

# Jurkatcellers følsomhet for høye temperaturer

En flowcytometriundersøkelse

**Solveig Andersen**

Master i lærerutdanning med realfag  
Oppgaven levert: Juni 2008  
Hovedveileder: Anders Carl G. Johnsson, PHYS  
Biveileder(e): Thor Bernt Melø, PHYS



# Forord

Denne masteroppgaven avslutter mitt studieløp ved den 5-årige lærerutdanningen i realfag, studieretning matematikk og fysikk, på Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet, NTNU. Oppgaven er på 30 studiepoeng og er innenfor feltet biofysikk.

Etter mange år som student er det godt å endelig levere fra seg masteroppgaven. Det har vært spennende å få lov til å bruke såpass lang tid på å sette seg inn i et tema, og jeg er godt fornøyd med oppgavevalget mitt. Det var flere grunner til at jeg valgte nettopp denne oppgaven; en av dem var at jeg synes forskningen på kreftceller er et meget viktig område innenfor medisinsk forskning, og da jeg med min fysikkbakgrunn fikk muligheten til å bidra på dette området måtte jeg gripe sjansen. I tillegg inneholdt denne oppgaven en del laboratoriearbeid innen cellebiologi, og siden studiet mitt så langt ikke har bestått av annet laboratoriearbeid enn fysikk var det artig å få lov til å lære noe nytt.

Jeg vil benytte anledningen til å takke mine til veiledere, Professor Anders Johnsson og Professor Thor Bernt Melø, for samarbeidet underveis. Jeg vil også rette en stor takk til min veileder og medhjelper på laboratoriet, Ingeniør Kristin Grendstad Sæterbø: uten deg hadde ikke denne oppgaven latt seg gjennomføre.

Til slutt vil jeg takke den personen som har stått meg nærmest gjennom hele oppgaven, og for så vidt gjennom de fire siste årene: min kjære samboer Bård Olav. Han har vært en trofast klagemur og god støtte, både på gode og mindre gode dager. Så Bård Olav: Tusen takk skal du ha!

# Forkortelser

Nedenfor er en liste over de mest brukte forkortelsene i oppgaven. Alle andre forkortelser er forklart etter hvert som de dukker opp i teksten.

<b>Forkortelse</b>	<b>Forklaring</b>
Annexin	Annexin-V-Fluos
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
FBS	Fetal Bovine Serum
FSC	Forward scatter
HSF	Heat Shock Factor
HSP	Heat Shock Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonucleic acid
SSC	Side scatter

# Sammendrag

Målet med denne oppgaven var blant annet å nærmere studere effekten av varmebehandling av cellene innenfor intervallet  $37 - 50^{\circ}\text{C}$ . Dette ble gjort ved å la cellene ligge 30 min i vannbad med den aktuelle temperaturen, ta ut 1ml celleduspensjon hvert 45.min, farge denne prøven med Annexin og PI, og deretter kjøre den i flowcytometeret. Siden alle cellene hadde et signal for begge disse fargestoffene kunne intensiteten til disse signalene plottes i dot-plot. Ut i fra dette dot-plottet kunne det avgjøres om cellene var viable, apoptotiske eller nekrotiske.

Resultatene viste at celler behandlet med vannbad med en temperatur på  $44-45^{\circ}\text{C}$  hadde en betydelig større andel celler i apoptose enn celler behandlet med andre temperaturer. De viste også at celler behandlet med vannbad med en temperatur på  $50^{\circ}\text{C}$  hadde en merkbart større andel celler i nekrose enn celler behandlet med lavere temperaturer.

I diskusjonen har jeg også sett på sammenhengen mellom kaspaser og andelen celler i apoptose og nekrose ved henholdsvis  $44 - 45^{\circ}\text{C}$  og  $50^{\circ}\text{C}$ . Der konkluderer jeg med at det er ulike signalveier bestående av proteiner som kan være en av årsakene til den høye apoptoseandelen ved  $44 - 45^{\circ}\text{C}$  siden disse signalveiene medvirker i overgangene mellom initatorkaspasene, effektorkaspasene og utførelseskaspasene.



# Innhold

<b>Forord</b>	<b>i</b>
<b>Forkortelser</b>	<b>ii</b>
<b>Sammendrag</b>	<b>iii</b>
<b>Innhold</b>	<b>v</b>
<b>1 Introduksjon</b>	<b>2</b>
<b>2 Teori og bakgrunn</b>	<b>3</b>
2.1 Cellesyklus . . . . .	3
2.2 Celledeling . . . . .	5
2.2.1 Doblingstid . . . . .	7
2.3 Kreftceller . . . . .	7
2.4 Celledød . . . . .	8
2.4.1 Apoptose . . . . .	8
2.4.2 Onkose . . . . .	11
2.4.3 Apoptose eller onkose? . . . . .	12
2.5 Varmesjokkproteiner (HSP) . . . . .	12
2.5.1 Introduksjon . . . . .	12
2.5.2 Hsp70-familien . . . . .	13
2.5.3 Kaspaser . . . . .	14
2.5.4 HSPer og reguleringen av apoptose . . . . .	15
2.6 Flowcytometeret . . . . .	16
<b>3 Materialer</b>	<b>18</b>
3.1 Jurkatcellelinjen . . . . .	18
3.2 Dyrkningsmedium . . . . .	18
3.3 Hepesbuffer . . . . .	18
3.4 Steril PBS . . . . .	19

3.5	PI-løsning . . . . .	19
3.6	Annexin-PI-løsning . . . . .	19
3.7	Instrumenter . . . . .	19
3.7.1	Flowcytometeret . . . . .	19
3.7.2	Andre instrumenter . . . . .	19
<b>4</b>	<b>Metoder</b>	<b>22</b>
4.1	Dyrkningsprosedyren . . . . .	22
4.2	Oppvarming av cellene . . . . .	22
4.3	Farging av cellene . . . . .	23
4.4	Analysering av cellene ved hjelp av flowcytometeret . . . . .	23
<b>5</b>	<b>Resultater</b>	<b>28</b>
5.1	Apoptose . . . . .	29
5.2	Nekrose . . . . .	34
5.3	Doblingstid . . . . .	38
<b>6</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>39</b>
6.1	Hvorfor Annexin og PI? . . . . .	39
6.2	Erfaringer . . . . .	39
6.3	Plassering av grenselinjene . . . . .	40
6.4	Tolkning av resultatene . . . . .	41
6.5	Feilkilder . . . . .	42
6.6	Forslag til videre arbeid . . . . .	43
	<b>Tillegg</b>	<b>44</b>
<b>A</b>	<b>Statistikk</b>	<b>44</b>
<b>B</b>	<b>Cellesyklus</b>	<b>45</b>
<b>C</b>	<b>Doblingstid</b>	<b>49</b>
<b>D</b>	<b>Materialer</b>	<b>52</b>
D.1	Dyrkningsmedium . . . . .	52
D.2	Hepesbuffer . . . . .	52
D.3	Steril PBS . . . . .	53
D.4	PI-løsning . . . . .	53
D.5	Annexin-PI-løsning . . . . .	53
<b>E</b>	<b>Metoder</b>	<b>54</b>
E.1	Dyrkningsprosedyren . . . . .	54



E.2 Farging av cellene . . . . .	55
<b>F Måledata</b>	<b>56</b>
<b>Bibliografi</b>	<b>78</b>

# Kapittel 1

## Introduksjon

På midten av 1980-tallet fant forskere ut at mange varmesjokkproteiner (HSP<sup>1</sup>) fungerte som molekylære "voktere" og dermed spilte en viktig rolle i sammenfoldingen av proteiner, intracellulær proteintrafikk og i prosesser der proteiner ble denaturert på grunn av varme eller andre former for stress. Følgelig har studier av stressproteinene hatt et voldsomt oppsving siden da.

Det er kjent at hurtig herding mot varme kan bli provosert frem av å la cellene få en kort eksponering av nesten-dødlige høye temperaturer, som igjen fører til en beskyttelse mot kommende og høyere temperaturer. [1]

I 2006 var det en masterstudent ved NTNU som skrev en oppgave om PDT-behandling av Jurkatceller. [2] 44°C- og 50°C-varmebehandling av cellene ble brukt for å fremkalle henholdsvis stor andel apoptose og nekrose hos cellene.

Målet med oppgaven var å nærmere studere effekten av varmebehandling av cellene innenfor intervallet 37 – 50°C, og også å finne et godt forsøksoppsett for å utføre varmebehandlingen. Det var også ønskelig å se om det var mulig å knytte disse resultatene opp mot teorien om at HSP'er er med på å styre apoptoseprosessen. Flowcytometrimålinger ble brukt for å skille viable, apoptotiske og nekrotiske celler siden flowcytometeret er meget effektivt til dette formålet.

---

<sup>1</sup>Heat Shock Protein

# Kapittel 2

## Teori og bakgrunn

### 2.1 Cellesyklus

Dette kapittelet er basert på [3] dersom ikke annet er nevnt i teksten.

Cellessyklusen består av fire faser: G1-fasen, S-fasen, G2-fasen (også kalt interfase) og M-fasen (se figur 2.1). M-fasen er igjen delt inn i to ulike prosesser: mitosen<sup>1</sup> og cytokinesen<sup>2</sup>. Aktiveringen av hver fase er avhengig av den foregående fasen. Celler som midlertidig har stoppet opp i celledelingsprosessen har gått inn i en "hvilefase" som kalles G0-fasen.

Den relativt korte M-fasen består av cellekjernedelingen og cytoplasmadelingen (cytokinesen). Etter denne fasen begynner hver enkelt dattercelle på interfase til en ny celle. Selv om de ulike stadiene i interfase ikke er skarpt avgrensede, inneholder hver enkelt fase i syklusen et avgrenset sett med biokjemiske prosesser som forbereder cellen på celledelingen.

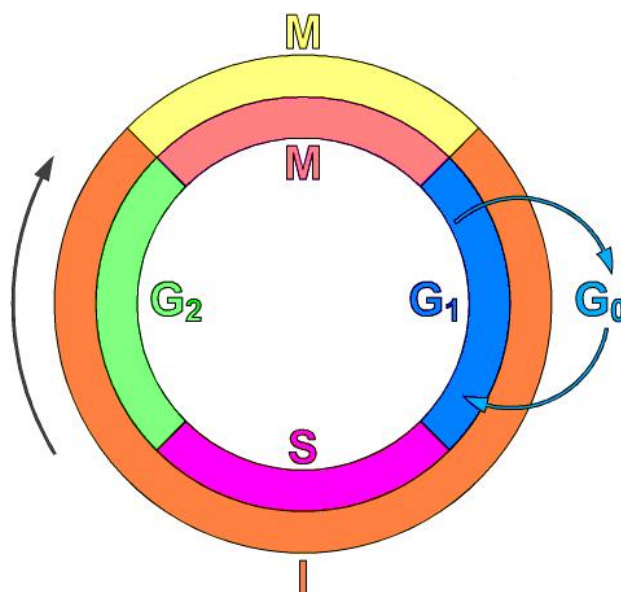
Den første fasen i interfase kalles G1. I løpet av denne fasen øker hastigheten på de biosyntetiske aktivitetene i cellen tilbake til det normale (etter å ha redusert tempoet betraktelig i løpet av M-fasen). Denne fasen markeres med syntesen av ulike enzymer som er nødvendige i S-fasen, og da spesielt de enzymene som er nødvendige for DNA-replikasjonen. Varigheten på G1-fasen varierer fra celle til celle.

Den påfølgende S-fasen starter når DNA-syntesen setter igang. Når S-fasen er ferdig har alle kromosomene kopiert seg. Det vil si at mengden DNA i cellen

---

<sup>1</sup>I mitosen deler cellens kromosomer seg mellom to datterceller.

<sup>2</sup>I cytokinesen deler cellens cytoplasma seg og danner to avgrensede celler.



Figur 2.1: Cellesyklusen. I: interfasen, M: mitosefasen, G0: hvilefasen, G1: "gap-1", G2: "gap-2", S: syntesefasen. [3]

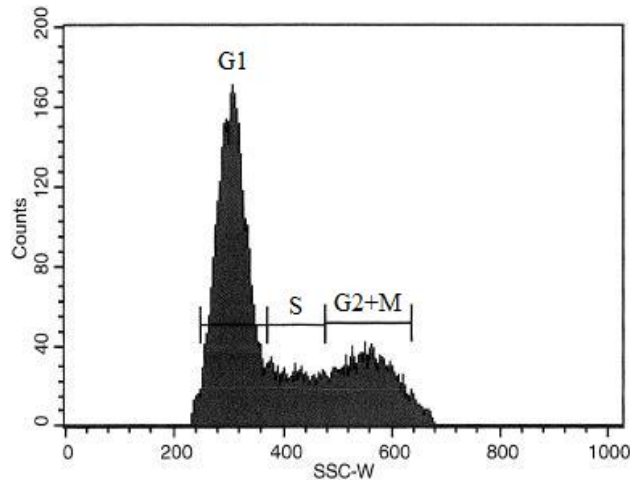
har doblett seg selv om cellen utad er uendret. Raten til RNA-transkripsjonen og proteinsyntesen er veldig lav i denne fasen. Varigheten til S-fasen er relativt konstant for celler av samme type.

Den neste fasen, G2-fasen, varer helt til cellen begynner på mitosen. Mange proteinsynteser skjer i løpet av denne fasen, og i stor grad involverer de produksjon av mikrotubulus, som igjen er nødvendig for mitoseprosessen. Hindring av proteinsyntesene i G2-fasen forhindrer at cellen kan gå i mitose.

Uttrykket "post-mitotisk" brukes ofte til å referere til både passive og aldrende celler. Ikke-formerbare celler i multicellulære organismer entrer gjerne G0-fasen fra G1-fasen og kan godt forbli passive der i lange perioder ad gangen. Cellulær alderdom er en tilstand som oppstår som en respons på skader på DNAet eller nedbrytning som fører til at en celledatter ikke blir levedyktige. Dette er gjerne et biokjemisk alternativ til apoptoseprosessen (se kapittel 2.4.1).

Ved hjelp av flowcytometri (se kapittel 2.6 og 4.4) kan vi få frem et DNA-histogram, som vi igjen kan bruke til å beregne cellesyklusen til cellene. Dette kan vi få til fordi alle celler som befinner seg i G1-fasen har like mye DNA og vil registreres på samme sted i histogrammet. På samme måte vil alle celler som befinner seg i G2- og M-fasen inneholde like mye DNA, tilsvarende det dobbelte av celler i G1-fasen, og disse vil da bli registrert som en topp i

histogrammet dobbelt så langt ute på x-aksen som G1-cellene. Denne toppen vil være mindre enn den første toppen, siden varigheten av G2-fasen er kortere enn G1-fasen. Mellom disse to toppene finner vi de cellene som befinner seg i S-fasen. Se figur 2.2. Arealet under grafen kan brukes til å bestemme antallet celler i hver fase. [4]



Figur 2.2: Fordelingen av DNA gjennom cellyklus. Dette histogrammet viser DNA-fordelingen til Jurkatcellene i april 2008.

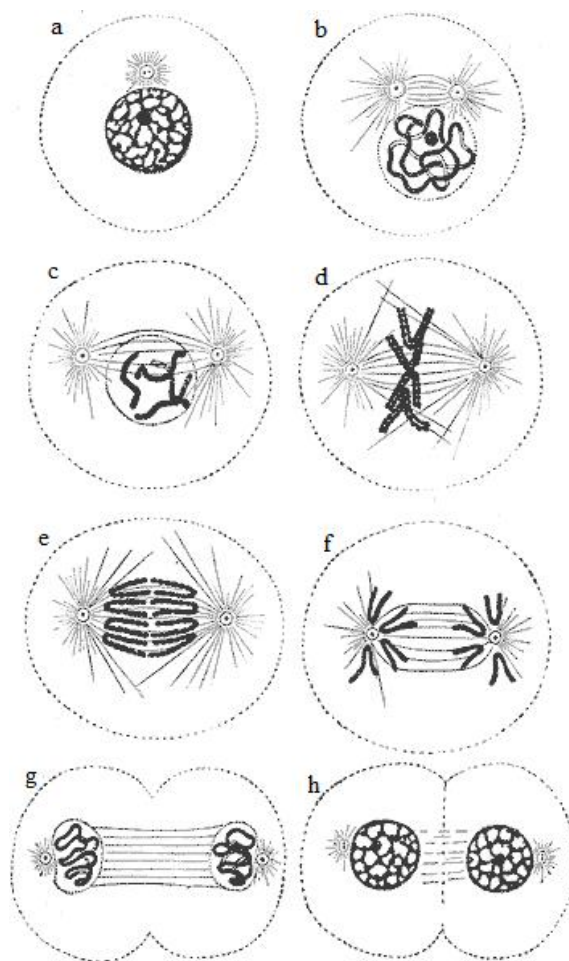
I vårt tilfelle (figur 2.2) ble fasevarighetene beregnet til å være 15 t og 54 min for G1-fasen, 5 t og 6 min for S-fasen, og 9 t og 0 min for G2- og M-fasen tilsammen. Se Tillegg B for utregning.

## 2.2 Celledeling

Dette kapitlet er basert på [5] dersom ikke annet er nevnt i teksten.

Den mitotiske fasen er en relativt kort periode av cellyklusen. Resten av cellyklusen består av interfasen der cellen forbereder seg selv på celledelingen. Interfasen deles inn i tre deler: G1, S og G2. I løpet av alle disse tre fasene vokser cellen ved å produsere proteiner og organeller. Det er bare i S-fasen at kromosomene replikerer seg. Kort oppsummert kan vi si at cellen vokser i G1-fasen, den vokser videre og replikerer kromosomene i S-fasen, og den vokser enda mer og forbereder seg på mitosen i G2-fasen.

Normalt sett er det genetiske materialet i cellekjernen samlet i en løst sammensatt "klump", kalt kromatin. Når profasen igangsettes, samler kromatinet



Figur 2.3: a: interfase, b: profase, c: prometafase, d: metafase, e og f: anafase, g: telofase, h: cytokinese. Figuren er hentet fra [6].

seg i oppstilte strukturer, kalt kromosomer. Siden det genetiske materialet allerede er replikert (i S-fasen), består hvert kromosom av to søster-kromatider som er bundet sammen på midten.

I nærheten av cellekjernen er det to sentrosomer. Hvert sentrosom fungerer som et koordinasjonssenter for cellens mikrotubulus. De to sentrosomene samler sammen mikrotubulusene før de, ved hjelp av molekulære motorproteiner, blir dyttet til motstående sider av cellekjernen. Deretter løser cellekjernemembranen seg opp, og mikrotubulusen kan spre seg inn i cellekjerneoområdet.

Når spindeltrådene til mikrotubulusen har vokst seg lange nok vil disse feste

seg til midten av hvert sitt kromosom, det vil si der hvor de to søster-kromatidene er festet sammen. Kromosomene samler seg nå på en rekke på midten av cellen, også kalt ekvatorialplanet. Nå fester resten av mikrotubulustrådene seg, slik at hvert kromosom har mange tråder festet til sitt midtpunkt.

Deretter skjer det to ting: proteinet som binder de to søster-kromatidene sammen splittes slik at de kan separeres til to kromosomer, og de blir ført mot hver sitt sentrosom ved hjelp av mikrotubulustrådene. Deretter blir sentrosomene og det tilhørende kromosomet ført mot ytterkanten av cellen, slik at de to tidligere søster-kromatidene er på motstående sider av cellen. Til slutt har alt det genetiske materialet i cellen delt seg inn i to identiske grupper.

Telofasen er en reversering av profasen og prometafasen. Kort sagt kan man si at telofasen rydder opp etter mitosen. I denne fasen fortsetter mikrotubulusen å vokse og cellen forlenges. Korresponderende søster-kromosomer fester seg til motstående sider av cellene og en ny cellekjernemembran dannes rundt hver av de to kromosomansamlingene. Kromosomene omvandles nå videre til kromatin og mitosen er vel overstått.

Cytokinesen blir ofte feilaktig tatt for å være den avsluttende delen av telofasen, men cytokinesen er heller en egen separat prosess som begynner samtidig som telofasen. Egentlig er ikke cytokinesen en del av mitosen i det hele tatt, men er nødvendig for å avslutte celledelingen. Cytokinesen sørger for at cellen deler seg i to ved det ekvatoriale planet og "lukker" cellemembranen på begge de to nye cellene. Avslutningen av cytokinesen markerer slutten på M-fasen.

### 2.2.1 Doblingstid

Doblingstiden til en cellekultur er den tiden det tar før antallet celler i cellekulturen har doblet seg i antall. I forbindelse med denne oppgaven ble det gjennomført to uavhengige tellinger av cellene for å regne ut doblingstiden; en i 2007 og en i 2008. Se kapittel 5.3.

## 2.3 Krefceller

For å holde antall celler i kroppen i balanse er cellene utstyrt med en mekanisme som gjør at de dør etter å ha delt seg et visst antall ganger (vanligvis mellom 60 og 100 ganger). Denne mekanismen er knyttet til telomeren, og sitter

ytterst på alle kromosomene i DNAet. Den er en spesiell DNA-sekvens som er repetert mange ganger, og hver gang cellen deler seg, forsvinner litt av telomeren. Når cellen har delt seg så mange ganger at det ikke er mer igjen av telomeren, dør cellen.

Dessverre, i alle fall i denne sammenhengen, finnes det et molekyl som forhindrer at deler av telomeren forsvinner når cellen deler seg, og hele telomeren kopieres dermed over til dattercellene. Dette molekylet heter telomerase, og er årsaken til kreftcellenes udødelighet.

Kroppen lager telomerase av seg selv, men produksjonen stopper opp omtrent når vi blir født. Kreftcellene har imidlertid funnet en måte å reaktivere denne produksjonen på. [7]

## 2.4 Celledød

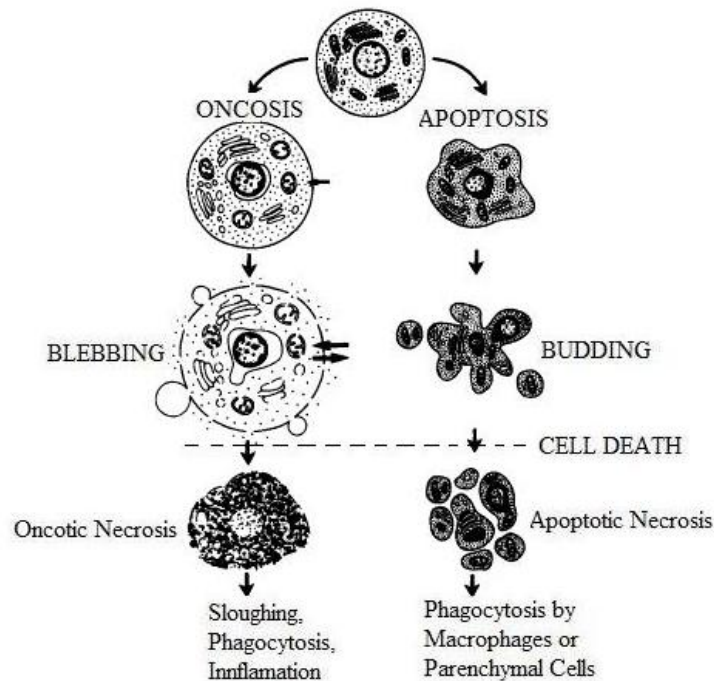
Det finnes flere typer celledød, men i denne oppgaven vil jeg kun fokusere på to av dem: *apoptose* og *onkose*. Begge disse formene for celledød fører til *nekrose*, henholdsvis *apoptotisk nekrose* og *onkotisk nekrose*. Tidligere har nekrose blitt brukt i betydningen ”det motsatte av apoptose”, men ettersom kunnskapene om feltet har økt, har det blitt nødvendig å endre på dette til de ovenfor nevnte betegnelse. [8] For å holde meg til den nye terminologien har jeg derfor brukt disse begrepene i dette kapitlet om celledød, men fordi dette fremdeles kan være uvante begreper for ikke-spesialister, har jeg, i hele resten av oppgaven, valgt å bruke begrepet apoptose om hele apoptoseprosessen (inkludert den apoptotiske nekrosen), og begrepet nekrose om onkoseprosessen (inkludert den onkotiske nekrosen).

Arbeidet på celledød-feltet er intenst, og med tiden regner jeg med at det vil komme en endelig avklaring på terminologibruken, men enn så lenge så forholder jeg meg slik som jeg har forklart i avsnittet over.

### 2.4.1 Apoptose

Apoptose er en type celledød som blant annet hjelper kroppen til å kvitte seg med uønskede celler på en måte som er mest mulig skånsom for de gjenværende cellene. Denne typen celledød blir også gjerne kalt ”celledød ved selvmord” eller programmert celledød. Dette kalles den fordi cellen som regel går i apoptose på grunn av en forhåndprogrammering i cellen og ikke som et resultat av en ytre påvirkning, noe som gjerne er tilfellet ved onkose. Cellene





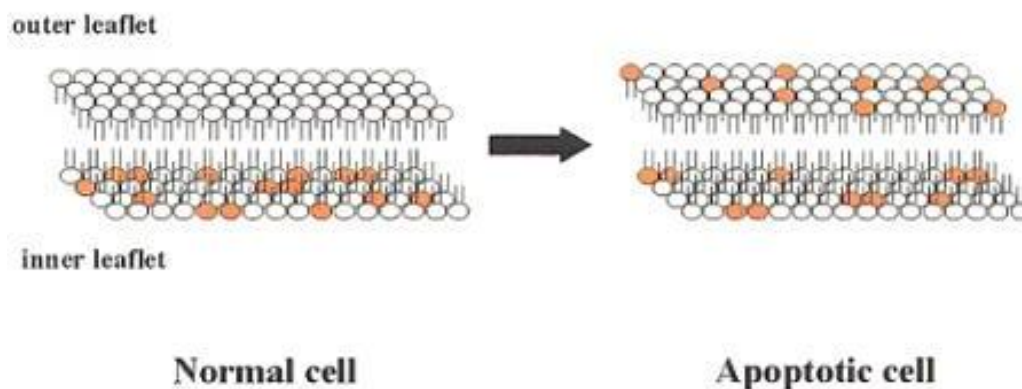
Figur 2.4: To veier som begge fører til nekrose. Øverst er en normal celle. Ved onkose sveller først cellen, deretter oppstår "blebbing", og til slutt skjer den nekrotiske endringen med koagulering, krymping og karyolyse. Ved apoptose krymper først cellen, deretter oppstår "budding", og til slutt skjer den nekrotiske endringen med oppdelingen av apoptotiske deler i grupper. [8]

aktiverer et intracellulært dødsprogram som dreper cellen på en kontrollert måte. Cellen krymper og blir raskt absorbert av omkringliggende celler. Ved apoptose dør cellen med intakt cellemembran og forsvinner uten å etterlate spor. [9]

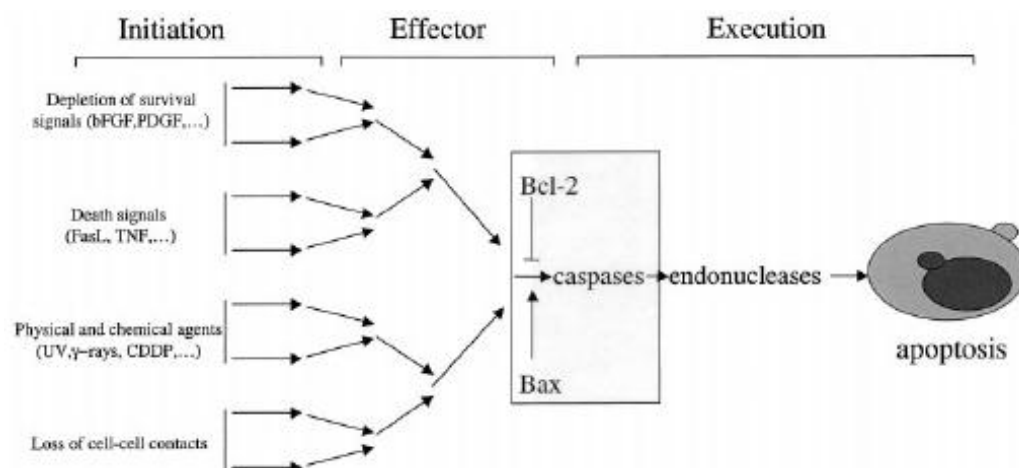
En av de første forandringene i en apoptotisk prosess er flyttingen av negativt ladet fosfatidylserin fra den indre til den ytre overflaten av cellemembranen. Her hjelper molekylet til med å markere overflaten slik at den døende cellen raskt blir gjenkjent og absorbert av omkringliggende celler. [8]

Cellene kan gå i apoptose som et resultat av flere ulike stimuli, og de kan følge ulike veier som kan variere i både involverte substrater og tidsperspektiv. Likevel kan disse veiene som leder til apoptose generelt sett deles inn i tre faser: innledningsfasen, effektorfasen og utførelsesfasen.<sup>3</sup> [11]

<sup>3</sup>Fritt oversatt til norsk.



Figur 2.5: Her er det illustrert hvordan fosfatidylserinet flytter seg fra den indre til den ytre cellemembranen i apoptotiske celler. [10]



Figur 2.6: Her er det illustrert de tre ulike fasene som leder til apoptose. bFGF: grunnleggende fibroblasisk vekstfaktor, PDGF: blodplateutledet vekstfaktor, TNF: tumor nekrosefaktor, FasL: medlem av TNF-familien, CDDP: cisplatin. [11]

Innledningsfasen inkluderer vanligvis kaskadisk aktiviering av enzymer kalt kaspaseinitiatorer (Caspases-2, -8, -9 og -10) og/eller andre pro- eller anti-apoptotiske faktorer som er tilstede i cytosolen. I effektorfasen summeres signalene fra innledningsfasen og avgjørelsen om cellen skal dø ved hjelp av apoptose tas her. Bcl-2<sup>4</sup> er et onkogen som ser ut til å sammenfalle med apoptoseprosessen, og mengden Bcl-2 i forhold til Bax-proteinmengden kan være

<sup>4</sup>B-cell leukemia/lymphoma 2

avgjørende for om cellene fortsetter videre til utførelsesfasen. I utførelsesfasen starter nedbrytningen av cellen, inkludert fordøyingen av proteiner og spaltningen av DNA. Effektorkaspasene spiller en viktig rolle i dette, og fasen er mest sannsynlig ATP-avhengig. Det er tidlig i denne fasen at fosfatidylserinet flytter seg til den ytre membranen (se fig 2.5). [11]

## 2.4.2 Onkose

Onkose fører til destruksjon av cellemembranen og en sekundær inflammatorisk reaksjon. Celler som dør som en følge av ytre påvirkning dør gjerne i en ukontrollert prosess: de sveller opp og sprekker. Dette resulterer i at cytosolen spres i det omkringliggende cellevevet og dette fører til en ødeleggende inflammasjon. Selv om onkose gjerne kalles tilfeldig celledød så er det mye som tyder på at denne også er genetisk programmert. [12] Det er også ting som tyder på at onkose i noen tilfeller kan være den foretrukne immune responsen, for eksempel når den immune responsen som trengs må være ekstra kraftig. [13]

Onkose kan oppsummeres på følgende måte: Onkose er en form for celledød som gjenkjennes av at cellen og organellene øker i volum, "blebbing" og økt membranpermeabilitet. Onkose skyldes en feil i ionepumpene til plasmamembranen og onkoseprosessen går over til nekrose innen 24 timer. Onkose fører også til at DNAet brytes ned til uspesifikke fasonger. [8]

De veiene som fører til onkose kan deles inn i de samme tre fasene som ved apoptose. Dette er naturlig siden onkose kan oppstå som et resultat av mange forskjellige stimuli, og mange av disse stimuliene kan føre til både onkose og apoptose. Det er derfor naturlig å anta at det er i en av de tre fasene at avgjørelsen om hvordan cellen skal dø tas. [14]

Dersom vi tar utgangspunkt i at onkoseprosessen kan deles inn i tre faser, er det naturlig å anta at innledningsfasen og effektorfasen forløper på nesten tilsvarende måte som ved apoptoseprosessen. [15] I den siste fasen, utførelsesfasen, er det derimot mer usikkert hva som skjer. Noen mener at den kalsiumavhengige calpainfamilien spiller en rolle i nedbrytningsprosessen på samme måte som Kaspasene. Siden mitokondriene inneholder  $Ca^{2+}$  er det mulig at åpningen av mitokondriske porer kan aktivere noen av calpainene. Andre typiske onkotiske steg som kanskje opptrer i utførelsesfasen inkluderer økt mengde av intracellulær ATP; et steg som enten kan være en grunn til at celler går i onkose, det kan være et resultat av onkose, eller muligens begge to. Steget inkluderer også åpningen av ionekanaler i plasmamembranen og

muligens også brudd i denne. [16]

### 2.4.3 Apoptose eller onkose?

Som jeg har nevnt tidligere kan samme typen skade føre til både apoptose og onkose, og utfordringen blir å finne svar på hvorfor det ene skjer fremfor det andre. Vi vet at styrken/størrelsen på skaden som påføres cellen, samt celletypen, tidspunkt i cellyklusen, metabolistisk status osv, er med på å bestemme utfallet. Dermed kan vi trekke den konklusjonen at det ikke først og fremst er typen skade, men heller graden av skade som er avgjørende. [15] En kan se for seg en skala der celler som blir utsatt for skader av mindre omfang overlever, celler utsatt for skader av medium omfang går i apoptose, og celler utsatt for skader av stort omfang går i onkose.

Man har tidligere antatt at apoptose og onkose har vært to typer celledød som utelukker hverandre, og at det er mekanismer i prosessene som utelukker den ene eller andre typen celledød. [16] Nå vet man imidlertid at typen celledød kan endres ved å endre mengden ATP i cellen. [15]

Kunnskapene om apoptose og onkose blir stadig større, og vi vet nå at disse to typene celledød bare er ytterpunktene i en spektrum av mange forskjellige typer celledød. [13] Hvordan den ene prosessen blir "valgt" fremfor den andre er kompleks, og jeg har forsøkt å gi leseren et lite innblikk i denne kompleksiteten.

## 2.5 Varmesjokkproteiner (HSP)

### 2.5.1 Introduksjon

Varmesjokkproteiner (HSP<sup>5</sup>), også kalt stressproteiner, er en gruppe proteiner som er tilstede i alle celler. Produksjonen av HSP øker når en celle blir utsatt for en form stress, enten i form av unaturlig varme, infeksjoner, betennelser, giftstoffer, sulteforing, oksygenmangel eller vannmangel. Denne produksjonsøkningen er i hovedsak regulert av varmesjokkfaktorer (HSF<sup>6</sup>). [17] HSP er også tilstede i celler som ikke er utsatt for stress, de fungerer da som "voktere" og passer på at cellens proteiner er i riktig stand på riktig sted

---

<sup>5</sup>Heat Shock Protein

<sup>6</sup>Heat Shock Factor

til riktig tid. Man tror også at HSP spiller en rolle i presentasjonen av peptider på cellens overflate, der de hjelper immunsystemet med å gjenkjenne syke celler. [1]

HSP blir navngitt etter deres molekylvekt. For eksempel vil Hsp60, Hsp70 og Hsp90 (de tre mest studerte HSPene) referere til proteiner i henholdsvis størrelsesordenen 60, 70 og 90 kDa<sup>7</sup>. [17]

Forskere har ennå ikke funnet ut nøyaktig hvordan varmesjokk (eller andre former for stress) aktiverer HSF, men noen studier foreslår at en økning i ødelagte eller unormale proteiner fører til en aktivering av HSP. [17]

Tidligere har kreftforskere kommet frem til at dyr muligens responderer på ”kreftvaksiner”. Forsøk ble gjennomført der kreftcellene ble svekket og injisert i små mengder inn i en gnager (rotte, mus e.l.), noe som førte til at gnageren ble immun mot fremtidige injeksjoner av kreftceller med full styrke. Resultatene er ennå ikke testet på mennesker, men det er mulig at resultatene for gnagerne er overførbare til andre arter. [17]

Med utgangspunkt i disse forsøkene, begynte forskere å undersøke om også HSP kunne brukes i behandlingen av kreft. Det ble spekulert i om HSPer kunne være involvert i bindingen av proteinfragmenter fra døde ondartede celler, som siden kunne presenteres for immunforsvaret. På denne måten kunne forsøksdyrene bli utsatt for små mengder svekkede kreftceller, på lik linje med tidligere forsøk. [1] Først mange år etter at de første forsøkene på gnagerer ble utført, ble det oppdaget at det var HSP som beskyttet de immune gnagerne mot kreftcellene. [17]

## 2.5.2 Hsp70-familien

Medlemmer av Hsp70-familien fremstår som de mest robuste av alle HSPene. Disse proteinene sørger for den koordinerte reguleringen av proteintransporten, proteinimporten og proteinsammenbrettingen. De regulerer også begrensningen av cellulære ødeleggelser som følge av stress ved hjelp av deres evne til å forhindre opphopningen av proteiner, og gjenoppretter funksjonene til denaturerte proteiner. [19]

Den første kjente beskyttende evnen til HSPene ble kjent da celler, etter å ha blitt utsatt for en liten temperaturøkning, ble mindre følsomme for en

---

<sup>7</sup>kDa = kiloDalton.  $1\text{Da} = \frac{1}{1000N_A}kg$ , der  $N_A$  er Avogadros tall ( $= 6,02214179 \times 10^{-23} \text{mol}^{-1}$ ). [18]

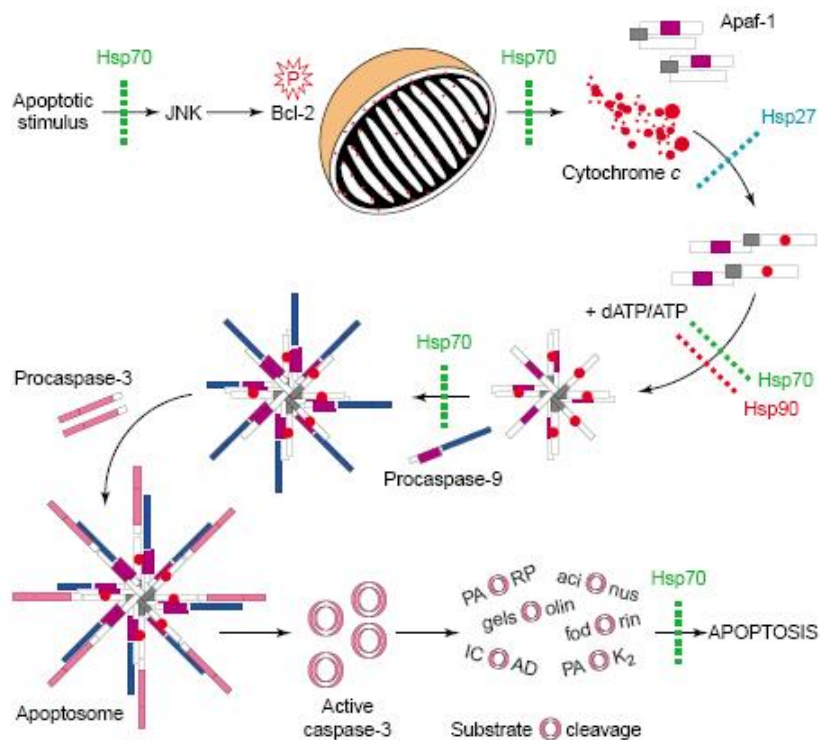
påfølgende større, og normalt dødelig, temperaturøkning. Denne varmetoleransen ble direkte knyttet opp mot det økte nivået av HSP, og da spesielt til medlemmer av Hsp70-familien. [20] Temperaturtolerante celler viste også en evne til å motsette seg apoptose, og dette ble også knyttet opp mot det økte nivået av Hsp70. [19]

Mange studier utført på pattedyrceller har vist at den beskyttende effekten fra Hsp70, i alle fall delvis, er direkte medvirkende i cellens evne til å undertrykke apoptoseprosessen. Dessverre er det fremdeles ukjent nøyaktig hvordan denne effekten oppstår. [21]

### 2.5.3 Kaspaser

Apoptoseprosessen reguleres av en rekke kaspaser. Kaspaser er syntetisert som inaktive molekyler som må aktiviseres av en delingsprosess for at de skal delta i aktiv protease. Grovt sett kan de deles inn i initiatorkaspaser og effektorkaspaser. Initiatorkaspaser, for eksempel kaspase-9, har store områder der det foregår protein-protein-interaksjon. Når spesielle adaptor-molekyler binder seg til disse områdene fører dette til en aktivering av kaspasen, og det dannes et fullt utviklet enzym. Effektorkaspasene, som inkluderer kaspase-3, bearbeides av initiatorkaspasene ved at disse deler effektorkaspasene slik at de kan inngå i det aktive enzymet. Disse effektorkaspasene kan deretter dele proteinsubstrater og på den måten sette igang de cellulære endringene som forbindes med apoptoseprosessen. [19]

Kaspaseaktiveringen inkluderer blant annet dannelsen av "apoptosomet" (se figur 2.7). Apoptosomet består av mange proteiner som er viktige for kaspaseaktiveringen, inkludert "apoptotisk protease-aktiverende faktor 1" (Apaf-1), cytokrom c og prokaspase-9. Tidligere studier har funnet at en rekke hendelser må inntreffe for at det skal dannes et fullt ut funksjonelt apoptosom og for at aktiveringen av kaspasene skal igangsettes. Når cytokrom c frigjøres fra mitokondriet binder det seg til Apaf-1, en hendelse som, ved hjelp av dATP/ATP, fører til at Apaf-1-molekylene danner oligomerer. [22] Dette oligomeret er i stand til å binde seg til prokaspase-9, som igjen autoaktiveres og binder seg til, og deler opp, prokaspase-3. Videre vet vi ikke om den aktive kaspase-3 nå frigjøres fra apoptosomet for å kunne dele opp sitt målsubstrat, eller om det fortsetter å fungere som en del av apoptosomet. [19]



Figur 2.7: Apoptotiske signaler, inkludert Jun N-terminal kinase-signalisering (JNK-signalisering) og aktiviteten til medlemmer av Bcl-2-protein-familien, fanges opp i mitokondrien og fører til frigjøringen av cytokrom c. Cytokrom c binder seg til Apaf-1 og, ved hjelp av dATP/ATP, fremkaller oligomeriseringen av Apaf-1. Apaf-1-komplekset binder nå seg til prokaspase-9 og setter i gang aktivering, rekruttering og splitting av prokaspase-3. Aktiv prokaspase-3 er nå istand til å splitte sine målsubstrater og induere apoptose. [19]

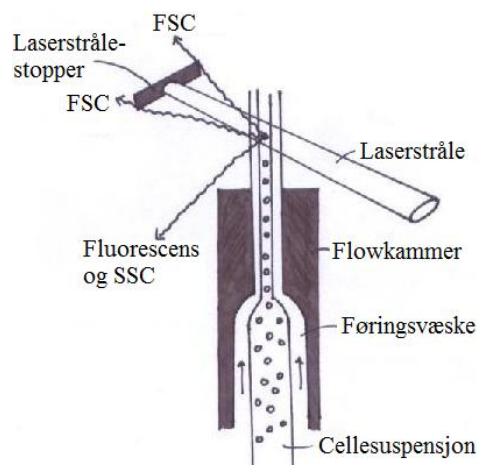
#### 2.5.4 HSPer og reguleringen av apoptose

Den første oppdagelsen av at Hsp70-medvirkningen til undertrykkelsen av apoptoseprosessen hang sammen med hindringen av kaspaseprosessen definerte ikke en nøyaktig mekanisme for disse hindrende effektene. Derimot har senere studier sett nærmere på denne sammenhengen, og resultatene indikerer at Hsp70 er i stand til å undertrykke kaspaseaktiveringen etter at cytokrom c er frigjort fra mitokondriet. H. M. Beere og D. R. Green går i sin artikkel foreslår at kanskje HSPene individuelt er med på å regulere de formmessige endringene som fører til oligomeriseringen av Apaf-1 og rekrutteringen av prokaspase-9. [19]

Mye av de eksisterende undersøkelsene som er gjennomført ser ut til å konkludere med at Hsp70 fungerer på en slik måte at den undertrykker apoptosen innad i den mitokondriske veien til celledøden, og da spesielt på apoptosomnivå. Dette blir også understøttet av undersøkelser som viser at Fas<sup>8</sup>-indusert apoptose, som kan fortsette uavhengig av innblanding fra mitokondriene, ikke blir påvirket av en unormalt stor fremstilling av Hsp70. På den annen side, det å hindre frigjøringen av cytokrom c fra celler utsatt for stress ser ut til å være en effektiv strategi for å oppnå cellulær overlevelse, så det er tydelig at noen av HSPene blander seg inn på dette nivået også. [19]

## 2.6 Flowcytometeret

Et flowcytometer er, kort fortalt, et instrument som kan brukes til å måle egenskapene til enkeltceller ved at cellene er lokalisert i en væske som strømmer gjennom cytometerets kapillær. [23]



Figur 2.8: Flowkammeret. Enkeltceller i suspensjonen omsluttet av føringsvæske går gjennom en dyse og belyses med en laserstråle.

Når en celleprøve skal analyseres plasseres suspensjonen i en slik posisjon at cytometeret kan suge opp litt av det og føre det gjennom et kammer. Suspensjonen blir sentrert i kammeret ved hjelp av en føringsvæske før den blir belyst med en laserstråle. Cellene passerer laserstrålen en etter en i et kapillær (dersom flere celler passerer laserstrålen samtidig, fører det til misvisende resultater). Se figur 2.8.

<sup>8</sup>En dødsreseptor



Når cellene blir belyst av laserstrålen, blir lyset enten transmittert, spredt, eller absorbert. Intensiteten til det spredte lyset er avhengig av både cellens egenskaper og vinkelen mellom innkommende og spredt stråle. Ved hjelp av cytometeret er det mulig å måle det spredte lyset både i en liten vinkel i forhold til den innkommende strålen ("forward scatter", heretter forkortet "FSC"), og i en retning vinkelrett på den innkommende strålen ("side scatter", heretter kalt "SSC").

Det absorberte lyset kan indusere fluorescens, og det er vanlig at fluorescerende lys måles vinkelrett på den innkommende strålen, det vil si ved hjelp av SSC. Lyset blir deretter delt inn i ulike bølgelengdeintervaller ved hjelp av dikroiske speil, og intensiteten til de ulike bølgelengdene kan måles. [24] Nærmere spesifikasjoner gis i kapittel 3.7.1.

For å få brukbare resultater ved hjelp av flowcytometeret er det er fordel å farge cellene først. Fluorescerende fargestoffer kan markere spesielle egenskaper eller deler av cellen, og ulike fargestoffer brukes alt etter som hva man vil studere. Blant annet finnes det fargestoffer for å måle DNA-innholdet i cellene, for å markere kaspaseaktiviteten i apoptotiske celler, eksponering for fosfatidylserin i apoptotiske<sup>9</sup> og onkotiske<sup>10</sup> celler, samt DNA i onkotiske<sup>11</sup> og nekrotiske<sup>12</sup> celler. [24]

I våre eksperimenter brukte vi fargestoffene Annexin-V-Fluos (Annexin) og Propidiumiodid (PI). Alle cellene har et signal for begge disse fargestoffene, og intensiteten til disse signalene ble plottet i såkalte dot-plot. Frekvensen til celler med spesielle egenskaper kan også presenteres i histogrammer (se kapittel 4.4).

---

<sup>9</sup>Her er ordet "apoptotiske" brukt i den betydningen som er definert i kapittel 2.4

<sup>10</sup>Her er ordet "onkotiske" brukt i den betydningen som er definert i kapittel 2.4

<sup>11</sup>Her er ordet "onkotiske" brukt i den betydningen som er definert i kapittel 2.4

<sup>12</sup>Her er ordet "nekrotiske" brukt i den betydningen som er definert i kapittel 2.4

# Kapittel 3

## Materialer

### 3.1 Jurkatcellelinjen

Den Jurkatcellelinjen som vi har brukt i våre eksperimenter stammer fra blodet til en 14 år gammel gutt som hadde akutt T-celle leukemi, og cellelinjen startet i 1976. Cellelinjen er en endret cellelinje med tilnavnet klone E6-1. Cellelinjen er klonet av Dr. Kendall Smith (Cornell University's Weill Medical College og Graduate School of Biomedical Sciences) og er uten mykoplasma. [25]

### 3.2 Dyrkningsmedium

Som dyrkningsmedium bruker vi RPMI-1640 tilsatt FBS<sup>1</sup>, L-glutamin, natriumpyruvat og gentamicin. [26] For en nærmere beskrivelse av innholdet, se Tillegg D.1.

### 3.3 Hepesbuffer

Hepesbufferen ble laget klar ved begynnelsen av prøveperioden og inneholdt: Elix-H<sub>2</sub>O, Hepes, NaCl, HCl, NaOH og CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O. [27] For en nærmere beskrivelse av innholdet, se Tillegg D.2.

---

<sup>1</sup>Fetal Bovine Serum

## 3.4 Steril PBS

PBS<sup>2</sup> ble laget etter interne prosedyrer ved instituttet og inneholdt Elix-H<sub>2</sub>O og PBS-tabletter. [26] For en nærmere beskrivelse av innholdet, se Tillegg D.3.

## 3.5 PI-løsning

PI-løsningen ble laget etter interne prosedyrer ved instituttet og inneholdt Hepesbuffer og PI. [28] For en nærmere beskrivelse av innholdet, se Tillegg D.4.

## 3.6 Annexin-PI-løsning

Annexin-PI-løsningen ble laget etter interne prosedyrer ved instituttet og inneholdt Hepesbuffer, Annexin og PI. Løsningen ble fordelt i 10 rør á 10 $\mu$ l og fryst ned. [28] For en nærmere beskrivelse av innholdet, se Tillegg D.5.

## 3.7 Instrumenter

### 3.7.1 Flowcytometeret

Flowcytometeret som ble brukt var av typen BD LSR, serienummer H0028. Flowcytometeret ble kjøpt inn av NTNU i april 2000. Figur 3.1 viser en tegning av plasseringen til speil og filter i flowcytometeret, og må sees i sammenheng med tabell 3.1. Figur 3.2 viser hvordan det fluorescerende lyset kan bevege seg mellom de ulike speilene.

### 3.7.2 Andre instrumenter

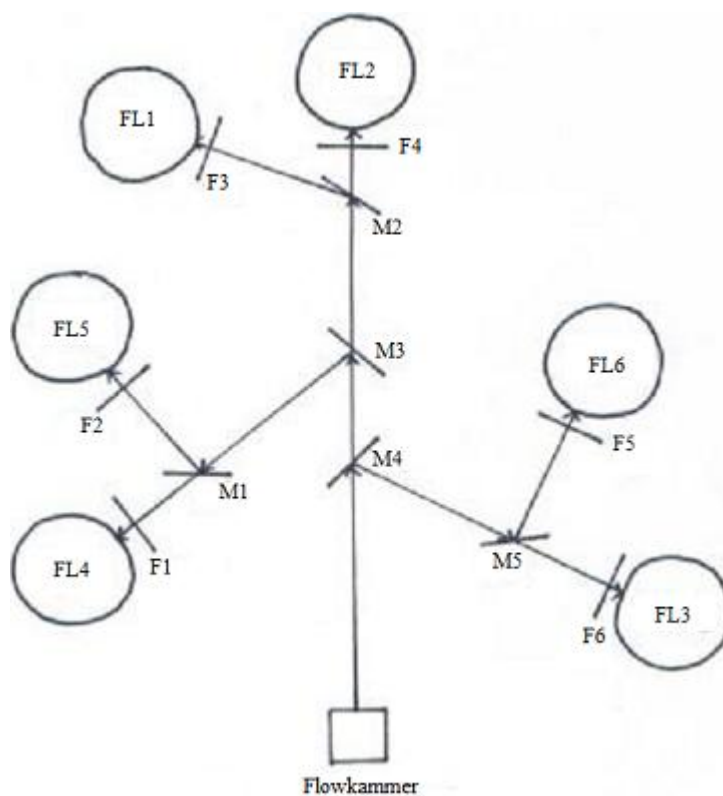
I tillegg til flowcytometeret ble følgende instrumenter brukt underveis: inkubatorskap (for spesifikasjoner, se kapittel 4.1), 3 stk vannbad og 2 stk sentrifuger.

---

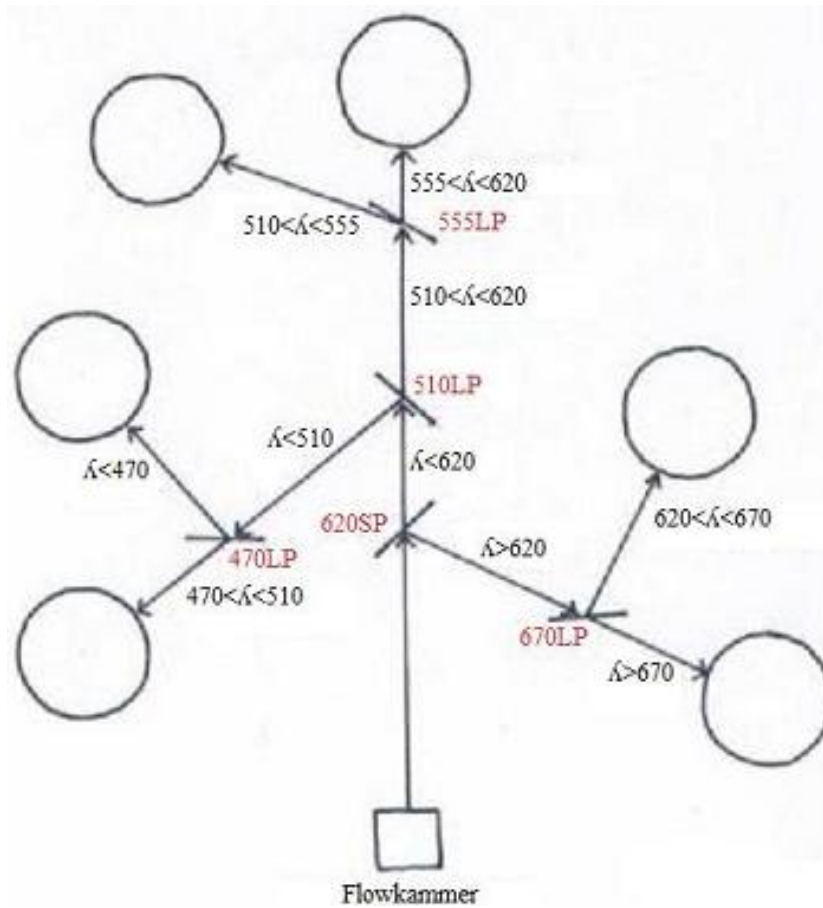
<sup>2</sup>Phosphate Buffered Saline

Navn i figur 3.1	Navn på speil/filter	Transmittert bølglengde
M1	470DRLP	$\lambda > 470\text{nm}$
M2	555DRLP	$\lambda > 555\text{nm}$
M3	510DRLP	$\lambda > 510\text{nm}$
M4	620DCSP	$\lambda < 620\text{nm}$
M5	670DRLP	$\lambda > 670\text{nm}$
F1	510DF20	$490\text{nm} < \lambda < 530\text{nm}$
F2	380ABLP	$380\text{nm} < \lambda$
F3	530BP28	$502\text{nm} < \lambda < 558\text{nm}$
F4	575BP26	$549\text{nm} < \lambda < 601\text{nm}$
F5	660DP13	$547\text{nm} < \lambda < 673\text{nm}$
F6	670AGLP	$670\text{nm} < \lambda$

Tabell 3.1: Spesifikasjoner for speil og filter i flowcytometeret



Figur 3.1: Spesifikasjoner for speil og filter i flowcytometeret, samt plasseringen av disse.

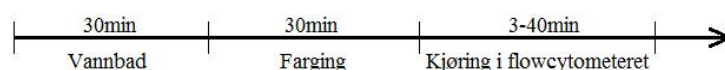


Figur 3.2: Det fluorescerende lyset emitteres fra flowkammeret og blir, avhengig av bølgelengden, enten transmittert eller reflektert av diokroiske speil. Bølgelengden er oppgitt i nm. SP og LP er henholdsvis "short pass" og "long pass".

# Kapittel 4

## Metoder

Figur 4.1 gir en kort oversikt over tidsforløpet og forsøksprosedyren. Hvert enkelt steg i prosedyren blir nærmere beskrevet i resten av kapittelet.



Figur 4.1: Tidslinje med oversikt over hvor lang tid hvert trinn i forsøksprosessen tok. Hvor lang tid kjøringen av prøvene i flowcytometeret tok var avhengig av hvor mange parallelle prøve som skulle kjøres samtidig.

### 4.1 Dyrkningsprosedyren

Cellene ble til enhver tid oppbevart i dyrkningsmediumet, og de ble holdt i eksponentiell vekst. Dette ble gjort ved å omsette cellene på mandager og fredager, samt tilsette ekstra medium på onsdager. Disse prosedyrene er nærmere beskrevet i Tillegg E.1. Resten av tiden ble cellene oppbevart i et Queue inkubatorskap med 5% CO<sub>2</sub> atmosfære, en temperatur på 37°C, samt luft mettet med vanddamp. [25]

### 4.2 Oppvarming av cellene

Cellene ble fordelt i 25cm<sup>2</sup> dyrkningsflasker slik at hver flaske inneholdt 10ml celleduspensjon. Det ble kjørt to paralleller av hver temperatur hver gang.

Før cellene ble lagt i vannbad ble lokkene dekket med parafilm for å hindre at vann trakk inn i flasken. Dyrkningsflaskene ble deretter lagt i vannbad i 30min. Etter vannbadet ble parafilmen fjernet fra lokkene og det ble tatt en 0-prøve før dyrkningsflaskene ble lagt i inkubatorskapet. Deretter ble det tatt ut 1ml celsesuspensjon fra dyrkningsflaskene hvert 45.min så lenge forsøket varte, og denne ble tatt med videre i fargeprosessen (se kapittel 4.3 og Tillegg E.2).

### 4.3 Farging av cellene

Før vi kjørte celleprøvene i flowcytometeret måtte de farges. Fargingen skjedde på varmerom (37°C). For en detaljert beskrivelse av fargeprosessen, se Tillegg E.2. Etter at fargeprosedyren var ferdig, kunne celleprøven gjøres klar for kjøring i flowcytometeret (se kapittel 4.4).

### 4.4 Analysering av cellene ved hjelp av flowcytometeret

Etter fargingen ble prøvene filtrert gjennom et 50µm filter. Dette ble gjort for at ikke flowcytometeret skulle bli tettet igjen av store partikler. Deretter ble prøveglasset plassert i flowcytometeret (se figur 2.8) og prøven ble kjørt og analysert ved hjelp av Apple-programmet CellQuest Pro.

I flowcytometeret ble celleprøvene belyst med en laserstråle med bølgelengde 488nm. Fluorescensen til Annexin og PI ble detektert ved hjelp av henholdsvis FL1 og FL6<sup>1</sup>. For hver celleprøve ble 20000 celler analysert og strømningsraten ble holdt på ca 250 celler pr. sekund.

Siden ulike parametere kan bli målt for individuelle celler, er det mulig å fremstille resultatene fra en kjøring på mange forskjellige måter. Som nevnt i kapittel 2.6, brukte vi fargestoffene Annexin og PI i våre eksperimenter. Alle cellene har et signal for begge disse fargestoffene, og intensiteten til disse signalene kan bli plottet i såkalte dot-plot. Frekvensen til celler med spesielle egenskaper kan også presenteres i histogrammer. Figur 4.2 - 4.6 viser de metodene jeg har benyttet meg av i denne oppgaven. Alle eksemplene er

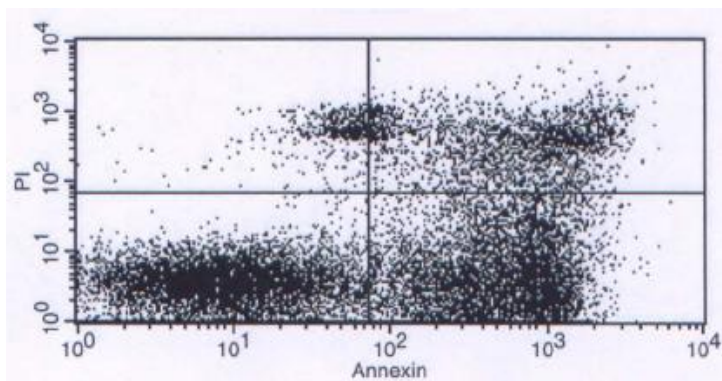
---

<sup>1</sup>FL1 og FL6 er beskrevet i 3.7.1

hentet fra samme prøvekjøring, så det er derfor mulig å se en sammenheng mellom alle figurene.

Som den observante leser sikkert vil legge merke til, er ikke SSC tatt med i analyseringen av resultatene. Dette er gjort fordi det flowcytometert som er brukt ikke er nøyaktig nok til at dette vil gi gode resultater. FSC viste for så vidt nøyaktige nok resultater, men fordi det var vanskelig å trekke noen gode slutninger ut av disse resultatene, valgt jeg å basere min analyse mer på diagrammene som viser PI og Annexin. Mer om dette i diskusjonen (kapittel 6).

Både Annexin/PI-, FFC/PI- og FFC/Annexin-diagrammene baserer seg på den økte permeabilitet til cellemembranen til de nekrotiske cellene, og på forflytningen av fosfatidylserinet (fra den indre til den ytre cellemembranen) i de apoptotiske cellene. (Se kapittel 2.4.1 og 2.4.2.) Annexinet fester seg til fosfatidylserinet på den ytre cellemembranen til de apoptotiske cellene og til fosfatidylserinet som befinner seg intracellulært i de nekrotiske cellene etter hvert som permeabiliteten øker. PI binder seg i hovedsak til DNA og vil derfor ikke farge viable og apoptotiske celler, men kun nekrotiske celler der de kan trenge gjennom både cellemembranen og cellekjernemembranen. [10] Vi kan derfor skille mellom tre cellyper: viable celler som ikke binder hverken Annexin eller PI, apoptotiske celler som binder Annexin, samt nekrotiske celler som binder både Annexin og PI. (Se figur 4.2.)

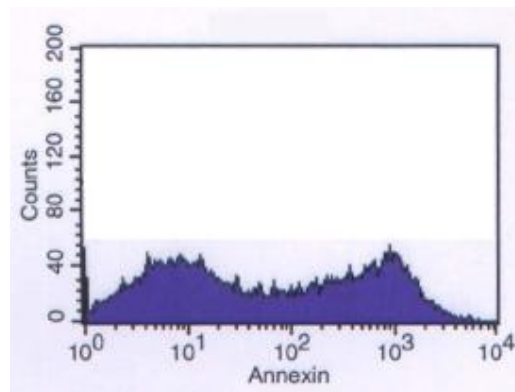


Figur 4.2: Dot-plot fra CellQuest Pro. Her vises cellenes innhold av PI og Annexin.

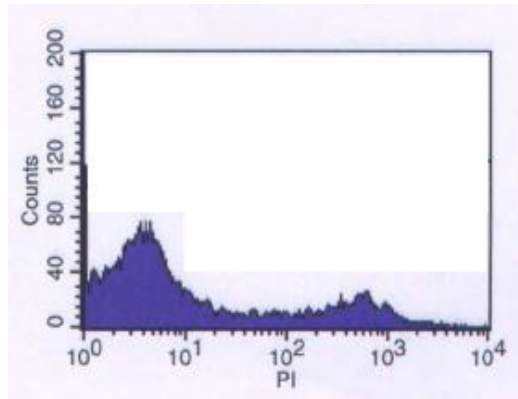
Når det gjelder figur 4.2, så trenger denne en liten tilleggsforklaring. Dette dot-plottet er delt inn i fire kvadranter. Kvadranten nede til venstre viser celler som i liten grad er farget av hverken PI eller Annexin. Disse kaller vi for viable celler, dvs celler som fortsatt er i live. Kvadranten nede til høyre viser celler som i liten grad er farget av PI, men som har bundet



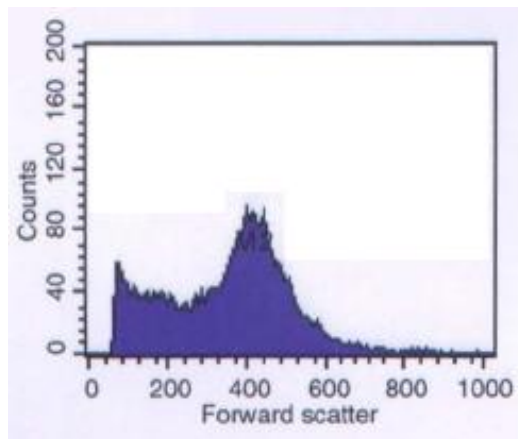
Annexin. Disse cellene er de apoptotiske cellene. Kvadranten opp til høyre viser celler som i stor grad er farget av både PI og Annexin. Dette er de nekrotiske cellene. Til slutt har vi kvadranten øverst til venstre: denne viser celler som liten grad er farget av Annexin, men som har tatt til seg fargestoffet PI. Her er det mest sannsynlig DNAet i cellekjernene som har blitt farget av PI etter at cellekjernemembranen er oppløst, og det tyder derfor på at også dette er nekrotiske celler. I min oppgave har jeg derfor valgt å betegne begge de to øverste kvadrantene som nekrotiske celler, og i resultatene har jeg slått sammen andelen celler i begge disse. Grenselinjene mellom de fire kvadrantene har jeg plassert der hvor tettheten av celler er minst. Jeg vil se nærmere på hva slags utslag dette gir på resultatene i diskusjonen (kapittel 6.3).



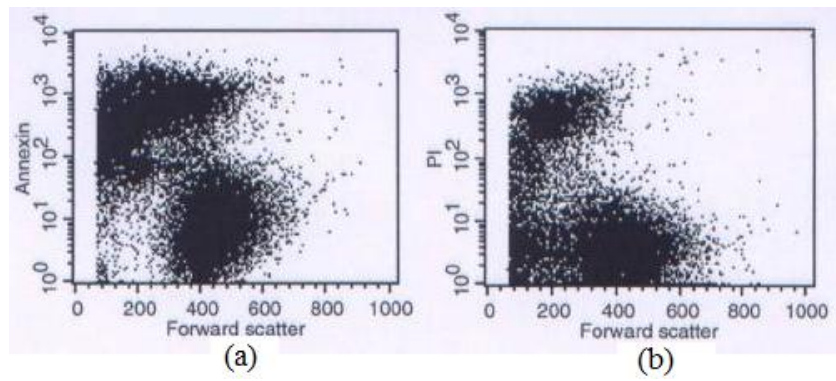
Figur 4.3: Hentet fra CellQuest Pro. Her vises cellenes innhold av Annexin presentert som et histogram. Toppen til venstre skyldes andelen celler i de to venstre kvadrantene i figur 4.2, mens toppen til høyre skyldes andelen celler i de to kvadrantene til høyre.



Figur 4.4: Hentet fra CellQuest Pro. Her vises cellenes innhold av PI presentert som et histogram. Toppen til venstre skyldes andelen celler i de to nedre kvadrantene i figur 4.2, mens toppen til høyre skyldes andelen celler i de to øvre kvadrantene.



Figur 4.5: Histogram fra CellQuest Pro. Ut fra dette kan vi ved, hjelp av FSC, lese av cellenes størrelse.



Figur 4.6: Dot-plot fra CellQuest Pro. Ut fra dette kan vi, ved hjelp av FSC, lese av cellenes størrelse.

# Kapittel 5

## Resultater

I løpet av ett år er det mye som kan skje på en cellelab. For mitt vedkommende skjedde det uheldige at cellene viste ulik ”oppførsel” i høstsemesteret og vårsemesteret. Dette kan blant annet tydelig leses ut av resultatene for doblingstiden i kapittel 5.3. I min fremstilling har jeg derfor valgt å dele opp resultatene i to: en for prøveperioden før jul (2007), og en for prøveperioden etter jul (2008).

Når det gjelder feilmarginen som er med i grafene, har jeg brukt standardfeil istedenfor standardavvik. Jeg har valgt å gjøre det på denne måten selv om det innimellom, og da spesielt i resultatene fra 2008, er få parallelle prøvesett som ligger til grunn for den grafiske fremstillingen. Formlene for standardavvik og standardfeil blir gitt i Tillegg A. Antall parallelle prøvesett som ligger til grunn for grafene kommer frem av Tillegg F og er som oftest rundt 6 paralleller.

Når vi studerer apoptoseresultatene ser vi tydelig at cellene som er behandlet med vannbad på  $44^{\circ}\text{C}$  skiller seg ut. I nekroseresultatene er det derimot cellene som er behandlet med vannbad på  $50^{\circ}\text{C}$  som skiller seg ut. Dette vil bli sett nærmere på i diskusjonskapittelet (kapittel 6).

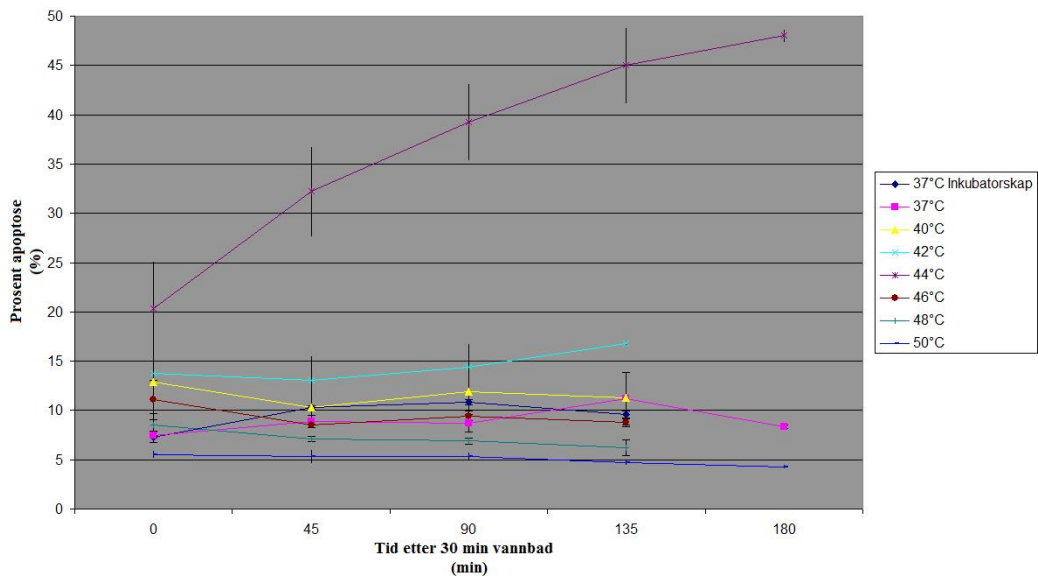
## 5.1 Apoptose

I figur 5.1 og 5.2 ser vi tydelig hvordan  $44^{\circ}\text{C}$ -dataene skiller seg ut. I resultatene fra 2007 øker apoptoseandelen i disse forholdsvist jevnt i 135 min, mens apoptoseandelen i 2008 er litt mer varierende selv om de til enhver tid har en høyere apoptoseandel enn de andre cellene som er behandlet med vannbad med andre temperaturer.

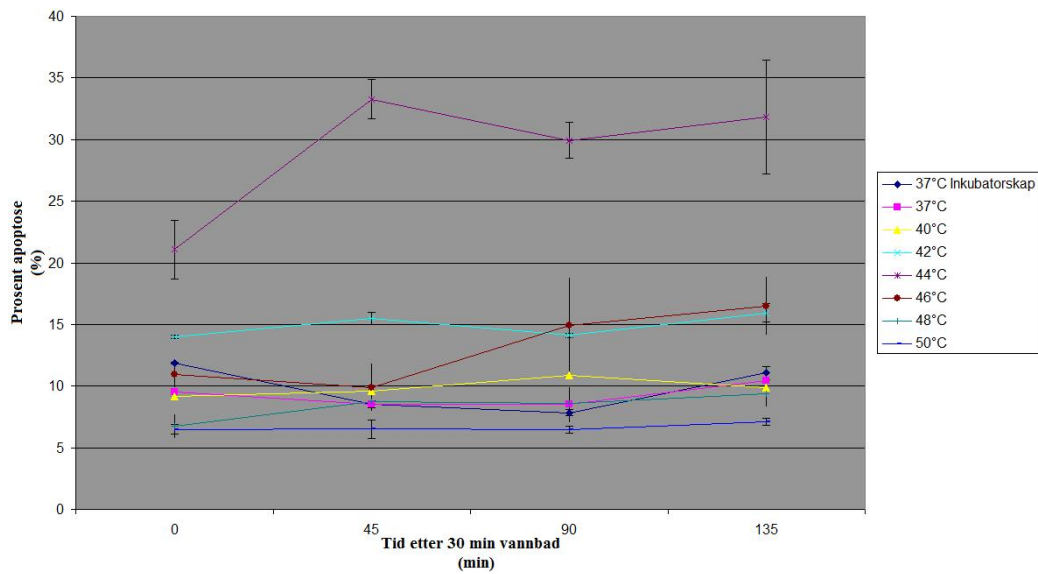
Figur 5.3 og 5.4 viser en oversikt over de samme forsøkene som de to foregående figurene, men denne gangen presentert som prosentandel celler i apoptose som funksjon av temperatur. Disse to grafene gjør det enkelt å se at cellene behandlet med vannbad på  $44^{\circ}\text{C}$  skiller seg ut både i 2007 og 2008. Forøvrig viser resultatene fra 2008 at også celler behandlet med vannbad på  $45^{\circ}\text{C}$  har en relativt høy andel celler i apoptose i forhold til de andre temperaturene.

Langtidsforsøket, som er presentert i figur 5.5 og 5.6 viser igjen hvordan apoptoseandelen hos cellene som er behandlet med vannbad på  $44^{\circ}\text{C}$  er høyere enn celler behandlet med vannbad med andre temperaturer. Vanligvis ble det tatt ut og kjørt prøver av cellene hvert 45.min i 135 min, men for å se om tendensene endret seg over lengre tid ble langtidsforsøket gjennomført slik at det ble tatt ut og kjørt prøver av cellene hvert 45.min i 135 min og deretter hvert 60.min i 180 min til. Det vil si at de siste prøvene ble kjørt 360 min (6 t) etter at cellene ble tatt ut av vannbadet. Disse grafene baserer seg på resultatene fra 28.04.08. Cellene viste denne dagen et tydelig avvik fra tidligere celler (se nærmere spesifikasjoner i Tillegg F).

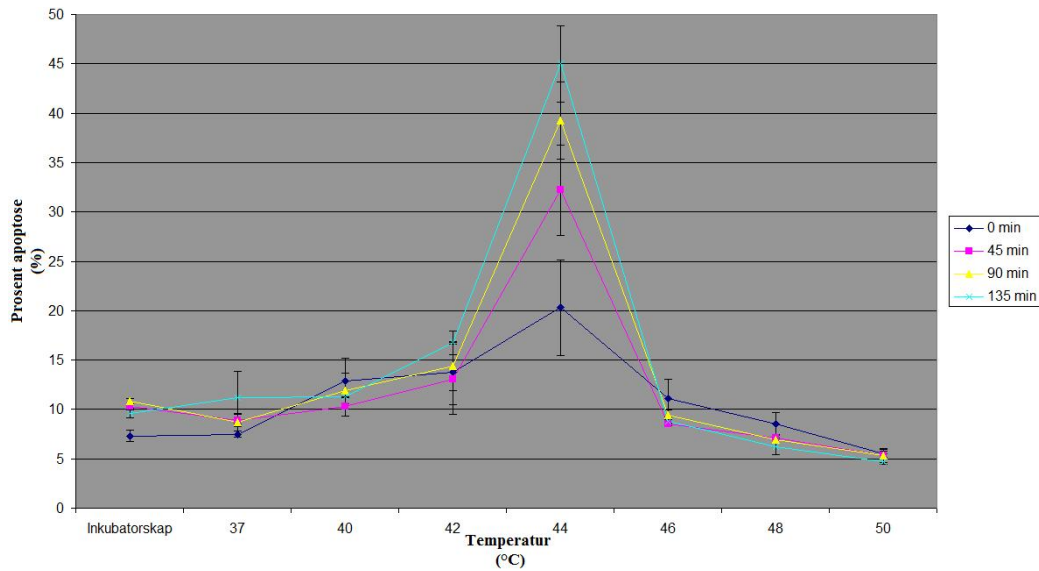
Når vi studerer apoptoseandelen til cellene som er behandlet med vannbad på  $43^{\circ}\text{C}$ ,  $44^{\circ}\text{C}$  og  $45^{\circ}\text{C}$  ser vi at  $44^{\circ}\text{C}$  og  $45^{\circ}\text{C}$  skiller seg ut. (Se figur 5.7.) Disse to har en høyere apoptoseandel enn cellene som er behandlet med vannbad på  $43^{\circ}\text{C}$ . Denne "nærstudien" av temperaturene rundt  $44^{\circ}\text{C}$  ble gjort for å se om det kun var  $44^{\circ}\text{C}$  som skilte seg ut, eller om de var flere temperaturer som førte til en like stor andel celler i apoptose.



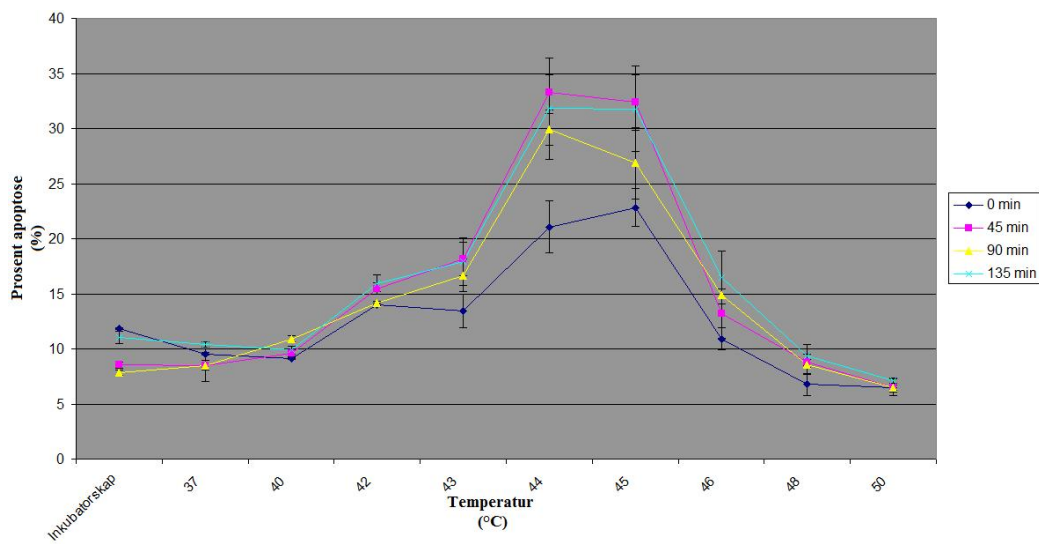
Figur 5.1: Andelen av cellene som hadde gått i apoptose ved ulike tidspunkt etter varmebehandlingen. Resultatet er fra 2007.



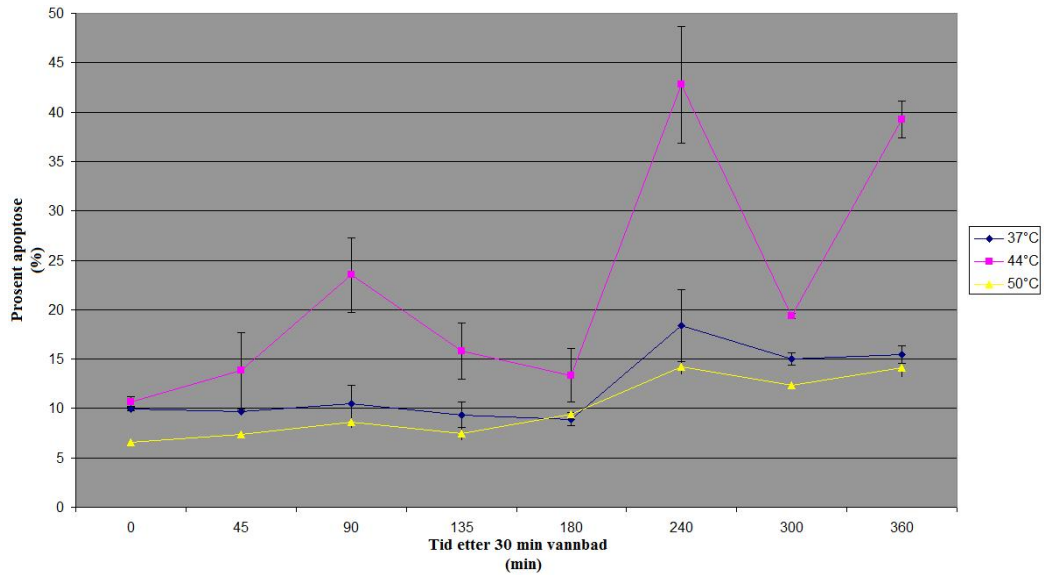
Figur 5.2: Andelen av cellene som hadde gått i apoptose ved ulike tidspunkt etter varmebehandlingen. Resultatet er fra 2008.



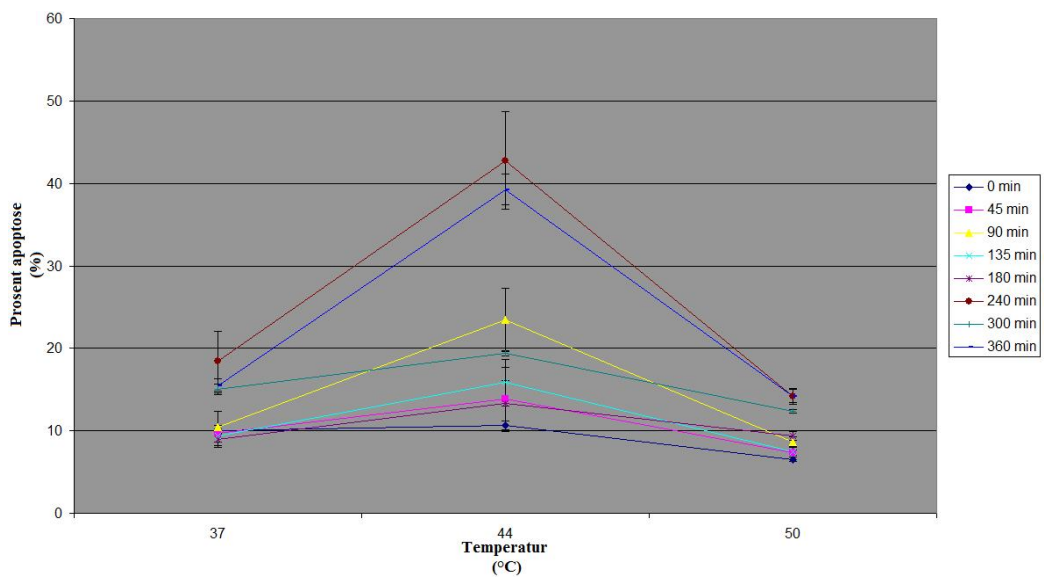
Figur 5.3: Andelen av cellene som hadde gått i apoptose for de ulike temperatu-  
 rene. Resultatet er fra 2007.



Figur 5.4: Andelen av cellene som hadde gått i apoptose for de ulike temper-  
 arene. Resultatet er fra 2008.

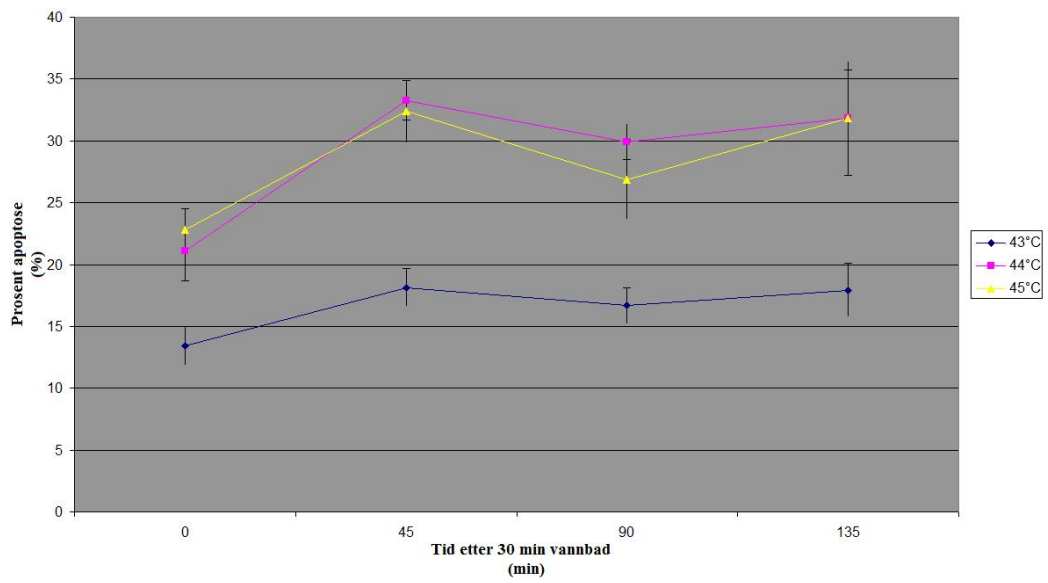


Figur 5.5: Langtidsforsøk. Andelen av cellene som hadde gått i apoptose ved ulike tidspunkt etter varmebehandlingen. Resultatet er fra 2008.



Figur 5.6: Langtidsforsøk. Andelen av cellene som hadde gått i apoptose for de ulike temperaturene. Resultatet er fra 2008.





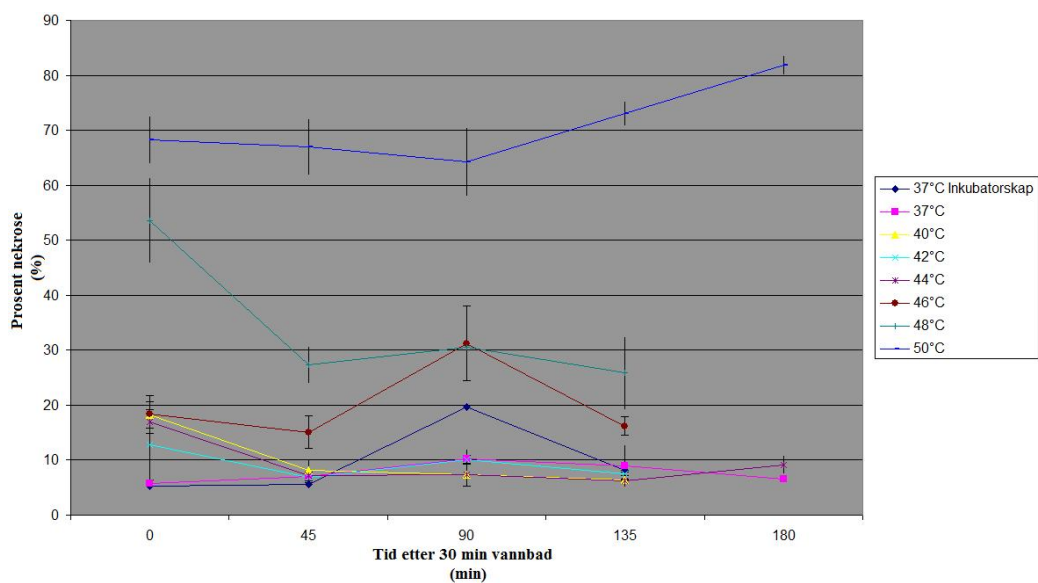
Figur 5.7: Et mer detaljert studie av hvordan apoptoseandelen for cellene er rundt omkring  $44^{\circ}\text{C}$  ved ulike tidspunkt etter varmebehandlingen. Resultatet er fra 2008.

## 5.2 Nekrose

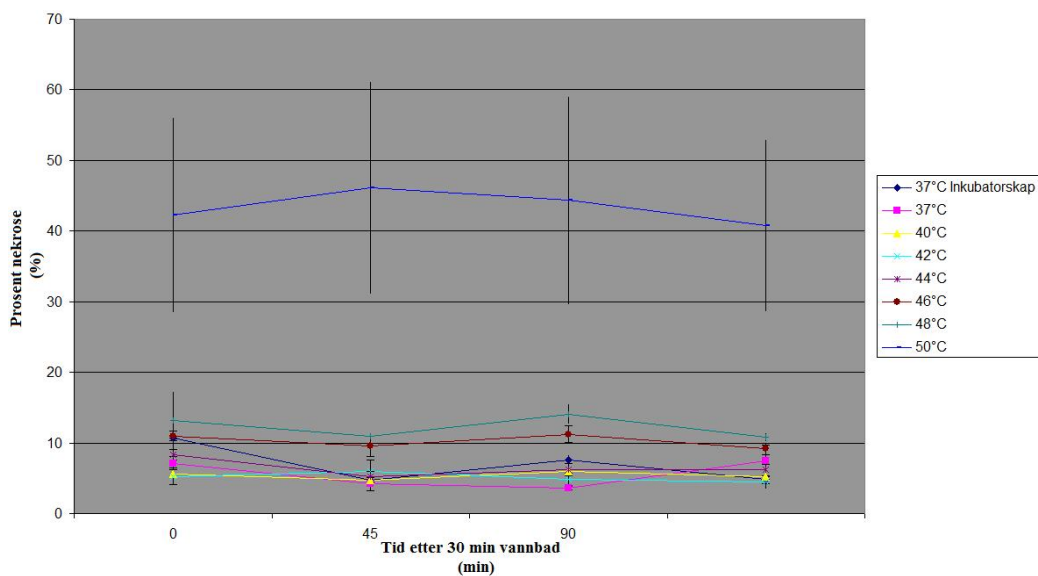
I figur 5.8 og 5.9 ser vi tydelig hvordan cellene som er behandlet med vannbad på  $50^{\circ}\text{C}$  skiller seg ut. Disse cellene viser en betydelig høyere nekroseandel enn de andre cellene som er behandlet med lavere temperaturer. Vi kan i tillegg legge merke til at i resultatene fra 2007 er prosentandelen for  $50^{\circ}\text{C}$  noe høyere enn for tilsvarende temperatur i 2008.

Figur 5.10 og 5.11 viser en oversikt over de samme forsøkene som de to foregående figurene, men denne gangen presentert som prosentandel celler i nekrose som funksjon av temperatur. Disse to grafene gjør det enkelt å se at cellene behandlet med vannbad på  $50^{\circ}\text{C}$  skiller seg ut både i 2007 og 2008. Legg forøvring merke til at resultatene fra 2007 viser at også celler behandlet med vannbad på  $48^{\circ}\text{C}$  til tider har en relativt høy andel celler i nekrose i forhold til de lavere temperaturene.

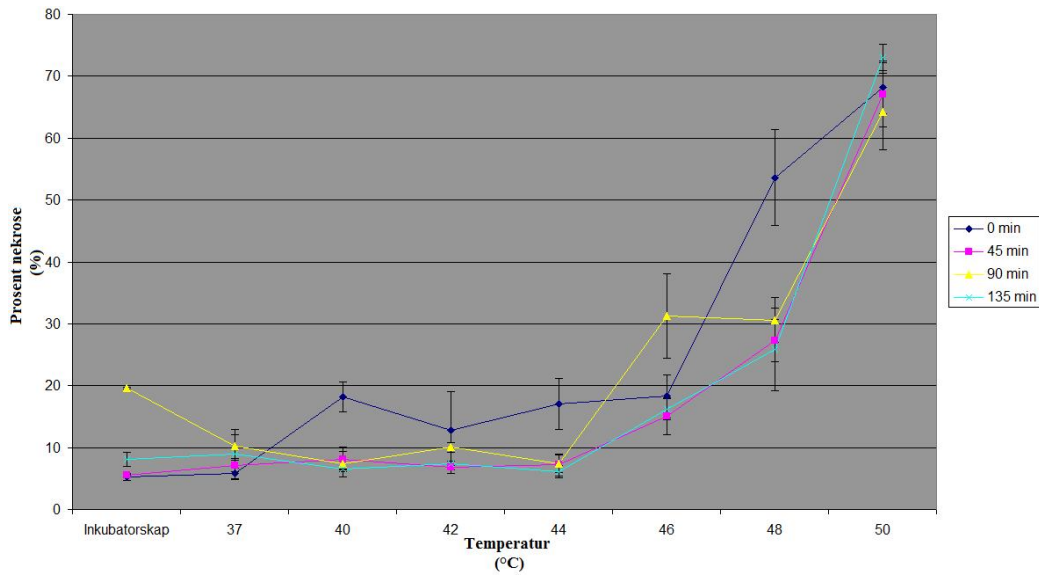
Langtidsforsøket, som er presentert i figur 5.12 og 5.13 viser igjen hvordan nekroseandelen hos cellene som er behandlet med vannbad på  $50^{\circ}\text{C}$  er høyere enn celler behandlet med vannbad med lavere temperaturer. Dette holder seg stabilt gjennom hele tidsperioden på 6 t.



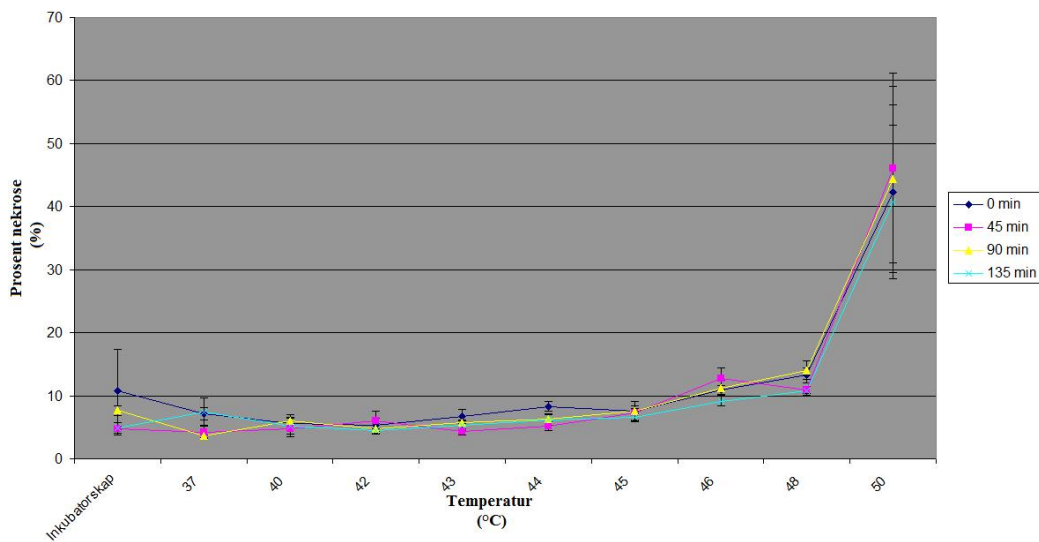
Figur 5.8: Andelen av cellene som hadde gått i nekrose ved ulike tidspunkt etter varmebehandlingen. Resultatet er fra 2007.



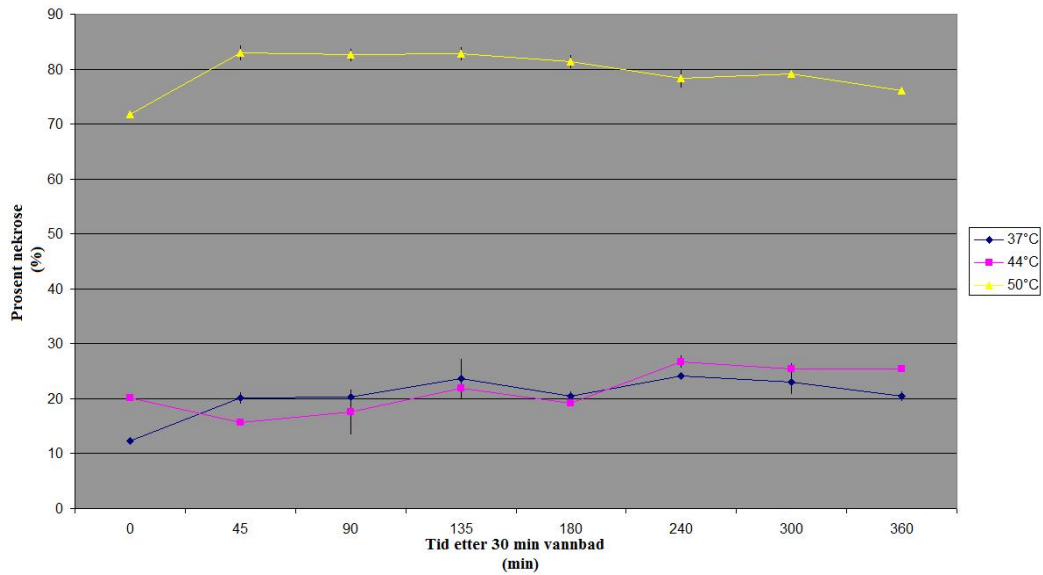
Figur 5.9: Andelen av cellene som hadde gått i nekrose ved ulike tidspunkt etter varmebehandlingen. Resultatet er fra 2008.



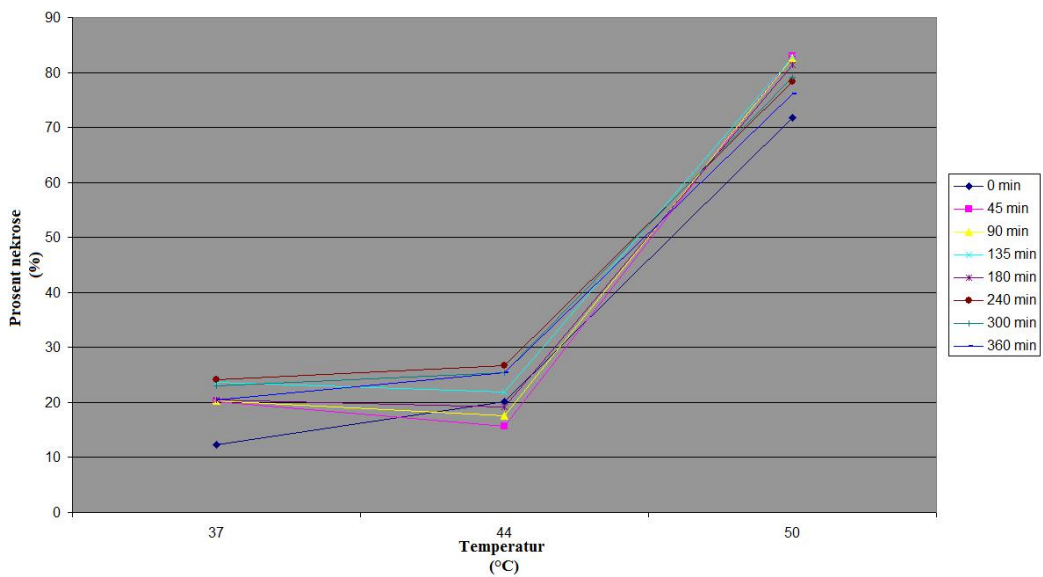
Figur 5.10: Andelen av cellene som hadde gått i nekrose for de ulike temperatu-  
 rene. Resultatet er fra 2007.



Figur 5.11: Andelen av cellene som hadde gått i nekrose for de ulike temper-  
 arene. Resultatet er fra 2008.



Figur 5.12: Langtidsforsøk. Andelen av cellene som hadde gått i nekrose ved ulike tidspunkt etter varmebehandlingen. Resultatet er fra 2008.



Figur 5.13: Langtidsforsøk. Andelen av cellene som hadde gått i nekrose for de ulike temperaturene. Resultatet er fra 2008.

### 5.3 Dablingstid

Dablingstid høsten 2007:  $t_{2007} = 24 \text{ t } 19 \text{ min}$

Dablingstid våren 2008:  $t_{2008} = 30 \text{ t } 26 \text{ min}$

For utregning, se Tillegg C.

# Kapittel 6

## Diskusjon

### 6.1 Hvorfor Annexin og PI?

For å studere hvordan cellene responderte på varmebehandlingen på best mulig måte, valgte jeg å bruke fargestoffene Annexin og PI. Dette er også de mest brukte fargestoffene for å skille viable, apoptotiske og nekrotiske celler ved hjelp av flowcytometriske målinger, og det var derfor hensiktsmessig å bruke disse slik at mine resultater kunne sammenlignes med andres. [29]

### 6.2 Erfaringer

Alle former for praktisk arbeid innebærer en viss risiko for at noe kan gå galt. I løpet av masteroppgaveperioden min oppsto det en infeksjon på laboratoriet som førte til at vi måtte destruere alle opptinte celler. Da nye celler ble tint opp, viste disse tydelige tegn på avvik fra de tidligere cellene. Blant annet gav dette utslag i at cellene begynte en apoptoseprosess uten ytre stimuli, og det ble vanskelig å få sammenlignbare resultater ut av forsøkene. Resultatene fra 24.04.08 og 28.04.08 er tydelige eksempler på dette. Også doblingstiden gir en tydelig indikasjon på at noe var galt, da denne var på over 30 t i motsetning til drøye 24 t før jul. (Se kapittel 5.3.) Jeg har derfor valgt å ikke ta med disse resultatene i fremstillingen av grafene i kapittel 5. Ett unntak er langtidsforsøket som kun ble gjennomført 28.04.08., og dermed er det disse resultatene som danner grunnlaget for grafene 5.5, 5.6, 5.12 og 5.13. På grunn av avvikene fra tidligere celler ble cellene nok en gang destruert og nye celler tint opp, men igjen viste de tydelige tegn på avvik fra tidligere celler. Denne

gangen gav det utslag i at cellene viste stor motstandsdyktighet mot ytre stimuli, og selv om cellene ble utsatt for vannbad på  $50^{\circ}\text{C}$  var det bare en liten andel av cellene som gikk i nekrose. Dessverre har det ikke vært mulig, så langt, å finne ut nøyaktig hva som har vært årsaken til disse avvikene i cellekulturene.

Det er ikke ønskelig å utføre forsøk på celler som i utgangspunktet ikke oppfører seg normalt, men siden masteroppgaven skulle leveres innen en bestemt tidsfrist valgte jeg å kjøre forsøk likevel. Det ble vanskelig å sammenlikne resultatene fra de to prøveperiodene sett i forhold til prosentandelene, så derfor valgte jeg å dele dem opp og heller sammenlikne tendensene for de to periodene. Som resultatene i kapittel 5 viser, så er det tydelig at cellene behandlet med  $44^{\circ}\text{C}$ -vannbad skiller seg ut på andelen celler i apoptose, mens cellene behandlet med  $50^{\circ}\text{C}$ -vannbad skiller seg ut på andelen celler i nekrose. Hvorfor akkurat disse temperaturene er så spesielle skal jeg se nærmere på i kapittel 6.4.

På grunn av disse utfordringene underveis ble det ikke mulig å kjøre så mange tilfredsstillende paralleller av hver temperatur som det som var ønskelig. Det er hele tiden en vurdering av hva som er det beste av to onder: å trekke konklusjoner ut i fra mange eksperimenter, men med inkluderte kjente feilaktige resultater, eller fra få eksperimenter med smalere grunnlag. Jeg valgt den første varianten, uten at jeg med sikkerhet kan si at det var den beste avgjørelsen. Dersom jeg skulle begynne å kutte ut alle de resultatene som jeg ser har unormalt avvik, enten på grunn av kjente feil med cellene i den perioden, et unormalt stort avvik fra normal standardfeil (såkalte "outliers"), eller andre årsaker, ville jeg i enkelte tilfeller stå igjen med få resultater per temperatur. Dette mener jeg er et altfor dårlig grunnlag til å trekke noen konklusjon ut i fra, så derfor har jeg valgt å presentere alle resultatene.

### 6.3 Plassering av grenselinjene

Når det gjelder plasseringen av grenselinjene mellom de fire kvadrantene i Annexin-PI-diagrammet (se figur 4.2, så er disse plassert etter en vurdering av hvor tettheten av celler er minst. Dette er gjort fordi det er forventet at cellene enten skal være klart viable, apoptotiske eller nekrotiske, og at mesteparten av cellene vil plassere seg i en mer eller mindre samlet gruppe innenfor hver sin kvadrant. Siden grenselinjene er plassert på øyemål, blir en konsekvens av dette at en liten forflytning av grenselinjene enten til høyre eller venstre, opp eller ned vil gi utslag på prosentandelen celler innad i



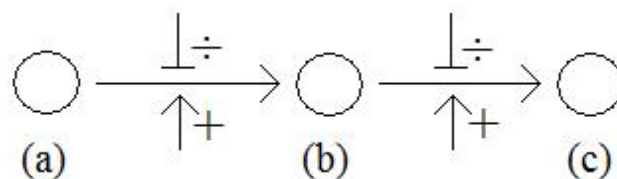
hver kvadrant. Jeg har vurdert det slik at siden grenselinjene blir plassert der tettheten av celler en minst, vil en forflytning av grenselinjene gi et relativt lite utslag, og jeg ser derfor bort i fra dette som en feilkilde. For hver enkelt prøvedag foretok jeg en individuell vurdering av hvor grenselinjene skulle plasseres, og derfor varierer plasseringen fra dag til dag, men den er konstant for alle prøver som er kjørt samme dag. Dette gjorde jeg fordi cellene viste ulike oppførsel avhengig av når i prøveperioden prøvene ble kjørt, og også fordi det blir forventet at celleprøver som kjøres samme dag skal binde Annexin og PI på samme måte (selvfølgelig avhengig av om de er viable, apoptotiske eller nekrotiske).

## 6.4 Tolkning av resultatene

Ut i fra resultatene er det tydelig at det er noe spesielt som skjer med cellene når de blir utsatt for varmebehandling med temperaturer på  $44^{\circ}\text{C}$  og  $50^{\circ}\text{C}$ . Ved  $44^{\circ}\text{C}$ -varmebehandling er det en betydelig andel av cellene som går i apoptose, mens det ved  $50^{\circ}\text{C}$ -varmebehandling er en betydelig andel av cellene som går i nekrose. Nøyaktig hvorfor dette skjer er det vanskelig å svare på med utgangspunkt i de undersøkelsene som jeg har utført, men mye tyder vel på at det ved  $44^{\circ}\text{C}$ -behandlingen er kaspasene som reagerer på nøyaktig denne stimulien (se kapittel 2.5.3).

En teori vil jeg likevel komme med: For at kaspasene skal ende opp som utførelseskaspaser og igangsette apoptoseprosessen, må de "omdannes" fra initiatorkaspaser til effektorkaspaser og deretter videre til utførelseskaspaser. Min teori er at vi kan tenke oss to ulike signaler som påvirker hver overgang; ett signal som prøver å igangsette overgangen (+), og ett signal som prøver å hindre overgangen ( $\div$ ). (Figur 6.1 viser en enkel skisse av dette.) Videre tenker jeg meg at disse to signalveiene består av proteiner som denatureres ved ulike temperaturer. Det vil si: ved lave temperaturer ( $37^{\circ}\text{C} - 43^{\circ}\text{C}$ ) er det en balanse mellom de to signalene, og apoptoseprosessen igangsettes ikke av seg selv. Når temperaturen stiger til  $44 - 45^{\circ}\text{C}$  denatureres de proteinene som leder det negative signalet, dermed får det positive signalet overtaket og det blir en oppsving i andelen celler som går i apoptose. Når så temperaturen stiger videre til de høye temperaturene ( $46^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ ) denatureres også de proteinene som leder det positive signalet, dermed blir det ingen signaler som igangsetter overgangene mellom kaspasene og ingen apoptoseprosesser igangsettes.

Når det gjelder årsaken til at en stor andel av cellene går i nekrose først ved



Figur 6.1: En enkel skisse av overgangene mellom (a) en initiatorcaspase, (b) en effektorcaspase og (c) en utførelsescaspase. I overgangen mellom kaspasene er det tegnet inn to signaler, ett som prøver å igangsette overgangen (+), og ett som prøver å hindre overgangen ( $\div$ ).

$50^{\circ}\text{C}$ , kan dette muligens forklares med at nekroseprosessen er avhengig av at cellemembranen brytes ned. Det er mulig at denne membranen klarer å motstå relativt høye temperaturer, men at den brytes ned når temperaturen blir for høy ( $50^{\circ}\text{C}$ ). Noe tilsvarende kan også være en av årsaken til de ulike nekrosenivåene som resultatene viser for de ulike prøvedatoene mine. Resultatene fra 2008 stammer fra forsøk på celler som var relativt nytinte, mens resultatene fra 2007 stammer fra forsøk på celler som hadde vært oppe og gått i en lang periode. Det er mulig at cellemembranen til de nytinte cellene var mer robust enn cellemembranen til de eldre cellene og at det derfor var nødvendig med en kraftigere varmebehandling for at disse skulle gå i nekrose. På den annen side så ser vi jo av doblingstiden (kapittel 5.3) at cellene fra prøveperioden i 2008 ikke var helt optimale (vi hadde forventet en doblingstid på ca 24t da dette har vært telt på Jurkat-cellene mange ganger tidligere), og årsaken til dette kan også ha en innvirkning på cellene, og da kanskje på motstandskraften til cellemembranen.

Det forrige avsnittet er foreløpig kun en hypotese og må derfor verifiseres eksperimentelt ved en senere anledning.

## 6.5 Feilkilder

Jeg har jo allerede nevnt noen av de feilkildene som kan ha innvirkning på resultatene tidligere i diskusjonen, men det er også andre, kanskje mer "metodemessige"-feilkilder som er verdt å nevne.

Som vi kan lese i Tillegg E.2, er det en lengre fargeprosess i forkant av at cellene kjøres i flowcytometeret. Mange ting underveis kan gå galt, og dette må tas inn som en klar mulig feilkilde. For eksempel blandes både PI-løsningen og Annexin-PI-løsningen på morgenen hver forsøksdag, og små endringer i

denne vil muligens kunne få innvirkning på hvordan cellene responderer på fargeprosessen.

Noe som også vil kunne påvirke resultatene, er tidsperioden fra cellene var ferdig farget og til prøven ble kjørt i flowcytometeret. Avhengig av hvor mange paralleller som ble farget samtidig, kunne denne tidsperioden variere fra 3-45minutter. I denne perioden sto prøvene i  $37^{\circ}C$ -vannbad da dette ble antatt å være det beste alternativet, men det ble ikke gjort noen forsøk for å finne ut hvordan dette påvirket resultatene.

## 6.6 Forslag til videre arbeid

Det viktigste forslaget mitt til videre arbeid er å bekrefte mine funn ved å kjøre noen nye paralleller på friske celler. Når det er sagt, så er det mange andre ting som også kunne være interessante å undersøke. Blant annet er det gjort forsøk med Jurkatceller og PDT-behandling ([2] m.fl.) og det kunne vært spennende å kombinere PDT-behandlingen med bruken av varmebehandling i vannbad for å se hvordan dette påvirker andelen av celler som går i apoptose og nekrose.

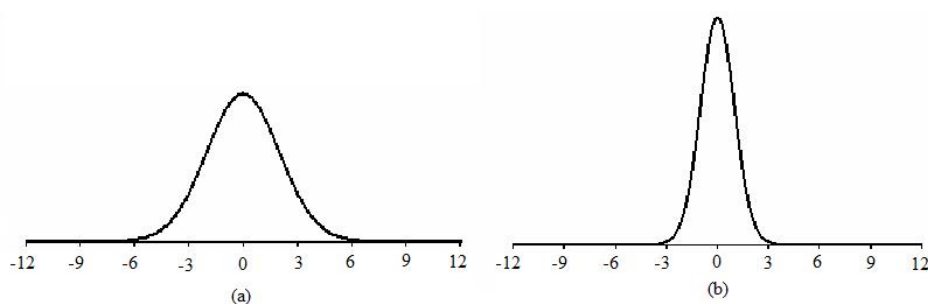
I introduksjonen nevner jeg også forsøk der pattedyrceller herdes mot høye temperaturer ved å gradvis bli utsatt for høyere temperaturer. I den sammenhengen kunne det kanskje vært mulig å se nærmere på hvor små temperaturendringene må være for at cellene eventuelt vil herdes istedenfor å gå i apoptose eller nekrose.

I mine forsøk har jeg benyttet meg av 30 min vannbad for å varmebehandle cellene. Ulike undersøkelser benytter seg av ulike typer varmebehandlinger når de skal studere det samme (andelen celler som går i apoptose og nekrose etter behandlingen), uten at jeg har sett noen artikler som har sammenliknet den ene behandlingen opp mot den andre. Det kunne derfor være interessant å se en studie hvor varmebehandlingens lengde varierer. Går for eksempel en større andel av cellene i apoptose ved varmebehandling på  $44^{\circ}C$  dersom vannbadet varer i 60 min fremfor 30 min? Eller hva med 2 t? Eller hva med å ikke bruke vannbad i det hele tatt, men heller et inkubatorskap der temperaturen kan justeres og parafilm over lokket ikke er nødvendig?

# Tillegg A

## Statistikk

Standardavviket er et mål for det gjennomsnittlige avviket fra det estimerte gjennomsnittet i et datasett.



Figur A.1: Viser spredningen til et datasett. (a) har en stor spredning rundt gjennomsnittet og dermed et stort standardavvik, mens (b) har en liten spredning rundt gjennomsnittet og dermed et lite standardavvik.

Standardavviket, der det er tatt et utvalg  $x_1, \dots, x_n$  fra en større populasjon, er definert som:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{A.1})$$

der  $\bar{x}$  er gjennomsnittet til utvalget og  $n$  er antall stikkprøver. [30]

Standardfeilen er en funksjon av standardavviket  $s$  og utvalgsstørrelsen  $n$ :

$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{A.2})$$

[31]

# Tillegg B

## Cellesyklus

Utledningen nedenfor er hentet fra [32].

Varigheten av de ulike fasene i cellesyklusen kan bestemmes ut i fra populasjonens aldersfordeling, det vil si sannsynligheten for at en celle har en gitt alder  $\tau$ .

Dersom vi antar en ideell cellepopulasjon der alle cellene deler seg og gir opphav til to nye datterceller, vil populasjonen doblingstid  $T_d$  være lik varigheten til cellesyklusen,  $T_c$ . Denne ideelle populasjonen vil ha en eksponentiell vekstkurve, hvor det eneste tidsavhengige er celleantallet:

$$N_{tot}(t) = N_0 e^{t \cdot \ln \frac{2}{T_c}} \quad (\text{B.1})$$

Dette er en stasjonær cellesyklusfordeling, det vil si at andelen celler i de ulike fasene ikke endrer seg med tiden.  $N(t, \tau)$  er dermed antall celler ved tid  $t$  og med alder mellom  $\tau$  og  $\tau + d\tau$ . Dette kan vi skrive som:

$$N(t, \tau) = N_{tot}(t) \cdot n(\tau) \quad (\text{B.2})$$

Her er aldersfordelingen  $n(\tau)$  normalisert, det vil si:

$$\int_0^1 n(\tau) d\tau = 1 \quad (\text{B.3})$$

hvor  $\tau = t/T_c$ .

Vårt mål er å bestemme hvordan aldersfordelingen ser ut, og vi ser derfor på uttrykket for antall celler med alder  $\tau$  ved tidspunktet  $t + dt$ :

$$N(t + dt, \tau) = N(t, \tau - d\tau) \quad (\text{B.4})$$

Vi kan nå utlede formelen for aldersfordelingen for en ideell populasjon i esponentiell vekst:

$$\left[ N_{tot}(t) + \frac{dN_{tot}}{dt} \cdot dt \right] \cdot n(\tau) = N_{tot}(t) \cdot \left[ n(\tau) - \frac{dn}{d\tau} \cdot d\tau \right] \quad (\text{B.5})$$

$$\frac{dn}{n(\tau)} \cdot \frac{d\tau}{d\tau} = -\frac{dN_{tot}}{dt} \cdot \frac{1}{N_{tot}} dt = -\ln 2 \frac{2}{T_c} dt = -\ln(2) \cdot d\tau \quad (\text{B.6})$$

$$\frac{dn(\tau)}{n(\tau)} = -\ln(2) \cdot d\tau \quad (\text{B.7})$$

$$\int \frac{dn(\tau)}{n(\tau)} = \ln(n(\tau)) = -\tau \cdot \ln(2) \quad (\text{B.8})$$

$$n(\tau) = C e^{-\tau \cdot \ln(2)} \quad (\text{B.9})$$

$C$  kan bestemmes ved hjelp av formel B.3:

$$C \int_0^1 e^{-\tau \cdot \ln(2)} d\tau = -\frac{C}{\ln(2)} e^{-\ln(2)-1} = 1 \quad (\text{B.10})$$

$$C = \ln \frac{2}{1 - e^{-\ln(2)}} = 2 \ln(2) \quad (\text{B.11})$$

Dette gir oss da formelen for aldersfordelingen:

$$n(\tau) = 2 \cdot \ln(2) \cdot e^{-\tau \cdot \ln(2)} \quad (\text{B.12})$$

Når vi da vet at

$\tau_1$  = cellens alder i syklus ved overgangen mellom G1- og S-fasen.

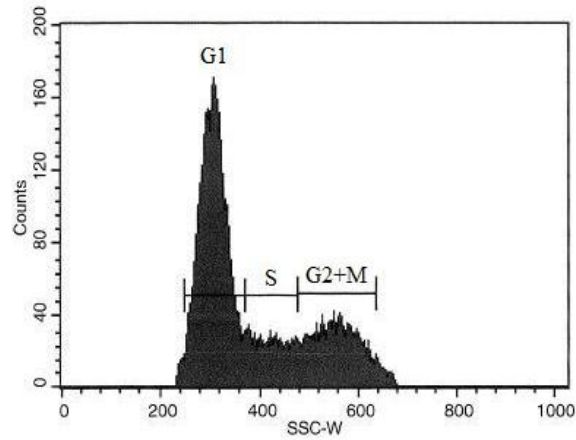
$\tau_2$  = cellens alder i syklus ved overgangen mellom S- og G2-fasen.

gir figur B.1 oss:

Andelen celler i G1:  $F_{G1} = 0,6147$

Andelen celler i G2+M:  $F_{G2+M} = 0,2317$

Faseandelen kan dermed bestemmes ved å integrere formel B.12 for de ulike fasene:



File: jurkat2.002 Acquisition Date: 14-Apr-08  
 Gate: G4 Gated Events: 16051  
 Total Events: 20000 X Parameter: SSC-W (Linear)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Median	Peak Ch
All	0, 1023	16051	100.00	80.25	381.75	327.00	305
G1	248, 370	9866	61.47	49.33	305.43	305.00	305
S	370, 476	2194	13.67	10.97	421.56	421.00	376
G2+M	476, 637	3719	23.17	18.59	552.88	552.00	548

Figur B.1: Fordelingen av DNA gjennom cellyklus. Dette histogrammet viser DNA-fordelingen til Jurkatcellene i april 2008.

$$F_{G1} = \int_0^{\tau_1} 2 \cdot \ln(2) e^{-\tau \cdot \ln(2)} d\tau = 2(1 - e^{-\tau_1 \cdot \ln(2)}) \quad (\text{B.13})$$

$$\Rightarrow \tau_1 = -\frac{\ln(1 - \frac{F_{G1}}{2})}{\ln(2)} = \frac{-\ln(1 - \frac{0,6147}{2})}{\ln(2)} = 0,53 \quad (\text{B.14})$$

$$F_{G2+M} = \int_{\tau_2}^1 2 \cdot \ln(2) e^{-\tau \cdot \ln(2)} d\tau = 2e^{-\tau_2 \ln(2)} - 1 \quad (\text{B.15})$$

$$\Rightarrow \tau_2 = \frac{\ln(\frac{1-F_{G2+M}}{2})}{\ln(2)} = \frac{-\ln(\frac{1+0,2317}{2})}{\ln(2)} = 0,70 \quad (\text{B.16})$$

Vi kan nå regne ut de relative fasevarighetene:

G1-fasen:  $\tau_{G1} = \tau_1 = 0,53$

S-fasen :  $\tau_S = \tau_2 - \tau_1 = 0,17$

G2- + M-fasen:  $\tau_{G2+M} = 1 - \tau_2 = 0,30$

I vårt tilfelle regner vi med en doblingstid på 30 t (se Tillegg C), og dette gir oss følgende fasevarigheter:

$$t_{G1} = 15 \text{ t } 54 \text{ min}$$

$$t_{GS} = 5 \text{ t } 6 \text{ min}$$

$$t_{G2+M} = 9 \text{ t } 0 \text{ min}$$



# Tillegg C

## Doblingstid

Doblingstiden utledes fra eksponentialfunksjonen

$$N_t = N_0 e^{kt} \quad (\text{C.1})$$

der  $N_t$  beskriver antall celler ved tiden  $t$ ,  $N_0$  er celleantallet ved  $t = 0$  og  $k$  er helningskoeffisienten.

Beregningen av doblingstiden gjøres ved å sette  $N_t = 2N_0$ :

$$2N_0 = N_0 e^{kt} \quad (\text{C.2})$$

$$2 = e^{kt} \quad (\text{C.3})$$

$$\ln(2) = kt \quad (\text{C.4})$$

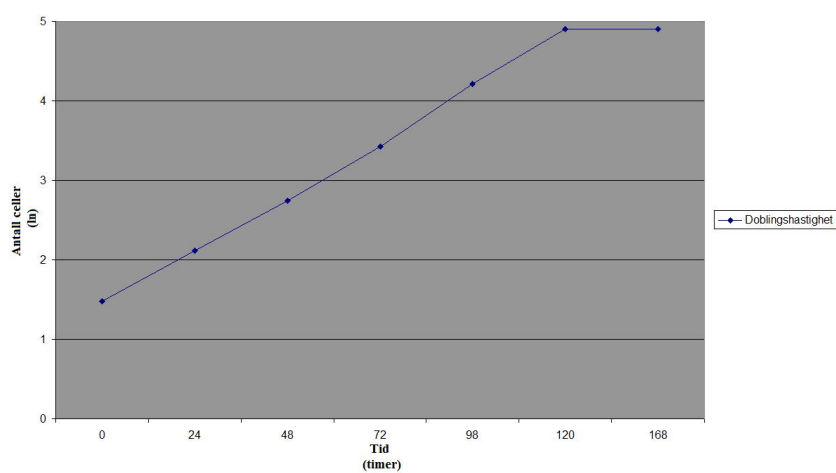
$$t = \frac{\ln(2)}{k} \quad (\text{C.5})$$

Antall celler ( $\times 10^6$ )	Antall celler ( $\ln$ )	Timer ( $t$ )
4,4	1,48	0
8,3	2,12	24
15,6	2,75	48
30,7	3,42	72
67,8	4,22	98
135	4,91	120
134,5	4,90	168

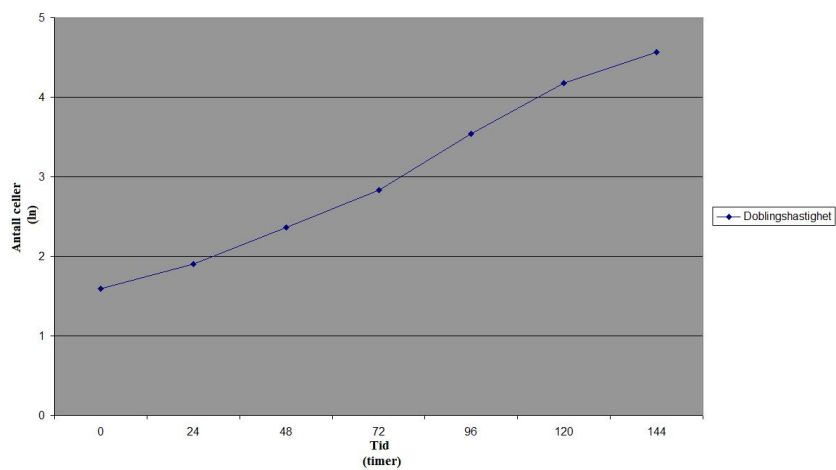
Tabell C.1: Resultater for telling av celler 2007

Antall celler ( $\times 10^6$ )	Antall celler ( $ln$ )	Timer ( $t$ )
4,9	1,59	0
6,7	1,90	24
10,6	2,36	48
17,0	2,83	72
34,5	3,54	96
65,3	4,18	120
95,9	4,56	144

Tabell C.2: Resultater for telling av celler 2008



Figur C.1: Doblingshastigheten 2007



Figur C.2: Doblingshastigheten 2008

Ut i fra formel C.5, tabell C.1 og C.2, samt figur C.1 og C.2, kan vi nå beregne doblingshastigheten for cellekulturen i 2007 og 2008:

$$k_{2007} = \frac{4,22 - 2,11}{98 - 24} = \frac{2,11}{74} = 0,0285 \quad (\text{C.6})$$

$$t_{2007} = \frac{\ln(2)}{k_{2007}} = 24,31 \quad (\text{C.7})$$

$$k_{2008} = \frac{34,5 - 6,7}{96 - 24} = \frac{1,64}{72} = 0,0228 \quad (\text{C.8})$$

$$t_{2008} = \frac{\ln(2)}{k_{2008}} = 30,43 \quad (\text{C.9})$$

$$\Rightarrow t_{2007} = 24 \text{ t } 19 \text{ min}$$

$$\Rightarrow t_{2008} = 30 \text{ t } 26 \text{ min}$$

# Tillegg D

## Materialer

### D.1 Dyrkningsmedium

For å lage RPMI-1640 tok vi utgangspunkt i en 450ml flaske med RPMI-1640, natriumpyruvat-løsning og gentamicin (med filter). Deretter tilsatte vi følgende:

- 50ml FBS
- 5ml L-glutamin
- 5ml sodium pyruvate
- 0,5ml gentamicin

[26]

### D.2 Hepesbuffer

Hepesbufferen ble laget etter følgende prosedyre:

- 0,862g NaOH og 0,4768g Hepes oppløst i 150ml Elix H<sub>2</sub>O
- Justeres til pH 7,4
- 1,6421g NaCl og 0,1171g CaCl<sub>2</sub> tilsettes
- Justeres til pH 7,4
- Fyll opp med Elix-H<sub>2</sub>O til 200ml volum

[27]

### **D.3 Steril PBS**

Steril PBS ble laget etter følgende prosedyre:

- 1000ml Elix-H<sub>2</sub>O
- 5 PBS-tabletter

[26]

### **D.4 PI-løsning**

PI-løsningen ble laget etter følgende prosedyre:

- 1034 $\mu$ g PI (50 $\mu$ g/ml)
- 20,68ml Elix-H<sub>2</sub>O

[28]

### **D.5 Annexin-PI-løsning**

Annexin-PI-løsningen ble laget etter følgende prosedyre:

- 20 $\mu$ l Annexin
- 1ml HEPESbuffer
- 20 $\mu$ l PI (50 $\mu$ g/ml)

[28]

# Tillegg E

## Metoder

### E.1 Dyrkningsprosedyren

Vi fulgte følgende fremgangsmåte for omsettingen på mandager og fredager:

- Varmet mediumet til  $37^{\circ}\text{C}$
- Pipetterte i cellesuspensjonen for å oppnå en homogen cellesuspensjon
- Overførte cellesuspensjonen til et 50ml sentrifugerør
- Sentrifugerte cellene med 1500rpm i 5 min og telte cellene i burkerkammer samtidig
- Sugde av det resterende mediumet og tilsatte nytt medium til sentrifugerøret slik at vi fikk en cellekonsentrasjon på  $2 \times 10^6$  pr. ml
- Overførte  $5 \times 10^6$  celler i suspensjon til en ny celleflaske
- Tilsatte medium slik at det totalt ble 25ml væske. Cellekonsentrasjonen var nå  $0,2 \times 10^6$  pr. ml

Onsdager fulgte vi følgende prosedyre for å tilsette medium:

- Varmet mediumet til  $37^{\circ}\text{C}$
- Pipetterte i cellesuspensjonen for å oppnå en homogen cellesuspensjon
- Telte cellene i burkerkammer
- Tilsatte medium slik at den nye cellekonsentrasjonen ble ca  $0,5 \times 10^6$  pr. ml.

[25]

## E.2 Farging av cellene

Fargingen skjedde etter følgende prosedyre:

- Tok ut 1ml prøve fra dyrkningsflasken
- Sentrifugerte på 27°C med 1500rpm i 5 min
- Helte av væsken
- Resuspenderte i 2ml PBS
- Sentrifugerte på 27°C med 1500rpm i 5 min
- Helte av væsken
- Resuspenderte i 100 $\mu$ l AnnexinV-løsning
- Pakket prøven inn i aluminiumsfolie og inkuberte i 10 min
- Tilsatte 400 $\mu$ l PI-løsning

[28]

# Tillegg F

## Måledata

Dette tillegget inneholder alle resultatene fra flowcytometeret, sortert og satt inn i tabeller. Resultatene er presenter på to ulike måter: først kommer alle resultatene sortert etter temperatur, deretter kommer alle resultatene sortert etter tid etter vannbadet. Hver tabell har en overskrift som sier noe om hvordan resultatene er sortert (enten en temperatur eller antall minutter), og videre er hver tabell delt inn slik at viable, apoptotiske og nekrotiske celler er sortert for seg. Helt til høyre i tabellene er det oppgitt hvilken dato resultatene stammer fra. Tabellene har også en fargekode, der fargen på tallene sier noe om cellenes tilstand den aktuelle dagen. Denne fargekodingen blir nærmere presentert nedenfor.

- Tallene som er skrevet med blå skrift er resultatene fra 20.11.2007. Da brukte vi zip-pose rundt dyrkningsflaskene for å sikre oss mot at vann trengte inn i flaskene og for å holde  $CO_2$ -nivået på 5%. Cellene ble farget i romtemperatur.
- Tallene som er skrevet med rød skrift er resultatene fra 24.04.2008 og 28.04.2008. Da hadde vi problemer med at cellene gikk i apoptose uten ytre stimuli. Vi brukte parafilm for å holde dyrkningsflaskene tette i vannbadet og  $CO_2$ -nivået på 5%. Cellene ble farget på  $37^\circ C$  varmerom.
- Tallene som er skrevet med grønn skrift er resultatene fra 07.05.2008 og 08.05.2008. Da hadde vi problemer med at cellene viste stor motstandsdyktighet mot ytre stimuli. Vi brukte parafilm for å holde dyrkningsflaskene tette i vannbadet og  $CO_2$ -nivået på 5%. Cellene ble farget på  $37^\circ C$  varmerom.



- Tallene som er skrevet med sort skrift er resultatene fra 11.12.2007, 12.12.2007 og 13.05.2008. Vi brukte parafilm for å holde dyrkningsflaskene tette i vannbadet og  $CO_2$ -nivået på 5%. Cellene ble farget på  $37^\circ C$  varmerom.

I kapittel 5 er resultatene delt inn i to deler: en for 2007 og en for 2008. Resultatene fra 2007 baserer seg på alle resultater fra dette året (20.11.07, 11.12.07 og 12.12.07). Resultatene fra 2008 baserer seg på resultatene fra tre av kjøringene dette året (07.05.08, 08.05.08 og 13.05.08), med ett unntak: langtidsforsøket er basert på resultatene fra 28.04.08.

## 37°C inkubatorskap

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Viabile celler	89,76			85,45	11.12.2007
	86,72			84,23	
	88,20	83,82	69,19	79,34	12.12.2007
	85,06	84,38	69,95	80,18	
	63,25		67,54		24.04.2008
			67,38		
			65,29		
	62,06		67,56		
	84,12	87,91	83,55	83,77	08.05.2008
	70,75	85,45	85,50	84,31	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Apoptotiske celler	5,77			8,82	11.12.2007
	7,27			9,12	
	7,58	10,50	11,11	10,57	12.12.2007
	8,61	10,14	10,53	9,81	
	12,72		24,58		24.04.2008
			24,21		
			25,59		
	11,96		22,70		
	11,78	8,27	8,08	11,60	08.05.2008
	11,92	8,82	7,61	10,50	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Nekrotiske celler	4,47			5,73	11.12.2007
	6,00			6,66	
	4,22	5,68	19,70	10,09	12.12.2007
	6,34	5,48	19,52	10,00	
	24,03		7,89		24.04.2008
			8,40		
			9,13		
	25,98		9,74		
	4,10	3,82	8,37	4,64	08.05.2008
	17,34	5,73	6,90	5,18	

## 37°C vannbad

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Viabile celler	88.55	84.57	79.89						20.11.2007
	88.31	85.25	83.41						
	85.69	89.06	87.61	88.75	84.62				11.12.2007
	84.52	85.97	86.85	87.38	85.61				
		81.08	76.63	60.52					12.12.2007
	86.65	78.44	72.11	82.73					
	77.88	69.00	67.42	61.98	70.97	53.16	60.42	63.91	28.04.2008
	77.72	71.16	71.09	71.96	70.40	61.85	63.57	64.20	
	84.13	88.73	89.09	79.66					08.05.2008
	82.47	85.91	86.67	84.58					

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Apoptotiske celler	7.18	8.83	8.00						20.11.2007
	7.48	8.89	6.20						
	7.35	6.58	7.50	7.66	8.51				11.12.2007
	6.84	7.67	7.94	8.16	8.13				
		10.56	11.94	19.02					12.12.2007
	8.58	10.72	10.67	9.98					
	9.73	9.70	12.34	10.66	9.56	22.03	14.42	14.59	28.04.2008
	10.20	9.74	8.63	8.04	8.24	14.77	15.62	16.33	
	9.64	8.05	7.06	10.66					08.05.2008
	9.47	8.95	9.98	10.18					

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Nekrotiske celler	4.26	6.59	11.93						20.11.2007
	4.22	5.86	10.39						
	6.96	4.37	4.89	3.59	6.87				11.12.2007
	8.63	6.36	5.21	4.47	6.26				
		8.35	11.43	20.45					12.12.2007
	4.77	10.84	17.21	7.29					
	12.40	21.30	20.24	27.36	19.46	24.81	25.15	21.49	28.04.2008
	12.09	19.10	20.28	20.00	21.36	23.37	20.81	19.47	
	6.23	3.21	3.85	9.69					08.05.2008
	8.06	5.14	3.36	5.25					

## 40°C vannbad

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Viabile celler	73,74	86,33	85,58		20.11.2007
	79,11	86,41	89,12		
	63,78	77,04	74,34	82,38	12.12.2007
	58,97	76,61	74,08	82,21	
	84,30	84,59	83,89	86,98	08.05.2008
	86,24	86,83	82,27	82,75	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Apoptotiske celler	9,55	8,95	10,57		20.11.2007
	8,75	8,67	7,29		
	14,68	10,70	15,02	11,27	12.12.2007
	18,63	12,86	14,66	11,21	
	9,28	9,93	10,61	9,51	08.05.2008
	9,03	9,21	11,18	10,27	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Nekrotiske celler	16,72	4,71	3,84		20.11.2007
	12,13	4,92	3,58		
	21,53	12,26	10,65	6,35	12.12.2007
	22,39	10,53	11,26	6,59	
	6,43	5,48	5,50	3,51	08.05.2008
	4,73	3,95	6,54	6,98	

## 42°C vannbad

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Viable celler	85,68	86,36	80,44		20.11.2007
	88,16	84,98	81,66		
	77,34	76,35	69,88	75,95	12.12.2007
	42,82	72,93	70,50	75,61	
	82,07	77,40	80,04	79,05	08.05.2008
	79,36	79,65	82,08	80,05	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Apoptotiske celler	8,53	8,89	10,35		20.11.2007
	6,77	8,42	9,99		
	14,29	17,05	19,09	16,89	12.12.2007
	25,46	17,74	17,96	16,63	
	13,88	14,96	14,29	16,68	08.05.2008
	14,14	16,00	13,96	15,18	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Nekrotiske celler	5,80	4,75	9,23		20.11.2007
	5,07	6,60	8,35		
	8,36	6,59	11,04	7,15	12.12.2007
	31,72	9,33	11,54	7,76	
	4,05	7,63	5,66	4,26	08.05.2008
	6,49	4,35	3,95	4,78	

## 43°C vannbad

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Viabile celler	67,25	52,28	56,12	53,00	24.04.2008
		52,18			
	70,93	53,55	64,56	56,04	
	76,22	75,03	72,72	75,38	07.05.2008
	78,16	72,55	75,64	67,70	
	81,73	82,32	80,31	81,95	08.05.2008
	82,05	79,76	81,28	83,11	
	82,86	78,38	80,03	76,54	13.05.2008
	77,81	77,16	75,84	75,67	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Apoptotiske celler	22,05	36,48	29,30	35,64	24.04.2008
		35,64			
	15,83	34,76	24,32	33,43	
	18,66	22,29	22,26	20,12	07.05.2008
	16,89	23,00	18,98	27,74	
	12,05	14,52	13,90	14,71	08.05.2008
	13,56	14,64	12,53	13,27	
	8,77	15,93	15,09	15,60	13.05.2008
	10,66	18,52	17,23	16,11	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Nekrotiske celler	10,71	11,24	14,58	11,35	24.04.2008
		12,19			
	13,25	10,70	11,12	10,53	
	5,12	2,68	5,02	4,50	07.05.2008
	4,95	4,45	5,38	4,57	
	6,21	3,15	5,79	3,35	08.05.2008
	4,39	5,61	6,20	3,62	
	8,37	5,68	4,88	7,87	13.05.2008
	11,53	4,33	6,93	8,22	

## 44°C vannbad

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Viabile celler	70,25	75,27	67,61						20.11.2007
	82,88	77,03	68,75						
	61,33	52,53	47,12	45,56	41,70				11.12.2007
	54,66	51,27	45,83	42,77	43,92				
	50,40	50,49	45,68	50,10					12.12.2007
	56,71	57,12	44,93	56,90					
	68,06	55,18	64,19	62,45					24.04.2008
	71,12	57,86	65,76	54,97					
	69,84	74,62	66,79	63,10	70,56	35,17	56,45	36,49	28.04.2008
	68,42	66,33	50,97	61,42	64,50	25,76	53,91	34,02	
	64,93	67,31	66,47	67,75					07.05.2008
	69,64	61,97	59,67	46,00					
	73,81	64,22	66,80	67,44					08.05.2008
	68,43	65,67	68,23	69,28					
	69,75	53,63	59,85	71,36					13.05.2008
	77,10	56,50	61,75	50,29					

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Apoptotiske celler	10,30	20,09	27,62						20.11.2007
	6,69	17,79	27,05						
	31,99	43,23	46,97	50,07	47,38				11.12.2007
	37,00	44,62	48,20	52,64	48,63				
	18,34	34,39	42,73	41,49					12.12.2007
	17,49	33,09	42,95	35,78					
	13,40	27,15	22,32	27,16					24.04.2008
	12,80	25,71	19,44	30,64					
	10,15	9,96	19,71	13,00	10,67	36,90	19,12	37,38	28.04.2008
	11,17	17,70	27,28	18,66	16,06	48,67	19,61	41,12	
	28,67	28,64	29,29	28,52					07.05.2008
	24,47	34,54	36,09	49,89					
	16,93	31,55	27,82	25,22					08.05.2008
	23,08	29,87	25,72	25,22					
	20,98	38,91	30,59	20,66					13.05.2008
	12,31	36,06	30,14	41,30					

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Nekrotiske celler	19,45	4,64	4,76						20.11.2007
	10,44	5,17	4,21						
	6,68	4,43	5,92	4,37	10,92				11.12.2007
	8,32	4,10	5,97	4,59	7,45				
	31,27	15,12	11,58	8,40					12.12.2007
	25,80	9,79	12,13	7,31					
	18,55	17,67	13,48	10,38					24.04.2008
	16,09	16,43	14,80	14,40					
	20,01	15,41	13,50	23,90	18,77	27,93	24,43	26,13	28.04.2008
	20,41	15,97	21,75	19,91	19,44	25,57	26,49	24,86	
	6,41	4,05	4,23	3,74					07.05.2008
	5,88	3,49	4,23	4,12					
	9,27	4,24	5,37	7,32					08.05.2008
	8,49	4,46	6,04	5,49					
	9,26	7,47	9,57	7,98					13.05.2008
	10,59	7,45	8,11	8,40					



## 45°C vannbad

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Viabile celler	69,83	59,00	64,96	54,92	24.04.2008
	69,88	56,24	61,90	53,85	
	75,64	60,78	52,99	64,47	07.05.2008
	73,36	62,41	72,13	49,88	
	63,69	64,42	66,92	59,82	08.05.2008
	70,08	63,17	73,89	68,29	
	69,30	49,68	64,14	72,85	13.05.2008
	65,86	61,67	63,30	54,12	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Apoptotiske celler	14,04	22,96	20,94	30,38	24.04.2008
	14,64	28,37	23,18	30,34	
	17,88	31,09	42,46	28,89	07.05.2008
	18,04	31,44	21,76	44,21	
	28,08	32,09	26,63	34,25	08.05.2008
	24,07	29,29	21,94	27,26	
	22,56	44,12	25,86	17,13	13.05.2008
	26,30	26,22	22,55	39,06	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Nekrotiske celler	16,14	18,03	14,09	14,71	24.04.2008
	15,48	15,38	14,91	15,81	
	6,48	8,14	4,56	6,65	07.05.2008
	8,61	6,15	6,11	5,91	
	8,23	3,49	6,45	5,94	08.05.2008
	5,85	7,54	4,17	4,45	
	8,14	6,21	10,00	10,02	13.05.2008
	7,84	12,11	14,15	6,81	

## 46°C vannbad

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Viabile celler	79,91	82,77	75,50		20.11.2007
	79,64	79,84	67,66		
	62,86	70,32	47,78	77,15	12.12.2007
	60,02	72,69	46,34	72,86	
	75,39	70,10	73,26	67,75	08.05.2008
	76,50	75,11	66,07	70,53	
	79,81		77,76	78,44	13.05.2008
	80,81	77,11	78,40	80,64	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Apoptotiske celler	6,58	8,64	8,53		20.11.2007
	9,26	8,59	8,73		
	12,82	8,54	9,83	8,37	12.12.2007
	15,70	8,51	10,66	9,21	
	11,72	15,35	16,16	21,38	08.05.2008
	13,47	15,53	25,39	19,54	
	9,18		10,75	14,14	13.05.2008
	9,30	8,67	7,36	10,97	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Nekrotiske celler	13,52	8,59	15,98		20.11.2007
	11,10	11,57	23,60		
	24,32	21,15	42,40	14,48	12.12.2007
	24,28	18,81	43,00	17,94	
	12,90	14,54	10,59	10,87	08.05.2008
	10,03	9,35	8,54	9,93	
	11,01		11,49	7,42	13.05.2008
	9,89	14,23	14,24	8,38	

## 48°C vannbad

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Viabile celler	27,88	70,94	61,53		20.11.2007
	64,10	71,96	72,96		
	29,43	57,28	55,41	60,52	12.12.2007
	29,94	62,22	60,16	75,41	
	80,99	79,55	75,36	78,60	08.05.2008
	75,64	80,67	77,29	78,91	
	81,68	79,65	82,67	82,29	13.05.2008
	81,69	81,45	74,08	79,54	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Apoptotiske celler	8,40	6,71	6,19		20.11.2007
	5,46	6,73	6,59		
	10,72	7,02	7,03	6,98	12.12.2007
	9,62	7,92	7,74	5,45	
	8,77	8,04	9,99	10,70	08.05.2008
	8,21	9,41	10,08	11,62	
	5,13	9,05	6,16	7,32	13.05.2008
	4,95	8,56	8,14	7,90	

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	Dato
Nekrotiske celler	63,72	22,36	32,26		20.11.2007
	30,45	21,31	20,48		
	59,85	35,70	37,56	32,50	12.12.2007
	60,44	29,86	32,10	19,15	
	10,24	12,40	14,65	10,70	08.05.2008
	16,15	9,92	12,63	9,48	
	13,19	11,30	11,16	10,39	13.05.2008
	13,37	9,99	17,78	12,56	

## 50°C vannbad

	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Tid etter 30min i vannbad:	42.60	44.23	53.53						20.11.2007
Viable celler	33.30	39.20	38.07						
	18.39	18.93	15.48	19.09	12.31				11.12.2007
	14.54	20.12	16.40	17.97	15.43				
	25.38	21.63	28.38	27.31					12.12.2007
	23.02	21.80	30.51	24.75					
	21.92	10.76	9.32	10.35	8.40	6.44	8.86	9.40	28.04.2008
	21.43	8.58	8.31	9.21	10.03	8.33	7.78	10.23	
	75.98	73.63	79.06	71.81					08.05.2008
	73.24	70.84	69.15	73.68					
	26.87	24.62	25.38	33.20					13.05.2008
	28.75	20.41	23.20	29.75					

	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Tid etter 30min i vannbad:	4.75	7.85	6.15						20.11.2007
Apoptotiske celler	6.16	6.32	6.57						
	4.74	3.38	4.07	4.52	4.05				11.12.2007
	4.44	3.47	4.29	4.83	4.53				
	6.86	5.51	5.24	4.04					12.12.2007
	6.28	5.49	5.81	5.35					
	6.24	7.69	9.23	8.14	8.89	13.43	12.55	15.14	28.04.2008
	6.83	7.00	7.97	6.78	9.87	15.02	12.11	13.18	
	7.23	7.51	7.27	7.81					08.05.2008
	6.55	7.93	6.40	7.16					
	5.41	4.64	6.07	6.95					13.05.2008
	6.74	5.97	6.16	6.54					

Tid etter 30min i vannbad:	0	45	90	135	180	240	300	360	Dato
Nekrotiske celler	52,65	47,92	40,33						20.11.2007
	60,53	54,47	55,36						
	76,86	77,69	80,45	76,40	83,64				11.12.2007
	81,03	76,41	79,31	77,20	80,04				
	67,76	72,86	66,39	68,66					12.12.2007
	70,71	72,71	63,68	69,90					
	71,86	81,55	81,44	81,51	82,71	80,13	78,58	75,46	28.04.2008
	71,74	84,42	83,72	84,02	80,11	76,64	79,68	76,58	
	16,80	18,86	13,67	20,37					08.05.2008
	20,21	21,23	24,45	19,16					
	67,72	70,74	68,56	59,85					13.05.2008
	64,50	73,61	70,64	63,72					

# 0min

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Viable celler		88.55	73.74	85.68		70.25		79.91	27.88	42.60	20.11.2007
		88.31	79.11	88.16		82.88		79.64	64.10	33.30	
	89.76	85.69				61.33				18.39	11.12.2007
	86.72	84.52				54.66				14.54	
	88.20		63.78	77.34		50.40		62.86	29.43	25.38	12.12.2007
	85.06	86.65	58.97	42.82		56.71		60.02	29.94	23.02	
		63.25			67.25	68.06	69.83				24.04.2008
						71.12	69.88				
	62.06				70.93						
		77.88				69.84				21.92	28.04.2008
		77.72				68.42				21.43	
					76.22	64.93	75.64				
					78.16	69.64	73.36				
	84.12	84.13	84.30	82.07	81.73	73.81	63.69	75.39	80.99	75.98	08.05.2008
	70.75	82.47	86.24	79.36	82.05	68.43	70.08	76.50	75.64	73.24	
					82.86	69.75	69.30	79.81	81.68	26.87	13.05.2008
					77.81	77.10	65.86	80.81	81.69	28.75	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Apoptotiske celler		7.18	9.55	8.53		10.30		6.58	8.40	4.75	20.11.2007
		7.48	8.75	6.77		6.69		9.26	5.46	6.16	
	5.77	7.35				31.99				4.74	11.12.2007
	7.27	6.84				37.00				4.44	
	7.58		14.68	14.29		18.34		12.82	10.72	6.86	12.12.2007
	8.61	8.58	18.63	25.46		17.49		15.70	9.62	6.28	
		12.72			22.05	13.40	14.04				24.04.2008
						12.80	14.64				
	11.96				15.83						
		9.73				10.15				6.24	28.04.2008
		10.20				11.17				6.83	
					18.66	28.67	17.88				
					16.89	24.47	18.04				
	11.78	9.64	9.28	13.88	12.05	16.93	28.08	11.72	8.77	7.23	08.05.2008
	11.92	9.47	9.03	14.14	13.56	23.08	24.07	13.47	8.21	6.55	
					8.77	20.98	22.56	9.18	5.13	5.41	13.05.2008
					10.66	12.31	26.30	9.30	4.95	6.74	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50 Dato
Mekrotiske celler		4,26	16,72	5,80		19,45		13,52	63,72	52,65 20.11.2007
		4,22	12,13	5,07		10,44		11,10	30,45	60,53
	4,47	6,96				6,68				76,86 11.12.2007
	6,00	8,63				8,32				81,03
	4,22		21,53	8,36		31,27		24,32	59,85	67,76 12.12.2007
	6,34	4,77	22,39	31,72		25,80		24,28	60,44	70,71
	24,03				10,71	18,55	16,14			
						16,09	15,48			24.04.2008
	25,98				13,25					
		12,40				20,01				71,86 28.04.2008
		12,09				20,41				71,74
					5,12	6,41	6,48			
					4,95	5,88	8,61			
	4,10	6,23	6,43	4,05	6,21	9,27	8,23	12,90	10,24	16,80 08.05.2008
	17,34	8,06	4,73	6,49	4,39	8,49	5,85	10,03	16,15	20,21
					8,37	9,26	8,14	11,01	13,19	67,72 13.05.2008
					11,53	10,59	7,84	9,89	13,37	64,50

## 90min

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Viabile celler		79,89	85,58	80,44		67,61		75,50	61,53	53,53	20.11.2007
		83,41	89,12	81,66		68,75		67,66	72,96	38,07	
		87,61				47,12				15,48	11.12.2007
		86,85				45,83				16,40	
	69,19	76,63	74,34	69,88		45,68		47,78	55,41	28,38	12.12.2007
	69,95	72,11	74,08	70,50		44,93		46,34	60,16	30,51	
	67,54				56,12	64,19	64,96				24.04.2008
	67,38					65,76	61,90				
	65,29										
	67,56				64,56						
		67,42				66,79				9,32	28.04.2008
		71,09				50,97				8,31	
					72,72	66,47	52,99				07.05.2008
					75,64	59,67	72,13				
	83,55	89,09	83,89	80,04	80,31	66,80	66,92	73,26	75,36	79,06	08.05.2008
	85,50	86,67	82,27	82,08	81,28	68,23	73,89	66,07	77,29	69,15	
					80,03	59,85	64,14	77,76	82,67	25,38	13.05.2008
					75,84	61,75	63,30	78,40	74,08	23,20	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Apoptotiske celler		8,00	10,57	10,35		27,62		8,53	6,19	6,15	20.11.2007
		6,20	7,29	9,99		27,05		8,73	6,59	6,57	
		7,50				46,97				4,07	11.12.2007
		7,94				48,20				4,29	
	11,11	11,94	15,02	19,09		42,73		9,83	7,03	5,24	12.12.2007
	10,53	10,67	14,66	17,96		42,95		10,66	7,74	5,81	
	24,58				29,30	22,32	20,94				24.04.2008
	24,21					19,44	23,18				
	25,59										
	22,70				24,32						
		12,34				19,71				9,23	28.04.2008
		8,63				27,28				7,97	
					22,26	29,29	42,46				07.05.2008
					18,98	36,09	21,76				
	8,08	7,06	10,61	14,29	13,90	27,82	26,63	16,16	9,99	7,27	08.05.2008
	7,61	9,98	11,18	13,96	12,53	25,72	21,94	25,39	10,08	6,40	
					15,09	30,59	25,86	10,75	6,16	6,07	13.05.2008
					17,23	30,14	22,55	7,36	8,14	6,16	



Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Mekrotiske celler		11,93	3,84	9,23		4,76		15,98	32,26	40,33	20.11.2007
		10,39	3,58	8,35		4,21		23,60	20,48	55,36	
		4,89				5,92				80,45	11.12.2007
		5,21				5,97				79,31	
	19,70	11,43	10,65	11,04		11,58		42,40	37,56	66,39	12.12.2007
	19,52	17,21	11,26	11,54		12,13		43,00	32,10	63,68	
	7,89				14,58	13,48	14,09				
	8,40					14,80	14,91				
	9,13										
	9,74				11,12						
		20,24				13,50				81,44	28.04.2008
		20,26				21,75				83,72	
					5,02	4,23	4,56				
					5,38	4,23	6,11				
	8,37	3,85	5,50	5,66	5,79	5,37	6,45	10,59	14,65	13,67	08.05.2008
	6,90	3,36	6,54	3,95	6,20	6,04	4,17	8,54	12,63	24,45	
					4,88	9,57	10,00	11,49	11,16	68,56	13.05.2008
					6,93	8,11	14,15	14,24	17,78	70,64	

# 135min

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Viabile celler	85.45	88.75				45.56				19.09	11.12.2007
	84.23	87.38				42.77				17.97	
	79.34	60.52	82.38	75.95		50.10		77.15	60.52	27.31	12.12.2007
	80.18	82.73	82.21	75.61		56.90		72.86	75.41	24.75	
					53.00	62.45	54.32				24.04.2008
					56.04	54.97	53.85				
		61.98				63.10				10.35	28.04.2008
		71.96				61.42				9.21	
						67.75	64.47				07.05.2008
						46.00	49.88				
	83.77	79.66	86.98	79.05	81.95	67.44	59.82	67.75	78.60	71.81	08.05.2008
	84.31	84.58	82.75	80.05	83.11	69.28	68.29	70.53	78.91	73.68	
					76.54	71.36	72.85	78.44	82.29	33.20	13.05.2008
					75.67	50.29	54.12	80.64	79.54	29.75	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Apoptotiske celler	8.82	7.66				50.07				4.52	11.12.2007
	9.12	8.16				52.64				4.83	
	10.57	19.02	11.27	16.89		41.49		8.37	6.98	4.04	12.12.2007
	9.81	9.98	11.21	16.63		35.78		9.21	5.45	5.35	
					35.64	27.16	30.38				24.04.2008
						30.64	30.34				
					33.43						
		10.66				13.00				8.14	28.04.2008
		8.04				18.66				6.78	
											07.05.2008
					20.12	28.52	28.89				
					27.74	49.89	44.21				
	11.60	10.66	9.51	16.68	14.71	25.22	34.25	21.38	10.70	7.61	08.05.2008
	10.50	10.18	10.27	15.18	13.27	25.22	27.26	19.54	11.62	7.16	
					15.60	20.66	17.13	14.14	7.32	6.95	13.05.2008
					16.11	41.30	39.06	10.97	7.90	6.54	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Mekrotiske celler	5,73	3,59				4,37				76,40	11.12.2007
	6,66	4,47				4,59				77,20	
	10,09	20,45	6,35	7,15		8,40		14,48	32,50	68,66	12.12.2007
	10,00	7,29	6,59	7,76		7,31		17,94	19,15	69,90	
					11,35	10,38	14,71				24.04.2008
						14,40	15,81				
					10,53						
		27,36				23,90				81,51	28.04.2008
		20,00				19,91				84,02	
					4,50	3,74	6,65				07.05.2008
					4,57	4,12	5,91				
					3,35	7,32	5,94	10,87	10,70	20,37	08.05.2008
	4,64	9,69	3,51	4,26	3,62	5,49	4,45	9,93	9,48	19,16	
	5,18	5,25	6,98	4,78	7,87	7,98	10,02	7,42	10,39	59,65	13.05.2008
					8,22	8,40	6,81	8,38	12,56	63,72	

## 180min

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Viabile celler		84,62				41,70				12,31	11.12.2007
		85,61				43,92				15,43	
		70,97				70,56				8,40	28.04.2008
		70,40				64,50				10,03	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Apoptotiske celler		8,51				47,38				4,05	11.12.2007
		8,13				48,63				4,53	
		9,56				10,67				8,89	28.04.2008
		8,24				16,06				9,87	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Nekrotiske celler		6,87				10,92				83,64	11.12.2007
		6,26				7,45				80,04	
		19,46				18,77				82,71	28.04.2008
		21,36				19,44				80,11	

## 240min

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Viabile celler		53,16				35,17				6,44	28.04.2008
		61,85				25,76				8,33	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Apoptotiske celler		22,03				36,90				13,43	28.04.2008
		14,77				48,67				15,02	

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50	Dato
Nekrotiske celler		24,81				27,93				80,13	28.04.2008
		23,37				25,57				76,64	

## 300min

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50 Dato
Viåle celler		60,42				56,45				8,66
		63,57				53,91				7,78
Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50 Dato
Apoptotiske celler		14,42				19,12				12,55
		15,62				19,61				12,11
Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50 Dato
Nekrotiske celler		25,15				24,43				78,58
		20,81				26,49				79,68

## 360min

Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50 Dato
Viåle celler		63,91				36,49				9,40
		64,20				34,02				10,23
Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50 Dato
Apoptotiske celler		14,59				37,38				15,14
		16,33				41,12				13,18
Temperatur:	Inkubatorskap	37	40	42	43	44	45	46	48	50 Dato
Nekrotiske celler		21,49				26,13				75,46
		19,47				24,86				76,58

# Bibliografi

- [1] Antigenics. Heat shock proteins: basics. <http://qs-21.com/products/tech/hsp/>, 15.april, 2008.
- [2] T.A.M. Egeland. Photoinduces cell death in jurkat cells: A flow cytometric study using endogenous and exogenous protoporphyrin ix as photosensitizer. Master's thesis, Norwegian University of Science and Technology, Department of Physics, 2006.
- [3] Wikipedia. Cell cycle. [http://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_cycle](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle), 15.april, 2008.
- [4] K.G. Sæterbø and B. Kuitert. *PI-fargeprosedyre for måling av DNA-innhold*. NTNU, Institutt for fysikk, Biofysikk og medisinsk teknologi, April 2006.
- [5] Wikipedia. Mitosis. <http://en.wikipedia.org/wiki/Mitosis>, 15.april, 2008.
- [6] Biology Daily. Mitosis. <http://www.biologydaily.com/biology/Mitosis>, 24.mai, 2008.
- [7] forskning.no. Hvorfor kreftceller lever evig. <http://www.forskning.no/artikler/2003/februar/1044283144.92>, 15.april, 2008.
- [8] G. Majno og I. Joris. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, 146(1):3–15, 1995.
- [9] M. Raff. Cell suicide for beginners. *Nature*, 396:119–122, 1998.
- [10] M. van Engeland, L.J.W. Nieland, F.C.S. Ramaekers, B. Schutte, and C.P.M. Reutelingsperger. Annexin v-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31:1–9, 1998.

- [11] V.M. Gonzalez, M.A. Fuertes, C. Alonso, and J.M. Perez. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular pharmacology*, 59 (4):657–663, 2001.
- [12] W. Fiers, R. Beyaert, W. Declercq, and P. Vandenabeele. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 18:7719–7730, 1999.
- [13] S.Y. Proskuryakov, A.G. Konoplyannikov, and V.L. Gabai. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental cell research*, 283 (1):1–16, 2003.
- [14] M. Leist and P. Nicotera. The shape of cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 236:1–9, 1997.
- [15] J.J. Lemasters. Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*, 129:351–360, 2005.
- [16] L.F. Barros, T. Hermosilla, and J. Castro. Nectoric volume increase and the early physiology of necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 130:401–409, 2001.
- [17] Wikipedia. Heat shock protein. [http://en.wikipedia.org/wiki/Heat\\_shock\\_proteins](http://en.wikipedia.org/wiki/Heat_shock_proteins), 15.april, 2008.
- [18] Wikipedia. Atomic mass unit. [http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic\\_mass\\_unit](http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_mass_unit), 26.mai, 2008.
- [19] H.M. Beere and D.R. Green. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *TRENDS in Cell Biology*, 11:6–10, 2001.
- [20] G.C. Li and Z. Werb. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:3218–3222, 1982.
- [21] A. Samali and S. Orrenius. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress & Chaperones*, 3(4):228–236, 1998.
- [22] H. Zou, Y. Li, X. Liu, and X. Wang. An apaf-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:11549–11556, 1999.
- [23] H.M. Shapiro. *Practical flow cytometry*. Wiley-Liss, New York, fourth edition, 2003.

- [24] A.L. Givan. *Flow cytometry: First principles*. Wiley-Liss, New York, second edition, 2001.
- [25] K.G. Sæterbø. *Kvalitetshåndbok - Dyrking av celler i suspensjon*. NTNU, Institutt for fysikk, Biofysikk og medisinsk teknologi, September 2007.
- [26] K.G. Sæterbø. *Kvalitetshåndbok - Tillaging av medium og løsninger til celledyrkning*. NTNU, Institutt for fysikk, Biofysikk og medisinsk teknologi, September 2007.
- [27] Roche Diagnostics GmbH. Annexin-v-fluos. <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1828681a.pdf>, August, 2005.
- [28] K.G. Sæterbø. *Kvalitetshåndbok - Måling av celledød vha Annexin V og PI*. NTNU, Institutt for fysikk, Biofysikk og medisinsk teknologi, Juli 2006.
- [29] I. Vermes, C. Haanen, and C. Reutelingsperger. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243:167–190, 2000.
- [30] Wikipedia. Standardavvik. <http://no.wikipedia.org/wiki/Standardavvik>, 22.mai, 2008.
- [31] Wikipedia. Standarderror. [http://en.wikipedia.org/wiki/Standard\\_error\\_\(statistics\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Standard_error_(statistics)), 22.mai, 2008.
- [32] Ukjent. *Cellekinetikk - Måling av DNA gjennom cellesyklus med flow cytometri*. Emne TFY 4260 Cellebiologi og cellulær biofysikk, labøving 6, Vår 2006.