

10003
10006
10033
10036

Effekten av Ivermectin på opp- og nedreguleringen av apoptose hos A549 cellelinjen målt med SDS-PAGE og Western Blot

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy
Mai 2024

10003
10006
10033
10036

Effekten av Ivermectin på opp- og nedreguleringen av apoptose hos A549 cellelinjen målt med SDS-PAGE og Western Blot

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Kjære leser,

Denne bacheloroppgaven er skrevet av fire bioteknologistudenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet i Ålesund. Gjennom tre år med studier på NTNU har det blitt opparbeidet en rekke erfaringer, et godt kunnskapsgrunnlag og en interesse for praktisk arbeid på laboratoriet. Fag som anvendt bioteknologi og cellebiologi vekket en interesse for kreftgåten. Dette gjorde valget av bachelortema enkelt da det presenterte seg en oppgave om effekten av Ivermectin på A549 kreftceller. Bacheloroppgaven har vist oss hvordan det er å jobbe selvstendig på laboratoriet, og denne lærdommen tar gruppen med seg inn i videre studier og ut i arbeidslivet.

NTNU fortjener en spesiell takk for både økonomiske midler til bachelorprosjektet og bruk av laboratorier. Videre ønsker vi å takke våre forelesere og medstudenter for oppmuntring og støtte gjennom studieløpet. En ekstra stor takk til vår veileder Gro Audveig Hagen Bjørnøy, for uvurderlig kunnskap og veiledning gjennom bacheloren.

Sammendrag

Målet med denne studien var å undersøke effekten av Ivermectin på reguleringen av apoptosemarkørene Bax og Bcl-2 i A549 cellelinjen. Dette ble utført for å forstå hvordan Ivermectin påvirker apoptotiske mekanismer, og hvorvidt det fører til opp- eller nedregulering av disse proteinmarkørene. A549 celler ble behandlet med 5 μ M Ivermectin over tidsintervaller på 24 og 72 timer for å bestemme kort- og langsiktige effekter. I første delen av studien ble de ulike prosedyrene optimalisert, som cellevekst, SDS-PAGE og Western Blot. Cellelyseringsprosessen for A549 cellene ble også optimalisert, etterfulgt av måling med QubitTM 4 fluorometer og QubitTM Protein BR Assay Kit. I studiens hoveddel ble fire cellebrett med seks brønner dyrket for hvert tidsintervall, hvorav fire brønner inneholdt Ivermectin, videre var det to kontroller; en med DMSO fortynnet i vekstmedium og en med kun vekstmedium. Proteinene ble separert ved hjelp av SDS-PAGE og videre analysert med Western Blot for identifisering. Resultatene ble analysert ved å sammenligne membranene fra de ulike intervallene for å identifisere endringer i proteinbåndenes intensitet. A549 cellene som var behandlet med Ivermectin viste ikke signifikante endringer i apoptosemarkørene Bax og Bcl-2. Bax ble detektert, men det var ingen forskjell mellom behandlet og ubehandlet gruppe. Bcl-2 viste ingen bånd for verken behandlet eller ubehandlet gruppe. En svakhet med denne studien var mangel på tilstrekkelig optimalisering for å kunne vurdere effekten av Ivermectin på A549 cellene.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of Ivermectin on the regulation of apoptosis markers Bax and Bcl-2 in the A549 cell line. The reasoning for this was understanding the effects of Ivermectin on apoptotic mechanisms, and whether it can lead to an up- or downregulation of the aforementioned protein markers. A549 cells were treated with 5 μ M Ivermectin at time intervals of 24 and 72 hours to determine its short- and long-term effects. In the first part of the study various procedures were optimized, including cell growth, SDS-PAGE, and Western Blot. The cell lysis process was also optimized for A549 cells, subsequently followed by protein quantification with Qubit[™] 4 fluorometer and Qubit[™] Protein BR Assay Kit. In the main part of the study, four cell plates with six wells were cultured for each time interval, with four wells containing Ivermectin, along with two controls: one with DMSO diluted in growth medium and the other containing only growth medium. Proteins were separated using SDS-PAGE and further analyzed with Western Blot for identification. The results were analyzed by comparing the membranes from the different intervals to identify up- and downregulation of protein bands on the membranes. A549 cells that were treated with Ivermectin did not show significant changes in the regulation of apoptosis markers Bax and Bcl-2. Bax was detected but did not show to a change between samples treated with Ivermectin and those without. Bcl-2 did not exhibit any bands for either samples, both the ones treated with Ivermectin and those that didn't. A flaw in this study was a lack of optimization to assess the effect of Ivermectin on A549 cells.

Innholdsfortegnelse

Terminologi og forkortelser:	1
Begrensninger:	3
1 Innledning:	4
2 Teori	5
2.1 Lungekreft	5
2.2 Ivermectin	6
2.3 A549 celler.....	8
2.4 Cellesyklus og kontrollsystem	8
2.5 Celledyrking og cellevekst hos A549 celler	10
2.6 Apoptose og apoptosemarkørene Bax og Bcl-2	13
2.6.1 Kreftceller og apoptose	14
2.7 Ivermectin og kreft	16
2.8 Proteomikk	17
2.8.1 SDS-PAGE.....	18
2.8.2 Western Blot.....	19
3 Metode	23
3.1 Tillaging av medium	23
3.2 Tining av celler	23
3.3 Splitting av celler.....	23
3.4 Tillaging av vekstmedium med Ivermectin.....	24
3.5 Overføring av celler til cellebrett	24
3.6 Dyrking av celler med Ivermectin vekstmedium	25
3.7 Optimalisering av metode.....	26
3.7.1 Optimalisering av cellevekst.....	26
3.7.2 Optimalisering av SDS-PAGE	26
3.7.2.1 Første testforsøk	26
3.7.2.2 Andre testforsøk	27
3.8 Optimalisering av Western Blot.....	28
3.9 Hovedforsøk.....	29
3.9.1 Hovedforsøk 24 timer	29
3.9.2 Hovedforsøk 72 timer	31
4 Resultat	32
4.1 Optimalisering av cellevekst.....	32
4.1.1 Dyrking av A549 celler.....	32
4.2 Dyrking med Ivermectin.....	33
4.3 Testforsøk	33

4.4 24- og 72-timers hovedforsøk	33
4.5 SDS-PAGE og Western Blot testforsøk	35
4.6 Resultater fra Hovedforsøket	35
4.6.1 Resultater fra proteinisolering målt med Qubit™ 4 Fluorometer	35
4.6.2 SDS-PAGE	36
4.6.2.1 Resultater SDS-PAGE	36
4.6.3 Western Blot	37
4.6.3.1 Resultater Western Blot	37
5 Diskusjon	40
5.1 Dyrking av A549 celler	40
5.1.2 Optimalisering av cellevekst	40
5.2 Dyrking med Ivermectin i vekstmedium	41
5.3 Optimalisering av prosedyrer	41
5.3.1 Testforsøk	42
5.3.1.1 Testforsøk 1	42
5.3.1.2 Testforsøk 2	42
5.4 Hovedforsøk	43
5.4.1 SDS-PAGE	44
5.4.2 Western Blot	45
5.5 Videre forskning	47
6 Konklusjon	49
Litteraturliste	50
Vedlegg	60
A.1 Reagenser	60
A.2 prosedyrer	63
A.2.1 Rutiner på cellelaboratoriet	63
A.2.2 Tining av celler	64
A.2.3 Splitting av celler	65
A.2.4 Lysing av celler	66
A.2.5 Prosedyre for Qubit™ Protein BR Assay Kit	66
A.2.6 Utrekning av volumprøve	67
A.2.7 SDS-PAGE	68
A.2.8 Farging med Bio-Safe™ Coomassie stain	70
A.2.9 Farging med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	70
A.2.10 Tillaging av runningbuffer	70
A.2.11 Fortynning av antistoffer	71
Primære antistoff	71
Sekundære antistoff	71
A.2.12 Western Blot	72

<i>A.2.13 Tillaging av vaskebuffer</i>	75
<i>A.2.14 Blokking med EveryBlot Blocking buffer</i>	76
<i>A.2.15 Inkubering av membranen med antistoffer</i>	76
<i>A.2.16 Clarity™ Western ECL Substrate</i>	76
<i>A.2.17 Blokking med Clarity™ og Clarity max™ Western ECL substrat</i>	77
<i>A.2.18 Fotografering og redigering av membraner i Image Lab™ Software med ChemiDoc™ MP Imaging System</i>	77
Vedlegg A.3	79
<i>A.3.1.1 Western Blot resultat fra 24-timers intervall</i>	79
<i>A.3.1.2 Western Blot resultat fra 72-timers intervall</i>	81
<i>A.3.2 Western Blot resultat fra 72-timers intervall, PVDF membraner</i>	83
<i>A.3.3 Målinger fra Qubit™ 4 Fluorometer</i>	84
<i>A.3.4.1 Konfluens cellebrett 1 fra 24-timers intervall</i>	84
<i>A.3.4.2 Konfluens cellebrett 2 fra 24-timers intervall</i>	85
<i>A.3.4.3 Konfluens cellebrett 3 fra 24-timers intervall</i>	86
<i>A.3.4.4 Konfluens cellebrett 4 fra 24-timers intervall</i>	86
<i>A.3.4.5 Konfluens cellebrett 1 fra 72-timers intervall</i>	87
<i>A.3.4.6 Konfluens cellebrett 2 fra 72-timers intervall</i>	88
<i>A.3.4.7 Konfluens cellebrett 3 fra 72-timers intervall</i>	88
<i>A.3.4.8 Konfluens cellebrett 4 fra 72-timers intervall</i>	89

Terminologi og forkortelser

A549 celler: Adenokarsinomisk humane alveolære basale epitelceller (1)

Apoptose: Programmert celledød utløst av ulike faktorer og signalveier (2)

Apoptosemarkører: Biologiske signaler som er involvert på ulike nivåer i styringen av programmert celledød (4)

Apoptosom: Apoptosestruktur som dannes under apoptose og inneholder APAF1 og Caspase 9 (2)

Bax: Pro-apoptotisk protein, medlem av Bcl-2-proteinfamilien (4)

Bcl-2: Anti-apoptotisk protein, medlem av Bcl-2-proteinfamilien (4)

Caspase 3: En eksekutor caspase som er en del av kaskaden som fører til apoptose (5)

Caspase 9: En initiator caspase som er en del av den intrinsiske apoptoseveien (5)

Cellesyklusarrest: Midlertidig eller permanent stopping av cellevekst og celledeling (2)

Cytochrome c (cyto c): Et redoksaktivt protein i mitokondriene som har en sentral rolle med apoptose og elektrontransportkjeden (6)

DMSO: Dimethyl sulfoxide, et løsningsmiddel (7)

FBS: Fetal Bovine Serum (8)

In vitro: Undersøkelser utført utenom organismen i reagensglass, glass eller petriskåler (9)

Ivermectin (IVM): Et bredspektret antiparasittisk legemiddel (10)

Konfluens: Prosentandel av adherente pattedyrceller festet til en overflate (11)

PARP: Apoptoseassosiert polymerase involvert i enzymatisk kløyvning (2)

PBS: Phosphate Buffered Saline, saltvannsløsning for vasking (12)

Penstrep: En kombinasjon av penicillin og streptomycin som forhindrer bakterielle kontaminasjoner (13)

Proliferasjon: Grunnleggende prosess for flercellede organismer hvor cellene vokser og deler seg (14)

Begrensninger:

Studien møtte flere utfordringer som begrenset den og påvirket gjennomføringen. Laboratoriarbeidet var begrenset til hverdager mellom kl. 08.00-16.00. Dette førte til at det ble gjort tilpasninger og utsettelse for å holde tidsbegrensningene. I tillegg ble gjennomføringen og optimaliseringen av studien påvirket av de tidsrammene som ble satt for laboratoriarbeid i løpet av semesteret. I løpet av perioden ble laboratorieområdet delt mellom flere parter, inkludert bachelorgrupper og ansatte. Dette førte til nødvendig koordinering og samarbeid om bruk av areal for å sikre at alle fikk tilgang til nødvendig plass. Økonomiske begrensninger påvirket innkjøpet av reagenser, og dette resulterte i færre paralleller og at optimaliseringsprosessen ble kortere enn ønsket.

1 Innledning

Kreft er en gruppe sykdommer som kjennetegnes av ukontrollert cellevekst og spredning av celler, som følger av mutasjon i cellens arvestoff (15). Det er en av de ledende dødsårsakene på verdensbasis, og hvert år øker antallet krefttilfeller (16). De fleste tilfeller av kreft vil føre til dannelsen av en svulst. En svulst er neoplasti, ukontrollert vekst av celler, som kan påvises som en distinkt kul eller knute i et organ (17). Forskning på kreft foregår *in vitro* med etablerte cellelinjer. A549 cellelinjen blir mye brukt både som modell for lungeadenokarsinom og som type II lungeepitelceller i *in vitro* forsøk. Dette anses som en standard innen kreftforskning på lungekreft (18). Det foregår mye forskning rundt å finne alternative metoder for behandling av kreft. Det er svært dyrt med kreftbehandling, noe som har bidratt til at det er ønskelig å finne nye og billigere behandlinger. Ivermectin, videre omtalt som IVM, har en lang brukshistorie hos mennesker, og har blitt brukt på mennesker i mange tiår. IVM er et antiparasittisk legemiddel, som har vist potensial for kreftbehandling. Ulike studier har vist at IVM undertrykker proliferasjon og dannelse av metastase i doser som ikke er giftige for normale celler. IVM har et stort potensial, og burde forskes videre på. Legemiddelet er allerede godkjent for humant bruk, noe som vil gjøre veien til kliniske studier for kreftbehandling enklere (14, 16). Apoptose er programmert celledød og er en prosess som foregår i flercellede organismer. Denne prosessen spiller en sentral rolle i en organismes overlevelse og utvikling. Apoptosemarkørene Bax og Bcl-2 har henholdsvis pro-apoptotisk og anti-apoptotisk funksjon. Når A549 celler blir utsatt for et stress fører det til at Bax oppreguleres, og Bcl-2 nedreguleres (19 – 22). I denne bachelorstudien ble effekten IVM har på opp- og nedreguleringen av Bax og Bcl-2 i A549 celler studert gjennom SDS-PAGE og Western Blot forsøk. For å kunne studere dette måtte veksten til A549 celler optimaliseres på cellelaboratoriet. Det var ønskelig å få eksponentiell vekst før et stress ble påført. Når cellene hadde oppnådd eksponentiell vekst, ble de overført til et cellebrett. Cellene fikk et døgn på å adherere til overflaten, videre ble IVM tilsatt i en bestemt konsentrasjon og ulike tidsintervall. Etter dette ble det utført forsøk på cellene med SDS-PAGE og Western Blot for å studere opp- og nedregulering av Bax og Bcl-2.

2 Teori

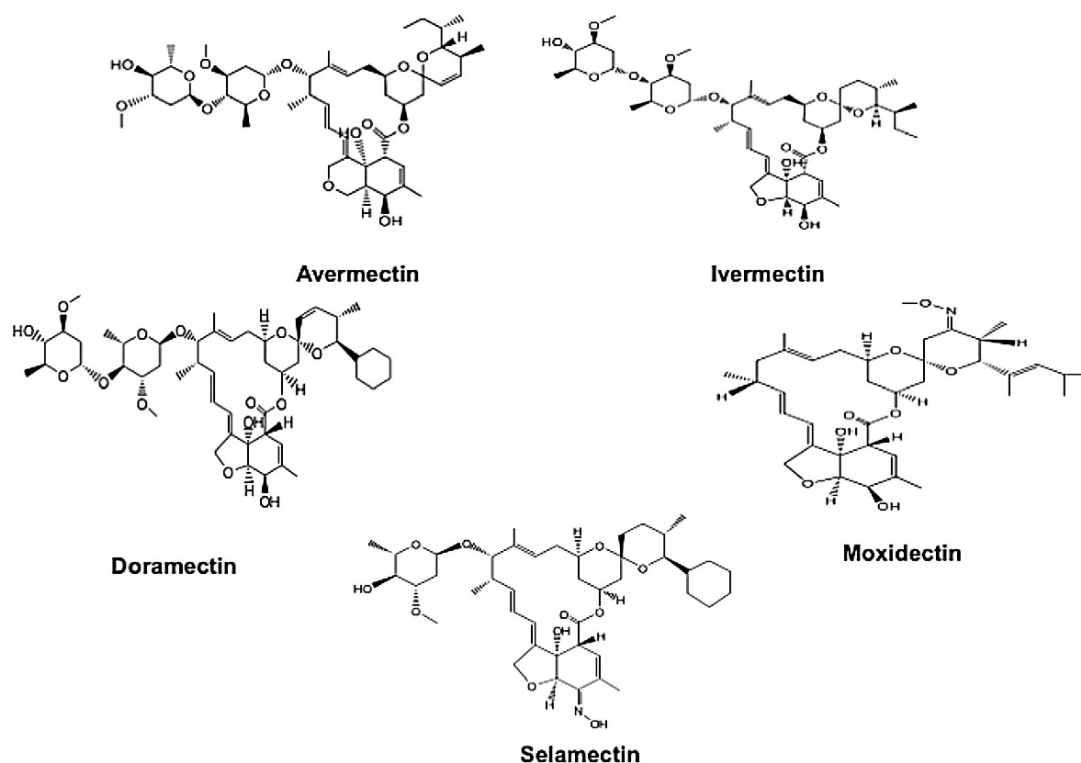
2.1 Lungekreft

Lungekreft karakteriseres ved ukontrollert cellevekst som sprer seg i lungevevet eller bronkiene. Denne krefttypen er en av de mest utbredte i Norge og utgjør 10 % av krefttilfellene i landet (23). Lungekreft er en krefttype som er spesielt vanskelig å behandle, og står for den største andelen av kreftrelaterte dødsfall blant menn og kvinner (18). Krefttypen er spesielt farlig da den har få symptomer i tidlig fase. Symptomer som hoste, oppspytt og luftveisinfeksjoner kan oppleves som relativt uspesifikke. Dette resulterer i at pasienter oppsøker behandling sent, noe som medfører at 40 % av pasientene har uhelbredelig sykdom ved diagnostidspunktet. Lungekreft kan oppstå spontant, men i Norden regner man med at 80-90 % av tilfellene er tilknyttet røyking. Andre årsaker kan skyldes luftforurensing, radon eller andre kreftfremkallende stoffer (23, 26). Lungekreft deles inn i småcellet lungekreft og ikke-småcellet lungekreft, hvor sistnevnte står for omtrent 85 % av tilfellene. Småcellet lungekreft har en høy proliferasjonsrate og regnes som den mest aggressive typen. Ikke-småcellet lungekreft deles inn i undergrupper som plateepitelkarsinom og adenokarsinom. Det differensieres mellom disse to basert på svulstens størrelse, og spredning til lymfeknute eller andre organer (24). Av undergruppene er lungeadenokarsinom (LUAD) den hyppigste formen for ikke-småcellet lungekreft. LUAD står for halvparten av alle krefttilfeller i Norge, og er en av krefttypene med høyest forekomst og dødelighet i verden (23, 31). Krefttypen oppstår fra kjertelvev og utvikler seg oftest i ytterkantene av lungene og under hinnene som dekker bronkiene (25). De konvensjonelle behandlingsformene for lungekreft er kirurgi, strålebehandling og medikamentell behandling. Behandlingsformene utvikles stadig for å øke overlevelsesraten og minimere senskader (15, 27). Den medikamentelle behandlingen kan være cellegift, immunterapi eller målrettet behandling. Behandlingene brukes alene eller i kombinasjon med hverandre avhengig av sykdomsutbredelsen, vevstypen og pasientens allmenntilstand (15, 24). Ved behandling av lungekreft kan det oppstå en rekke bivirkninger under eller i etterkant av behandling. Dette inkluderer for eksempel tretthet, hårtap, hodepine, kvalme, nedsatt matlyst og sårhet i svelget. Bivirkninger med cellegiftbehandling, strålebehandling og immunterapi oppstår som følge av at kroppens friske celler også har blitt eksponert under behandlingsprosessen (24). Av de medikamentelle behandlingene har cellegift vist seg å gi mest alvorlige bivirkninger. Cellegift, også kjent som kjemoterapi, svekker og dreper kreftsvulster ved å stanse kreftcellenes evne til å proliferere. En alvorlig bivirkning er

nedsatt immunforsvar, noe som gjør pasienten mer utsatt for andre infeksjoner og sykdommer. For eksempel kan infeksjoner føre til sepsis (blodforgiftning) som kan gi alvorlige komplikasjoner (28). Utvikling av alternative behandlingsmetoder kan gi forbedret effekt på sykdomsbehandling. Alternative behandlingsmetoder kan gi redusert resistens mot og forbedre effekten av konvensjonelle behandlinger. I tillegg kan det reduserte bivirkninger og gi pasienten flere valgmuligheter. En alternativ behandling kan være IVM. Ifølge studien til Jiménez-Gaona *et al.* inhiberer IVM proliferasjon av tumorceller og undertrykker vekst til en rekke ulike humane krefttyper (16). I en annen studie ble det observert følsomhet ovenfor IVM på kreftceller som er resistente mot konvensjonell kjemoterapi (4). Dette gjør det spesielt interessant å studere IVM videre. Dersom IVM kombineres med andre kjemoterapimidler eller målrettede legemidler kan det ha en optimal effekt på kreft ved å redusere utviklingen av resistens, øke effekten av behandlingen og redusere uønskede bivirkninger (4). Signalveiene IVM påvirker i kreftceller burde studeres grundigere før IVM kan brukes til kreftbehandling hos mennesker. Dermed gjenstår det ytterligere forskning for å studere effekten IVM har på kreftceller, blant annet ved å studere den farmakologiske virkningen av IVM nærmere gjennom *in vitro* studier (4, 16).

2.2 Ivermectin

IVM er et bredspektret antiparasittisk legemiddel som brukes til behandling av parasitter, som arachnider og helminter (10). I 1978 ble IVM godkjent for bruk på mennesker av FDA (4). Legemiddelet brukes blant annet til behandling av skabb. Behandling med IVM mot parasittiske sykdommer fører til at parasittene lammes og dør, fordi IVM angriper parasittens nervesystem (10). Når IVM binder seg til og aktiverer GluCl-kanalene, fører det til en åpning av Cl-kanalen som påvirker membranpotensialet til parasitten (4). Egenskapene til IVM inkluderer antimikrobielle, antiinflammatoriske og antivirale virkninger (4). IVM er et derivat av avermectin og tilhører avermectin-familien (4). Avermectin stammer fra mikroorganismen *Streptomyces avermitilis*. Dette er en aerob gram-positiv bakterie som er svært tilpasningsdyktig, og kan leve i både jord og vann (31). Den kjemiske sammensetningen av IVM består av to komponenter: 80 % av 22,23 dihydroavermectin-B1a og 20 % av dihydroavermectin-B1b (4). Det som skiller B1a og B1b er en forskjell i alkylsidekjeden ved C25 (36).



Figur 1: Illustrerer den kjemiske strukturen til medlemmer av avermectin-familien. Avermectin-familien består av Avermectin, Doramectin, Selamectin, Moxidectin og Ivermectin. Forskjellen mellom avermectin og IVM er at avermectin forekommer naturlig som et gjæringsprodukt fra *Streptomyces avermitilis*, mens IVM er en semisyntetisk avledning av avermectin. IVM dannes ved en regiospesifikk hydrogenering av avermectin B1 ved 22,23 dobbeltbindingen, som gir 22,23-dihydroavermectin B1 (36). Den kjemiske strukturen til IVM består av en ringstruktur med 16 ledd (4).

Det har blitt gjennomført studier som kan vise at IVM bremser veksten til ulike typer kreft (4). Konseptet legemiddelreposisjonering innebærer å finne nye bruksområder for legemidler som allerede eksisterer og er godkjente for klinisk bruk. Ved å anvende denne tilnærmingen med IVM som en ny type kreftbehandling spares både tid, penger og ressurser sammenlignet med å starte helt fra begynnelsen (4). IVM har vist potensialet til å hemme celleveksten hos ulike krefttyper, inkludert brystkreft, magekreft, gynekologisk kreft og respiratorisk kreft (4). Forskning har vist at behandling med IVM både *in vitro* og *in vivo* på LUAD fører til en reduksjon i cellevekst og induksjon av apoptose og autofagi (30). Den godkjente dosen av IVM er rundt 200 µg/kg og opptil 400 µg/kg for mennesker, hester og griser (29, 33, 34). Det har blitt gjort forskning hvor dosering opp til 800 µg/kg ikke har vist signifikant forskjell i uønskede hendelser eller bivirkninger sammenlignet med den godkjente dosen (29, 34). Friske mennesker kan tolerere doser opptil 2 mg/kg med IVM, uten at det er giftig for normale celler (4, 29). Dosen på 2 mg/kg i mennesker vil tilsvare en *in vitro* konsentrasjon på 5 µM når det testes på humane celler. I en studie ble det observert at denne konsentrasjonen av IVM førte til redusert

cellelevedyktighet og hemming av cellenes evne til å danne kolonier (35). I dette bachelorprosjektet ble det brukt en konsentrasjon på 5 μ M med IVM på A549 celler basert på én studie sin utregning (35). Det er strengt regulert å studere effekter av legemiddel, og derfor er det vanlig å velge å studere effekten på *in vitro* studier først. Hvis det er synlige effekter på cellenivå, kan dette bidra til videre forskning på legemiddelet (4). Det er et naturlig valg å studere effekten av IVM på A549 celler. Årsaken er at denne cellelinjen illustrerer type II alveolære epitelceller, og har blitt brukt til en omfattende mengde forskningsstudier (18).

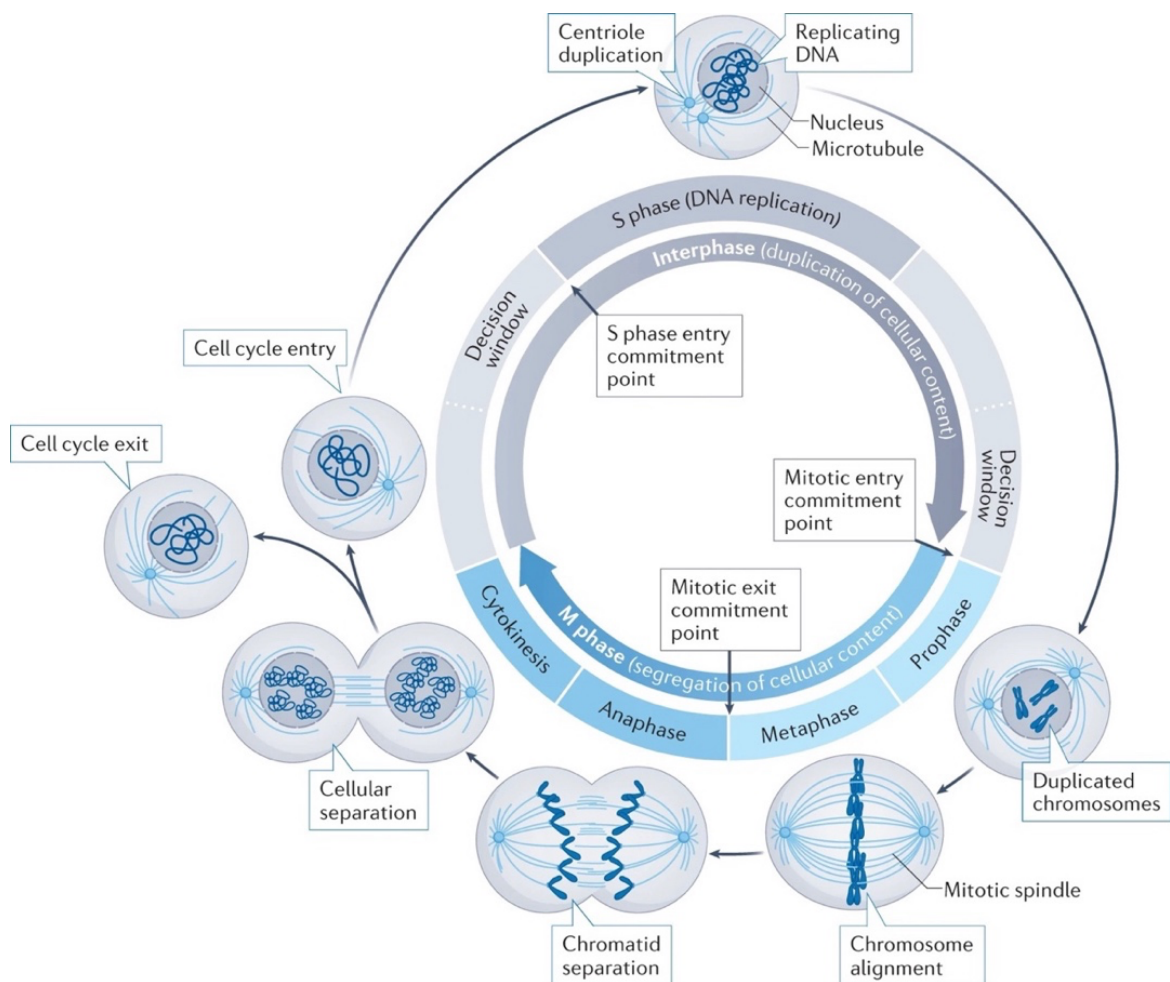
2.3 A549 celler

A549 cellelinjen er hypotriploid alveolære basale epitelceller ekstrahert fra en tumordannelse av alveole type-II (ATII) fra lungevevet (38, 39). Denne celletypen utvikler seg hyppigst til lungekreft, og er derfor godt egnet innen forskning som er rettet mot lungekarsinom (3, 39). ATII er ansvarlige for produksjon av surfaktant til overflaten av alveolene, samt diffusjon og transport av vann og elektrolytter til overflaten av epitellaget til alveolene i lungene (18, 40). ATII celler utgjør 60 % av alveolære epitelceller og opp mot 15 % av cellene i lungene (41). Cellelinjen er basert på adenokarsinom fra lungevevet og klassifiseres som ikke-småcellet lungekreft. Krefttypen er mindre aggressiv og spres saktere enn småcellet lungekreft. I 1972 utviklet D.J. Giard *et al.* cellelinjen ut ifra ATII celler fra en lungesvulst for å etablere en kontinuerlig cellelinje (18, 40). Ved å isolere en ønsket celle dannes en cellelinje som kan dyrkes og anvendes *in vitro* (9). Formålet med A549 cellelinjen var å ha en representativ cellelinje for forskning på lungekreft. A549 cellelinjen brukes i dag til forskning på lungekarsinom og som modell for ATII (39).

2.4 Cellesyklus og kontrollsystem

For å forstå apoptosemarkører er det essensielt å ha kunnskap om cellesyklusen og dens kontrollsystemer. A549 celler gjennomgår en cellesyklus før de deler seg, og denne prosessen fører til økt cellevekst. I den eukaryote cellesyklusen fordobler en celle sitt cellulære innhold og gjennom celledeling dannes det to identiske celler. Hovedfasene i cellesyklusen er interfase og M-fasen. M-fasen, også kjent som mitosefasen består av profase, metafase, anafase og telofase. I løpet av interfase i S-fasen (syntesefase) initieres DNA-replikasjonen, men den fullføres senere. I M-fasen separeres replikert DNA, og deler celleinnholdet i to identiske datterceller. G1 og G2 er “Gap-faser” som separerer S-fasen og M-fasen. Fasene spiller en

avgjørende rolle i regulering av cellyklusen og under “gap-fasene” er det kontrollpunkt, som avgjør om cellene skal gå videre til neste del av cellyklusen. Før S-fasen, i løpet av G1-fasen er det et kontrollpunkt hvor cellen enten må starte DNA-replikasjon, forbli i G1 eller gå inn i G0. I G0 forlater cellen cellyklusen og går over i en ikke-proliferativ tilstand der cellen ikke deler seg aktivt. Hvis forholdene er optimale, kan cellene forplikte seg til en mitotisk inngang under G2-fasen. Det er opphopningen av cyklinavhengig kinase (CDK)-aktivitet i løpet av interfase og M-fasen som styrer cellyklusprogresjonen. Akkumulering av ulike typer CDK fører til inngang i cellyklusen og hindrer utgang. Tap av aktivitet vil resultere i tilbakegang i cellyklusen. Cellyklusen skjer i en bestemt rekkefølge og retning som følge av den gjensidige avhengigheten av CDK-aktivitet.

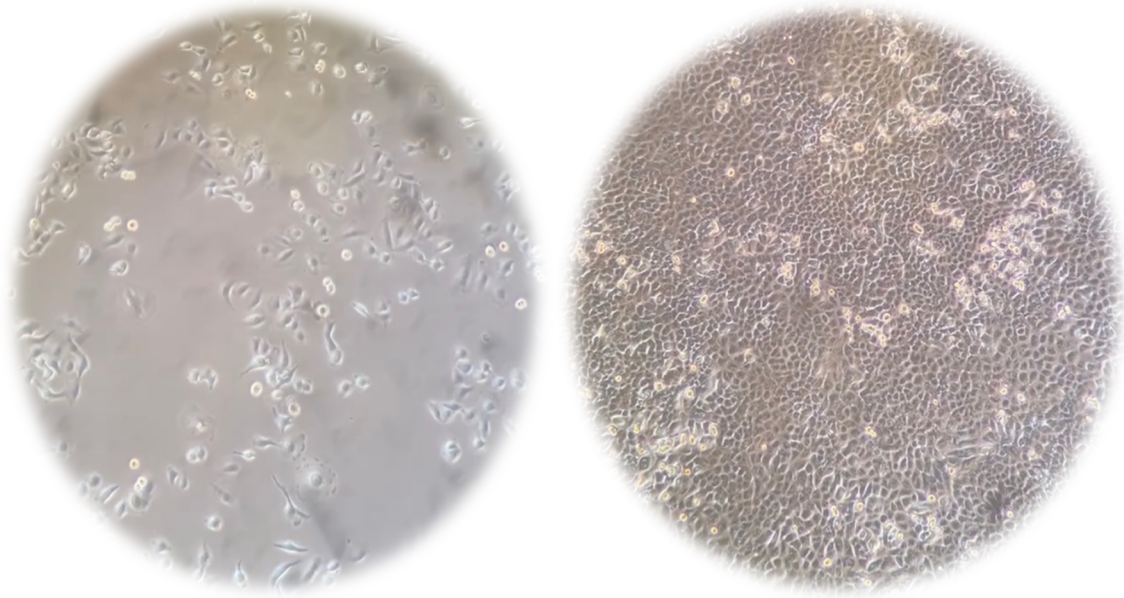


Figur 2: Illustrerer cellyklusen og gir en kort beskrivelse av hva som skjer i de ulike fasene. Figuren illustrerer hvordan hovedfasene er S-fasen (syntesefase) og M-fasen (mitosefase). Mellom S- og M-fasen er det gap-faser. I gap-fasene er det kontrollpunkt som kontrollerer om cellene skal fortsette med neste fase i cellyklusen. I S-fasen initieres DNA-replikasjon. I løpet av cytokinesen i M-fasen skjer det segregering av det cellulære innholdet i cellen. Dette skjer for å fullføre en cellyklus, og etter det kan cellen gå ut av cellyklusen eller gå inn i en ny runde med celledeling (42).

I både flercellede og unicellulære eukaryoter kontrolleres cellesyklusen av et komplisert nettverk med regulatoriske mekanismer. Målet er å produsere to identiske celler. Mekanismene overvåker systemet for å hindre feil, før cellen går inn i cellesyklusen. Det er flere kontrollpunkt som kontrollerer prosessen nøye. Kontrollpunktene kan føre til cellesyklusarrest ved oppdagelse av genetiske feil, eller indusere apoptose ved uopprettelig DNA-skade. Ved kontrollpunktet før M-fasen kontrolleres det for DNA-skade. Nivået av replikasjonsstress ved DNA-replikasjon kontrolleres ved kontrollpunktet før S-fasen. Hvis det oppdages stress, vil kontrollpunktet aktiveres og hindre replikasjonsprosessen fra å fortsette. Tidligere ble kreftceller beskrevet som celler som gjennomgår ukontrollert celledeling, men ny forskning kan indikere at cellene er kompromittert i evnen til å forlate cellesyklusen. Dette skiller dem fra normale celler. Et kontrollpunkt som ofte er kompromittert, er DNA-skadepunktet. Da kan kreftcellene fortsette med kontinuerlig celledeling, selv om det foregår en akkumulering av genetiske feil. Muterte gener er sjelden involvert i kontrollpunktet for replikasjonsstress, grunnet at flere kreftformer er avhengige av kontrollpunktfunksjonen for å tåle replikasjonsstress (40, 41).

2.5 Celledyrking og cellevekst hos A549 celler

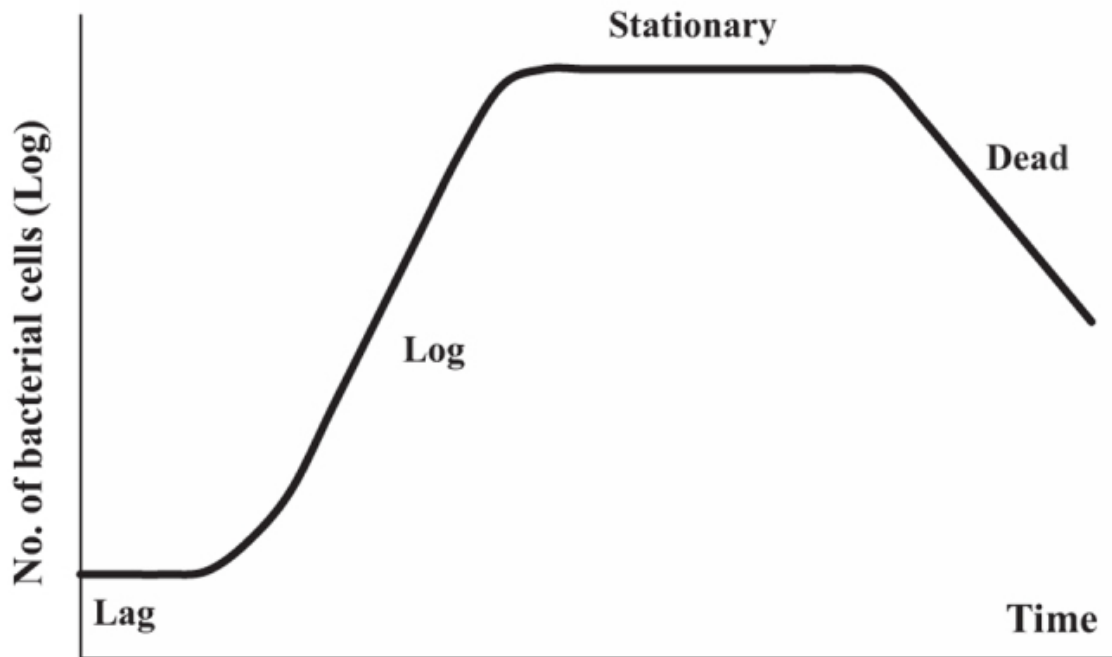
Til dette *in vitro* studie ble A549 cellelinjen valgt ettersom formålet var å studere effekten av IVM på lungekreft. Cellelinjen er spesielt egnet fordi, den stammer fra en pasient som hadde ikke-småcellet lungekarsinom. Når cellene kultiveres, vil A549 cellene adherere til bunnen av celledyrkningsflasken og danne et monolag. Mengden celler til stede beskrives med konfluens, som angir prosentandelen av overflaten som er dekket av celler (9, 43).



Figur 3: Bildet til venstre viser en celledyrkingsflaske med lav konfluens ettersom cellene ligger spredt og dekker en mindre prosentandel av flaskebunnen. Celletettheten er relativt lav i bildet til venstre. Bildet til høyre viser en celledyrkingsflaske med høy konfluens. Her er celletettheten betydelig høyere enn bildet til venstre. Cellene vokser tett og dekker omtrent hele bunnen av celledyrkingsflasken.

Forutsetningen for å dyrke celler *in vitro* er at cellene er omgitt av de rette vekstbetingelsene. Dette inkluderer et vekstmedium som inneholder nødvendige næringsstoffer og vekstfaktorer som glukose, aminosyrer, vitaminer og hormoner. Vekstmedium inneholder uorganiske salter som fungerer som en buffer. Fetal Bovine Serum (FBS) tilsettes til vekstmedium for å bidra med hormoner, vekstfaktorer og protease inhibitorer som beskytter mot virus. I noen tilfeller tilsettes antibiotika for å unngå bakteriell kontaminasjon (44). Det er viktig at cellene dyrkes ved optimal pH og temperatur. Cellene dyrkes i celledyrkingsflasker plassert i CO₂ inkubator med temperatur på 37 °C. CO₂ konsentrasjonen er ved 5 % for å gi en fysiologisk pH på omtrent 7.2. Formålet er å etterligne de fysiologiske forholdene de humane cellene ville vokst i ved naturlig tilstand (44, 45). Under utvikling av nye medikamenter er studier av effekten til legemiddelet avgjørende for å forstå deres virkning på kroppens vev og celler. Det kan være en fornuftig tilnærming å bruke *in vitro* celleforsøk til å forstå hvordan medikamentet påvirker cellevekst og fremmer apoptose. *In vitro* studier legger til rette for mer kontroll med tanke på faktorer som temperatur, pH og tilgang på næringsstoffer. Det er mulig å nøyaktig måle effekten av legemiddelet ved å måle proliferasjon, celledeling og apoptose (46, 47). Det tillater en raskere og billigere utvikling av medikamenter på en etisk måte før videre testing *in vivo*, som gjennomføres i levende organismer (19). Dyrking av cellekultur går gjennom tre vekstfaser. Celleveksten starter i lag-fasen. I den innledende fasen deler ikke cellene seg, men tilpasser seg

de nye forholdene og etablerer seg i det nye miljøet. Cellenes cytoskjeletter endres slik at cellene kan adherere til celledyrkingsflasken (45). Lagfasen varer normalt mellom 1-2 dager. Videre går cellene over i log-fasen, her er veksten eksponentiell. Ved celledeling på laboratoriet benyttes eksponentiell vekst for å sikre kontinuerlig vekst. Under stressanalyse på laboratoriet er det ønskelig at cellene er i eksponentiell vekstfase med en konfluens på 60-80 % (20). For A549 celler vil det ta omtrent 22 timer for cellene å dele seg (48).



Figur 4: En cellekultur går gjennom fire faser. Celleveksten starter i lag-fasen der cellene etablerer seg i nytt miljø. Videre går cellene over til log-fasen der det skjer eksponentiell cellevekst. Cellekulturen går inn i stasjonær fase når celleveksten til slutt flater ut på grunn av mangel på tilstrekkelige vekstbetingelser. Cellekulturen går så over i dødsfase, grunnet mangel på livsviktige næringsstoffer og vekstfaktorer. Y-aksen illustrerer logaritmisk tallverdi antall celler, mens x-aksen illustrerer tiden (49, 98).

Cellene vil dele seg så lenge vekstbetingelsene er optimale, og til slutt stagnerer og flate ut til den stasjonære fasen med et konstant celleantall. Cellene blir kontakthinhibert når dyrkingsarealet er fullt, og vokser ikke lenger i monolag (45). Celleveksten inhiberes av mangel på livsviktige næringsstoffer og vekstfaktorer, i tillegg til en økt opphoping av avfallsstoffer og andre ugunstige vekstbetingelser. Dette kan føre til at cellekulturen går over i dødsfase og deretter over i apoptose (49). Det er derfor passende å splitte cellene mens de er i eksponentiell fase med en konfluens på 70-80 % før veksten stopper opp ved stasjonær fase (49, 21).

2.6 Apoptose og apoptosemarkørene Bax og Bcl-2

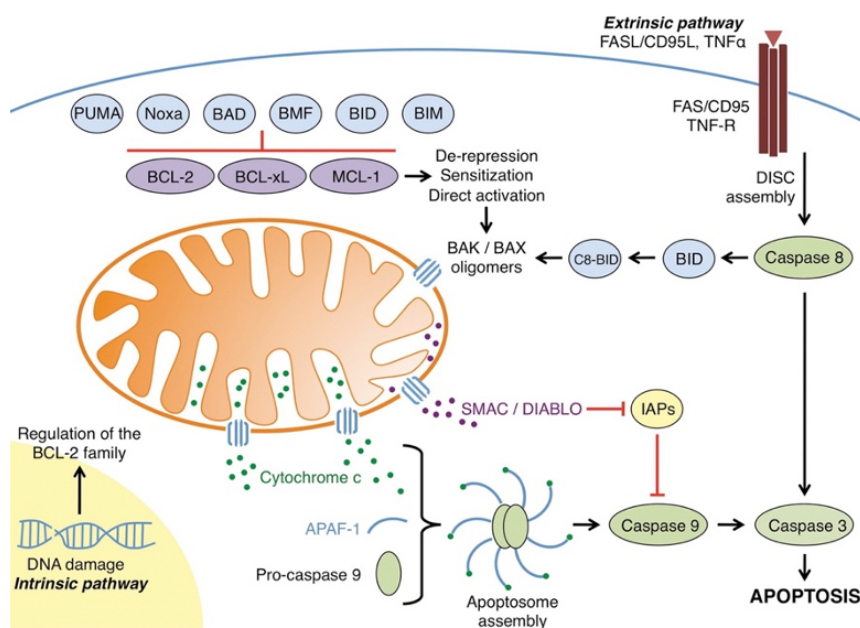
Apoptose, også kjent som programmert celledød, er en prosess som nøye regulerer fjerning av unødvendige, skadede eller potensielt skadelige celler fra organismen. Denne prosessen er avgjørende for overlevelse og utvikling av flercellede organismer (22). Apoptose bidrar til å opprettholde organismens helse ved å effektivt fjerne skadelige celler, enten de er muterte eller infiserte av patogener, samt overflødige celler. Dette forhindrer potensielt farlige tilstander som karsinogenese (22). Selve apoptosen kjennetegnes av en kaskade av selvdestruksjon i cellen, som kan aktiveres via to distinkte veier. Den intrinsiske (mitokondrielle) veien utløses av cellulære stressfaktorer, noe som endrer balansen mellom anti-apoptotiske medlemmer av Bcl-2 familien og pro-apoptotiske BH3-only proteiner (4). Den alternative veien er den ekstrinsiske veien, som aktiveres når spesifikke reseptorer (som FAS og TNFR1) på celleoverflaten bindes av ligandene FASL og TNF. Denne bindingen utløser en signalkaskade som til slutt fører til aktivering av caspase-8, som videre vil initiere effektor caspaser og celledød (4, 22). Regulering av apoptose er avgjørende for å opprettholde normal cellulær homeostase og funksjon. De fleste celler inneholder pro- og anti-apoptotiske familieproteiner som reguleres av en mangfoldig gruppe BH-3 only proteiner. Disse BH-3 only proteinene aktiveres som respons på ulike former for cellulært stress og initierer deretter aktiveringen til Bax, som vil starte en kaskade (50, 51). Balansen mellom disse proteinene er avgjørende for cellen, enten ved å fremme overlevelse eller fremme apoptose (22). Når en celle blir utsatt for stress, endres forholdet mellom anti-apoptotiske proteiner og pro-apoptotiske proteiner (22). I friske celler er Bax inaktivert, når cellen blir utsatt for stress vil Bax aktiveres (52). Under normale forhold er det meste av Bax i cytosol, mens en mindre del befinner seg i mitokondriene (22). Når Bax er aktivert kan det danne komplekser og lage «porer» i den mitokondrielle membranen, noe som fører til frigjøring av cyto c og andre proteiner som igjen vil aktivere caspaser i cytosol (51, 53). Bax inneholder flere BH domener (BH1, BH2 og BH3) og må interagere med en gruppe proteiner kalt BH-3-only for å fullføre apoptose. Permeabiliteten til den ytre mitokondriemembranen er svært sentral i apoptose og kontrolleres av Bcl-2 familien (52, 54). Når en celle blir utsatt for stress, aktiveres Bax og endrer form og posisjon (52). Dette fører til porering av mitokondriemembranen, som starter apoptose via en kaskadereaksjon i cytosol (52, 54). Det er fortsatt noe usikkerhet rundt hvilken mekanisme Bax bruker for å porere mitokondriemembranen (52). Når en celle blir stresset, vil BH3-only proteiner sende signaler videre og starte apoptoseprosessen (55). Bcl-2 er et anti-apoptotisk protein, som spiller en avgjørende rolle i regulering av apoptose ved å forhindre celledød (56, 58). Disse proteinene inneholder BH-domenet BH4, som ligger på den

N-terminale delen av Bcl-2 proteinet, som gjør at den kan feste seg til cellemembranen (56, 58) (51). Bcl-2 kan hemme apoptose ved å danne en heterodimer med det pro-apoptotiske proteinet Bax. Normalt bidrar Bax til dannelse av porer i mitokondriemembranen. Imidlertid blir denne funksjonen hemmet når Bcl-2 og Bax danner en heterodimer, noe som stopper frigjøringen av kalsiumioner (51, 56). Hvis det oppstår en endring i BH4 domenet til Bcl-2, kan det føre til tap av evnen til å danne heterodimere med Bax (56, 58). Dette resulterer i at Bcl-2 mister sin anti-apoptotiske funksjon og det kan dannes en pro-apoptotisk mutant (56). ROS er reaktive molekyler med kort levetid som dannes naturlig i cellen. Ved lave til moderate doser anses ROS som viktig for regulering av funksjoner som cellesyklusprogresjon, celleproliferasjon, differensiering, migrasjon og celledød. Imidlertid kan for høye konsentrasjoner av ROS føre til skade på nukleinsyrer, lipider, proteiner, membraner og organeller, og dette kan igjen føre til aktivering av apoptose (22).

2.6.1 Kreftceller og apoptose

Kreftceller unngår ofte apoptose ved å oppregulere Bcl-2. Samtidig vil mer resistente kreftformer nedregulere pro-apoptotiske proteiner i tillegg til å oppregulere Bcl-2, noe som bidrar til å undertrykke apoptose (58). Kreftceller har et høyere nivå av reaktive oksygenarter (ROS) som kan forårsake skade på proteiner, nukleinsyrer, lipider, membraner og organeller som mitokondrier. Dette skyldes en ubalansert tilstand i cellens redokssystem (22, 59). Siden kreftceller allerede har høye ROS-nivåer, er de mer følsomme for stoffer som øker ROS og oksidativt stress (59). Kreftceller er kjent for å deregulere apoptose for å sikre sin egen overlevelse og vekst og kan dermed bli resistente mot ulike behandlinger. Forskere prøver å finne medisiner som kan gå målrettet på Bax for å indusere apoptose i kreftceller (58, 60). Mitokondrier er viktige organeller som finnes i celler, de spiller en avgjørende rolle både i regulering av apoptose og energiproduksjon i form av ATP. De har en spesiell membran som består av en ytre membran (OMM) og en indre membran (IMM) (22, 54). Den ytre membranen muliggjør utveksling av stoffer involvert i respirasjonskjeden, som er en viktig del av ATP produksjonen, og tillater permeabilitet for molekyler opp til 5 kDa (22, 58). Den indre membranen er avgjørende for generering av elektrokjemisk potensial som er nødvendig for oksidativ fosforylering og ATP-produksjon. Under apoptose blir permeabiliteten til IMM regulert, og når cellen utsettes for stress-signaler som indikerer celledød, øker denne permeabiliteten (22, 58). Dette tillater små molekyler, mindre enn 1.5 kDa å passere fritt inn i den mitokondrielle matrixen. Som følge av dette kan oksidativ fosforylering forstyrres, noe som

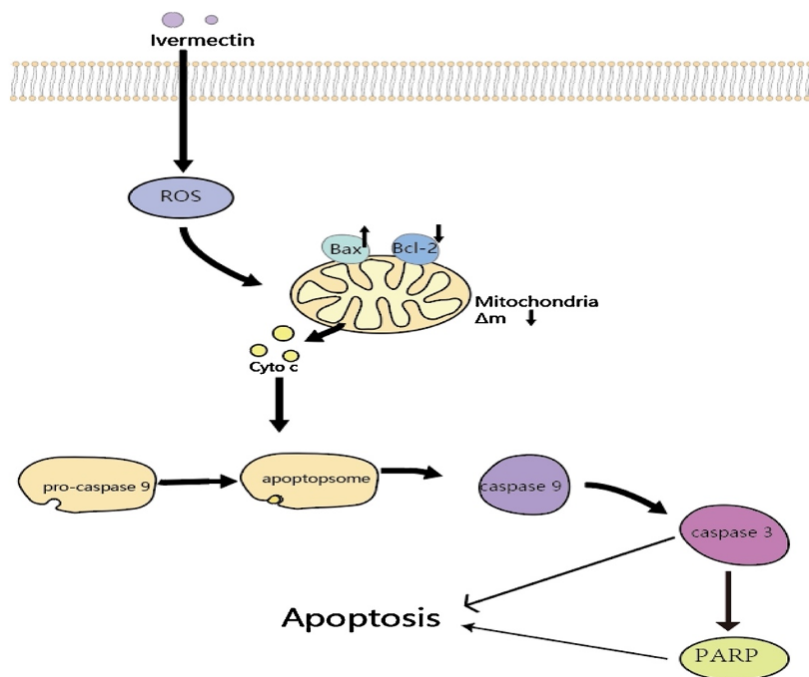
er viktig for energiproduksjonen. I figur 5 ser man den mitokondrielle veien (Intrinsic pathway) til apoptose. Den mitokondrielle veien for apoptose kan aktiveres ved hjelp av for eksempel ROS (22). ROS kan være med på å aktivere denne veien, som kan føre til oppregulering og aktivering av pro-apoptotiske BH3-only proteiner som BID, BAD, BFM, NOXA og PUMA (22, 58). Disse proteinene kan deretter binde seg til anti-apoptotiske medlemmer av Bcl-2 familien som Bcl-2, Bcl-xL og MCL-1 og bidra til å hemme deres aktivitet. BH3-only proteinene BID, BIM og PUMA kan også direkte aktivere de pro-apoptotiske proteinene Bax og Bak (55, 60). Når Bax og Bak er aktivert, vil de begynne å danne oligomerer som vil danne porer i den ytre mitokondrielle membranen, noe som fører til permeabilisering av den ytre mitokondrielle membranen (50, 55, 60). Permeabiliseringen av membranen vil resultere i frigjøring av pro-apoptotiske proteiner som cyto c, Smac/Diablo og AIF fra mitokondrie og ut til cytosol (22, 56). I cytosol vil cyto c sammen med APAF-1 og pro-caspase 9 danne et apoptosom (22, 56). Dette vil igjen føre til aktivering av caspase 9, som videre vil aktivere effektor caspaser 3,6 og 7. Når disse caspaseenzymene er aktivert, vil det føre til spalting av cellulære proteiner og til slutt ende i celledød ved apoptose (22, 56, 61).



Figur 5: Denne figuren illustrerer hvordan apoptose er regulert av Bcl-2 proteinfamilien og kan initieres mellom to hovedveier: den intrinsiske og den ekstrinsiske. Den intrinsiske veien aktiveres av celledress som igjen aktiverer pro-apoptotiske proteiner som BID, Bad og PUMA. Disse vil hemme anti-apoptotiske Bcl-2 proteiner og aktivere Bax og Bak, dette skaper da porer i mitokondriens membran og starter en kaskade som fører til apoptose. Den ekstrinsiske veien utløses av signaler utenfra cellen som aktiverer «døds»-reseptorer. Dette vil igjen fører til et signalkompleks som aktiverer caspase 3 og 8, dette vil føre til apoptose (60).

2.7 Ivermectin og kreft

IVM har vist seg å ha en kraftig anti-tumor effektor, som inkluderer hemming av metastaser, celleproliferasjon og angiogeneseaktivitet i en rekke kreftceller (4). Det er dokumentert at IVM har en antikreft aktivitet mot ulike typer kreft som brystkreft, kronisk myelogen leukemi og glioblastom (61). Hovedsakelig induserer IVM apoptose som den primære formen for celledød (4). I HeLa celler har det ifølge Mingyan Tang *et al.* blitt vist en nedgang i mitokondrielt membranpotensial og frigjøring av cyto c fra mitokondrier til cytoplasma etter bruk av IVM (4,61). Dette tyder på at IVM induserer apoptose gjennom den mitokondrielle veien ved å først inhibere proliferasjonen av HeLa celler via cellesyklusarrest (4, 61). Det er flere studier som har vist at IVM øker produksjonen av ROS og redusere membranpotensialet til mitokondrier, som vist i figur 6 (4, 61). Det er også påvist at økende konsentrasjon av IVM kan øke uttrykket av det pro-apoptotiske proteinet Bax og redusere uttrykket av det anti-apoptotiske proteinet Bcl-2 (63). Videre vil cyto c øke i cytoplasma ved eksponering av IVM (61). Et apoptosom vil dannes i cytoplasma etter frigjøring av cyto c, se figur 6 (4). Pro-caspase 9 vil ved hjelp av apoptosomet aktiveres til caspase 9 som vil sette i gang en kaskade og aktiverer caspase 3 (4). PARP brytes ned av caspase 3, noe som vil føre til apoptose av cellen (4, 61). IVM spiller en viktig rolle når det gjelder apoptose i kreftceller og utfører mange regulatoriske mekanismer, som regulering av apoptoserelaterte proteiner, frigjøring av cyto c, aktivering av caspase kaskader og generering av ROS (4, 61). Disse funnene antyder at IVM kan ha potensial som kreftmedisin mot flere typer kreft.



Figur 6: Figuren viser hvordan IVM påvirker apoptose i kreftceller ved å fremme produksjonen av ROS. Denne økningen svekker mitokondrienes membranpotensial og påvirker balansen mellom pro- og anti-apoptotiske proteiner ved å fremme Bax og inhibere Bcl-2. Dette resulterer i frigjøring av cyto c og aktiveringen av caspase-9 og 3 som fører til en kaskadereaksjon som ender i apoptose (4).

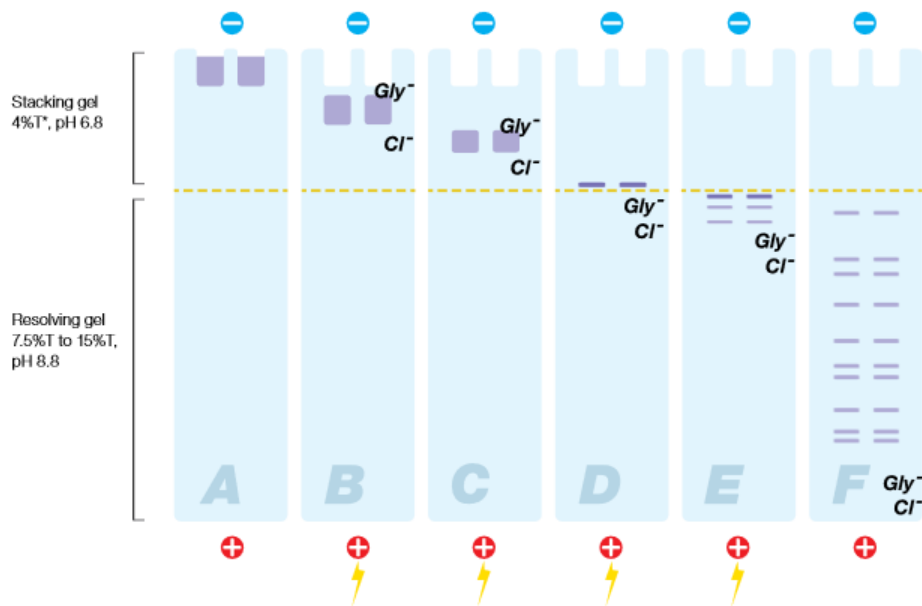
2.8 Proteomikk

Proteomikk er studiet av proteom og proteiner som befinner seg i en organisme. Området omfatter studier av struktur, funksjon, komposisjon og interaksjoner av proteiner for å bedre forstå hvordan en organisme fungerer (64). Det finnes mange ulike metoder for separering og analyse av proteiner, blant annet 1-dimensjonal og 2-dimensjonal gel elektroforese (1-DE/2-DE) (64), ELISA, kromatografi, western blotting og massespektrometri (65). Hensikten med separasjonsteknikkene er å skille ut proteinene fra andre molekyler i cellen, og i flere tilfeller separere de ulike proteinene som befinner seg i cellen fra hverandre. Analysemetodene innenfor proteomikk vil så kunne benyttes til å analysere proteinene. Ved å se på mengde, tilstedeværelse eller fravær av enkelte proteiner, som for eksempel apoptosemarkørene Bax og Bcl-2, vil det være mulig å studere cellenes cellevekst gjennom analyse av proteiner. Gel elektroforese er en gruppe teknikker for separering av nukleinsyrer eller proteiner. Ved bruk av et elektrisk felt vil disse ladde molekylerne vandre gjennom gelen og separere seg basert på en rekke ulike faktorer. Disse faktorene inkluderer; styrken på det elektriske feltet, egenskapene til gelen benyttet (66) samt størrelse, form og ladning av molekylet (32). Innenfor proteomikk er dette den mest

utbredte metoden for å separere og isolere proteiner (64), og det finnes flere ulike typer proteinelektroforese avhengig av hva som skal studeres.

2.8.1 SDS-PAGE

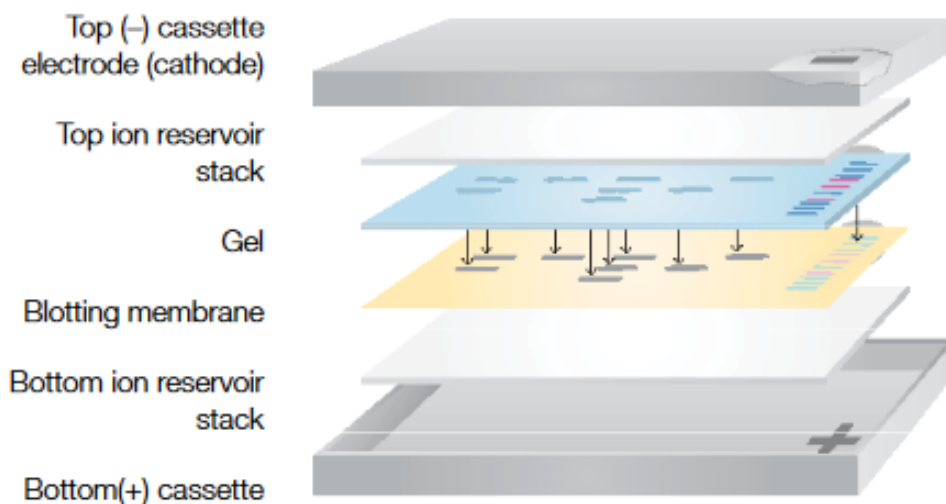
Natrium dodecyl sulfat polyakrylamidgel elektroforese, SDS-PAGE, er en 1-dimensjonal gel elektroforese metode (64), og det er den mest anvendte metoden for proteinelektroforese (67). Den benytter seg av Laemmli systemet, som består av en ikke-kontinuerlig polyakrylamidgel, en sample buffer og en running buffer for å separere proteiner. Denne metoden gjør det mulig å separere kun basert på massen til proteinene, ved å fjerne både konformasjonen til proteinet og gi alle proteinene samme negative ladning. Polyakrylamidgelen består av to deler, en øvre stablingsgel og en nedre separeringsgel. Den øvre delen har en lavere mengde akrylamid på 4 % og en pH på 6.8, i forhold til separeringsgelen som kan ha 7-15 % akrylamid samt pH på 8.8. Gelkonformasjonen fører til at proteinene separeres samtidig, og gir bedre oppløsning på proteinbåndene. Når det påføres spenning til systemet dannes to ionefronter; glysinat og klorin. Klorin er den ledende ionefronten i gelen, og vil bevege seg raskere enn proteinene, mens glysinat er den etterfølgende ionefronten som kommer fra running bufferen (68). Mellom disse to frontene vil det dannes en gradient (68), som samler proteinene mens de beveger seg til separeringsgelen, og fører til at alle proteinene når separeringsgelen samtidig. Separeringsgelen har større motstand, som gjør det lettere å få en tydelig separasjon av proteinene. Proteinene vil også kun bli separert basert på molekylvekt, ettersom forholdet mellom masse og ladning er identisk i alle proteinene, på grunn av SDS. SDS er en detergent til stede i både sample bufferen og running bufferen, som binder seg til proteinene i prøven. Denne bindingen er ikke-kovalent og konstant, 1.4g SDS per 1g protein (67). Siden SDS er negativt ladd og binder seg til proteiner med et konstant forhold, endrer det ladningen til proteinene og fører til lik negativ ladning. I tillegg til å fjerne ladning, fører SDS til denaturering av proteiner. For å separere proteiner basert på molekylvekt må både ladning og konformasjonen til proteinet elimineres. Det er tre faktorer som sammen fullstendig fjerner strukturen til proteinet; varme, detergent (SDS) og et reduksjonsmiddel (DDT) (68). Reduksjonsmiddelet blir ofte tilført bufferen som inneholder SDS før dette blandes med prøven og varmes opp.



Figur 7: Figur som illustrerer separasjonen av proteiner i SDS-PAGE. A. Ferdig preparert og denaturert prøve tilsettes brønnen på toppen av gelen. B. Spenning påføres systemet og prøven beveger seg nedover i gelen med klorid ionefront foran og glysin ionefront bak. C. Ionefrontene danner en spenningsgradient over hverandre, som er med på å samle proteinene i tynne bånd (67). D. Proteinene blir samlet mellom de to ulike delene av gelen, og vil sakte begynne å bevege seg inn i separeringsgelen med større motstand (67). E. Proteinene beveger seg gjennom porene i separeringsgelen, og de blir separert basert på molekylvekt alene, ettersom ladning og konformasjon er standardisert. F. Spenning skrur av, og proteinene er nå separert i tynne bånd basert på molekylvekt (67). Figuren er hentet fra Bio-Rad sine manualer (67).

2.8.2 Western Blot

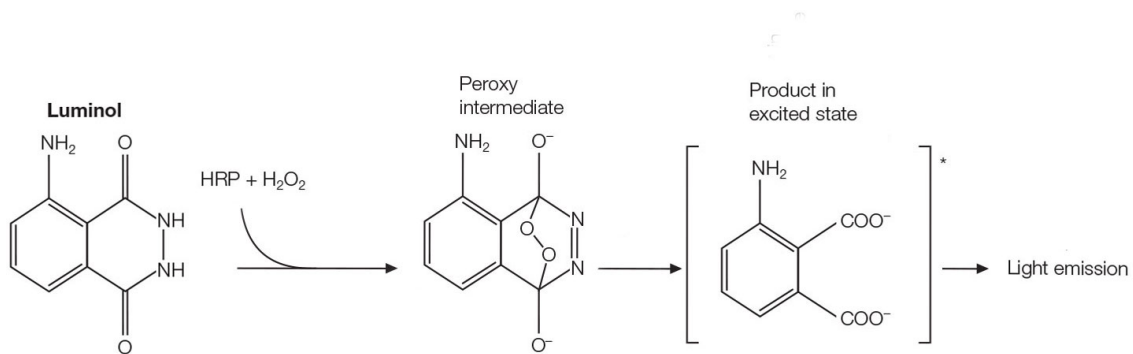
Western blotting, eller immunoblotting, er en analyseteknikk som omfatter overføring av en biologisk prøve, f.eks. proteiner, til en membran og videre deteksjon av materiale på denne membranen (66). Etter separering av proteiner gjennom SDS-PAGE er det nødvendig å overføre proteinene fra gelen, også kalt blotting, til en nitrocellulose (NC) eller polyvinylidendifluorid (PVDF) membran for videre analyse (66). Grunnen til dette er at gelen har lettere for å gå i stykker, og den videre immunanalysen er vanskelig å utføre på en gel med porer, ettersom antistoffene som benyttes for deteksjon ikke klarer å nå proteinene like lett. Prinsippet for overføring er lik elektroforese. En tilført spenning fører til vandring av negativt ladde proteiner fra katoden mot anoden, og over til en blotting membran. Proteinene fester seg til membranen på grunn av den høye affiniteten membranen har til å binde proteiner.



Figur 8: Figur som illustrerer overføringen av proteiner fra polyakrylamidgel til en blotting membran. Kassetten blir satt inn i et Turbo Blot overføringsssystem (68) med konformasjonen vist på figuren, og spenning blir tilført kassetten. De negativt ladde proteinene vandrer fra gelen, mot anoden, over på membranen med høy affinitet for å binde proteiner (88). Figuren er hentet fra Bio-Rad sine manualer (88).

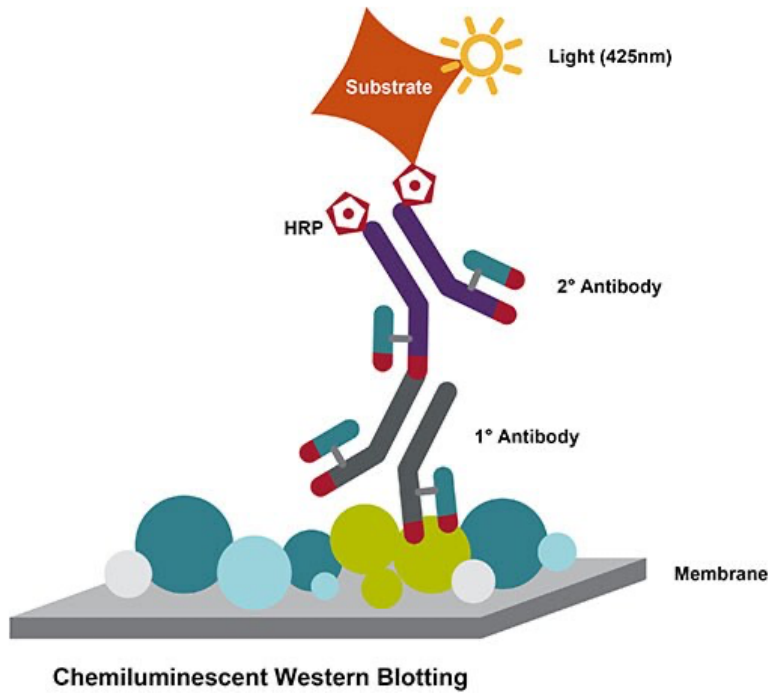
Etter overføring til membranen kan det utføres immunanalyse. Det finnes tre vanlige brukte metoder for deteksjon av proteiner under western blotting; kolorimetrisk, kjemiluminescens og fluorescens. Kolorimetri og kjemiluminescens fungerer ved enzymreaksjoner mellom enzym-konjugerte antistoff og fargesubstrat, mens fluorescens bruker fluorofor-konjugerte antistoff til å friggi lys som kan fanges opp av et kamera (69). I tillegg til ulike metoder for deteksjon, finnes det også en direkte og indirekte metode for immunodeteksjon. En direkte metode bruker et primært konjugert antistoff for deteksjon, mens en indirekte metode benytter seg av to antistoffer, primært og enzym-konjugert sekundært antistoff (70). Immunanalysen starter først ved å inkubere med en blokkebuffer rik på proteiner som danner ikke-spesifikke bindinger til membranen. Membranen har høy affinitet til å binde proteiner, og det er dermed viktig å dekke alle ledige bindings seter på membranen før man går videre i prosessen. Om blokkingen ikke binder seg til alle ledige seter, vil antistoffene i de neste trinn binde seg tilfeldig på membranen, og det vil ikke være mulig å analysere proteinene man ser etter. Etter blokkingen inkuberes membranen med primære antistoff som binder seg til proteinene som skal analyseres. Et primært antistoff er spesifikt og vil kun binde seg til det proteinet de er kompatible med. Videre vaskes rester bort fra det primære antistoffet som ikke har festet seg, for så å kjøre ny inkubering med sekundært antistoff. Ved kjemiluminescens benyttes det HRP-konjugerte sekundære antistoff, for å kunne produsere signal i det siste trinnet av analysen. Disse sekundære antistoffene vil kun binde seg til de primære antistoffene tilsatt tidligere. Til slutt inkuberes

membranen i et kjemiluminescenssubstrat, som reagerer med HRP enzymet bundet til de sekundære antistoffene. HRP oksiderer et av stoffene i substratet, luminol (71), som fører til en eksitert tilstand av luminol kalt 3-aminofalat (71). Denne tilstanden forfaller over tid og frigir energi i form av lys (71).



Figur 9: Figur som viser reaksjonen mellom HRP og substratet med luminol. HRP oksiderer luminol i nærvær av peroksid (95) (f.eks. hydrogen peroksid, H₂O₂) til en eksitert tilstand, 3-aminofalat, som frigir lys når den går tilbake til sin grunntilstand (95). Figuren er hentet fra Bio-Rad sine nettsider (37).

Ved analyse av proteiner med western blotting er det viktig å inkludere immunodeteksjon av en loading kontroll i form av et protein. Disse proteinene kalles ofte «housekeeping» proteiner, og prøvene i western blotting blir normalisert opp mot disse kontrollene for å sikre at prøvene har standardisert mengde proteiner. Vanlige «housekeeping» proteiner innenfor western blotting er GAPDH, β-aktin og β-tubulin (72). En av fordelene ved indirekte deteksjon er kostnad, ettersom enzym-konjugerte primære antistoff kan være dyre (70) i motsetning til sekundære. Andre fordeler er sterkere signal ettersom flere sekundære antistoff kan binde seg til ett primært antistoff (70), og de sekundære antistoffene kan også benyttes til flere primære antistoff så lenge antistoffene kommer fra samme art.



Figur 10: Figur som illustrerer metoden for indirekte kjemiluminescens western blotting. Membranen blir inkubert med en blokkebuffer/melkeprotein for å mette membranen. Deretter inkuberes membranen med primært antistoff som binder seg spesifikt til proteinet. Ikke festede primære antistoff vaskes bort, og så tilsettes HRP-konjugert sekundært antistoff som binder seg til det primære antistoffet. Sekundært antistoff vaskes bort og det tilsettes substrat. Substratet reagerer med HRP, luminol oksideres og det dannes lys. Figuren er hentet fra Termo Fisher sine nettsider (71).

3 Metode

Metoden er delt inn i tre deler som sammen beskriver de eksperimentelle prosedyrene som ble utført. Den første delen fokuserer på cellekultivering, inkludert tining av celler, vekst og splitting av A549 celler, samt deres eksponering for IVM. Alle prosedyrene som involverte celledyrking ble utført aseptisk (Vedlegg A.2.1). Den andre delen fokuserer på optimalisering av prosedyrene, herunder cellevekst, SDS-PAGE og Western Blot teknikker. Den siste delen presenterer den endelige prosedyren for hovedforsøket. Detaljerte beskrivelser av alle refererte prosedyrer er gitt i vedlegg A.2.

3.1 Tillaging av medium

Vekstmedium for A549 cellene ble fremstilt ved å blande 500 ml Ham's F-12K Nut Mix (1X) medium (*Gibco, a.nr. 21127-022*) med 50 ml (10%) Fetal Bovine Serum, Qulified, One Shot (*FBS, Gibco, a.nr. A3160802*) og 5 ml PenStrep (*Gibco, a.nr. 15140122*). Hele prosedyren for fremstilling av vekstmedium ble utført aseptisk i LAF-benk. Denne blandingen ble videre brukt som vekstmedium til A549 celler (*ATTC, a.nr. CCL-185*).

3.2 Tining av celler

En 25 cm² celleflaske ble tilsatt 7 ml Ham's F-12K medium og satt til forvarming i inkubator ved 37°C og 5 % CO₂. De frosne A549 cellene ble tilsatt 1 ml vekstmedium og overført til falconrør med 4 ml vekstmedium. Røret ble sentrifugert i 5 minutter, supernatant ble fjernet og cellepelletten ble resuspendert i 1 ml vekstmedium. Suspensjonen ble deretter overført til den forvarmede celleflasken etterfulgt av inkubering ved 37°C og 5 % CO₂. Tiningen ble utført etter prosedyren for tining av celler (Vedlegg A.2.2).

3.3 Splitting av celler

Etter at vekstmediumet var tilberedt og cellene hadde tint, ble kultiveringsprosessen igangsatt. Celleveksten ble kontinuerlig studert i et invert mikroskop og splittet når konfluensen nådde 80 %. Cellene ble splittet aseptisk i LAF-benk, etter prosedyren beskrevet i (Vedlegg A.2.3). Gammelt vekstmedium ble fjernet, og cellene ble vasket med HBSS (*Gibco, a.nr. 14025092*). Cellene ble løsnet fra underlaget ved å tilsette 0.5 ml 0.25 % trypsin (*Gibco, a.nr. 25200056*),

og trypsineringen ble overvåket i invert mikroskop. Trypsineringen ble stanset ved å tilsette 4 ml vekstmedium når 80 % av cellene hadde løsnet. Cellesuspensjonen ble deretter pipettert opp og ned før den ble overført til et 15 ml falconrør for sentrifugert i 3 minutter ved 1200 rpm. Supernatanten ble fjernet og cellepelletten resuspendert i 1 ml vekstmedium, ytterligere 1 ml vekstmedium ble tilsatt. To nye 25 cm² celleflasker ble tilsatt 6 ml vekstmedium, og deretter ble 1 ml av cellesuspensjonen overført til hver flaske. Celleflaskene ble inkubert ved 37°C og 5 % CO₂. Hver 24 time ble cellene undersøkt under invert mikroskop, og splittet når konfluensen var omtrent 80 %. Senere i forsøket ble cellene også splittet ved en konfluens på 55–60 %.

3.4 Tillaging av vekstmedium med Ivermectin

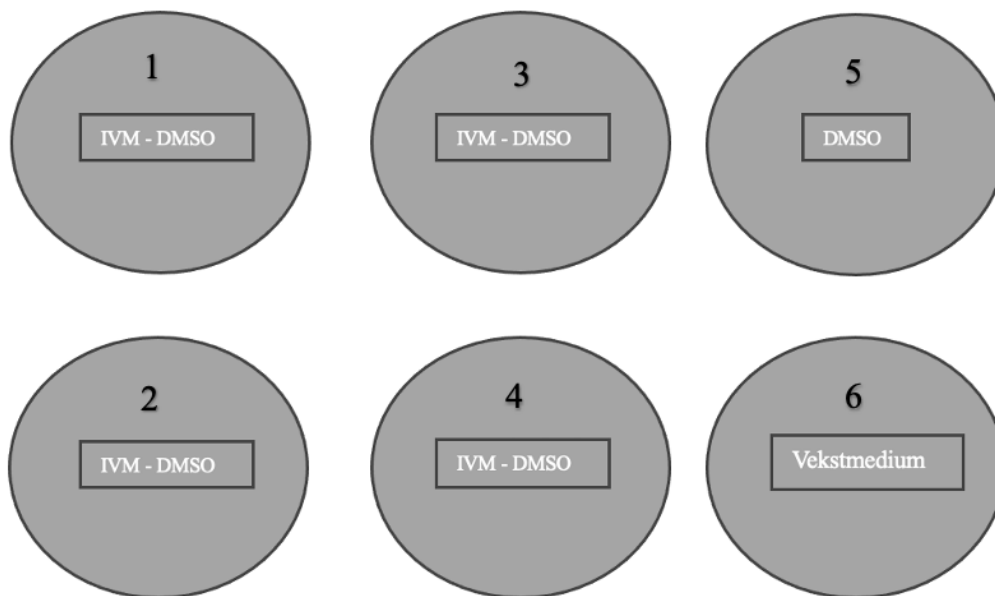
IVM-DMSO-løsningen ble fremstilt ved å veie inn 0.0437 g IVM (*Sigma-Aldrich, a.nr. 1003310507*) og fortynnet i 5 ml Dimethyl Sulfoxide, heretter referert til som DMSO (*PanReac Applichem, a.nr. A3672*). Dette tilsvarer en konsentrasjon på 10 mM. Løsningen ble deretter sterilfiltrert gjennom et 0,2 µm membranfilter. Stamløsningen ble oppbevart i kjøleskap og brukt til å tilberede ønsket konsentrasjon av IVM ved å blande med vekstmedium. For å oppnå den ønskede konsentrasjonen av IVM på 5 µM, ble fortynningsformelen $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ anvendt og omformet til $V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$. Det totale volumet som skulle tilberedes med 5 µM var 50 ml. Det ble dermed beregnet hvilken mengde det skulle være av stamløsningen. Det ønskede volumet av V_1 som var 25 µl, ble blandet sammen med 49,975 ml vekstmedium i et 50 ml falconrør. Dette ble blandet godt før videre bruk.

3.5 Overføring av celler til cellebrett

For å effektivisere Western Blot analysen ble det valgt å overføre cellene til cellebrett etter celleveksten var optimalisert i celleflaskene. Cellebrett med seks brønner ble benyttet, hvor hver brønn ble fylt med cellesuspensjon fra cellekultur. Prosedyren for splitting (Vedlegg A.2.3) ble fulgt frem til punktet hvor cellepelletten ble resuspendert i 1 ml vekstmedium. Deretter ble det tilført ytterligere 5 ml vekstmedium til cellesuspensjonen. Hver brønn ble fylt med 6 ml vekstmedium og 1 ml cellesuspensjon. Cellebrettet ble inkubert ved 37°C og 5 % CO₂ i 24 timer for at cellene skulle feste seg.

3.6 Dyrking av celler med Ivermectin vekstmedium

For å studere virkningen av IVM på A549 celler, ble de dyrket som beskrevet i cellebrett. Etter at cellene hadde fått 24 timer til å feste seg til cellebrettet, ble IVM tilsatt. Cellebrettene hadde seks brønner. Brønn 1-4 ble behandlet med 5 μM IVM løst opp i DMSO, og fortynnet i vekstmedium. Dette blir videre omtalt som IVM. Brønn 5 og 6 ble brukt som kontroller; brønn 5 ble behandlet med DMSO i vekstmedium og blir videre omtalt som DMSO. Brønn 6 ble kun behandlet med vekstmedium og vil videre omtales som vekstmedium i sammenheng med cellebrett. Det har blitt tatt utgangspunkt i konsentrasjon og tidsintervall fra to andre bachelorstudier (73, 74). Studiene indikerte at den optimale konsentrasjonen var 5 μM IVM, og den beste effekten ble oppnådd etter 72-timers eksponering. Derfor ble virkningen av IVM undersøkt ved både 72-timer og 24-timers eksponering for å kunne sammenligne celleveksten. Før tilsetning av IVM ble gammelt vekstmedium fjernet, og hver brønn ble vasket med 2 x 3 ml HBSS. Deretter ble 7 ml av den ønskede løsning, tilsatt hver brønn som vist i figur 11. Cellebrettene ble deretter inkubert ved 37°C og 5 % CO₂ i enten 24 timer eller 72 timer. Totalt ble det brukt fire cellebrett for hver eksponeringstid.



Figur 11: Figuren viser en oversikt over innholdet i de seks ulike brønnene. Fire brønner ble behandlet med vekstmedium som inneholdt en konsentrasjon på 5 μM IVM løst opp i DMSO. To av brønnene ble brukt som kontroller, en med DMSO i vekstmedium og den andre med rent vekstmedium.

3.7 Optimalisering av metode

Optimalisering av metode var avgjørende for å sikre konsistente og pålitelige resultater i forsøket. Ettersom eksisterende prosedyrer ikke passet direkte for A549 celler, måtte tilpassinger og kombinasjoner av ulike metoder utføres for å finne den mest hensiktsmessige tilnærmingen. Både innen SDS-PAGE og Western Blot ble det gjennomført en grundig gjennomgang av flere prosedyrer for å utvikle en tilpasset metode som kunne fungere for denne studien.

3.7.1 Optimalisering av cellevekst

Optimalisering av cellevekst ble gjennomført ved å utføre flere celledelinger (Vedlegg A.2.3) for å sikre tilstrekkelig vekst før eksponering med IVM. Opprinnelig var planen å bruke 25 cm² celleflasker som senere skulle overføres til cellebrett. Celleveksten varierte gjennom forsøket, og delingen ble derfor utført med ulike forhold, som 1:2 eller 1:3, avhengig av tiden frem til neste celledeling. For å øke celleveksten ble større celleflasker på 75 cm² benyttet, og når konfluensen var tilstrekkelig høy ble cellene overført til cellebrett.

3.7.2 Optimalisering av SDS-PAGE

Optimalisering av SDS-PAGE var avgjørende for å sikre effektiv utvinning og analyse av proteiner fra A549 celler. Dette inkluderte evaluering av celledelings effektivitet og elektroforeseprosessen for å sikre nøyaktig separasjon av proteiner. Ettersom den opprinnelige SDS-PAGE prosedyren (Vedlegg A.2.7) var utviklet for fiskeceller, ble det nødvendig med noen tilpassinger for å tilpasse den A549 celler.

3.7.2.1 Første testforsøk

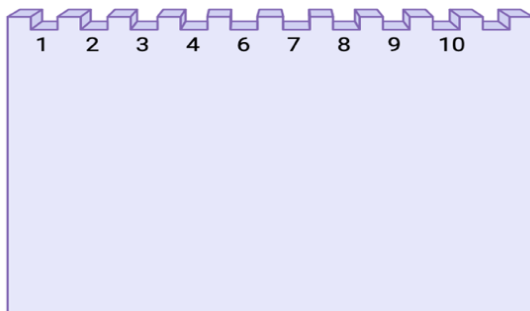
Det første testforsøket ble utført ved å inkubere A549 cellene med 5 µM IVM i 72 timer, etterfulgt av celledeling i henhold til prosedyren fra Thermo Fisher (Vedlegg A.2.4). Først ble konfluensen vurdert ved hjelp av et invert mikroskop. For å kvantifisere antall celler i hver brønn ble cellene fra brønn 6 med vekstmedium trypsinert med 0.5 ml trypsin i 1 minutt, etterfulgt av celledeling og telling i Bürker tellekammer. Deretter ble cellebrettet plassert på is, det gamle vekstmediumet ble aspirert bort, og cellene ble vasket to ganger med 3 ml kald 1x PBS (*Bio-Rad, a.nr. 1610780*). Celledelingen ble utført for å bestemme mengden RIPA-buffer (*Thermo ScientificTM, a.nr. 89900*) som skulle tilsettes i hver brønn. På grunn av utfordringer

med celletellingen, ble anbefalingene fra Thermo Fisher fulgt, som angir bruk av 1 ml RIPA buffer per 5×10^6 HeLa eller A431 celler (Vedlegg A.2.4). For lysering av cellene ble en blanding av 30 μ l 100X Fosfatase/protease (*Thermo ScientificTM, a.nr. 1861281*) inhibitor fortynnet 1:100 i RIPA-buffer tilberedt. Cellebrettet ble satt på is og gammelt medium ble aspirert fra brønnene, etterfulgt av rensning med 2-3 ml 1X PBS. Deretter ble 1 ml RIPA-buffer tilsatt i hver brønn og inkubert i 5 minutter, med forsiktig omrøring for å sikre fullstendig lysering av cellene. Cellene ble løsnet fra brønnene ved hjelp av celskrape og overført til mikrosentrifugerør for sentrifugering ved 14 000g i 15 minutter. Supernatanten ble deretter fjernet og overført til nye mikrosentrifugerør for videre analyse. Etter lysering ble proteinkonsentrasjonen målt ved bruk av QubitTM 4 med QubitTM Protein BR Assay Kit (*InvitrogenTM a.nr. A50668*) og prøvene ble forberedt i henhold til prosedyren for QubitTM (Vedlegg A.2.5). På grunn av tekniske problemer med QubitTM 4 Fluorometer ble prøvene stående over 1 time, og testforsøket ble avsluttet. Det ble besluttet at neste testforsøk skulle inkludere et separat cellebrett for celletelling i tillegg til prøvebrettet, for å unngå å bruke kontrollbrønnen med vekstemedium til dette formålet.

3.7.2.2 Andre testforsøk

Grunnet avbrytning av det første testforsøket ble det utført et nytt testforsøk, denne gangen med cellebrett som hadde blitt inkubert i 24 timer med 5 μ M IVM. I tillegg ble det dyrket et ekstra cellebrett for å observere konfluens og telle antall celler. Basert på antall celler skulle det beregnes hvor mye RIPA-buffer som skulle brukes for lyseringen etter prosedyren (Vedlegg A.2.4). Lyseringen ble fulgt på samme måte som i første testforsøke bare at RIPA-buffer ble halvert til 500 μ l. Mengden protein i prøvene etter lysering ble målt ved å bruke QubitTM 4 Fluorometer, og prosedyren for QubitTM Protein BR Assay Kit ble fulgt (Vedlegg A.2.5). Ikke alle prøver ga målbare verdier og flere av prøvene resulterte i feilmeldingen «Sample concentration too low». For å sikre at alle prøvene ble behandlet under like forhold, ble det tatt utgangspunkt i den laveste målte proteinkonsentrasjonen. De resterende prøvene ble fortynnet med RIPA-buffer til samme konsentrasjon. Prøvene ble fortynnet til en konsentrasjon på 0.103 μ g/ μ L med et totalt volum på 20 μ l i mikrosentrifugerør (Vedlegg A.2.6). Videre ble prosedyren for SDS-PAGE fulgt (Vedlegg A.2.7). Prøvene ble fortynnet med 20 μ l Laemmli Sample Buffer (*Bio-Rad, a.nr. 1610737*) og blandet. Running buffer ble tilberedt ved å fortynne 10 x Tris/Glycine/SDS med destillert vann (Vedlegg A.2.10). Mini-PROTEAN[®] Tetra gel apparatet og TXGTM kassetten ble klargjort for å kjøre SDS-PAGE. Running buffer ble fylt opp i både det innerste og det ytterste kammeret i elektroforesekammeret. Prøvene ble varmet opp i

mikrosentrifugerør med hull i lukket ved 95°C i 5 minutter. Ved hjelp av en loading pipettespiss ble det lastet 5 µL Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Protein Standard (*Bio-Rad a.nr. 1610375*) og 20 µL av hver prøve på gelen. Plasseringen av prøvene ses på bilde 12. Elektroforesemaskinen ble koblet opp og kjørt ved 200V i 30 minutter. Gelene ble tatt ut av kassetten, vasket tre ganger med vann i 5 minutter, etterfulgt av farging i 1 time. Den ene ble farget med Bio-Safe™ Coomassie Stain (*Bio-Rad, a.nr.1610786S*) i henhold til prosedyren beskrevet i (Vedlegg A.2.8) og avfarget med vann. Den andre med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (*Bio-Rad, a.nr. 161-0436*) etter prosedyren og avfarget med Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain Solution (*Bio-Rad, a.nr 1610438*) (Vedlegg A.2.9). Gelene ble avfarget over natten.



Figur 12: Figuren viser hvor de ulike prøvene ble lastet i brønnene på gelen. Brønn 2: Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Protein Standard, Brønn 3: IVM fra prøve 3, Brønn 4: IVM fra prøve 4, Brønn 5: DMSO fra prøve 5, Brønn 6: Vekstmedium fra prøve 6. Figuren er laget med BioRender (97).

3.8 Optimalisering av Western Blot

Western Blot ble utført etter SDS-PAGE fra det andre testforsøket. Gelene ble avfarget over natten i henhold til fargeprosedyrene (Vedlegg A.2.8 og A.2.9). Antistoffene som skulle brukes kom i konsentrert form og måtte derfor fortynnes før blot kunne startes. Det var begrenset informasjon om antistoffene og hvordan de skulle fortynnes. For å bestemme volumet til antistoffene ble det pipettert med ulike mengder for å måle nøyaktig volum. Rabbit anti-Bax (*Bio-Rad, a.nr. AHP2716*) inneholdt 60 µL, resten inneholdt 100 µL. Disse ble fordelt på mikrosentrifugerør med 10 µL i hvert rør. Videre ble det utarbeidet en fortynningsprosedyre for videre bruk (Vedlegg A.2.11). Prosedyren for Western Blot ble videre fulgt for å overføre de separerte proteinene fra gelene til membranene (Vedlegg A.2.12). Toppen og bunnen av gelene ble kuttet av, og mini transferpakkene ble forberedt til en gelkasset sandwich. Gelkassetten ble deretter satt inn i Trans-Blot® Turbo™ og blottet i 7 minutter. Kassetten ble låst opp og blotting

sandwichen ble demontert, og membranene tatt ut. Vaskebuffer ble tilberedt ved å blande 1 350 ml destillert vann, 150 ml 10x PBS og 3.75 ml 10 % Tween (*Bio-Rad a.nr. 1662404*), som skulle brukes i vasketrinnene (Vedlegg A.2.13). Membranene ble blokkert med EveryBlot blocking buffer (*Bio-Rad, a.nr. 12010020*) i 5 minutter (Vedlegg A.2.14). Etersom GAPDH, Bax og Bcl-2 har ulike primære- og sekundære antistoff, ble hver av dem blokket separat. Membranene ble derfor klippet rett under bånd 5 mellom 37 kDa og 25 kDa. Før bruk måtte antistoffene fortynnes med blokkebuffer i henhold til prosedyren (Vedlegg A.2.11). De primære antistoffene ble fortynnet som følger: Rabbit anti Bax 1:500 (*Bio-Rad, a.nr AHP2716*), Mouse anti Human Bcl-2 1:500 (*Bio-Rad, a.nr MCA1550*) og Mouse anti Human GAPDH 1:1000 (*Bio-Rad, a.nr MCA4740*), med utgangspunkt 10 µL primært antistoff. Sekundære antistoffer ble fortynnet som følgende: Goat anti rabbit IgG 1:1000 (*Bio-Rad, a.nr STAR121P*) og Goat anti mouse IgG 1:1000 (*Bio-Rad, a.nr STAR120P*). Det sekundære antistoffet for Bcl-2 Goat anti mouse IgG kunne også benyttes for GAPDH. Etter blokking ble membranbitene plassert i 15 ml rør inkubert med 5 ml primært antistoff i 20 minutter og 5 ml sekundært antistoff i 15 minutter, med vasketrinn mellom hvert antistoff (Vedlegg A.2.15). Volumene som ble brukt for de ulike antistoffene avvek fra prosedyren. Etter bruk ble antistoffene oppbevart i kjøleskap da de kunne gjenbrukes opptil 3 ganger. Til slutt ble Clarity™ Western ECL Substrate (*Bio-Rad, a.nr 1705060*) brukt i henhold til prosedyren i (Vedlegg A.2.16). Det ble forberedt en substratblanding bestående av 7 ml Clarity™ Western ECL Substrate Luminol/enhancer Solution og 7 ml Clarity™ Western Substrate Peroxide Solution. Membranbitene ble liggende i 15 ml rør og tilsatt 3.5 ml substratblanding og inkubert i 5 minutter på rulling. Membranene ble plassert sammen der de var klippet og fotografert med ChemiDoc™ MP Imaging System etter prosedyre (Vedlegg A.2.18).

3.9 Hovedforsøk

De følgende forsøkene ble utført med cellebrett som hadde blitt utsatt for IVM i enten 24 eller 72 timer. Disse forsøkene var avgjørende for å undersøke virkningen av IVM på celleveksten til A549 cellene og apoptosemarkørene Bax og Bcl-2. Prosedyren ble gjennomført på samme måte som testforsøkene, men med noen justeringer for å optimalisere metodene ytterligere.

3.9.1 Hovedforsøk 24 timer

Forsøket ble startet med cellebrett som hadde blitt inkubert i 24 timer med 5 µM IVM. Fire cellebrett var forberedt for å kunne sammenligne ulike paralleller og sikre pålitelige resultater.

Konfluensen i hver brønn ble vurdert ved hjelp av et invert mikroskop før lysering som ble utført på samme måte som testforsøkene, men denne gangen med 300 μ l RIPA-buffer i hver brønn (Vedlegg A.2.4). Proteinkonsentrasjonen ble målt med Qubit™ 4 Fluorometer ved å følge prosedyren for Qubit™ Protein BR Assay Kit (Vedlegg A.2.5). Alle konsentrasjonene ble standardisert til den laveste målte konsentrasjonen ved å fortynne med RIPA-buffer til et totalt volum på 20 μ l (Vedlegg A.2.6). SDS-PAGE ble deretter utført i henhold til prosedyren i (Vedlegg A.2.7). Proteinløsningene ble fortynnet i 20 μ l Laemmli Sample Buffer og running buffer ble forberedt etter prosedyren i (Vedlegg A.2.10). Mini-PROTEAN® Tetra gel apparatet og TXG™ kassetten ble klargjort for å kjøre SDS-PAGE. I brønnene ble 10 μ l prøve lastet i hver brønn på gelen, i tillegg til 5 μ l Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Protein Standard. Elektroforesen ble kjørt ved 200V i 30 minutter. De ferdige gelene ble deretter vasket 3x5 minutter i vann. De to første cellebrettene ble ikke farget og gikk direkte videre til Western Blot (Vedlegg A.2.12). Gelkassetten ble forberedt og satt inn i Trans-Blot® Turbo™ og blottet i 7 minutter, mens vaskebuffer ble forberedt (Vedlegg A.2.13). Membranene ble klippet under bånd 5 og blokket med 10 ml EveryBlot blocking buffer i 5 minutter i et 50 ml rør etter prosedyren (A.2.14). Antistoffene ble fortynnet som i testforsøket (Vedlegg A.2.11). Inkuberingen av antistoff ble utført likt som testforsøket med likt volum og tider (A.2.15). Til slutt ble Clarity™ Western ECL Substrate tilsatt i henhold til prosedyren i (Vedlegg A.2.16) med likt volum som testforsøket. Det ble ikke observert synlige bånd, dermed ble membranene lagt i vann i en time. Membranene ble satt sammen igjen der de var klippet og fotografert med ChemiDoc™ MP Imaging System (Vedlegg A.2.18). De to første gelene fra det første cellebrettet viste ingen resultater etter Western Blot. Derfor ble de neste gelene farget. De fire siste gelene ble farget i 1 time, to med Bio-Safe™ Coomassie stain (Vedlegg A.2.8) og to med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (Vedlegg A.2.9), etterfulgt av avfarging over natten. Immunodeteksjon kunne ikke utføres dagen etter, og gelene ble dermed overført til membraner ved å følge prosedyren for Western Blot (Vedlegg A.2.12). De fire siste membranene ble vasket og blokket i en time med 10 ml EveryBlot blocking buffer frem til og med trinn to (Vedlegg A.2.17). Immunodeteksjon ble utsatt til uken etter og membranene ble oppbevart i PBS/TBS ved 4°C. Derfor ble det laget vaskebuffer uten Tween, bestående av kun destillert vann og 10x PBS (Vedlegg A.2.13). Gelene ble lagt i hver sin beholder med PBS og dekket med plastfolie. Disse ble oppbevart i 5 dager ved 4°C og inkludert med 72-timers forsøket.

3.9.2 Hovedforsøk 72 timer

Neste hovedforsøk ble utført med cellebrett som hadde vært eksponert for 5 μ M IVM i 72 timer. Grunnet brannalarm ble deler av forsøket forsinket, og noen av cellene ble stående lenger enn ønsket. Ettersom det var begrensede resultater i 24-timers hovedforsøk, ble det gjort noen endringer i prosedyren for 72-timers forsøket. Cellelyseringen ble fulgt som tidligere (Vedlegg A.2.4), med følgende endring at 240 μ l RIPA-buffer ble tilsatt. Cellene ble sentrifugert og det første cellebrettet ble stående lenger enn ønsket med RIPA-buffer på grunn av brannalarmen. Cellebrett to ble tatt ut seks minutter etter angitt tidspunktet grunnet samme hendelse. Proteinkonsentrasjonen i cellebrettene ble målt ved hjelp av QubitTM 4 og QubitTM Protein BR Assay Kit prosedyren (Vedlegg A.2.5). Under forsøket oppstod det mangel på QubitTM reagenser, noe som resulterte i at noen prøver ikke kunne måles for proteininnhold. Videre ble prøvene fortynnet til den laveste målte konsentrasjonen med RIPA-buffer til et totalt volum på 30 μ l (Vedlegg A.2.6). SDS-PAGE ble utført etter prosedyren i (Vedlegg A.2.7). Mini-PROTEAN[®] Tetra gel apparatet og TXGTM kassetten klargjort og running buffer forberedt (Vedlegg A.2.10). Brønnene ble fylt med 25 μ l prøvevolum. I tillegg ble 5 μ L Precision Plus ProteinTM KaleidoscopeTM Protein Standard lastet i en av brønnene. Denne gikk tom i løpet av forsøket og det ble tatt i bruk en ny proteinstandard (*Bio-Rad a.nr. 1610375*). Elektroforesen ble kjørt ved 200V i 30 minutter. Gelene ble farget med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution og avfarget over natten (Vedlegg A.2.9). Gelene ble overført til membraner etter prosedyren for Western Blot (Vedlegg A.2.12). Membranene ble blottet i 7 minutter, samtidig som vaskebuffer ble klargjort (Vedlegg A.2.13). Deretter ble membranene blokket i 1 time med 10 ml EveryBlot Blocking buffer, som beskrevet i prosedyren (Vedlegg A.2.17). Fra dette trinnet ble gelene fra 24-timers forsøket inkludert i prosessen. Membranene ble klippet, og antistoffene fortynnet (A.2.11). Det ble tatt i bruk en ny prosedyre for immunodeteksjon (Vedlegg A.2.17). 5 ml primært antistoff ble tilsatt til hvert rør og inkubert over natten med kontinuerlig rulling. Primært antistoff ble helt av, og rørene ble vasket med vaskebuffer 5x5 minutter med kontinuerlig rulling. Videre ble rørene inkubert med 5 ml sekundært antistoff i 1 time med kontinuerlig rulling (Vedlegg A.2.17). Sekundært antistoff ble helt av og rørene ble vasket med vaskebuffer 6x5 minutter. Til slutt ble 3.5 ml ClarityTM Western ECL Substrate tilsatt rørene og inkubert i 10 minutter med kontinuerlig rulling. Membranbitene ble fjernet fra substratblandingen og lagt sammen med sin korresponderende bit i en beholder med PBS. Membranene ble deretter fotografert med ChemiDocTM MP Imaging System etter prosedyre (Vedlegg A.2.18).

4 Resultat

Resultatene som presenteres er basert på optimalisering av cellevekst, dyrking av A549 celler med 5 μM IVM tilsatt til vekstmedium, samt SDS-PAGE og Western Blot forsøk. Det blir vist resultater fra to testforsøk og to hovedforsøk, der cellene har blitt dyrket med 5 μM IVM i 24 og 72 timer. Ved optimalisering av cellevekst illustreres resultatene gjennom bilder av cellenes konfluens i celleflaskene. For celledyrking med IVM består resultatene både av bilder med konfluens og tabeller som setter konfluensen til cellebrettene opp mot hverandre. Resultatene fra SDS-PAGE og Western Blot er satt opp i en tabell med målingene fra QubitTM 4 Fluorometer, samt bilder av gelene fra SDS-PAGE, og bilder av membranene tatt med ChemiDocTM MP. Figur 26 (Vedlegg A.3.1.1) og figur 27 (Vedlegg A.3.1.2) viser resultatet fra Western Blot ved dyrking med IVM i 24 timer og 72 timer. Figurene viser bilder av alle membranene med proteinbånd etter utført immunodeteksjon. Bildene er beskåret rundt de ulike proteinmarkørene, Bax og Bcl-2, samt loading kontroll proteinet GAPDH. De originale bildene er tatt med ChemiDocTM MP. Tabell 6 (Vedlegg A.3.3) viser til resultatet av målingene gjort med QubitTM 4 Fluorometer ved cellene som har blitt dyrket med IVM ved 24- og 72-timers intervall. I tabellen vises alle målingene fra standardene som er brukt, samt blank prøve, og alle prøvene fra hvert cellebrett. Verdiene viser til proteinkonsentrasjonen til hver prøve fra de ulike cellebrettene.

4.1 Optimalisering av cellevekst

4.1.1 Dyrking av A549 celler

A549 cellene ble dyrket på celledlaboratoriet i rundt en måned for å gjenopprette optimal cellevekst etter tining. De ble dyrket i et inkubasjonsskap med 5 % CO_2 og 37°C , som ga et kontrollert miljø med optimale forhold. Ved en konfluens på 60-80 % ble cellene splittet i 25 cm^2 celleflasker (Vedlegg A.2.3). I begynnelsen vokste cellene ujevnt, men dette stabiliserte seg etter noen passasjer. Etter en periode ble veksten redusert grunnet hyppig splitting for å oppnå tilstrekkelig antall celleflasker og unngå overvekst. Videre ble cellene overført til 75 cm^2 celleflasker for å oppnå tilstrekkelig antall celler til stressanalysen. Etter dette fulgte en vekstoptimaliseringsperiode for å oppnå eksponentiell vekst før stresset (IVM) ble introdusert. Etter tre uker hadde cellene oppnådd ønsket vekst. Ved optimaliseringsperioden ble det utført 13 passasjer. Cellene fra enten en 25 cm^2 , eller en 75 cm^2 celleflaske ble overført til cellebrett

og inkubert i et døgn, før stresset ble introdusert. Inkuberingen sørget for at cellene festet seg til underlaget i brønnene.

4.2 Dyrking med Ivermectin

Basert på tidligere bachelorstudier ved NTNU i Ålesund (73, 74) ble det avgjort å tilsette en konsentrasjon på 5 μM IVM til tidsintervallene 24 timer og 72 timer. Hensikten med tidsintervallet på 24 timer var å undersøke om IVM hadde en umiddelbar effekt på cellene, mens ved 72 timer var det ønskelig å se om effekten endret seg over et lengre tidsintervall. Hvert cellebrett hadde fire brønner med IVM, samt to kontroller. Første kontroll inneholdt DMSO i vekstmedium og den andre inneholdt kun vekstmedium.

4.3 Testforsøk

Ved dyrking av celler med 5 μM IVM i testforsøk 1 ble cellebrettet inkubert i 72 timer, og cellebrettet i testforsøk 2 ble inkubert i 24 timer. Konfluensen i tabell 1 viser til celletettheten i brønnene etter at de har stått et tidsintervall med IVM, DMSO eller kun vekstmedium.

Tabell 1: Viser konfluensen til testforsøk 1 ved 72 timer og testforsøk 2 ved 24 timer. For testforsøk 1 hadde brønnen med vekstmedium en konfluens på 95 %, og de resterende brønnene hadde en konfluens på 80 %. For testforsøk 2 var konfluensen rundt 30 % for alle brønnene. Det var ingen vesentlig forskjell på kontrollene eller brønnene tilsatt IVM.

Testforsøk	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 4	Brønn 5	Brønn 6
	IVM	IVM	IVM	IVM	DMSO	Vekstmedium
Nr. 1	80 %	80 %	80 %	80 %	80 %	95 %
Nr. 2	25 %	25 %	35 %	35 %	30 %	35 %

4.4 24- og 72-timers hovedforsøk

Ved dyrking av celler med 5 μM IVM i hovedforsøk ble cellebrettene fra første intervall inkubert i 24 timer, og cellebrettene fra andre intervall inkubert i 72 timer. Konfluensen i tabell 2 og 3 viser til celletettheten i brønnene etter at de har stått et tidsintervall med IVM, DMSO eller kun vekstmedium.

Tabell 2: Tabellen viser konfluensen til brønnene fra fire cellebrett ved 24-timers hovedforsøk. Celletettheten ser ut til å være tilnærmet lik på tvers av brønnene behandlet med IVM og kontrollene. Dette observeres også fra bildene av konfluensen til cellebrettene (Vedlegg A.3.4.1-A.3.4.4). A549 cellene hadde størst proliferasjon i cellebrett 4, der alle brønner, med unntak av brønn 2, hadde en konfluens på 100 %.

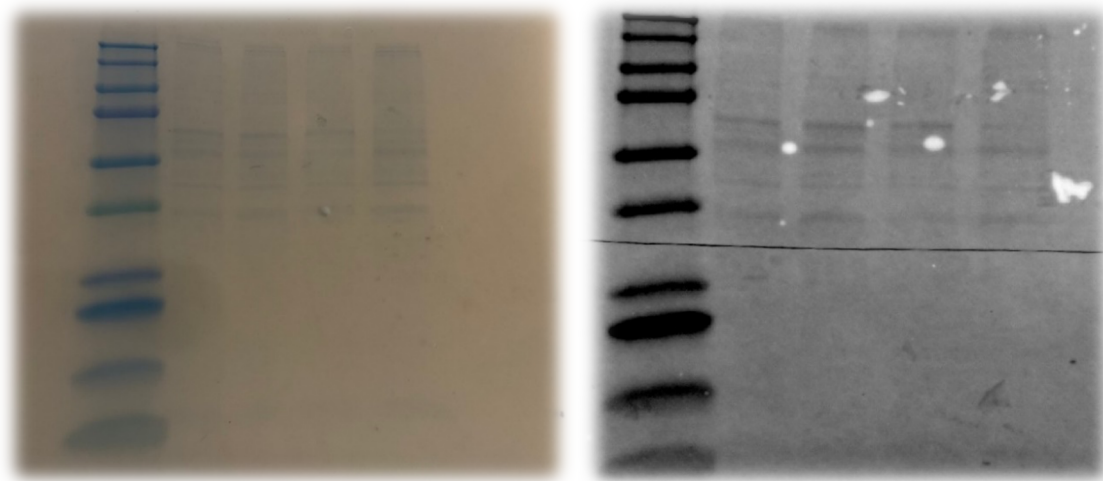
Cellebrett nr.	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 4	Brønn 5	Brønn 6
	IVM	IVM	IVM	IVM	DMSO	Vekstmedium
Nr. 1:	95 %	95 %	95 %	93 %	93 %	95 %
Nr. 2:	95 %	100 %	95 %	97 %	100 %	95 %
Nr. 3:	95 %	90 %	95 %	95 %	90 %	95 %
Nr. 4:	100 %	97,5 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabell 3: Tabellen viser konfluensen til brønnene fra fire cellebrett ved 72-timers hovedforsøk. Resultatene viser at alle brønnene i alle cellebrettene hadde en konfluens på 100 % etter 72 timer. Ut ifra bildene av konfluens observeres det at A549 cellene har vokst svært tett i brønnene (Vedlegg A.3.4.5-A.3.4.8).

Cellebrett nr.	Brønn 1	Brønn 2	Brønn 3	Brønn 4	Brønn 5	Brønn 6
	IVM	IVM	IVM	IVM	DMSO	Vekstmedium
Nr. 1:	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Nr. 2:	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Nr. 3:	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Nr. 4:	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

4.5 SDS-PAGE og Western Blot testforsøk

Under testforsøkene oppstod det utfordringer med blant annet trypsinering og proteinmåling. Dannelse av celleklumper førte til ujevn fordeling, noe som resulterte i et lavt antall celler ved telling. Dette samsvarte ikke med konfluensen, derfor var det ikke mulig å bestemme volumet til RIPA-buffer basert på antall celler. Flere prøver hadde for lav proteinkonsentrasjon ved proteinmåling med Qubit™ 4 Fluorometer. Det ble kun målt proteinkonsentrasjon for prøvene fra brønn 3 og 4 med IVM, samt kontrollene fra brønn 5 og 6 med DMSO og vekstmedium. Grunnet disse problemene var det lite resultater fra testforsøkene. Etter SDS-PAGE viste Kaleidoscope-standardene sterke bånd til venstre på gelen. Det ble observert noen svake og utydelige bånd fra prøvene på gelen. Disse svake båndene korresponderte med den lave mengden protein som ble målt i prøvene.



Figur 13 & 14: Bildene viser den ene gelen og membranen under testforsøk 2, som var et 24-timers forsøk. A549 cellene hadde fått tilsatt 5 μ M IVM og ble inkubert i 24 timer. Til venstre er bildet av gelen etter utført SDS-PAGE. Bildet til høyre av membranen er tatt med ChemiDoc™ MP etter utført Western blotting. Gelen er farget med Bio-Safe™ Coomassie Stain. Proteinstandardene på gelen er Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Protein Standard. Prøvene lastet fra venstre til høyre i brønnene på gelen er: Brønn 1: Proteinstandard. Brønn 2: IVM fra prøve 3. Brønn 3: IVM fra prøve 4. Brønn 4: DMSO fra prøve 5. Brønn 5: Vekstmedium fra prøve 6.

4.6 Resultater fra Hovedforsøket

4.6.1 Resultater fra proteinisolering målt med Qubit™ 4 Fluorometer

Proteinisolering av A549 cellekulturer behandlet med og uten IVM ble analysert ved bruk av Qubit™ 4 Fluorometer (Vedlegg A.2.5). Fire cellebrett ble målt for hvert tidsintervall. Resultatene viste variasjoner i proteinkonsentrasjon både innenfor og mellom de ulike intervallene. Tabell 6 (Vedlegg A.3.3) viser målingene av proteinkonsentrasjon med Qubit™ 4

Fluorometer for alle prøvene fra hovedforsøket, både 24-timers og 72-timers intervallene. Det ble laget nye prøver av både standard 1, 2 og blank for hvert brett etter Qubit™ Protein BR Assay Kit prosedyre (Vedlegg A.2.5). Disse målingene ble utgangspunktet for å bestemme fortyning av prøvene i preparasjon av SDS-PAGE. Den laveste konsentrasjonen fra hvert brett ble valgt som endelig konsentrasjon for alle prøvene, som vist i tabell 4. Ved 24-timers hovedforsøk viste ikke kontrollene stort avvik fra prøvene behandlet med IVM, med unntak av brett 2. Ved 72-timers hovedforsøk var det ikke stort avvik fra prøvene behandlet med IVM og kontrollene, med unntak av brett 1.

Tabell 4: Viser proteinkonsentrasjonen for prøvene som ble lastet på gelen i 24-timers og 72-timers hovedforsøkene. Verdiene stammer fra brønnen med lavest proteinkonsentrasjon fra hvert cellebrett. Det ble tatt utgangspunkt i denne verdien for å fortynde de resterende prøvene. Dette medførte lik konsentrasjon før lasting på gelen.

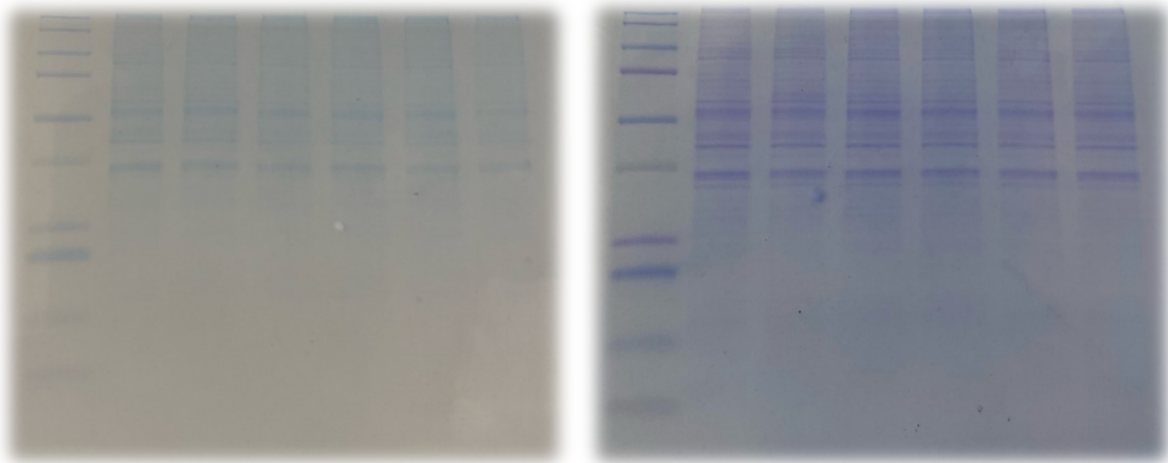
	24 Timer				72 Timer			
	Brett 1	Brett 2	Brett 3	Brett 4	Brett 1	Brett 2	Brett 3	Brett 4
µg/µL	1.71	1.44	1.07	1.33	1.61	2.36	2.79	2.37

4.6.2 SDS-PAGE

Brønnene på gelen kunne maksimum ta 30 µL. For 24-timers hovedforsøk ble det lastet 10 µL i hver brønn. På grunn av svake bånd ble det lastet 25 µL i brønnene ved 72-timers hovedforsøk. Det var viktig å laste lik proteinkonsentrasjon på gelen for å kunne sammenligne resultatene. Ved 24-timers intervallet ble det forsøkt å utføre prosedyren uten farging av de fire første gelene, for å effektivisere prosessen. Uten farging ble det utfordrende å bekrefte proteinbånd, som førte til problemer rundt klipping av membranen før inkubering med antistoff. For å unngå dette problemet ble det utført farging av de fire resterende gelene fra 24-timers forsøket, og gelene fra 72-timers forsøket.

4.6.2.1 Resultater SDS-PAGE

Alle gelene viste tydelige og separerte bånd. Både spenning og tiden for elektroforese ble holdt konsistent for alle gelene. Figurene nedenfor viser tydelige bånd rundt 37 kDa, som er molekylvekten til GAPDH. For Bax ble det ikke observert bånd rundt 21 kDa, som hadde vist mulig tilstedeværelse av proteinet. For Bcl-2 ble det ikke observert noen bånd rundt 26 kDa, som kunne vist til Bcl-2 protein i prøvene.



Figur 15 & 16: Bildene er tatt av to geler fra brett 3 og 4 ved 24-timers hovedforsøk. A549 cellene hadde fått tilsatt 5 μ M IVM og var inkubert i 24 timer. Gelen til venstre kommer fra brett 3 og er farget med Bio-Safe™ Coomassie stain. Gelen til høyre kommer fra brett 4 og er farget med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution. Proteinstandard på begge gelene er Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Protein Standard. Prøvene lastet fra venstre til høyre på begge geler er; Brønn 1: Proteinstandard. Brønn 2: IVM fra prøve 1. Brønn 3: IVM fra prøve 2. Brønn 4: IVM fra prøve 3. Brønn 5: IVM fra prøve 4. Brønn 6: DMSO fra prøve 5. Brønn 7: vekstmedium fra prøve 6.

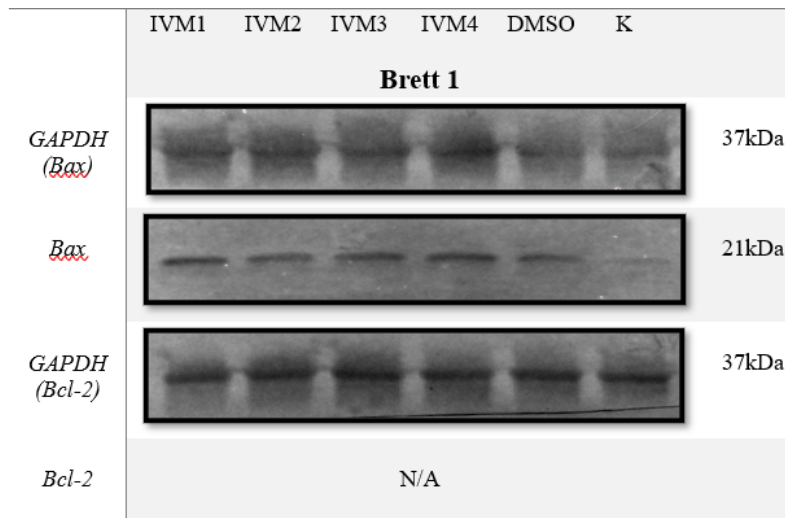
4.6.3 Western Blot

Det ble det fulgt samme prosedyre i hovedforsøket som ved testforsøk 2 (Vedlegg A.2.15). Western blotting for membranene ga ikke synlige resultater for brett 1 og 2, og det ble derfor besluttet at immunodeteksjonen for brett 3 og 4 skulle utføres sammen med 72-timers intervaller. En time etter utført blotting endte membranene opp med resultat, som vist i figur 17. Forsøket var allerede stanset, før det ble kjent at prosedyren fungerte. Den andre prosedyren brukt til blotting (Vedlegg A.2.17) hadde lengre inkubering med blokkebuffer og antistoff, både primært og sekundært. Denne prosedyren ga svake bånd for membranene til brett 3 og 4 ved 24-timers intervall (se figur 26), og tydelige bånd ved 72-timers intervall (se figur 26). Som nevnt tidligere ble det ikke observert resultater for Bcl-2, uavhengig av prosedyre benyttet.

4.6.3.1 Resultater Western Blot

Figur 26 (Vedlegg A.3.1.1) viser proteinbånd av proteinmarkørene Bax og loading kontrollen GAPDH for 24-timers intervall under hovedforsøket. Proteinbånd for GAPDH ble observert på seks av åtte membraner, hvor brett 3 og 4 manglet proteinbånd for GAPDH på membranene for Bax. Bånd for Bax ble observert på en av membranene fra cellebrett 1 (se figur 17). Bcl-2 ble

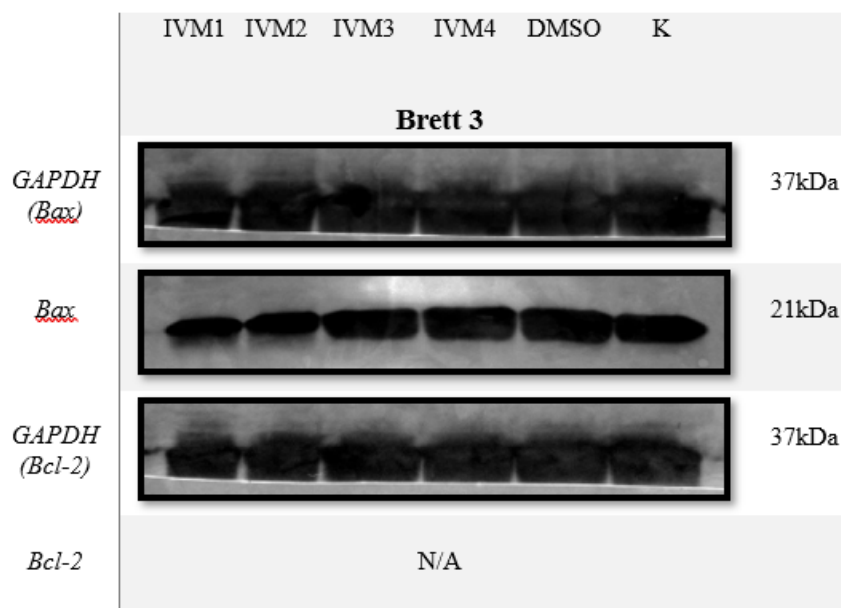
ikke observert for noen av de fire membranene som ble testet mot Bcl-2, og er derfor ikke representert i figuren. Øverst på figuren vises inndelingen av brønnene til hver membran, og på siden av hvert bilde i figuren er det oppgitt molekylvekten til proteinet som ble påvist.



Figur 17: Figuren er et utsnitt av figur 26 (Vedlegg A.3.1.1), og viser bilder av membranene fra brett 1 ved 24-timers hovedforsøk etter utført Western blotting. Bildene er tatt med ChemiDoc™ MP. For hvert brett ble det analysert to membraner, en for Bax og en for Bcl-2. GAPDH ble analysert for begge membranene som en loading kontroll. Bcl-2 er satt opp som N/A, siden det ikke ble observert resultat for proteinet. Til venstre er proteinet som ble detektert på bildene, over bildene er inndelingen av prøver, og til høyre vises molekylvekten til de korresponderende proteinene. Bildene til Bax og GAPDH (*Bax*) kommer fra membranene som ble testet for Bax, mens GAPDH (*Bcl-2*) kommer fra membranene som ble testet for Bcl-2. IVM 1-4 er prøvene tilsatt IVM, DMSO er kontroll fra prøven tilsatt DMSO og K er kontroll med vekstmedium.

Figur 27 (Vedlegg A.3.1.2) viser proteinbånd av proteinmarkørene Bax og Bcl-2, samt loading kontrollen GAPDH for 72-timers intervall under hovedforsøk. Det ble observert tydelige proteinbånd for GAPDH på alle åtte membranene testet under intervallet. Bånd for Bax ble observert på alle fire membranene som testet for Bax. Bcl-2 ble ikke observert for noen av de fire membranene som ble testet for Bcl-2 og er derfor ikke representert i figuren. Øverst på figuren vises inndelingen av brønnene til hver membran, og ved siden av hvert bilde i figuren er det oppgitt molekylvekten til proteinet som ble påvist. Hvite linjer synlige på bildene for GAPDH (*Bax*) er der membranene ble klippet. Dette var for å gjøre det mulig å inkubere med to ulike antistoff samtidig på samme membran. For begge hovedforsøk ble det ikke detektert noe Bcl-2 på membranene. For flere av membranene i 24-timers intervallet ble det heller ikke observert noe GAPDH, som vist i figur 26. Da det både var lavt volum og proteinkonsentrasjon lastet på gelene resulterte dette i tynne eller manglende bånd. For membranene fra brett 3 og 4

var dette et problem, da disse membranene ble blokket og lagt i PBS over fem dager før immunodeteksjon, som endte opp i svake eller ingen bånd. Gelene som ble overført til membraner og blottet umiddelbart hadde tydelige bånd, spesielt for loading kontrollen GAPDH. Ved 24-timers hovedforsøk hadde kontrollene smale bånd for GAPDH (Bax) ved brett 1 og 2, samt Bax for brett 1 og GAPDH (Bcl-2) for brett 2. Ved 72-timers hovedforsøk ble det benyttet større volum og proteinkonsentrasjon, noe som førte til store og tydelige bånd på alle membranene. Alle membranene for Bax fikk resultater, og alle membranene fikk resultat mot GAPDH. Bcl-2 ble ikke observert på noen av membranene. For GAPDH var flere av båndene spredt ut, ettersom det var mye proteiner lastet på gelene under SDS-PAGE. For brett 3 hadde Bax smalere bånd i prøvene 1 og 2 (se figur 18), som hadde blitt tilsatt 5 μ M IVM. Det er uklart om GAPDH også er smalere ved disse båndene, ettersom membranen ble klippet for nært molekylvekten til GAPDH (se figur 18). For resten av brettene hadde Bax jevn størrelse på alle båndene.



Figur 18: Figuren er et utsnitt av figur 27 (Vedlegg A.3.1.2), og viser bilder av membranene fra brett 3 ved 72-timers hovedforsøk etter utført Western blotting. Bildene er tatt med ChemiDocTM MP. For hvert brett ble det analysert to membraner, en for Bax og en for Bcl-2. GAPDH ble analysert for begge membranene som en loading kontroll. Bcl-2 er satt opp som N/A, siden det ikke ble observert resultat for proteinet. Til venstre er proteinet som ble detektert på bildene, over bildene er inndelingen av prøver, og til høyre vises molekylvekten til de korresponderende proteinene. Bildene til Bax og GAPDH (Bax) kommer fra membranen som ble testet for Bax, mens GAPDH (Bcl-2) kommer fra membranen som ble testet for Bcl-2. IVM 1-4 er prøvene tilsatt IVM, DMSO er kontroll fra prøven tilsatt DMSO og K er kontroll med vekstmedium.

5 Diskusjon

Virkningen IVM har på A549 cellelinjen har blitt studert, med spesielt fokus på om cellene uttrykker apoptosemarkørene Bax og Bcl-2, når cellene utsettes for IVM. Målet var å øke forståelsen av hvordan IVM kan påvirke apoptoseprosessen til kreftcellene. Med tanke på optimalisering ble det tatt utgangspunkt i tidligere studier der 5 μM IVM ble tilsatt til A549 celler (73). I denne studien ble det brukt en konsentrasjon på 5 μM IVM og tidsintervallene 24 og 72 timer.

5.1 Dyrking av A549 celler

Tining av frosne celler må skje raskt for å unngå skade eller død. Unødvendig lang tineprosess kan påvirke cellene negativt ved å initiere apoptose (Vedlegg A.2.2). Etter en tineprosess vil det ofte kreve noen runder med splitting før veksten stabiliseres, noe som ble observert her. For å holde cellene frie for kontaminasjon og LAF-benken steril ble det jobbet aseptisk, og tilsatt Penstrep for å forhindre bakteriell kontaminasjon (Vedlegg A.2.1). Det ble ikke observert noe utenom det vanlige i celleflaskene eller cellebrettene. Bestemmelse av konfluens er et estimat og kan være en unøyaktig metode. For å forhindre ulik oppfatning av konfluens ble dette diskutert. Flere problemer oppstod under celledyrkingen da cellepelletene var harde og vanskelige å løse opp, noe som resulterte i celleklumper og ujevn vekst. Noen flasker i passasjen vokste raskere enn andre, og cellene i celleklumpene døde på grunn av mangel på næring (45, 49). For å løse dette problemet ble cellepelleten pipettert opp og ned i vekstmedium.

5.1.2 Optimalisering av cellevekst

Optimalisering av cellevekst var avgjørende før eksponering av IVM. Ved å variere mellom celleflasker av ulik størrelse og tilpasse cellekonfluensen før eksponering, ble det oppnådd en mer robust cellepopulasjon før analysen. Opprinnelig var planen å bruke 25 cm^2 celleflasker, men dette viste seg å være utfordrende, da det var vanskelig å oppnå tilstrekkelig konfluens på cellebrettene som skulle brukes til testforsøkene. Den lave konfluensen resulterte i et begrenset antall celler til gjennomførelse av forsøkene, noe som sannsynligvis påvirket resultatene negativt. På grunn av den begrensede veksten, ble det derfor besluttet å overføre cellene til 75 cm^2 celleflasker for å oppnå tilstrekkelig konfluens. Denne tilpassingen resulterte i betydelig bedre vekst, økt konfluens og skapte et bedre utgangspunkt til hovedforsøkene. Mindre hyppige

splittinger og overføring til større celleflasker førte derfor til bedre vekst og dermed bedre resultater.

5.2 Dyrking med Ivermectin i vekstmedium

Cellene hadde fått inkubere ett døgn slik at de skulle feste seg til underlaget av cellebrettet, før brønnene ble tilsatt 5 μM IVM i vekstmedium. Dette ble gjort for å se om cellene ville oppføre seg annerledes ved påføring av stress. Resultatene fra dyrking med IVM viste høy konfluens i brønnene, både fra 24-timers hovedforsøk og 72-timers hovedforsøk. Overordnet konfluens observert fra 24-timers hovedforsøk var mellom 90-100 %. Konfluensen observert i cellebrettene ved 72-timers hovedforsøk var 100 % i alle brønnene. Derfor var det utfordrende å differensiere mellom resultatene til de ulike brønnene i cellebrettene. Det ble ikke observert en tydelig differanse i konfluens mellom brønnene som hadde fått tilsatt IVM, DMSO og vekstmedium. Det er uvisst om dette resultatet skyldes overvekst i brønnene eller IVM. For høy celletetthet kan være en årsak til dette. Det kan være hensiktsmessig å teste andre tidsintervall, hvor cellene dyrkes med IVM over en lengre tidsperiode. Under 72-timers hovedforsøk var det forventet høy konfluens i brønnene grunnet lang tid mellom cellesplitting. Derfor kan overvekst i cellebrønnene ha ført til en usikkerhet i resultatet.

5.3 Optimalisering av prosedyrer

Optimalisering av prosedyrer var avgjørende for å oppnå god cellevekst og sikre at ønskede resultater ble oppnådd. Det var nødvendig å tilpasse og kombinere ulike standardiserte prosedyrer til SDS-PAGE og Western Blot, for å studere Bcl-2 og Bax hos A549 celler. På grunn av manglende eller utilstrekkelige resultater ble prosedyrene justert flere ganger i løpet av tiden studien pågikk. Optimaliseringen ble hovedsakelig gjennomført under testforsøkene, men det ble også foretatt justeringer under hovedforsøkene, da resultatene ikke ble som forventet. Ideelt sett ville det vært ønskelig med mer tid for å utføre ytterligere optimaliseringer og mulighet til å gjennomføre flere testforsøk. Muligheten for videre optimalisering ble begrenset av tid og tilgjengelige reagenser. Det var derfor viktig å kontinuerlig evaluere og forbedre prosedyrene, for å sikre pålitelige og konsistente resultater som førte til gjentatte justeringer.

5.3.1 Testforsøk

Testforsøkene ble utført for å se om den utviklede prosedyren og metoden var gjennomførbar. Hensikten var å identifisere områder som krevde justeringer, som mengden RIPA-buffer for cellelysering, prøvevolum til brønnene og effektiviteten av immunodeteksjonen med antistoff og ECL fargesubstrat.

5.3.1.1 Testforsøk 1

I det første testforsøket ble A549 cellene behandlet med 5 μM IVM i 72 timer. Til tross for lav konfluens ble testforsøket gjennomført for å gjennomgå prosedyren. Det var derfor ikke forventet å få gode resultater. Cellene ble telt i Bürker tellekammer for å bestemme riktig volum av RIPA-buffer til cellelysering. Mengden RIPA-buffer baseres på antallet celler som skal lyses. Det ble utfordrende å telle cellene nøyaktig, grunnet ujevn fordeling av celler i tellekammeret. Standardprotokollen fra Thermo Fisher med 1 ml for 5×10^6 celler ble derfor fulgt (Vedlegg A.2.4). Proteinkonsentrasjonen til brønnene ble målt med Qubit™ 4 Fluorometer, men grunnet tekniske problemer med instrumentet ble prøvene stående i over en time. Siden fluorescenssignalet avtar over tid, ble forsøket avbrutt (Vedlegg A.2.5). Det måtte utføres nytt testforsøk da hele prosedyren ikke ble utført.

5.3.1.2 Testforsøk 2

På grunn av tidsbegrensning var det ikke mulig å oppnå tilstrekkelig konfluens, noe som medførte at resultatene ikke ble optimale. Likevel ble det gjennomført et nytt testforsøk for å gjennomgå prosedyren og utføre justeringer om nødvendig. Cellene ble telt i Bürker tellekammer, men som ved første testforsøk var det utfordringer. Det ble igjen ujevn fordeling av celler, grunnet dannelse av celleklumper. Ettersom det var usikkerhet rundt celleantall, ble det gjort et tilnærmet anslag av celleantallet basert på konfluensen til brønnene. RIPA-bufferen ble halvert til 500 μL , ettersom det var rundt 50 % konfluens. Proteinkonsentrasjonen ble målt med Qubit™ 4 Fluorometer for å kvalitetssikre de videre analysene. Av seks brønner hadde kun fire tilstrekkelig proteininnhold for videre analyse. Dette inkluderte prøvene som stammet fra brønn 3 og 4, som begge hadde fått tilsatt 5 μM IVM, samt kontrollene; DMSO og vekstmedium. Den lave proteinkonsentrasjonen kan skyldes for høy mengde RIPA-buffer, som kan ha hatt en fortynnende effekt. En viktig del av testforsøket var å bestemme om det var optimalt å gå direkte fra SDS-PAGE til Western Blot uten å farge gelene, da dette kunne spare tid. Siden dette var første gang SDS-PAGE ble utført, ble gelene farget for å bekrefte resultatene

(Vedlegg A.2.8 og A.2.9). Uten farging av gelene kunne det ikke observeres proteinbånd før immunodeteksjon var utført. Med en begrenset mengde reagenser og et kostbart prosjekt, var det nødvendig å sikre at SDS-PAGE ga tydelige resultater før Western Blot ble utført. Etter farging viste gelene utydelige bånd, noe som samsvarte med den lave proteinkonsentrasjonen, dette kan observeres på figur 13. I prosessen med å overføre gelene til membranene, ble standardprotokollen for Western Blot fulgt (Vedlegg A.2.12) og EveryBlot blocking buffer ble brukt for raskere blokkering (Vedlegg A.2.14). Siden GADPH, Bax og Bcl-2 krever ulike antistoffer, ble de blokket separat. Membranene ble klippet opp ved bånd 5 som befant seg mellom 37 kDa og 25 kDa. Dette ble gjort for å skille GADPH som har en molekylvekt på 37 kDa, fra Bax/Bcl-2 med molekylvekt rundt 20-26 kDa. De oppklippede membranene ble inkubert i rør med både antistoffer og Clarity™ Western ECL Substrate, etterfulgt av fotografering. Bildene av membranene som er vist i resultatdelen i figur 14, bekreftet at det var protein til stede, men båndene var svake. Dette korresponderte med observasjonene av lave proteinkonsentrasjoner fra tidligere målinger. Resultatene fra testforsøkene var ikke optimale, noe som var forventet på grunn av lav konfluens. For å øke konfluensen ble det byttet til større celleflasker på 75 cm². Bruken av tellekammer ble avvirket grunnet problemer med dannelse av celleklumper og tidsbegrensning. Det ble generelt utført lite optimalisering gjennom testforsøkene, men prosedyrens gjennomførbarhet ble evaluert.

5.4 Hovedforsøk

Det var ønskelig å optimalisere flere deler av prosedyren, og om det hadde vært mulig å utføre flere testforsøk ville dette bidratt til et bedre utgangspunkt for utførelsen av hovedforsøket. Det burde vært optimalisering rundt tid og spenning på SDS-PAGE, lengde på eksponering, mengde ECL substrat og mengde RIPA-buffer. En mulig løsning for optimalisering ville vært å nedskalere hovedforsøket for å kunne utføre flere testforsøk på optimaliseringspunktene. Dette ville gitt et bedre utgangspunkt for utførelsen av hovedforsøket, men ville også redusert antall paralleller for begge tidsintervall. Det ville også vært gunstig å ha en positiv kontroll for apoptose, i tillegg til den negative kontrollen med vekstmedium. En positiv kontroll ville gitt en indikasjon på hvorfor det ikke ble detektert noe Bcl-2 i prøvene. Altså om cellene gikk mot apoptose på grunn av andre faktorer enn IVM, eller om prosedyren ikke var optimalisert godt nok.

5.4.1 SDS-PAGE

For 24-timers intervallet ble det brukt 300 μL RIPA-buffer, basert på tidligere testforsøk. Det var uklart hvor mye RIPA-buffer som burde benyttes. Et for stort volum RIPA-buffer vil kunne gi en fortyningseffekt, som kunne gjort det vanskelig å detektere lavt uttrykte proteiner. En mindre mengde RIPA-buffer ville gitt større konsentrasjon av proteiner i prøvene, og gjort det mulig å standardisere proteinkonsentrasjoner på tvers av alle gelene. Dette hadde vært gunstig for de membranene som fikk lite resultat grunnet lav konsentrasjon, og gjort det mulig å sammenligne alle parallellene. For 72-timers intervallet ble det utregnet mengde RIPA-buffer basert på konfluenstabell fra Thermo Fisher (92) og prosedyre (76). 100 % konfluens og et forhold på 1 ml buffer per 75 cm^2 celleflaske, med 5×10^6 HeLa eller A431 celler ga 240 μL med RIPA-buffer. Ettersom det ble brukt cellebrett og A549 celler i dette studiet, er volumet en tilnærming. Det kunne antageligvis blitt brukt mindre volum av RIPA-buffer, da 200 μL per 1×10^6 celler er tilstrekkelig for lysering (76). Lasting av prøvene på gelene var også et mulig optimaliseringspunkt, som kunne gitt bedre resultat ved utførelse. For 24-timers intervallet ble det lastet 10 μL prøve, som følge av at 20 μL under testforsøk 2 så ut til å mette brønnene, da det fløyt over. Dette kan skyldes for hurtig pipettering ned i brønnene.

For 72-timers intervallet ble det brukt 25 μL . Volumet for dette intervallet ble basert på svake eller ikke-eksisterende bånd for 24-timers intervallet (se figur 26). Et volum rett under kapasiteten til brønnene på 30 μL ville gi et godt utslag med proteinbånd. Etter testforsøk 2 ble det bestemt å utføre 24-timers intervallet uten farging under SDS-PAGE. Farging/avfarging av gelene er en tidskrevende prosess og er ikke nødvendig for å utføre Western blotting. Fordelene ved farging er bekreftelse på at separering har funnet sted og at det finnes proteiner i prøvene som skal bli analysert. Det kan også brukes til å gi en indikasjon på om apoptosemarkørene er til stede i prøven, og det gir en visuell veiledning for klipping av membranene. Brett 1 og 2 fra 24-timers intervallet ble ikke farget, og dette førte til problemer rundt klipping av membranene. Ettersom disse brettene ikke fikk resultat ved immunodeteksjon, ble brett 3 og 4 satt til farging og avfarging over to døgn for å få nok tid til å revidere prosedyren. Denne utsettelsen førte til at membranene fra brett 3 og 4 ble liggende flere dager i PBS. Disse membranene fikk svakere resultat (se figur 26). PBS ser ikke ut til å ha svekket styrken på proteinbåndene, siden brettene hadde lavest proteinkonsentrasjon av alle parallellene (se tabell 4). Membranene som lå i PBS mistet derimot mye av fargingen, som førte til samme problem rundt klipping. Fra figur 15 og 16 er det tydelige bånd hvor proteinstigen har en kDa på 37, som kan vise til GAPDH i prøvene langs båndene midt på gelen. Dette ble senere bekreftet å være GAPDH etter Western blotting,

da disse båndene endret farge etter inkubering med antistoff og substrat (se figur 26). For proteinmarkørene Bax og Bcl-2 er det ikke mulig å observere bånd etter SDS-PAGE, spesielt for 24-timers intervall, hvor konsentrasjonen av proteiner var relativt lave. Figur 15 og 16 viser ikke til noen merkbare bånd rundt 21-26 kDa. SDS-PAGE er en separeringsmetode og brukes generelt ikke til å observere proteiner i prøven, men heller gi en bekreftelse på at prøvene inneholder proteiner og at separeringen var vellykket. I 72-timers intervallet ble alle gelene farget, samt avfarget over natten. Grunnet mangel på Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution ble ikke gelene fullstendig avfarget (Vedlegg A.2.9). Dette førte til en kraftig blåfarge på alle gelene fra 72-timers intervallet og påfølgende membraner (Vedlegg A.3.2). Fargen førte til samme problem som for resten av membranene, i forhold til klipping. Det var uklart både hvor proteinstigen var og båndene med proteiner. Dette kan ha ført til uklare resultater for GAPDH ved flere membraner (se figur 27). Disse problemene rundt farging førte også til at det ikke var mulig å få en indikasjon på mulig tilstedeværelse av markørene, som er en av fordelene ved farging. Av denne grunnen ble ikke bildene fra disse gelene inkludert i resultatet. Båndene kunne ha gitt en antydning på feil i prosedyren som ble brukt, ettersom det ikke ble observert Bcl-2, selv etter immunodeteksjon. Dette strider med resultatene til Bax, hvor det ble observert bånd etter Western blotting, til tross for utydelige bånd på gelene.

5.4.2 Western Blot

Under hovedforsøket ble det brukt to ulike prosedyrer for immunodeteksjon, og samme prosedyre for blotting (Vedlegg A.2.12). Den første prosedyren for immunodeteksjon (Vedlegg A.2.15) ble brukt til 24-timers intervallet, og den andre prosedyren (Vedlegg A.2.17) ble brukt til 72-timers intervallet, etter mangel på resultat ved 24-timers intervallet. Grunnen til endringen i prosedyre for immunodeteksjon, var at både testforsøk 2 og 24-timers intervallet ga lite til ingen resultat. Det var uklart om dette var på grunn av proteinkonsentrasjoner eller mangel på optimalisering ved prosedyren. Den minste proteinmengden som ble lastet på en gel ved 24-timers intervall var ca. 10 µg, som ligger innenfor anbefalt mengde (94). Testforsøket var derimot på nedre grense av optimal proteinmengde, på ca. 2 µg protein. Ettersom hovedforsøket hadde fem ganger proteinmengden til testforsøket og fortsatt fikk relativt svake resultater, var det mulig at prosedyren ikke var optimalisert nok for cellene, proteinene eller antistoffene som ble brukt. Ved 72-timers intervallet ble andre prosedyre for immunodeteksjon (Vedlegg A.2.17) benyttet. Det ble utført immunodeteksjon av de fire siste membranene fra 24-timers intervallet, sammen med membranene fra 72-timers intervallet. Resultatene tyder på at endringen i

prosedyre ikke hadde en vesentlig effekt. Som vist i tabell 4, hadde de fire siste membranene fra 24-timers intervallet lavest proteinkonsentrasjon blant parallellene, og fikk ingen resultat. Derimot hadde de fire første membranene fra 24-timers intervallet større proteinkonsentrasjon, og fikk tydelige bånd etter immunodeteksjon (se figur 26). Disse tydelige båndene ble observert til tross for at ulike prosedyrer ble benyttet. Dette tyder på at proteinkonsentrasjonen var mest avgjørende for deteksjon av bånd på membranene. Tabell 4 tyder også på at grensen for å detektere Bax ligger et sted mellom 14.5-17 µg protein, ettersom brett 1 fikk påvist Bax, mens brett 2 ikke fikk påvist Bax (se figur 26). I tillegg var konfluens tilnærmet 100 % for begge intervaller, som vist i tabell 2 og 3 og burde gitt lik mengde GAPDH for alle prøvene. Dette ble ikke observert.

Det ble ikke detektert Bcl-2 på noen av membranene, uavhengig av proteinmengde. Bcl-2 ble fortynnet med samme forhold som Bax, 1:500, siden leverandøren ikke oppga noe forhold til fortynning (84). Dette kan være en av grunnene til mangel på Bcl-2 ved prøvene, ettersom for lav konsentrasjon av antistoff er en av årsakene til mangel på bånd (96). I tillegg var alle testene i hovedforsøket utført ved høy konfluens (~100 %). På grunn av utilstrekkelig med næring ved høy konfluens vil veksten av cellene kunne hemmes, og Bcl-2, et anti-apoptosisk protein, vil nedreguleres som følge av dette. Siden Bcl-2 ikke ble detektert ved kontrollene, og begge feilkildene nevnt vil kunne gi dette utfallet, er begge antagelige årsaker. For Bax ble det kun detektert proteinbånd ved proteinmengde ≥ 17 µg. Ut ifra figur 26 ser det ut som 17 µg er ca. nedre grense for deteksjon, ettersom båndene er veldig svake. For 72-timers intervallet er det tydelige bånd for alle Bax membranene, hvor proteinmengden lastet går fra ca. 40-70 µg. Brett 3 og 4 i figur 27 ser ut til å ha for mye protein lastet, da GAPDH båndene ikke har klart å samle seg godt nok. Det ble ikke observert noe variasjon innad i membranene for Bax, som ikke ble gjenspeilet i loading kontrollen GAPDH. GAPDH er et normaliseringsprotein som viser relativ mengde protein i hver prøve. Lik variabilitet mellom Bax og GAPDH betyr at eventuelle variasjoner på båndene for Bax skyldes ulike mengder proteiner, ikke ulike mengder Bax mellom de forskjellige prøvene. Ulike mengder proteiner mellom prøvene kan komme fra blant annet lasting av gelene eller dårlig overføring fra geler til membraner. Membranene hadde heller ingen vesentlige forskjeller fra IVM prøvene og kontrollene, for verken Bax eller GAPDH. Dette er fundamentalt for funksjonen GAPDH har som loading kontroll, siden cellen ikke endrer regulering av proteinet som følge av stress. For Bax viser mangel på variasjon mellom båndene at IVM ikke hadde vesentlig effekt på regulering av proteinmarkøren i cellene. Siden Bax ble detektert, tyder det på at cellene har gått mot apoptose, da Bax er et pro-apoptotisk

protein og oppreguleres i celler som går mot apoptose. Siden alle prøvene hadde tilnærmet 100 % konfluens, ble det vanskelig å verifisere effekten av IVM på regulering av Bax, ettersom cellene kunne blitt påvirket av veksthemming.

Ifølge prosedyren for deteksjon med ECL substrat (Vedlegg A.2.17) skulle membranene være dekket i substratet. Grunnet mangel på reagens ble volumet fordelt jevnt utover alle membranene. Inkuberingstiden økte fra 5 minutter (Vedlegg A.2.16) til 5-15 minutter for å kompensere for dette. For de fire første membranene ved 24-timers intervallet ble inkuberingen foretatt i falconrør med kontinuerlig rulling. Dette ble gjort til tross for at prosedyren tilsier flat overflate uten agitasjon. Dette kan ha påvirket reaksjonen mellom substratet og HRP, og kan forklare forsinket deteksjon ved disse membranene.

5.5 Videre forskning

I denne studien ble det observert økt ekspresjon av Bax i A549 celler. Ut ifra resultatene i studiet var det ikke mulig å identifisere om IVM var årsaken til denne ekspresjonen. Det er uklart hva økningen i uttrykk av Bax stammer fra. For videre forskning anbefales det å inkludere flere paralleller og optimalisere prosedyren. Bruk av tellekammer anbefales for mer presis kvantifisering av celleantall. Det vil også anbefales å bruke flere analyseteknikker, da dette bedre vil dokumentere effekten IVM har på cellene.

I studien til Shican Zhou, *et al.* (63) om IVM sin innvirkning på tarmkreft ble Western Blot anvendt. Det ble sett på endringer til apoptosemarkørene Bax, Bcl-2, PARP og kløyyet PARP i tarmkreft, etter behandling med IVM. Studien viste at ekspresjonen av det pro-apoptotiske proteinet Bax økte og uttrykket av det anti-apoptotiske proteinet Bcl-2 ble nedregulert. Dette tydet på at cellene begynte å gå mot apoptose. Flow cytometri støttet dette ved å se på nivået av ROS i cellene, og studien viste at ROS økte når cellene ble behandlet med IVM. Økt ROS fører til økt ekspresjon av Bax, som videre fører til apoptose (22, 63). Ved å bruke disse to analysemetodene, kan hver metode lettere bekreftes og det kan vurderes om IVM hadde en effekt.

Det var generelt høy konfluens i brønnene, og ved cellebrettene fra 72-timers intervallet hadde brønnene en konfluens på 100 %. Dette kan være grunnen til at det kun ble observert uttrykk av Bax i membranene, og ikke Bcl-2. På grunn av denne usikkerheten kunne det vært interessant

å teste IVM på celler som ikke hadde vokst seg 100% konfluente. Det kan tyde på at metoden har fungert for IVM på A549 celler, og gitt uttrykk av Bax. For videre forskning kunne det vært gunstig å teste ulike konsentrasjoner av IVM, ulike antistoffkonsentrasjoner og optimalisere tidsintervall. Det kunne også vært aktuelt å teste flere apoptosemarkører, for å se om andre markører passer bedre til prosedyren og A549 cellene.

6 Konklusjon

A549 celler behandlet med IVM viste oppregulering av apoptosemarkøren Bax. Dette indikerer at prosedyren kan brukes for påvisning av Bax. Det er usikkert om oppreguleringen skyldes overvekst eller IVM. Proteinbånd for Bax ble observert ved Western blotting, men viste ingen vesentlig forskjell på bånd behandlet med og uten IVM. Dette viser til pro-apoptotisk proteinmarkør Bax i prøvene, men indikerer at andre faktorer enn IVM, blant annet overvekst, kan ha påvirket mengden Bax hos cellene. For anti-apoptotisk proteinmarkør Bcl-2 ble det ikke observert noen bånd ved Western blotting, uavhengig av behandling. Dette indikerer at andre faktorer enn IVM kan ha medført induksjon av apoptose. Ettersom kontrollene ikke kunne brukes som referanse, er det vanskelig å utlede noe om effekten av IVM i dette studiet. Det ville vært hensiktsmessig å optimalisere prosedyren om studiet skulle blitt repetert.

Litteraturliste

1. A A, X J, V A, P V. M. L-Cysteine capped zinc oxide nanoparticles induced cellular response on adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells using a conventional and organ-on-a-chip approach. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internett]. [hentet 11. april 2024]1. mars 2022;211:112300. Tilgjengelig fra: doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.112300. Epub 2021 Dec 28. PMID: 34974288.
2. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. *Nat Rev Clin Oncol* 17, 395-417 (2020) [hentet 11. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.nature.com/articles/s41571-020-0341-y>
3. Chuwen L, Song H., Huang C, Yao E, Gacayan, R, & Chuang, Alveolar type II cells possess the capability of initiating lung tumor development. *PloS one*, 7(12), e53817 (2012) [Internett]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053817>
4. Tang M, Hu X, Wang Y, Yao X, Zhang W, Yu C, mfl. Ivermectin, a potential anticancer drug derived from an antiparasitic drug. *Pharmacol Res.* 2021;163:105207. [Hentet 23. mars 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1016/j.phrs.2020.105207
5. Araya LE, Soni IV, Hardy JA, Julien O. Deorphanizing Caspase-3 and Caspase-9 Substrates In and Out of Apoptosis with Deep Substrate Profiling. *ACS Chem Biol.* 19. november 2021;16(11):2280–96. [Hentet 24. mars 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1021/acschembio.1c00456
6. Zhou Z, Arroum T, Luo X, Kang R, Lee YJ, Tang D, mfl. Diverse functions of cytochrome c in cell death and disease. *Cell Death Differ* 31, 387-404 (2024). 23. mars 2024. [Hentet 24. mars 2024] Tilgjengelig fra: doi: 10.1038/s41418-024-01284-8
7. DMSO, Anhydrous [Internett]. Thermo Fisher [Hentet 11. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D12345>
8. Bovine Serum, certified, United States [Internett]. Thermo Fisher [Hentet 11. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16000044>
9. Kåss E. in vitro. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [Hentet 11. april 2024]. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/in_vitro

10. Ashour DS. Ivermectin: From theory to clinical application. *Int J Antimicrob Agents*. 1. august 2019;54(2):134–42. [Hentet 23. April 2024]. Tilgjengelig fra DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.05.003
11. Chiu CH, Leu JD, Lin TT, Su PH, Li WC, Lee YJ, Et.al. Systematic Quantification of Cell Confluence in Human Normal Oral Fibroblasts. *Appl Sci*. januar 2020;10(24):9146. [Hentet 23. april]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.3390/app10249146>
12. Bio-Rad. 10x Phosphate Buffered Saline (PBS) #1610780. Bio-Rad [Hentet 11. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/en-no/sku/1610780-10x-phosphate-buffered-saline-pbs?ID=1610780>
13. Tufa TB, Guta A, Tufa TB, Nigussie D, Beyi AF, Gutema FD, Et.al. Efficacy of Penicillin–Streptomycin Brands against *Staphylococcus aureus*: Concordance between Veterinary Clinicians’ Perception and the Realities. *Antibiotics*. mars 2023 14;12(3):570. [Hentet 24 april 2024]. Tilgjengelig fra; doi: 10.3390/antibiotics12030570. PMID: 36978437
14. He L, Pu W, Liu X, Zhang Z, Han M, Li Y, Et.al. Proliferation tracing reveals regional hepatocyte generation in liver homeostasis and repair. *Science*. 26. Februar 2021;371(6532):eabc4346. [Hentet 26. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1126/science.abc4346
15. Hva er kreft? [Internett]. Kreftforeningen. 2020 [Hentet 11. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/hva-er-kreft/>
16. Jiménez-Gaona Y, Vivanco-Galván O, Morales-Larreategui G, Cabrera-Bejarano A, Lakshminarayanan V. Outcome of Ivermectin in Cancer Treatment: An Experience in Loja-Ecuador. *Nurs Rep*. 22mars 2023;13(1):315–26. [Hentet 26. April 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.3390/nursrep13010030. PMID: 36976682
17. Farstad IN, Roald B. svulst. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [Hentet 24. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/svulst>
18. A549 CELL LINE. A549 Cell Line Transfection Protocol [Internett]. [Hentet 16. april 2024] Tilgjengelig fra: <https://a549.com>
19. Øye I. in vivo. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/in_vivo

20. Gro Audveig Hagen Bjørnøy. FLOW chart stress evaluation A549 2023. [Hentet 24. April].
21. Spence L. Cell culture guidelines. Abcam discover more [Internett]. [Hentet 24. april 2024]. Tilgjengelig fra: https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell_culture.pdf
22. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1. desember 2016;1863(12):2977–92. [Hentet 29. April 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012
23. NHI.no. Lungekreft [Internett]. NHI 2001. [Hentet 16. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/sykdommer/kreft/lunger-kreft/lungekreft>
24. Kreftforeningen. Lungekreft [Internett]. Kreftforeningen. 2020. [Hentet 16. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/kreftformer/lungekreft/>
25. NHI.no. Ikke-småcellet lungekreft [Internett]. NHI 2001. [Hentet 16. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/sykdommer/kreft/lunger-kreft/lungekreft-ikke-smacellet>
26. Skjønsberg OH, Hofslie E. Lungekreft [Internett]. I: Store medisinske leksikon 2023 [Hentet 16. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/lungekreft>
27. Kreftforeningen. Senskader etter kreftbehandling blant voksne [Internett]. Kreftforeningen 2020. [Hentet 16. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/senskader-voksne/>
28. Kreftforeningen. Cellegift [Internett]. Kreftforeningen 2020. [Hentet 16. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/behandling/cellegift/>
29. Martin RJ, Robertson AP, Choudhary S. Ivermectin: An Anthelmintic, an Insecticide, and Much More. *Trends Parasitol.* januar 2021;37(1):48–64. [Hentet 24. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1016/j.pt.2020.10.005
30. Li MY, Zhang J, Lu X, Zhou D, Deng XF, Liu QX, Et.al. Ivermectin induces nonprotective autophagy by downregulating PAK1 and apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1. januar 2024;93(1):41–54. [Hentet 25. april]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1007/s00280-023-04589-6.
31. Barbuto Ferraiuolo S, Cammarota M, Schiraldi C, Restaino OF. Streptomycetes as platform for

- biotechnological production processes of drugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1. januar 2021;105(2):551–68. [Hentet 26. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1007/s00253-020-11064-2.
32. Rabindra P, Raju N. Gel-Electrophoresis and Its Applications. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* [Internet]. InTech; 2012. [Hentet 8.mai 2024]. Tilgjengelig fra: <http://dx.doi.org/10.5772/38479>
33. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, Et.al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects. *J Clin Pharmacol.* oktober 2002;42(10):1122–33. [Hentet 29.april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1177/009127002401382731
34. Navarro M, Camprubí D, Requena-Méndez A, Buonfrate D, Giorli G, Kamgno J, mfl. Safety of high-dose ivermectin: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 1. april 2020;75(4):827–34. [Hentet 29.april 2024]. Tilgjengelig fra: doi:10.1093/jac/dkz524
35. Juarez M, Schcolnik-Cabrera A, Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Diaz-Chavez J, Duenas-Gonzalez A. Antitumor effects of ivermectin at clinically feasible concentrations support its clinical development as a repositioned cancer drug. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1. juni 2020;85(6):1153–1163. [Hentet 29.april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1007/s00280-020-04041-z
36. Emami J. In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications. *J Pharm Pharm Sci.* 2006;9(2):169-89. [Hentet 29.april 2024]. Tilgjengelig fra: PMID: 16959187
37. Bio-Rad. ECL Substrates for High-Sensitivity Western Blot Detection. Bio-Rad [siteret 6. mai 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/en-no/feature/ecl-western-blotting-substrates.html>
38. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Exp Cell Res.* 15. september 1998;243(2):359–66. [Hentet 29.april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1006/excr.1998.4172
39. Gro Audveig Hagen Bjørnøy. IBA procedure for stressresponse on A549 cells. NTNU i Ålesund; 2022. [Hentet 29.april 2024].
40. Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol.* mai 1988;93(3):472–83. [Hentet 29.april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1016/0041-008x(88)90051-8.

41. Carlton JG, Jones H, Eggert US. Membrane and organelle dynamics during cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2020;21(3):151–66. [Hentet 29.april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1038/s41580-019-0208-1
42. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* januar 2022;23(1):74–88. [Hentet 28.april 2024]. Tilgjengelig fra doi: 10.1038/s41580-021-00404-3.
43. Cell Confluency: Why It Matters and 3 Easy Methods [Internett]. *Cells and model organisms* 26.mai 2022. [Hentet 24. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://bitesizebio.com/63887/cell-confluency/>
44. Gro Audveig Hagen Bjørnøy. Celledyrking 2023. NTNU 2023. [Hentet 24.april 2024].
45. NTNU. CELLEDYRKING [Internett]. *Cellebiologi NTNU 2001* [sisert 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://folk.ntnu.no/bstokke/Sif4070/CellLab.pdf>
46. MedicineNet. In Vivo vs. In Vitro: Advantages & Disadvantages [Internett]. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: [In Vivo vs. In Vitro: Advantages & Disadvantages](#)
47. Eldrige L. What Do the Terms In Vivo and In Vitro Mean? [Internett]. *Verywell health* 11 mars 2024. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.verywellhealth.com/what-does-in-vivo-and-in-vitro-mean-2249118>
48. ATCC. A549-CCL-185™ [Internett]. ATCC 2020. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.atcc.org/products/ccl-185>
49. Straube T, Müller C, Perestrelo AR. How to do a Proper Cell Culture Quick Check [Internett]. *Leica Microsystems* 6. februar 2023. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>
50. Hauseman ZJ, Harvey EP, Newman CE, Wales TE, Bucci JC, Mintseris J, Et.al. Homogeneous Oligomers of Pro-apoptotic BAX Reveal Structural Determinants of Mitochondrial Membrane Permeabilization. *Mol Cell.* juli 2020;79(1):68-83.e7. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.029
51. van Delft MF, Huang DC. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res.* februar 2006;16(2):203–13. [Hentet 20. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1038/sj.cr.7310028

52. Moldoveanu T, Czabotar PE. BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* april 2020;12(4):a036319. [Hentet 20. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1101/cshperspect.a036319
53. Singh G, Guibao CD, Seetharaman J, Aggarwal A, Grace CR, McNamara DE, Et.al. Structural basis of BAK activation in mitochondrial apoptosis initiation. *Nat Commun.* 11. januar 2022;13(1):250. [Hentet 20. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi 10.1038/s41467-021-27851-y.
54. Czabotar PE, Garcia-Saez AJ. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* oktober 2023;24(10):732–48. [Hentet 20. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1038/s41580-023-00629-4
55. Hantusch A, Das KK, García-Sáez AJ, Brunner T, Rehm M. Bax retrotranslocation potentiates Bcl-xL's antiapoptotic activity and is essential for switch-like transitions between MOMP competency and resistance. *Cell Death Dis* 9 430. 22. mars 2018;9(4):1–13. [Hentet 20. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0464-6>
56. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol* [Internett]. 12. oktober 2022 [Hentet 15. april 2024];12. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
57. Liu Z, Wild C, Ding Y, Ye N, Chen H, Wold EA, Et.al. BH4 domain of Bcl-2 as a novel target for cancer therapy. *Drug Discov Today.* juni 2016;21(6):989–96. [Hentet 15. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1016/j.drudis.2015.11.008
58. Lopez A, Reyna DE, Gitego N, Kopp F, Zhou H, Miranda-Roman MA, Et.al. Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer. *Nat Commun.* 7. mars 2022;13(1):1199. [Hentet 15. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28741-7>
59. Zou P, Chen M, Ji J, Chen W, Chen X, Ying S, Et.al. Auranofin induces apoptosis by ROS-mediated ER stress and mitochondrial dysfunction and displayed synergistic lethality with piperlongumine in gastric cancer. *Oncotarget.* 28. september 2015;6(34):36505–21. [Hentet 18. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.18632/oncotarget.5364

60. Elkholi R, Floros KV, Chipuk JE. The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes Cancer*. Genes Cancer 1. mai 2011;2(5):523–37. [Hentet 18. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi:10.1177/1947601911417177
61. Zhang P, Zhang Y, Liu K, Liu B, Xu W, Gao J, mfl. Ivermectin induces cell cycle arrest and apoptosis of HeLa cells via mitochondrial pathway. *Cell Prolif. Mars* 2019;52(2):e12543. [Hentet 18. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1111/cpr.12543.
62. Green DR. The Mitochondrial Pathway of Apoptosis Part I: MOMP and Beyond. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5. januar 2022;14(5):a041038. [Hentet 28. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1101/cshperspect.a041038
63. Zhou S, Wu H, Ning W, Wu X, Xu X, Ma Y, mfl. Ivermectin has New Application in Inhibiting Colorectal Cancer Cell Growth. *Front Pharmacol [Internett]* august 2021 13; 12:717529. [Hentet 16. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.3389/fphar.2021.717529.
64. Al-Amrani S, Al-Jabri Z, Al-Zaabi A, Alshekaili J, Al-Khabori M. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World J Biol Chem*. 27. september 2021;12(5):57–69. [Hentet 16. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.4331/wjbc.v12.i5.57
65. Protein Purification Methods [Internett]. Foundations of clinical sciences. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: [Protein purifications methods](#)
66. Overview of Electrophoresis [Internett]. Thermo Fisher [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: [Overview of Electrophoresis](#)
67. Bio-Rad Bulletin. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection [Internett]. Bio-Rad; 2013. [Hentet 17.april 2024]. Tilgjengelig fra: [Guide to polyacrylamide gel](#)
68. Bio-Rad. Comparative Proteomics Kit I: Protein Profiler Module [Internett]. Bio-Rad. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10004530.pdf>
69. Bio-Rad. Detection Methods [Internett]. Bio-Rad. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/en-no/applications-technologies/detection-methods?ID=LUSQ6KKG4>
70. Thermo Fisher. Overview of Western Blotting [Internett]. Thermo Fisher. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: [Overview of Western Blotting](#)

71. Thermo Fisher. Chemiluminescent Western Blotting [Internett]. Thermo Fisher. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: [Chemiluminescent Western Blotting](#)
72. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*. 5 februar 2005;5(2):566–71. [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1002/pmic.200400941.
73. En studie av effekten Ivermectin har på celleproliferasjon og cellyklus til A549-celler [Internett]. NTNU 2022. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: [En studie av effekten Ivermectin har på celleproliferasjon og cellyklus til A549-celler](#)
74. En studie om effekten av Ivermectin på celleproliferasjon og cellevekst hos cellelinjen Caco-2. NTNU 2022. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: no.ntnu:inspera:147337496:148956899.pdf (9.046Mb)
75. Thermo Fisher. Thawing Frozen Cells [Internett]. Thermo Fisher Scientific. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/thawing-cells.html>
76. Thermo Fisher. RIPA Lysis and Extraction Buffer [Internett]. Thermo Fisher Scientific 2020. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: [RIPA lysis and Extraction buffer](#)
77. Thermo Fisher Scientific. Qubit™ Protein BR Assay Kit [Internett]. Invitrogen 2021. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: [Qubit Protein BR Assay kit](#)
78. Gro Audveig Hagen Bjørnøy. Protein Profile og Western blot for myosin og aktin på fiskemuskel. NTNU i Ålesund; 2022.
79. Bio-Rad. explorer.bio-Rad.com. Comparative Proteomics Kit II: Western Blot Module. Bio-Rad. [siteret 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: [Comparative Proteomics Kit II: Western Blot Module](#)
80. Bio-Rad. Instructions for staining crylamide gels [Internett]. Bio-Rad. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4307051.pdf>

81. Bio-Rad. Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution #1610436 [Internett]. Bio-Rad [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/en-no/sku/1610436-coomassie-brilliant-blue-r-250-staining-solution?ID=1610436>
82. Bio-Rad. 10x Tris/Glycine/SDS #1610732 [Internett]. Bio-Rad. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/en-no/sku/1610732-10x-tris-glycine-sds?ID=1610732>
83. Bio-Rad. Anti BAX Antibody [Internett]. Bio-Rad. [Hentet 27. april 2024] Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/polyclonal/human-bax-antibody-ahp2716.html>
84. Bio-Rad. Anti Human Bcl-2 Antibody, clone 100 (Monoclonal Antibody Antibody) [Internett]. Bio-Rad [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/monoclonal/human-bcl-2-antibody-100-mca1550.html>
85. Bio-Rad. Anti Human GAPDH Antibody [Internett]. Bio-Rad. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/monoclonal/human-gapdh-antibody-4g5-mca4740.html>
86. Bio-Rad. Anti Mouse IgG (Fc) Antibody [Internett]. Bio-Rad [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/polyclonal/mouse-igg-antibody-star120.html>
87. Bio-Rad. Anti Rabbit IgG (Fc) Antibody [Internett]. Bio-Rad. [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/polyclonal/rabbit-lapine-igg-antibody-star121.html>
88. Bio-Rad. Trans-blot turbo system [Internett]. Bio-Rad [Hentet 17. april 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000071567.pdf>
89. Bio-Rad. EveryBlot Blocking Buffer Instructions [Internett]. Bio-Rad. [Hentet 23. april 2024]. Tilgjengelig fra: [EveryBlot Blocking buffer instructions](#)
90. Bio-Rad. Clarity™ and Clarity Max™ [Internett]. Bio-Rad [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_10026527.pdf
91. Bio-Rad. Clarity™ og Clarity max™ Western ECL substrat [Internett]. Bio-Rad [Hentet 27. april 2024]. Tilgjengelig fra: [Clarity™ og Clarity max™ Western ECL substrat](#)

92. Bio-Rad. Useful Numbers for Cell Culture [Internett]. Bio-Rad [Hentet 3. mai 2024]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>
93. Thermo Fisher Scientific. Pierce® IP Lysis Buffer [Internett]. Thermo Fisher [Hentet 3. mai 2024]. Tilgjengelig fra: [Pierce® IP Lysis Buffer](#)
94. Bio-Rad. Quantitative Western Blot Analysis [Internett]. Bio-Rad [Hentet 2. mai 2024]. Tilgjengelig fra: [Quantitative Western Blot Analysis](#)
95. Sigma-Aldrich Documents. Detection methods: Nucleic acid labeling and detection. Sigma-Aldrich [Hentet 6. mai 2024]. Tilgjengelig fra: [Detection methods: Nucleic acid labeling and detection](#)
96. R&D Systems. Troubleshooting guide Western blot. [Hentet 6. mai 2024]. Tilgjengelig fra <https://www.rndsystems.com/resources/technical/troubleshooting-guide-western-blot>
97. Created with BioRender.com
98. Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev EM. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. Sci Rep. 2015 Oct 14;5:15159. [Hentet 20. mai 2024]. Tilgjengelig fra: doi: 10.1038/srep15159

Vedlegg

A.1 Reagenser

Reagenser	Produsent (Leverandør)	Artikkelnummer
A549 celler	ATCC	CCL-185
Ivermectin	Sigma-Aldrich	1003310507
Fetal Bovine Serum, Qualified, One shot	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)	A3160802
Dimethyl Sulfoxide for cell culture	PanReac Applichem	A3672
Penicillin-Streptomycin (Penstrep)	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)	15140122
0,2 mikroliter membrane sprøytefiler	PALL	4612
10 ml SOFT-JECT	HENK SASS WOLF	5100-000V0
Cell Scraper	Sarstedt	83.3950
Ham's F-12K (Kaighn's) Medium (HFKM)	Gibco™ (Thermo Fisher)	21127-022
1X Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)	14025092
Trypsin EDTA (0.25%), phenol red	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)	25200056
10X Tris/Glycine/SDS buffer	Bio-Rad	1610732
10X Phosphate Buffered Saline (PBS)	Bio-Rad	1610780
2x Laemmli sample buffer	Bio-Rad	1610737
Qubit™ Protein BR Assay Kit	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)	A50668
- Qubit Standard 1 0mg/ml BSA		1863696
- Qubit Standard 2 10mg/ml BSA		1863698
		1863695

- Qubit Protein BR Assay Buffer		1863692
- Qubit Protein BR Assay Reagent		
10 % Tween 20	Bio-Rad	1662404
Bio-Safe™ Coomassie stain	Bio-Rad	1610786S
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	Bio-Rad	161-0436
Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution	Bio-Rad	1610438
Mouse anti Human Bcl-2: Purified	Bio-Rad	MCA1550
Goat anti Mouse IgG (Fc): HRP	Bio-Rad	STAR120P
Rabbit anti Bax: Purified	Bio-Rad	AHP2716
Goat anti Rabbit IgG (Fc): HRP	Bio-Rad	STAR121P
Mouse anti Human GAPDH: Purified	Bio-Rad	MCA4740
EveryBlot Blocking Buffer	Bio-Rad	12010020
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad	1705060
Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well,	Bio-Rad	4569033
Trans-Blot® Turbo™ Mini 0.2 µm PVDF, Transfer Packs	Bio-Rad	1704156
Pierce™ RIPA Buffer	Thermo Scientific™ (Thermo Fisher Scientific)	89900
Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X) Kit	Thermo Scientific™ (Thermo Fisher Scientific)	78440 1861281

- Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)		
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards	Bio-Rad	1610375
Precision Plus Protein WesternC Standards	Bio-Rad	1610376

A.2 prosedyrer

A.2.1 Rutiner på cellelaboratoriet

Denne prosedyren beskriver rutiner på cellelaboratoriet som er viktig å følge for å forhindre kontaminasjon og spredning av cellematerialet. Prosedyren er utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag ved NTNU i Ålesund og brukt i emnet Anvendt bioteknologi (emnekode: MB301712) (39).

Før man går inn på laboratoriet:

1. Ta på skotrekk og sjekk om skiltet for UV-lys henger på døren. Om skiltet henger på døren må UV-lys skrus av så snart man går inn i laboratoriet.
2. Bruk alltid laboratoriefrakk og ta den på før du begynner arbeidet i laboratoriet. Langt hår må settes opp.
3. Vask hendene og ta på hansker. Spray etanol på hendene og gni over hele hansken. Spray så armene med etanol.
4. Løft opp glassdøren til LAF-benken og plasser beskyttelsesdeksel foran UV-lyset. Spray dekslene og skapet innvendig med 70 % etanol.
5. Skru på lyset i LAF-benken og start LAF-benken til arbeidsposisjon, benken er klar til bruk når den lyser grønt.
6. Tørk alltid opp søl umiddelbart og vask overflaten med 70 % etanol.
7. Alltid ha så få ting som mulig i skapet mens man jobber. Viktig å aldri dekke til luftfilteret, da vil luftstrømmen brytes. Luftstrømmen beskytter atmosfæren i skapet.
8. Alltid planlegg arbeidet du skal gjøre i skapet og legg alt du trenger inn i skapet før du begynner å jobbe. Alt man tar med inn i skapet skal sprayes med 70 % etanol. Spray armene med etanol før de tas inn i skapet.
9. Aldri åpne en flaske eller pipette før du går inn i LAF-benken. Ta på lokket så snart som mulig etter at du har tatt ut eller tilsatt noe. Når du skrur av lokket på en celleflaske eller mediumflaske må lukket plasseres med åpningen vendt ned i LAF-benken. Husk at LAF-benken er ren, og at det er større sjanse for kontaminering fra luften enn fra benkens overflate.
10. Sett opp et spillbeger for søl og brukte pipettespisser i LAF-benken. Tøm deretter dette i en avfallsbeholder for farlig avfall etter bruk.
11. Berør aldri en pipette direkte med hånden. Pipetten må ikke berøre noe annet enn det den skal suge opp eller levere. Hvis du er uheldig og kommer borti noe med

pipettespissen, må den kastes, og du må bruke en ny. Ikke fjern plasten fra pipettespissen før du er klar til å bruke den.

12. Ikke arbeid med to cellelinjer samtidig i samme LAF-benk. Dette kan føre til krysskontaminering, og det er ofte umulig å oppdage fordi cellene ser like ut.
13. Slå på UV lyset i 60 minutter hvis du skal bytte fra en cellelinje til en annen.
14. Bruk aldri samme pipette i forskjellige beholdere.
15. Prøv å ikke berøre flaskens hals med pipetten.
16. Vær så stille som mulig mens du jobber i LAF-benken. Føl deg fri til å bruke maske hvis du er forkjølet eller må snakke.
17. Jobb så raskt som mulig, men ikke la det gå på bekostning av nøyaktigheten. Cellene vokser best i riktig temperatur, og bør være så kort tid som mulig ved romtemperatur.
18. Sett cellene tilbake i inkubatoren etter du har fullført. Fjern alt fra LAF-benken og vask LAF-benken med 70 % etanol. Trykk på pilen ned for å lukke LAF-benken. Åpne døren til LAF-benken og lokkene foran UV-lysrørene. Plasser lokkene i LAF-benken og lukk døren.
19. Slå på UV-lyset i LAF-benken og forlat laboratorierommet umiddelbart. Laboratoriefrakker må oppbevares på cellelaboratoriet, og skotrekk/hansker må kastes som farlig avfall.

A.2.2 Tining av celler

Denne prosedyren beskriver tining av A549 celler som har vært oppbevart på frys i - 80°C. Prosedyren er basert på prosedyren til Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Institutt for biologiske fag ved NTNU i Ålesund, som er hentet fra Thermo fisher «Thawing Frozen Cells» (75).

1. Ta 7 ml medium i en celleflaske og sett det i inkubator ved 37°C for å varmes opp.
2. A549 cellene har vært oppbevart ved -80°C før de ble tatt ut for tining.
3. Tilsett 1 ml medium i røret med cellene for å tine dem.
4. Tilsett 4 ml medium i et falconrør og tilsett A549 cellene i medium.
5. Sentrifuger falconrøret i 5 minutter på 200g.
6. Etter sentrifugering sjekk røret for cellepellet og fjern supernatant.
7. Resuspender cellepellet med 1 ml medium.
8. Overfør til en 25 cm² celleflaske og inkuber ved 37°C med 5 % CO₂.

A.2.3 Splitting av celler

Prosedyren beskriver metoden for dyrking og celledeling. Det ble splittet i 25 cm² celleflaske, 75 cm² celleflaske og celledelt med seks brønner. Prosedyren er utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag ved NTNU i Ålesund (39).

1. Forbered LAF-benken og kontroller at UV kovyrene er på plass. Desinfiser alle overflater i benken ved å spraye dem med 70 % etanol. Vent til at både lampen for arbeidsstilling og viften lyser grønt, noe som indikerer at LAF-benken er klar til bruk.
2. Planlegg arbeidet:
 - a. Merk celleflasker tydelig med nummer, celletype, dato og egne initialer.
 - b. Finn fram alt utstyr og reagenser som trengs: HBSS, trypsin, pipettespisser, pipettepistol, falconrør (15 ml) og en beholder for søl i LAF-benken. Viktig at man sprayer alt med alkohol før man setter det inn i LAF-benken.
3. Sjekk konfluens ved å studere cellene i et invert mikroskop for å vurdere konfluensen.
4. Bruk en pipette for å fjerne gammelt vekstmedium fra cellene og overfør det til en beholder for søl.
5. Skyll cellene forsiktig med 2x3 ml HBSS for å fjerne eventuelle gjenværende kulturmedium. Beveg flasken frem og tilbake for hver gang HBSS tilsettes, fjern så saltløsningen og overfør til spillbeger.
6. Tilsett 0,5 ml 0,25 % trypsin, og sørg for at alle cellene er dekket. La trypsin virke i omtrent 5-10 min.
7. Bank forsiktig flasken mot baksiden av hånden og se på den i invert mikroskop. Når omtrent 80 % av cellene har løsnet, inaktiver trypsin ved å tilsette 4 ml vekstmedium. Viktig at dette gjøres i LAF-benken.
8. Bland cellekultur forsiktig ved å pipettere opp og ned og overfør til et 15ml falconrør. Skru toppen godt fast.
9. Sentrifuger celleduspensjonen i 3 minutter ved 1200 rpm og sjekk for cellepellet.
10. Fjern supernatanten over cellepellet og kast det i spillbegeret. Vær forsiktig og ikke sug opp cellepellet.
11. Tilsett 1 ml vekstmedium og pipetter opp og ned for å løsne cellepellet.
12. Tilsett 1 ml vekstmedium og pipetter opp og ned. (Det varierer hvor mye man fortynner basert på hvordan man skal splitte).

13. Tilsett 6 ml vekstmedium til en ren tom 25cm² celleflaske (dette kan gjøres i starten), og tilsett 1 ml cellesuspensjon. Roter flasken horisontalt for å blande det godt. Dette gjentas for alle flaskene som skal splittes.
14. Plasser begge celleflaskene i en CO₂ inkubator ved 37°C for å la cellene fortsette å vokse.
15. Kast alt avfall i farlig avfall. Tørk eventuelle søl og spray alle overflater med 70 % etanol. Fjern UV lys beskyttelsen og plasser dem inne i LAF-benken. Kast hansker og skotrekk i farlig avfall og sett på UV lys. Forlat labben umiddelbart.

A.2.4 Lysering av celler

Prosedyren beskriver lysering av celler før SDS-PAGE. Prosedyren er basert på «RIPA Lysis and Extraction Buffer» fra Thermo Fisher (76).

1. Aspirer gammelt medium fra brønnene med de adherente cellene.
2. Rens to ganger med iskald 1X PBS.
3. Tilsett kald RIPA-buffer til cellene. Bruk 1 ml buffer per 75 cm² flaske som inneholder 5 x 10⁶ HeLa eller A431 celler. Ha det på is i 5 minutter med delvis omrøring for å spre bufferen.
4. Skrap cellene til en side med celleskrape, og samle lysatet til en side og overfør til mikrosentrifugerør.
5. Sentrifuger ved 14 000g i 15 minutter for å samle celledebri.
6. Fjern supernatanten over cellepellet og overfør til nytt mikrosentrifugerør.
 - a. PBS må lages: 10X PBS fortynnes 1:10 i destillert vann.
7. 100X Fosfatase/protease inhibitor cocktail fortynnes 1:100 i RIPA-buffer. Viktig å vortexe og spinne inhibitor før bruk.

A.2.5 Prosedyre for Qubit™ Protein BR Assay Kit

Prosedyren beskriver hvordan hver prøve skal behandles for å kunne lese av proteinkonsentrasjonen. Prosedyren er hentet fra «Qubit™ Protein BR Assay Kit» som er utarbeidet av Thermo Fisher (77).

1. Finn frem Qubit rør og marker dem med standard 1 og 2, blank og prøver.

2. Lag til standardene ved å ta 20 µl av hver Qubit standard (1 og 2) og 150 µl av Qubit Protein BR Assay Buffer. Pippeter opp og ned for å mikse.
3. Lag til prøver ved å ta 20 µl av hver proteinprøve til prøverørene. Tilsett 150 µl Qubit Protein BR Assay Buffer og pipeter opp og ned for å mikse.
4. Lag til Sample buffer blank ved å ta 20 µl buffer til prøverøret og tilsett 150 µl Qubit Protein BR Assay Buffer og pipeter opp og ned for å mikse.
5. Tilsett 30 µl Qubit Protein BR Assay reagens til prøverørene, standard 1 og 2, og Sample Buffer Blank. Miks rett etter tilsetning og vortex i 5-7 sekunder. Sluttvolumet skal være 200 µl i hvert rør.
6. La alle tubene inkubere i 10 minutter. Står de lenger enn 1 time vil de miste fluorescens signalet.
7. Skru på Qubit™ 4 Fluorometer og velg «Protein broad range».
8. Sett inn standard 1 i Qubit™ 4 Fluorometer, steng lokket og trykk Read standard.
9. På samme måte som standard 1 analyser standard 2.
10. På skjermen velg sample volum og trykk 20 µl volum.
11. Sett inn Sample Buffer Blank og analyser den.
12. Sett i prøve rørene en etter en og trykk Read tube.

A.2.6 Utregning av volumprøve

Prosedyren viser fremgangsmåten for utregning av volum til prøvene som skulle lastes på gelen. Dette ble basert på de målte proteinkonsentrasjonene. Prosedyren er utarbeidet av gruppen med fortynningsformelen som utgangspunkt.

Velg den laveste konsentrasjonen som ble målt med Qubit™ 4 Fluorometer og bruk formelen:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

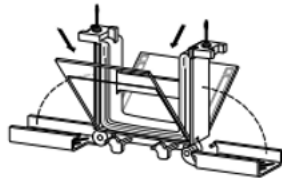
Snur den til formen $V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$

- V_1 Volumet av prøven som skal tilsettes
- V_2 Totalt ønsket volum
- C_1 Opprinnelig konsentrasjon
- C_2 Ønsket konsentrasjon

A.2.7 SDS-PAGE

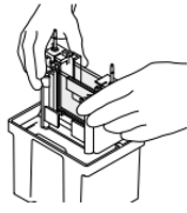
Prosedyren beskriver fremgangsmåten for SDS-PAGE og hentet fra Bio-Rad Expolorer med katalog nummer 1662800EDU (s. 25-27) (78, 79).

1. Merk 1.5 ml fliptop mikrotube for hver fiskeprøve. Merk også skrutoppen.
2. Tilsett 250 µl Bio-Rad Laemmli sample buffer til hvert mikrotube rør.
3. Kutt en bit av hver fiskemuskel 0.25 x 25 x 25 cm³ og overfør hver bit til hvert sitt mikrotestrør.
4. Rør mikrorøret 15 ganger for å blande vevet i sample buffer.
5. Inkuber i 5 minutter i romtemperatur.
6. Overfør bufferen fra hvert mikrorør til et mikrorør med skrutopp. Ikke overfør fisken.
7. Varm opp prøven ved 95°C i 5 minutter i skrutopp mikrotuber.
8. Etter denaturering kan prøvene oppbevares i romtemperatur i opptil 3-4 timer før de skal på gelen, eller lagres ved -20°C i flere uker.
9. Sett opp Mini-PROTEAN® Tetra gel apparatet for å kjøre SDS-PAGE.
10. Forbered TXG™ kassetten ved å kutte langs den svarte linjen i bunnen av kassetten med barberblad og dra av plaststripen, som vist på gelkassetten.



Figur 19: Vertikal gelkassett

11. Fjern kammen som er plassert i kassetten.
12. Skyv begge gelene mot hverandre og sørg for at de er mot de grønne pakningene som er i klemmene. Sørg for at de korte platene sitter rett under hakkene, øverst på de grønne pakningene. Skyv de grønne klemmene over gelen og lås dem på plass.
13. Plasser gelkassett pakningen ned i elektroforesekommeret. Pass på at de røde pluggene er på samme side som den røde rundingen i kammeret.



Figur 20: Viser vertikal gelkassetten som settes inn i elektroforese kammer.

14. Forsiktig! Om det bare skal kjøres 1 eller 2 geler, ikke plasser det andre kammeret i elektroforesetanken. Dette vil føre til overdreven varmegenerering og forhindre elektroforetisk separasjon.
15. Hell 1x TGS elektroforesebuffer inn i det innerste kammeret, bufferen må dekke toppen av brønnene i gelkassetten. Det er viktig å sjekke om gelene er helt nedsenket i bufferen. Det er også viktig å sjekke for lekkasje (ca. 150 ml).
16. Tilsett så 1x TGS elektroforesebuffer i det ytre kammeret, opp til streken «2 gels».
17. Noter hvilken prøve som blir lastet inn i hvilken brønn på gelen.
18. Varm fiskeprøvene med aktin og myosin standard til 95°C i 2-5 minutter.
19. Tilsett 5 µl Precision Plus Protein Kaleidoscope prestained standard i den tredje brønnen.
20. Tilsett så 5 µl av hver prøve til hver sin brønn på gelen. Bruk en gel loading pipette spiss. Overfør prøvene veldig forsiktig for ikke å ødelegge gelen, proteinprøvene kan være litt seige å få ut.
21. Etter at prøvene er lastet på gelen, skyll brønnene med deionisert vann, dette kan hjelpe med å fjerne eventuelle luftbobler og urenheter.
22. Når alle prøvene og standardene er lastet på gelen, setter man lokket på gelen og kobler ledningene til strøm. Pass på å matche rød til rød og svart til svart. Angi så spenning 200V og kjør gelen i 30 minutter.
23. Etter at elektroforesen er ferdig slår man av strømforsyningen, kobler fra ledningene og fjerner lokket på elektroforesekammeret. Deretter løfter man ut gelkassetten.
24. Etter at gelen er ferdig så legger man gelkassetten flatt på benken med den korte platen vendt oppover.
 - a. Bruk en «gelåpningsnøkkel» for å forsiktig separere gelplatene. Gelen vil ofte være festet til en av platene.

- b. Overfør platen med gelen som er festet til den, over i en beholder som inneholder kranvann. Dette bidrar til å løsne gelen fra platen, ved å la den suge inn vannet. Man kan også løfte av hele gelen og legge den direkte i vannet.
- c. Skyll gelen 3 ganger med kranvann i 5 minutter. Gjør det ved å forsiktig tømme ut vannet fra beholderen og erstatt det med nytt vann. Skyllingen bidrar til å forbedre intensiteten av proteinbåndene på gelen.

A.2.8 Farging med Bio-Safe™ Coomassie stain

Prosedyren beskriver farging av gelen med Coomassie stain og er hentet fra Bio-Rad's prosedyre for farging av polyakrylamidgeler (80).

1. Vask gelene 3 ganger i 5 minutt med 200ml destillert vann for å fjerne SDS, som vil kunne forstyrre fargingen.
2. Fjern vannet fra gelene og tilsett 50 ml Bio-Safe™ Coomassie stain nok til at det dekker gelen.
3. La gelen stå på risting i 1 time. Proteinbånd vil bli synlig etter 20 minutter og når maksimum synlighet etter 1 time.
4. Rens gelen med 200 ml destillert vann i minst 30 minutter. Å rense gelen lenger vil bidra til å unngå bakgrunnsstøy. Fargede geler kan lagres i vann.

A.2.9 Farging med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution

Prosedyren beskriver farging med Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution. Prosedyren er hentet fra Bio-Rad sin nettside for Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (81).

1. Farg gelen i 1-2 timer på risting, kan farges over natten om det er ønskelig.
2. Avfarg gelen med Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution flere ganger frem til bakgrunnen er mindre mørk, f.eks: 4 vask x 30 minutter.

A.2.10 Tillaging av runningbuffer

Prosedyren beskriver hvordan runningbuffer forberedes, dette er hentet fra Bio-Rad nettside (82).

1. 10x Tris/Glycine/SDS må fortynnes til arbeidsløsning ved hjelp av destillert vann.

2. Skal man lage 1 liter løsning må man ha 100 ml 10x Tris/glycine/SDS og og 900 ml destillert vann.

A.2.11 Fortynning av antistoffer

Ikke alle antistoffene hadde informasjon om fortynning. Prosedyrene er hentet fra Bio-Rad sin nettside. Det var noen av antistoffene som manglet prosedyre. Bcl-2 var en av antistoffene som ikke hadde noen fortynningsfaktor på Bio-Rad sine nettsider, det ble dermed brukt samme fortynning som Bax. GAPDH manglet også prosedyre, og fortynning ble bestemt etter veiledning fra Bio-Rad. Antistoffene skulle blandes ut med EveryBlot blocking buffer (83-88).

Primære antistoff

Bax: Rabbit anti-Bax

- Minimum fortynning 1:500
- Maksimum fortynning 1:2000

Bcl-2: Mouse anti-Human Bcl-2

- Minimum fortynning 1:500
- Maksimum fortynning 1:2000

GADPH: Mouse anti human

- Fortynning 1:1000

Sekundære antistoff

Bax: Goat anti Rabbit IgG (Fc)

- Minimum fortynning 1:1000
- Maksimum fortynning 1:10 000

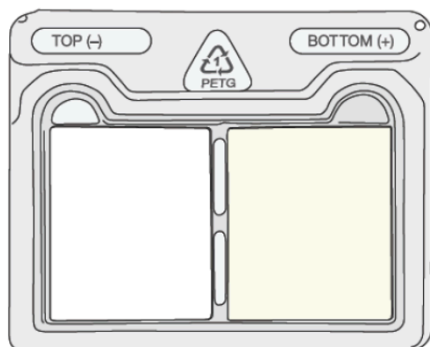
Bcl-2 Goat anti Mouse IgG (Fc)

- Minimum fortynning 1:1000
- Maksimum fortynning: 1:10 000

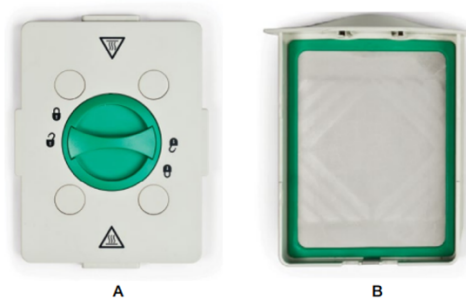
A.2.12 Western Blot

Denne prosedyren beskriver fremgangsmåten til starten av Western Blot og ble brukt gjennom hele studien. Prosedyren er hentet fra instruksjonsmanualen til Trans-Blot® Turbo™ (side 9-21) (78, 88).

1. Bruk alltid hansker under blotteprosessen for å forhindre kontaminering på gelene og membranene.
2. Bruk en linjal til å kutte toppen og bunnen av gelen.
3. Forberedelse av mini transferpakken:
 - a. Pakningen inneholder to ionreservoir stacks, en for anoden (positiv) og en for katoden (negativ). Reservoarene er plassert i høyre og venstre brønn i brettet.
 - b. Høyre brønn inneholder en stack for anoden som plasseres under gelen. Dette inkluderer også overføringsmembranen (Nitrocellulose).
 - c. Venstre brønn inneholder en stack for katoden, som skal plasseres over gelen.
 - d. Man kan bruke fingerbrønnen i brettet for enkelt å løfte opp og plassere ionreservoir stacks, i henhold til etikettene og plasseringene som er angitt på brettet. Stacken og membranene i høyre fingerbrønn, merket som (+) plasseres nederst i kassetten rett over anoden. Stacken i venstre er merket (-), og plasseres på toppen av transfergelen nærmest katoden.

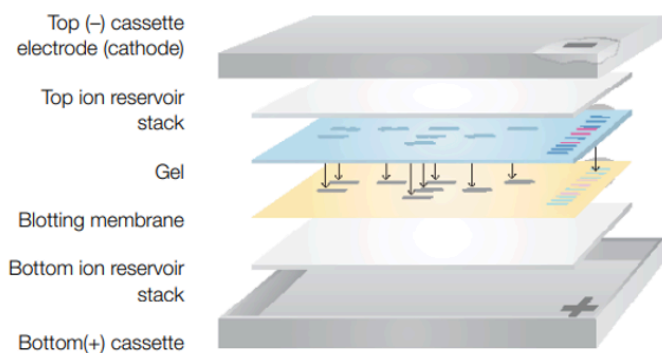


Figur 21: Viser mini transfer pack



Figur 22: Viser kassett med katode, A (-) og anode B (+)

4. Plasser gelen og overføringsmembranene i henhold til figur 22.

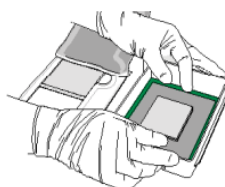


Figur 23: Viser gelkassett sandwich

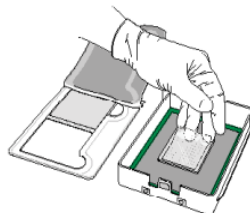
5. Følg instruksjonen på bildet:

- a. Legg ionereservoir stack med membranen (anode) i midten av kassetten. Sørg for at stacken ikke overlapper den grønne gummipakningen i basen. Dette er for å opprettholde god elektrisk kontakt under elektroforesen og unngå lekkasjer. Dette trinnet innebærer å forberede den nederste delen av kassetten.
- b. Plasser gelen forsiktig på membranen og sørg for at de er ordentlig justert. Hvis det er luftbobler mellom gelen og membranen, kan man bruke en blot-rulle for å forsiktig fjerne dem. Om man overfører to mini-geler, bør de plasseres på membranen slik at «føttene» på gelen vender mot hverandre. Dette innebærer å forberede gelen for overføring.
- c. Forsiktig plasser den andre ionereservoir stack (katode) på gelen. Dette legger til rette for elektroforeseprosessen.
- d. Bruk blott-rullen for å fjerne eventuelle gjenværende luftbobler i den monterte transferpakken, for å sikre at det er god kontakt mellom lagene. Dette sikrer at overføringen av proteiner fra gelen til membranen utføres jevnt og effektivt.

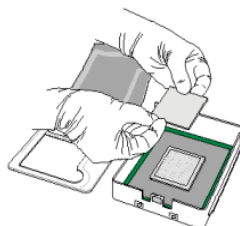
Lay the ion reservoir stack with the membrane (anode stack) in the center of the cassette base. Ensure that the stack is not overlapping the green rubber molding in the base.



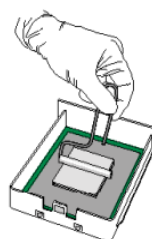
Carefully align the gel on the membrane. If necessary, gently use the blot roller to remove air bubbles between the gel and membrane. If transferring two mini gels, place them on the membrane so that the feet of the gels are facing toward each other.



Gently place the second ion reservoir stack (cathode stack) on the gel.

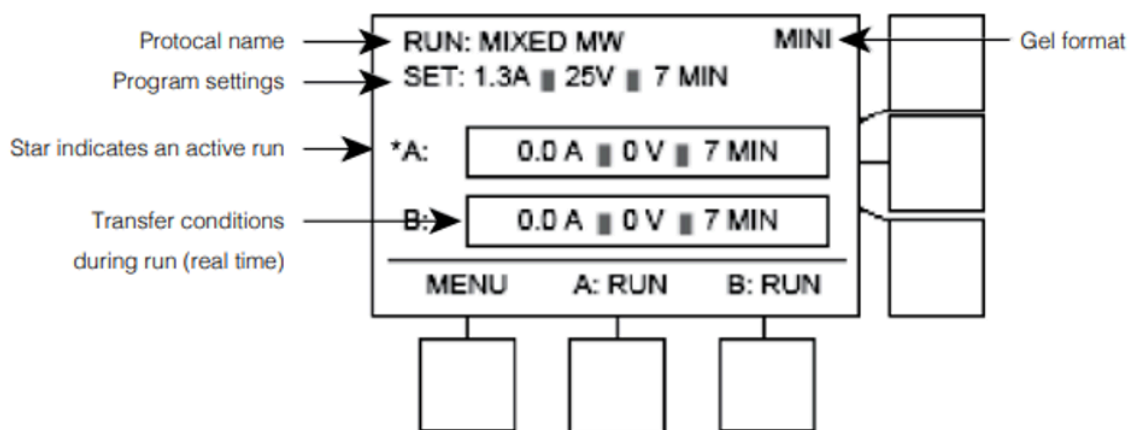


Use the blot roller to remove any air bubbles in the assembled transfer pack and provide consistent contact between the layers.



Figur 24: Viser hvordan mini format transfer pack settes sammen.

6. Når stackene og komponentene er riktig plassert i kassetbasen plasseres lokket på basen. Lokket er reversibelt, men man må sørge for at de elektriske kontaktene passer tett inn i sporet i basen. Trykk lokket ned og vri bryteren med klokken for å lukke låsepinnene i låsesporet. Dette sikrer at systemet er riktig forseglet og klart for elektroforese og proteinoverføring.
7. Skyv kassetten inn i brettene til Trans-Blot® Turbo™ instrumentet til den kommer i kontakt med det magnetiske interlock systemet i bakkant av instrumentkammeret, til et klikk høres. Dette sikrer at kassetten er riktig plassert i instrumentet og klar for prosessen.
8. Slå på transturbo systemet ved å bruke bryteren som er plassert på høyre side av instrumentet. Etter en innledende oppstartsskjerm vil systemet gå videre til hjemskjermen.



Figur 25: Viser hjem skjerm til Trans-Blot® Turbo™

9. Velg STANDARD SD forhåndsinnstilt protokollknapp for dette eksperimentet. Velg «mini gel» format.
10. Etter å ha fulgt protokollen, trykk på navigasjonsknappen som viser «A: RUN» for kassetten i det øvre brettet eller «B: RUN» for kassetten i nedre brett. Hvis man kjører begge kassetten, trykk på en av dem først, og deretter på den andre.
11. Protokollen vil kjøre automatisk, og skjermen vil vise forholdene for overføringen og fremgangen i kjøringen.
12. Når overføringsprotokollen er fullført, vil skjermen vise «RUN COMPLETE» og man hører et alarmsignal.
13. Fjern kassetten fra brettet ved å trekke den rett ut av instrumentet. LCD meny skjermen vil automatisk gå tilbake til protokollskjermen som nettopp ble fullført.
14. Lås opp kassetten ved å vri bryteren mot klokken til «lås opp»-posisjonen. Demonter blotting-sandwichen og legg membranen i en passende beholder.
15. Kast ion reservoir stack etter bruk: ikke bruk dem igjen. Tøm eventuell gjenværende væske fra kassetten. Hvis ingen ytterligere overføring skal utføres umiddelbart, skyll basen og lokket på kassetten med deionisert vann og tørk med et papirhåndkle.

A.2.13 Tillaging av vaskebuffer

Prosedyren beskriver tillaging av vaskebuffer som brukes til Western Blot. Hentet fra Bio-Rad explorer med katalog nummer: 1662800EDU, side 21 (79). Bland sammen 1X phosphate buffer saline med 0,025 % Tween 20. Volumene som var gitt i prosedyren vises under.

1. Destillert vann: 1 350 ml

2. 10x PBS: 150 ml
3. 10 % Tween 20: 3,75 ml

A.2.14 Blokking med EveryBlot Blocking buffer

Prosedyren beskriver fremgangsmåten for blokking med EveryBlot blocking buffer. Prosedyren er hentet fra Bio-Rad (89).

1. Tilsett Blot Blocking buffer til membranene og inkuber i 5 minutter på rullemaskin.

A.2.15 Inkubering av membranen med antistoffer

Prosedyren forklarer hvordan membranen inkuberes med primært og sekundært antistoff, samt vasketrinnene. Prosedyren er hentet fra Bio-Rad explorer med katalognummer: 1662800EDU, siden 63-64, (79).

1. Etter blokking tilsett 10 ml primært antistoff og inkuber 10-20 minutter på rullemaskin eller over natten. Lenger inkubasjonstid vil resultere i mer intense bånd.
2. Hell av det primære antistoffet.
3. Vask membranen med 50 ml vaskebuffer og kast vaskebufferen.
4. Tilsett ytterligere 50 ml vaskebuffer og da la ligge på rullebrett i 3 minutter. Kast vaskevæsken.
5. Inkuber membranen med 10 ml sekundært antistoff i 5-15 minutter på rullebrett. Lenger inkubasjonstid vil gi mer intense bånd.
6. Hell av sekundært antistoff.
7. Rens membranen med 50 ml vaskebuffer og kast væsken.
8. Tilsett ytterligere 50 ml vaskebuffer og la det ligge på rullebrett i 3 minutter. Om nødvendig kan membranen lagres over natten i vaskebuffer ved 4°C.

A.2.16 Clarity™ Western ECL Substrate

Prosedyren forklarer stegene etter immunodeteksjon og er hentet fra katalogen til Clarity™ Western ECL Substrates (90).

1. Etter immunodeteksjon behold membranen i vaskebuffer mens substratmikset lages.
2. Miks substrat kit komponentene i forhold 1:1. Lag 0,1 ml løsning/cm² membran.
 - a. For mini-size membran (7 x 8,5 cm), 7 ml løsning.

- b. For mid-size membran (8,5 x 13,5 cm), 12 ml løsning.
3. Inkuber membranen i substratet i 5 minutter,
4. Ta bilde av membranen med et digitalt bildeapparat eller eksponer den for røntgenfilm.

A.2.17 Blokking med Clarity™ og Clarity max™ Western ECL substrat

Prosedyren beskriver en annen framgangsmåte til blokking som ble brukt. Prosedyren er hentet fra Bio-Rad (91).

1. Vaskebuffer volum burde være minst 20 ml for mini blots og 100 ml for blots. Blokke buffer og antistoff burde være minst 10 ml for mini blots og 25 ml for midi blots.
2. Overfør membranen med proteinene til vaskebuffer i 3 minutter.
3. Inkuber membranen med proteinsiden opp i blokkebuffer i 1 time med kontinuerlig rulling.
4. Inkuber membranen i fortynnet primært antistoff i 1 time med kontinuerlig rulling.
 - a. Inkuberingen kan stå over natten i 4°C.
5. Vask membranen i vaskebuffer 5x5 minutter med kontinuerlig rulling.
6. Inkuber membranen i fortynnet sekundært antistoff i 1 time med kontinuerlig rulling.
7. Vask membranen i vaskebuffer 6x5 minutter med kontinuerlig rulling.
8. Behold membranen i vaskebuffer mens substratmiksen lages.
9. Miks substrat kit komponentene i forhold 1:1 og lag 0,1 løsning/ cm² membran.
 - a. Ved Mini størrelse membran (7 x 8.5 cm) er 7 ml løsning nok.
 - b. Ved Midi størrelse membran (8.5 x 13.5 cm) er 12 ml løsning nok.
10. Plasser membranen med protein siden opp på en klar overflate.
 - a. Tilsett substrat løsning og inkuber i 5 minutter.
 - b. Pass på at blotten er helt dekket med substrat slik at luftbobler unngås.
11. Fjern membranen fra substratløsningen og tørk den.
12. Plasser membranen i plastpapir så den ikke tørker.
13. Ta bilde av membranen med ChemiDoc™ MP.

A.2.18 Fotografering og redigering av membraner i Image Lab™ Software med ChemiDoc™ MP Imaging System

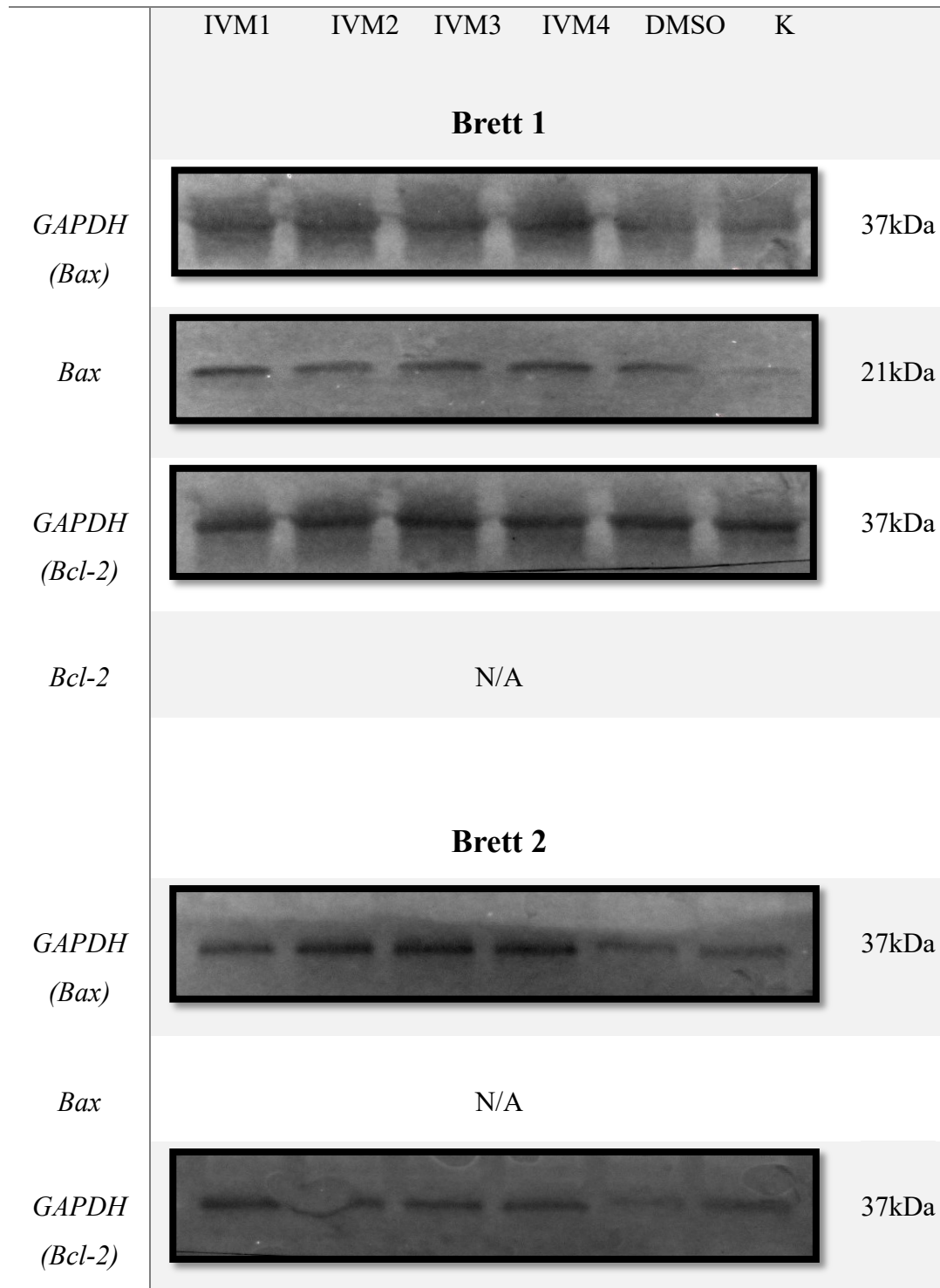
Prosedyren beskriver fremgangsmåten for fotografering og redigering av membraner etter utført immunodeteksjon. Prosedyren ble utarbeidet med veileder.

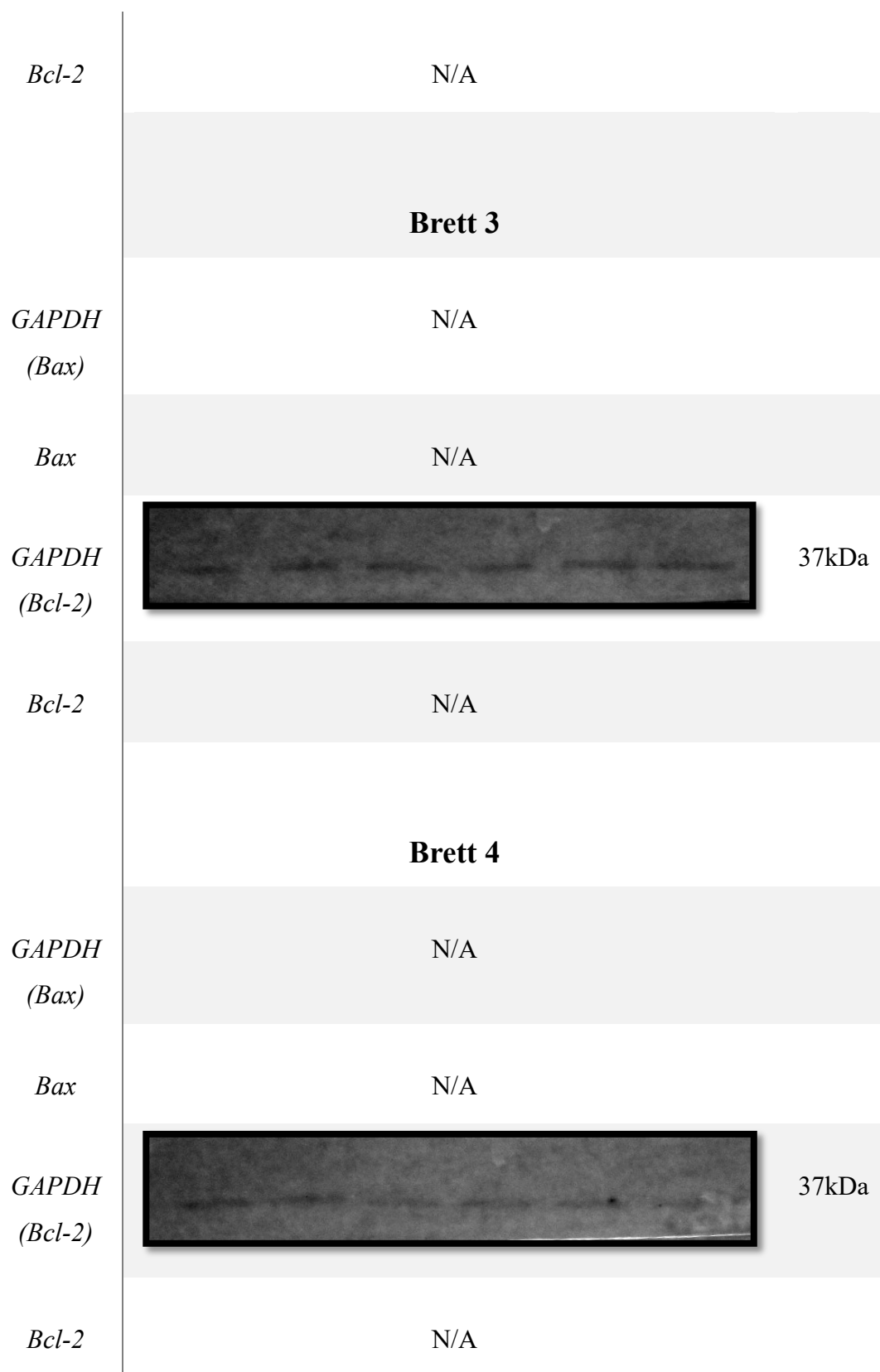
1. Skru på ChemiDoc™ MP Imaging System.
2. Start opp Image Lab™ Software Version 5.2.1 fra datamaskin tilkoblet ChemiDoc™ MP Imaging System.
3. Fra **Start Page** inne på Image Lab™ Software, velg **New Single Channel** under **Protocols**.
4. Fra **Protocol Setup** under **1. Gel Imaging & Applications**, trykk **select**, **Blots** og **Stain Free Blot**.
5. Åpne nedre skuff på ChemiDoc™ MP Imaging System og legg inn den våte membranen som skal fotograferes, og lukk skuffen.
6. Trykk **Position Gel** på Image Lab™ Software.
7. Åpne øvre luke på ChemiDoc™ MP Imaging System og juster membranen etter justeringsrutenettet på datamaskinen, og lukk luken.
8. Når membranen er på plass, trykk **Run Protocol**.
9. Etter prokollen er kjørt, trykk **Image Transform** for å endre eksponeringen til bildet.
10. Juster skyveknappene **Høy**, **Low** & **Gamma** etter behov for å få fargeprofilen en vil ha.

Vedlegg A.3

A.3.1.1 Western Blot resultat fra 24-timers intervall

IVM (5 μ M; 24t)

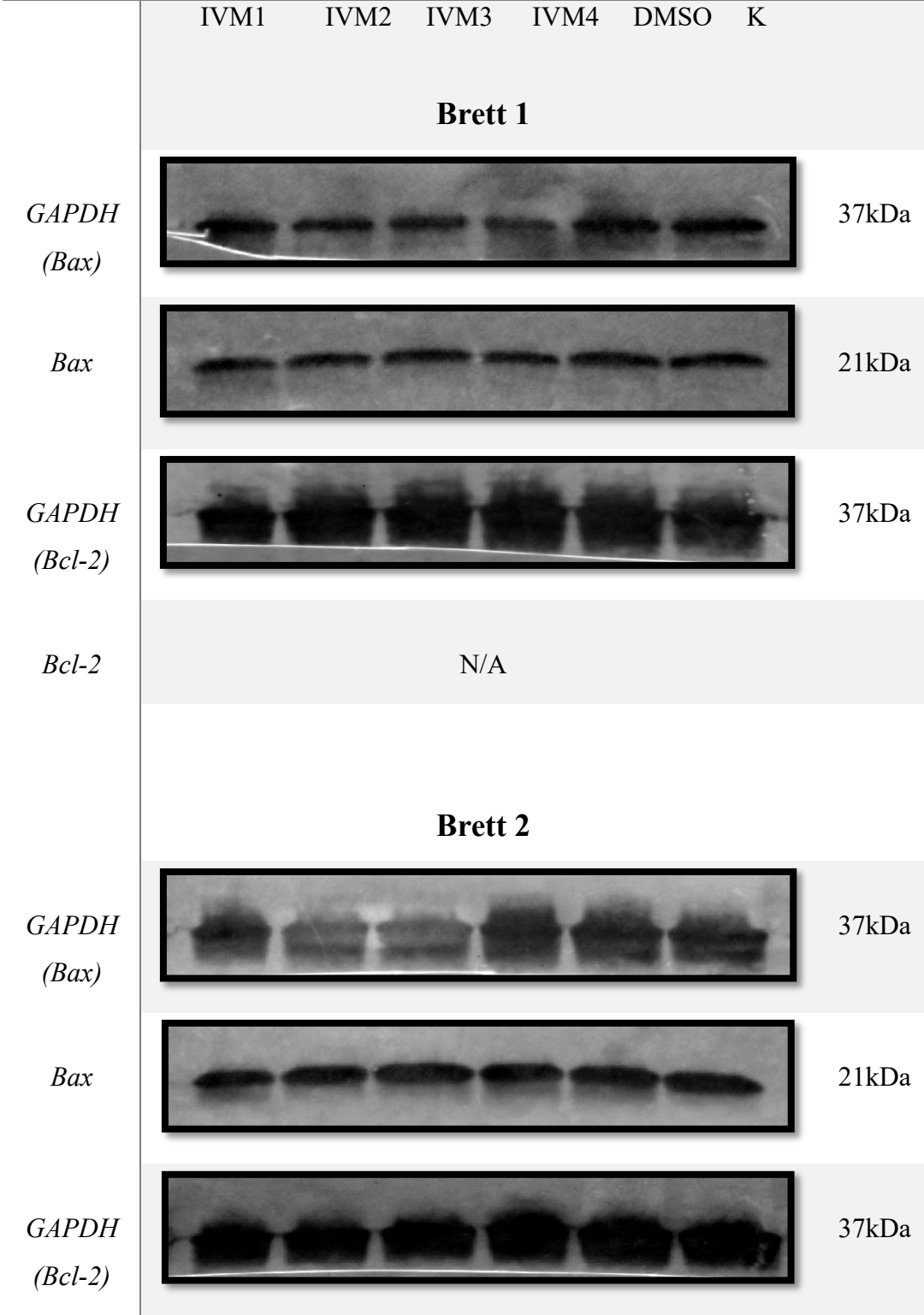


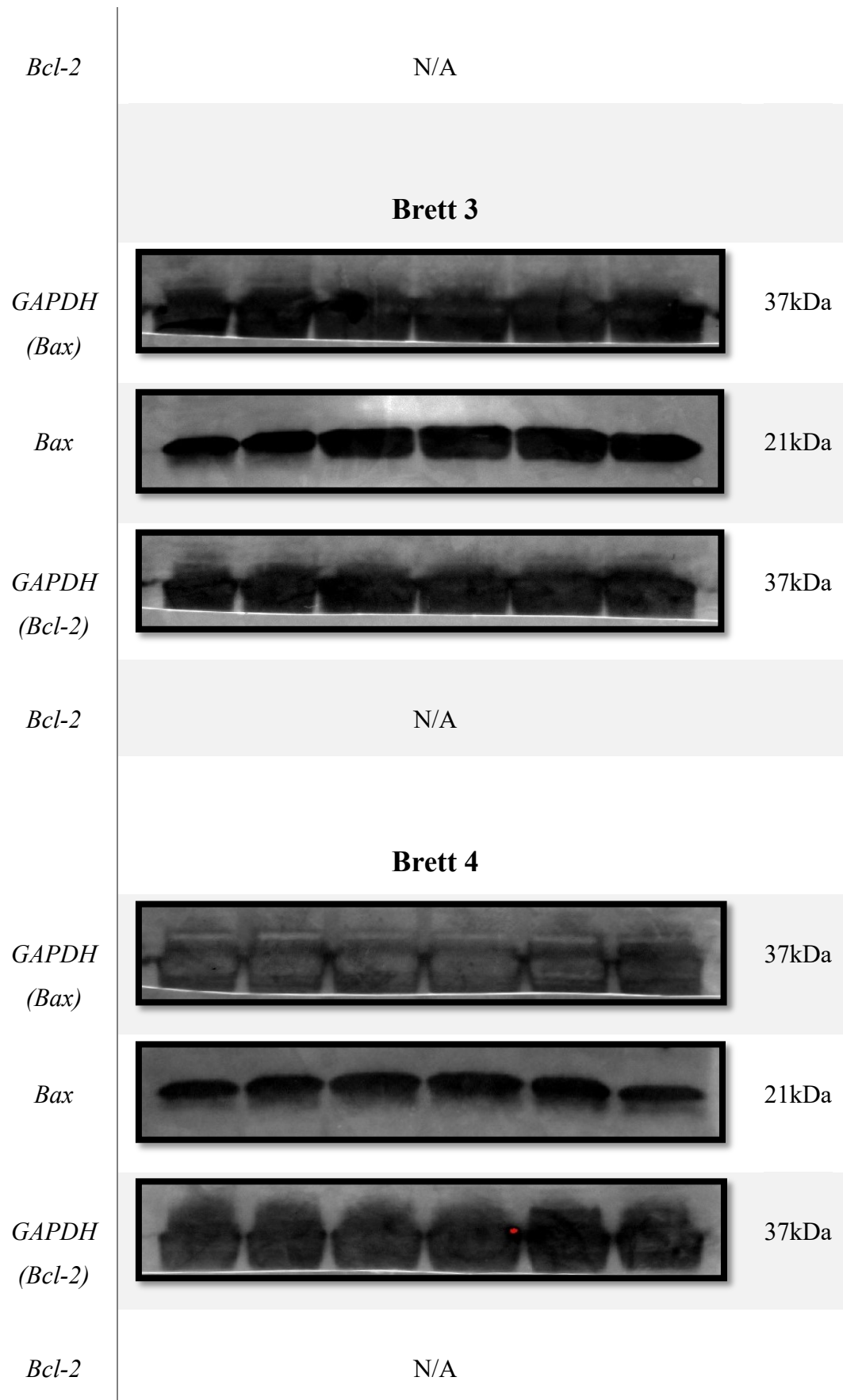


Figur 26: Viser bilder av membranene ved 24-timers hovedforsøk, tatt med ChemiDocTM MP. Membraner uten observerbart resultat er satt opp som N/A, og gjelder mest for *Bcl-2*, siden det ikke ble observert på noen av membranene. For hvert brett ble det analysert 2 membraner, en for *Bax* og en for *Bcl-2*. *GAPDH* ble analysert på alle membranene som en loading kontroll. IVM 1-4 er prøvene tilsatt IVM, DMSO er kontroll fra prøven tilsatt DMSO og K er kontroll med vekstmedium.

A.3.1.2 Western Blot resultat fra 72-timers intervall

IVM (5µM; 72t)



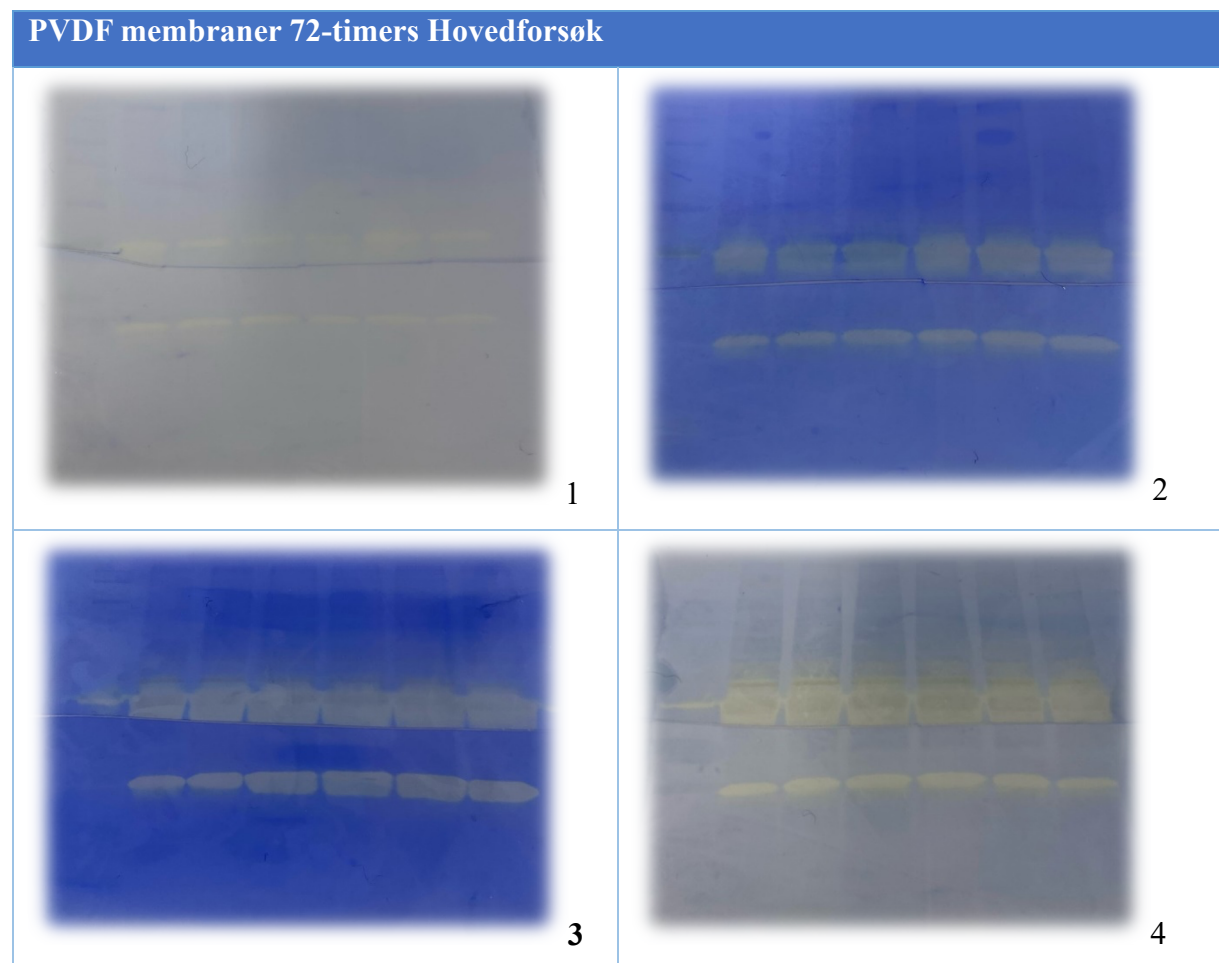


Figur 27: Viser bilder av membranene ved 72-timers hovedforsøk, tatt med ChemiDoc™ MP. Membraner uten observerbart resultat er satt opp som N/A, og gjelder mest for *Bcl-2*, siden det ikke ble observert på noen av

membranene. For hvert brett ble det analysert 2 membraner, en for Bax og en for Bcl-2. GAPDH ble analysert på alle membranene som en loading kontroll. IVM 1-4 er prøvene tilsatt IVM, DMSO er kontroll fra prøven tilsatt DMSO og K er kontroll med vekstmedium.

A.3.2 Western Blot resultat fra 72-timers intervall, PVDF membraner

Tabell 5: Tabell som viser bilder tatt med mobilkamera av membranene etter utført Western Blot analyse ved 72-timers intervall. Disse fire membranene ble inkubert med antistoff mot Bax (nedre bånd) og GAPDH (øvre bånd), som er de gule båndene vist på bildene. Membranene er nummerert etter hvilket brett de kom fra, og kolonnene på hver membran inneholder prøver av de ulike brønnene fra hver sine cellebrett, som fra venstre til høyre er: 1. IVM, 2: IVM, 3: IVM, 4: IVM, 5: DMSO, 6: Vekstmedium.



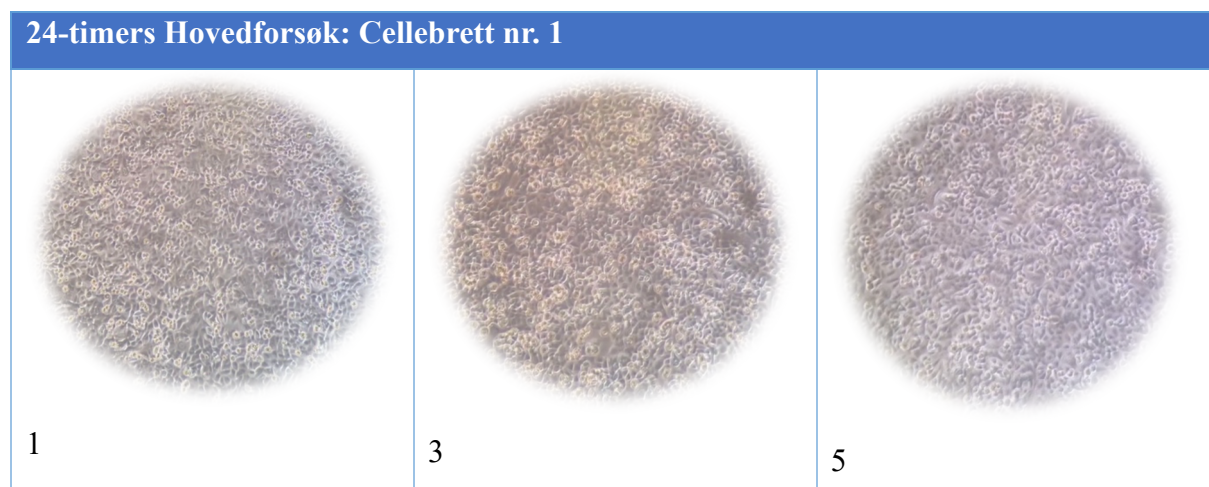
A.3.3 Målinger fra Qubit™ 4 Fluorometer

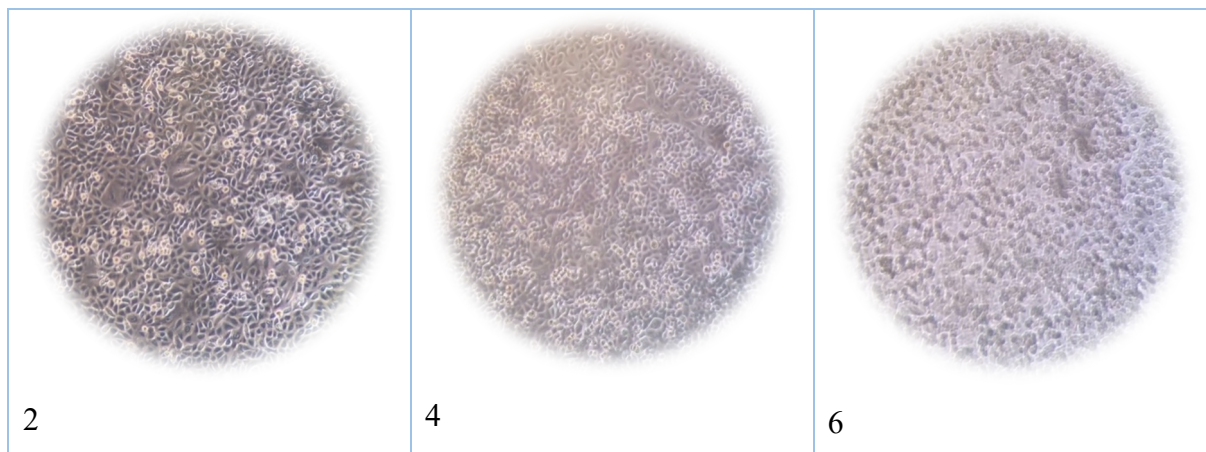
Tabell 6: Viser konsentrasjon av protein målt med Qubit™ 4 Fluorometer for alle prøvene ved både 24-timers og 72-timers hovedforsøk. Standardene er oppgitt i mg/mL, blank har ingen enhet, og prøvene er oppgitt i µg/µL. Ved prøvene med x i verdi ble det ikke utført proteinanalyse grunnet mangel på reagenser.

	24 Timer				72 Timer			
	Brett 1	Brett 2	Brett 3	Brett 4	Brett 1	Brett 2	Brett 3	Brett 4
ST1	46.33	45.17	43.40	42.52	48.65	47.70	49.60	46.03
ST2	3512.49	1957.68	3092.6	2893.29	3456.8	1967.57	2110.06	2202.68
Blank	80.65	78.29	68.29	38.58	73.52	77.09	79.68	87.78
IVM1	1.91	1.80	1.09	2.14	1.61	2.53	3.20	2.83
IVM2	2.34	1.44	1.20	1.64	2.04	2.62	3.38	2.37
IVM3	2.03	1.86	1.07	1.63	2.03	3.60	3.14	x
IVM4	1.88	1.88	1.19	1.33	1.85	2.60	3.01	x
DMSO	1.71	2.94	1.31	1.49	2.37	2.36	2.79	x
Vekstm edium	2.06	3.06	1.19	1.66	2.54	3.14	3.21	x

A.3.4.1 Konfluens cellebrett 1 fra 24-timers intervall

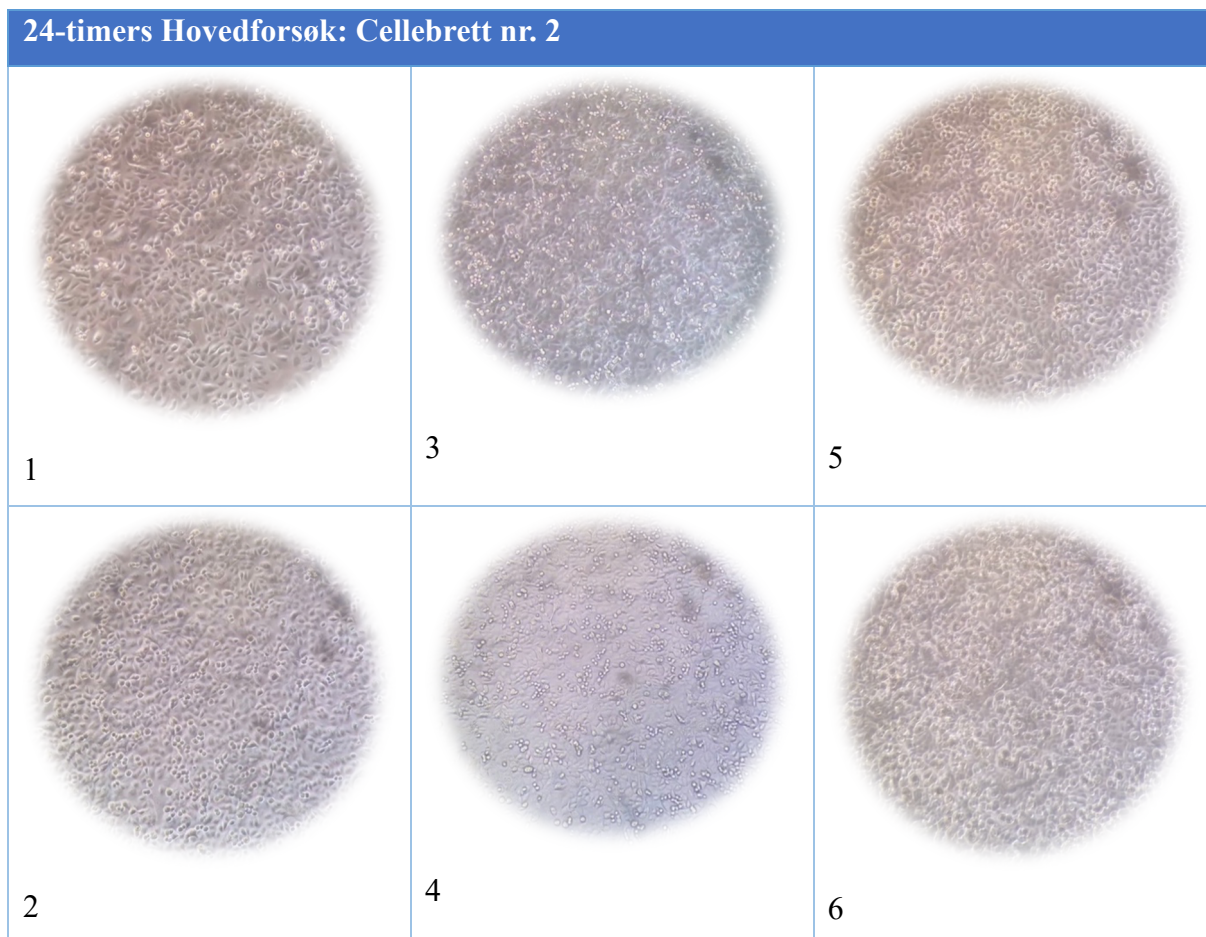
Tabell 7: Viser cellenes konfluens på cellebrett nr. 1 ved 24-timers hovedforsøket. Bildene viser A549-cellene etter de har blitt tilsatt IVM. Bildene er tatt gjennom linsen på invert mikroskop.





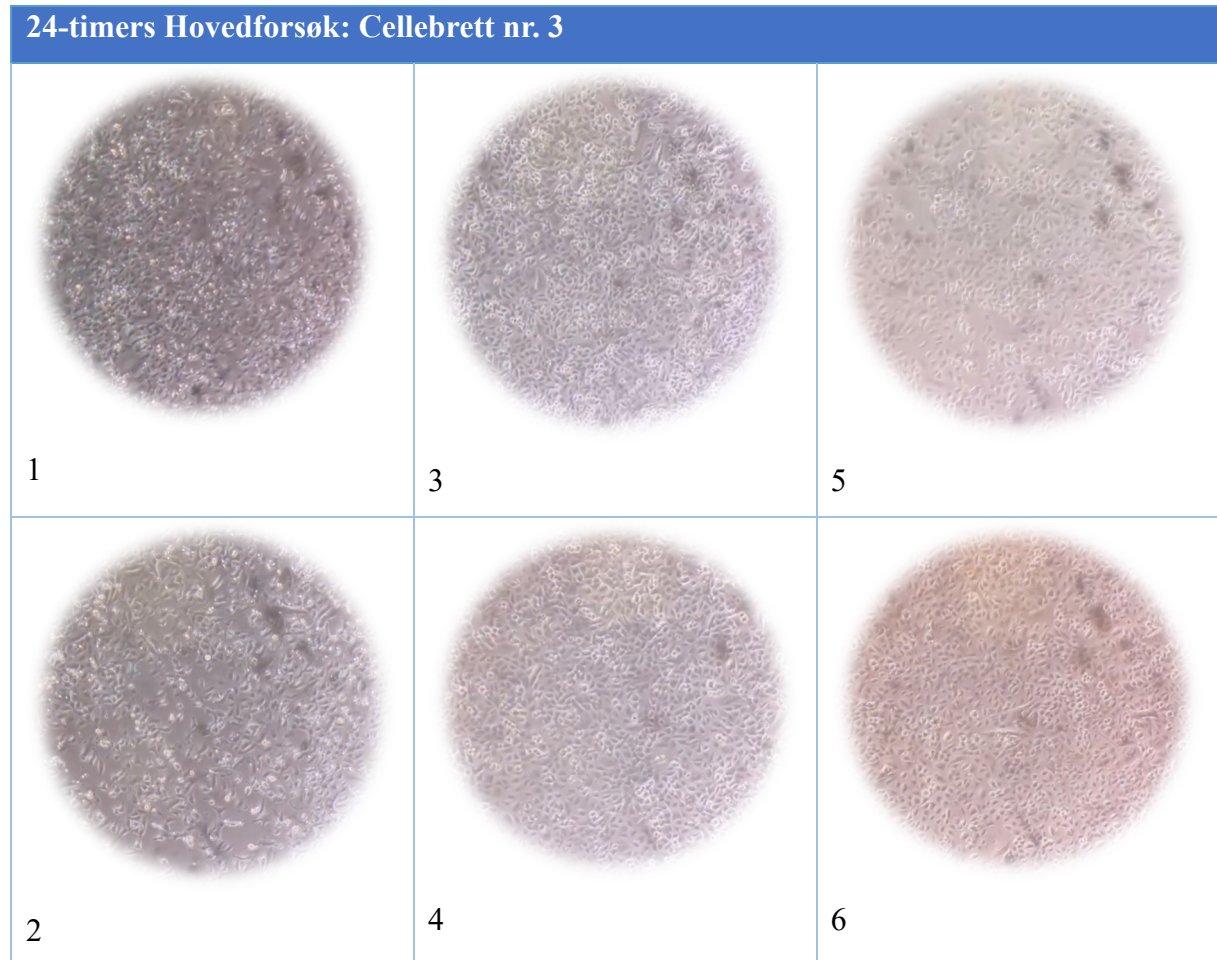
A.3.4.2 Konfluens cellebrett 2 fra 24-timers intervall

Tabell 8: Viser cellenes konfluens på cellebrett nr. 2 ved 24-timers hovedforsøket. Bildene viser A549-cellene etter de har blitt tilsatt IVM. Bildene er tatt gjennom linsen på invert mikroskop.



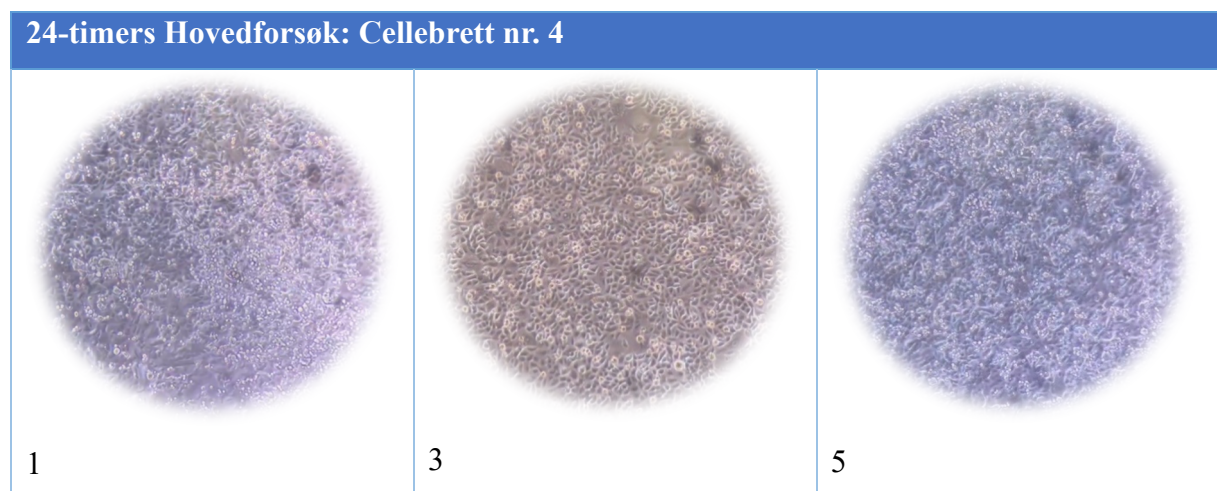
A.3.4.3 Konfluens cellebrett 3 fra 24-timers intervall

Tabell 9: Viser cellenes konfluens på cellebrett nr. 3 ved 24-timers hovedforsøket. Bildene viser A549-cellene etter de har blitt tilsatt IVM. Bildene er tatt gjennom linsen på invert mikroskop.



A.3.4.4 Konfluens cellebrett 4 fra 24-timers intervall

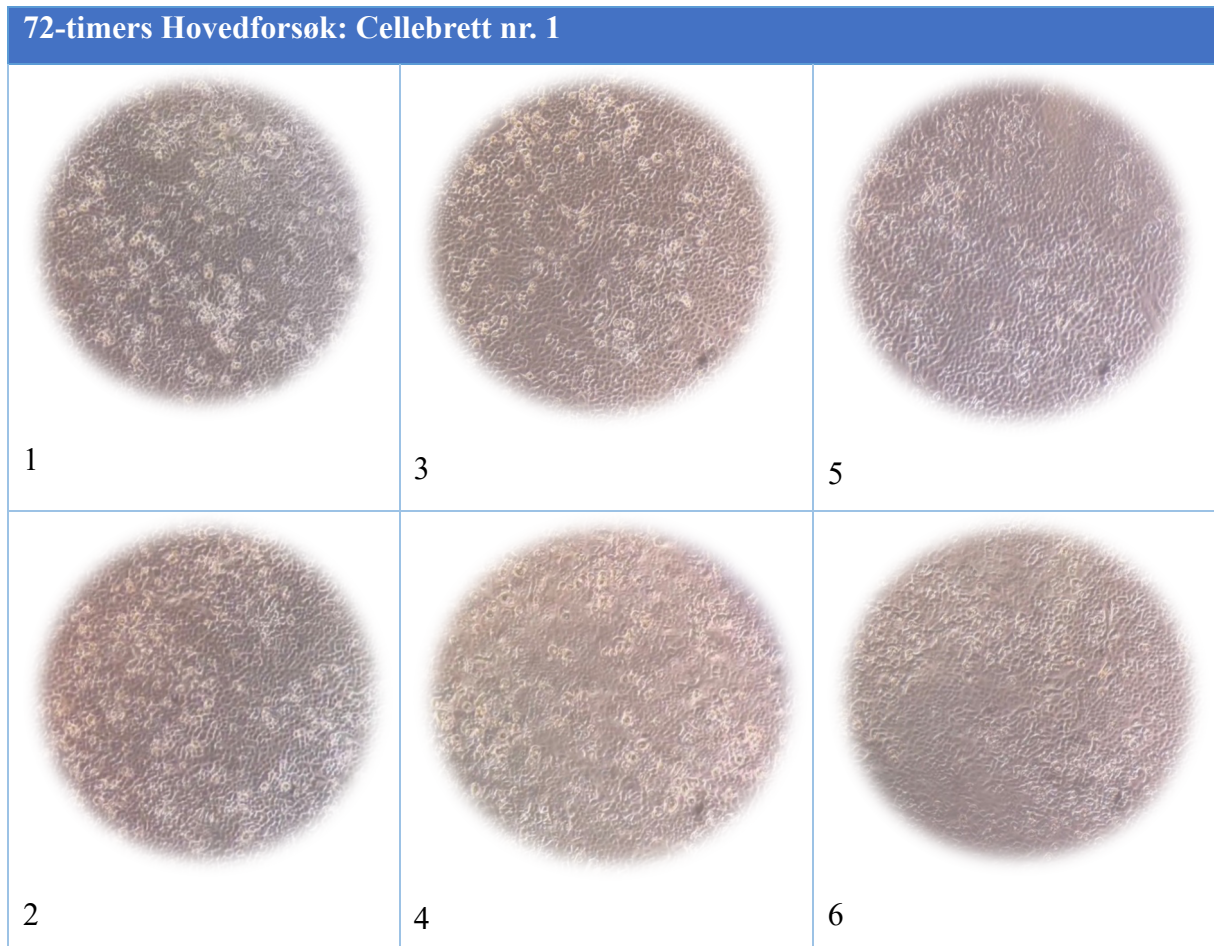
Tabell 10: Viser cellenes konfluens på cellebrett nr. 4 ved 24-timers hovedforsøket. Bildene viser A549-cellene etter de har blitt tilsatt IVM. Bildene er tatt gjennom linsen på invert mikroskop.





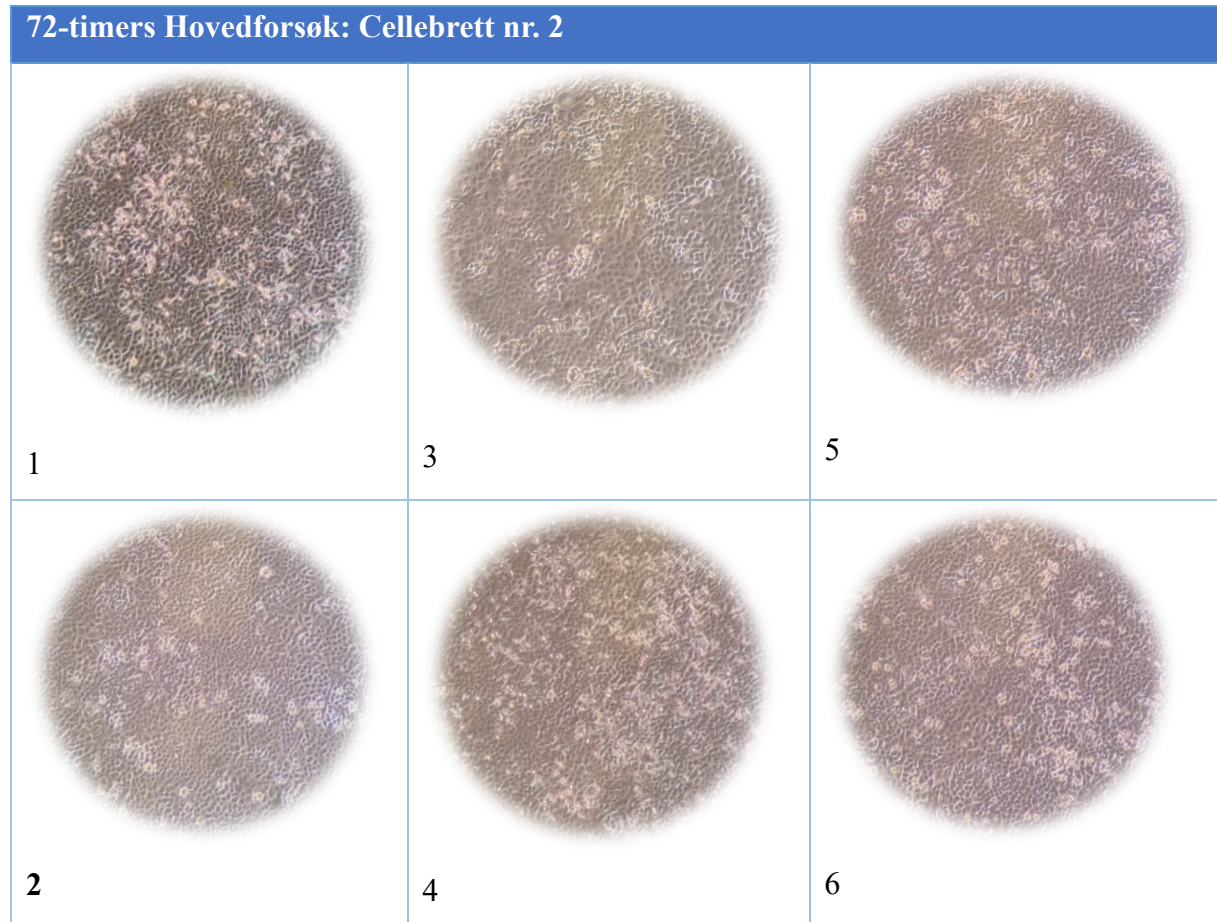
A.3.4.5 Konfluens cellebrett 1 fra 72-timers intervall

Tabell 11: Viser cellenes konfluens på cellebrett nr. 1 ved 72-timers hovedforsøket. Bildene viser A549-celleene etter de har blitt tilsatt IVM. Bildene er tatt gjennom linsen på invert mikroskop.



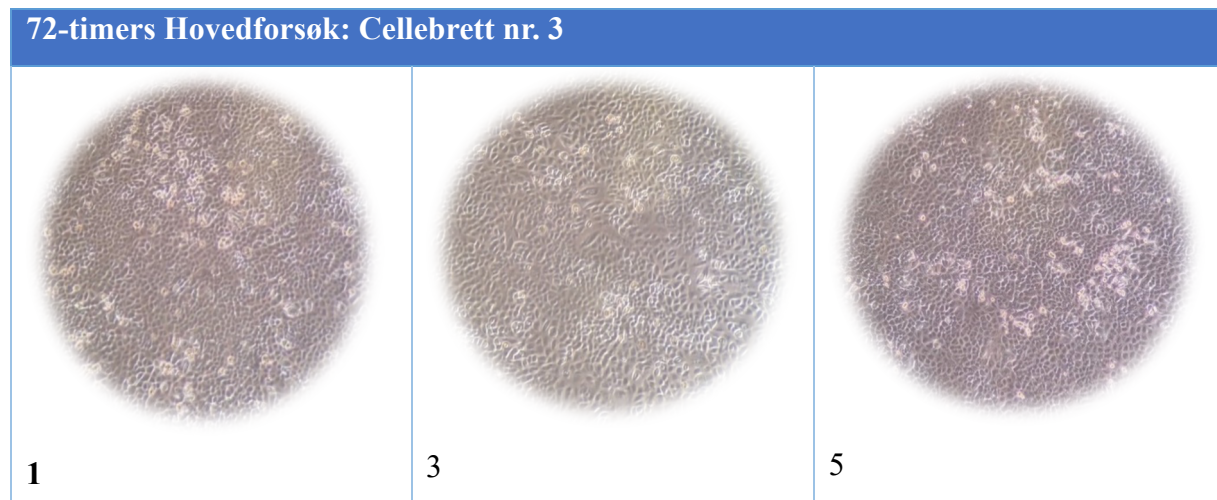
A.3.4.6 Konfluens cellebrett 2 fra 72-timers intervall

Tabell 12: Viser cellenes konfluens på cellebrett nr. 2 ved 72-timers hovedforsøket. Bildene viser A549-celle etter de har blitt tilsatt IVM. Bildene er tatt gjennom linsen på invert mikroskop.



A.3.4.7 Konfluens cellebrett 3 fra 72-timers intervall

Tabell 13: Viser cellenes konfluens på cellebrett nr. 3 ved 72-timers hovedforsøket. Bildene viser A549-celle etter de har blitt tilsatt IVM. Bildene er tatt gjennom linsen på invert mikroskop.





A.3.4.8 Konfluens cellebrett 4 fra 72-timers intervall

Tabell 14: Viser cellenes konfluens på cellebrett nr. 4 ved 72-timers hovedforsøket. Bildene viser A549-cellene etter de har blitt tilsatt IVM. Bildene er tatt gjennom linsen på invert mikroskop.

