

Johanne Nyutstumoen og Marie Apalseth

# Immunfluorescens som metode for fibertyping av type II muskelfibre

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Kristine Pettersen, forsker & Sonja Andersen,  
senioringeniør

Mai 2023



Johanne Nyutstumoen og Marie Apalseth

# **Immunfluorescens som metode for fibertyping av type II muskelfibre**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Kristine Pettersen, forsker & Sonja Andersen, senioringeniør

Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Bacheloroppgaven ble gitt som en avsluttende oppgave for bioingeniørutdanningen, Fakultet for naturvitenskap, Institutt for bioingeniørfag (IBF), NTNU, av Forsker Kristine Pettersen og Senioringeniør Sonja Andersen. Oppgaven som ble gitt er knyttet til et pågående prosjekt i deres forskningsgruppe.

Prosjektet ble gjennomført i perioden mars til mai 2023, på laboratoriene til IBF og ved kjernefasiliteten "Cellular & Molecular Imaging Core Facility (CMIC)" ved NTNU.

Vi ønsker å rette en stor takk til våre positive og behjelpelige veiledere Kristine Pettersen og Sonja Andersen. De har gitt god faglig veiledning, opplæring i laboratoriearbeid og uvurderlig støtte under skriveprosessen. Vi ønsker også å takke Kari Anne Hoset, avdelingsingeniør ved IBF, som har bistått med snitting av vev, omstøpning av prøvemateriale og anvendelse av frysemikrotom.

*Trondheim, mai 2023*

Marie Apalseth

Marie Apalseth

Johanne Nyutstumo

Johanne Nyutstumo

## Sammendrag

Kakeksi er et vekttapssyndrom som blant annet kan ramme pasienter med langt fremskreden kreft. Tilstanden kjennetegnes ved tap av muskelmasse som følge av en metabolsk ubalanse i musklene. Mekanismene bak kakeksi er ikke fullstendig forstått, og det finnes fremdeles ingen effektiv behandling. Det er vist at muskelfiber-sammensetning og -diameter kan endres i løpet av utviklingen av tilstanden. Fibertyping av muskelfibre kan være et nyttig verktøy i forskning som omhandler mekanismene bak kakeksi. Målet med oppgaven var å etablere en metode for fibertyping av type II muskelfibre, som videre kunne brukes til å se på effekten kakeksi har på musklene, samt evaluere behandlingsresponsen.

Lårmuskel fra friske mus, samt fra pre-kakektisk mus, ble benyttet som prøvemateriale. Indirekte immunfluorescens ble brukt for å etablere metoden for fibertyping, med primærantistoffer rettet mot ulike muskelfiberproteiner av typen myosin tungkjede (MyHC) type II, nærmere bestemt MyHCIIa, MyHCIIx og MyHCIIa,b,x. Type IIa og type IIx kan identifiseres direkte med sine respektive antistoffer. Type IIb vil være positiv med antistoff mot IIa,b,x men samtidig negativ for IIa og IIx. De fibre som ikke er positive med noen av disse antistoffene vil være type I fibre. Primærantistoffene var laget i ulike organismer, og sekundærantistoffene var konjugert med forskjellige fluoroforer, noe som muliggjorde samfarging av alle antistoffene på samme vevssnitt. Metoden ble testet på både parafinsnitt og frysensnitt, med ulike trinn for optimalisering. Blant annet ble blokkering av uspesifikke bindinger og forskjellige betingelser for antigendemaskering testet.

På tross av ulike forsøk på optimalisering ble det ikke detektert konsekvent og spesifikk binding av MyHCIIa,b,x- eller MyHCIIx-antistoffet i muskelfibre. Det ble derimot oppnådd tydelig signal i enkelte fibre i forventet mønster fra MyHCIIa-antistoffet.

Av tidsmessige årsaker ble ikke metoden ferdigstilt og derfor ble det heller ikke gjort analyser av pre-kakektisk vev slik målet for oppgaven var. På tross av dette har prosjektet resultert i nyttige erfaringer som kan brukes videre i optimaliseringsprosessen. Videre bør blant annet alternative antistoffer for deteksjon av type IIb og type IIx muskelfibre testes.

## Abstract

Cachexia is a weight loss syndrome that can affect patients with advanced cancer. The condition is characterized by loss of muscle mass as a result of an imbalance in muscle protein metabolism. The mechanisms leading to cachexia are not fully understood, and there is still no effective treatment available. Studies have indicated that muscle fiber composition and diameter can change during development of the condition. Fiber typing can therefore be a useful tool while trying to understand the mechanisms leading to cachexia. The aim of this study was to establish a method for fiber typing of type II muscle fibers, that can be used to study how cachexia affects skeletal muscles and to evaluate treatment responses.

The biological material used in this study was muscle samples (thigh muscle) from healthy mice and pre-cachectic mice. The fiber typing method was established using indirect immunofluorescence, using primary antibodies targeting various types of myosin heavy chain type II proteins (MyHC), specifically MyHCIIa, MyHCIIx, and MyHCIIa,b,x. Type IIa and type IIx were directly identified by their respective antibodies. Type IIb was detected by antibodies against IIa,b,x but not detected by antibodies against IIa and IIx. The fibers that are not positive with any of these antibodies will be type I fibers. The primary antibodies were produced in different animals, and the secondary antibodies were conjugated with different fluorophores, enabling costaining of the type II muscle fibers. The method was tested on both paraffin embedded tissue and cryosections, with different steps for optimization. These included blocking of nonspecific binding and testing different conditions for antigen retrieval.

Despite various attempts at optimization, consistent and specific binding of the MyHCIIa,b,x or MyHCIIx antibodies in muscle fibers were not detected. However, distinct signals were obtained in certain fibers in the expected pattern from the MyHCIIa antibody.

Due to limited time, the method was not completed. Therefore, no analysis of pre-cachectic tissue was performed as originally intended. Despite this, the project has resulted in valuable experiences that can be utilized in further optimization processes. Among other things, alternative antibodies for detecting type IIb and type IIx muscle fibers should be tested.

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>i</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>iv</b>
<b>1.0 Innledning</b> .....	<b>1</b>
1.1 Skjelettmuskulatur.....	1
1.1.1 Muskelanatomi .....	1
1.1.2 Muskelfibertyper .....	4
1.2 Kakeksi.....	5
1.2.1 Hva er kakeksi? .....	5
1.2.2 Kreftkakeksi .....	5
1.2.3 Muskelatrofi ved kakeksi .....	7
1.3 Synliggjøring av muskelfibre .....	9
1.3.1 Fargemetoder.....	9
1.3.2 Viktige momenter ved immunfluorescensfarging.....	11
1.4 Mål med oppgaven .....	13
<b>2.0 Materiale og metode</b> .....	<b>14</b>
2.1 Materiale.....	14
2.1.1 Biologisk prøvemateriale .....	14
2.1.2 Antistoffer .....	15
2.1.3 Løsninger.....	16
2.2 Metode.....	17
2.2.1 Fiksering, innstøping og snitting .....	17
2.2.2 Kontroll av muskelorientering og vevskvalitet .....	18
2.2.3 Farging med immunfluorescens .....	19
2.2.4 Mikroskopering .....	20



<b>3.0 Resultater .....</b>	<b>22</b>
3.1 HES-farging for å kontrollere muskelorientering .....	22
3.2 Optimalisering av blokkeringsbetingelser for sekundærtistoff .....	23
3.3 Optimalisering av MyHCIIa,b,x primærtistoffkonsentrasjon.....	25
3.4 MyHCIIa,b,x-, MyHCIIa- og MyHCIIx-samfarging av muskelvev .....	26
3.5 Optimalisering av antigendemaskering .....	28
3.6 Optimalisering av MyHCIIa,b,x primærtistoffkonsentrasjon etter antigendemaskering i trisbuffer.....	30
3.7 Deteksjon av MyHCIIa,b,x, MyHCIIa og MyHCIIx på frysesnitt .....	31
<b>4.0 Diskusjon.....</b>	<b>32</b>
<b>5.0 Referanser .....</b>	<b>38</b>
<b>6.0 Vedlegg .....</b>	<b>43</b>

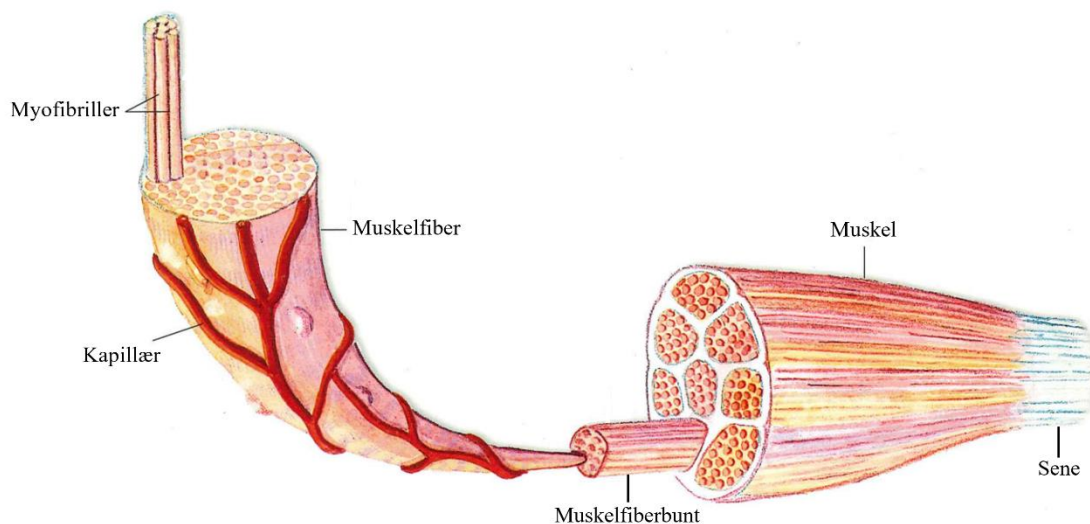
## 1.0 Innledning

40% av den totale kroppsvekten hos mennesket består av skjelettmuskulatur, og denne muskeltypen gir grunnlag for all viljestyrt bevegelse (1). Muskulaturen jobber sammen med skjelettet ved å gå fra en knokkel til den neste. I tillegg til bevegelse bidrar skjelettmuskulaturen til kroppens stabilitet, holdning og styrke, samtidig som musklene støtter og beskytter indre organer (2). Flere sykdomstilstander er forbundet med forstyrrelser i skjelettmuskulatur som fører til nedsatt muskelfunksjon. En av disse tilstandene er kakeksi, et livstruende muskeltapssyndrom som rammer svært mange med alvorlig underliggende sykdom (3).

## 1.1 Skjelettmuskulatur

### 1.1.1 Muskelanatomi

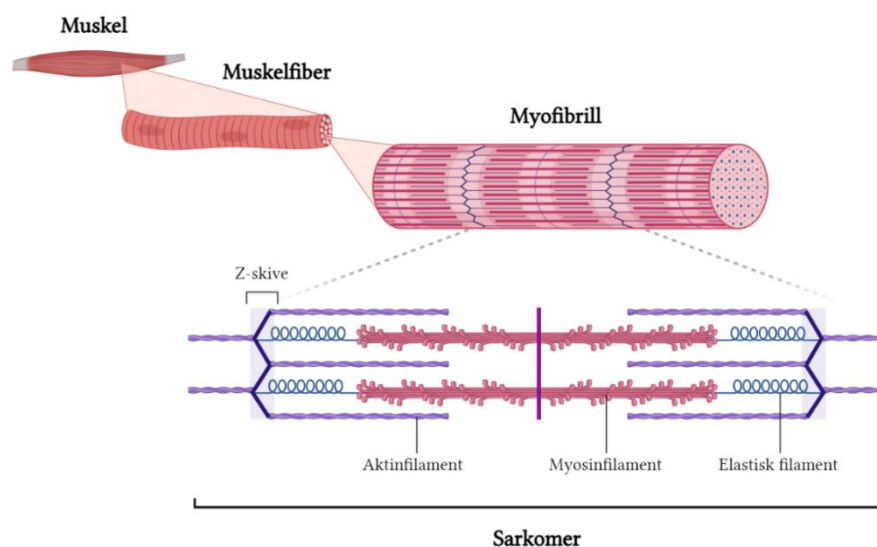
Skjelettmuskulatur består av muskelceller, bindevev, blodårer og nerver. Muskelcellene, også kalt muskelfibre, er de aktive elementene, mens bindevevet er bindeleddet mellom muskelfibrene og skjelettet (4). Hver muskelfiber er omgitt av en tynn bindevevshinne. I tillegg omgir bindevev bunter av muskelfibre, og til slutt hele muskelen (Figur 1). Dette gir en glatt og friksjonsfri overflate mot vevet omkring. I endene av muskelen går bindevevet over i en sene som binder muskel og skjelett sammen (1).



**Figur 1: Oppbygging av skjelettmuskulatur.** Skjelettmuskulaturen består av bunter av muskelfibre omgitt av bindevev. Bildet er hentet og modifisert fra boka «Menneskekroppen: Fysiologi og Anatomi» (5).

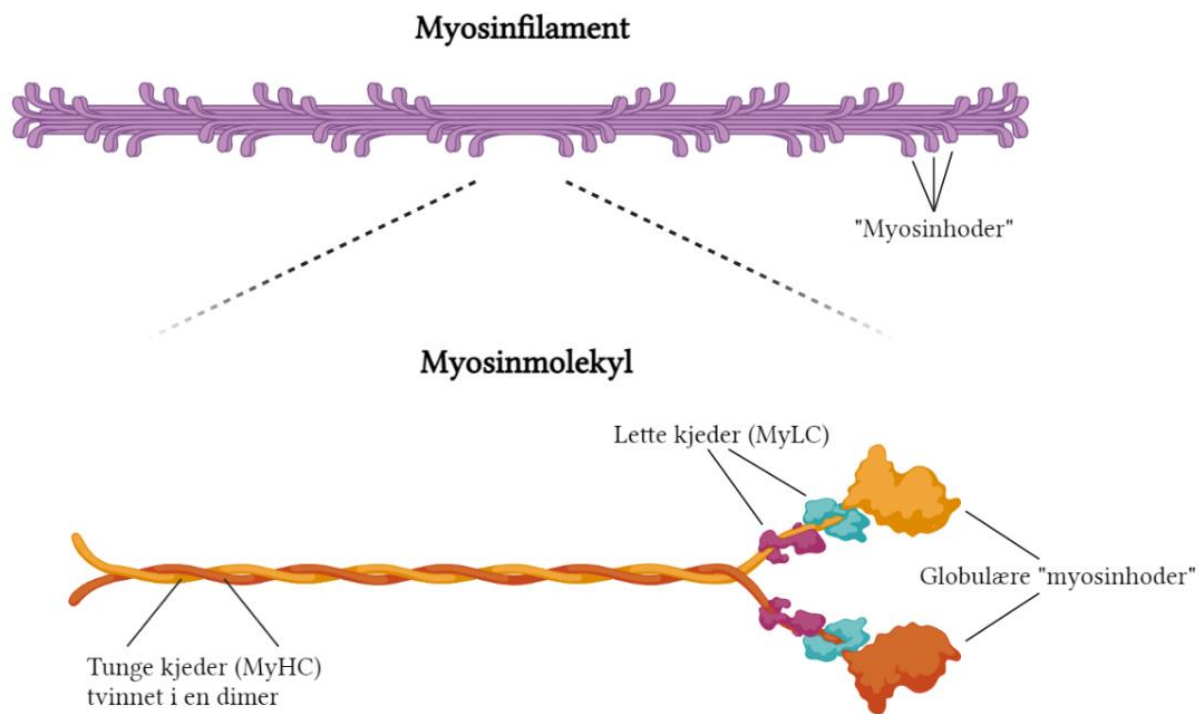
Muskelfibrene er lange celler som ofte strekker seg like langt som selve muskelen (2). De er derimot relativt tynne, og vanligvis mindre enn  $50\mu\text{m}$  i diameter (1). Hver muskelfiber kan inneholde flere tusen cellekjerner, noe som er et resultat av at flere celler (myoblaster) smelter sammen i fosterlivet og gir opphav til skjelettmuskelfibrene (1,4). Cytoplasmaet i en skjelettmuskelcelle består hovedsakelig av kontraktile proteiner som er ordnet i myofibriller. I tillegg inneholder muskelcellene organeller. Sarkoplasmatiske retikulum og mitokondrier er to eksempler som har stor betydning for muskelkontraksjonen, og antall mitokondrier er avhengig av fibertypen og treningstilstand (1).

De kontraktile proteinene i muskelfibrene er aktin- og myosinfilamenter, som samlet kalles myofilamenter. Den minste kontraktile enheten i skjelettmuskulaturen kalles en sarkomer, og denne består av ett myosinfilament og to aktinfilamenter (Figur 2). Den ene delen av aktinfilamentene er festet i en z-skive, som fungerer som en skillevegg mellom sarkomerene (5). Sarkomerene er koblet i serie, i tillegg til at de ligger parallelt over hverandre. Denne organiseringen gjør at de tynne aktin filamentene og de noe tykkere myosinfilamentene ses som mørkere og lysere striper. Dette gir muskelfibrene det tverrstripede utseende (1). Ved kontraksjon av en muskelcelle bindes myosin til aktin og proteinene forskyves i forhold til hverandre, slik at muskelen kontraherer (5). Ved styrketrening vil det dannes flere myofibriller, og antall kontraktile enheter i muskelen øker. Antall muskelfibre forblir dermed uendret, men massen i hver fiber blir større (2).



**Figur 2: Oppbygging av muskelfibrene.** Sarkomerene er de minste kontraktile enhetene i musklene, og disse består av to aktinfilamenter og ett myosinfilament. Under kontraksjonen vil myosin vandre bortover aktinfilamentene slik at lengden på sarkomerene reduseres og muskelen kontraherer (5). Laget med biorender.com (6).

Myosinfilamentene består av mange symmetrisk organiserte myosinmolekyl. Disse molekylene består av to tunge kjeder (Myosin Heavy Chains - MyHC) og fire lette kjeder (Myosin Light Chains - MyLC) (1). Som vist i figur 3 kan molekylet sammenlignes med en golfkølle, der de identiske tunge kjedene er tvinnnet rundt hverandre og danner en dimer. Hver MyHC ender i en globulær struktur, som ofte kalles «myosinhodet». Det er disse «hodene» som binder seg til aktin. Myosin vil under kontraksjonen omdanne kjemisk energi, i form av adenosintrifosfat (ATP), til mekanisk energi og på den måten generere kraft og bevegelse. Myosin er dermed motorproteinet som fører til at myofilamentene forskyves i forhold til hverandre (7). Det finnes forskjellige isoformer av MyHC, og hvilken isoform en muskelfiber inneholder er med på å bestemme muskelfibertypen (8).



**Figur 3: Oppbygging av myosinfilament.** Myosinfilamentene er bygd opp av mange myosinmolekyler. Myosinmolekylene består av to lange tunge kjeder (MyHC) der "halene" er tvinnnet sammen i en dimer. MyHC ender i en globulær struktur som ofte kalles "myosinhodet". Myosinmolekylet har også fire lette kjeder (MyLC) (1). Laget med biorender.com (6).

### 1.1.2 Muskelfibertyper

Det finnes to hovedtyper muskelfibre, type I og type II. Disse skilles på bakgrunn av kontraksjonshastighet. Type I fibre kalles langsomme muskelfibre (slow twitch). De inneholder flere mitokondrier og har en høy oksidativ kapasitet og god utholdenhet. De raske muskelfibrene (fast twitch), type II, baserer seg hovedsakelig på anaerob metabolisme og får energi gjennom glykolysen. Energien frigjøres derfor raskt, men fibre har dårligere utholdenhet (9). I musklene er det en heterogen kombinasjon av de ulike muskelfibrene (10). Sammensetningen av disse påvirker musklens kontraktile og metabolske egenskaper, i tillegg til utholdenhet (9). Hvor mye hver muskel har av de ulike muskelfibrene varierer, både fra menneske til menneske og fra muskel til muskel (11). Dessuten er muskelfibrene i stand til å endre fenotype som respons på nye funksjonelle krav (12).

Blant type II fibre har man hos mus og flere andre pattedyr identifisert tre ulike isoformer av MyHC: MyHCIIa, -IIb og -IIx. Hos mennesket uttrykkes imidlertid ikke type IIb, og det man tidligere trodde var type IIb viser seg å samsvare med type IIx. Derfor sier man at mennesket kun har to raske muskelfibertyper (13). I tillegg til disse finnes det egne MyHC isoformer hos fostre og nyfødte, men disse blir ikke nevnt videre i denne oppgaven da de forsvinner i utviklingen av voksen muskel (11). Tabell 1 viser en oversikt over MyHC isoformer i type I og type II muskelfibre i voksen muskel, i tillegg til egenskapene til fibertypene.

*Tabell 1: MyHC isoformer og egenskaper i type I og type II muskelfibre i voksen muskel (8,14)*

Protein (myosin tungkjede)	Gen	Uttrykk i voksen muskel	Egenskaper
MyHC-slow	MYH7	Type I muskelfibre og ventrikler.	Langsom og utholdende.
MyHCIIa	MYH2	Type IIa muskelfibre.	Rask og relativt utholdende.
MyHCIIb	MYH4	Type IIb muskelfibre. (NB: uttrykkes ikke i menneske).	Rask og lite utholdende.
MyHCIIx	MYH1	Type IIx muskelfibre.	Veldig rask og lite utholdende.

## 1.2 Kakeksi

### 1.2.1 Hva er kakeksi?

Kakeksi (engelsk: cachexia) er et alvorlig vekttapssyndrom, som i hovedsak skyldes tap av muskulatur. Kakeksi defineres som «a multifactorial syndrome defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass (with or without loss of fat mass) that can be partially but not entirely reversed by conventional nutritional support» (15). Det er en tilstand som har vært kjent allerede fra de første medisinske tilstandene ble dokumentert (16). Kakeksi stammer fra gresk «kakos» og «hexis» og betyr «dårlig tilstand» (17). I tillegg til det karakteristiske tapet av muskelmasse kan pasientene miste fett, samt beinmasse og mineraler. Kakeksi er ikke reversibelt, og skyldes som regel en kombinasjon av flere forhold, deriblant redusert matinntak, kronisk inflammasjon og metabolske endringer. Det at vekttapet ved kakeksi ikke kan reverseres, skiller dette fra et normalt vekttap som kan reverseres med ernæringsbehandling, og hvor det i hovedsak er fett som brytes ned i tillegg til noe muskelmasse (16).

Kakeksi er en tilstand som kan oppstå hos pasienter med mange ulike underliggende sykdommer. Pasienter med blant annet kronisk hjertesvikt, kronisk nyresvikt, kronisk obstruktiv lungesykdom, virussykdom og kreft er utsatt for å utvikle kakeksi (16). Kakeksipasienter har et komplekst sykdomsbilde som innebærer symptomer som appetittløshet, vekttap, kronisk kvalme og fatigue (18). I dette prosjektet er det kreftkakeksi som er hovedfokus.

### 1.2.2 Kreftkakeksi

#### *Forekomst av kreftkakeksi*

Hos omtrent 80% av pasienter med langt fremskreden kreft er det også funnet kakeksi (19). Symptomene som oppstår ved kakeksi og konsekvensene av dette kan føre til svekkelser i muskulaturen til pasienten, som igjen kan gi betydelig begrenset livskvalitet. Pasientene kan oppleve en redusert toleranse for behandling som gis i forbindelse med kreftsykdommen, i tillegg til at de kan få en ubalanse i immunsystemet (19). Man regner med at opptil 30% av kreftpasienter dør av kakeksi og ikke av kreftsykdommen i seg selv (18). Forekomsten av kakeksi hos kreftpasienter varierer med krefttype. Lungekreft og kreft i mage-tarmkanalen er forbundet med høy risiko for utvikling av kakeksi, i motsetning til f.eks. brystkreft, hvor risikoen er relativt liten (Tabell 2). Tallene er basert på en studie utført på norske sykehus og

viser forekomst av kakeksi hos kreftpasienter som er inneliggende eller ikke-inneliggende på sykehus (20).

*Tabell 2: Forekomst av kakeksi hos pasienter med ulike krefttyper (20) KI: konfidensintervall.*

Krefttype	Forekomst hos inneliggende pasienter (95% KI)	Forekomst hos ikke-inneliggende pasienter (95% KI)
Hematologisk	13%	19%
Bryst	-	11%
Urologisk/mannlige kjønnsorgan	53%	13%
Andre	54%	23%
Mage og tarm	62%	42%
Lunge	83%	36%

### *Årsaker til kakeksi*

De underliggende mekanismene for utviklingen av kakeksi er ikke fullstendig forstått, men det er trolig mange ulike mekanismer involvert. Blant annet er endringer i metabolisme trolig en viktig årsak til kakeksi. Pasienter med kakeksi er vist å kunne ha en unormal energiomsetning. Eksempelvis er energiforbruket i hvile («Resting Energy Expenditure», REE) vist å være forhøyet hos mange pasienter, og i den aktuelle studien var det en signifikant sammenheng mellom økt metabolisme/vekttap og redusert overlevelse (21). Økt REE kan skyldes flere ting, blant annet en økt omdanning fra hvite til brune fettceller (19). I brune fettceller er det høyere forekomst av såkalte «uncouplers», eller utkoblingsproteiner, som gjør at mitokondriene ikke kan produsere energi som normalt og man får en negativ energibalanse (22). Det er også observert økt nedbrytning av fettvev, som fører til økt nivå av frie fettsyrer i sirkulasjon (19). Dette har betydning for skjelettmuskulatur, som under påvirkning fra kreftceller kan øke sin evne til å oksidere frie fettsyrer, og som så kan resultere i muskeltap (23). Kakeksipasienter vil også ofte oppleve insulinresistens, som gjør at celler og organer får redusert evne til å respondere normalt på næring (18,24). Videre er sultfølelsen nedsatt hos mange kakeksipasienter, hvilket kan skyldes endrede nivå av appetittregulerende hormoner (25), men også kvalme, smerter, angst og kreftsykdommen i seg selv (26). Kakeksi er også en kronisk inflammatorisk tilstand, og det frigis en rekke inflammatoriske cytokiner som kan være bidragsyttere i kakeksiutviklingen og mediatorer for muskeltap (27–29).

### *Behandling av kreftkakeksi*

Det er, som beskrevet ovenfor, ikke helt avklart hvilke mekanismer som forårsaker utvikling av kreftkakeksi. Kakeksi er en sammensatt metabolsk tilstand som involverer mange organer. Forløpet er komplekst og dette, sammen med den ufullstendige forståelsen av årsakssammenhengene, bidrar til at det per i dag ikke finnes noen effektiv behandling av tilstanden. De ulike medikamentene som brukes i dag retter seg mot ett eller flere av symptomene på kakeksi ved å øke appetitten, hemme inflammatoriske reaksjoner eller regulere oppbyggingen og nedbrytningen av vev og celler (henholdsvis anabolske og katabolske prosesser) (30). Eksempler på slike medikament er progesteron-analoger og kortikosteroider (31).

Fysisk aktivitet kan til en viss grad motvirke muskeltap, og studier på pasienter med langt fremskreden kreft har vist at trening med eller uten tilpasset ernæring kan hjelpe pasientene å opprettholde muskelmassen, mens det er nødvendig med både trening og næringstilskudd for å motvirke tap av fettvev (32). Det er imidlertid motstridende resultater i ulike studier, og det er ingen som har klart å fullstendig reversere kakeksi med trening og ernæring. Imidlertid kan økt fysisk aktivitet og næringstilskudd bidra til forbedret livskvalitet, og dette alene kan tilsi at dette kan være et gunstig tilbud for de pasientene som er i stand til å trene (32).

### **1.2.3 Muskelatrofi ved kakeksi**

Muskelatrofi er et generelt begrep som brukes om tap av muskelmasse og styrke. Normalt vil det i en muskel være balanse mellom syntese og nedbrytning av proteiner, slik at muskelmassen holdes tilnærmet konstant. Dersom balansen skiftes til en netto negativ metabolisme, altså en metabolsk ubalanse mellom anabolisme og katabolisme, vil muskelmasse gå tapt (33). En rekke arvede og ervervede patofysiologiske tilstander kan føre til atrofi av muskelvev. Blant disse finner man kroniske lidelser, hjertesvikt, nerveskade, kreft og kakeksi, men også sult, aldring og inaktivitet (33,34). Fellesnevneren i akutt muskelatrofi er hyperaktivering av katabolske celledesignaleringsveier som fører til mer nedbrytning enn syntese av proteiner (34). Som tidligere nevnt er atrofi av skjelettmuskulatur karakteristisk ved kakeksi. Sammenlignet med andre vekttapssykdommer, som for eksempel anoreksi, er tapet av muskelmasse betydelig større ved kreftkakeksi og det lar seg ikke reversere selv ved økt næringstilførsel. Dette tyder



på at det finnes kreftspesifikke mekanismer som fører til atrofi av skjelettmuskulatur, uavhengig av ernæringsstatus (35).

Det finnes mange forslag til mekanismer som kan ha betydning for muskelatrofi ved kakeksi. En av de mest fremtredende faktorene er en metabolsk ubalanse i skjelettmuskulaturen. Flere studier foreslår at det i kakektisk muskelvev er en økt aktivitet av proteolytiske signalveier, noe som øker nedbrytning av proteiner (36,37). Samtidig viser resultater fra kakektiske musmodeller at proteinsyntesen er redusert (26,36), og i tillegg er økt apoptose av muskelceller og defekt regenerasjon av muskelvev også foreslått som medvirkende årsaker til muskelatrofi ved kakeksi (36,38). Hvor mye hver av disse faktorene blir vektlagt varierer fra studie til studie (36).

To karakteristiske endringer ved muskelatrofi er fibertypeskift og redusert diameter på fibertverrsnittene som følge av tap av cytoplasma, organeller og protein (33). Ulike fibre ser ut til å bli påvirket i ulik grad, men en sammenligning av ulike studier viser at resultatene varierer. Hvordan fibertypene påvirkes av kakeksi ser ut til å være forskjellig fra muskel til muskel, samt at resultater fra musmodeller ikke alltid stemmer overens med humant vev fra pasienter med kakeksi (35). For eksempel har et flertall av studier utført på pasienter med kakeksi vist en uforandret fordeling mellom type I og type II muskelfibre. Enkelte musmodeller har derimot vist et fibertypeskift fra type I til type II (35). Redusert diameter på fibertverrsnittene har konsekvent blitt rapportert fra både musmodeller og humant kakektisk vev. Dette gjelder både type I og type II muskelfibre. Selv om det også her finnes variasjon mellom studier, er det flere som viser at type II muskelfibre påvirkes i størst grad og dermed er mer utsatt for atrofi enn type I (35). Endring i diameter på muskelfibre kan således være et verktøy for å vurdere utviklingen av kakeksi i skjelettmuskulatur.

## 1.3 Synliggjøring av muskelfibre

### 1.3.1 Fargemetoder

Det finnes mange fargemetoder som kan benyttes til å studere vev. Samlet betegnes disse metodene som histokjemi, og hovedsakelig kan histokjemi deles inn i tre kategorier; kjemisk farging, molekylærbiologiske metoder og immunologiske teknikker (39). Ved analyse av vev benyttes gjerne en kombinasjon av ulike fargemetoder for å oppnå ønsket informasjon. Hvilke metoder man benytter er avhengig av hva man ønsker å studere. For eksempel kan en rutinefargemetode egne seg til å studere morfologien i vevet, mens en immunologisk metode kan påvise spesifikke proteiner. HES-farging (hematoxylin-erytrosin-safran) og immunfluorescens er to eksempler på fargemetoder som kan egne seg til henholdsvis å se på anatomien i muskelvev og å synliggjøre spesifikke muskelfibre.

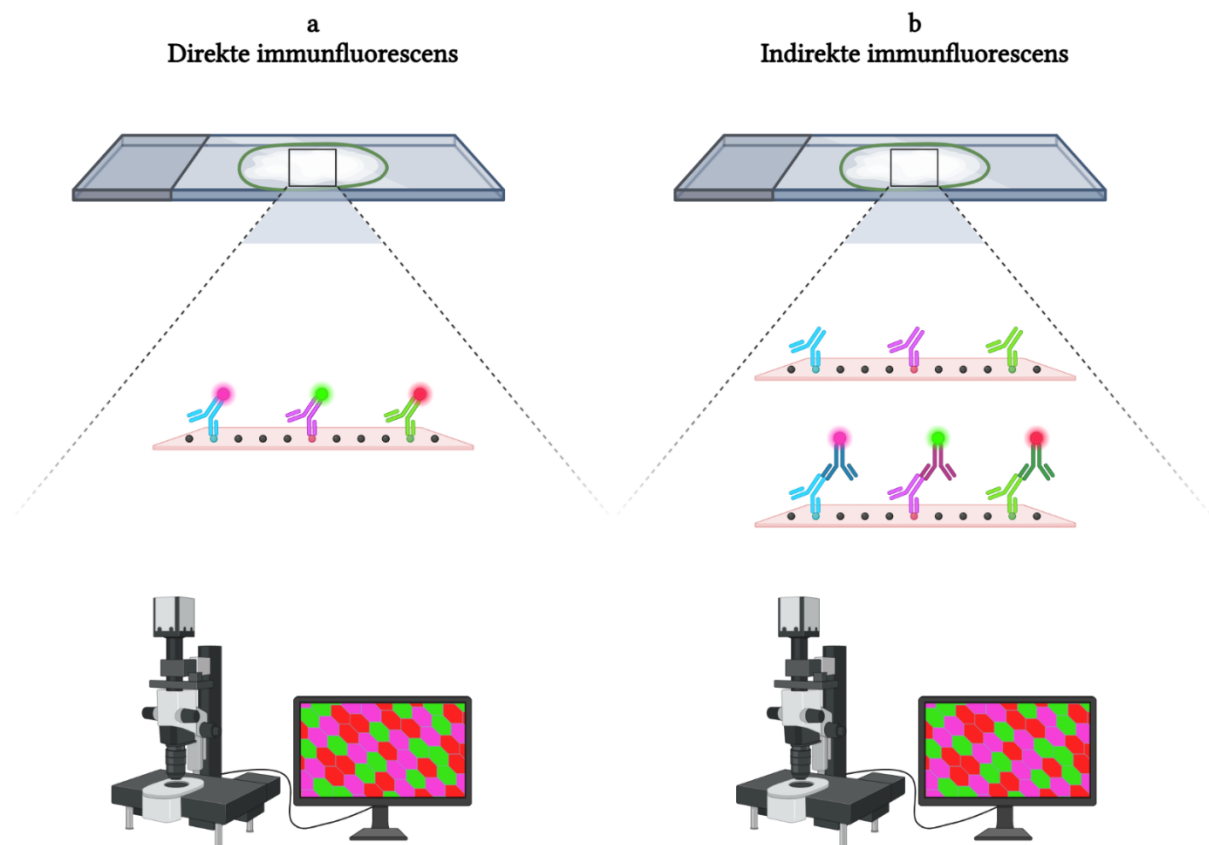
#### *HES-farging*

HES-farging er en rutinefargemetode og forkortelsen står for farging med hematoxylin, erytrosin og safran. Cellekjernene farges blå av hematoxylin, cytoplasma farges rød/rosa av erytrosin og kollagene fibre farges oransje av safran (40). Fargemetoden gjør det enkelt å studere og differensiere morfologien i vevssnitt. I senere tid har det blitt mer vanlig å benytte farging med kun hematoxylin og erytrosin (HE-farging). Dette er fordi tillaging av safranløsningen er en tidkrevende og lite stabil metode, og siden fargen ekstraheres fra en plante (*Crocus sativus*) (41) er det vanskelig å få en reproducerbar fargeløsning. Derfor har farging med safran gradvis blitt faset ut.

#### *Immunfluorescens*

Immunfluorescens er en immunhistokjemisk teknikk der fluoroforer brukes for å synliggjøre antigen. Teknikken kan brukes på mange ulike prøvemateriale, som for eksempel cellekulturer, parafininnstøpt vev og frysesenitt (42). Når en fluorofor absorberer lys med riktig bølgelengde, den såkalte eksitasjonsbølgelengden, vil det sendes ut et foton med en annen bølgelengde. Dette såkalte emisjonslyset, eller fluorescensen, har mindre energi og lengre bølgelengde enn det absorberte lyset (43). Eksitasjonsbølgelengden varierer fra fluorofor til fluorofor, og hvis man bruker flere ulike fluoroforer samtidig kan det være aktuelt å bruke ulike eksitasjonsbølgelengder. Det vil da være nødvendig å detektere signalene i ulike kanaler. Det er viktig at emisjonslyset fra de ulike fluoroforene ikke har overlappende spekter, da dette kan gi interfererende lyssignal (44).

Ved immunfluorescens blir det benyttet fluoroforer konjugert til antistoff. Dette kan gjøres på to forskjellige måter, enten med direkte eller indirekte immunfluorescens (43). Disse prinsippene vises i figur 4. Ved direkte deteksjon er primærantistoffet merket med en fluorofor, og dette antistoffet binder seg direkte til antigenet man ønsker å detektere (45). Den indirekte metoden benytter seg av et fluorescensmerket sekundærantistoff, sammen med et umerket primærantistoff. Primærantistoffet binder seg til målantigenet, mens sekundærantistoffet er rettet mot Fc-delen av det første antistoffet. Her er det da sekundærantistoffet som avgir det fluorescerende signalet (43). For å detektere dette fluorescerende signalet må analyse av prøvene utføres ved bruk av et fluorescensmikroskop. I mikroskopet blir prøven bestrålt av en laser hvor man velger en eksitasjonsbølgelengde tilpasset den aktuelle fluoroforen (46). Fluoroforer som utsettes for mye lys kan gradvis blekes, og etter hvert blir signalet svakere (43).



**Figur 4: Direkte og indirekte immunfluorescens. a-b** I direkte immunfluorescens (a) er primærantistoffet merket med en fluorofor og rettet mot ønskelig antigen i vevet. I indirekte immunfluorescens (b) benyttes et umerket primærantistoff rettet mot ønskelig antigen, og fluoroformerket sekundærantistoff rettet mot primærantistoffet. I begge metodene kan flere antistoff og fluoroforer kombineres, og gi deteksjon av flere antigener samtidig (43,45). Laget med biorender.com (6).

Immunfluorescens er godt egnet til deteksjon av ulike muskelfibre da det gjør det mulig å kombinere ulike antistoff rettet mot forskjellige MyHC-varianter. De ulike antistoffene kan detekteres samtidig ved å bruke ulike fluoroforer. På den måten kan man få et samlet bilde av fordelingen av de ulike muskelfibrene i ett og samme snitt (47). Ved farging av vev for å synliggjøre spesielle vevskomponenter er det også vanlig å kontrastfarge cellekjernene. Dette skaper et bilde det er lettere å orientere seg i. DAPI er et fluorescerende fargemolekyl som binder seg til DNA i cellekjernene, og dette er et eksempel på en kjernefarge som kan brukes ved immunfluorescens (48,49).

### **1.3.2 Viktige momenter ved immunfluorescensfarging**

Immunfluorescens kan brukes til mange ulike formål, og derfor vil betingelsene rundt metoden kunne variere. Type prøvemateriale, aktuelle antigen, antistoff og om metoden brukes på f.eks. parafininnstøpt vev eller fryseseisnitt, er faktorer som kan påvirke hvordan metoden utføres. Det er mange tiltak som kan utføres for å optimalisere metoden (42). Noen av disse vil bli omtalt her.

#### *Antigendemaskering*

Når antistoff skal benyttes for å detektere proteiner i vev er det viktig at antigenene er tilgjengelige. Dette kan være en utfordring på parafininnstøpt vev. Under fikseringen vil proteinene gjennomgå strukturelle endringer hvor det dannes kryssbindinger mellom ulike aminosyrer innad i proteiner og mellom proteiner. Dette resulterer i endret reaktivitet mellom epitoper i vevet og antistoff. Før antistoff kan tilsettes må derfor reaktiviteten gjenopprettes med antigendemaskering (42). Dette kan gjøres på to forskjellige måter, enten med enzym (proteaseindusert antigendemaskering - PIER) eller varme (varmeindusert antigendemaskering - HIER) (50).

Ved antigendemaskering med PIER vil enzymer bryte ned kryssbindingene som maskerer epitopene. Disse enzymene er imidlertid ikke spesifikke, og kan ødelegge morfologien i vevet og selve målepitopene (50). Siden enzymmetoden ikke alltid er like god, er HIER et godt alternativ. Ved bruk av HIER blir vevssnittene varmet opp i en buffer, der varmen skal bryte kryssbindinger og bufferen skal hindre refolding av proteinstrukturen. HIER kan blant annet utføres i mikrobølgeovn eller trykkoker (50). Bufferen kan ha forskjellig pH, og hva som er optimalt kan variere fra metode til metode og fra antistoff til antistoff (42).

### *Blokkering av uspesifikke bindinger*

Det er viktig at antistoffene binder seg spesifikt til sine antigener. Selv om antigen-antistoffreaksjoner i utgangspunktet er spesifikke, kan det oppstå uspesifikke bindinger av antistoff i vevet. For å hindre dette er det vanlig å utføre et blokkeringstrinn. Innholdet i blokkeringsbufferen kan variere, men reagensene bør ikke binde seg til proteinene som skal detekteres (42). En blokkeringsbuffer kan blant annet inneholde bovint serum albumin (BSA). BSA har muligheten til å binde seg til alle proteiner i vevet, og slik oppstår det en konkurranse om binding til målproteinet mellom BSA og antistoffene. Dette kan redusere uspesifikke bindinger. Gelatin og tørrmelk er andre reagenser som kan fungere på samme måte som BSA (51). Normalserum er et annet reagens som kan benyttes i en blokkeringsbuffer. Da brukes serum fra samme art som sekundærantistoffene er produsert i, og dette inneholder antistoffer som vil bidra til å blokkere uspesifikke bindinger av sekundærantistoffet (42). I de tilfeller hvor materialet man studerer og primærantistoffet kommer fra samme organisme, eksempelvis antistoff fra mus brukt på vev fra mus, vil man kunne få ytterligere utfordringer med uspesifikk binding (52). Dette skyldes ofte at sekundærantistoffet binder enten til endogene immunglobulinmolekyler i vevet, eller at primær- eller sekundærantistoffene binder til Fc-reseptorer på immunceller som for eksempel B-celler, plasmaceller eller makrofager. Det kan derfor være aktuelt å blokkere med Fc-blokk og/eller Fab-fragmenter. Fc-blokk er et antistoff spesifikt for Fc-reseptorer hos mus ( $Fc\gamma RIII$  (CD16) og  $Fc\gamma RII$  (CD32)), som brukes for å forhindre ikke-spesifikk binding av antistoffer til Fc-reseptorer (53). Fab-fragment rettet mot hele muse-immunglobulinmolekyler kan brukes for å forhindre binding av sekundærantistoff til endogene immunglobuliner (54).

### *Antistoffkonsentrasjoner*

Antistoffer kan brukes i forskjellige fortynninger. Den optimale fortynningen av et gitt antistoff kan variere mellom ulike vev. Ulike antistoffer mot samme antigen vil også kunne ha lik eller ulik optimal fortynning. Dette må ofte optimaliseres for det aktuelle prøvematerialet og den aktuelle metoden man ønsker å bruke. En for høy antistoffkonsentrasjon vil resultere i mye uspesifikk bakgrunn da antistoffene binder seg til mer enn målantigenet. Dersom konsentrasjonen blir for lav vil ikke det spesifikke signalet bli sterkt nok til å detekteres. Å finne den riktige antistoffkonsentrasjonen er derfor et viktig punkt for å oppnå best mulig kvalitet på resultatet (55).

#### **1.4 Mål med oppgaven**

Kakeksi er en tilstand som karakteriseres ved tap av muskelmasse og -funksjon. Målet med denne oppgaven var å etablere en metode for identifisering av ulike type II (fast twitch) muskelfibre i vevssnitt ved hjelp av immunfluorescens, og deretter bruke metoden for å studere hvordan kakeksi påvirker muskelfiber-sammensetning og -størrelse.

## 2.0 Materiale og metode

### 2.1 Materiale

#### 2.1.1 Biologisk prøvemateriale

##### *Pre-kakektisk muskelvev*

Det ble benyttet muskelmateriale (lårmuskel) fra BALB/c-mus som hadde etablert en tumor etter injeksjon av brystkreftceller (cellelinjen 4T1) i brystanlegg ca. 3 uker før avliving. Ved bruk av 4T1-celler som brystkreftmodell er det kjent at musene, ved langt fremskreden kreftutvikling og metastasedannelser, vil utvikle kakeksi (56). Cellelinjen, 4T1, stammer opprinnelig fra en spontan brystsvulst hos en BALB/c-mus (57) og kan dermed settes inn i denne immunkompetente musestammen uten å bli frastøtt. Musene var del av et forskningsprosjekt ved NTNU hvor dyrene skulle avlives og analyseres mens tilstanden fortsatt var på et tidlig stadium. De hadde derfor ikke utviklet åpenbar kakeksi, og dette materialet må dermed anses å representere en pre-kakektisk tilstand med tidlige endringer. Pre-kakektisk muskel ble kun benyttet til parafinsnitt, ikke frysesnitt.

##### *Muskel, milt og lever fra friske mus*

Fra friske BALB/c-mus uten kreftceller ble det hentet både lårmuskel, lever og milt. Lever og milt skulle brukes som negative kontroller på fibertypingen, og muskelvev fra disse friske musene skulle gjøre det mulig å se etter forskjeller mellom normal og pre-kakektisk muskel. Det ble også brukt lever og miltvev fra andre friske mus (CD1-mus). Disse vevene ble brukt for parafinsnitt. For testing av frysesnitt, ble det hentet lårmuskel, lever og milt fra andre friske mus (INS-GAS-mus). Både CD1-mus og INS-GAS-mus er mus fra andre stammer enn den hvor den pre-kakektiske muskelen ble hentet (BALB/c), men det ble vurdert at noe ulik genetisk bakgrunn ikke ville være av betydning for etablering av fargemetoden.

### 2.1.2 Antistoffer

Prinsippet for deteksjon av de ulike muskelfibertypene i musevevet var i dette prosjektet indirekte antigen-antistoff-reaksjon med fluorescensmerkede sekundærantistoffer. Det ble brukt primærantistoffer mot myosin tungkjede-proteiner type IIa, IIb og IIx, som vist i tabell 3. Antistoffene gjenkjenner enten kun MyHCIIa, kun MyHCIIx eller både IIa, b og x. Ved å kombinere disse antistoffene, kan man identifisere IIa og IIx direkte, mens type IIb vil kunne identifiseres som de som er positive med antistoff mot IIa,b,x men samtidig negativ for IIa og IIx. De fibrene som ikke er positive med noen av disse antistoffene vil være type I fibre. Sekundærantistoffene som ble brukt er vist i tabell 4. Ulike fortyninger av primærantistoffer ble testet som beskrevet i resultatdelen. Alle antistoffene ble levert klare til bruk, med unntak av Anti-MYH1 som før bruk ble løst i PBS i henhold til anbefaling fra produsenten.

*Tabell 3: Primærantistoff benyttet i dette prosjektet til immunfluorescens.*

Primærantistoff	Isotype	Klon	Opphav	Produsent	Produktnummer
Anti-MYH-2* MyHCIIa**	IgG2 <sub>aK</sub>	8F72C8, monoklonal.	Rotte	Sigma- Aldrich	MABT848
Anti-MYH1* MyHCIIx**	IgG	1E15, rekombinant monoklonal.	Kanin	Sigma- Aldrich	ZRB1214
Anti-Myosin MyHCIIa,b,x***	IgG1	MY-32, monoklonal.	Mus	Sigma- Aldrich	M4276

\*Refererer til gennavnet for den aktuelle fibertypen (MYH er en forkortelse for «myosin heavy chain»)

\*\*Refererer til fibertypen antistoffet binder til (MyHCII er en forkortelse for «myosin heavy chain type II»)

\*\*\*Refererer til proteinene MyHCIIa, MyHCIIb og MyHCIIx



**Tabell 4:** Sekundærantistoff benyttet i dette prosjektet til immunfluorescens.

Sekundærantistoff	Type	Produsent	Produktnummer	Fortynning
Geit anti-rotte (brukt mot MyHCIIa)	IgG (H+L) konjugert til Alexa Fluor™ Plus 647. Polyklonal.	Thermo Fisher	A48265	1:500
Geit anti-kanin (brukt mot MyHCIIx)	IgG (H+L) konjugert til Alexa Fluor™ Plus 555. Polyklonal.	Thermo Fisher	A32732	1:500
Geit anti-mus (brukt mot MyHCIIa,b,x)	IgG (H+L) konjugert til Alexa Fluor™ Plus 488. Polyklonal.	Thermo Fisher	A32723	1:500

### 2.1.3 Løsninger

#### *Hematoxylin fargeløsning*

Hematoxylin (Merck KGaA, produktnr. 1.04302.0025) (5g) ble blandet med glycerol (Merck KGaA, produktnr. 8.18709.1000) (200mL), iseddik (Merck KGaA, produktnr. 1.00063.2511) (100mL) og ionebyttet vann (200mL). Deretter ble perjodsyre (Merck KGaA, produktnr. 1.00524.0100) (0,5g) tilsatt. Aluminiumsulfat (VWR, produktnr. 100103M) (50g) og ionebyttet vann (500mL) ble blandet i en annen kolbe til pulveret var løst. Løsningene ble blandet sammen og det ble kontrollert at pH lå mellom 1,8 og 2,2 (her 1,83). Hematoxylinløsningen ble oppbevart på en mørk flaske ved romtemperatur (RT) frem til bruk.

#### *Erytrosin fargeløsning*

Erytrosin (Merck KGaA, produktnr. 1.15936.0025) (1g) ble blandet med ionebyttet vann (100mL). Det ble kontrollert at pH lå mellom 6 og 7 (her 6,5). Ved behov kan pH justeres med fortynnet eddiksyre. Løsningen ble oppbevart på en mørk flaske ved RT frem til bruk.

#### *Citratbuffer (10mM natriumcitrat, 0,05% Tween20, pH 6)*

Sitronsyre monohydrat (Merck KGaA, produktnr. 1.00244.1000) (2,1g) ble løst i ionebyttet vann (litt mindre enn 1000mL). pH ble justert til 6,0, med NaOH (Merck KGaA, produktnr.

1.06482.1000) (10M), før det ble tilsatt Tween20 (Sigma-Aldrich, produktnr. P1379) (5mL av 10% stock). Til slutt ble volumet justert med ionebyttet vann til 1000mL.

#### *Trisbuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 9)*

Tris Base (Merck KGaA, produktnr. 1.08382.1000) (1,21g) og EDTA (VWR, produktnr. 20296.260) (0,37g) ble løst i 1000mL ionebyttet vann.

#### *Blokkeringsbuffer*

Blokkeringsbufferen ble laget fra stockløsninger av de ulike komponentene som ble blandet i PBS (Sigma-Aldrich, produktnr. D8537) og bestod av BSA (Sigma-Aldrich, produktnr. A7030) (1%), geitenserum (Sigma-Aldrich, produktnr. G9023) (2%) og Triton X-100 (Merck KGaA, produktnr. T8787) (0,2%). I tillegg ble det laget to andre blokkeringsbufferer med samme innhold, men hvor den ene i tillegg inneholdt Fc-blokk (BD Pharmingen, produktnr. 553141) (0,005µg/µL), mens den andre inneholdt Fab-fragment (Abcam, produktnr. AB6668) (1mg/mL).

#### *Buffer for fortynning av antistoffer og DAPI*

Antistoffer, samt DAPI (Thermo Scientific, produktnr. 62248) ble fortynnet til ønsket konsentrasjon i følgende buffer: BSA (0,5%), geitenserum (1%), Triton X-100 (0,1%) og Tween20 (0,025%) i PBS.

#### *PBS med Tween20 (PBST)*

PBS med 0,05% Tween20 (f.eks. 2,5mL 10% Tween20 i 497,5mL PBS).

## **2.2 Metode**

### **2.2.1 Fiksering, innstøping og snitting**

#### *Parafininnstøpt vev.*

Muskelvev, lever og milt ble fiksert i formalin (10%) i 48-72 timer ved RT. Etter fikseringen ble vevet dehydrert i en økende konsentrasjon av etanol og klarnet i TissueClear (Sakura, produktnr. 1426). Vevet ble så kuttet i mindre biter, orientert og støpt inn i parafinblokker. Milt, lever og muskel fra friske mus ble støpt inn i samme blokk, mens pre-kakektisk muskel ble støpt inn i en egen blokk.

For å kunne bruke det parafininnstøpte vevet videre til testing av antistoff mot muskelfibertyper, ble parafinblokkene snittet i 4µm tykke skiver ved hjelp av en mikrotom (Leica RM2235). Snittene ble tatt opp på superfrost objektglass (J1800AMNZ) der muskel, lever og milt fra friske mus og pre-kakektisk muskel ble lagt på samme glass. Snittene ble lagret ved RT. Beklageligvis havnet miltvevet på mange av glassene så langt ut mot kanten at det rent teknisk ble vanskelig å bruke. Dette vevet vil derfor ikke bli kommentert videre.

### *Frysesnitt.*

Vev fra lårmuskel, lever og milt fra friske mus ble frosset ferskt (ingen fiksering) for å lage frysesnitt. For muskel ble det benyttet små korkbiter (3mm tykk, ca. 1x1cm) med en dråpe Optimum Cutting Temperature Compound (OCT) (VWR, produktnr. 361603E). Lårmuskelen ble delt i to på tvers av lengderetningen, og hver halvdel ble plassert med snittflaten ned på hver sin korkbit. Med vevet stikkende opp av OCT'en, ble kork og vev frosset i en metallbeholder med isopentan som i sin tur ble plassert i en større beholder med flytende nitrogen. Isopentanen ble nedkjølt noen minutter på forhånd til det hadde begynt å danne seg hvite «kuler» i bunnen av beholderen, noe som skjer ved en temperatur på ca. -140 til -150°C. Vevet ble holdt i isopentan i 20sek, og deretter så raskt som mulig plassert i en plastpose som så ble lagret i en -80°C fryser. Biter av lever og milt ble plassert sammen i en liten støpeform av plast på ca. 1x1cm, dekket med OCT og frosset som beskrevet for muskelvevet.

Muskelvevet ble snittet på en frysemikrotom (Thermo Scientific CryoStar NX70 Cryostat) med snittykkelse på 8µm, med en temperatur på kniv og i kammer på henholdsvis -25 og -15°C. Lever og milt måtte snittes ved 4µm og her var temperatur på kniv og i kammer det samme som for muskelvevet. Snittene ble oppbevart ved -20°C inntil bruk.

## **2.2.2 Kontroll av muskelorientering og vevskvalitet**

For å se på muskelfibrene var det i dette prosjektet ønskelig med tverrsnitt av muskelvevet. Før snitting til deteksjon av muskelfibre ble derfor kvaliteten og orienteringen av muskelvevet kontrollert ved HES-farging.

### *HES-farging (hematoxylin-erytrosin-safran) på parafininnstøpt vev.*

Muskelorienteringen på de parafininnstøpte vevssnittene ble kontrollert ved hjelp av HES-farging. Snittene ble deparafinisert ved å først bli plassert i varmeskap (60 °C) i 10min og

deretter umiddelbart overført til TissueClear i 2x10min. Snittene ble så rehydrert i synkende konsentrasjon av etanol (2x100%, 95%, 80%), før de ble plassert i rennende vann. Hematoxylin ble dryppet på snittene og virket i 4min før snittene ble plassert i lunkent rennende vann i 5min. Deretter ble erytrosin dryppet på snittene, og virket i 4min, før de ble skylt kort i rennende vann og dehydrert (96%-, 2x100% etanol). Snittene ble så plassert i fargekar med safran i 4min og skylt kort i 3x100% etanol. Det er ikke nødvendig å bruke safran, men siden løsningen var tilgjengelig på studentlaboratoriet ble den brukt for å få et mer variert cellebilde. Til slutt ble snittene klarnet i TissueClear i 2x2min og montert med TissueMount (Sakura, produktnr. 1467) og dekkglass. Snittene ble herdet i varmeskap (60°C) i 20min, og oppbevart ved RT.

### *Frysesnitt.*

Orienteringen av snittene ble kontrollert ufarget i mikroskop.

## **2.2.3 Farging med immunfluorescens**

### *Varmeindusert antigendemaskering*

Varmeindusert antigendemaskering ble utført på de parafininnstøpte snittene. Det ble testet to ulike buffere til dette trinnet, både citratbuffer (pH 6) og trisbuffer (pH 9). Snittene ble plassert i en plastboks, dekket med aktuell buffer og kokt i mikrobølgeovn (Whirlpool 6<sup>th</sup> sense, modellnr. JT366/WH) i 15 min. Etter kokingen ble snittene stående i bufferen og avkjølt i 20 min, før de ble vasket i ionebyttet vann.

### *Blokkering av uspesifikke bindinger*

Alle snitt ble ringet inn med DAKO-penn (Dako, produktnr. S2002) for å redusere forbruk av dyre antistoffløsninger og hindre uttørking av vevet under fargeprosessen. For parafinsnitt ble dette gjort etter antigendemaskering, mens frysesnitt først ble lagt til tørk ved RT i 1 time. DAKO-ringen fikk tørke ved RT i ca. 1min for parafinsnitt og ca. 15min for frysesnitt, før snittene ble tilsatt blokkeringsbuffer og inkubert ved RT i 1 time. For parafinsnitt ble det gjort en test hvor blokkeringsbuffer ble tilsatt Fc-blokk og Fab-fragment (se punkt 2.1.3). Her ble snittene først inkubert med blokkeringsbuffer med Fc-blokk (RT, 1 time) og deretter skylt 3x2min i PBST. Blokkeringsbufferen med Fab-fragment ble så tilsatt, og snittene ble satt til inkubering (RT, 1 time). Alle inkuberingene ble gjort i fuktekammer. Volum av løsninger som ble brukt varierte ut fra størrelsen på vevsbitene og DAKO-ringen, men det ble lagt på nok til å fylle opp hele DAKO-ringen samt lage en dråpe med høyde på ca. 2mm (volum 50 – 150µl).

### *Tilsetting av primær- og sekundærantistoff*

I dette prosjektet ble det testet ulike fortynninger av primærantistoffene for å finne de optimale betingelsene for fibertypingen. Ønsket konsentrasjon av primærantistoffene ble tilsatt på forskjellige snitt, og inkubert over natt i fuktekammer ved 4°C. Fortynningene er beskrevet i resultatdelen. Etter inkubering med primærantistoff ble snittene vasket i 3x10min i PBST, før de ble inkubert med sekundærantistoff (1:500) og DAPI (1:1000) i en time ved RT i fuktekammer. Siden sekundærantistoffene var konjugert med fluoroforer, ble snittene inkubert uten lystilgang.

### *Montering*

Etter inkubering med sekundærantistoff ble snittene vasket 3x10min i PBST, og deretter i ionebyttet vann. Snittene ble montert med Fluoromount G medium (Thermo Fisher, produktnr. 00-4958-02) og dekkglass, og oppbevart mørkt ved RT.

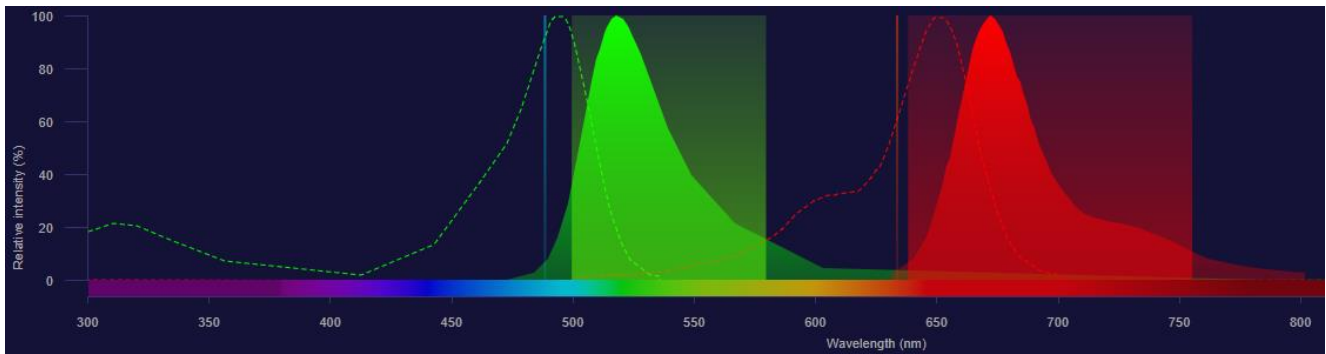
## **2.2.4 Mikroskopering**

### *Mikroskopering av HES-fargede snitt*

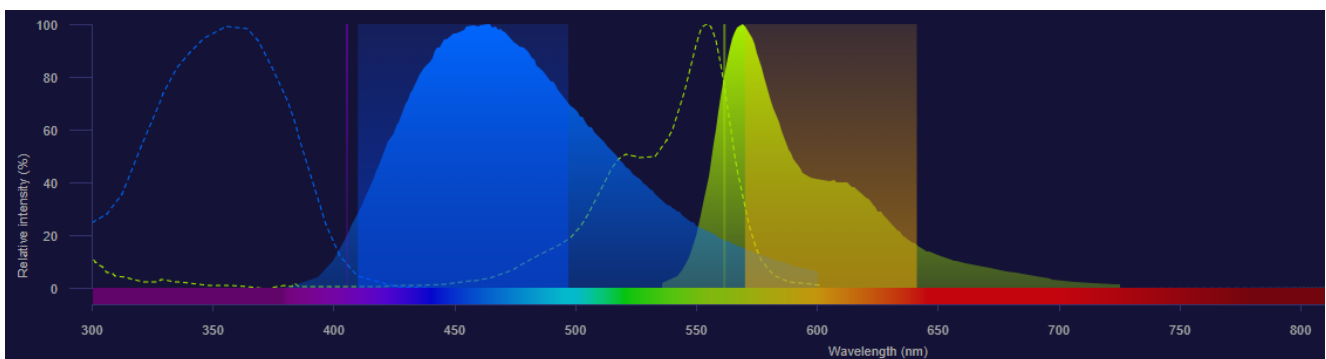
For å se på orientering av muskelvevet ble de HES-fargede snittene studert i et mikroskop (Olympus CX41RF), med 10x- og 40x objektiv. Mikroskopet var montert med et digitalt kamera (Olympus EP50), og det ble tatt bilder gjennom dette (se punkt 3.1).

### *Mikroskopering av immunfluorescensfargede snitt*

Immunfluorescensfargede snitt ble studert i et konfokalmikroskop (Zeiss 880 Airyscan), med 10x og 20x objektiv. DAPI, og de tre fluoroforene som ble benyttet (Alexa Fluor™ Plus 488, Alexa Fluor™ Plus 555 og Alexa Fluor™ Plus 647) ble eksitert med bølgelengde henholdsvis; 405nm, 488nm, 561nm og 633nm. Emisjon ble henholdsvis detektert i bølgelengdeområde 410-497nm, 499-579nm, 570-641nm og 638-755nm. For å unngå overlappende signaler ble DAPI og Alexa Fluor™ Plus 555 eksitert og avlest sammen, mens Alexa Fluor™ Plus 488 og Alexa Fluor™ Plus 647 ble eksitert og avlest sammen (sekvensiell eksitasjon). Eksitasjon- og emisjons-spektre for de ulike fluoroforene, samt eksitasjon – og emisjons-område benyttet er oppsummert i figur 5 og 6.



**Figur 5: Fluorescensspekter for Alexa Fluor™ Plus 488 og Alexa Fluor™ Plus 647.** Eksitasjonsspekter for Alexa Fluor™ Plus 488 og Alexa Fluor™ Plus 647 er markert med henholdsvis grønn og rød stippet linje, mens emisjonsspekter er markert som henholdsvis, grønn og rød fylt graf. Eksitasjonsbølgelengde benyttet er henholdsvis merket med blå og rød vertikal linje og bølgelengdeområdet hvor emisjon ble detektert er markert som svakt grønt og rødt bånd. Figuren er laget ved hjelp av Thermo Fisher Scientific sitt "Fluorescence spectra viewer tool» (58).



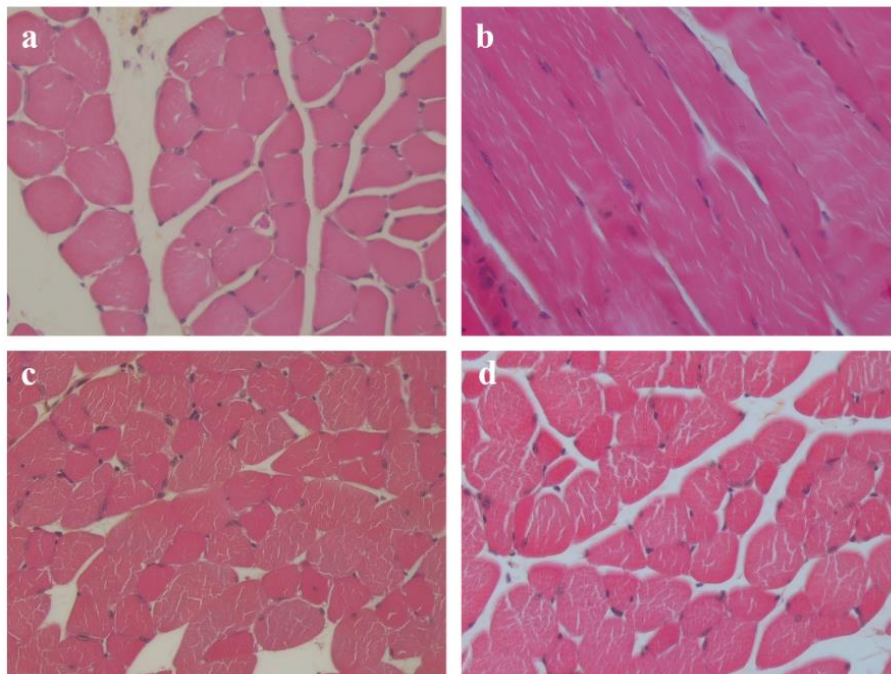
**Figur 6: Fluorescensspekter for DAPI og Alexa Fluor™ Plus 555.** Eksitasjonsspekter for DAPI og Alexa Fluor™ Plus 555 er markert med henholdsvis blå og gul stippet linje, mens emisjonsspekter er markert som henholdsvis, blå og gul fylt graf. Eksitasjonsbølgelengde benyttet er henholdsvis merket med lilla og gul vertikal linje og bølgelengdeområdet hvor emisjon ble detektert er markert som svakt blått og gult bånd. Figuren er laget ved hjelp av Thermo Fisher Scientific sitt "Fluorescence spectra viewer tool» (58).

### 3.0 Resultater

I dette prosjektet var målet å etablere og optimalisere en metode for fibertyping av muskelvev ved hjelp av immunfluorescens. Denne fibertypingen skulle utføres på tverrsnitt, da dette gjør det mulig å studere diameteren og sammensetningen av muskelfibre. I tillegg ble ulike betingelser i fargemetoden testet ut for å optimalisere metoden.

#### 3.1 HES-farging for å kontrollere muskelorientering

I dette prosjektet var det ønskelig at musklene var orientert slik at det ble snittet tverrsnitt av muskelfibrene, så metoden videre kunne brukes til å vurdere hvordan kakeksi påvirker muskelfiberstørrelse. Orienteringen ble sjekket på HES-fargede snitt av parafininnstøpt skjelettmuskel (lårmuskel) fra to friske mus, samt to pre-kakektiske mus. Større områder ble undersøkt på både 10x og 40x objektiv. Av de to muskelprøvene fra friske dyr var det én hvor tverrsnitt hadde blitt oppnådd, mens den andre var orientert i lengderetning (henholdsvis Figur 7a og b). Prøven med tverrsnitt ble brukt i videre arbeid. For begge muskelprøvene fra pre-kakektisk mus hadde det blitt oppnådd tverrsnitt (Figur 7c-d), og derfor ble en av disse prøvene tilfeldig valgt for videre arbeid.



**Figur 7: HES-farget muskelvev viser orienteringen på snittet materiale. a-b) Snittet og HES-farget muskelvev (lårmuskel) fra to friske mus viser at vev fra den ene musen er snittet i tverretning (a) og den andre i lengderetning (b). c-d) Snittet og HES-farget muskelvev (lårmuskel) fra to pre-kakektiske mus viser at vev fra begge musene er snittet i tverretning. Alle bildene er tatt med 40x objektiv.**

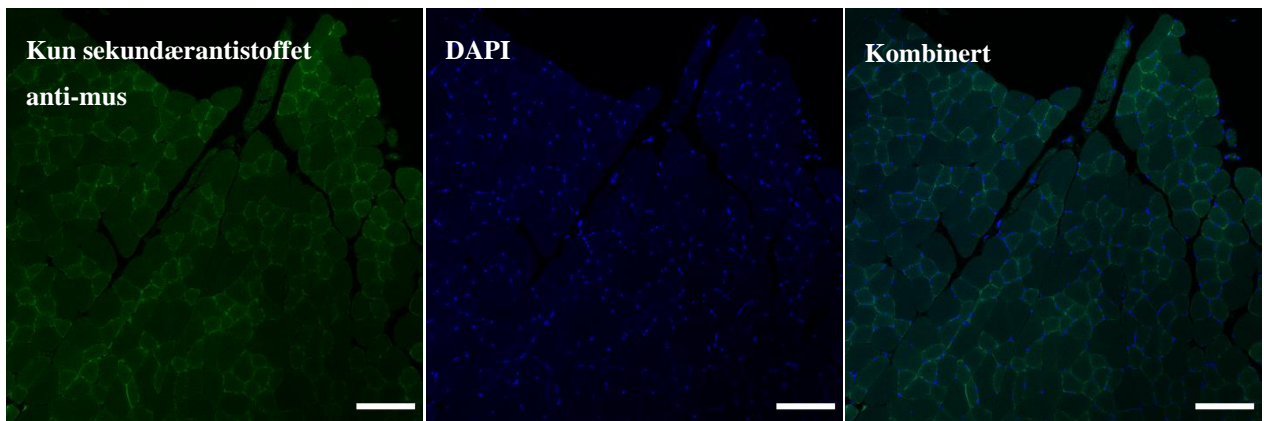
### 3.2 Optimalisering av blokkeringsbetingelser for sekundærantistoff

Det første primærantistoffet som skulle testes til fibertypingen var MyHCIIa,b,x. Antistoffet er laget i mus, og derfor ble det brukt et fluorescensmerket sekundærantistoff rettet mot museantistoff. Det er ønskelig at sekundærantistoffet utelukkende skal binde til primærantistoffet, men ettersom sekundærantistoff rettet mot mus også kan binde endogene immunglobuliner i musevev eller Fc-reseptorer på immunceller i vevet, kan det oppstå utfordringer med uspesifikk binding i prøvematerialet. For å unngå dette ble det gjennomført en farging med kun sekundærantistoff hvor uspesifikk binding ble forsøkt blokkert ved hjelp av Fc-blokk og Fab-fragment. Det ble farget to muskelsnitt fra friske mus. Begge snittene ble blokkert med en standard blokkeringsbuffer (se punkt 2.1.3). I tillegg ble ett av snittene blokkert med Fc-blokk og Fab-fragment. Deretter ble begge snittene inkubert med sekundærantistoff, og fluorescens i vevet ble undersøkt i mikroskopet. I begge snittene ble det detektert fluorescenssignal som var mer intenst rundt enkelte muskelfibre. Standard blokkering og blokkering med Fc-blokk og Fab-fragment ga ingen betydelig forskjell i fluorescensintensitet eller lokaliseringsmønster (Figur 8a-b).

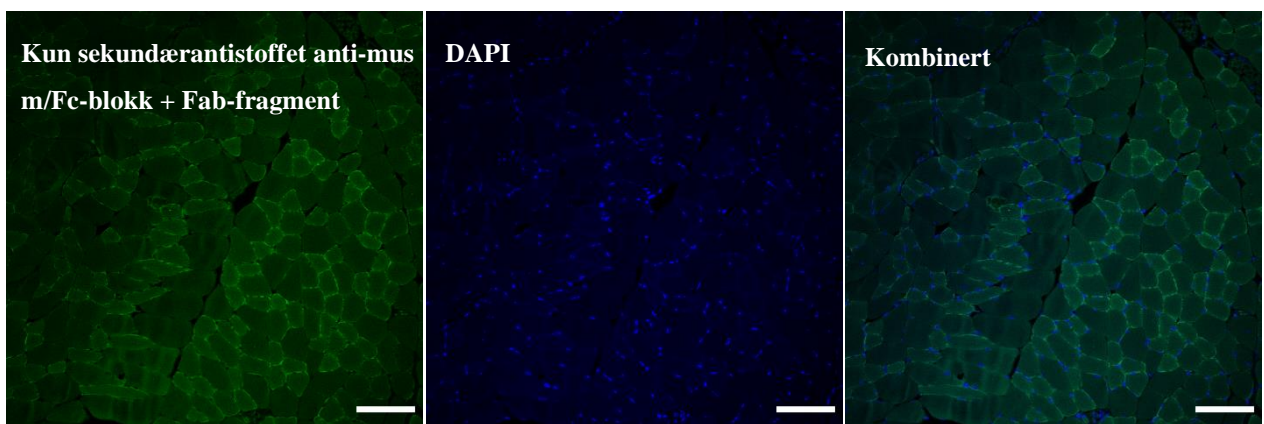
Fab-fragment er ment å redusere uspesifikk binding av sekundærantistoff til endogene immunglobuliner i musevevet, mens Fc-blokk har som formål å redusere binding av både primær- og sekundærantistoff til immunceller i vevet. Ettersom det ikke ble detektert noen reduksjon i fluorescenssignal i vevet med disse blokkeringsagensene, er det mulig at signalet ikke skyldes uspesifikk sekundærantistoffbinding, men heller autofluorescens i dette vevsmaterialet. For å undersøke dette ble fluorescenssignal i vev som ikke hadde vært inkubert med sekundærantistoff observert. Sammenlignet med vev som hadde blitt inkubert med sekundærantistoff ble det ikke observert betydelig forskjell i fluorescensintensitet eller lokaliseringsmønster (Figur 8c). Dette tyder på at fluorescens som detekteres i vevet skyldes autofluorescens og ikke uspesifikk binding av sekundærantistoff. Videre forsøk ble derfor gjort uten tilleggsblokkering med Fc-blokk og Fab-fragment.



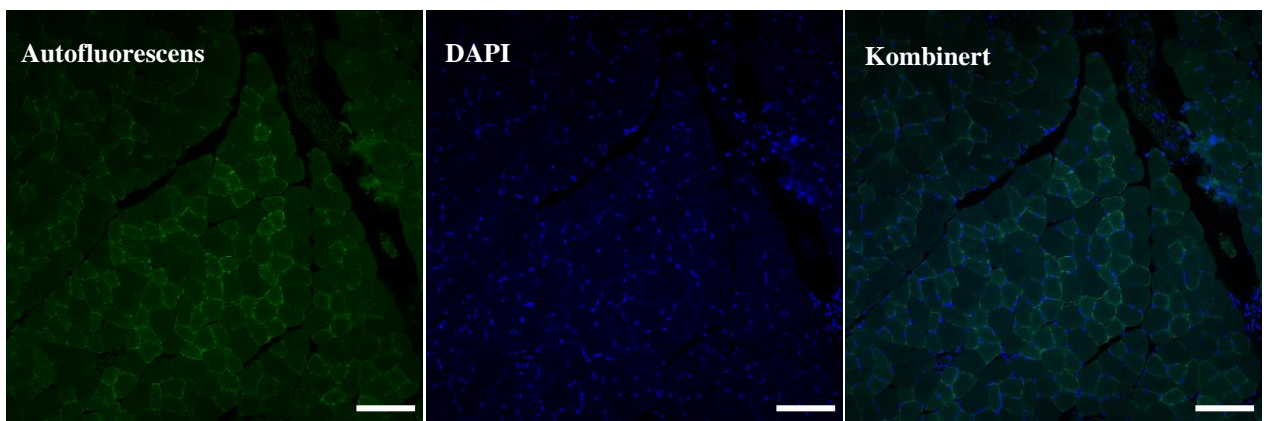
a)



b)



c)



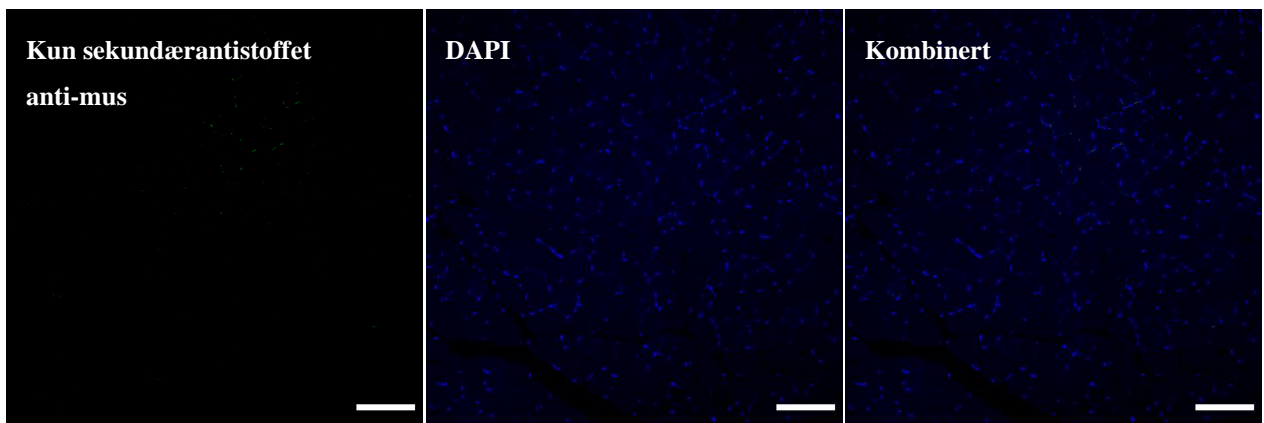
**Figur 8: Fluorescenssignal i muskelvevet skyldes autofluorescens i vevet, ikke uspesifikk binding av sekundærantistoff. a-b) Musevev farget med sekundærantistoff etter standard blokkering (a) eller standard blokkering i tillegg til inkubering med Fc-blokk og Fab-fragment (b). c) Musevev kun blokkert i standard blokkering uten påfølgende tilsetning av antistoff. For alle tre snitt er fluorescens visualisert som grønn detektert i bølglengdeområdet 499-579nm, som tilsvarer emisjon fra sekundærantistoffet.**

Størrelsesmarkør: 100 $\mu$ m

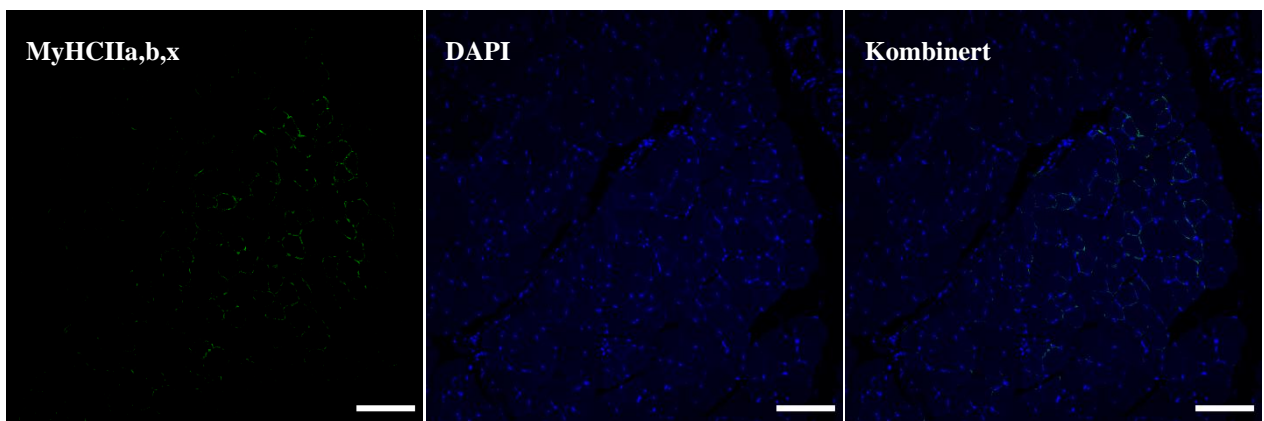
### 3.3 Optimalisering av MyHCIIa,b,x primærantistoffkonsentrasjon

Ulike fortynninger av antistoffet MyHCIIa,b,x ble testet på muskel fra en frisk mus. Det ble valgt tre fortynninger; anbefalt fortynning fra produsenten (1:400), samt en mer og en mindre konsentrert løsning; henholdsvis 1:200 og 1:800. Ved undersøkelse av fluorescenssignal i vevet ble laserinnstillinger justert slik at signalet i vevssnitt som var inkubert med kun sekundærantistoff (negativ kontroll) så vidt var synlig (Figur 9a). Vevssnitt inkubert med både primær- og sekundærantistoff ble undersøkt ved samme innstillinger, og fluorescenssignal av sterkere intensitet enn negativ kontroll ble ansett å skyldes binding av primærantistoff. Ingen av antistofffortynningene som ble testet ga noe vesentlig signal sterkere enn negativ kontroll, her vist med vevssnitt inkubert i den mest konsentrerte primærantistoffløsningen (Figur 9b). Ut ifra observasjonene ser det ikke ut til at primærantistoffet som er rettet mot MyHCIIa,b,x binder seg i vevet under disse eksperimentelle betingelsene.

a)



b)



**Figur 9:** Primærantistoffet rettet mot MyHCIIa,b,x binder seg ikke vesentlig i muskelvevssnitt fra mus. *a)* Muskelvevssnitt inkubert med kun sekundærantistoff, der laserinnstillingene er justert til tilnærmet ingen signal fungerer som negativ kontroll. *b)* Muskelvevssnitt inkubert med MyHCIIa,b,x-spesifikt antistoff fortynnet 1:200.

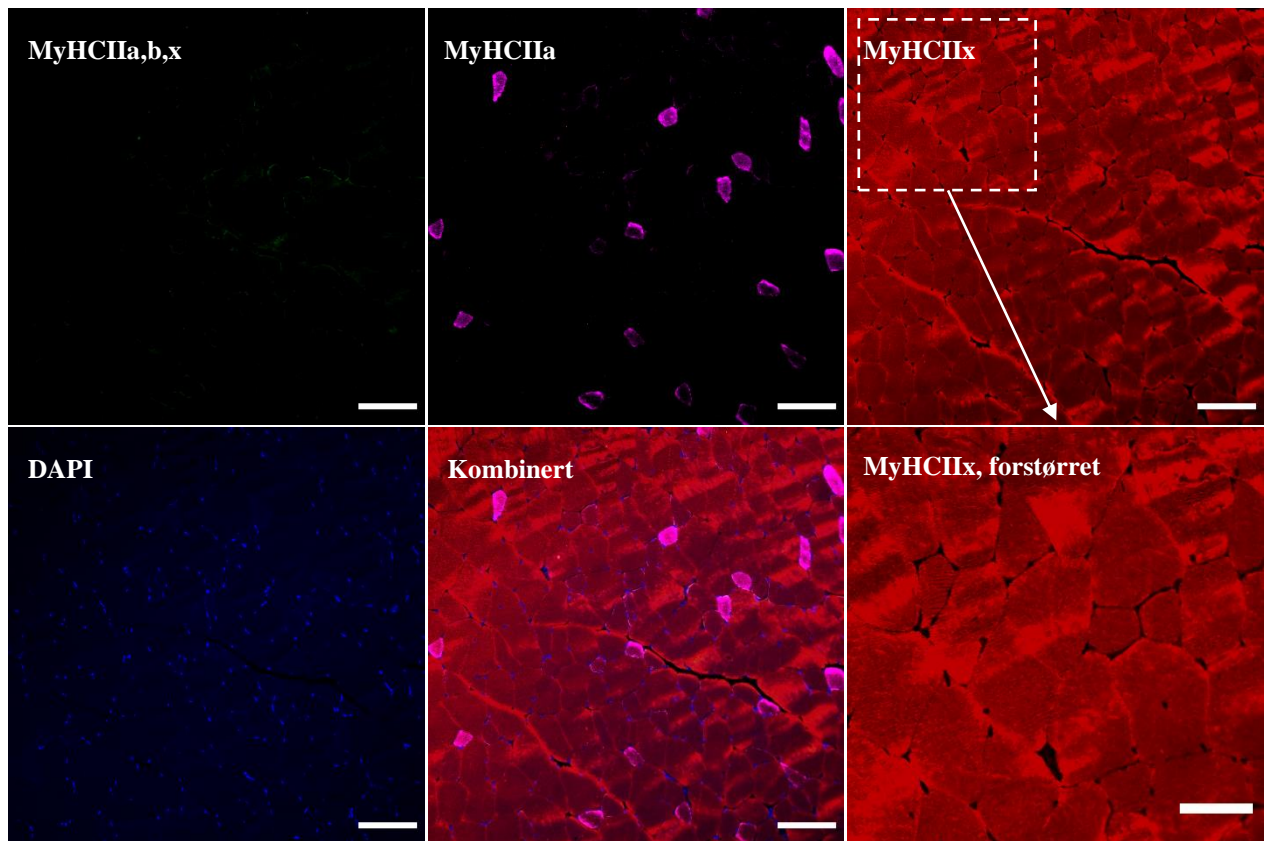
Størrelsesmarkør: 100µm

### 3.4 MyHCIIa,b,x-, MyHCIIa- og MyHCIIx-samfarging av muskelvev

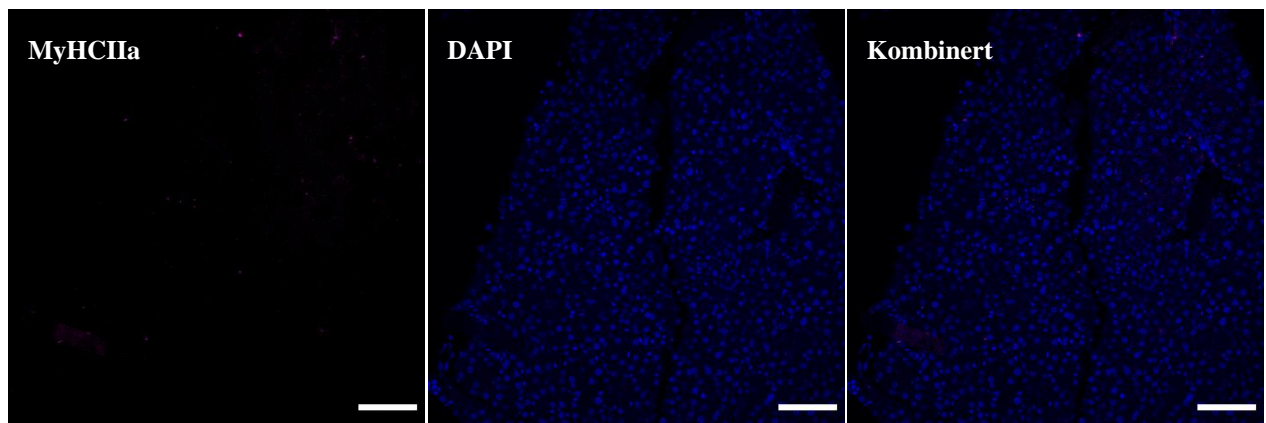
I den forrige testen av primærantistoffet som er rettet mot MyHCIIa,b,x, ble det ikke detektert noe signal. For å bekrefte at mangel på signal ikke skyldtes en manuell feil under utførelsen, ble dette antistoffet på nytt brukt (fortynnet 1:200) på et muskelsnitt fra en frisk mus. Samtidig ble primærantistoff rettet mot MyHCIIa og MyHCIIx brukt på samme vevssnitt. Disse ble brukt ved fortynning anbefalt av produsenten; henholdsvis 1:200 og 1:100. Primærantistoff rettet mot MyHCIIa,b,x, MyHCIIa og MyHCIIx er produsert i henholdsvis mus, rotte og kanin. Ulik art for generering av antistoffene ga mulighet til å benytte tre ulike fluorescensmerkede sekundærantistoff. Til sammen kan farging med disse tre antistoffene benyttes for å detektere de tre ulike type II muskelfibrene og i tillegg type I-fibre; type IIa og type IIx kan identifiseres direkte med sine respektive antistoffer. Type IIb vil være positive med antistoff mot IIa,b,x men samtidig negativ for IIa og IIx. De fibrene som ikke er positive med noen av disse antistoffene vil være type I fibre.

Uspesifikk bakgrunn ble eliminert ved å justere laserinnstillingene slik at signal i alle tre bølgelengdeområder (emisjon fra de tre ulike sekundærantistoffene) så vidt var synlig (Vedlegg 1). Som observert tidligere, ble det ikke detektert noe MyHCIIa,b,x signal utover bakgrunnsfluorescens (Figur 10a). MyHCIIx-antistoffet bandt ujevnt over hele vevet, og var ikke lokalisert til enkelte fibre (Figur 10a). Dette tyder på at MyHCIIx-antistoffet binder uspesifikt og ikke kan brukes til deteksjon av MyHCIIx-fibre. MyHCIIa-antistoffet har markant lokalisering til enkelte fibre slik det forventes at MyHCIIa-proteinet skal være lokalisert (Figur 10a). De samme observasjonene ble gjort i muskel fra pre-kakektiske mus (resultatene er ikke vist). For å kontrollere at MyHCIIa-antistoffet ikke binder i vev hvor man ikke forventer å finne dette proteinet, ble også lever fra friske mus farget med MyHCIIa-antistoff. Som forventet ga dette antistoffet ingen signal i vevssnitt fra lever (Figur 10b).

a)



b)



**Figur 10: Kombinasjon av antistoffer rettet mot MyHCIIa,b,x, MyHCIIa og MyHCIIx på musevev. a)** Muskelsnitt farget med antistoffene MyHCIIa,b,x (fortynnet 1:200), MyHCIIa (fortynnet 1:200) og MyHCIIx (fortynnet 1:100), viser forventet lokaliseringsmønster kun for antistoffet rettet mot MyHCIIa. Signalet fra MyHCIIx er ujevnt og uspesifikt, og ikke lokalisert til enkelte fibre, som tydelig vises på nærbildet av et mindre område av vevet (MyHCIIx, forstørret). Antistoffet rettet mot MyHCIIa,b,x gir ingen vesentlig signal. **b)** Antistoffet rettet mot MyHCIIa gir ingen signal i lever.

Størrelsesmarkør: 50 $\mu$ m (MyHCIIx, forstørret)

Størrelsesmarkør: 100 $\mu$ m (resten)

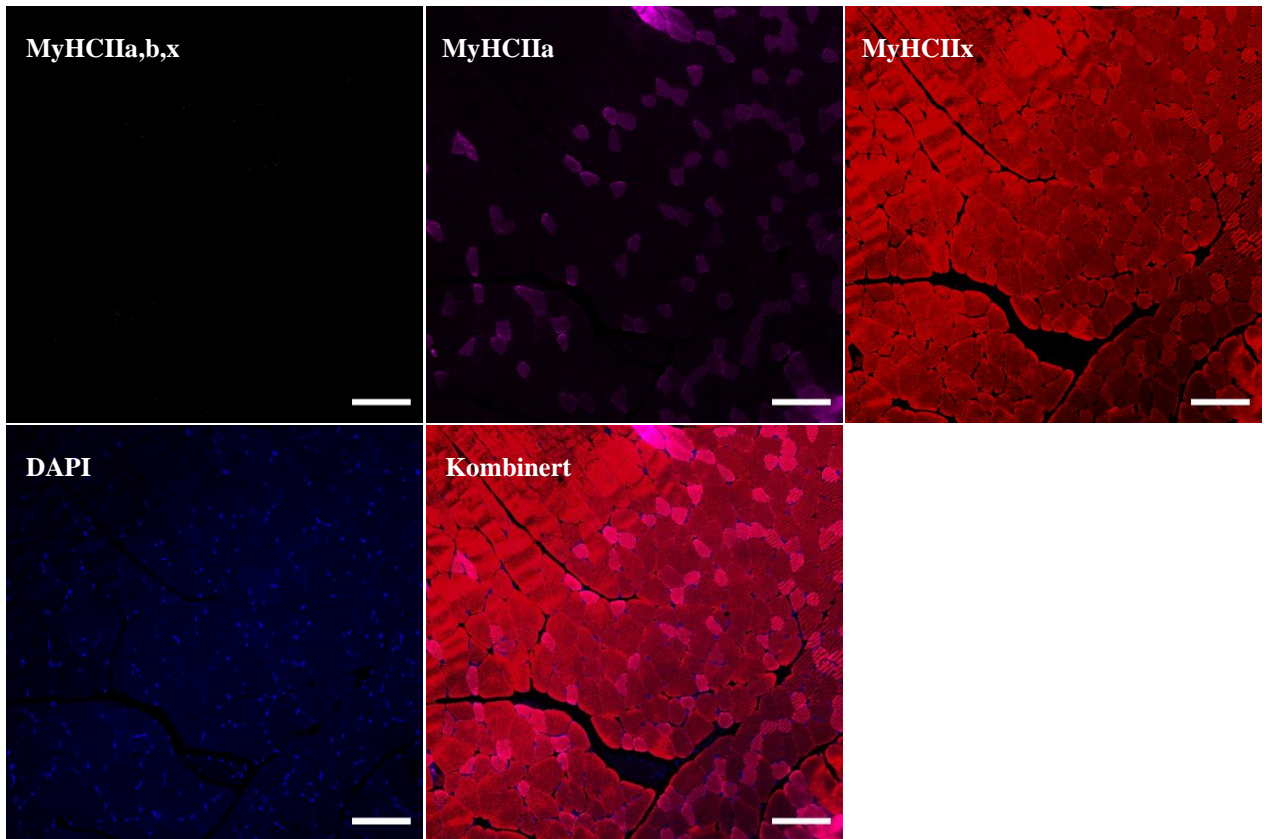
### 3.5 Optimalisering av antigendemaskering

Hittil har bare antistoffet MyHCIIa gitt signal med forventet lokalisering i vevet. For å undersøke om deteksjon av MyHCIIa,b,x og MyHCIIx kunne oppnås, og om MyHCIIa-deteksjon kunne forbedres ytterligere, ble det testet en ny buffer for antigendemaskering. Den nye bufferen var trisbuffer med pH 9, og denne ble testet parallelt med den originale citratbufferen med pH 6. Først ble muskelsnitt fra friske mus utsatt for antigendemaskering i enten trisbuffer eller i citratbuffer og farget med kun sekundærantistoff. Det ble ikke observert vesentlig forskjell i signalintensitet eller lokalisering mellom vevene hvor trisbuffer og citratbuffer ble benyttet (resultatene er ikke vist). Videre ble muskelsnitt fra friske mus utsatt for antigendemaskering i enten trisbuffer eller citratbuffer og farget for deteksjon av MyHCIIa,b,x, MyHCIIa og MyHCIIb. Snittene fikk den samme kombinasjonen av antistoffer og fortynninger som i forsøk 3.4. Som i tidligere forsøk er laserinnstillinger justert til tilnærmet ingen bakgrunn, i forhold til snitt med kun sekundærantistoff (Vedlegg 2). Signalintensitet over dette nivå ble ansett å skyldes binding av primærantistoff.

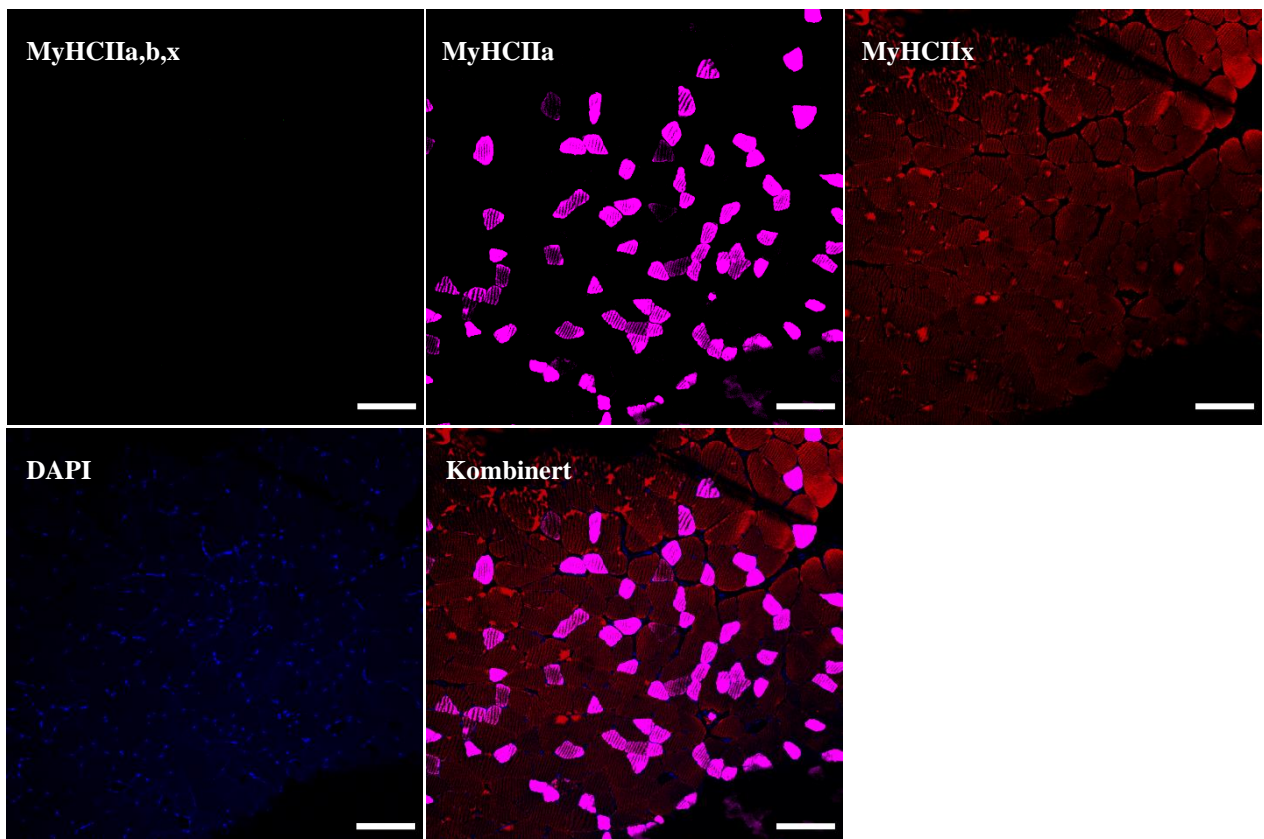
Som observert tidligere (Figur 9b og 10a), ga MyHCIIa,b,x-antistoffet ingen signal når citratbuffer ble brukt til antigendemaskering (Figur 11a). Det ble heller ikke observert noen forskjell ved bruk av trisbuffer til antigendemaskering (Figur 11b). MyHCIIx-antistoffet ga, som tidligere ved bruk av citratbuffer (Figur 10a), ujevn farge, men i dette forsøket ble det også observert områder med tydeligere farging av enkelte fibre (Figur 11a). Disse områdene utgjorde grovt estimert ca. 30% av vevssnittet og fibre med tydeligere signal var overlappende med MyHCIIa-positive fibre. I trisbuffer var det kun ujevn farging som ikke var lokalisert til enkelte muskelfibre (Figur 11b), men signalintensiteten var redusert i forhold til i citratbufferen. Trisbufferen forbedret deteksjon med MyHCIIa-antistoffet; det ble observert et sterkere signal av MyHCIIa i trisbuffer (Figur 11b) enn ved bruk av citratbufferen til antigendemaskering (Figur 11a). De samme observasjonene ble gjort i muskel fra pre-kakektiske mus (resultatene er ikke vist).

For å kontrollere at MyHCIIa-antistoffet ikke binder i vev hvor man ikke forventer å finne proteinet MyHCIIa (også ved bruk av trisbuffer til antigendemaskering), ble lever fra friske mus farget med MyHCIIa-antistoffet. Som forventet ga MyHCIIa-antistoffet ingen signal i dette vevet (Figur 11c).

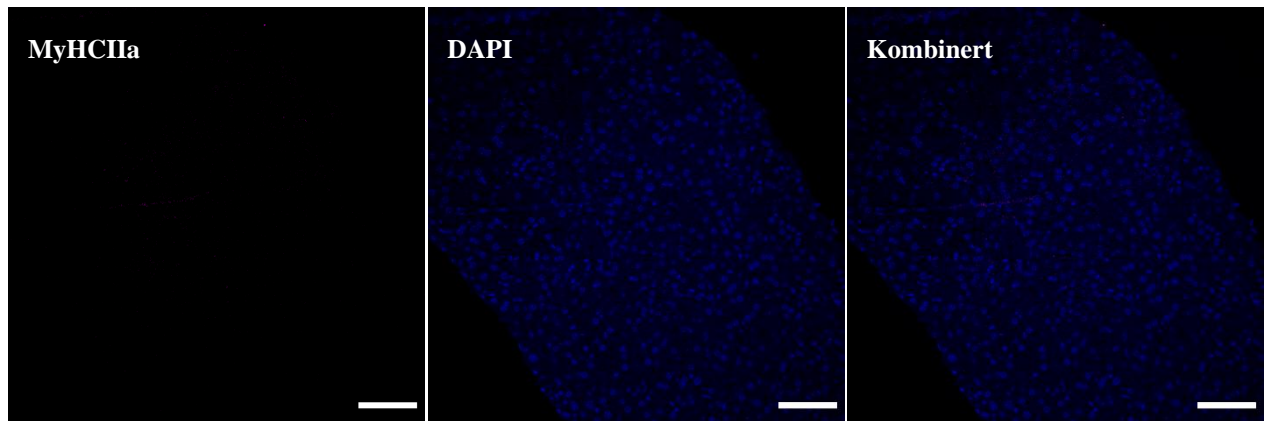
a)



b)



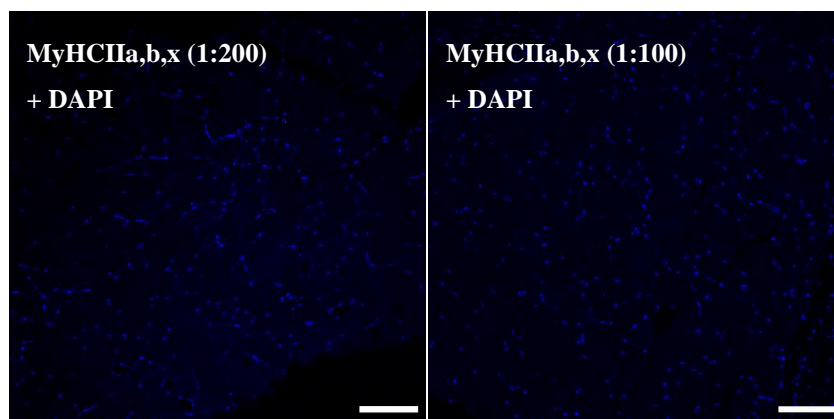
c)



**Figur 11: Sammenligning av tris- og citratbuffer for antigendemaskering.** a-b) Citratbuffer (a) og trisbuffer (b) brukt til antigendemaskering før test av antistoffene MyHCIIa,b,x (fortynnet 1:200), MyHCIIa (fortynnet 1:200) og MyHCIIx (fortynnet 1:100), viser ingen endring i binding av MyHCIIa,b,x. Trisbuffer gir kraftigere signal fra antistoffet MyHCIIa og redusert bakgrunnssignal fra MyHCIIx. c) Antistoffet rettet mot MyHCIIa gir ingen signal i lever ved bruk av trisbuffer.

### 3.6 Optimalisering av MyHCIIa,b,x primærantistoffkonsentrasjon etter antigendemaskering i trisbuffer

Antistoffet MyHCIIa,b,x har hittil ikke gitt noe signal over bakgrunnen i. Ettersom mangel på signal kan skyldes at for lite antistoff ble benyttet, ble det undersøkt om en mer konsentrert løsning av antistoffet (1:100, ift. tidligere 1:200) kunne forbedre binding i vevet. Det ble imidlertid ikke observert noen vesentlig forskjell i signalintensitet ved bruk av en mer konsentrert antistoffløsning (Figur 12).



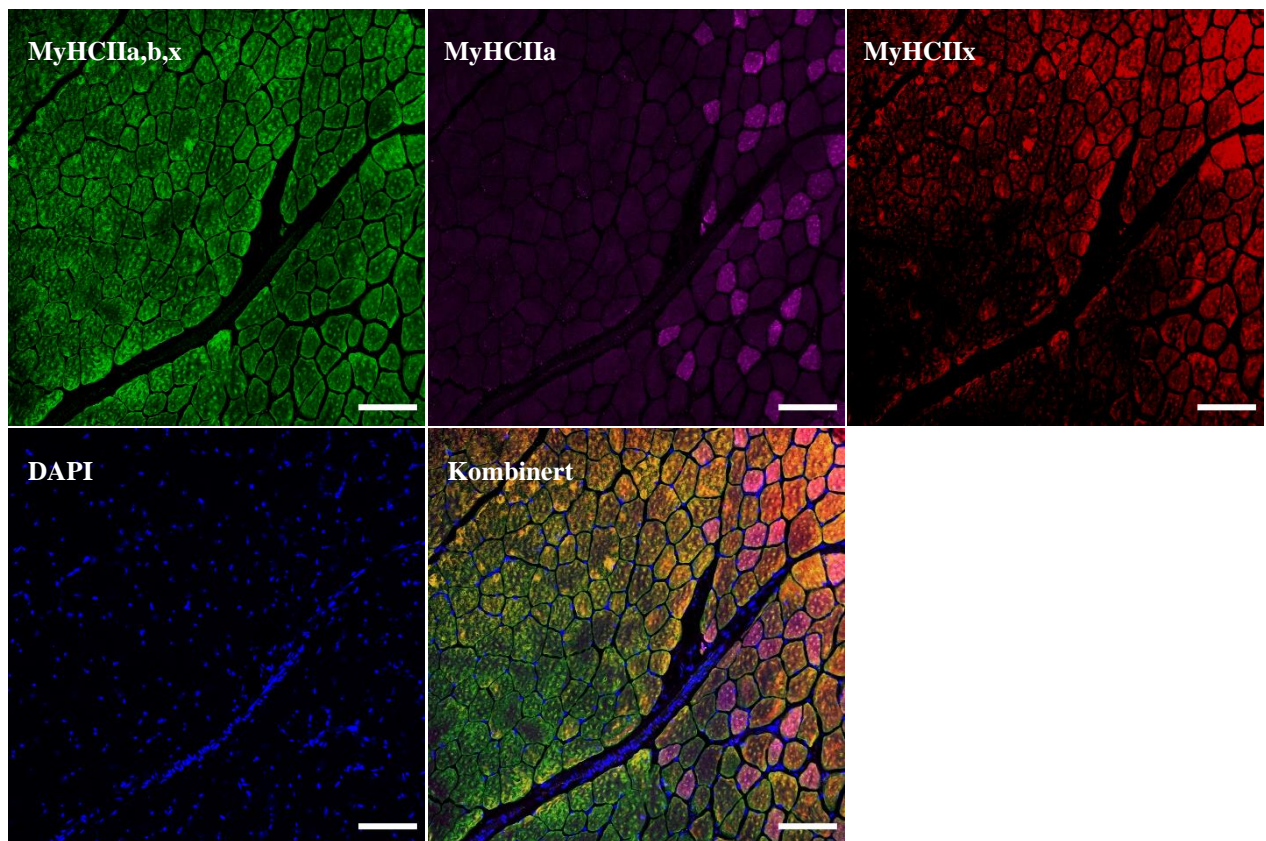
**Figur 12: Sammenligning av to fortynninger av MyHCIIa,b,x-spesifikt antistoff.** En mer konsentrert fortynning av antistoffet rettet mot MyHCIIa,b,x (fortynnet 1:100), gir ingen endring i signal i forhold til den opprinnelige fortynningen (1:200).

Størrelsesmarkør: 100 $\mu$ m

### 3.7 Deteksjon av MyHCIIa,b,x, MyHCIIa og MyHCIIx på frysensnitt

På tross av ulike former for optimalisering på parafininnstøpt vev, har det ikke blitt oppnådd konsekvent og spesifikk binding av MyHCIIa,b,x- og MyHCIIx-antistoffet i muskelfibre. I lignende studier har det ofte blitt brukt frysensnitt for muskelfibertyping (9,47). Det ble derfor innhentet muskelvev fra friske mus, som ble frosset og snittet (se punkt 2.2.1) for uttesting av MyHCIIa,b,x- og MyHCIIx-antistoff i henholdsvis 1:200 og 1:100 fortynning. Disse ble også kombinert med antistoffet rettet mot MyHCIIa (1:200 fortynning), da det er ønskelig å gjennomføre samfarging av de ulike muskelfibrene.

Som for parafinsnitt ble laserinnstillinger justert i forhold til fluorescenssignal i muskelsnitt som har blitt inkubert med kun sekundærantistoff (Vedlegg 3). MyHCIIa,b,x og MyHCIIx ga ujevn intensitet i vevet og signalet var ikke lokalisert til spesifikke muskelfibre (Figur 13). Antistoffet rettet mot MyHCIIa har i deler av vevet markant binding til enkelte fibre, mens andre deler av vevet kun har svak signalintensitet og mangler markant lokalisering til enkelte fibre (Figur 13).



*Figur 13: Test av MyHCIIa,b,x-, MyHCIIa- og MyHCIIx-spesifikke antistoff på frysensnitt. Frysensnitt farget med antistoffene MyHCIIa,b,x (fortynnet 1:200), MyHCIIa (fortynnet 1:200) og MyHCIIx (fortynnet 1:100).*

*Størrelsesmarkør: 100µm*



## 4.0 Diskusjon

Målet med dette prosjektet var å utvikle en metode for identifisering av ulike type II muskelfibre ved hjelp av immunfluorescens. Denne metoden skulle videre kunne brukes til å sammenligne muskelfiber-sammensetning og -størrelse i kakektisk og friskt muskelvev. I løpet av prosjektet ble det testet ulike betingelser i et forsøk på å optimalisere metoden.

Tre antistoff rett mot forskjellige fibertyper skulle testes; MyHCIIa,b,x, MyHCIIa og MyHCIIx. På parafinsnitt var MyHCIIa det antistoffet som fungerte best og som bandt seg til enkelte muskelfibre i et mønster som kan stemme overens med litteraturen (9,47). I et forsøk på å optimalisere binding av alle antistoffene, ble det testet to ulike buffere for antigendemaskering. Det viste seg at bruk av trisbuffer ga et sterkere signal fra MyHCIIa, til tross for at produsenten hadde angitt at det skulle fungere med citratbuffer. Dette kan tyde på at trisbufferen er bedre egnet til å tilgjengeliggjøre det aktuelle proteinet, og til videre studier på parafinsnitt kan trisbuffer være et bedre alternativ enn citratbuffer for dette antistoffet. På frysensnitt ble det også signal fra MyHCIIa, men bakgrunnssignalet var sterkere enn på parafinsnittene. I tillegg var fordelingen av signalet fra MyHCIIa ujevnt, da store områder av vevet var uten signal, mens andre deler hadde karakteristisk mønster. Den ujevne fordelingen av signal kan blant annet skyldes en naturlig variasjon i vevet. I undersøkelse av leggmuskler i mus og rotte, er det vist at fordelingen av en muskelfibertype kan variere mye innen samme muskel (9). I dette prosjektet er det brukt lårmuskel fra mus, og det er naturlig å anta at de samme variasjonene kan forekomme her. Tekniske feil under utførelsen kan også være en mulig forklaring på at enkelte deler av vevet er uten signal. Dette er derimot en mindre sannsynlig årsak, da hele vevsbiten skal ha fått samme behandling. For å utelukke tekniske feil som årsak må det likevel utføres flere parallelle forsøk, og gjerne på flere mus. På grunn av tidshensyn ble ikke dette gjort her.

Antistoffet rett mot MyHCIIa ga tydelig farging av enkelte muskelfibre. For å undersøke om dette signalet er spesifikt for muskelvev, bør det være med en negativ kontroll for å sjekke om signalet vises i et vev der det ikke er forventet. I forsøket med parafinsnitt ble signalene fra MyHCIIa sjekket i lever. Her var resultatet som forventet negativt, da levervev ikke inneholder muskelprotein myosin tungkjede. Dette styrker teorien om at antistoffet binder seg spesifikt til muskelspesifikke epitoper. Den markante lokaliseringen til enkelte muskelfibre i vevet støtter også at bindingen er spesifikk for en eller noen få fibertyper. Signalet fra MyHCIIa på

frysesnittet burde også blitt sjekket i et annet vev. I utgangspunktet var det med en kontroll fra lever, men tekniske problemer gjorde at den ikke kunne brukes. Dette fører derfor til en usikkerhet om signalet kommer fra muskelfibre, eller om antistoffet har bundet seg uspesifikt. Likevel tyder den markante lokaliseringen til enkelte fibre på at bindingen, også på frysesnitt, er spesifikk for en eller noen få fibertyper. En annen kontroll som kunne vært med på å bekrefte om signalet er spesifikt, er en isotypekontroll. En isotypekontroll kan skille mellom hva som er spesifikk farging og hva som er uspesifikk bakgrunn. Dette er et antistoff av samme immunglobulinklasse, subklasse og fra samme art som primærantistoffet. Isotypekontrollen mangler den antigenspesifikke delen, og skal derfor ikke binde seg i vevet (59). Dersom isotypekontrollen binder seg i samme mønster som primærantistoffet, kan det understøtte at bindingen som oppstår ikke er avhengig av den antigenspesifikke delen av antistoffet, men heller uspesifikk binding fra denne isotypen av immunglobuliner. For et pålitelig resultat må derfor isotypekontrollen være negativ. Det er likevel verdt å merke seg at selv om isotypekontrollen er negativ kan primærantistoffet mulig binde seg (med antigenspesifikk del) til andre epitoper enn ønsket epitop på målproteinet, og på denne måten gi uspesifikke signal.

For å forsikre seg om at antistoffet rettet mot MyHCIIa kun detekterer målproteinet, kan knockout mus benyttes der genet MYH2 er slått ut. Da forventes ikke et fluorescerende signal ved bruk av det aktuelle antistoffet ved immunfluorescens. En mindre tidkrevende, men mer usikker metode, er å benytte flere antistoff rettet mot samme protein. Dersom flere antistoff rettet mot MyHCIIa binder akkurat de samme muskelfibrene, øker det sannsynligheten for at det er muskelfibertype IIa som detekteres. Det ble derimot ikke tid til å prøve flere antistoffer i løpet av prosjektperioden.

Antistoffet rettet mot MyHCIIx bandt seg uspesifikt med mye bakgrunnsfarge i hele vevet. Fargen var til tider ujevnt fordelt, men stort sett ikke avgrenset til spesifikke fibre. I et forsøk på å oppnå mer spesifikk binding av antistoffet rettet mot MyHCIIx, ble trisbuffer testet for antigendemaskering. Dette resulterte i mindre bakgrunnsfarge, men ingen muskelfibre med tydeligere signal. Det samme uspesifikke signalet ble også observert i frysesnitt. Unntaket fra denne uspesifikke bindingen var ett forsøk i citratbuffer (se punkt 3.5), der bindingen ga antydning til sterkere farge på noen fibre i deler av vevet. Grovt estimert gjaldt dette 30% av muskelvevet i én prøve. De få muskelfibrene som hadde antydning til sterkere farge ved bruk av antistoffet rettet mot MyHCIIx, hadde et overlappende mønster med fibrene farget av antistoffet rettet mot MyHCIIa. Overlappende signal kan generelt skyldes at de to

målproteinene er kolokalisert. Dette er ikke sannsynlig ettersom MyHCIIx og MyHCIIa er karakteristisk for spesifikke, og ikke overlappende fibertyper. Overlappende signal kan også skyldes at bølgelengdeområdet for deteksjon av en fluorofor til dels omfatter emisjon fra den andre fluoroforen. I dette prosjektet ble MyHCIIa-farging detektert ved 638-755nm. Emisjon fra fluoroforen benyttet til MyHCIIx-fargingen kan detekteres helt opp til ca. 725nm (men med mindre enn 20% relativ intensitet over 638nm), og kunne potensielt blitt detektert som MyHCIIa. For å unngå dette ble fluoroforene for deteksjon av MyHCIIa og MyHCIIx eksitert sekvensielt, og vil derfor ikke under disse betingelsene kunne gi overlappende signal. Den tydeligere fargen noen muskelfibre fikk av MyHCIIx-antistoffet kan også være et resultat av tekniske feil under utførelsen eller lokale variasjoner i vevet. Mangel på denne typen mønster i den første fargingen med MyHCIIx-antistoffet gir grunn til å mistenke at dette skyldes et teknisk avvik, men flere replikate forsøk burde vært gjennomført for å kunne si dette med større sikkerhet.

Et gjennomgående problem med farging med det MyHCIIa,b,x-spesifikke antistoffet var at det ikke ble oppnådd noe fluorescenssignal. En mulig årsak til dette kan være at antigenene ikke var tilgjengelige i vevet. Derfor ble det testet to ulike buffere til antigendemaskering, men de ga ingen forskjell i binding av antistoffet. Det ble også testet ulike konsentrasjoner av antistoffet for å se om en mer konsentrert løsning kunne gi sterkere signal, men resultatet ble det samme. Da frysesenitt ble testet bandt derimot antistoffet seg i hele vevet. Det antas at denne bindingen er uspesifikk ettersom MyHCIIa,b,x kun skal detektere type II fibre. Årsaken til denne forskjellen i binding mellom snitt fra parafininnstøpt vev og frysesenitt, kan være at proteinene i frysesenitt er mer tilgjengelige. Antistoff skal i utgangspunktet kun binde seg til sitt respektive antigen, men det kan også oppstå uspesifikke bindinger til proteiner med lignende epitoper. Siden antistoffet ikke ga en tydelig deteksjon av type II fibre, er en mulighet for videre studier å teste andre antistoff rettet mot samme protein.

Ved studering av vevssnittene ble det flere ganger observert ujevn fluorescensintensitet i vevet, noen områder med svakere og andre områder med sterkere intensitet. Dette ble hovedsakelig observert ved bruk av antistoffer rettet mot MyHCIIa,b,x og MyHCIIx. En faktor som kunne ført til svakere fluorescensintensitet er bleking av vevssnittene etter tilsetning av sekundærantistoff. Det er imidlertid tenkelig at dette ville ført til et jevnt blekere signal. I tillegg skal denne problematikken ha vært unngått, da snittene i tiden etter tilsetning av sekundærantistoff har blitt oppbevart uten lystilgang. Noe bleking kan ha forekommet under

mikroskopering av snittene som følge av laserlyset. Avhengig av hvilke områder som har vært utsatt for laserlys, kunne vevssnittet fått preg av både mer og mindre fluorescensintense områder. Dette ble også tatt hensyn til under mikroskoperingen ved at laserinnstillingene ble justert i ett område av vevssnittet, mens bildene ble tatt i områder uten tidligere lyspåvirkning. Det er derfor lite sannsynlig at regionale forskjeller skyldes bleking fra laseren. Det er også verdt å merke seg at den ujevne fargen som observeres antagelig ikke hadde vært et problem dersom forsøkene hadde resultert i sterke, spesifikke signal. Forsøkene i dette prosjektet benytter en relativt sterk laserstyrke, men med spesifikke signal kunne innstillingene blitt justert deretter, og bakgrunnen (observert som ujevn og uspesifikk farge) ville sannsynligvis blitt eliminert.

På frysensnitt ble det generelt observert mye og ujevnt signal som følge av farging av MyHCIIa,b,x og MyHCIIx. Det ble ikke forsøkt å optimalisere blokkering på disse snittene, da metoden fra parafinsnitt ble direkte overført til frysensnitt. Kontrasten var spesielt stor for antistoffet rettet mot MyHCIIa,b,x, da det ikke var signal på parafinsnitt, men mye signal på frysensnitt. Det tilhørende sekundærantistoffet var rettet mot mus, og det er vist at bruken av dette på musevev kan gi store mengder uspesifikke signal. Her kunne det derfor i videre studier vært aktuelt å teste blokkering med Fc-blokk og Fab-fragment. Varmebehandling av ufikserte frysensnitt har også blitt brukt for å eliminere uspesifikke signaler, med forbehold om at antigenene er varmemestabile (60). Begge disse metodene kunne vært forsøkt i dette prosjektet. Dette er imidlertid mer hensiktsmessig dersom antistoffet også gir spesifikt signal.

Vev kan avgi autofluorescens i ulike bølgelengder. I forsøket der blokkering ble testet (se punkt 3.2) ble signalet betydelig amplifisert for å kunne se forskjell på effekten av standard blokkering og blokkering med Fc-blokk og Fab-fragment. Det er ingen forskjell i signalet fra snittene med sekundærantistoff, og snittet som ikke har antistoff. Det betyr at signalet mest sannsynlig kommer fra vevet sin egen fluorescens. I de resterende forsøkene ble laserinnstillingene justert slik at all uspesifikk bakgrunn gitt av sekundærantistoff eller autofluorescens ble eliminert, før signalet fra binding av primærantistoff ble detektert. I de forsøkene som ga signal ble det også kontrollert at snittet med kun sekundærantistoff var negativt, og derfor har det heller ikke vært hensiktsmessig å sjekke autofluorescens.

Det kan være store variasjoner i fibersammensetning i ulike muskler. I tillegg kan muskelfibrene være ujevnt fordelt inne i samme muskel. Det ble forsøkt å ta høyde for dette

ved å studere et stort område av muskelsnittene, i stedet for noen få utvalgte områder som potensielt hadde få av en spesiell muskelfibertype. Likevel bør det poengteres at det kun er studert en type muskel, hvor man i snittet ikke kan være sikker på frekvensen av de ulike fibertypene. Selv om det sannsynligvis vil være en andel av alle muskelfibertypene i vevssnittet fra lårmuskelen burde man, for å være sikker på at man undersøker vev hvor alle fibertyper er godt representert, undersøke flere ulike muskeltyper. I tillegg burde flere uavhengige farginger vært gjennomført for å utelukke tekniske feil som kan oppstå i enkeltforsøk.

I dette prosjektet var det ønskelig at antistoffene for deteksjon av de tre type II muskelfibrene kunne kombineres. Av antistoffene testet her, er det kun MyHCIIa som gir godt signal i enkelte muskelfibre, og forsøk på optimalisering har ikke gitt mer spesifikk binding av de to andre antistoffene. Et naturlig steg videre er derfor å teste nye antistoff som er spesifikke for MyHCIIa,b,x og MyHCIIx. De utprøvde antistoffene ble valgt på bakgrunn av produsentenes opplysninger om at de var egnet på parafininnstøpt vev, da det var dette materiale som i utgangspunktet var ønskelig å bruke i videre studier av kakektisk vev. Dette prøvematerialet ga få muligheter i valg av antistoff. Dersom frysesnitt brukes i videre utvikling av metoden, vil det være et større utvalg av antistoff tilgjengelig. I tillegg er det mange muligheter for optimalisering på frysesnitt som ikke har blitt testet ut i dette prosjektet, blant annet blokkering av uspesifikke bindinger, varmebehandling av ufikserte frysesnitt og undersøkelse av primærantistoffkonsentrasjoner.

Det opprinnelige målet med dette prosjektet var å etablere en metode for fibertyping og bruke metoden til å sammenligne friskt muskelvev med pre-kakektisk vev. En slik metode kunne blitt brukt til å studere hvordan kakeksi påvirker muskelfiber-sammensetning og -størrelse i type II muskelfibre. For eksempel kan endring i diameter på fibertverrsnittene måles når fibrene er tydelig avgrenset, slik de blir ved optimalisert metode for fibertyping. Denne type målinger kan videre brukes i forskning for å bedre forståelsen av hvilke mekanismer som påvirker utvikling av kakeksi, samt evaluere behandlingsresponsen. Gjennom arbeidet med dette prosjektet oppstod det uforutsette problemer, primært med mangel på spesifikk binding av antistoffer til målproteinene. Dersom det hadde vært mer tid, ville det blitt testet andre antistoff som spesifikt skal gjenkjenne MyHCIIb og MyHCIIx. Det MyHCIIa-spesifikke antistoffet ga et tydelig avgrenset signal som ser ut til å være spesifikt for en type fiber, både på parafinsnitt og frysesnitt, uavhengig av demaskeringsbuffer. Ettersom dette er et antistoff og en metode som fungerer bra, kunne denne vært brukt for å se etter forskjeller mellom frisk og pre-kakektisk

muskel. Det ble likevel gjort en vurdering i løpet av prosjektperioden på at gjenværende tid skulle benyttes til å forsøke å optimalisere betingelsene for de to gjenværende antistoffene, i stedet for å analysere forskjeller i MyHCIIa-proteinet mellom friskt og pre-kakektisk muskelvev.

Av tidsmessige årsaker ble ikke metoden for identifisering av type II muskelfibre i vevssnitt ferdig etablert, og da heller ikke brukt til å studere hvordan kakeksi påvirker muskelfiber-sammensetning og -størrelse. På tross av dette har prosjektet resultert i nyttige erfaringer som kan brukes i videre optimalisering av metoden.

## 5.0 Referanser

1. Dahl HA. Kapittel 1 - Litt grunnleggende muskelbiologi. I: Mest om muskel - essensiell muskelbiologi. Oslo: Cappelen Damm AS; 2008. s. 13–26.
2. Holck P. musklene. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 26. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/musklene>
3. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, mfl. Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition*. 1. desember 2008;27(6):793–9.
4. Fasting S. muskelvev. I: Store norske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 25. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://snl.no/muskelvev>
5. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Bjåle JG. Kapittel 8 - Musklene. I: Menneskekroppen fysiologi og anatomi. 3.utgave. Oslo: Gyldendal; 2019. s. 274–88.
6. Scientific Image and Illustration Software | BioRender [Internett]. [sitert 10. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.biorender.com/>
7. Cooper GM. Actin, Myosin, and Cell Movement. *The Cell: A Molecular Approach* 2nd edition [Internett]. 2000 [sitert 29. mars 2023]; Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9961/>
8. Talbot J, Maves L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. juli 2016;5(4):518–34.
9. Sawano S, Komiya Y, Ichitsubo R, Ohkawa Y, Nakamura M, Tatsumi R, mfl. A One-Step Immunostaining Method to Visualize Rodent Muscle Fiber Type within a Single Specimen. *PLOS ONE*. 4. november 2016;11(11):e0166080.
10. Plotkin DL, Roberts MD, Haun CT, Schoenfeld BJ. Muscle Fiber Type Transitions with Exercise Training: Shifting Perspectives. *Sports (Basel)*. 10. september 2021;9(9):127.
11. Dahl HA. Kapittel 2 - Motonevron- og muskelfibertyper. I: Mest om muskel - essensiell muskelbiologi. Oslo: Cappelen Damm AS; 2008. s. 51–5.
12. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*. 2000;50(6):500–9.
13. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews*. oktober 2011;91(4):1447–531.
14. Schiaffino S, Rossi AC, Smerdu V, Leinwand LA, Reggiani C. Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skeletal Muscle*. desember 2015;5(1):1–14.

15. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, mfl. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* mai 2011;12(5):489–95.
16. Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. Cancer-associated cachexia (Primer). *Nature Reviews: Disease Primers.* 2018;4(1):17105.
17. Hofslie E. kakeksi. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2022 [sitert 14. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/kakeksi>
18. Watanabe H, Oshima T. The Latest Treatments for Cancer Cachexia: An Overview. *Anticancer Res.* februar 2023;43(2):511–21.
19. Ferrara M, Samaden M, Ruggieri E, Vénéreau E. Cancer cachexia as a multiorgan failure: Reconstruction of the crime scene. *Front Cell Dev Biol.* 8. september 2022;10:960341.
20. Vagnildhaug OM, Balstad TR, Almberg SS, Brunelli C, Knudsen AK, Kaasa S, mfl. A cross-sectional study examining the prevalence of cachexia and areas of unmet need in patients with cancer. *Support Care Cancer.* juni 2018;26(6):1871–80.
21. Bosaeus I, Daneryd P, Lundholm K. Dietary intake, resting energy expenditure, weight loss and survival in cancer patients. *J Nutr.* november 2002;132(11 Suppl):3465S-3466S.
22. Fossum S. protongradient. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 15. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/protongradient>
23. Fukawa T, Yan-Jiang BC, Min-Wen JC, Jun-Hao ET, Huang D, Qian CN, mfl. Excessive fatty acid oxidation induces muscle atrophy in cancer cachexia. *Nat Med.* juni 2016;22(6):666–71.
24. Kordes M, Larsson L, Engstrand L, Löhr JM. Pancreatic cancer cachexia: three dimensions of a complex syndrome. *Br J Cancer.* 11. mai 2021;124(10):1623–36.
25. Mannelli M, Gamberi T, Magherini F, Fiaschi T. The Adipokines in Cancer Cachexia. *International Journal of Molecular Sciences.* januar 2020;21(14):4860.
26. Esper DH, Harb WA. The Cancer Cachexia Syndrome: A Review of Metabolic and Clinical Manifestations. *Nutrition in Clinical Practice.* 2005;20(4):369–76.
27. VanderVeen BN, Murphy EA, Carson JA. The Impact of Immune Cells on the Skeletal Muscle Microenvironment During Cancer Cachexia. *Front Physiol.* 2020;11:1037.
28. Cuenca AG, Cuenca AL, Winfield RD, Joiner DN, Gentile L, Delano MJ, mfl. Novel role for tumor-induced expansion of myeloid-derived cells in cancer cachexia. *J Immunol.* 15. juni 2014;192(12):6111–9.



29. Baazim H, Antonio-Herrera L, Bergthaler A. The interplay of immunology and cachexia in infection and cancer. *Nat Rev Immunol.* mai 2022;22(5):309–21.
30. Li Y, Jin H, Chen Y, Huang T, Mi Y, Zou Z. Cancer cachexia: molecular mechanism and pharmacological management. *Biochem J.* 14. mai 2021;478(9):1663–88.
31. Roeland EJ, Bohlke K, Baracos VE, Bruera E, Del Fabbro E, Dixon S, mfl. Management of Cancer Cachexia: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 20. juli 2020;38(21):2438–53.
32. Barnes O, Wilson RL, Gonzalo-Encabo P, Kang DW, Christopher CN, Bentley T, mfl. The Effect of Exercise and Nutritional Interventions on Body Composition in Patients with Advanced or Metastatic Cancer: A Systematic Review. *Nutrients.* 18. mai 2022;14(10):2110.
33. Yin L, Li N, Jia W, Wang N, Liang M, Yang X, mfl. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacological Research.* 1. oktober 2021;172:105807.
34. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS Journal.* 2013;280(17):4294–314.
35. Martin A, Freyssenet D. Phenotypic features of cancer cachexia-related loss of skeletal muscle mass and function: lessons from human and animal studies. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* 2021;12(2):252–73.
36. Tisdale MJ. Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiological Reviews.* april 2009;89(2):381–410.
37. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, mfl. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *The FASEB Journal.* 2004;18(1):39–51.
38. Talbert EE, Guttridge DC. Impaired Regeneration: A Role for the Muscle Microenvironment in Cancer Cachexia. *Semin Cell Dev Biol.* juni 2016;54:82–91.
39. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob J Health Sci.* mars 2016;8(3):72–9.
40. Cook DJ, Warren PJ. Kapittel 7 - Staining theory. I: Cellular Pathology - An Introduction to Techniques and Applications. 3. edition. Banbury, UK: Scion; 2015. s. 95–118.
41. Ceccopieri C, Skonieczna J, Madej JP. Modification of a haematoxylin, eosin, and natural saffron staining method for the detection of connective tissue. *Journal of Veterinary Research.* 1. mars 2021;65(1):125–30.

42. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299–311.
43. Moreno V, Smith EA, Piña-Oviedo S. Fluorescent Immunohistochemistry. I: Del Valle L, redaktør. *Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Methods and Protocols* [Internett]. New York, NY: Springer US; 2022 [sitert 24. april 2023]. s. 131–46. (Methods in Molecular Biology). Tilgjengelig på: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3_9)
44. Yang C, Hou V, Nelson LY, Seibel EJ. Mitigating fluorescence spectral overlap in wide-field endoscopic imaging. *J Biomed Opt.* august 2013;18(8):086012.
45. Harboe M. immunfluorescens. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 24. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/immunfluorescens>
46. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 1. oktober 2014;2014(10):pdb.top071795.
47. Murach KA, Dungan CM, Kosmac K, Voigt TB, Tourville TW, Miller MS, mfl. Fiber typing human skeletal muscle with fluorescent immunohistochemistry. *Journal of Applied Physiology.* desember 2019;127(6):1632–9.
48. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry.* 1. januar 1995;70(5):220–33.
49. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) - NO [Internett]. [sitert 24. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>
50. Antigen Retrieval Methods [Internett]. [www.rndsystems.com](http://www.rndsystems.com). [sitert 25. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/antigen-retrieval-methods>
51. Blocking Strategies for IHC - NO [Internett]. [sitert 25. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/blocking-strategies-ihc.html>
52. Mouse on Mouse (MOM) staining protocol | Abcam [Internett]. [sitert 6. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.abcam.com/protocols/mouse-on-mouse-staining-protocol>
53. Uses of Fc Block [Internett]. [sitert 6. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/protocols/uses-of-fc-block>
54. Blocking Endogenous IgG - JIR [Internett]. [sitert 6. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.jacksonimmuno.com/technical/products/groups/fab/blocking>

55. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:289–98.
56. Wang G, Biswas AK, Ma W, Kandpal M, Coker C, Grandgenett PM, mfl. Metastatic cancers promote cachexia through ZIP14 upregulation in skeletal muscle. *Nat Med.* juni 2018;24(6):770–81.
57. Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligiel Z, Vogel R, Heppner GH. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* oktober 1978;38(10):3174–81.
58. Fluorescence SpectraViewer [Internett]. [sitert 10. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer>
59. Isotype Control Antibodies - NO [Internett]. [sitert 7. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/antibodies/primary-antibodies/control-antibodies/isotype-control-antibodies.html>
60. Mundegar RR, Franke E, Schäfer R, Zweyer M, Wernig A. Reduction of High Background Staining by Heating Unfixed Mouse Skeletal Muscle Tissue Sections Allows for Detection of Thermostable Antigens With Murine Monoclonal Antibodies. *J Histochem Cytochem.* 1. november 2008;56(11):969–75.

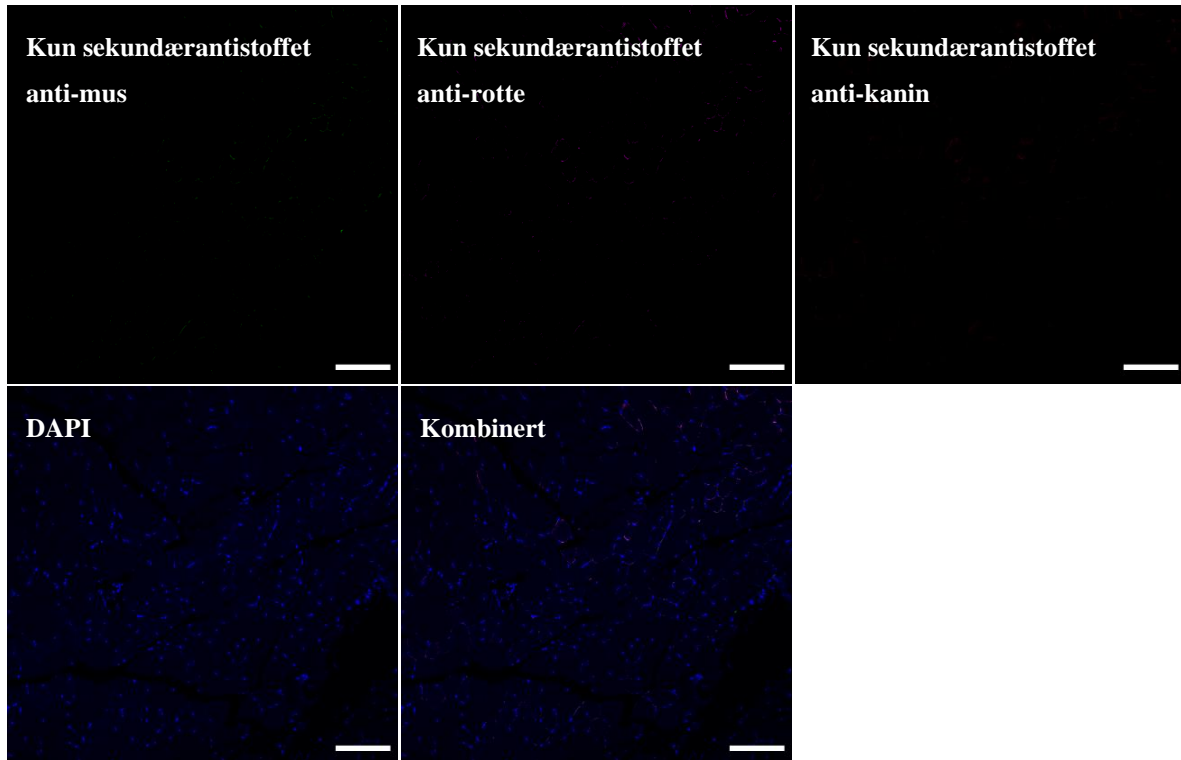
## 6.0 Vedlegg

### *Liste over vedlegg*

- 1 Negativt bakgrunnssignal iht. punkt 3.4
- 2 Negativt bakgrunnssignal iht. punkt 3.5
  - 2.1 Citratbuffer
  - 2.2 Trisbuffer
- 3 Negativt bakgrunnssignal iht. punkt 3.7

### Vedlegg 1: Negativt bakgrunnssignal iht. punkt 3.4

Laserinnstillinger justert til tilnærmet ingen signal, i forhold til snitt kun tilsatt sekundærantistoff, i henhold til punkt 3.4.



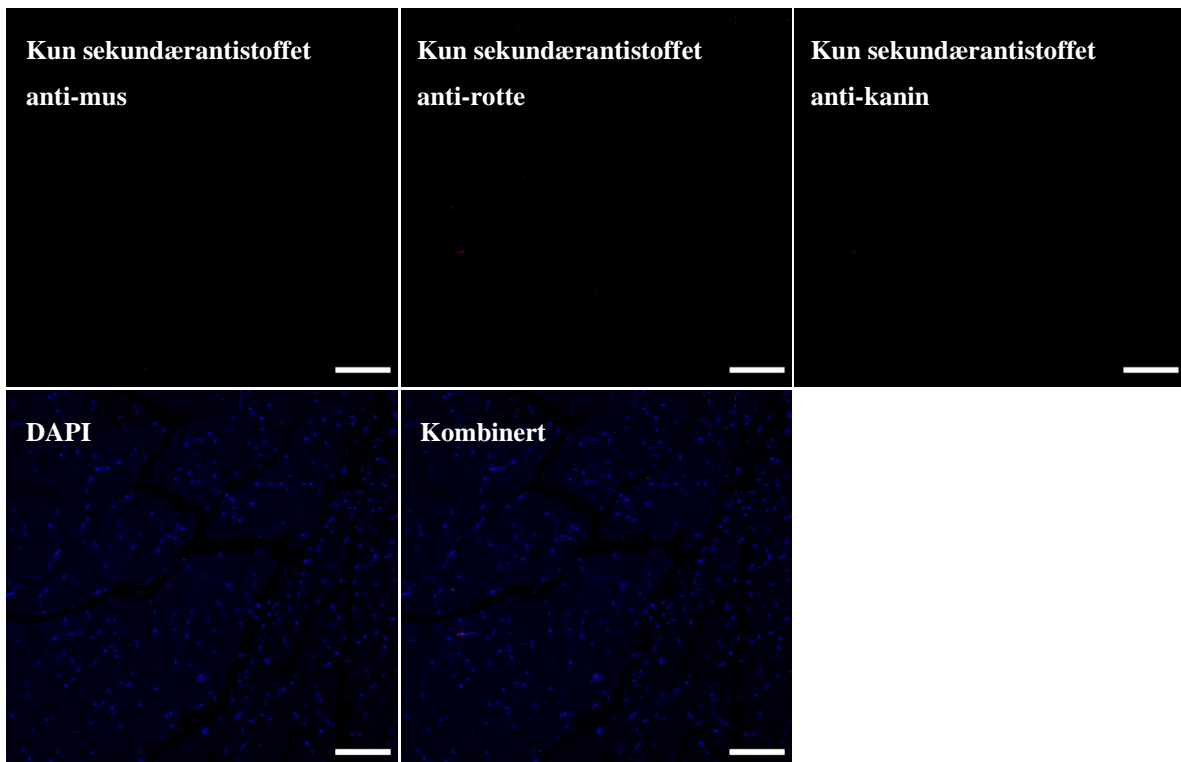
## Vedlegg 2: Negativt bakgrunnssignal iht. punkt 3.5

Laserinnstillinger justert til tilnærmet ingen signal, i forhold til snitt kun tilsatt sekundærantistoff, i henhold til punkt 3.5.

### Vedlegg 2.1: Citratbuffer



### Vedlegg 2.2: Trisbuffer



### Vedlegg 3: Negativt bakgrunnssignal iht. punkt 3.7

Laserinnstillinger justert til tilnærmet ingen signal, i forhold til snitt kun tilsatt sekundærantistoff, i henhold til punkt 3.7.

