

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Masteroppgave 2014
60 stp

Undersøkelse av migrasjons- inhiberende og apoptose- induserende effekt av *Chlorella sorokiniana* ekstrakt på Krefceller (Hep G2)

Investigation of migration
inhibitory and apoptosis inducing
effects of *Chlorella sorokiniana*
extracts on cancer cells (Hep G2)

Helge Christoffer Høgberg Hansen

Undersøkelse av migrasjons-inhiberende og apoptose-induserende effekt av *Chlorella sorokiniana* ekstrakt på kreftceller (Hep G2)

Forfatter

Helge Christoffer Høgberg Hansen

Hovedveileder

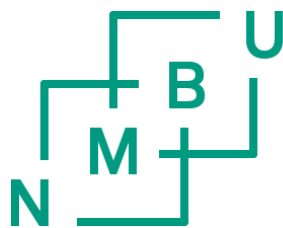
Tor Erling Lea

Tilleggsveiledere

Hanne Skomedal

&

Kari Skjånes



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet



NIBIO

NORSK INSTITUTT FOR
BIOØKONOMI

Forord

Denne oppgaven er gjennomført ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved NMBU, og skrevet som en del av et prosjekt for Norsk institutt for bioøkonomi (NIBIO).

Først av alt vil jeg rette en stor takk til min hovedveileder professor Tor Erling Lea for god veiledning under labarbeid, under skriveprosessen, for konstruktive tilbakemeldinger og støtte gjennom hele oppgaven. Veilederne mine ved NIBIO, Dr. Hanne Skomedal og Dr. Kari Skjånes, fortjener en stor takk for å ha gitt meg muligheten til å skrive denne oppgaven, og for god veiledning og tilbakemeldinger. Charlotte Kleiveland fortjener også en stor takk for all hjelp og gode råd.

Jeg vil også takke for at jeg fikk låne plass på "Celle-labben", og all den hjelpen jeg fikk under arbeidet med masteroppgaven av alle som jobber der. Det har vært gøy og inspirerende å bli kjent med så mange dyktige mennesker. Jeg er veldig takknemlig for tålmodigheten og hjelpsomheten jeg ble møtt med der under de mest hektiske periodene.

Takk til Johanna Sande Mikkelsen for den tiden vi har hatt sammen som labpartnere. Det har virkelig vært gøy å dele arbeidsplass med deg. Jeg vil også takke "lunsjgjengen" for fine samtaler og motivasjon under masterperioden.

Tilslutt vil jeg takke min familie for enorm støtte og motivasjon. Dere har virkelig stilt opp for meg under hele prosessen.

Ås, August 2015

Helge Christoffer Høgberg Hansen

Sammendrag

Kreft er en dødelig gruppe sykdommer som omfatter hele verden, og i 2013 ble det rapportert over 30 000 nye krefttilfeller i Norge. Dersom kreften oppdages før spredning, er det med dagens teknologi gode utsikter for å bli kurert. Men hvis kreften sprer seg, er risikoen for dødsfall sterkt øket. Derfor er det av interesse å finne preventive tiltak, som kan forsinke spredningen, øke suksessraten for behandling og redusere tilbakefall av kreft.

Produksjon av mikroalger startet allerede tidlig på 1900-tallet, og bruk av mikroalger i bioteknologien har lenge vært rettet mot næringsstoffer produsert av algene. I den siste tiden er fokus imidlertid rettet mot bruk av alger i legemidler. Det har blant annet blitt rapportert at ekstrakt fra *Chlorella sorokiniana* inhiberer migrering og inducerer apoptose i kreftceller. I denne masteroppgaven skal det undersøkes om ekstrakt fra *C. sorokiniana* kan redusere viabiliteten, inhibere migrasjon gjennom Matrigel og fibringel, samt inducere apoptose i kreftceller (Hep G2).

I forsøkene ble det brukt to ekstraksjonsmidler, 96% etanol (EtOH) og vann (dH₂O), for å undersøke hvilken ekstraksjonsmetode som påvirket kreftcellene mest.

Algeekstraktene ble navngitt i henhold til ekstraksjonsmiddel som ble brukt, CSEt (etanol) og CSH (dH₂O).

I MTT-viabilitets-forsøkene ble cellelinjene WI-38 (normale lungefibroblaster), WI-38 VA-13 (SV40-transformert) og Hep G2 (hepatocellulært karsinom) behandlet med algeekstraktene. Det ble observert størst nedgang i celleviabilitet i cellelinjene behandlet med CSEt. Det ble også observert en nedgang i celleviabilitet for de samme cellelinjene behandlet med CSH, men effekten av disse ekstraktene var mer moderat enn effekten av CSEt. Ut i fra migrasjonsassayforsøkene så det ikke ut til at algeekstraktene inhiberte migrasjon av Hep G2-cellelinjen verken gjennom fibringel eller Matrigel.

I immunoblotforsøkene skulle det undersøkes om algeekstraktene induserte apoptose i Hep G2-cellelinjen. Det ble ikke identifisert aktivert caspase-3 i noen av forsøkene, og om nedgangen i celleviabilitet som ble observert i MTT-viabilitets-forsøkene var apoptose-relatert, kan ikke bekreftes. Videre arbeid er nødvendig for å kunne identifisere hva som forårsaket celledøden i MTT-viabilitets-forsøkene.

Abstract

Cancer is a group of deadly diseases worldwide, and in 2013 more than 30 000 new cancer cases were reported in Norway. If cancer is detected before dissemination, there are good prospects of being successfully treated with current technology. However, it is the spread of cancer that causes most deaths related to cancer. Therefore it is of interest to find preventive measures, which can slow the dissemination, thus increasing the success rate of treatment and reduce the recurrence of cancer.

Production of microalgae started in the early 1900s, and the use of microalgae in biotechnology has long been focusing on nutrients produced by the algae. Lately, the focus has also been directed to the use of algae in pharmaceuticals. Thus it has been reported that the extract of *Chlorella sorokiniana* inhibits migration and induces apoptosis in cancer cells (Hep G2). In this thesis it was investigated whether the extract from *C. sorokiniana* may reduce cell viability, inhibit migration through Matrigel and fibrin gel, and induce apoptosis in cancer cells. In the experiments, two extractants, ethanol (96%) and water (dH₂O), were used for examining the extraction procedure that affected the cell lines the most. The algae extracts were named according to extraction solvent used, CSEt (ethanol) and CSH (dH₂O)

In the MTT viability experiments the cell lines WI-38 (normal lung fibroblasts), WI-38 VA-13 (SV40-transformed) and Hep G2 (hepatocellular carcinoma) were treated with algae extracts. The greatest decrease in cell viability was observed in cell lines treated with CSEt. It was also observed a decrease in cell viability for the same cell lines treated with CSH. However, the effect of these extracts was more moderate compared to CSEt. Based on migration assay tests there was no indication of algae extracts inhibiting cell invasion in either fibrin gel or Matrigel of the Hep G2 cell line.

In the immunoblot experiments was examined whether algae extracts induced apoptosis in Hep G2 cell line. No activated caspase-3 was identified in the experiments, and if the decrease in cell viability observed in the MTT viability experiments were do to apoptosis can not be confirmed. Further work is needed to identify what caused the cell death observed in MTT viability experiments.

Forkortelser

APAF1	Apoptotisk protease aktiverings faktor 1
APS	ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-trifosfat
Bad	Bcl-2-assosiert døds promotor
Bak	Bcl-2 homolog antagonist/killer
Bax	bcl-2-like protein 4
Bcl2	B-celle lymfom 2
Bid	BH3 interagerende-domene døds-agonist
Bok	Bcl-2 related ovarial "killer"
Caspase	Cystein-dependent aspartic-directed proteaser
CCA	cholangiokarsinom
CSC	Kreftstamceller
CSEt	Ekstrahert <i>Chlorella sorokiniana</i> med 96% etanol som ekstraksjonsmiddel
CSH	Ekstrahert <i>Chlorella sorokiniana</i> med vann som ekstraksjonsmiddel
dATP	Deoksyadenosin trifosfat
dH₂O	Deionisert vann
DISC	døds-induserende signalkompleks
DMSO	dimetyl sulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ECM	Ekstracellulær matriks
EndoG	Endonuklease G
EtOH	Etanol
FADD	Fas-Assosiert protein med Døds Domene
FAK	Fokal adhesjon kinase
FBS	føtalt bovint serum
HCC	Hepatocellulært karsinom
IgG	Immunoglobulin G
Io	Ionomycin
kDa	kilodalton
MMP	metalloproteinaser
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

PMA	forbol 12-myristat 13-acetat
PMA	Phorbol myristate acetate
PP	Polypropylen
FS	fosfatidylserin
PSII	Fotosystem II
PVDF	Polyvinyliden difluorid
ROS	Reaktive oksygen forbindelser
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfat polyakrylamid gel elektroforese
SMAC	mitokondrie-derivert aktivator av caspaser
SV40	Simian virus 40
SV40 Tag	T-antigen Simian virus 40
TAP	Tris-Acetat-fosfat
TBS	Tris buffret saltvann
TBST	Tris buffret saltvann med 0,1% TWEEN
TLR3/4	Toll-like reseptor 3/4
TNF	Tumor nekrose faktor
TrisHCl	Tris hydroklorid

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
Forkortelser	iv
Kapittel 1 - Introduksjon	1
1.1 Kommersielle bruksområder for grønnalger	1
1.1.1 <i>Chlorella sorokiniana</i>	4
1.1.2 Ekstrakt fra <i>Chlorella sorokiniana</i> som potensiell kreftmedisin	4
1.2 Kreft	5
1.2.1 Mekanismer i kreftcelle migrering og dannelse av metastaser	7
1.2.2 Rømming fra tumorvev	8
1.2.3 Molekylære mekanismer i celledødd	9
1.2.4 Kreftceller i blodsirkulasjon	10
1.2.5 Etablering og proliferering av metastaser	11
1.2.6 Fibrinogen i tumormikromiljøet	11
1.2.7 Ekstracellulært matris (ECM) og Matrigel	12
1.3 Homeostase - Balansen mellom mitose og celledød	13
1.4 Apoptose	13
1.4.1 Ekstrinsisk og intrinsisk signalvei for aktivering av apoptose	14
1.4.2 Initiator- og effektor Caspaser	15
1.4.3 Nekrose	16
1.5 Migrasjons assay - kvantitativ <i>in vitro</i> invasjonforsøk av tumorceller gjennom proteingeler	17
1.6 Hepatocellulært karsinom (HCC)	19
1.6.1 SV40-transformerte lungefibroblaster (WI-38 VA-13)	19
1.7 Bakgrunn for oppgaven	22
Kapittel 2 - Materialer	24
2.1 Cellekulturer	24
2.2 Algeekstrahering	26
2.3 MTT-viabilitets assay	27
2.4 Migrasjons assay	27
2.5 SDS-PAGE elektroforese og Immunoblot	30
Kapittel 3 - Metoder	34
3.1 cellekultur	34
3.1.1 Splitting av cellelinjene	34
3.2 Ekstraksjonsprosedyre for <i>Chlorella sorokiniana</i>	35
3.2.1 Høsting av alger	35
3.2.2 Ekstrahering av <i>Chlorella sorokiniana</i> (CSEt/CSH og sCSEt/CSH)	36

3.2.3 Tørking og resuspending av biomassen	37
3.2.4 Bestemmelse biomassekonsentrasjon.....	37
3.3 MTT-viabilitets-assay	38
3.3.1 Prosedyre for MTT-viabilitets assay.....	38
3.4 Migrasjons assay (<i>in vitro</i>).....	39
3.4.1 Preparering av Nuclepore membranfilter (overfilter)	39
3.4.2 Prosedyre for etsning av Nuclepore membranfilter	40
3.4.3 Tildekking med kollagen.....	40
3.4.4 Migrasjons assay med fibringel/matrigel.....	41
3.4.5 Migrasjons-assay - forsøksoppsett.....	41
3.4.6 Farging av celler på Nucelpore-filtret	42
3.4.7 Farging av nitrocellulosefilter	43
3.4.8 telling av celler på filtre.....	44
3.4.6 Kvantitativ analyse av migrerende celler	44
3.4.7 Estimering av adherente celler på filtre.....	45
3.5 Immunoblotting	45
3.5.1 Prosedyre for preparering av lysater	46
3.5.2 Prosedyre for SDS-PAGE	46
3.5.3 Blot	47
3.5.5 Immunodeteksjon.....	47
3.6 Statistikk.....	49
Kapittel 4: Resultater.....	50
4.1 Ekstrahering av <i>Chlorella sorokiniana</i>	50
4.2 MTT-viabilitets assay	52
4.2.1 DMSO kontroll	53
4.2.3 MTT-viabilitets-assay i med CSEt stimulerte celler (WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2).....	55
4.2.4 MTT-viabilitets-assay i med CSH stimulerte celler (WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2).....	56
4.2.5 MTT-viabilitet-assay med sCSEt og sCSH	57
4.3 Migrasjons assay	58
4.3.1 Celleadhesjon til kollagendekket membranfilter og membran filter uten kollagen	59
4.3.2 Migrasjons assay med fibringel	60
4.3.4 Migrasjons assay med Matrigel.....	62
4.4 Deteksjon av caspase-3 med immunoblotting	66
4.4.1 Immunoblot deteksjon av caspase-3 i celler stimulert med CSEt-ekstrakt.....	67
4.4.2 Immunoblot deteksjon av caspase-3 i celler stimulert med CSH-ekstrakt.....	68
4.6 Morfologiske endringer på Hep G2 etter stimulering med CSE/CSH	69
Kapittel 5 – Diskusjon	72
Kapittel 6 - Konklusjon	81
Kapittel 7 - Videre arbeid	82
Litteratur	83

Vedlegg A - P-verdier for DMSO-kontroll	89
Vedlegg B - P-verdier for migrasjons assay Fibringel	93
Vedlegg C - P-verdier for migrasjons assay med Matrigel	96

Kapittel 1 – Introduksjon

Kreft er en av de hyppigste dødsårsakene i verden. Ut ifra en studie utført av "Institutt for populasjonsbasert kreftforskning", ble det i år 2013 rapportert 30 401 nye krefttilfeller (Sæther et al. 2015). Dødeligheten relatert til kreft har imidlertid blitt redusert de siste årene dette som et resultat av bedre forståelse av biologien rundt kreft, og derav ført til forbedret diagnostikk og behandling. I dag behandles ofte kreft med kjemoterapi, kirurgiske inngrep eller strålebehandling, noe som også påfører skade på normale celler. Derfor forskes det til stadighet på behandlinger som aktivt, eller passivt, kan "angripe" kreftceller spesifikt (Peer et al. 2007).

Spredning av kreft fra opphavsstedet til et fjerntliggende organ kalles metastase (dattersvulst). De fleste dødstilfellene tilknyttet kreft er forårsaket av metastaser, og er grunnet i fysiologiske skader forårsaket av svulstvekst på eller inne i organene kreften har spredd seg til. Det å kunne forutse om en pasient er mottagelig for tilbakefall av kreften, har sine begrensninger. På grunn av dette benyttes adjuvant terapi ved tidlige stadier i sykdomsforløpet på pasienter som betraktes å være i faresonen for tilbakeslag av kreft. Dette er kun til nytte for et fåtall av dem som får denne tilleggsbehandlingen, og forårsaker overbehandling av mange pasienter. I en møterapport av Ann F. Chambers og Zena Werb, stilles spørsmålet; er det mulig å forsinke forekomsten av metastaser etter en primærbehandling, enten gjennom informasjon i primærsvulsten, gjennom livsstil eller anti-metastaserende preventive tiltak (Chambers & Werb 2015).

1.1 Kommersielle bruksområder for grønnalger

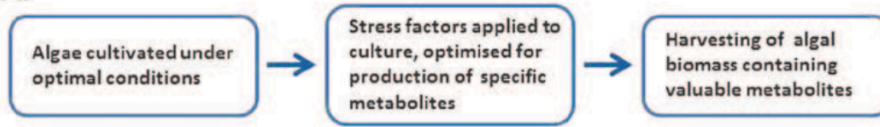
Produksjon av alger ble introdusert allerede tidlig på 1900-tallet da Warburg dyrket *Chlorella Spp.* for studier på fotosyntese. Masseproduksjon av grønnalgen *Chlorella* startet tidlig på 1960-tallet, og i 1977 fantes det 30 fabrikker med produksjon av *Chlorella* i Taiwan (Skjånes et al. 2013; Spolaore et al. 2006). En mikroalge er definert som encellede, eller kolonidannende, alger som danner små kolonier og som ikke kan observeres uten mikroskop (Skjånes et al. 2013). Disse organismene kan drive fotosyntese med høyere effektivitet enn høyerestående planter (Illman et al. 2000). Hovedfokuset på bruk av mikroalger i bioteknologien har lenge vært rettet mot

næringsstoffer produsert av algene (Apt & Behrens 1999). Hvor blant annet biomasse eller ekstrakt fra *Dunaliella*, og tørket biomasse fra *Chlorella* har dominert markedet (Lee 1997; Yamaguchi 1996). I dag produseres alger til en rekke formål, blant annet til helsekost, dyrefôr og akvakultur. Ekstrakt fra alger kan brukes både kosmetikk samt til forskjellige farmasøytiske produkter (Apt & Behrens 1999; Skjånes et al. 2013; Yamaguchi 1996). Systematisk kartlegging av biologisk aktive komponenter i alger, spesielt med fokus på antibiotika, startet på 1950-tallet. Mange legemidler og antibiotikatyper har sitt opphav fra naturen, og hvor mange naturlige produkter har bidratt til utvikling av lignende syntetiske produkter (Borowitzka 1995).

Grønnalger produserer forskjellige sekundærmetabolitter som en respons på når de utsettes for ulike former for stress. Stressfaktorer kan blant annet innebære: begrenset tilgang på næring, temperatur, pH og høy lysintensitet. Sekundærmetabolittene som produseres under slike forhold kan øke overlevelsen eller opprettholde celleveksten, i andre tilfeller er funksjonene til metabolittene ukjent (Skjånes et al. 2013). Disse Sekundærmetabolittene kan ekstraheres fra algebiomassen, og brukes til blant annet tilskudd av vitaminer, antioksidanter, og som legemidler. Sekundærmetabolittene kan også bli observert hos alger under optimale vekstvilkår. Kunnskap om optimalisering av ekstraksjon og vekstvilkår av algene er begrenset (Skjånes et al. 2013).

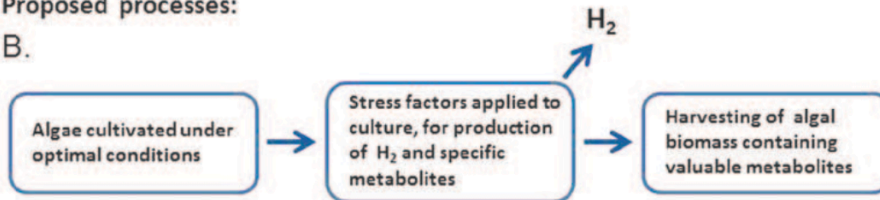
Current commercial processes:

A.

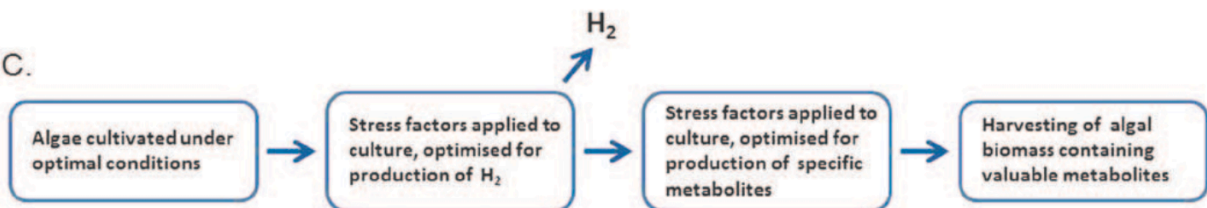


Proposed processes:

B.



C.



Figur 1.1.1. Viser (A) hvordan kommersiellproduksjon av metabolitter fra alger forgår i dag. Sammenlignet med en foreslått prosess hvor hydrogenproduksjon og metabolittproduksjon kobles (B), eller at algene induseres til hydrogenproduksjon med stressfaktorer, deretter appliseres stressfaktorer som stimulerer til produksjon av metabolitter, og biomassen høstes (C). Figuren er hentet fra artikkelen "Potensial for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process" (Skjånes et al. 2013)

Det er mange algearter som kan produsere hydrogen, deriblant: *Chlamydomonas reinhardtii* og *Chlorella sorokiniana* (Skjånes et al. 2013). Ved å redusere svoveltilgangen til *C. reinhardtii* i kultur, vil mikroalgen produsere hydrogen (H₂). Lite tilgang på svovel vil forårsake delvis inaktivering av fotosystem II (PSII) i kloroplastene, og dermed forårsake anaerobe forhold. Som en respons på svovelbegrensinger stopper Calvin syklusen, som under normale forhold er ansvarlig for oppbyggingen av biomasse. (Antal et al. 2003; Zhang et al. 2002; Zhang & Melis 2002). Ved slike forhold er algecellen avhengig av å frigjøre elektroner fra systemet for å unngå oksidativ skade. For å frigjøre den overflødig energien, produserer algecellene hydrogenase, som katalyserer produksjon av hydrogen, ved å motta et elektron fra ferronoxin (Long et al. 2008).

1.1.1 *Chlorella sorokiniana*

Grønnalger tilhørende slekten *chlorella*, underordenen Chlorococcales (familien Chlorellaceae), er mikroalger som er enkle å kultivere og brukes ofte i fysiologiske studier. (Beyerinck 1900; Hoek et al. 1995; Wu et al. 2001). Disse algene reproducerer seg aseksuelt, ved å produsere ikke-motile autosporer, og kan leve i ferskvann, sjøvann, luft og jord. *Chlorella sorokiniana* er en grønnalge som lever i ferskvann, og er den eneste arten av *chlorella* som har blitt observert til å tolerere temperaturer opp mot 42°C (Wu et al. 2001). På grunn av høyt innhold av blant annet, proteiner, mineraler og vitaminer spiller *Chlorella sorokiniana* en viktig rolle i produksjon av mat og fôr (Kumar & Das 2012). Under vekstbetingelser som redusert tilgang på svovel, vil *C. sorokiniana* kunne produsere hydrogengass (Chader et al. 2009; Kumar & Das 2012). Disse algene har også blant annet blitt brukt til kommersiell produksjon av antioksidanter som: Lutein, α - og β -carotene, α - og β -tocopherol og zeaxanthin (Matsukawa et al. 2000). *Chlorella* inneholder også forskjellige pigmenter, som for eksempel klorofyll og karotenoider, med bioaktive egenskaper (Cha et al. 2010). De biologiske aktivitetene til pigmentene har blitt tilskrevet egenskaper som blant annet anti-tumor aktivitet (Chung et al. 2012)

1.1.2 Ekstrakt fra *Chlorella sorokiniana* som potensiell kreftmedisin

Fra tidligere studier har det blitt rapportert at biologisk aktive polysakkarider fra *Chlorella pyrenoidosa* har anti-tumor egenskaper og immunoregulatorisk aktivitet (Sheng et al. 2007; Yang et al. 2006). Jing-Gung Chung et al., undersøkte effekten på apoptoseinduksjon og inhibering av migrering til en hepatocellulært karsinom cellelinje fra menneske (Hep G2), behandlet med ekstrakt fra *C. sorokiniana*. Det var tidligere rapportert at etanol var egnet som ekstraksjonsmiddel for å ekstrahere biologisk aktive komponenter i *Chlorella*, grunnet høyt utbytte av biologisk aktive molekyler. *Chlorella sorokiniana* ekstrahert med 80% etanol viste høyere inhiberende effekt på veksten av Hep G2 cellelinjene sammenlignet med 50% etanol og H₂O. Derfor valgte Jing-Gung Chung et al. etanolekstrahert (80%) *C. sorokiniana* videre i arbeidet med Hep G2 cellelinjen. I eksperimentene ble det blant annet observert en reduksjon i membranpotensialet ($\Delta\psi_m$) i Hep G2 cellene etterfulgt av frigjøring cytokrom c, samt en

økning i både reaktive oksygen forbindelser (ROS) og Ca^{2+} . Det ble også rapportert at ekstraktet økte nivået med caspase-3, -8 og -9 i Hep G2 cellene, og konkluderte med at ekstraktet induiserte celledød samt inhiberte Matrigel invaderende migrasjon på Hep G2 (Chung et al. 2012). Det har også blitt rapportert vekstinhivering av Hep G2 celler med bruk av H_2O -ekstrahert *C. sorokinana* (Wu et al. 2005). De molekylære mekanismene bak effekter fra H_2O -ekstrakter er imidlertid ikke kartlagt per i dag (Chung et al. 2012).

1.2 Kreft

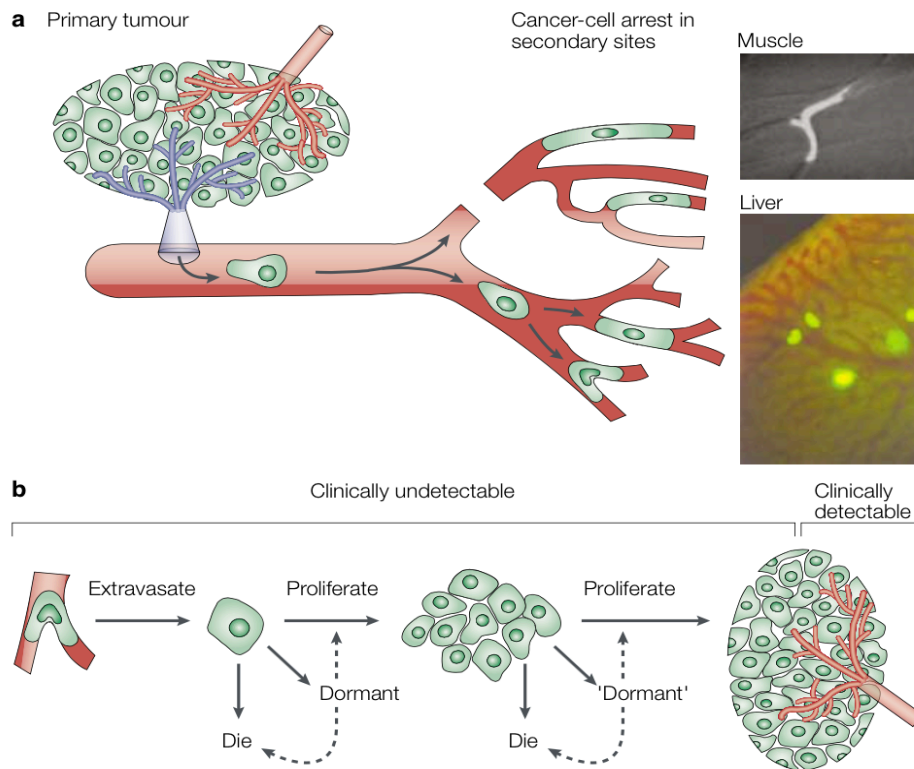
Med mer enn 10^{14} celler i menneskekroppen vil flere celler gjennomgå mutasjoner i løpet av en dag. Slike mutasjoner kan dreie seg om endringer i DNA-sekvensen i cellene, eller endringer i genuttrykket uten forandringer i selve gensekvensen (epigenetisk endring). Dersom mutasjonen gir cellen en selektiv fordel, egenskaper som for eksempel å vokse og dele seg raskere samt bedre overlevelsesdyktighet enn sine naboceller, vil dette potensielt kunne være opphavet til en voksende mutantklon. Slike individuelle mutantkloner kan dele seg og vokse slik at det går utover nærliggende celler, og til slutt ødelegge hele organismen. Dette er hovedprinsippene for utvikling av kreft.

Kreftceller defineres etter to egenskaper: (1) De kan migrere til og etablere seg i områder på kroppen som normalt er reservert for andre celletyper, og (2) de unngår restriksjonene for celle –vekst og –deling som normale celler har. Den ukontrollerte celleveksten og proliferasjonen i kreftceller vil kunne gi opphav til en svulst, også kalt neoplasme. Dersom neoplastiske celler holder seg til opphavsstedet, det vil si ingen migrasjon, vil fjerning eller ødeleggelse av svulsten lokalt være nok for å bli kvitt svulsten, og det heter at svulsten er *benign*. Ut i fra definisjonen kan en svulst kun kalles kreft dersom svulstcellene er *maligne*, det vil si at cellene i svulsten har egenskapen til å løsrive seg fra svulstvevet, gå inn i blodbanen eller lymfeårer for å deretter danne sekundærsvulster.

Genetiske og epigenetiske endringer i celler er begge viktige komponenter i utviklingen av kreft. Felles for kreftfremkallende stoffer er at de forårsaker genetiske endringer (*mutagenese*). Derimot er ikke én enkel mutasjon nok til å forårsake dannelsen av kreftceller (*carcinogenese*). På grunn av begrensninger i DNA –replikasjon og –

reparering ville cellene kunne gjennomgå mutering uten tilstedeværelse av mutagener (som for eksempel kjemiske carcinogener eller UV- og røntgen -stråling). Det er mye bevis som peker i retning av at kreft oppstår som en konsekvens av mange, uavhengige og sjeldne genetiske hendelser på én celle (Alberts et al. 2008).

For at kreft skal kunne spre seg må kreftcellene først vandre i nærliggende ekstra cellulært matriks (ECM), samt stromale cellelag, for å deretter gå inn i blodsirkulasjonen. Deretter må kreftcellene overleve mikromiljøet i det nye organet for å kunne danne mikrometastaser. For dannelse av makrometastaser eller neoplasi må kreftcellene kunne feste seg til et organ, et annet enn der hvor primærsvulsten befinner seg, for å videre migrere til parenkymet til det nye vevet. Det siste steget dreier som å reetablere prolifereringen (Valastyan & Weinberg 2011). Uten blodårer kan ikke svulsten bli noe særlig større enn 1-2mm, og høyt vaskulariserte svulster viser høyere evne til å produsere metastaser sammenlignet med svulster med mindre tilgang på blod (Harlozinska 2005).



Figur 1.2.1. Viser i (a) en kreftcelle som løsriver seg fra en primærsvulst, for å deretter vandre til blod sirkulasjonen i nærliggende blodåre. Kreftcellen blir fanget i blodbanen til det nye organet (for eksempel lever og muskel som vist på bilde) grunnet størrelsen i kapillærene. I (b) vises de mulige utfallene for en kreftcelle på en sekundærlokasjon. Kreftcellen kan være på sekundærlokasjonen som en enkelt celle, liten metastase (ingen angiogenese), eller en større metastase med blodårer. Kun et fåtall av kreftcellene vil proliferere, de andre cellene vil enten gå i en dvaletilstand eller begå celledød. Figuren er hentet fra artikkelen "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites". (Chambers et al. 2002)

1.2.1 Mekanismer i kreftcelle migrering og dannelsen av metastaser

Det er metastaser, og ikke primærtumorer, som forårsaker flest dødsfall tilknyttet kreft (Wells et al. 2013). Det er kun et fåtall av vaskulære metastaser som kan detekteres med dagens teknologi, og når det gjelder enkelt celler eller mikrometastaser er de generelt problematisk å detektere (Chambers et al. 2002). Forståelsen av de molekylære kontrollpunktene for migrering av kreftceller er derfor et godt grunnlag for å begrense initiering eller spredning av kreft (Wells et al. 2013).

1.2.2 Rømming fra tumorvev

Både homotypisk og heterotypisk celle-celle adhesjon er begge viktige faktorer i utvikling av metastaser. Hvor homotypiske celle-celle adhesjon omhandler interaksjoner mellom celler av samme type, dreier heterotypisk celle-celle adhesjon seg om interaksjoner mellom kreftcelle og ekstracellulær matriks (ECM) eller andre celletyper. Løsrivelse av en enkel, eller et aggregat av, tumorceller fra en svulst krever at homotypiske celle-celle adhesjon opphøres (Harlozinska 2005). Godt differensierte kreftceller opprettholder epitelvevsstrukturen og viser godt utviklet intercellulære koblinger. Dårligere differensierte kreftceller derimot har færre celle-celle koblinger og viser høyere grad av migrering sammenlignet med mer differensierte krefttyper (Frixen et al. 1991).

Kreftceller kan bevege seg ved hjelp av to forskjellige stimuli: Løselige vekstfaktorer og den basale motiliteten fra adhesjons-reseptorene til cellene, hvor førstnevnte er en stor bidragsyter i spredning av kreft. Tumorceller produserer både autokrine og parakrine signaler, som igjen generer resiprokt parakrine signalnettverk som aktiverer motilitet i cellene (Wells et al. 2013). Autokrine signaler betyr signaler som cellen selv produserer og skiller ut, og som virker tilbake på cellen som produserte signalet. Parakrine signaler er celle-celle kommunikasjon via utskilte signalmolekyler som virker på celler i nærområdet (Alberts et al. 2008). Etter at en celle har løsrevet seg fra primærsvulsten vil polymerisering av aktin i cellen gi dem en mesenkymal morfologi, noe som gir dem muligheten til å migrere. Den høye tettheten i ECM gjør det vanskelig for migrerende kreftceller å invadere matriksen. Dette problemet overkommes ved økt utskillelse av proteolytiske enzymer som produseres både av den migrerende cellen og stromaleceller. Blant disse proteasene er: matriks metalloproteinaser (MMP) og serin proteinaser, hvor MMPer omfatter 27 enzymer med sentrale multifunksjonelle roller i degraderingen av ECM. Det kan også tyde på at sekresjon av proteolytiske faktorer forårsakes av inflammatoriske prosesser. Infiltrering av T lymfocytter, mastceller, neutrofile granulocytter samt makrofager forårsaker lokale endringer i både homeostase og strukturen i vev, og dermed promoterer dannelse av svulster. Proteasene bidrar blant annet med å løsne på den høye tettheten i ECM og endre matriks komposisjonen, slik at den migrerende cellen får plass gjennom matriksen (Wells et al. 2013). Med kunnskap om proteasenes rolle i migrasjon av kreftceller, vil legemidler

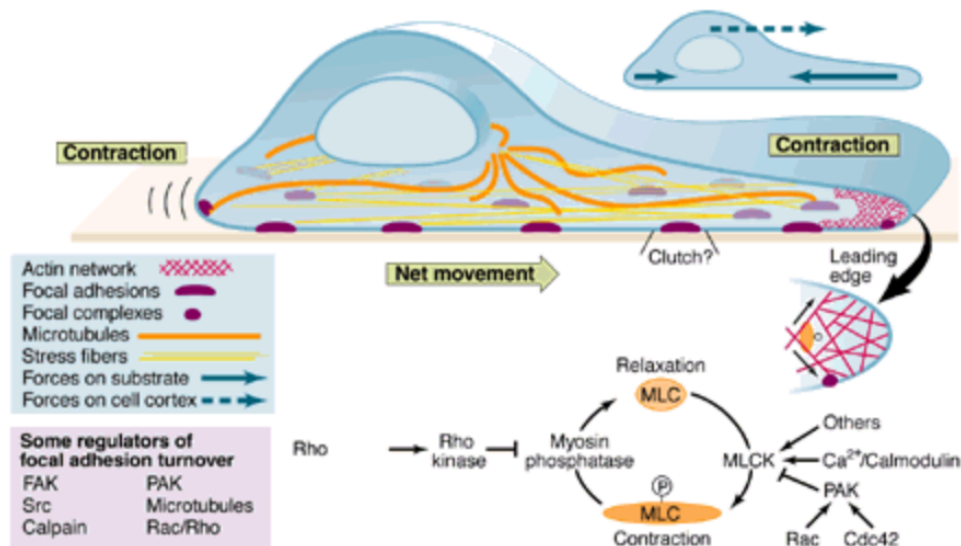
som inhiberer aktiviteten til disse protease enzymene være en mulig vei å gå i kreftbehandling (Harlozinska 2005).

1.2.3 Molekylære mekanismer i celle migrering

For at en celle skal kunne migrere må cellen endre morfologi slik at den kan interagere med nærliggende vevsstrukturer. ECM virker som et substrat samt en barriere for den migrerende cellen. Migrering gjennomført av svulst celler er ikke ulik migreringen som observeres i vanlige ikke-neoplastiske celleprosesser, som for eksempel legning av sår og cellulærvandring av immunceller. I front, i retningen til den migrerende cellen, dannes det pseudopodier som fester seg til ECM. Pseudopodier er fingerlignende utposninger av cellemembranen, og dersom disse utposingene proteolyserer ECM-komponenter kalles de invadopodium. Etter pseudopodiene har festet seg til ECM, dannes det en fysisk spenning i cellen som drar hele cellen i retning av utstrekningen (pseudopodiet) (Friedl & Wolf 2003).

Dannelse av pseudopodier er drevet av aktinpolymerisering. Den voksende forlengelsen av cellemembranen kommer deretter i kontakt med ECM og cellens adhesjonsmolekyler. Av disse adhesjonsmolekylene er det særlig transmembran reseptorer i integrin-familien som er mest fremtredende (Hynes 2002). Integrinmolekyler kobles, via adaptormolekyler, med actincytoskjelettet inne i cellen og danner fokale komplekser. Fokale komplekser er forbigående interaksjoner mellom cellen og ECM som innebærer, blant annet adhesjonsmolekylene integrin. Disse interaksjonene kan vedvare i sekunder til minutter og deretter utvikler de seg til fokale kontakter. Fokale kontakter vedvarer i minst ett minutt eller lengre, og innebærer interaksjoner mellom integrin, FAK, talin, vinculin, paxillin samt mange andre proteiner som kobles til aktinfilament nettverket inne i cellen (Friedl & Wolf 2003). Fokal kontakt kan reguleres av komponentene i ECM, deriblant: $\alpha 5 \beta 1$ integrin som binder laminin (Cukierman et al. 2001; Leavesley et al. 1992; Maaser et al. 1999). Celle migreringen kan foregå ved at celle-substrat koblingen bak cellen løsner, samtidig som cellen stadig strekker seg lengre fremover (Ballestrem et al. 2001; Palecek et al. 1997). Dette forårsaker at cellen glir i retning av cellens pseudopodie. Størrelsen og antall fokale kontakter, som en celle har, varierer fra celletype til celletype. Dette gjelder også mellom samme type celler, som en respons på

miljøbetingelser (Friedl & Wolf 2003). Hastigheten på migreringen bestemmes av raten i celle-substrat-koblingen og hastigheten disse koblingene løsner med (Lauffenburger & Horwitz 1996).



Figur 2.2.2. Viser en migrerende celle med blant annet fokale kontakter og komplekser. Fokale komplekser dannes foran og bak cellen (på figur). Striplett pil indikerer bevegelsesretningen til cellen, mens heltrukket pil representerer retningen på spenningen som dannes i cellen. Figuren er hentet fra artikkelen "cell migration - movin'on" (Horwitz & Parsons 1999).

1.2.4 Kreftceller i blodsirkulasjon

Ettersom en neoplasi vokser trenger den tilgang på blod. For å dekke dette behovet dannes det nye blodårer i primærsvulsten i en prosess kalt angiogenese. I tillegg til å dekke det metabolskebehovet til cellene fungerer de nye blodårene som en rømningsvei for kreftcellene til kroppens blodsirkulasjonssystem (hematogen spredning).

Svulstcellene kan også komme inn i blodsirkulasjonssystemet indirekte, ved å først vandre via lymfesystemet (lymfogen spredning) (Chambers et al. 2002). Blodårene som dannes i en svulst er forskjellig fra blodårer i vanlig vev, ved at de er mer permeable (Carmeliet & Jain 2011; Valastyan & Weinberg 2011). Dette, sammen med fravær av pericytter som dekker blodårene i neoplasien, kan være med å gi grunnlaget til intravasjon (Valastyan & Weinberg 2011). Det er estimert at oppholdstiden til

brystkreftceller i sirkulasjon er flere timer (Meng et al. 2004; Valastyan & Weinberg 2011). Derimot, med tanke på cellestørrelsen til mange kreftceller (20-10 μm) og diameteren til lumina i kapillærene (ca. 8 μm) vil mange kreftceller bli fanget i disse kapillærene innen noen minutter etter de har kommet inn i blodsirkulasjonen. Det er mulig at kreftcellene unngår anoikis, en form for apoptose, på grunn av den korte tiden de tilbringer i sirkulasjonen (Valastyan & Weinberg 2011).

1.2.5 Etablering og prolifering av metastaser

Det er mye som tyder på at spesifikke molekylære markører (f.eks. cytokiner) tilhørende bestemte organer, styrer hvorvidt én kreftcelle kan etablere seg og proliferere eller ikke. Det nye miljøet kreftcellene skal etableres i, påvirker blant annet cellenes vekstmuligheter og genuttrykk. Det kan tyde på at cytokiner spiller en viktig rolle når det gjelder organspesifikk metastasering. Ekspresjon av cytokinreseptorer på overflaten til kreftceller, passer med cytokiner som uttrykkes på organer hvor disse krefttypene ofte observeres til å metastasere (Chambers et al. 2002). Det samme gjelder for at kjemokiner har en rolle i metastasering av kreftceller. Aktinpolymerisering, migrering samt dannelse av pseudopodier er alle cellulære funksjoner som kan initieres av kjemokinreseptor-interaksjon. På en sekundærlokasjon kan kreftceller eksistere i tre forskjellige tilstander: (1) Som en enkelt celler som ikke deler seg, eller (2) som en aktiv ikke-vaskulær mikrometastase hvor proliferasjon og apoptose nuller hverandre ut, slik at metastasen ikke øker i masse, eller (3) vaskulære metastaser (Chambers et al. 2002).

1.2.6 Fibrinogen i tumormikromiljøet

Fibrinogen er et stavformet glykoprotein som polymeriserer under katalytisk aktivitet fra trombin, og danner fibrin (Ferry 1952). I tillegg til å være en akutfase-reaktant, som produseres under inflammasjon, er krysskoblet fibrin antatt å være viktig for tumorstroma-dannelse. De fleste svulstene observert i mennesker inneholder betydelige mengder fibrinogenrelaterte produkter, hvor kryssbundet fibrinogen (fibrin) utgjør mesteparten. Fibrin spiller en viktig rolle i kreftpatologi samt er en determinant for metastatisk potensial (Palumbo et al. 2000). Med mekanismer som er analoge til reparasjon av sår, promoterer fibrin nydannelse av blodårer og tilrettelegger for

dannelse av svulst stroma (Dvorak et al. 1979; Dvorak 1986; Dvorak et al. 1987). Det har også blitt foreslått at fibrin-tumor celleaggregater kan bidra til endotel adhesjon samt metastatisk potensial (Cavanaugh et al. 1988; Chew & Wallace 1976; Crissman et al. 1988). Fibrinogen øker også adhesjon og viabilitet i tumorembolismer i blodårer på målorganet (Palumbo et al. 2000). Når det gjelder cellevekst i etablerte metastaser derimot, synes fibrin ikke å spille noen viktig rolle (Palumbo et al. 2000).

1.2.7 Ekstracellulært matriks (ECM) og Matrigel

Ekstracellulært matriks består av utskilte molekyler som bidrar med strukturell- og biokjemisk- støtte til cellene i området. Makromolekylene som ekstracellulær matriks består av, produseres hovedsakelig lokalt av cellene i matriks (Alberts et al. 2008).

Tidlige biokjemiske studier på ekstracellulær matriks (EMC) baserte seg på store, strukturelle ECM som brusk og bein. Imidlertid åpnet tilgangen på Engelbreth-Holm-Swarm sakroma, (Matrigel) mulighetene til å studere et helt annet sett med ECM proteiner som det ikke var tilgjengelig på tidligere (Hynes & Naba 2012). Blant disse proteinene er: Laminin, kollagen type IV, heparan sulfat proteoglykan og entactin (Sigma-Aldrich 2015). Matrigelens tumorpromoterende egenskaper kan forklares med gelens evne til å indusere angiogenese samt gelens apoptosehemmende egenskaper. Anoikis, en type apoptose, forekommer når cellene mister kontakt med ECM og er antageligvis forårsaket av minkende signal fra integrin reseptorene (Kleinman & Martin 2005). Kollagen type IV og laminin-1 binder seg til spesifikke integrin reseptorer som rekrutterer FAK kinase, aktiverer RAS-veien, og initierer transkripsjon av anti-apoptotiske gener (Kleinman & Martin 2005).

Mange cellelinjer differensieres i Matrigelen, hvor morfologi samt genuttrykket til cellene reflekterer en mer differensiert fenotype. Cellene i gelen danner ofte et tredimensjonalt nettverk som ligner på nettverket cellelinjen danner i sitt originale habitat (Kleinman & Martin 2005). F.eks: Endotelceller fester seg og sidestilles etter en time og danner kapillær-lignende strukturer over natten i Matrigel (Kubota et al. 1988).

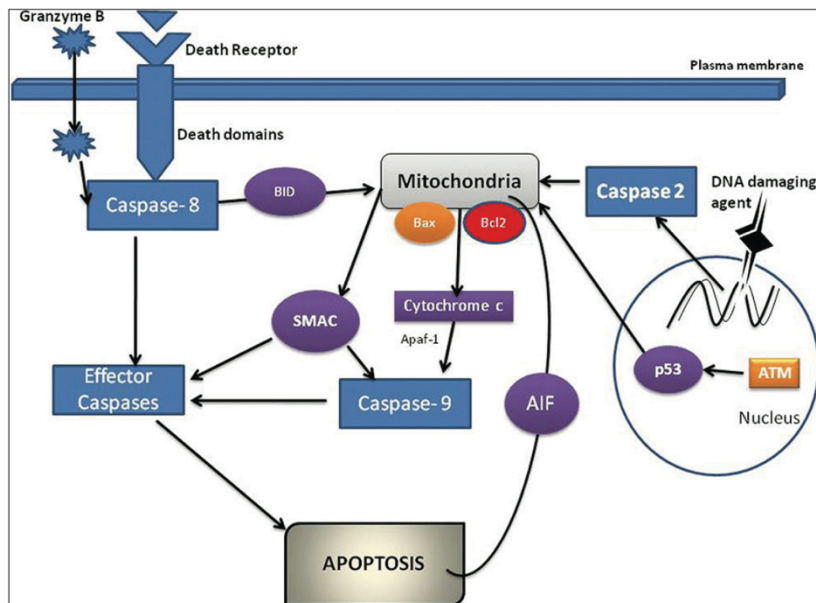
1.3 Homeostase – Balansen mellom mitose og celledød

I flercellede organismer er balansen mellom celledød og celledeling helt essensiell for opprettholdelse og utviklingen av organismen. Ubalansen mellom disse hendelsene kan gi alvorlige patologiske konsekvenser, som f.eks; nevrodegenerative sykdommer, forstyrrelser under utvikling av embryo samt utvikling og dannelse av kreft (Ghatage et al.). Apoptose er en form for programmert celledød, som er viktig for opprettholdelse av denne balansen, og karakteriseres ved at cellen fragmenterer til apoptotiske legemer, som igjen blir fjernet av nærliggende makrofager. Det er imidlertid flere måter å indukere apoptose, deriblant: Irreversibel DNA skade, seponering av vekstfaktorer, frie radikaler, virusinfeksjoner og bakterielle toksiner, samt strålebehandling og kjemoterapi. Nekrose er en annen velstudert form for celledød (McIlwain et al. 2013). I motsetning til apoptose som kan ta flere timer eller dager for å utvikle seg, er celledød forårsaket av nekrose relativt hurtig og er sjeldent fordelaktig for organismen. Vevsnekrose er en konsekvens av akutte forandringer i cellenes metabolisme, og fører til: Svelling av cellene og mitokondriene, tap av adenosintrifosfat (ATP), svekkelse i plasmamembranen, ubalanse i ion distribusjonen, aktivering av degenererende enzymer, samt lysering av celler (Lemasters et al. 1998).

1.4 Apoptose

Som tidligere nevnt, er apoptose en form for programmert celledød (McIlwain et al. 2013). Apoptose settes i gang når cellen mottar spesifikke signaler, som fører til distinktive forandringer i cellen. Cystein-dependent aspartic-directed proteaser (caspase), en gruppe med endoproteaser, aktiveres vanligvis i tidlige stadier i apoptosen. Etter aktivering bryter disse enzymene ned komponenter som er viktige for opprettholdelse av normale cellefunksjoner, deriblant DNA-reparasjonsenzymer i cellekjernen og strukturelle proteiner i cytoskjelettet. Innskrumping av cellen er en følge av kløyving av aktin og laminin filamenter i cytoskjelettet. Caspasene aktiverer også andre enzymer, for eksempel DNase, som kløyver DNA i cellekjernen. Nedbryting av kromatin fører til kondensering av cellekjernen, som gir en "hestesko"-formet

cellekjerne (Ghatage et al. 2012). Det er flere mulige aktiveringveier for apoptose i en celle.



Figur 1.4.1. oppsummering av de grunnleggende mekanismene i indusering av apoptose. Figuren er hentet fra artikkelen "Apoptosis: Molecular mechanism" (Ghatage et al. 2012).

1.4.1 Ekstrinsisk og intrinsisk signalvei for aktivering av apoptose

I pattedyr kan apoptose induseres på to måter; via den ekstrinsiske- og intrinsiske signalveien. Den intrinsiske aktiveringsveien, også kalt mitokondrie-mediert apoptose, omhandler signaler som kommer inne i fra cellen (Ghatage et al. 2012 ; Riedl & Shi 2004). Stråling, virus infeksjoner og DNA-skader er eksempler på faktorer som fører til intrinsisk-mediert apoptose, hvor proteiner i Bcl2 familien spiller en nøkkelrolle. Alle proteinene i Bcl2 proteinfamilien har fire konserverte domener, kalt Bcl2 homologi domene (BH-domene). Det finnes både pro-apoptopiske og anti-apoptopiske Bcl2-proteiner, hvor pro-apoptopiske Bcl2-proteiner videre kan deles inn i Bax familien (Bax, Bok og Bak) og BH-3 ("BH-3 only proteins") proteinene (Bid, Bad og Bim). Ved apoptotisk stimulans gjennomgår disse pro-apoptopiske proteinene konformasjonsendringer og blir aktive. Hovedoppgaven til proteiner i Bcl2 familien er å frigi apoptotiske signalfaktorer fra mitokondriene ved å øke membran-permeabiliteten. Dette blir enten gjort ved oligomerisering av pro-apoptopiske Bcl2-proteiner i

yttermembranen (mitokondriene), interaksjoner med membranporene eller tap av membranpotensialet i mitokondriene (Ghatage et al. 2012).

Den ekstrinsiske signalveien for apoptose kan aktivere caspase kaskaden i løpet av sekunder, og er mediert av døds-reseptorer (homotrimerer tilhørende Tumor nekrose faktor (TNF)-reseptor familien) (Alberts et al. 2008 ; Ghatage et al. 2012). Disse reseptorene er transmembran proteiner med et ekstracellulært ligand-bindende domene, og et intracellulært døds-domene. Binding av Fas ligand fra en cytotoxisk lymfocyt til Fas på overflaten av en målcelle er et eksempel på hvordan døds-reseptorene fungerer. Etter binding av Fas-ligand til Fas døds-reseptoren rekrutteres adapterproteiner til den cytosoliske halen til reseptoren. Dette vil videre rekruttere initiator procaspasene caspase-8 eller caspase-10 (eller begge). Procaspasene (ikke aktivert caspase) sammen med fas døds-reseptoren og adapterproteinene kalles DISC ("death-inducing signaling complex"). Initiator procaspasene aktiveres på DISC og aktiverer videre nedstrøms effektor caspaser som induserer apoptose (Alberts et al. 2008).

1.4.2 Initiator- og effektor Caspaser

Caspaser er viktige regulatorer av homeostase. Av de 12 caspasene som er identifisert i mennesker, er det syv av dem som overfører signaler i apoptoseprosessen. Alle caspaser blir uttrykt som procaspaser (zymogener), med strukturelle fellestrekk: Et prodomene på N-terminalen av proteinet (varierende lengde mellom caspasene) samt et katalytiskdomene bestående av en liten og stor subenhet (henholdsvis 17-20 kDa og 10 kDa). En aktivert caspase hydrolyserer peptidbindinger etter aspartat etterfulgt av små aminosyrer, eller aminosyrer uten ladning (serin, glycin eller alanin) (Würstle et al. 2012). Caspasene har blitt klassifisert etter rollene de har i både apoptose (caspase-3, -6, -7, -8 og -9) og inflammasjon (caspase-1, -4, -5, og -12). De apoptose-relaterte caspasene blir videre delt i subklasser (initiator- og effektor caspaser) etter mekanismene og funksjonen de har i gjennomføringen av apoptose (McIlwain et al. 2013). Initiator caspasene inkluderer caspase-8 og -9, mens caspase-3, -6 og -7 inngår som effektor caspaser. For å aktivere caspasen må den dimerisere eller i andre tilfeller kløyves. Initiator caspasene aktiveres ved dimerisering (McIlwain et al. 2013). Aktivering av en initiator caspase vil føre til videre caspase-dimerisering og aktivering. Dimeriseringen vil også føre til autokatalytisk kløyving av caspase monomerer til en

liten og stor subenhet . I likhet med initiator caspaser, befinner effektor caspaser seg som zymogener (inaktive precursor enzymer) før initiering av apoptose. Effektor caspasene aktiveres ved protolytisk kløyving av zymogenet til en katalytisk aktiv heterodimer (Bai & Cederbaum 2000). Aktivering av effektor caspasen finner sted når en aktivert initiator caspase dimer kløyver procaspase dimeren. Kløyvingen forårsaker en konformasjons endring i procaspasen, hvor det aktivesetet i effektor caspase dimeren settes sammen og danner en aktiv protease. Hastigheten på aktiveringen av flere effektor caspaser øker ved at aktive effektor caspaser kan aktivere andre effektor caspaser (feedback loop) (McIlwain et al. 2013). Dersom aktiveringen av caspase-proteasene inhiberes, vil cellene gjennomføre nekrose fremfor apoptose.

1.4.3 Nekrose

Celledød forårsaket av nekrose kan morfologisk karakteriseres ved økt cellevolum (kalles oncosis), ødeleggelse av plasmamembran, etterfulgt av tap av intracellulært innhold og svelling av cellulære organeller (Kroemer et al. 2009).

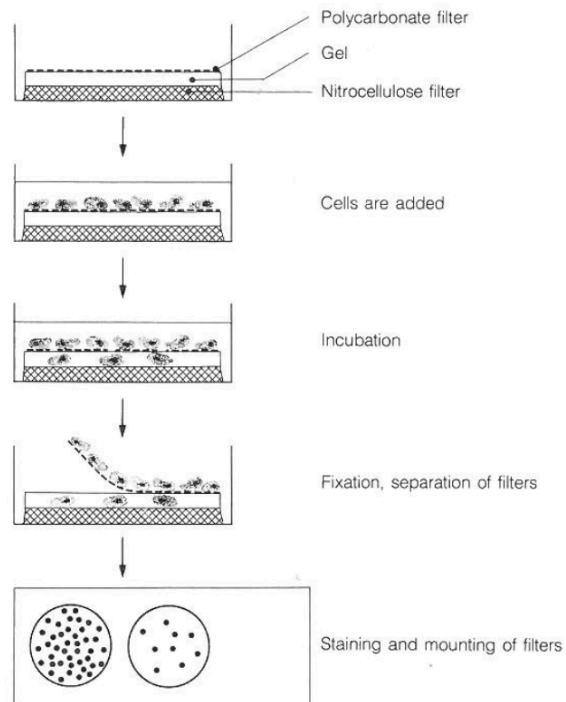
Nekrose, i motsetning til apoptose, har ofte blitt omtalt som en tilfeldig og ukontrollert form for celledød (Ouyang et al. 2012). Derimot finnes det flere holdepunkter for at celledød forårsaket av nekrose reguleres med signalveier og katalytiske mekanismer (Kroemer et al. 2009). Det finnes flere eksempler på slike signalveier, deriblant: "Death domain"-reseptorer (feks. Fas/CD95) og "toll-like"-reseptorer (f.eks. TLR3 og TLR4). Signalene som overføres av disse reseptorene, med tilhørende ligand, har vist seg å fremprovosere nekrose særlig ved tilstedeværelse av caspase-inhibitorer (Kroemer et al. 2009). I tilfeller hvor aktivitet fra caspaseaktivitet inhiberes slik at cellen ikke kan fullføre apoptoseprosessen, erstattes apoptose med nekrose. Denne observasjonen kan tyde på at apoptose inhiberer nekrose aktivt (Golstein & Kroemer 2007). Tap av ATP kan også forårsake et skifte fra apoptose til nekrose, siden cellen krever ATP for optimal aktivering av caspase (Leist et al. 1997).

Induksjon av nekrose gjennom en fler trinns reaksjonsvei hvor Fas-assosierte dødsdomener (FADD) rekrutteres til tumor nekrose faktor (TNF) -reseptor 1 (TNF-R1) er det mest studerte eksemplet på programmert nekrose (Festjens et al. 2006). RIP1 er en spesifikk kinase som rekrutteres til det draps-induserende signalet etter TNF-R1, og kan blant annet indusere nekrose (Golstein & Kroemer 2007).

Når celler gjennomgår nekrose frigjøres alle intracellulære molekyler i ECM ved nærliggende celler, og kan forårsake inflammatoriske responser av immunceller. Dette kan videre føre til promotering av svulstvekst (Ouyang et al. 2012). Til tross for dette har nekrotisk celledød blitt foreslått for å eliminere kreftceller (Agostinis et al. 2004; Zong et al. 2004). Dette begrunnes med et fellestrekk for mange krefttyper er at de er resistente mot apoptoseindusering, hvor p53 mutasjon er den mest vanlige for mange krefttyper. Tap av funksjonell p53 er assosiert med apoptoseresistens (Zong et al. 2004).

1.5 Migrasjons assay - kvantitativ *in vitro* invasjonforsøk av tumorceller gjennom proteingeler

Migrerings assay er en *in vitro* metode for å få et kvantitativt estimat på migreringsevnen til cellelinjer. Forsøksoppsettet består av følgende tre komponenter: (1) Nitrocellulosefilter med 8.0µm porer (underfilter), som plasseres i bunnen av en 24 platebrønn, (2) En proteingel som tilsettes på nitrocellulosefiltret i brønner, og (3) Nuclepore polykarbonat membranfilter (overfilter) med 8.0µm porer, som plasseres oppå proteingelen (se figur 1.5.1). Filtrene sammen med gelen blir lagt i brønner med passende størrelse til filtrene, og cellene blir applisert på toppen etter polymerisering av gelen. Cellene må først migrere gjennom porene til Nuclepore membranfilteret, deretter gjennom proteingelen og tilslutt adherere til nitrocellulosefilteret (Erkell & Schirrmacher 1988). Det er flere typer proteingeler som kan brukes til migreringsforsøk: Fibringel, Matrigel, kollagen I gel (rotte hale kollagen I) og ekstracellulært matriks (ECM) (Erkell & Schirrmacher 1988).



Figur 1.5.1. Skjematisk fremvisning av forsøksoppsettet for migrasjons-assay-forsøket (Erkell & Schirmmacher 1988)

Denne metoden er utarbeidet for å kunne observere invadering av celler gjennom basalmembranen uten tilstedeværelse av stromale lag, og dermed kunne få en forenklet modell til å studere migrasjonsmekanismene (Erkell & Schirmmacher 1988). Ved bruk av ECM i forsøksoppsettene vil strukturen og komposisjonsammensteningen representere det som en finner i basalmembranen. Matrigel vil ha tilnærmet lik komposisjon som ECM, derimot mangler Matrigel den fibrillære strukturen i ECM. For å utføre eksperimenter med enkle basalmembraner kan fibrin- og kollagen geler benyttes (Erkell & Schirmmacher 1988).

Cellene vil normalt ikke adherere til polykarbonat filtret (overfilteret) siden de i utgangspunktet er hydrofobe. Filtrene behandles/etses derfor med en metallisk natrium-metanol-løsning før de settes på nitrocellulosefiltrene og proteingelen. Etsing av polykarbonat filtrene gir 20-60 prosent mer celleadhesjon, avhengig av cellelinjene som brukes (Erkell & Schirmmacher 1988).

I forsøkene til Lars Erkell og Volker Schirmmacher ble en ikke-metastaserende T-celle lymfom type fra mus (Eb) sammenlignet med to metastaserende varianter av samme

celletype, (ESb) og (ESb-MP) ved å bruke kvantitativ *in vitro* forsøk av tumorcelle invasjon. I forsøkene migrerte de metastaserende cellelinjene (ESb og ESb-MP) Matrigel mye bedre sammenlignet med den ikke-metastaserende (Eb), og hvor migreringen av ESb var fire ganger så høy gjennom Matrigel enn gjennom fibringelen. Den mindre metastaserende fenotypen ESb-MP derimot viste ingen forskjeller i antall celler som migrerte gjennom fibringel og Matrigel. *In vivo* er det en betydelig forskjell på de metastaserende egenskaper mellom cellelinjene ESb og ESb-MP (Benke et al. 1987), selv om det ikke ble observert noen signifikant forskjell mellom cellelinjenes migrering i fibrin- og Matrigel i forsøksoppsettet. Artikkelforfatterne konkluderer med at ESb-cellens evne til å migrere gjennom kollagengel hyppigere enn ESb-MP, kan forklare ESb-cellenes hurtige spredning *in vivo*, og er grunnet i cellenes evne til å invadere vevsstroma og basalmembranen. (Erkell & Schirmacher 1988).

1.6 Hepatocellulært karsinom (HCC)

Primærleverkreft kan deles inn i fire kategorier: Hepatocellulært karsinom (HCC), hepatoblastom, angiosarkom og cholangiokarsinom (CCA). HCC forårsaker omtrent 80 prosent av alle leverkreft tilfellene i verden (Aravalli et al. 2013), og er en av de mest forkommende maligne kreftformene, etter henholdsvis lunge- og mage- kreft. Dersom HCC oppdages på et tidlige stadium, er pasientene mer mottagelige for strålebehandling og kirurgiske inngrep (levertransplantasjon og fjerning av svulst). I et godt selektert utvalg av pasienter med HCC, overlever 60 – 70% av pasientene de første fem årene etter konstatert diagnose. Imidlertid, i tilfeller der HCC oppdages ved senere stadier eller etter tilbakeslag av HCC etter strålebehandling, finnes det ingen effektive behandlingsalternativer (Llovat et al. 2008). Hep G2 cellelinjen (cellelinjen som brukes i denne oppgaven) stammer fra hepatocellulært karsinom og er adherente celler med epitel morfologi (ATCC).

1.6.1 SV40-transformerte lungefibroblaster (WI-38 VA-13)

I denne oppgaven ble humane embryo fibroblaster (WI-38), og en Simian virus 40 (SV40) transformert variant av samme celletype (WI-38 VA-13) brukt som cellemodell, for å nærmere sammenligne effekten av algeekstrakt fra *C. sorokiniana* på normale celler

og immortaliserte celler. Immortalisering innebærer at cellene ikke har begrensinger i antall celledelinger, og hvor DNA-sekvensen på telomerene opprettholdes (Tao et al. 2001). Telomerase er hovedsakelig ansvarlig for opprettholdelsen av telomerene, og er fraværende i normale somatiske celler (Cerni 2000). T-antigen (SV40 Tag), et 90-kDa protein blir ofte funnet i SV-40 transformerte celler (Sheppard et al. 1999). SV40 Tag er kjent for å binde seg til og inaktivere tumor supressor proteinet p53 samt andre regulatoriske proteiner i cellesyklusen (Strickler 2001). p53 suppressor proteinet kan blokkere progresjon i cellesyklusen som en respons på f.eks. DNA-skade, og dermed promotere apoptose i cellen (Vousden & Prives 2009). WI-38 VA-13 kategoriseres ikke som maligne, derimot er ubegrenset celledeling ett av flere steg til malignitet (Tao et al. 2001).

1.7 Bakgrunn for oppgaven

Fremskritt i både diagnostikk og behandling av kreft har ført til gode prognoser dersom kreftsvulstene oppdages før spredning. Hvis kreften oppdages etter spredning, er utsiktene for å bli frisk derimot langt dårligere og fører ofte til død. (Wells et al. 2013). Derfor er det av stor interesse å finne en behandlingsmåte som kan angripe kreftceller spesifikt før de kan metastasere og etablere sekundære svulster. Jing-Gung Chung et al. publiserte en artikkel hvor de behandlet en Hepatocellulært karsinom cellelinje (Hep G2) med ekstrakt fra *Chlorella sorokiniana* (ekstrahert i 80% etanol). De rapporterte at *C. sorokiniana*-ekstraktet reduserte celleviabiliteten samt induiserte apoptose i Hep G2 cellene. I tillegg ble det observert inhibering av migrasjonraten til cellene gjennom Matrigel. Klorofyll og karotenoider i algeekstraktene ble karakterisert ved HPLC-DAD, hvor innholdet av lutein, klorofyll a og b, ble målt (Chung et al. 2012). Disse pigmentene har tidligere blitt beskrevet med egenskaper som blant annet; antioksidative og med krefthemmende aktivitet (Sheng et al. 2007; Yang et al. 2006).

I denne masteroppgaven skal effekten av EtOH- og H₂O- ekstrahert *C. sorokiniana* (henholdsvis CSEt og CSH) på Hepatocellulært karsinom fra menneske (Hep G2) cellelinjer, samt humane lungefibroblaster (WI-38) og humane simian virus 40- (SV-40) transformerte lungefibroblaster (WI-38 VA-13), undersøkes. Alle cellelinjene skal benyttes for å se om algeekstraktene påvirker viabiliteten på cellelinjene. WI-38 og WI-38 VA-13 cellelinjene brukes i viabilitetsforsøkene for å se etter eventuelle forskjeller mellom normale og immortaliserte celler. Hep G2 blir brukt som cellemodell for maligne kreftceller siden det tidligere ble funnet effekt av ekstrakt fra *C. sorokiniana* på denne cellelinjen. Det er kun Hep G2 cellelinjene som skal brukes i migrasjons-assay og apoptose-forsøkene. Ingen av komponentene i ekstraktene skal karakteriseres eller kvantifiseres i denne oppgaven, derimot er fokuset rettet mot effekten algeekstraktene har på cellene, samt eventuelle forskjeller av effekt mellom EtOH- og H₂O som ekstraksjonsmiddel.

Spesifikke mål for oppgaven

- Undersøke om algeekstraktene påvirker celleviabiliteten til cellelinjene; WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2 ved å bruke MTT-viabilitets assay. Det skal også undersøkes om det er noen forskjeller mellom effekten algeekstraktene (CSEt og CSH), samt hvordan ekstrakter av alger som har gjennomgått stress i form av hydrogenproduksjon (sCSEt og sCSH) påvirker celleviabiliteten sammenlignet med alger med optimale vekstvilkår (CSEt og CSH)
- Videre skal det undersøkes om algeekstraktene (CSEt og CSH) påvirker migrasjonsraten til Hep-G2 cellelinjen gjennom fibringel og Matrigel (basalmembraner), ved å bruke *in vitro* migrasjons assay.
- Undersøke om algeekstraktene (CSEt og CSH) induserer apoptose i Hep G2 cellene, ved å se på aktivert caspase-3 i celler behandlet med algeekstraktene

Kapittel 2 - Materialer

2.1 Cellekulturer

Tabell 2.1.1. kjemikaler og konsentrasjoner av løsninger brukt på cellelinjene.

Kjemikaler	Konsentrasjoner	Leverandør
RPMI-1640 medium med L-glutamin og NaHCO ₃		Sigma-Aldrich/ R8758
Inaktivert føtal kalveserum Gold		PAA/ A15-151
Penicillin-streptomycin (100x - stockløsning)		Sigma-Aldrich/ P0781
Natrium-pyruvat (100 mM)		Sigma-Aldrich/S8636
Ikke-essensielle aminosyrer (NEAA) (100x stockløsning)		Sigma-Aldrich/ M7145
1-thioglycerol (1M)		Sigma-Aldrich/ M6145
RPMI-1640 medium + inaktivert føtal kalve serum + Natrium pyruvat +NEAA + monothioglycerol	<ul style="list-style-type: none"> • 500mL RPMI-1640 medium • 10% inaktivert føtal bovintserum • 1x penicillin-streptomycin-løsning • Natrium pyruvat 1mM • 1x -NEAA-løsning • 50 μM thioglycerol 	
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)		Sigma-Aldrich/ D8537
Trypsin EDTA (1x)		GE Healthcare/ L11-004
Isoton II		Coulter Beckman/ 8448011
Trypan Blue solution, 0,4%	1:2	Amresco®/K940

Tabell 2.1.2. Cellelinjer og utstyr brukt i arbeidet.

Cellelinjer	Leverandør/ Katalognr.
WI-38 lunge fibroblast	ATCC /CCL-75
WI-38 VA-13 subline 2RA lunge fibroblast (SV40 transformert)	ATCC /CCL-75.1
Hep G2 heptatocellular karsinom	ATCC /HB-8065

Tabell 2.1.3. Utstyr brukt i arbeidet med celler

Utstyr	Leverandør/ Katalognr.
PP-testrør 50mL rør	Greiner bio-one/ 227 261
PP-testrør 15mL rør	Greiner bio-one/ 188 271
FALCON cellekulturflasker (T75), 75 cm ²	Becton Dickinson/ 353136
FALCON® cellekulturplate, 6 brønner	Becton Dickinson/ 08-772-33
FALCON® Cellekulturplater, 24 brønner	Becton Dickinson/ 353047
FALCON® Cellekulturplater, 96 brønner	Becton Dickinson/ 353072
1.5 mL eppendorfrør	Greiner Bio-one/ 616201

Tabell 2.1.4. Instrumenter brukt i arbeid med cellene.

Instrumenter	Leverandør
Z1 coulter particle counter	Coulter electronics Ltd
Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific
Leica DMIL mikroskop	Leica Microsystems
Steri-cycle CO ₂ inkubator, HEPA class 100	Thermo electron corporation

2.2 Algeekstrahering

Tabell 2.2.1. Algen som ble bruk til ekstraksjon

Chlorella sp.	Leverandør
<i>Chlorella sorokiniana</i> , stamnummer: CHL176	NIVA Culture Collection of Algae (NIVA-CCA) in Norway

Tabell 2.2.2. Utstyr benyttet i ekstraksjon av *C. sorokiniana*

utstyr	Leverandør/ katalognr.
Glassfiberfilter Whatman GF/C	GE Healthcare/ 1822-025
Vakuumskolbe	VWR
750 ml PP-sentrifugerør	Thermo scientific/ 75003699
0,5mm glasskuler	Scientific industries, inc/ SI-BG05
1,5mL PP-sentrifugerør	Sigma-Aldrich/ BR780731

Tabell 2.2.3. Kjemikaler benyttet i ekstraksjon av *C. sorokiniana*

Kjemikaler	Leverandør/ katalognr.
96% Etanol (EtOH)	VWR international/ 20824.365
Tris-Acetate-phosphate (TAP) medium	
Dimethyl sulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich/ D2438

Tabell 2.2.4. Instrumenter benyttet i ekstraksjon av *C. sorokiniana*

Instrumenter	Leverandør/ Katalognr.
Vekt AE260 deltarange®	Mettler Toledo
Leica DMLS mikroskop	Leica microsystems
Fastprep®-24	MP BIOMEDICALS
Vannbad SUB aqua pro water bath (SUB86)	Grant
Heraeus Multifuge X3R	Thermo scientific
Bordsentrifuge centrifuge 5424 R	Eppendorf
Vortex genie 2	Scientific industries
Frysetørker Heto FD3	Heto Lab Equipment
Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific
Ultrasonic bad	Branson®

2.3 MTT-viabilitets assay

Tabell 2.3.1. Kjemikaler, utstyr, instrumenter og programvare benyttet i eksperimenter med MTT-viabilitets-assay

Kjemikaler/ instrument/ Programvare	Leverandør/ katalognr.
FALCON Cellekulturplater, 96 brønner	Becton Dickinson/ 353072
Cell proliferasjon kit I (MTT)	Roche Diagnostics / 11 465 007 001
Steri-cycle CO ₂ inkubator, HEPA class 100	Thermo electron corporation
Sterilbenk	Biowizard
Sunrise Absorbance Reader	TECAN
Magellan v. 6.6 (programvare)	TECAN

2.4 Migrasjons assay

Tabell 2.4.1. Kjemikaler og utstyr til migrasjons-assay

Kjemikaler/ instrumenter	Fortynninger	Leverandør/ katalognr.
Casein hammarsten storfe	10 mg/mL	Sigma-Aldrich/E0789
Fibrinogen, humanplasma	50 mg/mL	Sigma-Aldrich/ F4883
Trombin, storfeplasma	10U/mL	Sigma-Aldrich/T6634
Inaktivert føtal kalveserum		PAA/ A15-151
Serumfritt medium, Minimum essential medium eagle (MEM)		Sigma-Aldrich/ M2279
Fibringel	<ul style="list-style-type: none"> • 5,6 mg/mL kasein • 11.1 mg/mL fibrinogen • 11% serumfritt RPMI-medium • 1,1 U/mL trombin 	-
Matrigel ECM Gel fra Engelbreth-holm-Swarm murine sarcoma	8 – 12mg/mL	Sigma-Aldrich/ E1270
Canada balsam	-	Sigma-Aldrich/ C1795
Glutaraldehyd løsning, grad II, 25%	25% og 2,5%	Sigma-Aldrich/ G6257
Kollagen fra rotte, lower viscosity 3 mg/ml	1:100	Cultrex/ 344-100-01

Tabell 2.4.2. utstyrliste til migrasjons-assay med både matrigel og fibringel

Utstyr	Leverandør/ Katalognr.
Vortex genie 2	Scientific industries
Polypropylen-testrør 15mL rør	Greiner bio-one/ 188 271
Sprøyte Plastipak™ 5mL	Becton Dickinson S.A/ 302187
0.20µm sterilfilter non-pyrogenic	SARSTEDT/ 83.1826.001

Tabell 2.4.3. Utstyr brukt til migrasjons-assay

Utstyr	Leverandør/ katalognummer
FALCON® Cellekulturplater, 24 brønner	Becton Dickinson/ 353047
Filtermembran nitrocellulose millipore, porestørrelse 8.0µm SCWP	Sigma-Aldrich/ N3896
Polykarbonat membranfilter	Merck Millipore/ TETP01300
Parafilm®	Bemis®

Tabell 2.4.4. Kjemikaler og utstyr til farging av filtre

Kjemikaler	Bruksløsninger	Leverandør/katalognr.
Hematoxylin løsning, Harris	1:1	Sigma-Aldrich/ HHS16
0,23M MgO ₄ /23,8 mM NaHCO ₃ -løsning (Blueing agent)	<ul style="list-style-type: none">• 0,23M MgO₄• 23,8mM NaHCO₃ Løst i dH ₂ O	
Propanol 99,9%	<ol style="list-style-type: none">1. 70% propanol med tre droper 1M HCl,2. 70% propanol3. 95% propanol4. 100% propanol Alle løsninger ble fortynnet i dH ₂ O	VWR international/ UN1219
NEO-CLEAR® (Xylen-erstatte)	-	VWR international/ 1.09843.5000
Geimsa stain, modified solution	1:1	Sigma-Aldrich/ 48900
Etanol (EtOH)	50%	

2.5 SDS-PAGE elektroforese og Immunoblot

Tabell 2.5.1. Løsninger benyttet i SDS-PAGE gel elektroforese

Løsninger	Kjemikalere	Leverandør/katalognr.
1.5M TrisHCl pH 8.8	<ul style="list-style-type: none"> 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol - Trizma base (Tris) (FW 121.1) Justert til pH 8.8 med HCl 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/T1503 Sigma-Aldrich/ 258148
	Fortynnes med dH ₂ O	
0.5M TrisHCl	<ul style="list-style-type: none"> Tris (FW 121.1) Justert til pH 6.8 med HCl 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/T1503 Sigma-Aldrich/ 258148
	Fortynnes med dH ₂ O	
10% SDS-løsning	<ul style="list-style-type: none"> 100mg/ml Sodium dodecylsulfat (SDS) 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/ L3771
	Fortynnes med dH ₂ O	
10% APS	<ul style="list-style-type: none"> Ammonium persulfate (APS) 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/ L3771
	Fortynnes med dH ₂ O	
2x samplebuffer	<ul style="list-style-type: none"> 0.125M TrisHCl 0,04% SDS 17% Glycerol 2 µg/ml Bromphenolblue 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/ G5516 Sigma-Aldrich/B0126
	fortynnes med dH ₂ O	
<i>Bruksløsning samplebuffer</i>	<ul style="list-style-type: none"> 2x samplebuffer (ref#5.5) 10% 2-mercaptoetanol 	
10x Elektroforesebuffer	<ul style="list-style-type: none"> 25mM Tris 192mM Glycin 10% SDS 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/T1503 Sigma-Aldrich/G7126
	Fortynnes med dH ₂ O	
<i>Bruksløsning elektroforesebuffer</i>	<ul style="list-style-type: none"> 10x Elektroforesebuffer 	
	Fortynnes 1:10 med dH ₂ O	
10x Transferbuffer	<ul style="list-style-type: none"> 25mM Tris (FW 121.1) 192mM Glycin 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/G7126
	Fortynnes med dH ₂ O	

Tabell 2.5.1. Fortsetter

Løsninger	Kjemikaler	Leverandør/katalognr.
<i>Bruksløsning transfer buffer</i>	<ul style="list-style-type: none"> 1x Transferbuffer (ref#5.7) 10% metanol <p>Fortynnes med dH₂O</p>	
10x Tris buffered saline (TBS) pH 7,4	<ul style="list-style-type: none"> 260.1mM Tris (FW 121.1) 1,54mM NaCl Justere til pH 7.4 med HCl <p>Fortynnes til 1000mL med dH₂O</p>	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/T1503 Sigma-Aldrich/ S 5886 Sigma-Aldrich/ 258148
<i>TBS bruksløsning m/ 0.1% TWEEN 20 (TBST)</i>	<ul style="list-style-type: none"> 1x TBS 0,1% Tween 20 <p>Fortynnes med dH₂O</p>	Sigma-Aldrich/ P1379
5% melk/TSBT-løsning	<ul style="list-style-type: none"> Tørrmelk <p>TBST bruksløsning</p>	
Precision plus protein Dual color - Proteinstandard		Bio rad/ 161-0374

Tabell 2.5.2. Kjemikaler benyttet i lyseringen av cellene

Løsninger	Kjemikaler	Leverandør/katalognr.
2x Lysisbuffer	<ul style="list-style-type: none"> 50mM Tris pH 7.5 200mM NaCl 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/T1503 Sigma-Aldrich/ S 5886
Proteasehemmere	<ul style="list-style-type: none"> Leupeptin 1 Ug/mL Antipain 1 mg/mL Pepstatin A 1 mg/mL Chymostatin 1mg/mL 	
<i>Lysisbuffer bruksløsning (10mL)</i>	<ul style="list-style-type: none"> 1x lysisbuffer 20mM NaF 10mM Na₃VO₄ 1% NP-40 1:100 fortynning av Proteasehemmere <p>Fortynnes med dH₂O</p>	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/ 201154 Sigma-Aldrich/ S- 6508 Cadbiochem/ 492015
PMA/ionomycin-løsning (PMA/Io-løsning) (Indusering av apoptose)	<ul style="list-style-type: none"> 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 1 µg/ml Ionomycin 	<ul style="list-style-type: none"> Sigma-Aldrich/16561-29-8 Millipore/80056-892

Tabell 2.5.3. utstyr benyttet i Westernblotting

Utstyr	Leverandør/ katalognummer
Elektroforesekammer, mini protean 3 cell	BIO RAD/165-8005EDU
Fremkallings kassett – Hypercassette	
Semi-dry transfer kammer TE77XP	Hoefer
Amersham hybond, PVDF membran	GM healthcare
Azure c400 – visible fluorescent western blot imaging system	Azure biosystems/10147- 220
Gel DOC™ EZ systems	BIO-RAD/ 1708270

Tabell 2.5.4. kjemikaler til polyakrylamidgel

Kjemikaler	Leverandør/katalognummer
30% Acrylamide/Bis solution (2,6%C)	Bio-Rad/ 161-0158
N,N,N' N'-tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED)	Bio-Rad/ 161-0800

Tabell 2.5.5. Løsninger benyttet i gelelektroforese

Løsninger	Konsentrasjoner
10% polyakrylamid gel (separerende gel)	<ul style="list-style-type: none"> • 10% Akrylamid • 375mM TrisHCl • 1% SDS • 0.1% APS • TEMED Fortynnet med dH ₂ O
4% polyakrylamid gel (konsentrerende gel)	<ul style="list-style-type: none"> • 4% Akrylamid • 125mM TrisHCl • 0.1% SDS • 0.05% APS • 0.1%TEMED Fortynnet med dH ₂ O

Tabell 2.5.6. Instrumenter og antistoffer benyttet i immunoblotting

Instrumenter	Leverandør/ katalognummer	
Electroforese Powerpac 300	BIO-RAD	
Block heater SBH130D	Stuart scientific	
Reciprocating shaker	Stuart scientific	
CURIX 60 developer		
Maskinen på LMG		
Antistoffer	Konsentrasjon/fortynning	Leverandør/katalog nr.
Caspase-3 kanin polyklonal IgG antistoff (primærantistoff)	1:1000	Santa cruz biotechnology/ D2105
Anit- β -Actin kanin IgG antistoff (primærantistoff)	1:10000	Cell-signaling technology/#4970
Geit-antikanin IgG (HRP-konjugat)(sekundærantistoff)	1:5000	Cell-signaling technology/ #5125

Tabell 2.5.7. kjemikaler benyttet for kjemisk apoptose-induksjon

Kjemikaler	Konsentrasjon	Leverandør/katalog nr.
Ionomycin, kalsium	1 μ g/ml	
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	50 ng/ml	

Tabell 2.5.7. Løsning for fremkalling av bilder

Løsninger	Fortynning	Leverandør/ katalog nr.
Luminata classico western HRP substrate	1:1	MILLIPORE/WBLUC0500

Kapittel 3 - Metoder

I denne delen av oppgaven blir metodene og eksperimentoppsettet beskrevet. I noen av forsøkene ble metoden modifisert fra protokollen (Algeekstraksjon og migrasjons-assay). Kjemikaler, instrumenter og cellelinjer som ble brukt i eksperimentene er listet i materialer. For mer informasjon om løsningene som ble brukt se material listen.

3.1 cellekultur

Det var totalt tre cellelinjer som ble brukt til eksperimentene: Humane lungefibroblaster (WI-38), SV40 -transformerte humane lunge fibroblast (WI-38 VA-13 subline 2RA) og Hepatocellulært karsinom (Hep G2). Cellelinjen som ble brukt i forsøkene ble først lageret i nitrogentank ved -196°C , deretter ble cellene kultivert på T75-flasker ved 37°C i 5% CO_2 .

3.1.1 Splitting av cellelinjene

Alle cellelinjene (WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2) ble splittet etter samme prosedyre. Flaskekulturen lå i inkubasjonsskapet til kulturen hadde nådd 70-80% konfluens (eksponentiellfase), to til tre dager, før passering. Nye cellekulturer ble hentet fra nitrogentank dersom antall passasjer hadde nådd den aktuelle cellelinjens maksimum (Informert i protokoll for cellelinjene).

RPMI-mediet i flaskene ble fjernet, og cellene ble vasket med fosfatbuffer (PBS). PBS i flasken ble deretter fjernet, og cellene ble tilført trypsin EDTA (3ml) . Deretter ble flaskene lagt i inkubasjonsskapet i 10-15 minutter ved 37°C i 5% CO_2 . Cellene ble observert i lysmikroskop for å se om cellene hadde løsnet fra flasken. For å få en enkeltcellesuspensjon ble cellene forsiktig pipettert i trypsin-cellesuspensjonen i flasken. Deretter ble 10 ml med 10% føtalt bovint serum (FBS) RPMI-medium tilført celleduspensjonen, og suspensjonen ble sentrifugert på $340 \times g$ i 10 minutter.

Supernatanten med trypsin ble fjernet etter endt sentrifugering, deretter ble pelleten resuspendert i 10% FBS-RPMI-medium. Celletallet ble deretter bestemt med partikkelteller. 2×10^4 celler/ cm^2 ble overført tilbake til flasken med 25mL 10% FBS-RPMI-medium, deretter ble flaskekulturen lagt tilbake i inkubasjonsskapet (37°C med 5% CO_2). Cellene ble med jevne mellomrom (~hver tredje uke) telt i tellekammer med

trypanblått for å kunne fastslå viabiliteten i cellekulturen. Dersom antall døde celler oversteg 7-10% ble cellelinjen kastet, og nye celler ble hentet fra nitrogentanken. WI-38 fibroblastene ble kastet dersom antall passasjer oversteg passasjemaksimum oppført i protokollen fra leverandør (ATCC, 2015).

3.2 Ekstraksjonsprosedyre for *Chlorella sorokiniana*

For å ekstrahere algene ble både destillert deionisert vann (dH₂O) og 96% etanol (EtOH) brukt som ekstraksjonsmiddel. Dette resulterte i to forskjellige ekstrakter, selv om ekstraktene var av samme alge; -*Chlorella sorokiniana*. Algeekstraktene ble navngitt i henhold til hvilket ekstraksjonsmiddel som ble brukt: henholdsvis *C. sorokiniana* H₂O (CSH) og *C. sorokiniana* EtOH (CSEt), samt sCSH og sCSEt for stressede celler (alger brukt i hydrogenproduksjon). Supernatanten fra ekstraksjonen ble deretter tørket, for å så bli løst opp i DMSO. For å ikke overstige DMSO-toleransen til cellelinjene, var det hensiktsmessig å oppnå høyest mulig konsentrasjon biomasse per mL DMSO. For å redusere DMSO-mengden ble biomassen fra algeekstraksjonen løst opp i en akseptabel mengde med DMSO, for å så bli satt på ultralydbad. Nedbrytningen av makromolekyler med ultralyd kløyver molekylet omtrent i sentrum av molekylet i en ikke-tilfeldig prosess, hvor de største molekylene brytes ned hurtigst (Antti et al. 2008). Dette ble gjort for å løse gjenværende partikler i ekstraktene.

3.2.1 Høsting av alger

C. sorokiniana ble først dyrket på agar fra stamkultur. Enkeltkolonier fra agar ble plukket og resuspendert i 50mL TAP medium. Kulturene ble dyrket på ristebord ved 25°C (lysintensitet på 80 uE/m²/sek). Ristekulturen ble brukt til å inokulere nye 50 ml ny ristekulturer, og dette ble gjentatt tre ganger. 1 L Tris-acetat-fosfat (TAP)-medium ble inokulert med 1 ml av ristekulturen i eksponentiell fase, og dyrket opp i flate flasker med bobling. Boblekulturen ble deretter dyrket ved 24°C, med lysintensitet på 100 uE/m²/sek og bobling med 5% CO₂ luftblanding. Dyrkingen av algene ble på forhånd utført av Kari Skjånes.

Tørrvekten ble målt ved å filtrere 2mL algesuspensjon gjennom vaskede forhåndsveide glassfiberfilter (Whatman GF/C) i to paralleller. Algeceller på glassfiberfiltrene ble

vasket med 3mL TAP-medium, og deretter tørket i varmeskap ved 105°C over natten. Etter tørkingen ble filtrene veid, og tørrvekten (mg/ml) ble bestemt som gjennomsnittet av parallellene. Tørrvekten ble videre brukt for å kunne estimere hvor stor prosentandel av den totale biomassen som ble ekstrahert.

Algesuspensjonen ble fordelt likt på to 750mL sentrifugerør, og sentrifugert ved 10°C og 4700 x g i 20 minutter. Etter sentrifugering ble supernatanten helt av, og pelleten resuspendert med 30mL TAP-medium. Deretter ble algesuspensjonen fordelt i 50mL sentrifugerør, og sentrifugert på 4700 x g ved 10°C i 10 minutter. Supernatanten ble helt av, og biomassen i rørene var nå klar for ekstrahering.

3.2.2 Ekstrahering av *Chlorella sorokiniana* (CSEt/CSH og sCSEt/CSH)

Det ble brukt to ekstraksjonsmidler, henholdsvis H₂O og EtOH. Ett av rørene med biomasse (fra siste steg i høsteprosessen) ble løst opp til en jevn suspensjon i 5mL H₂O, og det andre røret i 5mL EtOH. Deretter ble suspensjonene fordelt i 1,5mL sentrifugerør som inneholdt ~0,5mL av 0,5mm glasskuler. Sentrifugerørene ble pakket inn i aluminiumsfolie, for å begrense kontakt med lys så langt som mulig. For å knuse algecellene ble rørene med glasskuler satt på risting i 4 minutter ved 6 x g. Dette ble gjentatt tre ganger. Suspensjonen ble observert under lysmikroskop etter risting, for å se om de fleste cellene var knust etter tre runder med risting. Dersom det ble observert flere celler i suspensjonen ble cellene ristet ytterligere.

Etter knusingen av cellene ble CSH-ekstraktene inkubert én time på vannbad ved 100°C, og CSEt-ekstraktene på benken ved romtemperatur (ca. 25°C). Etter en time ble ekstraktene ristet fire minutter ved 6 x g, for å så igjen bli inkubert én time under samme betingelser. Ekstraktene ble ristet på nytt ved samme hastighet, deretter sentrifugert på 4700 x g ved 10°C i 30 minutter. Etter sentrifugeringen ble supernatanten samlet i hvert sitt 15mL rør, ett for CSH og ett annet for CSEt. Algepelleten i 1,5 ml røret ble totalt ekstrahert tre ganger. Som nevnt tidligere i avsnittet ble algene inkubert og ristet i to omganger i den første ekstraksjonsrunden. I de to siste ekstraksjonsrundene ble algene kun inkubert og ristet i en omgang.

Mellom hver ekstraheringsomgang ble supernatanten samlet i et 15mL rør. Etter ekstraksjon av algepelleten var biomassen løst opp i hvert sitt ekstraksjonsmiddel, - henholdsvis EtOH og H₂O. De ferdigstilte ekstraktene skulle derimot løses opp i DMSO.

3.2.3 Tørking og resuspending av biomassen

Først ble supernatanten fra ekstraheringen fordelt til forhåndsinnveide 2ml sentrifugerør (vekt med nøyaktighet på 10⁻⁶g), hvor volumet i rørene ikke oversteg 800µl. Det ble også tilsatt ekstraksjonsmiddel til prøverør (kontrollrør) som skulle med i tørkeprosessen: -fire rør med kun EtOH og fire rør med kun H₂O. Kontrollrørene ble brukt som referanse, for å se om tørkeprosessen hadde effekt på vekten av rørene. Tørking av CSEt-ekstraktene ble gjort med vakuumsentrifuge i 8 timer, mens CSH-ekstraktene ble først fryst ved -80°C over natten, for deretter å frysetørke i 29 timer. Kontrollrørene gjennomgikk samme prosedyre som rørene med algeekstraktene. Tørrvekten av ekstraktene ble bestemt ved å veie rørene med de tørkede ekstraktene for å deretter trekke fra den forhåndsinnveide vekten på rørene.

3.2.4 Bestemmelse biomassekonsentrasjon

Algeekstraktene skulle brukes for å se om de inneholder komponenter som har innvirkning på migreringsegenskapene, eventuelt indusering av apoptose, på Hep G2. Ekstraktene skal også brukes for å se om de påvirker viabiliteten i cellelinjene WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2. For å begrense påvirkningen fra DMSO når cellene skulle behandles med algeekstraktene, var det hensiktsmessig å bruke minst mulig DMSO per µg biomasse. Utbytte målt som tørrvekt viste seg å være høyere for H₂O- ekstraktene enn for EtOH ekstraktene. Derfor ble H₂O- ekstraktene løst i 100µl, mens EtOH ekstraktene ble løst i 60µl DMSO. Dette var imidlertid ikke nok til å få løst opp hele biomassen i sentrifugerørene. For å løse opp resterende biomasse, ble rørene lagt på ultralydbad med varme. EtOH- og H₂O ekstraktene lå i ultralydbadet (~40 kHz) én time ved 50°C, og deretter ved 37°C i 30 minutter. CSH ekstraktene lå ytterligere 30 minutter på 50°C. Etter behandlingen i ultralydbad var det ingen synlige partikler i sentrifugerørene.

Oppnådd konsentrasjon av algeekstraktene ble bestemt ved å legge sammen tørrvekten til ekstraktene i sentrifugerørene, deretter ble tørrvekten dividert med totalvolumet av ekstraktet. Konsentrasjonen ble målt i mg/ml.

Cellelinjene ble inkubert med algeekstrakt fortynnet i RPMI-medium (10% kalveserum). Det var viktig at ikke komponenter fra algeekstraktene felte ut i RPMI-mediet, siden eventuelle viktige metabolitter kan foreligge i utfellingen. I tillegg til dette kunne utfelling gitt konsentrasjonsforskjeller mellom forsøksparallelene, og dermed gitt uønskete resultater. For å kunne påvise eventuell utfelling, ble det lagd en fortykning til 1000 µg/ml med RPMI-medium av algeekstraktene i ett 15ml rør. Dette ble gjort for både EtOH og H₂O ekstraktene. Deretter sto fortykningen i romtemperatur over natten. Dagen etter ble det fortykningene gransket for eventuell utfelling.

3.3 MTT-viabilitets-assay

MTT-viabilitets assay ble brukt for å se etter eventuell cytotoxisk effekt av algeekstraktet på cellene, og ble utført på alle cellelinjene.

3.3.1 Prosedyre for MTT-viabilitets assay

Cellene ble satt til en 96-brønnsplate ($1.56 \cdot 10^5$ celler/cm²), og lagt i inkubasjonsskapet til dagen etter. Dette ble gjort for at cellene kunne adherere til bunnen av brønnene. Dagen etter ble algeekstraktet tilsatt til brønnene med følgende konsentrasjoner: 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62.5µg/ml, 15.125µg/ml samt en negativ kontroll (0µg/ml). Det ble også tilsatt algeekstrakter til brønner uten tilstedeværelse av celler. Dette ble gjort for å måle om OD-målingene ble påvirket av fargen i algeekstraktene. MTT-reaktantene ble tilsatt til alle brønner etter 48 timers behandling i henhold til protokoll for "Cell proliferation kit I (MTT)" fra Roche (Roche, 2005). Absorbansen ble målt på ELISA absorbans-leser (ved 620nm) og resultatene ble behandlet i Magellan v. 6.6 (programvare). Celleviabiliteten ble presentert i prosent, hvor brønnene uten algeekstrakt, negativ kontroll, var referanseverdiene for 100% celleviabilitet. OD-

målingene fra brønnene med algeekstrakt ble dividert med referansebrønnene og deretter multiplisert med 100 for å kalkulere celleviabilitetprosenten.

For å utelukke at DMSO (løsningsmidlet i algeekstraktet) påvirket celleviabiliteten, ble det lagd en fortynningsrekke med DMSO (1,85%, 0,90%, 0,45%, 0,23%, 0,12% og 0,06%) som ble tilsatt i brønner med celler. Disse konsentrasjonene representerer DMSO-konsentrasjonene i algeekstraktfortynningene fra den første runden med ekstraksjon. I likhet med celler som ble behandlet med algeekstrakt ble cellene DMSO ble lagt i inkubasjonsskapet i 48 timer, før tilsetting av MTT-reaktantene.

3.4 Migrasjons assay (*in vitro*)

Migrasjons-assay-forsøkene ble fulgt i henhold til protokoll fra (Erkell & Schirrmacher 1988) derimot ble det gjort metodemodifikasjoner: tildekking av polykarbonat membranfilter med kollagen, og øke trombinkonsentrasjon i kasein-fibrinogen fra 0,55 U/ml til 1,1 U/ml.

3.4.1 Preparering av Nuclepore membranfilter (overfilter)

Det er viktig at cellene adhererer til overflaten av Nuclepore polykarbonat membranfiltret for at cellene kan migrere videre gjennom proteingelen. Polykarbonat membranfiltret har i utgangspunktet en hydrofob overflate, noe som vil gi cellene problemer med å adherere til filtrene. Dette problemet løses ved at filtrene behandles med en løsning av metallisk natrium i metanol. Etsningen av filtrene bidrar til at overflaten til membranfiltrene blir svakt hydrofilt, og dermed bidrar til økt celleadherering på membranfiltrene. For forsøkene med migrasjons assay ble det brukt to typer Nuclepore polykarbonat membranfilter som ble preparert på forskjellige måter før de ble brukt i forsøket: En filtertype ble stemplet ut dra filtermembranark, og etset med metallisk natrium-løsning. Det andre polykarbonat membranfiltret var ferdig stemplet og ble dekket med kollagenløsning (30 µg/ml).

3.4.2 Prosedyre for etsning av Nuclepore membranfilter

Polykarbonat membranfiltrene ble stemplet ut i 13mm diameter fra et ark. Filtret hadde to forskjellige sider,-en matt side og en blank. Metallisk natrium ble løst opp i metanol (2mg/mL), og filtrene ble etset 30 sekunder i metallisk natrium metanol løsning.

Deretter ble filtrene lagt på en tørr petriskål med den blanke siden av filtret opp. Etter at filtrene hadde tørket, ble 25 dråper (~25 µl) med 25% glutaraldehyd satt til en ny petriskål, deretter ble hvert av filtrene ble plassert på glutaraldehyddråpen hvor de lå i en time. Kasein ble løst i PBS i konsentrasjonen 10mg/mL, hvor 6µL 0,3M NaOH ble tilsatt for hvert mg kasein i løsningen. Kaseinløsningen ble satt én time på risting. Etter at filtrene hadde vært en time på glutaraldehyd, ble filtrene lagt på vannoverflaten i en skål med dH₂O. Filtrene ble deretter tatt opp igjen, og overflødig vann på filtrene ble tørket av med tørkepapir. Etter risting ble dråper av kasein/PBS-løsningen satt til en petriskål, og filtrene ble plassert på toppen av kasein/PBS-dråpene med den blanke siden av membranfiltrene opp. Filtermembranene sto deretter 1.5 timer på kasein-PBS løsningen.

Etter 1,5 timer ble filtrene tatt opp av petriskålene med Kasein/PBS-løsningen og lagt til en ny petriskål med 25% glutaraldehyd, hvor de lå ytterligere 30 minutter. Filtrene ble deretter vasket med dH₂O, og overflødig vann på membranfiltrene ble tørket av med tørkepapir. I det siste trinnet ble filtrene satt til vannbad, én liter vann for 25 filtre, og satt på lett risting til neste dag. Det er viktig at alle filtrene ligger under vannoverflaten under ristingen. Dagen etter ble filtrene satt til en tom petriskål med den mattesiden av opp, og Nuclepore polykarbonat membranfiltrene var nå klare for bruk.

3.4.3 Tildekking med kollagen

For å øke antall adherente celler til membranfiltrene, ble filtrene dekket med 30 µg/ml kollagen-løsning (1:100 fortykning fra 3 mg/ml-løsning). Membranfiltrene ble først satt til brønner i en 24 brønnsplate, og kollagen ble tilsatt på filtrene (500µl pr brønn).

Filtrene lå 3-4 timer i kollagen, deretter ble kollagenløsningen fjernet fra brønnene, og filtrene tørket i avtrekksskap til neste dag. Etter tørkingen var membranfiltrene klare for bruk.

3.4.4 Migrasjons assay med fibringel/matrigel

Det er flere proteingeler som kan benyttes i migrasjons assay. I eksperimentene i denne oppgaven ble det brukt både fibrin- og Matrigel.

3.4.5 Migrasjons-assay - forsøksoppsett

Prosedyrene for migrasjons-assay med fibringel og Matrigel ble fulgt i henhold til protokollen (Erkell & Schirmacher 1988). Kasein ble løst i serumfritt medium deretter ble 4µl 0.3M NaOH tilsatt til hvert mg kasein i løsningen (10mg/mL). Fibrinogen ble løst i deionisert vann (50mg/mL). Dobbelte mengde fibrinogen ble løst i medium enn det beskrevet i protokollen (Erkell & Schirmacher 1988) for å få 50% protein i løsningen. Kasein- og fibrinogen løsningene ble satt på risting til neste dag, kaseinløsningen ble deretter sentrifugert og pH-justert til 7.4. Begge løsningene kan oppbevares én uke ved 4°C.

Tabell 3.4.1 viser blandingsforholdene for fibringelblandingen

Løsninger	Sluttkonsentrasjoner
Kasein i serumfritt-medium (10 mg/ml)	5,6 mg/ml
Fibrinogen i dH ₂ O (50 mg/ml)	11,1 mg/ml
Inaktivert kalve serum	11.1%
Serumfritt medium	11.1%

Alle løsningene ble sterilfiltrert med 0.4µm sterilfilter før de ble blandet. Før fibringelblandingen ble tilsatt til nitrocellulose filtrene (underfilter), ble 45µL av blandingen overført til et 1.5mL eppendorfrør og tilsatt trombin (1.1 U/ml). Dersom fibrinogen-løsningen polymeriserte innen 5 minutter ble den resterende løsningen tilsatt trombin og blandingen var klar for bruk. Nitrocellulosefiltrene (underfiltret) ble lagt i en 24 brønnsplate med pinsett, og 30µL med fibrinogen/trombin-løsning ble tilsatt til filtrene. Deretter ble polykarbonat filtrene (overfilter) plassert med pinsett på

fibringelløsningen (oppsett vist i figur 3.4.1). 24 brønnsplaten ble tettet med parafilm, og lå i sterilbenken én time for at fibringelen skulle polymerisere.

I forsøkene med Matrigel ble nitrocellulosefiltrene først dekket med fibrin/trombin-løsning på undersiden av filtret før de ble tilsatt i brønnen. Fibringelen ble blandet med de samme blandingsforholdene som i migrasjons-asaay forsøkene med fibringel.

Nitrocellulose filtrene ble dekket med fibringel for å mette filtrene, og dermed hindre at de tørre filtrene skulle absorbere komponenter av matrigelen (Erkell & Schirmacher 1988). 24 brønnsplatene ble dekket med parafilm, og fibringelen polymeriserte etter én time. Siden Matrigel polymeriserer ved romtemperatur, ble matrigelen ble tint på is, og 10µL matrigel ble tilsatt på nitrocellulosefiltrene med forhåndskjølte pipettespisser. Nuclepore polykarbonat membranfiltrene ble deretter satt på dråpen med Matrigel, og plassert kant-i-kant med nitrocellulosefiltret. Nucelpore-filtret ble justert slik at Matrigel'en skulle fordele seg jevnt mellom filtrene. 24 brønnsplaten ble deretter tettet med parafilm, og lå i sterilbenken en time for å polymerisere.

Etter proteingelene hadde polymerisert (fibringel og Matrigel), ble cellene (Hep G2) applisert på filtrene 12 500 celler/cm² i brønnene med filter, samt to brønner uten filter. Deretter ble Algeekstraktet tilsatt direkte i brønnene med konsentrasjonene: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, og en brønn uten algeekstrakt (negativ kontroll (0 µg/mL)). 24 brønnsplatene ble inkubert ved 37°C med 5% CO₂ i 20 timer. Etter 20 timer inkubering ble medium med algeekstrakt fjernet fra brønnene, og deretter tilsatt 2.5% glutaraldehyd for fiksering av cellene (Erkell & Schirmacher 1988). I brønnene med celler uten filter (2 paralleller) ble medium fjernet, deretter ble cellene vasket med PBS, tilsatt trypsin, og celletallet bestemt i partikkelteller. Cellene ble fiksert i én time med 2.5% glutaraldehyd i forsøkene med fibringel, og til neste dagen i forsøkene med matrigel.

3.4.6 Farging av celler på Nucelpore-filtret

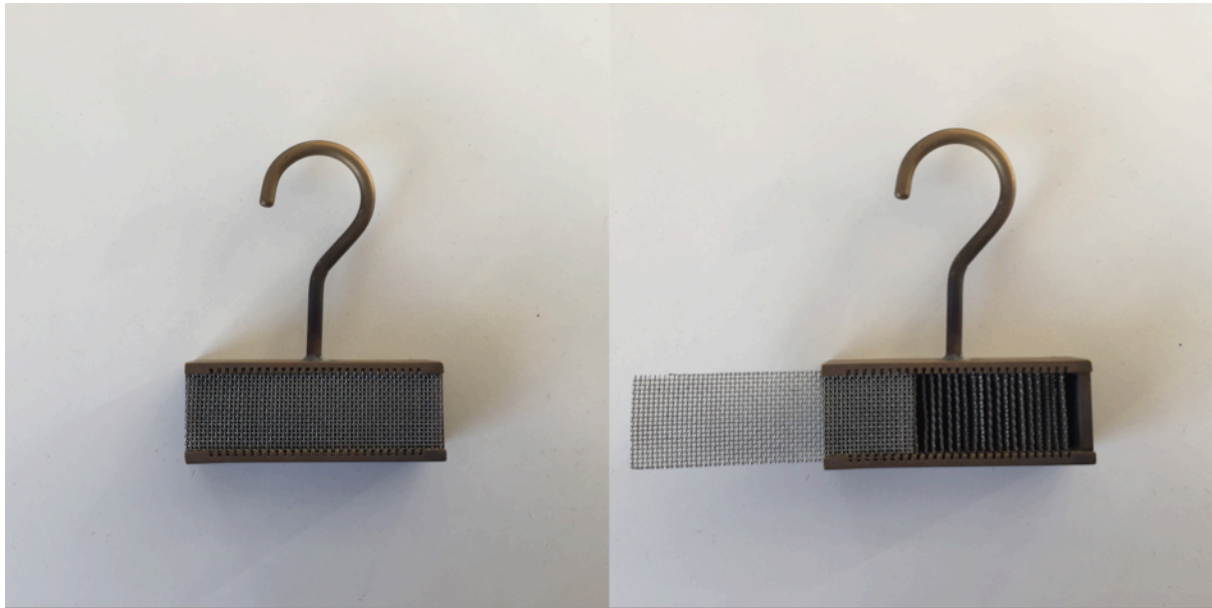
Etter endt fiksering av cellene med 2.5% glutaraldehyd (én time for fibringel og dagen etter med Matrigel), ble polykarbonat membranfiltrene (overfiltrene) tatt opp av brønnen med pinsett, og satt på hvert sitt objektivglass merket med algeekstrakt konsentrasjon og type ekstrakt. Det ble forberedt tre petriskåler med forskjellige

løsninger for farging av celler på overfilter: (1) geimsa stain, (2) 50% EtOH og (3) dH₂O. En dråpe med 50% EtOH ble plassert på polykarbonat membran filtret for å løsne det fra objektivglasset. Overflødig EtOH på filtret ble tørket lett bort på begge sider med tørkepapir. Filtret ble deretter lagt i petriskålen med geimsa farge i 30 sekunder. Etter 30 sekunder i geimsa farge ble filtret lagt direkte i skålen med 50% EtOH i ca. 10 sekunder. Filtrene ble tatt opp av skålen med EtOH, overflødig EtOH på filtrene ble forsiktig tørket vekk med tørkepapir og filtrene ble lagt i skålen med dH₂O. Objektivglasset ble vasket med 50% EtOH før filtret ble tatt av skålen med dH₂O, tørket forsiktig og lagt tilbake på tilhørende objektivglass.

3.4.7 Farging av nitrocellulosefilter

Nitrocellulosefiltret tatt opp fra 24 brønnsplatene med pinsett og lagt i et metallkammer med tverrvegger. Filtrene ble lagt i rekkefølge for å kunne identifisere hvilket nitrocellulosefilter som tilhørte sitt respektive Nuclepore polykarbonat membranfilter, og hvor tverrveggen i kammeret separerte nitrocellulosefiltrene fra hverandre (se figur 3.4.1). Heamatoxylin (fargeløsning) og de andre løsningsene ble tilsatt i glassbeger, slik at metallkammeret kunne plasseres i løsningene. Veggene på metallkammeret besto av netting, slik at løsningen kom inn i kammeret, og kom i kontakt med filtrene/cellene. Det var totalt 12 steg i fargingen av overfiltret inkludert vaskestegene: (1) Kammeret med filtrene ble lagt i et glassbeger med haematoxylin, og (2) Kammeret ble overført til et nytt glassbeger med dH₂O. (3) Filtrene ble vasket i en propanolløsning med 70% propanol og 60µl HCl, og (4) ble på nytt lagt i et glassbeger med dH₂O. (5) Kammeret ble deretter overført til en 0,23M MgO₄/23,8mM NaHCO₃-løsning, og (6) renses med dH₂O. I steg 7-10 ble kammeret satt i beger med økende konsentrasjoner med propanol ; (7) 70% propanol, (8) 95% propanol, (9) og (10) to ganger 100% propanol. Tilslutt, steg (11-12), ble kammeret plassert i to glassbeger med NEO-CLEAR® (Xylen erstatte). Metallkammeret med filtrene var i alle løsningene i fire minutter hver.

Etter fargingen ble underfiltret plassert på objektglasset på en dråpe canadabalsam sammen med tilhørende overfilter (fra samme brønn). For å unngå uttørking av filtrene ble en dråpe med canadabalsam tilført både over- og underfilter, og et dekkglass over slik at glasset dekket begge filtrene.



Figur 3.4.1. Nitrocellulose filterne ble satt i kammer ved farging av filterne (bilde).

3.4.8 telling av celler på filtre

Antall adherente celler på filterne ble telt i lysmikroskop med rutenett. Arealet av rutenettet ble bestemt ved å bruke en okular måleskala i lysmikroskopet. På grunn av varierende grad av celler på filter ble 20 områder i hele rutenettet telt på hvert filter med 10x og 40x objektiv. Celletallet ble bestemt som gjennomsnittet av alle områdene på filtret, multiplisert med arealet av filtret dividert med arealet av rutenettet

(Gjennomsnitt celler på 20 områder $(\bar{X}) * \frac{\text{Areal av filter } (r^2 * \pi)}{\text{Areal av rutenett } (s^2)}$).

Tabell 3.4.2 viser faktorene som ble multiplisert med gjennomsnitt av 20 telte områder på filterne. Dette ble gjort for å få et estimat på hvor mange celler som befant seg på filterne.

Objektiv	Faktor
10X	268,1460396
40X	4484,198973

3.4.6 Kvantitativ analyse av migrerende celler

Antall celler som hadde migrert gjennom porene i overfiltret, og gjennom fibrin/matri-gelen, ble bestemt av antall celler på nitrocellulose filter (underfilter) dividert på antall celler på begge filterne. Antall migrerte celler ble angitt i prosent (%).

3.4.7 Estimering av adherente celler på filtre

Da cellene ble tilsatt til filtrene i 24-brønnsplaten ble det også applisert celler i to brønner uten filter. Dette ble gjort for å kunne kalkulere antall adhererende celler på filtrene. Cellene i brønner uten filter ble telt med partikkelteller i to paralleller, og celledetallet ble bestemt som gjennomsnittet av parallellene multiplisert med totalvolum cellesuspensjon. Siden arealet av brønnene var større enn arealet av filtrene, ble antall celler på begge filtrene multiplisert med en koeffisient for å kompensere for størrelsesforskjellen. Koeffisienten ble beregnet til 1.515 ved å dividere arealet av brønnen (201.062mm²) med arealet av filtret (132.732mm²). Antall adherente celler ble beregnet ved å dividere antall celler på begge filtre med antall celler i brønner uten filtrene ($\frac{\text{antall celler på begge filtre} * 1.515}{\text{Antall celler i brønn}}$).

3.5 Immunoblotting

Immunoblotting er en mye brukt metode for å separere og identifisere enkelte proteiner i celler. Immunoblotting eksperimenter kan deles inn i fem steg. (1) preparering av prøver (lysater), og separering av proteiner i prøvene med elektroforese. (2) overføring av proteinene til en membran. (3) blokkere den gjenværende bindingskapasiteten til membranen. (4) inkubasjon med antistoff, og (5) deteksjon av bundet antistoff med sekundær, merkede, antistoff (Towbin et al. 1989). Cellelysater ble brukt for å se etter indusering av Caspase-3 etter stimulering med ekstrakt fra *c. Sorokiniana*, og forbol 12-myristat 13-acetat (PMA) samt ionomycin (Io) som positiv kontroll for industert av apoptose. Proteinkonsentrasjonen i prøvene ble ikke målt siden celledetallet var likt i alle prøver. Resultatene fra MTT-viabilitet-assay ble brukt for kompensere for celledød i celler behandlet med algeekstraktene.

3.5.1 Prosedyre for preparering av lysater

Det ble platet ut $0.5 \cdot 10^6$ celler i 500 μ l suspensjon til hver brønn i en 24-brønnsplate (250 000 celler/ cm^2) dagen før stimulering. 24-brønnsplaten med cellene ble inkubert ved 37°C. Dagen etter ble cellene observert under lysmikroskop for å bekrefte at cellene hadde adherert til plastbunnen. Stimuleringen med algeekstraktet (CSEt og CSH) ble gjort direkte i brønnene med konsentrasjonene 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62.5 μ g/ml, samt en negativ kontroll (0 μ g/ml). Det ble også preparert en positiv kontroll, hvor apoptose ble induert på cellene med 50 ng/ml PMA og 1 μ g/ml I α . Cellene ble stimulert i 24-, 48- og 72 timer, med tre individuelle paralleller for hver prøve. Etter endt stimulering ble mediet i brønnene fjernet og 100 μ L av lysisbufferbruksløsning (og proteasehemmere) ble tilsatt i hver brønn. Cellene, i lysisbufferen, ble deretter inkubert 30 minutter på is. Etter inkuberingen ble lysatene overført til 1.5mL eppendorfrør og sentrifugert ved 21 130 x g i 15 minutter. Supernatanten fra sentrifugeringen (proteinene fra de lyserte cellene) ble overført til nye eppendorfrør (pelleten ble kastet). Prøvene ble denaturert ved å tilsette 1x samplebuffer (med 10% 2-mercaptoetanol) samt oppvarming av lysatene ved 100°C i fem minutter, før de ble applisert til polyakrylamid gelen. 2-mercaptoetanol i sample bufferen bryter disulfid bindinger i proteinene i prøven og bidrar med netto negativ ladning i proteinene. Alle lysatene ble preparert før elektroforese steget, og oppbevart i fryser ved -20°C.

3.5.2 Prosedyre for SDS-PAGE

Den sparerende- og konsentrerende gelen ble blandet i henhold til tabell 2.5.5 i materialer. Separeringsgelen (10% polyakrylamid) ble tilsatt til 2/3 av støpeformen, og gelen hadde polymerisert etter ca. 30 minutter. Deretter ble den konsentrerende gelen (4% polyakrylamid) tilsatt på toppen av den polymeriserte separeringsgelen. Brønnene ble støpt ved en kam plassert på toppen av støpeformen. Etter at den konsentrerende gelen hadde polymerisert, ca. 10 minutter, ble brønnene vasket med bruksløsning 1x elektroforesebuffer og gelene satt i elektroforesekammeret. Kammeret ble tilsatt 1x elektroforesebuffer mellom gelene slik at bufferen var i kontakt med brønnene. Det ble også tilsatt elektroforesebuffer på utsiden av gelene i kammeret. Prøvene ble tilsatt i brønnene på gelen samt en proteinstandard (precision plus protein

dual color) molekylvektreferanse. Elektroforeseapparatet ble satt på 20mA for hver gel. Apparatet ble slått av da de blå båndene (fenolblått) fra samplebufferen hadde nådd motsatt ende fra brønnene på gelen. Støpeformene på gelen ble deretter demontert, og den konsentrerende gelen ble kuttet av separeringsgelen. Proteinene i gelen var nå separert etter molekylvekt på gelen, og gelen ble deretter lagt i transfer buffer for å klargjøre til å overføre proteinene til PVDF-membran.

3.5.3 Blot

Etter proteinene er separert i polyakrylgelen, er neste steg å overføre proteinene fra gelen til en membran. Selve proteinoverføringen fra polyakrylamid gelen til membranen blir gjort i et elektriskfelt som står vinkelrett på overflaten til gelen. Proteinoverføringen i denne oppgaven ble gjort ved semi-tørre forhold. PVDF-membranen sammen med gelen og bufferpapir settes sammen til en sandwich. For å oppnå klare bilder i et Western blot er det viktig å eliminere alle luftlommer mellom membran og gel, samt plasseringen av membranen i forhold til ladningen. Membranen skal være plassert mellom gelen og den positive elektroden (Mahmood & Yang 2012).

PVDF-membranen ble aktivert i metanol før overføring (i ca. 15 sekunder), deretter ble membranen vasket i dH₂O (i ca. 2 minutter) og satt i et kar med bruksløsning av transferbuffer (i ca. 10 minutter). Membran og gel ble lagt sammen med bufferpapir i oppsettet: 4x fiberpapir, membran, gel og 4x fiberpapir. Membran og filter sammen med bufferpapir ble deretter lagt på semi-tørr proteinoverfører med PVDF-membranen rettet mot den positive elektroden (rød side). Områdene på proteinoverføreren som ikke var dekket med membran/gel/bufferpapir ble dekket med tilpasset transparent film. Det ble det brukt en strøm på 60mA pr. membran, med en varighet på ~60 minutter. Dersom overføringen ble tørr før 60 minutter, ble apparatet tilsatt mer transferbuffer.

3.5.5 Immunodeteksjon

For immunoblottet ble Caspase-3 Kanin polyklonal IgG brukt som primærantistoff for å detektere caspase-3 på PVDF-membranen. Etter proteinoverføringen ble membranen

tilført i et kar med 5%melk/Tris-buffer-saline (TBS)-tween20-løsning (5% melk/TBST) for å blokkere membranen. Membranen ble blokkert i én time på rolig risting. Deretter ble primærantistoffet caspase-3 kanin polyklonal IgG tilført 5% melk/TBST-løsningen i 1:1000 fortykning. Membranen sammen med primærantistoffet ble satt på risting ved 4°C til dagen etter.

Etter inkubasjonen med primærantistoffet ble membranen vasket med TBST fire ganger i 15 minutter. Sekundærantistoffet, geit anti-kanin IgG (HRP-konjungert), ble fortennet 1:5000 i 5% melk/TBST å satt til karet med membranen. Deretter ble karet satt på rotator i én time. Etter inkubasjonen ble membranene vasket ytterligere fire ganger 15 minutter med TBST før tilsetting av 3ml Luminata classico Western HRP substrat.

β -actin ble brukt som proteinmengde kontroll til prøvene på gelen og membranen. Samme prosedyre ble fulgt for immunoblot med β -actin som for caspase-3. Derimot ble primærantistoffet β -actin kanin IgG fortennet 1:10000 i 5% melk/TBST-løsning. Sekundærantistoffet ble tilsatt på membranene i 1:5000 fortykning.

Bildene fra immunoblot ble fremkalt i Azure c400 – "visible fluorescent western blot imaging system" med 3 minutter eksponeringstid.

3.6 Statistikk

Resultatene fremstilles i tabell, linje- og søylediagram. Forsøkene ble gjort i paralleller hvor $n = 5$, $n = 4$, $n = 3$ eller $n = 1$. Statistiskeformler som ble benyttet til behandling av data er følgende:

$$\text{Gjennomsnitt: } \bar{X} = \frac{\sum_i X_i}{n}$$

$$\text{Standardavvik: } S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

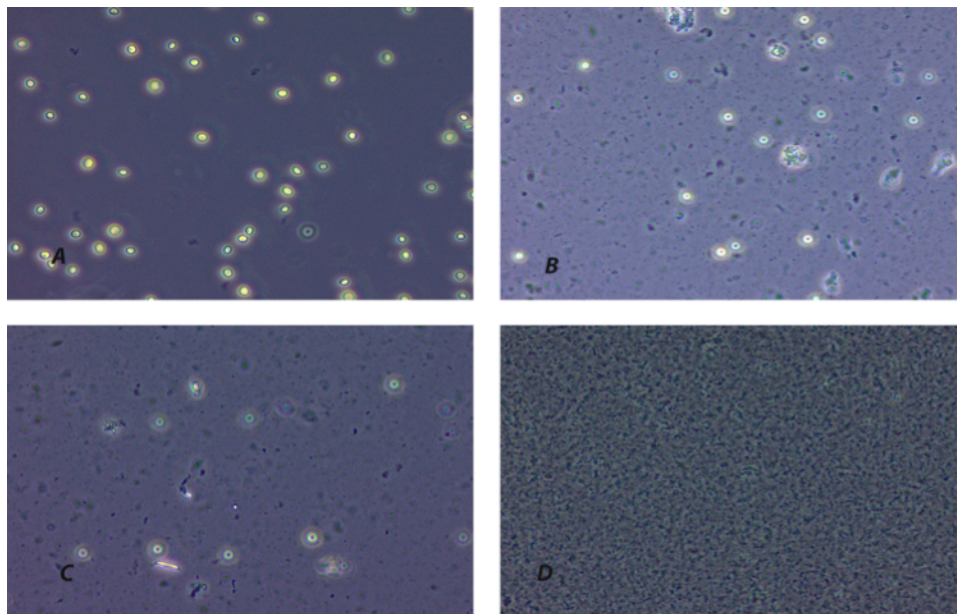
$$\text{Standardfeil: } SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

MiniTab (programvare) ble benyttet for å beregne P-verdiene til resultatene med "General linear model" ANOVA prosedyre.

Kapittel 4: Resultater

4.1 Ekstrahering av *Chlorella sorokiniana*

Før arbeidet med cellelinjene måtte grønnalgen *C. Sorokiniana* ekstraheres. Algene ble først knust med glasskuler og satt på risting 6 x g. Figur 4.1 viser bilder fra lysmikroskop av algene, før og etter knusing med glasskuler. På grunn av uønsket DMSO-konsentrasjoner (løsningsmidlet) i ekstraktene, ble ekstraksjonsarbeidet gjort i flere omganger. I den siste ekstraksjonsomgangen ble algebiomassen sammen med DMSO lagt på ultralyd varmebad. Utvinningen av mg biomasse pr. ml DMSO er presentert i tabell 4.1.1.



Figur 4.1.1. Viser bilder av *Chlorella sorokiniana* (ekstrahert med dH_2O) før og etter knusing av cellene med 0,5mm glasskuler. Bilde (A) er tatt av cellene før knuseprosessen, og bilde (B), (C) og (D) er etter henholdsvis én, to og tre omganger med knusing av cellene (foto av H.C Hansen)

Algeekstraktene skulle brukes videre for å se om de hadde noen effekt på celleviabiliteten, migreringsevne eller om de induserer apoptose i cellelinjene. For å kunne utelukke DMSO som en påvirkningsfaktor i forsøkene med algeekstraktene og cellelinjene, var det hensiktsmessig å oppnå høy biomassekonsentrasjon per ml DMSO. Behandlingen av algeekstraktene med ultralyd varmebad resulterte i mer biomasse per ml DMSO for begge ekstraktene. Utvinningen av biomasse per ml DMSO i ultralyd/varmebad-behandlet CSEt-ekstrakt ga en ~8,7 ganger økning sammenlignet med CSEt-ekstrakt som ikke ble ultralyd/varmebehandlet. Det samme ble observert i CSH-ekstraktene, hvor ultralyd behandlingen ga en økning på ~7,7 ganger høyere biomasseutvinning (Konsentrasjoner (mg/ml) er presentert i tabell 4.1.1).

Tabell 4.1.1. Oppnådd konsentrasjon av algeekstrakt fra første- (ingen ultralyd behandling) og andre (ultralydbehandlet) ekstraksjonsomgang. Konsentrasjonen er gitt i mg biomasse/ml DMSO.

Ekstrakter fra <i>C. sorokiniana</i> (ikke ultralyd behandlet)	
Ekstraksjonsmiddel	Konsentrasjon (mg/ml)
EtOH	13,4
dH₂O	19,2
Ekstrakter fra <i>C. sorokiniana</i> (Ultralyd behandlet)	
EtOH	117,2
dH₂O	147,8

I tillegg til CSEt- og CSH-ekstraktene ble det også lagd ekstrakter av *C. sorokiniana* som hadde produsert hydrogen (stresset *C. sorokiniana*). Konsentrasjon (mg/ml) av disse ekstraktene er presentert i tabell 4.1.2.

Tabell 4.1.2. Oppnådd konsentrasjon av sCSEt og sCSH.

Stresset <i>C. sorokiniana</i> ekstraksjon	
Ekstraksjonsmiddel	Konsentrasjoner (mg/ml)
EtOH	236,8
dH ₂ O	117,9

På grunn av høyere oppnådd biomassekonsentrasjon i ultralyd-behandlet algeekstrakt, ble disse ekstraktene brukt videre i forsøk med cellelinjene. I forsøkene ble det benyttet en to-folds titreringsrekke av ekstraktene, hvor 500 µg/ml var den høyeste konsentrasjonen (fortynnet i RPMI-medium), og hvor DMSO-mengden i fortynningene tilsvarte mengden tilsatt algeekstrakt i RPMI-medium. I tabell 4.1.3 er volumprosenten av DMSO i algeekstraktfortynningene angitt, og DMSO-toleransen til cellelinjene som ble brukt i forsøkene er presentert i figur 4.3.1

Tabell 4.1.3. Viser konsentrasjonene (venstre kolonne) som ble anvendt i forsøkene med algeekstraktene på cellelinjene. Verdiene representerer volumprosent av DMSO, korresponderende med algeekstraktkonsentrasjonen.

Konsentrasjon	CSEt	CSH	sCSEt	sCSH
500 µg/ml	**0,43%	0,34%	0,21%	0,42%
250 µg/ml	0,21%	0,17%	0,11%	0,21%
125 µg/ml	0,11%	0,08%	0,05%	0,11%
62,5 µg/ml	0,05%	0,04%	0,03%	0,05%
*31,25 µg/ml	0,03%	0,02%	0,01%	0,027%
*15,125 µg/ml	0,01%	0,01%	0,007%	0,013%

* Disse konsentrasjonene ble kun benyttet i MTT-viabilitet-assay

** Høyeste DMSO-konsentrasjon i algeekstraktfortynning som ble brukt i forsøkene med cellelinjene.

4.2 MTT-viabilitets assay

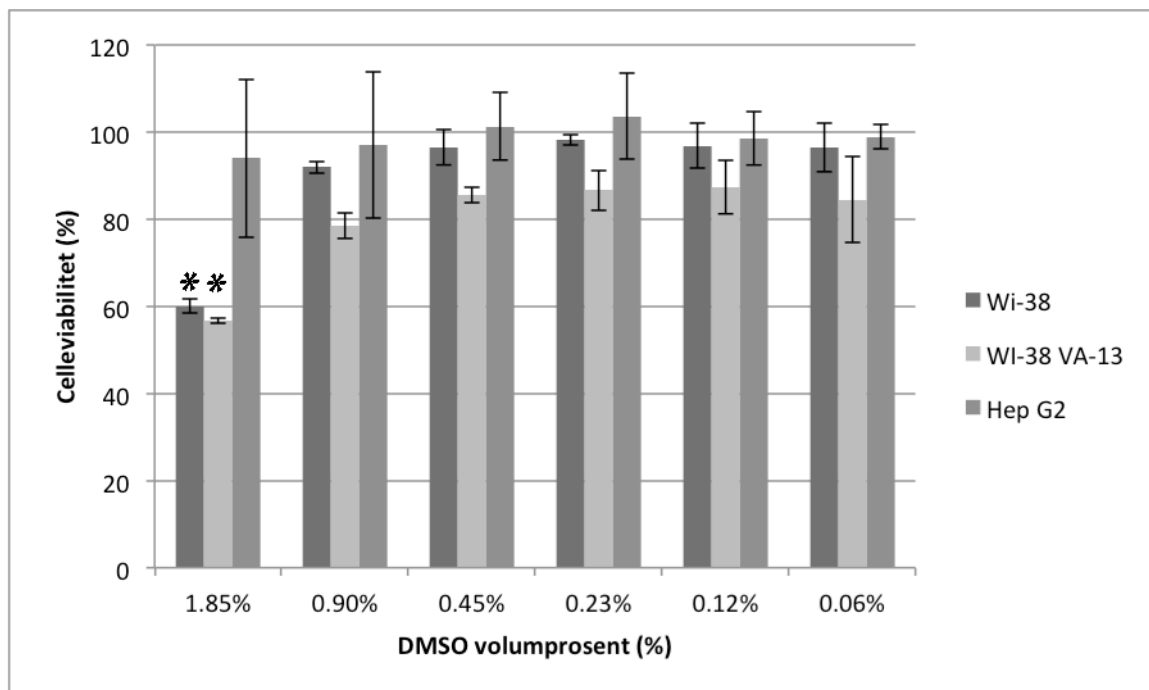
For å undersøke om algeekstraktene hadde cytotoxisk effekt på cellene, ble MTT-viabilitet-assay brukt for å måle viabiliteten til cellene under påvirkning av algeekstraktene. Cellene (Hep G2, WI-38 og WI-38 VA-13) ble sådd ut i 96-brønnsplater

og inkubert ved 37°C og 5% CO₂. Algeekstraktfortynningene ble tilsatt dagen etter utsåingen.

På grunn av sterk pigmentering (farge) i algeekstraktene ble det utført OD-målinger (ved 620nm) på alle Algeekstraktfortynningene (CSEt- og CSH-ekstraktene) og RPMI-medium uten celler. Dette ble gjort for at eventuelle høye OD-målinger ikke skulle skyldes pigmentering i ekstraktene. MTT-reaktantene ble tilført med samme prosedyre og betingelser som i MTT-viabilitet-assay forsøkene med cellelinjene. De høyeste konsentrasjonene av algeekstraktene, mest fremtredende i CSEt-fortynningene, ga store nok utslag på OD-målingene til at det ville gitt feil i beregningen av viabilitetsprosenten ved disse konsentrasjonene. Derfor ble OD-målingene fra algeekstraktene subtrahert fra OD-målingen i forsøkene med celler og korresponderende algeekstraktkonsentrasjon.

4.2.1 DMSO kontroll

Siden algeekstraktene var løst i DMSO var det derfor nødvendig å undersøke om DMSO-konsentrasjonen i algeekstraktfortynningene påvirket celleviabiliteten i MTT-viabilitets forsøkene. Det ble lagd en fortynningsrekke på henholdsvis 1,85%, 0,9%, 0,45%, 0,23%, 0,12% og 0,06% med DMSO fortynnet i RPMI-medium. DMSO-konsentrasjonene som ble benyttet i forsøkene tilsvarer DMSO-mengden i algeekstraktene som ikke ble ultralyd-varmebehandlet. Resultatene fra disse forsøkene ble brukt for å se om DMSO-konsentrasjonen i de nye algeekstraktene lå innenfor toleransegrensen til cellelinjene. Dersom DMSO-konsentrasjonen i algeekstraktene lå innenfor der hvor det ikke ble observert en signifikant nedgang i celleviabilitetsprosenten i DMSO-kontrollene, ville DMSO i algeekstraktene bli avskrevet som en påvirkningsfaktor i MTT-viabilitets forsøkene med algeekstraktene. Resultatene fra viabilitet-forsøket med DMSO-fortynninger er presentert i figur 4.2.1.



Figur 4.2.1. MTT-viabilitets assay av cellelinjene: WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2 med forskjellige konsentrasjoner med DMSO. Celler ble sådd i 96-brønns plater (tripletter av hver DMSO-konsentrasjon) dagen før de ble tilsatt DMSO. OD-målinger (ved 620nm) ble utført på "Sunrise Absorbance Reader" 48 timer etter cellene ble tilsatt DMSO. Celleviabilitetprosenten (Y-aksen) ble beregnet ved å dividere OD-målinger fra hver prøve (gjennomsnitt av trippletter) med kontrollprøvene (brønner uten DMSO), for deretter å multiplisere med 100 (kontrollen er ikke vist i figuren). Det ble gjennomført tre forsøksparalleller (n=3) for hver prøve. Standardfeil (SE) er beregnet utfra forsøksparallellene og vist som linjer på stolpediagrammene i figuren. Det ble anvendt tre forsøksparalleller for hver prøve, og en p-verdi < 0,05 blir ansett som statistisk signifikant. Kontrollene er ikke presentert i figuren.

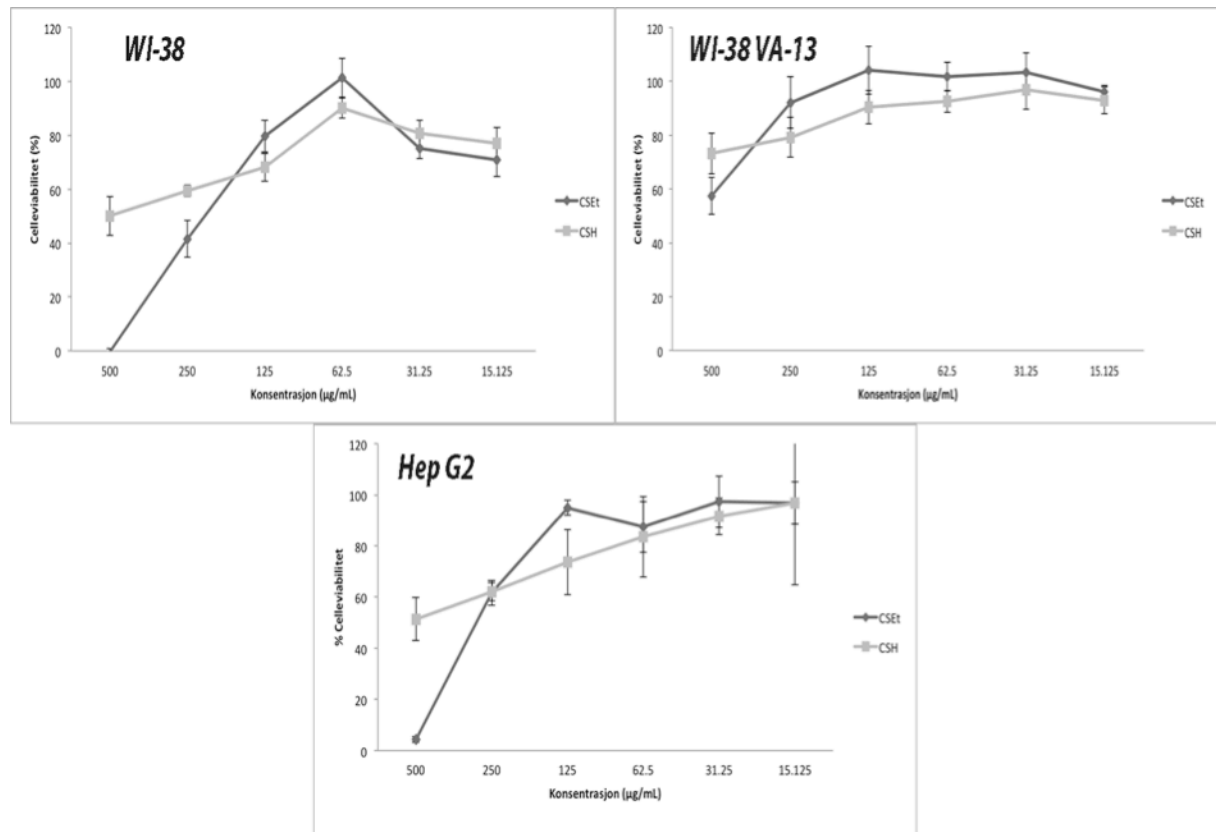
* ($P < 0,05$)

Fra DMSO-fortynningene 0,9% til 0,06% ble det ikke observert noen signifikant forskjell i celleviabiliteten for noen av cellelinjene (WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2). Ved den høyeste konsentrasjonen, 1,85% DMSO, ble det observert en reduksjon i celleviabiliteten til cellelinjene WI-38 og WI-38 VA-13 (henholdsvis p-verdi = 0,000 og p-verdi = 0,002) sammenlignet med 0,9% DMSO. Det ble imidlertid ikke observert noen signifikant forskjell mellom DMSO-konsentrasjonene innenfor intervallet 0,9% – 0,06% for de samme cellelinjene. Dette tyder på at DMSO-toleransen til alle cellelinjene er innenfor konsentrasjonsintervallet 0,9% - 0,06%, og Hep G2-cellelinjen tolererer en DMSO-konsentrasjon større enn 1,85% DMSO.

4.2.3 MTT-viabilitets-assay i med CSEt stimulerede celler (WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2)

I forsøkene med MTT-viabilitets-assay ble cellene tilsatt i 96-brønnsplater og tilsatt CSEt og CSH i en to-folds titreringsrekke (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml og 15,125 µg/ml). Resultatene fra MTT-assay er presentert i figur 4.2.2.

MTT-viabilitets-assay med CSEt og CSH



Figur 4.2.2. Viser celleviabilitet i WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2. Cellene ble inkubert med forskjellige konsentrasjoner med CSEt (mørk linje i figur) og CSH (lys linje i figur). Prøvene ble analysert i ELISA-reader (OD-målinger) og resultatene ble beregnet fra triplikater, og totalt tre forsøksparalleller ble gjennomført for hver cellelinje (n=3). Resultatet er presentert i prosent, og standardfeil (SE) er presentert som loddrettelinjer i grafen. Kontroll prøvene (celler uten tilført algeekstrakt) var referansen for 100% celleviabilitet. Y-aksen viser celleviabilitet (%), mens X-aksen viser konsentrasjonen med algeekstrakt (CSEt og CSH).

Den laveste celleviabilitetsprosenten ble observert ved den høyeste konsentrasjonen av CSEt (500 µg/ml), som var én gjennomgående observasjon for alle cellelinjene. For WI-38 ble celleviabilitetsprosenten beregnet til -0,4% (0%) og Hep G2 cellelinjene til 4,3%. Viabilitetsprosenten observert hos WI-38 VA-13, ved 500 µg/ml CSEt, var derimot høyere sammenlignet med WI-38 og Hep G2, og ble beregnet til 57,5%.

Hos WI-38 cellene økte celleviabilitetsprosenten gradvis ved lavere konsentrasjoner med CSEt, hvor det ved 250 µg/ml-fortynning og 125 µg/ml ble beregnet henholdsvis til 58,5% og 85,3%. Deretter økte celleviabiliteten til 95,6% i fortynningen 65,5 µg/ml. Det ble imidlertid observert noe nedgang i celleviabiliteten ved konsentrasjonene 31,25 µg/ml og 15,125 µg/ml, 89,7% og 87% respektive. De transformerte lungefibroblastene (WI-38 VA-13) viste en høyere toleranse for CSEt-ekstraktene sammenlignet med både WI-38 og Hep G2. Fra 57,5% celleviabilitet ved 500 µg/ml økte celleviabiliteten til henholdsvis 92,1% og 104,1% (100%) ved konsentrasjonene 250 µg/ml og 125 µg/ml. Ved de etterfølgende CSEt-fortynningene (65,2 µg/ml, 31,25 µg/ml og 15,125 µg/ml) ble det ikke observert noen nevneverdige endringer i celleviabiliteten. I Hep G2 cellelinjen økte derimot celleviabiliteten fra 4,3% (500 µg/ml CSEt) til 61,7% ved 250 µg/ml. Deretter økte viabiliteten til, og holdt seg ved, nærme 100% fra konsentrasjonene 125 µg/ml, 65,2 µg/ml, 31,25 µg/ml og 15,125 µg/ml.

4.2.4 MTT-viabilitets-assay i med CSH stimulerter celler (WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2)

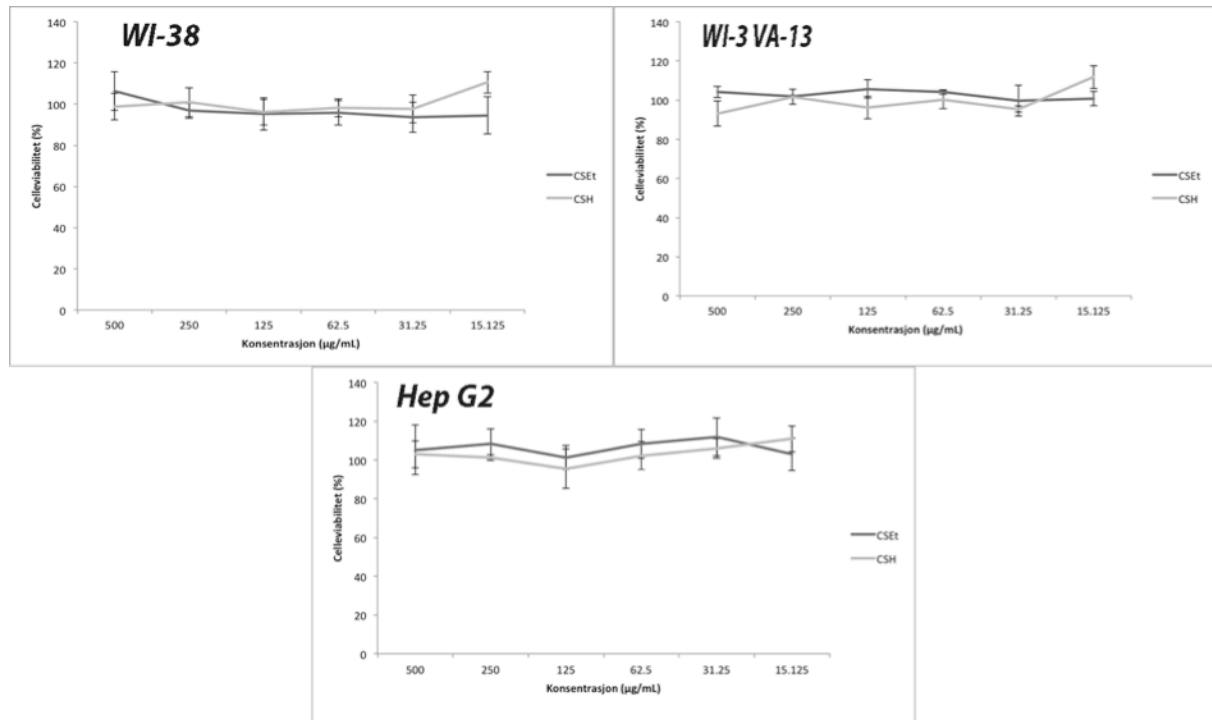
Viabiliteten til cellelinjene ble i mindre grad påvirket av CSH-ekstraktene sammenlignet med CSEt-ekstraktene. Derimot ble det observert en reduksjon i celleviabilitet ved de høyeste konsentrasjonene (500 µg/ml, 250 µg/ml og 125 µg/ml). Viabiliteten til lungefibroblastene (WI-38) ble beregnet til 50,1%, 59,5% og 68,1% ved 500 µg/ml, 250 µg/ml og 125 µg/ml respektive. Deretter økte viabilitetsprosenten til ~90% ved 62,5 µg/ml og en nedgang til 77,1% ved 15,125 µg/ml. I likhet med CSEt-ekstraktene hadde WI-38 VA-13 cellelinjen høyere toleranse for CSH-ekstraktene sammenlignet med de andre cellelinjene. Det var kun den høyeste konsentrasjonen (500 µg/ml) av CSH-ekstraktene som ga utslag på celleviabiliteten, hvor den ble beregnet til 73,3%. Ved de andre konsentrasjonene lå viabiliteten rundt 100%. I Hep G2 cellene ble det beregnet en celleviabilitet på 51,4% ved 500 µg/ml CSH-ekstrakt. Celleviabiliteten økte deretter til 62%, 74% og 84% ved henholdsvis 250 µg/ml, 125 µg/ml og 62,5 µg/ml. Ved 31,25 µg/ml og 15,125 µg/ml ble celleviabiliteten beregnet til ~100%.

4.2.5 MTT-viabilitet-assay med sCSEt og sCSH

MTT-viabilitet-assay ble også brukt for å undersøke om ekstrakt fra alger som hadde blitt brukt til hydrogenproduksjon (sCSEt og sCSH), ga et annet utslag på cellelinjene, sammenlignet med algeekstrakt med optimale vekstbetingelser. Ekstrakter med stressinduserte alger ble fortynnet til samme konsentrasjoner som ble brukt til forsøksoppsettet med CSEt og CSH (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml 31,25 µg/ml og 15,125 µg/ml), og MTT-viabilitet-assay-forsøket på cellene ble utført under samme vekstbetingelser som cellene inkubert med ekstrakt fra alger med optimale vekstbetingelser. Resultatene fra forsøkene med sCSEt og sCSH er presentert i figur 4.2.3.

Ved å sammenligne resultatene fra MTT-viabilitet-assay i tabell 4.2.2 (CSEt og CSH) og 4.3.3 (sCSEt og sCSH) er det tydelige forskjeller mellom ekstraktene. Der hvor de høyeste konsentrasjonene med CSEt og CSH ga tydelig reduksjon i celleviabiliteten, var det ingen av konsentrasjonene, med verken sCSEt eller sCSH, som ga noen observerbar effekt på viabiliteten til noen av cellelinjene.

MTT-viabilitets-assay med sCSEt og sCSH



Figur 4.2.3. Viser celleviabilitet i WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2. Cellene ble stimulert ved forskjellige konsentrasjoner med sCSEt (mørk linje i figur) og sCSH (lys linje i figur). Prøvene ble analysert i ELISA-reader (OD-målinger) og resultatene ble beregnet av triplikater, og totalt tre forsøksparallelleler for hver cellelinje ($n=3$). Resultatet er presentert i prosent, og standardfeil (SE) er presentert som linjer i grafen. Kontroll prøvene (celler uten tilført algeekstrakt) var referansen for 100% celleviabilitet. Y-aksen viser celleviabilitet (%), mens X-aksen viser konsentrasjonen med algeekstrakt (sCSEt og sCSH).

4.3 Migrasjons assay

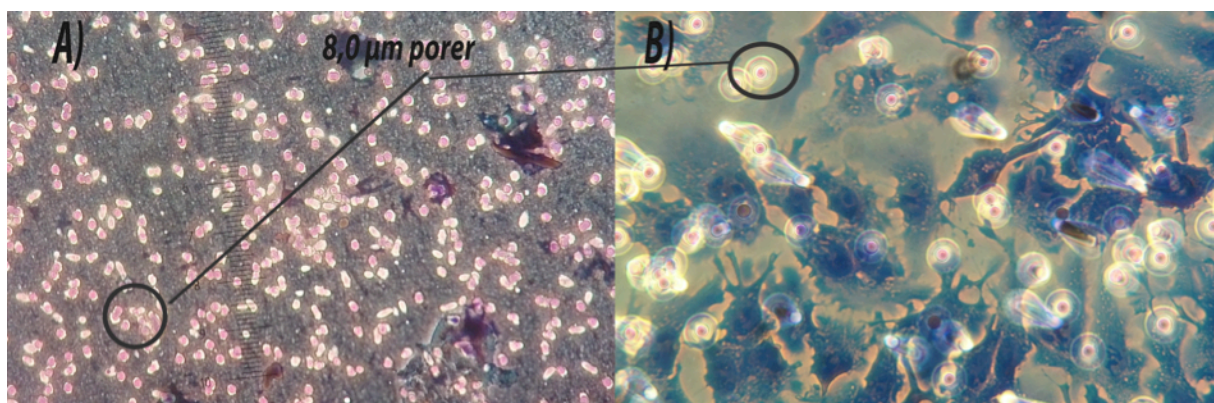
MTT-viabilitet-assay viste at algeekstraktene påvirket celleviabiliteten ved høye konsentrasjoner av CSEt- og CSH-ekstraktene. Deretter skulle det undersøkes om algeekstraktene inhiberte migrasjon av Hep G2 gjennom isolerte basalmembraner (fibringel og Matrigel) *in vitro*. Cellene ble først sådd i 24-brønnsplater (12 500 celler/cm²) og deretter tilsatt algeekstrakt (CSEt og CSH) i fire forskjellige konsentrasjoner: 500, 250, 125 og 65,5 µg/ml. Etter tilsetting av algeekstrakt ble cellene lagt i inkubasjonsskapet i 20 timer (ved 37°C og 5% CO₂). Alle resultatene fra migrasjons assay forsøkene med fibrin- og matrigel er samlet og presentert i tabell 4.3.2.

4.3.1 Celleadhesjon til kollagendekket membranfilter og membran filter uten kollagen

I de første forsøkene med migrasjon assay ble det brukt metallisk-Natrium-metanol etset Nuclepore polykarbonat membranfilter som overfilter i forsøksoppsettet. På grunn av få celler som adhererte til disse membranfiltrene, ble hydrofile polykarbonat membranfiltre fra Merck Millipore brukt som erstatning. Antall adherente celler på de nye polykarbonat membranfiltrene (med 8.0 μm porer) ga imidlertid heller ikke tilfredsstillende resultat. For å øke celleadhereringen til filtrene, ble de dekket med kollagen. En sammenligning av polykarbonat membranfilter med og uten tildekking av kollagen er presentert i tabell 4.3.1.

Tabell 4.3.1. Viser antall adherente celler på membranfilter tildekket med kollagen og uten kollagen. Forsøkene ble utført i to paralleller for hver filtertype ($n=2$), hvor antall adherente celler på filtrene (gjennomsnitt) og standardfeil ($\pm\text{SE}$) er beregnet fra parallellene.

Type filter	Antall celler på membranfilter uten kollagen ($\pm\text{SE}$)	Antall celler på membranfilter tildekket med kollagen ($\pm\text{SE}$)
Membranfilter (overfilter)	1600 \pm 770,9	7380 \pm 20,11

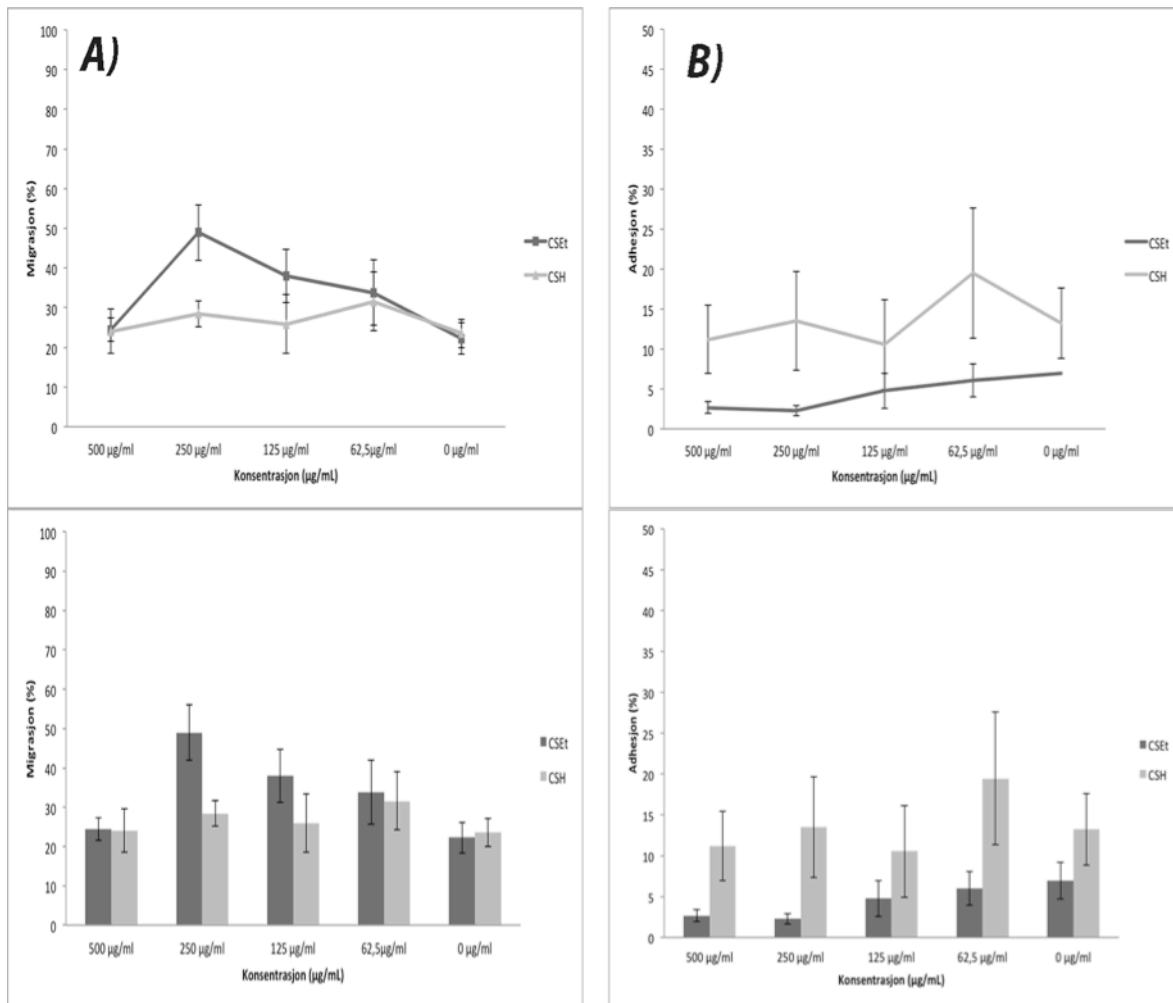


Figur 4.3.1. Bilde av adherente Hep G2 på Nuclepore polykarbonat membranfilter etset med metallisk natrium-metanol løsning(A), og (B) ferdig stanset polykarbonat membranfilter tildekket med kollagen. Bilde (A) er tatt med 10x objektiv og (B) med 40x objektiv på grunn av høyere celledetthet (foto tatt H.C Hansen og J.S Mikkelsen).

Tildekking med kollagen ga ~4,6 ganger flere adherente celler på polykarbonat membranfiltrene sammenlignet med filtre som ikke var dekket med kollagen. Bilde i figur 4.3.1 viser sammenligningen mellom filtrene, hvor cellene er farget (blått) med Geimsa stain. Grunnet økningen i adherente celler på kollagendekket polykarbonat filtre, ble disse filtrene valgt å bli brukt videre i forsøkene med migrasjons assay.

4.3.2 Migrasjons assay med fibringel

I migrasjons-assay-forsøkene med fibringel skulle Hep G2 cellenes evne til å migrere gjennom fibringel i påvirkning av algeekstraktene undersøkes (CSEt og CSH). Andel migrerte Hep G2 celler til hvert filteroppsett ble beregnet ved å telle celler på nitrocellulosefiltrene (underfilter) og dividere med totalt antall celler på polykarbonatfiltret (overfiltret) og nitrocellulosefiltret. Da cellene ble tilsatt i brønnene (24-brønnsplate) med filtre, ble samme antall (12 500 celler/cm²) celler tilsatt brønner uten filtre (adhesjonskontrollen). Cellene i adhesjonskontrollen skulle videre brukes til å kalkulere hvor mange av cellene som hadde adherert til filtret av de som ble tilsatt til brønnene. Cellene i adhesjonskontrollen ble telt med partikkelteller, og celletallet ble deretter brukt som referanse for hvor mange av cellene som hadde adherert til filtrene av de som hadde blitt tilsatt. Resultatene fra migrasjons assay forsøkene er presentert i figur 4.3.2 og 4.3.3 og oppsummert i tabell 4.3.2.



Figur 4.3.2. Viser resultatene fra migrasjons assay med fibrin som proteingel. (A) er resultatene fra migrasjons assay med Hep G2 under påvirkning av CSEt (mørk linje i figuren) og CSH (lys linje i figuren). diagrammet under figuren (A) er de samme resultatene som i grafen representert som stolpediagram. Y-aksen representerer prosent av celler som ble observert på nitrocellulosefiltret (underfiltret) av celler som adhererte til begge filtrene, og x-aksen viser konsentrasjonen av algeekstrakt (henholdsvis 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml og 0 µg/ml). (B) viser antall celler (%) som adhererte til begge filtrene i forhold til adhesjonskontrollen. I likhet med resultatene fra migrasjonsforsøket representerer de mørke linjene celler som ble stimulert med CSEt og de lyse linjene CSH. Y-aksen representerer prosentandelen (%) celler som adhererte til begge filtrene i forhold til adhesjonskontrollen, og x-aksen algeekstrakt konsentrasjonene. Stolpediagram av antall adherente celler er vist under graf (B). Standardfeil (SE) er vist i figuren som loddrett linje på grafen og stolpediagrammene. Migrasjons % og adherering % er beregnet fra fem forsøksduplikater (n=5) med to paralleler i hvert forsøksparallell. En p-verdi <0,05 blir ansett som statistisk signifikant.

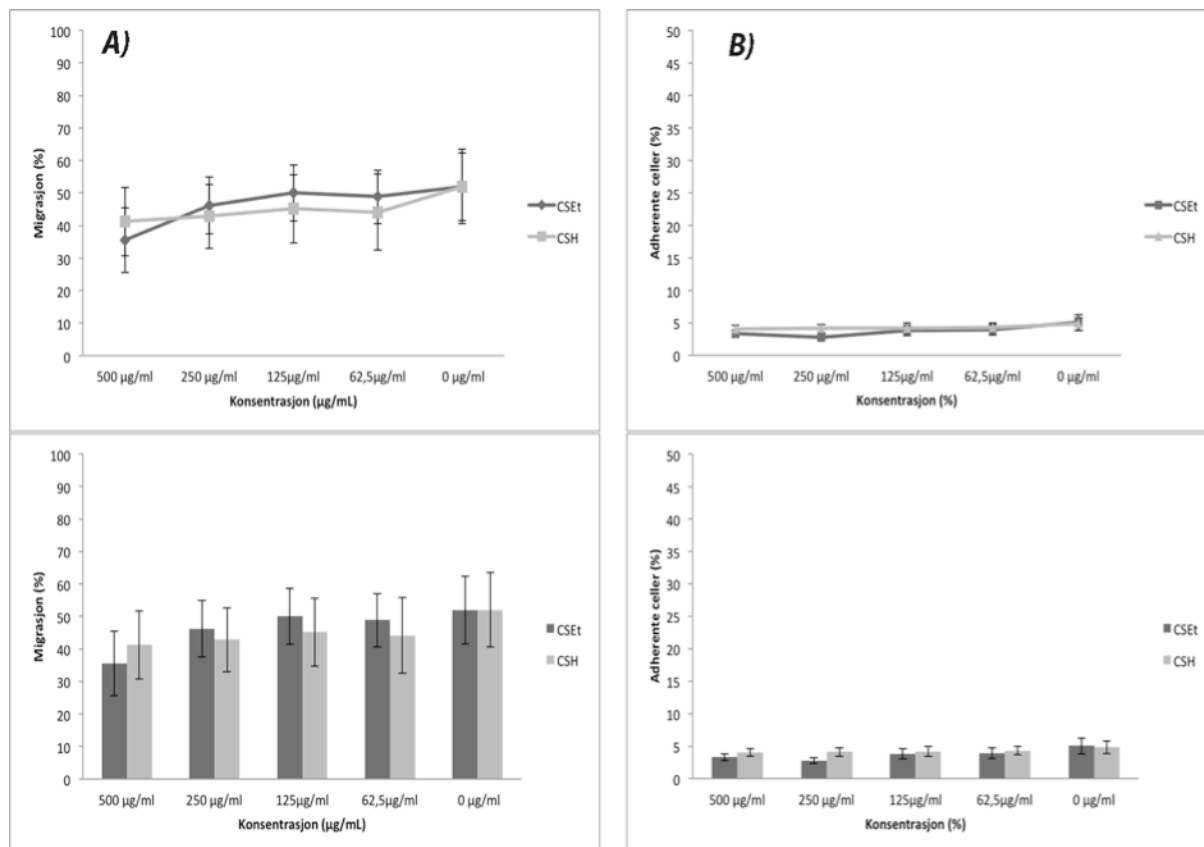
Sammenligning av alle konsentrasjonene med CSEt ga en p-verdien på 0,037, som tilsier en signifikant forskjell (p-verdi < 0,05) av andel migrerte celler. Ved å sammenligne konsentrasjonene 500 µg/ml, 125 µg/ml, 65,5 µg/ml og kontrollen ble p-verdien

beregnet til 0,219, noe som tilsier at forskjellene ikke er signifikante. Derimot ved å sammenligne celler stimulert med 250 µg/ml CSEt med kontrollen ble p-verdien beregnet til 0,010. 250 µg/ml CSEt-ekstrakt ble identifisert som konsentrasjonen som ga signifikant forskjell på migreringsprosenten til cellene. Ved å se på grafen (A) i figur 4.3.2 kan det observeres en økning i migrasjonsprosenten fra 500 µg/ml til 250 µg/ml, deretter reduseres migreringsprosenten mot kontrollen. 250 µg/ml CSEt var den eneste konsentrasjonen som ga signifikant forskjell i migrasjonsprosenten. I forsøkene med CSH-behandlede Hep G2 var det ingen av konsentrasjonen som påvirket migrasjonsprosenten..

Adhesjon av celler på filtrene i prosent er presentert i figur 4.3.2 (B). I utgangspunktet burde kontrollprøvene (0 µg/ml) for celler behandlet med CSEt og CSH ha tilnærmet lik prosentandel adherente celler. Derimot ble det observert færre andel adherente celler på kontrollprøven for CSEt sammenlignet med kontrollen for CSH (se tabell 4.3.2). Samme celleduspensjon ble brukt for å tilsette celler i forsøksoppsettet for CSEt- og CSH-behandlet celler samt adhesjonskontrollene. Det ble imidlertid ikke observert signifikant forskjell i adhesjonsprosenten mellom konsentrasjonene innbyrdes i algeekstraktene, hvor p-verdien for CSEt ble beregnet til 0,278 og p-verdi på 0,836 for CSH-ekstraktene.

4.3.4 Migrasjons assay med Matrigel

Ut i fra migrasjons assay forsøkene med fibrinigel, var det kun celler stimulert med 250 µg/ml CSEt-ekstrakt som viste signifikant forskjell i migrasjonsprosenten (økning i prosent migrerte celler). Videre skulle påvirkningen av algeekstraktene på Hep G2 cellenes migreringsevne gjennom matrigel undersøkes. Resultatene fra migrasjons assay forsøket med matrigel er presentert i figur 4.3.3 og i tabell 4.3.2.



Figur 4.3.3. Viser resultatene fra migrasjons assay med Matrigel som basalmembran (proteingel). (A) er resultatene fra migrasjons assay med Hep G2 i påvirkning av CSEt (mørk linje i figuren) og CSH (lys linje i figuren) diagrammet under figuren (A) er de samme resultatene som i grafen presentert som stolpediagram. Y-aksen representerer prosent av celler som ble observert på nitrocellulosefiltret (underfiltret) av celler som adhererte til begge filterne, og x-aksen viser konsentrasjonen av algeekstrakt (henholdsvis 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml og 0 µg/ml). (B) viser antall celler (%) som adhererte til begge filterne i forhold til adhesjonskontrollen. De mørke linjene representerer CSEt-behandlet Hep G2 og de lyse linjene CSH-behandlet Hep G2. Y-aksen representer prosentandelen (%) celler som adhererte til begge filterne i forhold til adhesjonskontrollen, og x-aksen algeekstrakt konsentrasjonene. Stolpediagram av antall adherente celler er vist under graf (B). Standardfeil (SE) er vist i figuren som loddrett linje på grafen og stolpediagrammene. Migrasjons % og adherering % er beregnet fra fem forsøksduplikater (n=5) med to paralleller i hver forsøksparallel. En p-verdi <0,05 blir ansett som statistisk signifikant.

Ved å sammenligne resultatene fra celler stimulert med forskjellige konsentrasjoner med CSEt-ekstrakt ga ingen av konsentrasjonene statistisk signifikant forskjell. Det ble verken observert noen økning eller redusering i migrasjonsprosenten gjennom Matrigel (P-verdi = 0,467). Ved å se på resultatene i tabell 4.3.3 kan det likevel observeres en moderat økning i antall migrerte celler fra CSEt-behandlede Hep G2 ved 500 µg/ml til 250 µg/ml. Prosentandelen celler behandlet med 500 µg/ml som migrerte gjennom

Matrigel ble beregnet til $36\% \pm 9,9\%$, og økte gradvis etter lavere konsentrasjoner av CSEt til henholdsvis, $46\% \pm 8,6\%$, $50\% \pm 8,6\%$, $49\% \pm 8,2\%$ og for kontrollen ($0 \mu\text{g/ml}$) $52\% \pm 10,4\%$. I likhet med celler behandlet med CSEt, ble det ikke funnet noen statistisk signifikant forskjell på prosentantall migrerte celler, gjennom matrigelen, behandlet med forskjellige fortynninger av CSH og kontrollen ($P\text{-verdi} = 0,678$). Ved å se på tabell 4.4.2 kan en økning i migrasjonsprosenten fra celler behandlet med $500 \mu\text{g/ml}$ CSH-ekstrakt ($41\% \pm 10,4\%$) til kontrollen ($52\% \pm 11,4\%$).

Når det gjelder prosentandel adherente celler på begge filtrene, ble det ikke observert noen signifikant forskjell mellom konsentrasjonene i algeekstraktene ($P\text{-verdi} = 0,406$ og $0,939$ for CSEt og CSH respektive). Imidlertid ble det observert en reduksjon fra $3,3\% \pm 0,53\%$ med celler behandlet med $500 \mu\text{g/ml}$ CSEt til $2,7\% \pm 0,42\%$ behandlet med $250 \mu\text{g/ml}$ CSEt, deretter økte prosentandelen adherente celler til $5\% \pm 1,2\%$ for kontrollen.

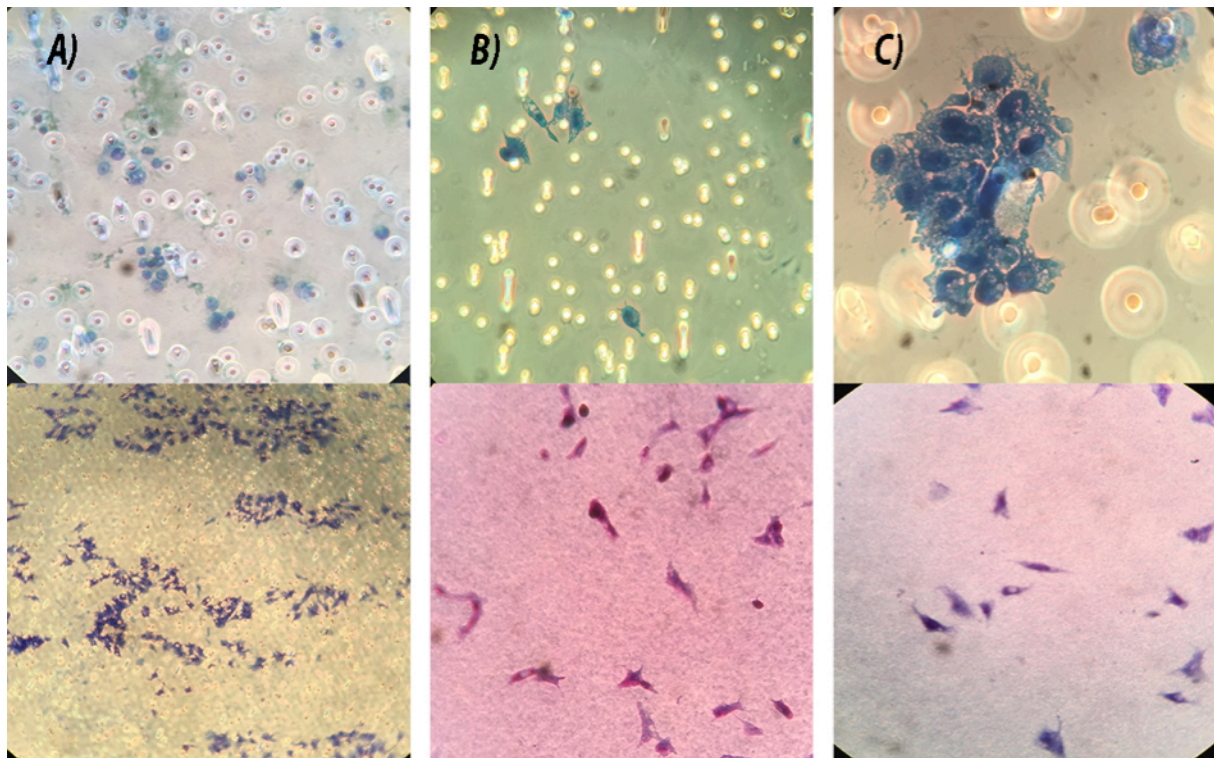
Tabell 4.3.2. Oppsummering av migrasjons assay forsøkene med fibringel og matrigel. Tabellen viser migrasjonsprosenten og prosentandelen adherente celler ved konsentrasjonene 500, 250, 125 og 65,5 µg/ml sammen med Standardfeil (\pm SE).

Fibringel				
Konsentrasjoner	Adherente celler (%)		Migrasjon (%) (\pm SE)	
	CSEt	CSH	CSEt	CSH
500 µg/mL	2.6 \pm 0.73	11.2 \pm 4.3	24.5 \pm 2,9	24 \pm 5.6
250 µg/mL	2.28 \pm 0.63	13.5 \pm 6.2	*49 \pm 7	28.4 \pm 3.3
125 µg/mL	4.76 \pm 2.19	10.5 \pm 5.6	38 \pm 6.7	25.9 \pm 7.5
62.5 µg/mL	6.01 \pm 2.06	19.5 \pm 8.2	34 \pm 8.2	31.6 \pm 7.4
0 µg/mL	6.95 \pm 2.27	13.2 \pm 4.4	22 \pm 3.9	23.5 \pm 3.6

Matrigel				
Konsentrasjoner	Adherente celler (%) (\pm SE)		Migrasjon (%) (\pm SE)	
	CSEt	CSH	CSEt	CSH
500 µg/mL	3,3 \pm 0,53	4 \pm 0,57	36 \pm 9,9	41 \pm 10,4
250 µg/mL	2,7 \pm 0,42	4,1 \pm 0,66	46 \pm 8,6	43 \pm 9,9
125 µg/mL	3,9 \pm 0,81	4,2 \pm 0,76	50 \pm 8,6	45 \pm 10,5
62.5 µg/mL	3,9 \pm 0,80	4,3 \pm 0,65	49 \pm 8,2	44 \pm 11,6
0 µg/mL	5 \pm 1,2	4,8 \pm 0,98	52 \pm 10,4	52 \pm 11,4

* Statistisk signifikant sammenlignet med de andre konsentrasjonen med samme basalmembran (P-verdi = 0,037)

Bilder av migrasjons assay forsøkene med 500 µg/ml, 250 µg/ml og kontroll (0 µg/ml) er presentert i figur 4.3.4. Bildene viser adherente celler på både polykarbonatfiltrene og nitrocellulosefiltrene.



Figur 4.3.4. Viser bilde av adhesjon av Hep G2 på polykarbonat membranfiltrene (øverste rad) og adhesjon av Hep G2 på nitrocellulosefiltrene (nederste rad). Bilde (A) er tatt av celler behandlet med 500 µg/ml CSEt-ekstrakt, (B) celler behandlet med 250 µg/ml CSEt, og (C) kontrollen (0 µg/ml). Cellene på polykarbonatfiltret ble farget med "Geimsa stain", og cellene på nitrocellulosefiltret ble farget med Hematoxylin-løsning. Bilde (A) og (B) og nitrocellulose filtret i (C) er tatt med 10x objektiv, mens polykarbonat membranfiltret i bilde (C) er tatt med 40x objektiv (foto av H.C Hansen).

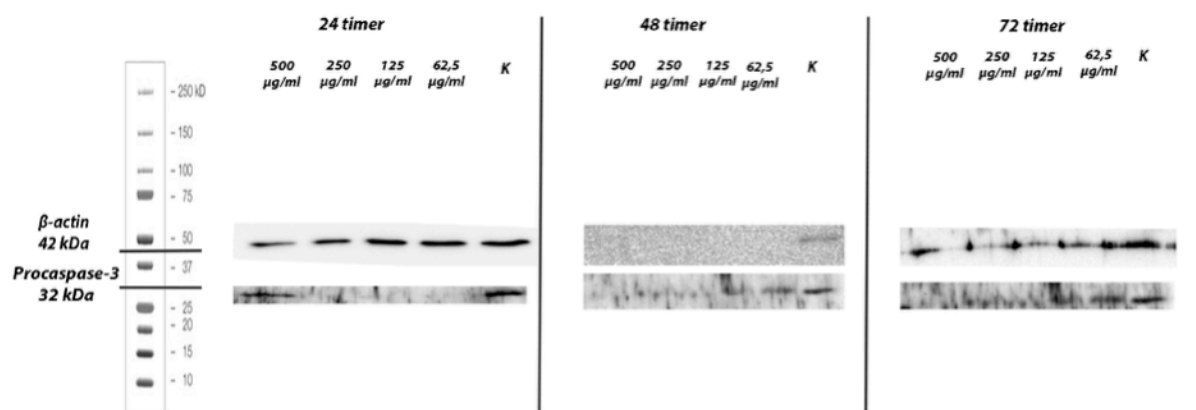
4.4 Deteksjon av caspase-3 med immunoblotting

I MTT-viabilitet-assay forsøkene ble det observert en nedgang i celleviabilitet ved konsentrasjonene 500 µg/ml til 125 µg/ml med behandling med CSEt og CSH, hvor observert celleviabilitet ved disse konsentrasjonene lå noe høyere i tilfelle for celler behandlet med CSH. Chung et al. observerte i sine studier at algeekstrakt preparatene de hadde preparert induiserte apoptose i Hep G2 (Chung et al. 2012). Det var derfor av interesse å se om nedgangen i celleviabilitet var forårsaket av apoptose for celler behandlet med CSEt og CSH. Hep G2 ble behandlet med CSEt og CSH, i konsentrasjonene 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml og 62,5 µg/ml, i henholdsvis 24, 48 og 72 timer. I tillegg til disse prøvene ble det preparert en negativ kontroll, samt en positiv kontroll hvor cellene ble kjemiskindusert til apoptose. Anti-Caspase-3 Kanin polyklonal IgG detekterte kun procaspase-3 og Ingen av subenhetene (p11, p17 og p20) ble identifisert

i prøvene. Det samme ble observert i den positive kontrollen (kjemisk induisert apoptose med 1 µg/ml Ionomycin og 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)). På grunn av varierende bredde på β-aktin båndene, og for å kunne sammenligne mengden procaspase-3 i de forskjellige prøvene, ble procaspase-3/β-aktin beregnet og er presentert i tabell 4.5.1.

4.4.1 Immunoblot deteksjon av caspase-3 i celler stimulert med CSEt-ekstrakt

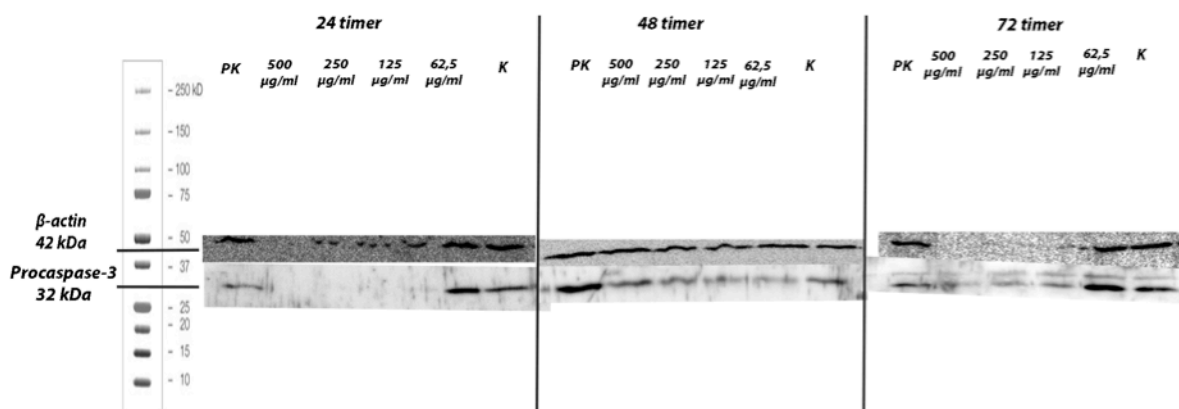
Immunoblot-resultatene fra celler behandlet med CSEt-ekstrakt er presentert i figur 4.4.3. Hep G2 celler som ble stimulert i 24 timer ga klare β-aktin bånd for alle prøvene. Proteinbåndene hvor cellene hadde blitt stimulert med 500 µg/ml CSEt var noe smalere sammenlignet med de andre β-aktin båndene. Procaspase-3 ble kun identifisert i prøvene behandlet med 500 µg/ml CSEt og negativ kontroll. Etter 48 timer var det kun den negative kontrollen som ga synlige β-aktin bånd. Procaspase-3 bånd ble identifisert på den negative kontrollen og ved 62,5 µg/ml CSEt-ekstrakt behandlet Hep G2. Etter 72 timer var det utydelige β-aktin bånd på alle prøvene behandlet med CSEt-ekstrakt ved alle konsentrasjoner. Det ble kun observert tydelige procaspase-3 proteinbånd ved den negative og positive kontrollprøven, og svakere bånd ved celler stimulert med 62,5 µg/ml CSEt.



Figur 4.4.3. Viser resultatene fra immuno blot med celler stimulert med CSEt (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml og 62,5 µg/ml) og kontrollprøver (0 µg/ml). Cellene ble stimulert i henholdsvis 24, 48 og 72 timer, og deretter lysert. Bildene av proteinbåndene er tatt med med Azure c400 – "visible fluorescent western blot imaging system". Positiv kontroll er presentert i figur 4.5.2. K = kontroll

4.4.2 Immunoblot deteksjon av caspase-3 i celler stimulert med CSH-ekstrakt

Etter 24 timer behandling på cellene med CSH-ekstrakt ble procaspase-3 kun observert ved 62,5 µg/ml, negativ kontroll samt den positive kontrollen. Procaspase-3 ble kun identifisert på de samme prøvene som viste tydelige β-aktin-bånd. Proteinmengden i prøvene ved 500 µg/ml, 250 µg/ml og 125 µg/ml CSH behandlede celler var lavere enn det som var tilfelle for 62,5 µg/ml-CSH behandlet Hep G2 og kontrollen. Derimot etter 48 timer var β-aktin-båndbredden tilnærmet lik for alle prøvene. Procaspase-3 bånd ble identifisert på alle prøvene etter 48 timer, derimot med svakere bånd for prøvene hvor cellene hadde blitt stimulert med CSH-ekstrakt. Etter 72 timer ble det ikke observert noen β-aktin-bånd for konsentrasjonene 500 µg/ml, 250 µg/ml og 62,5 µg/ml, derimot ble det observert svake procaspase-3 bånd ved disse konsentrasjonene. I prøvene behandlet med 62,5 µg/ml CSH, positiv kontroll samt negativ kontroll ble det observert to bånd for hver prøve, identifisert som β-aktin og procaspase-3.



Figur 4.5.3. Viser resultatene fra immuno blot med celler stimulert med CSH (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml og 62,5 µg/ml) og kontrollprøver (0 µg/ml). Cellene ble stimulert i henholdsvis 24, 48 og 72 timer, og deretter lysert. Bildene av proteinbåndene er tatt med med Azure c400 – "visible fluorescent western blot imaging system". PK = positiv kontroll og K = kontroll

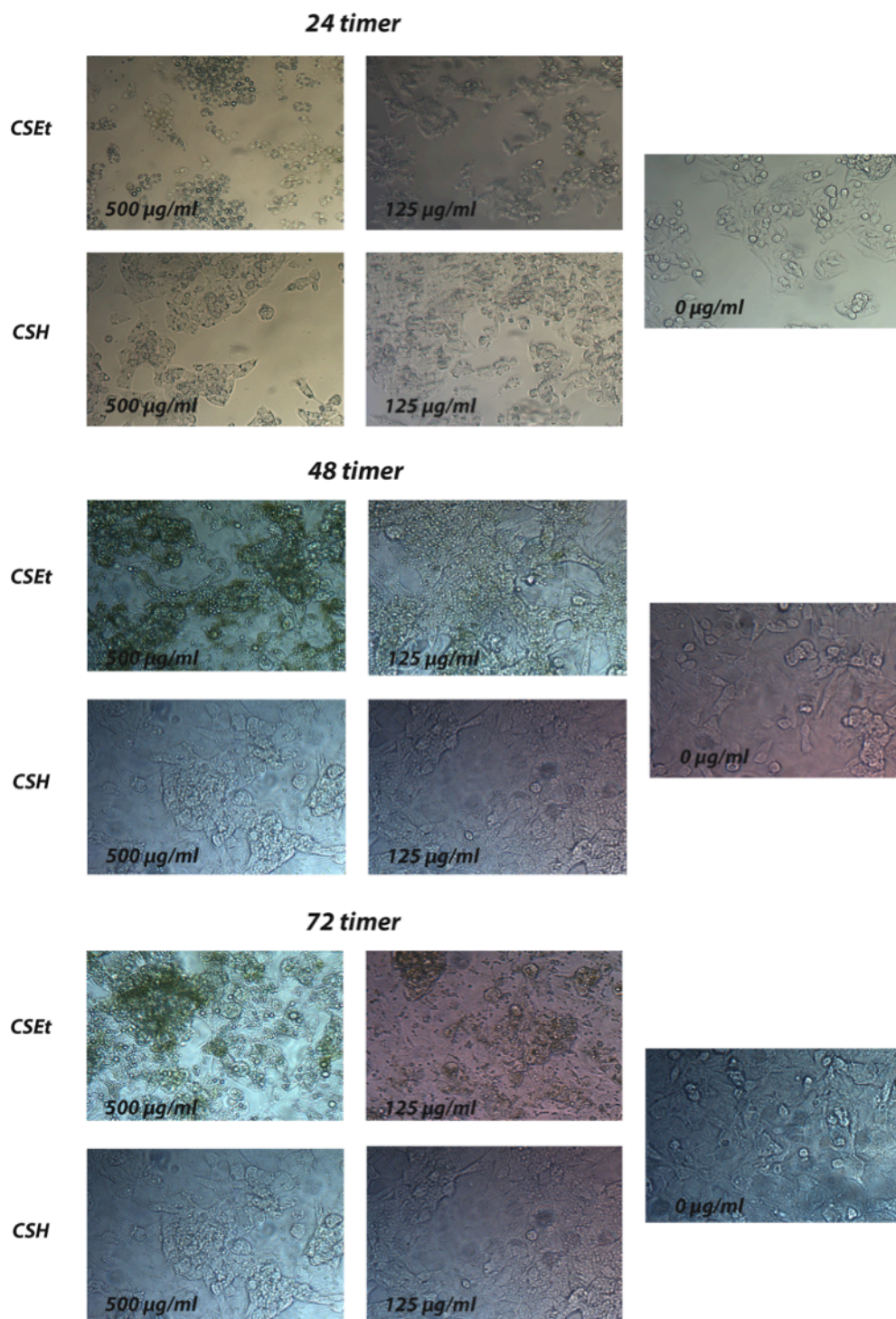
Tabell 4.5.1. Viser Størrelses ratioen mellom procaspase-3 og β -aktin proteinbånd fra immunoblot. Pikselstørrelsen på proteinbåndene ble beregnet med "Image J" (programvare), og størrelsesratio ble beregnet ved å dividere antall piksler på procaspase-båndene med antall piksel i β -aktin båndene. Verdiene som mangler i tabellen er grunnet manglende procaspase-3 eller β -aktin bånd i immunoblottet..

Procaspase/ β -aktin ratio						
CSEt			Konsentrasjon	CSH		
24 timer	48 timer	72 timer		24 timer	48 timer	72 timer
2,14	-	-	500 μ g/ml	-	1,64	-
-	-	-	250 μ g/ml	-	0,79	-
-	-	-	125 μ g/ml	-	0,3	1,51
-	-	1,44	62,5 μ g/ml	1,97	0,05	1,92
0,92	3,02	0,52	Positiv kontroll	0,92	3,02	0,52
1,56	0,57	1,05	kontroll	1,43	1,02	0,99

På grunn av vanskeligheter med å detektere både β -aktin og procaspase-3 i prøvene blir det vanskelig ut i fra disse resultatene å bekrefte om nedgang i viabilitet skyldes procaspase-3 aktivering. På grunn av menglende β -aktin bånd på mange av prøvene blir det vanskelig å sammenligne procaspase-3 mengden i de forskjellige prøvene opp mot hverandre. Som vist i tabell 4.5.1 kan en nedgang i procaspase-3 hos celler behandlet med CSH observeres. Derimot er synker procaspase-3/ β -aktin-ratioen etter bruk av lavere konsentrasjoner med CSH, og den høyeste procaspase-3/ β -aktin-ratioen kan observeres i den positive kontrollen.

4.6 Morfologiske endringer på Hep G2 etter stimulering med CSE/CSH

Morfologien til Hep G2-cellelinjen, i påvirkning av CSEt og CSH, ble observert under lysmikroskop. Formålet med dette forsøket var for å se om ekstraktene ga morfologiske endringer på Hep G2 cellene med hensyn på algeekstraktkonsentrasjon og tid (henholdsvis 24, 48 og 72 timer). Cellene ble sådd i 24-brønnsplater og sto over natt slik at cellene kunne adherere til bunnen brønnene. Dagen etter ble algeekstraktet tilsatt i konsentrasjonene 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62,5 μ g/ml og 0 μ g/ml (kontroll) i henholdsvis 24, 48 og 72 timer. Bildene av Hep G2 stimulert med CSEt og CSH (500 μ g/ml og 125 μ g/ml) i 24, 48 og 72 timer er presenter i figur 4.2.1



Figur 4.6.1. Viser lysmikroskopbilder av Hep G2 celler etter 24, 48 og 72 timer stimulering med CSEt og CSH. Det er kun konsentrasjonene 500 (venstre kolonne) og 125 µg/ml (midterste kolonne) samt kontroll (0 µg/ml) (Høyre kolonne) som er presentert i figuren. Cellene som ble behandlet med CSEt ble farget av ekstraktet på grunn av høy grad av pigmentering i preparatet. Bildene ble tatt med Leica lysmikroskop med 40x objektiv (Foto av H.C Hansen).

I utgangspunktet har Hep G2 cellelinjen en flat og polygonal morfologi (Bouma et al. 1989). I Hep G2 behandlet med 500 µg/ml CSEt ble observert morfologiske endringer etter 24 timer. For celler behandlet med 125 µg/ml CSEt-behandling utartet ikke de morfologiske endringer seg før etter 72 timer inkubering. Kontrollen og behandlingen med CSH ga imidlertid ingen morfologiske endringer på cellene. I tillegg til morfologiendringen ble det observert sterkt pigmentering fra CSEt-ekstraktene på cellene. Pigmenteringen ble mer synlig etter 48 og 72 timer sammenlignet med celler etter 24 timer.

Kapittel 5 – Diskusjon

Målet med denne oppgaven var å undersøke om ekstrakt fra *Chlorella sorokiniana* (*C. sorokiniana*) kan inhibere migrasjonen gjennom proteingeler (basal membraner) *in vitro* og inducere apoptose i hepatocellulært karsinom (Hep G2). Grunnet den sentrale rollen induert migrasjon av kreftceller har i progresjonen i dannelsen av svulster, er det ønskelig å utvikle kreftbehandlinger som begrenser disse prosessene. Det ble også undersøkt om algeekstraktene ville gi ulik påvirkning på Hep G2-cellene, i forhold til ekstraksjonsmetode som ble brukt, og dermed hvilke komponenter som foreligger i ekstraktene.

Før arbeidet med denne masteroppgaven var det allerede rapportert at EtOH-ekstrahert *C. sorokiniana* reduserte celleviabilitet, inhiberte migrasjon gjennom Matrigel, og induerte apoptose i Hep G2 (Chung et al. 2012). I forsøkene til (Chung et al.) ble *C. sorokiniana*-ekstraktene analysert med HPLC, hvor mengden av lutein, klorofyll a og b ble kvantifisert. Dette ble imidlertid ikke gjort for algeekstraktene i denne oppgaven. Siden hele algen ble benyttet under ekstraksjonsprosedyren, kan ekstraktene potensielt bestå av alle mulige komponenter som finnes i algen. Dette gir ekstrakter som består av en kompleks sammensetning av forbindelser og metabolitter. Disse komponentene kan hver for seg ha liten effekt på cellene, men kan tilsammen gi stor effekt. Videre kan forbindelsene ha ulik effekt på celleveksten; forsterke eller redusere viabiliteten og/eller migrasjonen til cellelinjene. Det er totalsummen av effektene fra alle forbindelsene og metabolittene som observeres i forsøkene. Det kan ut ifra dette være vanskelig å utpeke hvilke enkeltkomponenter i algeekstraktene som påvirker cellene.

Algeekstraksjonen ble gjennomført flere ganger for å få ekstrakt med DMSO-konsentrasjoner som lå under toleransegrensen til cellelinjene i forsøkene (tabell 4.2.1.). Etter flere mislykkede forsøk, ble algeekstraktene ultralydbehandlet. Med ultralydbehandling av algeekstraktene økte algebiomassen løst i DMSO betraktelig (~8,7 for CSEt og ~7,7 for CSH), slik at DMSO-mengden i algeekstrakt-fortynningene lå under toleransegrensen til cellelinjene (tabell 4.3.1.). Den høyeste konsentrasjonen av DMSO i algeekstraktene ble beregnet til 0,43%, og ved denne konsentrasjonen ble det ikke observert noen signifikant nedgang i celleviabiliteten til noen av cellelinjene. Med

holdepunkter i resultatene fra DMSO-kontrollen kunne det konkluderes med at DMSO-konsentrasjonen i algeekstraktene ikke ville påvirke viabiliteten til cellene.

I MTT-viabilitet-assay konverterer viable celler MTT (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid) til formazan med lilla farge. Når celler dør mister cellene denne egenskapen, og fargeendringen i MTT-viabilitets-assay er derfor en markør for viable celler. Det er imidlertid viktig å merke seg at MTT-reduksjonen til formazan ikke er en markør for proliferasjon i cellene, derimot reflekterer den heller aktiv metabolisme i viable celler (Riss et al. 2004). I MTT-forsøkene ble det observert en nedgang i viabilitet for celler behandlet med CSEt og CSH. Denne nedgangen ble observert for begge algeekstraktene hvor den største nedgangen ble observert hos CSEt-behandlede celler. Det var også forskjeller i hvilken grad cellelinjene (WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2) ble påvirket. Forskjellene i påvirkningsgraden mellom cellelinjene kan gi en indikasjon på om cytotoxiciteten fra algeekstraktene har en generell effekt, eller om ekstraktene påvirker cellene gjennom spesifikke mekanismer. De transformerte lungfibroblastene, WI-38 VA-13, viste høyest toleranse for CSEt. Denne observasjonen kan ha en sammenheng med simian virus 40 (SV40)-transformeringen av cellelinjen, hvor det tidligere har blitt vist at denne cellelinjen har to-folds høyere aktivitet ved initieringsstedet for c-myc lokus, sammenlignet med WI-38 (Tao et al. 2001). myc-genfamilien er høyt forekommende i mange svulster, og koder for transkripsjonsfaktorer som aktiverer vekst-promoterende gener (DeBerardinis et al. 2008; Kelly et al. 1983). Dette kan også forklares med SV40 Tag, et høyt forekommende protein i SV40-transformerte celler, som binder seg til og inaktiverer tumor suppressor proteinet p53 (Vousden & Prives 2009). Den største nedgangen i celleviabilitet ble observert for WI-38 og Hep G2, hvor celleviabiliteten ble målt til henholdsvis -0,4% og 4,3% ved 500 µg/ml CSEt. Dette kan tyde på at prolifererende egenskaper hos WI VA-13 kan bidra med å kompensere for den cytotoxiciske effekten fra CSEt.

Det har fra tidligere studier blitt rapportert at H₂O-ekstrakt fra *C. sorokiniana* inhiberer vekst av Hep G2 (Wu et al. 2005). Dette samsvarer med resultatene i MTT-forsøkene i denne oppgaven, hvor det ble observert en nedgang i celleviabilitet for alle cellelinjene som ble CSH-behandlet. Nedgangen i viabilitet var imidlertid moderat sammenlignet med det som ble observert for CSEt-behandlet celler. Det kan være flere faktorer som

bidrar til forskjellen i denne effekten. Dette kan være at ekstraksjonsmidlene løser ulike forbindelser fra algebiomassen. En annen forklaring kan være konsentrasjonsforskjeller av komponentene som foreligger i ekstraktene. Det kan også være en kombinasjon av begge. Det kan imidlertid ikke trekkes noen tydelig konklusjon fra dette, siden ingen av komponentene i ekstraktene ble karakterisert eller kvantifisert.

Det ble ikke observert nedgang i viabilitet for noen av cellelinjene behandlet med ekstrakt fra stressinduserte alger (sCSEt og sCSH) (tabell 4.2.3). Forskjellen i effekt mellom CSEt/CSH- og sCSEt/sCSH-ekstraktene, gir en indikasjon på at metabolittkompensasjonen i stressinduserte alger er forskjellig fra alger med optimale vekstvilkår. Sekundærmetabolitter er ikke en del av den primære metabolske prosessen ved cellevekst, og produseres ofte som en respons på endringer i miljøbetingelsene (Skjånes et al. 2013).

I migrasjonsassay-forsøkene ble det observert få adherente celler på både Nuclepore polykarbonat membranfilteret og nitrocellulosefilteret. For at celler skal kunne migrere gjennom proteingelen og adherere til nitrocellulosefilteret må de først adherere til polykarbonatfilteret (Erkell & Schirmmacher 1988). I de første eksperimentene ble polykarbonatfiltrene stemplet ut fra membranfilterark, for å deretter bli etset med metallisk natrium-løsning etter henvisning fra protokoll. Ved å følge denne metoden skulle antall adherente celler på filteret ligge i intervallet 20 – 60% (Erkell & Schirmmacher 1988). Det ble imidlertid observert svært få celler ved å bruke denne metoden. Etter flere mislykkede forsøk med metallisk natrium-behandlet polykarbonat filtermembraner, ble filtrene byttet med ferdigstanset, hydrofile polykarbonatfiltre. Dette resulterte i flere adherente celler på filtrene, men andelen adherente celler på filtrene var fremdeles mindre enn det som var beskrevet i protokollen. For å øke antall adherente celler ytterligere, ble de hydrofile polykarbonat membranfiltrene dekket med kollagen, noe som resulterte i ytterligere økning av adherente celler. Kollagen brukes til å dekke overflater for å øke cellevekst og adhesjon (Jokinen et al. 2004). Dette kan være med å forklare økningen av adherente celler på polykarbonat filtrene. Som en følge av økt adherering på polykarbonatfiltrene, ble det også observert flere adherente celler på nitrocellulosefiltrene. Selv om kollagenbehandlingen resulterte i flere adherente celler var andelen fremdeles lavere enn det som ble beskrevet i protokollen. En forklaring på

dette kan være at Hep G2 ikke er godt egnet til migrasjons-assay, og gir lav adhesjon sammenlignet med cellelinjene beskrevet i protokollen.

Det var stor forskjell på Hep G2-cellenes evne til å migrere gjennom fibringel og Matrigel. Sammenligning av kontrollprøvene for migrasjons-assay-forsøkene kan gi en indikasjon på Hep G2-cellenes evne til å migrere gjennom de forskjellige proteingelene. Det ble observert en høyere migrasjonsprosent for Hep G2-celler gjennom Matrigel enn gjennom fibringel. Et tidligere studie viste at injisering av svulstbiopsier i mus, som normalt ikke vokser i musen, kan vokse dersom injeksjonen blir gjort sammen med Matrigel. Studien konkluderte med at svulstcellelinjer vokste raskere i Matrigel (Fridman et al. 1991). Dette fenomenet kan være med på å forklare hvorfor migrasjonsprosenten i forsøksoppsettene med Matrigel var høyere enn i oppsettene med fibringel. Som nevnt i introduksjonen er det også antatt at Matrigel hindrer anoikis ved at laminin og kollagen IV binder seg spesifikt til integrinreseptorer (Kleinman and martin 2005). Durotaksis og/eller haptotaksis kan være en annen forklaring. Durotaksis og haptotaksis er migrasjonsmønsteret til celler, hvor de beveger seg mot høyere ECM-tetthet og ligand-tetthet respektive (Lo et al. 2000).

Siden det var utfordringer knyttet til å få fibrin til å polymerisere i mange av forsøkene, ble det brukt dobbel så høy trombinkonsentrasjon (10 U/ml stockløsning) i fibrinogenløsningen, enn det som ble beskrevet i protokollen (Erkell & Schirmmacher). Høyere trombinkonsentrasjoner fører til fibringelstrukturer som gir tettere krysskoblet fibrinfiber, og dermed gjør gelen mer resistent mot fibrinlyse (Wolberg 2007). Noe som kan forklare hvorfor det var lavere migrasjonsprosent for Hep G2 gjennom fibringelen.

I migrasjonsassay-forsøkene med fibrin ble det observert høyere migrasjonsprosent for algeekstrakt-behandlet Hep G2. Dette var mest fremtredende i CSEt-behandlede celler. Én forklaring kan være at algeekstraktene fremprovoserer migrasjon i fibringel. Dette er motstridende med funnene til (Chung et al. 2012), hvor det ble observert en nedgang i metalloproteinase MMP-2 og MMP-9. MMP'er bidrar med fibrinlyse og dermed migrasjon gjennom fibringel (Hotary et al. 2002). Derimot er det mer sannsynlig at den relativt høye migrasjonsprosenten er forårsaket av at cellene løsner fra polykarbonatfiltrene, som en konsekvens av cytotoxicitet fra algeekstraktene, som ble observert i MTT-viabilitet-assay-forsøkene. Det ble også observert morfologiske

endringer for Hep G2 behandlet med 500 µg/ml CSEt på polykarbonatfiltrene sammenlignet med celler behandlet med 250 µg/ml CSEt og kontrollen (figur 4.3.4). Denne påstanden har støtte i at det også ble observert lavere adhesjonsprosent i Hep G2 behandlet med algeekstrakt, sammenlignet med kontrollen. Siden adherente celler på nitrocellulosefiltrene ligger mellom fibringelen og polykarbonatfilteret, er det sannsynlig at disse cellene er mer beskyttet fra å løsne for deretter å ende i suspensjonen i brønnen. Dersom andelen celler som løsner fra polykarbonatmembranfiltrene er høyere enn andelen celler som løsner på nitrocellulosefilteret, vil migrasjonsprosenten øke som et resultat av at det blir talt færre celler totalt på filteroppsettet. Dette forklarer imidlertid ikke hvorfor migrasjonsprosenten øker fra Hep G2 behandlet med 500 µg/ml til celler behandlet med 250 µg/ml (tabell 4.3.2), noe som ble observert for både CSEt og CSH. Siden algeekstraktet ble tilsatt direkte sammen med cellene, kan den høyeste konsentrasjonen ha påvirket cellene slik at de ikke fikk adherert til filtrene. Dersom cellene fikk adherere før algeekstraktene ble tilsatt, ville Hep G2 migrert gjennom proteingelene før de eventuelt hadde blitt påvirket av algeekstraktene. De utydelige resultatene gjør det utfordrende å bedømme om algeekstraktet inhiberer migrasjon av Hep G2 gjennom fibringel.

Fra tidligere studier ble det rapportert at EtOH-ekstrahert *C. Sorokiniana* inhiberte migrasjon av Hep G2 gjennom Matrigel (Chung et al. 2012). I migrasjonsassay-forsøkene med Matrigel ble det ikke funnet noen signifikant forskjell i migrasjonsprosenten for celler stimulert med CSEt og CSH. Derimot er migrasjonsprosenten noe lavere for Hep G2 behandlet med CSEt og CSH, enn for kontrollen. Det er også korrelasjon mellom konsentrasjon av algeekstrakt og migrasjonsprosent (tabell 4.3.2). Ved de høyeste konsentrasjonene med algeekstrakt ble det observert lavere migrasjonsprosent, noe som var mest fremtredende for Hep G2 behandlet med CSEt. Det ble også observert færre adherente celler på filtrene hvor cellene hadde blitt behandlet med algeekstrakt. Ved å sammenligne dette med resultatene fra MTT-viabilitets-assay, kan det forventes færre celler for prøvene behandlet med de høyeste konsentrasjonene med algeekstrakt, spesielt celler behandlet med CSEt. Med utgangspunkt i disse observasjonene, kan nedgangen i migrasjonsassay-forsøkene i denne oppgaven være relatert til færre adherente celler på filtrene, og ikke inhibering av migrasjon.

Hep G2 cellelinjene er isolert fra leverbiopsi og kan derfor inneholde flere subpopulasjoner av celler med forskjellige egenskaper. Fra tidligere studier tyder det på at svulster består av en heterogen og hierarkisk sammensetning av cellepopulasjoner, hvor kun et fåtall av cellepopulasjonene opprettholder svulstveksten. Disse cellene kalles kreftstamceller (CSC). Det er ofte ikke mer enn 5% av totalmassen til en svulst som inneholder CSC (Ma et al. 2007). Dette tatt i betraktning, kan det tenkes at cellekulturene inneholder forskjellig sammensetning av disse subpopulasjonene, noe som kan være en forklaring på det høye standardavviket observert i migrasjons-assay-forsøkene. Det kunne derfor vært interessant å se hvilken effekt algeekstraktene hadde på isolerte subpopulasjoner av CSC, eller homogene kreftcellekulturer, til viabilitet-, migrasjons- og apoptoseforsøkene. Dette ble imidlertid ikke gjort i denne oppgaven, og kan tas med videre arbeid med algeekstraktene.

Tidligere studier med celler behandlet med 80% etanol-ekstrahert *C. sorokiniana* viste økt ekspresjon av blant annet Fas og FasL samt caspase-3 og -9 (Chung et al. 2012). For å se om algeekstraktene som ble preparert til denne oppgaven induserte apoptose, ble caspase-3 valgt som apoptosemarkør. Anti-caspase-3 antistoffet skal kunne gjenkjenne caspase-3 p11-, p17-, og p20-subenhetene, samt procaspase-3 fra mus, rotte og menneske. Ingen av subenhetene ble detektert i noen av prøvene i immunoblottet, det var kun procaspase-3 som ble påvist. Dette var også tilfelle for den positive kontrollen med PMA/ionomycin-indusert apoptose på Hep G2. PMA/ionomycin har tidligere vist å inducere apoptose, via oppregulering av Fas/Fas ligand på modne lymfocytter og glioblastoma cellelinjer, og dermed aktivere oppstrøms effektor caspaser (Han et al. 2013). Derfor kunne det forventes å detektere caspase-3 subenhetene i den positive kontrollen. Degradering av caspase-3 subenhetene kan være en mulig forklaring på hvorfor ikke subenhetene ble detektert i forsøkene. "Inhibitor av apoptose" (IAP)-enzymmer, som f.eks. XIAP, katalyserer ubiquitinerings (kovalent kobling av ubiquitiner til proteiner slik at de merkes for protolytisk ødeleggelse) og degrading av caspase-3 (!!! INVALID CITATION !!!; Alberts et al. 2008; Zhang et al. 2002). Siden caspase-3 subenhetene er små molekyler (henholdsvis 11, 17 og 20 kDa) kan en annen forklaring være at disse proteinene ble kjørt ut av PVDF-membranen da proteinene ble overført fra polyakrylamidgelen til PVDF-membranen. Det var generelt lite procaspase-3 og β -aktin som ble detektert i alle prøvene behandlet med algeekstraktene CSEt og CSH. Det ble

imidlertid detektert β -aktin for alle kontrollprøvene. Dette kan være en indikasjon på at algeekstraktene påvirker lysatene slik at β -aktin ikke blir detektert i immunoblottet. Proteinmengden i lysatene ble ikke målt før de ble applisert til polyakrylamidgelen, derimot ble forskjellen i proteinmengde kompensert ved å beregne bredden på proteinbåndene av β -aktin og procaspase, for å deretter beregne ratioen mellom proteinene (procaspase-3/ β -aktin-ratio). I tillegg ble lysatene med algeekstrakt behandlet celler applisert til brønnene til maksimal kapasitet (40 μ l), hvor 20 μ l av kontrollprøvene ble applisert til brønnene, for å kompensere for proteinkonsentrasjonsforskjellene.

Caspase-3 aktivering skulle observeres etter 24, 48 og 72 timer, siden apoptose kan ta flere timer eller dager for å utvikle seg. Siden det var problemer med å detektere aktivert caspase-3 i prøvene, kan det ikke påvises om nedgangen i celleviabilitet observert i MTT-assay-forsøkene var forårsaket av apoptose. Alternativt ville det vært mulig å få en indikasjon på caspase-3-aktivering ved å se etter nedgang i procaspase-3 i prøvene. Siden β -aktinbåndene for algeekstraktbehandlet Hep-G2 generelt ga svake eller ingen signaler i immunoblottet, er grunnlaget tynt for å sammenligne resultatene. Etter 24 timer med CSEt-behandling ble det kun detektert β -aktin og procaspase-3 for celler behandlet med 500 μ g/ml med CSEt og for kontrollprøvene. I prøvene behandlet med CSEt ble det imidlertid observert høyere procaspase-3/ β -aktin-ratio sammenlignet med kontrollene. Dette kan forklares med at signalet for β -aktin var svakt i forhold til procaspase-3 signalet, og ikke nødvendigvis på grunn av høyere procaspase-3 konsentrasjon i prøven. Etter 48 timer ble det kun detektert β -aktin for kontrollen, og etter 72 timer forekom det generelt mye bakgrunnsstøy. Bakgrunnsstøy i immunoblot kan komme av flere faktorer, for eksempel luftlommer mellom polyakrylamidgelen og PVDF-membranen i proteinoverføringen. En annen faktor som kan bidra til bakgrunnsstøy er dårlig vask av membranen med TBST. Det ble laget nye løsninger av TBST, samt at vasketiden ble økt fra 15 minutter i fire omganger, til 25 minutter i fire omganger. En tredje forklaring på bakgrunnsstøy er at antistoff binder seg til blokkløsningen (5% melk/TBST). Derfor ble det laget blokkløsning med kun 1% melk/TBST for å begrense støyen.

Den eneste prøven som ga β -aktin og procaspase-3 proteinbånd for alle prøvene, var CSH-behandlet Hep G2 etter 48 timer (tabell 4.5.1). Her synker procaspase-3/ β -aktin-

ratioen etter lavere konsentrasjoner med CSH. Dette er ikke sammenfallende med det som ble observert i MTT-viabilitet-forsøkene, der viabiliteten økte i takt med lavere konsentrasjoner CSH. I likhet med CSEt-behandlet Hep G2 kan det ikke påvises apoptose-induksjon for Hep G2 behandlet med CSH.

Hva som forårsaket nedgangen i celleviabilitet som ble observert i MTT-viabilitets-assay er et av delspørsmålene denne oppgaven forsøker å besvare. Resultatene fra immunoblot ga ingen klare holdepunkter for om nedgangen i celleviabilitet var forårsaket av apoptose. Nekrose kan være en annen forklaring på celledøden. Apoptose og nekrose kan skilles etter distinkte forskjeller i biokjemiske og morfologiske karaktertrekk (Ouyang et al. 2012). I figur 4.6.1 er celler behandlet med CSEt og CSH (500 og 125 µg/ml) ved forskjellige tidspunkter presentert. For CSEt-behandlet Hep G2 ble det observert en reduksjon i cellestørrelsen samt celler med avrundet morfologi (tydeligst etter 24 timer grunnet farge fra ekstrakten ved de andre tidspunktene) sammenlignet med CSH-behandlet Hep G2-celler og kontrollen. Dette kan peke i retning av at celledød i CSEt-stimulerte Hep G2 var forårsaket av apoptose. Dette er imidlertid det eneste holdepunktet for å si om nedgangen i celleviabilitet var forårsaket av apoptose, og kan ikke brukes som konklusjonsgrunnlag. I tillegg kan apoptose og nekrose oppstå samtidig i cellekulturer som en respons på forskjellig konsentrasjon av samme stimuli (Ankarcrona et al. 1995; Leist et al. 1996; Shimizu et al. 1996). På grunn av problemer knyttet til å detektere β -aktin og aktivert caspase-3 i prøvene, kunne det virke hensiktsmessig å benytte andre markører og /eller andre analyser. Andre markører kunne innebåret deteksjon av andre caspaser (-8,-9 eller -6, -7) eller helt andre apoptotiske proteiner som f.eks. Bcl2-proteinene (bax, Bok og Bak), cytokrom c og apaf-1. Når en celle gjennomgår apoptose vil fosfatidlyserin (FS) i plasmamembranen endre lokasjon fra cytosol-siden av membranen til utsiden av cellen (Alberts et al. 2008). Dette kan benyttes for deteksjon av apoptose, da annexin V, et Na⁺-avhengig fosfolipid bindende protein, binder seg til FS. Ved å i tillegg tilsette propidium iodid kan fargeforskjeller mellom apoptose-induserte, døde og levende celler dermed detekteres med bruk av flow-cytometri. I tillegg til å være sensitiv og enkel å utføre, kan denne metoden også diskriminere mellom celler som gjennomgår nekrose og apoptose (Vermees et al. 1995). Dersom det ble påvist apoptose i cellene, kunne denne metoden

kunne bli brukt i konjunksjon med andre apoptose markører i immunoblot. Dette kunne gitt en indikasjon på hvilke mekanismer som forårsaket apoptose-induksjonen.

Kapittel 6 - Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven var å kartlegge eventuell kreft- og migrasjonshekkende effekter av EtOH- og dH₂O ekstrahert *Chlorella sorokiniana*, på kreftceller, med hepatocellulær karsinom (Hep G2) som cellemodell. Begge algeekstraktpreparatene i denne oppgaven reduserte viabiliteten i cellelinjene; WI-38, WI-38 VA-13 og Hep G2, hvor CSEt ekstraktene ga størst nedgang i celleviabilitet for alle cellelinjene. Den cytotoksiske effekten diskriminerte ikke mellom normale cellelinjer (WI-38), immortaliserte cellelinjer (WI-38 VA-13) eller kreftcellelinjer (Hep G2). Derimot ble det observert mindre nedgang i celleviabiliteten for WI-38 VA-13. Det ble også lagd algeekstrakt på hydrogenproduserende *C. sorokiniana* (sCSEt og sCSH), for å sammenligne disse ekstraktene med ekstrakter fra alger med optimale vekstvilkår. Det ble imidlertid ikke observert noen reduksjon i celleviabilitet for noen av cellelinjene, i påvirkning av verken sCSEt eller sCSH, noe som tyder på at de ansvarlige komponentene for reduksjonen i celleviabiliteten i CSEt og CSH er fraværende, eller i lavere konsentrasjoner, i sCSEt- og sCSH-ekstraktene.

Migrasjons assay med fibringel og Matrigel ble utført for å kunne se om CSEt og CSH inhiberte migrasjonen til Hep G2 cellene. På grunn av få celler på filteroppsettet i forsøkene, ble polykarbonat filtermembranene dekket med kollagen I. Dette ga en ~4,6 ganger økning av andel adherente celler på polykarbonatfiltene. Det ble observert noe høyere migrasjonsprosent gjennom fibringel for algeekstraktbehandlet Hep G2 sammenlignet med kontrollen. Det var imidlertid kun Hep G2 behandlet med 250 µg/ml CSEt som ga statistisk signifikant økning på migrasjonsprosenten. Det var høyere migrasjonsprosent for Hep G2 i Matrigel sammenlignet med fibringel, noe som reflekterer forskjellen i cellens evne til å migrere gjennom forskjellige isolerte basalmembraner. Det var ingen av konsentrasjonene med algeekstrakt som ga signifikant endring i migrasjonsprosenten. Derimot ble det observert noe nedgang i migrasjonen for både CSEt og CSH gjennom Matrigel.

Det var kun procaspase-3 som ble detektert med immunoblot, og det ble ikke avdekket om algeekstraktene induserte apoptose. Det ble observert morfologiske endringer for Hep G2 behandlet med 500 µg/ml CSEt. Dette er imidlertid ikke sterke holdepunkter for å kunne konkludere med om nedgangen i celleviabilitet er apoptose-relatert.

Kapittel 7 - Videre arbeid

I videre arbeid med å kartlegge eventuell apoptose-induksjon og migrasjonshemmende virkning av *Chlorella sorokiniana*-ekstrakt på kreftceller, hadde det vært interessant å identifisere og kvantifisere komponentene i algeekstraktene. Ikke for å nødvendigvis utpeke enkeltkomponenter i algeekstraktene, men heller for sammenligne eventuelle konsentrasjonsforskjeller mellom de forskjellige ekstraktene. I artikkelen til Chung et al. ble karotenoider og klorofyll i algeekstraktene som ble brukt i forsøkene analysert med HPLC-kromatografi. I studien ble lutein, klorofyll a og b identifisert og målt til 3,8, 42,9 og 15,1 mg/g respektive (Chung et al. 2012). kvantifisering av komponenter som foreligger i algeekstraktene i denne oppgaven, kunne gitt et bedre sammenligningsgrunnlag mellom både CSEt og CSH- ekstraktene, samt forskjeller mellom ekstrakter laget på stressinduserte alger og alger med optimale vekstvilkår.

Det finnes også mange tilgjengelige kommersielle assay for å undersøke migrasjon av kreftceller. Kommerielle migrasjons assay er standardiserte og effektive, noe som kan redusere variasjoner mellom forsøksparalleller, og dermed bidra med tydeligere resultat. Migrasjons assay basert på to kammer separert med filter dekket med forskjellige ekstra cellulære matriks (ECM) forbindelser er et eksempel på slike kommersielle migrasjons assay. I disse assayene blir cellene tilsatt i det øverste kammeret og cellene migrerer fra kammeret gjennom porene på det ECM tildekket filtret. Deteksjon av andelen migrerte celler kvantifiseres med calcein fluorescens som sammenlignet med en standardkurve (R&D).

Det er flere apoptotiske proteiner som kan identifiseres i immunoblot for å kunne avdekke om nedgangen i celleviabilitet er apoptose-relatert. Dette kan f.eks. være initiator caspasene: caspase-8 og -9, eller effektor caspasene caspase -6 og -7, eller andre apoptose-relaterte proteiner. Det finnes også tilgjengelige assay, som f.eks. annexin V og flow-cytometri, som kan kvantifisere andel celler som gjennomgår apoptose eller nekrose i samme cellepopulasjon. Siden forskjellig konsentrasjon av samme stimuli kan inducere apoptose og nekrose i samme cellepopulasjon, kunne slike assayer avdekket om dette var tilfelle for CSEt og CSH.

Litteratur

- Agostinis, P., Buytaert, E., Breyssens, H. & Hendrickx, N. (2004). Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3 (8): 721-729.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of THE CELL*. Fifth utg. 711 Third Avnue, 8th floor, New York, NY 10017, USA, amd 3 park square, Milton Park, Abingdon, OX14 4RN, UK: Garland Science. 1269 s.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A. & Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15 (4): 961-973.
- Antal, T., Krendeleva, T., Laurinavichene, T., Makarova, V., Ghirardi, M., Rubin, A., Tsygankov, A. & Seibert, M. (2003). The dependence of algal H₂ production on photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1607 (2): 153-160.
- Antti, G., Pentti, P. & Hanna, K. (2008). Ultrasonic degradation of aqueous carboxymethylcellulose: effect of viscosity, molecular mass, and concentration. *Ultrasonics sonochemistry*, 15 (4): 644-648.
- Apt, K. E. & Behrens, P. W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, 35 (2): 215-226.
- Aravalli, R. N., Cressman, E. N. & Steer, C. J. (2013). Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Archives of toxicology*, 87 (2): 227-247.
- ATCC. (2015). *Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™)*.
- Bai, J. & Cederbaum, A. I. (2000). Overexpression of catalase in the mitochondrial or cytosolic compartment increases sensitivity of HepG2 cells to tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (25): 19241-19249.
- Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B. A. & Wehrle-Haller, B. (2001). Marching at the front and dragging behind differential α V β 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *The Journal of cell biology*, 155 (7): 1319-1332.
- Benke, R., Lang, E., Komitowski, D., Muto, S. & Schirmacher, V. (1987). Changes in tumor cell adhesiveness affecting speed of dissemination and mode of metastatic growth. *Invasion & metastasis*, 8 (3): 159-176.
- Beyerinck, M. (1900). *Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen*: [sl]:[sn].
- Borowitzka, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7 (1): 3-15.
- Bouma, M.-E., Rogier, E., Verthier, N., Labarre, C. & Feldmann, G. (1989). Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In vitro cellular & developmental biology*, 25 (3): 267-275.
- Carmeliet, P. & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 10 (6): 417-427.

- Cavanaugh, P., Sloane, B. & Honn, K. (1988). Role of the coagulation system in tumor-cell-induced platelet aggregation and metastasis. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 18 (1): 37-46.
- Cerni, C. (2000). Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462 (1): 31-47.
- Cha, K. H., Kang, S. W., Kim, C. Y., Um, B. H., Na, Y. R. & Pan, C.-H. (2010). Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (8): 4756-4761.
- Chader, S., Hacene, H. & Agathos, S. N. (2009). Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *international journal of hydrogen energy*, 34 (11): 4941-4946.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. (2002). Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2 (8): 563-572.
- Chambers, A. F. & Werb, Z. (2015). Invasion and metastasis—recent advances and future challenges. *Journal of Molecular Medicine*, 93 (4): 361-368.
- Chew, E.-C. & Wallace, A. C. (1976). Demonstration of fibrin in early stages of experimental metastases. *Cancer research*, 36 (6): 1904-1909.
- Chung, J.-G., Peng, H.-Y., Chu, Y.-C., Hsieh, Y.-M., Wang, S.-D. & Chou, S.-T. (2012). Anti-invasion and apoptosis induction of *Chlorella* (*Chlorella sorokiniana*) in Hep G2 human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Functional Foods*, 4 (1): 302-310.
- Crissman, J. D., Hatfield, J. S., Menter, D. G., Sloane, B. & Honn, K. V. (1988). Morphological study of the interaction of intravascular tumor cells with endothelial cells and subendothelial matrix. *Cancer Research*, 48 (14): 4065-4072.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R. & Yamada, K. M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294 (5547): 1708-1712.
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7 (1): 11-20.
- Dvorak, H. F., Dvorak, A. M., Manseau, E. J., Wiberger, L. & Churchill, W. H. (1979). Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *Journal of the National Cancer Institute*, 62 (6): 1459-1472.
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, 315 (26): 1650-1659.
- Dvorak, H. F., Harvey, V., Estrella, P., Brown, L., McDonagh, J. & Dvorak, A. (1987). Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 57 (6): 673-686.
- Erkell, L. J. & Schirrmacher, V. (1988). Quantitative in vitro assay for tumor cell invasion through extracellular matrix or into protein gels. *Cancer research*, 48 (23): 6933-6937.
- Ferry, J. D. (1952). The mechanism of polymerization of fibrinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38 (7): 566.
- Festjens, N., Berghe, T. V. & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757 (9): 1371-1387.

- Friedl, P. & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3 (5): 362-374.
- Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Löchner, D. & Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of cell biology*, 113 (1): 173-185.
- Ghatage, D. D., Gosavi, S. R., Ganvir, S. M. & Hazarey, V. K. (2012). Apoptosis: molecular mechanism. *Journal of Orofacial Sciences*, 4 (2): 103.
- Golstein, P. & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32 (1): 37-43.
- Han, S., Tie, X., Meng, L., Wang, Y. & Wu, A. (2013). PMA and ionomycin induce glioblastoma cell death: activation-induced cell-death-like phenomena occur in glioma cells. *PLoS one*, 8 (10).
- Harlozinska, A. (2005). Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer research*, 25 (5): 3327-3333.
- Hoek, C., Mann, D. & Jahns, H. M. (1995). *Algae: an introduction to phycology*: Cambridge university press.
- Horwitz, A. R. & Parsons, J. T. (1999). Cell migration--movin'on. *Science*, 286 (5442): 1102.
- Hotary, K. B., Yana, I., Sabeh, F., Li, X.-Y., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Allen, E. D., Hiraoka, N. & Weiss, S. J. (2002). Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and-independent processes. *The Journal of experimental medicine*, 195 (3): 295-308.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110 (6): 673-687.
- Hynes, R. O. & Naba, A. (2012). Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4 (1): a004903.
- Illman, A., Scragg, A. & Shales, S. (2000). Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and microbial technology*, 27 (8): 631-635.
- Jokinen, J., Dadu, E., Nykvist, P., Käpylä, J., White, D. J., Ivaska, J., Vehviläinen, P., Reunanen, H., Larjava, H. & Häkkinen, L. (2004). Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (30): 31956-31963.
- Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D. & Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35 (3): 603-610.
- Kleinman, H. K. & Martin, G. R. (2005). *Matrigel: basement membrane matrix with biological activity*. Seminars in cancer biology: Elsevier. 378-386 s.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P. & Green, D. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16 (1): 3-11.
- Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R. & Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *The Journal of cell biology*, 107 (4): 1589-1598.
- Kumar, K. & Das, D. (2012). Growth characteristics of Chlorella sorokiniana in airlift and bubble column photobioreactors. *Bioresource technology*, 116: 307-313.
- Lauffenburger, D. A. & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84 (3): 359-369.

- Leavesley, D., Ferguson, G., Wayner, E. & Cheresch, D. (1992). Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *The Journal of cell biology*, 117 (5): 1101-1107.
- Lee, Y.-K. (1997). Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *Journal of Applied Phycology*, 9 (5): 403-411.
- Leist, M., Gantner, F., Köstner, G., Bohlinger, I., Tiegs, G., Bluethmann, H. & Wendel, A. (1996). The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. *Molecular Medicine*, 2 (1): 109.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S. & Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of experimental medicine*, 185 (8): 1481-1486.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A.-L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A. & Brenner, D. A. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366 (1): 177-196.
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J.-L. & Forner, A. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359 (4): 378-390.
- Lo, C.-M., Wang, H.-B., Dembo, M. & Wang, Y.-I. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79 (1): 144-152.
- Long, H., Chang, C. H., King, P. W., Ghirardi, M. L. & Kim, K. (2008). Brownian dynamics and molecular dynamics study of the association between hydrogenase and ferredoxin from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophysical journal*, 95 (8): 3753-3766.
- Ma, S., Chan, K. W., Hu, L., Lee, T. K. W., Wo, J. Y. H., Ng, I. O. L., Zheng, B. J. & Guan, X. Y. (2007). Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 132 (7): 2542-2556.
- Mahmood, T. & Yang, P.-C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4 (9): 429.
- Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., Chihara, M. & Karube, I. (2000). Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *Journal of applied phycology*, 12 (3-5): 263-267.
- McIlwain, D. R., Berger, T. & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5 (4): a008656.
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., Shete, S., Naftalis, E. Z., Huth, J. F., Beitsch, P. D., Leitch, M., Hoover, S. & Euhus, D. (2004). Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clinical cancer research*, 10 (24): 8152-8162.
- Maaser, K., Wolf, K., Klein, C. E., Niggemann, B., Zänker, K. S., Bröcker, E.-B. & Friedl, P. (1999). Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin $\alpha 2\beta 1$ but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Molecular biology of the cell*, 10 (10): 3067-3079.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B. & Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45 (6): 487-498.

- Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A. & Horwitz, A. F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385 (6616): 537-540.
- Palumbo, J. S., Kombrinck, K. W., Drew, A. F., Grimes, T. S., Kiser, J. H., Degen, J. L. & Bugge, T. H. (2000). Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood*, 96 (10): 3302-3309.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2 (12): 751-760.
- R&D, a. b. b. *Cell invasion assays*: R&D systems Tilgjengelig fra: <https://http://www.rndsystems.com/products/cell-invasion-assays> (lest 05.08).
- Riedl, S. J. & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5 (11): 897-907.
- Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Benink, H., Worzella, T. & Minor, L. (2004). Cell viability assays.
- Sheng, J., Yu, F., Xin, Z., Zhao, L., Zhu, X. & Hu, Q. (2007). Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chemistry*, 105 (2): 533-539.
- Sheppard, H. M., Corneillie, S. I., Espiritu, C., Gatti, A. & Liu, X. (1999). New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen. *Molecular and cellular biology*, 19 (4): 2746-2753.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Itoh, Y., Hasegawa, J.-i., Yamabe, K., Otsuki, Y., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. (1996). Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer research*, 56 (9): 2161-2166.
- Sigma-Aldrich. (2015). ECM gel from Enelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma.
- Skjånes, K., Rebours, C. & Lindblad, P. (2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical reviews in biotechnology*, 33 (2): 172-215.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101 (2): 87-96.
- Strickler, H. D. (2001). Simian virus 40 (SV40) and human cancers. *Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine*, 18 (1): 14-20.
- Sæther, B., Aagnes, B. & Myklebust, T. Å. (2015). Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway. *Cancer registry in Norway INSTITUTE OF POPULATION BASED CANCER RESEARCH*: 4-98.
- Tao, L., Dong, Z., Zannis - Hadjopoulos, M. & Price, G. B. (2001). Immortalization of human WI38 cells is associated with differential activation of the c - myc origins. *Journal of cellular biochemistry*, 82 (3): 522-534.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1989). Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem*, 27 (8): 495-501.
- Valastyan, S. & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147 (2): 275-292.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods*, 184 (1): 39-51.

- Vousden, K. H. & Prives, C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137 (3): 413-431.
- Wells, A., Grahovac, J., Wheeler, S., Ma, B. & Lauffenburger, D. (2013). Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends in pharmacological sciences*, 34 (5): 283-289.
- Wolberg, A. S. (2007). Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood reviews*, 21 (3): 131-142.
- Wu, H.-L., Hseu, R.-S. & Lin, L.-P. (2001). Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42.
- Wu, L.-c., Ho, J.-a. A., Shieh, M.-C. & Lu, I.-W. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (10): 4207-4212.
- Würstle, M. L., Laussmann, M. A. & Rehm, M. (2012). The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Experimental cell research*, 318 (11): 1213-1220.
- Yamaguchi, K. (1996). Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of applied phycology*, 8 (6): 487-502.
- Yang, F., Shi, Y., Sheng, J. & Hu, Q. (2006). In vivo immunomodulatory activity of polysaccharides derived from *Chlorella pyrenoidosa*. *European Food Research and Technology*, 224 (2): 225-228.
- Zhang, L., Happe, T. & Melis, A. (2002). Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, 214 (4): 552-561.
- Zhang, L. & Melis, A. (2002). Probing green algal hydrogen production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357 (1426): 1499-1509.
- Zong, W.-X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z.-Q. & Thompson, C. B. (2004). Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & development*, 18 (11): 1272-1282.

Vedlegg A – P-verdier for DMSO-kontroll

WI-38

General Linear Model: Celleviabilitet DMSO kontroll WI-38

DMSO-kontroll WI-38 - Alle konsentrasjoner

Factor	Type	Levels	Values
DMSO kontroll_WI-38	fixed	6	0,0005; 0,0010; 0,0020; 0,0045; 0,0090; 0,0185

Analysis of Variance for Celleviabilitet_1_2, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
DMSO kontroll_WI-38	5	3291,83	3291,83	658,37	16,24	0,000
Error	12	486,39	486,39	40,53		
Total	17	3778,21				

S = 6,36650 R-Sq = 87,13% R-Sq = 81,76%

General Linear Model: Celleviabilitet DMSO kontroll WI-38

DMSO-kontroll WI-38 - 0,9% vs 0,45% vs 0,20% vs 0,10% vs 0,05%

Factor	Type	Levels	Values
DMSO kontroll_WI-38_1	fixed	5	0,0005; 0,0010; 0,0020; 0,0045; 0,0090

Analysis of Variance for Celleviabilitet_1_2_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
DMSO kontroll_WI-38_1	4	68,56	68,56	17,14	0,36	0,829
Error	10	470,57	470,57	47,06		
Total	14	539,13				

S = 6,85978 R-Sq = 12,72% R-Sq = 0,00%

General Linear Model: Celleviabilitet DMSO kontroll WI-38

DMSO-kontroll WI-38 - 1,85% vs 0,9%

Factor	Type	Levels	Values
DMSO kontroll_WI-38_1_1	fixed	2	0,0090; 0,0185

Analysis of Variance for Celleviabilitet_1_2_1_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
DMSO kontroll_WI-38_1_1	1	1518,5	1518,5	1518,5	216,39	0,000
Error	4	28,1	28,1	7,0		
Total	5	1546,6				

S = 2,64904 R-Sq = 98,19% R-Sq = 97,73%

Wi-38 VA-13

General Linear Model: Celleviabilitet versus DMSO kontroll

DMSO-kontroll WI-38 VA-13 - Alle konsentrasjoner

Factor	Type	Levels	Values
DMSO kontroll	fixed	6	0,0005; 0,0010; 0,0020; 0,0045; 0,0090; 0,0185

Analysis of Variance for Celleviabilitet, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
DMSO kontroll	5	2049,55	2049,55	409,91	7,54	0,003
Error	11	598,30	598,30	54,39		
Total	16	2647,85				

S = 7,37500 R-Sq = 77,40% R-Sq = 67,13%

General Linear Model: Celleviabilitet versus DMSO kontroll

DMSO-kontroll WI-38 VA-13 - 0,9% vs 0,45% vs 0,20% vs 0,10% vs 0,05%

Factor	Type	Levels	Values
DMSO kontroll_1	fixed	5	0,0005; 0,0010; 0,0020; 0,0045; 0,0090

Analysis of Variance for Celleviabilitet_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
DMSO kontroll_1	4	150,16	150,16	37,54	0,57	0,693
Error	9	595,42	595,42	66,16		
Total	13	745,59				

S = 8,13377 R-Sq = 20,14% R-Sq = 0,00%

General Linear Model: Celleviabilitet_1_1 versus DMSO kontroll_1_1

DMSO-kontroll WI-38 VA-13 - 1,85 % vs 0,9%

Factor	Type	Levels	Values
DMSO kontroll_1_1	fixed	2	0,0090; 0,0185

Analysis of Variance for Celleviabilitet_1_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
DMSO kontroll_1_1	1	707,30	707,30	707,30	54,04	0,002
Error	4	52,36	52,36	13,09		
Total	5	759,66				

S = 3,61787 R-Sq = 93,11% R-Sq = 91,38%

Hep G2

General Linear Model: Celleviabilitet versus DMSO kontroll Hep G2

DMSO-kontroll Hep G2 - Alle konsentrasjoner

Factor	Type	Levels	Values
DMSO kontroll_Hep G2	fixed	6	0,0005; 0,0010; 0,0020; 0,0045; 0,0090; 0,0185

Analysis of Variance for Celleviabilitet_1_2_1_2, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
DMSO kontroll_Hep G2	5	683,89	683,89	136,78	1,74	0,259
Error	6	471,54	471,54	78,59		
Total	11	1155,44				

S = 8,86513 R-Sq = 59,19% R-Sq = 25,18%

Vedlegg B - P-verdier for migrasjons assay Fibringel

General Linear Model: Migrasjon% i Fibrin CSEt

Migrasjons assay - Fibringel - CSEt- Alle konsentrasjoner

Factor	Type	Levels	Values
MA Fibrin konsentrasjon CSEt	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for Migrasjon %, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
MA Fibrin konsentrasjon CSEt	4	2334,2	2334,2	583,6	3,14	0,037
Error	20	3712,9	3712,9	185,6		
Total	24	6047,1				

S = 13,6251 R-Sq = 38,60% R-Sq = 26,32%

General Linear Model: Migrasjon% Fibrin CSEt

Migrasjons assay - Fibringel - CSEt- 500 vs 0

Factor	Type	Levels	Values
MA Fibrin konsentrasjon CSEt_1	fixed	2	0; 500

Analysis of Variance for Migrasjon %_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
MA Fibrin konsentrasjon CSEt_1	1	12,38	12,38	12,38	0,21	0,662
Error	8	481,72	481,72	60,21		
Total	9	494,10				

S = 7,75981 R-Sq = 2,51% R-Sq = 0,00%

General Linear Model: Migrasjon% Fibrin CSEt

Migrasjons assay - Fibringel - CSEt- 250 vs 0

Factor	Type	Levels	Values
MA Fibrin konsentrasjon CSEt__1	fixed	2	0; 250

Analysis of Variance for Migrasjon %_1_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
MA Fibrin konsentrasjon CSEt__1	1	1782,1	1782,1	1782,1	11,07	0,010
Error	8	1288,1	1288,1	161,0		
Total	9	3070,2				

S = 12,6890 R-Sq = 58,05% R-Sq = 52,80%

General Linear Model: Migrasjon% Fibrin CSEt

Migrasjons assay - Fibringel - CSEt- 500 vs 125 vs 62,5 vs 0

Factor	Type	Levels	Values
MA Fibrin konsentrasjon CSEt_1	fixed	4	0,0; 62,5; 125,0; 500,0

Analysis of Variance for Migrasjon %_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
MA Fibrin konsentrasjon CSEt_1	3	841,6	841,6	280,5	1,64	0,219
Error	16	2734,0	2734,0	170,9		
Total	19	3575,6				

S = 13,0719 R-Sq = 23,54% R-Sq = 9,20%

General Linear Model: Adhesjon % Fibrin CSEt

Adhesjon - fibringel - Alle konsentrasjoner CSEt

Factor	Type	Levels	Values
Adher Fibrin Konsentrasjon CSEt	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for Adhesjon %, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Adher Fibrin Konsentrasjon CSEt	4	83,22	83,22	20,80	1,38	0,278
Error	20	302,38	302,38	15,12		
Total	24	385,60				

S = 3,88833 R-Sq = 21,58% R-Sq = 5,90%

General Linear Model: Adhesjon% Fibrin CSH

Migrasjons assay - fibringel - Alle konsentrasjoner CSH

Factor	Type	Levels	Values
Adher Fibrin Konsentrasjon CSH	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for Adhesjon-2 %, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Adher Fibrin Konsentrasjon CSH	4	248,8	248,8	62,2	0,36	0,836
Error	20	3481,4	3481,4	174,1		
Total	24	3730,2				

S = 13,1936 R-Sq = 6,67% R-Sq = 0,00%

Vedlegg C - P-verdier for migrasjons assay med Matrigel

General Linear Model: Migrasjon% Matrigel CSEt

Migrasjons assay - Matrigel - Alle konsentrasjoner CSEt

Factor	Type	Levels	Values
MA Matri Konsentrasjon CSEt	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for Migrasjon-3 %, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
MA Matri Konsentrasjon CSEt	4	617,9	617,9	154,5	0,94	0,467
Error	15	2462,2	2462,2	164,1		
Total	19	3080,1				

S = 12,8119 R-Sq = 20,06% R-Sq(Tao et al.) = 0,00%

General Linear Model: Migrasjon% Matrigel CSH

Migrasjons assay - Matrigel - Alle konsentrasjoner CSH

Factor	Type	Levels	Values
MA Matri Konsentrasjon CSH	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for Migrasjon-4 %, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
MA Matri Konsentrasjon CSH	4	302,7	302,7	75,7	0,59	0,678
Error	15	1938,1	1938,1	129,2		
Total	19	2240,9				

S = 11,3670 R-Sq = 13,51% R-Sq = 0,00%

General Linear Model: Adhesjon% Matrigel CSEt

Adhesjon - Matrigel - Alle konsentrasjoner CSEt

Factor	Type	Levels	Values
Adher Matri Konsentrasjon CSEt	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for Adhesjon-3 %, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Adher Matri Konsentrasjon CSEt	4	11,313	11,313	2,828	1,07	0,406
Error	15	39,688	39,688	2,646		
Total	19	51,001				

S = 1,62662 R-Sq = 22,18% R-Sq(Tao et al.) = 1,43%

General Linear Model: Adhesjon Matrigel CSH

Adhesjon - Matrigel - Alle konsentrasjoner CSH

Factor	Type	Levels	Values
Adher Matri Konsentrasjon CSH	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for Adhesjon-4 %, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Adher Matri Konsentrasjon CSH	4	1,671	1,671	0,418	0,19	0,939
Error	15	32,748	32,748	2,183		
Total	19	34,420				

S = 1,47757 R-Sq = 4,86% R-Sq = 0,00%



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no