etter bestrålingen oppleve at cellene samler seg opp i de punktene i cellesyklus hvor reguleringspunktene er. Dette kan vi måle ved hjelp av et såkalt flowcytometer. Denne oppgaven går ut på å tolke resultatene av et slikt forsøk.

I flowcytometeret sendes cellene enkeltvis forbi en laserstråle som kan eksitere fluorescerende stoffer. Cellene har på forhånd blitt farget med et fluorescerende stoff som binder seg spesifikt til DNA. Dette stoffet (propidium iodid, forkortet PI) eksiteres og sender ut igjen lys med en lengre bølgelengde enn det absorberte lyset. Dette registreres i en fotomultiplikator og lysstyrken måles for hver enkelt celle. Dermed får man et mål for DNA-mengden i hver enkelt celle. Siden DNA-mengden er konstant i G1-fase, øker igjennom S-fase og er konstant, men doblet i G2 og mitose kan man så angi mengden av celler i hver av cellesyklusfasene. Ved å sammenligne slike målinger med tilsvarende gjort på ubestrålte celler (kontroll) får man et bilde av hvordan bestrålingen påvirket cellesyklusarrest.

Et eksempel på et DNA-histogram er vist i figuren under.



Et DNA-histogram av en eksponensielt voksende cellepopulasjon av livmorkreftceller. Den høye toppen til venstre representerer celler i G1 (som alle har samme DNA-innhold) mens den lave toppen til høyre representerer celler i G2 (som også har samme DNA-innhold, men dobbelt så mye som G1-celle). Celler i S har en DNA-mengde som ligger mellom den til celler i G1 og den til celler i G2. Merk at celleantallet er høyere tidlig enn sent i S. Dette stemmer med formen på aldersfordelingen.

I det eksperimentet som studentene skal analysere inngår det 3 armer med celleflasker, 3 flasker med celler i hver arm, og det lages én flowcytometriprøve fra hver celleflaske. Det er mellom 0,5 og 1 million celler i hver flaske.

- a) Kontroll: 3 ubestrålte flasker
- b) 3 flasker som bestråles med 3 Gy røntgenstråling på 220 kV
- c) 3 flasker som bestråles med 6 Gy røntgenstråling på 220 kV

Bestrålingen ble gjort dagen før på morgenen. Etter 5,5 timer ble cellene løsnet fra flaskebunnene med trypsinering og cellene ble fiksert i sprit. De sto i sprit over natt. Studentene skal betrakte cellene i mikroskop før de er med på den videre preparering for flowcytometrimåling.

Før cellene farges med propidium iodid (PI) må alt RNA ødelegges siden PI ellers også vil binde seg til RNA. Vi ønsker en helt spesifikk binding til DNA for å måle kun DNA.

Studentene skal så være med på flowcytometrimålingene og vil deretter få tilgang til histogrammene med matematiske analyser av fasefordelingene elektronisk.

På grunnlag av resultatene skal studentene kunne uttale seg noe om hvor i cellesyklus cellene har sine reguleringspunkter hvor de kan velge å reparere DNA-skader.