

10017

10018

Endringer i cellyklus hos CHSE-214-cellelinje, forårsaket av gjentatt, mildt termisk stress

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy

Mai 2020

Forord

Kjære leser,

Denne bacheloroppgaven er gjennomført og skrevet av to studenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Ålesund. Det har vært en spennende prosess hvor vi har lært mye om både oss selv og emnet. Vi har måttet være løsningsorienterte og fleksible etterhvert som vi har møtt utfordringer, spesielt relatert til covid-19-pandemien. Dyktige medstudenter som hjelper og støtter, er byttet ut med en ikke fullt så engasjert samboer, og der medstudentene stiller i labfrakk stiller samboer i kjøkkenforkle. Faglige diskusjoner på lesesalen er byttet ut med møter på Teams, der rimelige datalinjer fra en studenthybel kanskje ikke har gitt de raskeste og beste dataløsningene.

Vi vil rette en stor takk til nære og kjære som har bidratt med støtte, oppmuntring og forbedring av vår oppgave. Takk til vår veileder Gro Audveig Hagen Bjørnøy for hennes støtte og bidrag gjennom hele prosessen. Til slutt vil vi også takke Håvard Jåstad som har bidratt med uunnværlig korrekturlesing og ikke minst oppmuntring underveis.

Sammendrag

Kunnskap om hvordan gjentatt mildt termisk stress, i form av økte vanntemperaturer, påvirker fisk, er viktig for å forstå potensielle endringer i deres habitat og nedgang i bestander. Det vil videre gi en forståelse for de konsekvenser dette kan ha for fiskerinæringen. Cellelinjen CHSE-214 ble brukt for å studere endringer i stressresponsen, mer spesifikt endringer i cellesyklus, hos celler utsatt for gjentatt mildt termisk stress.

Cellene ble utsatt for termisk stress ved 26 °C i intervaller på to timer. Stressintervallene ble gjentatt én til fire ganger. Mellom stressintervallene fikk cellene hvile i 24 timer ved 20 °C. Stressutsatte celler ble sammenlignet med en kontroll, celler inkubert ved 20 °C.

Analyse av cellesyklus ble gjort ved hjelp av et flowcytometer hvor prosentandel celler i G1/G0-, S- og G2/M-fasen ble bestemt. Det var minimale differanser mellom kontroll og stressforsøkene, noe som indikerer at opp til fire stressintervaller med mildt termisk stress ikke påvirker cellene.

Abstract

Knowledge about the effect thermal stress has on fish, in the form of increased water temperatures, is important in the understanding of potential changes in habitats and declines in populations. This will further provide an understanding of the consequences for fisheries. The cell line CHSE-214 was used to study changes in the stress response, more specifically changes in the cell cycle in cells exposed to repeated, mild thermal stress.

The cells were exposed to thermal stress at 26 °C in two-hour intervals. The stress intervals were repeated one to four times. Between the stress intervals the cells recovered for 24 hours at 20 °C. The stress exposed cells were compared to a control, cells incubated at 20 °C.

Analysis of the cell cycle was done with the help of a flow cytometer where the percentage of cells in G1/G0-, S- and G2/M-phase was determined. There was a minimal difference between the control and the stress-exposed cells, which indicated that up to four stress intervals of mild thermal stress does not affect the cells.

Innholdsfortegnelse

Terminologi og forkortelser	1
Begrensninger	3
1.0 Innledning	4
2.0 Teori	6
2.1 Klimaendringer	6
2.2 Stress	6
2.2.1 Stressorer	6
2.2.2 Stressrespons	7
2.3 Heat shock proteiner	8
2.3.1 HSP70	8
2.4 Cellesyklus	8
2.4.1 Interfase	9
2.4.2 Mitose	9
2.4.3 Regulering av cellesyklus	10
2.4.4 Cellesyklusarrest.....	11
2.4.5 Flowcytometri for å studere cellesyklus	12
2.5 CHSE-214	14
3.0 Materiale og metoder	16
3.1 Cellekultivering	16
3.2 Induksjon av termisk stress	16
3.3 Analyse av cellesyklus på BD Accuri C6 Flowcytometer	17
3.3.1 Fiksering og preparering av prøvemateriale	17
3.3.2 Kalibrering av flowcytometer	18
3.3.3 Analyse på flowcytometer	19
3.4 Analyse av HSP70	20

3.4.1	<i>Stabilisering og lagring av cellulært RNA fra prøvemateriale</i>	20
3.5	<i>Statistiske utregninger av innsamlet data</i>	20
4.0	Resultat	21
4.1	<i>Gjennomsnittlige verdier fra analyse av cellesyklus</i>	21
4.2	<i>Grafisk fremstilling av resultat fra termisk stressforsøk</i>	22
4.3	<i>Statistiske utregninger av innsamlet data</i>	25
4.3.1	<i>Uavhengig T-test for å studere forskjeller mellom stressforsøkene</i>	25
4.3.2	<i>Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom stressforsøk og kontroll</i>	26
4.3.3	<i>Uavhengig T-test for å studere ulikheter ved gjentatte stressintervall</i>	27
5.0	Diskusjon	29
5.1	<i>Cellekultivering</i>	29
5.2	<i>Termisk stressforsøk</i>	29
5.3	<i>Fiksering, preparering og analyse av prøvemateriale på flowcytometer</i>	30
5.4	<i>Analyse av cellesyklus</i>	31
5.4.2	<i>Analyse av cellesyklus etter andre stressintervall</i>	33
5.4.3	<i>Analyse av cellesyklus etter tredje stressintervall</i>	33
5.4.4	<i>Analyse av cellesyklus etter fjerde stressintervall</i>	33
5.4.5	<i>Oppsummering av analyse av cellesyklus</i>	35
5.5	<i>Analyse av HSP70</i>	36
5.6	<i>Videre forskning</i>	37
6.0	Konklusjon	38
	Litteraturliste	39
A.0	Vedlegg	44
A.1	<i>Reagenser</i>	44
A.2	<i>Prosedyrer</i>	45
A.2.1	<i>Rutiner i cellelaboratoriet</i>	45

<i>A.2.2 Cellekultivering</i>	47
<i>A.2.3 Fiksering og preparering av prøvemateriale</i>	49
<i>A.2.4 Kalibrering av flowcytometeret</i>	50
<i>A.2.5 Analysering på flowcytometer</i>	51
<i>A.3 CHSE-214-celler</i>	52
<i>A.4 Histogram over cellesyklus fra analyse på BD Accuri C6 Flowcytometer</i>	53
<i>A.5 Prosentandel celler i cellesyklusfasene</i>	54
<i>A.5.1 Oversikt over prosentandel celler i G1/G0-fasen</i>	55
<i>A.5.2 Oversikt over prosentandel celler i S-fasen</i>	56
<i>A.5.3 Oversikt over prosentandel celler i G2/M-fasen</i>	57
<i>A.6 Resultat fra t-tester</i>	58
<i>A.6.1 Resultat fra t-tester for å studere forskjeller mellom stressforsøkene, ekskludert verdier fra P.4.1.3</i>	58
<i>A.6.2 Resultat fra t-tester for å studere ulikheter mellom stressforsøk og kontroll, ekskludert verdiene fra P.4.1.3</i>	59
<i>A.6.3 Resultat fra t-tester for å studere ulikheter ved gjentatte stressintervall i stressforsøk en, ekskludert P.4.1.3</i>	60
<i>A.6.4 Resultat fra t-tester for å studere ulikheter ved gjentatte stressintervall i stressforsøk to</i>	61
<i>A.6.5 Resultat fra t-tester hvor verdier fra P.4.1.3 inngår i datasettet</i>	62

Terminologi og forkortelser

Adherente celler	Celler som ved hjelp av proteiner på overflaten vokser bundet til en overflate
Anadrome organismer	Organismer som vil i løpet av sitt livsspan vil kunne bevege seg fra saltvann til ferskvann
Cdc	Proteiner som inngår i cellesyklus
CDK	Cyclin-dependent kinaser
Chaperoner	Gruppe proteiner som i en celle deltar i organisering, sammenkobling, folding og pakking av andre proteiner. Det deltar også i degradering av proteiner
CHSE	Chinook salmon embryotic cells
Cellesuspensjon	Celler som flyter løst i en væske uten å være bundet til en overflate
Co-chaperon	Proteiner som assisterer chaperoner i protein folding og andre funksjoner
Homeostase	Cellens indre likevekt, hvor de kjemiske og fysiske forhold i væskemiljøet som omgir cellen skal være konstante og stabile
HSF	Heat shock factor
HSP	Heat shock protein
kDa	Kilodalton

Konfluens	Hvor stor andel i prosent av overflaten på en beholder cellekulturen dekker
LAF-Benk	Sikkerhetsbenk for arbeid med biologisk materiale. Benken har laminær luftstrøm og front som beskytter mot kontaminering
Passasjenummer	Antall ganger en cellekultur har blitt splittet

Begrensninger

Alvorlig sykdom og dødsfall

I løpet av bachelorperioden ble faren til en av forfatterne alvorlig syk og døde tidlig i april måned. Det emosjonelle med sykdom og deretter bortgang har medført utfordringer med å opprettholde konsentrasjon og holde fremdriften med bacheloroppgaven.

Korona-pandemi

Covid-19 pandemien førte til en uforutsett nedstenging av universitetet. Dette gjorde det umulig å fullføre store deler av laboratoriarbeidet. Del én av forsøket var planlagt å utføres over ni dager, men måtte avsluttes etter fire dager. I tillegg ble del to, analyse av HSP70 ved qPCR, ikke mulig å utføre og dermed fjernet fra oppgaven. Oppgaven er dermed mindre enn planlagt og problemstilling er endret fra “*Hvordan vil nivået av HSP70 endres i CHSE-214-celler ved gjentatt, mildt termisk stress og vil det ha en sammenheng med en endringer i cellesyklus?*” til en med fokus på kun analyse av cellesyklus etter termisk stress.

Leveringstid

Leveringstiden på CHSE-214-cellene viste seg å være lengre enn forespeilet. Fra en planlagt oppstart rundt 25. januar ble oppstart justert til leveringsfrist den 6. februar. Cellene ble levert 20 februar og laboratoriarbeidet kunne tidligst starte én uke senere.

1.0 Innledning

Global oppvarming påvirker ikke bare livet på land. Økte overflatetemperaturer gir flere langvarige og mer hyppige forekomster av marine hetebølger. Den globale oppvarmingen vil ha stor innvirkning på fiskerinæringen, noe også FNs klimarapport poengterer (1). Økte temperaturer vil føre til at fiskebestander reduseres som følgelig kan gi redusert fangst for fiskerne. Miljødirektoratet indikerer at en temperaturøkning på 1,5 °C gir en reduksjon på 1,5 millioner tonn i årlig fangst. Fangsten vil reduseres med det dobbelte dersom temperaturen øker ytterligere, opp til 2 °C (2;3). Med 200 millioner jobber knyttet til denne næringen, kombinert med at 17 % av alt animalsk protein konsumert stammer fra fisk, vil en slik potensiell reduksjon i fangst få store økonomiske- og ernæringsmessige konsekvenser (4;5). Som en følge av økt vanntemperatur i fiskens opprinnelige, naturlige habitat vil en, i tillegg til en reduksjon i fangst, også se at det biologiske mangfoldet svekkes og at arter forflytter seg nordover (1).

Konsekvensene av global oppvarming på fiskebestander vil kunne studeres ved bruk av laks som indikatorart (6). Laks vil, i løpet av sitt livsløp, vandre mellom salt- og ferskvann (6;7). Vandringsmønsteret gjør at arten blir utsatt for forhøyede temperaturer gjentatte ganger (8). Økte vanntemperaturer vil påføre laksen stress som i ytterste konsekvens vil føre til død. Dødelighet er forbundet med stress i høye doser, men kan ved lavere doser være en fordel og gjøre fisken mer tilpasningsdyktig (9).

Kunnskapen om effektene av lave doser stress er begrenset. Dette innebærer hvordan kortvarig og gjentatt stress påvirker fisk på et cellulært nivå, deriblant proteinekspresjon og cellyklus (9). Cellyklus kan ved stress gå inn i en cellyklusarrest hvor det ikke vil gjennomføres en celledeling som et forsvar mot cellulær skade (10). For å studere endringer i cellyklus brukes cellelinjen CHSE-214, en primær cellelinje fra lakseembryo. Tidligere studier har observert at en temperatur på 26 °C gir en cellulær stressrespons uten at cellene går i apoptose (11;12). Dette vil dermed betegnes som en lav dose stress, også kalt mildt stress (9).

Vi skal i denne oppgaven undersøke om mildt stress av CHSE-214-celler gjentatt over et tidsrom, vil føre til endringer i cellyklus. Oppgaven er bygget opp etter følgende oppsett;

Først fremlegges teori relevant for oppgaven, etterfulgt av materialer og metoder brukt på laboratoriet. Deretter presenteres resultatene, som videre drøftes i diskusjonsdelen. Oppgaven rundes av med en konklusjon, før litteraturliste og vedlegg legges frem avslutningsvis.

2.0 Teori

2.1 Klimaendringer

De siste 70 årene har både luft- og vanntemperaturer på jorden steget, trolig som følge av global oppvarming (13). Endringene i temperaturer kan gi forandringer i de naturlige døgnvariasjonene og føre til økt hyppighet av sporadiske ekstreme temperaturer (14). Dette vil blant annet ha konsekvenser for mange fiskearter og deres marine økosystem (15). Fisk er sensitive til endringer i vanntemperatur da de er vekselvarme (7). Den innvendige temperaturen varierer normalt ikke med mer enn én grad fra miljøet rundt (14). For å opprettholde ideell kroppstemperatur ser vi at noen fiskearter trekker lenger nord mot kjøligere hav, eller på dypere vann for å unngå varme overflatetemperaturer forårsaket av klimaendringer (1).

Laks som lever i nordlige områder trues av både fiskearter som forflytter seg nordover og den økte vanntemperaturen (16). Effektene av global oppvarming kan studeres ved å bruke laks som en indikatorart siden de påvirkes av både fersk- og saltvann (6). Dette kommer av at de er anadrome organismer (7). Vekst hos lakseunger i både yngel- og parrstadiet påvirkes av temperaturen i vannet og veksten vil stoppe opp ved rundt 23 °C. Overstiger temperaturen 27,4 °C er dette potensielt dødelig (17). Miramichi River i Canada har hatt en temperaturøkning som trolig er årsaken til den observerte nedgangen i elvens laksebestand (14). Målinger fra elven viser at temperaturen kan nå opp til 27-30 °C i sommermånedene (18). Laks hentet fra elven ved 27 °C uttrykker høyere verdier av stressproteiner enn de hentet ut ved lavere temperatur. Resultatene indikerer at forhøyede temperatur er en stressor for fisken (14).

2.2 Stress

2.2.1 Stressorer

Stressorer er et omfattende utvalg av krevende psykologiske og fysiologiske påvirkninger som sammen med organismenes stressrespons, utgjør begrepet stress (19). Når en organisme eksponeres for stress vil dens homeostase påvirkes negativt (20). Dette kan føre til forstyrrelse av normal biologisk atferd, svekkelse eller død (6). For å redusere risikoen eller forhindre

skade vil organismen sette i gang en stressrespons som arbeider for å gjenopprette organismens homeostase (20).

I akvatisk miljø finner vi kjemiske og fysiske stressorer som påfører de vannlevende organismene stress. Kjemiske stressorer vil kunne være oppløst oksygen, ammoniakk, pH, gassinnhold og metaller. Forandringer i temperatur eller trykk er fysiske stressorer. Alle disse stressorene vil kunne påføre organismen alvorlig stress eller død (20).

2.2.2 Stressrespons

Organismes stressrespons starter med at sentralnervesystemet mottar signaler om at homeostasen blir truet. Da settes det i gang en biologisk respons bestående av en kompleks kombinasjon av fire ulike biologiske forsvarsmekanismer: atferdsrespons, respons fra det autonome nervesystemet, neuroendokrin respons og immunologisk respons (21). Hos fisk inngår dette i primær respons, sekundær respons og tertiær respons (20).

Primærresponsen er den neuroendokrine responsen. Her forekommer det en rask utskillelse av stresshormonene katekolaminer og kortisol til blodomløpet (20). Katekolaminer er fellesbetegnelsen for dopamin, noradrenalin og adrenalin (22).

Sekundærresponsen inkluderer de mangfoldige fysiologiske og biokjemiske tilpasningene som er assosiert med stress. Disse er alle til en viss grad påvirket av stresshormoner. Stresshormoner aktiverer regulatoriske signalveier som resulterer i endringer i metabolske-, cellulære-, osmoregulatoriske- og hematologiske endringer. Ved cellulær respons vil signalveiene sende signal til celler om å produsere heat shock proteiner (HSP), en av de mest typiske reaksjonene i dette eksempelet (20).

Tertiærresponsen representerer endringer som forekommer hos organismer og hele populasjoner. Hvis organismen ikke klarer å få en tilstrekkelig sekundærrespons vil det resultere i nedgang i vekst, sykdomsresistens og reproduksjon. Langvarig eksponering for en stressor, avhengig av intensitet, vil dermed kunne ha konsekvenser for organismen. I noen tilfeller kan dette føre til en nedgang i hele populasjoner (20).

2.3 Heat shock proteiner

Heat shock proteiner (HSP) fungerer som molekylære chaperoner i samarbeid med co-chaperoner ved å opprettholde proteinhomeostase. Dette foregår i både normalt tilstand og ved påføring av stress fra en stressor. Forhøyede temperaturer var tidligere trodd å være den eneste årsaken til oppregulering av HSP, men nyere studier viser at også oksidativt stress, tungmetaller, lav oksygenkonsentrasjon og infeksjoner kan føre til uttrykk av HSP (23;24). Deres funksjon som molekylære chaperoner gjør HSP i stand til å bistå med folding av denaturerte protein, stabilisering, translokasjon og forhindring av aggregering (25). Den molekylære størrelsen målt i kDa avgjør proteinets navn. Eksempelvis vil et HSP med en størrelse på 70 kDa følgelig hete HSP70 (26).

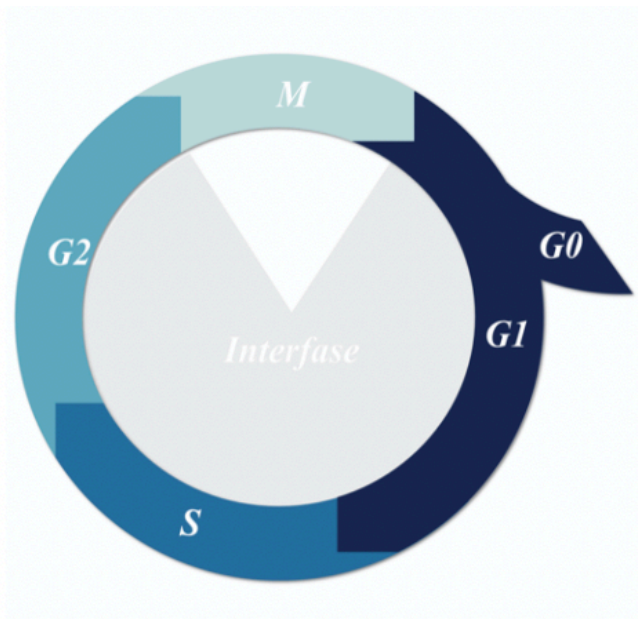
2.3.1 HSP70

HSP70, som er en av de mest studerte i HSPene, har chaperon- og proteaseaktivitet med flere funksjoner i forbindelse med folding og celledeling, deriblant folding og sammensetning av ny-syntetiserte protein, membran translokasjon, regulering av regulatoriske protein og forhindring, oppløsning og re-folding av aggregerte og denaturerte protein (23;26;27). HSP70 inneholder ett ATPase domene på N-terminus, og ett substratbindingsdomene på C-terminus. Ved hjelp av co-chaperonene J-domene protein, vil ATPase domenet hydrolysere ATP til ADP. Dette frigir energi som benyttes til bindingen av substrat. Frigjøring av substratet er avhengig av co-chaperonet nucleotide exchange factor som promoterer fosforyleringen av ADP til ATP. Substratet som HSP70 binder, kan være regulatoriske protein og vil dermed kontrollere flere signaliseringsveier som påvirker homeostase, celledeling og apoptose. Ett av de regulatoriske proteinene som påvirkes er CyclinB1/Cdk1. Dette er et protein som regulerer om cellen skal gjennomgå celledeling i mitose (27;28). HSP70 motvirker også apoptose ved å virke på kaspase-signalveien som den styres av (27).

2.4 Cellesyklus

En cellesyklus består av regulerte hendelser der resultatet er at en celle deler seg i to identiske datterceller. De to dattercellene inneholder en komplett kopi av genomet, altså celledens arvemateriale, og er derav genetisk identiske. Cellesyklusens varighet avhenger av cellens granularitet og kompleksiteten til arvestoffet (29). Hos eukaryote celler deles cellesyklusen inn i fire faser: G1-, G2-, S- og M-fasen. De tre første fasene innebærer at cellen vokser i

størrelse før den i siste fase gjennomgår en celledeling (30). Overgangen mellom disse fasene reguleres av kontrollpunkt som kontrollerer at deres prosesser blir korrekt utført (29).



Figur 1: Fremstilling av cellyklus og dens fire ulike faser; G1, S, G2 og M. Interfase hvor cellen klargjør seg for celledeling består av G1-, S- og G2-fasen. Etter fullført interfase gjennomføres celledeling, som er den fysiske separasjonen av cellen, i M-fasen. Deretter vil cellen enten tre inn i en ny cellyklus eller tre inn i hvilefasen, G0. Figuren er basert på (30), UiO: Institutt for biovitenskap sin figur over cellyklus.

2.4.1 Interfase

G1-, S-, og G2-fasen danner interfase. Dette er perioden hvor cellen gjør seg klar for celledeling (29). I G1-fasen vil cellen hovedsakelig vokse i størrelse og gjøre seg klar til å tre inn i S-fasen. Før dette skjer må cellen gjennomgå et kontrollpunkt som styres av intracellulære- og ekstracellulære signaler. De intracellulære signalene vil informere om celledørrelse og de ekstracellulære signalene vil informere om miljøet rundt cellen. Ligger disse to forholdene til rette vil cellen passere kontrollpunktet og tre inn i S-fasen. Der vil DNA replikeres og dobles. Videre går cellen inn i G2-fasen hvor den fortsetter å forberede seg til M-fasen (31).

2.4.2 Mitose

I mitosen deler cellen seg i to identiske datterceller. Mitosen er delt opp i seks faser: Profase, prometafase, metafase, anafase, telofase og cytokinese. Fra profasen til telofasen foregår

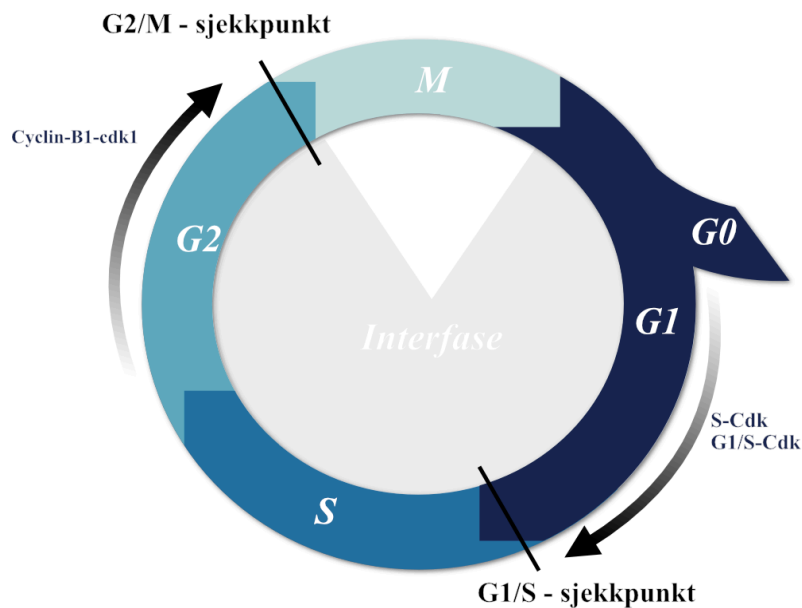
splittelsesprosessen av søsterkromatidene og resten av organellene. Etter at de er fordelt til cellens to poler går cellen inn i cytokinesen hvor cellen fysisk splittes i to av en kontrakttilring. Dette markerer slutten på mitosen og cellene vil enten gå inn i en ny interfase, eller gå inn i en G₀-fase som er en hvilefase. For at cellen skal ut av hvilefase kreves det ekstracellulært stimuli fra mitogener (29;30).

2.4.3 Regulering av cellesyklus

Cellesykluskontrollsystemet er et reguleringsystem som baserer seg på en rekke biokjemiske brytere. Spesifikke kinaser og fosfataser står for reguleringen ved henholdsvis fosforylering og defosforylering av viktige proteiner og proteinkomplekser. Kinaser vil ved fosforylering overføre en fosfatgruppe til proteinet slik at det aktiveres (29).

Kinasene presenteres gjennom hele cellesyklusen og reguleres av koenzymer kalt cycliner. Cyclinene har ikke enzymatisk aktivitet, men bindes til og aktiverer spesifikke kinaser. Dette betyr at én cyclin kun bindes til én bestemt kinase. Kinasene i cellesyklusen kalles for cyclin-avhengige-protein-kinaser, cdks. I cellesykluskontrollsystemet finnes det en del ulike cycliner og cdks som stimulerer overgangen til neste fase i syklusen. Overgangen fra G₁- til S-fasen stimuleres av S-cdk og G₁/S-cdk som dannes ved at S-cykliner og G₁/S-cykliner bindes til spesifikke cdks sent i G₁-fasen (29).

Konsentrasjonen av cycliner og cdk øker gradvis gjennom cellesyklusen frem til cellen går over i neste fase. Aktiviteten til cyclin-cdk reguleres av en kombinasjon av spesifikke kinaser, fosfataser og inhibitorproteiner. Disse proteinene inngår som en del av kontrollpunktene i cellesyklusen ved at de hemmer eller aktiverer kompleksene avhengig av hvilke signaler som sendes. Sendes det signaler om at cellen trenger mer tid til å vokse eller at de ekstracellulære forholdene ikke er tilrettelagt for celledeling vil cyclin-cdk hemmes. Da settes syklusen på pause og det har forekommet en cellesyklusarrest. (29).



Figur 2: Fremstilling av cellyklus med to av tre sjekkpunkt og cdks knyttet til disse sjekkpunktene. I G1-fasen oppkonsentreres det S- og G1/S-cdk ved positive tilbakemeldinger om cellens indre og ytre miljø slik at cellen kommer seg gjennom G1/S-sjekkpunktet og inn i S-fasen. I G2-fasen oppkonsentreres det inaktivt cyclin-B1-cdk1 som aktiveres av en fosfatase ved positive tilbakemeldinger fra G2/M-sjekkpunktet slik at cellen kan tre inn i M-fasen (29) Figuren er basert på (30), UiO: Institutt for biovitenskap sin figur over cellyklus.

2.4.4 Cellyklusarrest

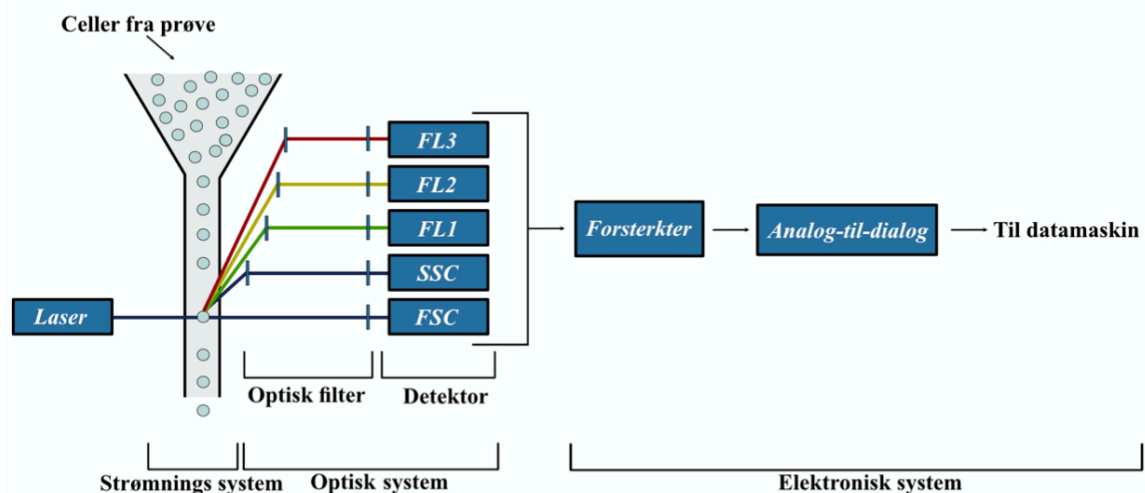
Cellyklusarrest er en respons på cellulært stress i form av kjemisk eller fysisk stress og er en cellulær forsvarsmekanisme (10). Syklusen settes i arrest når kontrollpunktene i kontrollsystemet til cellyklusen får signaler om en feil. Dette kan skyldes skader på DNA, eller at cellen befinner seg i et ugunstig miljø for å kunne fullføre celledelingen (32).

For at cellen skal entre M-fasen må det passere G2/M-fase kontrollpunktet samtidig som den er avhengig av Cyclin-B1-cdk1-komplekset (33). Inaktivt cyclin-B1-cdk1 oppkonsentreres gjennom G2-fasen, og aktiveres av fosfatase cdc25 ved positiv tilbakemelding fra kontrollpunktet. Cellen går derav inn i M-fasen (28). Hvis det derimot blir gitt negative tilbakemeldinger vil Cyclin B1-cdk1 inhiberes og cellen går i cellyklusarrest (29). Det har blitt påvist at mildt termisk stress etterfulgt av en dødelig dose termisk stress kan føre til G2/M-arrest. Det er da økt ekspresjon av HSP70, en respons på termisk stress, som bidrar til negative tilbakemeldinger og som en konsekvens fører til cellyklusarrest (33).

I humane glioblastomaceller, en aggressiv form for kreft i hjernen, er det påvist at ekspresjonen av HSP70 har en sammenheng med induseringen av den cyclin-avhengig-kinase-inhibitoren p21 (33). Økt konsentrasjon av HSP70 vil stimulere til aktivering av p53-proteinet. Videre vil p53 starte transkripsjonen av p21 ved å binde seg til den regulatoriske regionen av genet. Proteinet p21 vil inhibere G1/S-cdk og S-cdk, slik at cellen havner i G1-arrest (29).

2.4.5 Flowcytometri for å studere cellesyklus

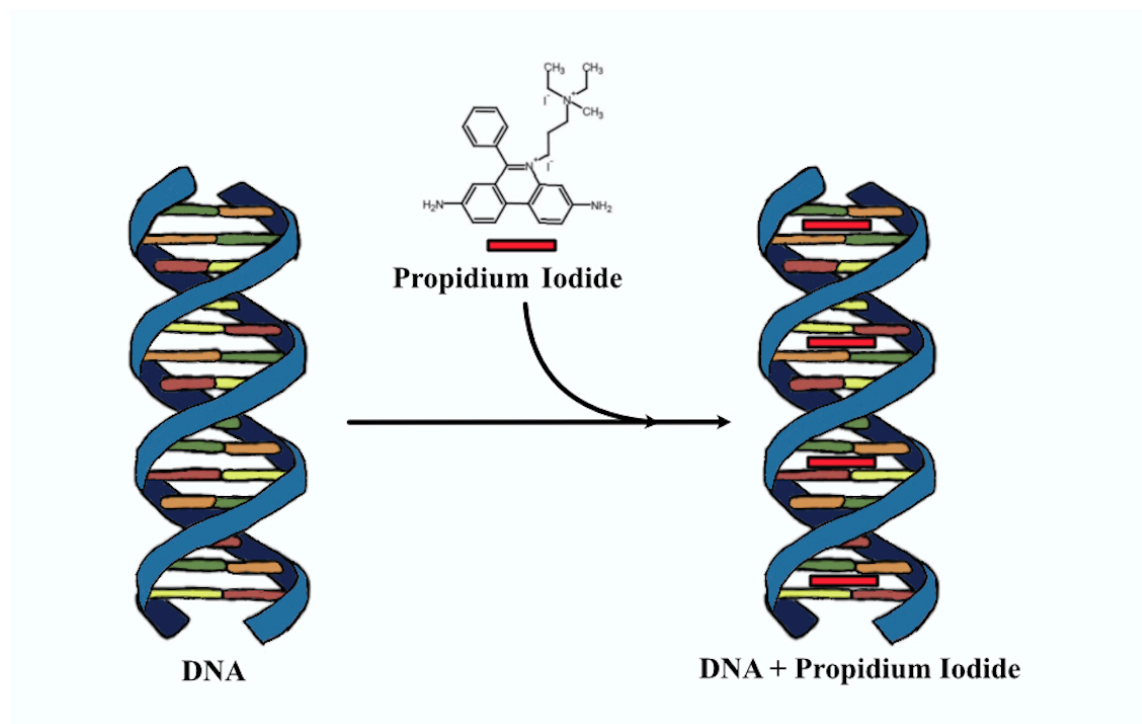
Flowcytometri er en teknikk som benyttes for å studere enkeltceller. Cellene må være i en suspensjon der hver enkelt celle vil gjennom en væskestrøm føres forbi en lysstråle (34). Lysstrålen vil brytes når den treffer cellen og denne lysspredningen måles av en detektor. En lysstråle med en 0.5-2 graders vinkel kalles for forward scatter, og sier hovedsakelig noe om cellens størrelse. En lysstråle med en 90 graders vinkel kalles for side scatter og informerer om cellens granularitet og kompleksitet (35). Resultatet av analysen kan uttrykkes i et histogram (34).



Figur 3: Figuren viser en forenklet oppbygging av et flowcytometer med de tre systemene; strømning, optisk og elektronisk. Strømnings systemet behandler selve prøven. Dette innebærer aspirering av prøven og væskestrømmen som fører en og en celle gjennom systemet. Lyset fra laseren vil treffe cellen og bryte lyset i ulike vinkler. Det brutte lyset vil detekteres av detektorer i det optiske systemet. Detektorene sender signal videre til det elektroniske systemet hvor signalet forsterkes. Deretter omgjøres signalet fra et analogt til et digitalt signal som kan leses av en datamaskin. Datamaskinen er det elektroniske systemet og

vil gi informasjon om cellen basert på hvilke detektorer signalet ble sendt fra (36). Figuren er basert på (36), Castillo-Hair S. sin figur.

Når en skal analysere celledyklusen må cellene på forhånd fikseres og videre merkes med en fluoriserende reagens. Dette kan gjøres ved å bruke propidium iodide/RNase (PI/RNase). PI er en fluorofor med rød farge som bindes både til DNA og RNA, mens RNase bryter ned RNA, slik at dette ikke påvirker resultatet (37).



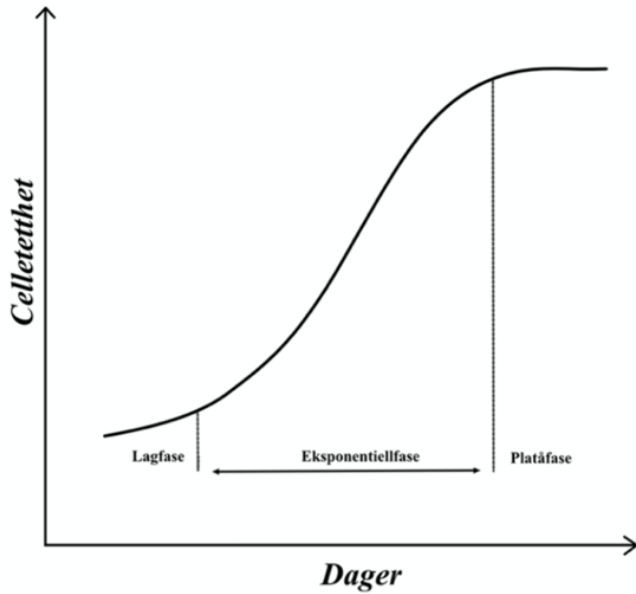
Figur 4: Fremstilling av hvordan PI/RNase interagerer med dobbeltrådig DNA. Det fluoriserende reagentet bindes til og markerer nukleinsyrene (37). Figuren er basert på informasjon fra (37), BD Bioscience; Optical filter guide.

Etter fiksering vil celledyklusjonen kunne analyseres i flowcytometeret. Ved bruk av PI/RNase som den fluoriserende reagenten benyttes detektorene FL2 og FL3, og resultatene fremvises i ulike plot (37). Resultatene i plotet kan fremvises ved ulike diagram, blant annet som et histogram. I tillegg velges det bestemte parametere som vil definere en gate som begrenser plotet. Ved analyse av celledyklus velges en gating som gir en oversikt over antall celler i hver celledyklusfase. Histogrammet vil da vise en prosentfordeling av antall celler i de ulike fasene (38).

2.5 CHSE-214

CHSE-214 er embryoceller hentet fra fiskearten Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (39). En voksen Chinook Salmon lever i Stillehavet og gyter i elver om høsten (40). I en cellekultur vokser CHSE-214 i et monolag bundet til overflaten av beholderen ved hjelp av overflateproteiner, og er dermed adherente (41;42). Ved dyrkning er cellene avhengige av at miljøet er tilrettelagt for vekst. Dette innebærer bestemte næringsstoff, tilgang på 5 % CO₂, en temperatur på 21 grader og en inkubator med fravær av lys (39). Leibovitz's L-15 Medium er anbefalt for bruk til embryoceller. Det inneholder galaktose, phenol red og sodium pyruvat, i tillegg til GlutaMAX som minimerer det giftige ammonium-innholdet. L-15 medium er laget for bruk uten tilgang på CO₂ og vil opprettholde fysiologisk pH. Alene er ikke L-15 medium tilstrekkelig for å dyrke CHSE-214-celler. I tillegg kreves 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) som tilfører lipider, protein og vekstfaktorer som ikke er inkludert i mediet (43).

I tillegg til det rette miljøet krever CHSE-214-celler signaler fra naboceller for vekst. Denne celledisignaliseringen foregår ved at cellene frigir kjemiske stoffer som mottas av reseptorene på andre celler. Det er fire hovedformer for celledisignalisering: parakrin, synaptisk, autokrin og endokrin. Den parakrine signaliseringen er viktig for CHSE-214-cellene da denne innebærer signalisering over en kort distanse, altså mellom naboceller (29). Ved fravær av celledisignalisering vil veksten hemmes og cellen kan gå i apoptose (44). Veksten vil videre være begrenset av overflatearealet i beholderen og cellene bør derfor splittes når de er i eksponentiell fase med en konfluens på 70-80 % (39;45).



Figur 4: Grafisk fremstilling av de ulike fasene i cellevekst: lagfase, eksponentiellfase og platåfase. Lagfase er den innledende fasen hvor cellene gjør seg klare for replikasjon ved blant annet syntetisering av proteiner og andre molekyler. Når cellene er klare for å dele seg går de inn i den eksponentielle fasen. Her vil cellene replikeres raskt og antallet økes. Videre vil mangel på næringsstoff, mindre areal til vekst og avfallsstoffer føre til at veksten trer inn i platåfasen. Her vil veksten bremse opp og det skjer ingen økning i antall celler (46). Figuren er basert på figur fra to tidligere studier (12;46) .

Ved celledeling må bindingene mellom overflateproteinene og beholderen brytes slik at cellene havner i en suspensjon. Denne prosessen utføres mekanisk, eller ved bruk av enzymer som trypsin (39). Trypsin er et proteolytisk enzym derivert fra proenzymet tryptsinogen. Ved en trypsinering vil peptidbindingene brytes på C-terminus på Lysin og Arginin (47).

3.0 Materiale og metoder

3.1 Cellekultivering

CHSE-214-celler (*Sigma-Aldrich, a.nr 91041114-IVL*) ble dyrket i celleflasker på 75 cm² med L-15 Medium (Leibovitz) (*Sigma-Aldrich, a.nr L1518*) tilsatt 10 % GibcoTM Fetal Bovine Serum (FBS) (*Gibco, a.nr A3160801*) og 0,1 % Gentamicin Reagent Solution (*Gibco, a.nr 15750-060*). Cellene ble dyrket i et inkubatorskap ved 20 °C.

For å undersøke om cellene hadde nådd eksponentiell fase ble konfluensen jevnlig undersøkt ved hjelp av et invertermikroskop. Ved en konfluens mellom 70-80 % ble cellene splittet i en LAF-benk under aseptiske forhold. Gammelt medium fra celleflaskene ble fjernet og cellene skylt to ganger med 5 ml HBSS (*HyClone, SH30588.01*). Cellene ble løsnet fra flaskeoverflaten ved å tilføre 0,5 ml 0,25 % trypsin (*Gibco, a.nr 2085461*). Etter inkubering i et par minutter og et lett dunk mot flasken ble cellene studert i et invertermikroskop. Da 80 % av cellene hadde løsnet ble trypsin inaktivert ved å tilføre 4 ml L-15 medium.

Cellesuspensjonen ble overført til et falconrør og sentrifugert på 1200 rpm i tre minutter ved 20 °C. Etter sentrifugering ble supernatanten sugd av, og 1 ml L-15 medium ble tilsatt for å løsne pelleten. Deretter ble 5 ml L-15 medium tilsatt. Cellesuspensjonen ble overført til nye celleflasker med L-15 medium til et totalvolum på 20 ml. Innholdet av cellesuspensjon i forhold til L-15 medium varierte avhengig av splittingsforholdene. Ved splitting av cellene 1:2 ble 3 ml cellesuspensjon tilsatt en ny celleflaske med 17 ml medium. Prosedyren *Cellekultivering* (vedlegg A.2.2), beskriver alle trinn som inngår ved dyrkning og splitting av CHSE-214-celler. Det ble gjennomført totalt fem cellesplittings. Startkulturen hadde passasjennummer 248 og sluttkulturen hadde passasjennummer 253.

3.2 Induksjon av termisk stress

Før induksjon av stressforsøket ble celleflaskene fra cellekultiveringen splittet i cellebrett med seks brønner, hver brønn med et volum på 9,6 cm². Splittingen ble utført med samme prosedyre som ved cellekultivering, men med lavere volum av reagensene. Ved skylting med PBS ble det brukt 3 ml før trypsineringen ble utført med 0,3 ml 0,25 % trypsin.

Trypsineringen ble inhibert ved at 1 ml av L-15 medium ble tilsatt. Etter sentrifugering og fjerning av supernatant, ble det først tilsatt 1 ml L-15 medium for å løsne pelleten, etterfulgt

av nye 8 ml. 0,5 ml av cellesuspensjonen ble tilsatt i hver sin brønn på cellebrettene med 5,5 ml L-15 medium.

Det termiske stressforsøket ble gjentatt to ganger. Hver av de to forsøkene, stressforsøk én og to, varte i en periode på fire dager. Før start ble konfluensen til hvert Brett undersøkt under et invertermikroskop. Ved en konfluens på minimum 70 % ble forsøket startet. Kontrollbrettene ble satt i inkubatorskap på 20 °C. Termisk stress av cellene foregikk i et inkubatorskap på 26 °C, i intervaller på to timer. Mellom hvert stressintervall fikk cellene hvile i 24 timer ved 20 °C. Etter hvert stressintervall ble det tatt ut ett Brett i tillegg til ett kontrollbrett for analyse.

Tabell 1: Viser oppsettet av et stressforsøk inkludert temperatur og tid ved hvert enkelt stressintervall og hvile. Stressintervallene er nummerert, fra første til fjerde stressintervall. X indikerer hvile.

Stressintervall #	1	x	2	x	3	x	4
Temperatur	26 °C	20 °C	26 °C	20 °C	26 °C	20 °C	26 °C
Tid (timer)	2	24	2	24	2	24	2

3.3 Analyse av cellesyklus på BD Accuri C6 Flowcytometer

Fokuset i oppgaven har vært på endringer i cellesyklus. Som en avgrensning har det vært utelukkende fokus på levende celler i cellesyklus. Dette er celler som var festet til brønnens overflate. Løse celler i medium og PBS brukt til skylting er ikke inkludert i prøvemateriale i prosedyren for fiksering og preparering. Videre er det fokusert på celler som befinner seg i cellesyklus ved analyse på flowcytometer. Oppgavens gating på flowcytometeret ekskluderer områder med ødelagte celler og cellerester, også kalt debri (48). Debri er ikke studert i oppgaven.

3.3.1 Fiksering og preparering av prøvemateriale

Cellebrettene som ble tatt ut for analyse av termisk stress ble observert under et invertermikroskop for å undersøke konfluensen. Deretter ble gammelt medium pipettert ut av brønnene og kastet i et spillbeger. Cellene i hver brønn ble skylt med 2x3 ml PBS. Videre ble

0,3 ml trypsin tilsatt for å løsne cellene fra underlaget. Da 80 % av cellene var løsnet ble trypsin inaktivert ved å tilsette 1 ml medium, og en celleskraper ble dratt lett over overflaten. Cellesuspensjonen ble pipettert ut fra hver sin brønn og over i sine respektive 15 ml falconrør. To av rørene ble videre stabilisert og lagret for analyse ved qPCR. 11 µl cellesuspensjon fra hver av de fire resterende rørene ble tilsatt i hvert sitt Burkers tellekammer. Tre av rutene i hvert kammer ble telt opp og gjennomsnittet for hele kammeret ble beregnet for å finne totalt antall celler. Resultatet kan regnes ut på følgende måte:

$$\frac{N}{Nr \times 0,001 \text{ ml}} = \text{Antall celler per ml}$$

N = antall telte celler
Nr = antall telte ruter
0.0001 ml = 10 µl per tellekammer

Samtidig som tellingen pågikk ble falconrørene sentrifugert i fem minutter ved 1200 rpm. Supernatanten ble sugd av røret og en bestemt mengde PBS ble tilsatt avhengig av utregningen fra Burkers tellekammer. Ved et resultat på opp til to millioner celler per ml ble det tilsatt 1 ml PBS, og resultater over to millioner ble fortynnet med 2 ml PBS. Etter at pelleten ble løst opp ble 1 ml cellesuspensjon fra hver prøve tilsatt i et eget falconrør som inneholdt 4 ml 96 % etanol med en temperatur på -20 °C. Falconrørene ble vortexet direkte etter tilsetning, og satt til frysing i 21-24 timer.

Etter at rørene ble tatt ut av fryseren ble de sentrifugert ved 1200 rpm i fem minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten løst. Deretter ble det tilsatt 5 ml PBS i hver prøve, før prøvene ble vortexet og satt til å hvile i 15 minutter. Videre ble rørene på nytt sentrifugert i fem minutter ved 1200 rpm. Pelleten ble løst etter at supernatanten ble fjernet. Hvert rør ble tilsatt 0.5 ml PI/RNase og inkubert i mørket i 90 minutter. Prosedyren *Fiksering og preparering av prøvemateriale* (vedlegg A.2.3), beskriver alle trinn som inngår ved fiksering og preparering av CHSE-214-celler før analyse på flowcytometer.

3.3.2 Kalibrering av flowcytometer

Klargjøring av BD Accuri C6 flowcytometeret (*BD biosciences*) før og etter analyse av prøvemateriale ble utført ved kalibrering. For kalibrering ble det brukt fem ulike reagenser:

Cleaner, dekontaminering, MQ-vann, 8-peak bead og 6-peak bead. Etter at datamaskinen som flowcytometeret er koblet til ble startet ble det funnet frem et templat for vask og rensing av maskinen, kalt «wash & clean templat». For hver reagens ble det stilt inn bestemte parametere. For cleaner, dekontaminering og MQ-vann ble analysen gjennomført med parameteren FAST på fem minutter. Det ble observert at analysen ikke overgikk 100 events/s.

Videre ble det kalibrert med 8-peak bead. Her ble parameterne stilt inn på SLOW og 10 000 events. Det ble observert at eventene lå på omtrent 200 events/s og at plot 3 M12 FL2-H lå under 5 %. Da instrumentet hadde målt opp 10 000 events var analysen ferdig og det ble utført BACKFLUSH før analyse av neste reagens. Her ble det observert at det dryppet dråper fra aspireringsnålen. Disse ble tørket bort med linsepapir.

Nest siste trinn i kalibreringen var med 6-peak bead reagens. Her ble det brukt samme parameter som ved 8-peak bead, men det ble observert at plot 6 M12 CV FL-4H hadde en verdi under 5 %. Etter endt analysering ble det igjen utført BACKFLUSH og kontrollert at det kom dråper før det ble tørket med linsepapir. Videre ble tuben med MQ-vann plassert inn i flowcytometeret igjen og kjørt med parameteren FAST i 5 minutter. Instrumentet var da ferdig kalibrert og klargjort for analyse av prøver. Prosedyren *Kalibrering av flowcytometer* (vedlegg A.2.4) beskriver alle trinn som inngår ved kalibrering av flowcytometeret.

3.3.3 Analyse på flowcytometer

Etter 90 minutter ble prøvene tatt ut fra inkubering og satt på is dekket med aluminiumsfolie. En og en prøve ble analysert med parameterne SLOW og 20 000 events. Det ble brukt et templat optimalisert av tidligere bachelorstudenter ved NTNU som inneholdt ferdigstilte gates for G1/G0-, G2/M- og S-fasene til cellyklusen, i tillegg til en gate for unknown (11). For å se resultatene ble FL2-plot 2 studert. For enkelte av prøvene var ikke gatingen for å skille fasene korrekt i FL-plot 2. Disse ble dermed endret manuelt. Prosedyren *Analyse på flowcytometer* (vedlegg A.2.5) beskriver alle trinn som inngår ved analyse av cellyklus på flowcytometer.

3.4 Analyse av HSP70

3.4.1 Stabilisering og lagring av cellulært RNA fra prøvemateriale

Falconrørene med celleduspensjon fra brønn 1 og 2 i 3.3.1 *Fiksering og preparering av prøvemateriale* ble videre stabilisert og lagret for analyse ved qPCR. Først ble celleduspensjonen sentrifugert i seks minutter på 1200 rpm. Videre ble det meste av supernatanten sugd av. Pelleten ble løst ved å pipettere opp og ned med resterende supernatant. Deretter ble celleduspensjonen overført til RNA-later og satt i kjøleskap. Prøvene ble satt til lagring i frys under en uke etter stabilisering i RNA-later.

3.5 Statistiske utregninger av innsamlet data

Innsamlet data fra analyse av prøvene på flowcytometer ble systematisert i tabeller. Videre ble det utført en normalfordeling for data. Etter påvist normalfordeling ble det utført tosidige uavhengige t-tester basert på den innsamlede dataen. T-testene ble utført mellom stressforsøk én og to, mellom kontroll og hvert stressforsøk, og mellom antall stressintervall i hvert stressforsøk. Det ble benyttet hypotesetest der nullhypotesen (H_0) vil bevise en likhet mellom prøvene og den alternative hypotesen (H_1) vil bevise ulikhet mellom prøvene.

Signifikansnivået ble satt på 5 % og dermed ble nullhypotesen forkastet ved statistisk signifikante verdier på eller under 0,05 og den alternative hypotesen ble akseptert. De statistiske beregningene ble utført i programmet IBM SPSS statistics 26.

4.0 Resultat

Resultatet presenterer resultat fra termisk stressforsøk hvor cellebrett med seks brønner er stresset én til fire ganger. Hvert termiske stressintervall betegnes som første, andre, tredje og fjerde stressintervall. Etter første stressintervall har cellene blitt utsatt for stress en gang, etter andre stressintervall har cellen blitt utsatt for stress to ganger og så videre. Det er utført to paralleller av forsøket; stressforsøk én og stressforsøk to. I tillegg er det analysert et brett i form av en kontroll ved hvert stressintervall. Brettene fra kontroll og de to stressforsøkene hadde seks brønner hvor to brønner ble brukt til analyse av HSP70 og fire brønner til analyse av cellesyklus. Til sammen er det dermed åtte paralleller fra hvert stressintervall som brukes for å studere cellesyklus.

Resultatene fra analyse på flowcytometer av kontroll, stressforsøk én og stressforsøk to er presentert i *tabell 3, 4 og 5* (vedlegg A.5). Verdiene er hentet fra histogram vist med eksempel i *figur 5, 6, 7 og 8* (vedlegg A.4). Prøvenes navn og forklaring på dette er beskrevet i vedlegg A.5. Det observeres høye verdier i alle fasene ved prøve P.4.1.3 (Navngitt som følger: Prøve, fjerde stress/stresset fire ganger, stressforsøk én og tredje brønn). Den er dermed valgt å inkluderes i datasettet, men ekskluderes i enkelte statistiske beregninger. I de statistiske beregninger hvor P.4.1.3 er ekskludert vil dette være presisert.

4.1 Gjennomsnittlige verdier fra analyse av cellesyklus

Etter første stressintervall observeres det i G1/G0-fasen 41,5 % i stressforsøk én, 39,6 % i stressforsøk to og 46,5 % i kontroll. Videre observeres det i S-fasen 9,2 % i stressforsøk én, 9,5 % i stressforsøk to og 10 % i kontroll. I G2/M-fase observeres det 11,1 % i stressforsøk én, 10,0 % i stressforsøk to og 12,6 % i kontroll.

Etter andre stressintervall observeres det i G1/G0-fasen 38,7 % i stressforsøk én, 41,7 % i stressforsøk to og 39,6 % i kontroll. I S-fasen observeres det her 8,4 % i stressforsøk én, 9,5 % i stressforsøk to samt 10,35 % i kontroll. I G2/M-fase observeres det 8,6 % i stressforsøk én, 11,0 % i stressforsøk to og 10,4 % i kontroll.

Etter tredje stressintervall observeres det i G1/G0-fasen 37,4 % i stressforsøk én, 39,3 % i stressforsøk to og 36,3 % i kontroll. I S-fasen observeres det 8,7 % etter stressforsøk én, 9,9

% i stressforsøk to og 9,2 % i kontroll. I G2/M-fase observeres det 10,5 % i stressforsøk én, 10,3 % i stressforsøk to og 9,5 % i kontroll.

Etter fjerde stressintervall observeres det i G1/G0-fasen 40,7 % i stressforsøk én, 36,4 % i stressforsøk to og 36,8 % i kontroll. I S-fasen observeres det 9,5 % etter stressforsøk én, 7,4 % i stressforsøk to og 7,25 % i kontroll. I G2/M-fase observeres det 11,6 % i stressforsøk én, 8,9 % i stressforsøk to og 10,2 % i kontroll. Ekskluderes P.4.1.3, en potensiell uteligger, fra stressforsøk én blir resultatet 38,7 % i G1/G0-fase, 8,8 % i S-fase og 9,9 % i G2/M-fase.

4.2 Grafisk fremstilling av resultat fra termisk stressforsøk

Resultatene fra analyse på flowcytometer er presentert i tre diagram etter de ulike fasene i cellesyklus: *G1/G0-fasen*, *S-fasen* og *G2/M-fasen*. I diagrammene sammenlignes resultatene fra de termiske stressforsøkene (vedlegg A.5) opp mot kontrollen.

Diagram 1, G1/G0-fase, inneholder gjennomsnittsverdier hentet fra *tabell 3* (vedlegg A.5.1). I diagrammet observeres det at kontrollen har en markant høyere verdi etter første stressintervall sammenlignet med kontrollene målt senere. Etter første stressintervall har stressforsøkene en lavere verdi i G1/G0-fasen satt opp mot kontrollen. Videre etter andre stressintervall har stressforsøkene tilnærmet like verdier som kontrollen, før stressforsøkernes verdier stiger noe over kontrollens verdi etter tredje og fjerde stressintervall.

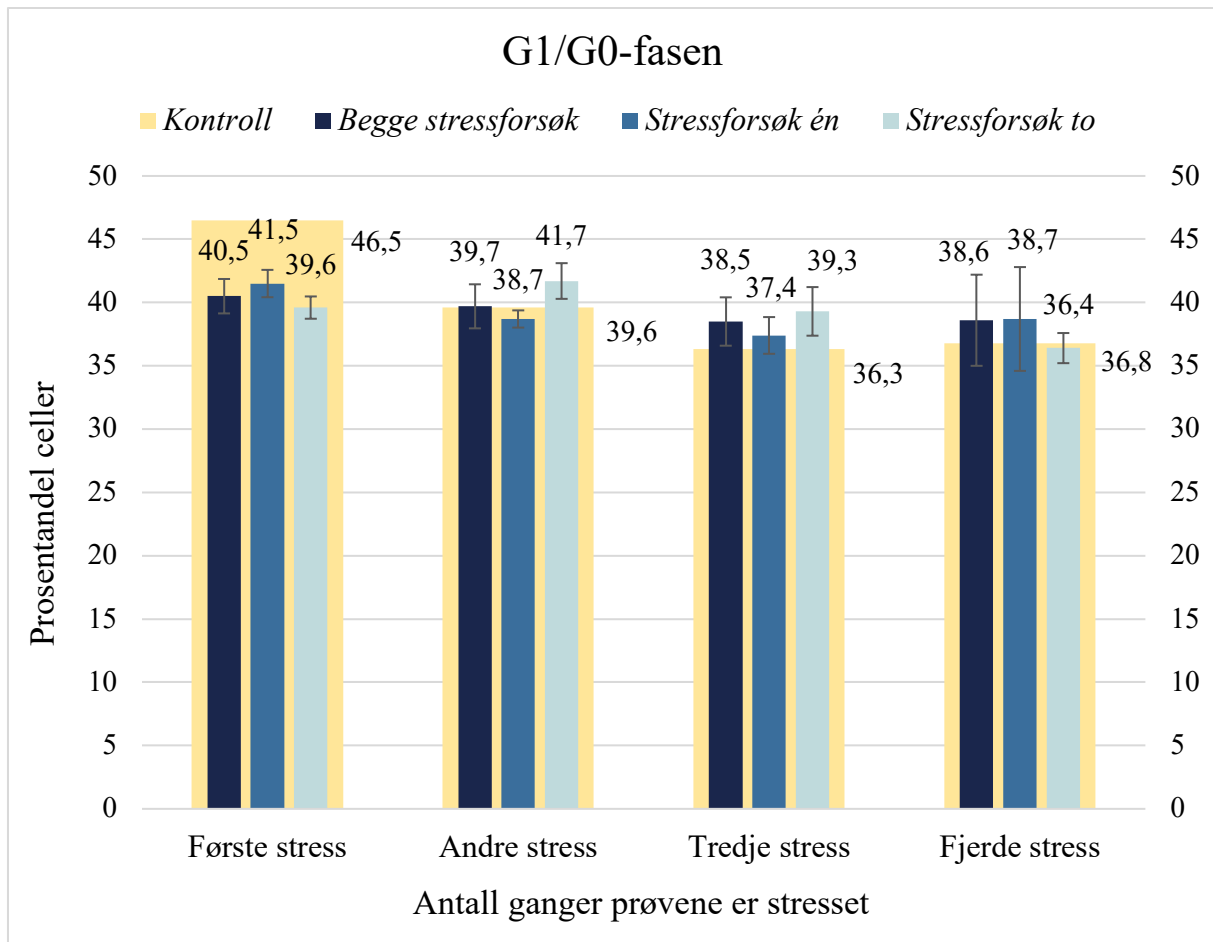


Diagram 1: Gjennomsnittsverdien av antall celler, vist i prosent, i G1/G0-fasen etter termisk stress. De blå kolonnene representerer gjennomsnittsverdien til stressforsøk én, stressforsøk to og begge stressforsøkene (sammenlagt gjennomsnitt av stressforsøk én og to). Gul kolonne representerer kontrollen. Langs x-aksen vises antall stressintervaller, fra første til fjerde stressintervall. Tallene oppgitt over stressforsøkernes kolonner er gjennomsnittsverdien for den spesifikke kolonne, og feilfeltet er standardavviket til de enkelte prøvene. Kontrollens gjennomsnittsverdi er oppgitt ved siden av kolonnen.

Diagram 2, S-fase, inneholder gjennomsnittsverdier hentet fra tabell 4 (vedlegg A.5.2). I diagrammet observeres det en høyere verdi i kontrollen etter første og andre stressintervall sammenlignet med tredje og fjerde stressintervall. Etter tredje stressintervall observeres en nedgang i kontrollens verdier som faller ytterligere etter fjerde stressintervall. For prøvene utsatt for termisk stress observeres ikke like markante endringer over tid. Stressforsøkene etter første stressintervall har en noe lavere verdi sammenlignet med kontrollen. Nedgangen i stressforsøkernes verdier tiltar etter andre stressintervall sammenlignet med tilhørende kontroll. Etter tredje stressintervall observeres det en økning hvor stressforsøk én har en noe

lavere verdi sammenlignet med kontrollen, og hvor stressforsøk to har en høyere verdi enn kontrollen. Etter fjerde stressintervall ser man en endring: stressforsøk én er markant høyere enn kontrollen, mens stressforsøk to kun er noe høyere.

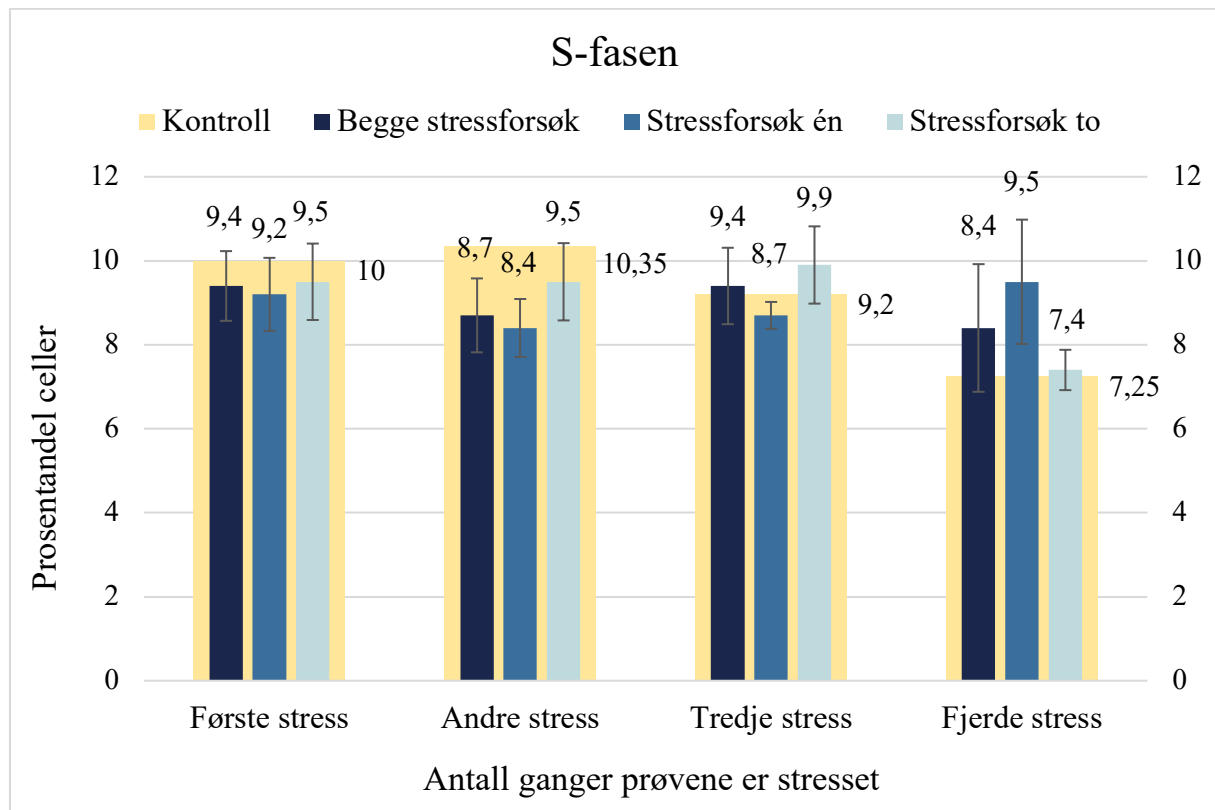


Diagram 2: Gjennomsnittsverdien av antall celler, oppgitt i prosent, i S-fasen etter termisk stress. De blå kolonnene representerer gjennomsnittsverdien til stressforsøk én, stressforsøk to og begge stressforsøkene (sammenlagt gjennomsnitt av stressforsøk én og to). Gul kolonne representerer kontrollen. Langs x-aksen vises antall stressintervaller, fra første til fjerde stress. Tallene oppgitt over stressforsøkene kolonner er gjennomsnittsverdien for den spesifikke kolonne, og feilfeltet er standardavviket til de enkelte prøvene. Kontrollens gjennomsnittsverdi er oppgitt ved siden av kolonnen.

Diagram 3, G2/M-fase, inneholder gjennomsnittsverdier hentet fra tabell 5 (vedlegg A.5.3). I diagrammet observeres det en høyere verdi i kontrollen etter første stressintervall sammenlignet med etterfølgende stressintervall. Kontrollens verdi er tilnærmet stabil etter andre, tredje og fjerde stressintervall med en liten nedgang etter tredje stressintervall. Stressforsøkene etter første stressintervall har en lavere verdi sammenlignet med kontrollen, som også observeres etter andre stressintervall i stressforsøk én. Stressforsøk to har derimot en noe høyere verdi. Etter tredje stressintervall har begge stressforsøkene en høyere verdi

sammenlignet mot kontrollen. Derimot observeres det at kun stressforsøk én har en høyere verdi sammenlignet med kontrollen etter fjerde stressintervall.

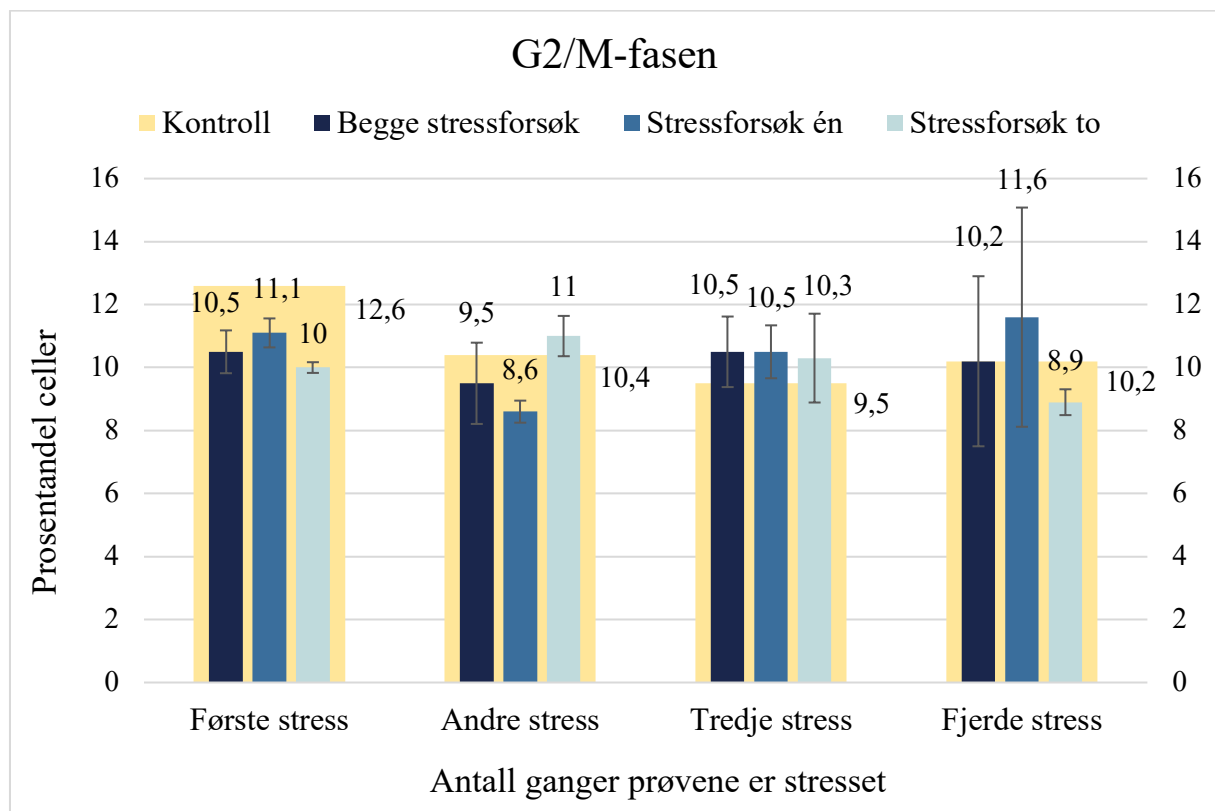


Diagram 3: Gjennomsnittsverdien av antall celler, oppgitt i prosent, i G2/M-fasen etter termisk stress. De blå kolonnene representerer gjennomsnittsverdien til stressforsøk én, stressforsøk to og begge stressforsøkene (sammenlagt gjennomsnitt av stressforsøk én og to). Gul kolonne representerer kontrollen. Langs x-aksen vises antall stressintervaller, fra første til fjerde stress. Tallene oppgitt over stressforsøkernes kolonner er gjennomsnittsverdien for den spesifikke kolonne, og feilfeltet er standardavviket til de enkelte prøvene. Kontrollens gjennomsnittsverdi er oppgitt ved siden av kolonnen.

4.3 Statistiske utregninger av innsamlet data

4.3.1 Uavhengig T-test for å studere forskjeller mellom stressforsøkene

Første t-test ble utført for å vurdere likheten mellom stressforsøk én og stressforsøk to. Det er ingen statistisk signifikante forskjeller mellom stressforsøkene ved en helhetlig analyse som inkluderer hele datasettet i tabell 3, 4 og 5 (vedlegg A.5), altså uten inndeling i ulike faser. Dette viser tester utført med og uten prøve 4.1.3. Resultatet viser at stressforsøkene er like.

Samme t-test ble utført med datasettet delt inn i de bestemte fasene, ekskludert verdier fra prøve 4.1.3, som presenteres i *tabell 6* (vedlegg A.6.1). Det er en statistisk signifikant forskjell i G1/G0-fasen mellom stressforsøk én og to etter første stressintervall ($p = 0,03$) og fjerde stressintervall ($p = 0,05$). Stressforsøkene er derav ulike i G1/G0-fasen etter første- og fjerde stressintervall.

I S-fasen er det en statistisk signifikant forskjell etter fjerde stressintervall mellom stressforsøk én og to ($p = 0,04$). Stressforsøkene er derav ulike etter fjerde stressintervall i S-fasen.

Det er en statistisk signifikant forskjell i G2/M-fasen mellom stressforsøk én og to etter første ($p = 0,00$) og andre stressintervall ($p = 0,00$). Stressforsøkene er derav ulike etter første- og andre stressintervall i G2/M-fasen.

En t-test ble også gjennomført med P.4.1.3 inkludert i datasettet, resultatene er presentert i *tabell 10* (vedlegg A.6.5). Det er en statistisk signifikant forskjell i S-fasen mellom stressforsøk én og to ($p = 0,04$). Stressforsøkene er derav ulike etter fjerde stressintervall i S-fasen når P.4.1.3 inkluderes.

4.3.2 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom stressforsøk og kontroll

Andre t-test ble utført for å observere ulikheter mellom stressforsøkene og kontroll for å videre vurdere om det har forekommet endringer i cellesyklus, som for eksempel en cellesyklusarrest, som følge av termisk stress. Resultatene fra t-testen er presentert i *tabell 7* (vedlegg A.6.2).

I G1/G0-fasen er det en statistisk signifikant forskjell etter fjerde stressintervall mellom kontroll og stressforsøk én ($p = 0,04$). Etter fjerde stressintervall observeres det en høyere verdi i G1/G0-fasen i stressforsøk én sammenlignet med kontrollen.

I S-fasen er det statistisk signifikant forskjell i stressforsøk én etter andre stressintervall mellom kontroll og prøve ($p = 0,03$) og etter fjerde stressintervall mellom kontroll og prøve ($p = 0,02$). I stressforsøk én ble det i S-fasen etter andre stressintervall observert en lavere verdi

sammenlignet med kontrollen, mens det etter fjerde stressintervall ble observert en høyere verdi.

I G2/M-fasen er det en statistisk signifikant forskjell etter fjerde stressintervall mellom kontroll og stressforsøk to ($p = 0,05$). I stressforsøk to ble det i S-fasen etter fjerde stressintervall observert en lavere verdi sammenlignet med kontrollen.

En t-test ble også gjennomført med P.4.1.3 inkludert i datasettet, resultatet er presentert i *tabell 10* (vedlegg A.6.5). Det er en statistisk signifikant forskjell etter fjerde stressintervall mellom kontroll og stressforsøk én i S-fasen ($p = 0,03$). Når P.4.1.3 inkluderes i datasettet observeres det etter fjerde stressintervall en høyere verdi i S-fasen i stressforsøk én sammenlignet med kontrollen.

4.3.3 Uavhengig T-test for å studere ulikheter ved gjentatte stressintervall

Tredje t-test ble utført for å observere endringer mellom antall stressintervall for prøvene. Dette ble gjort mellom stressintervallene i stressforsøk én og mellom stressintervallene i stressforsøk to. Datasettet brukt ekskluderer verdiene fra P.4.1.3 og resultatet presenteres i *tabell 8* (vedlegg A.6.3) og -9 (vedlegg A.6.4).

Det er en statistisk signifikant forskjell i G1/G0-fasen i stressforsøk én mellom prøvene etter første- og andre stressintervall ($p = 0,01$), tredje stressintervall ($p = 0,01$) og fjerde stressintervall ($p = 0,02$). Videre i samme fase er det en statistisk signifikant forskjell i stressforsøk to mellom prøvene etter fjerde stressintervall og første stressintervall ($p = 0,01$), andre stressintervall ($p = 0,01$) og tredje stressintervall ($p = 0,04$). I stressforsøk én observeres det i G1/G0-fasen en høyere verdi etter første stressintervall sammenlignet med etterfølgende stressintervall. I stressforsøk to observeres det i G1/G0-fasen en lavere verdi etter fjerde stressintervall sammenlignet med foregående stressintervall.

Det er ingen statistisk signifikant forskjell i S-fasen mellom prøvene fra stressforsøk én. Fra stressforsøk to observeres det derimot statistisk signifikant forskjell mellom prøvene etter fjerde- og første stressintervall ($p = 0,01$), andre stressintervall ($p = 0,02$) og tredje stressintervall ($p = 0,00$). I stressforsøk to observeres en lavere verdi etter fjerde stressintervall sammenlignet med foregående stressintervall.

Det er statistisk signifikant forskjell i G2/M-fasen i stressforsøk én mellom prøvene: Etter første- og andre stressintervall ($p = 0,00$), og etter andre- og tredje stressintervall ($p = 0,01$). Videre observeres det statistisk signifikante forskjeller i stressforsøk to mellom prøvene etter første- og fjerde stressintervall ($p = 0,01$), og mellom prøvene etter andre- og fjerde stressintervall ($p = 0,01$). I stressforsøk én observeres det i G2/M-fasen en lavere verdi etter andre stressintervall sammenlignet med første- og tredje stressintervall. Tilsvarende forekommer i stressforsøk to hvor det i G2/M-fasen observeres en lavere verdi etter fjerde stressintervall sammenlignet med første- og andre stressintervall.

En t-test ble også gjennomført med P.4.1.3 inkludert i datasettet. Resultatet presentert i *tabell 10* (vedlegg A.6.5) viser at det ikke er statistisk signifikante forskjeller i stressforsøk én etter fjerde stressintervall og foregående stressintervall når P.4.1.3 inkluderes.

5.0 Diskusjon

5.1 Cellekultivering

CHSE-214-cellene hadde god vekst uten tegn til kontaminering gjennom hele forsøket, se *figur 5 og -6* (vedlegg A.3). Etter splitting fra celleflasker til cellebrett, ble det observert ujevn konfluens hvor fordeling av celler i de respektive brønnene ikke var uniform. Konfluensen ble i enkelte områder observert til å være opp mot 100 % mens den i andre områder var nede i 20 %. Årsaken til dette var antatt å være dårlig fordeling av cellesuspensjon under splitting. Dette ble kontrollert ved at det ble gjennomført en ny splitting fra celleflaske til cellebrett hvor medium og cellesuspensjon ble blandet godt ved splittingen. Også her viste cellene ujevn konfluens i brønnene, noe som indikerer at fordeling av cellesuspensjon ikke var årsaken.

Områdene med høy konfluens økte raskt til tilnærmet 100 %, i motsetning til områdene med lavere konfluens. Der gikk veksten mer langsomt. Dette skyldes trolig CHSE-214-cellenes behov for cellesignalisering ved celleproliferasjon, som nevnt i 2.5 *CHSE-214* (44).

Ujevnheten i konfluens resulterte i at bedømmelsen av konfluens ble utfordrende. Det var usikkert om veksten var i enkelte av brønnene var i eksponentiell fase ved oppstart av forsøket.

Ved 100 % konfluens kan cellene oppleve kontaktinhibering, noe som vil bremse cellenes videre vekst. Cellene kan begynne å vokse i flere lag, slik at de underliggende cellene ikke får tilgang på næring. Dette resulterer i en økt stressrespons og en potensiell følgelig cellyklusarrest (10;20). Konfluensen nådde tilnærmet 100 % etter fjerde stressintervall. Fra tredje- til fjerde stressintervall, var det 24 timer hvile. Dette er trolig ikke tilstrekkelig tid til at cellene har dannet flere lag og vil dermed ikke påvirke resultatene.

5.2 Termisk stressforsøk

Stressforsøket ble utført over fire dager i stedet for ni, som i utgangspunktet var planen. Dette grunnet uforutsett nedstengning av laboratoriene ved NTNU i Ålesund som følge av koronavirus-pandemien. Under forsøket ble brettene utsatt for termisk stress i nøyaktig to timer. De fikk deretter hvile i 24 timer før neste stressinitiering. Temperatur, hviletid og lengden på stressintervallene ble valgt på bakgrunn av resultat av tidligere studier i forbindelse med bacheloroppgaver ved NTNU i Ålesund: To timer var tilstrekkelig tid for å få

en stressrespons, og 24 timer var tidsintervallet som var nødvendig for at cellen gikk tilbake til normalt nivå. Det termiske stresset ble utført ved 26 °C, da dette er en temperatur som gir CHSE-214-celler en stressrespons uten at de går i apoptose (11;12;49).

5.3 Fiksering, preparering og analyse av prøvemateriale på flowcytometer

Umiddelbart etter at cellene hadde vært utsatt for termisk stress i to timer, ble fikseringsprosedyren, vedlegg A.2.3, påbegynt. Tiden brukt fra uttak av inkubatorskap til trinn 17; plassering i frys, varierte mellom 21-28 minutter. Da cellene kan bli utsatt for stressfaktorer som for eksempel temperaturen i rommet eller mangel på medium, er fikseringstiden kritisk. Blir cellene utsatt for et slikt stress, kan det gi en cellesyklusarrest som ikke er forårsaket av selve stressforsøket. En fikseringstid på under 30 minutt er trolig ikke lenge nok til å forårsake en cellesyklusarrest (20).

Under fiksering og preparering ble det besluttet å ekskludere PBS brukt til skylling og medium fra prøvematerialet. Avgrensningen ble satt på bakgrunn av oppgavens fokus på endringer i cellesyklus i levende celler. Da CHSE-214-celler vokser bundet til en overflate ville PBS og medium i hovedsak inneholdt frittflytende celler som er døde eller nær døde (41;42). De frittflytende cellene kunne hatt en innvirkning på resultatet, men denne påvirkningen ville trolig vært minimal. Inkludering av PBS og medium ville også krevd et ekstra sentrifugeringstrinn for å oppkonsentrere cellene. Dette ville medført lengre fikseringstid med den konsekvens at cellene ville blitt utsatt for mulige stressfaktorer.

For å løsne cellene fra brønnens overflate ble det brukt en celleskrape etter trypsineringen. Bruk av celleskraper kan mekanisk skade cellene og føre til en større andel debri ved analyse på flowcytometer. Økt debri kan være en variabel som påvirker resultatet fra analysen av cellesyklus (48). For å fjerne denne variabelen må metoden optimaliseres slik at mengden debri er tilnærmet lik i alle prøvene. Som en konsekvens av nedstengning av laboratoriet og dermed begrenset tid ved utførelse av forsøket, ble det derfor valgt å ikke inkludere analyse av økt debri i oppgaven. En annen konsekvens av laboratoriets nedstengning var stor pågang og høyt forbruk av blant annet celleskraper. Det ble nødvendig å bruke samme celleskraper på alle prøver som ble fiksert samme dag. Celleskraperen ble vasket i etanol og tørket før den ble brukt i ny brønn. Det er vurdert at fremgangsmåte for rens av celleskraper ikke har påvirket resultatet.

Under analyse av cellesyklus på flowcytometeret ble det observert en forskyvning av cellesyklus mot venstre langs x-aksen på plot 2 i enkelte prøver. X-aksen viser størrelsen på cellene i plottet. En forskyvning mot venstre betyr dermed at en høyere andel av cellene er mindre. Forskyvningen forekommer i enkelte av prøvene ved alle stressintervallene, noe som indikerer at årsaken ikke har en sammenheng med antall stressintervaller. Konsekvensen er at de forhåndsinnstilte gatingene som skiller fasene i cellesyklus ikke lenger dekker korrekt område. Gatingene ble derav endret manuelt. I utførelsen kan det ha forekommet avvik, men da avvikene vil være minimale, vil det trolig ikke ha påvirket resultatet nevneverdig.

5.4 Analyse av cellesyklus

Basert på gjennomsnittsverdiene av celler i de enkelte fasene (vedlegg A.5), observeres det mindre endringer i cellesyklus, men ingen sterke indikasjoner på en cellesyklusarrest. For å vurdere om de observerte endringene er statistisk signifikante, ble det utført t-tester. Ved bruk av t-test i denne oppgaven, er det to usikkerhetsmomenter. Det første momentet er at til tross for at p-verdier på eller under 0,05 vil gi et statistisk signifikant resultat, er det opp til 5 % sannsynlig at resultatet skyldes tilfeldigheter. Som følge av dette, kan ikke en t-test alene brukes for å fastslå at det har forekommet endringer i cellesyklus (50). Det andre momentet er at et lavere antall verdier vil gi et mindre pålitelig resultat. Ved hvert stressintervall var utgangspunktet at totalt fire paralleller hver for stressforsøk én og to skulle analyseres. Det ble ved enkelte stressintervaller analysert færre paralleller. Færre analyserte paralleller var en konsekvens av feilkilder under utførelse av prosedyrene, kombinert med begrenset tid for utførelse som en følge av koronavirus-pandemien. Resultatene som viser en p-verdi på 0,00 vil i denne oppgaven være upålitelige, da for få verdier, som nevnt, vil gi et mindre pålitelig resultat. På tross av at en p-verdi på 0,00 betyr at resultatet er en konsekvens av termisk stress da det er 0 % sannsynlighet for at resultatet skyldes tilfeldigheter, vil man ikke kunne bruke dette resultatet alene for å bekrefte endringer i cellesyklus.

Før videre t-tester ble utført, ble parallellene fra stressforsøk én og to sammenlignet med hverandre for å vurdere likheten. Sammenligningen ble gjort da ulike paralleller ikke kan brukes i samme t-test. Resultatet fra t-testene som inkluderte hele datasettet med verdier fra alle fasene indikerte at stressforsøkene var like. Videre ble det utført t-tester med datasett fra de ulike fasene; G1/G0-, S- og G2/M-fasen, hver for seg, se *tabell 6* (vedlegg A.6.1) og *tabell 10* (vedlegg A.6.5). Disse t-testene viste flere statistisk signifikante forskjeller mellom stressforsøkene. Mulige årsaker til forskjellene kan være avvik under utførelse av

prosedyrene, men ingen konkrete årsaker ble avdekket. På bakgrunn av dette ble det valgt å skille stressforsøk én og to i videre t-tester.

5.4.1 Analyse av cellesyklus etter første stressintervall

Under analyse av enkelte av parallellene av kontroll etter første stressintervall, var det for få celler til å fullføre flowcytometerets analyse på 20 000 celler. Det er dermed kun én parallell som gjenstår. Kontrollen etter første stressintervall, med en verdi på 46,5 % i G1/G0-fasen, er betydelig høyere enn resterende kontroller i samme fase, se *tabell 3* (vedlegg A.5.1). Det er en forskjell på hele 6,9 fra kontroll etter første stressintervall til kontrollen med nest høyest verdi; kontroll etter andre stressintervall. Videre har kontrollen etter første stressintervall også en av de høyeste verdiene i S- og G2/M-fasen sammenlignet med kontroller fra andre stressintervall, se *tabell 4* (vedlegg A.5.2) og -5 (vedlegg A.5.3). Sammenlignet med stressforsøk én og to, har kontrollen høyere verdier i alle fasene etter første stressintervall. De merkbart høye verdiene, kombinert med at denne forekomsten kun fant sted ved én enkelt parallell, indikerer at det kan ha forekommet et avvik og at kontrollen dermed er en uteligger. En ny analyse av kontroll etter første stressintervall, var planlagt for å vurdere om verdien var en uteligger. Dette ble derimot ikke mulig som følge av nedstengingen av laboratoriet.

Minimumskravet på to verdier for å utføre en t-test medførte at t-tester som inkluderte kontroll etter første stressintervall ikke kunne utføres. Mer spesifikt gjelder dette t-tester mellom kontroll og stressforsøk én eller to. En slik sammenligning av kontroll og prøve etter et gitt stressintervall, gir sterkere indikasjoner på eventuelle endringer i cellesyklus da det fjerner alle andre variabler foruten det termiske stresset. Som tidligere nevnt i *5.4 Analyse av cellesyklus* er en verifisering ikke mulig i denne oppgaven da t-testen har flere svakheter og det er analysert et lite antall paralleller ved hvert stressintervall. Kontrollen etter første stressintervall blir her vurdert å være en uteligger, og en sammenligning av kontroll og stressforsøk er ikke hensiktsmessig. Drøftingen av resultatene etter første stress vil dermed ikke gi like presise og fullverdige konklusjoner som ved etterfølgende stressintervall.

Etter første stressintervall har stressforsøk én en høyere verdi i G1/G0-fasen sammenlignet med etterfølgende stressintervall i samme stressforsøk, se *diagram 1*. Dette vises som en statistisk signifikant forskjell i t-testen mellom stressforsøk én og etterfølgende stressintervall, se *tabell 8* (vedlegg A.6.3). Den høye verdien kan indikere at det er forekommet en G1-arrest etter første stressintervall. Differansen mellom gjennomsnittsverdiene etter første

stressintervall og resterende stressintervall i stressforsøk én, er derimot liten: Første stressintervall har en verdi på 41,5 % og resterende har en verdi på 37,4-38,7 %, se *tabell 3* (vedlegg A.5.1). Det er dermed mindre trolig at den observerte endringen er en cellesyklusarrest. Denne endringen kan i stedet forklares med naturlige variasjoner i prøvene.

Videre, i G2/M-fasen, observeres det en statistisk signifikant forskjell mellom første og andre stressintervall i stressforsøk én, se *tabell 8* (vedlegg A.6.3), og mellom første og fjerde stressintervall i stressforsøk to, se *tabell 9* (vedlegg A.6.4). Første stressintervall har den høyeste verdien, men forskjellene er minimale. T-testene mellom første stressintervall og resterende stressintervall viser ingen signifikante verdier. Som en følge av dette er resultatet trolig en konsekvens av naturlige variasjoner.

5.4.2 Analyse av cellesyklus etter andre stressintervall

Etter andre stressintervall observeres en nedgang i S-fasen i begge stressforsøk sammenlignet med kontroll, se *diagram 2*. I t-testen utført mellom stressforsøk én og kontroll observeres dette som en signifikant forskjell, se *tabell 7* (vedlegg A.6.2). En nedgang i S- eller G2/M-fasen er vanlig når man ser en økning i G1/G0-fasen, en G1-arrest. Det observeres en svak økning i stressforsøk to, se *diagram 1*. T-testene gir derimot ingen signifikant forskjell i G1/G0-fasen etter andre stressintervall i verken stressforsøk én eller stressforsøk to. Dette indikerer at reduksjonen i S-fasen er forårsaket av naturlige variasjoner.

5.4.3 Analyse av cellesyklus etter tredje stressintervall

Etter tredje stressintervall observeres det ingen statistisk signifikante endringer mellom kontroll og stressforsøkene. Det observeres derimot en statistisk signifikant forskjell i G2/M-fasen mellom andre og tredje stressintervall i stressforsøk én, se *tabell 8* (vedlegg A.6.3). Forskjellen observeres som en økt verdi etter tredje stressintervall. I *diagram 3* observeres det at både stressforsøk én og to har en høyere verdi sammenlignet med kontroll, men at differansen er minimal. Det samme observeres i *diagram 1*.

5.4.4 Analyse av cellesyklus etter fjerde stressintervall

P.4.1.3, en av parallellene i stressforsøk én, har en verdi på 46,7 % i G1/G0-fasen, en verdi som er betydelig høyere enn i resterende prøver tatt ved dette tidspunktet, se *tabell 3* (vedlegg A.5.1). De resterende tre prøvene har verdier som ligger mellom 37,7 %-39,7 %. Med få

paralleller som utgangspunkt er det usikkert om denne høye verdien er en uteligger eller en naturlig variasjon i datasettet. Dersom det antas at parallellen ikke er en uteligger kan den høye verdien indikere en cellesyklusarrest forårsaket av det termiske stresset. For å bekrefte eller avkrefte at prøven er en uteligger kreves det flere paralleller til hvert stressintervall. På bakgrunn av resultatene som ligger til grunn for oppgaven er det valgt å inkludere P.4.1.3 i tabeller og diagram, men den er ekskludert i enkelte t-tester.

I S-fasen er kontrollens verdi etter fjerde stressintervall betydelig lavere sammenlignet med foregående kontroller, se *diagram 2*. Den har en verdi på 7,25 %, mens resterende kontroller har en verdi på 9,2-10 %, se *tabell 4* (vedlegg A.5.2). Den observerte verdien i kontroll etter fjerde stressintervall virker isolert sett svært høy, men sammenlignes den med stressforsøkene fremstår verdien som normal. Stressforsøk én har en verdi på 9,5 % og stressforsøk to en verdi på 7,4 %, se *tabell 4* (vedlegg A.5.2). Den observerte differansen mellom kontroll og stressforsøk to er minimal. Dette indikerer at kontrollens verdi ikke er et resultat av avvik, men i stedet er en naturlig variasjon.

Stressforsøk to etter fjerde stressintervall har de laveste verdiene i G1/G0- og S-fasen sammenlignet med foregående stressintervall. Dette vises som statistisk signifikante forskjeller med alle foregående stressintervall, se *tabell 9* (vedlegg A.6.4). Det samme observeres i G2/M-fasen mellom fjerde stressintervall og første- og andre stressintervall, se *tabell 9* (vedlegg A.6.4). Til tross for en lavere verdi sammenlignet med foregående stressintervall har stressforsøk to en tilnærmet lik verdi som kontrollen i både G1/G0- og S-fasen, se *diagram 1* og *2*.

Resultatene fra t-testene utført mellom kontroll og hver av de to stressforsøkene, presentert i *tabell 7* (vedlegg A.6.2), viser signifikante forskjeller i flere faser. Stressforsøk én opplever en økning i både G1/G0- og S-fasen, mens stressforsøk to opplever en nedgang i G2/M-fasen. En nedgang i G2/M- og/eller S-fasen kan indikere en påbegynt G1-arrest. Økningen i G1/G0-fasen i stressforsøk én støtter opp under dette. Til tross for dette finner økningen sted i G1/G0-fasen i stressforsøk én, mens den observerte nedgangen finner sted i G2/M-fasen i stressforsøk to. Det kan i dette tilfellet ikke konkluderes med at det er noen cellesyklusarrest da resultatene er fra ulike stressforsøk. Det observeres ingen indikasjoner på G1-arrest dersom prøve 4.1.3 inkluderes i t-testen, se *tabell 10* (vedlegg A.6.5). Her er det kun en økning i S-fasen i stressforsøk én og det forekommer ingen endring i G1/G0-fasen.

5.4.5 Oppsummering av analyse av cellesyklus

Med unntak av kontroll etter første stressintervall og P.4.1.3, som blir vurdert som uteliggere, er det observert minimale endringer i cellesyklus. Uten betydelige endringer i cellesyklus ville en komparativ analyse for å studere uttrykkelse av biomarkører som HSP70 vært nyttig for å påvise en stressrespons i cellene. Økt produksjon av HSP70 er en del av sekundærresponsen, mer spesifikt den cellulære responsen, hos organismer utsatt for stress. En studie som undersøker stressrespons i form av uttrykkelse av HSP70 i CHSE-214-celler viser et forhøyet uttrykk av HSP70 etter to timer termisk stress med en ytterligere økning etter fire-seks timer (12). Utrykking av HSP70 kan videre inducere en G1- eller G2/M-arrest (33). Genuttrykk av HSP70 over normalnivå vil dermed være en pålitelig komparativ analyse som kan underbygge eventuelle resultater som antyder en cellesyklusarrest.

Verdien observert etter første stressintervall i G1/G0-fasen i stressforsøk én, se *tabell 3* (vedlegg A.5.1), er høyere sammenlignet med etterfølgende stressintervall, men den observerte differansen er marginal. En sammenligning av stressintervallene gir en svakere indikasjon på endringer i cellesyklus, men da kontroll er vurdert å være en uteligger er det ikke mulig med en sammenligning av kontroll og stressforsøk etter første stressintervall. En forklaring på observasjonene er at det har forekommet en G1-arrest etter første stressintervall etterfulgt av en tilvenning til det termiske stresset. I en slik tilvenning vil cellenes stressrespons, inkludert en eventuell cellesyklusarrest, reduseres ved gjentatte stressintervall og til slutt opphøre. Cellene er dermed ubeskyttet mot stressoren, slik at stresset blir kronisk. Dette vil skade cellene og kan føre til sykdom og eventuell død (10;20).

En tre dager lang studie undersøkte effekten naturlige temperatursvingninger i elver har på stressresponsen hos atlantisk laks, mer spesifikt uttrykkelsen av HSP70, og om det foregår en tilvenning til det termiske stresset. Det ble observert at en temperaturøkning opp til maksimalt 27 °C førte til økt uttrykkelse av HSP70. Forsøket konkluderte videre med at tre dager ikke var tilstrekkelig tid til at fisken ble tilvendt stresset og opplevde en såkalt heat-hardening-respons (14). Konklusjonen fra studien svekker den overnevnte tolkningen av økningen i G1/G0-fasen; en G1-arrest etter første stressintervall og en videre tilvenning til det termiske stresset. Den svekkes på bakgrunn av at de tre dagene studien varte ikke var tilstrekkelig for å oppnå en slik respons. Derfor vil de fire dagene dette stressforsøket varte, en dag lenger enn i studien, trolig heller ikke være det.

Antagelsen om at det har oppstått en tilvenning til det termiske stresset er avhengig av at stressforsøkene verdier nærmer seg kontrollens verdier etter gjentatte stressintervall. Resultatene fra t-test utført mellom kontroll og stressforsøk én etter fjerde stressintervall svekker ytterligere bevisene for en tilvenning. Dette da det observeres en økning i G1/G0-fasen etter fjerde stressintervall, se *tabell 7* (vedlegg A.6.2). I stressforsøk to observeres derimot en tilnærmet lik verdi i både G1/G0- og S-fasen etter fjerde stressintervall, se *diagram 1* og *2*. Videre viser t-testene som sammenligner fjerde stressintervall i stressforsøk to med foregående stressintervall at fjerde stressintervall har en lavere verdi, se *tabell 9* (vedlegg A.6.4). Dette er likevel ikke en pålitelig indikasjon på en tilvenning da også kontrollens verdi er lavere etter fjerde stressintervall sammenlignet med foregående kontroller. Det kan potensielt være en naturlig variasjon i kontrollen og stressforsøk to.

Den signifikante økningen i G2/M-fasen etter tredje stressintervall kan være en indikasjon på en cellesyklusarrest, men som nevnt i *5.4.3 Analyse av cellesyklus etter tredje stressintervall* er dette trolig en naturlig variasjon. Ved økt uttrykkelse av HSP70 i celler kan det forekomme en G2/M-arrest, men en G2/M-arrest blir ikke observert i denne oppgaven. En studie på fibroblastceller fra museembryo som undersøker sammenhengen mellom en økt uttrykkelse av HSP70 og G2/M-arrest kan forklare årsaken til fraværet av G2/M-arrest i det termiske stressforsøket. I studien demonstreres det at en mild dose stress alene ikke er nok til å indusere en cellesyklusarrest. Mildt stress etterfulgt av dødelig stress vil derimot føre til at cellen går inn i en G2/M-arrest. Den dødelige dosen vil normalt føre til at cellen går inn i apoptose, men det økte nivået av HSP70 som følge av foregående mildt stress forhindrer dette (33). Det er derfor mulig at en høyere dose stress i form av en høyere temperatur eller et lenger stressintervall kreves for å se en cellesyklusarrest. Studien viser derimot kun effektene av ett og to stressintervall, ett mildt stress og ett dødelig stress. Den omfatter med andre ord ikke gjentatte stressintervall og en G2/M-arrest kan derfor ikke utelukkes ved utførelse av flere stressintervall enn de fire induert i dette stressforsøket.

5.5 Analyse av HSP70

Celler ble isolert fra to av brønnene på hvert brett brukt i forsøket, altså både stressforsøk og kontroller, for analyse av HSP70. Når cellesuspensjonen ble tilsatt i RNA-later oppstod det noe bobling ved pipettering. Dette gjorde at ikke alt av cellesuspensjonen kom med. Ved analyse av HSP70 ved qPCR vil dette trolig ikke påvirke analysen da det tas høyde for

eventuelle variasjoner i antall celler ved videre preparering. Den videre prepareringen og analysen av HSP70 etter tilsetning i RNA-later ble ikke utført grunnet koronavirus-pandemien som førte til nedstengning av laboratoriet.

5.6 Videre forskning

Ved analyse av cellesyklus i CHSE-214-celler etter gjentatt mildt termisk stress ble det observert små til ingen endringer i verdiene i de ulike fasene. Dette indikerer at det ikke har forekommet en cellesyklusarrest. Ved videre forskning vil flere paralleller til hvert stressintervall i tillegg til en komparativ analyse i større grad kunne validere forsøkets resultater. For å kartlegge effekten gjentatt stress har på cellene må forsøket utvides over flere dager. I tillegg vil det være nyttig å studere et lengre stressintervall eller eventuelt en høyere temperatur. Dette vil gi informasjon om stresset som kreves for at det skal forekomme en cellesyklusarrest i CHSE-214-celler. Det er per i dag få studier som har studert effekten gjentatt stress har på celler, særlig når det gjelder celler fra fisk.

Konsekvensene gjentatt mildt termisk stress har på fisk blir stadig viktigere, ettersom at fisk, som en følge av global oppvarming, stadig opplever høyere temperaturer. Blant annet vil det være viktig å forstå antall stressintervall som kreves før cellene eventuelt tilvenner seg stresset. En slik respons, eller mer spesifikt mangel på en respons, vil være skadelig for fisken. Stressresponsen beskytter cellene mot skade ved å opprettholde cellenes homeostase. Over tid kan en mangel på stressrespons føre til et nedsatt immunforsvar og en eventuell død. Økt dødelighet blant fisk og en følgelig nedgang i bestander vil kunne ha store konsekvenser for fiskerinæringen. Det er derfor viktig å forstå omfanget av gjentatt mildt termisk stress på fisk da dette både kan påvirke menneskers økonomi og levesett.

6.0 Konklusjon

Analysen av cellesyklus i CHSE-214-celler ved bruk av flowcytometer viste liten variasjon mellom prøver utsatt for termisk stress og kontroll. I utgangspunktet indikerer dette at cellene ikke påvirkes av mildt termisk stress når dette gjentas opp til fire ganger med et stressintervall på to timer og en hviletid på 24 timer. Den svake økningen observert i G1/G0-fasen etter første- og fjerde stressintervall kan likevel være en respons på termisk stress. For å kunne avgjøre om termisk stress er årsaken til økningen, eller om det er et resultat av naturlig variasjon, kreves det derimot flere paralleller til de enkelte stressintervallene. Økningen i G1/G0-fasen etter fjerde stressintervall indikerer at det ikke har forekommet en tilvenning til det termiske stresset. For å undersøke cellenes tilvenning til stress vil en komparativ analyse, som for eksempel en analyse av biomarkøren HSP70, være fordelaktig. En slik analyse vil gi bedre forståelse av sammenhengen mellom gjentatt termisk stress og endringer i stressresponsen. Resultatene indikerer videre at én til fire stressintervall med mildt termisk stress ikke fører til store nok endringer i cellesyklus til at det forekommer en cellesyklusarrest.

Litteraturliste

1. Miljødirektoratet. Vi endrer havet [Internett]. miljødirektoratet.no: Miljødirektoratet [oppdatert 2019; lest 07. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/m1375/m1375.pdf>
2. Miljødirektoratet. Fisk og havbruk [Internett]. miljødirektoratet.no: Miljødirektoratet [oppdatert 19. Desember 2019; lest 11. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/myndigheter/klimaarbeid/klimatilpasning/klimatilpasning-i-sektorer/fiske-og-havbruk/>
3. Allen MR, Dube PO, Solecki W, Aragón-Durand F, Cramer W, Hymprheys S, et al. Global Warming of 1.5°C. I. ipcc.ch: IPCC; 2018. Tilgjengelig fra: https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/2/2019/05/SR15_Chapter1_Low_Res.pdf
4. Kituyi M, Thomson P. 90% of fish stocks are used up - fisheries subsidies must stop emptying the ocean [Internett]. weforum.org: World Economic Forum [oppdatert 12. Juni 2018; lest 07. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: <https://www.weforum.org/agenda/2018/07/fish-stocks-are-used-up-fisheries-subsidies-must-stop/>
5. Bryne S. Norsk laks i faresonen. dagbladet 18. November 2005 2005. Tilgjengelig fra: <https://www.dagbladet.no/nyheter/norsk-laks-i-faresonen/66155037>
6. Akbarzadeh A, Gunther OP, Houde AL, Li S, Ming TJ, Jeffries KM, et al. Developing specific molecular biomarkers for thermal stress in salmonids. BMC Genomics 2018;19(1). DOI: 10.1186/s12864-018-5108-9 Tilgjengelig fra: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12864-018-5108-9>
7. Pethon P, Vøllestad A. Fisk [Internett]. snl.no: Store norske leksikon [oppdatert 15. August 2019; lest 10. Februar 2019]. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/fisk>
8. Strøm JF. Laksens fantastiske vandringer i havet [Internett]. forskning.no: Forskning.no [oppdatert 23. August 2019; lest 07. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: <https://blogg.forskning.no/blogg-villaksbloggen/laksens-fantastiske-vandringer-i-havet/1360384>
9. School of Biostudies Kyoto University. Low-dose Stress Group [Internett]. fish.lif.kyoto-u.ac: Graduate School of Biostudies, Kyoto University [lest 08. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: http://www.fish.lif.kyoto-u.ac.jp/en/stress_en.html

10. Schwab M. Cell Cycle Arrest. I: Schwab M, red. Encyclopedia of Cancer. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. s. 737. Tilgjengelig fra: https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_995
11. Tumer-Walker AG, Colucci AC. Optimisation of a Protocol for the Analysis of Cell Cycle in Chinook Salmon Embryonic Cells (CHSE-214) Using Flow Cytometry: Analysis of Cell Cycle in Response to Thermal Stress. Ålesund: Norwegian University of Science and Technology; 2019.
12. Kirketeig R, Hauge BM. Endring i proteinekspresjon av HSP70 hos CHSE-214 cellelinje, forårsaket av stress ved høy temperatur og videre optimalisering av prosedyre for visualisering på SDS-PAGE. Ålesund: Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet; 2019.
13. Benestad R, Mamen J, Harstveit K, Fuglestad JS. Klimaendringer [Internett]. snl.no: Store norske leksikon [oppdatert 20. Januar 2020; lest 11. Februar 2020]. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/klimaendringer>
14. Tunnah L, Currie S, MacCormack TJ. Do prior diel thermal cycles influence the physiological response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to subsequent heat stress? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2017;74(1):127-39. DOI: 10.1139/cjfas-2016-0157 Tilgjengelig fra: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.1139/cjfas-2016-0157>
15. Kortsch S. Forskeren forteller: Glupske fisk endrer økosystemet i Arktis [Internett]. Forskning [oppdatert 19. September 2015; lest 13. Februar 2020]. Tilgjengelig fra: <https://forskning.no/forskeren-forteller-okologi-havforskning/forskeren-forteller-glupske-fisk-endrer-okosystemet-i-arktis/471262>
16. Jære L. Arter på vandring [Internett]. BarentsWatch [oppdatert 13. Juni 2017; lest 13. Februar 2020].
17. Sundt-Hansen L. Vil det bli for hett for villaksen i fremtidens klima? NINA, Norsk institutt for naturforskning 30. April 2018 2018. Tilgjengelig fra: <https://www.nina.no/Aktuelt/Nyhetsartikkel/ArticleId/4499/Vil-det-bli-for-hett-for-villaksen-i-fremtidens-klima>
18. Caissie D, Breau C, Hayward J, Cameron P. Water temperature characteristics of the Miramichi and Restigouche Rivers. Miramichi, New Brunswick, Canada: Canadian Department of Fisheries and Oceans; 2013.
19. Svartdal F, Malt U. Stress [Internett]. snl.no: Store norske leksikon [oppdatert 31. Oktober 2019; lest 10. Februar 2020]. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/stress>

20. Iwama GK, Vijayan MM, Forsyth RB, Ackerman PA. Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *Am Zool* 1999;39(6):901-9.
21. Moberg GP, Mench JA. The biology of animal stress basic principles and implications for animal welfare: CAB International; 2000. Tilgjengelig fra: https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=LmKCN-7kluYC&oi=fnd&pg=PA1&dq=biological+stress&ots=g3O-fuHtjd&sig=WMNgH7FuxSSPAs2woNZ8jRya7Rg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
22. Berg JP. Katekolaminer [Internett]. snl.no: Store norske leksikon [oppdatert 28. Januar 2020; lest 11. Februar 2020]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/katekolaminer>
23. Jolly C, Morimoto RI. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(19):1564-72.
24. Aarnes H. Varmesjokkproteiner [Internett]. snl.no: Store norske leksikon [oppdatert 25. Juni 2019; lest]. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/varmesjokkproteiner>
25. Hartl FU, Andreas B, Manajit H-H. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 2011;475(7356):324.
26. Miller DJ, Fort PE. Heat Shock Proteins Regulatory Role in Neurodevelopment. *Front Neurosci* 2018;12(821).
27. Mayer M, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(6):670-84.
28. Lindqvist A, van Zon W, Karlsson Rosenthal C, Wolthuis RMF. Cyclin B1–Cdk1 Activation Continues after Centrosome Separation to Control Mitotic Progression. *PLoS Biol* 2007;5(5):e123.
29. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Essential cell biology. Fourth utg. 711 Third Avenue, New York, NY 10017, USA and 3 Åark Square, Milton Park, Abingdon, OX14 4RN, UK.: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2014.
30. UiO: Institutt for biovitenskap. Cellesyklus [Internett]. uio.no: UiO: Institutt for biovitenskap [oppdatert 25. Januar 2020; lest 07. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/c/cellesy.html>
31. Aarnes H. Cellesyklus [Internett]. snl.no: Store norske leksikon [oppdatert 28. Januar 2020; lest 18. Januar 2020]. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/cellesyklus>

32. Schwab M. Cell Cycle Checkpoint. I: Schwab M, red. Encyclopedia of Cancer. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. s. 737-. Tilgjengelig fra: https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_996
33. Luft JC, Benjamin IJ, Mestril R, Dix DJ. Heat Shock Factor 1-Mediated Thermotolerance Prevents Cell Death and Results in G2/M Cell Cycle Arrest. Cell Stress Chaperones 2001;6(4):326-36.
34. Kierulf P. flowcytometri [Internett]. snl.no: Store norske leksikon [oppdatert 31. Desember 2018; lest 19. Februar 2020]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/flowcytometri>
35. Fenstad MH, Rø AD. Flowcytometri i klinisk praksis [Internett]. Bioingeniøren [oppdatert 11. Mai 2017; lest 19. Februar 2020]. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/fag/fag-originalartikkel/flowcytometri-i-klinisk-praksis/>
36. Castillo-Hair S. FlowCal: Software for Analysis and Calibration of Flow Cytometry Data [Internett]. benchling.com: Benchling [lest 07. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: <https://benchling.com/pub/tabor-flowcal>
37. BD Biosciences. BD Accuri C6 Flow Cytometer Optical Filter Guide [Internett]. bdbiosciences.com: BD Biosciences [oppdatert 2014; lest 07. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Accuri_Optical_Filter_Guide.pdf
38. Bio-Rad. Plots, gates and regions [Internett]. bio-rad-antibodies.com: Bio-Rad [lest 07. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-gating-strategies.html?JSESSIONID_STERLING=00A56AC867B0BEB99D81B9C4D22D48CB.ecommerce1&JSESSIONID=AFC1260C68F65A45A5B625AA86535944.lsdse1a&evCntryLang=NO-EN&cntry=NO&thirdPartyCookieEnabled=true
39. Public Health England. Culture Collections - ECACC General Cell Collection: CHSE-214. phe-culturecollections.org.uk: Public Health England; 2020.
40. Vøllestad A. Stillehavslaks [Internett]. snl.no: Store norske leksikon [oppdatert 30. November 2012; lest 02. Mars 2020]. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/stillehavslaks>
41. Proteintech. Cell types and culture characteristics [Internett]. ptglab.no: Proteintech [lest 07. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: <https://www.ptglab.com/support/cell-culture-protocol/cell-types-culture-characteristics/>
42. ThermoFisher. Adherent cell culture vs. suspension cell culture [Internett]. [lest 02. Mars 2020]. Tilgjengelig fra:

- <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>
43. ThermoFisher. Leibovitz's L-15 Medium, GlutaMAXtm supplement [Internett]. [lest 02. Mars 2020]. Tilgjengelig fra:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/31415086?SID=srch-srp-%2031415086#/31415086?SID=srch-srp-%2031415086>
 44. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 2015;7(12):a006080.
 45. Gibco Education. Cell Culture Basics Handbook [Internett].
thermofisher.com/gibcoeducation: ThermoFisher Scientific; [lest 07. Mai 2020].
Tilgjengelig fra:
https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf?fbclid=IwAR0St0B2INSR0hcjsjL8ZT_p_vyokQ7LmV_H0zQ8GtpTxmidF45ZTzZLYqk
 46. Livik M. Et eksperimentelt studium av kreftceller fra livmorhals - Strålesensitivitet, effektutvikling og cGMP nivåer. Tromsø: Universitetet i Tromsø; 2008.
 47. Merck. Cell Dissociation with trypsin [Internett]. [lest 11. Mai 2020]. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-dissociation-with-trypsin.html>
 48. Talukder MA, Menyuk CR, Kostov Y. Distinguishing between whole cells and cell debris using surface plasmon coupled emission. Biomedical optics express 2018;9(4):1977-91.
 49. Falkeid E, Pursti SM, Rigstad SN. Optimisation and validation of RT-qPCR assay for relative quantitation of references genes and stress related regulatory genes in CHSE-214 cells. Ålesund: Norwegian Univeristy of Science of Technology; 2019.
 50. Kvittingen I, Torgersen E. Hva er p-verdi og hva betyr statistisk signifikant? forskning 08. April 2019.

A.0 Vedlegg

A.1 Reagenser

Tabell 2: Tabellen viser de ulike reagensene og kit som ble brukt i forsøkene, inkludert artikkelnummer og leverandør.

Reagens	Artikkelnummer	Leverandør
Cellebrett	E200235D	Greiner bio-one
Celleflasker	734-2313	VWR
CHSE-214	91041114-1VL	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich
Rektifisert sprit Etanol 96%	200-578-6	Kemetyl
Fetal Bovine Serum (FBS) One Shot	A3160801	Gibco
Flow Cytometer Fluid kit	1811556540	BD Bioscience
Gentamicin Reagent solution	15750-060	Gibco
HBSS	SH30588.01	HyClone
L-15 Medium (Leibovitz)	SLCC5700	Sigma-Aldrich
PI/RNase	F10797	Thermo Fisher Scientific
RNA-later	148036916	Qiagen
Spherotech 6-peak Validation beads	653145	BD Accuri
Spherotech 8-peak validation beads	653144	BD Accuri
Trypsin-EDTA (0.25%)	2085461	Gibco

A.2 Prosedyrer

A.2.1 Rutiner i cellelaboratoriet

Prosedyre for rutiner som skal følges i cellelaboratoriet for å forhindre kontaminering i cellekulturen og spredning av cellemateriale i miljøet. Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

1. Før entring til cellelaboratoriet må det tas på skotrekk
2. Hvis UV-skiltet henger på døren, sørg for å skru av UV-lampen med en gang du går inn i laboratoriet.
3. LAF-benken må skrues på 15 minutter før bruk. Forsikre deg om at luftstrømmen i benken har korrekt hastighet før bruk.
4. Ha alltid på labfrakk, og hvis du har langt hår må dette opp i strikk.
5. Vask hendene og ta på deg hansker. Desinfiser hanskene med 70 % etanol. Spray armene med 70 % etanol.
6. Spray innsiden av LAF-benken med 70 % etanol når du skrur på LAF-benken. Alt inne i LAF-benken skal være dekket av 70 % etanol før det legges inn.
7. Tørk opp søl med en gang med papir og vask overflaten med 70 % etanol.
8. Under arbeid, ha så få objekter som mulig inne i LAF-benken, og unngå å ha noe direkte på luftstrømmen.
9. Planlegg arbeidet i LAF-benken. Alt av utstyr som skal brukes skal være plassert før start av arbeid. Medium og saltløsninger burde ha ideell temperatur før du begynner å bruke dem. Unngå å gå ut og inn av LAF-benken flere ganger under arbeid med celler. Hvis du må ta ut hendene fra LAF-benken må de sprayes med 70 % etanol før du tar dem inn igjen.
10. Aldri åpne cellekulturflasker, brett eller pipettespisser før du entrer LAF-benken. Ta alltid på lokk så raskt som mulig etter bruk.
11. Bruk beholder for brukt medium og pipettespisser inne i kabinetet og kast innholdet i biohazard-beholder etter du har fullført arbeidet.
12. Aldri berør serologiske pipetter direkte.
13. Alle lokk skal vende med innsiden ned når de er tatt av flaskene.
14. Aldri arbeid med to ulike cellelinjer i LAF-benken på samme tid siden dette kan føre til kryss-kontaminering.

15. Aldri bruk samme pipette i to ulike beholdere eller legg igjen pipetten i flasken etter bruk.
16. Prøv å ikke berør flaskehalsen med pipetten.
17. Vær så stille som mulig når du arbeider i LAF-benken. Bruk ansiktsmaske ved forkjølelse.
18. Arbeid så raskt som mulig.
19. Legg cellene tilbake i inkubatoren etter at arbeidet er ferdig. Ta vekk alle objekter fra LAF-benken og vask benken med 70 % etanol. Sett på coveret til LAF-benken og skru på UV-lyset. Ingen skal oppholde seg i cellelaboratoriet når UV-lyset står på. Dette kan medføre alvorlige brannskader på huden. Skru av UV-lyset etter to timer.

A.2.2 Cellekultivering

Prosedyre som beskriver fremgangsmåte ved dyrkning og splitting av CHSE-214-celler. Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

1. Start LAF-benk etter prosedyre.
2. Klargjør utstyr og planlegg i arbeidet i LAF-benk.
3. Sjekk konfluensen til cellene i et invertermikroskop, skal være mellom 70-80 % ved splitting.
4. Sug av og kast gammelt medium.
5. Skyll cellene forsiktig 2x5 ml med HBSS. HBSS suges av og kastes.
6. 0,5 ml 0,25 % Trypsin tilsettes og fordeles godt over alle cellene ved å bevege flasken sakte fra side til side. La stå i romtemperatur.
7. Dunk forsiktig på flasken og studer denne under invertermikroskop. Når minst 80 % av cellene har løsnet er trypsineringen ferdig.
8. Tilsett 4 ml L-15 medium for å inaktivere Trypsin.
9. Bland forsiktig cellesuspensjonen og overfør den til et 15 ml falconrør.
10. Sentrifuger cellesuspensjonen på 1200 rpm i tre minutt.
11. Sjekk at det har blitt dannet en cellepellet før supernatanten suges av og kastes.
12. Tilsett 1 ml L-15 medium for å løsne pelleten. Pipetter opp og ned til pelleten er løst.
13. Tilsett L-15 medium til cellesuspensjonen. Volum som skal tilsettes avhenger av splittingsforhold og arealet til den nye beholderen. Det totale volum av cellesuspensjon og medium i nye celleflasker eller cellebrett skal være 20 ml i en 75 cm² celleflaske og 6 ml i hver 9,6 cm² brønn i et cellebrett med seks brønner.
 - a. 5 ml L-15 medium tilsettes cellesuspensjonen ved splitting til 75 cm² celleflasker med 1:2 forhold.
 - b. 8 ml L-15 medium tilsettes cellesuspensjonen ved splitting til cellebrett med 9,6 cm² brønner med 1:3 forhold.
14. Tilsett L-15 medium til nye celleflasker eller cellebrett. Volum avhenger av splittingsforhold og arealet til den nye beholderen.
 - a. 17 ml L-15 medium tilsettes to nye celleflasker ved splitting til 75 cm² celleflasker med 1:2 forhold.
 - b. 5,5 ml L-15 medium tilsettes cellesuspensjonen ved splitting til cellebrett med 9,6 cm² brønner med 1:3 forhold.

15. Cellesuspensjon tilsettes nye celleflasker eller cellebrett med medium.
- a. 3 ml cellesuspensjon tilsettes to nye celleflasker ved splitting til 75 cm^2 celleflasker med 1:2 forhold.
 - b. 0,5 ml cellesuspensjon tilsettes cellesuspensjonen ved splitting til cellebrett med $9,6 \text{ cm}^2$ brønner med 1:3 forhold.
16. Bland cellesuspensjon og medium forsiktig ved å bevege sakte på flasken eller brettet og sett deretter inn i inkubatorskap på $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

A.2.3 Fiksering og preparering av prøvemateriale

Prosedyre for fiksering og preparering av prøvemateriale før analyse på flowcytometer.

Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

1. Start LAF-benken etter prosedyre.
2. Klargjør utstyr og planlegg i arbeidet i LAF-benk.
3. Sjekk konfluensen til cellene i et invertmikroskop, skal være mellom 70-80 % ved splitting.
4. Sug av og kast gammelt medium.
5. Skyll cellene forsiktig 2x3 ml med PBS. PBS suges av og kastes. Bruk samme pipette til alle brønner i et brett.
6. 0,3 ml 0,25% Trypsin tilsettes og fordeles godt over alle cellene ved å bevege flasken sakte fra side til side. La stå i romtemperatur.
7. Dunk forsiktig på flasken og studer denne under invertmikroskop. Når minst 80 % av cellene har løsnet er trypsineringen ferdig.
8. Tilsett 4 ml L-15 medium for å deaktivere Trypsin.
9. Bruk en celleskrape for å forsiktig løsne cellene fra brønnen. Utfør i rekkefølge brønn 1-6.
10. Pipetterer ut cellesuspensjonen fra hver brønn og over i hvert sitt falconrør.
11. Ta ut 11 µl cellesuspensjon fra falconrør 3-6 og tilsett i hvert sitt Burkers tellekammer.
12. Sentrifugerer falconrør 3-6 i seks minutt på 1200 rpm.
13. Pipetter ut supernatanten.
14. Tilsett 1 ml PBS til hvert falconrør og bland ved å pipettere opp og ned.
15. Tilsett 500 µl av cellesuspensjonen i to 15 ml falconrør med 4 ml etanol.
16. Vortex falconrørene direkte tilsetning.
17. Plasser rørene i fryseren i 21-24 timer.
18. Sentrifuger prøvene ved 1200 rpm i fem minutt.
19. Sug av supernatanten og løs opp pelleten ved å knipse lett på falconrøret.
20. Tilsett 5 ml PBS i hvert rør og vortex direkte etter tilsetning.
21. La falconrørene stå i 15 minutt.
22. Sentrifuger falconrørene ved 1200 rpm i fem minutt.
23. Sug av supernatanten og løs opp pelleten ved å knipse lett på falconrøret.
24. Tilsett 0,5 ml PI/RNase i hvert falconrør og inkuber 90 minutt i mørket.

A.2.4 Kalibrering av flowcytometeret

Prosedyre for kalibrering av flowcytometer før og etter bruk. Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

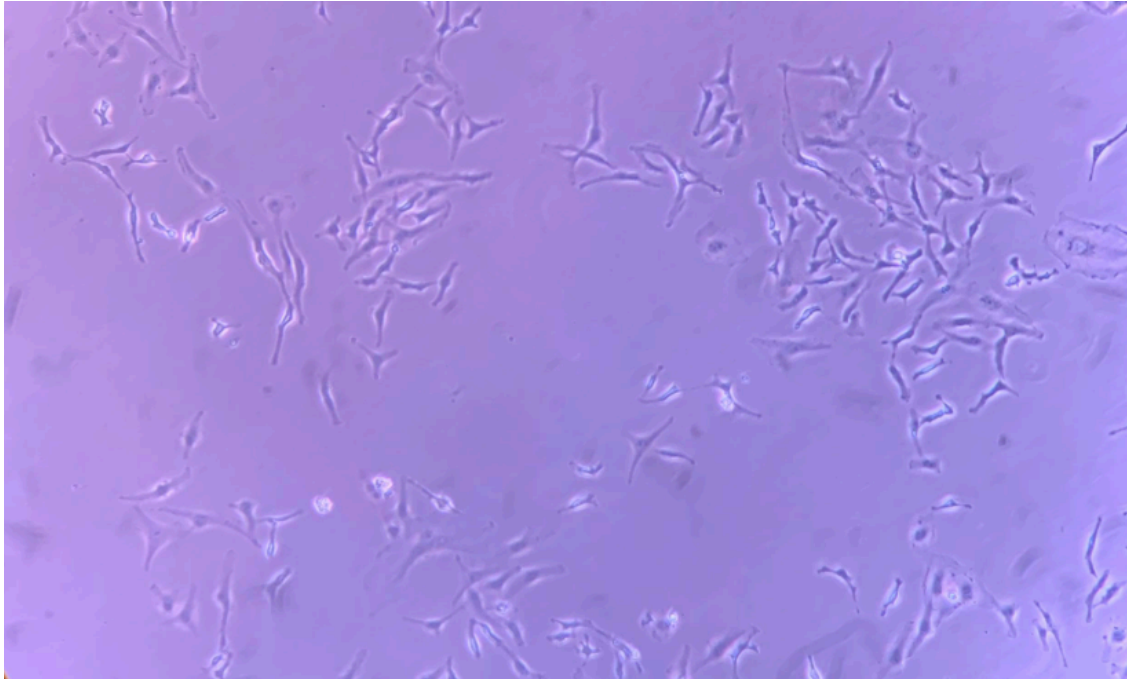
1. Preparerer seks kalibreringsrør og la dem stå i et rack.
2. De ulike kalibreringsrørene skal være som følger:
 - a. Clean (rør 1)
 - b. Dekontaminering (rør 2)
 - c. MQ-vann (rør 3)
 - d. 8-peak bead (rør 4)
 - e. 6-peak bead (rør 5)
 - f. MQ-vann (rør 6)
3. Rør 1 og 2 er allerede preparert klart. Rør 4 består av 0,5 ml MQ-vann + en dråpe 8-peak bead miks. Rør 5 er laget av 0,5 ml MQ-vann + en dråpe 6-peak bead miks.
4. Start datamaskinen og trykk på ikonet for flowcytometer.
5. Bla deg frem og finn filen: «*wash and clean templat*». Velg «*wash and clean templat*» og vent til grønt signal.
6. Velg så parameterne; Clean 2-5 minutter *FAST!*
7. Plasser rør 1 (clean) i instrumentet og trykk på *RUN!* Lagre filen; marker filen med dato og tid. Kontroller at events ikke overstiger 100 events/s.
8. Erstatt rør 1 med rør 2 (dekontaminering). Trykk *RUN!*
9. Erstatt rør 2 med rør 3 (MQ-vann). Trykk *RUN!*
10. Erstatt rør 3 med rør 4 (8-peak bead) og velg parameterne *SLOW* og 10000 events/s. Events skal ligge på rundt 200, hvis ikke kan hastigheten økes til *MEDIUM* eller *FAST*. Kontroller at plot 3. M6 CV FL2-H ligger under 5 %.
11. Etter endt analyse av rør 4 (8-peak bead), trykk *BACKFLUSH!* Kontroller at det kommer dråper fra aspireringsnålen i instrumentet. Tørk deretter med linsepapir.
12. Erstatt rør 4 med rør 5 (6-peak bead) og velg parameterne *SLOW* og 10000 events/s. Kontroller at plot 6. M12 CV FL-4H ligger under 5 %.
13. Etter endt analyse med rør 5 (6-peak bead) trykk *BACKFLUSH!* Kontroller at det kommer dråper fra aspireringsnålen i instrumentet. Tørk deretter med linsepapir.
14. Erstatt rør 5 med rør 6 (MQ-vann). Velg parameterne *FAST* i fem minutter. La røret stå igjen i instrumentet.

A.2.5 Analysering på flowcytometer

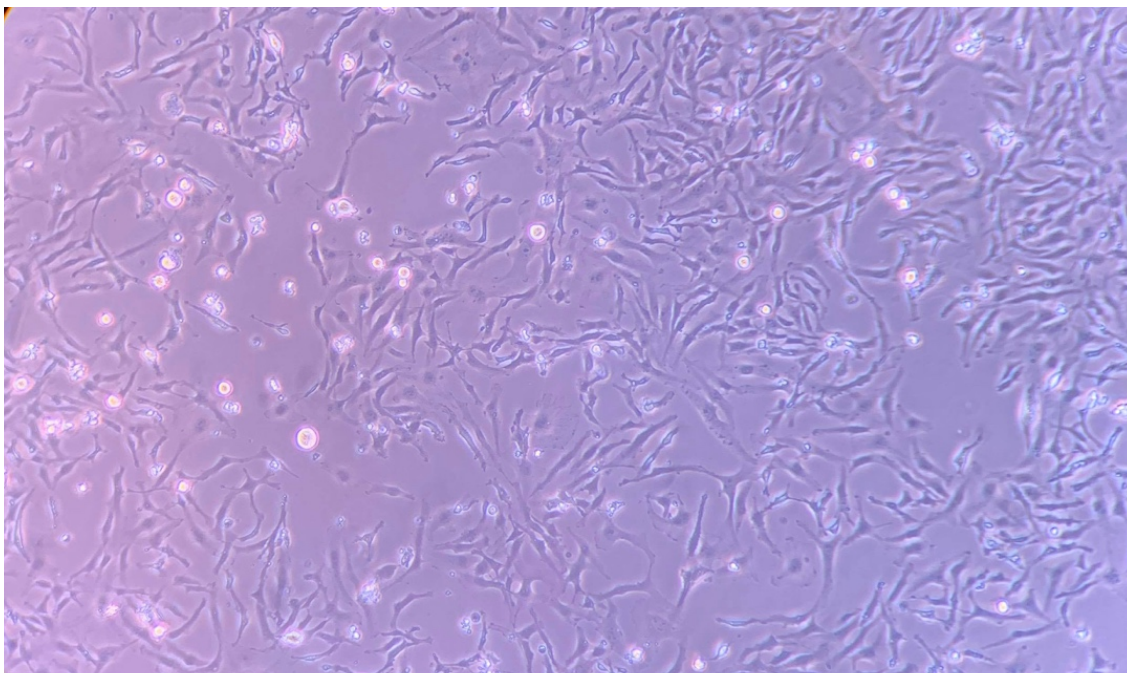
Prosedyre for bruk av flowcytometer til å analyse cellyklus i en prøve. Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

1. Kalibrer flowcytometeret etter prosedyre.
2. Overfør cellysuspensjon fra hvert falconrør til sitt respektive prøverør.
3. Sett prøverørene på is og dekk til med aluminiumsfolie.
4. Åpne fil med riktig templat.
5. Velg parameterne *SLOW* og 20000 events/s.
6. Erstatt rør 6 (MQ-vann) med prøverør 1 og trykk *RUN!*
7. Erstatt prøverør 1 med neste prøverør osv.
8. Etter endt analyse av alle prøverør, kalibreres flowcytometeret igjen etter prosedyre.

A.3 CHSE-214-celler



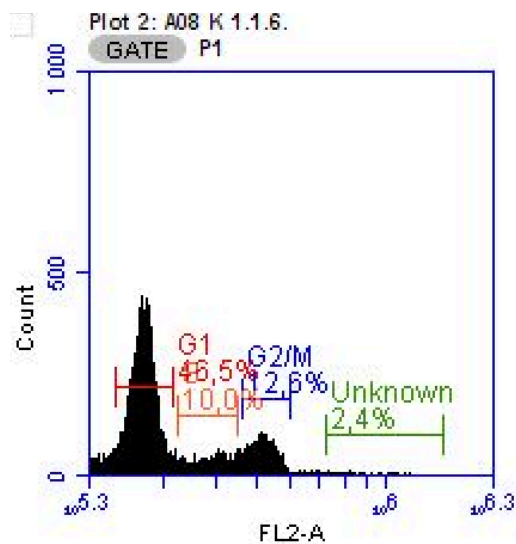
Figur 5: CHSE-214-celler med ca. 40 % konfluens observert gjennom et invertmikroskop.



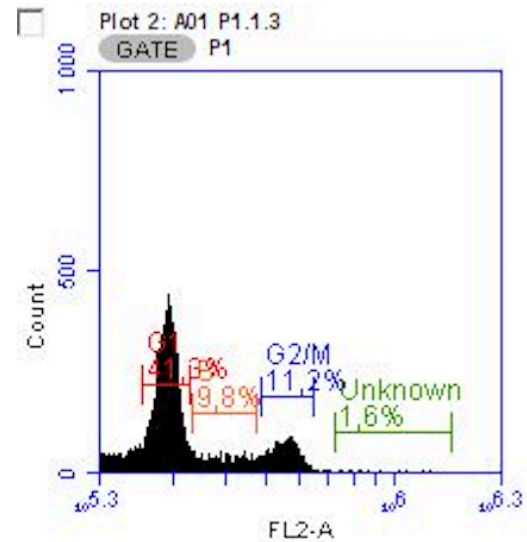
Figur 6: CHSE-214-celler med ca. 80 % konfluens observert gjennom et invertmikroskop.

A.4 Histogram over cellyklus fra analyse på BD Accuri C6 Flowcytometer

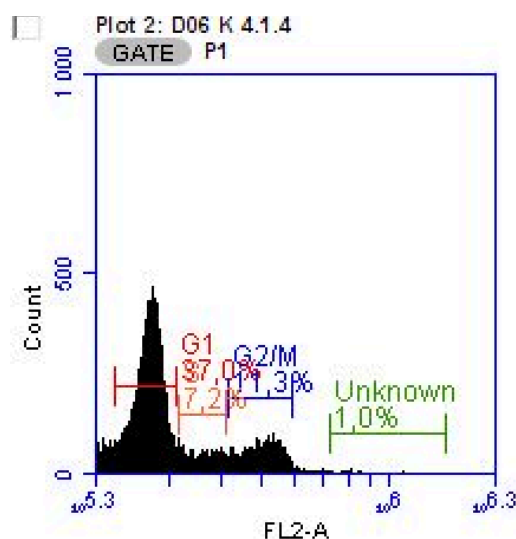
Utdrag av resultat av analyse av cellyklus på flowcytometer. Histogrammet fra plot 2 viser prosentandel celler i de ulike cellyklusfasene; G1/G0-, S- og G2/M-fasen. X-aksen viser størrelsen på cellene i plotet, mens y-aksen viser antall celler i den bestemte fasen.



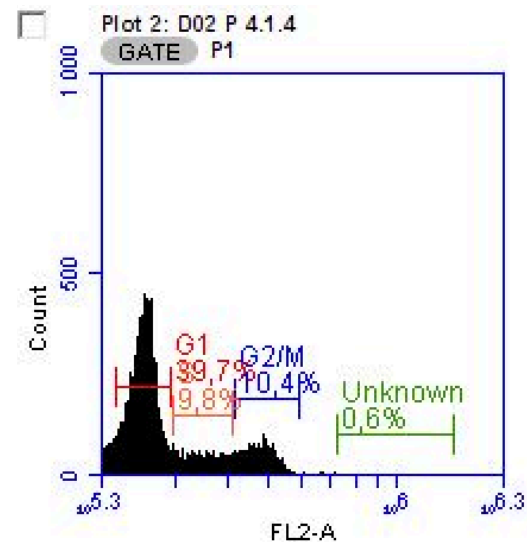
Figur 7: Parallell fra kontroll etter første stressintervall, prøve K.1.1.6



Figur 8: Parallell fra stressforsøk én etter første stressintervall, P.1.1.3



Figur 9: Parallell fra kontroll etter fjerde stressintervall, K.4.1.4



Figur 10: Parallell fra stressforsøk én etter fjerde stressintervall, P.4.1.4

A.5 Prosentandel celler i cellyklusfasene

Tabeller over prosentandel av celler i G1/G0-, S- og G2/M-fasen fra plot 2 på flowcytometeret. Fra cellebrett brukt til stressforsøk og kontroll har brønn tre-seks blitt brukt til analyse av cellyklus, totalt fire paralleller. Hver enkelt parallell av stressforsøkene og kontroll er navngitt som følger: Prøve, første stressintervall/stresset en gang, stressforsøk én og femte brønn. Dette presenteres som P.1.1.5. Kontroll er navngitt på tilsvarende måte ved at kontroll forkortes til K. Dette som eksempel. Fra følgende prøver mangler resultat som en konsekvens av for få celler for analyse eller store avvik. Dette gjelder K.1.1.3 - K.1.1.5, P.2.2.4, P.2.2.6, K.2.1.5, K.2.1.6, P.3.1.4 og K.3.1.5.

A.5.1 Oversikt over prosentandel celler i G1/G0-fasen

Tabell 3: Oversikt over prosentandel celler i G1/G0-fase. Kolonnene viser verdiene ved de ulike stressintervallene, fra første til fjerde stressintervall. Tabellen er videre delt inn etter resultat fra kontroll, stressforsøk én og stressforsøk to. Hver av disse har et maksimum på fire paralleller. Fra de fire parallellene ved hvert stressintervall er det regnet ut gjennomsnitt og standardavvik. I tillegg er det inkludert en rad med totalt antall prøver, gjennomsnitt og standardavvik fra begge stressintervallene.

	Første stressintervall	Andre stressintervall	Tredje stressintervall	Fjerde stressintervall
Kontroll	K.1.1	K.2.1	K.3.1	K.4.1
Brønn 3 (parallell 1)		40,1	35,3	37,2
Brønn 4 (parallell 2)		39,1	36,9	37,0
Brønn 5 (parallell 3)				37,3
Brønn 6 (parallell 4)	46,5		36,8	35,6
Gjennomsnitt	46,50	39,60	36,33	36,78
Standardavvik		0,71	0,90	0,79
Stressforsøk én	P.1.1	P.2.1	P.3.1	P.4.1
Brønn 3 (parallell 1)	41,3	38,3	35,7	38,6
Brønn 4 (parallell 2)	40,1	39,2		39,7
Brønn 5 (parallell 3)	42,7	39,4	38,3	46,7
Brønn 6 (parallell 4)	41,7	38,0	38,1	37,7
Gjennomsnitt	41,45	38,73	37,37	40,67
Standardavvik	1,08	0,68	1,45	4,10
Stressforsøk to	P.1.2	P.2.2	P.3.2	P.4.2
Brønn 3 (parallell 1)	38,3	42,7	39,9	37,3
Brønn 4 (parallell 2)	40,3		40,8	36,6
Brønn 5 (parallell 3)	39,6	40,7	40,1	37,1
Brønn 6 (parallell 4)	40,0		36,5	34,7
Gjennomsnitt	39,55	41,70	39,33	36,43
Standardavvik	0,88	1,41	1,92	1,19
Prøver fra stressforsøk én og to				
Totalt antall prøver	8	6	7	8
Gjennomsnitt	40,50	39,72	38,49	38,55
Standardavvik	1,36	1,74	1,91	3,60

A.5.2 Oversikt over prosentandel celler i S-fasen

Tabell 4: Oversikt over prosentandel celler i S-fase. Kolonnene viser verdiene ved de ulike stressintervallene, fra første til fjerde stressintervall. Tabellen er videre delt inn etter resultat fra kontroll, stressforsøk én og stressforsøk to. Hver av disse har et maksimum på fire paralleller. Fra de fire parallellene ved hvert stressintervall er det regnet ut gjennomsnitt og standardavvik. I tillegg er det inkludert en rad med totalt antall prøver, gjennomsnitt og standardavvik fra begge stressintervallene.

	Første stressintervall	Andre stressintervall	Tredje stressintervall	Fjerde stressintervall
Kontroll	K.1.1	K.2.1	K.3.1	K.4.1
Brønn 3 (parallell 1)		9,8	9,5	7,5
Brønn 4 (parallell 2)		10,9	8,6	7,2
Brønn 5 (parallell 3)				6,8
Brønn 6 (parallell 4)	10,0		9,5	7,5
Gjennomsnitt	10,00	10,35	9,20	7,25
Standardavvik		0,78	0,52	0,33
Stressforsøk én	P.1.1	P.2.1	P.3.1	P.4.1
Brønn 3 (parallell 1)	9,8	9,3	9,1	8,7
Brønn 4 (parallell 2)	10,0	7,9		9,8
Brønn 5 (parallell 3)	9,0	8,4	8,6	11,4
Brønn 6 (parallell 4)	8,1	7,8	8,5	8,0
Gjennomsnitt	9,23	8,35	8,73	9,48
Standardavvik	0,87	0,69	0,32	1,48
Stressforsøk to	P.1.2	P.2.2	P.3.2	P.4.2
Brønn 3 (parallell 1)	8,9	10,1	9,9	7,6
Brønn 4 (parallell 2)	10,6		11,1	6,7
Brønn 5 (parallell 3)	9,8	8,8	8,9	7,8
Brønn 6 (parallell 4)	8,6		9,6	7,4
Gjennomsnitt	9,48	9,45	9,88	7,38
Standardavvik	0,91	0,92	0,92	0,48
Prøver fra stressforsøk én og to				
Totalt antall prøver	8	6	7	8
Gjennomsnitt	9,35	8,72	9,39	8,43
Standardavvik	0,83	0,88	0,91	1,52

A.5.3 Oversikt over prosentandel celler i G2/M-fasen

Tabell 5: Oversikt over prosentandel celler i G2/M-fase. Kolonnene viser verdiene ved de ulike stressintervallene, fra første til fjerde stressintervall. Tabellen er videre delt inn etter resultat fra kontroll, stressforsøk én og stressforsøk to. Hver av disse har et maksimum på fire paralleller. Fra de fire parallellene ved hvert stressintervall er det regnet ut gjennomsnitt og standardavvik. I tillegg er det inkludert en rad med totalt antall prøver, gjennomsnitt og standardavvik fra begge stressintervallene.

	Første stressintervall	Andre stressintervall	Tredje stressintervall	Fjerde stressintervall
Kontroll	K.1.1	K.2.1	K.3.1	K.4.1
Brønn 3 (parallell 1)		11,0	8,6	10,7
Brønn 4 (parallell 2)		9,8	9,8	11,3
Brønn 5 (parallell 3)				10,0
Brønn 6 (parallell 4)	12,6		10,2	8,9
Gjennomsnitt	12,60	10,40	9,53	10,23
Standardavvik		0,85	0,83	1,03
Stressforsøk én	P.1.1	P.2.1	P.3.1	P.4.1
Brønn 3 (parallell 1)	11,2	8,7	11,5	8,6
Brønn 4 (parallell 2)	11,0	9,0		10,4
Brønn 5 (parallell 3)	10,5	8,2	10,0	16,6
Brønn 6 (parallell 4)	11,6	8,4	10,1	10,6
Gjennomsnitt	11,08	8,58	10,53	11,55
Standardavvik	0,46	0,35	0,84	3,48
Stressforsøk to	P.1.2	P.2.2	P.3.2	P.4.2
Brønn 3 (parallell 1)	10,1	11,4	11,0	9,2
Brønn 4 (parallell 2)	9,8		10,8	9,3
Brønn 5 (parallell 3)	10,1	10,5	11,2	8,5
Brønn 6 (parallell 4)	9,8		8,2	8,6
Gjennomsnitt	10,95	10,95	10,30	8,90
Standardavvik	0,17	0,64	1,41	0,41
Prøver fra stressforsøk én og to				
Totalt antall prøver	8	6	7	8
Gjennomsnitt	10,47	9,53	10,50	10,23
Standardavvik	0,68	1,29	1,12	2,70

A.6 Resultat fra t-tester

Prøvene i resultatet er navngitt som følger: Prøve, første stressintervall/stresset én gang, stressforsøk en. Dette presenteres som P.1.1. Kontroll er navngitt på tilsvarende måte ved at kontroll forkortes til K. Dette som eksempel.

A.6.1 Resultat fra t-tester for å studere forskjeller mellom stressforsøkene, ekskludert verdier fra P.4.1.3

Tabell 6: Tabell over resultat fra t-tester for å studere forskjeller mellom stressforsøk én og stressforsøk to. P.4.1.3 er ikke inkludert i datasettet. Kolonnen til venstre viser hvilke prøver som er inkludert i t-testen. Neste kolonne beskriver antall paralleller fra disse prøvene. Videre er cellesyklusfasen oppgitt og gjennomsnittsverdiene til prøven i den bestemte fasen. Deretter er det oppgitt t-verdi og p-verdi utregnet fra t-testen.

Prøve (P)	Antall prøver	Fase	Gjennomsnitt	T-verdi	P-verdi
P.1.1	4	G1/G0	41,45	2,73	0,03
P.1.2	4	S	9,23 9,48	-0,41	0,70
		G2/M	11,10 9,95	4,60	0,00
P.2.1	4	G1/G0	38,73 41,70	-2,82	0,18
P.2.2	2	S	8,35 9,45	-1,70	0,17
		G2/M	8,58 10,95	-6,24	0,00
P.3.1	3	G1/G0	37,37 39,33	-1,47	0,20
P.3.2	4	S	8,73 9,88	-2,02	0,10
		G2/M	10,53 10,30	0,25	0,81
P.4.1	3	G1/G0	38,67 36,43	2,63	0,05
P.4.2	4	S	8,83 7,38	2,81	0,04
		G2/M	9,87 8,90	1,45	0,26

A.6.2 Resultat fra t-tester for å studere ulikheter mellom stressforsøk og kontroll, ekskludert verdiene fra P.4.1.3

Tabell 7: Tabell over resultat fra t-tester for å studere forskjeller mellom stressforsøk og kontroll. P.4.1.3 er ikke inkludert i datasettet. Kolonnen til venstre viser hvilke prøver som er inkludert i t-testen. Neste kolonne beskriver antall paralleller fra disse prøvene. Videre er cellesyklusfasen oppgitt og gjennomsnittsverdiene til prøven i den bestemte fasen. Deretter er det oppgitt t-verdi og p-verdi utregnet fra t-testen.

Prøve (P) Kontroll (K)	Antall prøver	Fase	Gjennomsnitt	T-verdi	P-verdi
P.2.1 K.2.1	4	G1/G0	38,73	-1,47	0,22
	2		39,60		
			S	8,35 10,35	-3,25
		G2/M	8,58 10,40	-4,04	0,22
P.3.1 K.3.1	3	G1/G0	37,37	1,05	0,35
	3		36,33		
			S	8,73 9,20	-1,32
		G2/M	10,53 9,53	0,68	0,22
P.4.1 K.4.1	3	G1/G0	38,67	2,81	0,04
	4		36,78		
			S	8,83 7,25	3,30
		G2/M	9,87 10,23	-0,44	0,68
P.2.2 K.2.1	2	G1/G0	41,70	1,88	0,26
	2		39,60		
			S	9,45 10,35	-1,10
		G2/M	10,95 10,40	0,73	0,55
P.3.2 K.3.1	4	G1/G0	39,33	2,46	0,06
	3		36,33		
			S	9,88 9,20	1,30
		G2/M	10,30 9,53	0,46	0,83
P.4.2 K.4.1	4	G1/G0	36,43	-0,49	0,64
	4		36,78		
			S	7,38 7,35	0,43
		G2/M	8,90 10,23	-2,39	0,05

A.6.3 Resultat fra t-tester for å studere ulikheter ved gjentatte stressintervall i stressforsøk én, ekskludert P.4.1.3

Tabell 8: Tabell over resultat fra t-tester for å studere forskjeller ved gjentatte stressintervall i stressforsøk én. P.4.1.3 er ikke inkludert i datasettet. Kolonnen til venstre viser hvilke prøver som er inkludert i t-testen. Neste kolonne beskriver antall paralleller fra disse prøvene. Videre er cellesyklusfasen oppgitt og gjennomsnittsverdiene til prøven i den bestemte fasen. Deretter er det oppgitt t-verdi og p-verdi utregnet fra t-testen.

Prøve (P)	Antall prøver	Fase	Gjennomsnitt	T-verdi	P-verdi
P.1.1 P.2.1	4 4	G1/G0	41,45 38,73	4,28	0,01
		S	9,23 8,35	1,59	0,16
		G2/M	11,10 8,58	8,68	0,00
P.1.1 P.3.1	4 3	G1/G0	41,45 37,37	4,32	0,01
		S	9,23 8,73	0,92	0,40
		G2/M	11,10 10,53	1,11	0,32
P.1.1 P.4.1	4 3	G1/G0	41,45 38,67	3,49	0,02
		S	9,23 8,83	0,58	0,59
		G2/M	11,08 9,87	2,02	0,10
P.2.1 P.3.1	4 3	G1/G0	38,73 37,37	1,68	0,15
		S	8,35 8,73	-0,88	0,42
		G2/M	8,58 10,53	0,07	0,01
P.2.1 P.4.1	4 3	G1/G0	38,73 38,67	0,09	0,93
		S	8,35 8,83	-0,81	0,46
		G2/M	8,58 9,87	-1,96	0,17
P.3.1 P.4.1	3 3	G1/G0	37,37 38,67	-1,28	0,27
		S	8,73 8,83	-0,18	0,87
		G2/M	10,53 9,87	0,83	0,45

A.6.4 Resultat fra t-tester for å studere ulikheter ved gjentatte stressintervall i stressforsøk to

Tabell 9: Tabell over resultat fra t-tester for å studere forskjeller ved gjentatte stressintervall i stressforsøk to. Kolonnen til venstre viser hvilke prøver som er inkludert i t-testen. Neste kolonne beskriver antall paralleller fra disse prøvene. Videre er cellesyklusfasen oppgitt og gjennomsnittsverdiene til prøven i den bestemte fasen. Deretter er det oppgitt t-verdi og p-verdi utregnet fra t-testen.

Prøve (P)	Antall prøver	Fase	Gjennomsnitt	T-verdi	P-verdi
P.1.2 P.2.2	4	G1/G0	39,55	-2,39	0,08
	2	S	9,48 9,45		
		G2/M	9,95 10,95	-2,18	0,26
P.1.2 P.3.2	4	G1/G0	39,55	0,21	0,84
	4	S	9,48 9,88		
		G2/M	9,95 10,30	-0,49	0,66
P.1.2 P.4.2	4	G1/G0	39,55	4,23	0,01
	4	S	9,48 7,38		
		G2/M	9,95 8,90	4,74	0,01
P.2.2 P.3.2	2	G1/G0	41,70	1,57	0,20
	4	S	9,45 9,88		
		G2/M	10,95 10,30	0,59	0,58
P.2.2 P.4.2	2	G1/G0	41,70	4,88	0,01
	4	S	9,45 7,38		
		G2/M	10,95 8,90	4,98	0,01
P.3.2 P.4.2	4	G1/G0	39,33	2,57	0,04
	4	S	9,88 7,38		
		G2/M	10,30 8,90	1,91	0,11

A.6.5 Resultat fra t-tester hvor verdier fra P.4.1.3 inngår i datasettet

Tabell 10: Tabell over resultat fra t-tester hvor P.4.1.3 inngår i datasettet. Kolonnen til venstre viser hvilke prøver som er inkludert i t-testen. Neste kolonne beskriver antall paralleller fra disse prøvene. Videre er cellesyklusfasen oppgitt og gjennomsnittsverdiene til prøven i den bestemte fasen. Deretter er det oppgitt t-verdi og p-verdi utregnet fra t-testen.

Prøve (P) Kontroll (K)	Antall prøver	Fase	Gjennomsnitt	T-verdi	P-verdi
P.1.1 P.4.1	4	G1/G0	41,45	0,37	0,73
	4	S	9,26 9,48		
	G2/M	11,08 11,55			
P.2.1 P.4.1	4	G1/G0	38,73	-0,94	0,38
	4	S	8,35 9,48		
	G2/M	8,58 11,55			
P.3.1 P.4.1	3	G1/G0	37,37	-1,31	0,25
	4	S	8,73 9,48		
	G2/M	10,53 11,55			
P.4.1 P.4.2	4	G1/G0	40,68	1,99	0,09
	4	S	9,48 7,38		
	G2/M	11,55 8,90			
P.4.1 K.4.1	4	G1/G0	40,68	1,87	0,11
	4	S	9,48 7,25		
	G2/M	11,55 10,23			

