

Karakterisering av immuncellerespons og antimikrobiell effekt hos *Dendrobaena veneta*

Fride Berg



Høgskolen i **Hedmark**

Mastergradsoppgave

Avdeling for lærerutdanning og naturvitenskap

HØGSKOLEN I HEDMARK

2009

Innhold

Innhold

INNHold	2
FORORD	6
NORSK SAMMENDRAG	7
ENGELSK SAMMENDRAG (ABSTRACT)	8
FORKORTELSER, BENEVNINGER OG FAGUTTRYKK	9
1 INNLEDNING	16
1.1 IMMUNSYSTEM.....	17
1.2 MEITEMARKEN <i>DENDROBAENA VENETA</i> SOM MODELLORGANISME I IMMUNOLOGISKE STUDIER	19
1.2.1 <i>Coelomvæske og coelomocytter hos meitemark</i>	20
1.3 ANTIMIKROBIELL EFFEKT I COELOM VÆSKE	21
1.3.1 <i>Analyse av antimikrobiell effekt ved utplating- og sonehemningsforsøk</i>	22
1.3.2 <i>Analyse av antimikrobiell effekt ved flowcytometri</i>	23
1.3.3 <i>Analyse av antimikrobiell effekt ved PMA PCR metode</i>	24
1.4 CELLEPROLIFERASJON VED AKTIVERING AV IMMUNSYSTEMET	25
1.4.1 <i>Analyse av celleproliferasjon ved flowcytometri og fluorescensmikroskopi</i>	26
1.5 INSTRUMENTER OG TEKNOLOGI FOR ANALYSE AV IMMUNCCELLER, CELLEPROLIFERASJON OG ANTIMIKROBIELL EFFEKT	28
1.5.1 <i>Flowcytometri</i>	28
1.5.2 <i>Fluorescensmikroskopering</i>	32
1.5.3 <i>Real time PCR</i>	33
1.6 HENSIKT MED OPPGAVEN	34
2 MATERIALER OG METODER	36
2.1 HOLD AV MEITEMARK	36

2.2	IMMUNCELLEEKSTRAKSJON	36
2.2.1	<i>Immuncelleekstraksjon ved ultralydstimulering</i>	36
2.2.2	<i>Immuncelleekstraksjon ved etanolbehandling</i>	37
2.2.3	<i>Immuncelleekstraksjon ved elektrostimulering</i>	38
2.3	STUDIE AV IMMUNCELLERESPONS	39
2.3.1	<i>Injisering av bakterier i meitemark</i>	40
2.3.2	<i>Studie av bakterieinnhold i ekstrahert coelomvæske hos injisert mark</i>	40
2.4	FLOWCYTOMETRI OG MIKROSKOPI FOR STUDIE AV IMMUNCELLER OG CELLEPROLIFERASJON	41
2.4.1	<i>Analyse av ufarget celleprøve</i>	41
2.4.1.1	Autofluoresens.....	41
2.4.2	<i>DNA farging for studie av celleproliferasjon</i>	42
2.4.2.1	Cellefiksering.....	42
2.4.2.2	PI farging.....	43
2.4.2.3	PI farging med modifisert Vindeløvs prosedyre.....	43
2.4.2.4	PI farging med Vindeløvs prosedyre.....	44
2.4.2.5	DRAQ5 Farging.....	44
2.4.2.6	NIM DAPI reagens og DAPI-farging	44
2.4.2.7	HOE (Hoechst) farging	45
2.5	STUDIE AV ANTIMIKROBIELL EFFEKT I COELOMVÆSKE HOS MEITEMARKEN <i>DENDROBAENA VENETA</i>	45
2.5.1	<i>Analyse av bakteriedrap i immuncelleløsning/ coelomvæske ved PMA PCR metoden</i> .	46
2.5.1.1	Realtime PCR	47
2.5.2	<i>Analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske ved flowcytometri</i>	48
2.5.3	<i>Analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske ved sonehemningsforsøk</i>	49
2.5.4	<i>Studie av in vitro vekst ved bakterieinkubasjon i cellefri coelomvæske</i>	50
3	RESULTATER	51

3.1	IMMUNCELLEEKSTRAKSJON	51
3.1.1	<i>Immuncelleekstraksjon ved ultralydstimulering</i>	52
3.1.2	<i>Immuncelleekstraksjon ved etanolbehandling</i>	53
3.1.3	<i>Immuncelleekstraksjon ved elektrostimulering</i>	54
3.1.3.1	Celleutbytte ved elektrostimulering	55
3.2	KARAKTERISERING AV IMMUNCELLER OG IMMUNCELLERESPONS	55
3.2.1	<i>Cellepopulasjoner og autofluorescens</i>	55
3.2.2	<i>Studie av immuncellerespons</i>	59
3.2.3	<i>Cellefiksering</i>	61
3.2.4	<i>Cellefarging</i>	61
3.2.4.1	PI farging	61
3.2.4.2	PI farging med modifisert Vindeløvs prosedyre	63
3.2.4.3	PI farging med Vindeløvs prosedyre	63
3.2.4.4	DRAQ5 farging	64
3.2.4.5	NIM DAPI reagens og DAPI-farging	65
3.2.4.6	Hoechst (HOE) farging	67
3.3	STUDIE AV ANTIMIKROBIELL EFFEKT I COELOMVÆSKE HOS MEITEMARKEN <i>DENDROBAENA VENETA</i> 72	
3.3.1	<i>Analyse av bakteriedrap i immuncelleløsning/coelomvæske ved PMA PCR metoden</i> .72	
3.3.2	<i>Analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske ved flowcytometri</i>	72
3.3.3	<i>Analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske ved sonehemnings forsøk</i> ..	75
3.3.4	<i>Studie av invitro vekst ved bakterieinkubasjon i cellefri coelomvæske</i>	76
4	DISKUSJON	79
4.1	IMMUNCELLEEKSTRAKSJON	79
4.2	STUDIE AV IMMUNCELLER OG IMMUNCELLERESPONS VED FLOWCYTOMETRI OG MIKROSKOPI80	
4.3	ANTIMIKROBIELL EFFEKT	87

4.3.1	<i>Bakterieinnhold i ekstrahert immuncelleløsning hos injisert mark.....</i>	87
4.4	FORSLAG TIL VIDERE STUDIER	90
5	KONKLUSJON.....	91
	LITTERATURLISTE	92
6	VEDLEGG.....	97
6.1	LØSNINGER	97
6.2	STUDIE AV INVITRO VEKST VED BAKTERIEINKUBASJON I COELOMVÆSKE	99
6.3	BAKTERIEINJISERING	101
6.4	OD-CT FORHOLD FOR Å FINNE OPTIMALT BLANDINGSFORHOLD AV BAKTERIER.	102
6.5	IMMUNOFARGING.....	103

Forord

Denne mastergradsoppgaven har blitt utført på laboratorier på Biohus, ved Høgskolen i Hedmark, avdeling for lærerutdanning og naturfag (LUNA), i perioden januar 2008 til september 2009. Førsteammenuensis Frøydis Deinboll Myromslien og professor Knut Rudi som har vært veiledere. Oppgaven inngår i forskningsprosjekter der meitemark benyttes som modellorganisme.

Jeg vil først få rette en spesiell takk til Knut Rudi og Frøydis Myromslien for deres engasjement, støtte, forståelse og meget dyktige veiledning underveis og i skriveprosessen. Jeg har hatt stort faglig utbytte av å være deres mastergradsstudent.

Jeg vil også takke medstudent og ingeniør Brit Rønning Johansen for all verdifull hjelp og opplæring knyttet til bruk av flowcytometer. En stor takk går også til de ansatte ved bioteknologistudiet, stipendiater og medstudenter, for motivasjon, støtte, samarbeid og moro gjennom en flott studietid på Hamar. En spesiell takk rettes til dere som med kritiske øyne har lest igjennom oppgaveteksten.

Til slutt vil jeg takke familie, venner og min samboer Lars Standerholen for all støtte.

Hamar, 25. august 2009

Fride Berg

Norsk sammendrag

Studie av det innate immunforsvaret hos meitemark kan brukes til å øke forståelsen av mekanismene som ligger til grunn for immunsystemet hos høyerestående dyr. I dette arbeidet har det blitt etablert og optimalisert metoder for ekstraksjon av immunceller, såkalt coelomocytter, fra meitemarken *Dendrobaena veneta*. Ulike ekstraksjonsbuffer har blitt testet og optimalisert med hensyn på størst celleutbytte og lavest mulig grad av celleaggregering. Resultatene viste at elektrostimulering var den mest effektive metoden og at LBSS buffer tilsatt EDTA og serum ga minst celleaggregeringer.

Lite vet man om hva som styrer hvor bredspektret en immunrespons skal være. For å finne svaret på dette spørsmålet, vil det være naturlig å se på hvordan organismen responderer på ulike invaderende og ukjente stoffer eller organismer. Vi har arbeidet med å etablere og optimalisere metoder for studie av celleproliferasjon, som er en naturlig del av en immunrespons. Analyse av celleproliferasjon har blitt utført ved flowcytometri og fluorescensmikroskopi. Ulike DNA bindende fluorokromer har blitt testet for deteksjon av celleproliferasjon. For å trigge celleproliferasjon, ble mark elektrostimulert og tømt for coelomocytter gjentatte ganger. Meitemark har også blitt injisert med bakteriene *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus* og eventuell påfølgende respons i form av celleproliferasjon ble analysert ved flowcytometri og fluorescensmikroskopi. Av fluorokromene som ble testet, ga Hoechst 33258 (HOE) i kombinasjon med UV eksitasjon i flowcytometeret, de beste resultatene sett i forhold til et teoretisk riktig cellesyklus diagram. Det var allikevel ikke mulig å detektere celleproliferasjon av immunceller ved bruk av HOE, noe som kan skyldes et metodemessig problem.

Utøvelse av antimikrobiell effekt er viktig for overlevelse hos alle organismer. Coelomvæske som ble ekstrahert fra *Dendrobaena veneta* ble testet for antimikrobiell effekt ved sonehemningsforsøk, flowcytometri (med bruk av LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit), PMA PCR metode og ved utplatingsforsøk. Etter sterilfiltrering og oppkonsentrering av cellefri coelomvæske ved hjelp av frysetørking, ble det detektert tydelig antimikrobiell effekt i den cellefrie løsningen mot bakteriene *E. coli* og *S. aureus* i utplatingsforsøk. Basert på resultatene om eksistens av antimikrobiell effekt, bør det gjøres videre studier for å kartlegge hvor bredspektret denne effekten er og for å kunne si noe om mekanismene som styrer dette.

Engelsk sammendrag (abstract)

The mechanisms underlying the immune system in higher organisms can be better understood by studying the innate immune system in earthworms. In this work we established and optimized methods for extraction of immune cells, called coelomocytes, from the worm *Dendrobaena veneta*. Different extraction solutions were tested and optimized with regard to the highest cell yield and the lowest possible degree of cell aggregation. The results showed that electrical stimulation was the most efficient method, and that the LBSS buffer containing added EDTA and serum gave the lowest degree of cell aggregation.

Little is known about the mechanisms that determine how broad-spectred an immune response can or should be. To help answer to this question, it would be natural to look at how organisms respond to different invading organisms or unknown substances. Therefore, in this work, we attempted to establish and optimize methods for studying proliferation, which is a natural part of an immune response. Cell proliferation was analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy. Different fluorescent dyes were tested for detection of cell proliferation. To trigger cell proliferation, worms was electrostimulated repeatedly to drain them of coelomocytes. The cell proliferation response of earthworms injected with the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was analyzed by flow cytometry and in fluorescence microscope. The fluorescent dye Hoechst 33258 (HOE) used in combination with UV excitation, yielded results most consistent with the theoretic flow cytometric cell cycle diagram. However, we did not detect any cell proliferation of immune cells using HOE.

Antimicrobial defence is important for the survival of all organisms. Coelomic fluid extracted from *Dendrobaena veneta* was tested for antimicrobial effects in zone inhibition experiments, flow cytometry (using the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit), by the PMA PCR and disk methods. Results from the disk method showed a clearly antimicrobial effect of the cell-free coelomic fluid, which had been sterile-filtered and concentrated by freeze-drying, against the bacteria *E. coli* and *S. aureus*. Based on these data, further studies should be performed to map out how broad-spectred this antimicrobial effect is and to understand more about the mechanisms controlling it.

Forkortelser, benevninger og faguttrykk

Forkortelser:

Abs	absorbans
C _t	threshold sykel
dH ₂ O	destillert vann
DAPI	4', 6-diamidino- 2 phenyl- indole
DNA	deoksyribonukleinsyre (deoksyribo nucleic acid)
dNTP	deoksynukleosid trifosfat
EMA	Ethidium monoazide
EtOH	etanol
EV	elektrisk volum
FAM	6-carboxy fluorescein
FBS	fetal bovine serum
FC	forward scatter
HOE	Hoechst
mRNA	messenger RNA
NIM DAPI	Nuclear Isolation Medium med DAPI fluorokrom (se DAPI)
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidium iodide
PMA	Propidium monoazide
RNA	ribonukleinsyre
RNase	Ribonuklease
ROX	6-carboxy-X-rhodamine
rRNA	ribosomal RNA
RT-PCR	Real time PCR (se PCR)
SC	Side scatter
TAMRA	6-carboxy-terta-methyl-rhodamine
UV	Ultraviolett
Ver.	versjon

Benevninger:

°C	grader Celcius
g	gram
mg	milligram (10^{-3} g)
µg	mikrogram (10^{-6} g)
l	liter
ml	milliliter (10^{-3} l)
µl	mikroliter (10^{-6} l)
M	molar
mM	millimolar (10^{-3} M)
µM	mikromolar (10^{-6} M)
× g	enhet for akselerasjon (akselerasjon på 100 g, betyr det at det utsettes for en kraft som er lik 100 ganger dets tyngde)
sek	sekunder
min	minutter
V	volt
W	watt
cm	centimeter (0,01 meter, 10^{-2} m)
nm	nanometer (en milliards meter, 10^{-9} m)

Faguttrykk og ord hvor engelsk skrivemåte er bevart i teksten:

Adaptivt immunsystem/ humoral immunsystem- en selektiv respons som inngår som en del av immunsystemet hos vertebrater, hvor det produseres spesifikke antistoffer og/eller cytotoksiske celler mot invaderende mikroorganismer, parasitter, transplantert vev eller andre substanser gjenkjent som ukjente av kroppens antigener. Denne typen immunsystem resulterer i en varig og spesifikk immunitet mot patogener (hukommelse).

Albumen- innholdet i cocoon bestående av lipoproteiner.

Amplifiseringsplot- I real time PCR betegner dette plottet av antall syklener versus fluorescens signal som korrelerer med mengden templat av mål DNA i eksponentiell fase av PCR.

Annelider- Betegnelse på et fylum/ rekke. Leddorm brukes også om fylumet annelida.

Antikoagulant- stoff som hindrer aggregering eller antikoagulering.

Autofluorescens- lys som emitteres naturlig av en ufarget, illuminerende celle.

Baseline- innen realtime PCR betegner dette de initielle syklene av PCR når det er liten endring i fluorescenssignal.

Celleaggregering- ansamling av flere celler som danner såkalte aggregater.

Clitellum- en utposning som vanligvis dannes mellom segment 26 til 33 til kjønnsmodne meitemark i et kjertelrikt parti av huden, og som svulmer opp i paringstiden. Sekretet fra dette holder dyrene sammen under paringen, da hvert av dem opptar sæd fra det andre. Det

herdede slimet fra clitellum danner en «muffe», og når de trekker seg baklengs ut av denne, legges først eggene inni muffen, og derpå omgis eggene med sæd som stammer fra det andre dyret, så de blir befruktet. Ringen trekker seg så sammen til en kokong med 2–20 egg. Når ungene kommer ut av egget, er de selvhjulpne og blir voksne på 3–4 måneder.

Coelom- Hulrom mellom kroppsveggen og fordøyelseskanalen hos meitemark. Denne ekte kroppshulen betegnes også cølom og finnes hos alle virveldyr og noe virveløsedyr. Et coelom gir mulighet for organers tilvekst og sørger for å holde kroppsveggenes muskulatur atskilt fra tarmkanalen, som muliggjør uavhengig muskelbevegelse. Hos virvelløse dyr er coelomet er fylt med væske, coelomvæske, og denne spiller denne væsken en viktig rolle i den interne transporten i organismen og fungerer som et hydrostatisk skjelett. Hos meitemark inneholder denne coelomvæsken immunceller, ofte betegnet coelomocytt.

Coelomvæske- eng coelomic fluid, væske i coelomrommet hos virvelløse dyr. Kan spille en viktig rolle ved intern transport i organismen (gasser, næringsstoffer, avfallsprodukter), stive opp organismen (hydrostatisk skjelett). Inneholder coelomocytt (immunceller) hos meitemark.

Cocoon- eng. betegnelse for kokonger hos meitemark. Kan inneholde fra 2 til 20 egg. Meitemark legger flere kokonger utover forsommeren.

Cytoskjelettet- er en viktig del av eukaryote celler. Den stiver opp cellen, deltar i celledelingen, hjelper til med transport av proteiner i cellen og holder organeller på plass. Prokaryote har også en cytoskjelett-lignende struktur.

DAPI- 4', 6-diamidino- 2 phenyl- indole, DNA/RNA bindene fluorokrom. Eksiteres av UV lys og har emisjonsmaksimum ved 461 nm.

Dikrotisk speil/filter- et fargefilter brukt til å selektere lys for gjennomtrengning og refleksjon, betegner farger av lys som reflekteres.

DNA- arvestoff, fork. for eng. *deoxyribonucleic acid*, deoksyribonukleinsyre, kjemisk forbindelse, arvestoffet som kontrollerer prosessene i alle levende organismers celler. DNA finnes vesentlig i cellekjerner.

Dorsal porer: Små hull lokalisert i furer i segmentene nedover midten på meitemarkens rygg/overside. Disse hullene leder til coelom-rommet.

Dot plot- et todimensjonalt diagram som korrelerer intensiteten av to parametre for hver celle eller partikkel.

Eksitasjon- opptak/adsorpsjon av lys med en bestemt bølgelengde. Går fra ett energinivå til ett høyere energinivå (eksitert tilstand), der differansen mellom grunnivå og eksitert tilstand er lik $E_{\text{eksitasjon}}$. Noe av energien vil frigis som varme og partikkelen vil da nå en ny eksitert tilstand/energinivå. Energien til den eksiterte partikkelen vil kunne frigjøres gjennom emisjon, der energien som frigjøres fra eksitert tilstand etter varmefrigjøring og grunnivå er lik E_{emisjon} . Ved å beregne $E_{\text{eksitasjon}} - E_{\text{emisjon}}$ finner man Stokes Shift og er det som er avgjørende for hvor godt egnet fluorokromen er til bruk i fluorescensstudier.

Emisjon- frigjørelse av lys med en bestemt bølgelengde.

Epithelium- et lag av celler tett bundet sammen som kler alle ytre og indre kroppsoverflater, f. eks epidermis. Har beskyttende, sekretorisk og absorptive oppgaver. Epitelvev kan være bygget opp av et enkeltlag av celler eller bygget opp av flere lag. Epitelvevet deles inn i to

typer: overflateepitelvev (fysisk beskyttelse av kroppens vev og organer, kontrollere kroppens indre miljø ved å regulere transporten av forskjellige substanser og registrere sansepåvirkninger gjennom sanseceller) og kjerneepitel (produserer sekreter og hormoner som regulerer kroppens funksjoner).

Exposure- eksponering, brukt som faguttrykk innen flowcytometri I forhold til lyseksponering.

FAM- 6-carboxy fluorescein, den mest brukte reporter fluorokromen ved 5'enden av TaqMan® probe.

Filopodia- (microspikes), er tynne, dynamisk celle forlengelser, bestående av tette bunter av lange actin filamenter dekket med cellemembranen. Lengden varierer og de kan samhandle med andre celler.

Flowcytometri/væskestrømscytometri- eng. flow cytometry, er en metode for å måle fysiske og kjemiske egenskaper til enkeltceller i en væskestrøm. Kan brukes til bl.a. til å måle celleoverflate, cytoplasma eller cellekjerne. Baseres på fluorescens og lysspredningssignaler

Fluorescens- Mange organiske og uorganiske substanser viser noe fluorescens. Dette kalles for primær fluorescens eller autofluorescens. Noen substanser med høy sensitivitet er tatt i bruk til merking av biomolekyler. Disse kalles for fluorokromer, og konjugert til andre organiske aktive substanser kalt fluoriserende prober eller fluorofor. Metoden kalles for indirekte eller sekundær fluorescens. Fluorescensmolekylet er som oftest polyaromatiske hydrokarboner. Dens spesielle egenskap er at de opptar energi i form av lys av en bestemt bølgelengde (absorpsjon eller eksitasjon), og avgir energi på en annen bølgelengde (emisjon eller utstråling).

Fluorescence resonance energy transfer (FRET)- interaksjon mellom elektronisk eksiterte nivåer av to fluorokromer. Energien overføres fra det ene (donor) fargestoffet til det andre (akseptor) fargestoffet. FRET er distanseavhengig og skjer når donor og akseptor er nær hverandre.

Fluorokrom- Et fargestoff som absorberer lys med en gitt bølgelengde og deretter emitterer lys ved en annen bølgelengde (lengre bølgelengde).

Forward scatter (FC)- innen flowcytometri betegner dette lysspredningen som skjer i forlengelsen av eksitasjonslyset, såkalt lavvinkel lysspredning, og kan gi informasjon om cellens størrelse. EV prinsippet kan alternativt brukes for karakterisering av celledørrelse.

Frysetørking- En prosess hvor vann eller andre løsemidler fjernes fra en struktur ved sublimasjon fra frossen tilstand. Dette må foregå ved temperaturer under frysepunktet.

Fylum- nivå innen systematikk. Fylum brukes ofte istedenfor betegnelsen rekke.

Gain- engelsk betegnelse som brukes innen flowcytometri i forbindelse med justering av styrke på signaler. Innen elektronikk generelt, brukes betegnelsen som et mål for muligheten en amplifikator har til å øke styrke eller amplitude til et signal.

Gram positive og gram negative bakterier- Ved gram farging av bakterier vil man kunne skille mellom gram positive bakterier som farges lilla og gram negative bakterier som farges rosa. Celleveggen til gram positive bakterier består av et enkelt 20-80nm tykk homogent peptidoglukan eller murein lag på utsiden av plasmamembranen. Gram negative bakterier

har i kontrast til dette en mer kompleks cellevegg bestående av 2-7nm tykt peptidoglukan lag omsluttet av en 7-8nm tykk ytre membran. På grunn av det tykke peptidoglukanlaget, er celleveggen til gram positive bakterier sterkere enn hos gram negative bakterier. Den gram positive celleveggen inneholder også vanligvis store mengder teichoic acid, som ikke finnes hos gram negative bakterier.

Innat immunsystem /medfødt immunitet- innat immunitet, medfødt forsvars- eller immunsystem som kommer tillegg til det spesifikke immunsystemet (se adaptivt immunsystem), som utvikler forsvar rettet spesifikt mot det aktuelle antigenet. Det medfødte immunitetssystemet omfatter kplementsystemet, fagocytter og NK-celler. Dette er et «førstelinjeforsvar» som er i stand til å ta hånd om og uskadeliggjøre de fleste av de antigenene som trenger inn utenfra. Hos organismer som har både et innat og adaptivt immunsystem er det et nært samspill mellom medfødt og spesifikk immunitet, der såkalte toll-liknende reseptorer og mastceller er av stor betydning. Den medfødte immuniteten, og især NK-celler, antas også å ha en rolle i å forsvare kroppen mot kreftceller.

Invertebrater- evertebrater, Invertebrata. Evertebrata, fellesbetegnelse for alle dyr som verken har virvelsøyle eller ryggstreng (*chorda dorsalis*). Meitemark tilhører denne gruppen.

Invertert (omvendt) mikroskop: mikroskop med lyskilden og kondensoren på toppen, over brettet hvor prøven analyseres sett ovenfra, mens objektiver og dreieskive er plassert under.

Klonal- en klon (identiske celler eller ev. organismer), i forholdt til immunologi og immunceller: immunologisk hukommelse dannes gjennom primær respons som følge av proliferasjon av antigen stimulerede naive celler som danner mange hukommelsesceller, en prosess kjent som klonal ekspansjon, som er spesifikk.

Koaksial laminær flyt- brukes innen flowcytometri ved beskrivelse av væskestrømmen. Koaksial betyr med samme akse, mens laminær bevegelse indikerer bevegelse i væsker eller gasser slik at de enkelte partikler følger parallelle linjer (strømlinjer) uten virvler. Med økende fart opptrer virvler, turbulens.

Koherent lys- bestemt faseforhold mellom de lyskvantene som sendes ut (ekstremt liten spredning i bølgelengde, dvs. lys med en helt bestemt og ren farge), betegnes ofte i forbindelse med laserlys som er meget intenst, skarpt avgrenset retning, monokromatisk og koherent.

Kommensaler- lever på eller inni andre organismer (vert) uten å være til skade eller nytte for denne verten. Kommensalen har nytte av denne enveis prosessen som ikke er obligat.

Lysozym- enzym som finnes blant annet i sekreter fra dyr slik som tårer, eggehvite og i noen mikroorganismer. Den splitter glykosidbindinger mellom noen residuer i mykopolsakkarider og mykopeptider i bakterielle cellevegger, som resulterer i bakteriolyse, og dermed fungerer som en antibakteriell agent.

Oligocheter- klasse fåbørstemark/fåbørsteormer, leddormklassen *Oligochaeta*. Mangler børsteføtter, cirrer og gjeller og har få børster i hvert knippe. Hodet mangler oftest vedheng. Hermafroditter. Mest kjent er meitemarkene.

PAMPs- Pathogen associated molecular patterns, er små molekulære motiver konserverte i en klasse mikrober. De blir gjenkjent av toll-liknende reseptorer og andre pattern recognition receptors (PRRs) i planter og dyr. De aktiverer innate immunresponser når de blir gjenkjent som ukjente (non-self) molekyler og beskytter verten mot infeksjon.

Passiv referanse- en fluorokrom som utgjør en intern referanse som reporter fargestoffet (fluorokromen) kan normaliseres mot ved dataanalyse i programvaren. Ofte nødvendig for å

korrigere fluktuasjoner fra brønn til brønn forårsaket av endringer i konsentrasjon eller volum. ROX er den mest vanlig brukte passive referansen.

Propidium iodide (PI)- DNA/RNA bindende fluorokrom, eksiteres ved 488 nm og har emisjon ved 562-588nm. Kan brukes til blant annet å studere cellelevedyktighet og DNA syklus.

Pseudopodia/ pseudopodier- midlertidige utløpere av cellens cytoplasma hos mange encellede, eukaryote organismer, særlig amøber. Tjener cellens bevegelse («amøboid bevegelse») og næringsopptak. Cellen forflytter seg ved at cytoplasma-utløpere strekkes ut i bevegelsesretningen, hvoretter celleinnholdet flyter over i utløperne. Ulike grupper av encellede organismer har pseudopodier med karakteristisk bygning, f.eks. korte og stumpe (*lobopodier*), fine tråder (*filopodier*), forgrenet-sammenløpende som nettverk (*rhizopodier*) eller med en indre støttende skjelettstav (*axopodier*). Hos flercellede dyr dannes pseudopodier hos bevegelige celler som gjør tjeneste i organismens forsvar og renovasjon, f.eks. hvite blodceller og eteceller (makrofager).

Pulse labeled- flekkvis merket

Quencher- Molekyl som absorberer emisjon fra en fluoriserende reporter når de er i nærheten av hverandre.

Real time PCR- metode hvor det kontinuerlig samles fluorescenssignal fra en PCR reaksjon mens den skjer.

Referanse- passiv eller aktivt signal som brukes til å normalisere eksperimentelle resultater.

Refraktiv indeks- mål på endring i lyshastighet når det går fra ett medium til ett annet. Påvirker oppløsning i mikroskop.

Replikasjon/replikere- DNA: duplisering ved å lage en ny kopi av det eksisterende molekylet.

Reporter (fluorophore)- fluorokrom som brukes til å visualisere amplifiseringsakkumuleringen. Den kan festes til en spesifikk probe eller binde dobbeltrådet DNA (slik som SYBR[®] Green).

Rn- normalisert reportersignal. Beregnes ved å dividere intensiteten til reporterens fluorescens emisjon med emisjonen til den passive referansen.

RNA- ribonukleinsyre, molekyl bygget opp av enkeltkjeder av ribonukleotid subenheter som inneholder basene uracil, guanin, cytosin og adenin. Finnes i celler som tRNA, rRNA, og mRNA- som blir syntetisert ved transkripsjon av kromosomalt DNA som fungerer som templat.

16S RNA- rRNA (betegnelse på ribosomalt RNA, RNA-molekyler som inngår i oppbygningen av ribosomer) komponent i den lille subenheten av bakterielle ribosomer.

RNase- fellesbetegnelse på enzymer som kløver DNA til kortere oligonukleotider eller degraderer det fullstendig til ribonukleotid subenheter.

ROX- 6-carboxy-X-rhodamine. Den mest vanlig brukte passive referansen (fluorokromen) ved normalisering av reporter signal.

Side scatter (SC)- innen flowcytometri betegner dette lysspredningen som skjer til siden, såkalt høyvinkel lysspredning, og beskriver intracellulære egenskaper som for eksempel granulærighet.

SYBR[®] Green- fluorokrom som emitterer lite fluorescens når den er i løsning, men emitterer sterk fluorescens når den er bundet til dobbelttrådet DNA. Binder ikke enkelttrådet DNA, men pga manglende sekvensspesifisitet så binder den til et hvert dobbelttrådet DNA produkt amplifisert i PCR reaksjonen.

TAMRA- 6-carboxy-terta-methyl-rhodamine, en quencher som er vanlig brukt i 3`ende av en TaqMan[®] probe.

TaqMan[®] probe- en to-merket hydrolyseprobe designet for å binde til en målsekvens med en fluorescens reporter i en ende (5´) og en quencher i den andre (3´).

Threshold- vanligvis 10× standardavviket til Rn for tidlig PCR sykler (bakgrunns aktivitet/støy). Threshold (grenseverdi) bør settes i en region med eksponentiell vekst av PCR produkt og over høyeste ”baseline” signal.

Threshold sykel (Ct)- indikerer ved hvilken sykel fluorescensen som dannes overstiger/krysser threshold.

Transmittere/ transmisjon- teknisk betegnelse på enhver form for mekanisk eller elektrisk kraftoverføring/energioverføring.

UV (ultrafiolett) lys- elektromagnetisk stråling med bølgelengder mellom violett enden av det synlige lysspekteret (400nm) og røntgenstråler (4-20nm).

Vertebrater/ Vertebrata- underrekke i rekken ryggstrengdyr, betegnelse på dyr med indre skjelett med ryggvirvler, gruppen ryggstrengdyr som mennesker tilhører er den største. Sammenliknet med resten av dyreriket er dette en nokså liten gruppe (ca. 5 % av alle kjente arter).

1 Innledning

Interessen for immunsystemet til invertebrater er stor siden de representerer tidlige modeller eller forløpere for det innate systemet til vertebrater (Cooper, 2003). Vertebrater har i tillegg til det innate systemet også et høyere utviklet adaptivt system. Innate mekanismer omfatter innate, naturlige, ikke-spesifikke, ikke-foruttatte og ikke-klonale (germ line) mekanismer, og fungerer blant annet gjennom leukocytter, som ikke er komponenter av T og B makrofag forholdet som karakteriserer det vertebrate adaptive immunsystemet (Cooper, 2003; Cooper, Kvell, Engelmann, & Nemeth, 2006). Vertebraters adaptive immunsystem er derimot induserbart, spesifikt, forhåndsbestemt og klonalt (somatisk). Hos avanserte invertebrater, som hos gruppen annelider, finnes såkalt opprinnelig cellemediert immunitet.

Det er flere relevante grunner til å analysere invertebraters innate immunforsvar. Man kan lære mer om evolusjonshistorien til denne typen allestedsnærværende immunsystem, og bedre forstå mekanismene bak naturlig beskyttelse siden mekanismene bak dette systemet er essensielle i global skala (Cooper, 2003). Den generelle hensikten med evolusjonære studier er å samle observasjoner til et evolusjonært mønster som gir meningsfull innsikt i mekanismene bak funksjonell differensiering av immunokompetente celler (Vetvicka, Sima, Cooper, Bilej, & Roch, 1994). Studiene kan også brukes til å oppnå forenklede eksperimentelle modeller som tilrettelegger undersøkelser som ellers ville vært ekstremt vanskelige, ved bruk av vanlige mammalske systemer. Invertebrate modeller medfører en mindre kostnad og er mindre kontroversielle å bruke i eksperimenter sammenliknet med pattedyr (mammalia). De er derfor av stor betydning når det gjelder å forstå spørsmål som er fundamentale for biologien (Vetvicka, et al., 1994). Studier av innat immunitet kan gi svar på spørsmål knyttet til vert/mikrobiell krysstale ved epitel barrierer, gjenkjennelse av farlige signaler, fjerning av intracellulære patogener ved autofagocyttering, rekruttering av mesodermeriverte profesjonelle immunceller og sekresjon av lokale eller sirkulerende effektormolekyler slik som antimikrobielle peptider og enkel form for opsonisk komplement (Rosenstiel, Philipp, Schreiber, & Bosch, 2009). Viktigheten av intakte vert-mikrobielle interaksjoner for normal utvikling og funksjon av epitel barrierer, kan studeres ved hjelp av invertebrater, siden systemet er konserverv fra denne gruppen organismer og til mennesker.

Invertebrater har vært undervurdert når det gjelder å bruke disse til å forstå immunsystemet hos høyerestående dyr, inkludert mennesker, og den evolusjonære utviklingen som har

skjedd (Cooper, Kauschke, & Cossarizza, 2002). Det medfødte (humorale) immunsystemet fikk tidligere mer oppmerksomhet enn det innate, som siden slutten av 1900-tallet har fått økt fokus (Cooper, 2003; Cooper, et al., 2002; Cooper & Roch, 2003; Vetvicka, et al., 1994) til tross for at Charles Darwin tidlig fattet interesse for invertebrater gjennom fokus på nettopp meitemark (Sturzenbaum, Andre, Kille, & Morgan, 2009). Det meste av vår kunnskap om immunforsvarsmekanismer er hovedsakelig basert på resultater fra studier av vertebrater, dette til tross for at 95 % av de to millionene dyrearter tilhører det invertebrate fylumet (Cooper & Roch, 2003). Resultater fra studier av immunsystemet hos invertebrater kan bidra til å løse store gåter som for eksempel hvordan en immunrespons reguleres i forhold til å eliminere skadelige bakterier samtidig som gunstige symbionter bevares. Dette prinsippet er like essensielt og grunnleggende for invertebrater som meitemark som for mennesker. Undersøkelser som viser hvordan responsen aktiveres og utvikles, samt hvilke faktorer som er involvert, vil kanskje besvare noen av de mest essensielle spørsmålene og dermed øke forståelsen for hva som styrer eliminasjonsprosesser av mikroorganismer.

1.1 Immunsystem

Det totale infeksjonsforsvaret omfatter både et stort antall forskjellige celletyper og en rekke løselige molekyler som mer eller mindre direkte deltar i bekjempelsen av fremmede mikroorganismer (Lea, 2006). Det kan grovt deles inn i to hoveddeler som hver er representert ved karakteristiske celler og løselige faktorer;

- 1) Medfødt innat immunitet: komplementproteiner, akutt fasereaktanter, cytokiner, naturlig dreperceller og fagocytter (granulocytter, makrofager) er eksempler på cellulære forsvarsbestandeler som inngår i denne delen av immunsystemet.
- 2) Ervervet, adaptiv immunitet: Antistoffer, cytokiner, B-lymfocytter, T-hjelpeceller, T- dreperceller og regulatoriske T-celler er eksempler på celler og stoffer som inngår i denne delen av immunsystemets inndeling.

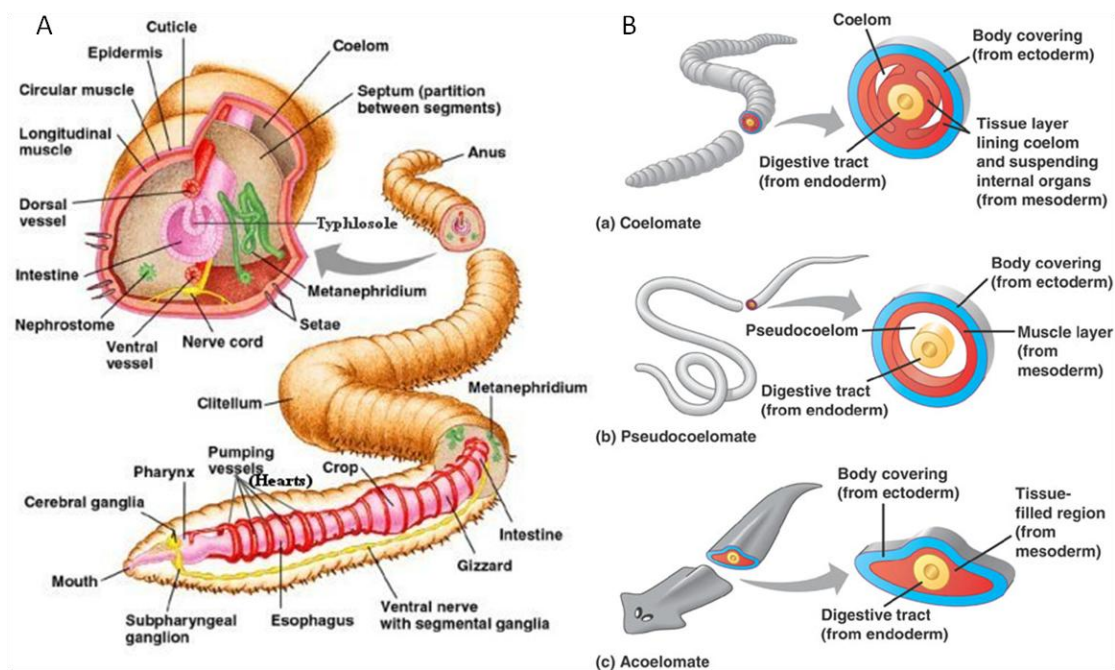
Mens elementer som tilhører medfødt immunitet reagerer raskt mot egenskaper som er felles for mange ulike mikroorganismer, vil adaptiv immunitet reagere mot strukturer som er unike og karakteristiske for hver enkelt bakterie eller virus (Lea, 2006). Det medfødte immunsystemet vil kunne utøve sin funksjon umiddelbart, mens det adaptive vil bruke lengre tid på å aktiveres.

Det innate immunsystemet er det opprinnelige immunforsvaret med opprinnelse fra tidlig evolusjon av matazoer og det adaptive immunforsvaret har oppstått senere som et evolusjonært tillegg til det innate immunsystemet (Cooper, et al., 2002; Cooper, et al., 2006; Kvell, Cooper, Engelmann, Bovari, & Nemeth, 2007; Pancer & Cooper, 2006; Rosenstiel, et al., 2009), for om lag 500 millioner år siden (Pancer & Cooper, 2006) og har siden vært konserverv gjennom millioner av år med evolusjon (Schulenburg, Kurz, & Ewbank, 2004). Det innate immunsystemet avhenger av et begrenset antall ”germline”-kodete reseptorer for gjenkjennelse av farlige signaler (Rosenstiel, et al., 2009). Disse mønstergjenkjennende reseptorene (pattern recognition receptors, PRRs) gjenkjenner invariante molekylære signaturer hos potensielle patogener (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) eller som stammer fra endogene kilder. Aktivering av PRRs fører til en rask induksjon av beskyttende systemer som f.eks. induksjon av antimikrobielle peptider eller apoptose. Reseptoren binder direkte til minimale konserverte strukturer til patogener. Janeway og Medzhitov (Janeway & Medzhitov, 2002) oppdaget at PAMPs er så essensielle for overlevelse og replikasjon av bakterier eller mikrobiota, at de ikke lett kan modifiseres for å unnsnippe immungjenkjennelse. Dette skaper spørsmål om hvordan en patogen kan bli skilt fra tallrike kommensaler og symbionter, og hvordan tilstedeværelse av mangfoldige bakterier på vertens overflate ikke medfører konstant høy inflammatorisk respons. Studier av vertebraters immunsystem kan med andre ord gi svar på mange ubesvarte spørsmål knyttet til det innate immunforsvaret og kanskje også det adaptive immunforsvaret.

Meitemark tilhører klassen oligochaeta under fylumet annelider (Store Norske Leksikon, 2009c) som har de fleste av de innate immunmekanismene (Withers, 1992). Bakterier kan relativt lett entre oligocheter gjennom deres dorsale porer og nå coelomvæska (kroppsvæsken), eller entre gjennom huden eller tarmen. Coelomvæska med coelomocytter tilsvarer vertebraters blod med forskjellige immunceller (Cooper, 2003), og coelomocytene tilsvarer dermed vertebraters immunceller. De fleste av bakteriene blir fagocyttert av amoebocytter (Withers, 1992), som er en bestemt type coelomocytt. Det er ingen respons på etterfølgende infeksjon (Withers, 1992). Fagocytose er den viktigste forsvarsmekanismen mot mikroorganismer, men coelomvæske kan også inneholde generelle bakteriedrepende substanser. Annelider frastøter overført vev, noe som indikerer en spesifisitet av de fagocytterende/-lytiske mekanismene. Det finnes også noen studier som viser at det eksisterer en humoral mediert avstøtningsrespons (Withers, 1992). I likhet med andre invertebrater, responderer annelider på parasitt invadering ved innkapsling.

1.2 Meitemarken *Dendrobaena veneta* som modellorganisme i immunologiske studier

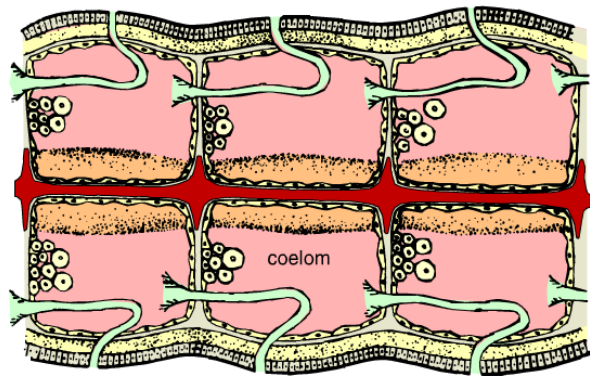
Meitemark er en ideell animalsk modell og blir hevdet å være svært nyttig ved analysing av evolusjon av cellulære og humorale immunforsvarsmekanismer (Cooper, Cossarizza, Kauschke, & Franceschi, 1999; Vetvicka, et al., 1994). Meitemark kan defineres som segmentert og bilateral symmetrisk invertebrat med en ytre kjertel (clitellum) som produserer egg (cocoon), en sensorisk flik ved munnpartiet (prostomium) foran, med anus ved bakre del av kroppen, og befatter ingen lemmer, men har et lite antall børstehør (chaetae) på hvert segment (Edwards, 2004). De er hermafroditter og reproduksjon skjer gjennom parring og gjensidig befruktning, etter at hver av markene kan produsere egg. Meitemark tilhører fylum annelider som består av segmenterte ormer (Vetvicka, et al., 1994). En illustrasjon av meitemarkens oppbygning er vist i Figur 1A.



Figur 1. **Oppbygning av meitemark.** (A) Figuren viser den anatomiske og fysiologiske oppbygningen av en meitemark. Det utheva utsnittet øverst til venstre viser coelomrommet ("A Rewiev of the Universe- Structures, Evolutions Observations and Theories," (s.a.)). (B) Figuren viser en sammenlikning av ulike former for oppbygning av hulrommet som finnes hos oligocheta. Meitemark tilhører den øverste gruppen, såkalt coelomate. ("Wikispaces," (s.a.)).

Annelida deles videre inn i undergrupper. Meitemarken *Dendrobaena veneta*, som har blitt brukt som modellorganisme i dette prosjektet, tilhører klassen oligocheta (Vetvicka, et al.,

1994). De fleste oligochaetes har rommelig hulrom (eng. body cavity) som betegnes coelom. Dette hulrommet er fylt med væske, såkalt coelomvæske og befinner seg mellom dyrets ytre overflate (epidermis) og den ytre overflaten på magetarm-kanalen, hvor de interne organene befinner seg (Figur 2) (Store Norske Leksikon, 2009b; Wikipedia, 2009). På bakgrunn av hulrommets oppbygning, deles organismene inn i tre grupper; pseudocoelomater (eks rundormer), acoelomater (eks flatormer) og coelomater hvor annelider hører til (se Figur 1B).



Figur 2. **Coelom.** Figuren viser tre segmenter fra en leddorm, sett fra rygg-siden. Hvert segment har utførselskanaler kalt coelomoducter fra kroppshulen. Coelom utgjør det væskefylte hulrommet mellom tarmkanalens organer og kroppsveggen (Store Norske Leksikon, 2009a).

Alle organer som befinner seg i coelomrommet er dekket med et lag av peritoneum (bukhinne) (Withers, 1992). Kanalen som leder fra coelomrommet til utsiden kalles coelomoduct (se Figur 2) og er et viktig ekskretorisk organ. Åpningen mellom coelomoduct og coelom kalles coelomostome. Coelomvæsken i coelomrommet inneholder immunceller som kalles coelomocytter. Disse er viktig i bekjempelse av uønskede mikroorganismer og utgjør derfor en viktig forsvarbarriere.

1.2.1 Coelomvæske og coelomocytter hos meitemark

Tre hovedtyper av coelomocytter har blitt påvist i coelomvæske til *Dendrobaena veneta*: eleocytter, amoebocytter og granulocytter (Adamowicz, 2005; P. Engelmann, Molnar, Palinkaas, Cooper, & Nemeth, 2004). Eleocytter er store ovale celler som inneholder karakteristiske granuler kalt chloragosomer (organeller på 1-3 μm med enzymatisk aktivitet) (P. Engelmann, Molnar, et al., 2004). Eleocytterne hos *Dendrobaena veneta* likner på coelomocytterne hos andre oligochaeter, beskrevet av noen forfattere som eleocytter og av andre som chloragocytter (Adamowicz, 2005). Disse eleocyttcellene deltar i ulike vitale

prosesser, både metabolske og regulatoriske, og sikrer korrekt funksjon av hele organismen (Affar, Dufour, Poirier, & Nadeau, 1998). Eleocyttpopulasjoner til bestemte meitemarkarter har vist sterk autofluorescens, blant annet for arten *Dendrobaena veneta* (Cholewa, et al., 2006). Amoebocytter er de mest tallrike coelomocytene og har blitt delt inn i to hovedtyper (I og II) (Adamowicz, 2005; Adamowicz & Wojtaszek, 2001; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004). Inndelingen av amoebocytter baseres på tilstedeværelse og utseende til pseudopodier på overflaten (Adamowicz, 2005). Type I amoebocytter har få korte lobopodier jevnt fordelt på overflaten, mens type II amoebocytter har lange pseudopodier irregulært fordelt på overflaten, gjerne sentrert ved en pole av cellen. Dette er multifunksjonelle celler som deltar i cellulære immunreaksjoner som blant annet involverer fagocytose og innkapsling (Adamowicz, 2005; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004). Granulocytter er ovale celler med kuleformet kjerne og cytoplasma som inneholder polymorfe, elektrontette granuler (Adamowicz, 2005). Granulocytene deles også inn i to undergrupper (I og II) basert på tilstedeværelse av vesikler på overflaten (Adamowicz & Wojtaszek, 2001). Funksjonen til disse cellene er ikke kartlagt, men muligens har disse cellene en viktig funksjon i forhold til lagring av materiale. Coelomocytene til *Dendrobaena veneta* og andre oligochaete arter er vanskelig å klassifisere basert på kun et av de eksisterende klassifiseringsskjemaene (Adamowicz, 2005). To metoder for klassifisering er imidlertid mest brukt. Den ene baseres på inndeling i to populasjoner: leucocytisk og chloragocytisk, mens den andre klassifiseringen baseres på inndeling i amoebocytter, granulocytter og eleocytter. Det er denne inndelingen som er benyttet i denne studien.

1.3 Antimikrobiell effekt i coelom væske

Så tidlig som i 1968 demonstrerte Du Pasquier og Duprat (Du Pasquier & Duprat, 1968) en hemolytisk faktor i coelomvæsken hos meitemark med aktivitet mot røde blodceller hos sau og forskjellige andre vertebrate erythrocytter (Pierre Valembois, Roch, Lassegues, & Cassand, 1981). Ved videre proteinstudier (Roch, 1979; Roch, Valembois, Davant, & Lassegues, 1981) ble det påvist og karakterisert fire lipoproteiner og totalt 18 proteinkomponenter. Bilej et al. (Bilej, De Baetselier, & Beschin, 2000) har senere gitt en beskrivelse av fetidiner, lyseniner, eisinapore, ulike hemolysiner og CCF (coelomic cytolytic factor) som alle er proteiner koplet til den antimikrobielle effekten hos meitemark. Forsøk med meitemarken *Eisenia fetida andreii* har vist at det i tillegg til antimikrobiell aktivitet i coelomvæsken, finnes tilsvarende om ikke sterkere antimikrobiell aktivitet i lipoprotein

holdig cocoon, kalt albumen. Studier av den antimikrobielle aktiviteten har vist at den bakteriostatiske effekten kun er rettet mot svært patogene bakterier (Lassègues & Valembois, 1989; Roch, Lassegues, & Valembois, 1991; Roch, Valembois, Lassegues, & Cassand, 1981). Flere forsøk på å detektere den antimikrobielle effekten har misslyktes, noe som kan skyldes at coelomvæsken ble testet mot bakterier som ikke finnes i meitemarkens naturlige habitat (Pierre Valembois, et al., 1981). Valembois et al. (Pierre Valembois, et al., 1981) testet 23 forskjellige bakteriestammer mot eventuell bakteriostatisk effekt i coelomvæske, og inhibert vekst ble registrert for seks av disse som også var patogene for meitemarken. Blant disse seks bakteriestammene var det både gram positive og gram negative bakterier, hvilket indikerer at den bakteriostatiske effekten ikke er knyttet til lysozym som kun påvirker gram positive bakterier. I et studie utført av Lasseguès et al. (Lassègues & Valembois, 1989) ble antibakteriell aktivitet studert ved å injisere meitemarken *Eisenia fetida andrei* med bakterier. Dette resulterte i økt bakteriostatisk aktivitet 4 dager etter injisering og bestemmelse av antibakteriell effekt ble gjort ved å plate ut fortynninger av bakterieløsning inkubert i coelomvæske. Studier for å kartlegge den molekylære basisen til den induserte aktiviteten, så vel som å kartlegge responsspesifisiteten hos meitemark, ble startet etter dette funnet (Lassègues & Valembois, 1989) og studier knyttet til kartlegging av antimikrobiell effekt har fortsatt siden den gang (Adamowicz, 2005; Adamowicz & Wojtaszek, 2001; Affar, et al., 1998; M. Engelmann, Pal, Berki, Cooper, & Nemeth, 2002; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004; Homa, Bzowska, Klimek, & Plytycz, 2008; Milochau, Lassegues, & Valembois, 1997; Roch, et al., 1991; P. Valembois, Lassegues, Hirigoyenberry, & Seymour, 1993). En revidert artikkel skrevet av Bilej et al. (Bilej, et al., 2000) oppsummerer mange av de viktigste resultatene knyttet til antimikrobielt forsvar hos meitemark.

1.3.1 Analyse av antimikrobiell effekt ved utplating- og sonehemningsforsøk

Analyse av antimikrobiell effekt ved hjelp av sonehemningsforsøk har blant annet blitt utført av Roch et al. (Roch, Valembois, Lassegues, et al., 1981) og Valembois et al. (Pierre Valembois, et al., 1981). I disse studiene ble agar inokulert med forskjellige bakteriestammer sådd ut, og en steril papir-plate impregnert med coelomløsning som skulle testes, ble plassert på midten av agarskålene. Inhibering av vekst i form av klare ringer rundt papirplaten ble målt og brukt som mål på grad av antimikrobiell effekt. Av de 15 bakteriestammene som ble testet i forsøket til Roch et al. (Roch, Valembois, Lassegues, et al., 1981), ble det kun registrert sensibilitet for bakteriene *Bacillus megaterium*, *Arthro-bacter sp.*, *Serrat sp.* og

Aeromonas hydrophila. Valembois et al. (Pierre Valembois, et al., 1981) registrerte i tillegg til disse fire bakteriene sensitivitet for bakteriestammene *Achromobacter sp.* og *Aeromonas hydrophila* av totalt 23 bakterier som ble testet. Resultatene fra disse studiene viser at coelomvæske har en antimikrobiell effekt mot både gram positive og gram negative bakterier (Roch, Valembois, Lassegues, et al., 1981).

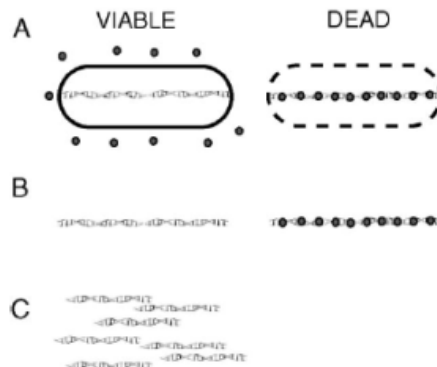
Det har blitt publisert flere studier hvor det er påvist antimikrobiell i coelomvæske og cocoon albumen hos meitemark (Lassègues & Valembois, 1989; Milochau, et al., 1997; Roch, et al., 1991). Ved kartleggingen av den antimikrobielle effekten ble bakteriet inkubert i coelomvæske i 30min før utplating av fortynningserier av inkubasjonsløsningen. Telling av kolonier ble utført etter 24 timer inkubasjon av utplatinge agarskåler. Resultatene ble sammenliknet mot utplating av bakterier inkubert i LNB agar istedenfor coelomvæske. I en av disse studiene utført av Lassègues et al. (Lassègues & Valembois, 1989), ble det rapportert en vekstinnhibering på $40 \pm 8\%$ for bakterien *A. hydrophila* og $60 \pm 2\%$ for *B. megatarium*.

1.3.2 Analyse av antimikrobiell effekt ved flowcytometri

Den coelomocytholdige coelomvæsken til annelider er involvert i mange biologiske aktiviteter (Bilej, et al., 2000). En slik aktivitet omfatter coelomocytters evne til å sekreere cytolytiske komponenter som en viktig del av den antimikrobielle forsvarsbarrieren. Denne antimikrobielle aktiviteten kan studeres ved flowcytometri (se avsnitt 1.5.1 for nærmere beskrivelse av flowcytometri) blant annet bruk av PI (propidium iodide) farging av døde bakterier (Hendawi, et al., 2004). LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits (Invitrogen) er et to-farget fluorescens kit som kan brukes til å skille mellom levende og døde bakterier, selv i løsninger som inneholder en blanding av bakteriearter (Invitrogen, 2004). Kittet inneholder de to DNA bindende fluorokromene SYTO[®]9 og PI som fluorescerer henholdsvis grønt og rødt. SYTO[®]9 penetrerer alle cellemembraner, mens PI kun penetrerer ødelagte cellemembraner hos døde celler og reduserer SYTO[®]9 fluorescens når begge fluorokromene brukes sammen. Levende bakterier med intakt cellemembran vil dermed fluorescere grønt, mens døde bakterier vil fluorescere rødt (Invitrogen, 2004). Farging av bakterieceller med SYTO[®]9 og PI for å skille mellom levende og døde celler ved eksponering ovenfor antimikrobielle agenter er tidligere beskrevet av Dynes et al. (Dynes, et al., 2009).

1.3.3 Analyse av antimikrobiell effekt ved PMA PCR metode

Forholdet mellom andel levende og døde celler, for eksempel bakterier, kan også studeres ved bruk av EMA (ethidium monazide) (Rudi, Moen, Dromtorp, & Holck, 2005). Membranintegritet er et av de viktigste kriteriene for å skille mellom levende og døde eller irreversibelt skadede celler (Nocker, Cheung, & Camper, 2006). Levende celler med intakt membran, det vil si høy membranintegritet, blir skilt ut på bakgrunn av deres mulighet til å ekskludere DNA-bindende fargestoffer. Slike fluorokromer penetrerer lett døde celler eller celler med skadet cellemembran (Nocker, et al., 2006). Cellenes tilstand kan med bakgrunn i dette prinsippet analyseres både ved mikroskopering og flowcytometri. EMA metoden er en metode som kan brukes for presist å kvantifisere levende-død forholdet i blandende cellepopulasjoner, og har sine fordeler sett opp mot andre eksisterende metoder (Rudi, et al., 2005). Denne diagnostiske DNA-baserte metoden kombinerer bruk av ethidium monazide (EMA) eller propidium monazide (PMA) med hastighets- og sensitivitetsegenskapene til realtime-PCR (se avsnitt 1.5.3), og ble først beskrevet av Rudi et al. (Rudi, et al., 2005). Metoden har senere blitt benyttet i flere studier (Lee & Levin, 2009; Nocker, et al., 2006).



Figur 3. PMA-PCR. (A) PMA blir tilsatt prøven som inneholder både levende og døde celler. (B) Kun DNA i døde celler vil danne kovalent binding med PMA. Levende celler vil forbli ufarget. (C) Ufarget DNA som bare finnes i levende celler vil bli PCR amplifisert. Figuren er hentet fra (Rudi, et al., 2005).

EMA er et DNA bindende fargestoff med en azid gruppe som kan danne kovalent binding til DNA ved lyseksposering av hvitt synlig lys (maks abs. 460nm) (Figur 3). EMA har en tendens til å trenge inn i levende gram positive bakterier, og kan derfor forårsake at levende celler karakteriseres som døde. Siden PMA gjør dette i liten eller ingen grad, anses dette stoffet som mer optimalt. Manglende selektivitet og generell anvendbarhet har ført til bruk

av PMA som substitutt for EMA (Nocker, et al., 2006). PMA trenger gjennom skadede cellemembraner og propidium iodide (PI) bindes til DNA ved å interkalere mellom baser med liten eller ingen sekvenspreferanse, og med en støkiometri på ett fargemolekyl pr 4-5 basepar av DNA (Waring, 1965). Ved bestråling med 750 W halogen-lampe vil PMA bindes kovalent til DNA, og noe av DNA vil også bli ødelagt. Ved PCR amplifisering av genomisk DNA isolert fra celledøsningen, vil kun levende celler bli oppamplifisert (se Figur 3). Dette skyldes at PMA skaper en sterisk hindring for DNA polymerase når det er bundet til DNA, slik at DNAet ikke vil kunne fungere som templat i replikasjonen.

1.4 Celleproliferasjon ved aktivering av immunsystemet

Proliferasjon av immunceller er en viktig del av den antimikrobielle effekten som utøves som et naturlig forsvar ved invadering av ukjente og mulig skadelige partikler. Celleproliferasjon, multiplisering av celler, skjer gjennom celledyklus. Varigheten til celledyklus varierer mye fra en celledytype til en annen (Alberts, et al., 1994). Tradisjonelt deles celledyklus inn i flere distinkte faser. I mitosen skjer det en celledeling som resulterer i nye celler (datterceller) med nøyaktig samme gener og kromosomer som den opprinnelige cellen (morcellen) (Sjøberg, 2002). Forut for mitosen må alt DNA i morcellen replikeres slik at det kan fordeles likt på de to dattercellene. Det er vanlig å dele mitosen i fem faser: *profase*, *prometafase*, *metafase*, *anafase* og *telofase* (Sjøberg, 2002). I tillegg brukes begrepene *interfase* om perioden før mitosen (mellom to mitoser) og *cytokinese* om selve atskillelsen til to celler. I profasen kondenserer kromosomene. Spindel festes i prometafasen og kromosomene samles videre i ekvatorialplanet i metafasen. I anafasen splittes de homologe kromosomparene, før hvert kromosomsett igjen samles i hver sin nye kjerne i telofasen. Dette er avslutningen før selve cytokinesen inntreffer (Sjøberg, 2002).

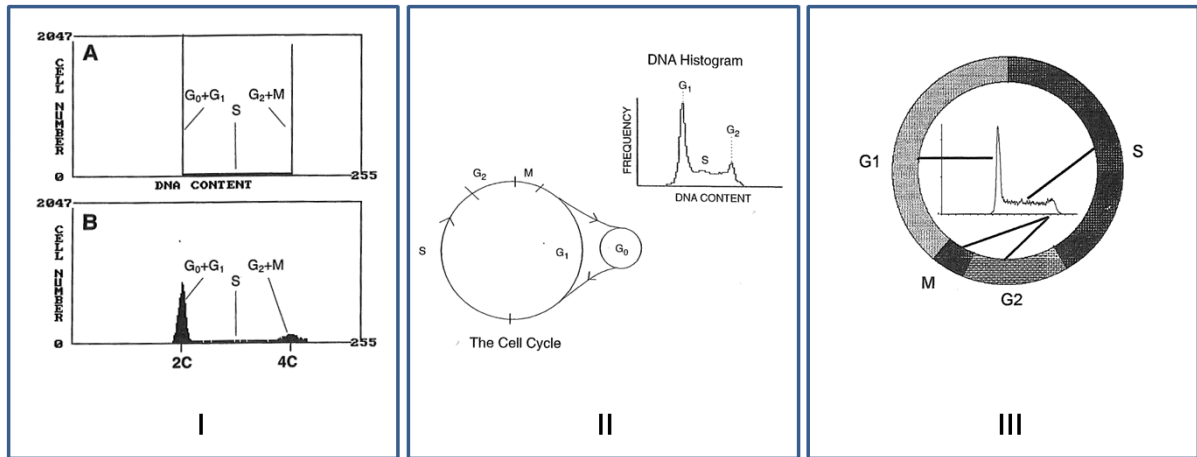
En celledyklus deles som nevnt inn i flere stadier. Disse er G1, S, G2 og M. I G1-fasen blir replikasjonen forbredt (G=gap, og utgjør tidsrommet mellom mitose og DNA syntesen (Alberts, et al., 1994; Sjøberg, 2002). I S-fasen forgår selve replikasjonen av DNA. Ved G2-fasen (tidsrommet mellom S-fasen og mitosen) er replikasjonen ferdig og kromosomene foreligger doble, i form av to søsterkromatider. Celledelingen skjer i mitosen, såkalt M-fase, som ble beskrevet ovenfor. Hvis cellen ikke skal dele seg videre, går den inn i G0-fase (Sjøberg, 2002). To kontrollpunkter, en før G1-fase og en før G2-fase, er med på å sikre at

cellesyklus forgår på rett måte. Celleproliferasjonsstudier kan brukes til å studere spesifisiteten av en immuncellerespons (M. G. Ormerod, 1999).

Meitemark som blir terget eksperimentelt, eller naturlig av eksempelvis predatorer, skiller ut coelomvæske med coelomocytter gjennom porer i kroppsveggen (Homa, et al., 2008). Homa et al. (Homa, et al., 2008) registrerte i sine studier at den normale celleproliferasjonen av coelomocytter ekstrahert fra eksperimentelt ubehandla *Dendrobaena veneta* var på 20 % (celler i G2-fase). Ut i fra disse resultatene vil man i en normalsituasjon kunne forvente at 20 % av den totale mengden immunceller konstant vil være i naturlig celleproliferasjon. Etter eksperimentell tømning av immunceller fra markene registrerte Homa et al. (Homa, et al., 2008) mer enn tre ganger så høy celleproliferasjonsaktivitet i en såkalt etterfyllingsfase.

1.4.1 Analyse av celleproliferasjon ved flowcytometri og fluorescensmikroskopi

En av de mest vanlige applikasjonene innen flowcytometri (se avsnitt 1.5.), er kvantifisering av DNA innhold i celler og kromosomer, utført i den hensikt å oppnå et bilde av cellesyklus som viser fordeling av cellene i de ulike fasene (M. G. Ormerod, 1999; Shapiro, 2003). Fluorescensmikroskop blir ofte brukt i kombinasjon med flowcytometri i celleproliferasjonsstudier (M. G. Ormerod, 1999). I følge teorien har alle normale diploide celler (celler i G0 og G1 fase av cellesyklus) i samme eukaryote organisme samme DNA innhold (Shapiro, 2003). Denne mengden er i Figur 4IB, som illustrerer et flowcytometrisk DNA histogram, definert som 2C. DNA syntese i S-fase av cellesyklus resulterer i en økning i cellulært DNA innhold, og i enden av S fase vil cellen inneholde dobbelt mengde DNA, definert som 4C i Figur 4IB. Cellen beholder dobbelt DNA mengde gjennom både G2 fase og mitosen (M fase) (Darzynkiewicz, Bedner, & Smolewski, 2001; Shapiro, 2003). Gjennom mitosen vil den opprinnelige cellen deles til to nye datterceller der hver av dem har et DNA innhold på 2C.



Figur 4. DNA histogram og replikasjonsyklus. IA. Illustrasjon av hvordan DNA histogram optimalt sett (A) og normalt sett (B) vil se ut i et flowcytogram. II viser cellesyklus og DNA histogram separat, mens i figur III er disse kombinert i samme figur. Figurene er hentet fra (M. G. Ormerod, 1999; Michael G. Ormerod, 2000; Shapiro, 2003).

Ved å analysere DNA mengde er det mulig å bestemme hvorvidt cellene er i G₀/G₁, S eller G₂/M fase av cellesyklus (Darzynkiewicz, et al., 2001; M. G. Ormerod, 1999). Det finnes en rekke fluorokromer som binder støkiometrisk til DNA. Disse fluorokrommene fluorescerer svakt i vannholdig løsning, mens de fluoriserer sterkt når de er bundet til DNA (M. G. Ormerod, 1999). PI, som er den mest brukte fluorokrommen i cellesyklusstudier, interkalierer mellom dobbeltrådede nukleinsyrer. Fluorokrommen eksiteres ved 488nm og fluoriserer rødt lys (~700nm). PI trenger ikke inn i levende celler, og cellene må derfor fikseres eller permabiliseres før PI blir tilsatt celleprøven. For permabilisering benyttes ofte detergentene Nonidet P-40 eller Triton X-100 (M. G. Ormerod, 1999; Shapiro, 2003). PI binder både dobbeltrådet RNA og DNA, og for å sikre spesifikk DNA farging kreves det at prøven behandles med RNase før farging. For å oppnå DNA histogram fra levende celler kan også fluorokrommen *bis*- benzimidazole, Hoechst 33342 benyttes (M. G. Ormerod, 1999). Denne fluorokrommen krever UV bestråling for eksitasjon og vil ved binding til DNA fluorisere blått lys (~450nm). Lav flowhastighet brukes normalt ved DNA histogramanalyse, og prøvene filtreres gjerne for å unngå forstyrrelser knyttet til celleaggregater.

Immunofarging er en metode som benyttes ved studie av celleproliferasjon i fluorescensmikroskop og flowcytometri (Becker, Kleinsmith, & Hardin, 2006). Teknikken baseres på antistoffers mulighet til å gjenkjenne og binde til spesifikke molekyler, antigener. Antistoffer er proteiner som produseres naturlig av immunsystemet ved en immunrespons, men de kan også produseres kommersielt ved å injisere et ukjent protein i et dyr som for

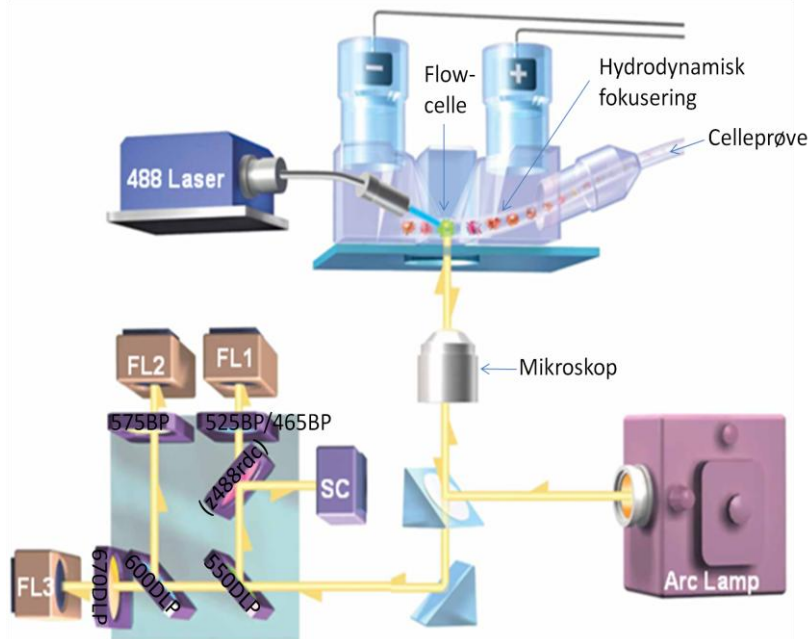
eksempel kanin og mus. På denne måten er det mulig å produsere antistoffer som vil binde selektivt til så si alle proteiner som ønskes studert (Becker, et al., 2006). Antistoffer bundet til prolifererende celler, merket med fluorokrom, vil emitere lys ved eksitasjon av fluorokrommen. Uttrykkelsen av det humane proteinet Ki-67 er sterkt assosiert med celleproliferasjon (Becker, et al., 2006). I interfase vil antigenet utelukkende kunne detekteres i kjernen, mens i mitosen vil uttrykkelsen være flyttet til overflaten av kromosomene. Det faktum at Ki-67 proteinet er tilstedeværende gjennom alle aktive faser av cellyklus (G_1 , S, G_2 og mitosen), men fraværende i G_0 fase (hvilefase), gjør det til en utmerket markør for å studere celleproliferasjon (Scholzen & Gerdes, 2000). Immunohistokjemi med bruk av antistoffer mot human Ki-67 prolifererende antigener har blitt brukt tidligere for å påvise prolifererende celler ved cytopsin preparering av coelomocytter fra meitemarken *Dendrobaena veneta* (Homa, et al., 2008).

1.5 Instrumenter og teknologi for analyse av immunceller, celleproliferasjon og antimikrobiell effekt

En samlet beskrivelse av instrumenter og teknologi som kan benyttes ved studier av immunceller, celleproliferasjon og bakteriedrap er gitt nedenfor.

1.5.1 Flowcytometri

Cytometri er en prosess hvor fysiske og/eller kjemiske karakteristikk av enkelt celler, eller andre biologiske eller ikke biologiske partikler i omtrentlig samme størrelsesorden, blir analysert (Shapiro, 2003). Flowcytometri, også kalt væskestrømcytometri, har utviklet seg til å bli en vanlig og mye anvendt teknikk, der kvantitative målinger av enkeltceller eller enkeltcellers innhold kan utføres med stor hastighet (Lea, 2006). I flowcytometri, blir målingene utført når cellene eller partiklene passerer gjennom måleinstrumentet, et flowcytometer, i en flytende væskestrøm. Væskesystemet bestående av en sentral kjerne hvor prøven blir injisert, er omsluttet av en ytre føringsvæske (se Figur 5 og Figur 7) som flyter raskere og som dermed danner en massiv dragnings effekt på den innsnevrede sentrale kjernen (Rahman, 2006). Dette endrer hastigheten på den midtre væsken og det skapes en strøm av enkeltceller som med en hastighet på $>10\ 000$ celler i sekundet kan passere forbi eksitasjonspunktet (Lea, 2006; Rahman, 2006). En illustrasjon som viser oppbygning til et flowcytometer fra Beckman Coulter av typen Cell Lab Quanta™ er vist i Figur 5.

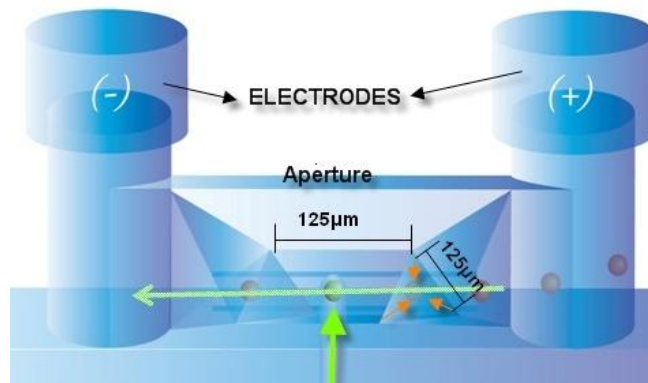


Figur 5. Skjematisk fremstilling av oppbygningen av et flowcytometer av typen Cell Lab Quanta™. Celleprøve som er sugd opp vil ved hjelp av hydrodynamisk fokusering nå flowcellen som enkeltceller, hvor de blir bestrålt enkeltvis av en diode laser (488nm) (Beckman Coulter, 2006a). Cellen vil spre lyset og det spredte lyset (side scatter, SC) blir samlet og detektert ved hjelp av en fotodiode detektor posisjonert 90° fra laserstrålen. Denne vinkelen er ideell for å oppnå detaljert info om blandede cellepopulasjoners forskjeller i granulæritet. Flowcytometeret inkluderer separate fluorecenskanaler (FL-kanaler) som detekterer emittert lys med ulike bølgelengder. Ved lysbestråling med laserlys benyttes et dikrotisk speil (dichroic mirror (z488rdc) og 525BP filter ved FL1 detektoren. Ved bruk av UV- lys (mercury arc lamp) tas derimot dichroic mirror (z488rdc) ut og 465 BP filter brukes ved FL1. Modifisert bilde hentet fra Beckman Coulter (Beckman Coulter, 2006b).

Lysspredning eller fluorescensemisjon fra bestrålte partikler gir informasjon om partiklens egenskaper (Rahman, 2006). Laser og UV lys er de mest brukte lyskildene i moderne flowcytometri. Laserlys produserer lys med en bestemt bølgelengde i form av koherent lys. UV lys utnytter fargeemisjoner av en antent gass i et forseglet rør og produserer ustabil ukoherent lys av en blanding av bølgelengder, som trenger påfølgende optisk filtrering. Et optisk system i flowcytometeret sørger for at fluorescensemisjonen fra partikler eller celler som har blitt eksitert ved bestråling, blir fanget opp. Når partiklene passerer gjennom belsningspunktet, vil emisjonen reflekteres til et speil og deretter til filtre som dirigerer fluorescenslyset videre til fotomultiplikator-rør (photomultiplier tubes), betegnet PMT'er (indikert som FL1, FL2 og FL3 i Figur 5). Mye av det spredte lyset vil ha samme bølgelengde som eksitasjonslyset (eksitasjonskilden), mens resten er fluorescens fra cellene med en bølgelengde lengre en eksitasjonslyset (Shapiro, 2003). Spesifisiteten av deteksjonen kontrolleres av optiske filtre som blokkerer noen bølgelengder mens de lar andre passere

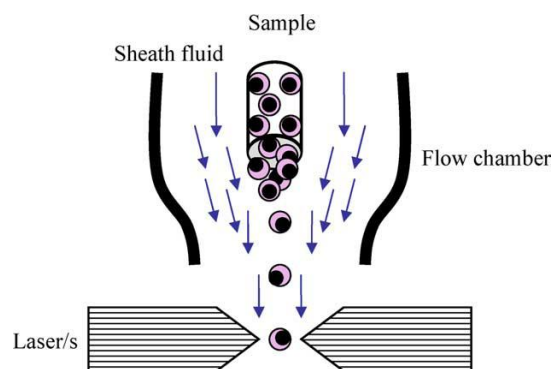
(Rahman, 2006). Det finnes tre hovedtyper av slike filtre. ”Long pass” filtre tillater lysgjennomstrømning av lys med lengre bølgelengde enn en bestemt bølgelengde, mens ”short pass” filtre tillater gjennomlys av lys med bølgelengde kortere enn en bestemt bølgelengde. ”Band pass” overfører lys med bølgelengde innen et spesifisert begrenset område. Når et filter plasseres med en 45° vinkel på det møtende eller innkommende lyset vil det fungere som et dikrotisk filter eller speil. Dette filtret, som benyttes ved bruk av laser som bestrålingskilde utøver to funksjoner; sende lys med bestemte bølgelengder rett frem, og bøye av blokkert lys i 90° retning. Dikrotisk speil er interferens filter eller så kalt ikke elektrisk ledende filter laget av klart glass eller kvarts substrat (Shapiro, 2003). Filtre som skal benyttes velges ut i fra hvilke lyssignaler man ønsker å detektere.

To prinsipper er vanlig brukt ved flowcytometerisk analyse av cellestørrelse. Disse er FC (forward scatter) og EV (elektrisk volum). I flowcytometre hvor FC benyttes, er det vanlig at instrumentet er bygd opp slik at lysspredning som skjer i forlengelsen av eksitasjonslyset, det vil si lyset som fortsetter rett frem uten avbøying, såkalt lavvinkellyspredning eller forwardscatter, benyttes til å beregne cellestørrelse (Beckman Coulter, 2006b). Siden cellene bestråles over hele tverrsnittet betyr dette at denne målemetoden vil være mer unøyaktig når celler som ikke er helt sirkulære undersøkes. Hvordan disse cellene passerer bestrålingspunktet med hensyn til planet har derfor stor innvirkning på cellenes målte størrelse. I flowcytometre hvor EV benyttes, vil cellens volum fortrenge en ekvivalent mengde elektrolytt væske når den passerer gjennom åpningen i flowcellen. (Beckman Coulter, 2006a). Dette fortrenkte volumet blir målt som en elektrisk puls med en styrke proporsjonal til volumet av cellen, og selv de minste forandringer i størrelse blir registrert. Denne teknologien i kombinasjon med datateknologi gjør det mulig nøyaktig å bestemme celleantall og cellestørrelse registrert som elektrisk volum (EV). Flowcytometre som benytter EV prinsippet for beregning av cellestørrelse og cellevolum er derfor hevdet å være bedre tilpasset undersøkelser av ikke sirkulære celler som spermier, ovale granulocytter mm. Figur 6 illustrerer hvordan elektrisk volum (EV) måles.



Figur 6. **Prinsippet for hvordan cellestørrelse bestemmes ved bruk av EV elektrisk volum (cellestørrelse) i flowcytometeret Cell Lab Quanta™.** Partikler løst i en svak elektrolytt løsning blir dratt gjennom en smal åpning lokalisert mellom to elektroder (Beckman Coulter, 2006b). Når hver partikkel passerer gjennom dette rommet, vil de fortrenge deres eget volum av den ledende løsningen. Dette forstyrrer strømføringen mellom elektrodene, og vil øyeblikkelig øke den elektriske impedansen (motstand). Endringen i motstand produserer en spenningspuls som registreres. Styrken på denne pulsen er direkte proporsjonal til volumet av partikkelen. Bildet er hentet fra Beckman Coulter (Beckman Coulter, 2006b).

Målingen påvirkes ikke av farge, form eller brytningsindeks til partiklene (Beckman Coulter, 2006b). Systemet utfører både EV og optiske målinger samtidig ved samme lokalisasjon, ved å bruke en flowcelle med likesidet trekantet tverrsnitt (Rahman, 2006). Denne triangulære flow geometrien bidrar til den hydrodynamiske fokuseringen som er vist i Figur 5 og Figur 7.



Figur 7. **Prinsippet for hydrodynamisk fokusering i et flowcytometer.** Prøven bestående av en celleduspensjon i løsning, blir i flowcellen fokusert i en kolonne av enkeltceller ved gradvis innsnevring av diameteren til den koaksiale laminære flyten av føringsvæsken (sheath fluid). Bildet er hentet fra Tarrant et al. (Tarrant, 2005).

Elektrisk volum (EV) puls, fluorescenspuls(er) og side scatter puls blir alle amplifisert, digitalisert ved hjelp av elektronikk og deretter analysert med hensyn til styrke. Signalene fra hver enkelt celle blir organisert i form av histogram etter hvert som cellene analyseres. Histogrammet dannes i et telleregister som inneholder et bestemt antall kanaler. Når pulsene registreres vil dette skje i et kanalnummer som er proporsjonalt med pulshøyden. Log amplifisering av signal blir normalt brukt ved fluorescens studier fordi svake signaler vil justeres opp mens sterke signaler vil komprimeres, noe som resulterer i en distribusjon som er lett å fremstille i et histogram (Beckman Coulter, 2006b). Lineær skala er å foretrekke når det ikke eksisterer slik stor vidde i signalstyrke, for eksempel DNA analyse. Lysspredningssignalene vil kunne gi en grov oversikt over fordelingen av de viktigste cellepopulasjonene (Lea, 2006). Dataanalysen kan utføres slik at bare celler med bestemte egenskaper inkluderes. Ved å "ramme inn" den aktuelle populasjonen ved hjelp av spesielle diskriminatorer, såkalt gating, kan videre undersøkelser begrenses og forenkles.

Mange andre kvantitative teknikker gir informasjon om gjennomsnitts- eller totalverdi for analyttene, mens det i flowcytometri er mulig å diskriminere mellom enkeltkomponenter (Lea, 2006). Små undergrupper av celler i en blandet og heterogen populasjon kan dermed identifiseres og analyseres. Flowcytometri kan benyttes for å måle flere parametre hos individuelle celler i komplekse blandinger, med stor grad av sensitivitet og spesifisitet. Metoden har raskt blitt et uunnværlig hjelpemiddel innen medisinsk forskning, spesielt innenfor immunologi og hematologi (Tarrant, 2005). Instrumentet kan blant annet benyttes for å studere T-lymfocytter, nukleinsyre-innhold (DNA, RNA) og proliferasjonsaktivitet, kromosomer, stamceller, celleaggregater, cellulære organeller, bakterier, virus, enzymaktivitet, kalsiumstrømmer, endringer i membranpotensial og intracellulær pH (Lea, 2006; Shapiro, 2003) for å nevne bare noen eksempler.

1.5.2 Fluorescensmikroskopering

Mikroskop er et uunnværlig verktøy for å kunne studere cellestruktur og cellekomponenter (Becker, et al., 2006). Uavhengig av type mikroskop, trengs det alltid tre elementer for å skape et bilde; lyskilde, prøve for analyse og linsesystem som fokuserer lysstråler. Fasekontrast mikroskop detekterer forskjeller i refraktiv indeks og tykkelse på forskjellige regioner til celler som blir analysert, uten å måtte farge eller seksjonere prøven. Lyset består av mange ulike lysstråler, og når disse passerer gjennom prøven vil deres hastighet påvirkes av ulike fysiske egenskaper hos prøven. Vanligvis vil hastigheten senkes i varierende

omfang i ulike regioner av prøven, noe som resulterer i en endring i fase relativt til lysstråler som ikke har passert igjennom objektet. Disse faseforskjellene blir så konvertert til endring i lysstyrke. Interne strukturer i cellen blir derfor gjerne bedre visualisert ved bruk av dette mikroskopi-prinsippet enn ved vanlig lysfeltmikroskopi.

En metode for å oppnå informasjon om lokalisering av spesifikke molekyler eller ioner i celler, i tillegg til visualisering av cellestrukturer, er å benytte fluorescensmikroskop (Becker, et al., 2006). Dette er et spesialisert lysmikroskop som utnytter lyset til å skape fluorescensemisjon i prøven. Fluorescensmikroskopet har et eksitasjonsfilter mellom lyskilden og kondensorklinsen som transmitterer lys med kun en bestemt bølgelengde. Kondensoren fokuserer lyset på prøven slik at fluorokromer i prøveobjektet begynner å emitte lys med lengre bølgelengde enn det innkomne lyset. Både eksitasjonslyset og emisjonslyset fra fluorokromen passerer så gjennom objektivlinse. Når lyset passerer gjennom tuben av mikroskopet ovenfor objektivlinse, vil det nå et barriere-filter som spesifikt fjerner eksitasjonslyset, og dermed vil kun emisjonslyset bidra til dannelsen av et fluorescerende bilde mot den mørke bakgrunnen. For å lokalisere spesifikke molekyler eller ioner inni cellen, brukes fluorescensprober eller fluorokromer.

1.5.3 Real time PCR

Real-time PCR er en teknikk hvor data samles mens PCR prosessen skjer, ved at amplifisering og deteksjon kombineres i et og samme trinn (Wong & Medrano, 2005). Realtime PCR gjør kvantifiseringen av DNA og RNA lettere og mer presis enn tidligere metoder (Wong & Medrano, 2005), og er så sensitiv at den kan detektere en to ganger forandring i antall kopier (Applied Biosystems). PCR reaksjonen deles inn i tre faser; ¹⁾ *eksponentiell fase* hvor produktet fordobles for hver syklus (100 % reaksjonseffektivitet). Denne reaksjonen er veldig spesifikk og presis. ²⁾ I den *lineære fasen* begynner reaksjonskomponentene å bli brukt opp og reaksjonshastigheten avtar. ³⁾ I *plateau fase* stoppes reaksjonen og det dannes ikke mer produkt, og dersom den blir stående lenge vil PCR produktet begynne å degradere. Dette fører til at målinger som gjøres i eksponentiell fase, hvor amplifiseringen skjer eksponentielt vil være mer spesifikke enn de som gjøres i sluttprodukt. Amplifiseringen kan fremstilles både logaritmisk og lineært. Bruk av for eksempel AmpliTaq Gold® DNA polymerase, som har 5'exo-nukleaseaktivitet, sammen med FRET (Fluorescent Resonant Energy Transfer), mellom fluorokrom og quencher på en probe, gjør det mulig å detektere PCR amplifiseringen i Real-time PCR. Probe som er

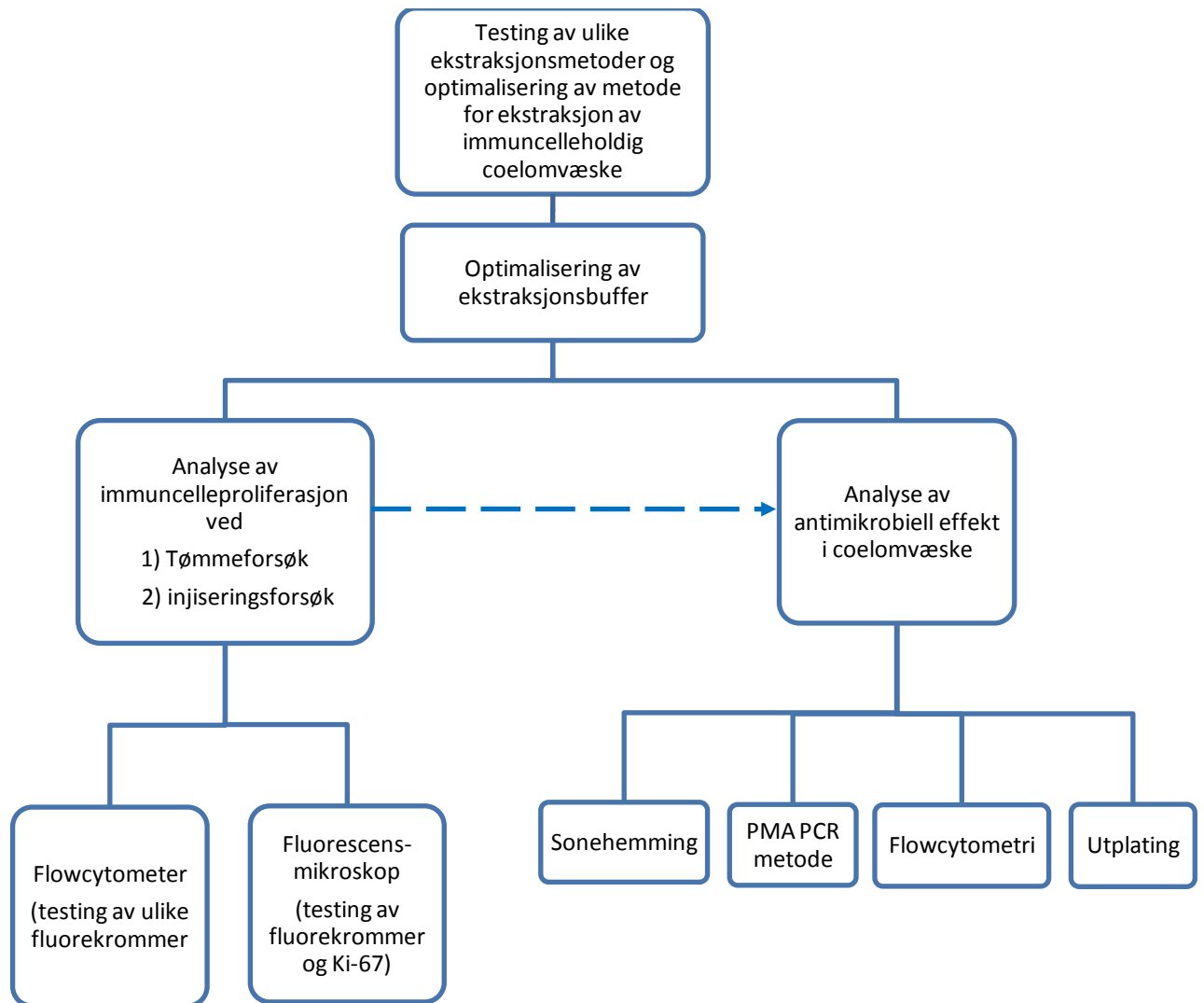
designet for å anneale til en spesifikk sekvens på templatet mellom forward og revers primer tilsettes til PCR miksen. Prober er konstruert slik at de har en fluorokrom med høy energi, kalt reporter, bundet til 5' enden, og fluorokrom med lav energi, kalt quencher, i 3' enden. Når proben er intakt og blir eksitert av en lyskilde, vil emisjonen fra reporter bli undertrykket av quencher. Denne undertrykkelsen skyldes energioverføring på grunn av deres nære tilstedeværelse. Når enzymet med sin 5' exo-nucleaseaktivitet spalter proben, vil distansen mellom reporter og quencher øke, og energioverføringen vil stoppe opp. Dette fører til at fluorescensemisjonen fra reporter vil øke, mens den vil avta for quencheren. Økningen i reporter signal detekteres av instrumentet og fremstilles av software. Når reportersignalet øker til et detekterbart nivå, kan dette fremstilles som et amplifiseringsplot, et plot som viser fluorescenssignal versus syklusnummer. Reaksjoner er karakterisert ved tidspunktet for en sykel når amplifiseringen av PCR produktet først blir detektert (Applied Biosystems). Jo høyere tilstedeværelse av målsekvens ved start, desto før vil en signifikant økning i fluorescens bli observert. I de initielle syklene av PCR-reaksjonen vil det være liten endring i fluorescenssignal. Dette definerer hva som utgjør baseline for amplifiseringsplottet, dvs. hva som defineres som bakgrunnsfluorescens i reaksjonen (R_n) og subtraheres fra resultatene ved normalisering av reporter (normalisert til ΔR_n). Beregningen av R_n gjøres ved å se på ratio av fluorescens emisjonsintensitet til reporter i forhold til fluorescens emisjonsintensitet til passiv referanse (Applied Biosystems). Passiv referanse, utgjør en intern fluorescens referanse som reporter normaliseres mot, for å korrigere fluorescens variasjoner forårsaket av endringer i konsentrasjon, volum eller prøvevariasjoner. Nivået til ΔR_n brukes til å bestemme threshold verdien. Nivået settes over baseline og tilstrekkelig lavt nok til å være innenfor regionen med eksponentiell vekst. Threshold- linjens skjæringspunkt med amplifiseringsplottet definerer C_T (threshold cycle). Dermed vil C_T fortelle hvor mange sykler templatet måtte behandles for å oppnå en bestemt produktmengde, og C_T vil synke med økende mengde templat. SYBR®GreenPCR kan også benyttes som deteksjonsmetode i Real-time PCR. Dette fluorescerende fargestoffet binder dobbeltrådet DNA og fluorescensintensiteten vil dermed øke proporsjonalt med mengden PCR produkt som dannes.

1.6 Hensikt med oppgaven

Et ubesvart spørsmål er hvor bredspektret den innate immunresponsen er og hvordan organismer med innat immunsystem kan skille mellom patogene og gunstige bakterier. For å

kunne besvare disse spørsmålene har oppgavens målsetning vært å etablere metoder for studie av immunrespons og antimikrobiell aktivitet hos meitemarken *Dendrobaena veneta*.

I metodeutviklingen ble det valgt å eksponere meitemarken for den gram negative bakterien *E. coli* og gram positive bakterien *S. aureus* ved injisering. Videre ble det valgt å utvikle og tilpasse metoder for studier av antimikrobiell effekt og immuncelleproliferasjon i coelomvæske. Teknikkene som ble brukt er flowcytometri, mikroskopi, Real-time PCR, levende/død farging av DNA og bakteriecelleutplating. Figur 8 nedenfor viser en forenklet oversikt over hvilke studier som er utført i denne oppgaven.



Figur 8. **Flytskjema/organisasjonskart.** Flytskjemaet viser hvilke analyser som har blitt utført i oppgaven.

2 Materialer og metoder

2.1 Hold av meitemark

Store meitemark av arten *Dendrobaena veneta* (1,0-1,5 gram) ble bestilt fra FIBE AB (Överkalix, Sverige). Meitemarken levde ved 18 °C i spesialtilpassede isoporkasserkasser med ca 3 liter jord bestilt fra Magic Products, Inc. (Amherst Junction, Wisconsin, U.S.A.). Meitemarkfôr ble tilført kassen med mark 1-2 ganger i uka, avhengig av antall mark i kassa og hvor raskt fôret ble spist opp. Destillert vann ble tilsatt jevnlig (ca hver 14. dag) for å opprettholde fuktig jord. Mark ble vasket med springvann før forsøk (tidligere beskrevet av (Diogene, Dufour, Poirier, & Nadeau, 1997; Milochau, et al., 1997)). Stryking av meitemarkens bakre del eller sulting har blitt utført i andre studier for å begrense kontaminering av tarminnhold i ekstrahert coelomvæske (M. Engelmann, et al., 2002; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004), men ble utelukket i denne studien.

2.2 Immuncelleekstraksjon

Ulike metoder for ekstraksjon av coelomvæske med immunceller fra meitemark er beskrevet i flere tidligere artikler (Diogene, et al., 1997; Eyambe, Goven, Fitzpatrick, Venables, & Cooper, 1991; Handy, 2007; Hendawi, et al., 2004; Homa, et al., 2008; Kohlerova, Beschin, Silerova, De Baetselier, & Bilej, 2004; Massicotte, et al., 2004). Disse ekstraksjonsmetodene er basert på at meitemark blir eksponert for ultralyd, etanol, elektrisk strøm, vakuüm eller punktering. Et utvalg av disse metodene har blitt testet i den hensikt å finne den mest effektive ekstraksjonsmetoden for marken *Dendrobaena veneta*. I tillegg har ulike ekstraksjonsbuffere blitt testet, for å optimalisere grad av ekstraksjonseffektivitet og forhindring av celleaggregering. Cellekonsentrasjon ble bestemt ved hjelp av et Bürker tellekammer.

2.2.1 Immuncelleekstraksjon ved ultralydstimulering

Meitemark ble vasket i romtemperert dH₂O og overført til 15 ml rør med 10 ml kald *Lumbricus* balanced salt solution (LBSS) (71,5 mM NaCl, 4,8 mM KCL, 1,1 mM MgSO₄·7H₂O, 0,4 mM KH₂PO₄, 0,3 mM Na₂H₂PO₄·H₂O og 4,2 mM NaHCO₃, pH7,3 og osmolaritet lik 220 mmos (KNAUER, semi-micro osmometer K-7400)) tilsatt 6,71 mM

EDTA. Rør med meitemark ble sonikert i ultralydbad (BRANSON 3200) i en serie på 10× 2-3 sekunder, som tidligere beskrevet av Hendawi et. al. (Hendawi, et al., 2004).

Ekstraksjon av celler ble også forsøkt i PBS (10×PBS: 2,0 g KCl, 2,0 g KH₂PO₄, 80,0 g NaCl, 14,29 g Na₂HPO₄·2H₂O, pH 7,4) tilsatt 25 g/l EDTA. Bruk av PBS som ekstraksjonsbuffer er tidligere beskrevet av Plytycz et al. (Barbara Plytycz, Klimek, Homa, Tylko, & Kolaczowska, 2007). Ekstraherte celler ble sentrifugert ved 150 × g i 10min ved 4 °C. Cellepellet ble resuspendert i PBS med EDTA.

2.2.2 Immuncelleekstraksjon ved etanolbehandling

Det ble laget tre forskjellige etanolholdige ekstraksjonsløsninger; 1) 5 % etanol løst i dH₂O, 2) 5 % etanol med 5 g/L EDTA løst i dH₂O, og 3) LBSS buffer med 5 % EtOH og 5 g/L EDTA. Mark ble overført til rør med de respektive etanoløsningene og inkubert i ca 2 min til den begynte å vikle og slippe immunceller. For å redusere celleaggregering, ble tilsats av forskjellige antikoagulerende stoffer i ekstraksjonsbufferne testet ut;

GGE ekstraksjonsbuffer med etanol: Meitemark ble vasket ved å legge de i petriskål med LBSS løsning. Immunceller ble ekstrahert ved å overføre mark til 15 ml rør med 3 ml GGE ekstraksjonsbuffer (5 % etanol, 2,5 mg/ml EDTA, 10 mg/ml GGE (Guaicol Glycerol Ether, Sigma-Aldrich Norway AS, G5627), pH 7,3) (Hendawi, et al., 2004). Etter 3 min ble meitemark tatt ut og det ble tilsatt 12 ml kald LBSS uten CaCl₂. I henhold til artikkel av Hendawi et al. (Hendawi, et al., 2004) skulle det benyttes LBSS buffer med 1,5 mM NaCl. I vår studie ble det imidlertid brukt LBSS buffer med 71,5 mM NaCl. Celleløsningen ble sentrifugert ved 150 × g i 10 min og pelleten ble resuspendert i 3 ml kald LBSS med 3,8 mM CaCl₂. Testet også effekten av å tilsette kald LBSS buffer med 6,7 mM EDTA og 10 mM EDTA, samt å løse pellet i disse to LBSS løsningene til slutt før mikroskopering.

Bruk av GGE ekstraksjonsbuffer i kombinasjon med Accumax™ (Hendawi, et al., 2004) ble også testet ut. Bruk av dette antikoagulerende midlet er tidligere beskrevet av (Patel, Francis, Cooper, & Fuller-Espie, 2007). En cellepellet ble resuspendert i 500 µl GGE buffer, mens en annen cellepellet ble løst i 500 µl LBSS- buffer. Begge rørene ble videre tilsatt 500 µl Accumax™ (A7089, Sigma). Celleløsning ble inkubert i 5 min ved romtemperatur før det ble tilsatt 5 ml av henholdsvis GGE ekstraksjonsbuffer eller LBSS buffer. Løsningene ble sentrifugert ved 118 × g i 5 min ved 4 °C. Cellepellet ble til slutt løst i de samme respektive bufferne.

Modifisert GGE ekstraksjonsbuffer med EGTA: Coelomvæske med immunceller ble ekstrahert ved at meitemark ble plassert i petriskål med kald modifisert GGE ekstraksjonsbuffer med EGTA (71,2 mM NaCl, 5 % Etanol, 50,4 mM GGE, 5 mM EGTA, pH7,3). Celledøsning ble overført til rør tilsatt likt volum av LBSS buffer (1:1 fortykning) og sentrifugert ved $120 \times g$ i 5 min. Cellepellet ble resuspendert i LBSS buffer til ønsket konsentrasjon.

Modifisert antikoaguleringsbuffer: Meitemark ble vasket i vann og overført til rør som inneholdt 3 ml antikoaguleringsbuffer (0,45 M NaCl, 0,1 M glukose, 30 mM Natrium citrat, 26 mM sitronsyre og 10 mM EDTA, pH4,6) (Kohlerova, et al., 2004) med 5 % EtOH. Celledøsning ble sentrifugert ved $150 \times g$ i 10 min. Cellepellet ble resuspendert i antikoaguleringsbuffer uten EtOH.

2.2.3 Immuncelleekstraksjon ved elektrostimulering

Meitemark ble vasket i springvann og overført til sterilfiltrert LBSS buffer med 10 mM EDTA og 2 % FBS (Foetal Bovine Serum, F7524, Sigma), kalt modifisert LBSS buffer. FBS ble inaktivert på forhånd ved å varme opp til 50 °C. Bruk av serum i kombinasjon med andre løsninger er tidligere beskrevet av Engelmann et al. (P. Engelmann, Molnar, et al., 2004; Krishan, 1975). Mark ble elektrostimulert i 40 ml modifisert LBSS buffer i 5 sek ved 5 V (power supply koplet til metallektroder) etter modifisert protokoll av Hendawi et al. (Hendawi, et al., 2004). Stimuleringen ble gjentatt inntil coelomvæske med immunceller ble skilt ut. Celler fra mark i grupper ble ekstrahert i samme løsning.

Bruk av Accumax™ for å forhindre celleaggregering ble også testet ut på celler ekstrahert ved elektrostimulering. Immunceller ble ekstrahert på samme måte som beskrevet ovenfor og celledøsning ble fordelt i to rør og sentrifugert ved $100 \times g$ i 10 min ved 4 °C. Den ene pelleten ble resuspendert i modifisert LBSS buffer med Accumax (1:1), mens den andre pelleten kun ble resuspendert i modifisert LBSS buffer. Begge celleprøvene ble inkubert i 5 minutt ved romtemperatur, etterfulgt av sentrifugering ved $100 \times g$ i 10 min ved 4 °C. Cellepellet som tidligere var blitt inkubert med Accumax ble resuspendert i 10 ml modifisert LBSS buffer. Den andre cellepelleten ble resuspendert i 4 % PFA og inkubert på is i 10 min og deretter sentrifugert ved $100 \times g$ i 10 min ved 4 °C. Cellepellet ble resuspendert i 15 ml modifisert LBSS buffer og sentrifugert ved $100 \times g$ ved 4 °C i 10 min. Deretter ble pelleten løst i modifisert LBSS buffer med Accumax (1:1). Etter 5 min inkubasjon ved

romtemperatur, ble prøven sentrifugert ved $100 \times g$ i 10 min ved $4 \text{ }^\circ\text{C}$ og pellet ble tilslutt løst i 10 ml LBSS løsning og filtrert gjennom $30 \text{ }\mu\text{M}$ filter (Partec CellTrics®, Münster, Germany). Celleprøve tilsatt Accumax ble mikroskopert før og etter PFA fiksering. Dette ble utført for å undersøke effekt av Accumax behandling før og etter PFA fiksering.

2.3 Studie av immuncellerespons

Ved studie av immuncellerespons hos meitemarken *Dendrobaena veneta* ble marken eksponert for bakteriestammene *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 og *Escherichia coli* MG1655 ved injisering (proliferasjonsstudie med injisering). Normal celleproliferasjon uten injisering av bakterier ble også studert ved kun å tømme meitemark for coelomvæske med immunceller (proliferasjonsstudie uten injisering). Celleekstraksjon ble utført ved elektrostimuleringsmetode beskrevet under 2.2.3, og det ble brukt injiseringsmetode beskrevet under 2.3.1. Celleløsningen ble sentrifugert ved $150 \times g$ i 10 min for oppkonsentrering dersom løsningen hadde for lav cellekonsentrasjon til å bli analysert i flowcytometer ($>1 \times 10^6$ celler pr ml). Immuncelleprøver som ble ekstrahert ble analysert ved flowcytometri og fluorescensmikroskopi for å studere eventuell proliferasjon (se 2.4). En nærmere beskrivelse av to forskjellige proliferasjonsforsøk/forsøksoppsett er beskrevet nedenfor.

- 1) Proliferasjonsstudie uten injisering (tømmeforsøk):** grupper med mark (20 stk) ble tømt for immunceller dag 1, dag 2 (og eventuelt dag 3). Ved dag 4, 5, 7 og dag 8 ble meitemark fra henholdsvis gruppe 1, 2, 3 og gruppe 4 tømt for immunceller. Immunceller fra mark som tidligere ikke hadde blitt tømt for coelomvæske, ble brukt som kontroll.
- 2) Proliferasjonsstudie med injisering (injiseringsforsøk):** mark ble tømt for immunceller med 7 dagers mellomrom. Etter første gang med tømning ble mark injisert med bakterieløsning av *S. aureus* NCTC 8325 eller *E. coli* MG1655 med $\text{OD}=0,5$. Mark injisert med LBSS buffer og mark som ble tømt, men ikke injisert, ble brukt som kontroller. Cellefri coelomvæske (supernatant) ble undersøkt for innhold av bakterie DNA (se 2.3.2). Etter siste tømning ble mark avlivet med 70 % etanol.

2.3.1 Injisering av bakterier i meitemark

Ved injisering av meitemark med bakterier ble det benyttet en modifisert prosedyre etter Kohlerova et al. (Kohlerova, et al., 2004). For å fjerne jord ble mark oppbevart på bløtt papir i 30 min eller skylt med springvann. Bakteriekultur, dyrket fra overnattekultur, ble dyrket til OD=0,5 og 1ml av kulturen ble sentrifugert ved $9000 \times g$ i mikrosentrifuge (Biofuge 13, Heraeus Sepatech) i 10 min. Pellet ble resuspendert i 1ml LBSS buffer og bakterieløsningen ble videre benyttet til injisering.

I begynnelsen av prosjektet ble meitemark bedøvet med Farris (CO₂ holdig vann, Ringnes AS, Larvik, Norge). Meitemark ble inkubert i petriskål med Farris-løsning til de ble slappe/bedøvet. Senere i prosjektet ble tørris benyttet som bedøvelsesmetode. Ved denne metoden ble meitemark plassert i en boks med tørris uten at de var i direkte kontakt med isen. For injisering ble en 0,3mm tykk kanyle (BD Microlance™ 3, BD Drogheda, Irland) benyttet og ~25µl bakterieløsning ble injisert med en 1 ml sprøyte (BD Plastipak™, Becton Dickinson S.A, Spania). Bakterieløsningen ble sprøytet inn i coelom rommet, ca 0,5 cm bak clitellum.

Bakteriene *Listeria Innocula* CLUC 24924, *Staphylococcus aureus* NCTC 8325, *Escherichia coli* MG1655 og *Bacillus cereus* ATCC 2 som ble benyttet i prosjektet ble tilsendt i form av utstryk fra Nofima Mat (Ås). Disse bakteriene ble fryst ned i 60 % glycerol til sluttkonsentrasjon på 30 % og oppbevart ved -80 °C.

2.3.2 Studie av bakterieinnhold i ekstrahert coelomvæske hos injisert mark

I prosjektet var det ønskelig å fastslå om det kunne detekteres bakterierester i ekstrahert coelomvæske 7 dager etter injiseringen. Følgende prøver av cellefri coelomvæske ble analysert; 1) coelomvæske fra uninjiserte mark, 2) coelomvæske fra mark injisert med 25µl bakterieløsning, 3) coelomvæske fra mark injisert med 10µl bakterieløsning. Prøver av cellefri coelomvæske ble oppbevart ved -80 °C før analyse. Ved analyse ble prøvene tint og sentrifugert ved 9000g i 10 min. Pellet av 1 ml coelomvæske ble resuspendert i 20 µl 10mg/ml lysozym og inkubert ved 37 °C i 30 min. DNA ble rensert ved hjelp av PrepMan™ Ultra reagens etter prosedyre beskrevet under avsnitt 2.5.1. Realtime PCR analyse ble utført på rensert produkt (se 2.5.1.1).

2.4 Flowcytometri og mikroskopi for studie av immunceller og celleproliferasjon

Flowcytometri og mikroskopi har i dette prosjektet blitt benyttet for å studere de forskjellige immuncellepopulasjonene og celleproliferasjon. Flowcytometeret som har blitt brukt er av typen Cell Lab Quanta™ SC MPL fra Becman Coulter levert av Nerliens Meszansky (se avsnitt 1.5 for bilde av instrumentets oppbygning og nærmere instrumentbeskrivelse). Analyser har blitt gjort i det tilhørende analyseprogrammet (Cell Lab Quanta™ SC MPL Analysis software package, Software Version 1,0 A). Flowcytometeret har to uavhengige eksitasjonslyskilder, en 488nm laser og en kvikk (Hg) UV lampe (Beckman Coulter, 2006b). NPE Analyzer™, ISO- Diluent (NPE systems, USA) ble benyttet som føringsvæske (sheat fluid). Mikroskopi har blitt brukt til å studere de ulike cellepopulasjonenes strukturer ved gjennomlys og fasekontrast, mens fluorescens har blitt benyttet ved proliferasjonsstudiene. Mikroskopet som ble benyttet er et fluorescensmikroskop av typen Nikon ECLIPSE Ti-U mikroskop og det tilhørende bildebehandlingsprogrammet Nikon NIS- Elements Basic Research (ver. 3.00) ble brukt for å visualisere og analysere bildene.

2.4.1 Analyse av ufarget celleprøve

Flowcytometrisk analyse av ufargede immunceller ble brukt for karakterisering av cellestørrelse, form og struktur. All fluorescens med bølgelengde lengre enn 550nm vil passere gjennom 550DLP filter (se Figur 5). Lys med kortere bølgelengde blir ført mot det dikrotiske speilet (dicroic mirror) hvor det blir bøyd vinkelrett av. Dette avbøyde lyset vil detekteres i side scatter detektor, mens resterende med bølgelengde på >550 vil gå gjennom 525BP filter og detekteres i FL1. Dette gjelder ved laserbestråling. Ved bruk av UV lampe ble det dikrotiske speilet tatt ut, slik at alt lys med bølgelengde kortere enn 550nm gikk gjennom et 465BP filter og ble detektert i FL1. Lyset med bølgelengde lengre enn 550nm, som vil passere gjennom 550DLP, vil treffe et nytt filter, 600DLP. Alt lys med bølgelengde fra 550 til 600nm vil gå gjennom 575BP filter og detekteres i FL2. Alt emittert lys med bølgelengde lengre enn 600nm vil sendes videre gjennom 670LP filter og vil detekteres av FL3 detektoren.

2.4.1.1 Autofluoresens

En av immuncelletypene hos meitemark, eleocytt, har autofluorescens egenskaper. Det var derfor viktig i oppstartsfasen å bli kjent med denne fluorescensegenskapen, for å finne

fluorokrom som ikke ville overlappes med disse signalene, og metoder for å fjerne denne form for fluorescens. Plott som viste side scatter mot EV ble brukt til å analysere fordelingen av populasjoner. Dette plottet ble så videre sammenliknet mot fluorescens i det grønne området, detektert i FL1 med 525BP filter, ved analyse av populasjoners grad av autofluorescens.

Egenskapen ble brukt til grovt å anslå fordelingen av eleocyttar og tilstedeværelsen av disse cellene ved ulike tidspunkter i proliferasjonsstudier. Gating av celler med autofluorescens, dvs eleocyttar, og utviklingen av andelen eleocyttar etter tømning eller injisering, ble brukt som en indikasjon på hvilke immunceller som er mest aktive i de ulike fasene av en immunrespons. Autofluorescens vil imidlertid kunne forstyrre fluorescenssignaler fra fluorokromer som benyttes ved farging av celler. Celleprøver ble derfor behandlet med Nonidet® P40 (0,002 %, Fluka BioChemika, 74385) løst i LBSS og inkubert på is i 10min før flowanalyse for fjerning av autofluorescens. Dette er tidligere beskrevet av Homa et al. (Homa, et al., 2008).

2.4.2 DNA farging for studie av celleproliferasjon

Ved studie av immuncelleproliferasjon ble ulike fluorokromer testet ut. Enkelte fluorokromer som ble benyttet i studien krevde fiksering av immuncellene for effektiv cellefarging. Fiksering av immunceller ble utført dersom dette var anbefalt fra produsent.

2.4.2.1 Cellefiksering

Enkelte fluorokromer som ble benyttet i prosjektet krevde at cellene ble fiksert før farging. Celler ble forsøkt fiksert med 50 % metanol, men etter hvert ble fiksering med 4 % PFA en standard metode i prosjektet.

Forut for fiksering ble celleløsningen sentrifugert (Beckman Coulter™, Allerga™ 25R Centrifuge, Germany) ved $150 \times g$ i 10 min ved 4 °C. Cellepellet ble resuspendert i 1- 5 ml av 4 % PFA løsning, avhengig av størrelse på pellet, og inkubert i 10 min på is. Etter inkubering ble celleduspensjonen sentrifugert ved $150 \times g$ i 8 min ved 4 °C. Immuncellepelleten ble vasket to ganger i modifisert LBSS buffer. Til slutt ble pelleten løst i passende mengde modifisert LBSS buffer, avhengig av ønsket cellekonsentrasjon. Ved flowanalyse ble det benyttet 1×10^6 celler/ml. Konsentrasjonen ble bestemt vha av et Bürker tellekammer.

2.4.2.2 PI farging

Ved analyse av celleproliferasjon ble det i starten av prosjektet benyttet en modifisert prosedyre av Homa et al. (Homa, et al., 2008). Ved denne prosedyren ble immunceller løst i LBSS buffer med 0,25 % EDTA eller ACD-buffer (4,8 g/l sitronsyre, 13,2 g/l natrium citrat, 14,7 g/l glukose, pH 5,0) til en konsentrasjon på 1×10^6 celler/ml. Bruk av ACD buffer i kombinasjon med andre løsninger ble også testet ut med følgende prøveoppsett for hver prøve; celler løst i **1)** ACD- buffer, **2)** ACD- buffer tilsatt permabiliseringsløsning (10 mM Tris Base, 10 mM NaCl, 700 U/l RNase (Ribonuclease A from bovine pancreas, R6513, Sigma) og 0,1 % Nonidet P40, **3)** ACD- buffer tilsatt permabiliseringsløsning og 1 μ l 2,4 μ M PI (Invitrogen L-7011), **4)** ACD- buffer tilsatt 1 μ l 2,4 μ M PI, **5)** LBSS- buffer med EDTA, **6)** LBSS- buffer med EDTA tilsatt permabiliseringsløsning, **7)** LBSS- buffer med EDTA tilsatt permabiliseringsløsning og 2,4 μ M PI, **8)** LBSS- buffer med EDTA tilsatt 2,4 μ M PI. Prøver tilsatt permabiliseringsløsning og PI ble inkubert 30 min ved 4 °C ved vipping.

Videre i prosjektet ble følgende prosedyre benyttet: 1 ml cellesuspensjon ble sentrifugert (Sigma Laborzentrifugen) ved $175 \times g$ i 10 min ved 4 °C. Cellene ble løst i modifisert LBSS buffer til cellekonsentrasjon på 1×10^6 celler/ml. 500 μ l immucelleløsning ble tilsatt 7 μ l Nonidet® P40 og inkubert 10 min på is. Videre ble det tilsatt 1 μ l RNase (700 U/l, Ribonuclease A from bovine pancreas, R6513, Sigma) og 2 μ l 2,4 μ M PI (Invitrogen L-7011). Løsningen ble inkubert i 15min ved romtemperatur før cellene ble analysert i flowcytometeret. I flowcytometeret ble PI eksitert ved 488nm og emisjonen på 610nm ble detektert i FL3 med 670 long pass (LP) filter.

PI fargede immunceller ble også studert i et fluorescensmikroskop. 1 ml prøve ble sentrifugert ved $200 \times g$ i 10 min ved 4 °C. Pellet ble løst i 3 μ M PI og inkubert ved romtemperatur i 15min. Celleløsningen ble videre sentrifugert ved $200 \times g$ i 10min ved 4 °C og pelleten ble resuspendert i 1 ml modifisert LBSS. Ved mikroskopering ble et TRITC filter som detekterer rød emisjon benyttet. Ufarget kontroll ble mikroskopert først. Gain og exposure ble justert ned ut i fra denne kontrollen, slik at cellene ble usynlige. Deretter ble immunceller farget med PI studert med de samme innstillingene.

2.4.2.3 PI farging med modifisert Vindeløvs prosedyre

Cellepellet med 1×10^6 celler ble resuspendert i 500 μ l ACD buffer (4,8 g/l sitronsyre, 13,2 g/l natrium citrat, 14,7 g/l glukose (dextrose), pH 5,0) (Blacklidge KH, 1993; Homa, et al., 2008). Videre ble det tilsatt 500 μ l sterilfiltrert Vindeløvs propidium iodide løsning (10 mM

Tris base, 10 mM NaCl, 700 U/l RNase (Sigma, R6513), $3,75 \times 10^{-5}$ M PI (Invitrogen, L-7011), 0,1 ml/100 ml Nonidet P-40, pH 8). Celleløsningen ble inkubert mørkt på is i 30 min før analysering på flowcytometeret. I flowcytometeret ble PI eksitert ved 488 nm og emisjonen på 610 nm ble detektert i FL3 med 670 LP filter. Ved mikroskopering ble et TRITC filter som detekterer rød emisjon benyttet.

2.4.2.4 PI farging med Vindeløvs prosedyre

I forbindelse med Vindeløvs prosedyre ble det laget en **stock løsning** (3,4 mM trisodiumcitratdihydrat, 0,1 % Nonidet P40, 1,5 mM Spermine (sperminetetrahydroklorid, Sigma, S2876-5G), 0,5 mM Tris HCl) som videre ble brukt til å lage andre bruksløsninger (Vindelov, Christensen, & Nissen, 1983). 200 μ l celleduspensjon med konsentrasjon på 2×10^6 celler/ml ble tilsatt 1800 μ l iskald løsning **A** (30 mg/l trypsin (Sigma, T1426) løst i stock løsning, pH 7,6). Celleløsningen ble blandet godt og inkubert i 10 min ved romtemperatur. Videre ble det tilsatt 1500 μ l iskald løsning **B** (500 mg/l trypsin inhibitor (Sigma, T9253), 100 mg/l RNase (Sigma, R6513) løst i Stock løsning, pH 7,6). Løsningen ble blandet og inkubert i 10 min ved romtemperatur. Deretter ble det tilsatt 1500 μ l iskald løsning **C** (100 μ g/l PI (Invitrogen L-7011), 1,16 g/l Spermine, løst i stockløsning, pH 7,6). Løsningen ble blandet og inkubert i 10 min ved romtemperatur. Videre ble prøven inkubert mørkt på is i en time. Etter inkubering ble immuncelleprøven sentrifugert ved $9000 \times g$ i 10 min. Cellepelleten ble resuspendert i supernatanten til cellekonsentrasjon lik 1×10^6 celler/ml og cellene ble analysert ved flowcytometri og fluorescensmikroskopi. I flowcytometeret ble PI eksitert ved 488 nm og emisjonen på 610 nm ble detektert med 670 LP filter (FL3). Ved mikroskopering ble et TRITC filter som detekterer rød emisjon benyttet.

2.4.2.5 DRAQ5 Farging

DRAQ5TM farger celler i alle faser unntatt de i G1 fase. Immunceller ble løst i modifisert LBSS buffer til en konsentrasjon på 1×10^6 celler/ml. Celleløsningen ble inkubert med 0,1 μ M DRAQ5TM probe (BioStatus Limited, UK), basert på titeringsforsøk, i 10 min før analysering i flowcytometeret. DRAQ5TM ble eksitert med laserlys på 488 nm og emisjon ble detektert i FL3 med et 670 LP filter.

2.4.2.6 NIM DAPI reagens og DAPI-farging

PFA fikserte eller ufikserte celler med konsentrasjon på 1×10^6 celler/ml ble tilsatt 25 μ l 10 % Triton-X og inkubert i 15 min ved romtemperatur. Celleløsningen ble sentrifugert ved $200 \times g$ i 10 min ved 4 °C og pelleten ble resuspendert i 1 ml 3 μ M DAPI (4', 6-diamidino-

2 phenyl- indole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) og inkubert i 15 min før løsningen ble sentrifugert ved $200 \times g$ i 10 min ved 4 °C. Pellet ble til slutt resuspendert i 1 ml modifisert LBSS buffer. Som et alternativ til denne metoden, ble NIM-DAPI (Nuclear Isolation and Staining, Beckman Coulter, 731085) reagens tilsatt i celleløsningen (1:1). DAPI ble eksitert av UV-lys (365-450nm) og emittert lys ble detektert med et 460/30 filter. Prøver ble analysert ved flowcytometri med bruk av UV lys og fluorescensmikroskopi med bruk av UV filter/ DAPI filter.

2.4.2.7 HOE (Hoechst) farging

Pellet med immunceller (1×10^6 celler) ble løst i 3 μM HOE (Bisbenzimidazole Hoechst, Sigma, 33258). Løsningen ble inkubert i 15 min ved romtemperatur og videre sentrifugert ved $200 \times g$ i 10 min ved 4 °C. Pellet ble resuspendert i 1 ml modifisert LBSS buffer. Hoechst (HOE) eksiteres av UV lys ved 354nm og emitterer lys med bølglengde lik 475nm, som detekteres med 460/30 filter. Prøvene ble analysert ved flowcytometri med bruk av UV lys (365-450nm) og fluorescensmikroskopi med bruk av UV filter.

Ved optimalisering av metoden ble effekten av å øke HOE konsentrasjonen til 6 μM testet. I tillegg ble det også testet om permabiliserte celler ga en mer effektiv farging. Celleprøvene ble permabilisert med 0,25 % TritonX-100 (Sigma) i 15 min, etterfulgt av sentrifugering ved $200 \times g$ i 10 min ved 4 °C (Beckman Coulter™, Allerga™ 25R Centrifuge, Germany). Cellepellet med permabiliserte celler ble resuspendert i fargeløsning. Forsøket ble utført både på PFA fikserte og ufikserte celler.

2.5 Studie av antimikrobiell effekt i coelomvæske hos meitemarken *Dendrobaena veneta*

Eventuell antimikrobiell effekt i coelomvæsken har i dette prosjektet blitt studert ved å se på ratio av andel levende og døde bakterier over tid ved inkubering i coelomvæske. PMA har blitt brukt i den hensikt å identifisere døde bakterier. Eventuell antimikrobiell effekt over tid har også blitt testet ved å se på sonehemming og/eller kolonidannelse, samt ved flowcytometrisk analyse med LIVE/DEAD® BacLight™ kit.

2.5.1 Analyse av bakteriedrap i immuncelleløsning/ coelomvæske ved PMA PCR metoden.

Forsøket ble først optimalisert ved å lage en kjent gradient av andel levende og døde celler. 100 µl av overnattkultur av *S. aureus* og *E. coli* ble overført til 10 ml TSB medium (TSB oxoid, CM0129) og inkubert ved 37 °C ved svak risting. 1 ml celler i logfase ble overført til 2 eppendorfrør for hver bakterietype. En prøve for hver kultur ble inkubert på is i 10 min, mens de to andre kulturene ble kokt på varmeblokk i 10 min, og deretter satt på is. For begge bakterietypene ble det deretter laget en gradient med hensyn til andel levende og døde celler; 0 % døde (100 µl av isbehandlet kultur), 33 % døde (33 µl varmedrept kultur tilsatt 67 µl isbehandlet kultur), 66 % døde (67 µl varmedrept kultur tilsatt 33 µl isbehandlet kultur), 100 % døde (100 µl varmedrept kultur). Prøvene ble vortexet og 50 µl fra hver gradient ble overført til nye rør som ble fryst ned ved – 80 °C (kontroller uten PMA behandling). På mørkerom, ble 5 µl 20 mM PMA (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmethylammino)propyl]-6-phenyl dichloride, Biotium, Inc., Hayward, California løst i 20 % DMSO (Dimethyl sulfoxide, Merck), tint, og tilsatt 495 µl 20 % DMSO til PMA konsentrasjon lik 0,2 mM. Til hver av gradientprøvene ble det tilsatt 10 µl 0,2 mM PMA løsning. Prøvene ble vortexet og inkubert på is i 5 min, etterfulgt av lysbestråling med 750 W lampe fra 20 cm avstand i 2 min. Prøvene ble så fryst ned ved -80 °C for å oppnå samme behandling som kontrollprøvene. Prøvene ble tint og sentrifugert (Biofuge 13, Heraeus Sepatech) ved 9000 × g i 3 min på mikrosentrifuge. Dette sentrifugeringstrinnet ble imidlertid utelatt senere i forsøket i den hensikt å oppnå bedre DNA utbytte. Tint pellet ble løst i 200 µL PrepMan™ Ultra reagens (Sample Preparation Reagent, Applied Biosystems, part nr 4318930) og vortexet i ca 30 sek, før de ble kokt på varmeblokk ved 100 °C i 10 min. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 9000 × g i 3 min, og 100 µl av supernatant ble overført til nytt rør. Prøven ble så analysert ved Realtime PCR, som er nærmere beskrevet under avsnitt 2.5.1.1. OD-Ct forhold ble brukt til å finne optimalt blandingsforhold av bakterier ved testing av drap i immuncelleløsning. DNA ble rensset fra følgende uttak; *E. coli* t=90 til t=210, *S. aureus* t=30 til t=180, *B. cereus* t=30 til t=180, *List. innocula* t=120 til t=270, *Agrobact. tumefaciens* t=315 til t=465 og *Acidovorax facilis* t=1380 til t=1650 (t oppgitt i min og uttak ble gjort hvert 30 min). Det ble benyttet PrepMan Ultra Reagens for rensing av DNA og rensset produkt ble analysert ved Realtime (se 2.5.1.1). Det ble analysert en parallell for hver prøve (med og uten PMA behandling) for hver gradient (0 %, 33 %, 66 % og 100 % levende), for hver bakterietype; *E. coli* og *S. aureus* og for hvert primerpar (*E. coli*, *S. aureus*

og Mangala), totalt 96 prøver. I tillegg ble det kjørt 2 negative kontroller som inneholdt 23 µl mastermiks og 2 µl PCR vann. Forsøket ble repetert og ved realtime PCR ble det i motsetning til første forsøk, kun benyttet universelle Mangala primer sett, tidligere publisert av Nadkarni et al. (Nadkarni, Martin, Jacques, & Hunter, 2002).

På bakgrunn av optimaliseringen ble bakteriene *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Agrobact. tumefaciens*, *Listeria innocua*, og *Acidovorax facilis* dyrket frem til likt OD-Ct-forhold og satt på is for å stoppe veksten. Coelomvæske med immunceller ble ekstrahert ved elektrostimulering i modifisert LBSS buffer (se 2.2.3 for beskrivelse av ekstraksjonsmetode). Celledøsning ble filtrert gjennom 30 µm filter (Partec CellTrics®, Germany) og satt på is. Cellekonsentrasjon ble bestemt ved celledøtelling i Bürker tellekammer. Coelomvæske og modifisert LBSS- løsning ble fryst ned som kontroller. 10 ml av bakterieløsning (blanding av de 6 ulike bakteriene) ble tilsatt likt volum (10 ml) av: **A**) immuncelleløsning og **B**) modifisert LBSS buffer. Tidspunkt ved inokulering tilsvarer t=0. Ved t=15, 30, 90, 105, 120, 135, 150, 165 og 180, ble det tatt ut 2 ×100 µl av prøve A og B som ble tilsatt 10 µl 0,2 mM PMA løsning. Prøvene ble vortexet og inkubert på is i 5min. Prøvene ble videre belyst på is i 2 min med 750 W lampe fra 20 cm avstand og deretter fryst ned ved -80 °C. Tilsvarende prøver, men uten tilsats av PMA ble laget og fryst ned ved -80 °C. Til slutt ble det også fryst ned 1 ml av løsning A og B uten noe behandling. DNA ble rensset ved PrepMan Ultra Reagens på samme måte som tidligere beskrevet i dette avsnittet. Realtime PCR analyse ble utført på rensset produkt (se 2.5.1.1).

2.5.1.1 Realtime PCR

Et probesystem med FAM™ som reporter, TAMRA™ som quencher og ROX™ som passiv referanse ble benyttet ved PCR amplifisering av 16S rRNA gener ved Real-time kvantitativ PCR (7500 Realtime PCR Systems, Applied Biosystems) og analysert i et analyseprogram (7500 system SDS v1.3.1 software, Applied Biosystems). Det ble benyttet *E. coli* og *S. aureus* primere som tidligere er publisert av Liu et al. (Liu, Lawrence, & Austin, 2005), samt universelle konserverte primersett som tidligere er beskrevet av Nadkarni et al. (Nadkarni, et al., 2002). Primer og prober som ble benyttet ble bestilt fra henholdsvis Applied Biosystems og Invitrogen og ble designet med Primer Express® programvare (Applied Biosystems). En oversikt over disse primerene og tilhørende prober som ble benyttet med respektive sekvenser er vist i Tabell 1.

Tabell 1. Oversikt over primer og prober som har blitt benyttet i Realtime TaqMan® PCR analyser. Tabellen viser navn på primer og prober benyttet ved Realtime PCR med tilhørende sekvens. Lengden av primer eller probe oppgitt i antall baser er også vist.

Primer navn:	Sekvens	Lengde
<i>Mangala F</i>	5-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3	19
<i>Mangala R</i>	5-GGA CTA CCA GGG TAT CTA TTC CTG TT-3	26
<i>E. coli F</i>	5-GTG TGA TAT CTA CCC GCT TCG C-3	22
<i>E. coli R</i>	5-AGA ACG GTT TGT GGT TAA TCA GGA -3	24
<i>S. aureus F (Sa0836F)</i>	5-GGC GCT TGT AAA ATT TTC GT-3	20
<i>S. aureus R (Sa0836R)</i>	5-TGC GCA AAG TTT TAT TGA ACA-3	21
Probe navn:	Sekvens	
<i>Mangalaprobe TAMRA probe</i>	5-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC AC-3	23
<i>Sar2684PR (S.aureus Taqman probe)</i>	5-TTG TTC ACG ATA TGC GTA CAC GTG-3	24
<i>E. coli – Taqman probe</i>	5-TCG GCA TCC GGT CAG TGG CAG T-3	22

Realtime PCR ble gjennomført i 25 µL reaksjonsvolum: 2 µl templat, 0,5 µl 5× ROX (F-401L, Finnzymes, Espoo, Finland), 0,5 µl 5 µM TaqMan-probe (se Tabell 1), 0,5 µl 10 µM forward (F) primer (se Tabell 1), 0,5 µl 10 µM reverse (R) primer (se Tabell 1), 0,5 µl 10 mM dNTP (AB-0315/A, Thermo Scientific), 0,5 µl DyNAzyme™ II Hot Start DNA polymerase (F-501L, 2,0 U/µl, Finnzymes), 2,5 µl DyNAzyme™ II Hot Start Reaction Buffer (F-504L, Finnzymes) og 17,5 µl H₂O. Følgende amplifiseringsprofil ble benyttet: 10 min aktivering ved 95 °C, etterfulgt av 40 syklor med 95 °C i 30 sek, 63 °C i 30 sek og 72 °C i 45 sek.

2.5.2 Analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske ved flowcytometri.

Drap av bakterier som ble inkubert i cellefri coelomvæske med immunceller, ble analysert ved flowcytometri. Ved analysen ble LIVE/DEAD® BacLight™ kit (Invitrogen, L13152) benyttet (se avsnitt 1.3.2 i innledning). Medium og løsninger ble sterilfiltrert før bruk. Det ble overført 100 µl overnattkultur av *E. coli* til 10 ml nytt TBS medium og kulturen ble dyrket videre til OD≈0,5. Videre ble det laget 2 prøver bestående av; 1) 10 ml *E. coli* kultur

+ 10 ml supernatant fra immuncelleløsning, 2) 10 ml *E. coli* + 10 ml 0,85 % NaCl. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur og 1 ml prøve ble tatt ut etter 0, 2, 4 og 6 timer, i tillegg til et uttak neste dag. Prøvene ble sentrifugert ved $10000 \times g$ ved $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i 7 min. Pellet ble resuspendert i 1 ml 0,85 % NaCl og løsningen ble sentrifugert ved $10000 \times g$ ved $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i 7 min. Videre ble pellet resuspendert i 1 ml dH₂O. Det ble laget en fortynningsrekke av bakterieprøvene for å eventuelt tydeligere fremheve drapeseffekten og for hvert uttak ble det platet ut prøver fra fortyningene 10^{-3} , 10^{-4} og 10^{-5} . LIVE/DEAD[®] BacLight™ kit fargeløsningene ble gjort klar ved å løse SYTO9 og PI i 10 ml dH₂O til konsentrasjon på henholdsvis 3 μM og 15 μM . 10 μl prøve ble tilsatt 240 μl dH₂O og 250 μl fargeløsning etterfulgt av inkubering i mørke ved romtemperatur i 15 min. Prøvene ble analysert på flowcytometer. Det ble forsøkt å inkludere en levende og en død kontroll. Levende kontroll bestod av 1 ml bakterier i TSB medium som ble vasket og farget på samme måte som de 4 andre uttaksprøvene. Den døde kontrollprøven ble før vaskingen med NaCl inkubert med 70 % EtOH i 150 min. Senere i prosjektet ble UV-bestråling (Kodak Image Station 4000MM) i 2 min av bakterier i eppendorfrør med åpent lokk, benyttet i opparbeidelsen av død kontroll. Etter hvert ble forskjellen i antall kolonier mellom levende kontroll ved utplating av uttaksprøver brukt direkte som indikator på drap.

2.5.3 Analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske ved sonehemningsforsøk

25 mark ble injisert (se prosedyre i avsnitt 2.3.1) med $\sim 25 \mu\text{l}$ *E. coli* kultur med OD= 0,5 (populasjon 1) og 25 mark ble injisert med $\sim 25 \mu\text{l}$ *S. aureus* kultur med OD=0,5 (populasjon 2). 25 uninjisert mark ble brukt som kontrollgruppe (populasjon 3). Markene hadde en inkubasjonstid av de injiserte bakteriene på 2 dager, før ekstraksjon av coelomvæske med immunceller ble utført (se avsnitt 2.2.3 for beskrivelse av ekstraksjonsmetode).

Enkeltrør med 6 ml TSA- softagar (0,5 g agar pr 100 ml flytende TSB medium) oppbevart i vannbad ved $48 \text{ }^\circ\text{C}$, ble tatt opp og tilsatt 0,1 ml (100 μl) av de respektive bakteriekulturene; *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* og *List. innocua*. Løsningene ble blandet og platet ut på petriskåler med TSA agar. Coelomvæske med immunceller ble ekstrahert fra injiserte og uninjiserte mark i dH₂O (30 ml pr gruppe) ved hjelp av elektrostimulering (se 2.2.3). Celleløsningene ble sentrifugert ved $300 \times g$ i 10 min ved $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatanten ble frysetørket (CHRIST[®] LOC 1-M, ALPHDA 1-4, Martin Christ Company) og resuspendert i 100 μl dH₂O. 10 μl fra hver av disse løsningene ble så avsatt på hver av de 4

bakterieskålene. Det ble avsatt en parallell for hver immuncelleløsning på hver skål. I tillegg ble det laget to kontrollskåler med *E. coli*, der det på den ene ble avsatt to dråper med 10 µl 100 µg/ml ampicillin som fungerte som positiv kontroll og en skål hvor det ikke ble avsatt noe (negativ kontroll). Skålene ble inkubert ved 37 °C. Neste dag ble skålene fotografert og analysert for hemmesoner.

2.5.4 Studie av in vitro vekst ved bakterieinkubasjon i cellefri coelomvæske

Coelomvæske med immunceller ble ekstrahert i 30 ml dH₂O fra 20 uinjiserte mark ved elektrostimulering (se 2.2.3). Celledøsningen ble inkubert over natt ved romtemperatur. Neste dag ble løsningen sentrifugert ved 11000 × g i 5 min og supernatanten (cellefri coelomvæske) ble sterilfiltrert. Den sterilfiltrerte løsningen ble fryst ned ved -80 °C. Gjennomfrossen løsning ble frysetørket over natt (CHRIST[®] LOC 1-M, ALPHDA 1-4, Martin Christ Company) og frysetørket produkt ble veid neste dag før produktet ble løst i 100 µl dH₂O. 10 µl bakteriekultur av *S. aureus* og *E. coli* ble dyrket i TSB medium til en konsentrasjon på 10⁸ celler/ml (dvs. OD ≈ 0,5) og ble videre tilsatt til hvert sitt rør med 50µl konsentrert cellefri coelomvæske (resuspendert frystørket produkt).

Det ble laget fortynningsrekker av bakteriekulturen opp til 10⁻⁵ ved hvert uttakstidspunkt, dvs. ved t=0, t=30 og t=2timer i første forsøk og ved t= 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 og etter 2 dager i forsøk 2. I forsøk nr 2 ble det også satt opp 4 kontroller; ¹⁾ 10 µl *E. coli* + 50 µl dH₂O, ²⁾ 10 µl *S. aureus* + 50 µl dH₂O, ³⁾ 10 µl *E. coli* + 50 µl LB medium og ⁴⁾ 10 µl *S. aureus* + 50 µl LB medium. Kontroll nr 3 og 4 ble kun tatt ut ved t=0, og skulle være en kontroll for grad av bakteriedrap forårsaket av resuspending i dH₂O. LB mediet ville antakeligvis gitt mye bedre vekstbetingelser over tid, og var derfor ikke relevant som kontroll utover t=0. Sammenlikning av bakterieinkubasjon i konsentrert cellefri coelomvæske opp mot bakterier inkubert i dH₂O ble brukt som indikasjon på om den cellefrie coelomvæska har antimikrobiell effekt. Følgende fortyninger ble platet utpå LB skåler (se 6.1); 10⁻³, 10⁻⁴ og 10⁻⁵. Skålene ble inkubert ved 37 °C over natt, før telling av kolonier neste dag.

3 Resultater

Metoder som kan brukes i videre studier knyttet til kartleggingen av mekanismene som styrer en immunrespons, har blitt utviklet og optimalisert i denne oppgaven. De viktigste funnene i denne optimaliseringsprosessen vil bli presentert. Meitemarken *Dendrobaena veneta* har blitt brukt som modellorganisme. Immuncelleløsning ble ekstrahert fra uinjisert mark (kontrollmark), fra mark injisert med bakteriestammene *E. coli* og *S. aureus*, samt fra uinjiserte mark som ble tømt for celler gjentatte ganger (tømmemark). Disse forskjellige behandlingene ble utført for å trigge frem forskjellige immunresponser hos meitemarken. Resultatene i denne oppgaven vil være nyttig som vurderingsgrunnlag i den videre utviklingen av hovedprosjektet.

3.1 Immuncelleekstraksjon

Det er vanlig at tarmen til meitemark tømmes før ekstraksjon av immuncelleløsning. Dette blir gjort for å unngå at tarminnholdet slippes ut samtidig med immuncelleløsningen og dermed kontaminerer denne løsningen. Hendawi et al. (Hendawi, et al., 2004) er blant de som har beskrevet hvordan man kan fjerne tarminnholdet ved stryking. Sulting kan utføres som en alternativ metode for fjerning av tarminnhold. Immunceller har i denne studien blitt ekstrahert fra usultet mark, da strykning og sulting påførte meitemark stress slik at de slapp immunceller før forsøksstart. Meitemark som skulle brukes i forsøk ble derfor kun vasket med springvann.

Ulike metoder for ekstraksjon av coelomvæske som inneholder immunceller ble testet, og metodenes effektivitet med hensyn til celleutbytte og evne til å opprettholde celleintegritet, ble analysert ved mikroskopering. Grad av dødelighet av mark som følge av ekstraksjonsmetodene ble også vurdert. En oppsummering av resultatene er vist i Tabell 2. Underveis i prosjektet ble det ved ekstraksjon av immunceller observert stor grad av celleaggregering. Det ble derfor testet ut forskjellige bufferløsninger tilsatt ulike antikoagulerende stoffer. En oversikt over de ulike ekstraksjonsbufferne som ble testet, med graderte egenskaper med hensyn til grad av antikoagulering og lysering, er oppsummert i Tabell 3.

Tabell 2. Ekstraksjonsmetoder. Tabellen viser en oppsummering over graderte egenskaper knyttet til parametrene celleutbytte, dødelighet og celleintegritet for ulike ekstraksjonsmetoder.

<i>Ekstraksjonsmetode</i>	<i>Celleutbytte</i>	<i>Dødelighet av mark</i>	<i>Påvirkning av celleintegritet</i>
Ultralydeksstraksjon	Lavt	Lav	Liten
Etanoleksstruderer	Middels	Høy	Høy
Elektrostimulering	Høy	Lav	Liten

Tabell 3. Ekstraksjonsbuffer. Tabellen viser en oppsummering over graderte egenskaper knyttet til grad av antikoagulering og lysering for ulike buffer som ble testet. Tabellen viser også hvilket stoff eller stoffer i bufferne som har antikoagulerende egenskaper.

<i>Ekstraksjonsbuffer</i>	<i>Antikoagulant</i>	<i>Grad av antikoagulering</i>	<i>Grad av lysering</i>
PBS	-	Høy	Middels
Etanoleksstraksjonsløsninger:			
1. 5 % EtOH løst i dH ₂ O	-	Høy	Høy
2. 5 % EtOH løst i dH ₂ O + 2g/l EDTA	EDTA	Høy	Høy
3. 5 % EtOH løst i LBSS + 2g/l EDTA	EDTA	Høy	Høy
4. GGE ekstraksjonsløsning	GGE	Høy	Høy
5. Modifisert ekstraksjonsbuffer	EGTA	Høy	Høy
6. Modifisert antikoaguleringsbuffer	EDTA	Høy	Høy
Accumax buffer	Accumax™	Lav	Middels
LBSS buffer	-	Middels	Lav
Modifisert LBSS buffer	EDTA, FBS	Lav	Lav

3.1.1 Immuncelleeksstraksjon ved ultralydstimulering

Ekstrahering av immunceller ved hjelp av ultralydeksponering ga lavt celleutbytte, sammenliknet med etanoleksstraksjon og elektrostimulering (Tabell 2). Det var dessuten veldig stor variasjon fra mark til mark med hensyn til virkningen av behandlingen. Noen mark skilte ut immunceller ved ultralydeksponering, andre ikke. Det ble registrert liten grad av dødelighet blant markene som følge av ultralydbehandlingen, og metoden så ikke ut til å

påvirke celleintegriteten. Det ble testet ut andre ekstraksjonsmetoder, da denne metoden ga lavt celleutbytte. Mikroskopering av celler ekstrahert i PBS-buffer med EDTA ved ultralydbehandlingen, viste tydelig tegn til celleaggregering. Andre buffere med mulig antikoagulerende effekt ble derfor testet ut ved bruk av annen ekstraksjonsmetode.

3.1.2 Immuncelleekstraksjon ved etanolbehandling

Alle de tre etanolholdige ekstraksjonsløsningene som ble testet, dvs. 5 % EtOH i dH₂O, 5 % EtOH i dH₂O + 2 g/l EDTA og 5 % EtOH i LBSS + 2 g/l EDTA, ga høyt celleutbytte av immunceller. Mikroskopering av celleprøvene viste tydelig tegn til celleaggregering. LBSS med EDTA og EtOH viste minst grad av aggregering. Det ble også testet ut tre andre etanolholdige ekstraksjonsløsninger tilsatt antikoagulerende stoffer: GGE ekstraksjonsbuffer, GGE buffer med EGTA, og modifisert antikoaguleringsbuffer.

Immunceller ekstrahert i GGE ekstraksjonsbuffer (5 % etanol, 2,5 mg/ml EDTA, 10 mg/ml GGE (Guaicol Glycerol Ether), pH 7,3 (Hendawi, et al., 2004)), og løst i LBSS uten CaCl₂, men med EDTA, viste tegn til lysing og celleaggregering ved mikroskopering. Immunceller som ble ekstrahert i GGE ekstraksjonsbuffer og løst i GGE buffer eller LBSS-buffer etter sentrifugering, viste høy grad av aggregering. Celleprøver løst i LBSS istedenfor GGE viste minst aggregering. På bakgrunn av disse resultatene ble GGE buffer ansett som lite optimal for ekstraksjon av immuncelleløsningen.

Immunceller ekstrahert i modifisert GGE ekstraksjonsbuffer med EGTA (71,2 mM NaCl, 5 % Etanol, 50,4 mM GGE, 5 mM EGTA, pH7,3) og løst i LBSS buffer viste veldig høy grad av celleaggregering ved mikroskopering. Denne bufferen ble derfor ansett som lite optimal ekstraksjonsbuffer og ble derfor ikke brukt videre i prosjektet.

Immunceller ekstrahert i modifisert antikoaguleringsbuffer (0,45 M NaCl, 0,1 M glukose, 30 mM Natrium citrat, 26 mM sitron syre, 10 mM EDTA, 5 % EtOH, pH 4,6) og løst i antikoaguleringsbuffer uten EtOH viste ved mikroskopering høy grad av celleaggregering. Bufferen ble derfor ansett som uegnet og ble ikke brukt videre i prosjektet.

Effekten av å løse celleprøven i 12 ml iskald LBSS buffer med 6,7 mM EDTA og 10 mM EDTA, sett i forhold til resuspensjon i LBSS uten EDTA, ble testet. Analysering i mikroskop viste tydelig tendens til mindre aggregering når celler ble løst i LBSS løsning tilsatt EDTA. Celleprøver løst i LBSS med 10 mM EDTA viste svakere tendens til

celleaggregering enn celler løst i LBSS med 6,7 mM EDTA. Resultatene viste dermed at EDTA fungerer som en god antikoagulant i kombinasjon med LBSS.

Resultatene viste at ekstraksjonsløsningene burde optimaliseres ytterligere, men siden ekstraksjon av immunceller i etanoløsning medførte høy dødelighet av meitemark allerede en dag etter ekstraksjon, ble det forsøkt å finne en annen og mer optimal ekstraksjonsmetode. Bruk av etanolholdig ekstraksjonsbuffer så også ut til å medføre noe cellelysering.

3.1.3 Immuncelleekstraksjon ved elektrostimulering

På grunn av lavt celleutbytte ved ultralyd ekstraksjon og høy dødelighet av mark ved etanolekstraksjon, ble elektrostimulering testet ut som alternativ ekstraksjonsmetode. Av metoder og løsninger som ble testet, var dette den ekstraksjonsmetoden som ga høyest celleutbytte og levedyktighet av mark etter behandlingen. Det ble registrert noe variasjon mellom mark når det gjaldt antall eksponeringer som måtte til for å få mark til å vrikle og slippe immunceller. Markene virket fullt vitale etter behandlingen, men ved gjentatt behandling 4 påfølgende dager, ble det registrert noe dødelighet.

På bakgrunn av observasjoner underveis som viste at LBSS i kombinasjon med EDTA ga best resultat med hensyn til parametre som aggregering og cellelysering, ble denne løsningen videre optimalisert. Tilsats av serum (Foetal Bovine Serum (FBS), F7524, Sigma) viste gode resultater med hensyn til forhindring av lysering, og så også ut til å ha en positiv effekt på celler i forhold til aggregering. Immunceller løst i samme løsning uten FBS, så ut til å inneholde noe mer celleaggregater. Bruk av LBSS buffer tilsatt 10 mM EDTA og 2 % FBS, kalt modifisert LBSS buffer, inngikk etter hvert som standard buffer i prosjektets videre forsøk etter endt bufferoptimalisering. Den modifiserte LBSS bufferen ble sterilfiltrert fordi krystallisering medførte problemer både i forhold til flowcytometri og mikroskopering.

Det ble også forsøkt å tilsette Accumax™ for å forhindre celleaggregering. Ufikserte celler behandlet med Accumax™ var intakte og viste veldig lav grad av aggregering. Samme prøve fiksert etter Accumax™ behandling viste derimot stor grad av celleaggregering og noe tegn til lysering. Fikserte celler behandla med Accumax™ etter fiksering viste også åpenbart tegn til celleaggregering. Resultatene viser at Accumax™ er en fin antikoaguleringsdetergent for ufikserte celler, men den har liten virkning ved fiksering av celler.

Sammenliknet med de andre bufferne tilsatt antikoagulerende stoffer, var modifisert LBSS buffer den bufferen som helt klart forhindret aggregering i størst grad. Siden elektrostimuleringsmetoden var den metoden som viste seg å være mest effektiv, ble denne metoden, kombinert med bruk av modifisert LBSS buffer som ekstraksjonsbuffer, benyttet videre i prosjektet.

3.1.3.1 Celleutbytte ved elektrostimulering

Som tidligere beskrevet ble det registrert stor variasjon med hensyn til celleutbytte fra hver mark. I gjennomsnitt ble det ekstrahert ca. 8 millioner celler pr mark ved elektrostimulering i modifisert LBSS buffer. For å få tilstrekkelig med celler til ulike analyser og for å utjevne eventuelle individforskjeller, ble det i prosjektets forsøk benyttet grupper av mark (n=10, dersom ikke annet er spesifisert).

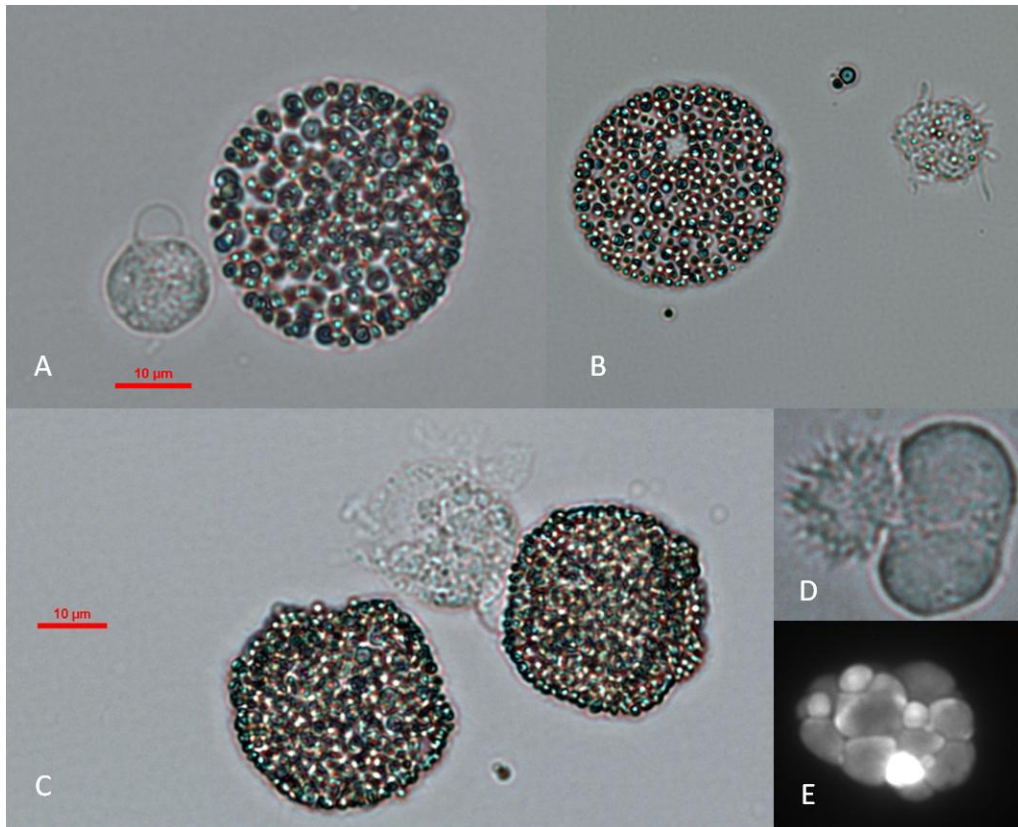
3.2 Karakterisering av immunceller og immuncellerespons

Som tidligere beskrevet har det blitt påvist tre hovedtyper av celler i coelomvæska hos meitemarken *Dendrobaena veneta*: eleocytt, amoebocytter og granulocytter (Adamowicz, 2005; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004), se avsnitt 1.2.1. Karakterisering av immuncellepopulasjoner og studie av immuncellerespons ble i dette prosjektet utført ved bruk av fluorescensmikroskop og flowcytometer.

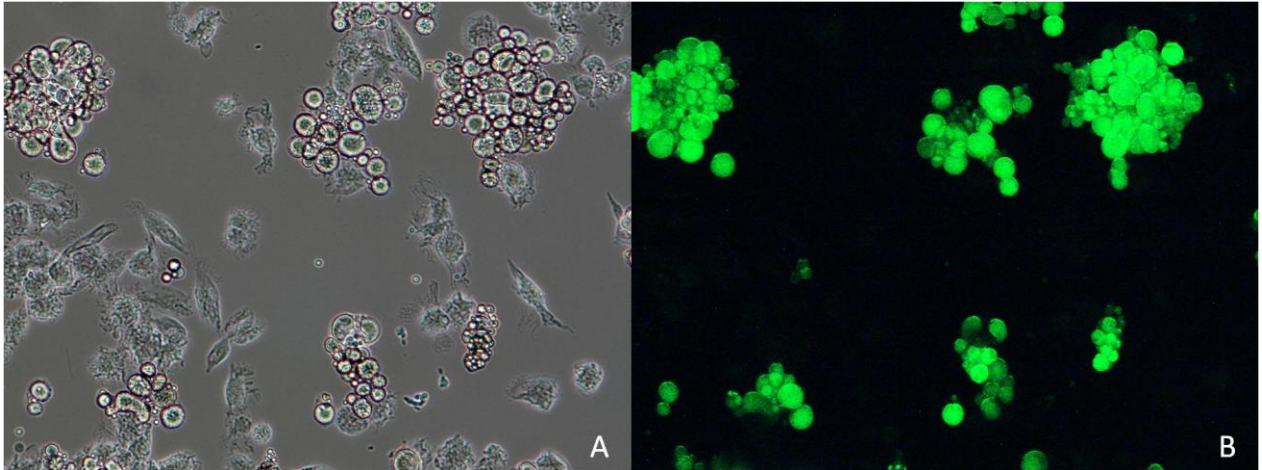
3.2.1 Cellepopulasjoner og autofluorescens

Et utvalg av representative bilder av de ulike celletypene som ble påvist hos meitemarken *D. veneta* er vist i Figur 9. Immuncelleløsning som ble ekstrahert fra markene inneholdt stort sett eleocytt og amoebocytter, men i noe varierende forhold fra gruppe til gruppe av mark, og fra ekstraksjon til ekstraksjon (se 3.2.2). Eleocytt ble identifisert på bakgrunn av sin karakteristiske granulære form og autofluorescens, som er vist i Figur 10. Fluorescensegenskapen ble kun registrert hos eleocytt. Bilde A og C i Figur 9 viser at eleocytt og amoebocytter har en størrelse på henholdsvis ~40-45 µm og ~10-15 µm. Det ble identifisert amoebocytter med ulike typer pseudopodier, som i tidligere studier utført av Adamowicz (Adamowicz, 2005) har blitt klassifisert som type I og type II (se avsnitt 1.2.1). Amoebocytter med lange filpodier (type II), slik som de som er avbildet til høyre i Figur 9B, var lettest og klassifisere. Den andre typen amoebocytter (type I) som har blitt beskrevet å ha kortere pseudopodier, lobopodier, fordelt jevnt rundt cellen, var derimot vanskelig å skille

fra type II amoebocytterne. På bakgrunn av problemet med å skille disse to undergruppene fra hverandre, har det i denne oppgaven blitt valgt å se på hovedgruppen av amoebocytter (type I og type II) samlet i de videre studiene. Den fagocytterende egenskapen til amoebocytterne ble også observert ved mikroskopering. Ved skjeldne tilfeller ble det observert en oval celletype som i studien ble klassifisert som granulocyt (celle vist til høyre i Figur 9 D). Disse cellene var for det meste litt større enn amoebocytterne, slik bildet også viser. Anslått gjennomsnittlig størrelse er $\sim 20 \mu\text{m}$.

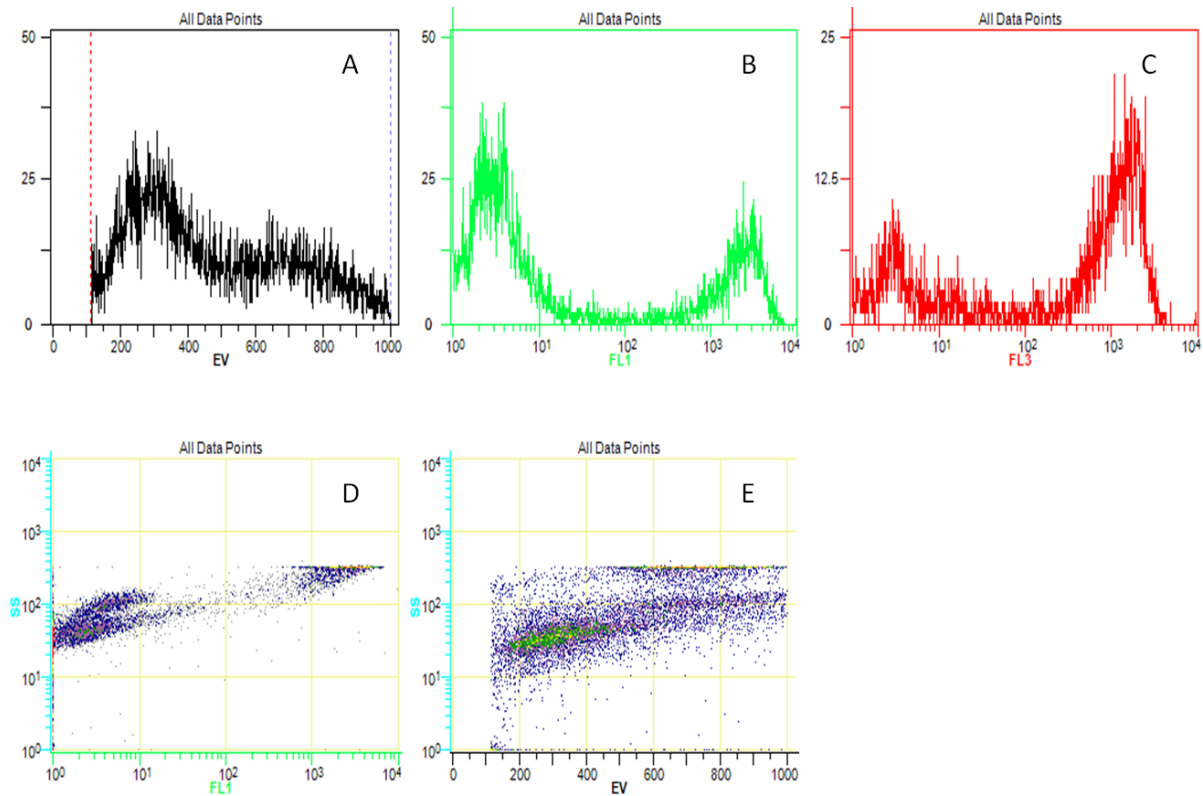


Figur 9. Ulike celletyper detektert ved mikroskopering. Figuren viser coelomocytter identifisert i coelomvæska hos *Dendrobaena veneta*. (A) til høyre vises en eleocyt, og til venstre en amoebocyt. (B) Bildet viser de samme cellene som i vist i figur A, men kjernen i eleocytten og de karakteristiske filopodiene til amoebocytten er mer fremtredende. (C) Bildet viser en typisk aggregering mellom eleocyt og amoebocyt. (D) Dette bildet illustrerer en aggregering mellom en amoebocyt og en granulocyt, som for øvrig sjelden ble observert i coelomvæska. (E) Bilde viser en fluoriserende eleocyt med PI-farget cellekjerne. (Målestreken $10 \mu\text{m}$).



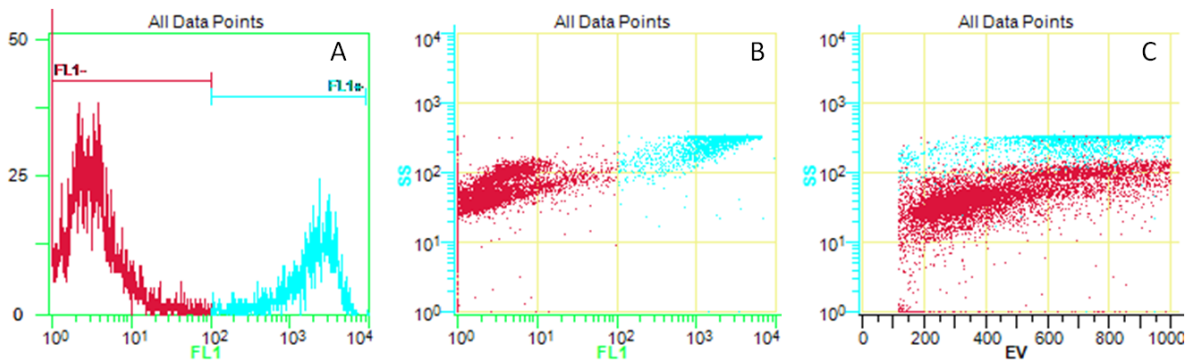
Figur 10. Autofluorescens. (A) viser et bilde av immuncelleløsning som inneholder en blanding av coelomocytter, deriblant store eleocytter og små amoebocytter som har koagulert med hverandre og/eller til eleocytter. Bildet er tatt med gjennomlys. (B). Bildet viser det samme bilde som (A), men dette bildet er tatt med fluorescensbelysning. Bildet viser at det kun er eleocytter som har autofluorescens. Varierende størrelse på cellene skyldes delvis fragmentering.

Studie av cellepopulasjoner og autofluorescens ble også gjort ved hjelp av flowcytometrianalyser. Figur 11 nedenfor viser utvalgte flowdiagrammer som er representative for flowcytometrisk analyse av en ufarget immuncelleprøve. Populasjonenes fordeling med hensyn til størrelse (elektrisk volum, EV) er vist i Figur 11A, mens fordelingen med hensyn til autofluorescens detektert i FL1 kanalen er vist på Figur 11B. Figur C og D viser punktplot hvor henholdsvis populasjonens fordeling med hensyn til side scatter (SS) mot FL1, og SS mot EV. I punktplottet representerer hvert enkelt punkt informasjon fra en enkelt celle. Punktplottene viser også intensitet (intensitetsplot) ved hjelp av forskjellige farger som indikerer hvor hovedvekten av celler er fordelt.



Figur 11. Fordeling av cellepopulasjoner. Diagrammene viser et representativt resultat fra flowcytometrisk analyse av immuncelleløsning. Prøven er ikke farget med fluorokromer og autofluorescens er heller ikke fjernet. (A) Diagrammet viser populasjonens fordeling med hensyn til elektrisk volum (EV). (B) Cellepopulasjonen viser en karakteristisk deling i to topper som representerer celler med og uten autofluorescens, med topp henholdsvis til høyre og venstre i FL1 vinduet. (C) Diagrammet viser populasjonens fordeling med hensyn til signalstyrke i FL3 kanalen. (D) Punktplot der sidescatter (SS) er plottet mot FL1 viser at det oppstår en populasjonsfordeling. (E) Når EV plottes SS oppstår det også delinger i populasjonen som flyter litt over i hverandre.

Ved å sette på gater i plottene, blir det litt lettere å skille populasjonene fra hverandre. I Figur 12 er det satt opp slike gater for den samme prøven som er vist i Figur 11. I denne figuren er det lettere å se at cellepopulasjonen med autofluorescens i Figur 12A (FL1+), tilsvarer populasjonen med størst grad av granulæritet (SS) i Figur 12B (blå populasjon). Resultatene viser dermed at det er eleocytter med autofluorescens, og med høyest grad av granulæritet og størst elektrisk volum som representerer den blåfargede utvalgte populasjonen.

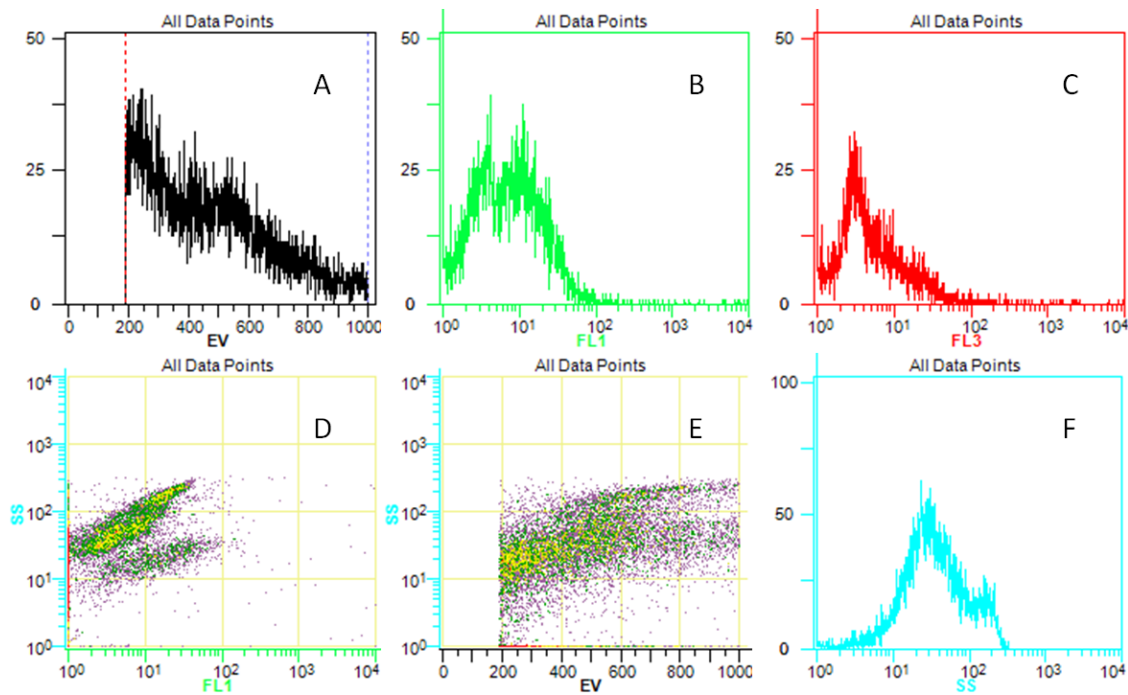


Figur 12. **Gating av cellepopulasjoner.** Diagram A, B og C er de samme som henholdsvis diagram B, D og E i Figur 11. I bildene ovenfor er det satt opp gate for de to toppene i FL1 vinduet (Figur 11A) som i dette tilfellet representerer intensitet av autofluorescens. Populasjonen lengst til høyre regnes som FL1 positiv (blå), dvs. har autofluorescens, mens populasjon til venstre regnes som FL1 negativ (uten autofluorescens, rød). Resultatet av gating viste at 78,4 % av cellene var FL1 positive og 21,6 % av cellene var FL1 negative. Populasjonenes fordeling ut i fra den signalutvalgte FL1 egenskapen er vist med fargene blå og rød på samme måte som i Figur 12A i punktplottene B og C, som viser pupulasjonen fordeling ved henholdsvis side scatter (SS) mot FL1 og elektrisk volum (EV) mot FL1.

3.2.2 Studie av immuncellerespons

For å kartlegge meitemarkens evne til å respondere mot ulike bakterier var det ønskelig å studere celleproliferasjon og å benytte den som et mål på hvor sterk en immunrespons kunne være. Celler ble farget med DNA bindende fluorokromer og analysert ved flowcytometri i hensikt å oppnå cellyklusdiagrammer som kunne benyttes for å anslå andel prolifererende celler. Fluorescensmikroskopering av celler farget med DNA bindende fluorokromer ble utført for deteksjon av prolifererende celler i form av sterkt fargede cellekjerner. Celleproliferasjon ble også forsøkt detektert ved gjentatte tømninger av immunceller fra samme gruppe av mark, et forsøk som likner på tømme-forsøk utført av Homa et. al. (Homa, et al., 2008). Meitemark ble i dette forsøket tømt ved ulike tidspunkter for å muliggjøre studier av immuncelleproduksjon, såkalt celleproliferasjon. En liknende immuncelleproliferasjon antas å skje ved bekjempelse av ukjente og ugunstige mikroorganismer. Meitemarkens immunrespons ble testet mot bakteriene *E. coli*, *S. aureus* og *B. cereus*. Bakteriene ble injisert i meitemarkens coelomrom (se 2.3.1). Påfølgende respons av de to behandlingene; injisering og tømning, ble studert ved å ekstrahere celler fra mark som hadde fått denne behandlingen. Cellene ble farget med ulike DNA bindende fluorokromer for å detektere eventuell celleproliferasjon (se 1.4 for teori rundt

celleproliferasjon). Autofluorescensen måtte imidlertid fjernes før farging. Autofluorescenssignaler har delvis overlappende emisjon med fluorokrommene og ville dermed overskygget signaler fra fargestoffene i FL3 kanalen. Eleocyttenes autofluorescens ble derfor fjernet ved hjelp av detergenten Nonidet P40. Denne detergenten ble også brukt til fjerning av autofluorescens i celleproliferasjonsstudiet utført av Homa et al. (Homa, et al., 2008). Effekten av denne behandlingen på populasjonens fordeling i flowdiagrammene ved flowcytometrianalyse er vist i Figur 13 nedenfor.



Figur 13. Fjerning av autofluorescens. Figuren viser de samme flowdiagrammene som vist i Figur 11, men representerer et annet forsøk der cellene har blitt behandlet med 0,5 % Nonidet P40 for fjerning av autofluorescens. Den FL1 positive toppen i Figur 10B er derfor ikke tilstede her i Figur 13B. Styrken på signaler tatt opp i FL3 kanalen har også avtatt, og toppen ligger derfor lengre mot venstre. Resultatene viser også at fjerning av eleocyttpopulasjonens autofluorescens, endrer celleoverflatens granulæritet, som igjen påvirker populasjonens plassering i flowbildene ved trigging mot sidescatter (figur A, D, E og F).

Ved fjerning av autofluorescens med Nonidet P40 ble det ved mikroskopering observert forandring i cellestruktur. Denne observasjonen stemte også med endring av flowdiagrammet for ufarga celler behandlet med Nonidet P40 ved studie av sidescatter og EV. Populasjonen med lavt signal i FL1 og med lavt signal på SS (Figur 13D) virker å øke i antall når autofluorescens fjernes med Nonidet P40. Dette viser at overflatestrukturen endres hos cellene som mister autofluorescensegenskapen. Eleocytter er store granulære celler og resultatene tyder på at det er cellestrukturen til disse cellene som påvirkes mest av Nonidet

behandlingen. Bruk av Nonidet P40 fungerte både på PFA-fikserte og ufikserte celler. Etter Nonidet behandlingen var det ikke lenger to synlige populasjoner i FL3 (Figur 13C). Toppen med høyest intensitet (positivt signal) var borte, og dette var hensikten siden denne populasjonen ville kunne overlapse med signaler fra fluorokromfargede celler. Autofluorescens i FL3 ville gitt et falskt høyt signal for eksempel ved DRAQ5 farging, hvor man vil forvente en celledopp der autofluorescenstoppen kom opp. Toppen ville representert en ufalsk positiv populasjon.

3.2.3 Cellefiksering

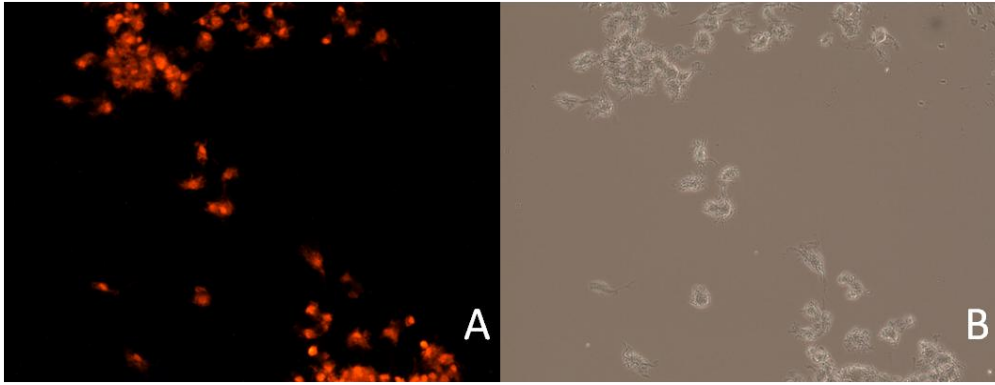
Noen av de DNA bindende fluorokrommene som har blitt brukt i celleproliferasjonsstudiene krever fiksering av cellen for effektiv farging av cellekjernen. Dette ble utført etter produsentenes anbefalinger. Celler ble først forsøkt fiksert med 50 % metanol. Dette viste seg imidlertid å være en lite optimal fikseringsmetode for immuncellene da det medførte mye aggregering og lysing. Fiksering med 4 % PFA viste mye mindre tegn til celleaggregering, og ble på bakgrunn av denne observasjonen benyttet som standard fikseringsmetode. Det ble også registrert at fiksering medførte mindre lysing av celler ved oppbevaring over tid, sammenliknet med oppbevaring av ufikserte celler.

3.2.4 Cellefarging

En gjennomgang av resultatene ved bruk av de ulike fluorokrommene er gitt nedenfor. Fluorescensbilder er ikke vist for alle fargestoffene/fargeprosedyrene som ble testet ut, da noen av fargestoffene ble utelukket allerede på bakgrunn av flowcytometrianalysene på grunn av teoretisk uoptimale cellesyklusdiagrammer (se avsnitt 1.4 for beskrivelse av hvordan cellesyklusdiagrammer teoretisk skal se ut).

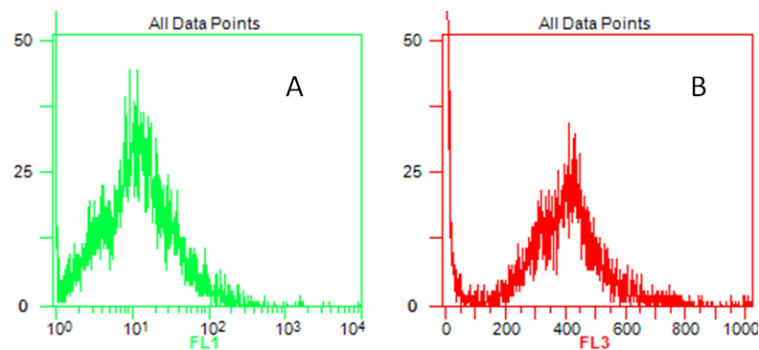
3.2.4.1 PI farging

Celler som skulle farges med PI fluorokrom ble fiksert på forhånd. PI farger både DNA og RNA. Prøvene ble derfor RNase behandlet. Figur 14 viser at PI farge trenger inn i alle celler. Det var imidlertid vanskelig å visuelt skille mellom prolifererende og ikke prolifererende celler ved mikroskopering med hensyn til fluorescensintensitet. Dette gjaldt celleprøver som både ble ekstrahert fra kontrollmark og fra mark man antok ville ha celler i proliferasjon som følge av behandling de var blitt utsatt for (tømming og injisering).



Figur 14. Fluorescensbilder av celler farget med PI. (A) Fluorescensbilde tatt av immuncelleløsning fra mark deltatt i tømmeforsøk (uten injisering) farget med 3 μ M PI i 15 min. TRITC filter som detekterer rød emisjon ble benyttet. (B) Samme cellepreparat som i bilde A detektert med gjennomlys.

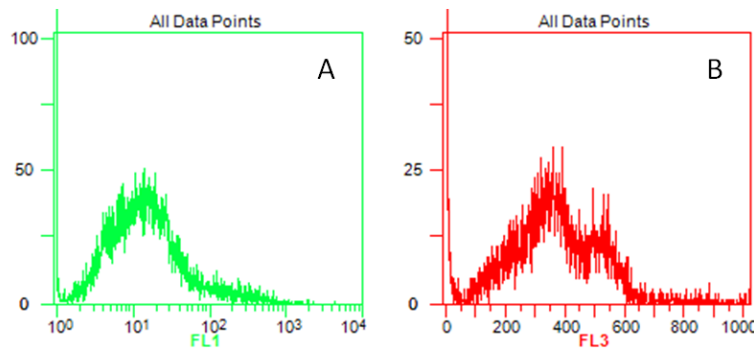
Resultatene fra flowcytometrianalysene (representert ved Figur 15) antydte dårlig farging. Optimalt sett skulle flowdiagrammet for PI fluorescens (FL3) vist en deling av celler i ulike cellesyklus, noe våre resultater ikke viste (se Figur 15). Det ble på bakgrunn av disse resultatene besluttet å gjøre titrering for å finne mest optimal konsentrasjon for tilsats av PI. Bruk av ulike konsentrasjoner av PI ga ikke noe bedre eller annet resultat. Resultatene viste heller ingen forskjell mellom kontrollmark og mark som deltok i proliferasjonsforsøk (injisert og/eller tømt gjentatte ganger). Bruk av annet fargestoff ble derfor testet ut.



Figur 15. Flowanalyse av celler farget med propidium iodide (PI). Diagrammene viser representative flowdiagrammer ved analyse av immuncelleløsning ekstrahert fra mark injisert med *E. coli*. Cellene ble fiksert med 4 % PFA og videre behandlet med Nonidet P40 og RNase, før PI farging i 15min ved romtemperatur. Diagrammene viser kun en topp i både FL2 (diagram A) og FL3 diagrammet (diagram B) som representerer henholdsvis grad av autofluorescens og grad av PI farging. Bilde viser derfor ikke et cellesyklusbilde med prolifererende celler i G2 fase slik Figur 4 viser.

3.2.4.2 PI farging med modifisert Vindeløvs prosedyre

En modifisert versjon av Vindeløvs prosedyre ble testet for å detektere prolifererende celler. Resultater fra flowcytometrisk analyse av celler farget ved hjelp av modifisert Vindeløvs prosedyre beskrevet under avsnitt 2.4.2.3, er vist nedenfor i Figur 16.

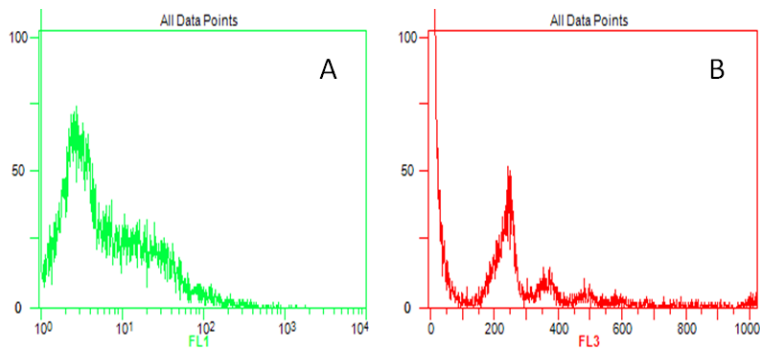


Figur 16. Flowcytometrisk analyse av celler farget med modifisert Vindeløvs prosedyre. Immunceller ble ekstrahert fra kontrollmark (tømt kun en gang, uninjisert), og farget ved hjelp av modifisert Vindeløvs prosedyre. (A) Diagrammet viser kun en topp i FL1 diagrammet, noe som viser at fjerning av autofluorescens var vellykket. (B) diagrammet viser to toppe i FL3 vinduet hvor proliferasjon av celler skulle detekteres ved PI farging.

Figur 16 ovenfor viser kun en topp i FL1 diagrammet, noe som indikerer at fjerningen av autofluorescens var vellykket. Diagrammet som viser PI farging (FL3 signal) i Figur 16 (diagram B) viser to toppe. Disse er imidlertid alt for breie i forhold til slik et cellesyklusdiagram skal se ut (se avsnitt 1.4). Forsøket ble også testet ut på celler fra injisert mark, men det ble ikke observert noen endringer i populasjonsbilde. Grunnet resultater som var vanskelig å tolke, ble farging ved hjelp av opprinnelig Vindeløv prosedyre testet ut.

3.2.4.3 PI farging med Vindeløvs prosedyre

Flowresultater fra analyse av celler farget ved hjelp av Vindeløvs prosedyre beskrevet under avsnitt 2.4.2.4, er vist i Figur 17. Ved bruk av Vindeløvs prosedyre fikk vi mye smalere toppe i FL3 vinduet som representerer intensitet av PI farging, sammenliknet med resultatene fra farging med modifisert Vindeløvs prosedyre som er vist i Figur 16. I FL3 vinduet (diagram B) i Figur 17 ser man klart at det er 3 toppe, noe det egentlig ikke skulle vært. I følge teorien skal et cellesyklus diagram inneholde kun to toppe. I tillegg skal avstanden mellom toppene optimalt sett være større.

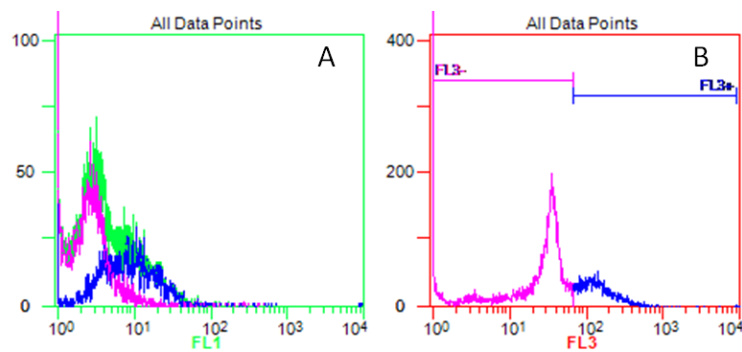


Figur 17. Flowanalyse av celler farget med Vindeløvs prosedyre. Cellene er ekstrahert fra kontrollmark (tømt kun en gang, uinjisert) og farget ved hjelp av Vindeløvs prosedyre. (A) Diagrammet viser kun en topp i FL1 diagrammet, noe som viser at fjerning av autofluorescens var vellykket. (B) diagrammet viser 3-4 topper i FL3 vinduet hvor proliferasjon av celler skulle detekteres.

Det ble ikke observert noen forskjeller i populasjonsbilde mellom celler fra kontrollmark og celleløsning fra mark man antok ville inneholde prolifererende celler. Andre fargestoffer ble derfor testet ut i håp om å oppnå et bedre cellesyklusbilde.

3.2.4.4 DRAQ5 farging

Fikserte celler så ut til å ta opp DRAQ5 lettere enn ikke fikserte celler ved flowcytometrisk analyse av farget celleløsning. Proliferasjon av celler kunne ikke detekteres ved flowcytometrisk analyse, til tross for at det ofte ble observert to topper i FL3 diagrammet (Figur 18).

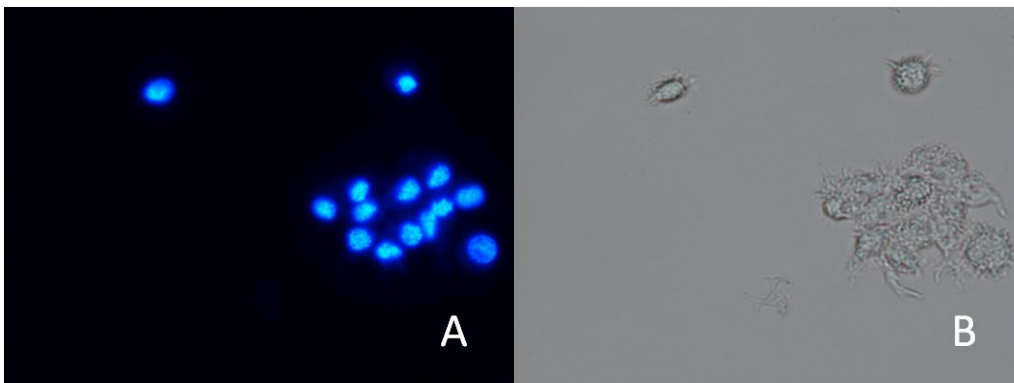


Figur 18. Flowanalyse av celler farget med DRAQ5. Flowdiagram av immunceller ekstrahert fra kontrollmark (tømt kun en gang, uinjisert). PFA fikserte celler ble behandlet med Nonidet P40 for fjerning av autofluorescens og inkubert 10 min på is. Cellene ble videre inkubert med 0,04 μ M DRAQ5 i 15 min ved romtemperatur før flowcytometrianalyse. FL1 diagrammet (A) Diagrammet viser kun en topp, noe som viser at fjerning av autofluorescens var vellykket. Diagram B viser to topper i FL3 vinduet hvor proliferasjon av celler skulle detekteres med DRAQ5 farging. Gating av FL3 negative og positive celler viste en fordeling på henholdsvis 77,3 % og 22,7 %.

Diagram B i Figur 18 viser antydninger til det karakteristiske bilde av cellyklus (se beskrivelse i avsnitt 1.4). De to toppene ligger i teorien litt for nære hverandre. Grunnen til at dette fargestoffet imidlertid ble utelukket, skyldes store variasjoner i populasjonsbilde. Ofte kunne det ikke registreres mer enn en topp i FL3 diagrammet. Ved gating observerte vi variasjon fra 0 % til 80 % DRAQ5 positive (FL3 positive) celler for kontrollmark. Resultatene tydet mest på at den FL3 positive toppen vi detekterte kun var en artefakt. I tillegg er DRAQ5 ikke optimal med hensyn til fluorokrommets eksitasjonsmaksimum og eksitasjonsbølgelengden til laseren i det benyttede flowcytometeret. Resultatene viste heller ingen forskjell mellom uninjisert og utømte mark (kontrollmark) og mark som deltok i proliferasjonsforsøk (injisert og/eller tømt gjentatte ganger). På bakgrunn av disse metodiske problemene ble det testet ut andre fargeløsninger.

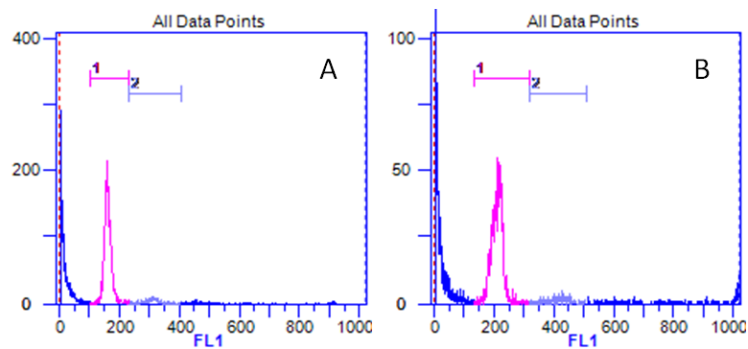
3.2.4.5 NIM DAPI reagens og DAPI-farging

For videre optimalisering av celleproliferasjonsstudier ble det valgt å bruke UV- lys som eksitasjonskilde i flowcytometrianalyser i kombinasjon med NIM DAPI reagens, eller DAPI fluorokrom alene. Celler farget med DAPI ble studert i fluorescensmikroskop og et representativt bilde er vist i Figur 19.



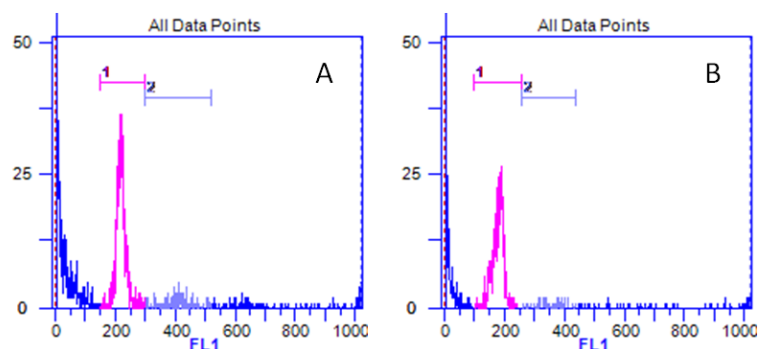
Figur 19. **Fluorescensbilde av celler farget med DAPI.** (A) Fluorescensbilde av immunceller fra kontrollmark (ubehandlet) farget med 3 μ M DAPI løsning i 15 min. (B) Samme cellepreparat som i bilde A detektert med gjennomlys.

Ved fluorescensmikroskopering kunne dapifarging detekteres i cellekjernen (Figur 19). Dette viser at DAPI har egenskapen til å trenge gjennom cellemembranen. Det var imidlertid vanskelig å detektere prolifererende celler med hensyn til fluorescens intensitet i mikroskopet. Celleløsninger behandlet med NIM DAPI og DAPI ble også analysert på flowcytometeret og utvalgte diagrammer som viser resultatene fra dette er vist i henholdsvis Figur 20 og Figur 21.



Figur 20. Flowdiagrammer ved analyse av celleløsning tilsatt NIM DAPI reagens. (A) Diagrammet representerer celler fra kontrollmark tilsatt NIM DAPI der gate1 (celler i G0 og G1 fase) og gate 2 (celler i G2 fase) inneholder henholdsvis 54,5 % og 7,3 % av cellene. (B) Grad av NIM DAPI fargede celler fra andre gang med tømning, der gate1 (celler i G0 og G1 fase) og gate 2 (celler i G2 fase) inneholder henholdsvis 49,4 % og 4,8 % av cellene. Diagrammene viser at andel celler i proliferasjonsfase (G2 fase) synker fra 7,3 % til 4,8 %.

Bruk av NIM DAPI reagens i kombinasjon med UV- bestråling i flowcytometeret ga gode resultater. For første gang viste flowdiagrammene klare definerte topper med en teoretisk mer riktig avstand mellom hver topp, dvs. en fordobling i signalstyrke. Problemet var at toppen som ble regnet som prolifererende celler eller celler i G2-fase inneholdt svært lite celler. Det ble ikke detektert forskjell mellom proliferasjonsdiagrammene ved analyse av celleløsning fra kontrollmark og celleløsning ekstrahert fra mark vi antok ville inneholde prolifererende celler. Diagrammene vist i Figur 20 viser faktisk en nedgang i andel prolifererende celler ved andre gangs tømning. Dette stemmer ikke med hva som teoretisk skulle forventes ved reproduksjon av celler etter tømning.

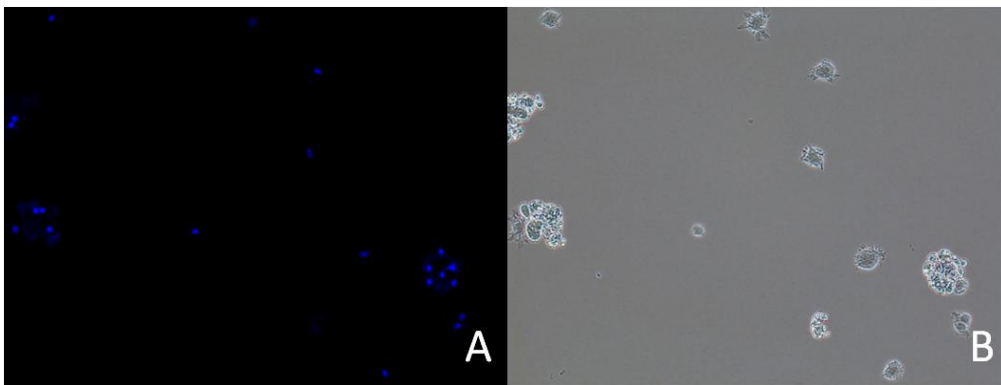


Figur 21. Flowdiagram av celler farget med DAPI reagens. (A) Diagrammet representerer celler fra kontrollmark farget med DAPI der gate1 (celler i G0 og G1 fase) og gate 2 (celler i G2 fase) inneholder henholdsvis 48,8 % og 6,7 % celler. (B) Grad av DAPI farga celler fra andre gang med tømning, der gate1 (celler i G0 og G1 fase) og gate 2 (celler i G2 fase) inneholder henholdsvis 62,9 % og 4,2 % celler.

Farging av celler med kun DAPI fargestoff ga svært like resultater sammenliknet med resultatene som ble oppnådd ved bruk av NIM DAPI reagens. Bruk av DAPI som fargestoff ga klare definerte topper, men det var vanskelig å detektere proliferasjon i immuncelleløsning eller forskjeller i proliferasjonsaktivitet mellom celleløsning ekstrahert fra kontrollmark og celleløsning ekstrahert fra det vi antok ville være mark med prolifererende immunceller. Bruk av fluorekromen Hoechst (HOE) i kombinasjon med UV-eksitasjon ved flowcytometrisk analyse ble derfor testet ut.

3.2.4.6 Hoechst (HOE) farging

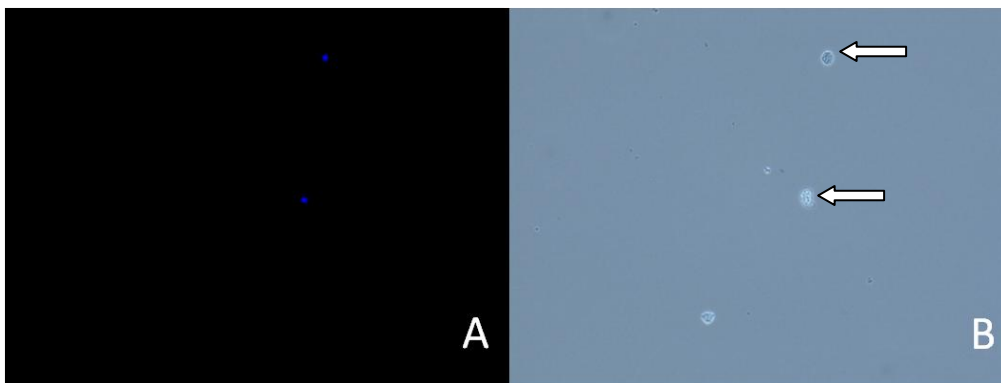
HOE ble testet ut som en alternativ metode fluorescensfarging av cellenes DNA ved bruk av UV bestråling som eksitatsjonskilde. En annen fordel med dette fargestoffet er at det kan brukes på ufikserte celler. Celler farget med HOE ble studert i fluorescensmikroskop og bilder av et representativt preparat er vist nedenfor i Figur 22.



*Figur 22. **Fluorescensbilde av celler farget med HOE.** A) Fluorescensbilde av immunceller fra utømte og uinjiserte mark (kontrollmark) farget med 3 μ M HOE løsning i 15 min. (B) Samme cellepreparat som i bilde A detektert med gjennomlys.*

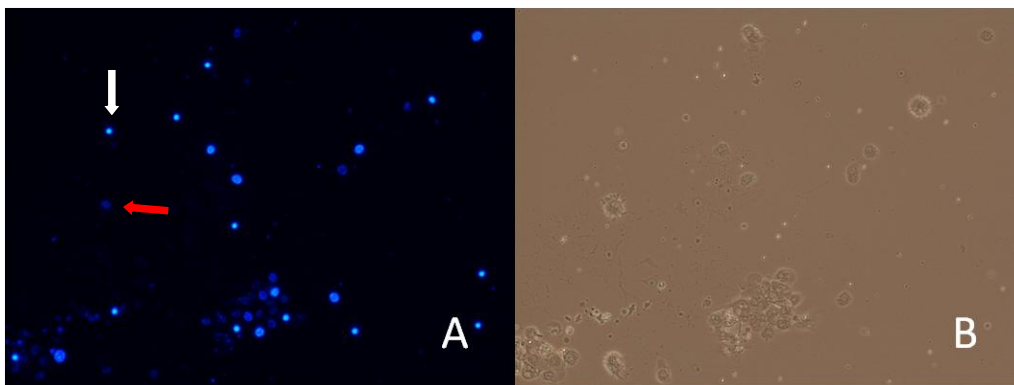
Analyse av HOE fargede immunceller fra meitemark (Figur 22) viser at fargestoffet ble tatt opp av cellene og farget cellekjernen. I likhet med DAPI farging, var det vanskelig å detektere prolifererende celler. PMT verdier på fluorescensmikroskopet ble justert ned slik at ufarga celler ikke syntes. Når preparatet med farga celler ble lagt på kunne man se cellekjerner som lyste opp. Disse cellene ble antatt å være i proliferasjon. Det ble imidlertid i større grad observert prolifererende celler ved bruk av HOE enn DAPI, og et resultat som viser at det ble detektert prolifererende celler er vist i Figur 23. Grovt anslått ble det observert 20 % prolifererende celler ved mikroskopering av celleløsninger uavhengig om disse var fra kontrollmark eller mark vi antok ville inneholde prolifererende celler. Det vil si at det ikke

ble detektert forskjell i immuncelleproliferasjon mellom kontrollmark, mark tømt for coelomvæske med immunceller, eller mark som ble injisert med bakterieløsning.



Figur 23. Studie av celleproliferasjon med HOE farging. (A) fluorescensbilde av immunceller farget med $3\mu\text{M}$ HOE der immunceller i proliferasjon er vist som bllysende kjerner. (B) samme celler som (A) detektert ved gjennomlys. Bildet viser at det er flere celler som ikke er i proliferasjon. Piler angir celler i proliferasjonsfase (G2 fase).

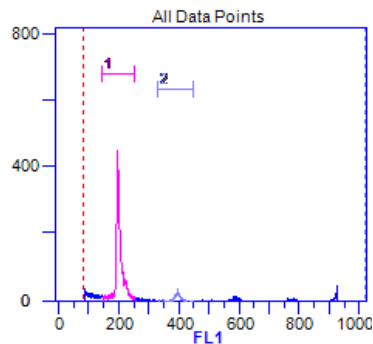
Det var også til dels vanskelig  sette en grense for hva som skulle regnes som prolifererende celler og ikke, på grunn av av varierende signalstyrke. Problemet er forsøkt illustrert i Figur 24 nedenfor.



Figur 24. Varierende signalstyrke ved HOE farging. (A) Bildet viser at det er forskjell i signalstyrke fra cellene, noe som medførte problemer med hensyn til bestemmelse av hva som skulle regnes som prolifererende og ikke prolifererende celler. Hvit pil indikerer celle med høy signalstyrke, mens rød pil henviser til celle med lav signalstyrke. (B) Bilde viser samme celler som i A, men detektert ved gjennomlys. Ved sammenlikning av bilde A og B ser man at en del av cellene ikke lyser i det hele tatt, og disse ble registrert som ikke prolifererende celler. Bildet viser også at forskjellige celletyper blir farget, og at fargestoffet derfor ikke er cellespesifikt.

Fluorescensmikroskopering viste ingen forskjell i andel prolifererende celler mellom frstegangstmte mark og mark som tidligere hadde blitt tømt for immunceller. Celler farget

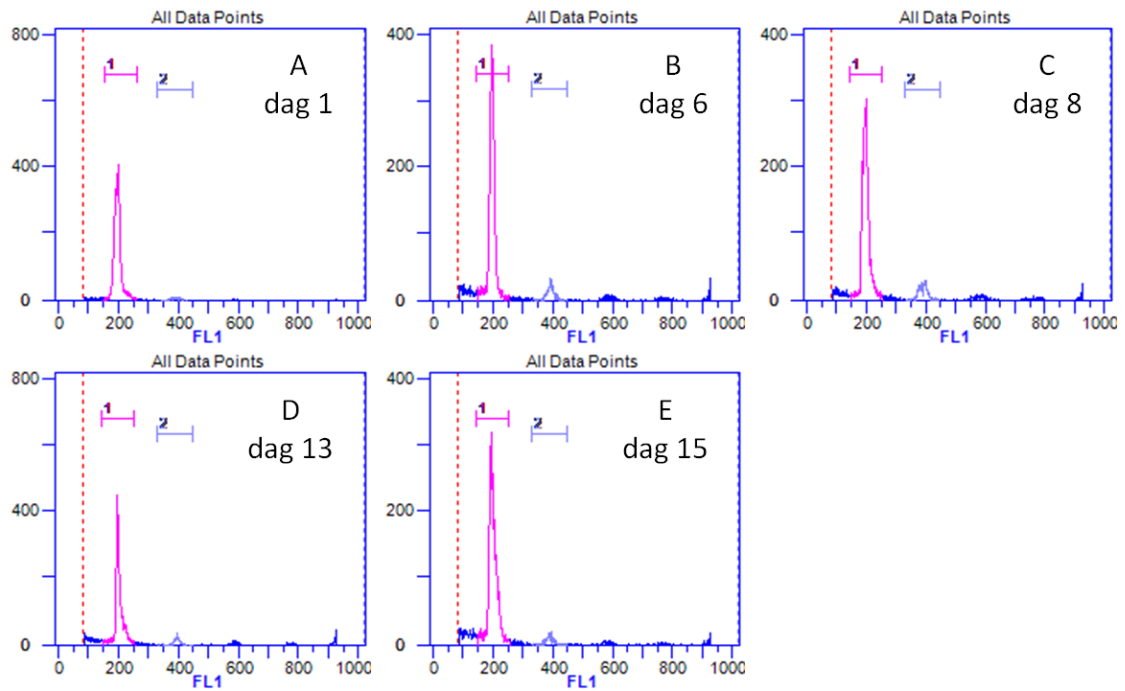
med HOE ble også analysert ved flowcytometri. Flowdiagram fra analyse av celler ekstrahert fra ubehandla (kontroll) mark farget med HOE er vist i Figur 25.



Figur 25. Flowdiagram av immunceller fra kontrollmark farget med HOE. Diagrammet viser et representativt resultat fra analyse av immunceller ekstrahert fra ubehandlet mark (kontrollmark). Gating av de ulike toppene viste at andel celler i det som antas å utgjøre G0 og G1 fase (gate1) tilsvarte 74,0 %, mens andel celler i G2 fase (gate 2) utgjorde 5,8 %.

Ved studie av normal celleproliferasjon (Figur 25) ble det detektert 5,8 % prolifererende celler. Tømming av coelomvæske med immunceller og injisering av bakteriene *E. coli*, *S. aureus* og *B. cereus* ble utført for å trigge frem en immunrespons med proliferasjon av immunceller. Figur 25 viser utvalgte representative flowdiagrammer fra tømme-forsøk ved studie av celleproliferasjon. Diagrammene viser tydelige spisse topper og avstanden mellom toppene tilsvarer dobbelt intensitet slik cellyklusdiagram i følge teorien skal gjøre (se avsnitt 1.4). Flere topper kan antydes videre mot høyre, noe som kan skyldes aggregering, siden hver topp representerer en fordobling. Dersom disse toppene representerer aggregater, så viser dette at en fordobling i signalstyrke ville kunne detekteres ved bruk av dette fargestoffet i kombinasjon med bruk av UV del i flowcytometeret. Den teoretiske fordoblingen i signal hos prolifererende celler med dobbelt sett DNA skulle derfor etter disse resultatene å dømme, bli detektert.

Representative flowdiagrammer fra tømme-forsøk av immunceller farget med HOE (Figur 26) viser lite variasjon med hensyn til populasjonsfordeling i FL1 (intensitet av HOE farging og grad av proliferasjon) ved de ulike tømme-tidspunktene (dag1, dag 6, dag 8, dag 13 og dag 15).



Figur 26. **Flowanalyse av immunceller fra tømmeforsøk farget med HOE ved studie av celleproliferasjon.** Flowdiagrammene viser (A) celler hentet fra førstegangstømming, **dag 1**, (B) celler hentet fra 2 gangs tømming ekstrahert 6 dager etter første tømming, **dag 6**, (C) celler ekstrahert 8 dager etter første tømming, **dag 8**. (D) celler ekstrahert 13 dager etter første tømming, **dag 13**. (E) celler ekstrahert 15 dager etter første tømming, **dag 15**. Fordelingen av celler i G0/G1 fase (gate 1) og celler i G2 (gate 2) er vist i Tabell 4.

Tabell 4 viser fordeling av andel celler i G1 og G2 fase gating av de ulike toppene.

Tabell 4. **Andel celler i ulike faser ved flowcytometrisk analyse av celler fra tømmeforsøk.** Tabellen viser ved hvilke tidspunkt celler ble ekstrahert og fordelingen av andel celler i det som antas å være G0/G1 fase (gate 1, markert rosa) og G2 fase (gate 2, markert blå) i Figur 26.

Tømmetidspunkt	Andel celler i G0/G1 fase (gate 1, markert rosa i figur 27) i %	Andel celler i G2 fase (gate 2, markert blå i figur 28) i %
Dag 1, første gangs tømming	92,5	2,9
Dag 6, celler ekstrahert 6 dager etter første tømming	75,2	7,5
Dag 8, celler ekstrahert 8 dager etter første tømming	75,4	9,1
Dag 13, celler ekstrahert 13 dager etter første tømming	74,0	5,8
Dag 15, celler ekstrahert 15 dager etter første tømming	77,7	5,0

Flowanalyse av immunceller fra meitemark som har blitt tømt for immunceller i tømingsforsøk (Figur 26) utført ved studie av celleproliferasjon, viste tydelig at det eksisterte to eller flere topper, der den første toppen antas å være celler i G0/G1 fase og den andre toppen celler i G2 fase. Toppene har dobbel avstand med hensyn til styrke, noe som stemmer med den forventede cellesyklusprofilen (se avsnitt 1.4). Cellene i G2 fasen har dobbelt så mye DNA og toppen kommer derfor dobbelt så høyt som cellene i G1 fasen. Noe celleaggregering kan medføre at det kommer topper enda lenger mot høyre med enda høyere intensitet. Dersom topp nummer 2 anses som proliferasjonstopp, viser resultatene at det er høyest grad av proliferasjon 8 dager etter første tømning (Figur 26C). Den observerte proliferasjonen (2 % - 9 %) var i likhet med bruk av NIM DAPI og DAPI, lavere enn hva som var forventet og forskjellene var veldig små. Resultatene antyder derfor at det er et metodisk problem som gjorde at proliferasjonen ikke ble detektert. Flowdiagrammene vist i Figur 26, antyder at HOE kan brukes til cellesyklusstudier. Det ble ikke detektert forskjeller i proliferasjonsaktivitet mellom kontrollmark og antatt prolifererende mark ved injiseringsforsøk.

Tabell 5. DNA bindende fluorokromer brukt til deteksjon av celleproliferasjon. Tabellen viser en oppsummering av egenskaper ved testing av ulike fluorokromer og metoder som ble testet ved analyse av celleproliferasjon.

Fluorokrom	Metode		Egenskaper		
	Flow-cytometer	Fluorescens-mikroskop	Deteksjon av proliferasjon:	Kommentar	Totalt
PI	-	-	nei	- Mye tilgjengelig litteratur rundt bruk av dette fargestoffet - Farger både DNA og RNA	-
DRAQ5	-	Ikke testet	nei	- ugunstig eksitasjonsmaksimum i forhold til det benyttede flowcytometeret.	-
Modifisert Vindeløvs prosedyre	-	Ikke testet	nei		-
Vindeløvs prosedyre	-	Ikke testet	nei		-
NIM DAPI og DAPI	+/-	+/-	nei	- Fine smale topper i flowdiagrammet - UV bestråling som eksitasjonskilde	+/-
HOE	+	+	nei	-Fine flowdiagrammer og mulig det går an å skille ut populasjon av prolifererende celler ved fluorescens-mikroskopering	+

3.3 Studie av antimikrobiell effekt i coelomvæske hos meitemarken *Dendrobaena veneta*

Antimikrobiell effekt i coelomvæske ble studert ved bruk av fire forskjellige metoder; PMA PCR metode, flowcytometer (LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit), sonehemming og utplating. Resultatene fra disse forsøkene er beskrevet nedenfor. Før disse metodene ble testet ut ble ekstrahert coelomvæske analysert for rester av injisert bakterieløsning. Dette ble utført som et kontrollforsøk for å sikre at slike eventuelle rester ikke skulle forstyrre resultatene i studiene av antimikrobiell effekt.

3.3.1 Analyse av bakteriedrap i immuncelleløsning/coelomvæske ved PMA PCR metoden.

Uttak av bakterieløsning inkubert i coelomvæske med immunceller behandlet med PMA ble analysert ved Real time PCR. Resultatene fra denne analyseringen viste lite amplifisering, både for prøver behandlet med PMA og prøver uten PMA behandling. Vi antok at dette ikke skyldtes PMA behandlingen, men DNA rensingen. DNA ble derfor rensert uten sentrifugering og påfølgende fjerning av supernatant (se avsnitt 2.5.1). Resultatene viste mye bedre kurver ved Realtime PCR analyse. Resultatene viser at DNA utbyttet ble bedre når PrepMan[™] Ultra reagens ble tilsatt direkte i prøvene. Forsøket ble optimalisert ved å lage en gradient med kjent andel levende og døde bakterier. Ved gradient tilsvarende 33 % levende bakterier var det mulig å skille mellom prøver behandlet med PMA og ikke. Gradientprøvene som inneholdt 100 % og 66 % levende andel bakterier var imidlertid noe like.

Resultatene viste at for lite bakterier ble tilsatt til å kunne si noe klart om grad av drap, men det var antydninger til drap over tid. Siden vi var litt i tvil om metoden var optimal, eller i stor nok grad tilpasset vårt forsøk, besluttet vi å teste alternative metoder for å påvise eventuell antimikrobiell effekt.

3.3.2 Analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske ved flowcytometri.

Drap av *E. coli* som ble inkubert i cellefri coelomvæske ble analysert i flowcytometer med bruk av LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit (Invitrogen, L13152). Flowdiagrammene i Figur 29 viser et resultat fra en slik studie hvor flowcytometrisk analyse av *E. coli* inkubert i NaCl

(Figur 29 A og B, kontroll) og *E. coli* inkubert i cellefri coelomvæske (Figur 29 C og D) ble analysert.

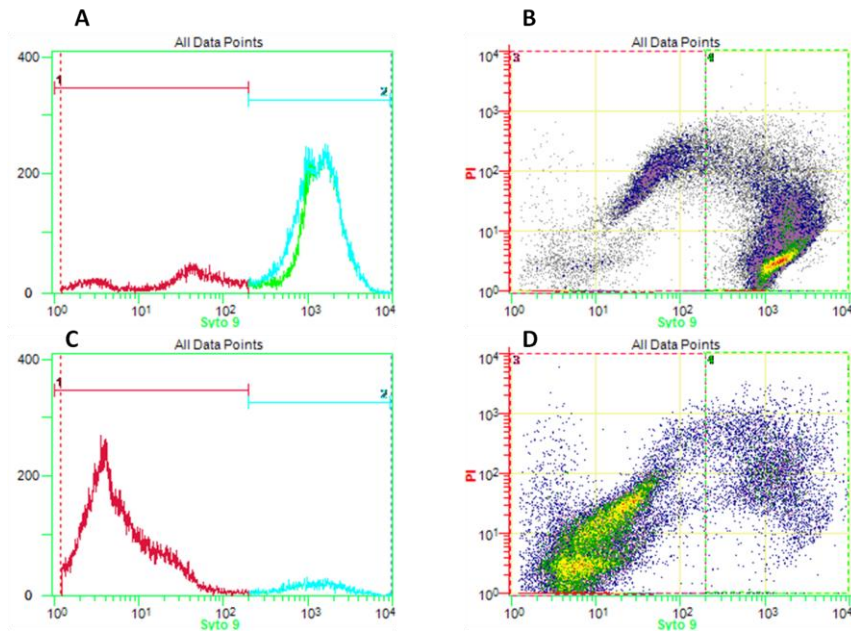
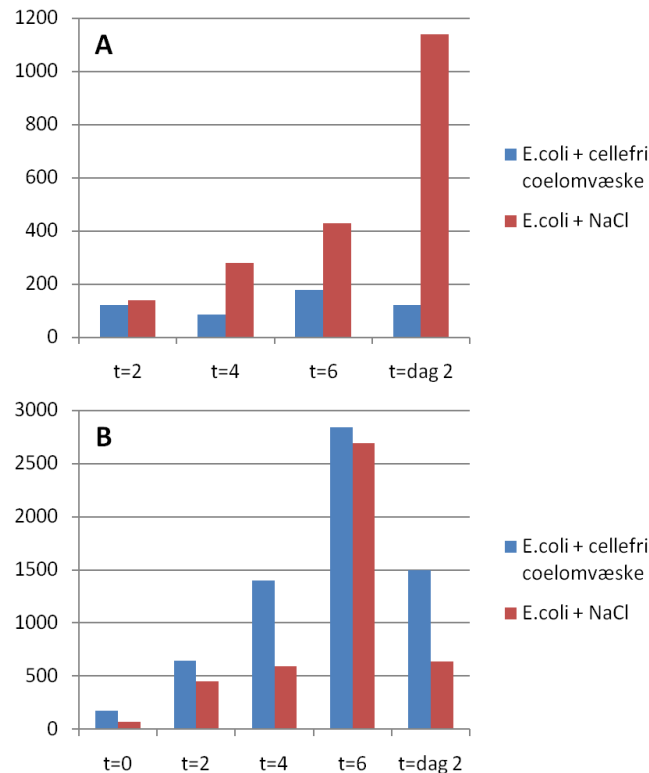


Diagram	Gate 1 (rød), SYTO [®] 9 negativ	Gate2 (blå), SYTO [®] 9 positiv	Gate 3 (rød), SYTO [®] 9 negativ	Gate4 (grønn), SYTO [®] 9 positiv
A og B (kontroll)	21 %	79 %	21 %	68 %
C og D	91 %	9 %	91%	9%

Figur 29. Resultater fra flowcytometrisk analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske. A) Flowhistogram og B) punktdiagram som viser drapeseffekten med hensynt til SYTO[®]9 farging ved å inkubere *E. coli* med NaCl løsning (kontroll) over natt. C) Flowhistogram og D) punktdiagram av bakterieløsning inkubert med cellefri coelomvæske over natt. A og C diagrammene viser grad av SYTO[®]9 farging, mens B og D diagrammene viser grad av SYTO[®]9 farging mot PI farging. Den prosentvise andelen av celler fordelt i de ulike toppene ble analysert ved gating og er vist i tabell under flowdiagrammene. Det ble utført 50000 tellinger ved hver analyse.

Gating av topper i flowdiagrammene vist i tabell i Figur 29, viste at andel SYTO[®]9 fargede celler var høyest for kontroll prøve (bakterier inkubert i NaCl løsning). Siden SYTO[®]9 trenger inn i levende celler, viser resultatene at andel levende celler avtar ved inkubasjon i cellefri coelomløsning. Resultatene indikerer derfor bakteriedrap ved inkubasjon i cellefri coelomvæske over tid, som følge av antimikrobiell effekt i løsningen. Figur 29 viser bare flowcytometrisk analyse av bakterieprøver som har blitt inkubert i cellefri coelomvæske og

NaCl løsning i ca 20 timer. Prøver ble i tillegg tatt ut etter 2 timer, 4 timer og 6 timer og disse ble både analysert på flowcytometeret (resultater ikke vist) og plattet ut på agarskåler. Resultatene fra plattetellingene er presentert grafisk med stolpediagrammer i Figur 30A.



Figur 30. Platetelling av bakterier ved inkubasjon i cellefri coelomvæske. (A) Grafisk fremstilling av antall bakteriekolonier som ble registrert ved utplating av prøver tatt ut etter 2, 4, 6 og ~18 timers (dag 2) inkubasjon av *E. coli* i cellefri coelomvæske eller natriumklorid løsning (kontroll). (B) Repetert forsøk med grafisk fremstilling av antall kolonier som ble telt ved prøver tatt ut etter 0, 2, 4, 6 og ~20 timers (dag 2) inkubasjon av bakterieløsning i cellefri coelom væske eller natriumklorid løsning. Platetellingene ble utført på prøver med 10^5 fortytning.

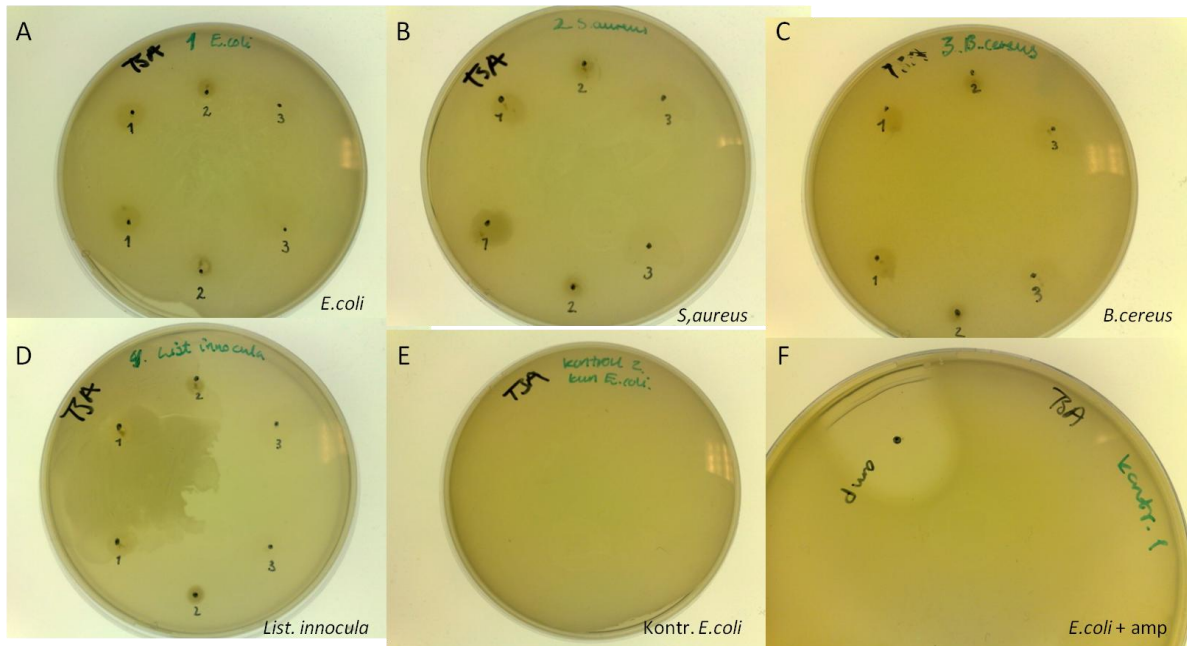
Både flowresultatene (Figur 29) og resultatene fra plattetelling (Figur 30 A) viser at det er større grad av *E. coli* vekst i NaCl løsningen enn i immuncelleløsningen. Forsøket ble repetert, og plattetelling fra dette forsøket er vist grafisk i Figur 30B. Ved sammenlikning av resultatene fra plattetellingen i de to forsøkene vist i Figur 30 med hensyn til grad av bakteriedrap ser man at det i første forsøk (Figur 30 A) er stor forskjell mellom *E. coli* drap i løsningen med cellefri coelomvæske og *E. coli* tilsatt i kontrolløsning. Resultatene fra det repeterte forsøket (Figur 30 B) som er vist, illustrerer imidlertid at forskjellen er mindre og at tendensen til drap i de to inkuberingsløsningene er mer lik, med hensyn plattetelling. Samme tendens ble registrert ved flowcytometrisk analyse (resultater ikke vist). Resultatene viser at

det er variasjon fra forsøk til forsøk, men at det er observert tendenser til drap av bakterier i cellefri coelomvæske. Forsøket mangler en god negativ kontroll. Denne kontrollen ble forsøkt laget ved å behandle bakterieløsning inkubert i immuncelleløsning med 70 % etanol. Behandlingen medførte imidlertid en ugunstig endring i populasjonsbilde som følge av cellefiksering. UV-bestråling viste seg å være bedre egnet for opparbeidelse av negativ kontroll. Tilsats av mer fargestoff så ikke ut til å ha noen virkning, og det antas derfor at konsentrasjonen av fargeløsning ikke var avgjørende når det gjelder den udetekterte antimikrobielle effekten. På grunn av de store variasjonene og lite konsistente resultater, ble andre metoder for deteksjon av antimikrobiell effekt testet ut.

3.3.3 Analyse av antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske ved sonehemnings forsøk

Ved inkubasjon av stoffer med antimikrobiell effekt på agarskåler som har blitt inokulert med bakterier, vil de antimikrobielle stoffene kunne diffundere utover på agarflaten og kan påvirke vekst eller overlevelse av bakterieceller (Lammert, 2007). Vekstinnhibering vil vises som en sone rundt den avsatte antimikrobielle prøven. Diameteren på denne sonen indikerer mottakelighet eller resistens/motstandsdyktighet for den testede bakterien mot det aktuelle antimikrobielle stoffet.

Hensikten med forsøket var å detektere antimikrobiell effekt i cellefri coelomvæske, og å studere eventuelle forskjeller i inhiberingssone mellom cellefri coelomløsning ekstrahert fra injisert og uinjisert mark, samt å detektere eventuelle forskjeller i inhibering av ulike bakterier ved bruk av denne visuelle metoden. Coelomløsning ekstrahert fra mark injisert med *E. coli* eller *S. aureus* og celleløsning fra uinjiserte mark ble oppkonsentrert ved hjelp av frysetørking. Produkt fra frysetørking av cellefri coelomvæske løst i vann ble avsatt på bakterieskåler med *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* og *List. Innocula*. 1g ampicilin ble brukt som positiv kontroll, mens skål uten prikking ble brukt som negativ kontroll. Resultatene fra sonehemningsforsøket vist i Figur 31 viser antydninger til hemmesoner rundt der hvor cellefri coelomvæske ble avsatt. Det var imidlertid vanskelig å måle diameter på hemmesonen på grunn av uønsket vekst i den cellefrie løsningen som ble avsatt. På bakgrunn av resultatene som viste problemer med uønsket vekst i de avsatte løsningene, ble det bestemt at løsningene skulle sterilfiltreres. Sterilfiltrering ga imidlertid ikke noe større eller mer tydelig hemmesone enn i forsøket der coelomløsning som ikke var sterilfiltrert ble benyttet.

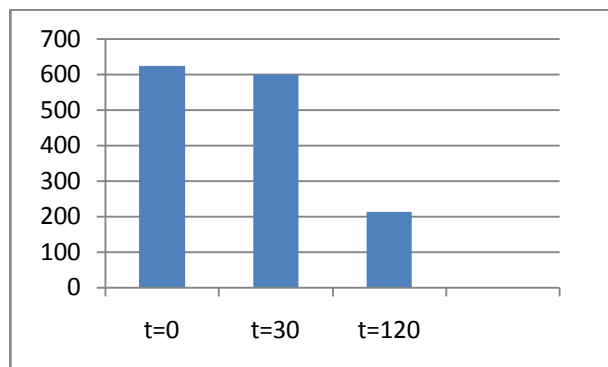


Figur 31. **Prikktest av frysetørket cellefri coelomløsning.** Prikk 1 tilsvarer frysetørket cellefri coelomvæske ekstrahert fra uninjisert mark, prikk 2 tilsvarer samme løsning fra mark injisert med *E. coli* (rør B) og prikk 3 tilsvarer frysetørket produkt fra mark injisert med *S. aureus*. Det ble avsatt parallell for hver prikk. Skål A, B, C og D ovenfor inneholder henholdsvis bakteriene *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* og *List. innocua*. Skål med *E. coli* uten prikking fungerte som negativ kontroll (E), mens *E. coli* skål prikket med 10µl av ampicillin med konsentrasjon på 100µg/ml fungerte som positiv kontroll (F). Resultatene viste svak tendens til hemmesoner, men de var vanskelig å måle på grunn av vekst i selve coelomløsningen.

3.3.4 Studie av invitro vekst ved bakterieinkubasjon i cellefri coelomvæske

Som et siste forsøk på visuelt å vise antimikrobiell effekt i den cellefrie coelomvæska, ble bakterier inkubert i sterilfiltrert frysetørka cellefri coelomløsning. Prøver fra denne inkubasjonsløsningen ble platet ut på agarskåler ved ulike tidspunkt. Forskjell i antall kolonier mellom kontrollskål (*E. coli* og *S. aureus* inkubert i dH₂O) og testskåler (*E. coli* og *S. aureus* inkubert i konsentrert sterilfiltrert cellefri coelomvæske) ble brukt som mål på grad av antimikrobiell effekt. Resultatene fra gjentatte forsøk viste tydelig at det var en bakteriehemmende effekt når bakterier ble inkubert i coelomløsningene. Representative resultater fra to av forsøkene som ble gjennomført, er vist nedenfor i Figur 32 (bilder av skåler er vist i vedlegg, Figur 34) og Figur 33 (se vedlegg, Figur 35). Resultatene fra et av forsøkene som er vist (Figur 32), viser kun resultater for inkubering av *E. coli* i cellefri coelomvæske. Utplating av prøver tatt ut ved ulike tidspunkter fra løsning hvor *E. coli* ble inkubert med oppkonsentrert sterilfiltrert coelomvæske (Figur 32) viser at antall

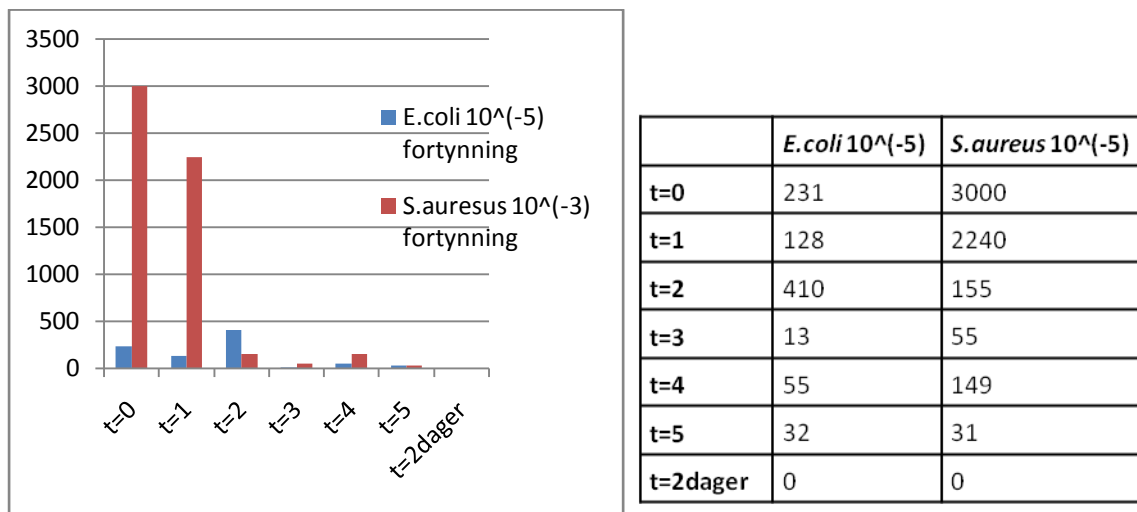
bakteriekolonier korrelerer med inkubasjonstiden. Antall kolonier som kunne telles på de ulike skålene er vist grafisk nedenfor i Figur 32.



Figur 32. Plattetelling ved studie av *in vitro* vekst ved inkubasjon av *E. coli* i cellefri coelomvæske. Søylediagrammet viser totalt antall bakteriekolonier som ble telt for ulike utplatningstidspunkter av bakterien *E. coli* inkubert med frysetørket og sterilfiltrert coelomløsning. Resultatet viser tydelig at bakterieantallet reduseres jo lengre inkubasjonstid som ble benyttet. Kontrollene er ikke vist, på grunn av overvekst.

Søylediagrammet i Figur 32 viser antall tellte kolonier på skålene tilhørende ulike utplatningstidspunkter. Forsøket ble repetert flere ganger og Figur 33 viser resultatene fra et annet repetert forsøk. Det kunne ikke observeres noen forskjell i vekst eller eventuelt drap ved å inkubere bakterier i dH₂O istedenfor LB medium ved t=0. Det var derimot betydelig mye mer vekst for bakterieprøver som ble inkubert i dH₂O (kontroll) enn i den cellefrie coelom løsningen. En annen viktig observasjon var at det var tydelig mer drap av *S. aureus* enn *E. coli* over tid. Figur 33 viser antall kolonier ved de ulike uttakstidspunktene for de to bakterieløsningene inkubert i oppkonsentrert sterilfiltrert cellefri coelomvæske. Resultatene viser at antall telt kolonier av både *E. coli* og *S. aureus* avtar i korrelasjon med inkubasjonstiden. Dette viser at konsentrert sterilfiltrert cellefri coelomløsning har antimikrobiell effekt mot bakteriene *E. coli* og *S. aureus*. Bilder av skålene som tellingene i Figur 33 er basert på er vist i Figur 35 i vedlegg. Kontrollene med bakterier inkubert i dH₂O hadde overvekst og var vanskelig å telle. Ved t=4 er det anslåtte antall kolonier ved 10⁻⁵ fortynningen lik 3840 for *S. aureus* og 17600 for *E. coli*, altså betydelig mye mer vekst enn skåler for uttak som tilsvarer løsninger hvor bakterier ble inkubert med immuncelleløsning. Kontrollene bestod av omtrentlig like mange kolonier ved uttakene de første 5 timene. Etter 2 dager kunne det ikke detekteres noen kolonier for bakterieprøver inkubert med den cellefrie coelomvæska, mens i kontrollen med bakterier inkubert i dH₂O var antallet kolonier

umulig å telle. Figur 35 i vedlegg viser utviklingen av den bakteriehemmende effekten over tid ved de ulike utplatingstidspunktene for de to ulike bakteriene som ble testet.



Figur 33. Sammenlikning av in vitro vekst av *E. coli* og *S. aureus* ved inkubasjon i cellefri coelomvæske. Søylediagrammet viser en grafisk fremstilling av totalantall bakterier som ble telt for de ulike utplatingstidspunktene for de to bakterieløsningene inkubert i cellefri coelomvæske. Tabellen viser antall telte kolonier ved ulike utplatingstidspunkter for bakteriene *E. coli* og *S. aureus* inkubert i frysetørket sterilfiltrert cellefri coelomvæske med konsentrasjon lik 0,0374g/ml. Tellingene er basert på 10⁻⁵ fortynning av utplatingssprøvene.

4 DISKUSJON

De viktigste funnene fra studiene som har blitt utført, viser at elektrostimulering i kombinasjon med LBSS buffer tilsatt EDTA og FBS var den mest effektive og egnede ekstraksjonsmetoden med hensyn til celleutbytte og levedyktighet av mark etter ekstraksjonsbehandling. Dette er et viktig funn for eventuelle videre studier som skal utføres på ekstraherte immunceller. Ved studie av antimikrobiell effekt var det nødvendig at cellefri coelomvæske ble sterilfiltrert og oppkonsentrert for at antimikrobiell effekt for bakteriene *E. coli* og *S. aureus* kunne detekteres.

4.1 Immuncelleekstraksjon

Sammenliknet med etanolekstraksjon og ultralydekstraksjon, var det elektrostimuleringsmetoden som ga best celleutbytte ved ekstraksjon av coelomvæske fra meitemarken *Dendrobaena veneta*. Tidligere ekstraksjonsforsøk med meitemarken *Eisenia fetida* viste derimot at ultralydekstraksjon ga best celleutbytte (Hendawi, et al., 2004). Det ble registrert høy dødelighet ved bruk av ekstraksjonmetoder med etanolholdige ekstraksjonsbuffer. Problemer med dødelighet knyttet til etanolekstraksjon av coelomvæske har også blitt observert for arten *Lumbricus terrestris* (Diogene, et al., 1997). Ved elektrostimulering virket markene fullt vitale etter behandlingen, men ved gjentatt behandling i fire påfølgende dager, ble det registrert noe dødelighet. Hvorvidt dette skyldtes selve ekstraksjonsmetoden, er vanskelig å si. Det kan tenkes at tømningen av immunceller resulterer i at markens forsvarsevne blir redusert og at dette i kombinasjon med etanolbehandling kan medføre økt dødelighet.

Siden elektrostimulering viste seg å være en effektiv metode for ekstraksjon av immunceller, samt at metoden medførte liten eller ingen dødelighet, og siden mikroskopering viste lite tegn til ødeleggelse av immuncellenes celleintegritet, ble denne metoden etter utprøvingen benyttet som standardprosedyre for ekstraksjon av immuncelleholdig coelomvæske. Det ble imidlertid senere forsøkt å optimalisere bufferen som coelomløsningen ble ekstrahert i, på grunn av problemer med celleaggregering. Bruk av GGE (Guaiacol Glyceryl Ether) som antikoagulant så ut til å medføre noe cellelysering. Diogene et al. (Diogene, et al., 1997) har også rapportert at GGE kan ha en skadelig effekt på immunceller fra meitemark. Våre

resultater viste at LBSS tilsatt 0,01M EDTA og 2 % FBS var den mest optimale bufferen med hensyn til å hindre celleaggregering og cellelysering. Bruk av serum og EDTA som antikoagulerende stoffer i ulike løsninger, er beskrevet i flere tidligere studier (Abdel-Moneim, Melamed, Darzynkiewicz, & Gorczyca, 2000; Diogene, et al., 1997; P. Engelmann, Kiss, Csongei, Cooper, & Nemeth, 2004; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004; Hendawi, et al., 2004; Kohlerova, et al., 2004; Krishan, 1975; B. Plytycz, Homa, Koziol, Rozanowska, & Morgan, 2006). Det å forhindre celleaggregering viste seg å være vanskelig. Dette kan forstås ut ifra at celleaggregering og kopling til andre celler er en svært viktig egenskap for immunceller, og nødvendig for at de skal kunne utøve sin destruktive funksjon (Cooper, et al., 1999; Cooper & Roch, 2003). Celleaggregeringen ble imidlertid forhindret i størst mulig grad for å unngå problemer ved videre analyse i flowcytometer.

Tidligere studier av immuncelleløsninger fra meitemark har blitt utført med bruk av de samme ekstraksjonsmetodene som har blitt testet i dette forsøket. Ekstraksjonsmetoder og studie av celleløsning virker imidlertid å være nøyere studert på arten *Eisenia fetida* (Diogene, et al., 1997; Hendawi, et al., 2004; Lassègues & Valembois, 1989; Roch, Valembois, & Vaillier, 1986; Pierre Valembois, et al., 1981) enn for arten *Dendrobaena veneta* (Adamowicz, 2005; Homa, et al., 2008). *Dendrobaena veneta* er en robust meitemark (Edwards, 2004) og et lite forstudie viste at denne meitemarken slapp mye immuncelleløsning når den ble utsatt for stress. Tilstedeværelse av mange fysiologiske og anatomiske variasjoner mellom ulike arter (Vetvicka, et al., 1994) indikerer at immuncelleobservasjoner bør gjøres på ulike arter, og ikke kun konsentreres rundt arten *Eisenia fetida*.

4.2 Studie av immunceller og immuncellerespons ved flowcytometri og mikroskopi

Ulike populasjoner av celler ble detektert ved mikroskopering og flowcytometrisk analyse av immuncelleløsning. Flowcytometri har i denne oppgaven også blitt benyttet i celleproliferasjonsstudier og ved analyse av antimikrobiell effekt i coelomvæske. Immuncellepopulasjoner hos meitemark har tidligere blitt karakterisert i flere studier (Adamowicz, 2005; Adamowicz & Wojtaszek, 2001; Diogene, et al., 1997; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004; Kurek & Plytycz, 2003; B. Plytycz, et al., 2006). Resultatene fra mikroskoperingen viste tydelig tre typer celler; eleocytt, amoebocytter og granulocytter.

Denne celleinndeling har blitt beskrevet i tidligere studier (Adamowicz, 2005; Adamowicz & Wojtaszek, 2001; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004). I likhet med tidligere observasjoner (Adamowicz, 2005), viser bilde A og C i Figur 9 at eleocytter og amoebocytter har en størrelse på henholdsvis ~40-45 μm og ~10-15 μm . Ekstraherte celled løsninger fra ubehandlet kontrollmark inneholdt mellom 50 og 80 % eleocytter. Kurek og Plytycz (Kurek & Plytycz, 2003) har tidligere registrert at halvparten av coelomocytterne utgjorde eleocytter for arten *D. veneta*, mens eleocytter kun utgjorde 4 % av den totale andelen coelomocytter som ble ekstrahert fra arten *Lumbricus terrestris*. Sterk grad av autofluorescens ble registrert for eleocytterne, slik Olchawa et al. (Olchawa, Bzowska, Sturzenbaum, Morgan, & Plytycz, 2006) har beskrevet tidligere. Det ble registrert stor variasjon i elektrisk volum (EV) ved studier av ulike cellepopulasjoner. Dette skyldes antakelig fragmentering av celler. Ved mikroskopering ble det observert fagocytterende egenskap hos amoebocytter. Adamowicz & Wojtaszek (Adamowicz & Wojtaszek, 2001) har rapportert at alle coelomocytterne har fagocytterende egenskaper og at amoebocytter er mest aktive. I studiene til Adamowicz & Wojtaszek (Adamowicz & Wojtaszek, 2001) ble den fagocytiske aktiviteten målt ved å inkubere gjær i coelomvæske. Våre resultater er imidlertid basert på enkeltobservasjoner ved mikroskopering (resultatene derfor ikke vist). Fagocytose er en av de mest nedarvede og essensielle funksjonene hos celler, og har stor innflytelse på organismers overlevelsessevne (Cooper & Roch, 2003).

Ved karakterisering av immuncellepopulasjoner ved flowcytometri, ble det benyttet et instrument av typen Cell Lab Quanta™ SC MPL fra Beckman Coulter. Dette instrumentet benytter elektrisk volum (EV) prinsippet ved beregning av cellestørrelse. EV er en nyttig parameter å bruke til å skille celler med ulik størrelse fra hverandre, og er kanskje bedre egnet enn forward scatter (FC), som har blitt brukt ved karakterisering av immunceller hos meitemark tidligere (Affar, et al., 1998; Cholewa, et al., 2006; Cossarizza, et al., 1996; Diogene, et al., 1997; M. Engelmann, et al., 2002; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004; P. Engelmann, Palinkas, Cooper, & Nemeth, 2005; Francis, et al., 2007; Hendawi, et al., 2004; Patel, et al., 2007; Sauve, Hendawi, Brousseau, & Fournier, 2002). En teoretisk beskrivelse av prinsippet bak måling av EV er gitt i avsnitt 1.5.1. Forskjeller knyttet til nøyaktigheten av målt cellestørrelse ved studier av helt sirkulære celler er antakeligvis ikke stor mellom de to prinsippene. Ved måling av ikke-sirkulære celler, vil det derimot være avgjørende for resultatet av målt cellestørrelse, når det gjelder hvordan cellen passerer belsningspunktet ved bruk av FC-prinsippet. Ved bruk av EV-prinsippet baseres målingen på volumet som

cellen fortrenger ved analysepunktet, og resultatet påvirkes derfor ikke av cellens orientering ved analysing. Vi anså derfor bruk av EV som en bedre egnet parameter for vurdering av cellestørrelse. Bruk av EV-prinsippet ved flowcytometrisk analyse av immunceller hos meitemark er innovativt, og det eksisterte derfor lite litteratur på slike analyser. Det var derfor vanskelig å sammenlikne våre resultater direkte opp mot resultater i tidligere forsøk hvor flowcytometri har blitt brukt til karakterisering av coelomocytter hos meitemark. Metodebeskrivelser og resultater beskrevet i disse studiene var ikke direkte overførbare til vår studie. Dette gjorde analysearbeidet både vanskelig og tidkrevende. Resultater fra studie utført av Sauvé et al. (Sauve, et al., 2002) viser også at det eksisterer store forskjeller mellom ulike meitemarkarter knyttet til immuncellenes fordeling i flowdiagrammer med hensyn på analyse av størrelse og granulæritet. Siden flowcytometri-analyser av immunceller hos meitemark hovedsakelig har blitt utført på andre meitemarkarter enn *Dendrobaena veneta* som har blitt brukt i denne oppgaven, medførte dette at sammenlikning av resultater ble ytterligere vanskelig. Homa et al. (Homa, et al., 2008) er blant de få som har brukt *Dendrobaena veneta* som modellorganisme i sine flowcytometri-analyser av prolifererende coelomocytter, men deres resultater viser ikke populasjonsfordeling med hensyn til granulæritet og cellestørrelse.

For å studere hvor bredspektret en immunrespons hos meitemark kan være, ønsket vi å etablere metoder for slike studier. Celleproliferasjonsstudier inngår som en viktig del av arbeidet med å karakterisere en immunrespons. *Dendrobaena veneta* ble injisert med bakteriene *E. coli*, *S. aureus* og *B. cereus* ved studie av celleproliferasjon. Som en del av optimalisering av prosedyrer ble meitemark også tømt for immunceller, siden dette teoretisk sett skulle medføre produksjon av nye celler, en celleproliferasjonsprosess vi ønsket å detektere ved flowcytometrianalyse og fluorescensmikroskopi.

Vi klarte ikke detektere tydelig celleproliferasjon verken ved bruk av flowcytometri eller fluorescensmikroskopi. Ved tømme-forsøk (proliferasjonsstudie uten injisering), ble det etter 4 til 8 dager restitusjonsperiode etter siste tømning, observert at markene begynte å slippe mer immunceller igjen, slik Homa et al. (Homa, et al., 2008) også observerte i deres tømme-forsøk, noe som igjen indikerer aktiv celleproliferasjon. Flowcytometri-diagrammer og fluorescensmikroskopianalyser av farget celleløsning burde derfor vist samme resultat. Ekstraherte celler fra mark som ble tømt, og celler fra injisert mark, ble farget med ulike fluorokromer for deteksjon av celleproliferasjon. Av fluorokrommene som ble testet viste HOE-farging best resultat med hensyn til utseende på cellesyklusdiagrammer ved

flowcytometrianalyser og kjernefargede bilder ved fluorescensmikroskopering. Forskjell i andel prolifererende celler kunne imidlertid ikke detekteres mellom kontrollmark og mark utsatt for stress som burde medført proliferasjon i de to proliferasjonsforsøkene (tømming og injiseringsforsøk). Homa et al. (Homa, et al., 2008) har tidligere utført liknede tømme-forsøk, hvor resultatene viste normal celleproliferasjon på $20,3 \pm 12,4$ % for immunceller ekstrahert fra kontrollmark (tømt for immunceller kun en gang). Immunceller fra mark som ble elektrostimulert for ekstraksjon av celler 2 eller 3 dager etter første tømming/stimulering, viste derimot en andel prolifererende celler på henholdsvis $34 \pm 13,6$ % og $57,5 \pm 8,7$ %. I disse studiene ble det dermed detektert opptil 3 ganger høyere proliferasjon for mark som ble tømt enn for ustimulerte mark.

Resultatene fra fluorescensmålingene i flowcytometer er vist ved hjelp av histogram som fremstiller det cellulære DNA innholdet. Disse histogrammene skulle optimalt sett vist proporsjoner av celler i respektive faser av cellyklus basert på forskjeller i fluorescens intensitet (Darzynkiewicz, et al., 2001). Ut i fra fargestoffene som ble testet i dette forsøket, var HOE det fargestoffet som ga best resultat, både med hensyn til flowcytometrianalyser og fluorescensmikroskopering. Resultatene viser at det fortsatt er behov for optimalisering for å løse de metodiske problemene som eksisterer knyttet til deteksjon av proliferasjon i denne studien. Bruk av positiv kontroll for celleproliferasjon ville antakelig gjort analysearbeidet lettere og ville også styrket resultatene. I studien har det kun blitt benyttet interne kontroller, det vil si ufarga mot farga, stimulert mot ustimulert etc. Årsaken til at studien ikke inkluderer bruk av positiv kontroll for celleproliferasjon, skyldes at vi ikke fant noen egnet kontroll som kunne brukes. Grunnen til at vi ikke oppnådde samme resultater i vår studie som Darzynkiewicz et al. (Darzynkiewicz, et al., 2001) kan skyldes tekniske metodemessige og/eller instrumentelle feil. Vi klarte ikke å detektere proliferasjon verken ved tømme-forsøk eller injiseringsforsøk med mark.

Vi observerte imidlertid antydninger til endringer i populasjonsfordeling for immunceller ekstrahert fra *Dendrobaena veneta* vi antok ville inneholde prolifererende celler. I flowcytometriagrammer der parameterne side scatter mot EV ble analysert, så prøver fra mark som deltok i proliferasjonsforsøk ut til å inneholde mer eleocyttar enn det som ble registrert for kontrollmark (mark som ikke ble stimulert verken for tømming eller injisering). Celleløsningen fra disse markene skulle imidlertid farges for videre studie av proliferasjon og prøvene ble derfor behandlet med Nonidet® P40 (Fluka BioChemika) for fjerning av autofluorescens. Dette ble gjort for å unngå overlappende fluorescens knyttet til

autofluorescens og emisjon fra eksiterte fluorokromer. Imidlertid ble det registrert endring av eleocyttpopulasjonens granularitet ved flowcytometrianalyser etter behandling med denne detergenten, og resultatene var dermed ikke sammenliknbare.

Bruk av HOE i celleproliferasjonsstudier ga som nevnt teoretisk best cellesyklusdiagrammer ved flowcytometrianalyse og kjernefargingsbilder ved fluorescensmikroskopering. DAPI og HOE er mye brukt som DNA spesifikke fluorokromer og disse emitterer blått lys ved ultrafiolett (UV) bestråling når de er bundet til DNA, og er mest brukt på ikke-levende celler (Martin, Leonhardt, & Cardoso, 2005). Fargeeffektiviteten til HOE med hensyn til opptak og fluorescens, varierer fra en celletype til en annen (M. G. Ormerod, 1999). Det er ikke for oss kjent at HOE har blitt brukt i flowcytometriske studier av immunceller fra meitemark tidligere. Siden bruk av HOE ikke medførte problemer med overlappende fluorescens med eleocyttenes naturlig autofluorescens, var det ikke nødvendig å fjerne autofluorescens, slik det var ved bruk av fluorokromene PI (enkel PI farging, opprinnelig og modifisert Vindeløvs prosedyre) og DRAQ5. I tillegg krever ikke HOE fiksering av celler før farging, slik mange andre fluorokromer krever (Martin, et al., 2005). Nonidet P40 og 4 % paraformaldehyd (PFA) ble brukt som detergenter for henholdsvis å fjerne autofluorescens og for fiksering av celler ved bruk av andre fluorokromer enn HOE. Disse behandlingene førte til endring av cellestruktur, noe som igjen førte til endringer i populasjonsbilder ved flowcytometrisk analyse. Bruk av HOE gjorde derfor prøveoppbeidelsen enklere og medførte mindre skade og aggregering av celler, siden bruk av disse to detergentene kunne utelukkes. Våre resultater fra proliferasjonsstudiene var ikke direkte sammenliknbare med resultater fra liknende flowcytometriske proliferasjonsstudier av immunceller hos meitemark (Affar, et al., 1998; Brousseau, et al., 1997; M. Engelmann, et al., 2002; P. Engelmann, Molnar, et al., 2004; Francis, et al., 2007; Hendawi, et al., 2004; Homa, et al., 2008; Olchawa, et al., 2006; Patel, et al., 2007; B. Plytycz, et al., 2006; Barbara Plytycz, et al., 2007) fordi det i disse studiene har blitt benyttet flowcytometre med en annen instrumentell oppbygning, og bruk av UV del har som sagt ikke blitt benyttet tidligere ved studier av coelomocyttoproliferasjon hos meitemark. Homa et al. (Homa, et al., 2008) virker dessuten å være eneste kjente referanse som har utført proliferasjonsstudier på arten *Dendrobaena veneta*. På grunn av store artsvariasjoner ligger det også et problem i det å sammenlikne våre data opp mot proliferasjonsstudier av immunceller utført på andre meitemarkarter.

Det er også tidligere beskrevet at det kan være vanskelig å finne optimale fargeprosedyrer for deteksjon av proliferasjon ved flowcytometri (M. G. Ormerod, 1999). Det er kjent at det

finnes en del instrumentelle problemer knyttet til overlapping av S- og G1-fase og mellom sen S- og G2/M-fase. Det er mulig at dette var noe av hovedårsaken til våre problemer med bruk av fluorokromene PI og DRAQ5 ved DNA farging av prolifererende celler. Optimalisering av konsentrasjonen av ulike detergenter er viktig for å oppnå nøyaktige resultater (M. G. Ormerod, 1999), men ved bruk av HOE bør dette ikke være en feilkilde da verken Nonidet P40 eller PFA ble brukt i disse analysene. Ormerod (M. G. Ormerod, 1999) har poengtert viktigheten av optimalisering knyttet til forhindring av aggregering, og eventuell fjerning av celler med filtrering. Gjennom sterkt fokus på bufferoptimalisering ble aggregering i stor grad redusert. Celleggregater antas å ikke utgjøre en stor feilkilde i våre flowcytometriske analyser av proliferasjon.

Nerliens Meszansky, produktleverandør av flowcytometeret som ble benyttet i analysene, anbefalte å bruke UV delen av instrumentet, siden det gjerne ville gi bedre resultater enn med laser ved DNA histogram analyse. Videre ble vi anbefalt å teste ut dette med bruk av NIM- DAPI reagens, men resultatene viste ikke noe tegn til proliferasjon, selv ved de tidspunktene man skulle anta at dette ville være naturlig. I proliferasjonsstudiene utført med bruk av NIM DAPI reagens ble det også forsøkt å inkludere bruk av TRBC-celler (Trout Red Blood Cells, NPE 629972, NPE Analyser, DNA referance Calibrator, Beckman Coulter) som kontroll, men dette fungerte dårlig da disse cellene i for stor grad var forskjellig fra coelomocytene til meitemarken som skulle analyseres. Vi har også vært i kontakt med personer og forskningsmiljøer i Oslo knyttet til våre problemer med deteksjon av proliferasjon. Ut i fra personlig kommunikasjon med Paula M. De Angelis (PhD., forsker ved institutt for patologi, UiO, Rikshospitalet) og Hans Christian D. Aass (leder ved The Flow Cytometry Core Facility, FoU seksjonen ved Ullevål Universitetssykehus), ble vi anbefalt å bruke Vindeløs prosedyre. Bruk av denne prosedyren ga ikke noe bedret resultat. Det ble ved bruk av metoden ikke detektert proliferasjon, og flowdiagrammene var ikke optimale med hensyn til hvordan de teoretisk burde sett ut (se avsnitt 1.4.1 for teoretisk beskrivelse av cellesyklusdiagrammer). Grunnen til at veiledningene ikke fungerte, skyldes igjen problemer med overførbarheten til vårt instrument, som ikke var likt flowcytometerene som de hadde mest kjennskap til eller benyttet.

BrdUrd/anti- BrdUrd metode og BrdUrd-Hoechst/PI metode kunne blitt utført som alternative metoder for deteksjon av celleproliferasjon. BrdUrd inkorporeres i DNA til celler som substitutt for tymin (M. G. Ormerod, 1999). Ved bruk av BrdUrd/anti- BrdUrd metoden vil celler i S-fase være "pulse-labelled" med BrdUrd og kan detekteres ved antistoffer mot

BrdUrd. Antistoff merkingen er korrelert til DNA histogrammet ved supplering av PI. Ved inkubering av cellene etter merking, kan de merkede cellenes bevegelse følges. Kromatin strukturen må imidlertid ødelegges før antistoffene kan reagere med DNA inkorporert med BrdUrd. BrdUrd/anti- BrdUrd metode kan utføres *in vivo* (M. G. Ormerod, 1999; Scupham, 2007) i motsetning til BrdUrd-Hoechst/PI metode som utføres *in vitro* (M. G. Ormerod, 1999). *In vivo* studie med BrdUrd/anti- BrdUrd metode ble ikke utført da mark antakeligvis ville sluppet immunceller ved injisering av BrdUrd, og noe som igjen ville ført til uønsket proliferasjon. Store individforskjeller ville trolig gjort analyseringen vanskelig. Bruk av prinsippet ved *in vitro* studier anses som mer optimalt. Fluorescens av *bis*-benzimidazole fluorokromer (Hoechst 33258 og Hoechst 33342) bundet til DNA, vil bli undertrykket (quenched) av BrdUrd (M. G. Ormerod, 1999). Som en konsekvens av kontinuerlig farging med BrdUrd og påfølgende DNA farging med Hoechst 33258, vil cellene separeres ut i fra antall replikasjoner de gjennomgikk i perioden med merking. Metoden krever dyrking av celler *in vitro*, noe det ikke var laboratoriefasiliteter til å kunne utføre i denne studien.

Immunofarging av ekstraherte immuncelleløsninger som var antatt å inneholde prolifererende celler, ble også forsøkt. Mulig prolifererede immunceller ble forsøkt detektert ved å merke cellen med et mus anti-human Ki-67 antistoff konstruert for å binde Ki-67 kjerneantigen. For deteksjon ble det benyttet et Alexa Fluor® 555 (geit- antimus) konjungert sekundær antistoff. Ved analyse av cellene i fluorescensmikroskop ble det ikke registrert celler i proliferasjon (resultater ikke vist). Hovedgrunnen til at proliferasjon ikke ble detektert kan forklares ut ifra at protokollen ikke var tilstrekkelig optimalisert (se vedlegg avsnitt 6.5 for nærmere beskrivelse av prosedyre). Ingen detektert proliferasjon ved bruk av denne metoden stemmer overrens med resultatene fra flowcytometrianalysene og fluorescensmikroskoperingen. Alikevel antas det det eksisterte proliferasjon og at metodemessig problemer medførte at dette ikke ble detektert. Videre optimalisering og testing med bruk av denne metoden burde vært gjort, men ble ikke gjennomført på grunn av manglende tid. Bruk av denne metoden for deteksjon av prolifererende celler er tidligere beskrevet av Homa et al. (Homa, et al., 2008), og hvor det ble detektert Ki-67 positive celler i form av brune ansamlinger i cellekjernen. Videre studier og metodeoptimalisering er derfor nødvendig. Ki-67 har blitt brukt i proliferasjonsstudier av kreftceller utført av Abdel-Moneim et al. ((Abdel-Moneim, et al., 2000), hvor det også ble benyttet samme fikseringsmetode som har blitt brukt i denne oppgaven, 4 % paraformaldehyd. Godartede diploide kontrollceller ble brukt som kontroll i immunofargingstudiene til Abdel-Moneim et al. (Abdel-Moneim, et al.,

2000). Ved eventuell videre optimalisering av immunofargingsmetoden som ble benyttet, bør det rettes fokus mot å finne en tilsvarende egnet positiv kontroll for prolifererende immunceller hos *Dendrobaena veneta*, slik som Abdel-Moneim et al. inkluderte i sin studie.

4.3 Antimikrobiell effekt

4.3.1 Bakterieinnhold i ekstrahert immuncelleløsning hos injisert mark

For å unngå at eventuelle bakterierester i coelomvæske fra injisering av mark, skulle forstyrre studiene av antimikrobiell effekt, ble coelomvæsken testet for innhold av *E. coli*. Ut i fra mikroskopering (resultater ikke vist) av cellefri coelomvæske fra mark som hadde blitt injisert med *E. coli*, kunne det ikke påvises rester av denne bakterien i immuncellevæsken. Coelomvæske fra mark injisert med *S. aureus* ble ikke testet. Realtime PCR analyse av coelomvæske ekstrahert fra meitemark 1 uke etter injisering viste heller ikke tegn til rester av *E. coli* og *S. aureus* (resultater ikke vist).

Antimikrobiell effekt ble studert ved bruk av fire forskjellige metoder; PMA PCR metode, flowcytometer (LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit), sonehemming og utplating. Det var kun ved utplating av bakterieløsning inkubert i frysetørket sterilfiltrert cellefri coelomløsning at inhibering av vekst tydelig kunne registreres. Det ble ikke benyttet sterilfiltrert coelomvæske oppkonsentrert ved hjelp av frysetørking ved testing av de andre metodene. Studie av antimikrobiell effekt burde blitt testet på nytt med bruk av oppkonsentrert cellefri coelomvæske også for disse metodene, på samme måte som den som ble benyttet i utplatingforsøk. Resultatene fra disse testene ville muligens da også kunne påvise antimikrobiell effekt, da det antas at for lav konsentrasjon av antimikrobielle stoffer var årsaken til at disse testene ikke entydig viste tilstedeværelse av antimikrobiell effekt i coelomvæsken.

Prinsippet bak EMA/PMA PCR metoden, som kan brukes for kvantifisering av andel levende og døde celler, ble først beskrevet av Rudi et al. (Rudi, et al., 2005). Vi har ikke kjennskap til at metoden har blitt brukt i studier av immuncellers evne til å drepe bakterier tidligere. Selv om det ikke ble detektert antimikrobiell effekt i immuncelleløsningen ved bruk av denne teknikken, så betyr ikke dette at teknikken ikke er egnet til dette formålet. Som tidligere antydte, ville metoden antakeligvis detektert drap av bakterier dersom det

hadde vært en høyere konsentrasjon av antimikrobielle stoffer i coelomløsningen som ble benyttet i analysen. Resultatene viste antydninger til drap over tid. Nye forsøk med bruk av denne teknikken med konsentrert coelomløsning bør utføres før man kan si noe om metodens evne til å detektere immuncellemediert drap av ulike bakterier.

Bruk av LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit ved flowcytometrianalyse av bakterieløsning inkubert i coelomvæske viste ukonsistente resultater, men ga indikasjon på antimikrobiell effekt. Det ble detektert lavere signalstyrke ved PI farging av døde celler enn det som var forventet. SYTO[®]9 ble derfor brukt som hovedindikator på grad av bakteriedrap, da denne DNA bindende fluorokrommen kun trenger inn i levende celler. I likhet med PMA PCR metoden ble det i dette forsøket benyttet ukonsentrert coelomvæske. For svak konsentrasjon av antimikrobielle stoffer er antakeligvis hovedårsaken til at det ikke tydelig kunne påvises antimikrobiell effekt. Varierende konsentrasjon av slike stoffer i coelomløsningen fra forsøk til forsøk kan være årsaken til at varierende grad av drap ble observert. Et annet LIVE/DEAD kit har tidligere blitt brukt av Patel et al. (Patel, et al., 2007) ved studie av coelomocytenes ”naturlig-drepercelle” liknende aktivitet.

Avsettelse av coelomvæske på agarskåler med bakteriene *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* og *List innocula*, samt måling av eventuell påfølgende hemmesone ble også testet ut som en metode for deteksjon av eventuell antimikrobiell effekt. Til tross for at det oppsto vekst av andre bakterier i de avsatte løsningene som følge av usteril coelomløsning, kunne det allikevel antydes små hemmesoner rundt de avsatte coelomløsningene. Studien bør gjentas med bruk av sterilfiltrert frysetørket coelomløsning på samme måte som løsningen som ble benyttet i utplatingsforsøket. Vi antar at for lav konsentrasjon av antimikrobielle stoffer var hovedårsaken til at vi ikke klarte å detektere tydelig antimikrobiell effekt. Ved analysering av resultater i ettertid ser vi at forsøket også burde blitt testet på skåler med ulik bakteriekonsentrasjon. Det har tidligere blitt påvist antimikrobiell effekt i coelomvæske ved sonehemningsforsøk for arten *Eisenia fetida andreii* (Roch, Valembois, Lassegues, et al., 1981; Pierre Valembois, et al., 1981).

Ved utplatingsforsøk ble det detektert drap av bakterier inkubert i coelomvæske over tid. Utplatingsforsøket viste større grad av drap for *S. aureus* enn *E. coli*. Dette kan skyldes at *S.auresus* er mer patogen ovenfor *Dendrobaena veneta* enn *E. coli*, siden tidligere studier har vist at den antimikrobielle aktiviteten er rettet mot de mest patogene bakteriene (Lassègues & Valembois, 1989; Roch, Lassegues, & Valembois, 1991; Roch, Valembois, Lassegues, &

Cassand, 1981). Studie av fagocytotisk aktivitet med bruk av disse bakteriene har blitt utført av Engelmann et al. (P. Engelmann, Molnar, et al., 2004), men deteksjonen av den antimikrobielle effekten ble studert på proteinnivå ved bruk av micro-Bradford assay. For å kunne påvise en antimikrobiell effekt, har det blitt hevdet at studiene bør rettes mot bakterier som finnes i det naturlige habitatet til meitemarken, og mot bakterier som er høyt patogene (Pierre Valembois, et al., 1981). Resultater fra studier utført av Valembois, har også vist at den antimikrobielle aktiviteten ikke er tilfeldig rettet mot alle bakteriearter, men mot bakterier som har minst et felles antigen med SRBC celler (sheep red blood cells). Det er også vist at immunceller fra meitemark kan krysst reagere med epitoper hos mennesker og drepe menneskelige kreftcellerlinjer (Cooper, et al., 2002; Cossarizza, et al., 1996). Dette viser hvor nyttig det kan være å bruke meitemark som modellorganisme for å studere ulike immuncellers funksjon og rolle i det innate immunforsvaret. I likhet med Valembois (Pierre Valembois, et al., 1981), har Lassegues et al. (Lassegues, Roch, & Valembois, 1989) hevdet på bakgrunn av deres resultater, at bakteriostatisk aktivitet kun vil bli stimulert ved injisering av patogene bakterier. Roch et al. (Roch, et al., 1991) observerte videre at økt antimikrobiell effekt nådde et maksimum 4 dager etter injiseringen av patogene bakterier.

Studie av antimikrobiell effekt kunne også vært utført i flytende bakterieløsning tilsatt konsentrert cellefri coelomvæske. Videre kunne man da sett på visuelle forskjeller i vekst mellom ulike rør tilsatt forskjellige konsentrasjoner av coelomløsningen. En slik spektrofotometrisk analyse for deteksjon av antimikrobiell effekt har tidligere blitt utført av Valembois et al. (Pierre Valembois, et al., 1981). Forsøket kunne kanskje blitt kombinert med bruk av LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit i flowcytometer. Dette ble imidlertid ikke gjort på grunn av manglede tid og er derfor noe som kan testes ut ved videre analyser av antimikrobiell effekt.

Vi har testet ut frysetørking av cellefri coelomvæske som metode for oppkonsentrering av antimikrobielle stoffer, noe som ikke er beskrevet i betydelig grad tidligere og som derfor er spennende å sammenlikne opp mot proteinrensing utført ved hjelp av for eksempel kolonnekromatografi (Milochau, et al., 1997) og gelfiltrering (Pierre Valembois, et al., 1981), som er mer vanlig brukte metoder for oppkonsentrering. Oppkonsentrering ved hjelp av frysetørking fungerte fint og utplattingsforsøk utført med denne oppkonsentrerte løsningen viser at den antimikrobielle aktiviteten ble beholdt ved bruk av denne metoden.

Prinsippet om å eliminere skadelige mikroorganismer eller ukjente stoffer, samtidig som gunstige symbionter bevares, er like viktig for mark som for mennesker (jf styring av tarmmikroflora og tarmmikroflorasammensetning hos mennesker). Studie av invertebrates innate immunsystem kan trolig hjelpe oss til å øke forståelsen av denne sammenhengen. I tillegg er det også vist at immunceller hos meitemark har evne til å drepe kreftceller hos mennesker, og i flere studier inkludert denne studien, har det blitt påvist antimikrobiell effekt i coelomløsningen. Dette viser at studie av immunsystemet hos meitemark kan ha stor nytteverdi og kommersiell betydning for oss mennesker.

4.4 Forslag til videre studier

Optimalisering av metoder for ekstraksjon av celler, samt testing og optimalisering av metoder brukt til karakterisering av immuncelleproliferasjon og analyse av antimikrobiell effekt i coelomvæske hos *Dendrobaena veneta*, har vært det viktigste arbeidet i denne oppgaven og resultatene vil kunne være nyttig i eventuelle videre studier.

Deteksjon av celleproliferasjon med bruk av HOE som fargemetode krever ytterligere optimalisering. Videre studier med bruk av Ki-67 for immunodeteksjon av celleproliferasjon kan også gjøres. Antimikrobiell effekt ble påvist i oppkonsentrert coelomvæske ved platespredning av bakterieløsning inkubert i den cellefrie og sterifiltrerte coelomvæska. Konsentrert coelomvæske burde blitt testet i sonehemningsforsøk, PMA PCR metode og ved flowcytometrisk analyse for deteksjon av antimikrobiell effekt. Som tidligere nevnt, kunne studie av antimikrobiell effekt blitt testet i flytende bakterieløsning tilsatt konsentrert cellefri coelomvæske. Resultatet av dette kan følges spektrofotometrisk og kombineres med flowcytometriske analyser ved bruk av LIVE/DEAD[®] BacLight™ kit.

Det viktigste steget fremover vil imidlertid være på opprette in vitro studier av coelomocytter. I ettertid ser vi at prosjektet kanskje burde blitt startet med slike studier, men fasiliteter var ikke tilgjengelig. In vitro dyrkning og testing av immunceller fra meitemark er tidligere beskrevet av Engelmann et al. (P. Engelmann, Kiss, et al., 2004; Kurek & Plytycz, 2003; Manerikar, Apte, & Ghole, 2008; Sauve, et al., 2002). Observasjoner av store individuelle variasjoner tilsier at det burde gjøres mer in vitro studier. Bruk av Brd-Urd for deteksjon av immuncelleproliferasjon er en av analysene som bør testes ut i et in vitro celledyrkingssystem.

5 Konklusjon

Våre resultater viste at elektrostimulering var den mest effektive metoden for ekstraksjon av immuncelleholdig coelomvæske fra *Dendrobaena veneta*. Minst grad av celleaggregering og cellelysering ble oppnådd ved bruk av LBSS buffer tilsatt 0,01M EDTA og 2 % FBS som ekstraksjonsbuffer.

Vi klarte ikke å detektere celleproliferasjon verken i immuncelleløsning ekstrahert fra mark som tidligere hadde blitt tømt for immunceller, fra mark som hadde blitt injisert med *E. coli* eller *S. aureus* eller i celleløsning ekstrahert fra kontrollmark som ikke hadde blitt behandlet på forhånd. Bruk av Hoechst 33258 (HOE) ga teoretisk sett, mest optimale cellesyklusdiagrammer.

Antimikrobiell effekt ble detektert i utplattingsforsøk, hvor bakterier ble inkubert i cellefri coelomvæske som ble sterilfiltrert og frysetørket for oppkonsentrering.

Litteraturliste

- Abdel-Moneim, I., Melamed, M. R., Darzynkiewicz, Z., & Gorczyca, W. (2000). Proliferation and apoptosis in solid tumors - Analysis by laser scanning cytometry. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 22(5), 393-397.
- Adamowicz, A. (2005). Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes. *Tissue and Cell*, 37(2), 125-133.
- Adamowicz, A., & Wojtaszek, J. (2001). Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae). *Zoologica Poloniae*, 46, 94-104.
- Affar, E. B., Dufour, M., Poirier, G. G., & Nadeau, D. (1998). Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species *Lumbricus terrestris*. *Mol Cell Biochem*, 185(1-2), 123-133.
- Alberts, L., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology Of The Cell* (Vol. 3rd). New York: Garland Publishing, Inc.
- Applied Biosystems. Real-Time PCR: Understanding CT, 2009, from http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/general_documents/cms_053906.pdf
- Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., & Hardin, J. (2006). *The World of the Cell* (6th ed.). San Francisco: Pearson Education, Benjamin Cummings,.
- Beckman Coulter (2006a). Cell Lab Quanta SC, Advanced Flow Cytometry with 3-color, Coulter volume and Side Scatter Analysis. U.S.A.: Beckman Coulter Inc.
- Beckman Coulter (2006b). Quanta™ SC MPL Training Guide.
- Bilej, M., De Baetselier, P., & Beschin, A. (2000). Antimicrobial defense of the earthworm. *Folia Microbiol (Praha)*, 45(4), 283-300.
- Blackledge KH, B. C. (1993). Protocol for DNA measurement in fishes by flowcytometry. In D. P. Robinson JP, Dean I, Dressler H, Tanke H, Wheelless L (Ed.), *Handbook of flow cytometry methods* (2nd ed., pp. p. 225-228). New York, NY: Wiley-Liss.
- Brousseau, P., Fugere, N., Bernier, J., Coderre, D., Nadeau, D., Poirier, G., et al. (1997). Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biology & Biochemistry*, 29(3-4), 681-684.
- Cholewa, J., Feeney, G. P., O'Reilly, M., Sturzenbaum, S. R., Morgan, A. J., & Plytycz, B. (2006). Autofluorescence in eleocytes of some earthworm species. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 44(1), 65-71.
- Cooper, E. L. (2003). Comparative immunology. *Current Pharmaceutical Design*, 9(2), 119-131.
- Cooper, E. L., Cossarizza, A., Kauschke, E., & Franceschi, C. (1999). Cell adhesion and the immune system: A case study using earthworms. *Microscopy Research and Technique*, 44(4), 237-253.
- Cooper, E. L., Kauschke, E., & Cossarizza, A. (2002). Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays*, 24(4), 319-333.
- Cooper, E. L., Kvell, K., Engelmann, P., & Nemeth, P. (2006). Still waiting for the toll? *Immunology Letters*, 104(1-2), 18-28.
- Cooper, E. L., & Roch, P. (2003). Earthworm immunity: a model of immune competence. *Pedobiologia*, 47(5-6), 676-688.
- Cossarizza, A., Cooper, E. L., Suzuki, M. M., Salvioli, S., Capri, M., Gri, G., et al. (1996). Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Exp Cell Res*, 224(1), 174-182.

- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., & Smolewski, P. (2001). Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology*, 38(2), 179-193.
- Diogene, J., Dufour, M., Poirier, G. G., & Nadeau, D. (1997). Extrusion of earthworm coelomocytes: comparison of the cell populations recovered from the species *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* and *Octolasion tyrtaeum*. *Lab Anim*, 31(4), 326-336.
- Du Pasquier, L., & Duprat, P. (1968). [Humoral and cellular aspects of a non-specific natural immunity in the oligochetee *Eisenia foetida* Sav. (Lumbricinae)]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 266(5), 538-541.
- Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Korber, D. R., Swerhone, G. D., Leppard, G. G., & Hitchcock, A. P. (2009). Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Can J Microbiol*, 55(2), 163-178.
- Edwards, C. A. (2004). *Earthworm Ecology* (2nd ed.). Florida, U.S.A.: CRC Press LLC.
- Engelmann, M., Pal, J., Berki, T., Cooper, E. L., & Nemeth, P. (2002). Earthworm leukocytes react with different mammalian antigen-specific monoclonal antibodies. *Zoology*, 105(3), 257-265.
- Engelmann, P., Kiss, J., Csongei, V., Cooper, E. L., & Nemeth, P. (2004). Earthworm leukocytes kill HeLa, HEp-2, PC-12 and PA317 cells in vitro. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61(1-2), 215-227.
- Engelmann, P., Molnar, L., Palinkaas, L., Cooper, E. L., & Nemeth, P. (2004). Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell and Tissue Research*, 316(3), 391-401.
- Engelmann, P., Palinkas, L., Cooper, E. L., & Nemeth, P. (2005). Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leukocyte markers. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(7), 599-614.
- Eyambe, G. S., Goven, A. J., Fitzpatrick, L. C., Venables, B. J., & Cooper, E. L. (1991). A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Lab Anim*, 25(1), 61-67.
- Francis, J., Wreesman, S., Yong, S., Reigstad, K., Krutzik, S., & Cooper, E. L. (2007). Analysis of the earthworm coelomocyte cell surface for the presence of Toll-like immune receptors. *European Journal of Soil Biology*, 43(Supplement 1), S92-S96.
- Handy, A. R. (2007). *Acute Toxicity and Immunotoxicity Testing of Total Petroleum Hydrocarbons in Aquatic and Terrestrial Organisms*. Wright State University
- Hendawi, M., Sauve, S., Ashour, M., Brousseau, P., & Fournier, M. (2004). A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(1), 17-22.
- Homa, J., Bzowska, M., Klimek, M., & Plytycz, B. (2008). Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from the earthworm, *Dendrobaena veneta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(1), 9-14.
- Invitrogen (2004). LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits Retrieved 20 aug, 2004, from <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07007.pdf>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197-216.
- Kohlerova, P., Beschin, A., Silerova, M., De Baetselier, P., & Bilej, M. (2004). Effect of experimental microbial challenge on the expression of defense molecules in *Eisenia foetida* earthworm. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(7-8), 701-711.

- Krishan, A. (1975). RAPID FLOW CYTOFLUOROMETRIC ANALYSIS OF MAMMALIAN-CELL CYCLE BY PROPIDIUM IODIDE STAINING. *Journal of Cell Biology*, 66(1), 188-193.
- Kurek, A., & Plytycz, B. (2003). Annual changes in coelomocytes of four earthworm species: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia*, 47(5-6), 689-701.
- Kvell, K., Cooper, E., Engelmann, P., Bovari, J., & Nemeth, P. (2007). Blurring borders: Innate immunity with adaptive features. *Clinical & Developmental Immunology*, 1-10.
- Lammert, M. J. (2007). *Techniques in microbiology*: Pearson Prentice Hall.
- Lassegues, M., Roch, P., & Valembois, C. (1989). Antibacterial Activity of *Eisenia fetida andrei* Coelomic Fluid: Specificity of the Induced Activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54, 28-31.
- Lassègues, M., & Valembois, P. R. P. (1989). Antibacterial Activity of *Eisenia fetida andrei* Coelomic Fluid: Evidence, induction, and Animal Protection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53, 1-6.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker* (Vol. 3). Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
- Lee, J. L., & Levin, R. E. (2009). A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. [Article]. *Journal of Microbiological Methods*, 76(1), 93-96.
- Liu, D., Lawrence, M. L., & Austin, F. W. (2005). Evaluation of PCR primers from putative transcriptional regulator genes for identification of *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 40(1), 69-73.
- Manerikar, R. S., Apte, A. A., & Ghole, V. S. (2008). In vitro and in vivo genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworm coelomocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25(1), 63-68.
- Martin, R. M., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2005). DNA labeling in living cells. *Cytometry Part A*, 67A(1), 45-52.
- Massicotte, R., Robidoux, P. Y., Sauve, S., Flipo, D., Mathiot, A., Fournier, M., et al. (2004). Immunotoxicological response of the earthworm *Lumbricus terrestris* following exposure to cement kiln dusts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(1), 10-16.
- Milochau, A., Lassegues, M., & Valembois, P. (1997). Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim Biophys Acta*, 1337(1), 123-132.
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257-266.
- Nocker, A., Cheung, C. Y., & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. [Article]. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 310-320.
- Olchawa, E., Bzowska, M., Sturzenbaum, S. R., Morgan, A. J., & Plytycz, B. (2006). Heavy metals affect the coelomocyte-bacteria balance in earthworms: Environmental interactions between abiotic and biotic stressors. *Environmental Pollution*, 142(2), 373-381.
- Ormerod, M. G. (1999). *Flow Cytometry* (2nd ed.). New York: Springer-Verlag New York Inc, BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Ormerod, M. G. (2000). *Flow Cytometry* (pp. 276). New York: Oxford University Press Inc.

- Pancer, Z., & Cooper, M. D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 24, 497-518.
- Patel, M., Francis, J., Cooper, E. L., & Fuller-Espie, S. L. (2007). Development of a flow cytometric, non-radioactive cytotoxicity assay in *Eisenia fetida*: An in vitro system designed to analyze immunosuppression of natural killer-like coelomocytes in response to 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA). *European Journal of Soil Biology*, 43(Supplement 1), S97-S103.
- Plytycz, B., Homa, J., Koziol, B., Rozanowska, M., & Morgan, A. J. (2006). Riboflavin content in autofluorescent earthworm coelomocytes is species-specific. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 44(4), 275-280.
- Plytycz, B., Klimek, M., Homa, J., Tylko, G., & Kolaczowska, E. (2007). Flow cytometric measurement of neutral red accumulation in earthworm coelomocytes: Novel assay for studies on heavy metal exposure. *European Journal of Soil Biology*, 43(Supplement 1), S116-S120.
- Rahman, M. (2006). Introduction to Flow Cytometry. Oxford: AbD Serotec Ltd.
- A Review of the Universe- Structures, Evolutions Observations and Theories ((s.a.)). 2009, from <http://universe-review.ca/I10-82-annelid.jpg>
- Roch, P. (1979). Protein analysis of earthworm coelomic fluid: 1) polymorphic system of the natural hemolysin of *Eisenia fetida andrei*. *Dev Comp Immunol*, 3(4), 599-608.
- Roch, P., Lassegues, M., & Valembois, P. (1991). Antibacterial Activity of *Eisenia fetida andrei* Celomic Fluid .3. Relationship within the Polymorphic Hemolysins. *Developmental and Comparative Immunology*, 15(1-2), 27-32.
- Roch, P., Valembois, P., Davant, N., & Lassegues, M. (1981). Protein analysis of earthworm coelomic fluid- II. Isolation and biochemical characterization of the *Eisenia fetida andrei* factor (EFAF). *Comp Biochem Physiol C*, 69B, 829-836.
- Roch, P., Valembois, P., Lassegues, M., & Cassand, P. (1981). Protective activity of coelomic fluid of a lumbricid *Eisenia fetida*. *Developmental & Comparative Immunology*, 5(1), 81-86.
- Roch, P., Valembois, P., & Vaillier, J. (1986). Amino acid compositions and relationships of five earthworm defense proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85B, 747-751.
- Rosenstiel, P., Philipp, E. E. R., Schreiber, S., & Bosch, T. C. G. (2009). Evolution and Function of Innate Immune Receptors -- Insights from Marine Invertebrates. *Journal of Innate Immunity*, 1(4), 9.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S. M., & Holck, A. L. (2005). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 1018-1024.
- Sauve, S., Hendawi, M., Brousseau, P., & Fournier, M. (2002). Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52(1), 21-29.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), 311-322.
- Schulenburg, H., Kurz, C. L., & Ewbank, J. J. (2004). Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunological Reviews*, 198(1), 36-58.
- Scupham, A. J. (2007). Examination of the microbial ecology of the avian intestine in vivo using bromodeoxyuridine. *Environmental Microbiology*, 9(7), 1801-1809.
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical flow cytometry* (4th ed.). Hoboken, N.J.: Wiley-Liss.
- Sjøberg, N. O. (2002). *Molekylær genetikk, genteknologi- humant DNA* (3 utgave ed.). Nesbru: Forlaget Vett & Viten AS.

-
- Store Norske Leksikon (2009a). Coelom Retrieved 25 august, 2009, from <http://www.snl.no/bilde/coelom> (leddorm)
- Store Norske Leksikon (2009b). Coelom Retrieved 25 august, 2009, from <http://www.snl.no/coelom>
- Store Norske Leksikon (2009c). Oligochaeta, from <http://www.snl.no/leddormer>
- Sturzenbaum, S. R., Andre, J., Kille, P., & Morgan, A. J. (2009). Earthworm genomes, genes and proteins: the (re)discovery of Darwin's worms. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 276(1658), 789-797.
- Tarrant, J. M. (2005). The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet J*, 170(3), 278-288.
- Valembois, P., Lassegues, M., Hirigoyenberry, F., & Seymour, J. (1993). Clearance and breakdown of pathogenic bacteria injected into the body cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *106C*(1), 255-260.
- Valembois, P., Roch, P., Lassegues, M., & Cassand, P. (1981). Antibacterial Activity of the Hemolytic System from the Earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40, 21-27.
- Vetvicka, V., Sima, P., Cooper, E., Bilej, M., & Roch, P. (1994). Immunology of annelids. 2, 299.
- Vindelov, L. L., Christensen, I. J., & Nissen, N. I. (1983). A DETERGENT-TRYPSIN METHOD FOR THE PREPARATION OF NUCLEI FOR FLOW CYTOMETRIC DNA ANALYSIS. *Cytometry*, 3(5), 323-327.
- Waring, M. J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*, 13(1), 269-282.
- Wikipedia (2009). oligochaetes Retrieved 25 august, 2009, from http://en.wikipedia.org/wiki/Body_cavity
- Wikispaces ((s.a.)). from <http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/coelom.html>
- Withers, P. C. (1992). *Comparative Animal Physiology* (1 ed.). Florida: Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.

6 Vedlegg

6.1 Løsninger

Lumbricus balanced salt solution, LBSS: 71.5mM NaCl, 4.8 med mer KCL, 1.1mM

MgSO₄·7H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.3 mM Na₂H₂PO₄·H₂O og 4.2mM NaHCO₃ justert til pH 7.3 og osmolaritet lik 220mmos.

ACD-buffer: 4.8g/l sitronsyre, 13.2 g/l natrium citrat, 14.7 g/l glukose, justert til pH=5.0

10× PBS buffer: 26.8×10^{-3} M KCl, 14.7×10^{-3} M KH₂PO₄, 1.37 M NaCl, 80.3×10^{-3} M Na₂HPO₄ × 2H₂O, pH justert til 7,4 med NaOH.

4% Paraformaldehyd (PFA) i Sørensen- buffer: 100g paraformaldehyd veies inn i avtrekkskap og løses i 200ml dH₂O ved 60°C med røring. Tilsatte NaOH pellets (Sigma) til pH10 ble oppnådd (ca15). Løsningen er helt gjennomsiktig når den er ordentlig løst. Denne 40% PFA løsningen ble så fortynnet videre til 4% i *Sørensen buffer* (1,0125 L 0,2M Na₂HPO₄, 237,5 ml 0,2M NaH₂PO₄, pH 7,4). Løsningen ble lagret som aliquoter i 15ml rør ved -20 °C. Ved bruk ble løsningen tint i vannbad ved 37 °C. Løsningen kan fryses og tines 3×.

Blokkeringsløsning: LBSS med 5% FBS og 2% 0,5M EDTA

Primærantistoffløsning: 8,75µl 10% tritonx-100 (stockløsning fortynnet i LBSS), 7µl pAb (Ki-67, mus-anti-human #M7240, 334,25µl blokkeringsbuffer).

Sekundærantistoffløsning: (Alexa 555 geit-antimus #...., fortynnet 1:200 i blokkeringsbuffer).

PMA-løsning: 1mg PMA ble løst i 100µl 20% DMSO til PMA stock konsentrasjon på 20mM. Bruksløsning lages ved at PMA stockløsning fortynnes ytterligere med 20% DMSO til PMA konsentrasjon lik 0,2mM.

Vindeløvs propidium iodide (PI): 10mM Tris base, 10mM NaCl, 700U/l RNAse, $7,5 \times 10^{-5}$ M PI, 0,1ml/100ml Nonidet P-40, pH 8, filtrert gjennom 0,45µm filter).

Modifisert LBSS buffer/ LBSS buffer med EDTA og serum (FBS) brukt som standard celleekstraksjonsbuffer etterhvert:

48ml LBSS

1ml FBS

1ml 0,5M EDTA

DSMO: 20 % DMSO ble laget fra 100% DMSO løsning, ved å ta ut 20µl DSMO som ble tilsatt i 80µl PCR vann.

PMA:

Molekylvekt: 511g/mol

Mengde: 1mg

Ønsker stock løsning på 20mM = 20×10^{-3} M = 0,020 M

$$511 \text{ g/mol} \times 20 \times 10^{-3} \text{ mol/l} = 10,22 \text{ g/l} = 0,01022 \text{ g/ml} = 0,00001022 \text{ g/}\mu\text{l} \\ = 0,001022 \text{ g/100}\mu\text{l}$$

= 1mg/100µl dvs PMA løsning med en konsentrasjon lik 10µg/µl.

Denne konsentrasjonen ble laget ved å blande 1mg PMA i 100µl 20% DMSO (konsentrasjon på 20mM). Denne løsningen ble fordelt med hensiktsmessig mengde PMA (f.eks. 5µl) i lystette rør på mørkerom og plasseres i mørk boks. De allokoterte løsningen ble så fryst ned ved -20°C.

LB-medium /LA skåler:

10g Trypton

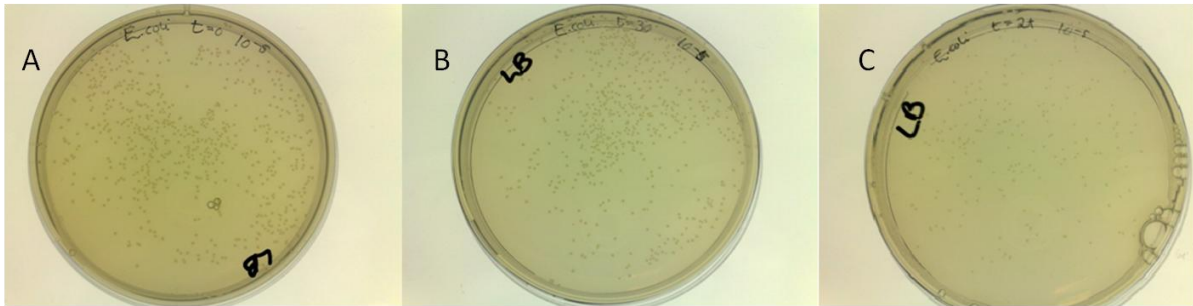
5g Gjærekstrakt

10g NaCl

Juster til pH 7 med 5M NaOH. Tilsett eventuelt 20g (2%) agar pr. liter for å lage LA skåler.

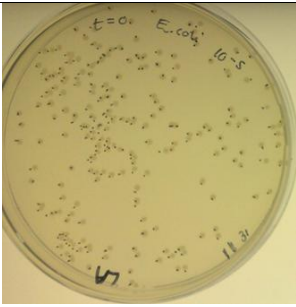
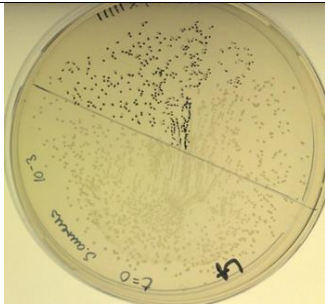
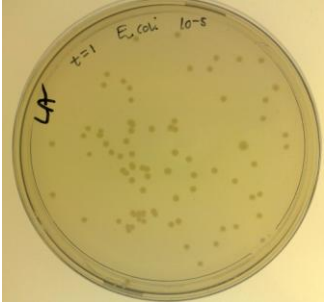

TSA-softagar : 0,5g agar pr 100ml flytende TSB medium

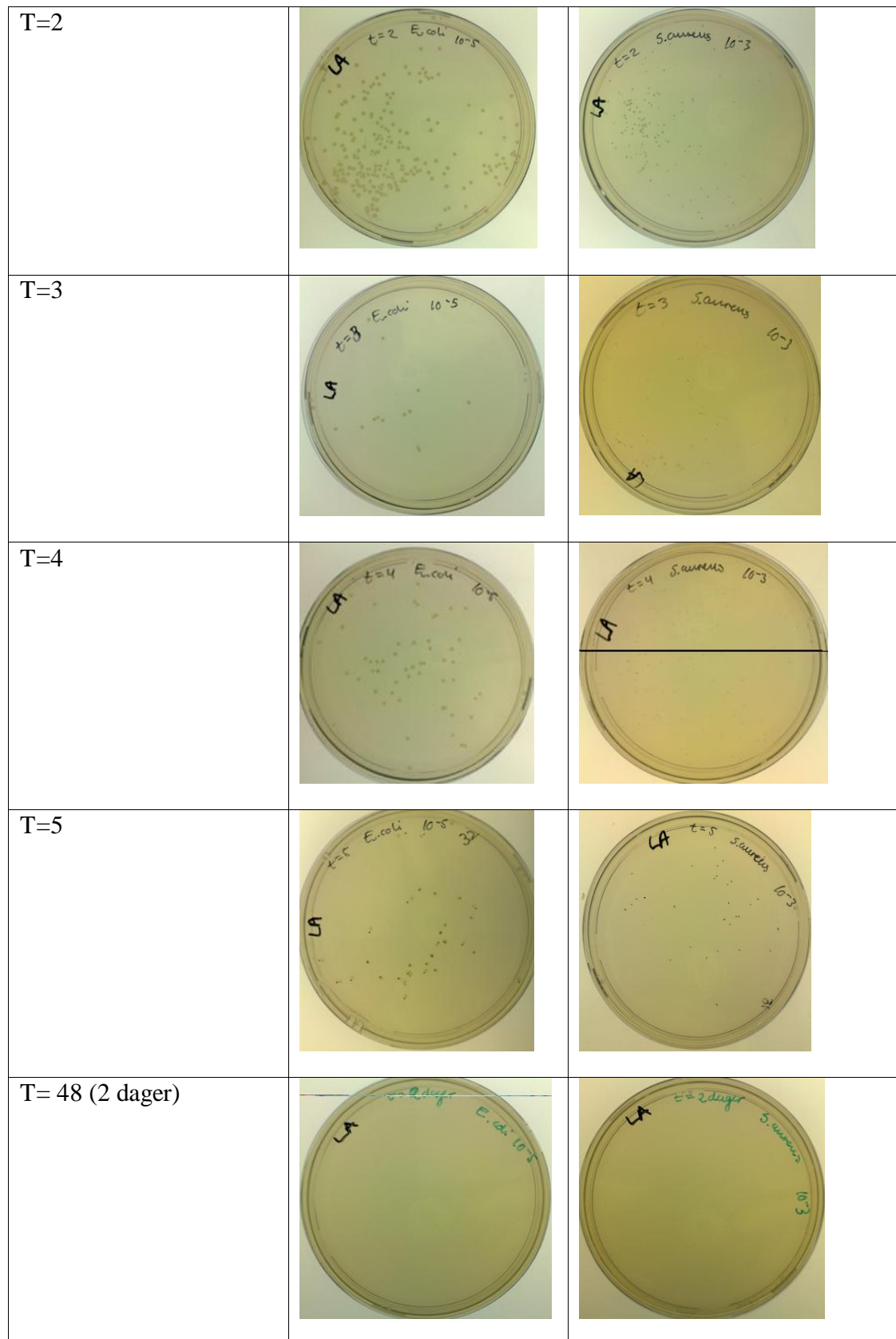
6.2 Studie av invitro vekst ved bakterieinkubasjon i coelomvæske



Figur 34. Inkubering av *E. coli* i cellefri coelomvæske. Bildene viser antall kolonier som oppstod ved utplating av prøver tatt ut ved tidspunktene (A) $t=0$ (tidspunktet for inkulering av bakterieløsning i coelomløsning), (B) $t=30$ utplating gjort etter 30 min inkubasjon og (C) $t=120$ utplating gjort etter 2 timer. Prøvene som ble plattet ut stammet fra løsning av *E. coli* inkubert i oppkonsentrert sterilfiltrert cellefri coelomvæske. Frysetørket produkt hadde en konsentrasjon på 0,214g/ml.

Bildene nedenfor hentet fra et av forsøkene i studien av antimikrobiell effekt. Ved ulike tidpunkter ble det plattet ut prøver fra løsninger hvor *E. coli* og *S. aureus* ble inkubert med konsentrert sterilfiltrert cellefri coelomvæske.

Tid (timer)	<i>E. coli</i> , 10^{-5} fortyning	<i>S. aureus</i> , 10^{-3} fortyning
T=0		
T=1		

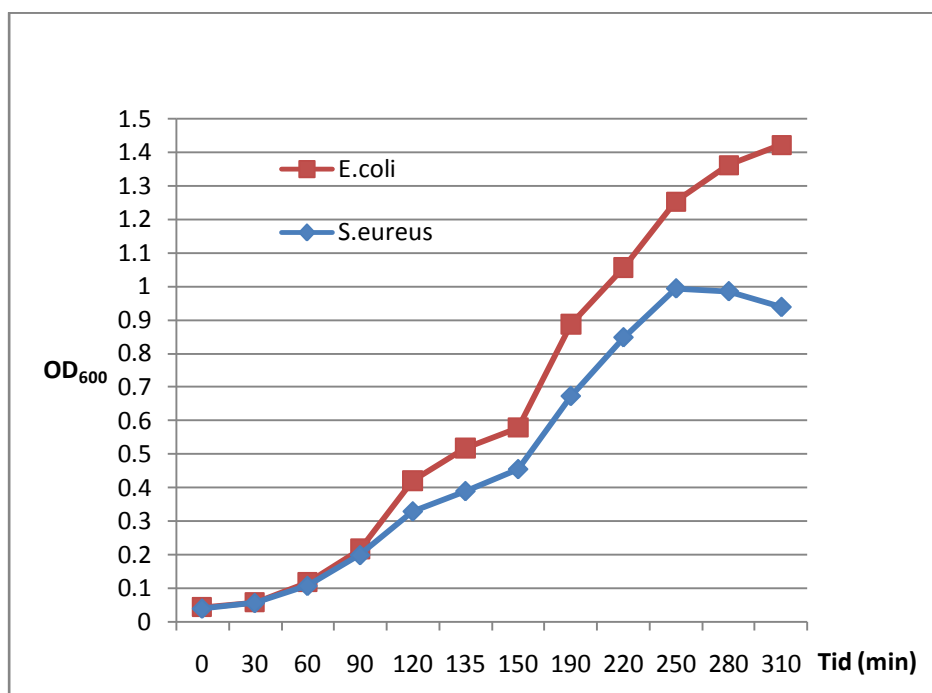


Figur 35. Viser virkningen av den antimikrobielle effekten på bakteriene *E. coli* og *S. aureus* over tid. Etter 2 dager kunne det ikke detekteres noe vekst til tross for høyt totalantall ved start ($t=0$). I kontrollen hvor de samme bakterieløsningene ble inkubert i dH_2O , var det imidlertid

utrolig mye vekst etter 2 dager. Resultatene viser helt klart at coelomvæska har en antimikrobiell effekt som er synlig over tid.

6.3 Bakteriejisering

Injisering av mark ble utført for å trigge frem en immunrespons og ulike bakterier ble injisert for å studere hvor bredspektret en immunrespons kunne. Vekstkurve ble laget for å anslå når bakteriene som skulle brukes til injisering nådde $OD=0,5$. Nedenfor er vekstkurvene til *E. coli* og *B. cereus* vist grafisk.



Figur 36. Vekstkurver av bakteriekulturer med *E. coli* eller *S. aureus* basert på OD måling over et tidsrom på 5 timer. Vekstkurven ble brukt til å grovt anslå når bakteriekulturer hadde nådd en bestemt OD, for eksempel ved injisering hvor kulturene skulle ha $OD=0,5$.

Mark ble oppbevar i kasser med jord etter injisering, da oppbevaring i kasser uten jord førte til høy dødelighet.

6.4 OD-Ct forhold for å finne optimalt blandingsforhold av bakterier.

OD-Ct forhold ble brukt til å finne optimalt blandingsforhold av bakterier ved testing av drap i immuncelleløsning og immuncellesupernatant.

Tabell 6. Viser OD målinger for ulike bakterier som ble blandet sammen ved optimalisering av PMA forsøk. Hensikten var at det skulle være lik tetthet av alle bakteriene. Blandingsforholdet ble bestemt ut i fra OD verdier og Ct forhold ved realtime PCR analyse.

Tid, t [min]	<i>E. coli</i> [OD(600nm)]	<i>S. aureus</i> [OD(600nm)]	<i>B. cereus</i> [OD(600nm)]	<i>List. innocula</i> [OD(600nm)]	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> [OD(600nm)]	<i>Acidovorax facilis</i> [OD(600nm)]
0	0,076	0,075	0,064	0,023	0,0234	0,02
30	0,077	0,089	0,085	0,027		
60	0,083	0,161	0,169	0,042		
90	0,103	0,319	0,413	0,068		
120	0,176	0,629	0,833	0,100		
150	0,551	0,931	1,341	0,181		
180	0,778	1,075	1,524	0,285		
210	1,086	1,296	1,721	0,459		
240				0,730		
270				0,970		
.....						
270					0,0734	
310					0,0963	
315					0,0969	
345					0,1199	
375					0,1382	
420					0,1639	
435					0,1986	
480					0,2380	
....						
1200						0,063
1380						0,097
1410						0,106
1440						0,118
1470						0,134
1500						0,145
1530						0,165
1590						0,193
1650						0,235

6.5 Immunofarging

Hensikten med dette forsøket var å detektere prolifererende coelomocytter i fluorescensmikroskopet ved hjelp av immunofarging. Immunceller ble ekstrahert i modifisert LBSS ved elektrostimulering som beskrevet i avsnitt 2.2.3. Celleprøvende ble sentrifugert ved 150g i 10 min ved 4 °C og cellepellet ble resuspendert i 15ml 4 % PFA for fiksering. Cellene ble inkubert på is i 10 min før de ble vasket 2 ganger ved å sentrifugere ved 145g, 4 °C i 10 min. Cellepellet ble resuspendert i 15ml modifisert LBSS buffer hver gang, men etter siste sentrifugering ble pellet løst i *blokkeringsløsning* (LBSS med 5 % FBS og 2 % 0,5M EDTA). Cellene ble inkubert i 30min med rolig vipping på is. Videre ble 180µl celleløsning overført til hver brønn på et 96 brønners brett med v-bunn og sentrifugerte ved 200g i 8min ved 4 °C. Brettet ble invertert raskt for å fjerne supernatantløsning og pelletene ble løst i 50µl *primærantistoffløsning* (8,75µl 10 % tritonx-100 (stockløsning fortynnet i LBSS), 7µl pAb (Ki-67 antigen, mus-anti-human, Dako M7240), 334,25µl blokkeringsbuffer). Cellene ble inkubert med primærantistoff over natt ved 4 °C og vipping. Cellene ble vasket 2 ganger før de ble inkubert med 50µl *sekundærantistoffløsning* (Alexa Fluor® 555 geit-antimus IgG (H+L), Invitrogen, A-21422) fortynnet 1:200 i blokkeringsbuffer) i 1 time på is ved vipping. Cellene ble vasket 2 ganger og til slutt løst i 50µl blokkeringsbuffer. Celleprøvene ble så analysert ved fluorescensmikroskopering (Nikon ECLIPSE Ti-U) og ved bruk av Nikon NIS- Elements Basic Research (versjon 3.00) bildebehandlingsprogram. Ved mikroskopering ble 30µl celleprøve overført på objektglass (1mm (76×26mm), VWR) og dekket med et dekkglass (0,17mm (24×60mm), la fontaine). Det ble brukt TRITZ filter for deteksjon av fluorescens.