

10023

10014

10002

# Effekten av Ivermectin på genekspresjon av apoptosemarkører BCL-2 og BAX i A549-celler

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy

Mai 2024



10023

10014

10002

# **Effekten av Ivermectin på genekspresjon av apoptosemarkører BCL-2 og BAX i A549-celler**

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,

Dette har vært en svært spennende tid, med mye latter, diskusjoner og etterkloke tanker. Tre studenter ved Norges teknisk- naturvitenskaplige universitet (NTNU) i Ålesund har våren 2024 gjennomført en studie om effekten Ivermectin har på den intrinsiske apoptoseveien hos A549-celler. Den delte interessen for medisinsk bioteknologi, laboratoriearbeid og qPCR la grunnlaget for bachelorgruppens ønske om å bygge videre på tidligere studier ved NTNU som har studert effekten av Ivermectin på humane cellelinjer. Bacheloroppgaven har gitt studiens forfattere ferdigheter i samarbeid, og prosjektplanlegging med gitte begrensninger. Året har vært svært givende og tillatt anvendelse av store deler av kunnskapen som har blitt oppbygget gjennom de tre forhenværende årene ved studiet i Bioteknologi.

Vi ønsker også å rette en spesiell takk til vår veileder Gro Audveig Hagen Bjørnøy, samt andre ansatte ved instituttet for deres tålmodighet, tillit og velvilje. Det rettes òg en takk til familie og venner som har vært aktive støttespillere med givende motivasjon og essensiell korrekturlesing under hele bacheloroppgaven.

---

## Sammendrag

Studiens formål var å undersøke om det antiparasittiske legemiddelet Ivermectin førte til apoptose via den intrinsiske apoptoseveien hos A549-celler. Studien er basert på tidligere bacheloroppgaver ved studieprogrammet, i tillegg til øvrige forskningsartikler som har demonstrert Ivermectins evne til å hemme veksten til ulike typer kreftceller. Studiene ble også benyttet i bestemmelse av tidsintervaller og Ivermectinkonsentrasjon. Hoveddelen av studien gikk ut på å studere virkningen av 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin i to ulike tidsintervall, 24 og 72 timer, ved å undersøke endring i genekspressjon til apoptosemarkørene BCL-2 og BAX ved hjelp av RT-qPCR.

RT-qPCR deles inn i templatfremstilling og qPCR-analyse. Templatfremstilling kan videre deles inn i celletelling med Bürker tellekammer, RNA-isolering, måling av RNA-konsentrasjon, cDNA-syntese og måling av cDNA-konsentrasjon. qPCR deles inn i primeroptimalisering og genekspressionsanalyse. Resultater fra genekspressionsanalysene ble bearbeidet ved hjelp av  $\Delta C_q$ -metoden og relativ genekspressionsendring ble målt ved hjelp av  $\Delta\Delta C_q$ -metoden. Signifikans til  $\Delta C_q$ -verdier og resultater fra celleteling ble bestemt med en tosidig t-test med antatt ulik varians. Det ble ikke observert statistisk signifikante nedganger i celleantall hos gruppen dyrket med 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin, sammenlignet med gruppene dyrket med vekstmedium og vekstmedium tilsatt 5  $\mu\text{M}$  DMSO. Genekspressionsanalysen viste ikke statistisk signifikante opp- eller nedreguleringer av genet som koder for BCL-2 i 24 timers tidsintervall. Derimot viste genekspressionsanalysen en trend til økt ekspresjon av BCL-2 for tidsintervall på 72 timer, hvorav to verdier var av statistisk signifikans. Resultatene kan indikere at 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin verken påvirker cellevekst eller apoptoseregulering via den intrinsiske apoptoseveien hos A549-celler.

---

## Abstract

The aim of the study was to examine if the anti parasitic drug Ivermectin would induce apoptosis through the intrinsic pathway in A549 cells. The study is based on previous bachelor theses associated with the study programme of the authors, as well as reasearch articles examining similar topics. The theses and articles have demonstrated that Ivermectin inhibits growth in several distinct types of cancer cells. The studies were also used to determine the time intervals and the Ivermectin concentration. The study examined the effect of 5  $\mu$ M Ivermectin in two distinct time intervals, 24 and 72 hours, by examining the change in gene expression for the apoptosis markers BAX and BCL-2, by means of RT-qPCR.

RT-qPCR is divided into isolation and synthesis of template, and qPCR analysis. Isolation and synthesis of template is further divided into counting cells with a Bürker counting chamber, RNA isolation, measuring of RNA concentration, cDNA synthesis and measuring of cDNA concentration. qPCR analysis is divided into optimalization of primers and gene expression analysis. The results from the gene expression analysis were prossessed with the  $\Delta C_q$  method and the relative change in gene expression was decided with the  $\Delta\Delta C_q$  method. The significance of the  $\Delta C_q$  values and the cell counts was decided with an unpaired, two-tailed t-test with assumed unequal variance. The study did not observe a statistic significant decline in cell numbers in groups incubated with 5  $\mu$ M Ivermectin, compared to the groups incubated with growth medium and growth medium added 5  $\mu$ M DMSO. The gene expression analysis did not show a significant up- or downregulation of gene expression within the gene responsible for the expression of BCL-2, within the time interval of 24 hours. In contrast, the gene expression analysis of the 72-hour time interval showed a trend of increased gene expression for BCL-2, where two of the p-values revealed values of statistical significance. The results indicate that a concentration of 5  $\mu$ M Ivermectin did not significantly affect the cell growth not the regulation of apoptosis thorough the intrinsic pathway of apoptosis within cells of the A549 cell line.

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> . . . . .	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> . . . . .	<b>II</b>
<b>Abstract</b> . . . . .	<b>III</b>
<b>Begrepsliste</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>Begrensninger</b> . . . . .	<b>2</b>
<b>1 Introduksjon</b> . . . . .	<b>3</b>
<b>2 Teori</b> . . . . .	<b>4</b>
2.1 Kreft . . . . .	4
2.1.1 Lungekreft . . . . .	4
2.1.2 A549-celler . . . . .	5
2.1.3 Kultivering av A549-cellelinjen . . . . .	6
2.2 Apoptose . . . . .	7
2.2.1 Intrinsisk apoptosevei . . . . .	8
2.2.2 BCL-2 familien . . . . .	9
2.3 Ivermectin . . . . .	11
2.4 RT-qPCR Analyse . . . . .	13
2.5 Statistiske analysemetoder . . . . .	20
<b>3 Materialer og metode</b> . . . . .	<b>23</b>
3.1 Celledyrking . . . . .	23
3.1.1 Tillaging av vekstmedium . . . . .	23
3.1.2 Tining av A549-celler . . . . .	23
3.1.3 Optimalisering av vekst . . . . .	23
3.1.4 Tillaging av Ivermectinløsning og vekstmedium med Ivermectin/DMSO . . . . .	24
3.1.5 Cellekultivering med 5 $\mu$ M Ivermectinløsning og kontroller . . . . .	24



---

3.2	Fremstilling av templat til RT-qPCR . . . . .	25
3.2.1	RNA-isolering . . . . .	25
3.2.2	cDNA-syntese . . . . .	26
3.2.3	Bestemmelse av RNA- og cDNA-konsentrasjon . . . . .	26
3.3	qPCR . . . . .	27
3.4	Statistiske analysemetoder . . . . .	29
3.4.1	$\Delta\Delta C_q$ -metoden . . . . .	29
3.4.2	T-test . . . . .	29
3.4.3	Coefficient of Variation . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Resultat . . . . .</b>	<b>31</b>
4.1	Cellekultivering . . . . .	31
4.1.1	Optimalisering av vekst . . . . .	31
4.1.2	Cellekultivering med 5 $\mu$ M Ivermectinløsning . . . . .	31
4.2	Fremstilling av templat til RT-qPCR . . . . .	32
4.2.1	Celletelling . . . . .	32
4.2.2	Konsentrasjonsanalyser . . . . .	33
4.3	qPCR . . . . .	34
4.3.1	Smeltekurver fra optimalisering av primerkonsentrasjoner . . . . .	34
4.3.2	$C_q$ -verdier . . . . .	36
4.3.3	Smeltekurver fra genekspressjonsanalyse . . . . .	37
4.4	Statistiske analysemetoder . . . . .	40
4.4.1	$\Delta C_q$ - Normalisering av genekspressjon . . . . .	40
4.4.2	$\Delta\Delta C_q$ -metode . . . . .	41
4.4.3	$2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metode . . . . .	42
4.4.4	T-test . . . . .	42

---

---

4.4.5	Coefficient of Variation . . . . .	43
<b>5</b>	<b>Diskusjon . . . . .</b>	<b>44</b>
5.1	Cellekultivering . . . . .	44
5.1.1	Optimalisering av vekst . . . . .	44
5.1.2	Kultivering med 5 $\mu$ M Ivermectin . . . . .	45
5.2	Fremstilling av templat til RT-qPCR . . . . .	46
5.2.1	Celletelling . . . . .	46
5.3	qPCR . . . . .	47
5.3.1	Primeroptimalisering . . . . .	47
5.3.2	Genekspresjonsanalyse . . . . .	49
5.4	Statistiske analysemetoder . . . . .	51
5.4.1	$\Delta C_q$ - Normalisering av genekspresjon . . . . .	51
5.4.2	$\Delta\Delta C_q$ -metode . . . . .	51
5.4.3	$2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metode . . . . .	52
5.4.4	T-test . . . . .	53
5.4.5	Coefficient of Variation . . . . .	55
5.5	Videre forskning . . . . .	57
<b>6</b>	<b>Konklusjon . . . . .</b>	<b>58</b>
	<b>Referanseliste . . . . .</b>	<b>59</b>
<b>A</b>	<b>Appendiks . . . . .</b>	<b>67</b>
A.1	Reagenser . . . . .	67
A.2	Prosedyrer . . . . .	68
A.2.1	Rutiner på celledlaboratoriet . . . . .	68
A.2.2	Tining av celler . . . . .	70
A.2.3	Subkultivering av celler . . . . .	71

---

A.2.4	Høsting av celler . . . . .	73
A.2.5	Celletelling . . . . .	74
A.2.6	RNA-isolering . . . . .	75
A.2.7	Måling av RNA-konsentrasjon . . . . .	76
A.2.8	cDNA-syntese . . . . .	77
A.2.9	Måling av cDNA-konsentrasjon . . . . .	78
A.2.10	Oppsett av PCR instrumentet . . . . .	79
A.2.11	Optimalisering av primerkonsentrasjoner . . . . .	80
A.2.12	Brønnoppsett . . . . .	81
A.3	Resultat . . . . .	82
A.3.1	Oversikt over konfluens . . . . .	82
A.3.2	Celletelling . . . . .	85
A.3.3	RNA-konsentrasjon . . . . .	87
A.3.4	cDNA-konsentrasjon . . . . .	88
A.3.5	Standardkurver fra primeroptimalisering . . . . .	89
A.3.6	$C_q$ -verdier primeroptimaliseringsforsøk . . . . .	90
A.3.7	Smeltekurve fra optimalisering av primerkonsentrasjoner . . . . .	91
A.3.8	Primersammensetninger . . . . .	92
A.3.9	$C_q$ -verdier Hovedforsøk . . . . .	93
A.3.10	Smeltekurver fra hovedforsøk . . . . .	99
A.3.11	Statistiske verdier . . . . .	102

---

## Begrepsliste

Begrep	Definisjon
Angiogenese	Dannelse av nye blodårer ut fra allerede eksisterende blodårer. Viktig for tumorvekst
Caspase	<i>Cysteine-aspartic protease</i>
$C_q$ -verdi	<i>Cycle Quantification</i> : Syklusnummeret hvor markørgenet krysser en gitt terskelverdi, vanligvis satt til $\pm 10$ SD til støy fra grunnlinjen
Dimerisering	Mekanisme for å øke affinitet, spesifitet og diversitet i bindingssetet.
Glioblastom	Malign hjernesvulst, gliom i hjernen
Gliom	Svult i sentralnervesystemet, celler som ligner gliaceller vokser uhemmet i hjernen/ryggmargen
<i>In vitro</i>	<i>I glass</i> , utenfor organismen
<i>In vivo</i>	<i>I det levende</i> , forsøk i levende organismer
LAF-benk	<i>Laminar Air Flow</i> -benk
ROS	Reaktive oksygenradikaler, skadelige oksygenmolekyler som kan ødelegge proteiner og DNA
Tumor	Masse, eller gruppe, av abnormale celler som dannes i kroppen. Fellesnavn på svulster, både god-og ondartede

---

## Begrensninger

Begrensninger i tid har vært en faktor som har preget studien ved flere tilfeller. Arbeid på laboratorier ble satt til ukedager mellom 08:00 og 16:00, i tillegg ble laboratoriene delt med to andre studentgrupper, samt ansatte, og laboratorietiden måtte samkjøres med disse. Dette har ført til smale tidsrom for gjennomføring av laboratoriearbeid, og med dét, vanskeliggjort planlegging av laboratoriearbeid. Optimaliseringsforsøk ble også påvirket av tid til gjennomføring av studien. En annen begrensning har vært økonomi, som har ført til begrenset mengde reagenser. Mengde reagens til cDNA-syntese, samt SYBR Green I har lagt føringen for forsøket. Dette, i tillegg til begrenset økonomi har ført til at studien benyttet et mindre antall paralleller enn initielt ønsket, noe som kan være en svakhet ved studien.

---

# 1 Introduksjon

I følge *International Agency for Research on Cancer* var det i 2022 estimert opp mot 20 millioner nye tilfeller av kreft. I samme år var det 9.7 millioner mennesker som døde grunnet kreftrelaterte årsaker [1]. Lungekreft var den vanligste formen for kreft hos menn og kvinner samlet, og lå jevnt på andreplass for menn og kvinner individuelt, med prostata- og brystkreft på førsteplass [1]. Lungekreft førte til høyest antall dødsfall, hvor 5-års overlevelsesraten befant seg i underkant av 20% for 2020 [2]. Ved å gjennomføre studier på kreftceller *in vitro*, blir man kjent med hvordan kreftceller reagerer på ulike stimuli. Et formål med kreftrelaterte studier *in vitro* er å kunne identifisere og etablere kjennetegn ved symptomer for kreft, og å stille en hurtig og korrekt prognose. Ved å gjennomføre studier som denne, er formålet å utrede alternative behandlingsmetoder for kreft. *In vitro* studier på tilgjengelige cellelinjer åpner for replikerbarhet, og mulighet for videre undersøkelser *in vivo* dersom flere studier indentifiserer et stimuli med ønsket virkning.

Legemiddelreposisjonering, å finne nye bruksmåter for allerede eksisterende legemidler, er nyttig da tidsrammen før legemiddelet kan brukes til det nye formålet reduseres, da kliniske forsøk på tryggheten til legemiddelet allerede er gjennomført. I tillegg medfører reposisjonering reduserte kostnader og redusert risiko, med tanke på at medikamentet allerede er klinisk godkjent [3]. Ivermectin er et bredspektret medikament med mulighet for reposisjonering. Ivermectin ble først godkjent til bruk som et antiparasittisk middel til dyr, og deretter for mennesker i 1987 [4, 5, 6]. Medikamentet kan blant annet brukes mot helminter, som mange innvollsmark, og ektoparasitter som skabb [5]. Det har tidligere blitt gjennomført studier som viser at Ivermectin har en hemmende effekt på celleproliferasjon [7]. I etterkant av oppmerksomheten Ivermectin fikk under koronapandemien, er det gjennomført flere studier ved NTNU Ålesund rundt effekten Ivermectin har på kreftceller [8, 9].

Denne studien bygger videre på deres betraktninger og resultater, samt andre relevante studier, for å undersøke effekten Ivermectin har på forholdet mellom genekspressjon av anti-apoptosemarkør BCL-2 og pro-apoptosemarkør BAX i A549-celler ved hjelp av RT-qPCR [7]. Dette ble gjort ved kontinuerlig celledyrking og subkultivering av A549-cellelinjen for å oppnå eksponentiell vekst. Videre ble cellene inkubert med en Ivermectinkonsentrasjon på 5  $\mu\text{M}$  i ulike parti over tidsintervall på 24 og 72 timer, med tilhørende DMSO- og kontrollgruppe. RNA fra cellene ble isolert og omdannet til cDNA før templatet ble preparert for endelig qPCR-analyse. Under qPCR-analysen ble primere for referansegen HPRT1 og B2M tatt i bruk for å bestemme relativ endring i genekspressjon. Det ble også anvendt andre statistiske analysemetoder som t-test for å bestemme statistisk signifikans og variasjonskoeffisientanalyse for å se differanse mellom prøve og gjennomsnittet.

Oppgaven er delt inn i teori, metode, resultat, diskusjon og konklusjon hvor de ovenfornevnte tema vil bli beskrevet i hensiktsmessig rekkefølge oppgitt i innholdsfortegnelsen.

---

## 2 Teori

Teoridelen vektlegger kunnskap vedrørende kreft, da spesielt lungekreft, A549-cellelinjen og apoptose. I tillegg gjøres det en gjennomgang av oppbygning og kjente mekanismer til legemiddelet Ivermectin, hvor hovedvekten er lagt på mekanismer i kreftutvikling. Teoridelen inneholder også en grundig gjennomgang av anvendte analysemetoder.

### 2.1 Kreft

Kreft er en genetisk sykdom av heterogent opphav [10]. Det vil si at opphavet for en tumor kan være unikt basert på mutasjoner som oppstår. Dette gjør at kreft i samme vev hos to ulike personer kan ha utviklet ulike egenskaper. Til tross for heterogent opphav, vil utviklingen av mutasjoner hos alle former for kreft danne flere fellestrekk som er nødvendige før de blir en dødelig sykdom [10, 11]. Gjennom progressive mutasjoner i tumorsuppressorgener og proto-onkogener slik som RAS, p53, BRCA1 og BRCA2, anskaffer kreftceller seg fordelaktige egenskaper [11]. Disse egenskapene er høy proliferasjon, overstyring av cellyklusens kontrollpunkter, egenskapen til å ignorere signaler fra miljøet rundt, og unngåelse av apoptose [11]. Når én enkelt kreftcelle i en tumor utvikler en ny fordelaktig mutasjon vil dattercellene bli dominante i tumoren, en prosess kjent som klonal seleksjon [12]. Mutasjoner oppstår når genmaterialet blir skadet. Dette kan skje gjennom kontakt med farlige stoffer, stråling og som et resultat av skadelige levevaner som røyking, dårlig kosthold og fedme. Mutasjoner kan òg oppstå ved feil under DNA-reparasjon- eller replikasjon, eller dersom man er genetisk predisponert for å utvikle kreft [11]. En malign tumor har invasive egenskaper og er synonymt med kreft [11]. Fra første mutasjon og frem til en tumor tilegner seg invasive egenskaper kan det gå mange år, avhengig av hvor raskt de nødvendige fordelaktige mutasjonene oppstår. Etersom kreftutvikling har et heterogent opphav, er det flere av mutasjonene som ikke utgjør noen økt risiko i startfasen, men etter akkumulasjon av mutasjoner over en lang periode vil cellen bli genetisk ustabil og antallet mutasjoner øker i større grad [11]. Dette medfører at sannsynligheten for å utvikle kreft øker med alderen [12]. En tumor med invasiv egenskap kan danne metastaser i lokalt og distalt vev som gjør det vanskelig å operere bort tumoren [11]. Når en tumor nærmer seg en viss størrelse vil dette, utfra tumorens plassering, påføre kraftig belastning på organene. Uten motvirkende behandling, kan tumorens gradvise økning i størrelse føre til organsvikt og eventuell død [11].

#### 2.1.1 Lungekreft

I 2020 hadde lungekreft høyest dødsrate av kreftrelaterte årsaker, og lå under 20% for 5-års overlevelse [2]. Den høye dødsraten skyldes at diagnosetidspunktet ofte kommer i et sent stadium av kreftutviklingen [13]. I Norge har dette ført til at rundt 40% av personer med lungekreft får diagnosen for sent. Majoriteten av de rammede er i en alder fra 50 til 70 år, og det er estimert at nærmere 90% av lungekrefttilfeller i Norge har oppstått som direkte konsekvens av røyking [13]. Histologiske forskjeller mellom primærceller gjør at man skiller mellom ikke-småcellet lungekreft

---

(NSCLC) og småcellet lungekreft [13]. Av disse står NSCLC for tilnærmet 85% av alle tilfeller av lungekreft, og småcellet lungekreft for de resterende 15% [14]. Videre deles ulike undertyper for NSCLC inn i plateepitelkarsinom, adenokarsinom og storcellet lungekreft. Adenokarsinom var i 2020 den mest vanlige undertypen for lungekreft og sto for 39% av alle tilfeller hos menn, og 57% hos kvinner [15]. Behandlingsalternativene for kreft har størst grad av suksess i et tidlig stadium av kreftutviklingen. Tumorens stadium vil derfor være avgjørende for valg av behandlingsmetode [13]. Ved begrenset spredning er det mulig å kirurgisk fjerne en tumor. Dersom personen har utviklet metastaser, anvendes behandling med én eller flere metoder som strålebehandling, kjemoterapi, kirurgiske inngrep og immunterapi. Valg av metode er avhengig av lokasjon, stadium og variant av kreft for å ha høyest suksessrate [13].

### 2.1.2 A549-celler

Under malign kreftutvikling vil de opprinnelige heterogene mutasjonene over tid utvikle felles likhetstrekk med andre tumorer. Derfor kan det med fordel lages cellelinjer som kan studeres *in vitro*. Studier gjennomført på en cellelinje gjøres i et kunstig miljø som i større grad er mer repliserbart enn studier *in vivo*. Dette gjør det enklere å studere spesifikke egenskaper hos ønsket målcelle, som videre danner et grunnlag for å identifisere flere spesifikke egenskaper på tvers av ulike former for kreft til tross for et heterogent opphav. Cellelinjen for A549-celler ble etablert i 1972 av Giard et. al. og anvendes *in vitro* i studier på adenokarsinom og som modell for type II pneumocytter (ATII) [16, 17]. Primærcellene er alveolar basal epitelceller og har opprinnelse fra en tumordannelse i lungevevet hos en 58 år gammel kaukasoid mann [17]. Primærcellene er lokalisert i alveolene og sekreterer surfaktant som gir alveolene beskyttelse mot patogene organismer, opprettholder homeostase og hjelper med reparasjon og regenerasjon av epitelvevet [18]. A549-celler er adherente og vokser optimalt i et monolag [19]. I et invertmikroskop observeres cellene som små runde kuler med ruglete overflate og noen utstikkere som viser tegn til cellemigrasjon. Diameteren på cellen ligger mellom  $10.59\mu\text{m}$  og  $14.93\mu\text{m}$  [19]. Generasjonstiden til A549-cellene vil være nærmere 22 timer under eksponentiell vekst, men kan ta opp mot 40 timer dersom forholdene ikke er optimale [19]. Vekstmedium brukt for disse cellene er Ham's F-12K Kaighns Medium med tilsatt Fetal Bovine Serum, Qualified, Oneshot (FBS) og antibiotika som *Penicillin* og *Streptomycin* for å motvirke kontaminasjon [19]. Dersom cellene skal langtidsoppbevares er det anbefalt å lagre de i flytende nitrogen i dampfase for å fryse cellene og redusere risiko for kontaminasjon [19]. A549-cellelinjen har i mange år blitt anvendt som en representativ ATII-celle for forskningsprosjekt som ønsker å identifisere stoff som endrer cellens proliferasjon, metabolisme og apoptose, men noen studier setter spørsmål med relevansen av å bruke cellelinjer som en representant for primærceller [19, 20]. Dette er basert på en distinkt forskjell fra den primære ATII-cellen og A549-cellelinjen. I løpet av de to første ukene under kultivering av A549-cellelinjen *in vitro* endret markørekspresjonen seg til en fenotype mer lik ATI-celler [20, 21].



---

### 2.1.3 Kultivering av A549-cellelinjen

Når man kultiverer cellelinjer ønsker man å etterligne det opprinnelige miljøet cellen er hentet fra. Dersom cellene blir stresset kan det endre cellens egenskaper, og resultatet fra gjennomførte analyser kan bli upålitelig. Ved gjenskapelse av optimalt vekstforhold tas det utgangspunkt i cellenes opprinnelige miljø i alveolene. Optimale vekstforhold for A549-celler innebærer en inkubasjonstemperatur på 37°C, og en gasskonsentrasjon på 5% CO<sub>2</sub> [22]. Cellene bør inkuberes i egnet medium tilsatt antibiotika og FBS [17]. Mediet inneholder aminosyrer, vitaminer, uorganiske salter som sørger for at celler vokser optimalt, i tillegg til andre nødvendige komponenter som dextrose for cellens metabolisme og natrium bikarbonat for å opprettholde pH [23, 24]. For at bufferen i mediet skal opprettholde optimal fysiologisk pH mellom 7.0 og 7.6 er det viktig at cellene inkuberes ved 5% CO<sub>2</sub> [23]. Egnet antibiotika for cellelinjen har som hensikt å redusere kontaminasjon ved å drepe eller inhibere vekst av andre prokaryote og eukaryote celler [25]. FBS supplerer mediet med nødvendige vekstfaktorer, men innholdet i FBS kan variere mellom ulike parti. Ved eksperimentell håndtering av cellekulturer kan invertmikroskop benyttes for å estimere konfluens, ved å se på arealet som er dekket av celler og arealet som er tomt.

Optimal konfluens før subkultivering er mellom 70% til 80% [26]. For hver gang man splitter, øker passasjennummeret tilsvarende. Etter at man har tint cellelinjen og tilført celler til en kulturbeholder ønsker man å få cellene i eksponentiell vekst [27]. I løpet av de to første ukene er cellene i det man kaller lagfasen. I lagfasen tilpasser cellene seg det nye miljøet og veksten er lav [27]. Cellene krever kontinuerlig tilsyn med mediumskifte omtrent hver 3. dag og subkultivering når cellene når 80% konfluens [27, 22]. Dersom konfluensen i cellekulturen økes over 80% konfluens, risikerer man vekst i høyden og dannelsen av polylag. Subkultivering av cellekulturen er hensiktsmessig for å sikre homogen tilgang til næringsstoffer fra vekstmediet. Dersom konfluensen overskrider 80% vil næringstilgangen i kulturen bli heterogent fordelt. Ved kontinuerlig subkultivering av cellene vil man over tid øke celleantallet og optimalisere celleveksten for en mer forutsigbar kultivering. Optimalisert vekst er en grunnleggende forutsetning ved innføring av stressfaktorer. Når celleveksten øker med forutsigbart intervall har cellene nådd den eksponentielle vekstfasen. I denne fasen er cellene i optimal kultiveringstilstand [27]. I eksponentiell vekstfase vokser cellene kontinuerlig med redusert forekomst av celledød. Dersom cellene nærmer seg 100% konfluens, vil de gå over i en stasjonær fase hvor antallet celler som dør og antallet celler som dannes, er i balanse [27]. På grunn av redusert cellevekst, stresset stasjonær fase påfører cellene og økende oppsamling av cytotoksiske stoffer, er dette ikke ønskelig [27, 28]. Før man kan splitte adherente celler må man bruke en protease kjent som trypsin i kombinasjon med ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for å løsrive overflateproteinene som cellen har festet seg til kulturbeholderens overflate med [27]. For optimal virkningsgrad av trypsin, vasker man cellene med egnet saltløsning [27]. Dette renser cellene for resterende FBS som kan inhibere trypsinet [27]. Dersom cellene løsrives og blir liggende i trypsinløsningen over lengre tid, vil trypsin bryte ned proteiner i cellens overflatemembran, som kan lede til celledød eller uønsket stress [27]. Når ønsket mengde celler har løsnet, tilsettes vekstme-

---

dium som inhiberer trypsin. Dersom man videre ønsker å finne celleantall kan Bürker tellekammer anvendes.

## 2.2 Apoptose

Kreft kan behandles ved å få kontroll på den ukontrollerte celleveksten. Medikamenter som omprogrammerer cellene slik at de går mot apoptose er den mest suksessfulle ikke-kirurgiske behandlingen av kreft. Apoptose er en form for programmert celledød hvor cellen setter igang mekanismer som gjør at cellen selv elimineres [29, 30]. Dysregulert apoptose, i form av nedregulering, er assosiert med alle former for kreft, og dermed vil medikamenter som virker på apoptotiske signalveier ha effekt i alle typer kreft [31]. Mekanismen blir strengt kontrollert av ekstracellulære signaler som enten promoterer eller inhiberer apoptose. Signaler som inhiberer apoptose vil vanligvis fungere ved å regulere proteiner i B-celle lymfom 2 (BCL-2) familien. I voksne vev skjer apoptose i omtrent samme frekvens som celledelingen, og kontrollerer størrelsen på vevet [32, 33]. I tillegg forekommer apoptose som en forsvarsmekanisme for eksempel ved skade på celler grunnet sykdom. Apoptose kan utløses av flere former for stimuli og varierer mellom ulike celletyper [34]. Mekanismen er viktig for å unngå skade på nærliggende celler og vev på grunn av lekkasje av cytoplasma, slik som er tilfellet ved nekrose [32]. Ved apoptose vil cellens morfologi endre seg. Tidlig i prosessen vil cellen krympe, slik at cytoplasma og organellene ligger tettere, og pyknose starter [34]. Pyknose er en irreversibel kondensering av kromatinet og cellekjernen. Pyknose forekommer i celler som gjennomgår apoptose og nekrose [35]. Senere i prosessen får membranen *blebs*, irregulære klumper i plasmamembranen. Kjernemembranen oppløses og separasjon av cellefragmenter forekommer. Cellefragmentene består av cytoplasma med tettpakkede organeller og kan i enkelte tilfeller inneholde kjernefragmenter. De omfattende endringene ved cellens fysiske og fysiologiske egenskaper, vil føre til tiltrekkelser av fagocytter, vanligvis makrofager, som tar opp fragmentene fra den apoptotiske cellen [32, 34].

Kreftceller kan overleve nivåer av stress som ville fått normalceller til å undergå apoptose. Kreftcellene unngår ofte apoptose ved mutasjoner i gener som koder for apoptoseregulering. For eksempel har 50% av humane kreftceller mutasjoner i genet p53 som er ansvarlig for respons ved skade på DNA [11]. p53 fungerer ved å stanse cellesyklusen ved skade på DNA, og dersom DNA ikke kan repareres, indusere apoptose [36]. Kreftcellene kan unngå apoptose ved å øke uttrykket av proteiner i BCL-2 familien som fungerer anti-apoptotiske. Overuttrykk av disse proteinene assosieres ofte med en dårlig prognose, økt risiko for tilbakefall eller resistens mot kreftmedikamenter. Samtidig har man sett at kreftcellene er ”avhengige” av anti-apoptotiske BCL-2 og dermed at inhibering av ett eller flere anti-apoptotiske proteiner i BCL-2 familien forårsaker apoptose i kreftcellene, men ikke i normalt vev [33, 37].

Kreftcellene dysregulerer ofte signalveier for å vedlikeholde cellulær homeostase. Enkelte kreftceller har for eksempel økt uttrykk av MCL-1, et protein som inhiberes i respons på cellostress og induseres ved stimulering fra cytokiner og vekstfaktorer. Enkelte krefttyper har også vist nedsatt uttrykk av miRNA som spiller en rolle i regulering av anti-apoptotiske proteiner. For eksempel har hepato-

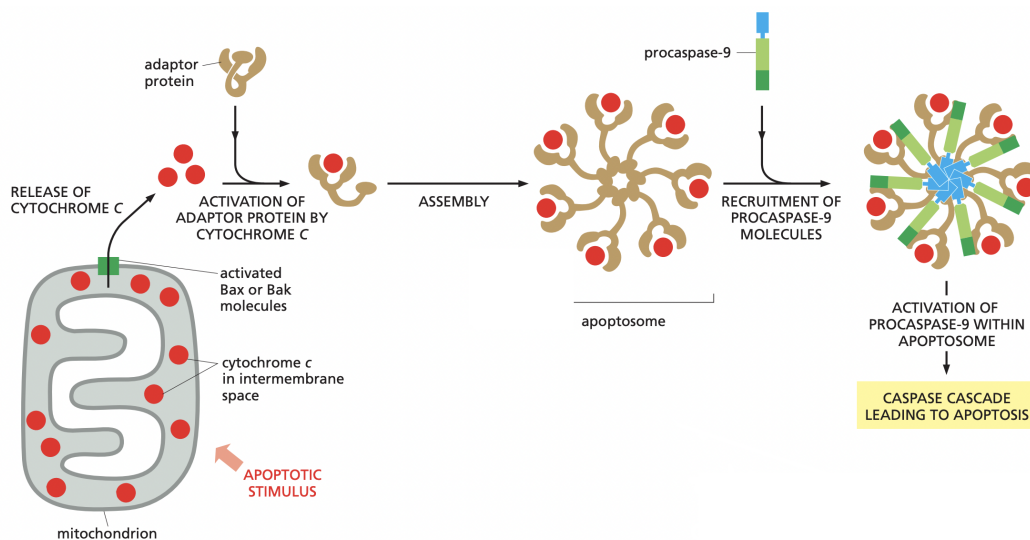
---

cellulær karsinom ingen uttrykk av miRNA-101 som normalt fungerer til å undertrykke uttrykk av MCL-1 mRNA-translasjon. Kreftcellene kan også undertrykke ekspresjon av pro-apoptotiske proteiner. Et eksempel er undertrykket ekspresjon av aktivator BH3-proteinet BIM, tilhørende BCL-2 familien. Post-translasjonelle modifikasjoner kan endre funksjon og stabiliteten til et protein, og dette utnytter kreftcellen på flere måter for å unngå apoptose. Et eksempel er endring av stabiliteten til apoptotiske proteiner. Normalt vil apoptotiske stimuli føre til at et pro-apoptisk protein ikke degraderes like raskt og at man dermed kan få en akkumulering av disse proteinene. Kreftcellene kan dysregulere denne prosessen ved å øke degraderingen av pro-apoptotiske proteiner eller øke stabiliteten til de anti-apoptotiske [37]. Apoptose kan deles inn i to hovedveier. Den ene hovedveien er den intrinsiske- eller mitokondrielle veien. Apoptose gjennom den intrinsiske veien skjer ved hjelp av flere stimuli som ikke er mediert av reseptorer, men som fortsatt produserer intracellulære stimuli. Signalene kan virke inhiberende eller aktiverende på apoptoseregulering i cellen. Den andre hovedveien er den ekstrinsiske- eller dødsreseptor veien. Her skjer apoptose ved hjelp av transmembrane reseptormediatede interaksjoner mellom ligander og dødsreseptorer. Signalet overføres fra en nærliggende celle [32, 34]. Ved binding mellom en ligand og en dødsreseptor, medieres et signal inn i cellen som utløser mekanismer som fører til apoptose. Interaksjonene inkluderer flere tumor nekrose faktorer (TNF) og FasL/FasR proteiner. Perforin/granzym veien kan også indusere apoptose ved hjelp av enten granzym A eller granzym B [34]. Intrinsisk -og ekstrinsisk apoptosevei og apoptose ved hjelp av granzym B leder alle til aktivering av initiator og utførelses caspaser. For eksempel er det en utførelses caspase som vil føre til nedbrytelsen av kjernelamina [34, 32]. Granzym A leder til apoptose uten hjelp fra caspasene, men gjennom skade på enkelttrådet DNA [34].

### 2.2.1 Intrinsisk apoptosevei

Den intrinsiske apoptoseveien reguleres av stimuli som virker inhiberende eller aktiverende. Intrinsisk apoptosevei kalles også den mitokondrielle apoptoseveien da signalveien hovedsakelig reguleres av mitokondrielle proteiner. Proteinene fra mitokondriene frigjøres som respons på stressfaktorer som kjemoterapeutiske midler, UV-lys, DNA-skade eller osmotisk stress [38]. Hovedregulatorene tilhører BCL-2 familien, og det er hovedsakelig balansen mellom aktiviteten til de pro-apoptotiske og anti-apoptotiske medlemmene av familien som bestemmer om cellen går i apoptose eller ikke. BCL-2 familien koder for omtrent 20 proteiner, blant disse BCL-2 og BAX, som regulerer den intrinsiske apoptoseveien. Dersom de pro-apoptotiske medlemmene av BCL-2 familien har overvekt av aktivitet, er resultatet en prosess som kalles mitokondriell yttermembran permeabilisering (MOMP). MOMP er selektiv permeabilisering av den mitokondrielle yttermembranen og fører til frigjøring av proteiner fra det intermembrane rommet. Mekanismen kan i tillegg induseres av cytolytiske stimuli [39, 33, 32]. Et av proteinene som frigjøres som følge av MOMP er cytokrom c. Cytokrom c induserer celledød ved å promotere samlingen av det syvarmede apoptosomet. Apoptosomet rekrutterer initiator procaspaser som trigger en kaskadereaksjon av caspaser som leder til apoptose [32]. En oversikt over veien fra frigjøring av cytokrom c til kaskadereaksjonen kan

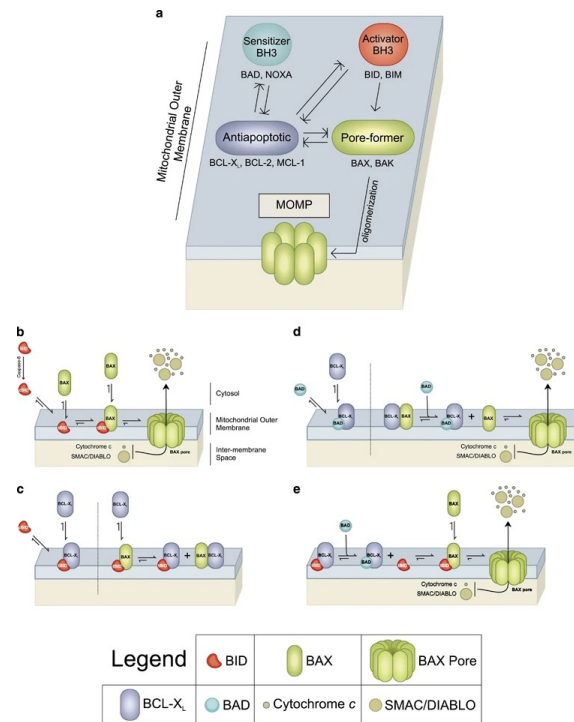
sees i figur 1. Caspase-kaskaden initiert av caspase-9 innebærer aktivering av utførelses caspaser (caspase-3,-6 og -7) som kløyver flere proteinsubstrater for å initiere apoptose og nedbrytning av cellulære komponenter [33, 32, 39]. For eksempel kløyver Caspase-3 mange substrater som fører til de morfologiske endringene i apoptotiske celler, som kondensering av kromatin, fragmentering av DNA og *blebbing* [40].



Figur 1: Oversikt over den intrinsiske apoptoseveien. Overvekt av apoptotiske stimuli i den ytre mitokondrielle membranen fører til frigjøring av cytokrom c [32]. Cytokrom c vil binde seg til et adaptorprotein som samles til apoptosomet, et syvarmet kompleks. De syv ”armene” rekrutterer og aktiverer initiator caspasen caspase-9 ved å fasilitere dimerisering av procaspasen [39]. Caspase-9 vil så lede til en kaskadereaksjon av caspaser som fører til apoptose [32]. Figuren er hentet fra ”Chapter 18- The cell-division cycle” i boka ”Essential Cell Biology” [32]

### 2.2.2 BCL-2 familien

Hovedregulatorene i den intrinsiske apoptoseveien tilhører BCL-2 familien. Proteinfamilien deles i tre; pro-apoptotiske proteiner, anti-apoptotiske proteiner og BH3-proteiner [33, 41]. En oversikt over disse kan sees i figur 2. Det er interaksjoner mellom de tre gruppene i BCL-2 familien, og deres ekspresjon, som bestemmer om cellen undergår apoptose via den intrinsiske apoptoseveien [42, 41].



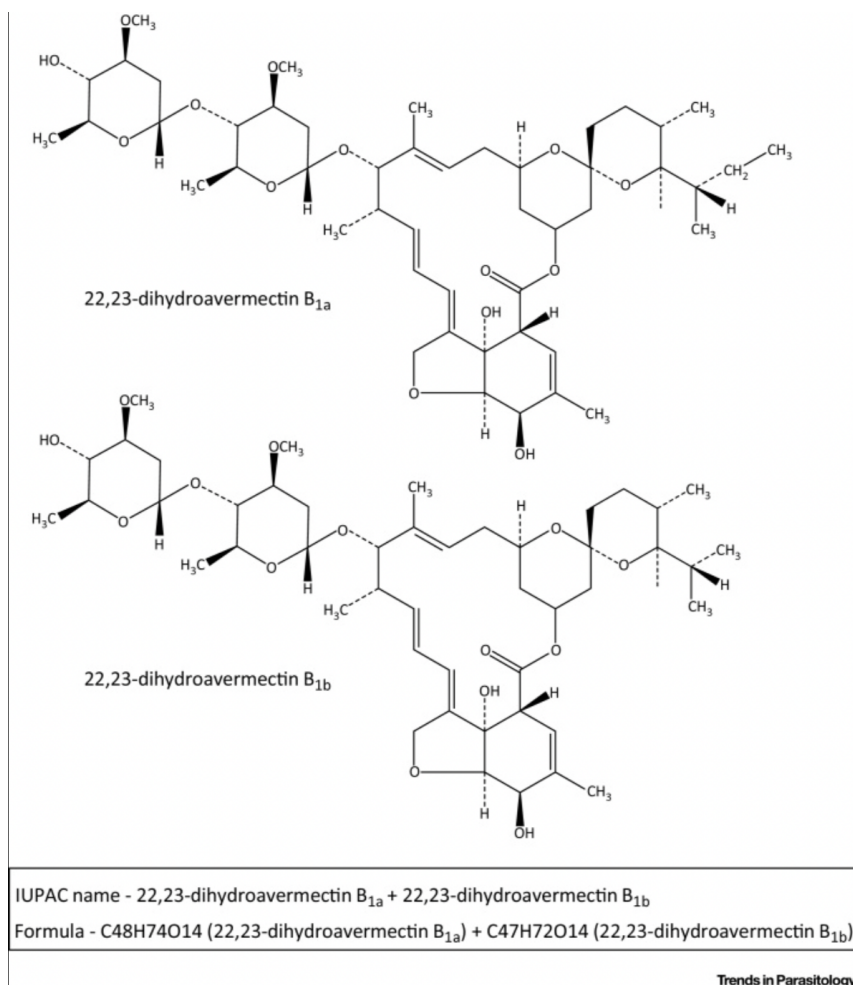
Figur 2: Oversikt over proteiner i BCL-2 familien og deres interaksjoner. Interaksjoner i mitokondrienes lipid bilag regulerer MOMP. Piler med strek oppå representerer inhiberende effekt, piler representerer aktiverende effekt. **Legend** viser oversikt over hvordan proteinene er illustrert i tegningene. **a)** Viser en oversikt over hvilken gruppe proteiner i BCL-2 familien tilhører. Pro-apoptotiske proteiner benevnes som "Pore-formers". Binding av aktivator BH3 proteiner til lipid bilaget øker affiniteten for pro-apoptotiske proteiner til bilaget slik at de kan oligomerisere og danne porer i bilaget. Sensitizer BH3 proteiner hemmer anti-apoptotiske proteiner ved felles hemming, av både BH3 proteinet og det anti-apoptotiske proteinet. Felles hemming forekommer også ved inhibering av pro-apoptotiske og BH3 proteiner ved anti-apoptotiske proteiner. **Figur b-d** viser interaksjoner i BCL-2 familien som fører til eller hemmer MOMP. Ett eksempel er brukt fra hver kategori ved cBID (aktivator BH3 protein), BAX (pro-apoptotisk), BCL-X<sub>L</sub> (anti-apoptotisk) og BAD (sensitizer BH3 protein). [41]. **b)** BID, aktivator BH3 protein, kløyves til den aktive formen cBID av initiator caspasen caspase-8 [41, 43]. cBID består av to fragmenter, hvor ett av dem settes inn i membranen. cBID bundet til membranen kalles tBID. tBID rekrutterer og binder til inaktiv BAX, slik at proteinet aktiveres og innsettes i lipidbilaget til mitokondriemembranen. Membranbundet BAX kan så oligomerisere til BAX porekompleks som initierer MOMP som frigjør proteiner fra det intermembrane rommet i mitokondrien til cytosol (SMAC/Diablo og cytokrom c). **c)** Viser binding mellom BCL-X<sub>L</sub> og tBID eller BAX. Dette fører til felles hemming av pro- og anti-apoptotiske proteiner. tBID bundet til BCL-X<sub>L</sub> kan ikke aktivere BAX og MOMP. BCL-X<sub>L</sub> kan også binde til aktiv BAX og dermed inhibere oligomeriseringen [41]. I denne modellen er BAX aktiv og kan indusere MOMP med mindre proteinet blir inhibert av anti-apoptotiske proteiner. **d og e)** Viser binding av BAD til BCL-X<sub>L</sub> som inaktiverer det anti-apoptotiske proteinet. Siden BCL-X<sub>L</sub> har større affinitet for tBID enn for BAX, vil BAD først løsne BAX fra BAX/BCL-X<sub>L</sub> komplekset (d). Deretter vil BAD frigjøre tBID hos BCL-X<sub>L</sub> ved å erstatte proteinet med seg selv. Dette fører til binding mellom tBID og BAX, aktivering av BAX, oligomerisering og porekompleks [41, 44]. Figuren er hentet fra "BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death" [41].

---

Alle proteiner i BCL-2 familien inneholder et domene som kalles BH3, her kan en gruppe i BCL-2 familien som kalles BH3-proteiner binde seg. BH3-proteinene kan igjen deles inn i *sensitizer* BH3-proteiner og aktivator BH3-proteiner. Det er binding av aktivator BH3-proteiner i BH3 domenet til de pro-apoptotiske proteinene som gjør at de endrer konformasjon og kan danne porer i den mitokondrielle yttermembranen. *Sensitizer* BH3-proteiner binder til BH3 domenet hos anti-apoptotiske proteiner og hindrer de i å binde seg til og inhibere pro-apoptotiske proteiner [41, 45]. BH3 domenet i anti-apoptotiske proteiner kan også binde til BH3 domenet til de pro-apoptotiske proteinene eller aktivator BH3 proteinene. Slik blir disse proteinene inhibert og vil dermed ikke promotere apoptose. Interaksjonene er kompetitive og reaksjonsretningen bestemmes av proteinene i overskudd. Dette betyr at anti-apoptotiske proteiner, som BCL-2, kan virke enten ved å binde til pro-apoptotiske proteiner og dermed inhibere proteinet, eller ved å binde til aktivator BH-3 proteiner slik at disse ikke kan aktivere pro-apoptotiske proteiner. Binding av aktivator BH3-proteiner til pro-apoptotiske proteiner, for eksempel BAX, fører til rekruttering av pro-apoptotiske proteiner til den mitokondrielle membranen. Proteinene vil herfra gjennomgå en konformasjonsendring i bilaget og danne homodimere som går sammen med andre homodimere til oligomerer. Disse oligomerene av pro-apoptotiske proteiner danner porer i bilaget som fører til MOMP [41].

### 2.3 Ivermectin

Heterogeniteten til krefttumorer gjør det vanskelig å finne et spesifikt medikament som bremser tumorveksten, men tidligere studier har vist at Ivermectin kan ha effekt på cellevekst i tumorer [46, 47]. Effekten er vist gjennom flere molekylære mekanismer, blant disse apoptose [48]. Ivermectin blir produsert gjennom en blanding av to avermectiner fra bakterien *Streptomyces avermitilis* og inneholder 80% 22,23-dihydroavermectin-B1a og 20% 22,23-dihydroavermectin-B1b [49, 50]. Kjemisk struktur kan sees i figur 3. Ivermectin har blitt brukt som et antiparasittisk middel for dyr og fungerer ved å aktivere glutamatkanaler for klor, dette fører til en stor innstrømning av klorioner som til slutt interfererer med nerve- og muskelfunksjoner, og fører til paralysen og død hos parasitten [4, 49, 51]. Dosering av Ivermectin varierer med behandlingsårsak, men hyppigst brukt er doser på 150-200 µg/kg [6]. Doser opp til 2000 µg/kg har en signifikant sikkerhetsmargin og skal være trygt for bruk til mennesker [6, 52]. 2000 µg/kg tilsvarer en *in vitro* konsentrasjon på 5 µM [52]. En tidligere bacheloroppgave om effekten av Ivermectin på Caco-2 testet Ivermectinkonsentrasjoner på 2.5, 5 og 7.5 µM i 24, 48 og 72 timer og så effekt ved 72 timer for 5 og 7.5 µM [8]. En annen bacheloroppgave som så på effekten av Ivermectin på A549-celler testet konsentrasjonene 0.5, 1 og 5 µM i 24, 72 og 120 timer. Studien så at prøver dyrket med en Ivermectinkonsentrasjon på 5 µM i 72 timer ga antydning til størst forskjell, sammenlignet med kontrollen. Tidsintervallet på 120 timer ga overvekst, mens kortere tidsintervaller tydet på dårligere effekt av Ivermectin [9].



Figur 3: Kjemisk struktur til de to komponentene i Ivermectin; 22,23-dihydroavermectin-B1a og 22,23-dihydroavermectin-B1b. Figuren er hentet fra "Ivermectin- Old Drug, New Tricks?" [53].

Senere studier antyder at Ivermectin påvirker flere molekylære mekanismer og kan ha effekt på andre sykdommer. Medikamentet har vist inhibitorisk effekt på Sars-CoV-2 viruset, utvist anti-inflammatorisk effekt på T-celle induert hudsykdom. Det er også vist at Ivermectin minsker serumkolesterol og glukosenivåer, samt forbedrer insulinsensitivitet i diabetisk mus [53, 49, 48]. I tillegg har man, som nevnt, sett at Ivermectin kan ha antikarsinogen effekt og derfor kan anvendes i behandling mot kreftsykdommer som for eksempel glioblastom, eggstokkreft og lungeadenokarsinomer (LUAD) [48, 4]. Opphavet til Ivermectin sine antikarsinogene egenskaper på et molekylært nivå er enda ikke kjent. Dette gjør at man per nå ikke kan bestemme hvilke krefttyper Ivermectin vil kunne behandle, men man har sett at Ivermectin blant annet kan føre til autofagi og apoptose [48, 49]. Med autofagi menes det prosesser som innebærer at cellene pakker inn og deretter fordøyer deler av sitt eget innhold. Det nedbrutte celleinnholdet vil senere kunne brukes av cellen selv eller organismen [54]. Autofagi induert av Ivermectin skjer ved at medikamentet inhiberer enzymet PAK1 (P21 (RAC1)-aktivert kinase 1). Enzymet er involvert i flere biologiske prosesser og dermed kan inhibering føre til autofagi ved hjelp av flere signalveier, blant annet Akt/mTOR signalveien i krefttyper som brystkreft og glioblastom [48]. PAK1 kan fosforylere Bad, et *sensitizer* BH3-protein

---

i BCL-2 familien, enten på egenhånd eller ved hjelp av Raf-1. Fosforyleringen inhiberer Bad sin interaksjon med anti-apoptotiske BCL-2 eller BCL-XL og leder slik til at cellen unngår apoptose. Nedregulering av PAK1 vil derfor kunne lede til apoptose [48, 55, 41]. Man har også sett at Ivermectin induerte apoptose i HeLa-celler og glioblastom ved å oppregulere uttrykket av BAX og p53, nedregulere uttrykket av BCL-2 og redusere nivåene av flere cykliner og cyklin avhengige kinaser (CDKer), i tillegg til å øke frigjøringen av cytokrom c. Ivermectin har også vist seg å kunne inhibere angionese, utøve anti-mitotisk aktivitet og inhibere mitokondriell respirasjon [48]. Dette er mekanismer som må være på plass for å få celle- og tumorvekst. Inhibering av mitokondriell respirasjon øker også mengden ROS, en bidragsyter til apoptose. [49, 48].

Hvordan Ivermectin fører til programmert celledød er forskjellig og varierer med krefttypen medikamentet brukes til å behandle [49]. I tillegg har Ivermectin ulik effekt på forskjellige celletyper. Cellelinjer fra brystkreft og eggstokkreft er mer sensitive til Ivermectin, mens en cellelinje fra prostatakreft er vist mer resistent [7]. Ivermectin førte til apoptose i cellelinjer blant annet fra tykktarmskreft, eggstokkreft, glioblastomer og leukemi. Hos cellelinjer fra gliom, brystkreft og melanom førte Ivermectin til autofagi [49]. En studie gjort av M.Li, et. al på effekten av Ivermectin på humane LUAD cellelinjer (A549, H358 og H1299), viste at Ivermectin hindret koloniformasjon og levedyktigheten til cellene, påvirket celleproliferasjonen, førte til apoptose og økt autofagi. Studien så at Ivermectin inhiberte PAK1 uttrykk i LUAD cellene, samtidig som en økning av Caspase-3 ble observert. M. Li, et. al så også på effekten av Ivermectin *in vivo*. I studien ble det injisert humane A549-celler i nakenmus. Det ble rapportert at tumorene hos mus som mottok Ivermectin vokste saktere sammenlignet med kontrollene. Samtidig var tumorene mindre i både størrelse og vekt, sammenlignet med kontrolltumorene. I studien ble det brukt en dose på 60 mg/kg uten at man så tegn på toksisitet. Dette tyder på at den trygge grensen satt på 2mg/kg er godt innenfor det trygge området for konsum av medikamentet [4].

## 2.4 RT-qPCR Analyse

Ekspresjonen av apoptosemarkører kan undersøkes ved hjelp av en genekspresjonsanalyse. En genekspresjonsanalyse tar for seg bestemmelsen av relativ ekspresjon for et gitt gen under bestemte forhold, målt relativt til det samme genet under andre spesifiserte forhold, eller mot standardiserte gener av bestemt ekspresjonsnivå [56]. For eksempel ekspresjonen av et gen før og etter tilførelsen av et legemiddel eller ulike stressbetingelser. Effekten av Ivermectin på A549-celler kan undersøkes ved hjelp av en slik genekspresjonsanalyse. qPCR er en analysemetode basert på polymerase kjedereaksjon (PCR) som kombinerer amplifikasjon av DNA-målesekvenser med kvantifikasjon av den initiale konsentrasjonen av den amplifiserte målesekvensen i reaksjonen [57].

En qPCR-analyse vil være godt egnet til studien av genekspresjon. PCR refererer til prosessen med amplifisering av en kjent DNA-sekvens, målesekvensen, et bestemt antall ganger for å generere tilstrekkelig med kopier av DNA-sekvenser for sekvensering av en ønsket region innad i DNA [58]. DNA-målesekvensene, heretter benevnt templat-DNA, er en definert region innad i DNA som



---

markerer den genetiske sekvensen, målsekvensen, som koder for det genet man ønsker å analysere [59]. For at qPCR skal kunne benyttes til kvantitativ analyse, er det essensielt med inkludering av referansegener som endogene kontroller. Referansegener, også kalt "husholdningsgener" eller normaliseringsgener, er gener med et konstant ekspressionsnivå uavhengig av forhold [60]. Integreringen av referansegener muliggjør sammenligningen av genekspressjon mellom ulike miljøbetingelser. Dette er for å sikre at eventuelle forskjeller i genekspressjon av målsekvensene ikke forekommer av andre faktorer enn de kontrollerte endringene gjort på laboratoriet. Prosessen med inkludering av referansegener, og sammeligningen mellom disse og målgenene, kalles normalisering av metoden [60]. Primere, bestående av oligonukleotider, er korte enkelttrådede DNA-polymerer (ssDNA) komplementære til hver DNA-tråd av sekvensen man ønsker å analysere [61]. Primere kreves for at DNA-polymerase skal kunne initiere DNA-syntese for amplifisering [62]. Det er i de fleste tilfeller, nødvendig med både en *forward* primer og en *reverse* primer komplementære til hver sin DNA-tråd, eller polynukleotidkjede [63]. *Forward* primer binder seg til polynukleotidkjeden som brukes som templat, mens *reverse* primer bindes til polynukleotidkjeden komplementær til den initielle templat-DNA polynukleotidkjeden. De to primerne, primerparet, vil syntetisere nye polynukleotidkjeder på henholdsvis den negative, *anti-sense* DNA-tråd i 3'- til 5'-retning, og den positive komplementære, *sense* polynukleotidkjeden i 5'- til 3'-retning [59]. *Forward* primer bindes til startkodon og *reverse* primer bindes til stoppkodon på de respektive polynukleotidkjedene [59]. Begrepene *anti-sense* og *sense* refererer til kodene- og ikke-kodene segmenter innad i DNA [64]. Primerparet gir DNA-polymerase et utgangspunkt for binding til 3'-hydroksylgruppen i primerenden, som muliggjør påfølgende DNA-replikasjon. I tillegg fører det DNA-polymerase til den spesifikke målsekvensen innad i DNA for amplifisering [62, 65]. Primerdesign er essensielt for å sikre spesifisitet og for å unngå dannelsen av primerdimere. Spesifisiteten kan kun bekreftes eksperimentelt [65].

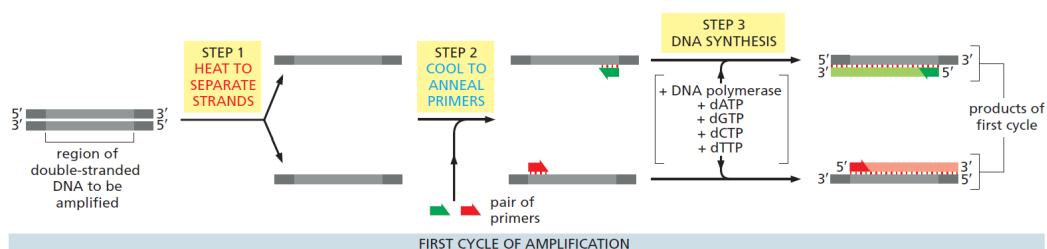
DNA-polymerase er enzymet som driver DNA-syntese [60]. Under PCR-analyse brukes en termostabil DNA-polymerase; Taq DNA-polymerase, først isolert fra den termostabile bakterien *Thermus aquaticus* [59, 66]. Taq DNA-polymerase brukes i PCR på grunn av av dens termostabile egenskaper, hvor enzymet har en halveringstid på opptil 40 minutter ved en temperatur på 95°C [59]. PCR-prosessen skjer gjennom konsekutive sykluser med repeterende temperaturerendringer over gitte tidsintervaller. Dermed er den termostabile egenskapen til Taq DNA-polymerase essensiell for ivaretagelse av DNA-polymerase sin enzymatiske aktivitet ved temperaturer høye nok for denatureringen av dsDNA [59].

---

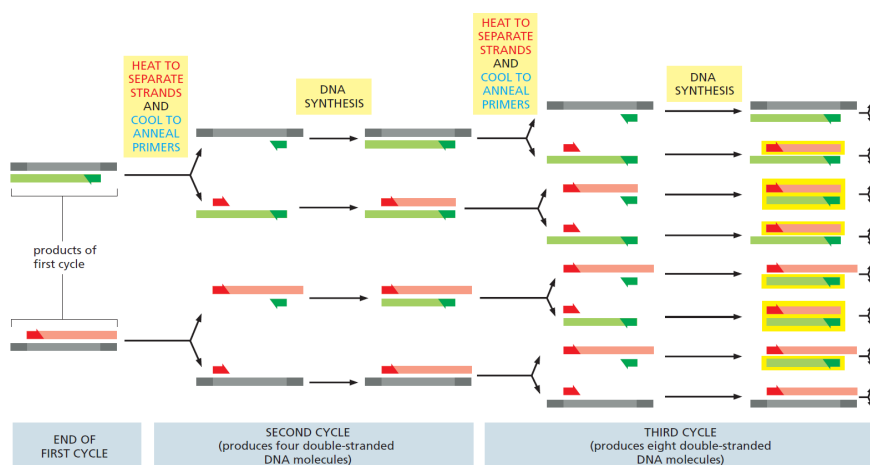
PCR baserer seg på fundamentale prosesser som skjer naturlig ved DNA-replikasjon, og benytter seg av de biokjemiske prinsippene baseparing og DNA-molekylers smeltetemperatur, for amplifisering og påfølgende analyse av DNA [63]. PCR-syklusene kan deles inn i tre hovedkategorier: Denaturering, hybridisering og polymerisering. I denatureringsfasen økes reaksjonstemperaturen til 95°C [63]. DNA denatureres ved at hydrogenbindingene som holder dsDNA sammen nedbrytes, og resulterer i enkeltstående polynukleotidkjeder, ssDNA [61]. Dette er grunnleggende for at de to respektive polynukleotidkjedene skal kunne amplifiseres. Under annilierungs- eller hybridiseringsfasen, reduseres temperaturen til 50-65°C [63]. Ved polymerisering fester primerne seg til deres komplementære polynukleotidkjeder, hvor det dannes tilsvarende hydrogenbindinger som forankrer primerne til 3'-enden av hver templatstråd samt forhindrer re-hybridiseringen av templatstrådene med seg selv [61, 63]. Polymerisering, eller elongering, markerer den siste overordnede fasen av PCR. Ved polymerisering justeres temperaturen til optimal temperatur for virkningen av Taq DNA-polymerase, som oppnås ved 75 til 80°C [63]. Taq DNA-polymerase elongerer PCR-primerene og lager kopier av templat-DNA [61]. Ved polymerisering, syntetiseres en ny polynukleotidkjede i 5'-3'-retning ved å binde frie nukleotider sammen i reaksjonsløsningen. Reaksjonen resulterer i et nytt DNA-molekyl komplementært til det initielle DNA-molekylet [63].

Kvantitativ PCR (qPCR) kan utføres ved ett- eller to-trinns RT-qPCR. Prosessen hvor DNA syntetiseres fra RNA før det videre gjennomgår PCR, spesifiseres som revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-PCR). Ved sanntidsanalyse kalles prosessen tilsvarende RT-qPCR [60]. Ett-trinns RT-qPCR går ut på å utføre prosessen ved omdannelse av RNA til DNA i et og samme PCR-rør som brukes i selve PCR-reaksjonen [67]. To-trinns RT-qPCR involverer bruken av ulike rør: Ett for revers transkripsjon av prøven, og ett annet til påfølgende PCR-amplifisering [67]. Til forskjell fra ett-trinns qPCR, vil to-trinns qPCR utføre en separat reaksjon for syntese av cDNA [67]. For at et gen skal uttrykkes, vil nukleotidsekvensen innad i DNA transkriberes til messenger-RNA (mRNA) [56]. Derfor isoleres cellenes mRNA for videre analyse. For å kunne utføre en genekspresjonsanalyse ved bruk av qPCR, må mRNA omdannes til komplementært DNA (cDNA) [68]. cDNA er en syntetisk form for DNA som ikke inneholder introner, ikke-kodende sekvenser, ettersom det er basert på mRNA-transkriptatet [69, 70]. cDNA-syntese er nødvendig for nøyaktig amplifisering. Dette skyldes at RNA-molekyler ikke vil detekteres i en qPCR-analyse grunnet deteksjonsprinsippets natur, beskrevet i avsnitt om fluorescens, i tillegg til praktiske aspekter ved analysen, inkludert molekylær stabilitet og effektivitet ved kvantifisering [68, 60]. Prosessen hvor cDNA syntetiseres ved bruk av mRNA som templat kalles revers transkripsjon. Enzymet revers transkriptase katalyserer reaksjonen. Revers transkriptase er en DNA-polymerase som brukes til transkripsjonen av RNA til DNA [71]. Under transkripsjonen, brukes en oligo(dT) primer til å initiere DNA-syntesen ved å danne et bindingssted for revers transkriptase [61]. En oligo(dT) primer består av 18-20 baser av thymin og er designet til å hybridisere mRNA-molekyler. Oligo(dT) primeren hybridiserer polyadenylsyrekjede på 3'-enden av mRNA-molekylet. Dette er en kjede av adeninbaser som danner hydrogenbindinger med komplementære thyminbaser fra Oligo(dT)

primeren [61]. Revers transkriptase bruker den frie 3'-OH-gruppen gitt av oligo(dT) primer som utgangspunkt for påfølgende DNA-syntese, og DNA syntetiseres i 3'- til 5'-retning [66, 72]. Oligo(dT) primer er derfor essensielt for at revers transkriptase skal kunne feste seg til mRNA og utføre cDNA-syntese. Fordelen med to-trinns RT-qPCR er at bruken av oligo(dT) primer tillater konversjonen av de kodende sekvensene av RNA til cDNA. Dette muliggjør at reaksjonen ikke begrenses til spesifikke gener, men kan brukes til genanalyse selv etter at revers transkripsjonsreaksjonen er gjennomført [60].



Figur 4: Grafisk representasjon av den første syklusen i en PCR-reaksjon vist i tre steg: Denaturering, hybridisering og polymerisering. Temperaturen økes og DNA denatureres til to enkeltstående polynukleotidkjeder. Reaksjonstemperaturen reduseres og primere tilsatt reaksjonen fester seg til komplementære sekvenser på de enkeltstående polynukleotidkjedene. Temperaturen økes igjen for optimal enzymatisk virkning av DNA-polymerase som syntetiserer nye komplementære polynukleotidkjeder. Resultatet er to identiske DNA-molekyl. Figuren er hentet fra "Essential Cell Biology, 5th Edition" [62].

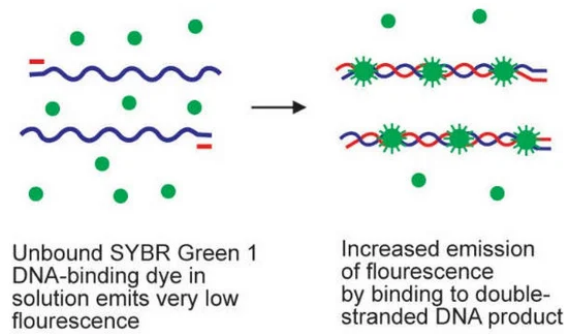


Figur 5: En forlengelse av figur 4. De tre stegene denaturering, hybridisering og polymerisering vil kontinuerlig fortsette så lenge det er tilstrekkelig med reagenser for amplifikasjon til stede. PCR-produktene fra første PCR-syklus vil kunne amplifiseres eksponentielt til man oppnår opptil millioner av kopier templat-DNA. Figuren er hentet fra "Essential Cell Biology, 5th Edition" [62].

qPCR baseres på prinsippet bak fluorescens. Reaksjonen har sitt opphav fra de fluorescerende egenskapene til et fluorescerende reporter-gen, som tilsettes qPCR-reaksjonsanalysen. Fluorescens er molekylers emisjon av lysenergi øyeblikkelig etter det samme molekylet selv har absorbert lysenergi av en lavere bølgelengde [73].

---

qPCR har to anvendte fremgangsmåter for deteksjon: Bruk av ikke-spesifikke DNA-bindende fluorescerende fargestoffer og fluorescens-merket sekvensspesifikke prober. Både ikke-spesifikke DNA-bindende fluorescerende fargestoffer og fluorescens-merket sekvensspesifikke prober, inneholder former for reporter gener [65]. Et reporter gen er et gen som produserer en proteinreseptor som tillater bindingen av prober til genet av interesse [61]. Inkludering av et slikt reporter gen tillater påfølgende fluorescens ved at de fluorescerende molekylerne kan bindes til dsDNAet. Fluorescens detekteres gjennom hele PCR-analysen og danner amplifikasjonskurven som tillater den kvantitative analysen [68]. TaqMan-prober eller fluorescens-merket sekvensspesifikke prober, er merkede sekvensspesifikke oligonukleotider [57]. Det at de er sekvensspesifikke betyr at det er designet for de spesifikke målsekvensene av interesse. TaqMan prober er mer spesifikke ved kvantifisering og deteksjon av templat-DNA sammenlignet med ikke-spesifikke DNA-bindende fluorescerende fargestoff [74]. Prosessen tillater generelt mer presis deteksjon av spesifiserte målsekvenser og utelater uspesifikke sekvenser i større grad enn ved bruk av ikke-spesifikke DNA-bindende fluorescerende fargestoff [65]. For at proben skal fluorescere, må den bindes til en sekvens komplementær til seg selv. Dette fører til at proben degraderes av exonuklease aktiviteten til Taq DNA-polymerase [75]. *SYBR Green I* er et asymmetrisk cyanin fargestoff med molekylær strukturformel (2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl-quinolinium) [75]. SYBR Green I er en interkalierende fluorofor. En fluorofor er et fluorescerende molekyl som emitterer lysbølger ved en gitt bølgelengde. Molekylet vil eksiteres ved lysabsorpsjon og emittere lysbølger ved en lenger lysbølgelengde når molekylet vender tilbake til sin grunntilstand [75]. At et stoff er interkalierende betyr at det kan binde seg til mindre fordypninger i dobbeltrådet DNA (dsDNA) uten å forstyrre dens struktur eller bryte hydrogenbindingene som holder polynukleotidkjedene sammen [61, 60]. Først når SYBR Green I har bundet seg til dsDNA vil molekylet fluorescere og påfølgende kvantifisering av DNA muliggjøres. SYBR Green I er et ikke-spesifikt fluorescerende fargestoff som tilsier at det tillater deteksjonen av både spesifikt og ikke-spesifikt amplikon. Av den grunn kan SYBR Green føre til deteksjonen av uspesifikke amplikon og primerdimerer [60]. Uspesifisert binding i en PCR-reaksjon refererer til bindingen av fluorescerende fargestoff til DNA-sekvenser som ikke er av interesse for analysen [59]. Dannelse av primerdimer refererer til prosessen med selv-hybridisering, eller hybridisering av en primer til en annen. Dette betyr at primerne hybridiserer med hverandre [59]. Under amplifisering av templat-DNA, vil mengden fluorescens i qPCR-analysen være proporsjonal med mengde amplikon. Ved deteksjon av SYBR Green I vil man dermed kunne kvantifisere den initielle mengden templat-DNA i prøven [74]. Differansen mellom spesifisitet og effektivitet ved sammenligning med bruk av prober eller ikke-spesifikke fluorescerende fargestoff, kan minimeres ved nøyaktig og omfattende optimalisering av analysen [76]. Ved bruk av SYBR Green I er korrekt primerdesign spesielt viktig da dannelse av primerdimer er desto mer sannsynlig enn ved bruk av sekvensspesifikke prober [65].

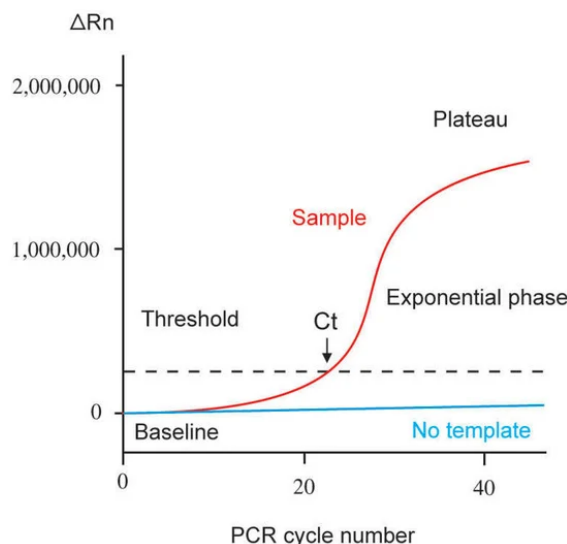


Figur 6: Binding av SYBR Green I fluorescerende molekyler til dsDNA. Figuren er hentet fra "Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis". Figuren viser at SYBR Green I er avhengig av dsDNA for å kunne interkalere og fluorescere, noe som betyr at man ikke vil få detektert enkeltstående ssDNA-molekyler ved deteksjon i qPCR [60]. Dette er hensiktsmessig for å unngå "falsk positiv" utslag for RNA- og ssDNA-molekyler innad i en qPCR-analyse. SYBR Green I vil binde til ethvert dsDNA-molekyl, uavhengig om det er spesifikt eller uspesifikt amplicon.

Til kontrast fra tradisjonell endepunkts-PCR, gir qPCR kvantitative analyseresultater i sanntid, som innebærer at man ikke har behov for etterfølgende gelelektroforese for videre analyse [74]. Det manglende behovet for prosessering av PCR-resultater ved gelelektroforese, reduserer sannsynligheten for krysskontaminering fra tidligere amplicon [60]. qPCR gir informasjon vedrørende mengde amplicon akkumulert innad i de ulike syklusene i reaksjonen, i tillegg til informasjon vedrørende effektiviteten av PCR-reaksjonen og potensielt ikke-spesifikke bindinger eller kontaminering [60]. qPCR-reaksjonsanalyse kan tilsvarende som for PCR, deles inn i tre faser: Den eksponentielle fasen, den lineære fasen, og platåfasen. Den eksponentielle fasen markerer fasen hvor antallet PCR-produkt amplifiseres lineært [65]. Ved teoretisk maksimum tilsvarer fordoblingen 100% økning av templat-DNA for hver syklus. Den eksponentielle fasen forekommer i det fluorescensintensiteten krysser terskelverdien, og er fasen hvor datainnsamling begynner. *Threshold* eller grenseverdien, markerer det nøyaktige punktet i reaksjonen hvor antall amplicon akkumuleres i stor nok grad til at reaksjonen har nådd punktet med eksponentiell økning av PCR-produkt [68]. Fluorescensintensitet i den eksponentielle fasen brukes til kvantifisering av initiell mengde templat-DNA og beregning av PCR-effektivitet [60]. Datainnsamling foregår i den eksponentielle fasen da reaksjonskomponentene enda ikke er en begrensende ressurs [68, 60]. I den lineære fasen reduseres amplifiseringsraten og man får en lineær amplifisering. Dette forekommer av at reaksjonskomponentene avtar og blir en begrensende ressurs for videre amplifisering av PCR-produktene [68]. Platåfasen betegner øyeblikket i reaksjonen hvor amplifiseringen avtar ytterligere. Under platåfasen slutter innsamlingen av data fra qPCR-analysen [68].

Terskelverdi settes til ti ganger verdien av standard derivasjonen for det gjennomsnittlige amplifikasjonssignalet som emitteres fra reaksjonen ved grunnlinjen [60].  $C_q$ -verdien er definert som syklusnummeret ved terskelnivået for log-basert fluorescens [77].  $C_q$ -verdien markerer ofte slutten på den eksponentielle fasen, og brukes til å estimere initiell mengde DNA i reaksjonen, hvor lavere verdier indikerer høyere initiell mengde DNA [60].

$C_q$ -verdien markerer også punktet i analysen hvor PCR-effektiviteten fremdeles er relativt høy, samtidig som forholdet mellom start-DNA og amplikon er kvantifiserbart. Ethvert fluorescenssignal høyere enn grenseverdien antas å være fluorescenssignal som representerer faktisk amplifisert PCR-produkt [60]. Grenseverdien må settes høyt nok til at analysen ikke skal inkludere bakgrunnsstøy, og lav nok til at faktiske fluorescenssignaler blir detektert og tatt med i analysen [60].  $C_q$ -verdien gir en indikasjon på PCR-spesifisitet, hvor høy  $C_q$ -verdi ( $>40$ ) indikerer ikke-spesifikk binding i reaksjonen [78].



Figur 7: Grafisk visualisering av amplifiseringsreaksjonen av ett enkelt amplikon. Kurven som viser forholdet mellom antall reaksjonssykluser (x-aksen) og antall amplikon (y-aksen).  $C_t$  er i denne teksten omtalt som  $C_q$ .  $\Delta R_n$  betegner amplikons fluorescensemisjon til enhver tid minus emisjonen av grunnlinjen [60]. Figuren er hentet fra "Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis" [60]

En smeltekurve visualiserer oligonukleotidenes spesifikke smeltetemperatur ( $T_m$ ) [78]. Kurven tillages ved å plote fluorescens som en funksjon av temperatur [79]. En smeltekurve muliggjør smeltepunktanalyse, som tillater grafisk visualisering av alle PCR-produktene innad i analysen. Dette inkluderer både spesifikke og ikke-spesifikke amplikon [79]. Smeltekurveanalyse er essensielt for å forsikre seg om at uspesifikk binding av primer ikke tar sted under qPCR-reaksjonen [65]. Dette er spesielt viktig ved bruk av ikke-spesifikke fluorescerende fargestoff, som SYBR Green I. Analyse vil kunne bestemme spesifisiteten av amplifisert templat-DNA [60]. Dersom reaksjonen produserer en større andel primerdimere, kan det resultere i redusert analyseeffektivitet samt produsere falskt positive prøver [78]. For å utelukke at dannelse av primerdimer og om annen kontaminasjon har hatt innvirkning på prøveresultatet, anvendes en *No Template Control*, heretter benvent som NTC. Ved å inkludere NTC for hvert primerpar kan man identifisere endringer i smeltekurven som oppstår utenom og innad i det forventede smeltepunktet for primerpar. Primerdimere er korte sekvenser som vil, av den grunn, ha et lavere smeltepunkt nærmere  $70^\circ\text{C}$  [80]. Etersom NTC ikke inneholder templat-DNA vil NTC være mer disponert for å utvikle primerdimere. Dette skyldes at de primerdimerene som kan dannes i NTC, ikke konkurrerer med templatet som primerene har

---

en høyere spesifisitet for [80]. En standardkurve, også kalt kalibreringskurve, inkluderes for hver qPCR-plate for optimalisering av primerkonsentrasjon [65]. En standardkurve er en grafisk representasjon av en serie standarder. Kurven viser sammenligningen av primerens  $C_q$ -verdier ved et gitt fluorescenssignal, mot ulike primerkonsentrasjoner [60].

## 2.5 Statistiske analysemetoder

Tolkning av qPCR-resultater kan gjøres ved hjelp av statistiske analysemetoder. Statistisk analyse av prøveresultater tillater kvantifisering og sammenligning av resultater på tvers av analyser.  $\Delta C_q$  gir et mål på relativt uttrykk av målgenet sammenlignet med referansegnet [78].  $\Delta C_q$  viser antall sykluser som kreves for at det fluorescerende signalet til templat-DNA skal overskride en spesifisert terskel, og er uttrykt i et invers forhold (høy  $\Delta C_q$  indikerer lav genekspresjon) [78].  $\Delta C_q$  viser forskjellen i genekspresjon mellom to prøver, altså forskjellen mellom  $C_q$ -verdiene [60, 78].  $\Delta C_q$  kan vises formelt ved:

$$\Delta C_q = C_{q\text{målgen}} - C_{q\text{referansegnet}} \quad [81, 77] \quad (1)$$

Ligning 1 viser at  $\Delta C_q$  er resultatet av  $C_q$ -verdi målt fra målgenet, eller målsekvensen, minus tilsvarende verdi for referansegnet i samme reaksjon [82]. For å kunne bruke  $\Delta C_q$  videre er det nødvendig å normalisere prøvene for både de faktiske prøvene og kontrollprøvene:

$$\Delta C_q(\text{prøve}) = C_q(\text{målsekvens, prøve}) - C_q(\text{referansegnet, prøve}) \quad [83] \quad (2)$$

$$\Delta C_q(\text{kontroll}) = C_q(\text{målsekvens, kontroll}) - C_q(\text{referansegnet, kontroll}) \quad [83] \quad (3)$$

$\Delta\Delta C_q$ -metoden tillater ytterligere sammenligning av genekspresjon. Metoden brukes til å sammenligne genuttrykk mellom forskjellige eksperimentelle betingelser [78]. Sammen med andre statistiske analyser, legger  $\Delta\Delta C_q$ -metoden grunnlaget for en omfattende genekspresjonsanalyse.  $\Delta\Delta C_q$ -metoden baserer seg på PCR-effektivitet [82]. Effektiviteten gir grunnlaget for sammenligning av genuttrykk da gener må amplifiseres med tilnærmet lik PCR-effektivitet for at de skal kunne sammenlignes [78]. Uten denne samsvarelsen, vil ikke nøyaktig sammenligning kunne legges til grunn, og dermed er metoden unøyaktig i sin helhet. Ulikheter i PCR-effektivitet mellom ulike analyser, ved sammenligning av genekspresjon, vil også resultere i standardkurver med ulike stigningstall [78, 77]. Dersom mengde templat varierer i analysene, kan dette føre til ulikheter mellom  $C_q$ -verdiene, som videre fører til misvisende resultater [78]. Metoden antar at en tilnærmet ideell PCR-effektivitet;  $E \approx 1.00$ . Ligning 4 viser hvordan  $\Delta\Delta C_q$  avhenger av ligning 2 og ligning 3:

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_q(\text{prøve}) - \Delta C_q(\text{kontroll}) \quad [81] \quad (4)$$

---

For å kvantifisere den relative genekspressjonsendringen, kalkuleres endringen som ett enkelt tall. Denne metoden kalles  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden og er tilsvarende  $\Delta\Delta C_q$ -metoden omgjort fra en logaritmisk til en lineær skala [84, 85]. Tallet benevnes ekspresjonsforholdet og refererer til antall ganger genet er uttrykt eller undertrykt, relativt til kontroll [81, 85]. Ligning 5 brukes til å beregne det normaliserte ekspresjonsforholdet:

$$\text{Relativ genekspressjonsendring} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad [81] \quad (5)$$

Tallet man får fra ligning 5 gir et intuitivt resultat: Dersom  $2^{-\Delta\Delta C_q} = 1$  tolkes det som at det ikke har forekommet en endring i genekspressjon. Dersom  $2^{-\Delta\Delta C_q} > 1$  er genet oppregulert i den eksperimentelle gruppen, og dersom  $2^{-\Delta\Delta C_q} < 1$  er genet nedregulert i den eksperimentelle gruppen.

T-Test er en statistisk analysemetode som i qPCR kan brukes til å sammenligne gjennomsnittet mellom to eksperimentelle grupper, for å bestemme om denne ulikheten er av statistisk signifikans eller ikke [77]. Dersom det viser seg at resultatene forekommer av ren tilfeldighet, vil ulikheten ikke være av statistisk signifikans. Det finnes to typer t-test: sammenlignende og uavhengig t-test. En sammenlignende t-test brukes til å studere ulikheter i resultat som stammer fra samme prøve. En uavhengig t-test sammenligner resultatet av to uavhengig prøveresultater; resultater fra to ulike, ikke-relaterte grupperinger [86]. Videre kan det bestemmes hvorvidt en t-test skal anta lik varians (homoskedastisitet) i resulterende data, eller ikke (heteroskedastisitet). Resultat fra en t-test gir grunnlaget for om man kan avkrefte det som kalles for nullhypotesen. Nullhypotesen sier at differansen innad i resultatene ikke er av signifikant verdi. Ved avkreftelse av nullhypotesen, vil det deduktivt bekrefte den alternative hypotesen, som tilsvarende at differansen er av signifikant forskjell [87]. Før man gjennomfører en t-test analyse, settes en  $\alpha$ -verdi.  $\alpha$ -verdien setter maksimum grense resultatet må overholde for at analysen skal kunne sies å være statistisk signifikant [87]. Resultatet av en t-test kalles en p-verdi (p for probability); en verdi som går fra 0 til 1 og indikerer sannsynligheten for at et resultat forekommer tilfeldig [87]. En p-verdi større enn fastslått  $\alpha$ -verdi indikerer at differansen med høy sannsynlighet skyldes tilfeldigheter, og at en robust korrelasjon ikke kan bekrefte. Ved p-verdier lavere enn  $\alpha$ -verdien, forkastes nullhypotesen og resultatet er av signifikant verdi [84, 88].

Variasjonskoeffisientanalyse, "coefficient of variation (CV) analysis", brukes for å statistisk evaluere variasjon i resultatene. CV måler variasjonen mellom gjennomsnittet av dataene. CV er videre definert som forholdet mellom standardavviket fra grunnlinjen, og gjennomsnittet av målingene [84]. En lav CV indikerer at enkeltresultatene er mindre spredt relativt til gjennomsnittet av data, som tilsvarende mer stabilitet innad i resultatene [84]. Dette er igjen med på å forsterke sannsynligheten for at utfallet faktisk er av reel betydning. CV burde ikke brukes på  $C_q$ -verdier da disse verdiene er inverse relativt til mengden templat-DNA (desto mindre  $C_q$ -verdi, desto høyere initiell mengde templat-DNA er det i qPCR-analysen) [78].



---

Istedenfor brukes en CV analyse på resultat fra  $\Delta C_q$ -metoden [78]. Prosentvis CV utregnes matematisk ved

$$CV = \left( \frac{\sigma}{\mu} \right) \times 100\% \quad [84] \quad (6)$$

Ligning 6 er et mål på relativ varians med to variabler;  $\sigma$  som betegner standardavvik (SD), og  $\mu$  betegner gjennomsnittet. Forholdet mellom  $\sigma$  og  $\mu$  viser at desto større SD relativt til gjennomsnittet, desto større variasjon er det mellom prøveresultatene.  $\sigma$  er proporsjonal med CV; hvis det er lavt SD vil det tilsvarende være lav CV, og vice versa. %CV-verdien i biologiske analyser er ofte satt med en *cutoff*-verdi på 11%-20% [89, 90].

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad [91] \quad (7)$$

Ligning 7 viser hvordan man beregner standardavviket,  $\sigma$ .  $\bar{x}$  betegner gjennomsnittet av prøvene  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ , av totalstørrelse  $n$ .  $x_i$  er en gitt  $C_q$ -verdi i analysen. Ligningen viser avviket av de individuelle resultatene fra populasjonsgjennomsnittet [92]. SD beskriver delen av et normalt distribuert datasett og er relativ til gjennomsnittet av prøveverdiene. Ligning 7 viser at SD er avhengig av antall  $C_q$ -verdier, og deres distribusjon rundt gjennomsnittsverdien [87].

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad [91] \quad (8)$$

Ligning 8 viser hvordan man beregner gjennomsnittet av resultatverdiene fra en qPCR-analyse. Hvor  $x_i$  representerer hver enkelt resultatverdi og  $N$  er totalt antall verdier.  $x_i$  verdiene er de normaliserte genekspressjonsverdiene hentet fra formel 5. I kontekst av en qPCR-analyse vil man sette  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  inn for  $x_i$ . Ligning 8 viser summen av alle de relative genekspressjonsnivåene målt fra alle qPCR-analysene, delt på antall replikater, for å finne gjennomsnittlig relativ genekspressjon.

---

## 3 Materialer og metode

I denne delen beskrives materialer og metoder anvendt i studien. Det praktiske segmentet kan inndeles i optimalisering av vekst, kultivering med Ivermectin- og kontrolløsninger og hovedforsøk inndelt i fremstilling av templat til RT-qPCR, qPCR-analyse og statistiske analyser. Optimalisering av vekst innebar å dyrke A549-cellene til stabil vekst var oppnådd. A549-celler ble kultivert med en Ivermectinkonsentrasjon på 5  $\mu\text{M}$  i to tidsintervaller på 24 og 72 timer.

### 3.1 Celledyrking

Seksjonen omhandler metoder knyttet til kultivering av A549-celler, med og uten Ivermectin. Dette innebærer oppstart av cellekulturen, vekstoptimalisering og dyrkning med Ivermectin- og kontrolløsninger. Celledyrking ble gjennomført i LAF-benk etter prosedyre "Rutiner på cellelaboratoriet" (A.2.1). Cellekulturen opprettholdes med regelmessig tilsetning av nytt vekstmedium. For at cellekulturen ikke skulle vokse for tett ble det utført subkultivering. Ved kontinuerlig subkultivering ble celleveksten optimalisert, noe som ble gjort for å kvalitetssikre resultatene.

#### 3.1.1 Tillaging av vekstmedium

500 mL Hams F-12K Kaighns Medium (Thermo Fisher Scientific art. nr. 21127-022) ble tilsatt 5 mL Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific art. nr. 15140163) og 50 mL FBS (Thermo Fisher Scientific art. nr. 3160802). Flasken med FBS ble tatt fra fryser og tint i 2 timer før bruk. Tillaging av løsningen ble gjennomført aseptisk i LAF-benk. Løsningen vil heretter bli omtalt som vekstmedium.

#### 3.1.2 Tining av A549-celler

Ved oppstart av cellekultivering ble en 25cm<sup>2</sup> celleflaske med 6 mL vekstmedium bufret i inkuberingsforhold på 37°C og 5% CO<sub>2</sub>. A549-cellene var oppbevart i 2 mL kryorør i kryotank ved -80°C. Celletiningsprosessen ble utført med utgangspunkt i vedlagt prosedyre "Tining av celler" (A.2.2). Cellene ble oppbevart i romtemperatur i omtrent 30 sekunder. Deretter ble vekstmedium forsiktig tilsatt kryoflasken slik at A549-cellene ble fullstendig tint. Innholdet fra kryorøret ble overført til et 15 mL Falconrør tilsatt 4 mL vekstmedium. Falconrøret med cellene ble sentrifugert ved 200 g i fem minutter for å danne cellepellet. Tilstedeværelse av pellet ble visuelt kontrollert. Supernatant ble deretter aspirert og cellepellet ble resuspendert i 1 mL vekstmedium. Cellesuspensjonen ble overført til den forvarmede celleflasken. Ved hjelp av et invertmikroskop ble det kontrollert at flasken inneholdt tilstrekkelig mengde celler før celleflasken med cellene ble plassert i inkubatorskap.

#### 3.1.3 Optimalisering av vekst

Etter tining av cellene startet arbeidet med å optimalisere veksten. Kultiveringen ble gjort ved optimale vekstforhold for A549-celler ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub>. Cellene ble subkultivert i 1:2 forhold 24

---

timer etter oppstart av cellekultivering. Subkultivering ble gjennomført i henhold til prosedyre for "Subkultivering av celler" (A.2.3). 6 mL vekstmedium ble overført til to nye celleflasker. Gammelt vekstmedium ble fjernet fra celleflasken med cellekulturen, og overført til et spillbeger. Cellene ble vasket to ganger med 3 mL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco art.nr 14025-092) eller fosfatbufret saltvann (PBS) (VWR art.nr E504-500ML), etter tilgjengelighet. 0,5 mL 0,25% Trypsin-EDTA, heretter omtalt som trypsin, (Thermo Fisher Scientific art. nr. 25200-056) ble tilsatt celleflasken. Trypsinen fikk virke over hele overflaten ved å sakte vippe flasken fra side til side. Etter omtrent to minutter ble cellene ytterligere løsnet ved å slå håndflaten bestemt i siden av celleflasken. Ved hjelp av invertmikroskop ble det sjekket om cellene hadde løsnet. Når omtrent 80% av cellene hadde løsnet, ble trypsin inaktivert ved å tilsette 4 mL vekstmedium. Cellekulturen ble homogenisert ved bruk av en pipette, og ble deretter overført til et 15 mL Falconrør. Cellesuspensjonen ble så sentrifugert ved 1200 rpm i tre minutter. Ved endt sentrifugering ble det kontrollert at røret hadde klar supernatant og at det var dannet cellepellet. Supernatanten ble så aspirert og cellepelleten ble resuspendert i 1 mL vekstmedium. Det ble så tilsatt 1 mL vekstmedium i Falconrøret per celleflaske det ble subkultiverert til, slik at totalt antall mL tilsvarte antall celleflasker. Deretter ble 1 mL cellesuspensjon tilsatt de klargjorte celleflaskene. Etter tilsetning av cellesuspensjon ble flasken flyttet rolig i en horisontal bevegelse i x-, så y-retning for jevn fordeling av celler i celleflasken. Celleflaskene ble kontrollert for innhold av celler ved hjelp av invertmikroskop og overført til inkubator med optimale vekstforhold. Under kultivering ble det gjennomført kontinuerlig kontroll av konfluens hvert døgn i invertmikroskop. Cellekulturen ble subkultivert når konfluensen nærmet seg 80%. Splittingsforholdene ble optimalisert for oppskalering til nødvendig antall celleflasker for studiens formål, hovedsakelig i forholdet 1:2 eller 1:3 (A.2.3). Før subkultivering ble det vurdert hvilke flasker som var egnet til å ta med videre i studien. Her ble god, jevn vekst og fravær av kontaminasjon vektlagt.

### 3.1.4 Tillaging av Ivermectinløsning og vekstmedium med Ivermectin/DMSO

Stamløsning inneholdende 10 mM Ivermectin ble laget ved å veie inn 0,04376 gram Ivermectin i pulverform (Sigma-Aldrich art. nr. I8898-1G). Ivermectin ble overført til et 50 mL Falconrør og oppløst i 5 mL "Dimethyl Sulfoxide for Cell Culture", heretter kalt DMSO (ITW Reagents art. nr. 3672.0100). Blandingen mellom Ivermectin og DMSO, heretter kalt Ivermectinløsningen, ble tillaget i avtrekksbenk og blandet ved hjelp av en vortexmikser. Deretter ble Ivermectinløsningen sterilfiltrert i LAF-benk ved hjelp av 0,2 µM sterilt sprøytefilter (Pall art. nr. PN 4612) og overført til nye Falconrør. Ivermectinløsning ble fortynnet i vekstmedium til en konsentrasjon på 5 µM. Kontrolløsning med konsentrasjon på 5 µM DMSO ble også laget ved å fortynne DMSO i vekstmedium.

### 3.1.5 Cellekultivering med 5 µM Ivermectinløsning og kontroller

Før oppstart av cellekultivering med 5 µM Ivermectinløsning, ble cellene subkultivert i 1:3 forhold til et 6-brønners cellebrett etter prosedyre for "Subkultivering av celler" (A.2.3). Cellene ble kul-

---

tivert i 24 timer ved optimale vekstbetingelser før vekstmedium med 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin ble tilsatt løsningen. For å tilsette vekstmedium med Ivermectin ble gammelt vekstmedium aspirert, cellene ble vasket med 3 mL HBSS/PBS to ganger og 6 mL vekstmedium tilsatt 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin ble tilsatt til fire av brønnene. I de to siste brønnene ble det tilsatt kontrolløsninger i form av vekstmedium med 5  $\mu\text{M}$  DMSO og vekstmedium. Kulturene tilsatt vekstmedium, vekstmedium tilsatt Ivermectin og vekstmedium tilsatt DMSO omtales heretter som henholdsvis kontroll-, eksperimentell- og DMSO-gruppe. To av brettene for eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppene ble dyrket i 24 timer og de resterende tre ble dyrket i 72 timer. Cellekulturene ble dyrket ved  $37^\circ\text{C}$  og 5%  $\text{CO}_2$ . To av brettene på hvert tidsintervall ble videre benyttet i hovedforsøket. Et av brettene kultivert i 72 timer ble brukt til optimaliseringsforsøk. For å kunne håndtere alle brettene ble tidsintervallene satt til forskjellige dager og tidspunkter.

## 3.2 Fremstilling av templat til RT-qPCR

Seksjonen presenterer metoder knyttet til fremstilling av templat-cDNA til RT-qPCR. Seksjonen beskriver derfor metoder for høsting av celler, RNA-isolering, cDNA-syntese og måling av RNA- og cDNA-konsentrasjoner.

Etter 24 eller 72 timers kultivering av eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen, ble cellene høstet i henhold til prosedyre "Høsting av celler" (A.2.4). Vekstmediet ble aspirert fra brønnene i cellebrettet, og cellene ble vasket to ganger med 3 mL HBSS/PBS. Det siste volumet av HBSS/PBS ble ikke fjernet før brønnen skulle trypsineres slik at cellene ikke tørket ut. To og to brønner ble trypsinert med 0,5 mL 0,25% trypsin. Trypsin ble latt virke i to minutter før cellene ble skrapet og samlet ved hjelp av en celledraper. Det ble kontrollert med et invertmikroskop at 80% av cellene hadde løsnet. Trypsin ble inaktivert ved å tilsette 4 mL vekstmedium til brønnene. Cellesuspensjonen ble overført til 15 mL Falconrør og homogenisert ved hjelp av en pipette. Cellene i suspensjonen ble telt med Bürker tellekammer C-chip (NanoEntek art. nr. 631-1094), heretter omtalt som Bürker tellekammer, i henhold til prosedyre for "Celle telling" (A.2.5). 11  $\mu\text{L}$  av celsesuspensjonen ble overført til begge sider av Bürker tellekammer. 3 ruter ble telt i begge kammer.

### 3.2.1 RNA-isolering

RNA-isolering ble gjennomført med et RNeasy mini kit (Qiagen art. nr. 74104) i henhold til prosedyre for "RNA-isolering" (A.2.6). Prøvene ble fremstilt på is. Som forberedelse ble Buffer RPE tilsatt fire volum 96% etanol (VWR art. nr. 20823.290). Cellesuspensjonen ble sentrifugert på 300 g i fem minutter etterfulgt av en visuell sjekk for å identifisere om cellepellet ble dannet. Supernatant ble aspirert og 350  $\mu\text{L}$  buffer RLT ble tilsatt for å lysere cellene. Volumet ble valgt da alle suspensjonene inneholdt mindre enn  $5 \cdot 10^6$  celler. Pellet med lysisbuffer ble overført til et eppendorfrør og vortexet i ett minutt. Ett volum 70% etanol, i henhold til prosedyren (A.2.6), ble tilsatt og det ble blandet i volumet ved å pipettere opp og ned. Prøven ble så overført til en RNeasy spinnkolonne plassert i et 2 mL oppsamlingsrør, og deretter sentrifugert i 15 sekunder ved

---

10 000 rpm. Væsken i oppsamlingsrøret ble kastet i et spillbeger.

Videre ble 700  $\mu\text{L}$  buffer RW1 tilsatt og røret sentrifugert i 15 sekunder ved 10 000 rpm, væsken i oppsamlingsrøret ble kastet i et spillbeger. 500  $\mu\text{L}$  buffer RPE ble tilsatt og røret ble sentrifugert i 15 sekunder ved 10 000 rpm. Igjen ble væsken i oppsamlingsrøret kastet i et spillbeger og nye 500  $\mu\text{L}$  buffer RPE ble tilsatt kolonnen. Røret ble deretter sentrifugert i 2 minutter ved 10 000 rpm. Deretter ble oppsamlingsrøret kastet i et spillbeger og spinnkolonnen ble plassert i et nytt oppsamlingsrør med lokk. Spinnkolonnen ble tilført RNase-fritt vann. Volum med RNase-fritt vann ble bestemt etter forventet RNA-innhold, og ble vurdert etter estimert antall celler i suspensjonen basert på gjennomført celledelling. Prøver med  $\leq 500\,000$  celler ble tilsatt 30  $\mu\text{L}$  RNase-fritt vann, prøver med 500 000-900 000 celler ble tilsatt 40  $\mu\text{L}$ , og prøver med over 900 000 celler ble tilsatt 50  $\mu\text{L}$  RNase-fritt vann. Spinnkolonnen ble sentrifugert i ett minutt ved 10 000 rpm for å elluere RNA. Det ble pipettert ut en liten mengde RNA for å måle RNA-konsentrasjon ved hjelp av Qubit 4.0 Fluorometer. Prøvene ble deretter fryst ned til  $-18^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2 cDNA-syntese

Syntese av cDNA ble gjort ved hjelp av qScript Ultra Supermix (Quantabio art. nr. 95217-100) og i henhold til prosedyre for "cDNA-syntese" (A.2.8). Prøvene ble fremstilt på is. Sterilteknikk ble vektlagt. Det ble laget tre cDNA-kopier per RNA-prøve. Hvert PCR-rør ble fylt med 4  $\mu\text{L}$  qScript Ultra Supermix, templat-RNA og nukleasefritt vann til et totalt reaksjonsvolum på 20  $\mu\text{L}$ . RNA-konsentrasjoner målt med Qubit 4.0 fluorometer ble brukt til utregning av mengde templat-RNA i reaksjonen. Restvolumet ble fylt med nukleasefritt vann. I noen tilfeller ble RNase-fritt vann brukt. Reaksjonene ble så kort vortexet og sentrifugert med en minisentrifuge for å samle innholdet. Prosedyre for RT-PCR ble gjennomført i henhold til tabell 1. Konsentrasjon til ferdig cDNA ble så målt ved hjelp av Qubit 4.0 før cDNA ble fryst ned til  $-18^\circ\text{C}$  før videre analyse.

Tabell 1: Program for cDNA-syntese. Viser temperatur og tid for de forskjellige trinnene i cDNA-syntese

Temperatur	25°C	55°C	95°C	4°C	4°C
Tid	2 min	10 min	1 min	4 min	Hold

### 3.2.3 Bestemmelse av RNA- og cDNA-konsentrasjon

Konsentrasjon av RNA og cDNA ble målt i Invitogen Qubit 4.0 Fluorometer. Analyse av RNA- og cDNA-konsentrasjon ble utført i henhold til prosedyrene "Måling av RNA-konsentrasjon" (A.2.7) og "Måling av cDNA-konsentrasjon" (A.2.9). Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific art. nr. Q10210) ble tatt i bruk ved måling av RNA-konsentrasjon i Qubit 4.0 Fluorometer. Måling av cDNA-konsentrasjon ble gjort med Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific art. nr. Q32850) ved hjelp av Qubit 4.0 Fluorometer. *Working solution* ble tillaget for alle prøver, inkludert to standarder, ved å blande Qubit Reagens og Qubit Buffer fra de respektive reagenssettene i et 1:200 forhold. Volumet ble beregnet ved hjelp av reagenskalkulatoren på Qubit

4.0 Fluorometer. Standarder for de forskjellige reagenssettene ble laget ved å tilsette 190  $\mu\text{L}$  *working solution* og 10  $\mu\text{L}$  standard. Ved bestemmelse av RNA-konsentrasjon ble BR RNA-standard #1 og #2 fra reagenssettene brukt. dsDNA BR standard #1 og #2 ble brukt til bestemmelse av cDNA-konsentrasjonen. Standardene ble blandet med vortexmikser og inkubert i to minutter ved romtemperatur før resultatene ble avlest i fluorometeret. Standardkurver ble generert av fluorometeret. For å finne konsentrasjoner som ga resultater innenfor standardkurven, ble det utført optimaliseringsforsøk. Under optimaliseringen ble volum prøve og *working solution* variert for å finne den mest hensiktsmessige mengden reagens og prøvevolum. Ut fra optimaliseringsforsøk ble mengde RNA-prøve for å bestemme RNA-konsentrasjon satt til 1-2  $\mu\text{L}$ , og mengden cDNA for å bestemme cDNA-konsentrasjon satt til 10  $\mu\text{L}$ . Det ble hovedsaklig brukt 2  $\mu\text{L}$  i bestemmelse av RNA-konsentrasjon, men ved celleduspensjoner inneholdende et høyt celleantall ble det brukt 1  $\mu\text{L}$ . Restvolumet ble fylt med *working solution* til et totalt volum på 200  $\mu\text{L}$ . Rørene med prøve og *working solution* ble blandet med en vortexmaskin og inkubert i to minutter før de ble analysert i Qubit 4.0 Fluorometer.

### 3.3 qPCR

Genekspresjonsanalyse ble utført ved hjelp av AriaMx Real-Time PCR (qPCR) Instrument fra Agilent med Power Track SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific art. nr. A46012). Syklusene ble satt opp i henhold til prosedyre ”Oppsett av PCR instrumentet” (A.2.10), FAM og ROX ble valgt som fargestoff i programvaren, hvor ROX er angitt referansefargestoff. Tabell 7, vedlegg A.2.10 viser oppsett for varmesyklus brukt i qPCR. Enzymaktivering foregikk ved 95°C i to minutter, denatureringstrinnet ved 95°C i 15 sekunder og hybridisering og polymerisering ved 60°C i 60 sekunder. Denaturerings- og hybridiseringstrinnene ble gjentatt i 40 sykluser. For å detektere eventuelle dannelser av primerdimere og andre ikke-spesifikke PCR-produkter, ble en smeltepunktsskurve benyttet. Innstillingene er oppgitt i tabell 8, vedlegg A.2.10.

Det ble i utgangspunktet brukt primere for HPRT1, B2M, BCL-2, BAX og Caspase-3 (Invitrogen, art. nr. 10336-022). Primersekvensene er oppgitt i tabell 2. Primere ble fortynnet fra 100x til 10x ved hjelp av nukleasefritt vann.

Tabell 2: Oversikt over *forward*- og *reverse* sekvenser for primere benyttet i forsøket.

Primer	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
BCL-2	TGTGGATGACTGACTACCTGAACC	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
BAX	CGGCGAATTGGAGATGAACTGG	CTAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC
Caspase-3	GTGGAACUGACGAUGAU AUGGC	CGCAAAGTGACTGGATGAACC
HPRT1	CATTATGCTGAGGATTTGAAAGG	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA
B2M	CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT	CCAATCCAAATGCGGCATCTCA

---

Det ble gjennomført en analyse for å bestemme den optimale primerkonsentrasjonen, samt undersøke om primerene bandt seg til målgenet. Dette ble gjort med utgangspunkt i prosedyre ”Optimalisering av Primerkonsentrasjoner” (A.2.11). For test av målgen ble prøver tilsatt Ivermectin benyttet, for referansegenene ble kontrollprøver benyttet. Det ble først gjort en analyse for å undersøke om primer bandt seg til målgenet. I denne analysen ble kun primerkonsentrasjonen 800 nM *forward* /800 nM *reverse* primer analysert. Det ble brukt fem brønner, én for hver primer, i tillegg til NTC for hver primer og blank med kun SYBR Green I og nukleasefritt vann. cDNA ble tilsatt brønnene til en endelig konsentrasjon på 2,56 ng/ $\mu$ L. Det ble i tillegg tilsatt 10  $\mu$ L SYBR Green I og 1,6  $\mu$ L av både *forward* og *reverse* primer. Restvolumet ble fylt med nukleasefritt vann til et totalt volum på 20  $\mu$ L. PCR-platen ble forseglest og sentrifugert, før den ble satt i PCR-maskinen. Deretter ble en analyse gjort for å undersøke optimale primerkonsentrasjoner (A.2.11). I denne analysen ble det ble valgt å ikke gå videre med Caspase-3. Til forskjell fra første forsøk ble cDNA fortynnet på forhånd ved hjelp av nukleasefritt vann til en konsentrasjon på 0,754 ng/ $\mu$ L. Det ble tilsatt 2,5  $\mu$ L templat, 10  $\mu$ L SYBR Green I, og 0,6  $\mu$ L, 1  $\mu$ L eller 1,6  $\mu$ L *forward*- og *reverse* primer til alle brønner (A.2.11, tabell 9). Restvolumet ble fylt med nukleasefritt vann. Platen ble forseglest og sentrifugert for å samle innhold i brønnene, før den ble satt i PCR-maskinen. For å velge optimal primerkonsentrasjon ble en standardkurve brukt. Standardkurven ble konstruert i Microsoft Excel ved å eksportere  $C_q$ -verdiene med tilhørende primerkonsentrasjon. For bestemmelse av optimal primerkonsentrasjon, ble  $C_q$ -verdiene separert og kategorisert ut i fra type gen (B2M, HPRT1, BCL-2, BAX) og rangert etter  $C_q$ -verdi i synkende rekkefølge. Alle  $C_q$ -verdier for ulike gen ble markert og satt inn i et punktdiagram og en lineær trendlinje ble implementert. Grafen dannet en lineær linje som tillot visualisering av en sammenligning mellom resulterende  $C_q$ -verdier fra prøvene tilsatt Ivermectin, og kontrollprøvene i samme reaksjon. Fra standardkurven ble primerkonsentrasjoner for analyse av genekspressjon bestemt. Oversikt over primervolum- og konsentrasjon kan sees i tabell 3. Analysen ble gjort på tre PCR-brett med paralleller for hver prøve i henhold til prosedyre for ”Brønnooppsett” (A.2.12). Det ble benyttet fire primere; BCL-2 og BAX som målgen og HPRT1 og B2M som referansegen. Det ble i tillegg satt opp NTC for hver primer, samt en blank prøve som kontroll. cDNA ble fortynnet til en konsentrasjon på 1,0225 ng/ $\mu$ L. Hver primer benyttet i forsøket ble blandet til en mastermix sammen med SYBR Green I og nukleasefritt vann (A.2.12). Volum brukt i hver mastermix kan sees i tabell 4. 1,25  $\mu$ L cDNA ble tilsatt alle brønnene, utenom NTC og blank. Deretter ble 18,75  $\mu$ L mastermix med ønsket primer tilsatt brønnene. Platen ble forseglest og sentrifugert for å samle innhold, før den ble satt i PCR-maskinen.

Tabell 3: Mengde( $\mu\text{L}$ )/konsentrasjon(mM) av *forward* og *reverse* primer ( $\mu\text{L}$ ) for BCL-2, BAX, HPRT1 og B2M brukt i analysen.

Primer	<i>Forward</i> ( $\mu\text{L}/\text{mM}$ )	<i>Reverse</i> ( $\mu\text{L}/\text{mM}$ )
BCL-2	0.6/300	1.6/800
BAX	0.6/300	0.6/300
B2M	1.6/800	0.6/300
HPRT1	1.6/800	0.6/300

Tabell 4: Oversikt over volum ( $\mu\text{L}$ ) mastermix/brønn for hver primer.

	BCL-2	BAX	B2M	HPRT1
<i>Forward</i> primer	0,6	0,6	1,6	1,6
<i>Reverse</i> primer	1,6	0,6	0,6	0,6
Nukleasefritt vann	6,55	7,55	6,55	6,55
SYBR Green I	10	10	10	10

## 3.4 Statistiske analysemetoder

### 3.4.1 $\Delta\Delta C_q$ -metoden

$\Delta\Delta C_q$ -metoden ble tatt i bruk for å sammenligne genekspresjon mellom prøvene tilsatt Ivermectin og kontrollprøvegruppene.  $C_q$ -verdiene ble normalisert ved bruk av ligning 2 og 3. Gjennomsnittet av  $\Delta C_q$ -verdiene utregnet ved ligning 8, ble brukt i utregning av  $\Delta\Delta C_q$ .  $\Delta\Delta C_q$ -metoden oppsummeres i ligning 4. Det normaliserte ekspresjonsforholdet ble utregnet med ligning 5 for forenklingen av kvantifikasjon av relativ genekspresjon. Verdiene i ligning 5 vil òg være av gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier da de ble brukt i utregning av  $\Delta\Delta C_q$ .

### 3.4.2 T-test

Det ble utført en t-test for å vurdere resultatenes signifikans. T-test ble gjennomført for å sammenligne numerisk data fra test- og kontrollgruppene, henholdsvis prøver med og uten Ivermectin. T-test ble utført på både celleantall fra celletelling, og for verdier fra qPCR-analysen. T-test av celletelling ble utført med gjennomsnittsverdiene fra eksperimentell- og kontrollgruppene.  $\alpha$ -verdien ble satt til 0.05 i henhold til normal statistisk praksis. Verdien tilsvarer et konfidensintervall på 95%. Det ble tatt i bruk en uavhengig, tosidig t-test med antatt ulik varians, for å undersøke om variasjon i celleantall mellom de ulike prøvene var av signifikant verdi. T-test for analyse av celleantall, ble utført i Microsoft Excel ved bruk av funksjon "TTest". Parametere innad i funksjonen ble satt til "tosidig fordeling" av data og "to utvalg, med ulik varians".

En uavhengig, tosidig t-test med antatt ulik varians, ble òg tatt i bruk for å undersøke om differansen mellom  $\Delta C_q$ -verdiene til eksperimentell- og kontroll-, og eksperimentell- og DMSO-gruppen



---

var av signifikant verdi.  $\alpha$ -verdien ble satt til 0.05, tilsvarende en konfidensintervall på 95%. T-test for analyse av celleantall, ble utført i Microsoft Excel ved bruk av funksjon "TTest". Parametere innad funksjonen ble satt til "tosidig fordeling" av data og "to utvalg, med ulik varians".

### 3.4.3 Coefficient of Variation

En CV-analyse ble i dette forsøket utført for bestemmelse av variasjonen i genekspresjonen som et supplement til t-test, og for å studere analysens presisjon. Ligningen brukt til utregning er angitt i ligning 6. Ved CV-analyse av relativ genekspresjon ble de normaliserte genekspresjonsverdiene fra  $\Delta C_q$ -analysen, benyttet i utregningen. Dette innebar å beregne gjennomsnittet og påfølgende SD fra  $\Delta C_q$ -verdiene. Hvordan gjennomsnitt og SD beregnes vises i ligning 8 og 7. CV-verdi ble satt til 15%.

---

## 4 Resultat

Resultatdelen presenterer resultater fra cellekultivering og templatfremstilling til RT-qPCR, inkludert celletelling med Bürker tellekammer, i tillegg til RNA-isolering og cDNA-syntese og gen-ekspressjonsanalyse ved hjelp av qPCR samt statistiske analyser. Studien ble gjennomført på fire 6-brønners cellebrett, med to brett per tidintervall, samt et cellebrett til optimaliseringsforsøk. Verdier til utregning av resultat fra statistisk analyser kommer fra celletelling og resultater av RT-qPCR-analyser.

### 4.1 Cellekultivering

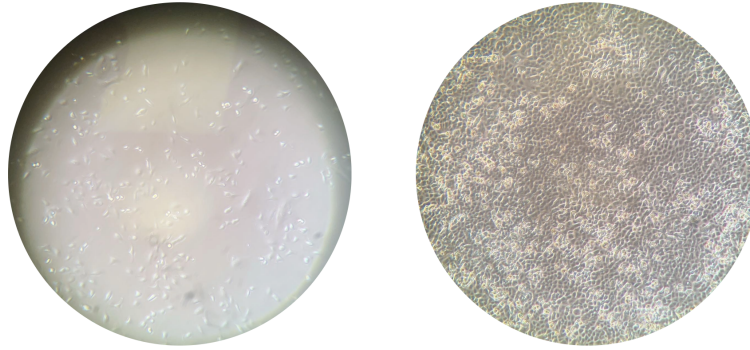
Seksjonen omhandler resultater relatert til kultivering av cellene, og deles inn i optimalisering av vekst og kultivering med 5  $\mu$ M Ivermectinløsning.

#### 4.1.1 Optimalisering av vekst

Ved oppstart av cellekulturen ble et høyt celleantall observert ved hjelp av invertmikroskop. 24 timer etter oppstart av cellekulturen, hadde cellekulturen oppnådd 90% konfluens. Subkultivering ble gjennomført i et forhold på 1:2. 72 timer senere ble veksten studert i invertmikroskop og konfluensen ble vurdert til 70%. Subkultivering ble igjen gjennomført i et forhold på 1:2. Etter subkultiveringen brukte cellene deretter 48 timer på å oppnå 75% konfluens, før de så ble subkultivert i et 1:2 forhold. 48 timer senere var konfluensen igjen på 75% og cellene ble subkultivert i et 1:3 forhold. Konfluens i cellekulturen 72 timer senere ble vurdert til 85% og cellekulturen ble subkultivert i et 1:3 forhold. Optimaliseringsperioden foregikk i omtrent to uker, med totalt seks subkultiveringer. Trypsinering for å oppnå at 80% av cellene løsnet, gikk fra omtrent 30 sekunder til to til tre minutter. I både optimaliseringsperioden og i optimal vekstfase ble cellekulturene subkultivert i et 1:2 og 1:3 forhold og splittet neste gang etter henholdsvis 48 og 72 timer. En uke senere ble det observert redusert cellevekst, med 20-40% konfluens 48 timer etter subkultivering i et 1:2 forhold. Etter to subkultiveringer i forhold på 1:2 med 72 timers mellomrom ble veksten observert forbedret.

#### 4.1.2 Cellekultivering med 5 $\mu$ M Ivermectinløsning

Ivermectin- og kontrolløsninger ble tilsatt til cellebrett inneholdende cellekulturer med 35-90% konfluens. Observasjoner av endring i konfluens ble utført i invertmikroskop ved høsting av cellene. Figur 8 viser ett eksempel på høy og lav konfluens. I appendiks "Oversikt over konfluens" (A.3.1) vises endring i konfluens hos cellekulturer fra eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen ved kultivering i 24 og 72 timer. Fra bildene ble det ikke observert redusert vekst i den eksperimentelle gruppen, relativt til kontroll- og DMSO-gruppen. For cellekulturer til optimaliseringsforsøk ble det ikke tatt bilder av alle brønner tilhørende den eksperimentelle gruppen. Av før og etter bilder i appendiks A.3.1 kan det relativt til kontrollprøvene, ikke observeres redusert vekst.



Figur 8: Bildene er tatt gjennom okkular på invertmikroskop ved 10x forstørrelse og viser eksempel på lav (venstre) og høy (høyre) cellekonfluens for A549-Celler. Konfluensen kan antas å være omtrent 20% og 100%. Tatt før og etter kultivering med vekstmedium tilsatt 5  $\mu$ M Ivermectinløsning i 72 timer ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub>.

## 4.2 Fremstilling av templat til RT-qPCR

Seksjonen fremstiller resultater relatert til fremstilling av cDNA-templat til qPCR-analysen. Dette innebærer resultat fra celletelling samt RNA- og cDNA-konsentrasjoner.

### 4.2.1 Celletelling

Ligning 9 ble brukt for å beregne antall celler i Bürker tellekammer.

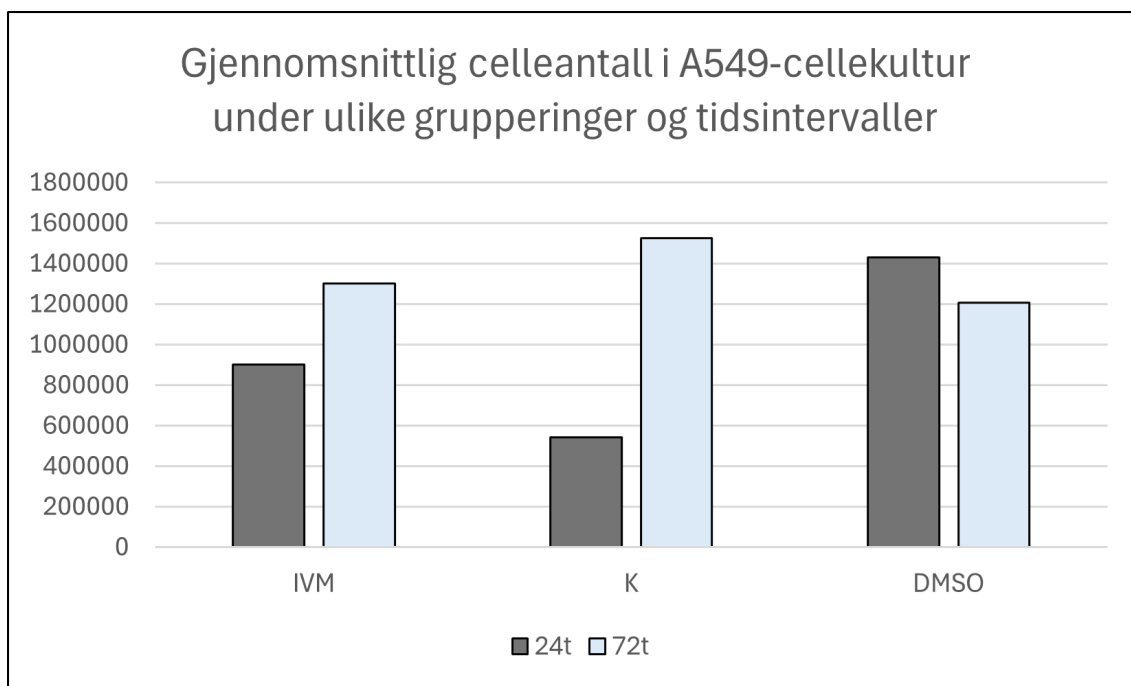
$$\frac{\text{Antall celler i tellekammer}}{9 \times 10^{-4} \text{ml}} = \text{Celler/mL} \quad (9)$$

Tabell 5: Gjennomsnitt og standardavvik til antall celler telt med Bürker tellekammer for eksperimentell-, kontroll- DMSO-gruppen. Første rad viser gjennomsnittlig cellentall og dets standardavvik til A549-celler kultivert med 5  $\mu$ M Ivermectinløsning, først for 24 timer og deretter for 72 timer. Andre rad viser gjennomsnitt og standardavvik for A549-celler kultivert med vekstmedium, først for kultivering i 24 timer og deretter for kultivering i 72 timer. Tredje rad viser gjennomsnitt og standardavvik for celler kultivert med 5  $\mu$ M DMSO, først for kultivering i 24 timer og deretter for kultivering i 72 timer.

	24 timer		72 timer	
	$\mu$	$\sigma$	$\mu$	$\sigma$
<b>IVM</b>	901333	556033	1301222	533829
<b>Kontroll</b>	542222	386667	1527777	598889
<b>DMSO</b>	1432592	905501	1208888	671111

En oversikt over gjennomsnittlig celleantall og standardavvik kan sees i tabell 5. Standardavvik ble utregnet med ligning (7). Figur 9 inneholder en visualisering av antall celler per tidsintervall. Tabellen og figuren viser at gjennomsnitt av celler telt i brønner fra kontrollgruppen og DMSO-

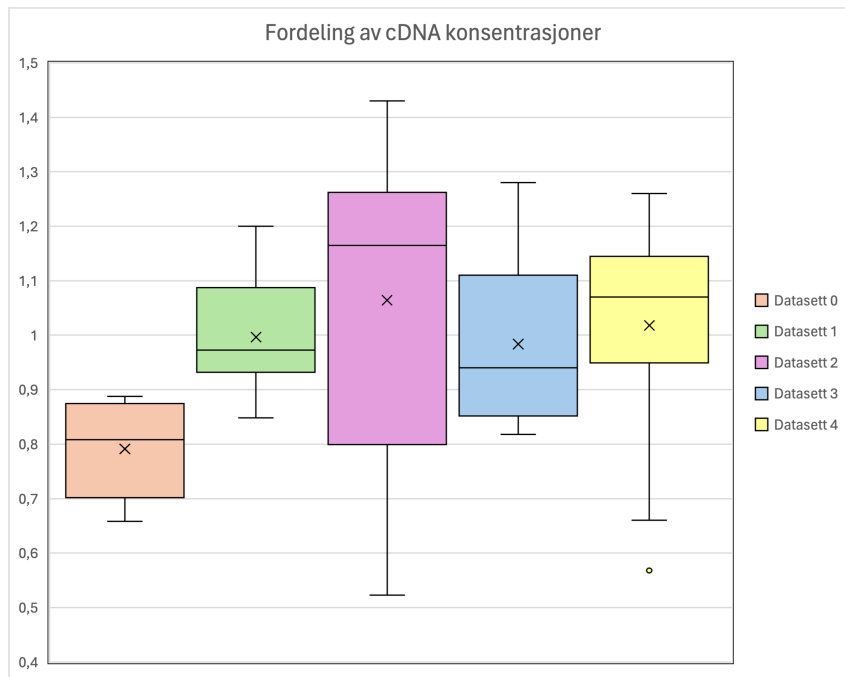
gruppen hadde lavest celleantall for kultivering i henholdsvis 24 og 72 timer. Høyest celleantall ble observert i DMSO-gruppen ved kultivering i 24 timer, og eksperimentellgruppen ved kultivering i 72 timer. Celleantallet er høyere for grupper kultivert i 72 timer, utenom for DMSO-gruppen hvor celleantallet er høyere for 24 timer.



Figur 9: Gjennomsnittlig celleantall for eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen. Celleantall ble sortert etter tidsintervall på 24 og 72 timer. Søyle en og to viser gjennomsnittlig celleantall hos A549-celler kultivert med 5  $\mu$ M Ivermectinløsning i henholdsvis 24 og 72 timer. Søyle tre og fire viser gjennomsnittlig celleantall for A549-celler kultivert med vekstmedium i henholdsvis 24 og 72 timer. Søyle fem og seks viser gjennomsnittlig celleantall for A549-celler kultivert 5  $\mu$ M DMSO i henholdsvis 24 og 72 timer.

#### 4.2.2 Konsentrasjonsanalyser

RNA-konsentrasjoner målt med Qubit 4.0 Fluorometer etter RNA-isolering ved hjelp av RNeasy kit vises i appendiks "RNA-konsentrasjon" (A.3.3). RNA fra RNA-isolering har gjennomgående høyt utbytte. cDNA-konsentrasjoner målt med Qubit 4.0 fluorometer etter cDNA-syntese ved hjelp av qScript Ultra Supermix fremstilles i appendiks A.3.4. Av appendikset ser man at lave volum templat-RNA ble brukt i cDNA-syntese. Utbyttet av cDNA var gjennomgående lavt, sett sammenlignet med RNA-konsentrasjonene. Gjennomsnitt for parti 0-5 var henholdsvis 0.791, 0.996, 1.064, 1.003 og 1.018 ng/ $\mu$ L. Standardavvikene er henholdsvis 0.092, 0.106, 0.261, 0.145 og 0.200. En oversikt over fordelingen av cDNA-konsentrasjoner kan sees i figur 10. Figuren viser at cDNA-utbyttet var varierende, både innad i og mellom datasett.



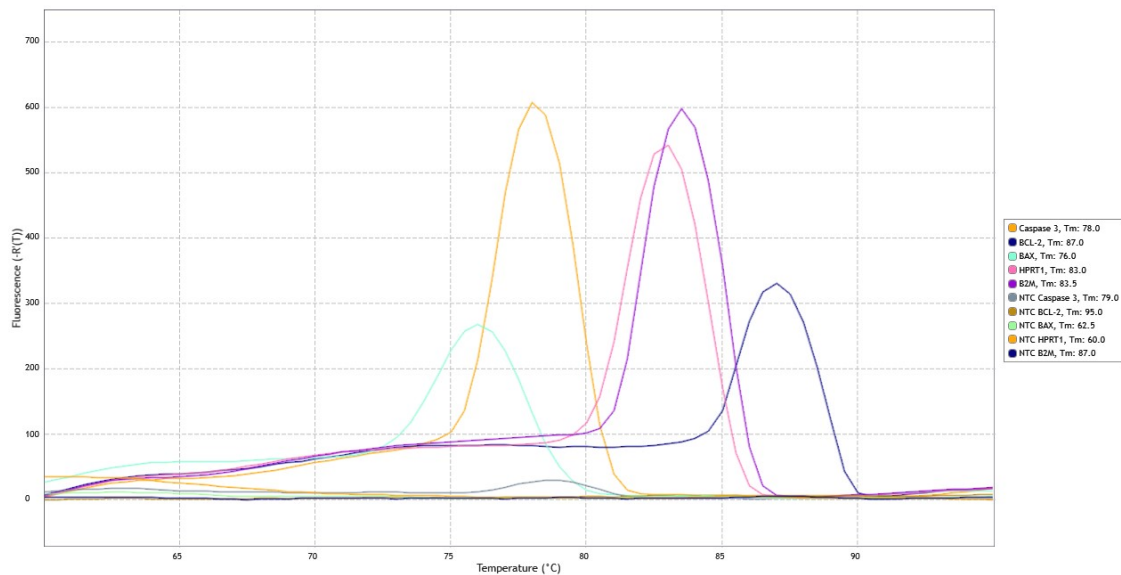
Figur 10: Oversikt over distribusjonen av cDNA-konsentrasjoner etter cDNA-syntese for parti 0-5. Konsentrasjon er oppsatt på y-aksen. Gjennomsnittlig cDNA-konsentrasjon for hvert parti er markert på de individuelle datasett med et kryss, "x", "værhårene" (strekene som strekker seg opp og ned i sentrum fra boksene) viser intervallet fra den laveste til den høyeste verdien i datasettet.

### 4.3 qPCR

Seksjonen omhandler resultater som dannet grunnlaget for valg av primer og primermengde brukt i genekspresjonsanalysen, og en samling av resultater knyttet til qPCR-analyser. Genekspresjonsanalysen er inndelt i hovedforsøk 1, 2 og 3.

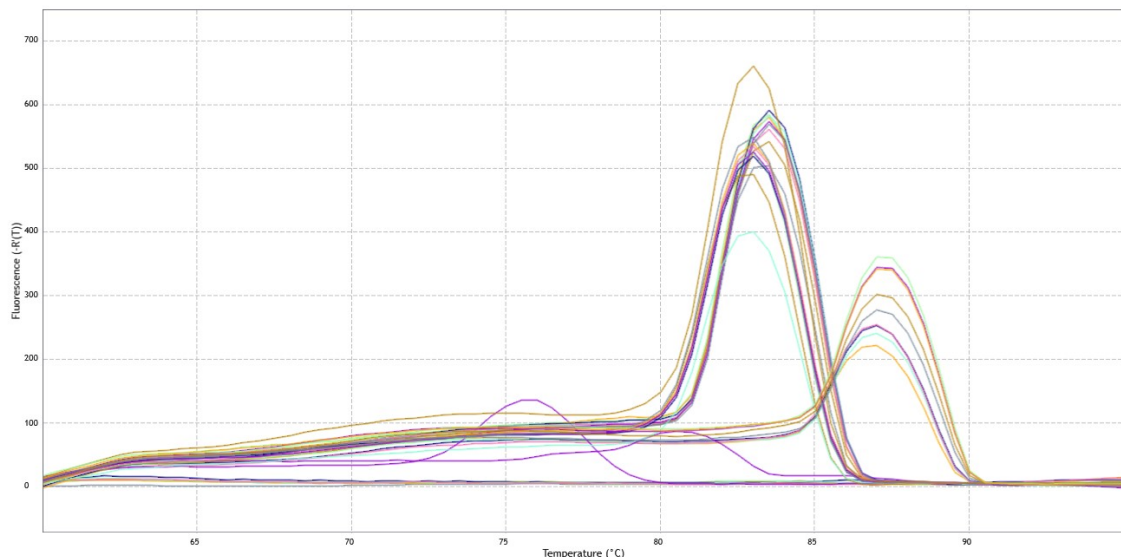
#### 4.3.1 Smeltekurver fra optimalisering av primerkonsentrasjoner

Smeltepunktsskurven i figur 11 ble brukt for å se om primerene, Caspase-3, BAX, BCL-2, B2M og HPRT1, festet seg til mål- og referansegene. En oversikt over primersekvensene finnes i tabell 2. Dette dannet grunnlaget for hvilke primere som ble brukt i videre analyse. Smeltekurve for BCL-2, BAX, B2M og HPRT1 har enkeltvis et entydig smeltepunkt med en klart definert bølgetopp for hvert gen. Fluorescensnivået for BCL-2 og BAX var jevnt, men tydelig mindre enn for Caspase-3, B2M og HPRT1. NTC for Caspase-3 har fått en amplifikasjon med  $C_q$ -verdi 37.79, som gjenspeiler seg i liten grad gjennom smeltepunktanalyse som en langstrakt bølgetopp med lav fluorescens og et toppunkt tilnærmet 79°C. Under primeroptimaliseringen ble optimal konsentrasjon av *forward* og *reverse* primer for de ulike RNA-sekvensene, bestemt ved hjelp av en standardkurve i et plotdiagram. Data anvendt i diagrammet er basert på resultat fra et qPCR-forsøk med de angitte primermengdene i tabell 14. Fluorescens ( $\Delta R_n$ ) er plottet langs x-aksen og  $C_q$  langs y-aksen. Primerkonsentrasjonen som uttrykte høyest fluorescens med lavest  $C_q$  for BCL-2, BAX, B2M og HPRT1 var henholdsvis 300f/300r, 300f/300r, 300f/500r og 500f/800r.



Figur 11: Kurve fra qPCR-smeltepunktanalyse for alle alternative primere i en graf. Figuren viser temperatur langs x-aksen og fluorescens ( $-R'(T)$ ) langs y-aksen. Til høyre er alle inkluderte prøver fargekodet, navnsatt, og tilført smeltepunktverdi ( $T_m$ ). Fra høyre til venstre viser figuren en definert topp med smeltepunkt for BAX, Caspase-3, HPRT1, B2M og BCL-2.

Standardkurvene for de ulike primerene kan sees i appendiks A.3.5. Endelig bestemmelse av optimal primerkonsentrasjon var for BCL-2, BAX, B2M og HPRT1 henholdsvis 300f/800r, 300f/300r, 800f/300r og 800f/300r, sammensetning av primerkonsentrasjoner kan sees i appendiks A.3.8. I figur 12 ser man total smeltepunktanalyse for primeroptimaliseringsforsøket. En mer detaljert figur over smeltepunktskurven for de individuelle mål- og referansegenene, finnes i appendiks A.3.7. Smeltekurvene for BCL-2 viser ensidige bølgetopper med variable toppunkt, med felles smeltepunkt på 87°C. Sammenlignet med HPRT1 og B2M, uttrykker kurven et lavere toppunkt med lavere fluorescensnivå. Smeltekurve for BAX viser to separate bølgetopper som er lave og langstrakte med smeltepunkt på 75.5°C og 80.5°C. Smeltekurve for B2M viser en jevn kurve som øker til en ensidig, spiss topp med smeltepunkttemperatur på 83.5°C. Smeltekurve for HPRT1 er tilsvarende kurven for B2M og er formet som en jevn kurve, med ujevn fordeling av toppunkt, og felles smeltepunkttemperatur på 83°C. Under første analyse av primere fikk NTC-prøve for Caspase-3 utslag med en  $C_q$ -verdi på 37.79. Under optimalisering av primerkonsentrasjon ga NTC for BAX primerutslag med en  $C_q$ -verdi på 36.89.



Figur 12: Kurve for alle primersettene fra primeroptimaliseringsforsøket med qPCR i en graf. Figuren viser temperatur langs x-aksen og fluorescens ( $-R'(T)$ ) langs y-aksen. BCL-2 har et smeltepunkt på  $87^{\circ}\text{C}$ , BAX har to enkle smeltepunkt på  $75.5^{\circ}\text{C}$  og ved  $80.5^{\circ}\text{C}$ , B2M har et smeltepunkt på  $83.5^{\circ}\text{C}$  og HPRT1 har et smeltepunkt på  $83^{\circ}\text{C}$ . Ingen utslag for NTC eller blank prøve

#### 4.3.2 $C_q$ -verdier

Appendiks A.3.9, tabell 16, 17 og 18 viser alle  $C_q$ -verdier fra genekspressjonsanalysen. For hver enkel målsekvens var det liten variasjon i  $C_q$ -verdi for amplifikasjon på tvers av ulike qPCR-brett. Like  $C_q$ -verdier for hver primer, per tidsintervall, gjorde det mulig å sette opp gjennomsnittlige verdier for å forenkle fremstillingen av verdiene. Med unntak av to prøver, gir alle paralleller for BAX enten "No  $C_q$ " på én eller begge parallellene. Gjennomsnittlig  $C_q$ -verdi for parallellene var 37.51 og 34.08 og kom henholdsvis fra prøver i kontroll- og eksperimentellgruppen kultivert i 72 timer. BCL-2 hadde lav variasjon i  $C_q$ -verdi mellom parallellene. Gjennomsnittsverdien var 27.79 og 27.95 for eksperimentellgruppen kultivert i henholdsvis 24 og 72 timer, og kontrollgruppen kultivert i 24 og 72 timer hadde et gjennomsnitt på henholdsvis 28.04 og 28.79. DMSO-gruppen hadde et gjennomsnitt på 28.06 ved kultivering i 24 timer og et gjennomsnitt på 28.44 ved kultivering i 72 timer. HPRT1 og B2M hadde en jevn  $C_q$ -verdi for alle hovedforsøkene. Den eksperimentelle gruppen hadde for HPRT1, en gjennomsnittsverdi på 18.59 og 19.10 ved henholdsvis 24 og 72 timers kultivering. Kontrollgruppen hadde gjennomsnittsverdier på 18.95 og 19.22 ved kultivering i henholdsvis 24 og 72 timer. Gjennomsnittsverdier for 24 og 72 timers kultivering var henholdsvis 18.68 og 19.81 for DMSO-gruppen. For B2M var gjennomsnittlig  $C_q$ -verdi for eksperimentellgruppen 17.28 ved 24 timers kultivering, og 17.54 ved 72 timers kultivering. Kontrollgruppen hadde gjennomsnittsverdier på 17.57 og 17.58 ved henholdsvis 24 og 72 timers kultivering. Gjennomsnittsverdiene for DMSO-gruppen ved kultivering i 24 og 72 timer er henholdsvis 17.42 og 17.61.

---

## Blank og NTC

For alle PCR-plater under hovedforsøket var det én blank prøve og én NTC-prøve per gensekvens. Blank prøve ga ikke utslag i form av  $C_q$ -verdi. Det første hovedforsøket fikk NTC for B2M primeren utslag med  $C_q$ -verdi på 35.31. I andre hovedforsøk ga både BCL-2 og BAX henholdsvis  $C_q$ -verdi på 33.34 og 38.74 for NTC. I tredje og siste hovedforsøk fikk NTC for B2M utslag med  $C_q$ -verdi på 32.70.

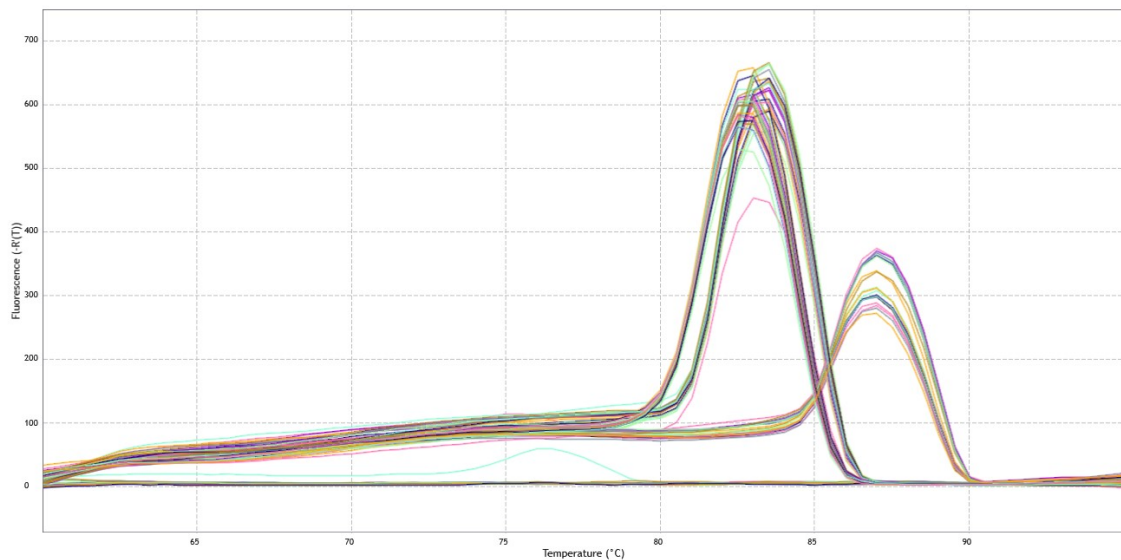
### 4.3.3 Smeltekurver fra genekspresjonsanalyse

Smeltekurvene illustrerer tidspunktet hvor fluorescensen var sterkest under gradvis økning av temperatur. Smeltekurvene inndeles i hovedforsøk 1, 2 og 3. I figur 13, 14 og 15 vises den totale smeltepunkt kurven for de tre hovedforsøkene. Enkeltvise illustrasjoner av smeltepunkt kurven for de ulike målsekvensene fremstilles i appendiks A.3.10, figur 25, 26 og 27.

#### Hovedforsøk 1

Den første genekspresjonsanalysen inneholdt 14 prøver fra eksperimentellgruppen, to prøver fra DMSO-gruppen, fire prøver fra kontrollgruppen og én NTC for alle gen, samt én brønn som blank. Figur 13 viser en oversikt over smeltepunkt analysen for dette forsøket. Smeltekurvene for BCL-2 viser ensidige bølgetopper med et smeltepunkt tilnærmet lik  $87^{\circ}\text{C}$ . Sammenlignet med HPRT1 og B2M, uttrykker kurven et lavere toppunkt med lavere fluorescensnivå. Smeltekurven for BAX viser tilnærmet ingen reaksjon. B2M sin smeltekurve viser en jevn kurve som øker til en ensidig, spiss topp inneholdene ett avvik som uttrykker lavere fluorescensverdi. Smeltepunktstemperaturen var på  $83.5^{\circ}\text{C}$ . Smeltekurve for HPRT1 viser en jevn kurve som øker til en ensidig og spiss topp med smeltepunktstemperatur mellom  $82.5$  og  $83^{\circ}\text{C}$ .

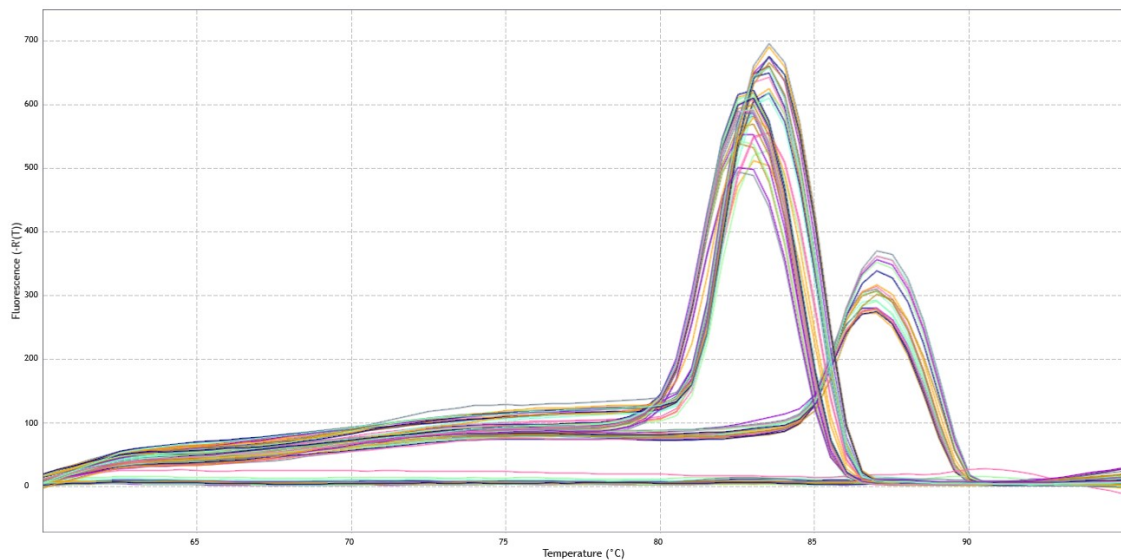




Figur 13: Oversikt over alle smeltekurver fra hovedforsøk 1 for 24 timers intervall med eksperimentell-, DMSO- og kontrollgruppen fremstilt i en graf. Figuren viser temperatur langs x-aksen og fluorescens (-R'(T)) langs y-aksen. BCL-2 har et smeltepunkt på 87°C, BAX har ikke blitt uttrykt, med unntak av en enkelt smeltekurve med smeltepunkt på 76.5°C, B2M har et smeltepunkt på 83.5°C, HPRT har et smeltepunkt på 82.5°C - 83°C, NTC for B2M er eneste NTC som ga utslag med et smeltepunkt på 77°C. Ingen utslag for blank prøve.

## Hovedforsøk 2

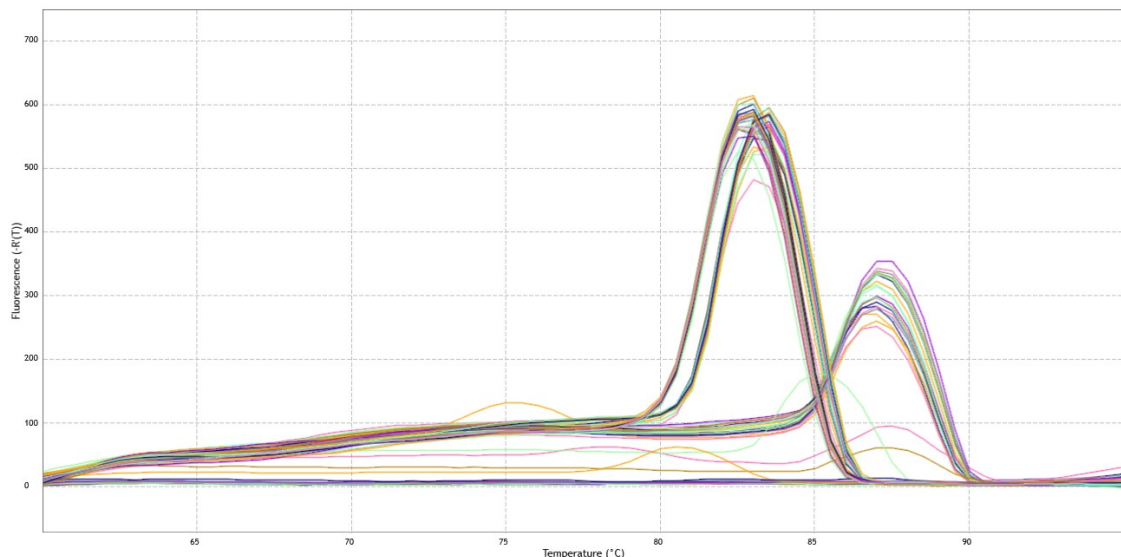
Den andre genekspresjonsanalysen inneholdt 14 prøver fra eksperimentellgruppen, fire prøver fra DMSO-gruppen, to prøver fra kontrollgruppen og én NTC for alle gen, samt én brønn som blank. Figur 14 viser oversikt over smeltepunktanalysen for dette forsøket. Smeltekurvene for BCL-2 viser ensidige bølgetopper med smeltepunkt tilnærmet 87°C. Sammenlignet med HPRT1 og B2M, uttrykker kurven et lavere toppunkt med lavere fluorescensnivå. Smeltekurve for BAX viser tilnærmet ingen reaksjon. Smeltekurve for B2M viser en jevn kurve som øker til en ensidig og spiss topp med en smeltepunkttemperatur rundt 83.5°C. Smeltekurven for HPRT1 viser en jevn kurve som øker til en ensidig og spiss topp, men med variable toppunkt. Smeltepunkttemperaturen ligger mellom 82.5°C og 83°C for HPRT1.



Figur 14: Oversikt over alle smeltekurver fra hovedforsøk 2 for 24 og 72 timers intervall med eksperimentell-, DMSO- og kontrollgruppen fremstilt i en graf. Figuren viser temperatur langs x-aksen og fluorescens (-R'(T)) langs y-aksen. Det ble ikke observert noen endring i smeltepunkt mellom 24 og 72 timers kultivering. BCL-2 har et smeltepunkt på 87°C. BAX har ikke blitt uttrykt. B2M har et smeltepunkt på 83.5°C. HPRT har et smeltepunkt på 82.5-83°C. NTC for BCL-2 ga et uforventet høyt utslag med et smeltepunkt på 76°C. Det ble ikke detektert et utsalg for blank prøve.

### Hovedforsøk 3

Den tredje genekspresjonsanalysen inneholdt tolv prøver fra eksperimentelgruppen, fire prøver fra DMSO-gruppen, fire prøver fra kontrollgruppen og én NTC for alle gen, samt én brønn som blank. Figur 15 viser oversikt over smeltepunktanalysen for dette forsøket. Smeltekurvene for BCL-2 viser ensidige bølgetopper med et smeltepunkt tilnærmet 87°C. Det lavere toppunktet betyr et lavere fluorescensnivå sammenlignet med B2M og HPRT1. Smeltekurve for BAX viser en svært ujevn kurve med flere lave og lange bølgetopper, uten indikasjon til en spesifikk smeltepunkttemperatur. Smeltekurve for B2M viser en jevn kurve som øker til en ensidig og spiss topp med en smeltepunkttemperatur rundt 83.5°C. Smeltekurve for HPRT1 viser en jevn kurve som øker til en ensidig og spiss topp med en smeltepunkttemperatur rundt 83°C.



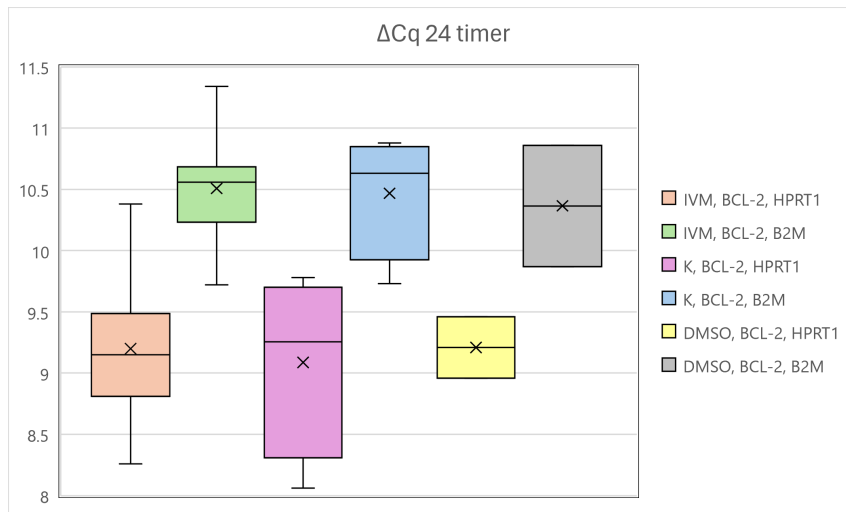
Figur 15: Oversikt over alle smeltekurver fra hovedforsøk 3 for 72 timers intervall med eksperimentell-, DMSO- og kontrollgruppen fremstilt i en graf. Figuren viser temperatur langs x-aksen og fluorescens (-R'(T)) langs y-aksen. BCL-2 har et smeltepunkt på 87°C, med en kontrollprøve som har utslag både ved 87°C og 75.5°C. BAX har fire variable smeltepunkt på 80.5°C, to på 87.5°C og en på 85°C, alle med lav fluorescens. B2M har et smeltepunkt på 83.5°C. HPRT1 har et smeltepunkt på 82.5°C-83°C. NTC for B2M har et smeltepunkt på 83°C. Ingen utslag for blank prøve.

#### 4.4 Statistiske analysemetoder

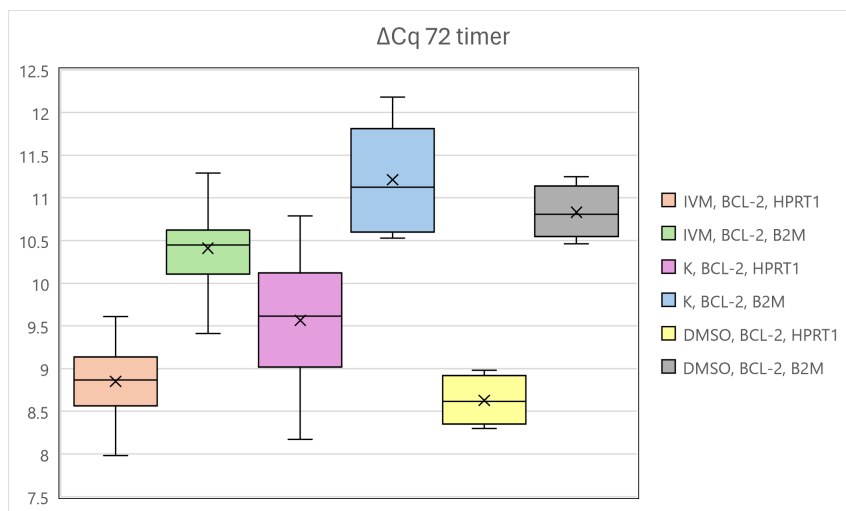
Seksjonen presenterer en helhetlig oversikt over alle de statistiske analyseresultatene inkludert normalisering av genekspressjon og relativ genekspressjon, samt utregning av statistisk signifikans og varians.

##### 4.4.1 $\Delta C_q$ - Normalisering av genekspressjon

Ligning 1 ble brukt for normalisering av genekspressjon,  $\Delta C_q$ . Alle  $C_q$ -verdiene ble brukt i utregningen av  $\Delta C_q$ . Normalisering av genekspressjon ble gjort med genet som koder for BCL-2 som målgene, og genene for HPRT1 og B2M som referansegener. BAX ble ekskludert fra videre analyse på grunn av mangel på data. Dette gjelder for alle de statistiske analysemetodene. Normalisering ble gjort i de tre ulike grupperingene; Eksperimentell-, DMSO- og kontrollgruppen. En oversikt over distribusjonen av  $\Delta C_q$ -verdier for prøver kultivert i 24 og 72 timer kan ses i henholdsvis figur 16 og 17.  $\Delta C_q$ -verdiene ble gruppert etter gen, tidsintervall og hvorvidt verdien tilhørte eksperimentell-, kontroll- eller DMSO-gruppe. Det ble utregnet gjennomsnittlig  $\Delta C_q$ -verdi for alle grupperingene. En oversikt over alle de gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdiene finnes i tabell 21 og 22 i appendiks "Statistiske verdier" (A.3.11). En oversikt over gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier brukt i utregning av standardavvik finnes i tabell 25 og 26, appendiks A.3.11. Standardavvik for samtlige verdier finnes i tabell 25 og 26, appendiks A.3.11.



Figur 16: Oversikt over distribusjonen av  $\Delta C_q$ -verdier for hver av de ulike gruppene; eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen, for tidsintervallet på 24 timer.  $\Delta C_q$ -verdi er oppsatt på y-aksen. Gjennomsnittlig  $\Delta C_q$ -verdi for hvert relative gensett er markert for alle de individuelle datasett med et kryss, "x". "Værhårene" (strekene som strekker seg opp og ned i fra sentrum av boksene) strekker seg fra den laveste til den høyeste verdien i datasettet, hvor utliggerdatapunkt har blitt utelatt.



Figur 17: Oversikt over distribusjonen av  $\Delta C_q$ -verdier for hver av de ulike gruppene; eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen, for tidsintervallet på 72 timer.  $\Delta C_q$ -verdi er oppsatt på y-aksen. Gjennomsnittlig  $\Delta C_q$ -verdi for hvert relative gensett er markert for alle de individuelle datasett med et kryss, "x". "Værhårene" (strekene som strekker seg opp og ned i fra sentrum av boksene) strekker seg fra den laveste til den høyeste verdien i datasettet, hvor utliggerdatapunkt har blitt utelatt.

#### 4.4.2 $\Delta\Delta C_q$ -metode

Ligning 4 ble brukt til utregning av  $\Delta\Delta C_q$ -metoden. De gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdiene ble benyttet i ligningen for å analysere relativ endring i genekspressjon. Det ble utregnet  $\Delta\Delta C_q$ -verdier for BCL-2 relativt til referansegenene HPRT1 og B2M i den eksperimentelle gruppen, relativt til kontroll- og DMSO-gruppen.  $\Delta\Delta C_q$ -metoden ble utført for både 24 og 72 timers tidsintervall.

---

En oversikt over alle  $\Delta\Delta C_q$ -verdier finnes i tabell 23, se appendiks ”Statistiske verdier” (A.3.11). For kontrollgruppen i 24 timers tidsintervall, var endring i genekspresjon for BCL-2 relativt til HPRT1 og B2M, henholdsvis lik 0.1125 og 0.0405. Tilsvarende for DMSO-gruppen, var relativ endring i genekspresjon lik -0.01 og 0.143. For kontrollgruppen i 72 timers tidsintervall, var relativ endring i genekspresjon for BCL-2 relativt til HPRT1 og B2M, henholdsvis lik -0.7155 og -0.8012. Tilsvarende for DMSO-gruppen, var relative endring i genekspresjon lik 0.222 og -0.422. Det kan ikke observeres en åpenbar trend ut i fra  $\Delta\Delta C_q$ -verdiene i de to tidsintervallene.

#### 4.4.3 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metode

$2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden ble brukt for analyse av prosentvis, relativ endring i genekspresjon av genet som koder for BCL-2, relativt til referansegenene.  $\Delta\Delta C_q$ -verdiene ble brukt i utregning av relativ foldendring i genekspresjon. Ligning 5 ble brukt til utregning av  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden. Relativ genekspresjonsanalyse ble utført for både kontrollgruppen og DMSO-gruppen, for 24 timers og 72 timers tidsintervall.  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -verdiene finnes i tabell 24, appendiks A.3.11. For den eksperimentelle gruppen i det 24 timers lange tidsintervallet, var den relative prosentvise genekspresjonsendringen av BCL-2 sammenlignet med referansegenene HPRT1 og B2M, redusert med henholdsvis 7% og 3% relativt til kontrollgruppen. I DMSO-gruppen hadde den relative prosentvise genekspresjonsendringen av BCL-2 sammenlignet referansegenene med HPRT1, økt med 1%. Til kontrast, for B2M var den relative genekspresjonsendringen av BCL-2 redusert 9% relativt til B2M. Tilsvarende for tidsintervallet på 72 timer, hadde relativ prosentvis genekspresjonsendring av BCL-2 sammenlignet med HPRT1 og B2M, økt med henholdsvis 64% og 74% relativt til kontrollgruppen. For DMSO-gruppen, var den relative prosentvise genekspresjonsendringen av BCL-2 sammenlignet med HPRT1, redusert med 14%. Til kontrast, økte ekspresjonen av BCL-2 med 34% sammenlignet med B2M. Generelt observeres det en tendens av økt genekspresjon BCL-2 i tidsintervallet på 72 timers sammenlignet med tidsintervallet på 24 timer. Dette gjelder særlig kontrollgruppene. Det er større variasjon mellom dataene i 72 timers tidsintervallet relativt til tidsintervallet på 24 timer.

#### 4.4.4 T-test

##### Celleantall

P-verdiene fra t-test av celleantallet for eksperimentell gruppe i 24 timers tidsintervall relativt til kontroll- og DMSO-gruppene, var av ikke signifikant verdi. P-verdiene var henholdsvis lik 0.51 og 0.50. Resultatet tilsier at forskjellen i antall celler mellom cellekulturene tilført Ivermectin og kontroll- og DMSO-gruppene, ikke er av statistisk signifikant verdi og nullhypotesen bekreftes. For gruppene i 72 timers tidsintervall, var p-verdiene på 0.77 og 0.91. Resultatene tilsier at forskjellen i antall celler mellom cellekulturene tilført Ivermectin, sammenlignet med kontroll- og DMSO-gruppene, ikke er statistisk signifikant, og nullhypotesen bekreftes. En oversikt over gjennomsnittlig celleantall og standardavvik finnes i tabell 5.

---

## Relativ genekspressjon

$\Delta C_q$ -verdiene benyttet for utregning av t-test var for primer BCL-2. En uavhengig, tosidig t-test med antatt ulik varians ble utført for å studere den relative forskjellen i ekspresjon av genuttrykk innad i de ulike tidsintervallene. Tabell 6 viser en oversikt over alle p-verdiene fra disse t-testene. Det ble observert ikke-signifikante verdier for alle verdiene innad i 24 timers tidsintervall. Det ble observert to signifikante verdier innad i 72 timers tidsintervall: De to p-verdiene er for den eksperimentelle gruppen relativt til kontrollgruppen for referansegenet B2M, og eksperimentell relativt til DMSO-gruppe for referansegenet HPRT1, begge i 72 timers tidsintervall. Nullhypotesen beholdes for øvrige alle verdier.

Tabell 6: P-verdier fra t-test av kvantifikasjon av  $\Delta C_q$ -verdier. T-testen ble utført innad i de to tidsintervallene for å sammenligne  $\Delta C_q$ -verdier fra den eksperimentelle gruppen sammenlignet med kontrollgruppen og DMSO-gruppen. De to grupperingene med henholdsvis kontrollgruppen og DMSO-gruppen sammenlignet med den eksperimentelle gruppen, vises på rad 1 og 2. Den første kolonnen viser verdier etter 24 timers tidsintervall, og den andre kolonnen viser verdier etter 72 timer. Verdiene er rundet opp til nærmeste to desimaler.

	IVM + Kontroll		IVM + DMSO	
	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M
24t	0.79	0.89	0.98	0.82
72t	0.10	0.03	0.03	0.07

### 4.4.5 Coefficient of Variation

De gjennomsnittlige verdiene fra  $\Delta C_q$ -metoden ble brukt i utregningen av CV-analyse. Gjennomsnitt og standardavvik for kontrollgruppen ble utregnet med ligning 8 og ligning 7. De ble utregnet en CV analyse for både 24 timers og 72 timers tidsintervall. En oversikt over gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier, standardavvik-verdier og samtlige CV-verdier finnes i tabell 25 og 26, se appendiks ”Statistiske verdier” (A.3.11). Fra tabell 25 observeres det en varierende varians, med relativt lave verdier. En trend man kan observere fra både tabell 25 og 26, er at HPRT1 i kontrollgruppene ser ut til å gi utslag for et større standardavvik relativt til gjennomsnittet (høyere CV-verdi) sammenlignet med øvrige verdier. Generelt vil CV-verdiene i begge tidsintervallene, indikere at det er størst variasjon mellom prøveresultatene i denne grupperingen. Videre ser man en stabil variasjon på tvers av alle CV-verdier, med lavest CV-verdi tilsvarende 2.57% og høyeste verdi på 8.15%. Dette tilsvarer en relativ liten spredning i datasettet rundt gjennomsnittet. Dette indikerer igjen relativt nøyaktige og forutsigbare resultater. Alle verdier er innenfor akseptområdet (<11%).

---

## 5 Diskusjon

Formålet med studien var å se om Ivermectin påvirket veksten til A549-celler *in vitro*. Den intrinsiske apoptoseveien, da spesifikt opp- og nedregulering av henholdsvis BAX og BCL-2, ble brukt som utgangspunkt for bestemmelsen av Ivermectins virkemåte på cellenes apoptoseregulering. Cellekulturens konfluens, samt bestemmelse av celleantall gjennom celletelling, ble brukt som ytterligere indikasjoner på endring av cellevekst. Endringer i genekspresjon ble vurdert ut fra qPCR-analyse. Studien benyttet en Ivermectinkonsentrasjon på 5  $\mu\text{M}$ . Det ble benyttet to ulike kontrollgrupper, hvor den ene inneholdt vekstmedium, og den andre inneholdt vekstmedium tilsatt 5  $\mu\text{M}$  DMSO. "Diskusjon" vil inneholde tolkning samt refleksjon rundt analysens resultater, inkludert cellekulturenes konfluens, templatfremstilling, celleantall og resultater fra qPCR-analyse, inkludert statistiske analysemetoder. Valg som ligger til grunn for studien begrunnes, metodens styrker og svakheter drøftes, og feilkilder samt alternative optimaliseringstrinn vil bli diskutert. Diskusjonen avsluttes med forfatterenes forslag til videre forskning og hvordan studien kunne ha blitt optimalisert ytterligere for å styrke analysenes resultater.

### 5.1 Cellekultivering

Seksjonen vil ta for seg diskusjon av resultater og metodebruk fra optimalisering av celleveksten. Videre tolkes og diskuteres resultat fra kultivering med Ivermectin.

#### 5.1.1 Optimalisering av vekst

Vekstoptimaliseringsperioden omtaler perioden fra tining av A549-cellekulturen til kultivering av celler med Ivermectinløsning tar sted. På grunnlag av høyt initielt celleantall, ble cellekulturen subkultivert 24 timer etter oppstart av forsøket. Tiden det tok mellom hver subkultivering var konsistent, og cellekulturene ble subkultivert med samme subkultiveringsforhold, både ved optimalisering av vekst og da cellene ble antatt å befinne seg i den eksponentielle fasen. En forventet økning i trypsineringstiden, fra ned mot 30 sekunder, til en tid som gjenspeilet prosedyren forekom i løpet av optimaliseringsperioden. Dette ga en indikasjon på forbedring i cellens adherens. Perioden med optimalisering av vekst ble ansett som viktig da den forsikret at eventuelle endringer i vekst og/eller genuttrykk var utelukkende et resultat av stresset påført cellene ved tilførsel av Ivermectin, og ikke skyldtes andre miljøpåvirkninger. Flere faktorer kan være årsak til at veksten, en uke etter den ble vurdert til å være i optimal vekstfase, ble svekket. En potensiell, indirekte faktor er at konfluens er et relativt mål, basert på personlig oppfatning. Dermed kan konfluensen ha blitt vurdert høyere enn den egentlig var, dette kan ha ført til overdreven subkultivering av cellene. På den andre siden ble konfluensen alltid vurdert av flere, noe som gir et sikrere grunnlag for at antatt konfluens reflekterte reell konfluens. Under optimaliseringen av vekst økte trypsineringstiden kontinuerlig med tiden. Dette kan ha gitt opphav til en ytterligere faktor som kan ha svekket cellene. Gjennom studien ble det fulgt et mål om at 80% av cellene skulle ha løsnet før trypsineringen ble opphørt. Dog er dette målet relativt, noe som åpner for at cellene kan ha blitt

---

utsatt for overtrypsinering, og med dét, svekket cellevekst. Overtrypsinering kan også øke stresset til cellene. Økt cellulært stress kan påvirke resultater i genekspresjonsanalysen ved ekspresjon av markører for cellulært stress som ikke er et resultat av studiens tilførte stress, ved tilførsel av Ivermectin. Ettersom veksten ble redusert relativt tidlig etter at cellene ble vurdert å være i optimal vekstfase, er det plausibelt å anta at denne antagelsen ikke reflekterte virkeligheten, og at optimal vekstfase aldri ble oppnådd. Dette støttes opp av at cellene, i den første vekstfasen, trenger tid til å tilpasse seg sine nye vekstforhold og oppnå optimal cellevekst.

### 5.1.2 Kultivering med 5 $\mu$ M Ivermectin

Ivermectinkonsentrasjon på 5  $\mu$ M samt kultiveringstidsintervallet, ble som følge av begrensninger i tid, valgt på grunnlag av tidligere studier [9, 8, 52, 6]. Videre er en konsentrasjon på 5  $\mu$ M den høyeste konsentrasjonen som er demonstrert til å være innenfor forsvarlig bruk hos mennesker [52, 6]. Av tidsintervaller brukt i tidligere bacheloroppgaver ble det sett på som hensiktsmessig å benytte seg av tidsintervallene 24 og 72 timer [9, 8]. Vurderingen ble gjort med grunnlag i at prøvene kultivert i 72 timer kunne stå over helgen, som var hensiktsmessig med tanke på tidligere beskrevne begrensninger tilknyttet tilgang på laboratoriet. Lengre tidsintervaller ble ikke vurdert på grunn av risiko for overvekst. Cellekulturen ble overført fra celleflasker til cellebrett for å gjøre det lettere å holde oversikt over mengden prøver og deres innhold. Basert på veilederens tidligere erfaringer ble det besluttet å benytte samme volum reagens og cellesuspensjon for 6-brønners cellebrett som ved 25cm<sup>2</sup> celleflasker for å unngå fordamping av vekstmedium. Samme celleantall førte til høy konfluens raskere, sammenlignet med tiden det tok i celleflasker, ettersom cellebrettet hadde mindre vekstoverflate (9.6 cm<sup>2</sup> i 6-brønners cellebrett, mot 25cm<sup>2</sup> i celleflaskene) [93]. Kontroll ble benyttet for å ha et grunnlag for sammenligning med den eksperimentelle gruppen. Kontrollgruppene ble inndelt i "kontroll" og "kontroll med DMSO". Ettersom Ivermectin i pulverform fortynnes i DMSO, ble det valgt å inkludere kontroll med DMSO for å kunne se om DMSO alene hadde en effekt på cellevekst og/eller genekspresjon. Appendiks "Oversikt over konfluens" (A.3.1) viser at konfluensen i brønnene var forskjellig ved tilsetning av vekstmedium, vekstmedium tilsatt Ivermectin og vekstmedium tilsatt DMSO. Differansen i konfluens før indusering av Ivermectin og kontrolløsninger mellom de ulike grupperingene, ansees som suboptimalt for forsøksdesignet, og kan være en mulig konsekvens av at veksten i celleflaskene ikke ble tilstrekkelig optimalisert før oppstart av forsøket. Cellekulturen ble subkultivert i et 1:3 forhold ved overføring til cellebrett, noe som tilsvarer at hvert enkelt cellebrett inneholdt celler fra to forskjellige celleflasker. Ved optimal og tilnærmet lik vekst i alle flaskene er det plausibelt at de forskjellige celleflaskene ikke ville hatt en betydelig innvirkning på forskjeller i konfluens. Differansen i andel celler overført fra cellesuspensjon til cellebrett, kan også ha forekommet som følge dårlig pipetteringsteknikk. Dersom man hadde hatt bedre tid, ville det optimale vært å telle cellene i Bürker tellekammer, eller tilsvarende metoder, slik at det ble tilsatt nøyaktig lik mengde celler i hver brønn. En visuell fremstilling av konfluens, vist i appendiks "Oversikt over konfluens" (A.3.1), før og etter cellekultivering i eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen innad i de ulike tidsintervallene, gjør at man



---

kan anta lik vekstutvikling på tvers av vekstbetingelser. Noen av figurene brukt for å sammenligne veksten i cellekulturen hadde ulike innstillinger på mikroskopet. Forskjellige innstillinger gjør bildene mindre representative, da sammenligningsgrunnlaget svekkes. Det ble forsøkt å ta bilder representative for cellekulturen i sin helhet, men dette er vanskelig da et bilde inn i mikroskopets okkular kun viser en liten del av cellekulturen. Visuelt observeres det også høy konfluens i brønner med observert lav konfluens før kultivering av eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppene. Dette kan begrunnes med at vekstflaten i brønner i cellebrett er mindre enn ved en celleflaske, og at høy konfluens derfor oppnås tidligere. Lik vekstutvikling kan tyde på at kultivering med Ivermectin over 24 og 72 timer ikke har hatt betydelig påvirkning på cellenes overlevelse eller proliferasjon. Cellene ble kultivert ved optimale vekstforhold i 24 timer etter subkultivering før vekstmedium med Ivermectin ble tilsatt. Dette tillot cellene å adherere seg før tilførsel av 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin. Økt adhesjon kan ha forsterket cellens motstandsevne mot Ivermectin, og derfor være en årsak til at effekt av Ivermectin ikke kan observeres. En annen begrunnelse kan være at 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin ikke har hatt en betydelig innvirkning på cellenes vekst eller overlevelse etter 24 og 72 timer.

## 5.2 Fremstilling av templat til RT-qPCR

Seksjonen vil ta for seg diskusjon angående resultater og metodebruk fra fremstilling av templat benyttet i qPCR-analysen. Dette innebærer resultater fra celletelling og måling av RNA- og cDNA-konsentrasjoner.

### 5.2.1 Celletelling

Etter at et parti A549-celler hadde blitt kultivert i brønner med vekstmedium tilsatt 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin, vekstmedium og vekstmedium tilsatt 5  $\mu\text{M}$  DMSO, over en periode på enten 24 timer eller 72 timer, ble cellene telt ved hjelp av Bürker tellekammer for å estimere celler per mL celleduspensjon. Dette ble hovedsakelig gjort for å anslå volum til RNeasy prosedyre for RNA-isolering. Samtidig ga celletellingen en indikasjon på om det fantes en betydelig forskjell i vekst mellom eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen. Telling av celler ved hjelp av et tellekammer viser kun et representativt utvalg; det reelle celleantallet kan variere. Ved å benytte flere paralleller kunne man ha sikret seg et mer representativt utvalg, men dette ble ikke gjennomført da fremstilling av RNA og cDNA for å måle genekspressjon må skje raskt, grunnet RNA sin ustabilitet. En annen faktor som spilte inn var begrenset antall tellekammer. I studien ble kun 3 ruter telt. Ved dårlig fordeling av celler i tellekammeret oppstår risikoen for et misvisende resultat. For å håndtere dette ble fordeling av celler i tellekammeret kontrollert. Celleantallet som ble overført fra suspensjonen til tellekammeret kan også ha vært lite representativt, da cellene vil synke til bunnen i en suspensjon. For å unngå dette ble suspensjonen homogenisert før den ble pipettert i Bürker tellekammer, men det kan tenkes at dette ikke alltid er tilstrekkelig for homogenisering og at det kan ha forekommet forskjeller i effektiviteten ved bruk av denne metoden. Celler i suspensjonen kan også ha blitt påvirket av hvor mange av cellene som løsnet ved trypsinering, hvor dette kan påvirke celleantallet både positivt og negativt. Før cellene ble tatt ut ble det kontrollert i invert-

---

mikroskop at tilnærmet 80% av cellene hadde løsnet, for å unngå undertrypsinering. Til ettertanke kunne det ha blitt innført et ytterligere kontrolltrinn ved å kontrollere celleantallet etter uttak av cellekultur fra brønnen. Overtrypsinering ble forsøkt unngått ved å la trypsin virke i nøyaktig to minutter. Her er derimot skraping av cellene en faktor som kan ha økt trypsineringstiden, på grunn av varierende tidsbruk. Resultatet viste lavest celleantall for kontrollgruppen ved kultivering i 24 timer, og for DMSO-gruppen ved kultivering i 72 timer. Høyest celleantall var det i DMSO- og kontrollgruppen ved kultivering i henholdsvis 24 og 72 timer. Standardavviket er høyt for alle grupper, og viser varierende resultater. Utvalget for prøver i kontroll- og DMSO-gruppen er begrenset, med kun to prøver per tidsintervall. Dette fører til mer troverdige gjennomsnittstall hos prøver fra den eksperimentelle gruppen, sammenlignet med kontroll- og DMSO-gruppen (Tabell 5). Det vises også en trend med høyere celleantall hos prøver fra tidsintervaller på 72 timer, med unntak av DMSO-gruppen. Høyere celleantall fra 72 timers tidsintervallet kan ha sammenheng med lengre kultiveringstid. Høyere celleantall hos DMSO-gruppen ved 24 timer kan ha sammenheng med forskjeller i konfluens ved tilsetning av DMSO. Videre indikasjoner vedrørende Ivermectin sin effekt på antall celler gis ved hjelp av statistiske analyser, som fremkommer i seksjon 5.4.

### 5.3 qPCR

Seksjonen vil ta for seg diskusjon av resultater og metodebruk knyttet til primeroptimalisering, inkludert oppsett av standardkurver, og genekspressjonsanalyse.

#### 5.3.1 Primeroptimalisering

Første qPCR-analyse utgjorde grunnlaget for hvilke primersekvenser som ble tatt i bruk for videre primeroptimalisering og i genekspressjonsanalysen. Formålet var å se om de utvalgte primere bandt seg til, og amplifiserte med god spesifisitet for markørgenet. Oversikten over de ulike markørene og deres bestemte *forward* og *reverse* primersekvens er fremstilt i tabell 2. Som negativ kontroll ble det brukt en NTC for hver primer med en konsentrasjon på 800f/800r nM. I qPCR-analysen fikk alle prøvene som inneholdt markørgen en  $C_q$ -verdi. Med unntak av NTC for Caspase-3, var det ingen NTC som passerte fastslått terskelverdi. En NTC inneholder ikke templat, noe som fører til større forekomst av primerdimere enn det som ville ha oppstått i en prøve inneholdende templat. Smeltepunktene for alle markørene er entydige i smeltepunktsanalysen. Den amplifiserte mengden av NTC for Caspase-3 primere ble gjenspeilet i smeltepunktsanalysen som en svært lav og langstrakt bølge. En slik bølge kjennetegner dannelse av primerdimere, men i motsetning til primerdimeres vanlige smeltepunkt rundt 70°C, er smeltepunktet for bølgen på 79°C, som er tilnærmet lik Caspase-3 sitt eget smeltepunkt målt til 78°C. Dette gjør det vanskelig å utelukke dannelse av primerdimere i markørprøven, men høy  $C_q$ -verdi og lavt fluorescensnivå indikerer at primerdimeren ville hatt neglisjerbar påvirkning for resultatet til markørgenet. Til tross for dette, var NTC for Caspase-3 den eneste kontrollprøven som ga  $C_q$ -verdi, og ettersom smeltepunktet overlappet nært markørgenets smeltepunkt, ble det bestemt at Caspase-3 ikke skulle testes videre. I retrospekt kan dette fremstå som en forhastet beslutning ettersom markørgenet hadde god amp-

---

lifikasjon med høy spesifisitet. Dermed kan det resonneres frem til at det burde blitt gjennomført flere replikat og paralleller for ulike primerkonsentrasjoner, før man kunne ha dannet et godt nok grunnlag for beslutningen, men på grunn av tids-, templat- og reagensbegrensning ble det valgt å gå videre til optimalisering av primerkonsentrasjoner.

I forsøk for optimalisering av *forward* og *reverse* primerkonsentrasjon ble det kun benyttet ett replikat per primer og i NTC ble kun konsentrasjonen 800f/800r nM brukt. I følge prosedyren ”Optimalisering av primerkonsentrasjoner” (A.2.11) skulle det ha blitt benyttet fire replikater per primer. Alle ni variasjoner av primerkonsentrasjoner skulle også ha blitt testet med fire replikater for NTC. Det ble ikke gitt prioritet på samme grunnlag som hvorfor det ikke ble gjennomført flere paralleller for valg av markører. Ettersom det bare ble gjennomført NTC på 800f/800r nM er det også usikkert hvordan andre primerkonsentrasjoner ville ha påvirket  $C_q$ -verdien og eventuell dannelse av primerdimere. Formålet med å bruke en replika i dette optimaliseringstrinnet var for å identifisere de eventuelle primerkonsentrasjonene som danner primerdimere, og for å bestemme de primerene som tilsynelatende hadde høyest primerspesifisitet for hvert gen til videre genekspresjonsanalyse. I motsetning til tidligere analyse for markørvalg, hvor BAX hadde en  $C_q$ -verdi på 33.89, viste det seg under primeroptimaliseringen at dette resultatet ikke var repeterbart. Syv av ni paralleller for BAX ble ikke amplifisert. De resterende to fikk  $C_q$ -verdi på 33.92 og 33.43. Ved sammenligning av prøvene amplifisert under analyse for primeroptimalisering, med de i test av markørspeifisitet, ble det observert en uforventet lav variasjon innad i  $C_q$ -verdier, sammenlignet med de resterende prøvene som ikke ble synlig amplifisert. Dette kan forekomme dersom primeren ikke er optimal. Dersom man skal forsøke å begrunne at BAX er uttrykt, men som konsekvens av en ukjent feilkilde ikke reflekteres i resultatet fra analysen, er det flere mulige årsaker til hvorfor resultatene ser unaturlige ut. cDNA-konsentrasjon i analyse for primeroptimalisering og test av markørspeifitet var høyere enn ved genekspresjonsanalysen. Dette er en feilkilde da økt templatkonsentrasjon kan redusere antall sykluser før amplifikasjonen oppnår eksponentiell vekst og krysser grenselinjeverdien. Dette kan forklare hvorfor  $C_q$ -verdiene i de to første analysene er lavere enn hva de verdiene man fikk i genekspresjonsanalysene var. På den andre siden forklarer ikke dette de markante forskjellene i  $C_q$ -verdier, fra verdi på 33 sykluser til ingen  $C_q$ -verdi. Dersom det hadde blitt gjort flere replikater for de ulike primerene kunne man ha antydnet om dette var en trend eller om de verdiene man har fått er utligere.

Standardkurvene og valg av optimal primerkonsentrasjon ble initielt valgt på feil premisser. Antall prøver ble plottet langs x-aksen og  $C_q$  langs y-aksen. Basert på en trendlinje ble den beste primerkonsentrasjonen bestemt basert på hvilken  $C_q$ -verdi som var nærmest trendlinjen. For BCL-2, BAX, B2M og HPRT1 ble henholdsvis 300f/800r nM, 300f/300r nM, 800f/300r nM og 800f/300r nM valgt som optimal primerkonsentrasjon. Disse primerkonsentrasjonene ble brukt videre for markørprøvene og tilhørende NTC-kontroll i genekspresjonsanalysen. Under primeroptimaliseringen, med unntak av resultatet for BAX, viste resterende markørgen entydige smeltekurver og jevn  $C_q$ -verdi. Dette kan bety at selv om forholdet mellom fluorescens og  $C_q$ -verdi ikke var optimalt,

---

ble korrekt markør-gen fremdeles amplifisert. Når optimal primerkonsentrasjon skulle avgjøres for BAX var det to  $C_q$ -verdier å ta utgangspunkt i. En begrensning på to verdier fører til at en standardkurve mellom fluorescens og  $C_q$ -verdi er meningsløst. I motsetning til under forsøket hvor man eksklusivt så på smeltekurvene fra primeroptimaliseringen, ble det i ettertid sammenlignet mellom smeltekurve fra analyse av markørspesifitet og primeroptimaliseringen. Da ble smeltepunktet på de to markørbrønnene for primerkonsentrasjon på 800f/800r, og den enkle 300f/300r prøven sammenlignet. Smeltepunktet i primeroptimaliseringen for 800f/800r ligger på 75.5°C, og for 300f/300r ligger det på 80.5°C, som er mer tilnærmet det som er observert under analyse av markørspesifitet. Under forsøket ble det valgt å fortsette med primerkonsentrasjon på 300f/300r ettersom dette er minst volum primere, men i ettertid kan man se indikasjon på at en primerkonsentrasjon på 300f/300r danner primerdimer og ikke ønsket amplikon. Feil valg av optimal primerkonsentrasjon kan ha fått konsekvenser for videre resultat i genekspressjonsanalysen.

### 5.3.2 Genekspressjonsanalyse

Store variasjoner i analyseresultatet kan forekomme av RT-PCR; grunnet flere kritiske kontrollpunkt i templatfremstillingen og spesiell fare for destabilisering av RNA. Som følge av RNA sin molekylære ustabilitet, ved isolering og videre bearbeiding, ble RNA-isolering og -håndtering utført på is. Alle RNA-isoleringer ga høyt RNA-utbytte som tilsier at RNA har blitt bevart gjennom isoleringen.  $C_q$ -verdier i genekspressjonsanalysen var like gjennom alle tre hovedforsøk og viser derfor repliserbarhet, som tyder på pålitelige resultater fra qPCR. Like  $C_q$ -verdier for hver primer, per tidsintervall, gjorde det mulig å sette opp gjennomsnittlige verdier for å forenkle fremstillingen av verdiene. Ettersom verdiene er relativt jevne, ble dette vurdert til å være hensiktsmessig. Da verdiene er av logaritmisk natur, vil denne fremstillingen kunne være misledende da enkeltverdier kan ha stor påvirkning på den helhetlige gjennomsnittsverdien. Likevel ble ikke fremstillingen av gjennomsnittsverdier sett på som misvisende da gjennomsnittsverdiene heller ikke brukes videre i statistisk utregning i form av  $\Delta C_q$ -verdier, hvor heller enkeltverdiene ble tatt i bruk for videre analyse. Hensikten med genekspressjonsanalysen var i utgangspunktet å studere forholdet mellom BLC-2 og BAX da samspillet mellom de to proteinene er med på å regulere den intrinsiske apoptoseveien. Det fantes få utslag for målgenet BAX i genekspressjonsanalysen. Analyse av målgenet ga  $C_q$ -verdier for begge paralleller ved to tilfeller, hvor disse kom fra kontroll- og eksperimentellgruppen.  $C_q$ -verdiene var høye, med verdi nær *cutoff*-verdien for prøven for kontrollgruppen. Utslagene kan tyde på kontaminasjon i brønnen, eller dannelse av primerdimer. Med qPCR kan man ikke bestemt si at et gen ikke er uttrykt, men en høy  $C_q$ -verdi kan indikere at genet er lavt uttrykt. Det kan derfor tenkes at BAX ikke blir uttrykt i noen betydelig grad i prøvematerialet. Manglende resultat kan tyde på at 5  $\mu$ M Ivermectin ikke har ført til apoptose ved den intrinsiske apoptoseveien for A549-celler. En annen årsak kan være feilkilder ved isolering av RNA, hvor RNA-uttrykket har gått tilbake til normalt tilstand etter Ivermectin ble fjernet fra cellekulturen.

Resultatene for BAX har blitt forkastet på grunn av manglende utslag på en av de to parallellene.

---

Flere replikater kunne gitt en bedre indikasjon på genekspresjonen ved å tilføre flere verdier, og kunne gjort at flere av prøvene kunne ha blitt brukt i videre analyse og resultattolkning. Det ble i utgangspunktet planlagt å benytte fire replikater for hver primer. På grunn av lavt cDNA-utbytte ble dette en utfordring, da det ikke var tilstrekkelig med templat. Her kunne en løsning vært å behandle alle cDNA-prøver fra samme RNA-prøve som én prøve ved å slå de sammen før måling av konsentrasjon. Dette utgjør ikke en økning i konsentrasjon, men volumet templat ville økt betraktelig. Grunnet lite templat ble det også brukt lave cDNA-konsentrasjoner i PCR-analysen. Templatkonsentrasjonen brukt i genekspresjonsanalysen lå i det nedre sjiktet av tillat konsentrasjon i følge prosedyren "Brønnoppsett" (A.2.12). Høyere templatkonsentrasjoner kunne ha ført til lavere  $C_q$ -verdier for alle markører, og derfor også flere resultat ved genekspresjonsanalyse av markørgenet BAX. Lavt cDNA-utbytte, til tross for høye RNA-konsentrasjoner, kan tyde på at ikke alt RNA ble omdannet til cDNA. Dette utgjør en risiko for at cDNA ikke inneholder målsekvensene og derfor ikke blir detektert i genekspresjonsanalysen. Resultatet av cDNA-konsentrasjonsanalyse kan indikere at det burde blitt gjennomført ytterligere optimalisering av prosedyren for syntese av cDNA. Videre optimalisering ble ikke gjennomført på grunn av begrensninger i tid og reagens. I genekspresjonsanalysen ble det brukt andre cDNA-konsentrasjoner enn ved primeroptimaliseringen, noe som kan ha påvirket effektiviteten til primerene. Ideelt burde primerkonsentrasjonene benyttet i optimaliseringsforsøk ha reflektert konsentrasjonen benyttet i hovedforsøkene. Dette kan være en alternativ forklaring på manglende amplifisering av BAX. Analysens andre målsekvenser har gitt utslag i form av  $C_q$ -verdi. Smeltekurver for alle primere, utenom BAX, tyder på spesifikk templatbinding. Med unntak av ett avvik for B2M, som kun forekommer i hovedforsøk 1. Denne verdien kan komme fra primerdimerdannelse i NTC. Resultatene tilsier at primerene allikevel har fungert, med unntak av primer for BAX.

NTC fungerer som kontrollpunkt for kontaminasjon fra andre nukleinsyrer og deteksjon av suboptimale primere. Blank prøve med kun SYBR Green I og nukleasefritt vann ble benyttet for å kunne se etter forurensning, samt fjerne støy. Genekspresjonsanalysen ga  $C_q$ -verdier for noen NTC i hvert hovedforsøk.  $C_q$ -verdiene var relativt høye, med ingen verdier under 32 sykluser. Samtidig er dannelse av primerdimer mer sannsynlig i NTC. Gjennomsnittlige  $C_q$ -verdier for primerene kan sees i appendiks A.3.11, tabell 19 og 20. For både BCL-2 og B2M viser kun smeltekurven for NTC tegn til primerdimer. Ved forekomst av primerdimer ville det oppstått flere, eller ujevne topper, i smeltepunkt kurven (A.3.10, figur 25, 26 og 27). Resultatene gir ikke grunnlag for betydelig dannelse av primerdimer i brønner med prøve. NTC for B2M fikk  $C_q$ -verdier langt høyere enn gjennomsnittsverdiene for prøvene med templat, dette tyder på at det ikke er kontaminasjon. Derimot kan kontaminasjon ha ført til falskt forhøyede verdier i prøven. For BCL-2 var  $C_q$ -verdiene kun litt høyere enn  $C_q$ -verdiene fra prøver med templat. Dette kan indikere kontaminasjon. Samtidig ga NTC utslag kun på hovedforsøk to, mens  $C_q$ -verdiene for BCL-2 var jevne gjennom alle tre hovedforsøk. Dette gir grunnlag for å se vekk fra NTC for BCL-2. Eventuell primerdimer eller kontaminasjon hos BAX er av lite betydning, da genekspresjonen ikke ble brukt i videre analyser.

---

$C_q$ -verdien i NTC for BAX var lik de få resultatene som fremkom for BAX. Dette gir lite grunnlag for å kunne si at primeren gir pålitelige resultater. Samtidig som det er verdt å påpeke at NTC for BAX kun ga utslag i ett av hovedforsøkene, og at sannsynlighet for dannelse av primerdimer er forhøyet i NTC generelt. Smeltekurven til NTC for BAX viser ingen fluorescensstopp og tilfører derfor ingen vurderingsgrunnlag for primerens effektivitet.

## 5.4 Statistiske analysemetoder

Seksjonen vil ta for seg diskusjon av resultater fra alle de ulike statistiske analysemetodene og deres betydning. I tillegg vil det ble diskutert metodebruk, inkludert grunnlaget for hvorfor de ulike testene benyttes og det vil bli kort nevnt alternative anvendelser av disse metodene innad i en qPCR-analyse.

### 5.4.1 $\Delta C_q$ - Normalisering av genekspresjon

Normalisering av genekspresjon er nødvendig for å kunne sammenligne mål- og referansegene.  $\Delta C_q$ -utregning ble gjort i sammenheng med utregning av  $\Delta\Delta C_q$  i tillegg til at verdiene ble anvendt i utregning av t-test og CV-analyse. Annet enn deres videre anvendelse i ytterligere analyse, beskriver  $\Delta C_q$ -verdiene òg relativ genekspresjon. Fra tabell 21 og tabell 22 (A.3.11) ser man relativt jevne verdier, både på tvers av eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppene innad i samme og ulike tidsintervaller. De stabile  $\Delta C_q$ -verdiene gir et indirekte mål på stabiliteten innad i qPCR-analysen på tvers av gruppene og de ulike analysene. Dersom verdiene hadde variert i stor grad mellom de ulike prøvene ville dette kunne tilsvare uegnede referansemarkører eller tekniske feil i oppsettet av qPCR med tanke på temperatur- og tidsintervaller. Resultatet av  $\Delta C_q$ -metoden kan sies å være av moderate til høye tallverdier; ideelt ville man kunne sett enda lavere verdier for å fastslå en større korrelasjon i forskjellen av genuttrykk innad i grupperingene. De gjennomsnittlige enkeltverdiene ligger generelt på et sted mellom ni og elleve, og skaper dermed tvil om ekspresjonen av målgene sammenlignet mot referansene er av tilstrekkelig forskjell til å kunne si at det finnes en korrelasjon. De høye  $\Delta C_q$ -verdiene indikerer lav ekspresjon av BCL-2, noe som reflekteres i videre analyse av  $\Delta\Delta C_q$ -metoden og innad i de statistiske analysene. De høye verdiene gjelder for øvrig begge referansegene, som avkrefter grunnlaget for at den lave relative ekspresjonen skyldes suboptimalisert valg av referansegene. Da det ble brukt to referansegene, kan det dermed argumenteres for at begge primerne var av uegnet natur, men primeroptimaliseringen diskutert ovenfor tilsier at det ikke er noe grunnlag som tyder på at bruk av suboptimale primere er tilfellet.

### 5.4.2 $\Delta\Delta C_q$ -metode

$\Delta\Delta C_q$ -verdier ble utregnet fra gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier ovenfor individuell utregning av alle de enkeltstående verdiene. Hensiken med utregning av  $\Delta\Delta C_q$  ut i fra gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier, er at dette gir en oversikt over trender ovenfor enkelttilfeller. Det ble sett på som nyttig å kunne jevne ut resultatene og dermed redusere varians innad i enkeltresultater og heller rette fokus på det helhetlige bildet. Videre vurderes det at gjennomsnittet ikke vil påvirke tolkningen av resultatet,

---

eller at resultatets fremstilling vil bli påvirket i den grad at det ikke lenger er representativt for studiens funn. Gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier blir sett på som mer oversiktlige og å foretrekke i analysen; det kunne like så godt bli gjort med alle enkelte  $\Delta C_q$ -verdier, men det ble altså ikke vurdert hensiktsmessig. For tallene i seg selv, ligger verdiene jevnt rundt 0, både på den positive og negative siden. Verdiene følger trenden til verdier observert i  $\Delta C_q$ -metoden: De er lave og relativt jevne, som indikerer liten differanse i genekspresjonen innad i eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppene.

### 5.4.3 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metode

$2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metode følger logisk samme konklusjoner tatt fra  $\Delta\Delta C_q$ -metoden. Trenden av økt genekspresjon i 72 timers tidsintervall gir en indikasjon på at genekspresjonen av BCL-2 øker relativt.  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metode ble sett på som hensiktsmessig å ta i bruk da den gir en oversiktig fremstilling av genekspresjonsendringene, noe som forenkler studiens forfattere sin evne til å kommunisere studiens vitenskaplige funn. Ut fra metodens anvendelse ble det generelt observert en reduksjon i genekspresjon, da spesielt i 24 timers tidsintervall. Ekspresjonen av genet som koder for BCL-2 ble redusert med henholdsvis 7% og 3% relativt til HPRT1 og B2M, relativt til kontrollgruppen. Etersom reduksjonen i genekspresjon er av relativt liten grad, bekreftet med ytterligere statistisk utregning, vil denne reduksjonen mest sannsynlig skyldes naturlige variasjoner. Genekspresjon er dynamisk og vil variere naturlig i løpet av en gitt periode, dermed vil man ikke kunne si med sikkerhet at disse nedgangene i ekspresjonsnivåer tilser at Ivermectin hadde en reduserende effekt på genekspresjonen, som ville forsterket studiens initielle hypotese. Det samme vil gjelde relativt til DMSO-gruppen, der genekspresjonen av BCL-2 økte med 1% relativt til genet for HPRT1, og redusertes med 9% relativt til genet for B2M. Trenden endrer seg betraktelig når man observerer data fra 72 timers tidsintervall. 72 timers tidsintervall resultaterte i større endringer sammenlignet med 24 timer. I sammenligningen av eksperimentell- og kontrollgruppen, økte genekspresjonen for HPRT1 med 64%, og 74% for B2M, relativt til BCL-2. For DMSO-gruppen i 72 timers tidsintervall, var genuttrykket for BCL-2 relativt til HPRT1 redusert med 14%, mens genekspresjonen relativt til B2M økt med 34%. Verdiene er merkbart høyere. Tallene vil likevel ikke gi grunnlag for at genene har blitt ytterligere uttrykt, men kan gi en indikasjon på at dette er tilfellet. De høyere verdiene for kontrollgruppen indikerer at et lenger tidsintervall økte ekspresjonen av BCL-2, men statistisk analyse av resultatene vil være nødvendig for ytterligere antydelse av resultatenes omfang. Som nevnt i teori (2.2) kan kreftceller unngå apoptose ved å øke uttrykket av anti-apoptotiske proteiner i BCL-2 familien [33, 37]. Den økte ekspresjonen av BCL-2 ved lenger kultivering med 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin kan derfor være forårsaket av A549-cellenes molekylære forsvarsmekanismer, som har kommet til uttrykk ved lenger kultivering. Oppreguleringen kan indikere motstandsdyktighet hos A549-celler mot 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin.

Merk at det ikke er tatt hensyn til andre faktorer som kan påvirkes ved behandling med Ivermectin, og at det kan være andre cellulære mekanismer som blir påvirket i en grad som endrer cellenes

---

fysiologi. For å bekrefte eller avkrefte trenden kan man argumentere for at studien skulle ha undersøkt effekten av Ivermectin innad i A549-cellekulturer over lengre tidsintervaller. Da resultatet fremdeles ikke er av statistisk signifikans, vil man kunne tenke seg til at et lenger tidsintervall, si eksponering i 96 timer, ville kunne ha ført til ytterligere omveltninger i genekspressjon. Et lengre tidsintervall vil òg kunne virke mot sin hensikt da for eksempel 96 timer kan føre til omfattende cellevekst i kontroll- og DMSO-grupper, og eventuelt også i den eksperimentelle gruppen i et 6-brønners cellebrett. Det vil kunne oppstå en situasjon hvor cellene blir stresset av den høye konfluensen. Til ettertanke kunne det vært en idé å heller ha tatt i bruk større celleflasker og eventuelt subkultivert cellekulturen under forsøket for å forhindre overvekst.

#### 5.4.4 T-test

T-test ble tatt i bruk i to ulike sammenhenger for undersøkelsen av ulike aspekter ved analysens prøveresultater i sin helhet: For analyse av differansen mellom antall celler,  $\Delta C_q$ -verdier innad i samme tidsintervall. Ved bearbeiding av resultatene fra celletelling, ble det utført en uavhengig, tosidig t-test. Dette ble sett på som nyttig i den forstand at en t-test vil kunne bestemme dersom det var statistisk signifikant differanse i celleantall mellom eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppene. Celletelling ble sett på som et resultat i seg selv ved å fortelle noe om veksten til cellekulturene i eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppene. Fra resultatet kan det observeres at celletallet for alle grupperingene var av ikke-signifikant differanse. Det observeres lavere p-verdier ved analyse av prøvene fra 24 timers tidsintervall; 0.51 og 0.50 for sammenligning mellom eksperimentell gruppe og henholdsvis kontroll- og DMSO-gruppene, sammenlignet med 72 timers tidsintervall med tilsvarende p-verdier på 0.77 og 0.91. Variasjonen kan ses på som naturlig da cellekulturene har hatt lenger tid på å vokse, dog det ble antatt at cellekulturene tilført Ivermectin skulle ha fått en redusert vekst, spesielt etter 72 timer.

T-test på verdier fra qPCR, ble utført ut i fra  $\Delta C_q$ -verdiene for sammenligning mellom resultatverdier og for vurdering av deres signifikans. Som nevnt i resultatdelen, ble ikke genet som koder for apoptosemarkør BAX brukt videre i statistisk utregning. BAX produserte ikke en reell mengde data og ettersom statistiske analyser avhenger av at det er et tilstrekkelig mengde datasett å ta verdier fra, ble denne ekskludert fra videre analyse. Både for vurdering av signifikans av differansen mellom  $\Delta C_q$ -verdiene innad i og mellom de to tidsintervallene, ble det utført en uavhengig, tosidig t-test med antatt ulik varians. Uavhengig t-test ble benyttet ettersom det er ulike grupperinger, og ikke én og samme cellekultur som studeres, som det for eksempel ville vært med en "før-og-etter" analyse. Videre ble det òg antatt ulik varians; dette skyldes hovedsaklig ulik prøvestørrelse. Innad i en gitt qPCR-analyse, var det betydelig stor forskjell i antall prøver for eksperimentell gruppe, sammenlignet med både kontroll- og DMSO-gruppene. Denne variansen ble vurdert til å være såpass omfattende at en t-test av lik varians ble ekskludert og valgt bort til fordel for en t-test med ulik varians. Statistiske analyser av biologisk datasett byr ofte på større variasjoner i datasettet, da det ofte er et stort mangfold av ulike faktorer som påvirker resultatet [77]. Blant



---

disse er alt fra naturlig forekommende forskjeller i biologisk materiale, til feil i prøvebehandling på laboratorie og innad i selve qPCR-analysens potensielle feilkilder. Denne biologiske variasjonen sett i sammenheng med stor differanse i antall prøver mellom de ulike gruppene, er med på å forsterke behovet for en t-test med antatt ulik varians. En tosidig t-test vil være hensiktsmessig ved analyse av  $\Delta C_q$ -verdiene, ettersom genekspressjon enten økes eller reduseres. En tosidig analyse vil ta høyde for at tallene man sammenligner enten kan uttrykke et negativt eller et positivt forhold.

Som nevnt tidligere har det blitt brukt  $\Delta C_q$ -verdier i t-test av analyseresultater fra qPCR. Etter som en  $\Delta C_q$ -verdi gir et mål på relativt uttrykk av målgen i forhold til et referansegene, vil det være hensiktsmessig å kunne bruke denne verdien ovenfor  $C_q$ -verdier.  $\Delta C_q$ -verdier vil, til forskjell fra  $C_q$ -verdier, føre til en normalisering av genuttrykket, som fører til mindre variabilitet i prøveverdiene da disse vil ta høyde for ulikheter i PCR-effektivitet samt prøvekvalitet. Denne studien ser også på relativ kvantifisering ovenfor absolutt kvantifisering, dermed vil det ikke være hensiktsmessig å studere absolutte  $C_q$ -verdier, men heller bruke sammenlignende verdier som  $\Delta C_q$ . Da både  $\Delta\Delta C_q$ - og  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -verdiene utgjør åtte verdier hver, vil disse ikke bestå av tilstrekkelig antall verdier til å få en representativ p-verdi. Dessuten er  $\Delta\Delta C_q$ - og  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden innad i denne studien, utregnet fra gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier, som ytterligere vil gjøre en t-test uegnet å bruke på disse tallverdiene. Relativ kvantifisering,  $\Delta\Delta C_q$ - og  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden, antar også tilnærmet ideell PCR-effektivitet ( $E \approx 1$ ), noe som sjeldent reflekteres i virkeligheten, og var ytterligere med på å forsterke beslutningen med å filtrere ut disse verdiene fra deres anvendelse i de statistiske analysemetodene. Man kan argumentere for å bruke alle  $\Delta C_q$ -verdier til endelig utregning av  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ , og heller ha utnyttet disse verdiene til utregning av t-test. Problemet oppstår da  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden vil transformere data til lineær skala. Dette er uheldig da en lineær skala vil kunne forskyve data-settet; verdiene fra analysen vil kunne bli asymmetriske og skjevfordelt som gjør at en t-test vil gi unøyaktige resultater.  $\Delta C_q$ -verdier er av natur, på en logaritmisk skala, noe som tilsvarer data som i større grad er symmetrisk fordelt. Da t-test antar normalfordeling av data, vil  $\Delta C_q$ -verdier være hensiktsmessig å bruke innad i beregningen av p-verdier. Den lineære fordelingen av  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -verdier, vil òg være opphavet til en større varians, som igjen bidrar standpunktet til å frastå fra å benytte logaritmiske resultatverdier, og heller anvende  $\Delta C_q$ -metoden i videre analyse av qPCR-resultater.  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -verdier kan log-transformeres, ved logaritmisk base 10 utregning, dog igjen er det ikke et likt antall kontrollprøver som antall prøver i den eksperimentelle gruppen, som gjør at det vil være lite hensiktsmessig.

For t-test innad i 24 timers tidsintervall, ga ikke resultatet signifikante verdier for genekspressjonen, for noen av markørene. Fra tabell 6 (A.3.11) ser man en tydelig trend med høye p-verdier ( $>0.05$ ) sammenlignet med fastslått  $\alpha$ -verdi. Da p-verdiene overskred  $\alpha$ -verdiene, ble nullhypotesen beholdt, det vil si, ingen av genene for de ulike markørene var uttrykt i en betydelig grad ovenfor kontroll- og DMSO-gruppene. Resultatet tilsier at A549-cellelinjen ikke går mot apoptose gjennom den intrinsiske apoptoseveien. Dog, det kan være en rekke faktorer som kan ha påvirket resultatet; fra praktisk håndtering på laboratoriet til suboptimalt primerdesign eller generelt fravær av virk-

---

ningen Ivermectin har på den intrinsiske apoptoseveien, som diskutert tidligere. Trendvis observeres det lavere p-verdier for 72 timers tidsintervall sammenlignet med tidsintervallet på 24 timer. For DMSO- og kontrollgruppen, er ulikheten ikke av uforventet utfall da cellekulturene hadde mer tid til å vokse og forsterke kreftcellers evne til motstandsdyktighet mot oppregulering av apoptose. For den eksperimentelle gruppen var antagelsen at cellevekst skulle opphøre eller reduseres. Ut i fra tabell 6 kan det observeres at p-verdiene for 72 timer tidsintervall er betydelig lavere relativt til 24 timer tidsintervall. P-verdier fra 72 timers tidsintervall var statistisk signifikante i kun enkelte av gruppene som diskutert tidligere. T-test av  $\Delta C_q$  for BCL-2 relativt til B2M i kontrollgruppen, hadde en tilhørende p-verdi på 0.025 ( $<0.05$ ), noe som oppfyller kravet om statistisk signifikans. Lignende for BCL-2 relativt til HPRT1 i DMSO-gruppen i 72 timers tidsintervall, var den tilhørende p-verdien 0.25 ( $<0.05$ ) nesten tilsvarende lik verdi som for tidligere gruppe. Disse to p-verdiene tilsvarer statistisk signifikans, og nullhypotesen avkreftes for begge testene. Dette kan tyde på økt ekspresjon av BCL-2 for tidsintervallet, og kan derfor gi grunnlag for å forkaste den initiale hypotesen om at 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin fører til apoptose via den intrinsiske apoptoseveien hos A549-celler.

T-test av de ulike grupperingene,  $\Delta C_q$ -verdier fra eksperimentell gruppe relativt til kontrollgruppen, og  $\Delta C_q$ -verdier fra eksperimentell gruppe relativt til DMSO-gruppen, tillater sammenligningen mellom potensiell innvirkning DMSO kan ha hatt på uttrykket av målgenet. Hypotesen har i utgangspunktet vært at DMSO ikke skal ha en påvirkning på cellevekst eller ekspresjon av verken mål- eller referansegenene brukt i denne analysen. Dette gjelder òg øvrige gener som ikke har vært av interesse i denne studien. Som nevnt tidligere, ble det observert høyere celleantall i cellekulturene indusert med kun DMSO relativt til eksperimentell- og DMSO-gruppen, se tabell 25, appendiks "Statistiske verdier" (A.3.11), og figur 9. Likevel finnes det ikke tilstrekkelig informasjon som tilsier at DMSO fører til verken økt eller redusert cellevekst, da  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden viser ingen betydelig variasjon fra de øvrige grupperingene, se tabell 24, appendiks "Statistiske verdier" (A.3.11). Det utelukkes ikke at det kan være faktorer innad i DMSO som påvirker cellevekst utenfor genmarkørene som har blitt observert. I denne studien ble dette vurdert som ren variasjon, og at ulikhetene kan skyldes tilfeldigheter ovenfor andre hypoteser. Ved sammenligning av p-verdier i DMSO-gruppen med de andre grupperingene, observeres det ikke en signifikant ulikhet i ekspresjon av BCL-2 verken innad i, eller på tvers av, tidsintervallene.

#### 5.4.5 Coefficient of Variation

CV ble bestemt for å evaluere stabiliteten til relativ genekspresjon for mål- og referanseprimerne. På samme grunnlag som for t-test av qPCR-verdiene, ble  $\Delta C_q$ -verdiene benyttet for utførelsen av CV-analyse. Bruk av  $C_q$ -verdier direkte i en CV-analyse vil kunne være med på å gi en unormal fordeling av verdienes distribusjon, og dermed skjevt fordelt varians. Dette kan påvirke CV-analysens evne til å reflektere resultatenes virkelighet [84, 78]. Videre vil ikke  $C_q$ -verdiene ta hensyn til ulikheter i PCR-effektivitet mellom forskjellige qPCR-analyser. Da denne studien videre har som

---

hovedformål å bruke qPCR til relativ kvantifisering ovenfor absolutt kvantifisering, ble det sett på som hensiktsmessig å ta i bruk  $\Delta C_q$ -verdiene til utregning av CV. Det er viktig å poengtere at ulike verdier som  $C_q$ - og  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  kan benyttes avhengig av hva man ønsker å bruke CV-analysen til. Denne CV-analysen tok sikte på å observere hvor jevnt uttrykket for genekspressjon av BCL-2 var relativt til HPRT1 og B2M på tvers av de ulike grupperingene, og dermed ble  $\Delta C_q$ -verdiene benyttet. Selve øvrige grense, eller *cutoff*-verdien, for en CV-verdi varierer innad i nåværende forskningslitteratur, og ut i fra hva slags type data man arbeider med. Dette vanskeliggjøres ytterligere da det er stor variasjon i hvilke verdier man bruker innad i en CV-analyse; om det er  $C_q$ -,  $\Delta C_q$ - eller  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -verdier, noe som vil gjøre grenselinje verdien enda vanskeligere å fastslå da den vil variere ut i fra hva slags data man tar utgangspunkt i ved utregning. I tillegg vil grenseverdien for CV ofte være satt høyere ved bruk av qPCR for absolutt kvantifikasjon for å bestemme initiell mengde cDNA i en analyse. For biologisk data vil man vanligvis kunne observere noe mer variasjon, samtidig som det er viktig å ikke sette CV-verdien for høyt. CV-verdien ble satt til 15%, en verdi som reflekteres i annen forskningslitteratur på håndtering av qPCR-data [90]. Verdien er også satt lavt da antall prøver innad i denne studien er relativt lavt i forhold til større forskningsprosjekter, hvor disse ofte kan akseptere en høyere grenseverdi for sin CV-analyse (CV>30-50%).

Resultatene viser relativt lave verdier: I 24 timers tidsintervall ble CV-verdiene utregnet til 5.27% for relativ ekspressjon av BCL-2 mot HPRT1 i eksperimentell gruppe, hvor verdiene var 7.12% og 2.71% for tilsvarende markører i kontroll- og DMSO-gruppen. Resultatene tyder på at man ikke kan fastslå en økt relativ genekspressjon av BCL-2 ved tilførsel av Ivermectin sammenlignet med kontroll- og DMSO-gruppene. Tilsvarende for verdier fra 24 timers tidsintervall for ekspressjonen av BCL-2 relativt til B2M, ble det observert mindre variasjoner mellom grupperingene og generelt lavere CV-verdier. Trenden med mindre variasjoner for relativ ekspressjon av BCL-2 mot B2M, fortsatte i tidsintervallet på 72 timer. For 72 timer tidsintervall var CV-verdien for relativ ekspressjon av genen for BCL-2 mot HPRT1, på 4.39% som relativt til kontroll- og DMSO-gruppen (henholdsvis 8.15% og 2.95%) viser noe høyere variasjon i stabiliteten av genekspressjonen på tvers av grupperingene, men det virker ikke til å være av relativ stor betydning for resultatets validitet. På tvers av enkelte CV-verdier som kan sees i tabell 25 og 26, i appendiks "Statistiske verdier" (A.3.11), observeres det lite variasjoner mellom 24 og 72 timers tidsintervaller. Ingen observerte resultater overskred grenseverdien på 15%. CV-verdiene i denne studien tyder på relativt lave variasjoner innad i datasettet og i genekspressjon mellom de ulike grupperingene, og med dét, mer presise resultater. Resultatene tyder på at verdiene i større grad vil reflektere faktiske forhold i analysen, i tillegg til å øke analysens reproduserbarhet. Ingen  $\Delta C_q$ -verdier ble i etterkant ekskludert fra analysens resultatbearbeiding eller -fremstilling, som følge av CV-analysens resultat.

---

## 5.5 Videre forskning

I denne studien ble det ikke observert signifikant nedgang i celleantall, eller signifikant endret genekspresjon av BAX eller BCL-2 for A549-celler ved behandling med 5  $\mu$ M Ivermectin i 24 timer. Derimot viste 72 timers intervall en trend på økt genekspresjon av BCL-2. Da ikke alle resultat var av statistisk signifikans, vil man kunne tenke seg til at et lenger tidsintervall, si eksponering i 96 timer, ville kunne ha ført til ytterligere omveltninger i genekspresjon. Et lengre tidsintervall vil òg kunne virke mot sin hensikt da for eksempel 96 timer kan føre til omfattende cellevekst i kontroll- og DMSO-grupper, og eventuelt også i den eksperimentelle gruppen i et 6-brønners cellebrett. Ved videre studier vil det derfor kunne være aktuelt å studere virkingen av lengre tidsintervaller for kultivering med 5  $\mu$ M Ivermectin for å kunne avkrefte eller bekrefte tendensen. Med undersøkelse av lengre tidsintervaller, vil det kunne være hensiktsmessig å splitte ved 70% konfluens, eller ved manglende adherens, vurdere større vekstareal.

Anbefaling ved videre studier av effekten av Ivermectin på den intrinsiske apoptoseveien er å sette av mer tid til optimalisering av studiens praktiske analysemetoder. Ved replisering av studiens metodikk og anvendelse av prosedyrer for qPCR-analyse, er det sterkt anbefalt å bruke flere replikater. Ut fra studiens resultater, er det enda usikkert om Ivermectin fører til apoptose via den intrinsiske apoptoseveien for A549-celler, samtidig som flere av Ivermectins molekylære mekanismer enda er ukjente. Dermed vil det kunne være av interesse å studere andre markører ved videre forskning, for å ytterligere bestemme Ivermectins virkningsmåte. Studien av M. Juarez, et. al. rapporterte at Ivermectin hadde varierende grad av effektivitet avhengig av hvilken cellelinje som ble undersøkt [7]. Det kan derfor òg være interessant å undersøke Ivermectins virkning på andre cellelinjer derivert fra kreftcellelev.

---

## 6 Konklusjon

A549-celler ble dyrket med en Ivermectinkonsentrasjon på 5  $\mu\text{M}$  i tidintervaller på 24 og 72 timer. Hensikten med studien var å undersøke om A549-cellelinjen gikk mot apoptose via den intrinsiske apoptoseveien, ved å se på endringer i forholdet mellom anti-apoptosemarkøren BCL-2 og pro-apoptosemarkøren BAX, samt pro-apoptosemarkøren Caspase-3. Etter test av markørspesifitet ble Caspase-3 ekskludert. Genekspresjonsanalyse av genet kodende for BAX ga ikke tilstrekkelig resultat, og genet ble derfor ikke vurdert i videre resultatbehandling.

Tilførsel av 5  $\mu\text{M}$  Ivermectin resulterte ikke i statistisk signifikant differanse i genekspresjon av BCL-2 sammenlignet med HPRT1 og B2M, i 24 timers tidsintervall. Det ble observert en antydning til økt genekspresjon av BCL-2 i 72 timers tidsintervall, hvor det var to signifikante verdier for ekspresjon av BCL-2. Oppreguleringen kan indikere motstandsdyktighet mot Ivermectin hos A549-celler. Dette indikerer at Ivermectin ikke førte til apoptose hos A549-celler. Resultatene fra studiens anvendte analysemetoder, gir ikke grunnlag for å kunne konkludere med at Ivermectin hadde en signifikant effekt på apoptoseregulering hos celler fra A549-cellelinjen. Dette skyldes i all hovedsak mangel på tilstrekkelig data. De samlede resultatene fra de ulike analysemetodene, indikerer at en Ivermectinkonsentrasjon på 5  $\mu\text{M}$  i opp til 72 timer ikke fører til apoptose via den intrinsiske apoptoseveien hos A549-celler.

---

## Referanseliste

- [1] B. Freddie et al. *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. URL: <https://doi.org/10.3322/caac.21834> (sjekket 12. apr. 2024).
- [2] World Cancer Research Fund International. *Cancer Survival Statistics*. URL: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/cancer-survival-statistics/> (sjekket 13. apr. 2024).
- [3] A.K. Zaidi og P. Dehgani-Mobaraki. *The mechanisms of action of ivermectin against SARS-CoV-2—an extensive review*. URL: <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00491-6> (sjekket 8. mai 2024).
- [4] M. Li. et al. *Ivermectin induces nonprotective autophagy by downregulating PAK1 and apoptosis in lung adenocarcinoma cells*. URL: <https://doi.org/10.1007/s00280-023-04589-6> (sjekket 23. mar. 2024).
- [5] Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok. *L1.6.6 Ivermectin*. URL: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.6.6/ivermectin> (sjekket 20. mar. 2024).
- [6] CA. Guzzo et al. *Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects*. URL: <https://doi.org/10.1177/009127002237994> (sjekket 18. feb. 2024).
- [7] M. Juarez et al. *Antitumor effects of ivermectin at clinically feasible concentrations support its clinical development as a repositioned cancer drug*. URL: <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04041-z> (sjekket 10. apr. 2024).
- [8] MT. Derås, S. Løvik og M. Østby. *En studie om effekten av Ivermectin på celleproliferasjon og cellevekst hos cellelinjen Caco-2*. URL: <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/3076358> (sjekket 18. feb. 2024).
- [9] SB. Akre et al. *En studie av effekten ivermectin har på celleproliferasjon og cellyklus til A549-celler*. URL: <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/bitstream/handle/11250/3004220/no.ntnu%3ainspera%3a112030131%3a112602573.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (sjekket 18. feb. 2024).
- [10] J. Zheng. «Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation». I: *Oncol Lett* 4.6 (des. 2012), s. 1151–1157. URL: <https://doi.org/10.3892/ol.2012.928>.
- [11] B. Alberts. «Essential Cell Biology»». I: W.W NORTON og COMPANY, 2019. Kap. 20 - Cell Communities: Tissues, Stem Cells, and Cancer.
- [12] G. M. Cooper. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000. Kap. The Development and Causes of Cancer. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.

- 
- [13] Norsk Helseinformatikk. *Lungekreft*. URL: <https://nhi.no/sykdommer/kreft/lunger-kreft/lungekreft?page=all> (sjekket 14. apr. 2024).
- [14] Norsk Helseinformatikk. *Ikke-småcellet Lungekreft*. URL: <https://nhi.no/sykdommer/kreft/lunger-kreft/lungekreft-ikke-smacellet?page=all> (sjekket 14. apr. 2024).
- [15] Y. Zhang, et al. «Global variations in lung cancer incidence by histological subtype in 2020: a population-based study». I: *The Lancet. Oncology* 24.11 (nov. 2023). Epub 2023 Oct 11, s. 1206–1218. DOI: 10.1016/S1470-2045(23)00444-8. URL: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(23\)00444-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00444-8).
- [16] D. J. Giard et al. *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. URL: <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417> (sjekket 14. feb. 2024).
- [17] UK Health Security Agency. *Cell Line Profile A549*. URL: <https://www.culturecollections.org.uk/products/cell-cultures/ecacc-cell-line-profiles/a549/> (sjekket 15. feb. 2024).
- [18] B. Ruaro et al. «The History and Mystery of Alveolar Epithelial Type II Cells: Focus on Their Physiologic and Pathologic Role in Lung». I: *International Journal of Molecular Science* 22.5 (mar. 2021), s. 2566. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22052566>.
- [19] Synthego. *Everything You Need To Know About A549 Cells*. URL: <https://www.synthego.com/a549-cells#overview> (sjekket 14. apr. 2024).
- [20] R. J. Swain et al. «Assessment of cell line models of primary human cells by Raman spectral phenotyping». I: *Biophysical Journal* 98.8 (apr. 2010), s. 1703–1711. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4289>.
- [21] F. Sabine et al. *Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C*. URL: <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0653-5> (sjekket 19. feb. 2024).
- [22] A549 Cell Line. *A549 Cell Subculture Protocol*. URL: <https://a549.com/a549-cell-subcultureprotocol/> (sjekket 14. apr. 2024).
- [23] Thermo Fisher Scientific. *Ham's F-12K (Kaighn's) Medium*. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21127022> (sjekket 15. apr. 2024).
- [24] Thermo Fisher Scientific. *21127 - Ham's F-12K (Kaighn's)*. URL: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/technical-resources/media-formulation.65.html> (sjekket 15. apr. 2024).
- [25] Thermo Fisher Scientific. *Antibiotics in Cell Culture*. URL: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/media-supplements/antibiotics.html> (sjekket 24. apr. 2024).
- [26] L. Spencer. *Cell culture guidelines*. 2022-04-15. Feb. 2012. URL: [https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell\\_culture.pdf](https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell_culture.pdf).
-

- 
- [27] T. Straube et al. *How to do a Proper Cell Culture Quick Check*. URL: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/> (sjekket 15. apr. 2024).
- [28] Qiagen. *Cell culture conditions*. URL: <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/animal-cell-culture/cell-culture-conditions/cell-culture-conditions> (sjekket 15. apr. 2024).
- [29] B. Roald. "apoptose". URL: <https://sml.snl.no/apoptose> (sjekket 16. apr. 2024).
- [30] B. Alberts. «Essential Cell Biology». I: W.W NORTON og COMPANY, 2019. Kap. Glossary.
- [31] C.M Pfeffer og A.T Singh. "Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy". URL: <https://doi.org/10.3390/ijms19020448> (sjekket 24. apr. 2024).
- [32] B. Alberts. «Essential Cell Biology». I: W.W NORTON og COMPANY, 2019. Kap. 18-The Cell-Division Cycle.
- [33] K. Matsuura et al. "Chapter Two- Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer". URL: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.006> (sjekket 12. apr. 2024).
- [34] S. Elmore. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death". URL: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337> (sjekket 11. apr. 2024).
- [35] L. Hou et al. *Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event form apoptotic pyknosis*. URL: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337> (sjekket 11. apr. 2024).
- [36] S. Fossum. *p53*. URL: <https://sml.snl.no/p53> (sjekket 14. apr. 2024).
- [37] K. Fernald og M. Kurokawa. *Evading apoptosis in cancer*. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006> (sjekket 14. apr. 2024).
- [38] K. Shanmugam og Sethi G. "Chapter 3- Molecular mechanisms of cell death: a brief overview". URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814208-0.00002-6> (sjekket 12. apr. 2024).
- [39] S. Fulda og K-M. Debatin. *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. URL: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608> (sjekket 12. apr. 2024).
- [40] E. Eskandari og C.J Eaves. *Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis*. URL: <https://doi.org/10.1083/jcb.202201159> (sjekket 24. apr. 2024).
- [41] J. Kale, E.J. Osterlund og D.W. Andrews. *BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death*. URL: <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186> (sjekket 12. apr. 2024).
- [42] C. Gao og A. Wang. *Significance of Increased Apoptosis and Bax Expression in Human Small Intestinal Adenocarcinoma*. URL: <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954446> (sjekket 14. feb. 2024).
-



- 
- [43] M. Fritsch et al. "*Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis*". URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1770-6> (sjekket 24. apr. 2024).
- [44] A. Shamas-Din et al. "*Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins*". URL: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714> (sjekket 8. mai 2024).
- [45] R. Jan og G-e-S. Chaudhry. "*Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics*". URL: <https://doi.org/10.15171/apb.2019.024> (sjekket 14. apr. 2024).
- [46] M.W Schmitt, L.A Loeb og J.J Salk. "*The influence of subclonal resistance mutations on targeted cancer therapy*". URL: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.175> (sjekket 24. feb. 2024).
- [47] Y. Jiménez-Gaona et al. "*Outcome of Ivermectin in Cancer Treatment: An Experience in Loja-Ecuador*". URL: <https://doi.org/10.3390/nursrep13010030> (sjekket 24. feb. 2024).
- [48] J. Liu et al. "*Progress in Understanding the Molecular Mechanisms Underlying the Antitumour Effects of Ivermectin*". URL: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S237393> (sjekket 20. feb. 2024).
- [49] M. Tang et al. "*Ivermectin, a potential anticancer drug derived from an antiparasitic drug*". URL: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105207> (sjekket 1. mar. 2024).
- [50] Siddique. Samia et al. "*Isolation, Characterization and Selection of Avermectin-Producing Streptomyces avermitilis Strains From Soil Samples*". URL: <https://doi.org/10.5812/jjm.10366> (sjekket 20. mar. 2024).
- [51] Mayo Foundation for Medical Education, Research og Merative US L.P. "*Ivermectin (Oral Route)*". URL: <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/ivermectin-oral-route/description/drg-20064397> (sjekket 1. feb. 2024).
- [52] M. Juarez et al. "*Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis*". URL: <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04041-z> (sjekket 24. apr. 2024).
- [53] R. Laing, V. Gillan og E. Devaney. "*Ivermectin- Old Drug, New Tricks?*" URL: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004> (sjekket 10. apr. 2024).
- [54] PO. Seglen. "*autofagi*". URL: <https://sml.snl.no/autofagi> (sjekket 10. apr. 2024).
- [55] H. Kim et al. "*Down-regulation of p21-activated serine/threonine kinase 1 is involved in loss of mesencephalic dopamine neurons*". URL: <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0230-6> (sjekket 14. apr. 2024).
- [56] National Library of Medicine. "*Gene Expression*". URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/applpression/#:~:text=Gene%20expression%20analysis,or%20in%20a%20specific%20cell.> (sjekket 14. apr. 2024).
- [57] J. S. Dymond. "*Chapter Twenty Three - Explanatory Chapter: Quantitative PCR*". URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9> (sjekket 19. feb. 2024).
- [58] P. Dixon. "*Basic Science in Obstetrics and Gynaecology (Fourth Edition)*". "Churchill Livingstone", 2010. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10281-3.00005-1>.
-

- 
- [59] T. C. Lorenz. *Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846334/> (sjekket 15. apr. 2024).
- [60] Made Artika et al. *Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis*. URL: <https://doi.org/10.3390/genes13122387> (sjekket 14. apr. 2024).
- [61] David P. Clark, Nanette J. Pazdernik og Michelle R. McGehee. *Molecular Biology, Third Edition*. "Academic Cell, Elsevier Inc.", 2019. URL: <https://doi.org/10.1016/C2015-0-06229-3>.
- [62] B. A. Walt et al. *Essential Cell Biology (Fifth Edition)*. "W. W. Norton og Company", 2019.
- [63] M. G. Ghannam og M. Varacallo. *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/#:~:text=This%20process%2C%20known%20as%20real,photodetector%2C%20and%20record%20the%20values.> (sjekket 9. apr. 2024).
- [64] Kufe D.W., Pollock R.E. og Weichselbaum R.R. *Basic Science in Obstetrics and Gynaecology (Fourth Edition)*. "Holland-Frei Cancer Medicine", 2003. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12983/>.
- [65] H. Ma, K. N. Bell og R. N. Loker. *qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies*. URL: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007> (sjekket 26. feb. 2024).
- [66] T. McKee og J. R. McKee. *Biochemistry: The Molecular basis of life, 7th Edition*. "Oxford University Press", 2019. Kap. 18 - Genetic information".
- [67] M. J. Wacker og M. P. Godard. *Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR Using SuperScript III*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2291734/#:~:text=One%20method%20involves%20including%20the,and%20disadvantages%20to%20both%20systems.> (sjekket 14. apr. 2024).
- [68] G. Adams. *A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR*. URL: <https://doi.org/10.1042/BIO20200034> (sjekket 15. apr. 2024).
- [69] P. P. Liu. *Intron*. URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Intron> (sjekket 14. apr. 2024).
- [70] O. A. Shchelochkov. *cDNA*. URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Copy-DNA#:~:text=Definition,cDNA%20contains%20only%20coding%20sequences.> (sjekket 14. apr. 2024).
- [71] W. J. Lennarz og M. D. Lane. *Encyclopedia of Biological Chemistry II*. Elsevier Inc.", 2013. URL: <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123786319/encyclopedia-of-biological-chemistry-ii>.
- [72] S. Maloy og K. Hughes. *Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2 Ed.* "Academic Press, Elsevier Inc.", 2013.
-

- 
- [73] Z. Smith og C. Roman. *Fluorescence*. URL: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Radiative\\_Decay/Fluorescence](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Radiative_Decay/Fluorescence) (sjekket 15. apr. 2024).
- [74] J. Y. H. Tang. *Detection of Microbiological Hazards*. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820013-1.00002-4> (sjekket 19. feb. 2024).
- [75] E. Navarro et al. "*Clinica Chimica Acta*". Bd. 439. Elsevier Inc.", 2014, s. 231–250. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>.
- [76] O. Bassy et al. *Rapid identification of Bacillus anthracis by real-time PCR with dual hybridization probes in environmental swabs*. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.11.001> (sjekket 15. apr. 2024).
- [77] J. S. Yuan et al. *Statistical analysis of real-time PCR data*. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85> (sjekket 17. apr. 2024).
- [78] S. A. Bustin et al. *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. URL: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797> (sjekket 7. feb. 2024).
- [79] K. M. Ririe, R. P. Rasmussen og C. T. Wittwer. *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. URL: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916> (sjekket 16. apr. 2024).
- [80] Life Technologies Corporation. *Real-Time PCR handbook: Troubleshooting*. 2012. URL: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf> (sjekket 14. mai 2024).
- [81] M. W. Pfaffl. "*A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*". URL: <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45> (sjekket 15. feb. 2024).
- [82] C. Zhang et al. *Selection of reference genes for gene expression studies in human bladder cancer using SYBR-Green quantitative polymerase chain reaction*. URL: <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7002> (sjekket 15. apr. 2024).
- [83] C. Agusti-Ridaura et al. "*Candidate genes for monitoring hydrogen peroxide resistance in the salmon louse, Lepeophtheirus salmonis*". URL: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04211-1> (sjekket 18. apr. 2024).
- [84] A. Forootan et al. "*Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)*". URL: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001> (sjekket 18. apr. 2024).
- [85] A. R.-V., J. M. Ruijter og M. J. B. van den Hoff. "*Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting*". URL: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002> (sjekket 3. mai 2024).
-

- 
- [86] M. T. Ganger, G. D. Dietz og S. J. Ewing. "A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments". URL: <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1949-5> (sjekket 22. apr. 2024).
- [87] *PCR/qPCR Data Analysis. A Technical Guide to PCR Technologies*". URL: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/data-analysis> (sjekket 21. apr. 2024).
- [88] N. Kumar Sampathkumar, V. Krishnan Sundaram og P. S. Danthi. *RNA-Seq is not required to determine stable reference genes for qPCR normalization*". URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009868> (sjekket 19. apr. 2024).
- [89] *Precision in qPCR*". URL: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/precision-qpcr.html> (sjekket 1. mai 2024).
- [90] Y. Karlen et al. *Statistical significance of quantitative PCR*". URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-131> (sjekket 5. mai 2024).
- [91] Skoog, Holler og Crouch. *Principles of Instrumental Analysis, 7th Edition*". "Cengage Learning", 2018.
- [92] R. M. Granger et al. *Instrumental Analysis*". "Oxford University Press", 2017. Kap. Chapter 22: Statistical Data Analysis. URL: <https://www2.chemistry.msu.edu/courses/cem434/Granger%20Ch%2022.pdf>.
- [93] Thermo Fisher Scientific. *Useful information for various sizes of cell culture dishes and flasks*". URL: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html> (sjekket 1. mai 2024).
- [94] Quiagen. *RNeasy® Mini Handbook*". URL: <http://www.bea.ki.se/documents/EN-RNeasy%20handbook.pdf> (sjekket 21. feb. 2024).
- [95] Thermo Fisher Scientific Inc. *Qubit™ 4 Fluorometer User Guide*". URL: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017209\\_Qubit\\_4\\_Fluorometer\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017209_Qubit_4_Fluorometer_UG.pdf) (sjekket 21. feb. 2024).
- [96] Thermo Fisher Scientific Inc. *Qubit™ RNA BR Assay Kits*". URL: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FQubit\\_RNA\\_BR\\_Assay\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FQubit_RNA_BR_Assay_UG.pdf) (sjekket 21. feb. 2024).
- [97] Quantabio. *qScript® Ultra SuperMix*". URL: <https://www.quantabio.com/wp-content/uploads/2022/06/IFU-137.1-REV-02-95217-qScript-Ultra-SuperMix-0522.pdf> (sjekket 21. feb. 2024).
- [98] Thermo Fisher Scientific Inc. *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit*". URL: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FQubit\\_dsDNA\\_BR\\_Assay\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FQubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf) (sjekket 21. feb. 2024).
-

- 
- [99] Thermo Fisher Scientific. *PowerTrack SYBRTM Green Master Mix User Guide*". URL: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0018825\\_PowerTrackSYBRGreenMasterMix\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0018825_PowerTrackSYBRGreenMasterMix_UG.pdf) (sjekket 18. mar. 2024).

---

## A Appendiks

### A.1 Reagenser

<b>Reagens</b>	<b>Produsent</b>	<b>Artikkelnummer</b>
0.25% Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific	25200-056
A549-celler	ATCC	CCL-185
Bürker tellekammer	NonoEntek	631-1094
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	I8898-1G
Etanol 96%	VWR	20823.290
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific	A3160801
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific	14025-092
Ham's F12-K Kaighn's Medium (HFKM)	Thermo Fisher Scientific	21127-022
Ivermectin	Sigma-Aldrich	18898-1G
Power Track SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific	A46012
Phosphate Buffered Saline (PBS)	VWR	E504-500ML
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	15140163
Primersekvenser	Thermo Fisher Scientific	10336-022
Qubit RNA BR Assay Kit	Thermo Fischer Scientific	Q10210
qScript Ultra Supermix Kit	Quantabio	95217-100
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32850
RNeasy mini kit	Qiagen	74104
Sterilfilter	Pall	PN 4612

---

## A.2 Prosedyrer

### A.2.1 Rutiner på cellelaboratoriet

Prosedyren er hentet fra ressurser til laboratoriekurs i Anvendt Bioteknologi (MB301812) ved NTNU, utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Institutt for biologiske fag Ålesund og oversatt fra engelsk. Rutiner på cellelaboratoriet følges for å unngå spredning av cellemateriell ut av cellelaboratoriet og for å unngå kontaminasjon i cellekulturene.

Hvis UV-lyset står på må dette skrues av umiddelbart ved opphold på cellelaboratoriet.

1. Hender vaskes før man går inn på laboratoriet.
2. Bruk alltid laboratoriefrakk og skotrekk. Ved langt hår må dette settes opp.
3. Ta på hansker og desinfiser disse med 70% etanol. Spray ermer på labfrakk.
4. Løft opp glassdøren på LAF-benken og sett på deksel foran UV-lys. Spray alle overflater med 70% etanol. Lukk døren og trykk på pilen for å åpne LAF-benken til arbeidsposisjon. Når lysene for viften og for arbeidsposisjon lyser grønt er LAF-benken klar til bruk.
5. Tørk alltid opp søl umiddelbart og vask overflaten med 70% etanol.
6. Aldri sett noe over luftfilteret, slik at luftstrømmen som lager den beskyttende atmosfæren ikke brytes.
7. Alt som settes inn i skapet må sprayes med 70% etanol før det settes inn. Armene må også sprayes med etanol før man tar de inn i skapet.
8. Gjør klar et spillbeger. Innholdet tømmes i dunk for farlig avfall etter bruk.
9. Aldri åpne noe som skal brukes til cellekultur utenfor LAF-benken
10. Aldri åpne celleflaske- eller plate før de tas inn i LAF-benken. Ved fjerning av lokk skal dette legges ned inne i LAF-benken med åpningen ned. Ta på lokket så raskt som mulig etter bruk.
11. Jobb aldri med to cellelinjer samtidig i samme LAF-benk. Dette kan føre til krysskontaminering og er ofte umulig å detektere da cellene ser like ut. UV-lys skal stå på i 60 minutter mellom forskjellige cellelinjer.
12. Ta aldri direkte på en pipette. Bruk aldri pipetten i to forskjellige beholdere. Pipetten må aldri røre noe annet enn hva den skal suge opp eller levere., Hvis pipettespissen rører noe annet må denne kastes. Ikke fjern plastemballasjen fra pipetten før du er klar til å bruke den.
13. Jobb aldri med to cellelinjer samtidig i samme LAF-benk. Dette kan føre til krysskontaminering og er ofte umulig å detektere da cellene ser like ut. UV-lys skal stå på i 60 minutter mellom forskjellige cellelinjer.

- 
14. Forsøk å ikke rør flaskehalsen med pipetten.
  15. Bruk ansiktsmaske dersom du er syk.
  16. Jobb så raskt, men presist, som mulig. Cellene vokser best i inkubator
  17. Når ferdig settes celler tilbake i inkubator, alt fjernes fra LAF benk og sprayes med 70% etanol.
  18. Trykk på ned-pilen for å lukke LAF-benken. Åpne døren og spray med 70% etanol. Fjern deksler på UV-lys. Lukk døren.
  19. Kast hansker og skoposer i farlig avfall.
  20. Skru på UV-lys i LAF-benken og forlat rommet umiddelbart.



---

### A.2.2 Tining av celler

Prosedyren er hentet fra Thermo Fishers protokoll for cellekultur og oversatt fra engelsk. Prosedyren anvendes for å minimalisere stress og bevare flest mulig celler når man skal tine en cellekultur fra kryotank til anbefalt temperatur for kulturmiljøet.

1. Fjern de kryogene kryorørene som inneholder de frosne cellene fra kryotank og plasser glassene umiddelbart i et vannbad på 37°C.
2. Tin cellene raskt (<1 minutt) ved å røre om kryorøret rundt i 37°C vannbad til det kun er en liten bit is igjen i kryorøret.
3. Overfør kryorøret til en LAF-benk. Før du åpner kryorøret, dra over overflaten av røret med 70% etanol.
4. Overfør ønsket mengde egnet forvarmet og ferdiglaget vekstmedium for cellelinjen, dråpevis inn i sentrifugerøret som inneholder de tinte cellene.
5. Sentrifuger cellesuspensjonen ved omtrent 200g i 5-10 minutter. Den aktuelle sentrifugehastigheten og tiden varierer avhengig av celletypen.
6. Etter endt sentrifugering, kontroller klarheten til supernatanten og synligheten til en komplett pellet. Aspirer supernatant aseptisk uten å forstyrre cellepelleten.
7. Forsiktig resuspender cellene i egnet vekstmedium, og overfør dem til egnet kulturkar og til det anbefalte kulturmiljøet.

---

### A.2.3 Subkultivering av celler

Prosedyren er hentet fra ressurser til laboratoriekurs i Anvendt Bioteknologi (MB 301712) ved NTNU, utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Institutt for biologiske fag Ålesund og oversatt fra engelsk. Prosedyren beskriver fremgangsmåten for kultivering og subkultivering av A549-celler i 25cm<sup>2</sup> celleflasker og 6-brønners cellebrett.

1. Forbered LAF-benken ved å skru den på, sørg for at deksel til UV-lys er på plass og spray alle overflater med 70% etanol. Lampen for arbeidsposisjonen og viften må lyse grønt før benken er klar til bruk.
2. Planlegg arbeidet i LAF-benken. Alt skal sprayes med 70% etanol før det settes inn.
  - Celleflasker/cellebrett må være merket med passasjennummer, type celler, dato og initialier.
  - Vekstmedium, HBSS, pipettespisser, pipettepistol, Falconrør og spillbeger kan settes inn i LAF-benken.
3. Legg til 6 mL vekstmedium til en ren, tom 25cm<sup>2</sup> celleflaske eller 6 brønners cellebrett.
4. Sjekk cellekonfluens i invertermikroskop
5. Sett celleflasker med celler i inn i LAF benk, spray med 70% etanol.
6. Fjern gammelt vekstmedium og overfør det til spillbeger.
7. Vask cellene forsiktig med 2x3 mL HBSS. HBSS fjernes og overføres til spillbeger
8. Tilsett 0,5 mL 0,25% trypsin og sørg for at alle cellene er dekket. La Trypsin virke i omtrent 2 minutter.
  - Ved celleflaske: Slå flasken forsiktig mot hånden og se om cellene har løsnet ved hjelp av invertermikroskop
  - Ved cellebrett: Løsne celler ved hjelp av celleskrape og sjekk om de har løsnet ved hjelp av invertermikroskop
9. Når omtrent 80% av cellene har løsnet inaktiveres trypsin ved å tilsette 4 mL vekstmedium. NB: Gjøres i LAF-benk.
10. Bland cellekulturen forsiktig ved å pipettere opp og ned. Overfør så til et 15 mL Falconrør.
11. Cellesuspensjonen sentrifugeres på 1200 rpm i 3 minutter.
12. Cellepellet skal nå ha blitt dannet.
13. Fjern supernatanten over pelletten og kast i spillbeger. Vær forsiktig med å ikke suge opp pelletten.

- 
14. Legg til 1 mL vekstmedium og pipetter forsiktig opp og ned for å løse opp pelletten
  15. Legg til vekstmedium i forhold til hva cellene skal splittes til. Pipetter forsiktig opp og ned.
  16. Legg til 1 mL celsuspensjon til de klargjorte celleflaskene eller brettene. Roter horisontalt for å blande
  17. Plasser celleflasker i en CO<sup>2</sup> inkubator ved 37°C.
  18. Kast alt avfall i dunk for farlig avfall. Tørk opp eventuelt søl og spray alle overflater med 70% etanol. Fjern deksel foran UV-lysene.
  19. Kast hansker og skoposer i farlig avfall.
  20. Skru på UV-lyset og forlat celledlaboratoriet umiddelbart.

---

#### A.2.4 Høsting av celler

Prosedyren er hentet fra håndbok for RNeasy kit og oversatt fra engelsk [94].

1. Fjern vekstmedium fra brønn i cellebrett.
2. Vask cellene med 2x3 mL HBSS.
3. Legg til 0,5 mL 0,25% trypsin. La virke i 2 minutter.
4. Løsne cellene med celskrape. Sjekk i mikroskop at cellene har løsnet.
5. Inaktiver trypsin ved å legge til 4 mL vekstmedium når 80% av cellene har løsnet
6. Overfør cellesuspensjonen til 15 mL Falconrør og bland ved å pipettere opp og ned.

---

### A.2.5 Celletelling

Prosedyren er hentet fra ressurser til laboratoriekurs i Anvendt Bioteknologi (MB301812) ved NTNU, utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Institutt for biologiske fag Ålesund og oversatt fra engelsk. Prosedyren beskriver hvordan celler telles ved hjelp av Bürker tellekammer C-chip.

1. 11  $\mu\text{L}$  cellesuspensjon legges til begge sider av kammeret. Bland godt før pipettering
2. Tell 3-9 ruter. Kun to av sidene telles per rute.
3.  $\text{Celler/mL} = \frac{\text{Antall celler i 9 ruter}}{9 \times 10^{-4} \text{ mL}}$
4. Totalt antall celler =  $\text{Celler/mL} \times \text{mL suspensjon}$

---

### A.2.6 RNA-isolering

Prosedyren er hentet fra håndbok for RNeasy kit og oversatt fra engelsk [94]. Beskriver steg i isolering av RNA fra celler i suspensjon.

1. Som forberedelse må buffer RPE tilsettes 4 volum 96-100% etanol.
2. Cellesuspensjonen sentrifugeres på 300g i 5 minutter.
3. Supernatant fjernes.
4. Tilsett buffer RLT.
  - 350  $\mu\text{L}$  ved mindre enn  $5 \times 10^6$  celler.
  - 600  $\mu\text{L}$  dersom  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  celler.
5. Overfør pellet og lysisbuffer til et eppendorfrør og vortex i 1 minutt.
6. Tilsett et volum 70% etanol. Bland ved å pipettere opp og ned.
7. Prøven overføres til RNeasy spinnkolonne som står i et 2 mL samlingsrør. Sentrifuger i 15 sekunder ved 8000g ( $\leq 10,000$  rpm). Kast væsken i oppsamlingsrøret.
  - Inntil 700  $\mu\text{L}$  prøve.
8. Ved ekstra prøve tilsettes dette til kolonnen og sentrifuger på nytt.
9. Tilsett 700  $\mu\text{L}$  buffer RW1 og sentrifuger i 15 sekunder ved 8000g ( $\leq 10,000$  rpm). Kast væsken i oppsamlingsrøret.
10. Tilsett 500  $\mu\text{L}$  buffer RPE og sentrifuger i 15 sekunder ved 8000g ( $\leq 10,000$  rpm). Kast væsken i oppsamlingsrøret.
11. Tilsett 500  $\mu\text{L}$  buffer RPE og sentrifuger i 2 minutter ved 8000g ( $\leq 10,000$  rpm). Kast væsken i oppsamlingsrøret.
12. Plasser spinnkolonnen i et nytt samlingsrør.
13. Legg til 30 – 50  $\mu\text{L}$  RNase-fritt vann. Sentrifuger i 1 minutt ved 8000g ( $\leq 10,000$  rpm).
  - Volum vurdert etter antall celler.
14. Om forventet RNA-utbytte er over 30  $\mu\text{g}$ , gjenta steg 13 ved å bruke ett til volum RNase-fritt vann. Gjenbruk samlerør.
15. Ta ut RNA til konsentrering og frys ned resten.

---

### A.2.7 Måling av RNA-konsentrasjon

Prosedyren er hentet fra deres håndbøker for Qubit 4 Fluorometer og Qubit RNA BR Assay kit og oversatt fra engelsk [95, 96]. Beskriver måling av RNA-konsentrasjon i Qubit Fluorometer ved hjelp av Qubit RNA BR Assay kit.

1. Lag working solution for alle prøver ved hjelp av Qubit RNA BR Reagent og Qubit DNA BR Buffer i et forhold på 1:200.
2. Standarder tillages i Qubit rør
  - 190  $\mu\text{L}$  working solution og 10  $\mu\text{L}$  Qubit BR RNA-Standard #1/#2
  - Inkuber i 2 minutter.
3. Velg assay: BR RNA
4. Kalibrer instrumentet
  - Les av standard #1.
  - Les av standard #2
5. Legg til prøver og working solution i Qubit rør.
  - 180-199  $\mu\text{L}$  working solution og 1-20  $\mu\text{L}$  prøve til et totalvolum på 200  $\mu\text{L}$ .
  - Inkuber i 2 minutter
6. Les av prøver

---

### A.2.8 cDNA-syntese

Prosedyren er hentet fra manual for qScript Ultra Supermix og oversatt fra engelsk [97]. Beskriver steg i syntese av cDNA fra RNA.

1. Vortex komponentene og sentrifuger før bruk. Hold på is
2. Overfør følgende til et tynnvegget PCR-rør på is:

Komponent	Volum for 20 $\mu$ L reaksjon	Sluttkonsentrasjon
Nukleasefritt vann	Variabelt	
Templat RNA	Variabelt	2,5 $\mu$ g- 1 pg av total RNA
qScript Ultra Supermix	4 $\mu$ L	
Sluttvolum	20 $\mu$ L	

3. Vortex forsiktig, sentrifuger for å samle innhold.
4. Inkuber
  - 2 minutter på 25°C
  - 10 minutter på 55°C
  - 1 minutt på 95°C
  - Hold på 4°C
5. Reaksjonene fryses



---

### A.2.9 Måling av cDNA-konsentrasjon

Prosedyren er hentet fra håndbøker for Qubit 4 Fluorometer og Qubit dsDNA BR Assay Kit og oversatt fra engelsk. [95, 98]. Beskriver måling av cDNA-konsentrasjon i Qubit Fluorometer med Qubit dsDNA BR Assay Kit.

1. Lag working solution for alle prøver ved hjelp av Qubit dsDNA BR Reagent og Qubit DNA BR Buffer i et forhold på 1:200.
2. Standarder tillages ved å tilsette 190  $\mu\text{L}$  working solution og 10  $\mu\text{L}$  Qubit dsDNA BR Standard #1 eller #2 til Qubit rør.
  - Inkuber i 2 minutter.
3. Velg assay: dsDNA BR
4. Kalibrer instrumentet
  - Les av standard #1
  - Les av standard #2
5. Legg til prøver og working solution i Qubit rør.
  - 180-199  $\mu\text{L}$  working solution og 1-20  $\mu\text{L}$  prøve til et totalvolum på 200  $\mu\text{L}$ .
  - Inkuber i 2 minutter
6. Les av prøver

---

### A.2.10 Oppsett av PCR instrumentet

Prosedyren er hentet fra brukermanual til PowerTrack SYBR Green Master Mix og oversatt fra engelsk [99]. Prosedyren beskriver oppsett av temperaturprofil til PCR-instrumentet.

1. Sett opp temperaturprofilen i Standard cycling mode:

Tabell 7: Viser temperatur, varighet og sykluser for enzymaktivering, denaturering, hybridisering og polymerisering.

Steg	Temperatur	Varighet	Sykluser
Enzymaktivering	95°C	2 minutter	1
Denaturering	95°C	15 sekunder	40
Hybridisering/Polymerisering	60°C	30 sekunder	

2. Still inn instrumentet til å gjennomføre et dissosiasjonstrinn i Standard cycling mode”:

Tabell 8: Viser ramp rate, temperatur og tid i dissosiasjonstrinnet for å danne en smeltekurve.

Steg	Ramp rate	Temperatur	Tid
1	1,6°C/sekund	95°C	15 sekunder
2	1,6°C/sekund	60°C	1 minutt
3(Dissosiasjon)	0, 075°C/sekund	95°C	15 sekunder

---

### A.2.11 Optimalisering av primerkonsentrasjoner

Prosedyren er hentet fra brukermanual til PowerTrack SYBR Green Master Mix og oversatt fra engelsk [99]. Prosedyren beskriver oppsett av PCR-analyse for å bestemme optimale primerkonsentrasjoner.

1. Forbered en 96-brønners plate.
2. Bruk 1-10 ng cDNA
3. Sett opp følgende ni konsentrasjonsvariasjoner (nM) for valgte primere med sammen med templat og NTC

Tabell 9: Tabellen viser en oversikt over *forward* og *reverse* primerkonsentrasjoner i ni brønner, i formatet *forward/reverse*. NB: Platekonfigurasjonen gjelder for fire replikater av hver av de følgende ni variasjonene av primerkonsentrasjon i både templat og NTC brønner

<i>Reverse</i> primer	<i>Forward</i> primer		
	300	500	800
300	300/300	500/300	800/300
500	300/500	500/500	800/500
800	300/800	500/800	800/800

4. Sett opp temperaturprofil
5. Sett inn platen og start analysen med oppsett ifølge ”Oppsett av PCR instrumentet” (A.2.10).
6. Samle resultat for  $\Delta R_n$  og  $C_q$ . Velg de minste *forward* og *reverse* primerkonsentrasjonene som gir høyeste  $\Delta R_n$  verdier og lave  $C_q$  verdier.

---

### A.2.12 Brønnoppsett

Prosedyren er hentet fra brukermanual til PowerTrack SYBR Green Master Mix og oversatt fra engelsk [99]. Prosedyren beskriver oppsett av brønner til PCR-analyse.

1. Sett opp følgende for 20  $\mu\text{L}$  brønn reaksjon:

Tabell 10: Tabellen viser volum til reagenser i PCR-reaksjonen. Volum primer bestemmes av valgt primerkonsentrasjon. Volum nukleasefritt vann skal fylle restvolumet

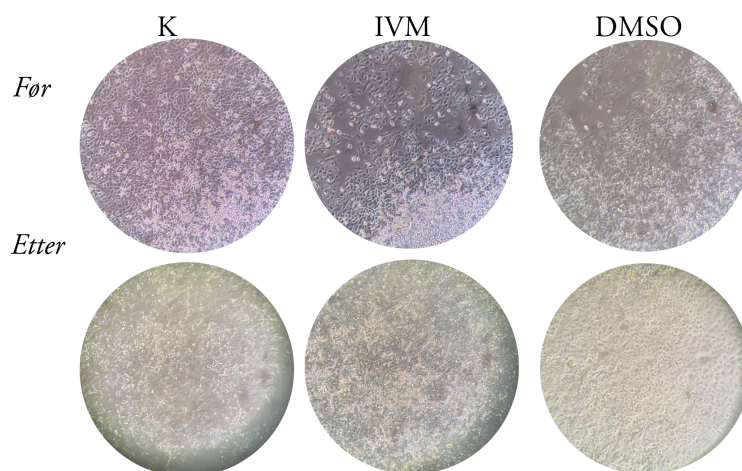
Yellow Sample Buffer	0,5 $\mu\text{L}$
PowerTrack SYBR Green Master Mix	10 $\mu\text{L}$
<i>Forward</i> primer	Variabel, 300-800 nM
<i>Reverse</i> primer	Variabel, 300-800 nM
DNA-templat	Variabel, 1-10 ng cDNA
Nukleasefritt vann	Variabel
Sluttvolum	20 $\mu\text{L}$

2. Bland komponentene godt og spinn ned
3. Overfør rett volum til brønner i plate
  - Yellow Sample Buffer kan erstattes med nukleasefritt vann
4. Forsegle platen og sentrifuger for å spinne ned
5. Sett platen i qPCR-maskinen og start analysen med ønsket temperaturprofil

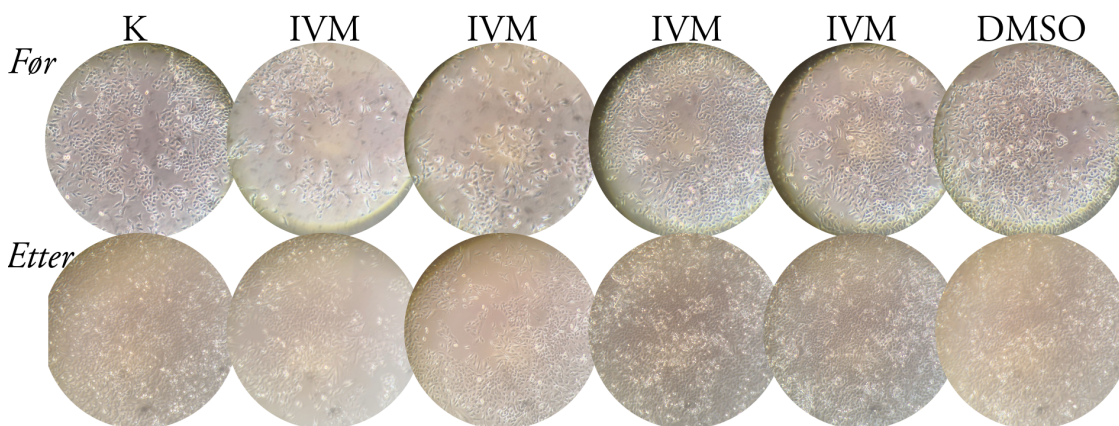
---

## A.3 Resultat

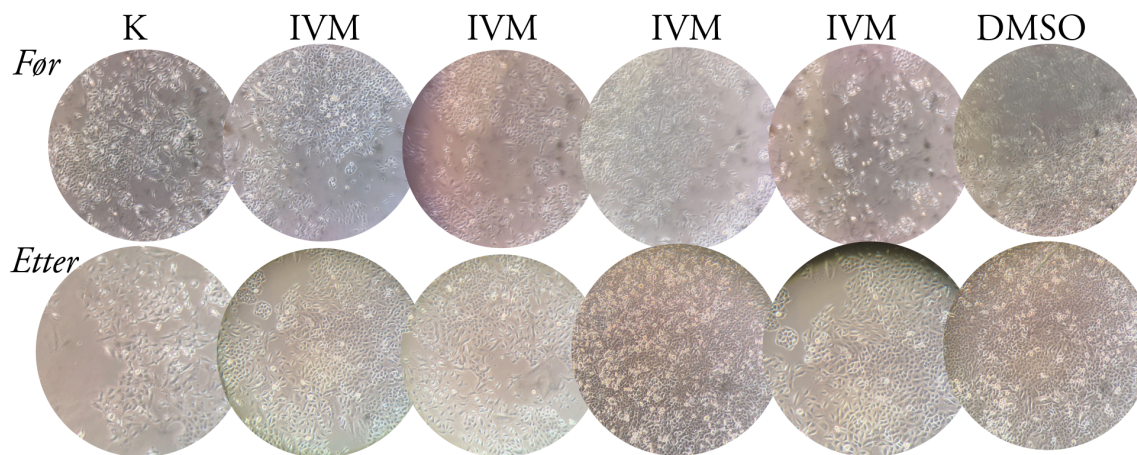
### A.3.1 Oversikt over konfluens



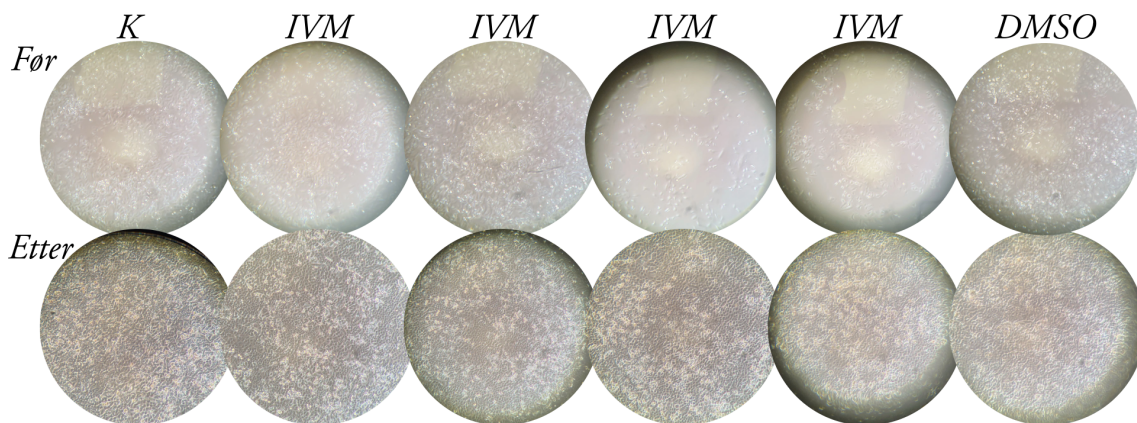
Figur 18: Bildene er tatt gjennom okkular på invertmikroskop ved 10x forstørrelse. Viser konfluens for en del av brønnoverflaten hos brønner i cellebrett fra parti 0 i kontroll-, eksperimentell- og DMSO-gruppen kultivert i 72 timer. Henholdsvis kalt "K", "IVM", "DMSO". Øvre rad viser A549-cellekulturene før tilsetning av løsningene, nedre rad viser A549-cellekulturene etter 72 timers kultivering med de respektive løsningene



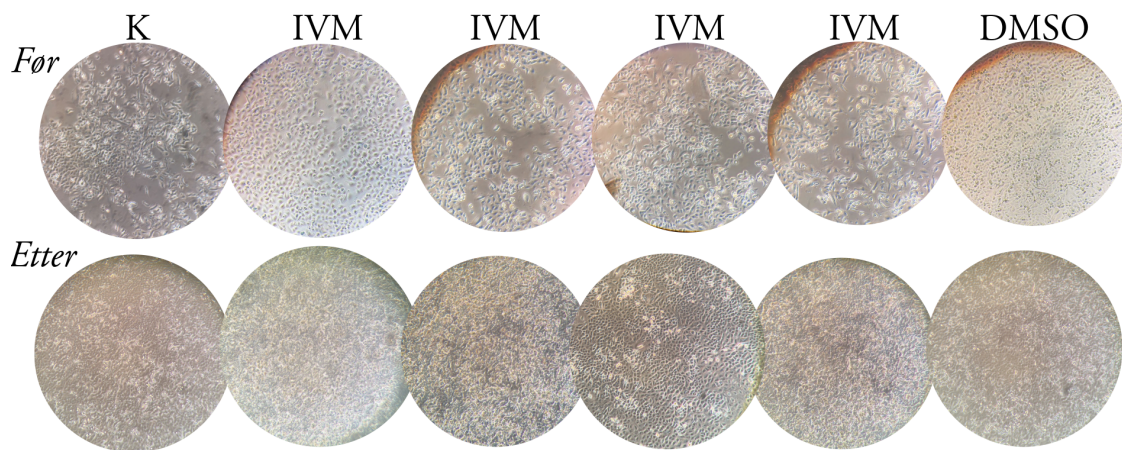
Figur 19: Bildene er tatt gjennom okkular på invertmikroskop ved 10x forstørrelse. Viser konfluens for en del av brønnoverflaten hos brønner i cellebrett fra parti 1 i kontroll-, eksperimentell- og DMSO-gruppen kultivert i 24 timer. Henholdsvis kalt "K", "IVM", "DMSO". Øvre rad viser A549-cellekulturene før tilsetning av løsningene, nedre rad viser A549-cellekulturene etter 24 timers kultivering med de respektive løsningene



Figur 20: Bildene er tatt gjennom okkular på invertmikroskop ved 10x forstørrelse. Viser konfluens for en del av brønnoverflaten hos brønner i cellebrett fra parti 2 i kontroll-, eksperimentell- og DMSO-gruppen kultivert i 24 timer. Henholdsvis kalt "K", "IVM", "DMSO". Øvre rad viser A549-cellekulturene før tilsetning av løsningene, nedre rad viser A549-cellekulturene etter 24 timers kultivering med de respektive løsningene



Figur 21: Bildene er tatt gjennom okkular på invertmikroskop ved 10x forstørrelse. Viser konfluens for en del av brønnoverflaten hos brønner i cellebrett fra parti 3 i kontroll-, eksperimentell- og DMSO-gruppen kultivert i 72 timer. Henholdsvis kalt "K", "IVM", "DMSO". Øvre rad viser A549-cellekulturene før tilsetning av løsningene, nedre rad viser A549-cellekulturene etter 72 timers kultivering med de respektive løsningene



Figur 22: Bildene er tatt gjennom okkular på invertmikroskop ved 10x forstørrelse. Viser konfluens for en del av brønnoverflaten hos brønner i cellebrett fra parti 4 i kontroll-, eksperimentell- og DMSO-gruppen kultivert i 72 timer. Henholdsvis kalt "K", "IVM", "DMSO". Øvre rad viser A549-cellekulturene før tilsetning av løsningene, nedre rad viser A549-cellekulturene etter 72 timers kultivering med de respektive løsningene

### A.3.2 Celletelling

Tabell 11: Tabell a - e, henholdsvis datasett 0 - 4 inneholder resultat fra celletelling med Bürker tellekammer fra separate parti, kultivert i henholdsvis 72, 24, 24, 72 og 72 timer. I hver enkelt tabell fra venstre til høyre beskriver hver kolonne hvilken prøve cellene er hentet fra, antall celler telt totalt i kammer A og kammer B, " $\overline{\text{Celler/mL}}$ " beskriver gjennomsnittet av antall celler per mL i kammer A og B ved å bruke formel 9, og totalt antall celler for hele cellesuspensjonen som prøvene er hentet fra. Hver rad i kolonnen for "prøve" angir mediet cellekulturen er kultivert med før celletelling. Rad 1-4 indikerer 4 paralleller fra eksperimentellgruppen. Rad DMSO inneholdt prøver fra DMSO-gruppen, og rad K inneholdt prøver fra kontrollgruppen.

(a) Datasett 0 kultivert i 72 timer.

Prøve	Antall celler (A)	Antall celler (B)	$\overline{\text{Celler/mL}}$	Celler Totalt
1	202	200	223 333.3	893 333
2	114	143	142 777.8	571 111
3	100	95	108 333	433 332
4	152	147	166 111.1	664 444
DMSO	123	73	108 888.9	435 555
K	139	168	170 555.5	682 222

(b) Datasett 1 kultivert i 24 timer.

Prøve	Antall celler (A)	Antall celler (B)	$\overline{\text{Celler/mL}}$	Celler Totalt
1	37	33	38 888.9	155 556
2	29	28	31 666.6	126 667
3	345	282	317 777	1 391 111
4	212	204	231 111.1	924 444
DMSO	143	99	134 444	537 778
K	184	234	232 222	928 889

(c) Datasett 2 kultivert i 24 timer

Prøve	Antall celler (A)	Antall celler (B)	$\overline{\text{Celler/mL}}$	Celler Totalt
1	75	105	100 000	400 000
2	130	121	139 444.4	557 778
3	143	104	137 222.2	548 889
4	35	37	40 000	160 000
DMSO	238	251	271 666.7	1 086 667
K	34	36	38 888.9	155 555



(d) Datasett 3 kultivert i 72 timer

Prøve	Antall celler (A)	Antall celler (B)	$\overline{\text{Celler/mL}}$	Celler Totalt
1	327	318	358 333	1 433 333
2	240	315	308 333	1 233 333
3	405	435	466 667	1 866 667
4	345	393	411 667	1 646 667
DMSO	597	606	668 333.3	2 126 667
K	465	492	531 666.7	2 126 667

(e) Datasett 4 kultivert i 72 timer

Prøve	Antall celler (A)	Antall Celler (B)	$\overline{\text{Celler/mL}}$	Celler Totalt
1	550	702	695 555.6	2 782 222
2	546	429	541 666.7	2 166 667
3	258	246	280 000.0	1 120 000
4	225	249	263 333.3	1 053 333
DMSO	552	678	683 333.3	2 733 333
K	588	531	621 666.7	2 486 667

---

### A.3.3 RNA-konsentrasjon

Tabell 12: Kolonne 0 - 4 viser for RNA-konsentrasjon (ng/L) for alle prøver i et parti. Kolonne 0, 3 og 4 har kultivert i 72 timer, og kolonne 1 og 2 har kultivert i 24 timer. Rad 1-4 viser prøver fra eksperimentellgruppen. Rad "DMSO" viser prøver fra DMSO-gruppen, og rad "K" viser prøver fra eksperimentellgruppen.

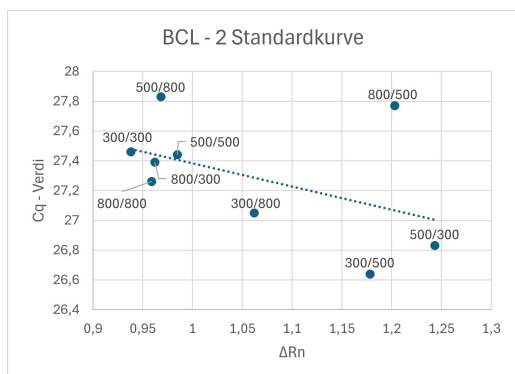
	0	1	2	3	4
1	296	90.9	94.0	350	830
2	480	56.1	94.6	498	340
3	606	331	104	444	362
4	602	159	126	512	368
DMSO	380	159	87.4	702	756
K	452	208	122	448	386

### A.3.4 cDNA-konsentrasjon

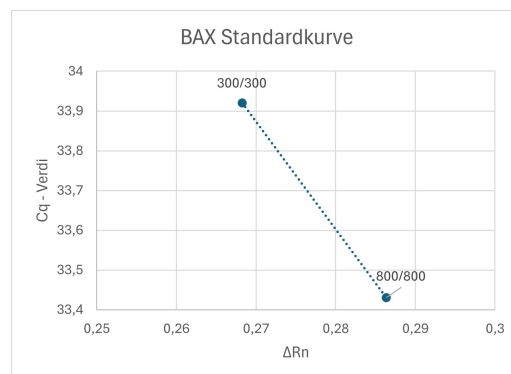
Tabell 13: Kolonne 0 - 4 refererer til prøvenes opprinnelige parti. Kolonne 0, 3 og 4 har kultivert i 72 timer, og kolonne 1 og 2 har kultivert i 24 timer. Rad 1-4 viser prøver fra eksperimentellgruppen. Rad "DMSO" viser prøver fra DMSO-gruppen, og rad "K" viser prøver fra kontrollgruppen. Kolonne 0 - 4 deles videre inn i "Templat" (L) og "kons." (ng/L) som henholdsvis angir opprinnelig mengde templat-RNA brukt i cDNA-syntese og konsentrasjon for tre paralleller angitt med tall 1-3 for hver enkelt prøve i separate subsub-rader med unntak av kolonne, og parti, 0. Referanse til spesifikk prøve i tabellen er oppgitt i formatet: prøve(rad)/parti(kolonne)/konsentrasjon(subsub-rad), ex. rad K, prøve 2, subsub-rad 3 vil tilsvare cDNA-templat prøverefranse: K.1.3 (1.010)

Prøve	0		1		2		3		4	
	Templat	Kons.	Templat	Kons.	Templat	Kons.	Templat	Kons.	Templat	Kons.
1	0.34	0.658	1.100	1: 0.940	1.064	1: 1.290	0.286	1: 0.852	0.120	1: 0.568
				2: 0.948		2: 1.260		2: 0.884		2: 0.660
				3: 0.908		3: 1.180		3: 0.926		3: 0.694
2	0.21	0.716	1.782	1: 0.848	1.056	1: 1.260	0.200	1: 1.050	0.294	1: 0.978
				2: 0.944		2: 1.430		2: 0.852		2: 1.020
				3: 1.040		3: 1.160		3: 0.818		3: 0.864
3	0.17	0.770	0.302	1: 1.150	0.962	1: 1.270	0.226	1: 0.940	0.276	1: 1.140
				2: 0.940		2: 1.200		2: 0.852		2: 1.160
				3: 0.988		3: 1.010		3: 0.842		3: 1.090
4	0.17	0.846	0.628	1: 1.120	0.794	1: 0.688	0.196	1: 1.280	0.272	1: 1.260
				2: 1.050		2: 0.523		2: 1.070		2: 1.120
				3: 1.110		3: 0.786		3: 0.968		3: 1.040
DMSO	0.26	0.870	0.628	1: 0.854	1.144	1: 0.894	0.222	1: 1.180	0.260	1: 1.240
				2: 0.958		2: 1.360		2: 1.210		2: 1.070
				3: 1.200		3: 1.170		3: 1.110		3: 1.030
K	0.22	0.888	0.480	1: 1.080	0.820	1: 0.754	0.142	1: 1.170	0.132	1: 1.240
				2: 0.848		2: 1.120		2: 0.936		2: 1.070
				3: 1.010		3: 0.804		3: 1.110		3: 1.080

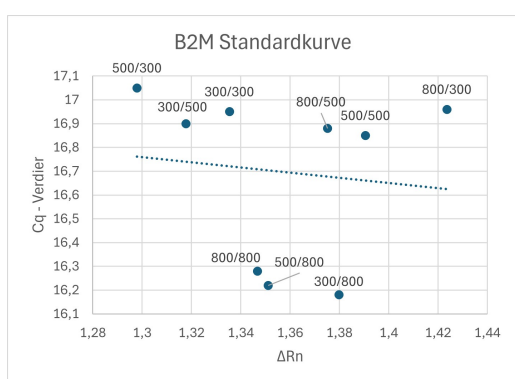
### A.3.5 Standardkurver fra primeroptimalisering



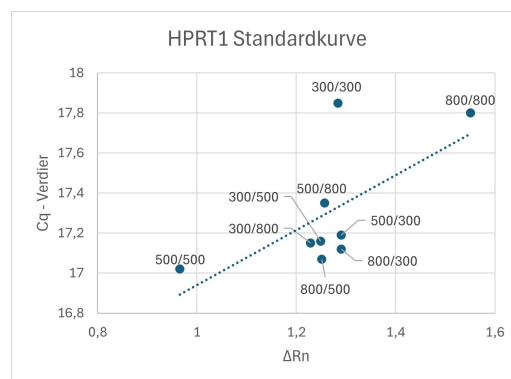
(a) Standardkurve for BCL-2



(b) Standardkurve for BAX



(c) Standardkurve for B2M



(d) Standardkurve for HPRT1

Figur 23: Oversikt over korrekte standardkurver for bestemmelse av ønsket primerkonsentrasjon, med  $\Delta Rn$  på x-aksen og  $C_q$ -verdier på y-aksen. Figur 23a viser standardkurve for BCL-2, figur 23b viser standardkurve for BAX, figur 23c viser standardkurve for B2M og figur 23d viser standardkurve for HPRT1

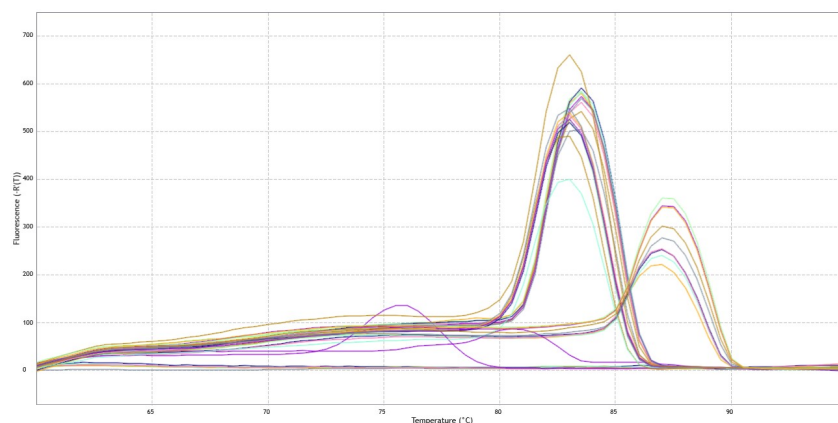
---

### A.3.6 $C_q$ -verdier primeroptimaliseringsforsøk

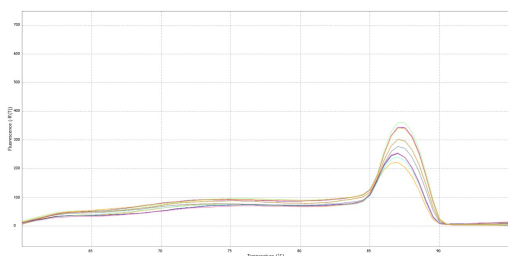
Tabell 14: Tabellen viser  $C_q$ -verdier fra forsøk for å finne optimale primerkonsentrasjoner. Kolonne fra venstre beskriver primerkonsentrasjon *forward/reverse* (nM). For hver enkelt rad er det angitt en unik sammensetning av *forward* og *reverse* primer. Kolonne BCL-2, BAX, B2M og HPRT1 viser  $C_q$ -verdier for de ulike primersammensetningene. "No  $C_q$ " betyr at genet med tilhørende primersammensetning ikke ga god nok amplifikasjon til å bli detektert.

Primer f/r	BCL-2	BAX	B2M	HPRT1
<b>300/300</b>	27.46	33.92	16.95	17.85
<b>500/300</b>	26.64	No $C_q$	17.05	17.19
<b>800/300</b>	27.05	No $C_q$	16.96	17.12
<b>300/500</b>	26.83	No $C_q$	16.90	17.16
<b>500/500</b>	27.44	No $C_q$	16.85	17.02
<b>800/500</b>	27.83	No $C_q$	16.88	17.07
<b>300/800</b>	27.39	No $C_q$	16.18	17.15
<b>500/800</b>	27.77	No $C_q$	16.22	17.35
<b>800/800</b>	27.26	33.43	16.28	17.80

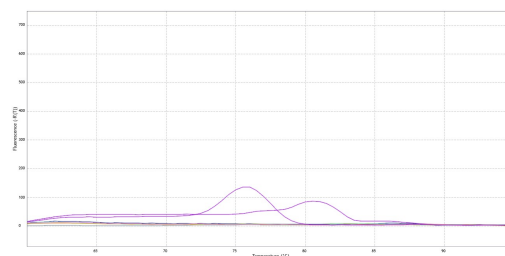
### A.3.7 Smeltekurve fra optimalisering av primerkonsentrasjoner



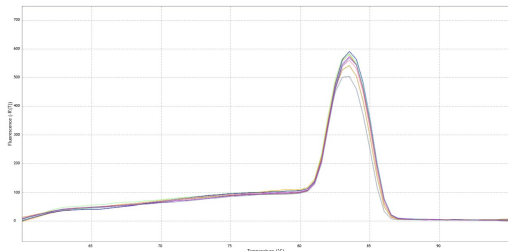
(a) qPCR-Primer, Total smeltekurve som viser resultat fra smeltepunktanalysen i primeroptimaliseringsforsøket



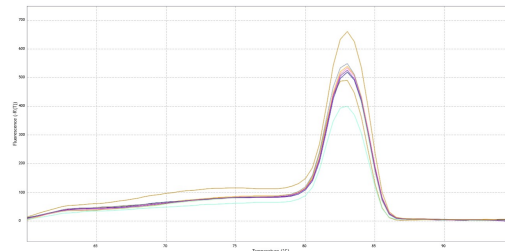
(b) qPCR-Primer, BCL-2



(c) qPCR-Primer, BAX



(d) qPCR-Primer, B2M



(e) qPCR-Primer, HPRT1

Figur 24: Oversikt over felles smeltekurve (a) for primeroptimaliseringsforsøk og sammenligning av smeltekurve for målgen og normaliseringsgen. BCL-2 (b), BAX (c), B2M (d) og HPRT1 (e) med ulike konsentrasjoner av *forward* og *reverse* primer. Smeltekurven er justert med oppløsning for temperatur 60-95°C langs x-aksen og fluorescensnivå  $-R'(T)$  fra -70 opp til 750 langs y-aksen.

---

### A.3.8 Primersammensetninger

Tabell 15: Viser hvilken primersammensetning som ble anvendt videre og hvilke som ikke ble tatt i bruk. Venstre kolonne beskriver mengde *forward* (F) og *reverse* (R) konsentrasjon (nM), videre mot høyre er det satt kryss for primersammensetning valgt for ulike gen og for NTC.

F / R	BCL-2	BAX	B2M	HPRT1	NTC
300/300	-	<b>X</b>	-	-	-
300/500	-	-	-	-	-
300/800	<b>X</b>	-	-	-	-
500/300	-	-	-	-	-
500/500	-	-	-	-	-
500/800	-	-	-	-	-
800/300	-	-	<b>X</b>	<b>X</b>	-
800/500	-	-	-	-	-
800/800	-	-	-	-	<b>X</b>

### A.3.9 $C_q$ -verdier Hovedforsøk

#### $C_q$ -verdier Hovedforsøk 1

Tabell 16: Viser resultat for  $C_q$ -verdier fra paralleller i hovedforsøk 1 for BCL-2, BAX, B2M og HPRT1 i egne tabeller, med referanse til cDNA-prøven som templatet er hentet fra. Venstre kolonne inneholder fordelingen av antall prøver for de spesifikke gen i qPCR-brettet. Kolonnen videre mot høyre identifiserer hvilken cDNA-prøve templatet for qPCR er hentet fra basert på tabell 13. Kolonnen for hovedforsøk identifiserer hvilket forsøk dataene er hentet fra og er videre delt inn i  $C_q$ -verdi for parallell 1 og 2 for samme cDNA-prøve. Kolonne til høyre merket " $\overline{C_q}$ " beskriver gjennomsnittsverdien for de to parallellene oppgitt for samme rad. Verdier markert med "\*" indikerer at en av parallellene har fått "No  $C_q$ ".

(a) Hovedforsøk 1, BCL-2

	Prøve Referanse	Hovedforsøk 1		$\overline{C_q}$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	No $C_q$	-	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>DMSO</b>	D.1.1	27.77	27.05	<b>27.41</b>
<b>K</b>	K.1.1	27.86	27.61	<b>27.74</b>
	K.2.3	28.80	27.89	<b>28.35</b>
<b>IVM</b>	1.1.1	27.11	27.11	<b>27.11</b>
	2.1.1	27.44	27.21	<b>27.33</b>
	3.1.1	27.85	27.91	<b>27.88</b>
	4.1.1	28.16	27.86	<b>28.01</b>
	1.2.2	27.39	26.85	<b>27.12</b>
	2.2.2	27.42	27.83	<b>27.63</b>
	3.2.2	27.62	27.77	<b>27.70</b>

(b) Hovedforsøk 1, BAX

	Prøve Referanse	Hovedforsøk 1		$\overline{C_q}$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	No $C_q$	-	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>DMSO</b>	D.1.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>K</b>	K.1.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	K.2.3	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>IVM</b>	1.1.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	2.1.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	3.1.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	4.1.1	35.95	No $C_q$	<b>35.95*</b>
	1.2.2	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	2.2.2	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	3.2.2	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>



(c) Hovedforsøk 1, B2M

	Prøve Referanse	Hovedforsøk 1		$\overline{C}_q$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	35.31	-	<b>35.31</b>
<b>DMSO</b>	D.1.1	16.91	17.18	<b>17.05</b>
<b>K</b>	K.1.1	16.98	17.10	<b>17.04</b>
	K.2.3	18.05	18.16	<b>18.11</b>
<b>IVM</b>	1.1.1	17.05	17.12	<b>17.09</b>
	2.1.1	16.89	16.91	<b>16.90</b>
	3.1.1	16.90	17.07	<b>16.99</b>
	4.1.1	17.01	17.17	<b>17.09</b>
	1.2.2	16.99	17.13	<b>17.06</b>
	2.2.2	16.92	17.26	<b>17.09</b>
	3.2.2	17.02	17.16	<b>17.09</b>

(d) Hovedforsøk 1, HPRT1

	Prøve Referanse	Hovedforsøk 1		$\overline{C}_q$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	No $C_q$	-	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>DMSO</b>	D.1.1	18.31	18.09	<b>18.20</b>
<b>K</b>	K.1.1	18.08	18.15	<b>18.12</b>
	K.2.3	19.75	19.83	<b>19.79</b>
<b>IVM</b>	1.1.1	18.32	18.41	<b>18.37</b>
	2.1.1	17.95	18.95	<b>18.45</b>
	3.1.1	18.77	18.70	<b>18.74</b>
	4.1.1	18.16	18.13	<b>18.15</b>
	1.2.2	18.28	18.24	<b>18.26</b>
	2.2.2	18.17	18.16	<b>18.17</b>
	3.2.2	18.75	18.29	<b>18.52</b>

## $C_q$ -verdier Hovedforsøk 2

Tabell 17: Viser resultat for  $C_q$ -verdier fra paralleller i hovedforsøk 2 for BCL-2, BAX, B2M og HPRT1 i egne tabeller, med referanse til cDNA-prøven som templatet er hentet fra. Venstre kolonne inneholder fordelingen av antall prøver for de spesifikke gen i qPCR-brettet. Kolonnen videre mot høyre identifiserer hvilken cDNA-prøve templatet for qPCR er hentet fra basert på tabell 13. Kolonnen for hovedforsøk identifiserer hvilket forsøk dataene er hentet fra og er videre delt inn i  $C_q$ -verdi for parallell 1 og 2 for samme cDNA-prøve. Kolonne til høyre merket " $\overline{C_q}$ " beskriver gjennomsnittsverdien for de to parallelene oppgitt for samme rad.

(a) Hovedforsøk 2, BCL-2

	Prøve Referanse	Hovedforsøk 2		$\overline{C_q}$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	33.34	-	<b>33.34</b>
<b>DMSO</b>	D.2.2	28.20	27.61	<b>27.91</b>
	D.2.3	29.73	28.02	<b>28.88</b>
<b>K</b>	K.3.3	30.06	28.53	<b>29.30</b>
<b>IVM</b>	4.1.3	28.17	27.68	<b>27.93</b>
	1.2.3	27.86	28.88	<b>28.37</b>
	2.2.3	28.75	28.96	<b>28.86</b>
	1.3.3	27.91	28.17	<b>28.04</b>
	2.3.3	28.61	28.06	<b>28.34</b>
	3.3.3	27.91	27.97	<b>27.94</b>
	4.3.3	27.65	27.69	<b>27.67</b>

(b) Hovedforsøk 2, BAX

	Prøve Referanse	Hovedforsøk 2		$\overline{C_q}$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	38.74	-	<b>38.74</b>
<b>DMSO</b>	D.2.2	No $C_q$	36.52	<b>36.52*</b>
	D.2.3	No $C_q$	38.90	<b>38.90*</b>
<b>K</b>	K.3.3	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>IVM</b>	4.1.3	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	1.2.3	37.02	No $C_q$	<b>37.02*</b>
	2.2.3	No $C_q$	39.12	<b>39.12*</b>
	1.3.3	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	2.3.3	No $C_q$	35.32	<b>35.32*</b>
	3.3.3	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	4.3.3	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>

(c) Hovedforsøk 2, B2M

	Prøve	Hovedforsøk 2		$\overline{C}_q$
	Referanse	Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	No $C_q$	-	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>DMSO</b>	D.2.2	17.22	17.52	<b>17.37</b>
	D.2.3	17.85	17.82	<b>17.84</b>
<b>K</b>	K.3.3	17.88	17.91	<b>17.90</b>
<b>IVM</b>	4.1.3	17.73	17.47	<b>17.60</b>
	1.2.3	17.85	17.54	<b>17.70</b>
	2.2.3	18.18	18.30	<b>18.24</b>
	1.3.3	17.93	18.19	<b>18.06</b>
	2.3.3	17.98	17.87	<b>17.93</b>
	3.3.3	17.37	17.45	<b>17.41</b>
	4.3.3	17.57	18.28	<b>17.93</b>

(d) Hovedforsøk 2, HPRT1

	Prøve	Hovedforsøk 2		$\overline{C}_q$
	Referanse	Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	No $C_q$	-	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>DMSO</b>	D.2.2	18.65	18.81	<b>18.73</b>
	D.2.3	19.20	19.04	<b>19.12</b>
<b>K</b>	K.3.3	19.27	19.23	<b>19.25</b>
<b>IVM</b>	4.1.3	18.92	18.92	<b>18.94</b>
	1.2.3	18.79	18.50	<b>18.65</b>
	2.2.3	19.56	19.86	<b>19.71</b>
	1.3.3	18.92	18.96	<b>18.94</b>
	2.3.3	19.40	19.03	<b>19.22</b>
	3.3.3	19.06	18.93	<b>19.00</b>
	4.3.3	19.12	18.99	<b>19.06</b>

### $C_q$ -verdier Hovedforsøk 3

Tabell 18: Viser resultat for  $C_q$ -verdier fra paralleller i hovedforsøk 3 for BCL-2, BAX, B2M og HPRT1 i egne tabeller, med referanse til cDNA-prøven som templatet er hentet fra. Venstre kolonne inneholder fordelingen av antall prøver for de spesifikke gen i qPCR-brettet. Kolonnen videre mot høyre identifiserer hvilken cDNA-prøve templatet for qPCR er hentet fra basert på tabell 13. Kolonnen for hovedforsøk identifiserer hvilket forsøk dataene er hentet fra og er videre delt inn i  $C_q$ -verdi for parallell 1 og 2 for samme cDNA-prøve. Kolonne til høyre merket " $\overline{C_q}$ " beskriver gjennomsnittsverdien for de to parallelene oppgitt for samme rad.

(a) Hovedforsøk 3, BCL-2

	Prøve Referanse	Hovedforsøk 3		$\overline{C_q}$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	No $C_q$	-	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>DMSO</b>	D.3.3	28.68	28.36	<b>28.52</b>
	D.4.1	28.12	28.59	<b>28.36</b>
<b>K</b>	K.4.1	28.94	27.90	<b>28.42</b>
	K.4.2	28.83	28.47	<b>28.65</b>
<b>IVM</b>	2.4.1	28.03	28.19	<b>28.11</b>
	3.4.1	28.20	28.68	<b>28.44</b>
	4.4.1	27.85	27.18	<b>27.52</b>
	4.4.2	27.75	27.69	<b>27.72</b>
	2.4.2	28.25	28.12	<b>28.19</b>
	3.4.2	27.58	27.56	<b>27.57</b>

(b) Hovedforsøk 3, BAX

	Prøve Referanse	Hovedforsøk 3		$\overline{C_q}$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	No $C_q$	-	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>DMSO</b>	D.3.3	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	D.4.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>K</b>	K.4.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	K.4.2	36.32	38.69	<b>37.51</b>
<b>IVM</b>	2.4.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	3.4.1	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	4.4.1	No $C_q$	33.79	<b>33.79*</b>
	4.4.2	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	2.4.2	No $C_q$	No $C_q$	<b>No <math>C_q</math></b>
	3.4.2	34.75	33.41	<b>34.08</b>

(c) Hovedforsøk 3, B2M

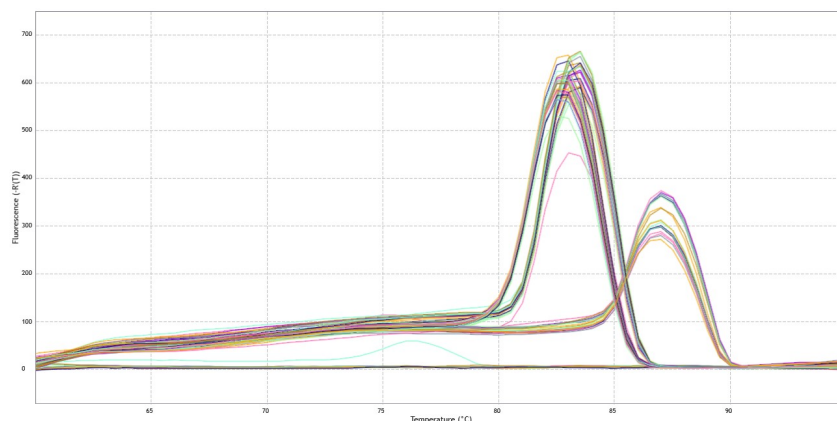
	Prøve Referanse	Hovedforsøk 3		$\overline{C}_q$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	32.70	-	<b>32.70</b>
<b>DMSO</b>	D.3.3	17.87	17.90	<b>17.89</b>
	D.4.1	17.31	17.34	<b>17.33</b>
<b>K</b>	K.4.1	17.25	17.37	<b>17.31</b>
	K.4.2	17.74	17.31	<b>17.53</b>
<b>IVM</b>	2.4.1	17.80	17.93	<b>17.87</b>
	3.4.1	17.23	17.39	<b>17.31</b>
	4.4.1	17.36	17.74	<b>17.55</b>
	4.4.2	17.34	17.29	<b>17.32</b>
	2.4.2	17.08	17.04	<b>17.06</b>
	3.4.2	16.98	17.02	<b>17.00</b>

(d) Hovedforsøk 3, HPRT1

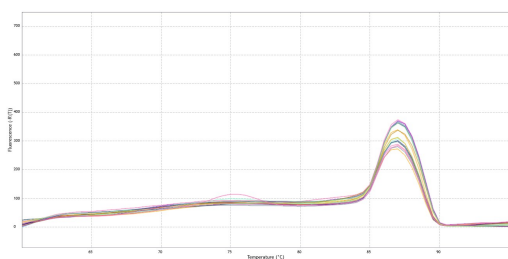
	Prøve Referanse	Hovedforsøk 3		$\overline{C}_q$
		Parallell 1	Parallell 2	
<b>NTC</b>	-	No $C_q$	-	<b>No <math>C_q</math></b>
<b>DMSO</b>	D.3.3	19.70	19.86	<b>19.78</b>
	D.4.1	19.82	19.86	<b>19.84</b>
<b>K</b>	K.4.1	19.24	19.73	<b>19.49</b>
	K.4.2	18.93	18.94	<b>18.94</b>
<b>IVM</b>	2.4.1	19.73	19.83	<b>19.78</b>
	3.4.1	19.20	19.07	<b>19.14</b>
	4.4.1	19.09	19.20	<b>19.15</b>
	4.4.2	19.30	19.02	<b>19.16</b>
	2.4.2	18.81	18.95	<b>18.88</b>
	3.4.2	18.70	18.75	<b>18.73</b>

### A.3.10 Smeltekurver fra hovedforsøk

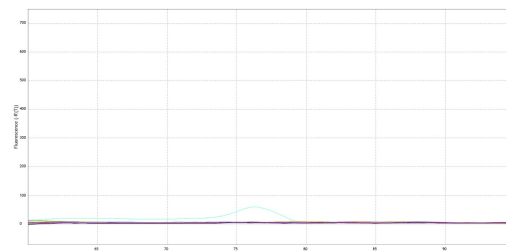
#### Hovedforsøk 1



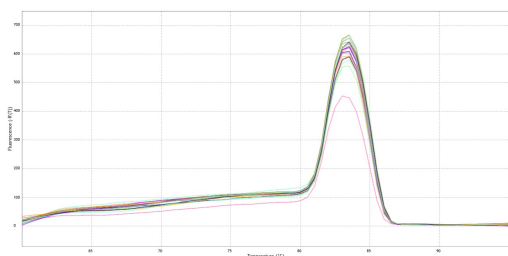
(a) qPCR 1, Total smeltekurve som viser resultat fra smeltepunktanalysen i 1. hovedforsøk



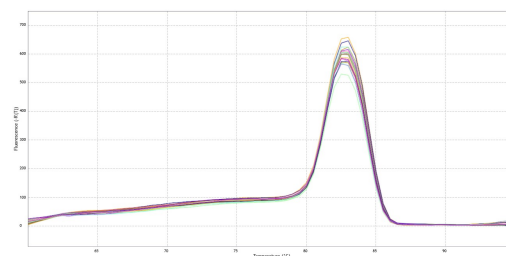
(b) qPCR 1, BCL-2 smeltepunkttemperatur 87°C



(c) qPCR 1, BAX smeltepunkttemperatur N/A



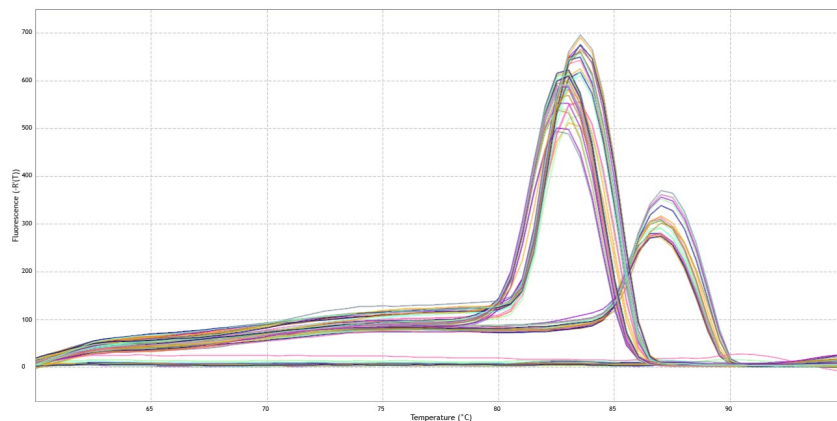
(d) qPCR 1, B2M smeltepunkttemperatur mellom 83.5°C



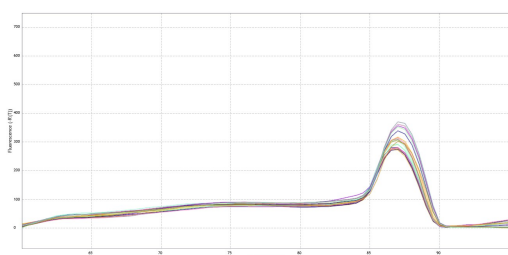
(e) qPCR 1, HPRT1 smeltepunkttemperatur mellom 82.5-83°C

Figur 25: Oversikt over felles smeltekurve (a) for 1. hovedforsøk og sammenligning av smeltekurve for målgjen og normaliseringsgen. BCL-2 (b), BAX (c), B2M (d) og HPRT1 (e). Smeltekurvene er justert med lik oppløsning for temperatur 60-95°C langs x-aksen og fluorescensnivå  $-R'(T)$  fra -70 opp til 750 langs y-aksen.

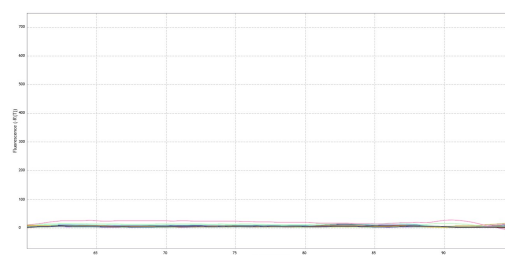
## Hovedforsøk 2



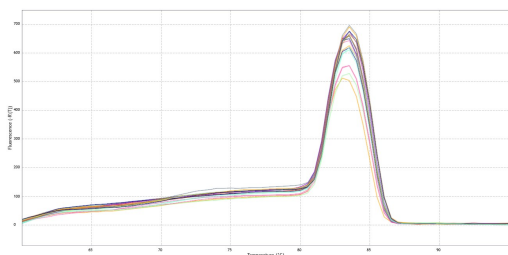
(a) qPCR 2, Total smeltekurve som viser resultat fra smeltepunktanalysen i 2. hovedforsøk



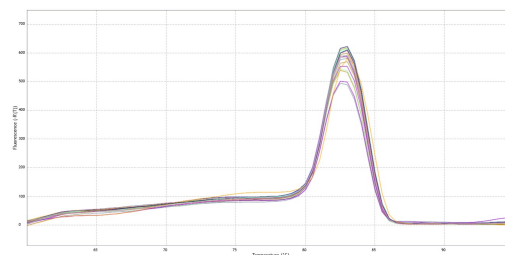
(b) qPCR 2, BCL-2 smeltepunkt tilnærmet 87°C.



(c) qPCR 2, BAX smeltekurven viser tilnærmet ingen reaksjon



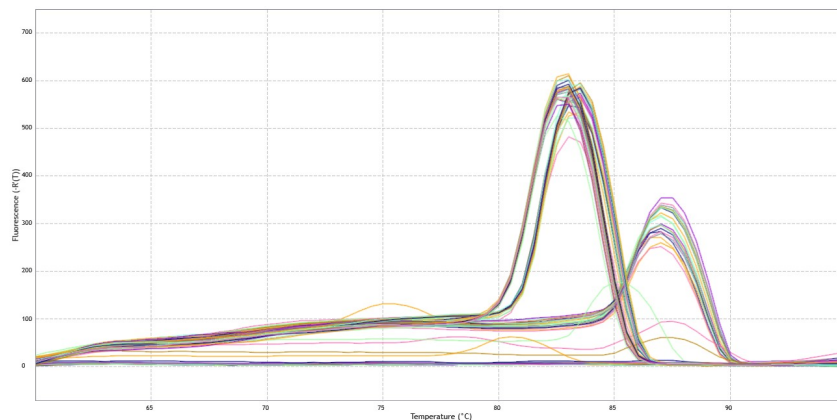
(d) qPCR 2, B2M smeltepunkttemperatur rundt 83.5°C



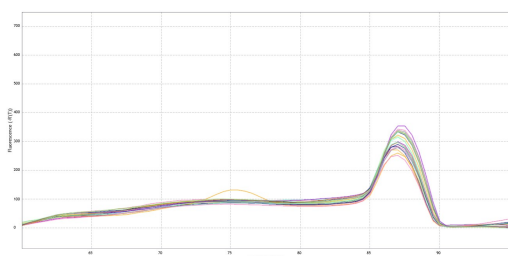
(e) qPCR 2, HPRT1 smeltepunkttemperatur ligger mellom 82.5-83°C

Figur 26: Oversikt over felles smeltekurve (a) for 2. hovedforsøk og sammenligning av smeltekurve for målgjen og normaliseringsgen. BCL-2 (b), BAX (c), B2M (d) og HPRT1 (e). Smeltekurvene er justert med lik oppløsning for Temperatur 60-95°C langs x-aksen og fluorescensnivå -R'(T) mellom -70 opp til 750 langs y-aksen.

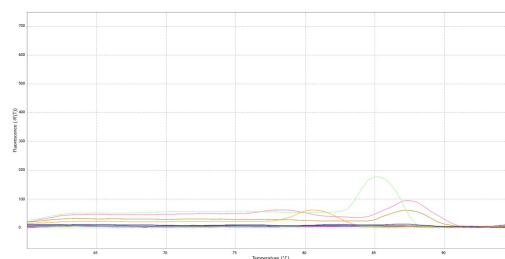
### Hovedforsøk 3



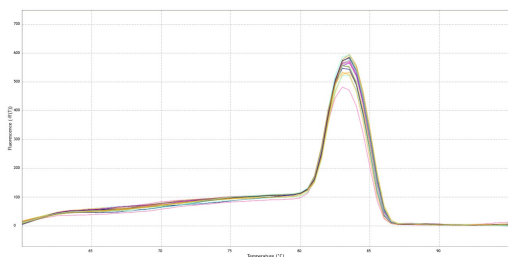
(a) qPCR 3, Total smeltekurve som viser resultat fra smeltepunktanalysen i 3. hovedforsøk



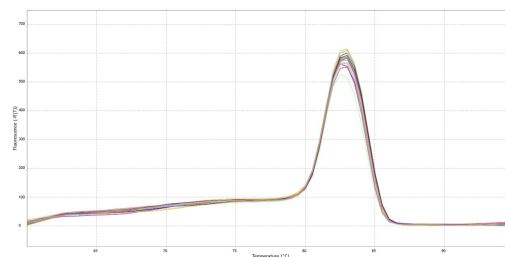
(b) qPCR 3, BCL-2 smeltepunkt tilnærmet 87°C.



(c) qPCR 3, BAX uten indikasjon til en spesifikk smeltepunkttemperatur



(d) qPCR 3, B2M smeltepunkttemperatur rundt 83.5°C



(e) qPCR 3, HPRT1 smeltepunkttemperatur rundt 83°C

Figur 27: Oversikt over felles smeltekurve (a) for 3. hovedforsøk og sammenligning av smeltekurve for målgen og normaliseringsgen. BCL-2 (b), BAX (c), B2M (d) og HPRT1 (e). Smeltekurvene er justert med lik oppløsning for temperatur 60-95°C langs x-aksen og fluorescensnivå  $-R'(T)$  fra -70 opp til 750 langs x-aksen.



### A.3.11 Statistiske verdier

Tabell 19: Gjennomsnittlige  $C_q$ -verdier 24 timer. Tabellen viser en oversikt over de ulike  $C_q$ -verdiene fra alle tre hovedforsøk for prøver kultivert i 24 timer.

IVM			Kontroll			DMSO		
BCL-2	HPRT1	B2M	BCL-2	HPRT1	B2M	BCL-2	HPRT1	B2M
27.79	18.59	17.28	28.04	18.95	17.57	28.06	18.68	17.42

Tabell 20: Gjennomsnittlige  $C_q$ -verdier 72 timer. Tabellen viser en oversikt over de ulike  $C_q$ -verdiene fra alle tre hovedforsøk for prøver kultivert i 72 timer.

IVM			Kontroll			DMSO		
BCL-2	HPRT1	B2M	BCL-2	HPRT1	B2M	BCL-2	HPRT1	B2M
27.95	19.10	17.54	28.79	19.22	17.58	28.44	19.81	17.61

Tabell 21: Gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier for alle grupperinger, mål- og referansegene, ved kultivering i 24 timer.

	<b>BCL-2, HPRT1</b>	<b>BCL-2, B2M</b>
<b>IVM</b>	9.20	10.51
<b>Kontroll</b>	9.09	10.47
<b>DMSO</b>	9.21	10.37

Tabell 22: Gjennomsnittlige  $\Delta C_q$ -verdier for alle grupperinger, mål- og referansegene, ved kultivering i 72 timer.

	<b>BCL-2, HPRT1</b>	<b>BCL-2, B2M</b>
<b>IVM</b>	8.85	10.41
<b>Kontroll</b>	9.57	11.21
<b>DMSO</b>	8.63	10.83

Tabell 23: Verdier fra  $\Delta\Delta C_q$ -metode av de ulike markør- og referansegene i grupperingene eksperimentell- mot kontrollgruppen, og eksperimentell- mot DMSO-gruppen.

	IVM + Kontroll		IVM + DMSO	
	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M
24t	0.11	0.04	-0.01	0.14
72t	-0.72	-0.80	0.22	-0.42

Tabell 24: Verdier fra  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -metoden. Verdiene er utregnet med verdiene fra  $\Delta\Delta C_q$ -metoden. Verdiene viser "foldendringen", det vil si relativ endring i genekspressjon, for eksperimentell gruppe sammenlignet med henholdsvis kontroll- og DMSO-gruppen, av markørgen BCL-2 relativt til henholdsvis HPRT1 og B2M. Første rad viser foldendring ved inkubering i 24 timer, mens andre rad viser foldendringen for inkubering i 72 timer.

	IVM + Kontroll		IVM + DMSO	
	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M
24t	0.93	0.97	1.01	0.91
72t	1.64	1.74	0.86	1.34

Tabell 25: Oversikt over gjennomsnittet ( $\mu$ ), standardavviket ( $\sigma$ ) og CV-verdiene for alle  $\Delta C_q$ -verdier for 24 timers tidsintervall. Verdiene inkluderer sammenligningen mellom målgenet BCL-2 sammenlignet med HPRT1 og B2M i eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen.

	IVM		Kontroll		DMSO	
	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M
$\mu$	9.2	10.51	9.09	10.47	9.21	10.37
$\sigma$	0.49	0.39	0.65	0.45	0.25	0.50
$CV$	5.27	3.67	7.12	4.26	2.71	4.78

Tabell 26: Oversikt over gjennomsnittet ( $\mu$ ), standardavviket ( $\sigma$ ) og CV-verdiene for alle  $\Delta C_q$ -verdier for 72 timers tidsintervall. Verdiene inkluderer sammenligningen mellom målgenet BCL-2 sammenlignet med HPRT1 og B2M i eksperimentell-, kontroll- og DMSO-gruppen.

	IVM		Kontroll		DMSO	
	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M	BCL-2, HPRT1	BCL-2, B2M
$\mu$	8.85	10.41	9.57	11.21	8.63	10.83
$\sigma$	0.39	0.49	0.78	0.58	0.25	0.28
$CV$	4.39	4.69	8.15	5.15	2.95	2.59

