

**Examensarbete 15 hp,
Kandidatexamen i biomedicinsk laboratorievetenskap
Vt 2017**

Mätning av kluven Kaspas-3 och kluven PARP i manganbehandlade PC3 celler

Författare: Hussein Karim Ali

Handledare: Bodil Hernroth och Helena Tassidis

Sektionen för lärande och miljö

Författare

Hussein Karim Ali

Titel/ Title

Mätning av kluven Kaspas-3 och kluven PARP i manganbehandlade prostatacancer celler

Mesurement of cleaved Caspase-3 and cleaved PARP in manganese-treated prostate cancer cells

Handledare

Prof. Biomedicinsk lab.vetenskap. Bodil Hernroth, HKR

Dr. Leg BMA. Helena Tassidis, HKR

Examinators

Prof. Mikrobiologi. Ann-Sofi Rehnstam-Holm, HKR

Populärvetenskaplig sammanfattning

Prostatacancer är den sjätte mest förekommande cancertypen i världen, och den tredje vanligaste cancertypen bland män. Sjukdomen drabbar främst äldre män. Sjukdomen kan behandlas genom kastrering där man opererar bort prostatakörteln och det används också läkemedel som hämmar celledelning genom att stoppa signalvägarna som stimulerar tillväxt. Denna typ av behandling botar inte cancer, men låter inte tumören växa lika snabbt. Resultatet av behandlingen är oftast inte långvarigt då cancer cellerna kan anpassa sig till den miljö de befinner sig i och därmed börja föröka sig igen. Det är därför viktigt att utveckla bättre behandlingsmetoder.

Apoptos är en programmerad celldöd som kan aktiveras av signaler från insidan och utsidan av cellen. Dessa signaler aktiverar olika apoptotiska markörer som i sin tur aktiverar andra markör såsom Kaspas-3 genom klyvning. Kluven Kaspas-3 kommer i sin tur att bryta ner cytoskelettet som bygger upp cellens form, aktiverar DNase, som bryter ner DNA molekylen och klyver även det intracellulära proteiner Poly ADP Ribose Polymerase (PARP). PARP sitter på DNA molekylen och hjälper till att reparerar DNA skador. När proteinet klyvs av kluven Kaspas-3 inaktiveras PARP och då kan inte nya DNA skador repareras utan cellen kan gå i apoptos. Mangan är ett viktigt spårämne som alla organismer behöver men tidigare studier har visat att mangan i höga koncentrationer kan orsaka apoptos. Det är något man skulle kunna dra nytta av i cancerbehandling.

Syftet med projektet var att undersöka om de sker en ökning av de apoptotiska markörerna kluven Kaspas-3 och kluven PARP efter manganbehandling av prostatacancer celler. Därefter kunna avgöra om manganbehandlingen har orsakat celldöd genom att inducera apoptos.

Under projektet odlades prostatacancer celler (PC3-celler) som sedan behandlades med mangan under 6, 24 och 48 timmar. Därefter mättes mängden av proteinerna kluven Kaspas-3 och kluven PARP med hjälp av antikroppar som specifikt kunde koppla till dessa proteiner. Själva detektionen skedde genom att ett enzym som var fäst på antikropparna reagerade med

ett substrat så att det bildades en färg, som mättes i en spektrofotometer. Ju mer färg desto mer ljus absorberas och absorbansen motsvarar koncentrationen av proteinerna.

Det hade förväntats att det skulle ske en tydlig stegvis ökning av apoptosmarkörerna med inkuberingstid. Detta skedde inte och orsaken kan vara att lyseringsbufferten förvarades felaktigt och därmed inte gav ett fullständigt lysat för alla prover. Bestämningen av proteinkoncentrationen visade att kontrollcellerna inte mådde så bra, då de bara innehöll en tredjedel av den proteinkoncentration som uppmättes i manganbehandlade cellerna. Detta kan bero på att det skedde ett byte av odlingsmedium. Glukoshalten i de olika odlingsmediummen kontrollerades aldrig. En högre koncentration av glukos kan leda till en snabbare förökning av cellerna.

Det är å andra sidan inte uteslutet att mangan inte inducerar apoptos via dessa signalvägar. Det krävs en uppföljning av arbetet för att kunna kartlägga vilka apoptotiska markörer som orsakar apoptos när det gäller manganbehandling av PC3 celler.

Sammanfattning

Prostatacancer är den sjätte mest förekommande cancertypen i världen, och den tredje vanligaste cancertypen bland män. De olika typer av behandlingar som finns idag botar oftast inte sjukdomen. Det är därför viktigt att utveckla bättre behandlingsmetoder. Det är sedan tidigare känt att mangan kan orsaka apoptos i olika celltyper. Det ger en möjlighet att använda mangan för att hämma cancer och det är därför viktigt att veta vilka apoptotiska markörer som är involverade.

Syftet med projektet var att undersöka om de sker en ökning av de apoptotiska markörerna kluven Kaspas-3 och kluven PARP efter manganbehandling av prostatacancer celler. Därefter kunna avgöra om manganbehandlingen har orsakat celdöd genom att inducera apoptos.

Under projektet odlades prostatacancer celler (PC3) som sedan behandlades med 200 μM mangan under 6, 24 och 48 timmar. Därefter mättes mängden av proteinerna kluven Kaspas-3 och kluven PARP med hjälp av ett sandwich-ELISA kit.

En tydlig stegvis ökning av apoptosmarkörerna med inkuberingstid hade förväntats. Det förväntade resultatet erhöles inte, för kluven Kaspase-3 ledde manganbehandlingen t.o.m. till en sänkning av koncentrationen. Det kan ha uppstått problem vid analysen som t.ex dålig lysering av cellerna eller ojämn tillväxt av dem. Det behövs fler studier för att utreda detta och för att undersöka andra potentiella apoptosmarkörer.

Ämnesord

Prostatacancer, Cancerbehandling, Mangan, Kluven Kaspas-3, Kluven PARP, Sandwich-ELISA

Abstract

Prostate cancer is the sixth most common cancer type in the world, and the third most common cancer type among men. The different types of treatments that are available today do not usually cure the disease. It is therefore important to develop better treatment methods. It has previously been stated that manganese can cause apoptosis in different cell types. It provides an opportunity to use manganese to inhibit cancer and it is therefore important to know which apoptotic markers that are involved.

The purpose of the project was to investigate whether an increase in the apoptotic markers cleaved Kaspas-3 and cleaved PARP after manganese treatment of prostate cancer cells. Thereafter, it can determine whether manganese treatment has caused cell death by inducing apoptosis.

During the project prostate cancer cells (PC3-cells) were cultivated, then treated with 200 μM manganese for 6, 24 and 48 hours. The amount of the proteins cleaved Kaspas-3 and cleaved PARP was measured by using a sandwich ELISA kit.

A clear gradual increase of apoptotic markers with incubation time was expected. The expected result was not obtained, for cleaved Kaspase-3 manganese treatment even decreased the concentrations. There may have been problems with the performance of the analysis such

as poor lysis of the cells or uneven growth of the cells. More studies are required to investigate this and other potential apoptotic markers.

Key words

Prostate cancer, Cancer treatment, Manganese, Cleaved Caspase-3, Cleaved PARP, Sandwich-ELISA

Innehållsförteckning

1. Inledning	7
1.1 Prostatacancer	7
1.2. Detektering av prostatacancer	7
1.3. Behandling av prostatacancer	7
1.4. Skillnaden mellan apoptos och nekros	7
1.5. Kaspaser	8
1.6. Poly ADP Ribose Polymerase (PARP)	8
1.7. Hur mangan påverkar cancerceller	9
1.8. Syfte	9
2. Material och metod	10
2.1 Cellodling	10
2.2 Manganbehandling	10
2.3 Kluven PARP och kluven Kaspas-3 i manganbehandlade PC3 celler	10
2.3.1. Lysering	10
2.3.2. Proteinbestämning	10
2.4 Statistik	11
3. Resultat	11
4. Diskussion	14
5. Slutsats	15
Referenser	16

1. Inledning

1.1 Prostatacancer

Prostatacancer är den sjätte mest förekommande cancertypen i världen, och den tredje mest vanliga cancertypen bland män. Sjukdomen drabbar främst äldre män (Grönberg 2003). Prostatacancer brukar inte visa några symptom i tidigt stadie. När tumören har växt till sig kan sjukdomen ge liknande symptom som godartad prostataförstoring., som t.ex. svag urinstråle. Det finns dock inget samband mellan dessa två sjukdomar [Statens bredning för utvärdering av medicinsk metodik (SBU) 1995]. Det finns även andra symptom som trötthet, aptitlöshet (Lund-Egloff & Löwbeer 2014), blodbrist, svullnad i benen och viktnedgång. Det är dock inte enbart prostatacancer som kan vara bakomliggande orsak till dessa symptom (SBU 1995).

1.2. Detektering av prostatacancer

Det krävs flera undersökningar för att helt säkert kunna veta om en patient är drabbad av prostatacancer. Med hjälp av ett blodprov mäts värdena för ett prostataspecifikt antigen (PSA). Förhöjda värden av PSA kan bero på prostatacancer (Damber & Aus 2008). Proteinet PSA produceras främst i prostatakörtelcellerna (Lund-Egloff & Löwbeer 2014) och har en tendens att öka med åldern. Förutom prostatacancer kan höjda PSA värden även bero på inflammationer och godartad prostataförstoring (Becker 2012). Om PSA värdet överstiger en viss gräns så utförs andra undersökningar. De börjar med att läkaren palperar prostatakörteln genom ändtarmen. Därefter kan andra undersökningar som biopsi (Vickers et al. 2010), magnetkameraundersökning (MR; Pokorny et al. 2014), datortomografi (PET/CT; Castellucci et al. 2015) eller skelettscintigrafi (Lu, Chien, Ke, Huang & Huang 2015) utföras.

1.3. Behandling av prostatacancer

En typ av behandling är androgendeprivationsterapi (ADT). Denna kan utföras genom kirurgiska ingrepp (kastring). Behandlingen kan även utföras med hjälp av läkemedel. Dessa läkemedel hämmar celldelning genom att stoppa signalvägarna för androgener. På så sätt hämmas tillväxten av prostatacancer cellerna. Detta botar inte cancer, men gör så att tumören inte växer lika snabbt. Resultatet av behandlingen är oftast inte långvarigt då cancer cellerna kan anpassa sig till den miljö de befinner sig i och därmed börja föröka sig igen. Vid förekomst av resistens mot ADT används Docetaxel. Dock ökar Docetaxel bara livslängden med 2,5 månader för de patienter som får positiva reaktioner av medicinen (Liu et al. 2012). Dessa behandlingsmetoder är således inte så effektiva. Det behövs nya metoder som genom t.ex. apoptos dödar cancer cellerna för att undvika inflammation och minimera påverkan på omkringliggande celler (Fadeel & Orrenius 2005)

1.4. Skillnaden mellan apoptos och nekros

Apoptos och nekros är två olika former av celldöd. Nekros förekommer när cellen utsätts för t.ex. fysiska skador, infektioner eller stroke. Under nekros svullnar cellen och dess organeller, cellmembranet brister, cellkärnan lyseras och bland annat töms cellen på reaktiva metaboliter. Vid förekomst av nekros skadas oftast många celler inom det drabbade området, vilket de inte gör vid apoptos. Apoptos är en programmerad celldöd som styrs av intracellulära eller

extracellulära signaler (Figur 1). Under apoptos förändras cellens morfologi. Cellmembranets struktur förändras, DNA molekylen klyvs vid specifika sekvenser och cellen krymper ihop och delas i mindre delar. Dessa fagocyteras och det uppstår ingen inflammation. Apoptos orsakar därmed ingen vävnadsskada. Hos flercelliga organismer används apoptos för att få bort oönskade och eller defekta celler (Mattson & Bazan 2012).

1.5. Kaspaser

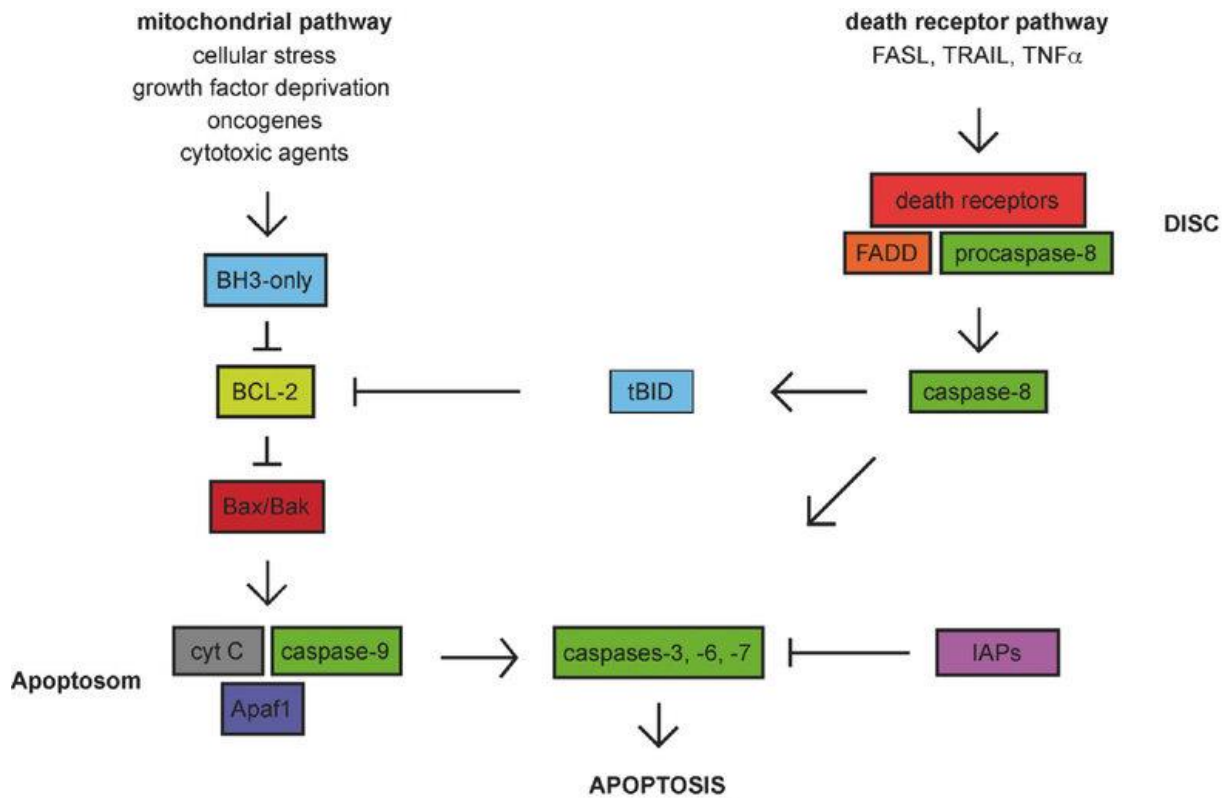
Kaspaser är intracellulära proteaser som triggar igång apoptos hos cellerna (Shi 2002). Kaspaser har aminosyran cystein på proteasens aktiva sida, vilken behövs för att klippa av specifika asparaginsyror i målproteinet (Alberts et al. 2015).

Kaspaserna delas in i två olika grupper: Initiator kaspaser (kaspas 8 och 9) och executioner kaspaser (kaspas 3, 6 och 7). Den viktigaste funktionen för initiator kaspaserna är att aktivera executioner kaspaserna genom att klyva dem (Budihardjo, Oliver, Lutter, Luo & Wang 1999).

Executioner kaspaserna aktiverar DNase som bryter ner DNA molekylen. De bryter även ner cytoskelettet i cellen (Alberts et al. 2015). Kaspas 3 och 7 klyver även Poly ADP Ribose Polymerase (PARP) vilket bidrar till apoptos (Puig, Tortosa & Ferrer 2001).

1.6. Poly ADP Ribose Polymerase (PARP)

PARP är proteiner som hjälper till med DNA reparationen. PARP spelar en stor roll inom många olika sjukdomar, bland annat inflammationer, cancer, myokardischemi, och diabetes (Berger et al. 2017). Vissa kluvna kaspaser som t.ex. kluven kaspas 3 klyver PARP proteinet, vilket gör att PARP inte längre kan reparera den skadade DNA molekylen. Om DNA molekylen inte längre kan repareras kan cellen genomgå apoptos (Puig, Tortosa & Ferrer 2001). PARP reparation av DNA-skada är ATP-krävande och alltför stora skador leder till att cellen istället går i nekros (Elkholi & Chipuk 2013).



Figur 1. Aktivering av intracellulär apoptos (startar från mitokondrien) och extracellulär apoptos (startar från extracellulära signaler som aktiverar membranreceptorer) (Hamcher, Schmid, Saur & Schneider 2008).

1.7. Hur mangan påverkar cancerceller

Mangan är ett essentiellt spårämne som är viktigt för många cellfunktioner (Jensen & Jensen 2014). Vid överskott av mangan tar cellerna upp mangan istället för calcium och stör på så sätt flera olika cellmekanismer (Luciaciu, Dragu, Copaescu & Morariu 1997). Mangan har visats aktivera extracellulära pro-apoptotiska signaleringsvägar via membranreceptorer (Corsetto et al. 2015). Mangan kan även inducera apoptos intracellulärt genom att orsaka oxidativ stress som i sin tur aktiverar apoptos via mitokondrierna (Hirata 2002). Det har även visats att mangan minskar prostatacancercellers viabilitet och inducerar celldöd, dock är det ännu oklart hur cellerna signalerar till celldöd (Hernroth & Tassidis et al. opublicerad data)

1.8. Syfte

Syftet med denna studie var att undersöka om koncentrationerna av apoptosmarkörerna kluven kaspas 3 och kluven PARP ökar hos prostatacancerceller (PC3 celler) efter manganbehandling. Om manganbehandlingen orsakar celldöd genom att inducera apoptos finns potential att använda mangan i framtida cancerbehandling med fokus på kombinationsbehandling med befintliga behandlingar.

2. Material och metod

2.1 Cellodling

Human prostatacancer cellinje PC3 (ATCC, Manassas, Virginia, USA) som odlats i 37 °C, 5% CO₂ i sterila, icke-pyrogena och icke-cytotoxiska odlingsflaskor (Sarstedt, Aktiengesellschaft & co, Nümbrecht, Tyskland) med Dulbecco's Modified Eagle's medium med tillsats av 10 % FBS samt 1 % PenStrep (10,000 units/mL of penicillin and 10,000 µg/mL of streptomycin) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) separerades från flaskan. Först aspirerades mediet och cellerna tvättades med D-PBS (D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1X) utan CaCl₂ och MgCl₂; Gibco) därefter lossades de från flaskan genom tillsättning av 1 ml, 0,25% Trypsin-EDTA (Gibco). Antalet celler bestämdes med Bürkers räknekammare och ca 1 miljon celler sattes ut i sterila, icke-pyrogena och icke-cytotoxiska 60 mm plattor med odlingsmedium. De nya plattorna inkuberades över natten i 37 °C med 5% CO₂ för att tillåta cellerna att fästa upp. Allt arbete utfördes i en steril miljö så att cellerna inte kontaminerades.

2.2 Manganbehandling

Odlingsplattorna med en miljon celler per platta togs ut från inkubatorn dagen efter. Mediet i plattorna aspirerades. Odlingsplattorna tvättades med D-PBS och 1,5 ml medium med 5% fetalt bovine serum (FBS; Gibco) tillsattes till plattorna. Som behandling tillsattes 200 µM MnCl₂ till varje odlingsplatta förutom till kontrollcellerna. Cellerna inkuberades i 37 °C under 6, 24 och 48 timmar. Manganbehandlingen utfördes sterilt.

2.3 Kluven PARP och kluven Kaspas-3 i manganbehandlade PC3 celler

2.3.1. Lysering

Från kittet Pathscan Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology; Danvers, Massachusetts, USA) togs 10X lysbuffert och späddes till 1X med MilliQ-vatten. Till 1X lysbufferten tillsattes 1 mM Phenylmethylsulfonyl florid (PMSF; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Medium aspirerades från cellkulturer som inte manganbehandlats (0 tim; kontroll) och från de exponerade (6, 24 och 48 tim). Därefter tvättades cellerna med iskall D-PBS. Samtliga lyserades i 250 µl lyseringsbuffert då odlingsplattorna inkuberades på is under 5 minuter. Odlingsplattorna skrapades och materialet fördes över till små centrifugrör. Rören vortexades före centrifugering 10 minuter i 4 °C, 14 000 x g. Supernatanterna fördes över till nya centrifugrör och frystes in mellan -10 och -18 °C.

2.3.2. Proteinbestämning

Kittet Pierce BCA Protein Assay Kit (nr: 23225 och 23227, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) användes för att beräkna proteinkoncentrationen för de olika supernatanterna. Reagens WR preparerades genom att 50 delar reagens A blandades med 1 del reagens B från kittet. Kitet innehöll en BSA-standard som späddes till koncentrationerna 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 och 0 µg/ml. 25 µl från standardproverna och de okända proverna överfördes till brunnar i en 96-hålsmikroplatta. Tvåhundra µl WR tillsattes

till varje brunn. Mikroplattan skakades under 30 sekunder och inkuberades i 37 °C under 30 minuter. Då proverna återfått rumstemperatur mättes absorbansen vid 595 nm med hjälp av en spektrofotometer från PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA). Provernas proteinkoncentration bestämdes i relation till standardkurvan.

2.3.3 Sandwich ELISA

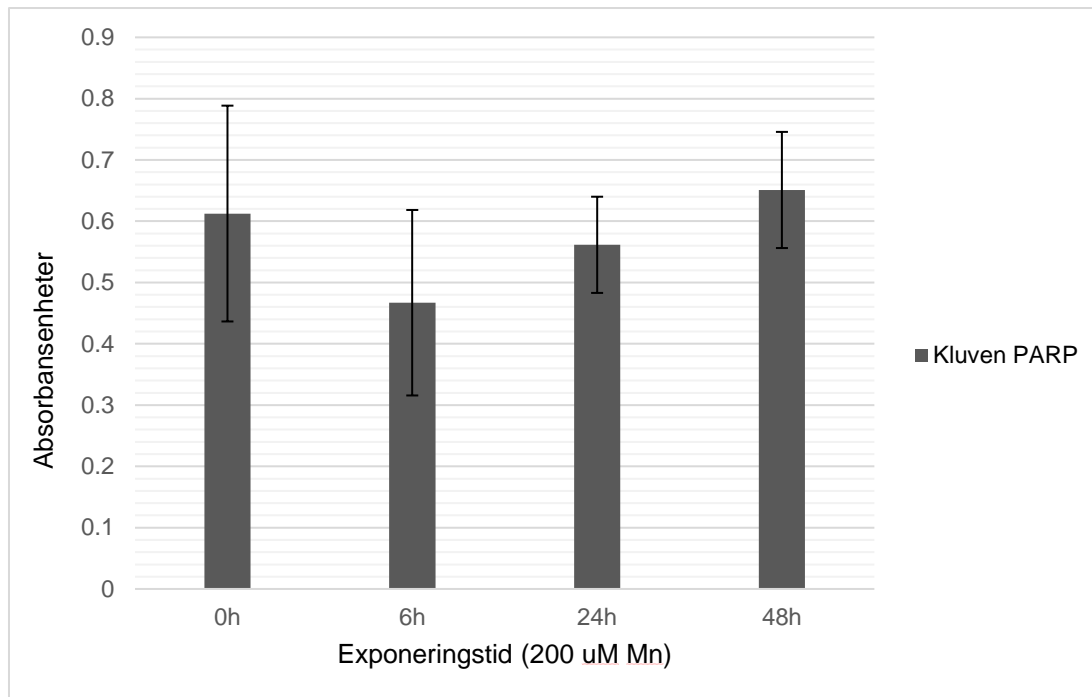
Med hjälp kittet PathScan Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA Kit (nr: 7105, Cell Signaling Technology) mättes mängden kluven PARP och kluven Kaspas-3 i de olika manganbehandlade PC3 cellerna (0, 6, 24 och 48 tim). Proteinkoncentrationerna som mätts enligt avsnitt 2.3.2 späddes till 500 µg/ml i MilliQ-vatten. De mikrobrunnar som var coatade med monoklonala kanin-antikroppar specifika för aminosyran Asp 175 i kluven Kaspas-3 och aminosyran Asp 214 i kluven PARP bröts av från kittets mikroplatta och fördes över till rumstemperatur. 105 µl "sample diluent" från kittet fördes över till mikrocentrifugrör. 105 µl av de lyserade cellerna överfördes till samma mikrocentrifugrör. Röret vortexades i några sekunder. 500 µg/ml av vardera prov överfördes till respektive mikrobrunn. Alla prover kördes i duplikat. Brunnarna täcktes med tejp och inkuberades i 4°C över natten. 20X tvättbuffert från kittet späddes till 1X med MilliQ-vatten och brunnarna tvättades fyra gånger. 100 µl biotinylerade detektionsantikroppar tillsattes till respektive prov innan inkubering i täckta brunnar i 37 °C under en timme. Tvättproceduren som beskrivs ovan upprepades och 100 µl HRP-bundna sekundära antikroppar tillsattes till varje brunn. Täckta brunnar inkuberades i 37 °C under 30 minuter och tvättproceduren upprepades igen innan 100 µl TMB substrat från kittet tillsattes till varje brunn. Efter inkubering under 10 minuter i 37 °C tillsattes 100 µl stopplösning. Provernas absorbansvärde mättes vid 450 nm med hjälp av en spektrofotometer (Victor X3 2030 multilabel reader, PerkinElmer). Försöket utfördes i två omgångar, vid första omgången behandling analyserades enbart en omgång PARP och i behandlingsomgång två analyserades en omgång PARP och två omgångar Kaspas-3.

2.4 Statistik

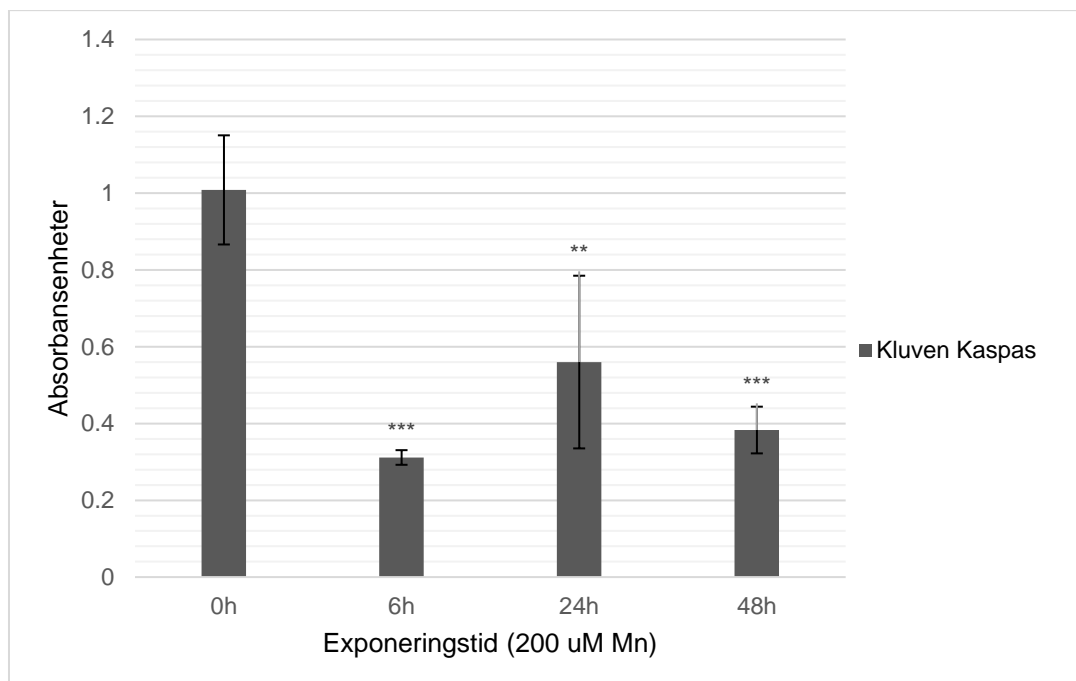
Det utfördes beräkningar av medelvärde av två oberoende försök utfört i duplikat, standardavvikelse, en-vägs ANOVA och t-test med hjälp av Excel 2013 för att jämföra kluven Kaspas-3 respektive kluven PARP i manganbehandlade PC3 celler i relation till obehandlade PC3 celler. Ett p-värde <0,05 ansågs som signifikant.

3. Resultat

De sammanställda resultatet från två försök som erhöles för kluven PARP och kluven Kaspas-3 efter 0, 6, 24 och 48 timmars exponering för mangan presenteras i Figur 2 och 3. Mängden kluven PARP påverkades inte av behandlingen (En-vägs ANOVA: $p > 0.05$). Kluven kaspas-3 påverkades av manganbehandlingen (En-vägs ANOVA: $p < 0.05$). Med hjälp av ett t-test jämfördes resultaten för 6, 24 och 48 timmars inkubering med resultatet från de obehandlade proverna för kluven Kaspas-3. T-testet visar en signifikant nedgång av kluven Kaspas-3 för de manganbehandlade PC3 cellerna i förhållande till de obehandlade, både efter 6, 24 och 48 tim (Figur 2).

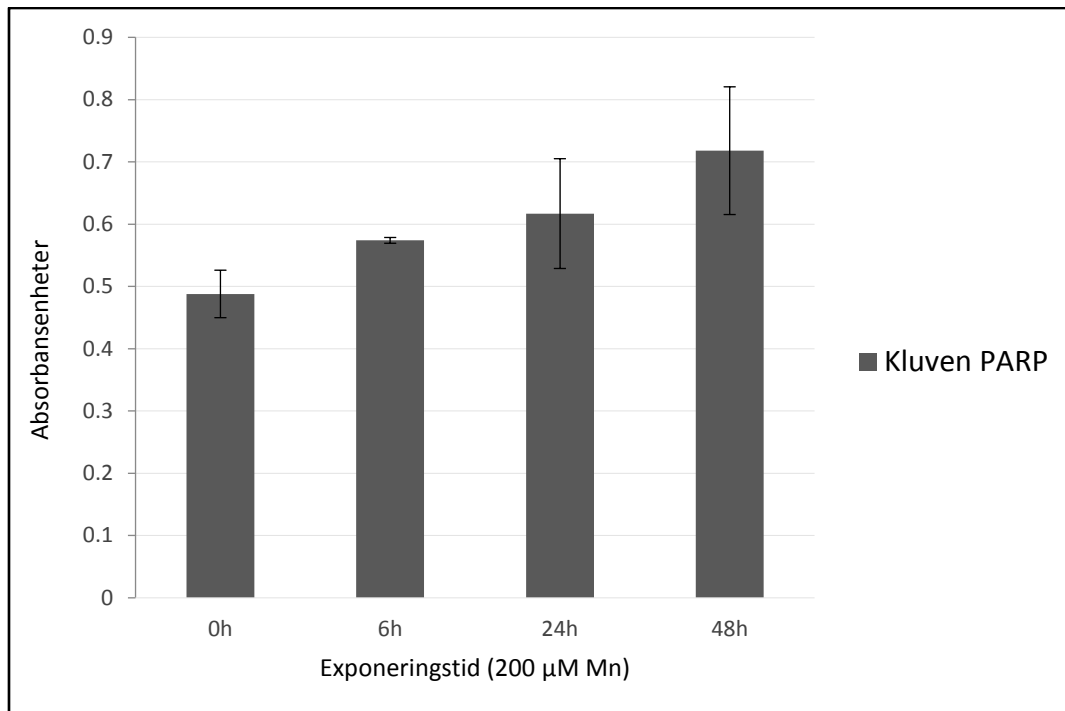


Figur 2. Medelvärde och standardavvikelse (n=2) för kluven PARP i PC3 celler som behandlats med 200 μM mangan.



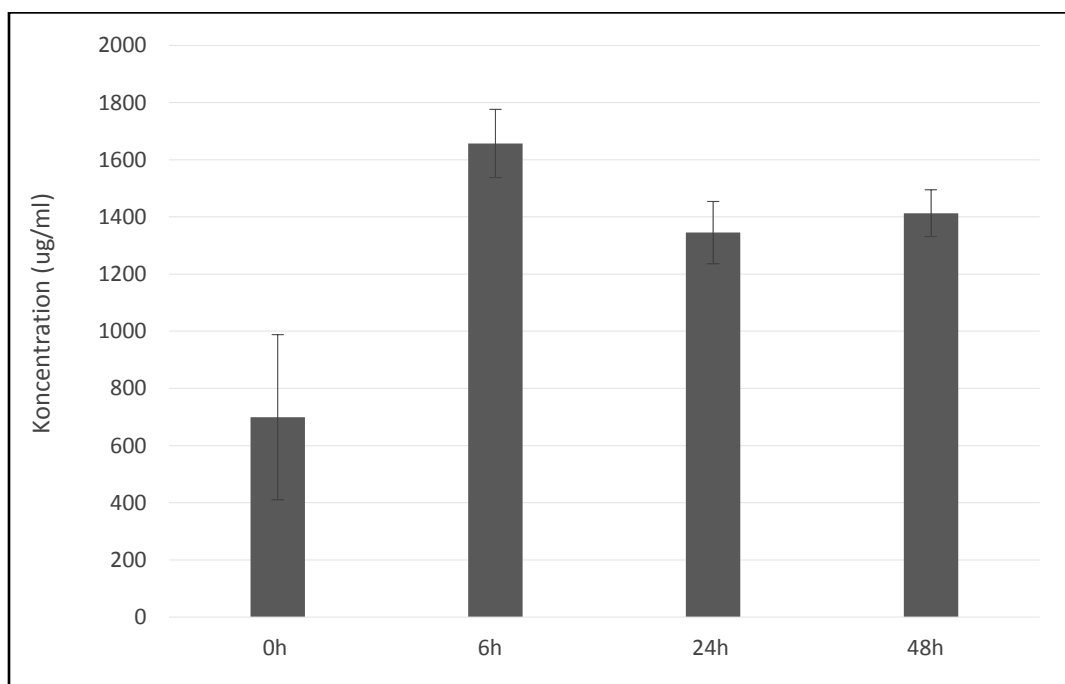
Figur 3. Medelvärde och standardavvikelse (n=2) för kluven Kaspas-3 i PC3 celler som behandlats med 200 μM mangan. Stjärnorna representerar resultat som erhöles från t-test: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

En sammanställning gjordes också av resultaten som erhöles för kluven PARP efter första analysomgången (n=1; Figur 4) för att illustrera hur de skiljer sig från resultaten i Figur 2 där båda replikaten (n=2) är inkluderade.



Figur 4. Absorbansvärden från första testet som erhöles för kluven PARP (n=1; utfört i duplikat).

I studien mättes protein i alla prover för att kunna använda samma proteinkoncentration till samtliga analyser och därmed normalisera resultaten till protein. Det visade sig att proteinerna skiljde sig markant mellan de obehandlade och de behandlade cellerna i behandlingsomgång två. Proteinkoncentrationen var betydligt lägre för de obehandlade cellerna (Figur 5).



Figur 5. Jämförelse av proteinkoncentrationen (mätta i triplikat) efter den andra behandlingsomgången.

4. Diskussion

Provresultaten blev inte som det förväntats. De förväntade värdena skulle följt det mönster som ses i Figur 4. Resultaten från första sandwich-ELISA körningen för kluven PARP visar att de obehandlade proverna hade lägst absorbans. Efter 6 timmars behandling ökade absorbansen och efter 48 timmars behandling blev absorbansen högst. En sådan trend förväntades både för kluven PARP och kluven Kaspas-3 eftersom tidigare studier har visat att mangan har orsakat apoptos för andra celler genom aktivering av kaspas-kaskaden (Uchida, Oh-hashii, Kiuchi & Hirata 2012).

I detta fall går det inte exakt att säga vad som har orsakat de oväntade resultaten, men det finns några olika teorier som kan ge förklaring. Det är inte alltid enkelt att arbeta med levande biologiskt material, såsom cellkulturer, eftersom de påverkas av omgivningen såsom näring i mediet. Proteinkoncentrationsbestämningen i figur 5 visade att kontrollcellerna inte mådde så bra, då de bara innehöll en tredjedel av den proteinkoncentration som uppmättes i de manganbehandlade cellerna. Eftersom mangan har visats påverka viabiliteten negativt i denna typ av celler (Hernroth & Tassidis et al. opublicerad data) borde de behandlade cellkulturerna innehålla färre celler efter behandling medan kontrollcellerna fortsätter att dela sig. Den minskade proteinkoncentrationen kan bero på att de obehandlade cellerna fick gå i samma medium längre än de manganbehandlade gjorde vilket kan påverka cellernas mående eftersom de då kan ha blivit för täta i odlingsplattan och förbrukat sin näring. Dock späddes proteinkoncentrationerna till 500 µg/ml för alla analyser för att normalisera initiala skillnader och ge alla prover samma koncentration av protein. Även om Hofer et al. (1991) har visat att PC3 celler kan tillväxa *in vitro* under förhållanden som icke-maligna celler inte skulle klara kommer även de försättas i apoptos vid näringsbrist. En annan felkälla kan också vara att när mediet byttes för de manganbehandlade (men inte till kontrollceller) så användes av misstag ett medium med en glukoshalt på 4 g/L istället för 1g/L. Eftersom glukos är en viktig energikälla för cellerna så kan en högre koncentration leda till att cellerna förökar sig snabbare (Vaz et al. 2012). Detta kan ha gett kontrollcellerna försämrade förutsättningar så att de har försatts i apoptos vilket kan ha maskerat effekten på de behandlade cellerna.

Ännu en aspekt är att i första sandwich-ELISA analysen av kluven PARP där det erhöles förväntade värden till skillnad från det andra testet, där kluven PARP och duplikat av kluven Kaspas-3 analyserades, kan vara att lysbufferten inte fungerat tillfredsställande. Lysbuffeten förvarades i kylen efter första testet tills det var dags att lysera PC3 celler för andra testet. Enligt instruktionerna som medföljer kittet PathScan Apoptosis Multi-Target Sandwich ELISA Kit kan lysbufferten förvaras i kylskåp. Lysbufferten får dock inte innehålla någon PMSF under den perioden då denna fungerar som en inhibitor för proteinnedbrytning. Lysbufferten som förvarades i detta fall innehöll PMSF som ska tillsättas färskt, vilket kan ha lett till att enzymerna som klyver Kaspas-3 och PARP fortfarande kan vara aktiva vid lyseringen. Detta borde dock påverkat alla celler inklusive de behandlade men kan vara en felkälla för analysen.

Det är inte helt uteslutet att mangan inducerar apoptos via andra apoptotiska signalvägar. I sällsynta fall är det kluven Kaspas-7 som klyver PARP, vilket i så fall skulle innebära att kluven Kaspas-3 inte ökar (Puig, Tortosa & Ferrer 2001). En mätning av t ex proteinerna Bad och p53 och andra apoptotiska och anti-apoptotiska markörer skulle kunna utföras för att se om manganbehandlingen inducerar apoptos (Vazquez, Bond, Levine & Bond 2008; Na Co et al. 2008).

5. Slutsats

Det krävs en uppföljning av denna studie för att kunna säga vilka apoptotiska markörer som är inblandade när det gäller manganbehandlig av PC3 celler. Uppföljningen borde i första hand inkludera omkörning av samtliga prover. Om det förväntade resultatet ändå uteblir borde andra apoptotiska markörer analyseras.

Tackord

Jag vill tacka mina handledare Helena Tassidis och Bodil Hernroth som har hjälpt mig otroligt mycket under projektets gång. Jag vill även tacka Högskolan Kristianstad som bidrog med all material. Utan handledarnas hjälp och högskolans resurser hade jag inte kunnat genomföra projektet.

Referenser

- Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Morgan, D. Raff, M. Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell: Apoptosis Depends on an Intracellular Proteolytic Cascade That Is Mediated by Caspases*. Connecticut: Garland Science. ss 1022-1023.
- Berger, N. Besson, V. Boulares, H. Bürkle, A. Chiarugi, A. Clark, R. Curtin, N. Cuzzocrea, S. Dawson, T. Dawson, V. Haskó, G. Liaudet, L. Moroni, F. Pacher, P. Radermacher, P. Salzman, A. Snyder, S. Garcia Soriano, F. Strosznajder, R. Sümegi, B. Swanson, R. & Szabo, C. (2017). *Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases*. British Journal of Pharmacology. **DOI:** 10.1111/bph.13748.
- Budihardjo, I. Oliver, H. Lutter, M. Luo, X. & Wang, X. (1999). *BIOCHEMICAL PATHWAYS OF CASPASE ACTIVATION DURIG APOPTOSIS*. Texas universitet. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 15(1): 269-290. **DOI:** 10.1146/annurev.cellbio.15.1.269
- Castellucci, P. Ceci, F. Graziani, T. Juarez, A.R. Alvarez Nieto, L.F. & Fanti, S. (2015). *PET/CT in prostate cancer*. Medecine Nucleaire-Imagerie Fonctionnelle Et Metabolique. 39(1): 54-58. **DOI:** 10.1016/j.mednuc.2015.01.001.
- Corsetto, P. Ferrara, G. Buratta, S. Urbanelli, L. Montorfano, G. Gambelunghe, A. Chiaradia, E. Magini, A. Roderi, P. Colombo, I. Rizzo, A. & Emiliani, C. (2015). *Changes in Lipid Composition During Manganese-Induced Apoptosis in PC12 Cells*. Neurochemical Research. 41(1): 258-269. **DOI:** 10.1007/s11064-015-1785-9.
- Damber, J. & Aus, G. (2008). *Prostate cancer*. Lancet. 371(9625): 1710-21.
- Elkholi, R. & Chipuk, J. (2013). *How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis*. BioEssays. 36(1): 46-51. **DOI:** 10.1002/bies.201300117.
- Fadeel, B. & Orrenius, S. (2005). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease*. Journal of Internal Medicine. 258(6): 479-517. **DOI:** 10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.
- Grönberg, H. (2003). *Prostate cancer epidemiology*. The Lancet. 361(9360): 859-864. **DOI:** 10.1016/S0140-6736(03)12713-4.
- Hamcher, R. Schmid, R. Saur, D. & Schneider, G. (2008). *Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Molecular Cancer 7(1): 64-74. **DOI:** 10.1186/1476-4598-7-64.
- Hirata, Y. (2002). *Manganese-induced apoptosis in PC12 cells*. Neurotoxicology and Teratology. 24(5): 639-653. **DOI:** 10.1016/S0892-0362(02)00215-5.
- Hofer, D. Sherwood, E. Bromberg, W. Mendelsohn, J. Lee, C. & kozlowski, J. (1991). *Autonomous Growth of Androgen-independent Human Prostatic Carcinoma Cells: Role of Transforming Growth Factor α^1* . Cancer Research 51(11): 2780-2785.
- Jensen, A. & Jensen, N. (2014) *Manganese Transport, Trafficking and Function in Invertebrates*. Manganese in Health and Disease. (22): 1-33 **DOI:** 10.1039/9781782622383-00001.

- Liu, C. Zhu, Y. Lou, W. Nadiminty, N. Chen, X. Zhou, Q. Shi, X.B. White, R.W.d. & Gao, A.C. (2012). *Functional p53 Determines Docetaxel Sensitivity in Prostate Cancer Cells*. *The Prostate*. 73(4): 418-427. **DOI:** 10.1002/pros.22583.
- Lu, Y.M. Chien, T.M. Ke, H.L. Huang, S.P. & Huang, C.N. (2015). *The most suitable guidelines for performing bone scans in prostate cancer staging - One southern Taiwan medical center's results*. *Urological Science*. 27(4): 208-211. **DOI:** 10.1016/j.urols.2015.06.287.
- Lucaciu, C.M. Dragu, C. Copaescu, L. & Morariu, V. (1997). *Manganese transport through human erythrocyte membranes. An EPR study*. *BBA – Biomembranes*. 1328(2): 90-98. **DOI:** 10.1016/S0005-2736(97)00039-4.
- Lund-Egloff, D. Löwbeer, C. (2014). *Klinisk kemi: kortfattad analytisk kemi. PSA, P-/S-; PSA-kvot, P-/S-*. Lund: Studentlitteratur. ss 104.
- Mattson, M.P. Bazan, N.G. (2012). *Apoptosis and Necrosis*. *Basic Neurochemistry*. Boston: Elsevier. 8th edition. ss. 663-676.
- Na Co, N. Tsang, W.P. Wong, T. Cheung, H.H. Tsang, T.Y. Kong, S.K. & Kwok, T.T. (2008). *Oncogene AF1q enhances doxorubicin-induced apoptosis through BAD-mediated mitochondrial apoptotic pathway*. *American Association for Cancer Research. Mol. Cancer Ther.* 7(10): 3160-3168. **DOI:** 10.1158/1535-7163.MCT-08-0416
- Pokorny, M. de Rooij, M. Duncan, E. Schröder, F. Parkinson, R. Barentsz, J. & Thompson, L. (2014). *Prospective Study of Diagnostic Accuracy Comparing Prostate Cancer Detection by Transrectal Ultrasound–Guided Biopsy Versus Magnetic Resonance (MR) Imaging with Subsequent MR-guided Biopsy in Men Without Previous Prostate Biopsies*. *European Urology*. 66(1): 22-29. **DOI:** 10.1016/j.eururo.2014.03.002.
- Puig, B. Tortosa, A. & Ferrer, I. (2001). *Cleaved caspase-3, caspase-7 and poly (ADP-ribose) polymerase are complementarily but differentially expressed in human medulloblastomas*. *Neuroscience Letters*. 306(1): 85-88. **DOI:** 10.1016/S0304-3940(01)01873-0.
- Shi, Y. (2002). *Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis*. 12(3): 277.
- Statens bredning för utvärdering av medicinsk metodik (SBU). (1995). *Massundersökning för prostatacancer. Symptom vid tidig prostatacancer*. Stockholm: PrintCenter AB. ss 33.
- Uchida, A. Oh-hashii, K. Kiuchi, K. & Hirata, Y. (2012). *Manganese regulates caspase-3 gene promoter activity by inducing Sp1 phosphorylation in PC12 cells*. *Toxicology*. 302(2-3): 292-298. **DOI:** 10.1016/j.tox.2012.08.011.
- Vaz, C. Alves, M. Marques, R. Moreira, P. Oliveira, P. Maia, C. & Socorro, S. (2012). *Androgen-responsive and nonresponsive prostate cancer cells present a distinct glycolytic metabolism profile*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 44(11): 2077-2084. **DOI:** 10.1016/j.bioce.2012.08.013.
- Vazquez, A. Bond, E. Levine, A. & Bond, G. (2008). *The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy*. *NatureReviews/ Drug Discovery* 7(12): 979-87. **DOI:** 10.1038/nrd2656.

Vickers, A. Cronin, A. Aus, G. Pihl, C. Becker, C. Pettersson, K. Scardino, P. Hugosson, J. & Lilja, H. (2010). *Impact of Recent Screening on Predicting the Outcome of Prostate Cancer Biopsy in Men With Elevated Prostate-Specific Antigen*. *Cancer* 116(11): 2612-2620. 9. **DOI:** 10.1002/cncr.25010.