

Universitetet i Oslo

Det odontologiske fakultetet

Institutt for oral biologi



Masteroppgave

**ORALE KREFTMODELLER GJENSPEILER
MUNNHULEKREFT - EN MOLEKYLÆR STUDIE**

Av student odont: Louise Linn Lam

Veiledere:

Førsteamanuensis Tine M. Sjøland

Postdoktor/spesialistkandidat Ingvild J. Brusevold

[2015]

Forord

Laboratoriearbeidet i denne oppgaven ble utført ved Det odontologiske fakultetet, institutt for Oral Biologi i forbindelse med mitt studentforskningsstipend i 2012-2013 og er en del av graden Master i odontologi.

Kreft og kreftforskning er et stort og spennende felt som jeg begynte å interessere meg for i 2. semester. Grunnen til at jeg valgte dette emnet er at jeg liker å jobbe på laboratoriet, i tillegg til ønsket om å lære mer om kreftsykdom generelt og munnhulekreft spesielt.

I denne oppgaven ønsker jeg først å fortelle litt om normal cellulær kommunikasjon før jeg går over til å se nærmere på kreftutvikling og kreftcellers atferd. Videre vil jeg gå inn på immunhistokjemi som metode. Til slutt følger en presentasjon av mitt arbeid på laboratoriet.

Jeg vil gjerne rette stor takk til mine veiledere, førsteamanuensis Tine M. Sølund og postdoktor/spesialistkandidat Ingvild J. Brusevold for mye hjelp, støtte og gode råd under arbeidet med masteroppgaven. Stor takk rettes også til Olav Schreurs for hjelp på laboratoriet.

Innholdsfortegnelse

FORORD	III
FORKORTELSER	VII
SAMMENDRAG	1
INNLEDNING	3
DEL 1 - TEORIDEL	5
1a - Normal celleregulering og -signalering	5
1b - Hvordan endres normale cellulære prosesser ved kreftutvikling?	8
Kreftutvikling og mutasjoner	8
Cellesyklus og proliferasjon.....	11
Ki67.....	12
Cellevekst og overlevelse.....	13
Apoptose.....	14
Survivin.....	16
Cleaved-caspase 3	16
Invasjon og metastasering	17
E-cadherin	17
β -catenin.....	18
1c - Karakteristika av en kreftcelle	20
DEL 2 - LABORATORIEARBEID	22
Materialer	22
Snitting	24
Metoden.....	25

Fotografering og scoring	30
RESULTATER	31
DISKUSJON AV LABORATORIEARBEIDET	35
Diskusjon av resultater	35
Metodologisk betraktning	38
Immunhistokjemi	39
KONKLUSJON	40
REFERANSER	42
VEDLEGG	44

Forkortelser

3D-modell	3-dimensjonal co-kultur organotypisk munnhulekreftmodell
ABC^{HRP}	Avidin-Biotin-Complex, HorseRadish Peroxidase
Bcl-2	B-cell lymfom 2
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bax	Bcl-2-associated X protein
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
FADD	Fas-associated protein with death domain
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine 5'-triphosphate
H₂O₂	hydrogen peroxide
HIER	Heat-Induced Epitop Retrieval
HRP	HorseRadish Peroxidase
IAP	the inhibitor of apoptosis family
IHC	immunohistochemistry
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
MAPK	mitogen-activated protein kinases
mTOR	mammalian target of rapamycin
OSCC	oral squamous cell carcinoma/oral plateepitelkarsinom
PBS	phosphate buffered saline
PIP₃	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PI3-kinase	phosphatidylinositide 3-kinase
pRB	retinoblastoma protein

PTEN	phosphatase and tensin homolog
R-punkt	restriksjonspunkt
SEM	standard error of the mean
STAT	signal-transducer and activator of transcription
TNF	tumor necrosis factors
VEGF	vascular endothelial growth factor

Sammendrag

Munnhulekreft er en farlig tilstand på grunn av den høye dødeligheten. Dessuten er sykkeligheten er også høy. Oralt plateepitelkarsinom (OSCC) er den vanligste ondartede svulsten i munnen. Tall fra Kreftregisteret viser at ca. 36-46 % av pasientene med munnhulekreft dør i løpet av 5 år i Norge. Ved spredning til lymfeknuter på hals, halveres overlevelsesraten (oncolex.no). Det er derfor behov for bedre forståelse av sykdommen.

Immunhistokjemi (IHC) er en metode som brukes mye innen kreftforskning for å undersøke molekylære endringer i kreftsvulster. Vi har valgt å se på molekylære forandringer da dette kan danne grunnlag for utvikling av optimale prognostiske molekylære markører for OSCC. På basis av denne kunnskapen vil man på sikt kanskje kunne gi en individuelt tilpasset behandling, noe som ikke er mulig per idag.

I denne oppgaven benyttet vi IHC som metode for å undersøke uttrykk av noen molekyler av betydning for viktige cellulære prosesser som proliferasjon, overlevelse, apoptose og celleadhesjon. Forekomst av molekyler ble undersøkt i en 3-dimensjonal co-kultur organotypisk munnhulekreftmodell. Enkelte modeller ble tilsatt CoCl_2 (en hypoxihermer) og p38-hemmer. 3D-modellene ble dyrket av Sjøland og Brusevold i forbindelse med deres doktorgradsarbeider. Arbeidet som ble utført av meg i dette prosjektet var uttesting og optimalisering av antistoffer som ble brukt, alle IHC-farginger, samt fotografering og scoring av molekyluttrykk. I tillegg fikk jeg hjelp fra Brusevold med statistisk analyse.

Innledning

Denne oppgaven består av to deler, og målene med oppgaven er som følger:

Del 1: Teoridel

- a. Å opparbeide kunnskap om normal celleregulering og –signalering
- b. Å forstå hvordan normale cellulære prosesser endres ved kreftutvikling
- c. Å forstå hva som karakteriserer en kreftcelle

Del 2: Laboratoriarbeid

- a. Å undersøke uttrykk av ulike molekyler av betydning for celleproliferasjon, migrasjon, overlevelse og apoptose ved hjelp av immunhistokjemi.
- b. Å undersøke i hvilken grad disse molekylene påvirkes ved tilsetning av en hypoksi-hermer (CoCl_2) eller en signalvei-hemmer (p38-hemmer) i modellen.
- c. Å lære metoden immunhistokjemi og å mikroskopere.

I følge data fra Kreftregisteret var det totalt 232 774 personer i Norge med kreft pr 31.12.2013, hvorav 3323 tilfeller var munnhulekreft (kreft i leppe, tunge, spyttkjertler og andre steder i munnhulen). Insidensen (antallet nye tilfeller) av munnhulekreft var på 395 i 2013, derav 237 menn og 158 kvinner ¹. Forekomsten er høyere enn dette i Øst-Europa og deler av Asia. Selv om munnhulekreft utgjør en liten andel av alle krefttilfeller som rapporteres, er det en farlig tilstand på grunn av den høye dødeligheten. Fem års overlevelsesrate er på 53,6 % hos menn og 63,9 % hos kvinner (tallene er fra 2013) ². Tilsammenligning er 5-års overlevelse ved prostatakraft og brystkreft henholdsvis 91 % og 89 %. Disse er de to hyppigste formene for kreft hos menn og kvinner i Norge. Å overleve munnhulekreft er dessuten ofte forbundet med svært redusert livskvalitet. Graden av plagene etter behandling avhenger av tumors lokalisasjon, størrelse og stadium.

Oralt plateepitelkarsinom (OSCC) er den vanligste maligne tilstanden i munnhulen og utgjør ca. 90 % av krefttilfellene. Behandling av OSCC idag består hovedsakelig av kirurgi og strålebehandling, ofte i kombinasjon. I tillegg gis det også kjemoterapi til pasienter yngre enn 70 år med avansert kreft i stadium III og IV. Kjemoterapi gis også ved residiv når kirurgi og stråling ikke er aktuelt ³.

Pasienter med forventet dårlig prognose trenger en annen type behandling og oppfølging enn pasienter med forventet god prognose. Med dagens kliniske og histologiske metoder kan man si noe om prognose for en gruppe av pasienter, men metodene er ikke gode nok til å forutsi prognosen for den enkelte pasient. Dermed gis samme type behandling til pasienter innen en og samme prognosegruppe ⁴.

Når man skal studere molekytlære forandringer i kreftceller, brukes ofte kreftceller i kultur (todimensjonal). I en kreftsvulst er det imidlertid flere celletyper, samt at de er organisert i et 3-dimensjonalt vev. Derfor har det blitt utviklet 3D-modeller for bedre å etterligne *in vivo* situasjonen. Søland og Brusevold har i sitt doktorgradsarbeid konstruert en 3D-modell. 3D-modellen består av orale plateepitelkarsinomceller som dyrkes på en bindevevsmatriks med innstøpte humane fibroblaster ⁵.

Immunhistokjemi er en metode som ofte anvendes for å undersøke endringer og lokalisasjon av ulike molekyler i kreftsvulster. Ved IHC brukes et antistoff som er spesifikt rettet mot et antigen i det vevet man ønsker å undersøke. Metoden er en ikke-standardisert flertrinnsprosess som medfører at antigenet blir farget og kan dermed studeres i mikroskopet.

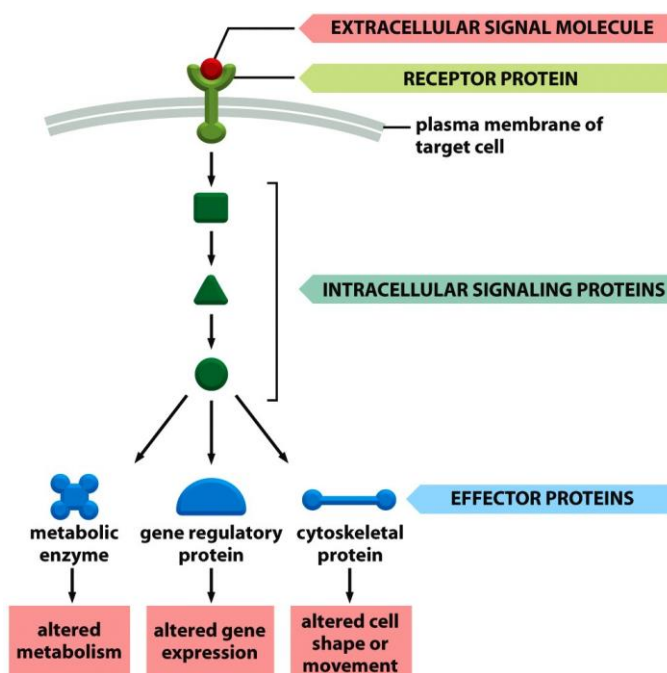
I denne oppgaven har vi valgt å undersøke uttrykk av overlevelsesmolekylet survivin, proliferasjonsmakøren Ki-67, apoptosemolekylet cleaved-caspase 3 og adhesjonsmolekylene β -catenin og E-cadherin i 3D-modeller ved hjelp av IHC. Dette er fordi disse molekylene ofte er påvirket ved kreftutvikling og metastasering.

Del 1 - Teoridel

1a – Normal celleregulering og -signalering

Kroppen vår er bygd opp av mange ulike celletyper som utfører spesifikke oppgaver. Man må derfor ha systemer som nøye regulerer aktiviteten til cellene for å møte kroppens behov. Disse systemene gjør at cellene kan kommunisere med hverandre, både innenfor samme vev (kort avstand) og mellom forskjellige vev (lang avstand). All kommunikasjon skjer ved at signalmolekyler binder seg til sine spesifikke reseptorer. Noen signalstoffer er lipofile og kan diffundere gjennom cellemembranen og binde seg til intracellulære reseptorer i cytoplasma eller i kjernen; mens de fleste signalstoffer binder seg til reseptorer som ligger i cellemembranen. Det er 3 hovedgrupper av reseptorer: ligandstyrte ionekanaler, G-proteinkoblede reseptorer og enzymkoblede reseptorer ⁶.

Når en plasmamembran-reseptor blir aktivert av et ekstracellulært signal, overføres signalet til innsiden av cellen. Ett eller flere intracellulære signalmolekyler vil dermed bli dannet. Disse overfører informasjon fra den aktiverte reseptoren til effektorproteiner i cytosol eller kjerne. En serie av intracellulære reaksjoner initieres for å regulere cellenes aktivitet som metabolisme, proliferasjon, overlevelse, apoptose osv (Figur 1) ⁶.



Figur 1- Cellesignalering

© 2008 from *Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition* by Alberts et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

Denne figuren viser en enkel intracellulær signaleringsvei som aktiveres av et ekstracellulært signalmolekyl. Binding av signalmolekylet til plasmamembran-reseptor fører til aktivering av en eller flere intracellulære signalveier mediert av en rekke intracellulære signalproteiner. En eller flere av disse intracellulære signalmolekyler forandrer aktiviteter av effektorproteiner og dermed cellens aktivitet.

Signaleringsveier og signaltransduksjon i cellene er veldig komplekse. Enkelte signalmolekyler kan bindes til flere reseptortyper og gi ulike responser. Samme signalmolekyl og samme reseptortype kan også gi ulike responser i ulike celletyper og ulike situasjoner. Aktivering av en reseptor kan dermed føre til mange ulike responser. Likeledes kan en spesifikk respons initieres av flere forskjellige eksterne signaler, såkalt «cross-talk» mellom signalveier.

Det er veldig viktig at celledesignal kan slås av når det ikke lenger er behov for det. Dette kan skje på flere måter: (Figur 2)

- (A): endocytose av signalmolekyl-reseptor kompleks
- (B): nedregulering av reseptor
- (C): inaktivering av reseptor
- (D): inaktivering/degradering av intracellulære signalmolekyler
- (E): produksjon av inhiberende protein som blokkerer signaltransduksjonen

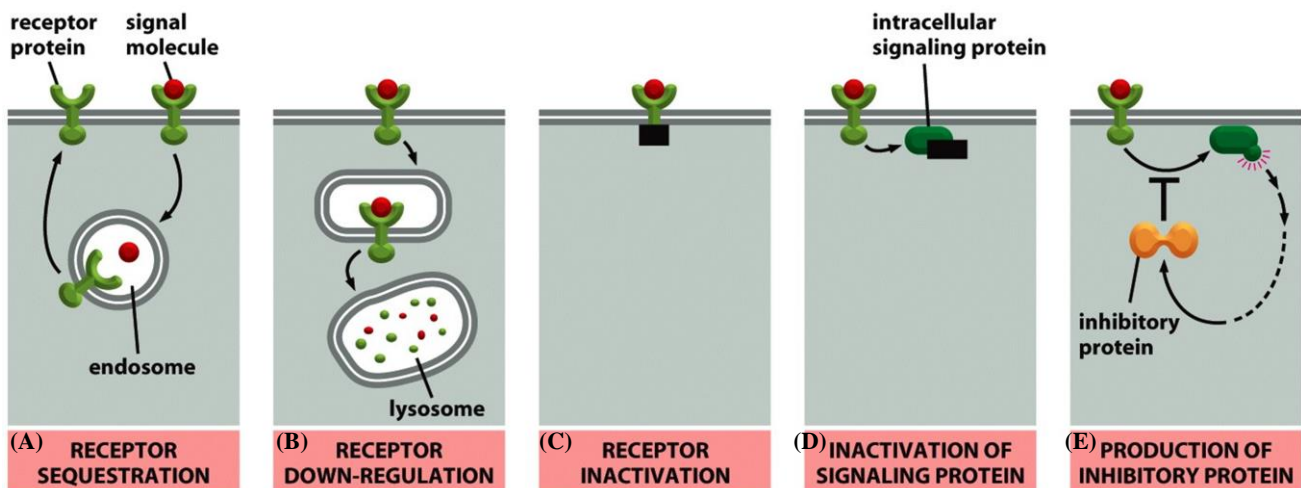


Figure 15-29 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figur 2: Ulike mekanismer for avslåing av celledesignal

© 2008 from Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition by Alberts et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

I tillegg til disse mekanismene fungerer mange intracellulære proteiner som brytere for å slå av og på deres egen aktivitet. Når de mottar et signal, vil de skifte fra en inaktiv til en aktiv konformasjon inntil et annet signal slår dem av (Figur 3).

To mekanismer som kan nevnes er:

- (A): fosforylering/defosforylering av proteiner
- (B): GTP/GDP-binding. Disse proteinene er i aktiv form når de binder GTP, og inaktiverer seg selv når GTP hydrolyseres til GDP.

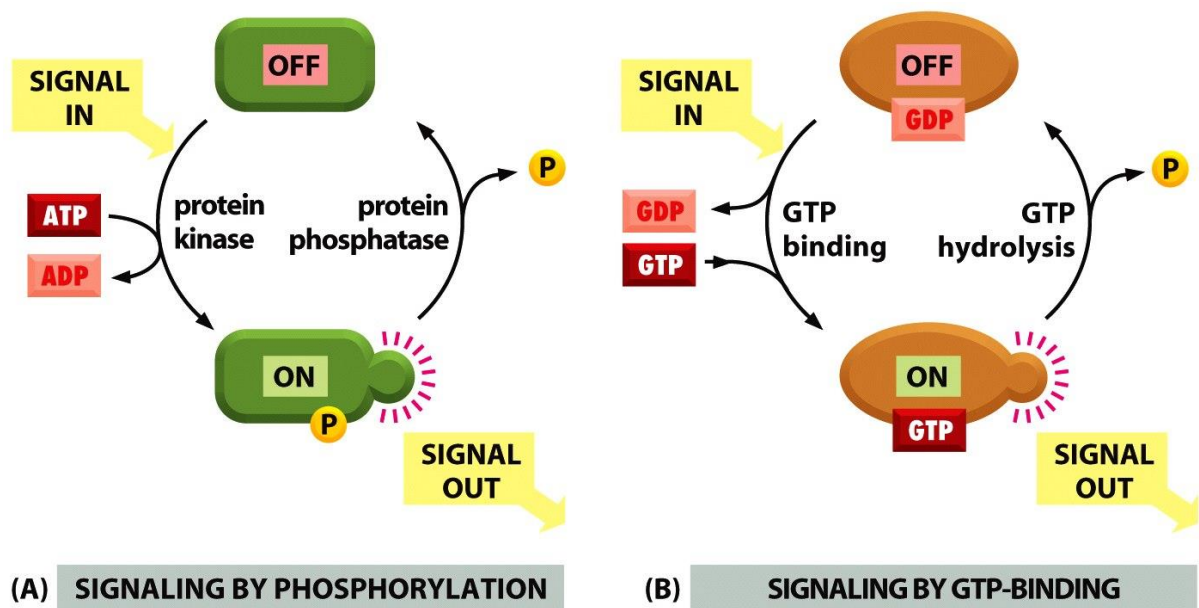


Figure 15-18 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figur 3 - Intracellulære «brytere»

© 2008 from Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition by Alberts et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

(A) Et intracellulært signalprotein skifter fra inaktiv form til aktiv form ved fosforylering, dvs. at signalproteinet får en fosfatgruppe fra ATP som blir til ADP. Reaksjonen katalyseres av en proteinkinase. For å slå av signalet fjernes fosfatgruppen fra signalproteinet. Dette skjer ved hjelp av en proteinfosfatase.

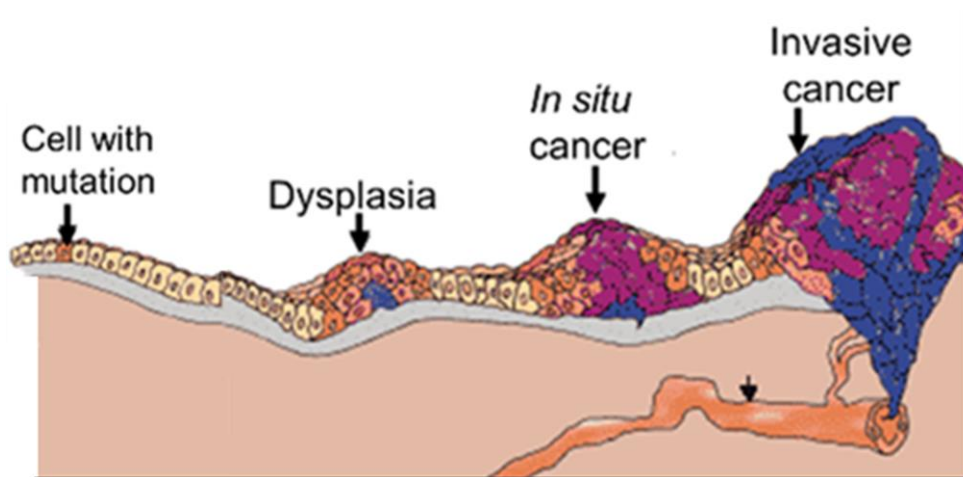
(B) Et GTP-bundet protein er aktivt når det binder GTP og blir inaktivt når GTP blir byttet ut med GDP

1b - Hvordan endres normale cellulære prosesser ved kreftutvikling?

Kreftutvikling og mutasjoner

Kreftutvikling er et resultat av mutasjoner i gener som styrer celledeling, celledød og –differensiering. Det er anslått at det vanligvis må muteres 5-7 ulike gener i samme celle for å få en kreftcelle. Det har også blitt hevdet at det tidlig i kreftutviklingen må muteres gener som indirekte øker mutasjonsfrekvensen i cellen ^{6, 7}. I løpet av kreftutviklingen i et epitel kan cellen gå gjennom ulike stadier fra første mutasjon til dysplasi, så til carcinoma in situ, videre til invasive kreftceller og til slutt metastasering (Figur 4) ⁸.

- *Dysplasi* er en vekstforstyrrelse/celleforandring som kan være forstadium til kreft. Dysplasiens grad angis som mild, moderat eller grov. Mild og moderat dysplasi er reversibel. Histologisk sees det flere celler i basalcellelaget enn normalt og tap av normal lagdeling. Epitelappene er tåreformede, det sees økt mitoseaktivitet og enkeltcelle keratinisering/dyskeratose. Cellene varierer i form og størrelse. Cellekjerner varierer i form, størrelse og fargbarhet.
- *Carcinoma in situ* defineres som intraepitelial cancer før tumorcellene invaderer nabovevet. Her ser vi celleforandringer gjennom hele epitelets tykkelse. Tilstanden er irreversibel.
- *Invasjon* skjer når tumorceller løsriver seg fra omkringliggende celler og ekstracellulær matriks (ECM) og beveger seg inn i nabovev. Tumorcellene er mobile og kan flytte seg rundt omkring. Mekanismene bak tumorcellers motilitet er komplekse. De omtales ikke her.
- *Metastasering* er spredning av tumoren til andre vev. Tumorceller følger blod- og lymfekar til andre vev hvor de slår seg ned og danner en sekundær tumor som kalles *metastase*.

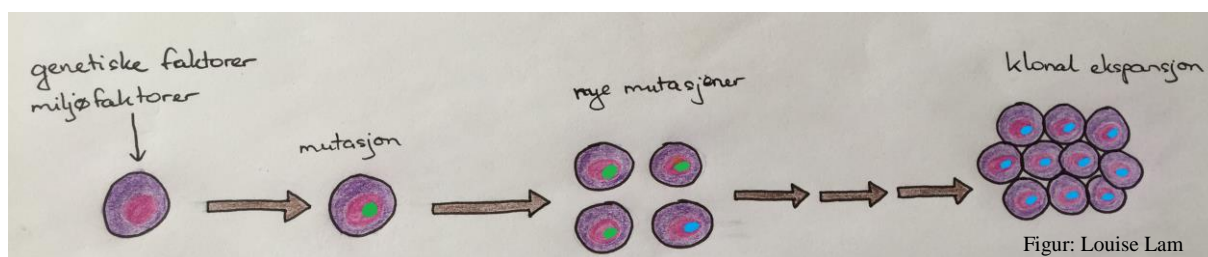


Figur 4 - Kreftutviklingen

Kreft utvikler seg fra en enkelt celle med mutasjoner som gjennom klonal ekspansjon gir dysplasi, og så videre til carcinoma in situ, videre til invasive kreftceller og til slutt metastasering.

Figuren hentet fra <http://science.education.nih.gov/supplements/nih1/Cancer/guide/understanding1.html>

Det første trinnet i kreftutviklingen antas å være resultat av en genetisk endring som fører til unormal proliferasjon av en enkelt celle. Celleproliferasjon fører til klonal ekspansjon av tumorcellen. Tumorprogresjonen fortsetter med ytterligere mutasjoner i dette området med klonalt ekspanderte tumorceller. Noen av disse mutasjonene gir en selektiv fordel til cellen, for eksempel hurtigere vekst, og etterkommere av en celle som bærer en slik mutasjon vil følgelig bli dominerende innen tumorpopulasjonen. Klonal seleksjon fortsetter gjennom tumorutviklingen, så tumoren vokser enda raskere og blir stadig mer ondartet ⁹.



Figur 5 - Klonal ekspansjon

Mutasjon oppstår i en enkelt celle som deler seg videre, og det oppstår etter hvert nye mutasjoner i datterceller. Datterceller med nye mutasjoner ekspanderer og etablerer en celleklon, dvs. at det blir mange helt like celler.

I løpet av den lange inkubasjonstiden gjennomgår kreftceller en rekke genetiske og epigenetiske forandringer. Disse forandringene har betydning for viktige cellefunksjoner som apoptose, DNA-reparasjon, cellyklusregulering og differensiering. *Genetiske forandringer* er irreversible og medfører endringer i gensekvens, f.eks. punktmutasjon, genamplifikasjon, deleksjon, insersjon og

translokasjon. *Epigenetiske forandringer* betyr forandringer i genuttrykk som nedarves fra morcelle til datterceller, men som ikke skyldes forandret gensekvens. DNA-metylering er et eksempel på epigenetisk forandring⁸.

Gener som kan forårsake kreft når de muteres kalles proto-onkogener og tumor-suppressorgener.

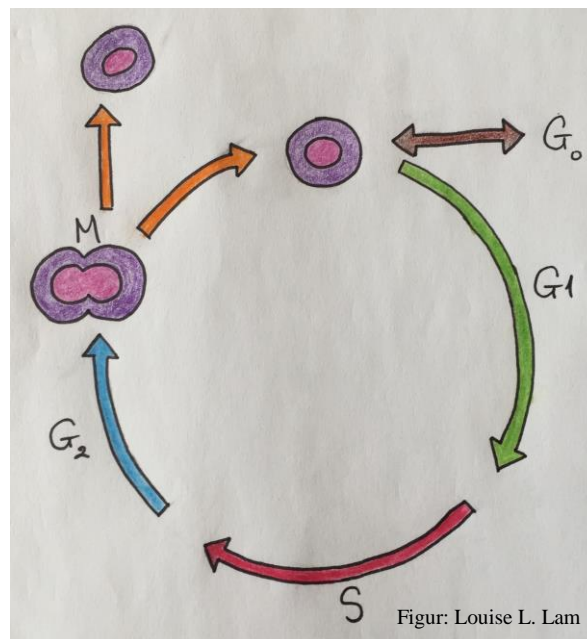
- *Proto-onkogener* er normale gener som kan forårsake kreft hvis de muteres slik at det blir økt nivå eller aktivitet av genproduktet. De tilsvarende muterte genene kalles onkogener. Onkogener er gjerne muterte celledelingsstimulerende eller apoptosehemmende gener. Eksempler på proto-onkogener er Myc, Ras, bcl-2.
- *Tumor-suppressorgener* eller *antionkogener* er gener som koder for proteiner som på en eller annen måte virker hemmende på cellyklus. Det kan være kontrollproteiner som stopper cellyklus dersom DNA er ødelagt, proteiner som fremmer apoptose, eller proteiner som deltar i DNA reparasjon. Tumor-suppressorgenet kan forårsake kreft hvis genet muteres slik at genproduktet tapes (nivå eller funksjon av proteinet). Eksempler på tumor-suppressorgener er p53, pRB, bax, E-cadherin.

For at et proto-onkogen skal bidra til kreft, holder det at kun det ene allelet i genet muteres, dvs. mutert fenotype er dominant. For at et tumor-suppressorgen skal bidra til kreft, må begge alleler muteres, dvs. mutert fenotype er recessiv.

Proto-onkogener blir ofte til onkogener ved mutasjoner i form av *translokasjoner* (genet flyttes til et annet kromosom, der det kommer under kontroll av en aktiv promoter), *punktmutasjoner* (kan føre til at genproduktet får økt aktivitet) eller ved *amplifikasjoner* (flere kopier av samme gen, fører til økt mengde genprodukt). Normale tumor-suppressorgener blir til kreftgener enten ved *delesjoner* (hele eller deler av genet fjernes, og dermed tapes funksjonen av genproduktet) eller ved *punktmutasjoner* (funksjonen til genproduktet tapes)^{6,7}.

Cellesyklus og proliferasjon

For å kunne forstå hvordan en celle deler seg og hvordan celledeling reguleres, må vi først gå inn i cellesyklus. Cellesyklus er en rekkefølge av prosesser som cellen må gjennomgå som forberedelse til og gjennomføring av celledeling. Cellesyklus består av 4 faser: G_1 , S, G_2 og M. G_1 og G_2 er «gap»-faser mellom S- og M-fase, og i disse fasene foregår det kontinuerlig proteinsyntese. S-fase (syntesefase) er DNA-syntese fase. G_2 -fase er premitotisk fase. M-fase står for mitosefase. I tillegg finnes det såkalt G_0 -fase, en hvilefase, der cellen er gått ut av cellesyklus for en kortere eller lengre tid (Figur 6). Noen celletyper, f.eks. nerveceller, er permanent i G_0 -fase, dvs. at de har mistet evne til å dele seg.



Figur 6 - Cellesyklus

Når en celle har fått et signal om å dele seg, vil den gå først inn i G_1 -fase, deretter til S-fase, og så over til G_1 -fase, og til slutt deler seg i M-fase. R-punktet i G_1 -fase er angitt med en liten rød pil.

Før en celle skal komme fra en fase til en annen fase, må cellen passere ulike restriksjonspunkter (R-punkter). Disse kontrollpunktene finnes i alle faser av cellesyklus. Her forsikrer cellen seg om at alt har gått riktig for seg før den kan gå videre til neste fase. Det viktigste R-punktet er i G_1 -fase.

Retinoblastom protein (pRB) er et reguleringsprotein som ligger i cellekjernen, og som spiller en viktig rolle i R-punktet i G_1 -fasen. I begynnelsen av G_1 -fase

er pRB ufosforylert og binder transkripsjonsfaktoren E2F. For at cellen skal kunne gå inn i S-fasen, må en rekke spesifikke gener transkriberes. Transkripsjonen av disse genene skjer ved hjelp av transkripsjonsfaktoren E2F. Når cellen mottar et signal fra en vekstfaktor, blir pRB fosforylert og E2F frigjøres. E2F blir dermed fri til å transkribere S-fase gener. Cellen har passert R-punktet i G1. Dersom det skjer mutasjon av RB-genet i form av delesjon, vil pRB miste sin funksjon. E2F er dermed hele tiden fri til å binde seg til promoteren i S-fase gener. Cellene vil passere R-punktet i G1-fase helt uavhengig av ytre signaler ^{6,7}.

Alle normale celler trenger vekstfaktor for å kunne passere R- punktet i G1-fase. Etter at cellen har passert dette punktet, kan vekstfaktorene fjernes og cellen vil fullføre cellesyklus og til slutt dele seg dersom alt annet er normalt. Kreftceller kan i motsetning til normale celler proliferere i fravær av vekstfaktorer ved at ¹⁰:

- De kan selv produsere vekstfaktorer og uttrykker samtidig tilsvarende reseptorer.
- De kan sende signaler for å stimulere normale celler i området til å forsyne dem med vekstfaktorer.
- Vekstfaktorer dannes i kreftceller og virker på omgivende normale celler og indirekte fremmer kreftcellenes ekspansjon.

Ki-67

Ki-67 er et protein som uttrykkes i cellekjernen i proliferative celler. Ved cellesyklusanalyse har man funnet at Ki-67 uttrykkes under alle aktive faser av cellesyklus, dvs. G₁, S, G₂ og mitose, men er fraværende i hvilende fase, G₀.

Ki-67 brukes idag som en proliferasjonsmakør i forskning og diagnostikk. Selv om man vet mye om Ki-67, er dens funksjon fortsatt uklar. Ki-67 finnes i både normale celler og tumorceller. ^{11,12}

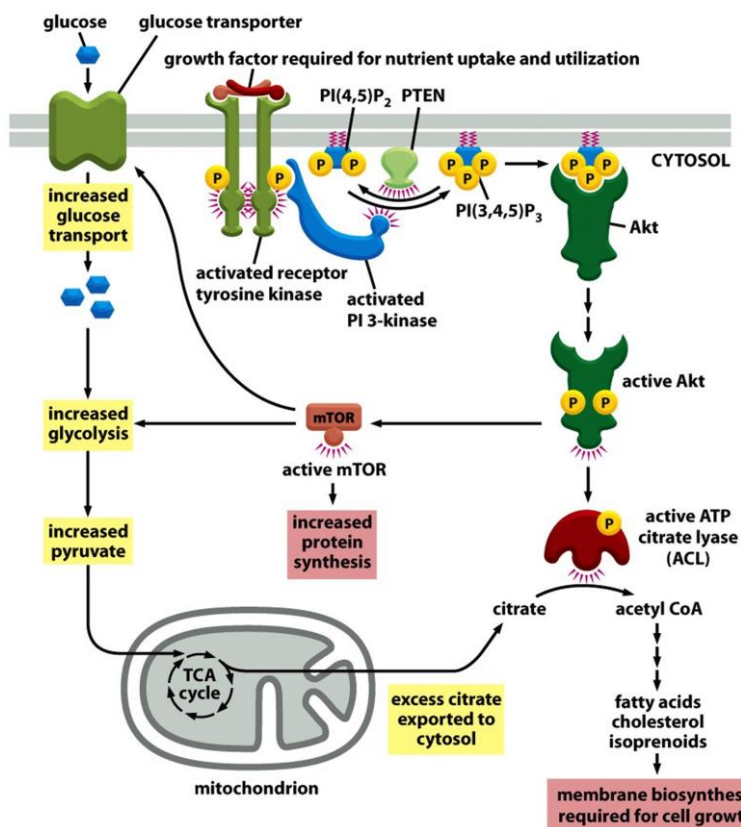
Cellevekst og -overlevelse

PI3-kinase, PTEN, Akt og mTOR

Disse proteinene er involvert i en signalvei som har stor viktighet for cellevekst og -overlevelse, og er hyppig involvert i kreftutvikling.

PI3-kinase er en kinase som fosforylerer inositollipider i plasmamembranen. Det dannes såkalt PIP₃ (PI 3,4,5-trifosfat) som fungerer som et docking-sete for å aktivere andre intracellulære signalproteiner bl. a. Akt og mTOR. En viktig funksjon av *Akt* er å fosforylere og inaktivere Bad. Aktiv Bad induserer celledød ved apoptose. Siden Akt inaktiverer Bad, fremmes dermed celleoverlevelse. *mTOR* stimulerer cellevekst ved både å øke proteinsyntese og å hindre proteinnedbrytning.

PI3K-signalveien har en innebygd brems, PTEN fosfatase. PTENs funksjon er å begrense Akt aktivitet ved å defosforylere molekyler som PI3-kinase fosforylerer. Den demper og balanserer derved aktiviteten i denne signalveien. PTEN fungerer altså som en tumor-suppressor, og manglende PTEN-aktivitet på grunn av mutasjon vil føre til utvikling av kreft ⁶.



Figur 7 - PI3-kinase/Akt signalvei

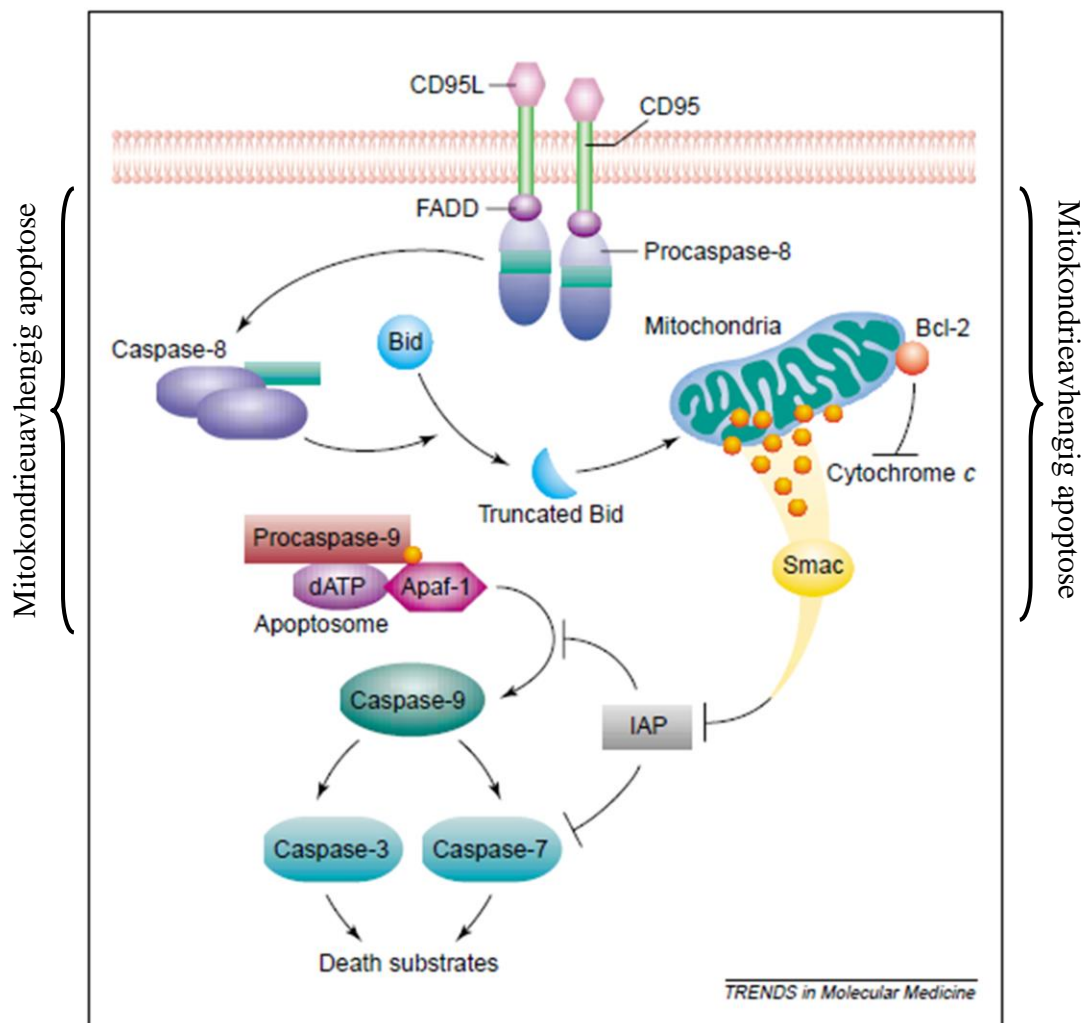
© 2008 from *Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition* by Alberts et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

Figuren viser hvordan denne signalveien gir økt cellevekst ved å stimulere glukoseopptak. Dette systemet aktiveres tidlig i tumorprogresjon.

Apoptose

Apoptose er programmert celledød. Dette er en normal fysiologisk form for celledød og medfører ikke inflammasjon slik man ser ved nekrose. Apoptose er ansvarlig for en balansert celleproliferasjon og for å opprettholde et konstant antall av celler i en organisme. I tillegg fungerer apoptose som en forsvarsmekanisme der skadde/infiserte celler elimineres. For eksempel kan celler med DNA-skade bære skadelige mutasjoner som kan føre til utvikling av kreft. Derfor vil disse cellene gjennomgå apoptose hvis DNA-skaden ikke kan repareres. Virusinfiserte celler elimineres gjennom apoptose for å hindre spredning av viruset^{6,7}.

Det er 2 mekaniser for apoptose: mitokondrieavhengig og –uavhengig apoptose (Figur 8).



Figur 8 - Apoptose

Figuren viser hvordan mitokondrieavhengig og mitokondrieuavhengig apoptose virker sammen.
Figuren hentet fra TRENDS in Molecular Medicine Vol.7 No.12 December 2001

1. Mitokondrieavhengig apoptose:

Stimuli som trigger celledød fører til ødeleggelse av mitokondrier og frigjøring av cytochrome c til cytosol. Cytochrome c er et protein som inngår i elektrontransportkjeden i mitokondriet og spiller en viktig rolle i cellenes energiproduksjon. Vanligvis er cytochrome c lokalisert til mitokondriets intermembranrom mens Apaf-1 og caspase-9 ligger i cytosol. Caspase-9 foreligger i en inaktiv form som procaspase-9. I cytosol, binder cytokrom c til Apaf-1 og fører til dannelse av en multisubunit Apaf-1/caspase-9 kompleks kalt apoptosom, hvor caspase-9 aktiveres. Caspase-9 vil deretter spalte og aktivere andre nedstrømscaspaser, som f.eks. caspase-3, som til slutt resulterer i celledød.

2. Mitokondrieuavhengig apoptose:

Denne formen for apoptose innebærer binding av signalmolekyler til dødsreseptorer på celleoverflate. Disse signalmolekylene tilhører en familie av tumor-nekrose faktorer (TNF).

TNF-reseptorer induserer apoptose ved å aktivere caspase direkte. Den cytoplasmatiske delen av reseptoren er bundet til et adaptormolekyl, f.eks. FADD. Binding mellom ligand og reseptor fører til konformasjonsendringen i reseptoren, som i sin tur fører til konformasjonsendring i FADD som igjen fører til at FADD interagerer med første caspase, caspase 8. Dette aktiverer caspasen som i sin tur aktiverer andre nedstrømscaspaser, for dermed å initiere en caspase-kaskade som resulterer i celledød.

Kreftceller har mange ulike strategier som de kan bruke for å unngå apoptose. Vanligst er mutasjon i p53-genet. Dette tumor-suppressorgenet er mutert i mer enn 50 % av alle humane tumorer. Andre måter er ved å øke uttrykk av antiapoptotiske faktorer (Bcl-2, Bcl-x) eller overlevelsessignaler (survivin), ved å nedregulere proapoptotiske faktorer som Bax og Bim.

Survivin

Survivin er et intracellulær protein som tilhører IAP familien (the inhibitor of apoptosis family). Flere studier har vist at høyt uttrykk av survivin korrelerer med mer aggressiv sykdom, motstand mot terapi og dårlig klinisk utfall ¹³. Survivin regnes derfor som en potensiell biomakør i diagnose og prognose, samt som et ideelt «target» for framtidig kreftbehandling.

Survivin har fått mye oppmerksomhet innen kreftforskning på grunn av dets 2 spesielle egenskaper:

- det er det mest kreftspesifikke proteinet ved at det finnes i kreftceller, og nesten ikke i normale celler. ¹⁴
- det fremmer overlevelse i kreftceller ved å blokkere apoptose og regulerer celledeling via forskjellige signalveier ¹⁵. Her inngår blant annet PI3K/Akt, mTOR, ERK, MAPK, STAT, tumor-suppressorgener TP53 og PTEN, onkogener Bcl-2 og Ras, en rekke vekstfaktorer (EGFR) og vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF).

Den apoptotisk hemmende effekten til survivin synes å virke ved å hemme aktiviteter nedstrøms for både Bax- og Fas-signalvei og ved å redusere caspase-aktiviteter ved å binde seg til blant annet caspase-3 og caspase-7 .

Cleaved-caspase 3

Caspase 3 er et av effektorenzymene ved apoptose som ligger nedstrøms i caspase-kaskaden (se avsnittet om apoptose). Disse caspasene er proteaser, det vil si at de er enzymer som spalter proteiner. De har cystein på sitt aktive sete og bryter binding på målproteinet. Caspasene foreligger vanligvis i inaktiv form, og ved et apoptosesignal vil de spaltes og bli aktive. Altså er caspase-3 inaktiv form, og cleaved-caspase-3 er den aktive formen ⁶.

Invasjon og metastasering

Invasiv vekst og metastasering er et stort problem ved kreftsykdom og kreftbehandling. Metastaser er ansvarlig for 90 % av kreftrelaterte dødsfall ⁶.

For at en epitelial kreftcelle skal metastasere, må den først løsne fra primærtumor, før den krysser basalmembranen for deretter å invadere omgivende vev. Videre må den penetrere blod- og lymfekar ved å krysse basalmembranen og endotelcellelaget for å komme inn i blod- og lymfekar. Videre må kreftcellen komme seg ut av årene før den skal kunne slå seg ned i et nytt vev. Der proliferer den og danner små knuter med kreftceller kalt mikrometastaser. Dette kalles kolonisering ⁶.

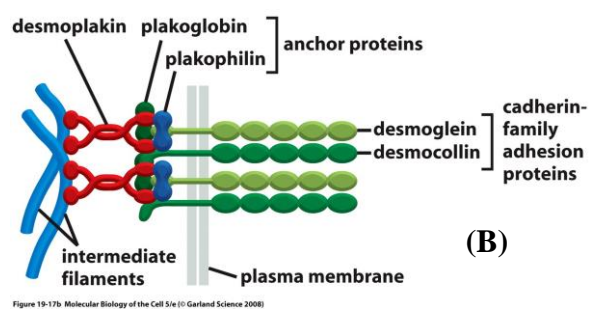
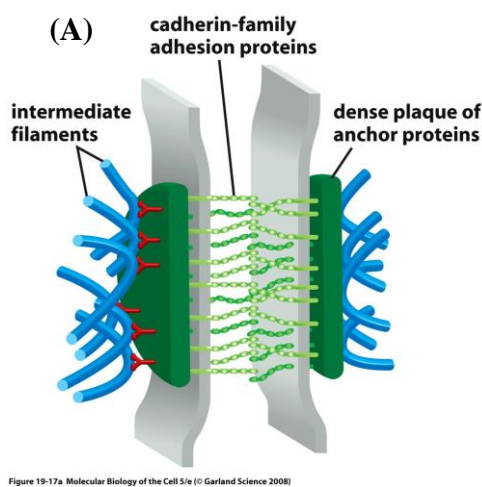
Ved lokal invasjon og metastasering har det blitt observert nedregulering og inaktivering av E-cadherin i humane karsinomer (mer om E-cadherin i senere avsnitt). I tillegg er det også påvist forandring i andre typer adhesjonsmolekyler (både celle-til-celle og celle-til-matriks adhesjon). Adhesjonsmolekyler som normalt er forbundet med cellevandring ved embryogenese og inflammasjon er ofte oppregulert ved kreft. Et eksempel er N-cadherin som normalt uttrykkes under organogenese og ikke i normalt epitel. N-cadherin er oppregulert i mange invasive karsinomceller. Mange av mekanismene for invasjon og metastasering er fortsatt uavklart selv om det forskes intensivt på dette området ¹⁰.

E-cadherin

E-cadherin er et transmembran adhesjonsmolekyl som tilhører cadherin superfamilien, og som inngår i celle-celle adhesjon. E-cadherin formidler bindingen mellom epitelceller i normalt epitel. Navnet E-cadherin kommer av at denne typen cadherin først ble funnet i epitelceller. E-cadheriner binder cellene sammen ved at deres ekstracellulære domener binder seg til hverandre ved hjelp av en Ca^{2+} -avhengig mekanisme, og deres intracellulære domener er bundet med anker- proteiner som i sin tur binder filamenter i cytoskjelettet (Figur 9) ⁶.

E-cadherin spiller også en viktig rolle i signalering. Gjennom deres intracellulære domene gir de informasjon til cellens indre om hvorvidt cellen er bundet til andre celler eller ikke.

Forandring i gensekvenser av E-cadherin kan føre til at E-cadherin mister sin funksjon, og epitelceller blir mindre adhesive. Dermed vil de kunne løsne fra epitelvevet rundt.



Figur 9 - E-cadherin

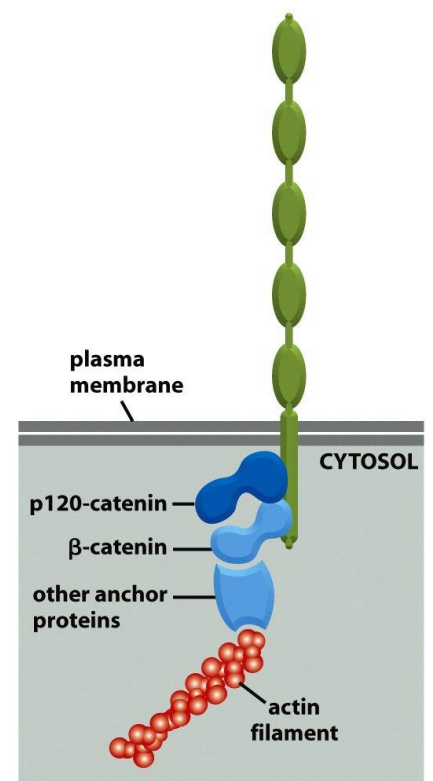
© 2008 from *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition by Alberts et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

(A): celle-celle-adhesjon

(B): forstørrelse av figure (A) som viser bindingene mellom cadherin familien og filamenter i cytoskjelettet

β-catenin

β-catenin er et intracellulært ankerprotein som binder seg til det intracellulære domenet på E-cadherinmolekyler. Det intracellulære domenet til E-cadherin binder seg indirekte til filamenter i cytoskjelettet (gjelder både actin filamenter og intermediate filamenter). Denne bindingen skjer ved hjelp av flere intracellulære ankerproteiner, blant annet β-catenin som har en viktig rolle. (Figur 10) Binding til det intracellulære domenet av E-cadherin stabiliserer β-catenin. Ubundet β-catenin vil dermed bli raskt degradert.



Figur 10 - β-catenin

© 2008 from *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition by Alberts et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

Figuren viser binding av β-catenin til E-cadherin og til ankerproteiner

Det å formidle bindingen mellom cadherin og filamenter i cellens cytoskjelett er bare en av funksjonene til β -catenin. I Wnt-signalveien (Figur 11) fungerer β -catenin som en direkte regulator av genuttrykk ved å danne kompleks med Tcf/LEF-familien. Den fungerer som en koaktivator og induserer transkripsjon av Wnt-målgener. Ett av genene som aktiveres av β -catenin er c-Myc som koder for c-Myc protein. Dette proteinet er en kraftig stimulator for cellevekst og –proliferasjon ⁶.

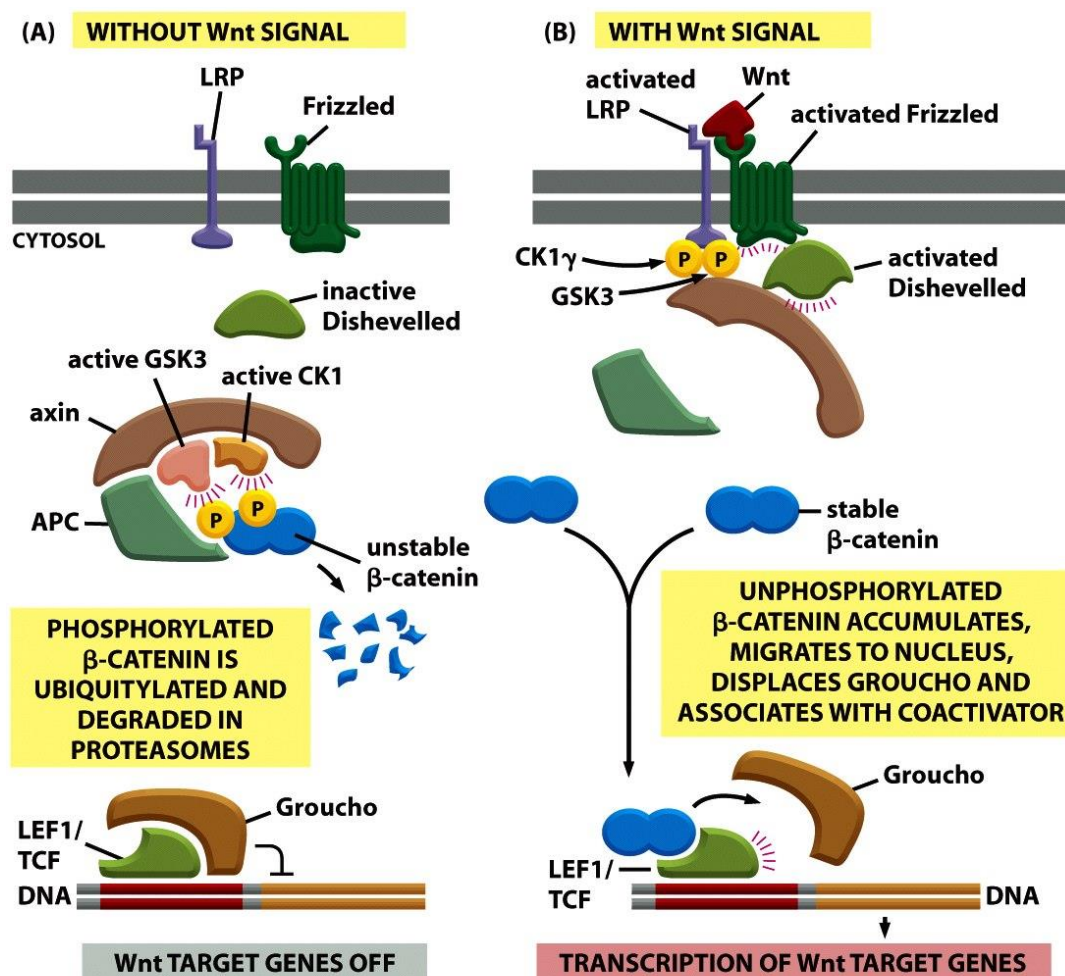


Figure 15-77 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figur 11 - Wnt/ β -catenin signalveien

© 2008 from Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition by Alberts et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

(A): Uten Wnt-signal blir β -catenin som ikke er bundet til den cytosoliske delen av E-cadherin fosforylert og degradert av APC-komplekset. LEF1/TCF komplekset forblir bundet til co-repressorprotein Groucho. Det skjer dermed ingen transkripsjon av Wnt-målprotein.

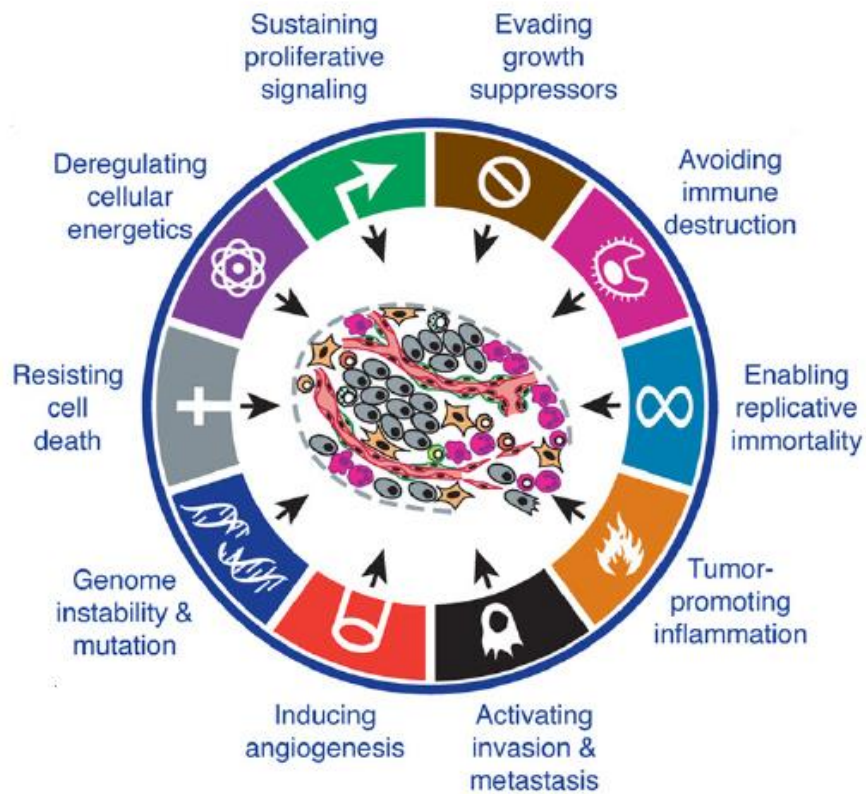
(B): Binding av Wnt til sin reseptor fører til rekruttering av APC-komplekset til plasmamembranen og inaktivering av komplekset. β -catenin blir dermed ikke fosforylert og degradert. Frie β -catenin akkumuleres og translokeres til cellekjernen. I cellekjernen binder β -catenin til LEF1/TCF-komplekset, og Groucho displasseres. β -catenin fungerer nå som en co-aktivator og stimulerer transkripsjonen av Wnt-målgener sammen med LEF1/TCF-komplekset.

1c - Karakteristika av en kreftcelle

Kreftceller unngår normale reguleringsmekanismer for viktige prosesser som proliferasjon, celledifferensiering og apoptose. I tillegg har de egenskaper som gjør at de kan invadere omgivende vev og destruere og kolonisere områder som er reservert for andre celler. Hanahan og Weinberg har beskrevet en rekke karakteristika som kjennetegner kreftceller ¹⁰: (Figur 12)

- Evne til å opprettholde proliferative signaler
 - Evne til å unngå veksthemning
 - Evne til å motstå apoptose
 - Ubegrenset replikativ potensial
- Disse egenskapene gir oss udødelige kreftceller som kan økes i både antall og størrelse i det uendelige. Det fører til en ubalanse mellom celledeling og celletap, og dermed vokser kreftsvulster.*
- Evne til å unngå immun-ødeleggelse gjør at immunsystemet ikke oppfatter kreftsvulst som noe fremmed. Kreftsvulsten unngår dermed immunologisk ødeleggelse og fortsetter å vokse og dele seg.
 - Tumorfremmende inflammasjon. Inflammasjonen kan forsterke de andre kjennetegnene hos kreftsvulster ved at svulstens miljø forsynes med bioaktive molekyler. Blant disse molekylene kan det nevnes vekstfaktorer som gir opprettholdelse av proliferative signaler, overlevelsesfaktorer som hindrer celledød, proangiogenetiske faktorer og ekstracellulære matriks-modifiserende enzymer som fremmer angiogenese, invasjon og metastase.
 - Evne til invasjon og metastasering gir økende malignitet hos kreftsvulster.
 - Evne til å indusere angiogenese. Tilstrekkelig blodforsyning er viktig for at en svulst kan vokse. Når svulsten har vokst til en viss størrelse, økes avstanden til et kapillær og blodforsyningen er ikke lenger tilstrekkelig. Svulster induserer dermed angiogenese for å skaffe blodforsyning.

- Ustabilt genom og mutasjoner. Dette gjør at mutasjoner akkumuleres, noe som gir fordel for tumorprogresjon ved utvikling av blant annet en eller flere av de overnevnte egenskapene.



Figur 12 - Det er flere kjennetegn som kan drive en normal celle til å bli en kreficelle: opprettholdelse av proliferative signaler, unngåelse av veksthemning, immun-ødeleggelse og apoptose, ubegrenset replikasjon, induksjon av angiogenese, ustabilt genom og mutasjon, tumor-fremmende inflammasjon, invasjon og metastasering. Figuren hentet fra Hanahan og Weinberg - Hallmarks of Cancer: the next generation ⁹

Del 2 - Laboratoriearbeid

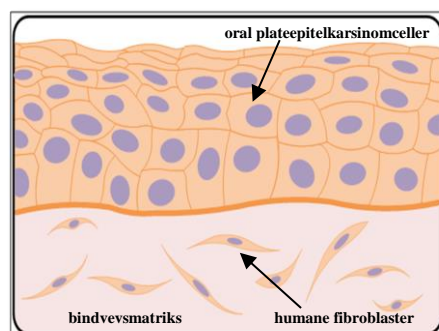
Hensikten med del 2 av oppgaven:

- Å undersøke uttrykk av ulike molekyler av betydning for celleproliferasjon, migrasjon, overlevelse og apoptose ved hjelp av immunhistokjemi.
- Å undersøke i hvilken grad disse molekylene påvirkes ved tilsetning av en hypoksi-hermer (CoCl_2) eller en signalvei-hemmer (p38-hemmer) i modellen.
- Å lære metoden immunhistokjemi og å mikroskopere.

Materialer

I denne studien ble det brukt 34 ulike 3-dimensjonale organotypisk munnhulekreftmodeller. I tillegg brukte vi snitt fra biopsier av OSCC som sammenligningsgrunnlag. Bruk av biopsier er REK-godkjent. 3D-modellene ble laget av Søland og Brusevold ved at de lot orale plateepitelkarsinomceller vokse på en kollagenmatriks hvor normale humane fibroblaster ble inkorporert (Figur 13 og 14). Etter 11 dager ble modellene høstet. De ble fiksert i formalin, og støpt i parafin.

3D-modellene som ble brukt i denne oppgaven var modeller som ble behandlet med CoCl_2 , p38-hemmer (SB203580) samt ubehandlede kontroller for å undersøke om disse behandlingene kunne påvirke et utvalg av proteiner involvert i proliferasjon, apoptose, invasjon og adhesjon. Det er fra før funnet at invasiviteten øker ved behandling med hypoxihermeren CoCl_2 ⁵, men ikke med p38-signalveihemmeren (upublisert).

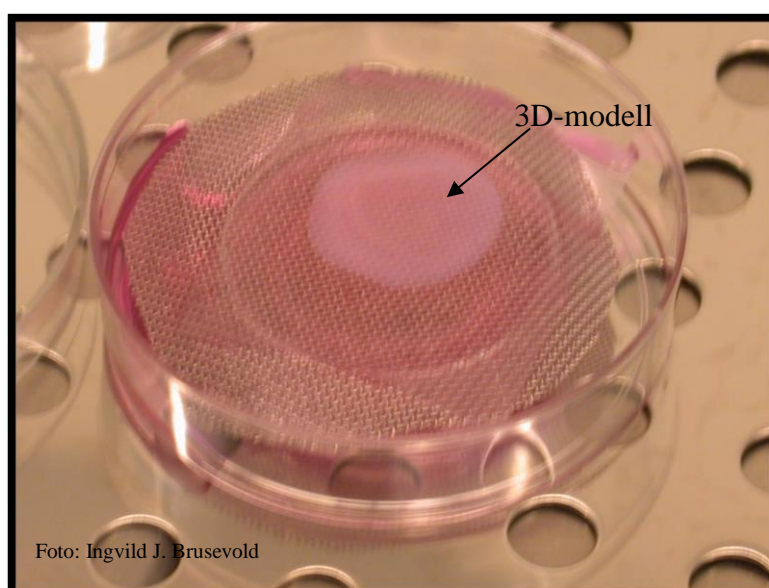


Figur 13 - 3D-modellen

Denne figuren illustrerer hvordan 3D-modellene er bygd opp med OSCC-celler og underliggende bindevevsmatriks med innstøpte humane fibroblaster

CoCl₂ ble tilsatt ved dag 3 med forskjellige konsentrasjoner (50, 100 og 200 µM) i modellene. CoCl₂ ansees som en hypoxihermer og ble valgt fordi det er høy forekomst av hypoksi i en voksende tumor, og i klinikken ser man at hypoksiske svulster gir dårligere prognose for pasienten ¹⁶. På sikt kan man tenke seg at økt kunnskap om endringer i signalveier i hypoksiske svulster kan bidra til utvikling av kreftmedikamenter som kan motvirke den hypoksiske effekten.

p38-hemmer ble tilsatt med forskjellige konsentrasjoner (0,5, 1 og 2 µM) fra dag 4 og ved hvert medieskift fram til høsting. p38-hemmer ble løst i DMSO som er et toksisk organisk løsemiddel. Som kontroll hadde vi modeller uten p38-hemmer, men med DMSO, samt modeller uten både p38-hemmer og DMSO. p38 er en MAP kinase som aktiveres av stress og cytokiner. p38-signalveien er involvert i inflammasjon og apoptose. Det har blitt foreslått at p38 kan fungere som en tumorsuppressor ¹⁷. p38 er involvert både i aktivering av p53 og i p53-indusert apoptose, og fungerer som en negativ regulator av cellyklus ¹⁷. Det som er interessant er at noen humane svulster viser en lavere p38-aktivitet enn normalt vev, f.eks. ved hepatokarsinom, mens økt nivå av fosforylert p38 (aktiv form) har vært korrelert med malignitet i andre kreftformer inkludert lunge-, thyroidea- og brystkarsinom samt plateepitelkarsinom i hode og hals ¹⁸.



Figur 14 - Dyrking av 3D-modell på lab'en

Modellen legges på en rist som ligger i en skål med et vekstmedium (rosa farge). Avhengig av hvilken behandling modellen skal ha, brukes det ulike medium, og medium skiftes ut på ulike tidspunkter.

Snitting

Etter at vevet var fiksert i 4 % formaldehydløsning og støpt inn i en parafinblokk, brukte vi en mikrotom til å skjære preparatet i tynne skiver. Som standard skar vi 4µm tynne snitt. Etter snitting ble snittene overført til vannbad på 45°C ved hjelp av et objektglass med 50 % alkohol. Snittene lå i vannbad inntil rynkene i parafinen hadde strukket seg. Snittene ble så tatt opp på et merket objektglass. Objektglassene ble deretter tørket i et varmeskap ved 37°C over natt for at snittene skulle feste seg ordentlig på glasset. Deretter var snittene klare til bruk og ble oppbevart i lukkede bokser i kjølerom ¹⁹



Figur 15 - Ulike trinn under snitting

Bildene er hentet fra www.odont.uio.no/iob/om/organisasjon/fagavd/cellebiologi/rutiner-metoder/parafinsnitt.html

Øverst til venstre er bildet av en mikrotom med påmontert parafinblokk som er klar for snitting

Øverst til høyre: ferdig skåret parafinsnitt klister seg til hverandre og lager en lang remse med snitt

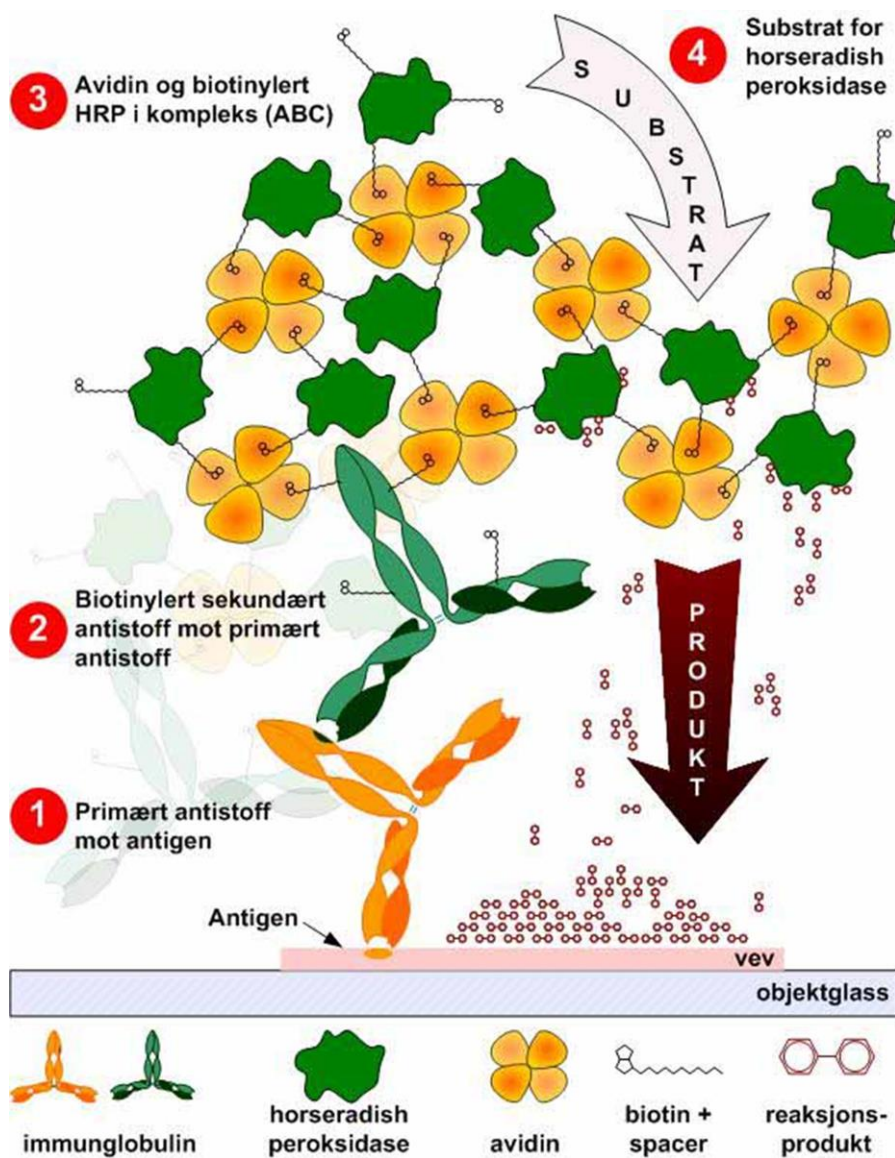
Nederst til venstre: snittene overføres til vannbad

Nederst til høyre: 2 lange remser med snitt ligger i vannbad

Metoden

Immunhistokjemi er en av de mest brukte innfargingsmetodene innen histologi/patologi for å identifisere og lokalisere molekyler av interesse. Immunhistokjemi baserer seg på antigen-antistoff interaksjon. For å synliggjøre bindingen mellom antigen og antistoff i lysmikroskop må bindingen fremtre med farge, og fargesignalet forsterkes gjennom flere trinn.

Framgangsmåte



Figur 16 - Prinsippet for IHC

Figuren er hentet fra <http://www.odont.uio.no/iob/om/organisasjon/fagavd/cellebiologi/rutiner-metoder/ihc.html#prosedvrefortsett>

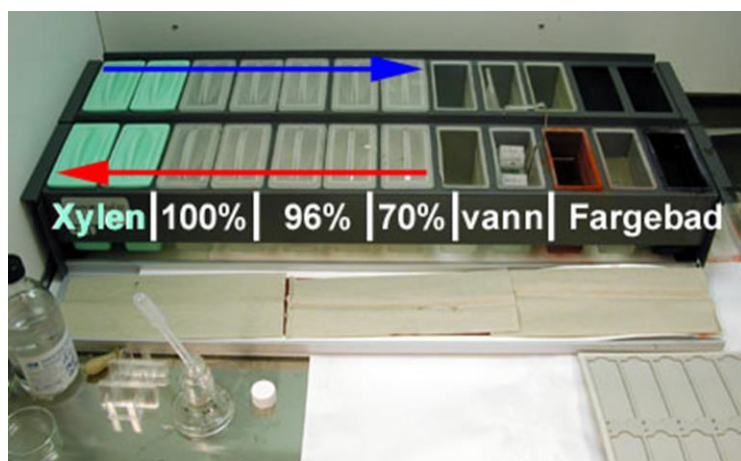
Hver farging foregikk over 2 dager med ca. 3 timer pr dag og inkubering av antistoff over natt. Unntaket var snittene med E-cadherin og β -catenin hvor antistoffet hadde en inkubasjonstid på 2 timer, og hele fargeprosessen kunne foregå på én dag. Vurdering av immunhistokjemisk farging ble foretatt påfølgende dag i lysmikroskop, snitt for snitt. 6-8 objektglass med snitt ble farget i hver seanse. På hvert glass var det 3-4 snitt. Totalt ble det brukt 169 objektglass, dvs. over 600 snitt, på uttesting av antistoffer og farging. Når alle fargingene var ferdige, scoret og fotograferte vi snittene (se senere avsnitt).

Før den «ordentlige» fargingen kunne settes i gang måtte jeg gjennom mange omganger med uttestinger og optimaliseringer av hvert enkelt antistoff. Jeg testet ut flere ulike primære antistoffer mot samme antigen, da kvaliteten kan variere og slett ikke alle antistoffer fungerer. Etter at jeg hadde valgt antistoff, testet jeg ut ulike konsentrasjoner for å finne optimal konsentrasjon, samtidig som ulike behandlinger av snittet ble evaluert (med eller uten varmebehandling, hvilken buffer snittene varmebehandles i, m.m.). Selv om det følger med bruksanvisning fra produsenten, er det ikke sikkert at den anbefalingen egner seg for alle vevstyper. Derfor er det viktig å teste ut antistoffer før bruk, og det finnes ingen «ready to use» antistoffer²⁰.

Nedenfor er hele fargingsprosessen beskrevet trinn for trinn:^{19,21} (Figur 16)

Dag 1

1. Deparafinering & hydrering



Figur 17 - deparafinering og hydrering

Ulike kammere med ulike løsninger som brukes under IHC, bl.a. xylen og etanol i forskjellige konsentrasjoner.

For at fargestoffet skal kunne komme til, må parafin i snittet vaskes bort. Dette ble gjort ved å legge snittene i xylen-bad 2 x 5 minutter. I tillegg skulle vannet føres tilbake til vevet ved å legge snittene i alkoholbad i avtagende styrke: etanol 100 % - 2 x 1 min; etanol 96 % - 2 x 1 min.

2. Quenching med 3 ‰ H₂O₂ i metanol.

Snittene lå i denne løsningen i 30 minutter. Målet med quenching var å dempe endogen peroksidase aktivitet i vevet. Senere i fargeprosessen ble det brukt horse radish peroxidase som oksiderte DAB for å synliggjøre antistoff-antigen komplekset (HorseRadish Peroxidase er bundet indirekte til antistoff-antigen komplekset). Dersom det var andre peroksidaser i vevet, ville det gi utfelling av DAB der det ikke var bundet antigen. Dette ville gi bakgrunnsfarging som vi ikke ønsket å ha. Etter quenching ble snittene skylt med destillert vann.

3. Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) med citratbuffer

Under vevsfiksering kan antigen-epitoper endre sin konformasjon ved at de krøller seg sammen. Dette fører til at binding med antistoffer ikke er mulig og epitopen kan dermed ikke påvises. Dette vil gi et falskt negativt resultat. HIER er en av de to viktigste metodene for å demaskere slike sammenkrøllede epitoper. Varmekilden kan være en mikrobølgeovn, vanlig kokeplate, vannbad osv. Her har jeg brukt trykkoker. Snittene ble lagt i et kar med bufferløsning, og hele karet ble lagt i trykkoker med 0,5 liter destillert vann. Snittene ble deretter kokt i 100°C i 15 minutter, og så i 90°C i 10 sekunder.

Trykkokeren med snittene ble avkjølt i isbad i 20 minutter. Etterpå ble snittene vasket i PBS i 2 x 5 minutter. Til slutt ble snittene tørket forsiktig og ringet rundt med fettpen. Dette for at forskjellige løsninger som var påført snittene, ikke skulle flyte utover hele objektglasset og blande seg med løsninger fra andre snitt.

4. Normalserum ble påført alle snittene og de fikk virke i 20 minutter i romtemperatur. Målet med denne forbehandlingen var å unngå uspesifikk bakgrunnsfarging ved å blokkere uspesifikk antistoff-adhesjon til vevsproteiner. Immunglobuliner, utover den spesifikke interaksjonen med antigen-epitoper, er også i stand til å binde seg til vevsproteiner gjennom elektrostatiske tiltrekning og hydrofob interaksjon.

Normalserum kan velges fra hvilket som helst dyr bortsett fra det dyret primærantistoffet kommer fra, men dyret må være det samme dyret som sekundærantistoffet kommer fra; f.eks. hvis primærantistoffet kommer fra kanin, kan normalserum fra geit velges, og sekundærantistoffet blir da geit-anti-kanin.

5. Primærantistoffet ble applisert på snittene bortsett fra ett snitt på hvert objektglass. Der ble det tilsatt enten et uspesifikt antistoff i form av IgG, eller PBS. Disse snittene fungerte da som negative kontroller, dvs. at de ikke skal gi positiv farge. Dersom man får en positiv negativ kontroll, vet man at man har en feilkilde, og man kan derfor ikke stole på det man ser i mikroskopet.

Snittene med primærantistoffet, PBS og uspesifikk IgG ble inkubert over natt ved 4°C i en lukket boks med rikelig luftfuktighet for at snittene ikke skulle tørke ut.

Dag 2

Snittene ble tatt ut av kjøleskapet. Overskuddet av primære antistoffet ble fjernet ved at snittene ble skylt i et kar med PBS i 2 x 5 minutter på ristebord.

1. Sekundærantistoffet ble påført og fikk virke i 20 minutter i romtemperatur. Det er viktig at sekundærantistoffet er konjugert med biotin eller et annet molekyl på forhånd for at komplekset som tilsettes i neste trinn skal kunne binde seg til dette. Etterpå ble preparatene skylt med PBS i 2 x 5 minutter.

2. ABC^{HRP} ble påført og fikk virke i 30 minutter. Dette komplekset består av avidin og biotinyleret HRP. Komplekset binder seg til biotinmolekyler på det sekundære antistoffet (se figur 16). Dette er trinnet som forsterket signalet fra molekylet vi ønsket å undersøke.
3. DAB (3,3'-diaminobenzidin) blandes med 1 ‰ H₂O₂. Hele løsningen ble påført snittene og fikk virke i 7 minutter. I dette trinnet er det viktig å være nøyaktig med tiden fordi man får en veldig mørk farging hvis løsningen ligger for lenge. DAB og H₂O₂ er substrater for HRP, og DAB oksideres til et brunfarget tungt løselig produkt som binder seg til vevet der antigenet ligger. OBS! DAB er karsinogent og skal brukes med stor forsiktighet.

Preparatene ble skylt først med destillert vann, så med PBS.

4. Kontrastfarging med hematoxylin. Hematoxylin måtte først filtreres gjennom et filter-papir for å fjerne krystaller. Snittet lå i hematoxylin i 5 sekunder. Preparatene ble skylt godt med vann, så PBS i 1 minutt, og til slutt skylt med vann en gang til.

Poenget med kontrastfarging er å farge alle cellene slik at de kan lokaliseres og bli synlige i mikroskopet.

5. Dehydrering

Før dekkglass skulle monteres over snittene, ble snittene gjort vannfrie igjen slik at de ble holdbare.

Vann ble trukket ut gjennom alkoholbad i stigende rekkefølge (Figur 17): etanol 70 % i 15 sekunder, etanol 96 % i 2 x 30 sekunder, etanol 100 % i 2 x 1 minutt, og til slutt xylen 2 x 2 minutter.

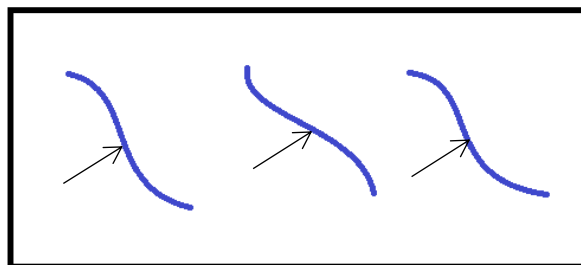
6. Montering med histokit

Dekkglasset ble montert med xylenbasert lim. Snittene lå til tork i avtrekksskapet til all xylenen var fordampet på grunn av helsefare ved xylen.

Fotografering & scoring

Fotografering

Når fargingen var ferdig, kunne jeg starte med fotografering og scoring. I denne oppgaven ble det brukt Nikon Eclipse 800 lysmikroskop til fotografering og scoring. Bildene ble tatt med 20x objektiv. Det ble tegnet inn en pil i midten av hvert snitt, og bildene ble tatt på hver side av pilen (Figur 18). Sentralt område ble valgt fordi her er det minst fare for uttørring av snittet og dermed feil i fargingen. Det er også fare for at snittene blir revet opp i sidene ved behandling. Sentralt område er derfor best å undersøke.



Figur 18 illustrerer et objektglass med 3 vevssnitt (blå linjer). Det ble tegnet inn en pil i midten av hvert snitt som vist på figuren, og bildene ble tatt på hver side av pilen.

Scoring

Scoringene ble gjort på fotografiene på en dataskjerm, den samme skjermen for alle bildene. Scoringen foregikk blindt, det vil si at jeg ikke visste på forhånd hvilken behandling hvert enkelt snitt hadde fått.

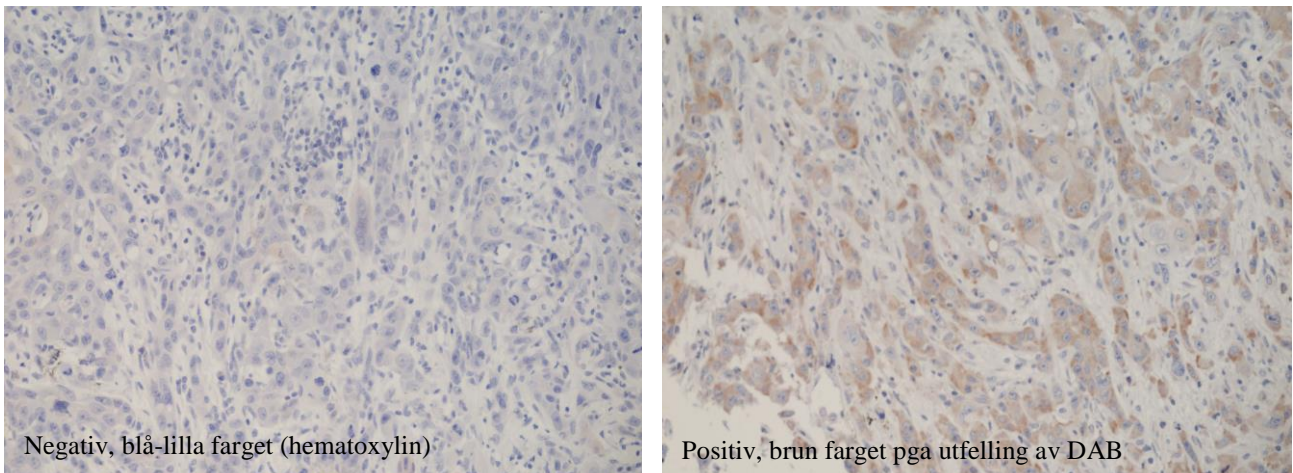
For Ki-67 og cleaved-caspase 3 var det kjernefarging mens det var cytoplasmatisk og membran-farging for resten av molekylene (Figur 21 på side 33 og 34). Scoringen av Ki-67 og cleaved-caspase-3 ble utført ved at antall positive og negative celler ble registrert/telt manuelt ved hjelp av et dataprogram. Brune cellekjerne ble registrert som positive, og blå-lilla cellekjerne ble registrert som negative. Etter tellingen regnet vi ut total score:

$$\text{Total score} = \frac{\text{antall positive celler}}{\text{totalt antal celler}} \times 100 \%$$

Resultatet

Hva er positiv? Hva er negativ?

Bildene under er et OSCC farget med survivin. I denne oppgaven indikerer brunfarge positiv farging.



Figur 19 - Histologisk snitt fra biopsi av OSCC. Bildet til venstre farges negativ for survivin. Bildet til høyre farges positiv for survivin

Resultater

Resultater av fargingene ble som forventet ut ifra karakteristika av kreftcellene som høy grad av proliferasjon og overlevelse og liten grad av apoptose.

Survivin hadde en cytoplasmatisk farging. Man så en jevn brun farge over hele snittet, og det betyr at alle cellene er positive. I noen snitt ble også fibroblaster farget positive. Konklusjon: survivin er tilstede i både OSCC-celler og fibroblaster. For de modellene som var behandlet og de som ikke var behandlet, fikk vi ganske like farge hele veien. Det betyr at behandling med CoCl_2 og p38-hemmer ikke påvirket uttrykk av survivin. Det ble også påvist uttrykk av survivin i pasientbiopsier fra OSCC.

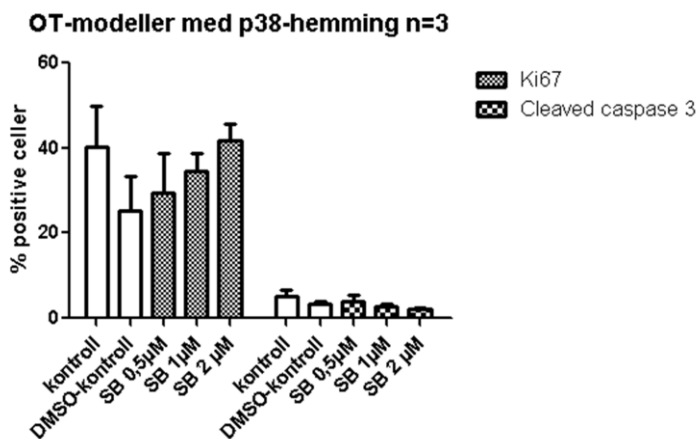
E-cadherin og β -catenin hadde membranfarging, det vil si at vi så en brun linje langs hver enkelt cellemembran. Alle OSCC-cellene var positive, mens fibroblaster var negative. Her (farging med E-cadherin og β -catenin) var det

også ganske lik farge i både ubehandlede og behandlede modeller. Konklusjon: E-cadherin og β -catenin er tilstede i modellene, og deres uttrykk blir ikke påvirket av CoCl_2 og p38-hemmer.

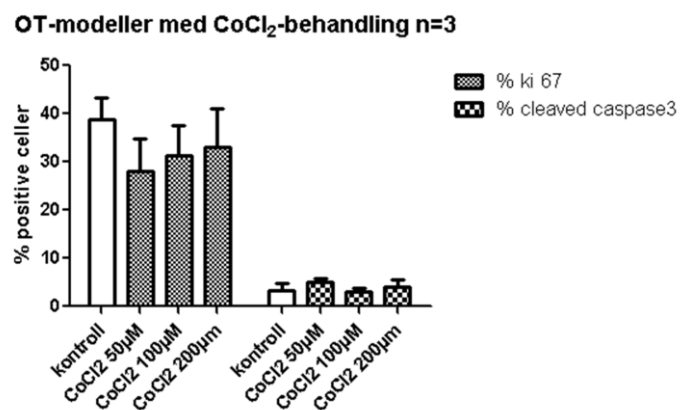
For Ki-67 og cleaved-caspase-3 som hadde kjernefarging, så man både positive og negative cellekjerne. Celler i vevet som farget med Ki-67 hadde mange positive kjerne, mens celler i vevet som farget cleaved-caspase-3 hadde ganske få brune kjerne. I tillegg så vi også uttrykk av Ki-67 i fibroblaster.

Dataene fra tellingen av Ki-67 og cleaved-caspase 3 ble brukt i et statistisk dataprogram (SigmaStat - Systat Software Inc.), og det ble kjørt t-test. T-testen forteller oss om gjennomsnittet av antall positive celler i en gruppe er signifikant forskjellig fra gjennomsnittet i en annen gruppe.

Proliferasjon og apoptose i modeller med p38-hemming



Proliferasjon og apoptose i CoCl_2 -behandlede modeller



Figur 20 - Grafene viser andelen av celler som farges positiv for Ki67 og caspase 3, behandlet med p38-hemmer (grafene til venstre) og CoCl_2 (grafene til høyre) i ulike konsentrasjoner, samt kontroller. Søylenes representerer gjennomsnittet \pm SEM, n=3.

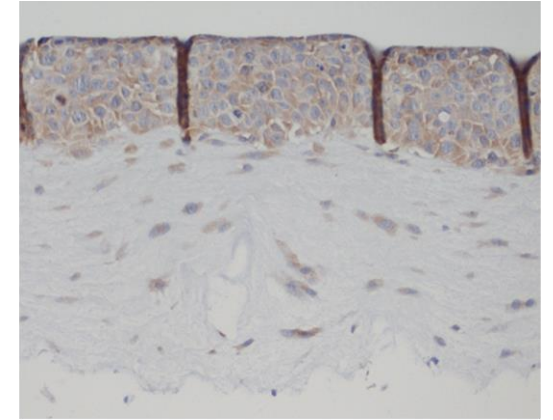
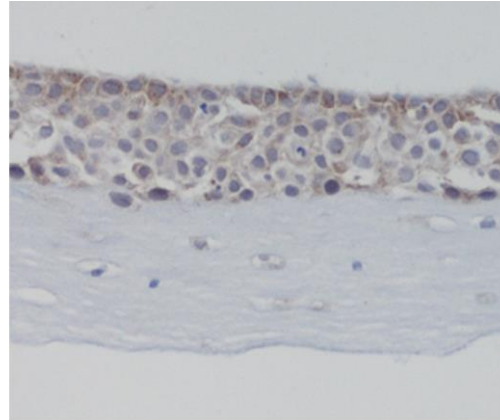
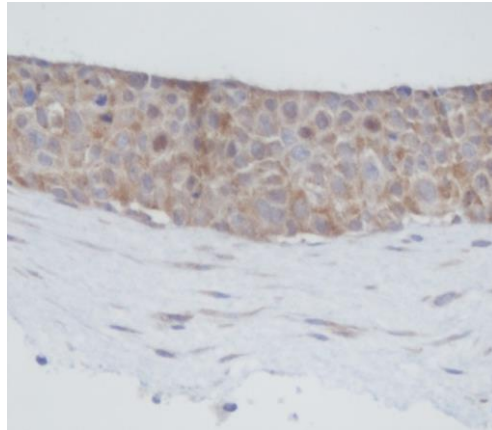
Grafene viser en liten forandring/påvirkning, men t-testen viste at disse endringene ikke var signifikante. Det betyr at det ikke er noen statistisk signifikant forskjell på antall positive cellekjerne mellom ubehandlede og behandlede modeller. Vi kan derfor slutte at uttrykket av Ki67 og cleaved-caspase-3 ikke lar seg påvirke av CoCl_2 og p38-hemmer.

Ubehandlet modell

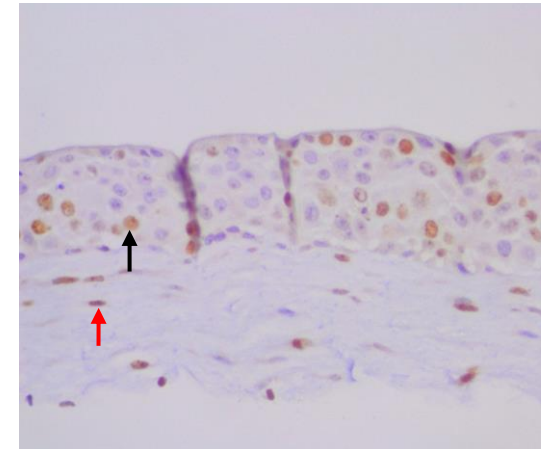
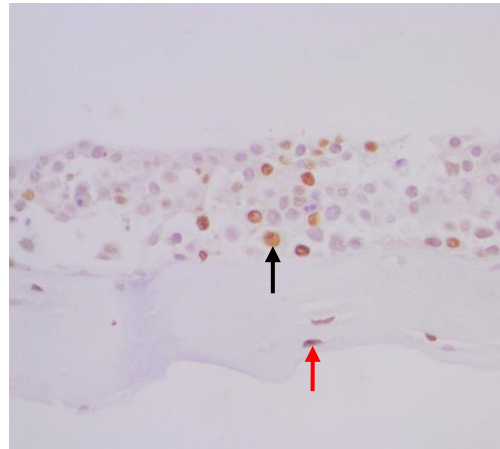
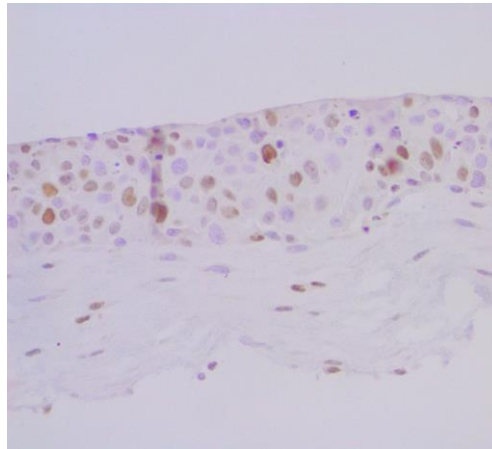
Behandlet med CoCl_2

Behandlet med p38-hemmer

Survivin



Ki-67

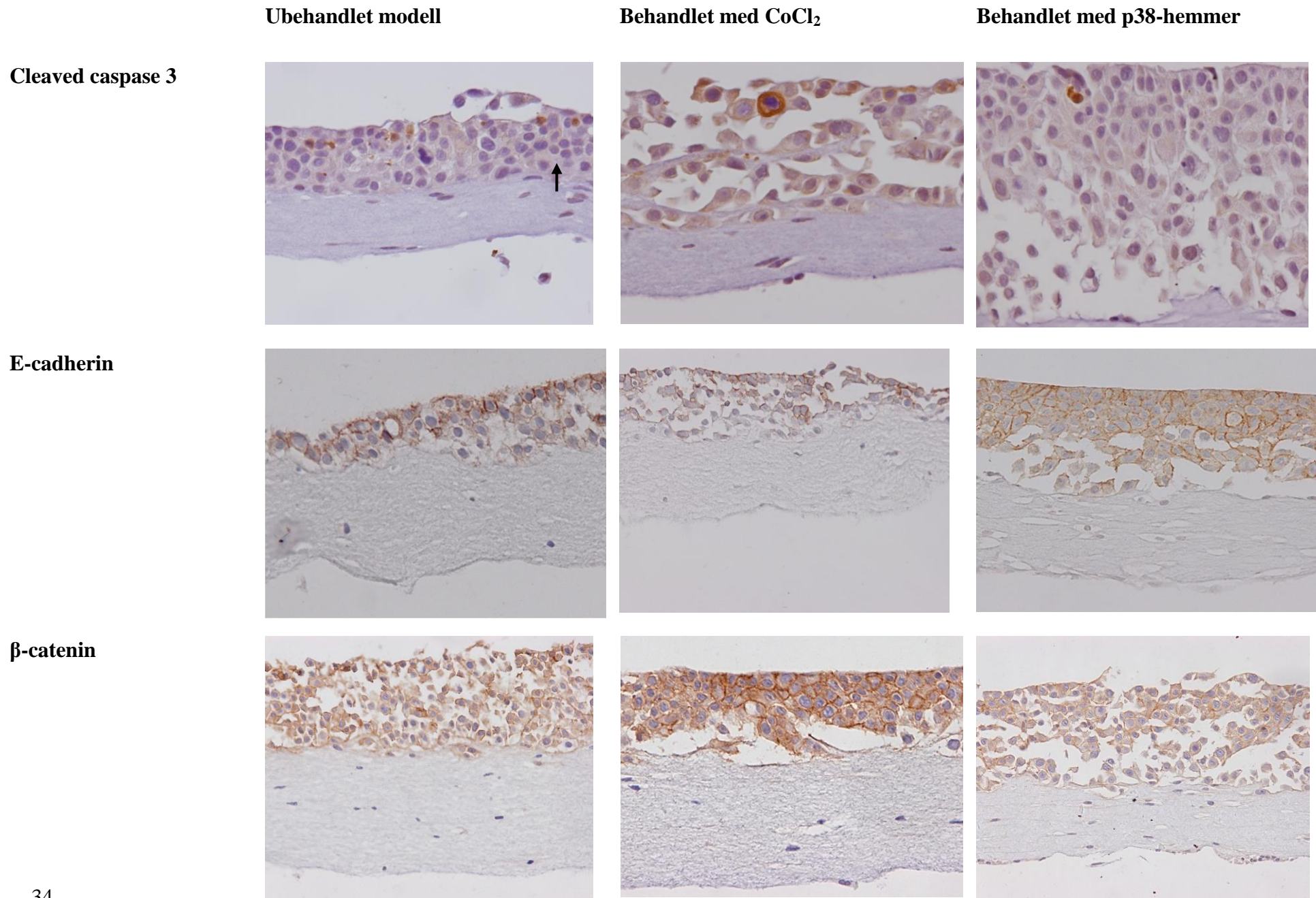


Figur 21 - Immunohistokjemisk farging av 3-dimensjonal co-kultur organotypisk munnhulekreftmodell

Bildene ble tatt med 20x objektiv. Ubehandlede modeller er til venstre. CoCl_2 -behandlede modeller er i midten. p38-hemmer er til høyre.

Svart pil: positiv OSCC-celle. Rød pil: positiv fibroblast.

Snittene på neste side er litt løsrevet fra hverandre og fra underliggende bindevev. Dette skyldes behandlingene modellene fikk under dyrking.



Figur 21 - Immunhistokjemisk farging av 3-dimensjonal co-kultur organotypisk munnhulekreftmodell

Diskusjon av laboratoriearbeid

Prognosen for pasienter med munnhulekreft er avhengig av primærtumors omfang (T-klassifisering) og lokalisasjon. Pasienter med tidlige stadier (T1, T2) av plateepitelkarsinom uten spredning til lymfeknuter har en relativt god prognose. Langtidsoverlevelse reduseres ved mer avansert sykdom (T3, T4). Ved spredning til lymfeknuter på hals, halveres overlevelse i forhold til tilsvarende T-stadium uten spredning³. Det er derfor viktig med tidlig diagnostisering, men dessverre oppdages ofte svulstene på et sent stadium. Dagens prognostiske verktøy er vist å ikke være gode nok da disse kun forutsier prognosen for en gruppe av pasienter, men ikke for en enkelt pasient⁴. Det er dermed ønskelig med utvikling av prognostisk verktøy som kan skille mellom ulike OSCC på individnivå.

Diskusjon av resultatet

Survivin

Proteinet survivin er i en tidligere studie påvist i OSCC. Her ble det vist at over 50 % av kreftcellene er survivin-positive²². I min farging av et oralt plateepitelkarsinom var de fleste kreftcellene survivin-positive (Figur 19). Jeg fant også at alle OSCC-celler i 3D-modellen var survivin-positive. Jeg har ikke klart å finne andre studier av survivin-uttrykk i 3D-modeller. Siden survivin synes å være et kreftspesifikt molekyl, kan det kanskje brukes som en diagnostisk markør, en prognostisk markør eller evt. som et behandlingsmål. Behandlingen av 3D-modellen med p38-hemmer og CoCl₂ påvirket ikke survivinuttrykket og dermed celleoverlevelse.

Ki67

Ki67 er en viktig proliferasjonsmarkør. I en studie av Lukandu et al. (2010)²³ ble Ki67 studert i 3D-modell av normal munnslimhinne. Som i en normal

munnslimhinne ble det funnet Ki67-positive kjerner i basalcellelaget. Motsatt av dette fant jeg Ki67-positive OSCC-celler spredt rundt i hele tumorvevet i 3D-modellen. Ca 40 % av kreftcellene var her positive. Dette er også forenlig med uttrykk av Ki67 i orale plateepitelkarsinom ²⁴. Behandling av 3D-modellen med p38-hemmer og CoCl₂ påvirket ikke Ki67-uttrykket og dermed proliferasjonen. OSCC-cellene vi har brukt viser kreftkarakteristika når det gjelder proliferasjon. Ki-67 uttrykket synes ikke å være regulert av en hypoksi-hermer eller p38-signalvei.

E-cadherin

I et normalt plateepitel er E-cadherin et viktig adhesjonsmolekyl mellom epitelcellene. Jeg fant E-cadherinuttrykk i samtlige modeller. Dette samsvarer med at de områdene som jeg undersøkte ikke var invasive. Søland og Brusevold påviste tap av E-cadherin i områder med tegn til invasjon. Tap av E-cadherinuttrykk i invasive områder stemmer overens med funn i OSCC fra pasienter ⁵. Så lenge kreftceller ikke viser tegn til invasjon synes behandlingen av 3D-modellen med p38-hemmer og CoCl₂ ikke å påvirke E-cadherinuttrykket og dermed celleadhesjonen.

β-catenin

Sammen med E-cadherin binder β-catenin seg til aktin som en del av adhesjonen mellom epitelceller. Vi fant positiv membranfarging for β-catenin i hele modellen, og uttrykket ble ikke påvirket av CoCl₂ eller p38-hemmer. β-catenin kan også gå inn i cellekjernen hvor det bidrar til økt cellevekst. Jeg fant ikke β-catenin positive cellekjerner i modellen, noe som er i samsvar med OSCC i kontrollerte IHC-forsøk fra The Human protein atlas (proteinatlas.org).

Cleaved-caspase 3

Det er spredt uttrykk av cleaved-caspase 3 i normal slimhinne ²⁵. I en tumor forventes ikke økt uttrykk av aktiverte caspase 3, og det fant vi heller ikke i 3D-

modellen. Behandlingen av 3D-modellen med p38-hemmer og CoCl_2 påvirker ikke cleaved-caspase-3-uttrykket og dermed ikke apoptose.

Metodologiske betraktning

3D-modellen

Vi har her benyttet en 3D-modell. I motsetning til 2D-modell hvor celler vokser på en plastflate, vokser kreftcellene i 3D-modell på en bindevevsmatriks som inneholder fibroblaster slik de gjør *in vivo*. I 3D-modell kontra 2D ligger kreftcellene i flere lag og kan dermed påvirkes av sine nabokreftceller på en annen måte enn i 2D-modell. Dessuten inkluderer en 3D-modell ECM og ytterligere celler, f.eks. fibroblaster i vår modell. Studier har vist en viktig kommunikasjon mellom ECM og dens celler og kreftceller. 3D-modeller ligner derfor mer på *in vivo* situasjonen enn 2D-kulturer. Det må likevel presiseres at sammenlignet med et plateepitelkarsinom, mangler vår 3D-modell for eksempel blodforsyning, nerver og immunceller. Modellen er tidkrevende og kostbare å dyrke. Likevel er 3D-modeller mer lik *in vivo* situasjonen enn 2D-modeller og er dermed viktige for å studere biologien i en svulst og for uttesting av medikamenter.

CoCl_2

CoCl_2 har vært benyttet som en hypoxihermer i gjennom mange år, og man tenker seg at Co^{2+} erstatter jern i hemoglobin og hemmer opptaket av oksygen. Det er en anerkjent metode, men det er uvisst hvordan Co^{2+} påvirker våre kreftceller i modellen. Effekt på kreftceller av CoCl_2 versus hypoxikammer på celler studeres nå ved IOB (personlig kommunikasjon, Sølund).

I sin studie fant Brusevold og Sølund at 31 av 40 3D-modeller behandlet med CoCl_2 hadde invasjon. Det er en statistisk signifikant assosiasjon mellom invasjon og tilsetning av CoCl_2 ⁵. Jeg fant ikke invasive OSCC-celler i de modellene som ble brukt i denne oppgaven. Dette kan skyldes snitting av

modellene eller at de modellene som ble brukt ikke hadde invasjon. En annen grunn kan være at i dette prosjektet ble kun et område sentralt i vevssnittet brukt i målingene, mens i Sølund og Brusevolds arbeider ble et større område av modellen evaluert (2 synsfelt på hver side av pilene).

Immunhistokjemi

Siden IHC er en ikke-standardisert metode som har mange trinn, er det mange faktorer som kan påvirke fargeresultatet. Vev som brukes i IHC må fikseres i formalin, støpes inn i parafin, snittes og overføres til objektglass. Før snittene kan brukes til farging må de deparafineres. Alle disse trinnene kan ha innflytelse på fargeintensiteten.

Som en kvalitetssikring på at det er riktig molekyl som studeres under mikroskopet hadde vi både positiv kontroll, negativ kontroll og DMSO-kontroll.

- a. *Negative kontroller* var snittene som ble påført uspesifikk antistoff i form av IgG istedenfor primærantistoff. Disse ble inkludert ved hver farging på hvert objektglass. Snittene med uspesifikt IgG skal ikke gi positivt fargeresultat. Dersom den negative kontrollen hadde gitt brunfarge, ville dette tydet på en uspesifikk binding av antistoffet i modellen. Man kunne dermed ikke stole på resultatet fra de snittene som lå på samme objektglass.
- b. *Positive kontroller*. Her vet vi fra før at vevet vil farge positivt. Hensikten med denne kontrollen er å undersøke om f.eks. antistoffet har blitt påvirket av oppbevaring.
- c. *DMSO-kontroller* omfatter 3D-modellene som kun ble tilsatt DMSO. Som tidligere nevnt er DMSO et løsemiddel som ble brukt for å løse opp p38-hemmer. Løsemidler vil kunne påvirke vevene. Hensikten med disse kontrollene er å forsikre at vevet ikke blir påvirket av DMSO og dermed endret IHC-fargingen.

Konklusjon & oppsummering

Jeg har i mine forsøk vist at det er stor grad av proliferasjon og overlevelse og liten grad av apoptose i 3D-modellene. Det vil si at det er høyt uttrykk av survivin og Ki-67 og lavt uttrykk av cleaved-caspase-3. Dette er typisk for en cancer. Det ble dessverre ikke funnet invasive OSCC-celler i dette prosjektet, men Brusevold og Sølund har i sine forsøk vist at CoCl_2 påvirker invasjon i OSCC-celler i 3D-modellene.

T-testen viste at endringene i uttrykk av survivin, Ki-67 og cleaved-caspase-3 ikke var signifikant, men kan skyldes tilfeldighet. Proliferasjon, overlevelse og apoptose i disse modellene ble altså ikke påvirket av behandling med CoCl_2 eller p38-hemmer.

Litteraturliste


- ¹ Larsen IK. Cancer in Norway 2013
- ² www.kreftforeningen.no
- ³ www.oncolex.no
- ⁴ Sjøland TM, Brusevold IJ. Prognostiske markører i kreftsvulster fra munnhulen – quo vadis? Den norske tannlegeforenings Tidende 2014; 124: 364-68.
- ⁵ Brusevold IJ, Husvik C, Schreurs O, Schenck K, Bryne M, Sjøland TM. Induction of invasion in an organotypic oral cancer model by CoCl₂, a hypoxia mimetic. European Journal of Oral Sciences 2010; 118: 168-76.
- ⁶ Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell, 5th edition. New York: Garland Science, 2008.
- ⁷ Notat fra forelesninger med Heidi Kiil Blomhoff
- ⁸ Kåresen R & Wist E. Kreftsykdommer – en basisbok for helsepersonell. 3. utgave. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag, 2009. 43-44.
- ⁹ Cooper GM & Hausman RE. The cell – a molecular approach, 3rd edition. Boston: Sinauer Associates, Inc., 2004.
- ¹⁰ Hanahan D og Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: the next generation. Cell 2011; 144: 646-74.
- ¹¹ Scholzen T & Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. Journal of cellular physiology 2000; 182: 311-22.
- ¹² Luporsi E, André F, Spyrtos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et. al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. Breast cancer research and treatment 2012; 132(3): 895-915.
- ¹³ Guindalini RSC, Machado MCM, Garicochea B. Monitoring surviving expression in cancer: implications for prognosis and therapy. Molecular Diagnosis & Therapy 2013; 17(6): 331-42.
- ¹⁴ Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nature Medicine 1997; 3(8): 917–21.

-
- ¹⁵ Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Research* 1999; 59(24): 6097–102.
- ¹⁶ Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiotherapy & Oncology* 2005; 77(1): 18-24.
- ¹⁷ Dhillon AS, Hagan S, Rath O & Kolch W. MAP kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3279-90.
- ¹⁸ Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Review* 2009; 9: 537-49.
- ¹⁹ www.odont.uio.no/iob/om/organisasjon/fagavd/cellebiologi/rutiner-metoder/
- ²⁰ Baker M. Blame it on the antibodies. *Nature* 2015; 521: 274-276
- ²¹ Vyberg M. Immunhistokemisk teknik 2005.
- ²² Zhang M, Li J, Wang L, Tian Z, Zhang P, Xu Q, et al. Prognostic significance of p21, p27 and survivin protein expression in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncology letters* 2013; 6(2): 381-386.
- ²³ Lukandu OM, Neppelberg E, Vintermyr OK, Johannessen AC, & Costea DE. Khat alters the phenotype of in vitro-reconstructed human oral mucosa. *Journal of dental research*, 2010; 89(3): 270-275.
- ²⁴ Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT & Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *British journal of cancer*, 2009; 100.7: 1128-1134.
- ²⁵ Karatsaidis A, Hayashi K, Schreurs O, Helgeland K, & Schenck K. Survival signalling in keratinocytes of erythematous oral lichen planus. *Journal of oral pathology & medicine* 2007; 36(4): 215-222.

Vedlegg

Det er gitt tilattelser for bruk av figurer i denne masteroppgaven.

RightsLink



Thank You For Your Order!

Dear Ms. Louise Lam,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Elsevier has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful.

Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below:
<http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=00aa4629-6960-4e6b-ab6b-7b150c54204c>


Order Details
Licensee: Louise Lam
License Date: Jul 8, 2015
License Number: 3664421102666
Publication: Trends in Molecular Medicine
Title: The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy
Type Of Use: reuse in a thesis/dissertation
Total: 0.00 USD

To access your account, please visit <https://myaccount.copyright.com>.

Please note: Online payments are charged immediately after order confirmation; invoices are issued daily and are payable immediately upon receipt.

To ensure that we are continuously improving our services, please take a moment to complete our [customer satisfaction survey](#).

B.1:v4.2



+1-855-239-3415 / Tel: +1-978-646-2777

Thank You For Your Order!

Dear Ms. Louise Lam,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink service. Elsevier has partnered with RightsLink to license its content. This notice is a confirmation that your order was successful.

Your order details and publisher terms and conditions are available by clicking the link below:

<http://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=b04f09cf-5fbf-4be5-bd28-aec532f8ad7c>

Order Details

Licensee: Louise Lam

License Date: Jul 8, 2015

License Number: 3664430051090

Publication: Cell

Title: Hallmarks of Cancer: The Next Generation

Type Of Use: reuse in a thesis/dissertation

Total: 0.00 USD

To access your account, please visit <https://myaccount.copyright.com>.

Please note: Online payments are charged immediately after order confirmation; invoices are issued daily and are payable immediately upon receipt.

To ensure that we are continuously improving our services, please take a moment to complete our [customer satisfaction survey](#).

B.1:v4.2



+1-855-239-3415 / Tel: +1-978-646-2777

SV: Tillatelse om å bruke dine figurer

Fra: **Olav Joseph F Schreurs** (o.j.f.schreurs@odont.uio.no)

Sendt: 23. april 2015 07:15:18

Til: Louise Linn Lam (louiselinnlam@hotmail.com)

Helt i orden!

Mvh Olav

Sendt fra min mobil

Fra: [Louise Linn Lam](#)

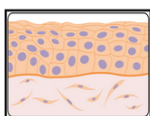
Sendt: 22.04.2015 23:18

Til: [Olav Joseph F Schreurs](#)

Emne: Tillatelse om å bruke dine figurer

Hei Olav,

Det er Louise, tannlegestudenten som har vært og jobbet på laben. Jeg holder på å skrive min masteroppgave. I den forbindelse tenker jeg å bruke et par figurer som du har laget. Er det greit for deg at jeg bruker dem i min masteroppgave? Jeg skal selvfølgelig sitere at det er deg som har laget dem. Den ene figuren er den om IHC-metode, den andre figuren er den figuren under



MVH,



BSCS Permission Form

Request Date: 12 August 2015

Requested By: Louise Linn Lam
linhkl@student.odont.uio.no


Description: NIH1 module: *Cell Biology & Cancer*, figure 3

For Use In: Requestor's master thesis, dental school

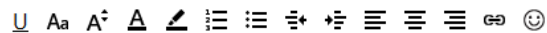
Use Requirements: We are granting non-exclusive rights for use of this BSCS image. The image may be used for the requestor's master thesis only. Use in any other project requires new permission. Permission for use of the image may not be transferred to any other person, company, or organization. Credit must be obviously given in relation to the image as shown below. The reference is provided for your convenience.

Credit Line: Copyright © 1999 BSCS & Videodiscovery. All rights reserved. Used with permission.

Reference: BSCS & Videodiscovery. (1999). *Cell biology and cancer*. NIH publication No. 99-4646.

Signed: 
Stacey Luce
Production Coordinator
31 August 2015

FW: Permission request

F K U Aa A⁺ A 

Subject: RE: Permission request
From: Ana.Perez@taylorandfrancis.com
To: linhkl@student.odont.uio.no
Date: Wed, 18 Nov 2015 21:23:23 +0000

Dear Louise,

Apologies. We have decided to grant you republishing rights for the following figures from *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition. As such, each copy bearing our material must contain the following credit line:
© 2008 from *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition by Alberts et al. Reproduced by permission of Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

Thank you!
Ana Perez
Marketing Assistant
Garland Science | Taylor & Francis Group LLC
711 Third Avenue, 8th floor
New York, NY 10017
917-351-7138
ana.perez@taylorandfrancis.com
www.garlandscience.com
[Twitter](#) | [YouTube](#) | [Facebook](#)