

**Effects on Cell Cycle and Cell Killing in Eukaryotic Cells
of Exposure to various Anti-Cancer Agents:
Cytological and Morphological Aspects**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Nil Saydan
MSc. (Biology)
University of Istanbul

born in Istanbul 21.04.1959
citizen of Turkey



accepted on the recommendation of

Prof. Dr. F.E. Würgler, examiner
Prof. Dr. B. Larsson, co-examiner
PD Dr. R. Jaussi, co-examiner

1.1 Summary

Eukaryotes demonstrate complex cellular responses to DNA damage including DNA repair, cell cycle blocks and programmed cell death (apoptosis). Most current anti-cancer agents induce DNA damage in the cells. Therefore, understanding the mechanism of such responses is crucial in the fight against cancer. The present study investigates cytological and morphological aspects of some of these responses in eukaryotic cells exposed to various anti-cancer agents. In the first part of this thesis, radiation-induced S-phase delays were studied quantitatively by flow cytometry. Exponentially growing V79 Chinese hamster lung fibroblasts were found to undergo cell cycle arrest in the S- and G2-phases after irradiation with 6 Gray X-rays. Compared to controls, irradiated cells showed a delay of approximately 30 min in their progression through S-phase. As expected, this delay was abrogated by caffeine administration.

In the second part the aim was to quantify radiation-induced chromatin changes due to DNA damage using fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) methodology. For this purpose, TK6 human lymphoblastoid cells were used. The effect of X-ray induced DNA damage on chromatin was quantified by measuring the area of signals from the fluorescent centromere spots. The area of the centromere spots from irradiated cells were larger than those from unirradiated cells in the first two experiments. However, a last experiment did not confirm this trend. In spite of careful application, the technique yielded very variable spot sizes that depended on minor alterations of the experimental conditions and thus had to be dismissed.

The last part of the thesis focused on the cytotoxicity of various anti-cancer agents. TK6 cells were treated with X-rays, protons, photodynamic therapy (PDT) and, as a chemotherapeutic, paclitaxel (taxol) and then analyzed by flow cytometry. Cytotoxicity experiments were performed using proton irradiations from the two proton therapy facilities at the Paul Scherrer Institute : OPTIS and GANTRY. Cell killing increased in a dose-dependent manner and reached 32% at 6 Gy OPTIS protons irradiation. 6 Gy GANTRY protons irradiation caused 20% dying cells. The OPTIS and GANTRY dose rate was approximately 3.0 Gy/min and 0.2 Gy/min, respectively. The results were comparable with those obtained with a similar dose rate of X-rays. The relative biological effectiveness of protons from both facilities was about 1.1.

Paclitaxel was used alone and in combination with X-ray irradiation. In both cases TK6 cells were sensitive and 14% and 30% dying cells were observed, respectively. Based on the literature and these data it is concluded that paclitaxel can be used as chemotherapeutic and as a possible adjunct to radiation.

The mode of death of cells after PDT treatment was quite different from that observed after ionizing radiation. The cells died more quickly (within 8 h 80% cell killing). The examination of the dying cells by transmission electron microscopy indicated that ionizing radiation induced cell death via an apoptotic pathway. PDT may induce cell death by a necrotic mechanism. Apoptosis has been shown to contribute significantly to tumor cell kill caused by ionizing radiation. Therefore, levels of cell kill by apoptosis are a major factor in therapy success and when apoptosis is inhibited therapy may fail. In these cases PDT could be a useful modality for salvaging the failure.

Zusammenfassung

Eukaryoten zeigen komplexe zelluläre Antworten auf DNA-Schäden einschliesslich DNA-Reparatur, Arretierung des Zellzyklus und Zelltod. Ein besseres Verständnis der Mechanismen solcher Antworten ist wesentlich im Kampf gegen den Krebs. Die vorliegende Studie befasst sich mit zytologischen und morphologischen Aspekten von einigen dieser Antworten in eukaryotischen Zellen, welche unter Einfluss von anti-Krebsagentien stehen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die strahleninduzierte S-Phasenverzögerung quantitativ mittels Durchflusszytometrie studiert. Exponentiell wachsende V79 Lungenfibroblasten aus chinesischen Hamstern arretieren in der S- und G2-Phase nach Bestrahlung mit 6 Gy Röntgen. Verglichen mit Kontrollen ist in den bestrahlten Zellen der Fortschritt durch die laufende S-Phase um etwa 30 min verzögert. Koffein eliminiert diese Verzögerung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten strahleninduzierte Chromatin-Veränderungen die durch DNA-Schäden verursacht worden sind, mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden lymphoblastoide menschliche TK6 Zellen verwendet. Der Effekt des Röntgen-induzierten DNA-Schadens am Chromatin wurde durch Messung der Fläche des fluoreszierenden Signals von den Zentromeren-Flecken bestimmt. In den ersten zwei Experimenten waren die Zentromeren-Flächen in den bestrahlten Zellen grösser als in den unbestrahlten Zellen. Aber ein weiteres Experiment bestätigte diesen Trend nicht. Trotz sorgfältiger Anwendung der Technik wurden nur sehr variable Fleckengrößen gemessen, welche vor allem von minimalen, kaum kontrollierbaren Variationen der experimentellen Bedingungen abhängig waren. Deshalb wurden diese Experimente eingestellt.

Der letzte Teil der Dissertation fokussiert auf die Zytotoxizität von verschiedenen Anti-Krebsagentien. TK6 Zellen wurden mit Röntgen, Protonen, photodynamischer Therapie und dem Chemotherapeutikum Paclitaxel behandelt und mit Durchflusszytometrie analysiert. Zytotoxizitäts-Experimente wurden mit Protonen aus den zwei Protonentherapieanlagen OPTIS und GANTRY am Paul Scherrer Institut durchgeführt. Der Zelltod häufte sich mit ansteigenden Dosen und erreichte 32% bei 6 Gy OPTIS Protonenbestrahlung. Die gleiche Dosis von GANTRY Protonen induzierte 20% tote Zellen. Die ungefähre Dosisrate von OPTIS war 3.0 Gy pro min und diejenige der GANTRY 0.2 Gy.

5 a'

pro min. Die Resultate waren vergleichbar mit denjenigen, die mit Röntgenstrahlung einer ähnlichen Dosisrate erhalten wurden. Die relative biologische Wirkung von Protonen aus beiden Therapieanlagen war ca. 1.1.

Paclitaxel wurde für sich und in Kombination mit Röntgen verwendet. In beiden Fällen waren die TK6 Zellen sensitiv und 14% und 30% sterbende Zellen wurden registriert. Basierend auf der Literatur und diesen Daten wird geschlossen, dass Paclitaxel als Chemotherapeutikum und als mögliches Adjuvans zu Bestrahlungen verwendet werden könnte.

Der Sterbemodus der Zellen nach photodynamischer Therapie war deutlich vom Sterbemodus nach ionisierender Strahlung verschieden. Die Zellen starben schneller; 80% waren innert 8 Stunden tot. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab, dass Zellen, welche mit ionisierender Strahlung behandelt worden waren, primär durch programmierten Zelltod (Apoptosis) starben. Photodynamische Therapie induziert vermutlich nekrotischen Zelltod. Es ist gezeigt worden, dass Apoptosis als wesentliche Komponente beim Abtöten der Tumorzellen durch ionisierende Strahlung beteiligt ist. Deshalb trägt die Menge der durch Apoptosis getöteten Zellen als Hauptfaktor zum Erfolg der Radiotherapie bei. Falls die Apoptose reduziert verläuft, kann die Therapie versagen. In solchen Fällen könnte photodynamische Therapie als Ausweg benutzt werden.