

Kandidatnummer:

10014

10015

Analyse av cellyklus hos CHSE-214-celler etter varmestress over tid, analysert på BD Accuri C6 flowcytometer

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy

Mai 2020

Kandidatnummer:

10014

10015

Analyse av cellesyklus hos CHSE-214-celler etter varmestress over tid, analysert på BD Accuri C6 flowcytometer

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy
Mai 2020

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



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Kjære leser,

Vi er to studenter som ønsker å formidle den kunnskapen vi har tilnærmet oss etter en treårig bachelor i bioteknologi på Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), med denne prosjektoppgaven. Takket være fjorårets bacheloroppgaver som har optimalisert metodene vi bruker, kan vi bruke deres resultater til å best studere effekten av stress på cellenivå.

Vi ønsker å rette en stor takk til NTNU i Ålesund som har gjort det mulig å utføre forsøket vårt med å bidra med økonomisk støtte og tilgjengelige laboratorier. Gro Audveig Hagen Bjørnøy fortjener også en ekstra takk, da hun har vært vår primære veileder. Hun har stilt opp til alle døgnets tider med motivasjon og kunnskap gjennom hele prosessen.

Sammendrag

For å undersøke effekten av langvarig stress gjennom analyse av cellesyklus, ble CHSE-214 celler dyrket in vitro og stresset med bruk av varme. Optimal vekst til CHSE-214 ligger på 20°C, i stressanalysen ble brett med seks brønner plassert til varmestress på 26°C. Forsøket ble gjentatt to ganger, der fem tidspunkter ble analysert i hvert forsøk; 24-, 48-, 72-, 96- og 120 timer. Grunnet SARS-CoV-2, ble det ikke tid til å analysere 120 timer stress i forsøk 2. Etter stressinitiering ble prøvene samlet, fiksert med etanol og farget med propidium iodide (PI), før analyse av cellesyklus på flowcytometer.

Varmestress på 26°C ga en endring i cellesyklus på åtte av de femten undersøkte punktene av statistisk signifikans. Endringen ble undersøkt i de tre fasene G₁/G₀-, S-, og G₂/M på alle de fem prøvetidspunktene. Resultatene kan være påvirket av forhastet stressinitiering i forsøk 2 som har resultert i store variasjoner mellom parallellene. De stressede cellene viste en nedgang i G₁/G₀-fasen mot kontrollceller dyrket på 20°C, der nedgangen økte med lengden påført stress. Det ble også observert en nedgang i G₂/M-fasen mot kontroll. Derimot viste de stressede cellene en økning i andelen celler i S-fasen mot kontroll som kan indikere en S-fase cellesyklusarrest.

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Sammendrag.....	2
Terminologi og forkortelser	7
Forutsetninger og avgrensninger	8
<i>Forutsetninger.....</i>	<i>8</i>
<i>Begrensninger</i>	<i>8</i>
1 Innledning.....	9
1.1 <i>Bakgrunn for valg av tema.....</i>	<i>9</i>
1.2 <i>Problemstilling</i>	<i>9</i>
1.3 <i>Leserveiledning</i>	<i>10</i>
2 Teori	11
2.1 <i>Hva er stress?.....</i>	<i>11</i>
2.1.1 <i>Heat Shock Proteins, HSPs.....</i>	<i>13</i>
2.2 <i>Cellesyklus.....</i>	<i>15</i>
2.2.1 <i>Cellesyklus kontrollsystemet.....</i>	<i>16</i>
2.2.2 <i>G₁-fase</i>	<i>16</i>
2.2.3 <i>G₀-fasen</i>	<i>16</i>
2.2.4 <i>S-fase</i>	<i>17</i>
2.2.5 <i>G₂-fase</i>	<i>17</i>
2.2.6 <i>M-fase.....</i>	<i>17</i>
2.3 <i>CHSE-214, cellemodell</i>	<i>17</i>
2.3.1 <i>Vekstvilkår</i>	<i>18</i>
2.3.2 <i>Splitting av celler med hjelp av Trypsin.....</i>	<i>19</i>
2.4 <i>Flowcytometri.....</i>	<i>20</i>
2.4.1 <i>Komponentene i et flowcytometer</i>	<i>20</i>
2.4.2 <i>Analyse av cellesyklus</i>	<i>21</i>
2.4.3 <i>Fiksering av celler</i>	<i>22</i>

2.4.4 Farging av DNA med propidium iodide (PI)	23
2.5 RT-qPCR	23
3 Metode og materiale.....	26
3.1 Dyrking av CHSE-214 celler.....	26
3.2 Stressinitiering.....	27
3.3 Flowcytometri.....	27
3.3.1 Fiksering og farging med PI	27
3.3.2 Kalibrering av flowcytometer.....	28
3.3.3 Analyse av cellesyklus med flowcytometri.....	29
4 Resultat.....	30
4.1 Dyrking av CHSE-214 celler.....	30
4.2 Endring i G ₁ /G ₀ -fasen etter påført stress	30
4.2.1 Påført 26°C varmestress i 24 timer.....	31
4.2.2 Påført 26°C varmestress i 48 timer.....	31
4.2.3 Påført 26°C varmestress i 72 timer.....	32
4.2.4 Påført 26°C varmestress i 96 timer.....	32
4.2.5 Påført 26°C varmestress i 120 timer.....	32
4.3 Endring i S-fasen etter påført stress.....	32
4.3.1 Påført 26°C varmestress i 24 timer.....	33
4.3.2 Påført 26°C varmestress i 48 timer.....	33
4.3.3 Påført 26°C varmestress i 72 timer.....	34
4.3.4 Påført 26°C varmestress i 96 timer.....	34
4.3.5 Påført 26°C varmestress i 120 timer.....	34
4.4 Endring i G ₂ /M-fasen etter påført stress	34
4.4.1 Påført 26°C varmestress i 24 timer.....	35
4.4.2 Påført 26°C varmestress i 48 timer.....	35
4.4.3 Påført 26°C varmestress i 72 timer.....	36
4.4.4 Påført 26°C varmestress i 96 timer.....	36

4.5.5 Påført 26°C varmestress i 120 timer.....	36
5 Diskusjon	37
5.1 Dyrking av CHSE-214 celler.....	37
5.2 Stressforsøk	37
5.2.1 Endring i G ₁ /G ₀ -fasen eller ikke?	38
5.2.2 Endring i S-fasen eller ikke?	39
5.2.3 Endring i G ₂ /M-fasen eller ikke?.....	39
5.3 Komparativ metode, RT-qPCR.....	40
5.4 Drøfting av resultatet og videre forskning	40
6 Konklusjon	41
A.0 Vedlegg.....	42
A.2 Resultater	43
A.2.1 Flowcytometri.....	43
A.2.2 Avvik	47
A.2.3 Statistikk	50
A.2.4 Grafer	53
7 Litteraturliste.....	59

Terminologi og forkortelser

Homeostase – Det stabile fysiologiske miljøet inne i en organisme opprettholdes(2).

Chaperoner – Er en proteingruppe som bidrar til rett folding av proteiner og forhindrer aggregering i cellen(3).

Mitogen – Et ekstracellulært signalstoff som signaliserer at en celle kan dele seg. Mitogener stimulerer celledeling hos friske celler(3).

In vitro – En biologisk prosess som tar plass utenfor en organisme. Celler som dyrkes isolert i kultur på et laboratorium(3).

Adherent – At en celle vokser adherent betyr at cellen vokser i monolag på en overflate i motsetning til fritt i løsning(4).

Konfluens – Er et uttrykk for hvor stor prosentandel av overflaten cellene dekker, og hvor tett de vokser. Dersom cellene når konfluens, har de 100% områdedekning(5).

Fluorescens – Er lys sendt ut fra molekyler etter at de har blitt eksitert av lys med en høyere energi(6).

Fluorokrom – Fluoriserende fargestoff(6).

PVN - Den paraventrikulære kjernen

CRF - kortikotropinfrigjørende faktor

ACTH - adrenokortikotropisk hormon

HSPs - Heat Shock Proteins

ORI - origins of replication

EDTA - etylendiamintetraacetat

PCR – polymerase chain reaction

RT-qPCR - Reverse transcriptase real time polymerase chain reaction

PI - Propidium iodide

Forutsetninger og avgrensninger

Forutsetninger

Tilgjengelige ressurser: En forutsetning for å kunne gjennomføre forsøket er tilgjengelige ressurser som laboratorium, prøvemateriale som CHSE-214 celler, reagenser og analyseverktøy som flowcytometer.

Begrensninger

Tid: Prøvematerialet, CHSE-214 cellene, ble tilgjengelig 26.02.2020. Splitting til nok prøvemateriale og prøveforsøk ble utført i perioden 26.02.2020-06.03.2020 Tidsperioden som opprinnelig ble satt opp til å utføre forsøket ble forkortet grunnet SARS-CoV-2. Forsøket ble derfor utført fra og med 06.03.2020 til og med 16.03.2020.

Økonomi: For å holde det gitte budsjettet ble det regnet ut ressursbruk som medium, reagenser, pipettespisser og annet nødvendig utstyr for å utføre forsøket. Forsøket ble finansiert av NTNU.

1 Innledning

1.1 Bakgrunn for valg av tema

Studieløpet i bioteknologi har gitt god kunnskap i et bredt spekter av fagområder. Gjennom disse tre årene har ulike analysemetoder og laboratorieteknikker blitt jobbet med. Blant disse teknikkene har det vært kurs i dyrking av CHSE-214 celler i LAF-benk, der flowcytometeret og PCR-maskiner er blitt benyttet for å se på cellesyklus og stressrespons.

Laboratoriekursene med disse teknikkene var tidkrevende, lærerike og utfordrende. Likevel var det noen av de mest spennende laboratoriekursene i løpet av studieløpet. På bakgrunn av dette, var det et sterkt ønske om å få jobbe med levende celler i bachelorprosjektet.

Tidligere studenter ved NTNU i Ålesund, Andreas George Turner-Walker og Ana Colucci Climent, skrev sin bacheloroppgave i fjor. De optimaliserte protokollen for analyse av cellesyklus i Chinook-laksembryonceller (CHSE-214), med bruk av flowcytometri, og analyserte cellesyklus som respons på varmestress. Dette virket spennende å bygge videre på, så det ble bestemt at bachelorprosjektet skulle ta for seg hvordan langvarig stress påvirker cellesyklus og hva som skjer med produksjonen av HSP70. Det vekket også en interesse og nysgjerrighet rundt det dagsaktuelle temaet, stress, og effekten av dette. I tillegg er det å dyrke og studere celler in vitro gjennom selvstendig arbeid, fantastisk god trening til fremtidige forskningsprosjekt som skal gjennomføres i jobbsammenheng eller videre studier.

1.2 Problemstilling

Hva vil effekten av langvarig stress i form av varme være på cellenivå, vil det skje en endring i cellesyklus og er det en sammenheng mellom endringer i cellesyklus og proteinuttrykket av HSP70?

Før valg av problemstilling, var det viktig å tenke relevans for bioteknologi faget, samtidig som det i praksis måtte være mulig å forske på problemstillingen. Det var også viktig at det var noe faglitteratur som støtte. Problemstillingen, som består av to spørsmål, kan besvares gjennom samme forsøk, men med to komparative metoder. Det var ønskelig å kunne diskutere forsøkets resultater, og undersøke sammenhengen mellom cellesyklus og proteinuttrykket av HSP70.

1.3 Leserveiledning

Teori som er relevant for forsøket blir presentert i begynnelsen av oppgaven. Videre følger metoder og materialer som ble benyttet på laboratoriet. Oppgaven tar så for seg en presentasjon av analysens resultater, som så blir drøftet i en diskusjon. Avslutningsvis kommer en konklusjon og en litteraturliste.

2 Teori

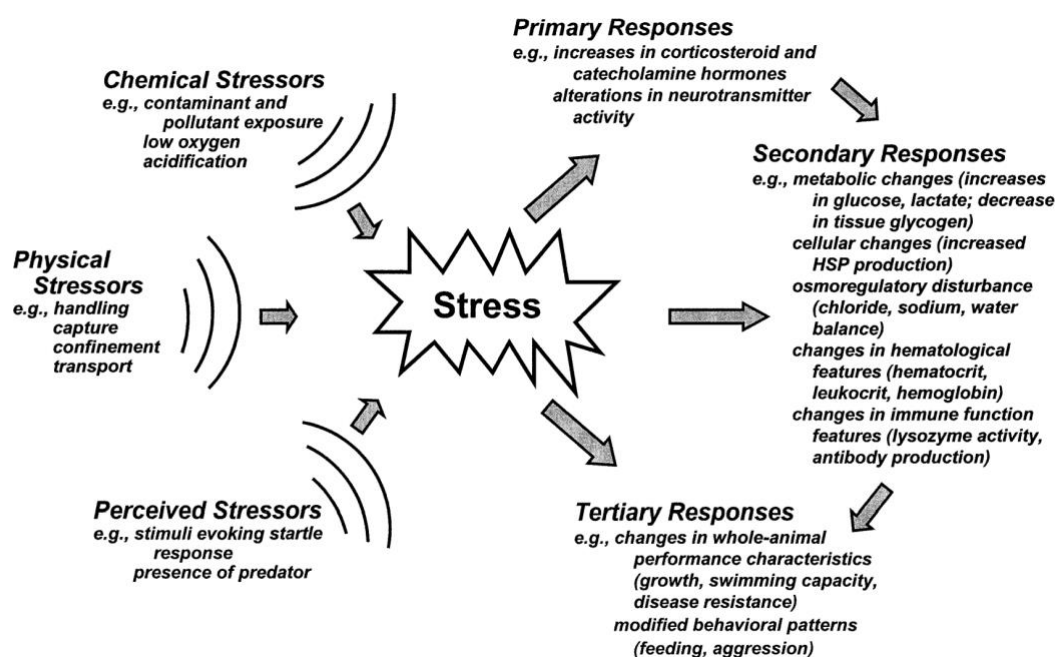
2.1 Hva er stress?

Stress defineres som miljømessige faktorer som skiller seg fra optimale forhold (cellulær homeostase), og omsider resulterer i reduksjon/hemming av vekst og utvikling. En tilstand av truet eller oppfattet truet, homeostase(7). Stressresponsen fremkalles som en reaksjon på frykt og opplevd trussel mot egen sikkerhet, velvære eller status(8), der signaler fra det neuroendokrine nettverket sendes som en respons, der målet er å motvirke effektene av disse stimuliene(9). Den paraventrikulære kjernen (PVN), i hypothalamus aktiveres i en stressituasjon. Videre sendes signaler fra nevronene i PVN til hypofysen i mellomhjernen og derfra via blodbanen til binyrene for utskillelse av stresshormoner. Systemet er også kalt hypothalamic-putuitary-adrenal-aksen. Det endokrine systemet, nervesystemet og immunforsvaret aktiveres, som endrer atferdsmessige og fysiologiske trekk med organismen for å øke sjansen for overlevelse av den truede situasjonen. Økt bevissthet, eufori, økt kognisjon, og økt smerteterskel er atferdsmessige endringer. De fysiske tilpasningene er økning i respirasjonssystemet og det kardiovaskulære systemet (økt hjerterytme og utviding av arteriene for bedre sirkulasjon). Med å samtidig hemme fordøyelse, vekst, reproduksjon og immunforsvar, vil energi bli prioritert til livsnødvendige funksjoner for å unngå fare(10).

Signalene, neuropeptider sendes gjennom det neuroendokrine nettverket som består av spesifikke nevrone og neuroendokrine kretsløp. Neuropeptidene er informasjonsmolekyl som lagres i vesikler i nervecellene, og har indirekte modulerende effekt på nervesystemet(9). Nevroner i hypofysen syntetiserer og skiller ut kortikotropinfrigjørende faktor (CRF), gjennom aktivering fra hypothalamus, som overføres til den fremre lappen av hypofysen. Binding av CRF til reseptorer induserer frigjøring av adrenokortikotropisk hormon (ACTH), til blodbanen. Via blodbanen sirkulerer ACTH til binyrebarkene, der reseptorbindinger stimulerer en sekundær budbringer, cAMP, til å indusere sekresjon av glukokortikoider som kortisol (stresshormonet), samt katekolaminer som adrenalin og noradrenalin(10). Dette utgjør den primære stressresponsen(11).

Stressresponsen skjer også på cellulært nivå, kalt cellulær stressrespons. Cellen reguleres for å sikre en fleksibilitet og økt robusthet for miljøet rundt, med å gjendanne homeostase i cellene utsatt for stress. Det er fire hovedpunkt i cellulær stressrespons; reparering/restaurering av denaturerte proteiner til sin native form, aktivering av

cellesykluskontrollpunkt, omdisponering av metabolismen, og kontroll av programmert celledød (apoptose). For å reparere makromolekyler kreves tid og energi, der energien tilføres via metabolismen. Som et steg i denne prosessen aktiveres cellesykluskontrollpunkter i form av cellesyklusarrest, for å omfordele energien til stressrespons i stedet for celfornyning. Cellesyklusarrest gir cellen tid til omforming av denaturerte proteiner til sin native form samt reparasjon av potensiell ødeleggelse av DNA(12).



Figur 1: Figuren viser ulike stressorer; kjemiske, fysiske eller oppfattet truede som alle resulterer i en stressrespons hos organismen. Som et resultat utløses tre ulike grader av stressrespons. Primærrespons, sekundærrespons og tertiærrespons. Pilene viser også at en primær stressrespons kan med lengre varighet utvikles til en sekundær respons, og videre til en tertiær stressrespons(13).

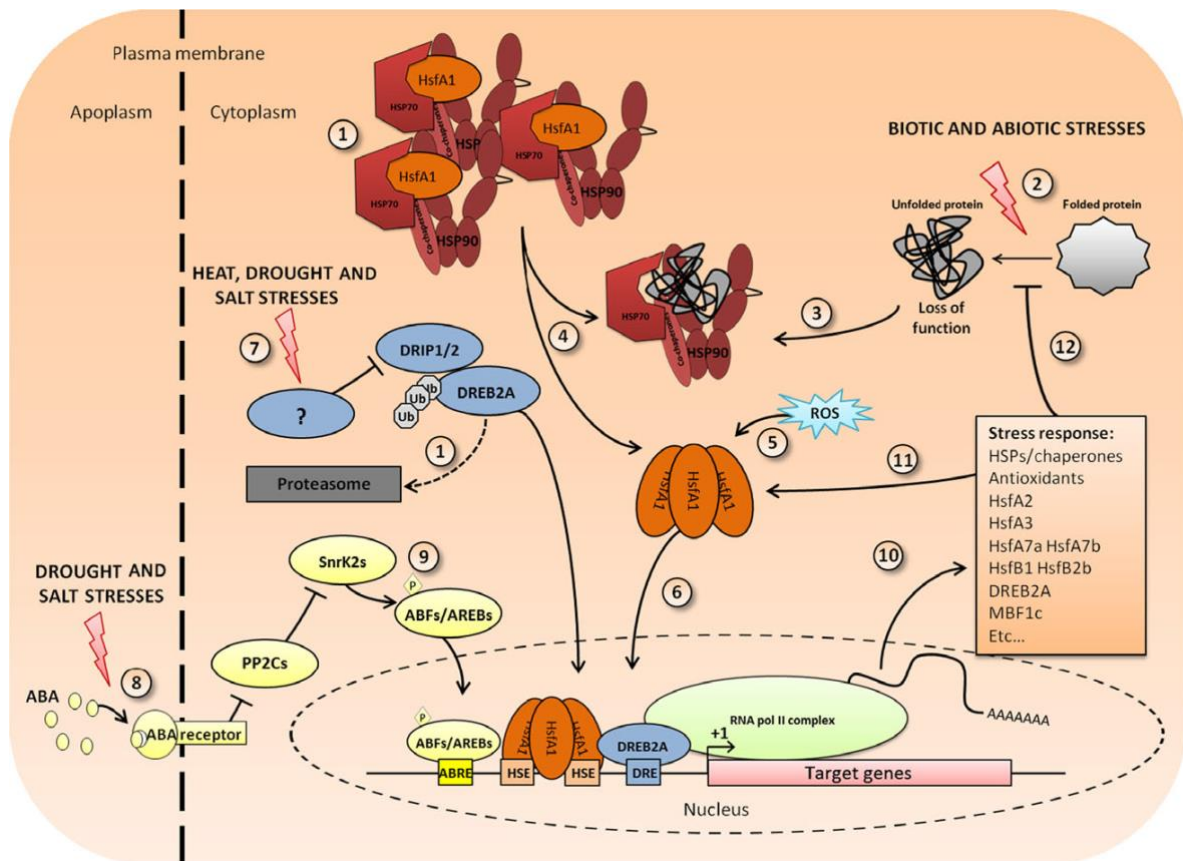
Stresshormonene adrenalin og kortisol aktiverer en rekke metabolske veier. Ved langvarig stress vil ikke organismen være i stand til å gjendanne homeostase, og stressresponsen vil bli ødeleggende for helsetilstanden. Stress krever store mengder energi. Glykogenlagrene omdannes til glukose via glykolysen og glukoneogenesisen for å dekke energibehovet. Dette resulterer i en økt konsentrasjon av glukose i plasma for å mobilisere energi til vev i en stressrespons, som for eksempel i hjernen og muskler. Den metabolske stressresponsen kalles den sekundære stressresponsen, som gir biokjemiske og fysiologiske endringer hos organismen(11). Det inkluderer endring i blodkonsentrasjonen av ulike metabolitter og ioner, ekspresjon av Heat Shock Proteins (HSPs), og andre stressproteiner. Hvis intensiteten til stressoren fortsetter å være alvorlig eller langvarig, vil organismens stressrespons gå over i

tertiær respons. En tertiær stressrespons vil gi endringer på organismen som en helhet, og kan bli skadelig for helse og velvære. Det meste av energien brukes nå på å gjendanne cellulær homeostase. Som en konsekvens vil vekst, reproduksjon, sykdomsresistens og fysisk tilstand svekkes(13).

2.1.1 Heat Shock Proteins, HSPs

Denaturering av makromolekyler som utfører normale celledfunksjoner, er hovedkonsekvensen av stresspåvirkning på cellenivå. Stressfaktorene resulterer i feilfolding av proteiner. Denne feilfoldingen gir en konformasjon som hemmer de normale funksjonene proteinene utgjør i cellen. Chaperoner er nødvendig for å omforme proteinene tilbake til sin native form. HSPs er en gruppe chaperoner normalt uttrykt som en stressrespons for å reparere denaturerte proteiner(14). Proteinstrukturen avhenger av den kjemiske tilstanden til løsemiddelet og de oppløste stoffene rundt. En ubalanse skapes når cellene utsettes for cellulært stress, som destabiliserer de tertiære og kvartære strukturene i proteinet gjennom å skifte likevekten mellom de ulike konformasjonene. Proteinskade kan også oppstå grunnet oksidativ ødeleggelse. De aktive aminosidekjedene har reaktive grupper utsatt for elektrofilt angrep. Avviket i den cellulære redoks-statusen fra homeostase, vil gruppene kunne bli over- eller underoksidert, som igjen påvirker proteinstrukturen(12).

HSPs var først undersøkt som en konsekvens av varmemstress. Senere er det funnet ut at HSPs også spiller en faktor for andre stressorer som UV, kulde, osmotisk trykk, tørke, sterkt lys, patogener og oksidativt stress. Både eukaryote- og prokaryote organismer pluss noen virustyper har HSPs. Hovedfunksjonen til chaperonene er å virke som en buffer for å redusere misfolding av proteiner utsatt for stress. I tillegg har enkelte chaperoner andre viktige funksjoner innen signalisering, proteinmerking og degradering (HSP70 og HSP90)(14). HSPs er en gruppe chaperoner, der HSP90 og HSP70 er to av flere undergrupper. HSP90 utgjør omkring 1-2% av det totale innhold av proteiner i eukaryote celler. HSPs klassifiseres etter molekylstørrelse, fra 10 til 150-kDA (henholdsvis HSP10 – HSP150)(15).



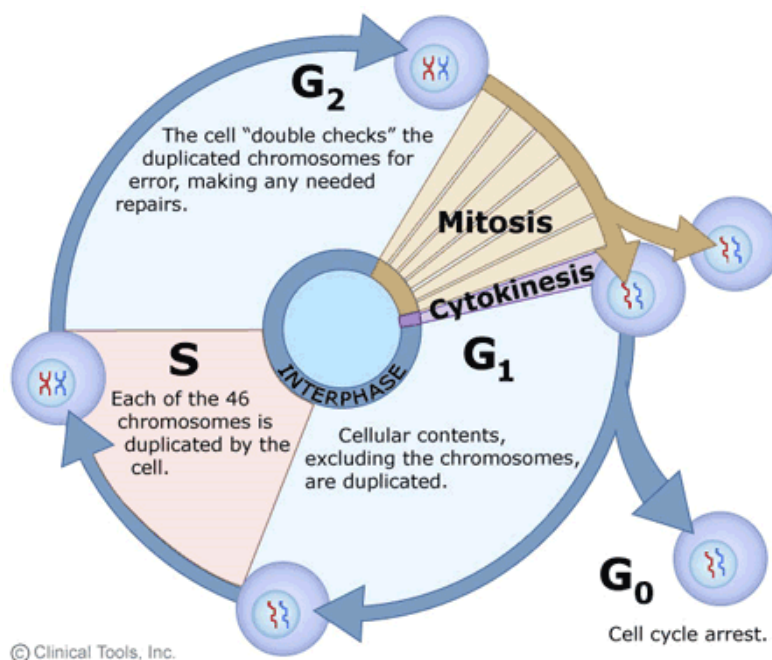
Figur 2: Figuren viser cellulær stressrespons. 1) HSPs sine aktive seter hemmes av en allosterisk hemmer HSF (Heat Shock Factor), i en ustresset tilstand i cellen. DREB2A proteiner degraderes av proteasomer. 2) Cellen utsettes for stress som resulterer i denaturerte proteiner. 3) Denatureringen utløser rekruttering av Chaperonene HSP70/90. 4) HSF aktiverer de aktive setene med å løsne fra proteinene. 5) De frie HSF-proteinene danner oligomerer og transporteres inn i kjernen. 6) HSF bindes til HSE- setet på DNA. 7) Stressfaktorer som varme, tørke og saltstress inhiberer DRIP1/2 og rekrutterer DREB2A. 8) Stressfaktorene akkumulerer ABA til de ekstracellulære ABA-reseptorene som utløser intracellulære signalveier som aktiverer PP2Cs. 9) ABFs/AREBs og DREB2A entrer deretter cellekjernen alene eller sammen. ABFs/AREBs bindes til ABRE setet på DNA og DREB2A bindes til DRE setet på DNA, som aktiverer RNA polymerase 2 komplekset til å utføre transkripsjon av mål-genene for stressresponsen. 10) De induerte proteinene påvirker via en positiv tilbakekobling som regulerer videre transkripsjon av HSP eller 11) av HSF etter behovet for økt stressrespons eller mot homeostase. 12) Etter stress vil cellen ha et annet forhold av HSP/HSF enn før stressrespons, som vil definere den akklimatiserte tilstanden i cellen(14).

Stressrespons er hvordan en organisme som helhet kan motvirke effektene av stress, samtidig som hver enkelt celle også har en stressrespons. Abiotiske og biologiske stressorer gir en stressreaksjon som øker nivåene av kortisol og adrenalin, der adrenalin vil ha en direkte effekt på HSP70 ekspresjonen i cellene(11). HSP70-gruppen er en molekylær Chaperon innen HSPs-familien på 70-kDa, som kodes av genomet til eukaryote og prokaryote organismer. Chaperonene er sentral i en rekke vedlikeholdsreaksjoner i cellen innen proteinfolding. Samtidig som de er sentrale i stressrelaterte aktiviteter som rettfolding av feilfoldede denaturerte proteiner og stabilisering av aggregerte proteiner. HSP70 beskytter cellen mot cellulær ubalanse fra proteolytiske stressorer, patofysiologiske forhold og cellulær

aldring(16). Å måle forskjellen uttrykt HSPs over basalt nivå i en stresset organisme vil man kunne få en kvantitativ måling av effekten stressoren har på cellenivå. HSP70 er blitt identifisert som den ideelle biomarkøren for å kvantifisere varmestress(17).

2.2 Cellesyklus

I en vanlig livssyklus til en eukaryotisk celle, vil den gjennomgå en rekke celledelinger. I hver celledeling splittes cellen i to identiske datterceller med hver sin kopi av genomet. Dette er for å erstatte gamle eller ødelagte celler. Cellesyklusen deles inn i fire ulike faser; G₁, S, G₂ og M, der interfase består av G₁, S og G₂ mens M-fasen er mitosefasen som også blir kalt celledelingsfasen. Mengden DNA varierer mellom de ulike fasene i celledelingscyklusen fra 2N, diploid, (der N representerer mengden kromosomer), til 4N, tetraploid. Cellesyklusen har flere kontrollpunkter for å regulere at alle mekanismene i cellesyklusen fungerer optimalt. Det er tre kontrollpunkter: G₁/S, G₂/M, og intra-S. For at en celle skal gjennomgå celledeling må en rekke biologiske faktorer være til stede, som vekstfaktorer og mitogener. Uten nærvær av disse biologiske signalmolekylene vil cellen gå inn i en siste cellesyklusfase, G₀, hvor den ligger i hvile til tilførsel av tilstrekkelige vekstfaktorer gjør at cellen kan gå inn i normal cellesyklus igjen(18).



Figur 3: Figuren viser en enkel fremstilling av cellesyklusen, og syklusens forskjellige faser. Det er også en oversikt på mengden DNA i de ulike fasene. Derimot er ikke kontrollpunktene vist like godt i denne figuren. Go som forklart i avsnittet ovenfor vises som en avstikker og blir cellens hvilepunkt(19).

2.2.1 Cellesyklus kontrollsystemet

Cellesyklus kontrollsystemet koordinerer overgangen mellom de ulike fasene i cellesyklusen med å kontrollere intracellulære molekylære brytere. Disse bryterne aktiverer og inaktiverer nøkkelproteiner og proteinkomplekser i hvert kontrollpunkt. Denne transformasjonen av nøkkelproteinene mellom aktiv og inaktiv form, initierer eller regulerer DNA-replikasjon, mitose og cytokinese(3). Kontrollsystemet sikrer at alle prosessene fra en syklus må være komplett og uten feil før den kan gå videre til neste cellesyklus eller cellesyklusfase, for å unngå at genomet kopieres med mutasjoner(18). Utsettes celler for mekaniske eller kjemiske påvirkninger som stress, vil cellulære mekanismer i cellen avgjøre cellens respons etter hvor alvorlig påkjenningen er. De to mulige prosessene er cellesyklusarrest, eller at cellen vil gjennomgå apoptose. Sistnevnte vil skje dersom påkjenningen er mer alvorlig. Cellen havner i cellesyklusarrest for at den skal kunne reparere cellulære skader som feil i replikasjonen av DNA. Den havner også i cellesyklusarrest ved mangel på næring, vekstfaktorer og/eller om cellen blir utsatt for eksogent cellulært stress(20).

2.2.2 G₁-fase

G₁-fasen (Gap-fasen), er en vekstfase, og det mest kritiske kontrollpunktet for om cellen gjennomgår en ny cellesyklus. Cellen mottar intracellulære og ekstracellulære signalmolekyler for å kontrollere indre og ytre faktorer som påvirker om cellen går inn i ny cellesyklus. Cellen holdes ofte igjen i G₁/S arrest om det er skader på DNA eller mangel på vekstfaktorer og mitogener. I gode vekstforhold mottar cellen vekstfaktorer og mitogener, som er ekstracellulære signalmolekyl som stimulerer cellevekst gjennom syntese av proteiner eller andre makromolekyler. På bakgrunn av dette kan kontrollsystemet holde cellen igjen i G₁ eller klargjøre den for overgang til S-fasen(3). Ved starten av en syklus i G₁-fasen, har cellen en kopi av alle sine 46 kromosomer som ligger i 23 kromosompar, der en av disse er kjønnskromosomer, cellen er da 2N(18).

2.2.3 G₀-fasen

Mottar ikke cellen de ekstracellulære signalmolekylene mitogener fra nærliggende celler i G₁-fasen, vil cellen gå over i G₀-fasen(3). G₀-fasen regnes som hvilefase, der cellen går ut av cellesyklusen som et alternativ til apoptose. Dette på grunn av skader på DNA eller telomeraseslitasje(20).

2.2.4 S-fase

I S-fasen (syntesefasen), replikeres DNA slik at hver dattercelle får sin identiske kopi av genomet. Med høy presisjon kopieres hvert nukleotid en gang til en ny DNA-tråd.

Forberedelsene til DNA-replikasjon starter allerede i G₁-fasen, der nødvendige proteiner fraktes til ORI (*origins of replication*), startpunktet for replikeringen(3). I S-fasen kopieres alt genomet i to kopier. Cellen går da fra 2N til 4N, tetraploid, etter hvert som alt genomet kopieres(18). Cellesykluskontroll systemet initierer DNA-syntesen, samtidig som den hindrer rereplikasjon(3).

2.2.5 G₂-fase

G₂-fasen (Gap 2), er en ny vekstfase som klargjør cellen for celledeling. Før overgangen fra G₂- til M-fasen kontrolleres genomet for mutasjoner, skader eller ukomplett replikering som har oppstått gjennom G₁- eller S-fasen. Oppstår det skader på DNA, eller skader som denaturering av proteiner eller andre makromolekyler i cellen grunnet ekstracellulære påvirkninger, holdes cellen igjen i G₂-fasen i cellesyklusarrest(3). Cellen er 4N gjennom hele G₂-fasen(18).

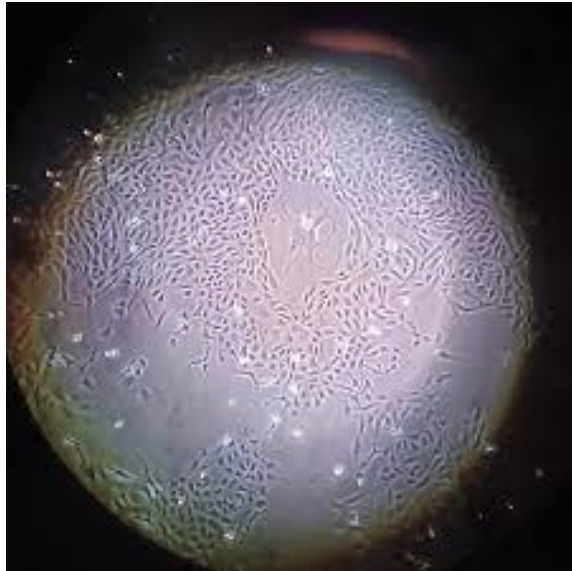
2.2.6 M-fase

M-fasen består av mitose og cytokinese. Her reorganiserer cellen alle sine komponenter og fordeler dem til ulike deler av cellen før den splittes i to identiske datterceller. Den drastiske prosessen foregår relativt raskt på rundt en time for pattedyrceller. Genomet kondenserer til kromosomer før en kopi dras av mikrotubuli til hver sin side av cellen(3). Cellen er da 4N frem til cytokinesen(18), der cellen splittes og hver celle får en kopi av de 46 kromosomene. Splittingen skjer som en innsnevring av cytoskjelettet i midten av cellen(3).

2.3 CHSE-214, cellemodell

CHSE-214-celler er embryoceller fra Chinook-laksen, *Oncorhynchus tshawytscha*, som først ble isolert fra Orgeon State University i 1964(21). Startpunktet for all biologisk og medisinsk forskning er in vitrostudier, som gir en innsikt i cellulære mekanismer til prokaryote og eukaryote celler. Utviklingen innen in vitrostudier på cellenivå har gitt en økning i kunnskap om hele organismer. Når cellen isoleres fra sitt naturlige miljø vil en aldri klare å framstille alle faktorene som påvirker cellen på et laboratorium, men man kan enkelt undersøke enkeltfaktorer(22). For in vitrostudier brukes immortaliserte cellelinjer. Dette er cellelinjer som kan proliferere ubegrenset og derfor dyrkes over lengre tid på et laboratorium.

Kreftceller er naturlig immortaliserte celler ofte brukt til dette formålet. En rekke andre celletyper har blitt kunstig manipulert til å ha samme egenskap, for biologiske eller medisinske studier, som CHSE-214. Fordelen med de immortaliserte cellelinjene er at de er godt karakterisert, homogene (teoretisk, kan komme avvik), og genetisk like. CHSE-214 brukes kommersielt av flere laboratorier, som gir konsekvente og reproducerbare resultater(23). De er ofte brukt som modellceller for in vitrostudier, herunder som modellcelle for oppdrettsfisk og havbruk. Da genomet er fullstendig sekvensert og tilgjengelig i ulike databaser, gir dette lett tilgjengelig material til for eksempel PCR-analyser, der flere referansegener er verifisert av ulike forskerteam. En fordel er at cellene er lett å dyrke i kultur på laboratoriet, samtidig som de er representative for de cellulære responsene til organismen(24).



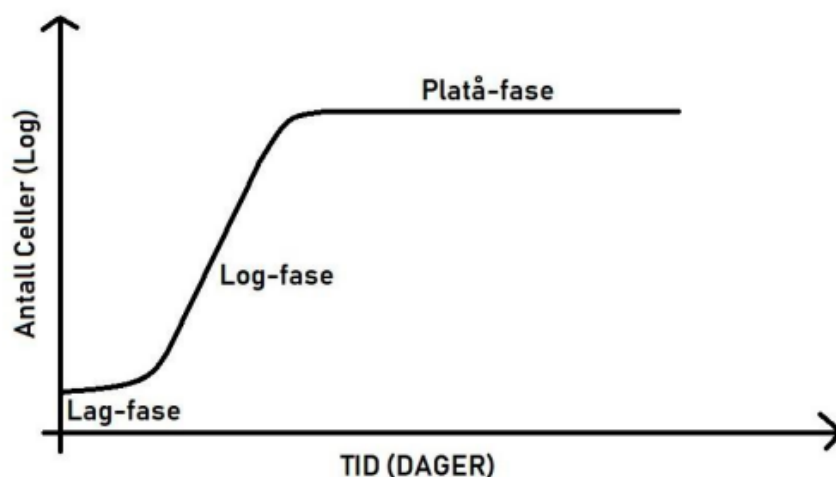
Figur 4: Bildet viser hvordan CHSE-214 celler vokser i klynger og hvordan en ser cellene gjennom et invertmikroskop. Her har cellene en konfluens på 65-75%. Cellene blir avlange når de fester seg adherent til underlaget noe som tydelig vises i figuren(1).

2.3.1 Vekstvilkår

For best mulig vekstvilkår dyrkes CHSE-214 cellene i L-15 Glutamax Medium med 10% FBS(25). For å hindre vekst av bakterier tilføres mediet et antibiotikum som er effektivt mot flere bakteriearter(21). Cellene har epitellignende morfologi og vokser adherent med en doblingsrate på 2.2 ± 0.3 dager(26). Optimumstemperaturen ligger rundt 21°C , med en drastisk nedgang i vekst på temperaturer mellom $24-27^{\circ}\text{C}$. Cellene overlever oppbevaring i over tre måneder på 4°C , uten utskifting av medium(21). For optimalt opptak av næring fra mediet må celleflaskene splittes med en konfluens på 70 - 80%, før de når overvekst. De adherente cellene vil i overvekst vokse i flerlag. Dette vil hindre cellene i å dekkes med det overliggende mediet som da vil hindre maksimalt opptak av næring, og resultere i hemmet vekst(27). Invert-mikroskop brukes for å undersøke konfluens i celleflasken. Da cellene vokser adherent i monolag, må de løsnes fra underlaget med hjelp av Trypsin før de subkultiveres. Subkultivering er en fortykning av cellekulturen for videre vekst, der splitteforholdet anbefales til 1:2 eller 1:3(25).

2.3.2 Splitting av celler med hjelp av Trypsin

Som vist i figur 5 under, går celler gjennom tre faser med vekst. Disse tre vekstfasene er lagfase, logfase og platåfase. Cellene vil vokse svært sakte eller ikke i det hele tatt i lagfasen. Den dårlige veksten kan skyldes at cellene akkurat har blitt trypsinert og splittet, og dermed trenger tid til å tilpasse seg til nye omgivelser. Det vil skje en fordobling av celler i logfasen. Her vil nesten alle cellene dele seg og antall celler vil øke eksponentielt. I platåfasen vil antall celler være konstant. Cellene vil her dekke bunnen av celleflasken eller brønnen, og dermed blir konfluensgrensen nådd(28).



Figur 5: Grafisk fremstilling av lagfase, logfase, og platåfase. X-aksen viser tid og Y-aksen viser cellekonsentrasjon.

Som nevnt tidligere vokser CHSE-214 celler adherent og festes dermed til underlaget de vokser på. Før splitting må cellene derfor løsnes fra underlaget. Med en konfluens rundt 70-80% blir dette gjennomført. 0,25% Trypsin-EDTA kan benyttes når celler som er adherente skal splittes. Enzymet trypsin har proteolytisk effekt og virker derfor godt til å løsne celler fra underlaget. Proteinene som fester cellene til underlaget blir brutt ned av trypsin og cellene løsner. Det er hovedsakelig på den C-terminale enden av Lysin eller Arginin at trypsin virker. Trypsin krever noen minutter før alle cellene løsner fra underlaget, men med for lang inkuberingstid risikerer man at enzymet bryter ned cellenes overflateproteiner. Dette kan føre til apoptose.

Ulike tilsetningsstoffer og konsentrasjoner av trypsin blir benyttet til ulike celletyper. Et eksempel på et slikt tilsetningsstoff er etylendiamintetraacetat (EDTA). Kalsium- og magnesiumioner vil normalt hemme aktiviteten til trypsin, men med tilsetning av EDTA

binder ionene seg heller til tilsetningsstoffet(29). FBS i mediet inhiberer aktiviteten til trypsin, så for at effekten av trypsineringen skal være optimal er det viktig å vaske bort rester av medium grundig. For å unngå skade på overflateproteinene benyttes nettopp denne egenskapen til mediet, og inaktivering av trypsin skjer med å tilsette medium etter en bestemt tid(29).

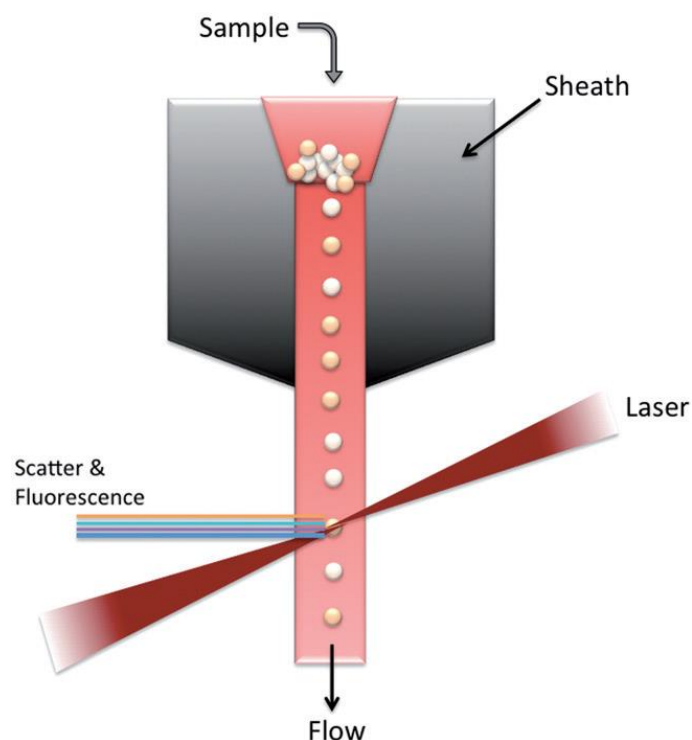
2.4 Flowcytometri

Flowcytometri er en effektiv teknikk for å måle fysiske og/eller kjemiske karakteristikk til hver enkeltcelle i en populasjon. Her sendes enkeltpartikler med en væskestrøm gjennom en lyskilde for å måle størrelse og granularitet i cellen. Lysstråler sendes på cellene gjennom væskestrømmen. Når laserstrålen treffer cellen brytes lysstrålene opp, der faktorene som påvirker hvordan lyset sprer seg er cellens fenotype. Cellestørrelsen måles av lys detektert av en fotodiode i samme akse som laserstrålen, der intensiteten er direkte proporsjonal med diameteren av cellen (forward scatter, FSC). Sidespredningen er brutt lys omtrent 90 grader fra aksene til laserstrålen, og gir informasjon om indre elementer som granularitet og fluorescens. Med fluorescens brukes en fluoriserende probe, der lysspredningen er proporsjonal med mengden fargestoff bundet til cellekomponenter. En forbehandling av komponentene av interesse med fluorescerende fargestoff, gir muligheter for å analysere individuelle komponenter i cellen. Deriblant membranen, cellekjernen, DNA og RNA, cytokiner, samt hormoner og proteiner. Et eksempel på et fluoriserende fargestoff er propidium iodide (PI), som bindes til DNA og RNA. Dette undersøker blant annet cellesyklusstadiet hos celler i en populasjon(30).

2.4.1 Komponentene i et flowcytometer

Et flowcytometer består av et væskesystem og et optisk system som registrerer og prosesserer informasjon om partikkelen sendt gjennom væskesystemet. Væskesystemet transporterer cellepopulasjonen fra en løsning og gjennom instrumentet. Grunnet trykkforskjellen mellom væsken i væskesystemet (sheath-væsken), og prøvestrømmen, der trykket i prøvematerialet alltid er høyere enn sheath-væsken, presses cellene i en strøm av enkeltceller. Det optiske systemet består av en optisk benk, herunder en laser og linser i ordnet stilling for å fokusere laserstrålen i rett posisjon til prøvestrømmen. Når cellene føres i enkeltcellesuspensjon sendes en laserstråle på cellene. Laserstrålens bølgelengde avhenger av fluorokromen brukt i forbehandlingen, vanligvis brukes laser i bølgelengde 488nm. De spredte laserstrålene fra

cellen registreres av en detektor på motsatt side av væskestrømmen, gjennom et system av optiske speil og filtre som separerer ønsket bølglengde av det innkommende lyset(30).

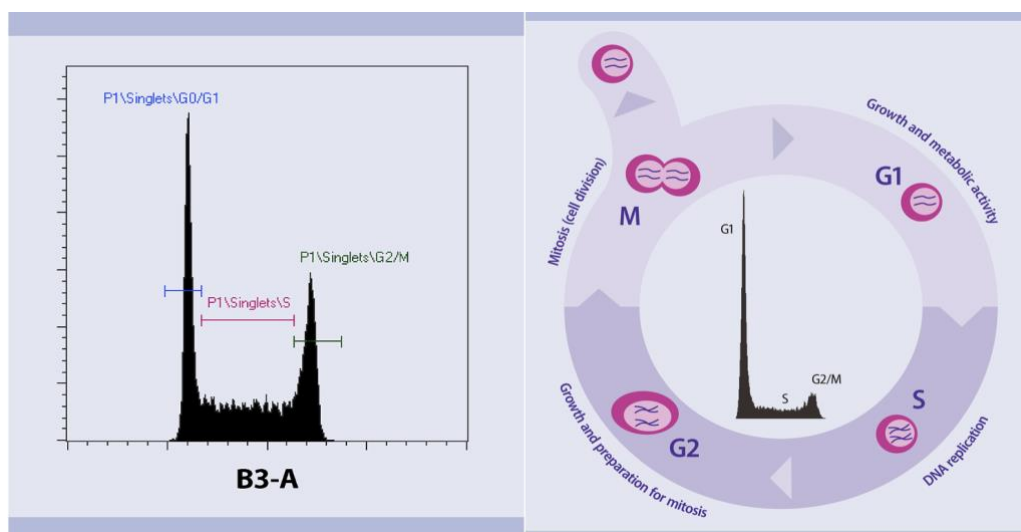


Figur 6: Figuren viser et forenklet bilde av noen av komponentene i et flowcytometer. Prøvematerialet (Sample), presses til en enkeltcellesuspensjon grunnet trykkforskjellene mellom Sheath-væsken og prøvestrømmen, der trykket i Sheath-væsken alltid er høyere enn i prøvematerialet. Trykket fører enkeltceller med strømmen (flow), gjennom en laserstråle (Laser). Laserstrålen treffer cellene som gir spredning av lys i ulike retninger og gir informasjon om cellens karakteristikk. De brutte lysstrålene i samme akse som laserstrålen (laser, vist i rødt på figuren), gir informasjon om cellens størrelse. Sidespredningen (vist i regnbuens farger), gir informasjon om indre komponenter i cellen og/eller om fluorescens(30).

2.4.2 Analyse av cellesyklus

Flowcytometri kan brukes som et verktøy for å måle cellulært DNA-innhold og for analyse av cellesyklus. DNA-innholdet i cellene måles kvantitativt med å tilføre celleduspensjonen et fluorokrom. Det fluorescerende fargestoffet absorberer elektromagnetisk stråling som eksiterer den absorberte energien i form av fotoner (lys). Mengden fluorescens blir da proporsjonal med mengden DNA i hver celle. Sammen med størrelse gir dette resultater på hvor i cellesyklusen den enkelte cellen befinner seg. Analysen registrerer tre ulike faser; G_1 (her inngår også G_0 , da metoden ikke klarer å skille mellom de to fasene), S og G_2/M . DNA-mengden er identisk i fasene G_2 og M, som gjør metoden uegnet til å skille mellom de to, og de inngår da i en samlet fase(31). Celler med to fullkomne kjerner indikerer fullføring av en cellesyklus, som måles med dobbelt DNA-innhold i en enkelt celle. En reduksjon i antall

tokjernede celler, kan indikere en forsinkelse i syklusen. Dette kan være en effekt av stoff som fører til skade på arvestoffet(32).



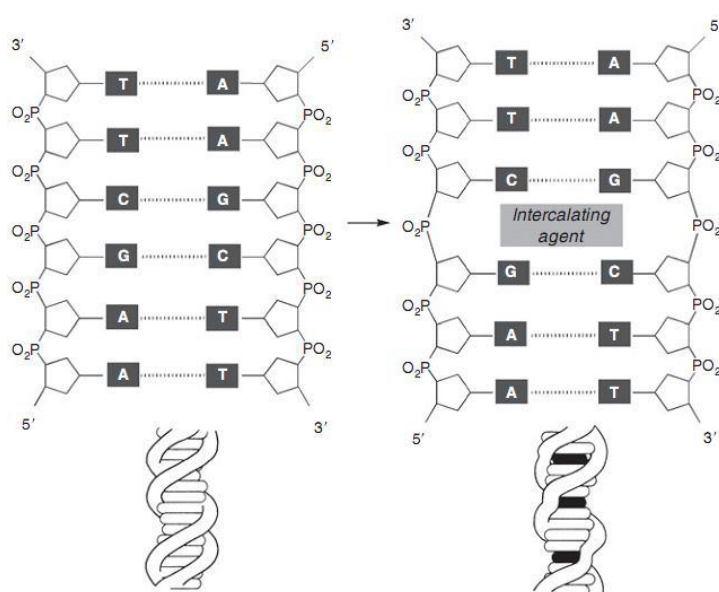
Figur 7: Figuren til venstre viser et eksempel på en analyse av cellyklus i flowcytometer med fluorescens som et histogram plot. Langs X-aksen vises fluorescens intensitet. Gatingen viser hvor de ulike cellyklusfasene ligger i histogrammet; innenfor blå gating havner celler i G₀/G₁-fasen, innenfor rød gating havner celler i S-fasen og i grønn gating havner celler i G₂/M-fasen. Langs Y-aksen vises frekvensen innenfor de ulike fasene, en høyere søyle gir en høyere frekvens av celler i den gitte fasen. Figuren til høyre viser størrelsen på cellene og mengden DNA i de ulike fasene. Cellene i G₁ har 2N mengde DNA og derav en lavere fluorescens intensitet enn S-fasen som har 2N-4N mengde DNA. G₂/M har høyest fluorescens intensitet da cellen i denne fasen har 4N DNA og cellene har størst overflate fordi de skal til å dele seg, sammenlignet med celler i de andre fasene(33).

2.4.3 Fiksering av celler

Optimalt benyttes levende celler for flowcytometrisk analyse, men for å undersøke intracellulære komponenter er fiksering (og permeabilisering), nødvendig for å kunne farge komponentene av interesse. For denne bruken er flere agenter dokumentert brukt i vitenskapelige artikler, som aldehyder, alkoholer og aceton(34). En utfordring med å analysere levende celler, er å innhente nøyaktig informasjon som gjenspeiler cellens respons på det naturlig eller eksperimentelt ønskede miljøet, uten stresspåvirkningene de gjennomgår i selve analysedelen. Med å fikserer cellene, setter du dem i en uforstyrret tilstand som gjør dem uberørt av påfølgende stress. Metanol og etanol er koagulerende fikseringsmidler som ikke modifierer nukleinsyrer, der etanol virker gjennom å dehydrere cellene. Tilsetning av etanol over 65% og i fravær av salter, tørker cellene ut til en “kollapset” tilstand, som må rehydreres tilbake til opprinnelig form før analyse(35).

2.4.4 Farging av DNA med propidium iodide (PI)

Propidium iodide er et lite fluorokrom som bindes interkalært mellom nukleotidene i DNA. Fargen bindes støkiometrisk med mellomrom på ca. fire-fem basepar, med lite til ingen sekvenspreferanse(36). Da fargeprosessen går relativt raskt er dette en effektiv måte for kvantitativ måling av DNA-innhold i celler med flowcytometrisk analyse(37). PI kan ikke passivt transporteres inn i celler som har en intakt plasmamembran, og det er derfor nødvendig å fiksere cellene før farging. Det lille fluorokromet er en rødflorescerende farge som eksiteres av bølgelengder mellom 400 - 600nm og avgir lys mellom 600 - 700nm. Dette gjør fargestoffet korresponderende med laserne normalt brukt i et flowcytometer(38). Fargestoffet bindes også til RNA, derfor er det viktig å bryte ned RNA i cellene med DNase-free RNase før analyse av cellesyklus på flowcytometer. Da det er mengden DNA som måles, vil fluorescenssignal fra farget RNA gi feil intensitet fra de gitte cellesyklusfasene(36).



Figur 8: Figuren viser hvordan propidium iodide (PI), bindes interkalært mellom nukleotidene i DNA. Figuren til venstre er et forenklet bilde fra et utklipp av en deoksyribonukleinsyre, DNA tråd med sukkerenhetene og fosfatgruppen på utsiden av molekylet og nukleotidbasene med baseparing i sentrum av molekylet som danner en dobbelttrådet helix. Figuren øverst til høyre viser hvordan fargestoffet PI bindes interkalært mellom nukleotidene (mellom to basepar), i DNA. Den forenklete modellen av DNA tråd ned til høyre viser hvordan fargen bindes støkiometrisk mellom ca. fire til fem basepar, der fargen vises som svarte felt på DNA tråden(39).

2.5 RT-qPCR

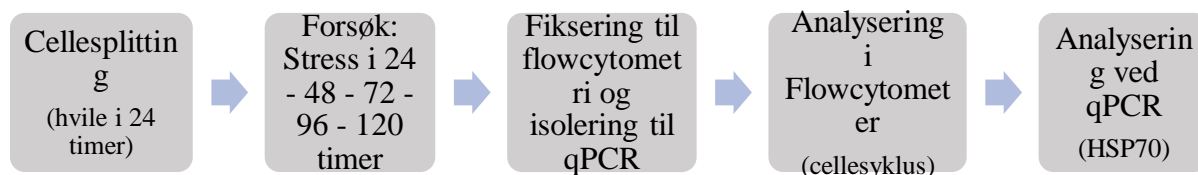
For å undersøke cellens stressrespons, må en undersøke de cellulære endringene i genuttrykk. Reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), gjør det mulig å

undersøke fenotypiske endringer hos en organisme utsatt for stress. Andelen mRNA som uttrykker HSP70 i en celle kan kvantitativt måles mot en kontrollprøve med basalt nivå uttrykt HSP70. Revers transkriptase brukes når startmaterialet er mRNA, da qPCR-analysen krever dobbeltrådet DNA som templat. Da mRNA er svært ustabil, må prøver som skal tas over en lengre periode eller lagres, oppbevares i rette forhold for å hindre degradering. Enten med frysing på -80°C og/eller i RNA løsning som RNA lyster(40). RT-qPCR kan gjennomføres i ettstegs-, eller tostegsanalyse. I tostegsanalyse omdannes mRNA til cDNA i et separat steg før en qPCR-analyse. Her tilføres optimaliserte buffere for hvert trinn, og tre mulige primere for revers transkriptase (Oligo (dT), tilfeldige primere eller sekvensspesifikke primere). I ett stegs RT-qPCR vil mRNA omdannes til cDNA, før qPCR-analyse i et enkelt rør. Buffere, sekvens-spesifikke primere og DNA-polymerase nødvendig for begge reaksjonene tilføres samtidig. Noe som gjør det vanskeligere å optimalisere buffere for begge reaksjonene enn med to stegs qPCR. Det er nødvendig for begge reaksjoner å tilføre buffere, sekvensspesifikke primere og DNA-polymerase. PCR-reaksjoner krever termotolerante enzymer for å hindre denaturering under analysen. Enzymet revers transkriptase omdanner mRNA til cDNA. Vanligvis brukes Moloney murine leukemia virus revers transkriptase eller Avian myeloblastosis virus revers transkriptase(41).

Polymerasekjedereaksjon deles inn i tre trinn; denaturering, annealing og amplifisering, der mengden DNA doubles i hver syklus. I første trinn denatureres DNA-trådene til enkelttråder på høy temperatur (94°), for å brukes som templat til å danne to nye DNA-tråder. I annealing-trinnet senkes temperaturen slik at primerne hybridiseres til DNA-trådene med komplementær binding. I siste trinnet heves temperaturen til rundt 72° , optimaltemperaturen til polymerasen, som danner to nye tråder med de ordinære DNA-trådene som templat. Økningen i PCR-produkt vil dermed være eksponentiell(42). Real-time PCR (qPCR), baserer seg på måling av fluorescenssignal produsert etter hver runde PCR, der intensiteten korrelerer med mengden PCR-produkt i prøven. Signalene fremstilles i en graf, der fluorescens signalet i de første syklusene ikke er over bakgrunnsstøy og derfor ikke målbar. Når signalet når målbar intensitet over terskel/baseline, kan en måle Ct-verdi. Ct-verdien representerer antall amplifiseringssykluser nødvendig for å nå denne terskelgrensen. Ct-invers er dermed proporsjonal med startmengden DNA, når denne måles over terskelverdien, C_p (quantification cycle)/baseline. Den måles mot en rekke kjente standarder med kjent konsentrasjon gjennom en standardkurve med logverdiene(43). Uten standarder, måles

verdiene mot normaliseringsgener der det regnes ut en høyere eller lavere konsentrasjon i genet av interesse i forhold til referansegnet med bruk av $2^{\Delta\Delta CT}$ metoden(44).

Det brukes vanligvis to typer fluorokromer; dobbelttrådet nukleinsyrebindende fargestoff (eks. SYBR Green), eller merkede primere med sonder (eks. TaqMan). Taqman er sekvensspesifikke primere, oligonukleotid sonder som avgir fluoriserende signal etter kløyving. Proben som er merket med et fluorokrom og quencher, bindes komplementært til enkelttrådet DNA med baseparing. Taq-polymerase har 5'-3'eksonnukleaseaktivitet som bryter ned proben i forlengelsen av DNA-tråden under PCR. Når proben brytes ned, frigis fluorokromen fra quencheren og fluorokromen emitterer lys. Det fluorescerende signalet er dermed proporsjonalt med mengde PCR-produkt etter hver syklus(45). SYBR Green vil i ubundet tilstand emittere lave nivåer av fluorescens, men med interkalær binding til dsDNA forsterkes signalet. Signalet vil da øke eksponentielt i takt med den totale mengden amplifisert PCR-produkt. En ulempe med SYBR green er at det i motsatt til TaqMan ikke bindes spesifikt til DNA, som kan gi falske resultater om uønskede produkter er til stede i prøven, og/eller primer-primer binding, også kalt primer-dimers. Det er dermed nødvendig å foreta en smeltepunktanalyse i etterkant for å skille primer-dimer fra PCR-produkt, da de har ulikt smeltepunkt(46).



Figur 9: Figuren viser et flytskjema over prosessen i det gjennomførte prosjektet. Gjennom hele prosessen har cellesplittning blitt gjentatt for å holde liv i cellene. De siste tre trinnene i prosessen er blitt gjennomført på celler som har blitt utsatt for stress i 24-, 48-, 72-, 96- og 120 timer, men på forskjellige dager da dette er tidkrevende. Alle tidspunktene ble gjentatt to ganger. Grunnet SARS-Cov-2 ble laboratoriet stengt ned og forsøket forkortet. 120 timer stress ble dermed bare analysert en gang og siste del av forsøket; analysering med qPCR (HSP70) ble ikke utført. Detaljert oversikt over prosjektet ligger vedlagt i tabell 3 (vedlegg A.2.1 Forsøk)

3 Metode og materiale

3.1 Dyrking av CHSE-214 celler

Tillaging av L-15 medium (Sigma, A: L-1518-500ML) ble utført i henhold til tabell 1 under. Før Fetal bovine serum (Gibco, A: A3160801), ble tilsatt i L-15 medium ble det tint opp til romtemperatur, og tilsatt sammen med gentamicin (Gibco, A: 15750-060).

Tabell 1: Tabellen viser volum av de ulike reagensene som ble benyttet i tillaging av L-15 medium.

Reagens	Volum
L-15 Medium (1X) + GlutaMAX	500 mL
Fetal Bovine Serum (FBS), One Shot	50 mL
Gentamicin (50mg/mL)	0.5 mL

En batch med CHSE-214 celler p=348 ble utdelt i en 75 cm² celleflaske med L-15 medium. CHSE-214 cellene ble dyrket i 75 cm² celleflasker og på cellebrett med seks brønner i et inkubatorskap på 20 °C. I løpet av uken ble cellene kontinuerlig undersøkt i et invertmikroskop for å sjekke konfluensen til cellene. Den optimale konfluensen var mellom 70-80% for å kunne splitte cellekulturen. Cellekulturen ble hovedsakelig splittet med forhold 1:3.

Gammelt medium ble pipettert ut av flasken og kastet når cellekulturen skulle splittes, deretter ble kulturen vasket to ganger med 5 mL HBSS (GE Healthcare - Hyclone, A: SH30588.01). 1 mL Trypsin-EDTA 0.25% (Gibco, A: 25200-072), ble så tilsatt celleflaskene, før de ble satt til inkubering i to til fem minutter i romtemperatur. For å få cellene til å løsne fra underlaget ble det dunket lett på flasken. De ble videre studert i invertmikroskop og trypsineringen var ferdig når 80% av cellene hadde løsnet. For så å tilsette 4 mL L-15 medium ble trypsinen inaktivert. Hele cellesuspensjonen fra en flaske ble overført til et 15 mL falconrør. Falconrørene ble så sentrifugert i tre minutter på 1200 rpm. Etter sentrifugeringen ble det kontrollert om det var en cellepellet før supernatanten ble pipettert av og kastet. Først ble 1 mL L-15 medium tilsatt for å løse opp pelleten, og deretter ble 8 mL med L-15 medium tilsatt. For å lage en homogen løsning, ble det pipettert litt opp og ned i

falconrørene. For hver nye 75 cm² celleflaske ble det tilsatt 17 mL L-15 medium, samt 3 mL cellekultur fra falconrøret slik at totalvolumet i celleflasken ble 20 mL.

I forberedelsen av prøver for analyse i flowcytometer ble cellene overført fra en 75 cm² celleflaske til et 6-brønns 9,6 cm² cellebrett. I brettene ble det tilsatt 5.5 mL med L-15 medium og 0.5 mL cellekultur fra falconrøret, slik at totalvolumet i celleflasken ble 6 mL i hver brønn.

3.2 Stressinitiering

For å gå videre med forsøket ble cellekulturen i cellebrettene studert i invert-mikroskop for å se om konfluensen var på 70-80%. Dersom cellekulturen var i en eksponentiellfase og hadde hvilt minst 24 timer etter splitting, ble de satt i et inkubatorskap på 26°C for stress. Det samme gjaldt for kontrollflasken, som ble plassert tilbake i inkubatorskapet på 20°C. De ulike cellebrettene ble stresset i 24-, 48-, 72-, 96- og 120 timer.

De cellene som skulle benyttes i qPCR ble stresset i samme brett som cellene som skulle benyttes til flowcytometri. Det ble benyttet to brønner til qPCR og fire til flowcytometri. De to til qPCR høstes etter den gitte stresstiden. Høstingen ble gjort på følgende måte: gammelt medium ble fjernet og kastet, deretter ble 1.5 ml RNA larter (1018087, Qiagen, Hilden, Tyskland), tilsatt. Brønnene ble forsiktig skrapet med en celleskraper (VWR, Radnor, USA), pipettert over til sterile oppsamlingsrør og direkte lagret ved 4°C.

3.3 Flowcytometri

3.3.1 Fiksering og farging med PI

Før cellene ble fiksert, ble cellene samlet til en cellepellet. Dette ble gjort med å fjerne medium fra hver brønn over til hvert sitt sterile 15mL Falconrør. Deretter ble hver brønn skylt to ganger med 1mL HBSS, den brukte milliliteren ble overført til det tilhørende Falconrøret sammen med mediet. Brønnene ble så tilsatt 0.2 m Trypsin, før de ble satt til inkubering i ett til tre minutter i romtemperatur. For å få cellene til å løsne fra underlaget ble det dunket lett på brettet. De ble videre studert i invert-mikroskop og trypsineringen var ferdig når 80% av cellene hadde løsnet. Det oppsamlede mediumet ble så tilsatt med HBSS fra Falconrøret til tilhørende brønn slik at trypsinen ble inaktivert. Brønnene ble forsiktig skrapet med en celleskraper, før hele cellesuspensjonen ble overført tilbake til Falconrøret som en homogen løsning. Tilførte så 11 µL til et engangs Burker-tellekammer for å telle cellene

fra de ulike brønnene. Cellesuspensjonen i de ulike Falconrørene ble fortynnet slik at det er ca. like mange celler i alle prøvene og i kontrollen.

Suspensjonen ble deretter sentrifugeres på 500 g i fem minutter før supernatanten ble fjernet. Det ble tilsatt 1.0 mL PBS til røret i romtemperatur for å vaske cellene. Hele volumet av resuspenderte celler ble deretter overført til et Falconrør som inneholdt 4.0 mL 96% etanol ved -20°C med å pipettere cellesuspensjonen i etanolen. Cellene ble så lagret i en fryser i etanolen i minst femten minutter. Etter fiksering ble cellesuspensjonen sentrifugert, på 1200rpm i fem minutter før supernatanten ble fjernet. Løsnet så pelleten med å dunke på røret, før 5.0mL PBS ble tilsatt i romtemperatur, og deretter trengte cellene femten minutter til å rehydrere. Deretter blir rørene sentrifugert i fem minutter på 1200 rpm. Supernatanten ble så fjernet slik at kun cellepelleten var igjen i bunn av rørene. 0,5 ml med PI-RNAse (F10797), ble tilsatt rørene, og deretter inkubert i mørket i nitti minutter i romtemperatur. Prøven kunne deretter analyseres i flowcytometeret.

3.3.2 Kalibrering av flowcytometer

Flowcytometeret ble kalibrert både før og etter at prøvene ble tatt. Seks kalibreringsrør ble gjort klare og satt i et stativ. Rør nummer en ble fylt med 800 μL cleaning solution, rør nummer to ble fylt med 500 μL decontamination solution, rør nummer tre og seks ble fylt med 1ml MQ vann, rør nummer fire ble fylt med en dråpe 8-peak beads mix og 500 μL MQ vann, og rør fem ble fylt med en dråpe 6-peak beads mix og 500 μL MQ vann.

Både flowcytometeret og datamaskinen koblet opp mot instrumentet ble slått på. Deretter måtte en åpne programmet tilhørende flowcytometeret, og åpne filen “wash and validation template for så å vente på grønt lys. Følgende parameter ble valgt; clean 2-5 min fast, det ble trykket “delete events” dersom ruten var blå. Rør nummer én ble plassert i instrumentet og det ble trykket «run. Kontrollerte at events/s ikke oversteg 100. Rør én ble byttet ut med rør nummer to, og den samme parameteren som med rør én ble brukt, og det ble trykket “run”. Det samme ble gjort når rør nummer to ble byttet ut med rør nummer tre. Rør nummer tre ble byttet så ut med rør fire, og det ble valgt en annen parameter; «slow» og 10000 events, før det ble trykket “run”. Plot 3, kolonne M6 CV FL-2-H ble sjekket og skulle være mindre enn 5%. Det var viktig å trykke på “backflush” etter rør fire, og å passe på at det kom ut en dråpe fra instrumentet før det ble tørket med linsepapir. Deretter kunne rør fire bli byttet ut med rør fem, og også her ble den samme parameteren som med forrige rør, benyttet og det ble trykket

“run”. Plot 6, kolonne M12 CV FL-4-H ble sjekket og skulle være under 5%. Det var også viktig her å trykke på “backflush” etter rør fem, og å passe på at det kom ut en dråpe fra instrumentet før det ble tørket med linsepapir. Rør fem ble så byttet ut med rør seks, og følgende parameter ble valgt; «fast» og kjørte i fem minutter. Rør seks ble stående i instrumentet slik at det ikke skulle tørket ut.

3.3.3 Analyse av cellesyklus med flowcytometri

Når flowcytometeret var ferdig kalibrert var det klart til å ta analysetester av prøvene. Prøvene som hadde inkubert i 90 minutter i mørket med PI-RNAsen, ble hentet frem og satt på is. De ble så dekket med aluminiumsfolie for å beholde mørket. Når en jobber med PI-RNase var det viktig å bruke hansker. I dataprogrammet til flowcytometeret ble riktig templat åpnet, og parameteren «slow» og 20000 events/sec ble valgt. Rør seks ble så byttet ut med kontrollen for de gitte prøvenes tidspunkt før en valgte “run”. Deretter ble kontrollen byttet med prøve nummer én, og det ble trykket “run”. Dette ble gjentatt for alle prøvene, for så å kalibrere på nytt.

4 Resultat

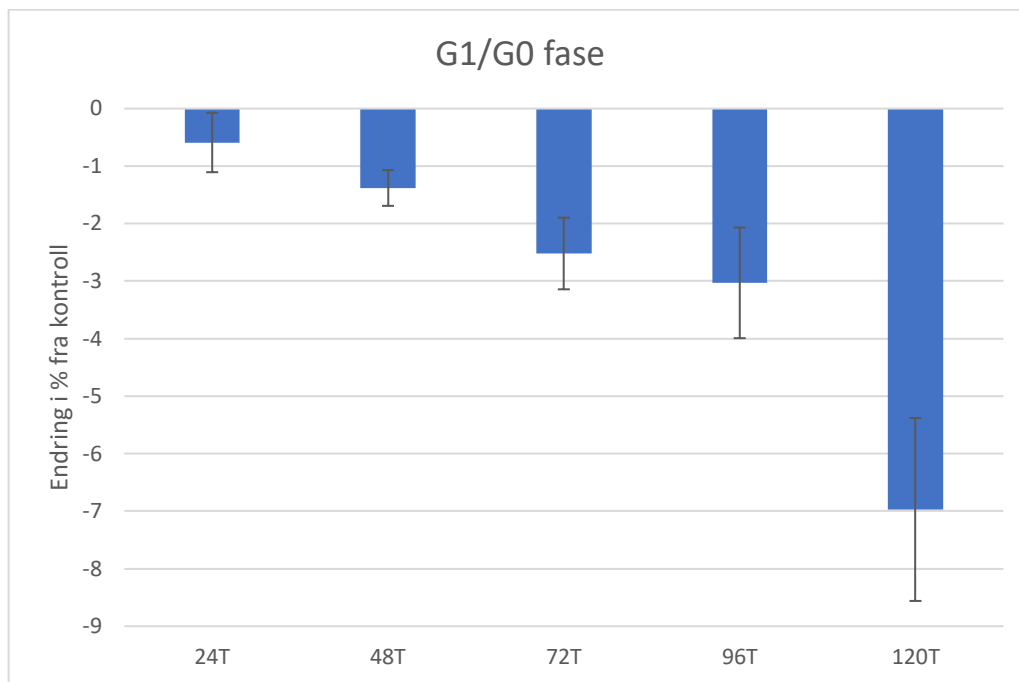
Å utsette CHSE-214 cellene for varmestress på 26°C mot normalt 20°C, ble en endring i cellesyklus observert på flowcytometeret med farging av DNA med PI. Som vist på tabell 3-7 (Vedlegg A.2.1), ble fem ulike stressintervaller analysert; 24 timer, 48 timer, 72 timer, 96 timer og 120 timer der prosenten av cellepopulasjonen i hver cellesyklus ble observert (G₁/G₀, S og G₂/M). For hvert forsøk ble det analysert fire paralleller per stressintervall, og forsøket ble gjentatt to ganger (120 timer ble bare analysert i forsøk 1). Resultatene ble overført til Excel for statistisk analyse av data representert i Vedlegg A.2.3. Endringen i cellesyklus er fremstilt grafisk, der en ser utviklingen til alle parallellene etter gitte stressintervaller fra hver syklus i figur 13-18. Prøveresultatene varierer mellom forsøk 1 og forsøk 2, med en større spredning mellom parallellene på forsøk 1.

4.1 Dyrking av CHSE-214 celler

Cellelinjen som ble utgitt som utgangspunkt for forsøket hadde god vekst de første to ukene etter tining. En 80% konfluens ble dermed nådd etter en til to dager. Veksten avtok etter ca. to uker. CHSE-214 cellene hadde vekst uten synlig kontaminasjon. Grunnet SARS-CoV-2 ble laboratoriet stengt ned fire dager inn i forsøket, og det ble gitt dispensasjon i fire dager for å få avsluttet forsøket. For å analysere flest mulig av de resterende prøvene ble noen av forsøkene fremskyndet og ble derfor analysert før 70-80% konfluens.

4.2 Endring i G₁/G₀-fasen etter påført stress

Grafene vist i figur 13 og 14 (Vedlegg A.2.4), viser en nedgang i antall celler i G₁/G₀-fasen etter stressinitiering mot kontroll. Denne nedgangen øker jo lenger cellene utsettes for stress hos seks til syv av åtte paralleller (75-87.5%). Nedgangen kommer tydelig frem i figur 10, der gjennomsnittsverdiene av endringen i prosent regnes mot gjennomsnitt av kontroll i G₁/G₀-fasen. Figuren viser også usikkerhetsstolpene med standardfeilen mellom parallellene. Utrengningene ble utført i Excel, vist i tabell 13-17 (Vedlegg A.2.3). Majoriteten av cellepopulasjonen ligger i G₁/G₀-fasen hos både kontrollene og prøvene utsatt for stress, på rundt 30-38%.



Figur 10: Figuren viser endringen i % i totalt antall celler av populasjonen som havnet i G₁/G₀-fasen etter x-antall timer stress. Usikkerhetsstolpene representerer standardfeilen til gjennomsnittsverdien til alle parallellene per tidspunkt. X-aksen representerer antall timer påført stress og Y-aksen representerer endringen fra kontroll (0), med en økning eller nedgang av totalt antall celler i G₁/G₀-fasen. X-aksen representerer antall timer påført stress og Y-aksen representerer endringen fra kontroll (0), med en økning eller nedgang av totalt antall celler i G₁/G₀-fasen.

4.2.1 Påført 26°C varmestress i 24 timer

Etter 24 timer stress i 26°C er det ingen statistisk signifikant forskjell mot kontroll i G₁/G₀-fasen ($P > 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen, vist i figur 10, gir en nedgang fra kontroll på -0.59% med standardfeil på 0.52 vist med usikkerhetsbarer. Seks av åtte paralleller (75%), ligger under gjennomsnitt av K i G₁/G₀-fasen, vist som graf i figur 13 og 14. Et 95% konfidensintervall av den sanne middelerdi ligger mellom -1.81 og 0.63. Veksten i prøven var relativt lav med rundt 100 000-150 000 celler totalt i hver per parallell (9.6 cm² brønner).

4.2.2 Påført 26°C varmestress i 48 timer

Etter 48 timer varmestress er det en endring i G₁/G₀-fasen av statistisk signifikans ($P < 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen på -1.38% fra kontroll, med en standardfeil på 0.31, er vist i figur 10. Åtte av åtte paralleller (100%), ligger under kontroll i G₁/G₀-fasen vist som graf i figur 13 og 14. Et 95% konfidensintervall av den sanne middelerdi ligger mellom -2.11 og -0.65. Veksten lå på rundt 200 000-300 000 celler totalt i hver parallell etter 48 timer stress (9.6cm² brønner).

4.2.3 Påført 26°C varmessress i 72 timer

Etter 72 timer stress er det en endring i G₁/G₀-fasen av statistisk signifikans (P<0.05). Den gjennomsnittlige endringen, vist i figur 10, er -2.52% fra kontroll, med standardfeil på 0.62 vist med usikkerhetsbarer. Et 95% konfidensintervall av den sanne middelvei ligger mellom -3.99 og -1.04. Åtte av åtte paralleller (100%), ligger under kontroll av andelen celler i G₁/G₀-fasen vist som graf i figur 13 og 14. God vekst på ca. 500 000 celler totalt i hver parallell (9.6cm² brønner).

4.2.4 Påført 26°C varmessress i 96 timer

Det er en endring i G₁/G₀-fasen etter 96 timer stress av statistisk signifikans (P<0.05). Den gjennomsnittlige endringen ligger på -3.03% fra kontroll, med en standardfeil på 0.96%, vist i figur 10. Et 95% konfidensintervall av den sanne middelvei ligger mellom -0.76 og -5.30. seks av åtte paralleller (75%), ligger under kontroll av andelen celler i G₁/G₀-fasen vist som graf i figur 13 og 14. Etter 96 timer påført stress var veksten stor hos cellelinjen med totalt antall celler i hver parallell (9.6cm²), på over 1 000 000 celler.

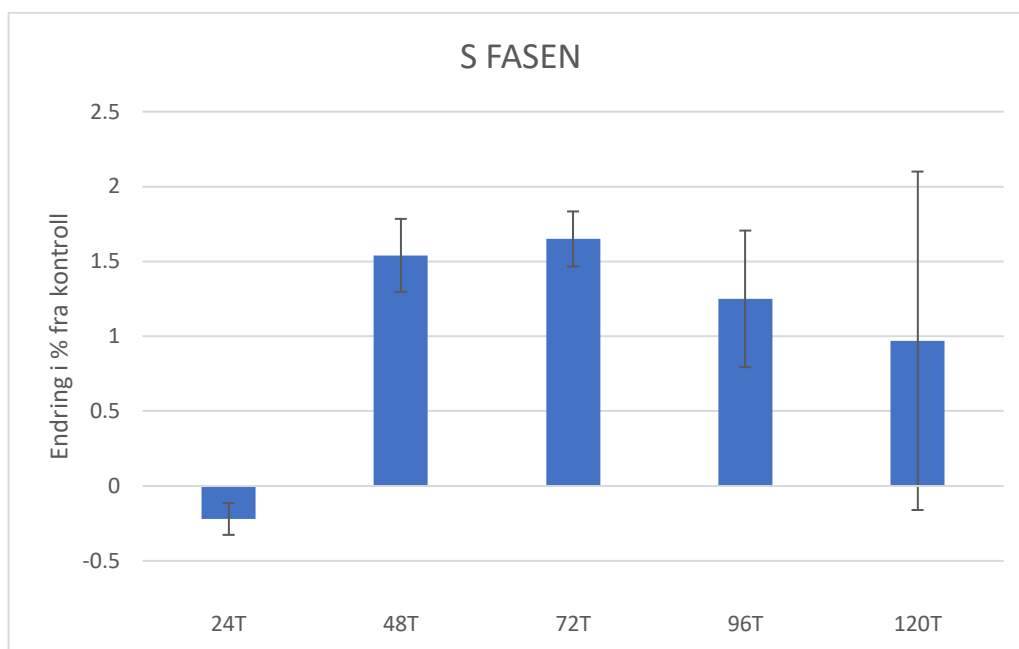
4.2.5 Påført 26°C varmessress i 120 timer

Etter 120 timer stress ved 26°C er det en endring i G₁/G₀-fasen av statistisk signifikans (P<0.05). Den gjennomsnittlige endringen ligger på -6.97% med standardfeil på 1.59 vist i figur 10. Et 95% konfidensintervall av den sanne middelvei ligger mellom -12.03 og -1.91. Fire av fire paralleller (100%), ligger under kontroll i G₁/G₀-fasen vist som graf i figur 13 og 14. Veksten hos cellelinjen etter 120 timer varmessress var god med mellom 1 000 000 – 2 000 000 celler totalt per parallell (9.6cm²).

4.3 Endring i S-fasen etter påført stress

Grafene, vist i figur 15 og 16 (Vedlegg A.2.4), viser en liten nedgang i antall celler i S-fasen etter 24 timer påført stress, før en økning etter 48- til 120 timer mot kontroll. Endringen viser ingen direkte trend, der den største gjennomsnittlige endringen er etter 72 timer, sett i figur 11. Fem av åtte paralleller (62.5%), ligger under kontroll etter 24 timer stress, de resterende tre av åtte (37.5%), ligger rett over kontroll. Andelen øker deretter i S-fasen, der seks til syv av åtte (75-87.5%), paralleller per tidspunkt ligger over kontroll. Figur 11 viser gjennomsnittsverdiene av endringen i prosent mot gjennomsnitt av K i S-fasen, der usikkerhetsstolpene viser standardfeilen mellom parallellene. Utrekningene ble utført på

Excel, vist i tabell 13-17 (Vedlegg A.2.3). Andelen celler i S-fasen hos både kontroll og prøvene ligger rundt 6-12%, betydelig lavere andel en G1/G0.



Figur 11: Figuren viser endringen i % i totalt antall celler av populasjonen som havnet i S-fasen etter x-antall timer stress. Usikkerhetsstolpene representerer standardfeilen til gjennomsnittsverdien til alle parallellene per tidspunkt. X-aksen representerer antall timer påført stress og Y-aksen representerer endringen fra kontroll (0), med en økning eller nedgang av totalt antall celler i S-fasen.

4.3.1 Påført 26°C varmestress i 24 timer

Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom kontroll og prøvene utsatt for stress i 24 timer i S-fasen ($P > 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen vist i figur 11, gir en nedgang fra kontroll på -0.22%, med standardfeil på 0.12. Fem av åtte paralleller (62.5%), under kontroll i S-fasen, sett i figur 15 og 16. Den samme middelerdien med et 95% konfidensintervall ligger mellom -0.47 og 0.03. Veksten i prøven var relativt lav med rundt 100 000-150 000 celler totalt i hver per parallell (9.6 cm² brønner).

4.3.2 Påført 26°C varmestress i 48 timer

Det er endring i S-fasen etter 48 timer stress av statistisk signifikans ($P < 0.05$). Figur 11 viser den gjennomsnittlige endringen på 1.54% fra kontroll, med en standardfeil på 0.24. Åtte av åtte paralleller (100%), har en økning i andel celler i S-fasen i forhold til kontrollen, vist i figur 15 og 16. Den samme middelerdien med et 95% konfidensintervall ligger på mellom 0.96 og 2.11. Veksten lå på rundt 200 000-300 000 celler totalt i hver parallell etter 48 timer stress (9.6cm² brønner).

4.3.3 Påført 26°C varmestress i 72 timer

Det er endring i S-fasen etter 72 timer stress av statistisk signifikans ($P < 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen er på 1.65 % fra kontroll, vist i figur 11, med en standardfeil på 0.18 vist med usikkerhetsbarer. Grafene, i figur 15 og 16, viser åtte av åtte paralleller (100%), ligger over kontroll i S-fasen. Den sanne middelveidien med et konfidensintervall på 95% ligger mellom 1.22 og 2.08. God vekst på ca. 500 000 celler totalt i hver parallell (9.6cm² brønner).

4.3.4 Påført 26°C varmestress i 96 timer

Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom kontroll og prøvene utsatt for stress i 96 timer i S-fasen ($P > 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen, gir en økning i S-fasen fra kontroll på -1.25%, med en standardfeil på 0.46, vist i figur 11. Den sanne middelveidien med et konfidensintervall på 95% ligger mellom 0.17 og 2.33. Grafene vist i figur 15 og 16, viser seks av åtte paralleller (75%), over kontroll i S-fasen. Etter 96 timer påført stress var veksten stor hos cellelinjen med totalt antall celler i hver parallell (9.6cm²), på over 1 000 000 celler.

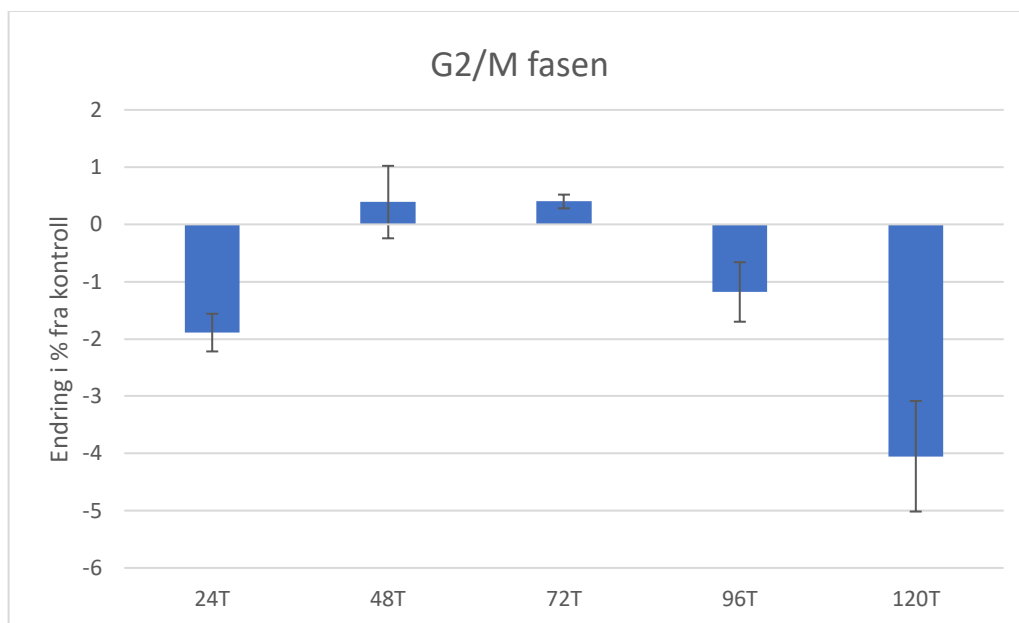
4.3.5 Påført 26°C varmestress i 120 timer

Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom kontroll og prøvene utsatt for stress i 120 timer i S-fasen ($P > 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen, vist i figur 11, gir en økning fra kontroll på 0.97%, med en høy standardfeil på 1.13. Figur 15 og 16, viser grafer der tre av fire paralleller (75%), ligger over kontroll i andelen celler i S-fasen, men med stor spredning mellom parallellene. Den sanne middelveidien med et konfidensintervall på 95% ligger mellom -2.62 og 4.56. Veksten hos cellelinjen etter 120 timer varmestress var god med mellom 1 000 000 – 2 000 000 celler totalt per parallell (9.6cm²).

4.4 Endring i G₂/M-fasen etter påført stress

Grafene vist i figur 17 og 18 viser ingen tydelig trend med påført stress. En liten nedgang i antall celler i G₂/M-fasen etter 24 timer påført stress, før en økning etter 48 til 72 timer, før igjen en nedgang etter 96 til 120 timer mot kontroll. Den største gjennomsnittlige endringen er etter 120 timer stress. Åtte av åtte paralleller (100%), ligger under kontroll etter 24 timer stress, etter 48 og 72 timer ligger fire av åtte (50%), under, og fire av åtte (50%), over kontroll. Etter 96- og 120 timer ligger syv til åtte av åtte (87.5-100%), paralleller under kontroll sett i figur 17 og 18 (Vedlegg A.2.4). Figur 12 viser gjennomsnittsverdiene av endringen i prosent mot gjennomsnitt av K i G₂/M-fasen, der usikkerhetsstolpene viser

standardfeilen mellom parallellene. Utrekningene ble utført i Excel, vist i tabell 13-17 (Vedlegg A.2.3). Andelen celler i G₂/M-fasen, i både kontroll og prøvene, ligger på 4-13%. Det er størst spredning mellom prøvene i G₂/M-fasen.



Figur 12: Figuren viser endringen i % i totalt antall celler av populasjonen som havnet i G₂/M-fasen etter x-antall timer stress. Usikkerhetsstolpene representerer standardfeilen til gjennomsnittsverdien til alle parallellene per tidspunkt. X-aksen representerer antall timer påført stress og Y-aksen representerer endringen fra kontroll (0), med en økning eller nedgang av totalt antall celler i G₂/M-fasen.

4.4.1 Påført 26°C varmestress i 24 timer

Det er en endring av statistisk signifikans i G₂/M-fasen etter 24 timer stress mot kontroll ($P < 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen i figur 12, viser en nedgang på -1.89% med standardfeilen mellom prøvene på 0.33. Grafene i figur 17 og 18, viser at åtte av åtte paralleller (100%), ligger under gjennomsnitt av K i G₂/M-fasen. Den sanne middelverdien med et 95% konfidensintervall ligger mellom -2.67 og -1.11. Veksten i prøven var relativt lav med rundt 100 000-150 000 celler totalt i hver per parallell (9.6 cm² brønner).

4.4.2 Påført 26°C varmestress i 48 timer

Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom kontroll og prøvene utsatt for stress i 48 timer i G₂/M-fasen ($P > 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen i figur 12 viser en liten økning fra kontroll på 0.39%, med en høy standardfeil mellom prøvene på 0.63. Grafene i figur 17 og 18, viser fire av åtte paralleller (50%), over kontroll, og fire av åtte paralleller (50%), under kontroll etter 48 timer stress. Den sanne middelverdien med et 95% konfidensintervall ligger

mellom -1.10 og 1.88. Veksten lå på rundt 200 000-300 000 celler totalt i hver parallell etter 48 timer stress (9.6cm² brønner).

4.4.3 Påført 26°C varmestress i 72 timer

Etter 72 timer stress er det ingen statistisk signifikant forskjell mellom prøvene og kontroll i G₂/M-fasen ($P > 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen, viser en økning fra kontroll på 0.40%, med en standardfeil mellom prøvene på 0.12 vist i figur 12. Fire av åtte paralleller (50%), ligger under kontroll, og fire av åtte paralleller (50%), ligger over kontroll i G₂/M-fasen etter 72 timer stress. Figur 17 og 18 viser en stor spredning mellom prøvene. Den sanne middelveiden med et 95% konfidensintervall ligger mellom 0,12 og 0,69. God vekst på ca. 500 000 celler totalt i hver parallell (9,6cm² brønner).

4.4.4 Påført 26°C varmestress i 96 timer

Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom kontroll og prøvene utsatt for stress i 96 timer i G₂/M-fasen ($P > 0.05$). Den gjennomsnittlige endringen, vist i figur 12, viser en nedgang fra kontroll på -1.18%, med en standardfeil på 0.52. Syv av åtte paralleller (87.5%), ligger under kontroll, men med stor spredning mellom parallellene, sett i figur 17 og 18. Den sanne middelveiden med et 95% konfidensintervall ligger mellom -2.41 og 0.05. Etter 96 timer påført stress var veksten stor hos cellelinjen med totalt antall celler i hver parallell (9.6cm² brønner), på over 1 000 000 celler.

4.5.5 Påført 26°C varmestress i 120 timer

Etter 120 timer stress er det en endring av statistisk signifikans i cellesyklus i G₂/M-fasen ($P < 0.05$). Figur 12 viser en nedgang på gjennomsnittlig -4.05 % fra kontroll, med en standardfeil mellom prøvene på 0.97. Grafene i figur 17 og 18, viser fire av fire paralleller (100%), ligger under kontroll med en stor spredning mellom prøvene. Den sanne middelveiden med et 95% konfidensintervall, ligger mellom -7.12 og -0.98. Veksten hos cellelinjen etter 120 timer varmestress var god med mellom 1 000 000 – 2 000 000 celler totalt per parallell (9.6cm² brønner).

5 Diskusjon

5.1 Dyrking av CHSE-214 celler

Gjennom hele forsøket har veksten av CHSE-214 cellene vært relativt gode. Dette er et resultat av god gjennomførelse av standard sterilteknikk for LAF-benk, og tilrettelagte vekstforhold, se 2.3.1 Vekstvilkår. Som nevnt i resultatene, se avsnitt 4.1 Dyrking av CHSE-214 celler, oppstod det et avvik hvor veksten av cellekulturen avtok etter ca. to uker, da cellene trolig hadde blitt akklimatisert etter tining. Dette gjorde at stressinitieringen måtte utsettes noen dager lenger enn planlagt. På grunn av SARS-CoV-2 og nedstenging av laboratoriet fire dager inn i forsøket, ble det viktig å unytte de fire dispensasjonsdagene. Den fremskyndete prøvetakningen før 70-80% konfluens kan ha påvirket resultatene av forsøket. Optimalt burde en 70-80 % konfluens vært sikret før stressinitiering og analyse, for å sikre at cellene var i eksponentiell vekst. Det ble prioritert å ha mest mulig resultater å jobbe med, enn å sikre konfluensen. Når det er sagt var aldri konfluensen under 50%.

Det ble utført totalt fire cellesplittings gjennom forsøket, fra passasje 349 til 353. For å opprettholde gunstige leveforhold, se 2.3 CHSE-214, cellemodell, og for å hindre overvekst ble cellekulturen splittet når konfluensen nådde ca. 70%. En sammenheng mellom konfluens og hvor mange cellebrett og celleflasker som var nødvendig for videre analyser avgjorde om cellekulturen ble splittet i et 1:2 eller 1:3 forhold. Hovedsakelig ble kulturen splittet med forholdet 1:3. Gjennom dyrkingen var det ingen antydning til kontaminasjon annet enn et par tilfeller hvor det ble oppdaget plastfilamenter fra brettene.

5.2 Stressforsøk

For å kunne tydelig studere effekten av langvarig stress ble det valgt tidsintervall på 24 timer mellom prøvene for å virkelig se en forskjell. Cellebrettene ble satt inn på forhåndsbestemte tidspunkter slik at det ble lett å ta de ut presis etter gitte stressintervall. Det var svært viktig å ta cellene ut på riktig tidspunkt for å få et mest mulig nøyaktig resultat. I tillegg var det viktig å jobbe effektivt når cellene ble høstet og fiksert før prøvetakningen i flowcytometeret, da dette også kunne påvirket resultatene. Dersom en sammenligner grafene i alle cellesyklusfasene, er det ikke vanskelig å se at spredningen til parallellene i alle prøvetidspunkt er mye større i forsøk 1 mot forsøk 2, som har mye mindre variasjon. Dette kan være fordi høsting og fiksering gikk raskere i forsøk 2, grunnet mer øving enn i forsøk 1. Nedstenging av laboratoriet grunnet SARS-CoV-2 fremskyndte også forsøk 2. For å ha nok

resultater å jobbe med ble dermed ikke konfluens så høy som ønsket i forsøk 2 før stressinitiering. Dette kan også hatt en innvirkning på resultatene.

Mindre spredning mellom parallellene gir et mer pålitelig resultat da resultatene er mer repetitive. Da det ble brukt cellebrett med fire paralleller fra samme passasje per prøvetidspunkt i hvert forsøk, har parallellene hatt de samme forutsetningene. Det viser seg derimot å være store forskjeller mellom parallellene i forsøk 1 og ikke like mye spredning i forsøk 2. Grunnet store variasjoner i prøveresultatene kan det kun regnes en endring av statistisk signifikans i åtte av de femten tidspunktene i de tre fasene G_1/G_0 , S, og G_2/M . Dette kan skyldes en for lav konfluens før stressinitiering, og at en del av populasjonen ikke er i eksponentiellfase og dermed påvirker resultatet til populasjonen. Det kan også skyldes at arbeidet var for tregt mellom høsting og fiksering og dermed stresset dette cellene. Den tredje grunnen kan være at det ikke er noen endring mot kontroll i disse tidspunktene grunnet gjenopprettet homeostase. Det er derfor vanskelig å stole helt på resultatene fra både forsøk 1 og 2. Flowcytometeret klarer ikke å skille mellom G_1 - og G_0 -fasene, grunnet størrelsen på cellene og mengden med DNA er lik i de to. Dersom det er cellyklusarrest i G_1 -fasen, eller at cellene har gått ut i hvilefase i G_0 -fasen, er det vanskelig å si noe om. Det er heller ikke mulig å skille mellom G_2 - og M-fasene av samme grunn. Cellene kan også havne i arrest i G_2 -fasen, men det blir ikke verifisert fra resultatene.

5.2.1 Endring i G_1/G_0 -fasen eller ikke?

I fire av de fem stressintervallene regnes en statistisk signifikant endring mot kontrollen i G_1/G_0 -fasen der $P < 0.05$. Endringen ser ut til å øke med lengden av stresset i en nedgående trend. Et 95% konfidensintervall for den sanne middelveiden ligger mellom -2.11 og -0.65 etter 48 timer stress. Etter 72 timer stress ligger den mellom -3.99 og -1.04. Etter 96 timer stress ligger den mellom -0.76 og -5.30, og etter 120 timer stress ligger den mellom -12.03 og -1.91. Dette viser også en endring mot kontroll (0-verdien), i nedgående trend. Det er kun etter 24 timer stress at det ikke er en endring mot kontroll i G_0/G_1 -fasen av statistisk signifikans, da $P > 0.05$. Her ligger også middelveiden med et 95% konfidensintervall mellom -1.81 og 0.63, som dermed ikke gir noen endring mot kontroll. Selv om middelveiden til parallellene etter 24 timer stress ligger litt under 0, er endringen for liten og med for stor variasjon mellom parallellene til å konkludere med noen reell endring. De resterende resultatene fra G_1/G_0 -fasen viser derimot en tydelig nedgående trend, med noen få avvik, sett i graf i figur 13 og 14.

5.2.2 Endring i S-fasen eller ikke?

I to av de fem stressintervallene vises en endring mot kontrollen av statistisk signifikans da $P < 0.05$ i S-fasen. Dette ses også med et 95% konfidensintervall, der middelveidien til endringen ligger mellom 0.96 og 2.11 etter 48 timer stress, og mellom 1.22 og 2.08 etter 72 timer stress. Som viser en reell endring mot kontroll (0-verdien). Endringen ser ut til å ha nesten like stort intervall for sanne middelveidien i de to tidspunktene mot kontrollen, som kan indikere at prøvene varierer likt ovenfor hverandre. Det er etter 24 timer, 96 timer og etter 120 timer stress at det ikke er en endring mot kontroll i S-fasen der $P > 0.05$. Dette ses også med 95% konfidensintervall der middelveidien ligger mellom -0.47 og 0.03 etter 24 timer stress, og etter 120 timer stress ligger middelveidien mellom -2.62 og 4.56 . Etter 120 timer stress er det stor spredning mellom parallellene som gjør det vanskelig å anta noen endring mot kontroll. Den sanne middelveidien med et 95% konfidensintervall for 96 timer stress, ligger den mellom 0.17 og 2.33 , som derimot viser en liten endring mot kontroll. Endringen er liten og har store variasjoner mellom parallellene, slik at den ikke er av statistisk signifikans.

5.2.3 Endring i G₂/M-fasen eller ikke?

I to av de fem stressintervallene vises en endring mot kontroll av statistisk signifikans i G₂/M-fasen da $P < 0.05$. Endringen følger ingen tydelig nedgående eller oppgående trend. Begge resultatene som viste en endring av statistisk signifikans, viser derimot en nedgang i antall celler i G₂/M-fasen, etter 24 timer stress og etter 120 timer stress. Dette ses også med et 95% konfidensintervall av middelveidien som ligger mellom -2.67 og -1.11 etter 24 timer stress, og etter 120 timer stress mellom -7.12 og -0.98 . Det er etter 48 timer, 72 timer og etter 96 timer stressintervall, at det ikke er en endring mot kontroll i G₂/M-fasen da $P > 0.05$. Dette ses også med et 95% konfidensintervall av sann middelveidie som ligger mellom -1.10 og 1.88 etter 48 timer stressintervall, og etter 96 timer stressintervall ligger middelveidien mellom -2.41 og 0.05 , som da ikke gir noen endring mot kontroll. Selv om det ikke regnes noen endring av statistisk signifikans etter 72 timer stress, ligger den sanne middelveidien mellom 0.12 og 0.69 , som viser en liten endring mot kontroll. Derimot har resultatene fra 48 timer, 72 timer og 96 timer i denne fasen såpass spredte verdier over og under kontroll som gjør resultatene for varierende til å se noen direkte trend.

5.3 Komparativ metode, RT-qPCR

RT-qPCR kan brukes som en komparativ metode til å undersøke cellulære endringer som uttrykt HSP70 etter påført stress. Å undersøke endringen i uttrykt HSP70 under samme stressforhold som analysen av cellesyklus, ville det gi et tydeligere resultat av effektene av langvarig stress. Dette for å undersøke forskjeller i cellesyklusfasene, og endring i mengde uttrykt HSP70 som kan forsterke evidensen for at cellene går mot cellesyklusarrest. Det ble tatt ut prøver fra to paralleller av hvert stressforsøk (24t, 48t, 72t, 96t og 120t + kontroll), overført til RNA-latter og plassert i kjøleskapttemperatur $<4^{\circ}\text{C}$ for lagring; Til tross for god planlegging av denne delen av prosjektet, ble dette ikke mulig å gjennomføre på grunn av uforutsette omstendigheter rundt SARS-CoV-2.

5.4 Drøfting av resultatet og videre forskning

Skulle prosjektet blitt gjort på nytt ville det vært lurt å gjennomføre flere forsøk, slik ville det blitt lettere å se eventuelle gjentakende resultater. I tillegg satt av tid til en komparativ metode for å underbygge resultatene fra cellesyklusanalysen. Det forventede resultatet sett i tidligere forskning(48, 49), ville vært en økning i G₂/M eller G₁/G₀, som kan indikere cellesyklusarrest. Derimot viser resultatene en endring totalt som en nedgang i både G₁/G₀ og G₂/M-fasen mot en økning i S-fasen. Denne økningen i S-fasen kan være cellesyklusarrest som også ble observert i analyse av cellesyklus: effekt av fluor for DNA-ødeleggelse(49). Da cellene etter langvarig stress hadde svært god vekst med rundt 1 500 000 til 2 000 000 celler på 9,6cm² brønner, indikerer dette at cellene vokser godt tross påført stress ved 26°C. Det ville vært interessant å se om cellene var mindre i størrelsen, og om cellene da ikke har brukt lang nok tid i vekstfasene G₁ og G₂. Måling av andelen uttrykt HSP70 i de samme stressintervallene kan gi informasjon om cellen beskyttes gjennom en økning HSP70 som oppretter homeostase, cellen kan dermed replikere genomet og fortsette cellesyklus. En økning i S-fasen kan indikere at cellesykluskontrollsystemet ikke holder cellen igjen i G₁, men initierer DNA-replikasjon hurtigere enn ved normal vekst. Langvarig stress kan dermed medføre en nedgang av kontrollsystemet i cellesyklus, som kan gi økt genfeil.

6 Konklusjon

Resultatene fra dette forsøket viser en nedgang i både G₁/G₀-fasen og i G₂/M-fasen mot kontroll. Denne endringen ser ut til å øke med lengden av stresset i en synkende trend. Derimot er det en økning i S-fasen mot kontroll, men det er ingen trend i sammenheng med lengden av stresset. Resultatene fra dette forsøket er for usikre og det er for lite prøvemateriale til å kunne konkludere med noen effekt av langvarig stress på cellyklus. Dette er likevel en indikasjon på at det skjer endringer i cellyklus etter stress over lengre tid, men prøvesvarene er som sagt ikke til å stole på. I tillegg med en manglende komparativ metode blir det vanskelig å gi noe svar på om langvarig stress er ødeleggende for cellene, og hvor ødeleggende det eventuelt er.

A.0 Vedlegg

A.1 Forsøk

Tabell 2: Viser en detaljert forklaring av flytskjema, se figur 9 (3.0 Metode og materiale), for alle forsøkene som ble gjennomført på laboratoriet. I venstre kolonne er det en forklaring på hvilken type forsøk som ble utført den spesifikke dagen, og i høyre kolonne kommer en forklaring på hva som ble gjort i dette spesifikke forsøket.

Forsøk	Forklaring
Cellesplitting (26.02.20)	Passasje 349 ble splittet til tre nye 75cm ² flasker og et brett med seks brønner.
Cellesplitting (04.03.20)	Passasje 350 ble splittet til fire nye 75cm ² flasker og to brett med seks brønner.
Cellesplitting og stress (06.03.20)	Passasje 351, to brett ble satt på stress (96 timer og 120 timer), en 75cm ² flaske ble splittet til tre 9,6cm ² flasker (kontroller) og tre brett med seks brønner. Det ble også laget nytt medium.
Cellesplitting (09.03.20)	Passasje 351, tre 75cm ² flasker ble splittet til to brett, fire 9,6cm ² flasker (kontroller) og tre 75cm ² flasker.
Fiksering og stress (10.03.20)	Passasje 352, satte inn to brett til stress (48 timer og 72 timer). Passasje 351, fikserte brettet som hadde stått til stress i 96 timer og en 9,6cm ² flaske som kontroll. Fire brønner ble fiksert til flowcytometri og to til qPCR.
Fiksering og flowcytometri (11.03.20)	Passasje 351, fikserte brettet som hadde stått til stress i 120 timer og en 9,6cm ² flaske som kontroll. Fire brønner ble fiksert til flowcytometri og to til qPCR. Fikserte ferdig prøvenene fra 96 timer og 120 timer og analyserte de i flowcytometeret.
Fiksering, flowcytometri og stress (12.03.20)	Passasje 352, fikserte brettet som hadde stått til stress i 48 timer og en 9,6cm ² flaske som kontroll. Fire brønner ble fiksert til flowcytometri og to til qPCR. Analyserte prøvene i flowcytometeret. Satte to brett med seks brønner til stress (72 timer og 96 timer)
Fiksering, flowcytometri, splitting og stress (13.03.20)	Passasje 352, fikserte brettet som hadde stått til stress i 72 timer og en 9,6cm ² flaske som kontroll. Fire brønner ble fiksert til flowcytometri og to til qPCR. Analyserte prøvene i flowcytometeret. Splittet to 75cm ² flasker til to brett med seks brønner, to 9,6cm ² flasker (kontroller) og to 75cm ² flasker. Satte inn et brett til stress (48 timer).
Fiksering, flowcytometri og stress (15.03.20)	Passasje 353, satte to brett til stress (24 timer). Passasje 352, fikserte brettet som hadde stått til stress i 48 timer og en 9,6cm ² flaske som kontroll. Fra hvert brett ble fire brønner fiksert til flowcytometri og to til qPCR. Analyserte prøvene i flowcytometeret.
Fiksering, flowcytometri og splitting (16.03.20)	Passasje 353, fikserte brettene som hadde stått til stress i 24 timer. Passasje 352, fikserte brettene som hadde stått til stress i 96 timer. Analyserte prøvene i flowcytometeret. Passasje 353, splittet en 75cm ² flaske til to 75cm ² flasker i håp om at de skulle overleve koronakarantenen som oppsto da laboratoriet stengte.

A.2 Resultater

A.2.1 Flowcytometri

Tabell 3: Tallene i tabellen viser prøvesvarene fra flowcytometeret i de ulike fasene etter 24 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse, prøvenummer og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
24 timer	K₁	35,24	6,95	9,55
	1	33,19	6,93	6,95
	2	34,43	7,86	8,23
	3	34,46	7,43	7,84
	4	34,12	7,39	7,70
	K₂	35,46	6,22	8,40
	5	37,61	7,01	9,55
	6	36,58	7,19	9,40
	7	36,08	7,39	9,28
	8	35,53	7,51	8,66

Tabell 4: Tallene i tabellen viser prøvesvarene fra flowcytometeret i de ulike fasene etter 48 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse, prøvenummer og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
48 timer	K₃	35,18	10,23	12,29
	1	32,71	9,61	12,12
	2	33,93	8,94	11,14
	3	35,48	10,14	12,61
	4	35,03	9,82	13,07
	K₄	36,21	6,70	9,09
	5	34,78	8,30	10,03
	6	34,04	8,96	9,46
	7	34,64	8,69	8,03
	8	35,06	8,32	9,38

Tabell 5: Tallene i tabellen viser prøvesvarene fra flowcytometeret i de ulike fasene etter 72 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse, prøvenummer og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
72 timer	K₅	35,55	7,58	9,24
	1	30,58	10,18	10,46
	2	35,63	8,38	9,50
	3	32,87	9,09	10,00
	4	31,02	9,56	9,70
	K₆	36,13	7,39	11,26
	5	34,26	9,20	10,69
	6	33,60	9,27	11,20
	7	33,82	8,99	10,38
	8	34,80	9,01	10,38

Tabell 6: Tallene i tabellen viser prøvesvarene fra flowcytometeret i de ulike fasene etter 96 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse, prøvenummer og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
96 timer	K₇	36,77	8,27	11,50
	1	36,96	6,31	10,45
	2	35,93	7,60	11,36
	3	29,08	10,12	6,96
	4	29,72	10,04	7,36
	K₈	36,59	7,95	11,54
	5	33,49	9,58	9,53
	6	32,88	9,14	9,29
	7	32,11	8,91	9,58
	8	32,28	8,79	8,74

Tabell 7: Tallene i tabellen viser prøvesvarene fra flowcytometeret i de ulike fasene etter 120 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse, prøvenummer og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
120 timer	K₉	36,47	7,24	10,19
	1	33,52	5,96	7,60
	2	27,61	8,37	5,00
	3	27,99	11,46	8,26
	4	26,35	8,33	4,31

A.2.2 Avvik

Tabell 8: Tallene i tabellen viser endringen mot gjennomsnitt av kontrollene i de ulike fasene etter 24 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
24 timer	1	- 2,65	-0,63	-3,39
	2	-1,41	0,30	-2,11
	3	-1,38	-0,13	-2,50
	4	-1,72	-0,17	-2,64
	5	1,77	-0,55	-0,79
	6	0,74	-0,37	-0,94
	7	0,24	-0,17	-1,06
	8	-0,31	-0,05	-1,68

Tabell 9: Tallene i tabellen viser endringen mot gjennomsnitt av kontrollene i de ulike fasene etter 48 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
48 timer	1	-3,13	2,05	1,78
	2	-1,91	1,38	0,80
	3	-0,36	2,58	2,27
	4	-0,81	2,26	2,73
	5	-1,06	0,74	-0,31
	6	-1,80	1,40	-0,88
	7	-1,20	1,13	-2,31
	8	-0,78	0,76	-0,96

Tabell 10: Tallene i tabellen viser endringen mot gjennomsnitt av kontrollene i de ulike fasene etter 72 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
72 timer	1	-5,26	2,62	0,12
	2	-0,21	0,82	-0,84
	3	-2,97	1,53	-0,34
	4	-4,82	2,00	-0,64
	5	-1,58	1,64	0,35
	6	-2,24	1,71	0,86
	7	-2,02	1,43	0,04
	8	-1,04	1,45	0,04

Tabell 11: Tallene i tabellen viser endringen mot gjennomsnitt av kontrollene i de ulike fasene etter 96 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
96 timer	1	1,12	-1,25	0,11
	2	0,09	0,04	1,02
	3	-6,76	2,56	-3,38
	4	-6,12	2,48	-2,98
	5	-2,35	2,02	-0,81
	6	-2,96	1,58	-1,05
	7	-3,73	1,35	-0,76
	8	-3,56	1,23	-1,60

Tabell 12: Tallene i tabellen viser endringen mot gjennomsnitt av kontrollene i de ulike fasene etter 120 timer stress. Stressintervallene representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall	Prøve	G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
120 timer	1	-2,32	-1,60	-2,74
	2	-8,23	0,81	-5,34
	3	-7,85	3,90	-2,08
	4	-9,49	0,77	-6,03

A.2.3 Statistikk

Tabell 13: Tallene i tabellen viser statistiske utregninger; gjennomsnitt, standardavvik, standardfeilen, P-verdi og den sanne middelvei med et 95% konfidensintervall (CI) av resultatene etter 24 timer stress. Statistikken representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall		G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
24 timer	Gjennomsnitt	-0,59	-0,22	-1,89
	Standardavvik	1,46	0,30	0,93
	Standardfeilen	0,516	0,106	0,329
	P-verdi	0,203	0,525	0,005
	Middelvei med 95%CI	(-1,81) - 0,63	(-0,47) - 0,03	(-2,67) - (-1,11)

Tabell 14: Tallene i tabellen viser statistiske utregninger; gjennomsnitt, standardavvik, standardfeilen, P-verdi og den sanne middelvei med et 95% konfidensintervall (CI) av resultatene etter 48 timer stress. Statistikken representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall		G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
48 timer	Gjennomsnitt	-1,38	1,54	0,39
	Standardavvik	0,88	0,69	1,79
	Standardfeilen	0,311	0,244	0,633
	P-verdi	0,001	0,007	0,616
	Middelvei med 95%CI	(-2,11) - (-0,65)	0,96 - 2,11	(-1,10) - 1,88

Tabell 15: Tallene i tabellen viser statistiske utregninger; gjennomsnitt, standardavvik, standardfeilen, P-verdi og den sanne middelvei med et 95% konfidensintervall (CI) av resultatene etter 72 timer stress. Statistikken representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

Stressintervall		G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
72 timer	Gjennomsnitt	-2,52	1,65	0,40
	Standardavvik	1,76	0,52	0,34
	Standardfeilen	0,622	0,184	0,12
	P-verdi	0,001	0,003	0,922
	Middelvei med 95% CI	(-3,99) - (-1,04)	1,22 - 2,08	0,12 - 0,69

Tabell 16: Tallene i tabellen viser statistiske utregninger; gjennomsnitt, standardavvik, standardfeilen, P-verdi og den sanne middelvei med et 95% konfidensintervall (CI) av resultatene etter 96 timer stress. Statistikken representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

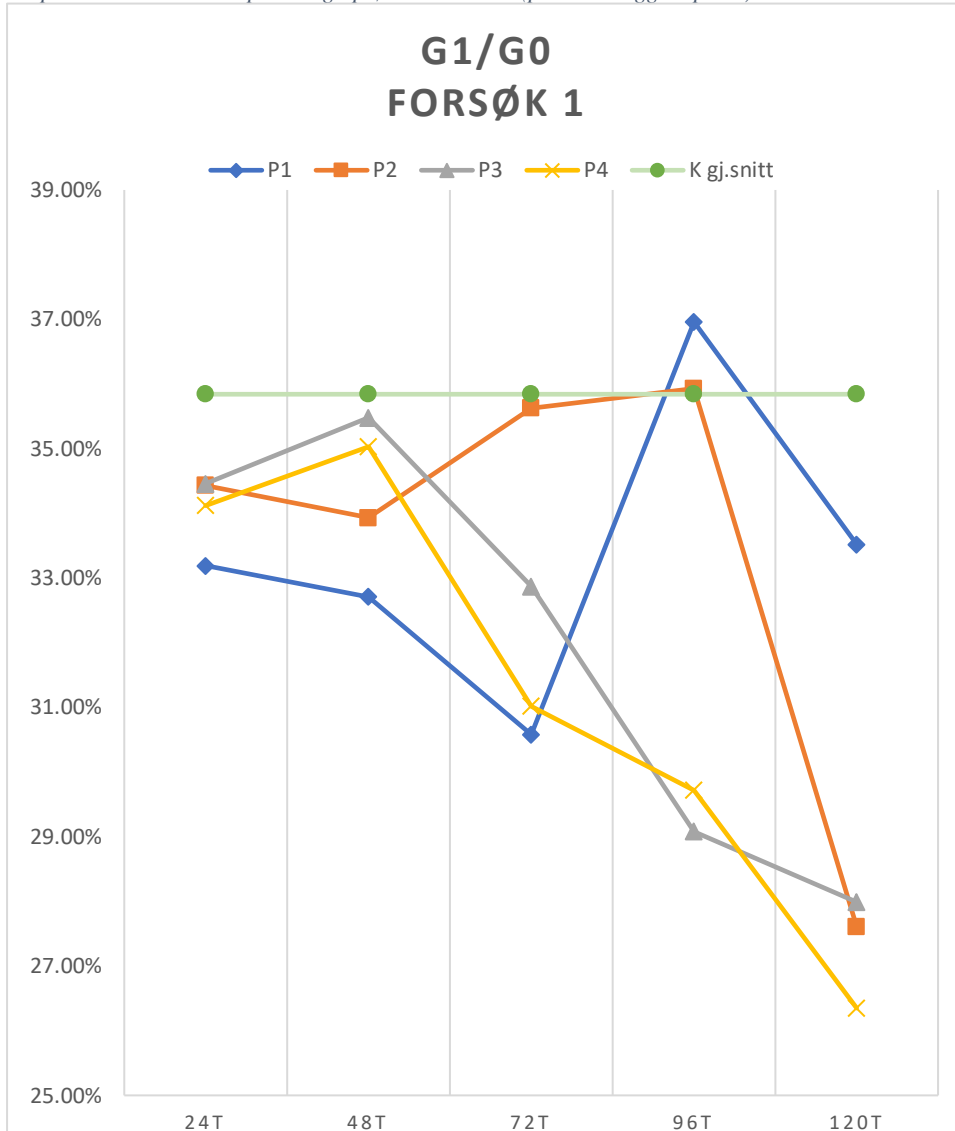
Stressintervall		G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
96 timer	Gjennomsnitt	-3,03	1,25	-1,18
	Standardavvik	2,72	1,29	1,47
	Standardfeilen	0,962	0,456	0,52
	P-verdi	0,004	0,062	0,105
	Middelvei med 95% CI	(-5,30) - (-0,76)	0,17 - 2,33	(-2,41) - 0,05

Tabell 17: Tallene i tabellen viser statistiske utregninger; gjennomsnitt, standardavvik, standardfeilen, P-verdi og den sanne middelerdi med et 95% konfidensintervall (CI) av resultatene etter 120 timer stress. Statistikken representeres langs vertikal akse og cellesyklusfasene representeres langs horisontal akse.

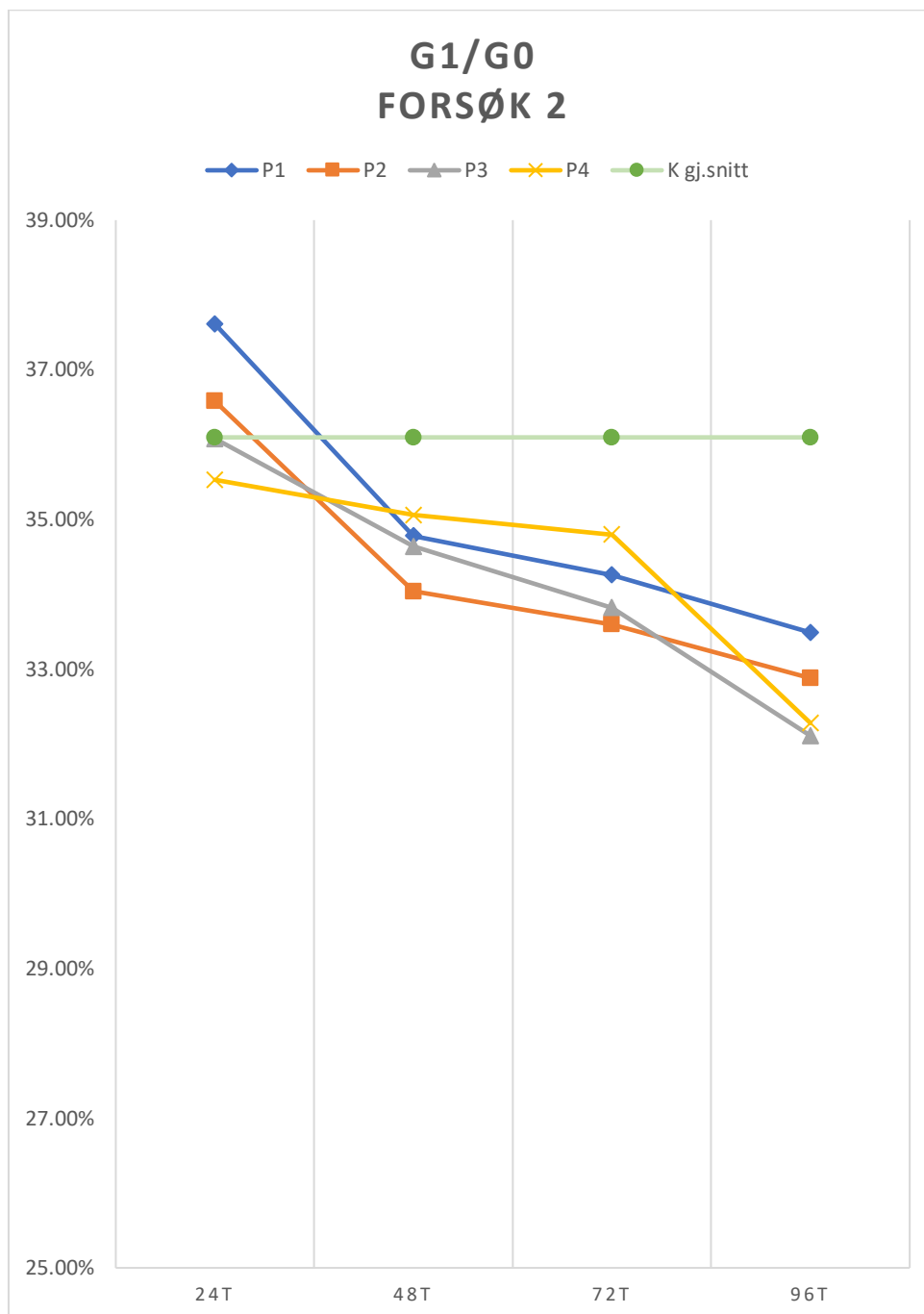
Stressintervall		G ₀ /G ₁ -fase (%)	S-fase (%)	G ₂ /M-fase (%)
120 timer	Gjennomsnitt	-6,97	0,97	-4,05
	Standardavvik	3,18	2,26	1,93
	Standardfeilen	1,59	1,13	0,965
	P-verdi	0,00003	0,343	0,001
	Middelerdi med 95% CI	(-12,03) - (-1,91)	(-2,62) - 4,56	(-7,12) - (-0,98)

A.2.4 Grafer

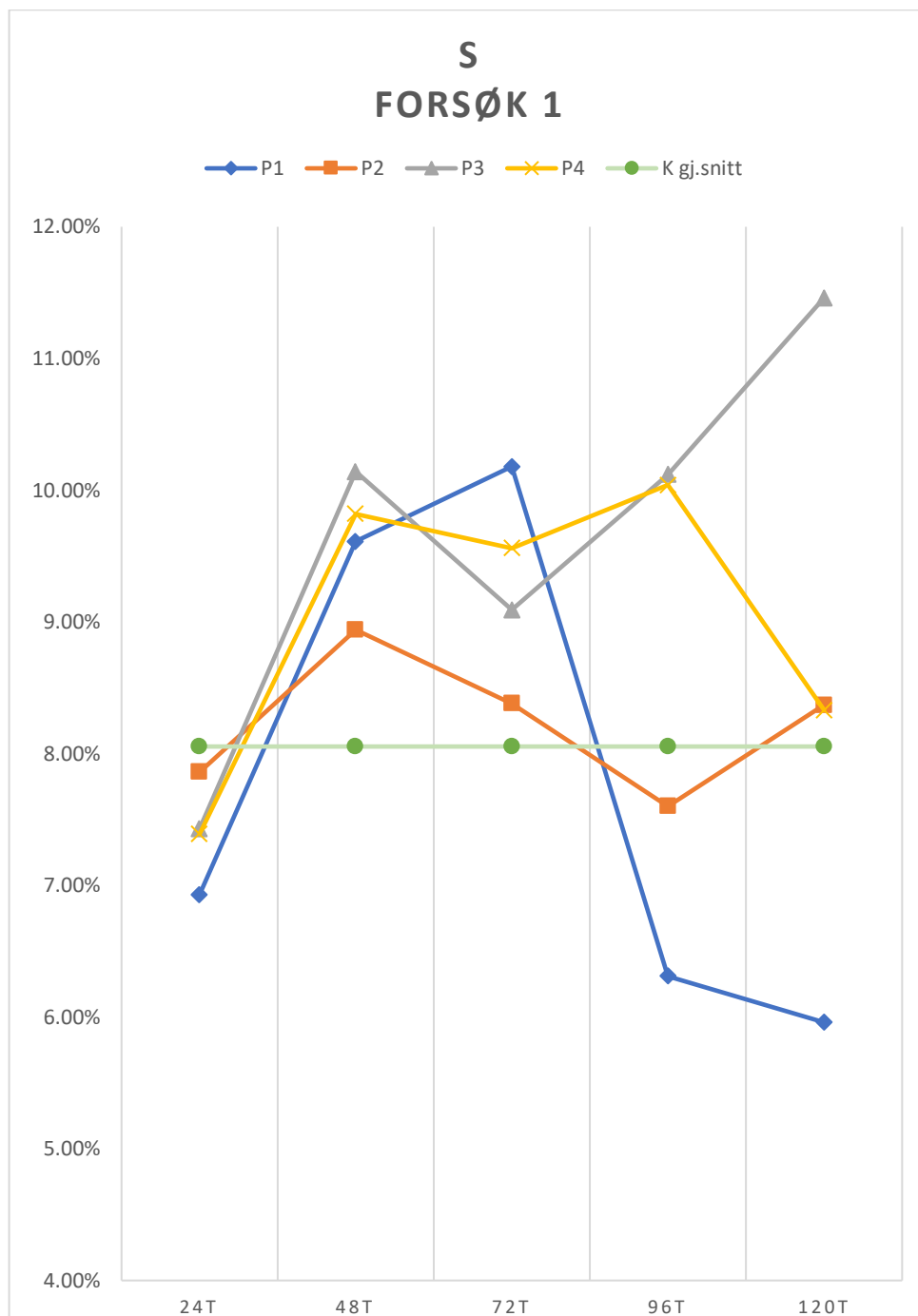
Figur 13: Figuren viser prøveresultatene fra forsøk 1 fra flowcytometeret i cellesyklusfase G1/G0 grafisk. Den grønne grafen viser gjennomsnittet av kontrollene i forsøk 1. Stressintervallene er plassert langs X-aksen og de prosentvise verdiene langs Y-aksen. De resterende fire grafene; p1-p4 representerer de ulike parallellene i hvert av stressintervallene. I alle tidspunktene er det stor spredning i prøveresultatene (punktene ligger spredt).



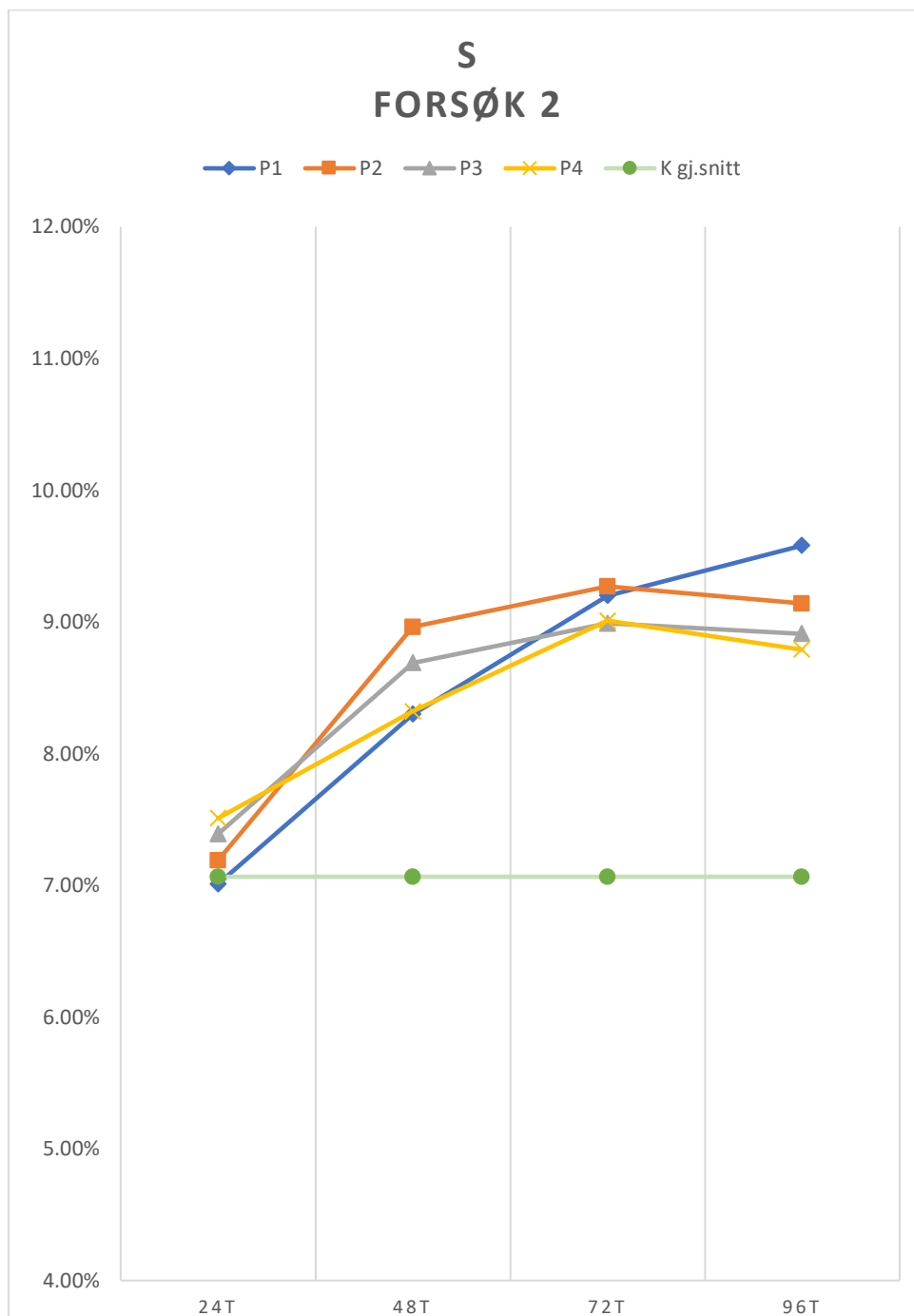
Figur 14: Figuren viser prøveresultatene fra forsøk 2 fra flowcytometeret i cellesyklusfase G1/G0 grafisk. Den grønne grafen viser gjennomsnittet av kontrollene i forsøk 2. Stressintervallene er plassert langs X-aksen og de prosentvise verdiene langs Y-aksen. De resterende fire grafene; p1-p4 representerer de ulike parallellene i hvert av stressintervallene. I alle tidspunktene er det liten spredning i prøveresultatene (punktene ligger tettere).



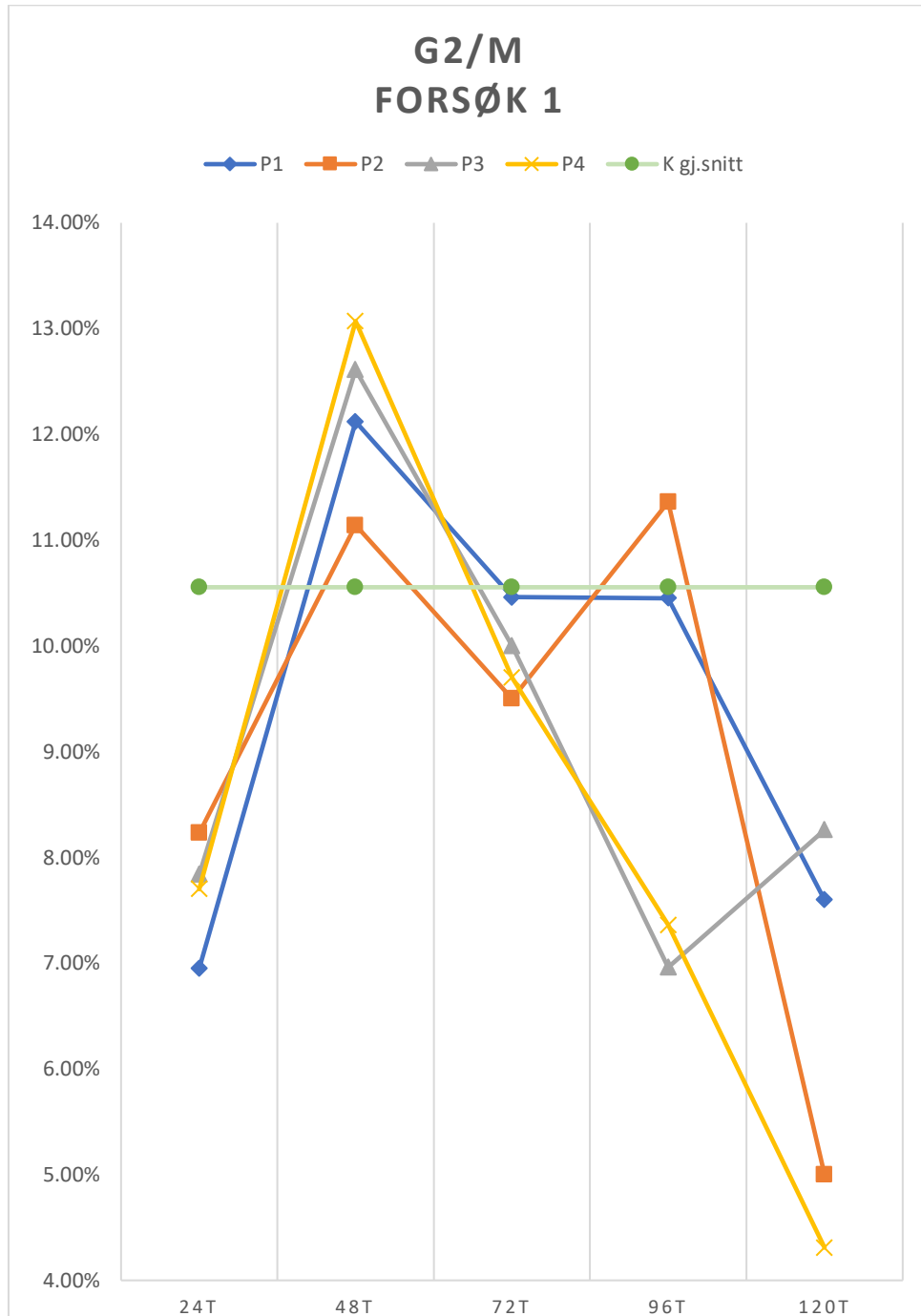
Figur 15: Figuren viser prøveresultatene fra forsøk 1 fra flowcytometeret i cellesyklusfase S grafisk. Den grønne grafen viser gjennomsnittet av kontrollene i forsøk 1. Stressintervallene er plassert langs X-aksen og de prosentvise verdiene langs Y-aksen. De resterende fire grafene; p1-p4 representerer de ulike parallellene i hvert av stressintervallene. I alle tidspunktene er det stor spredning i prøveresultatene (punktene ligger spredt).



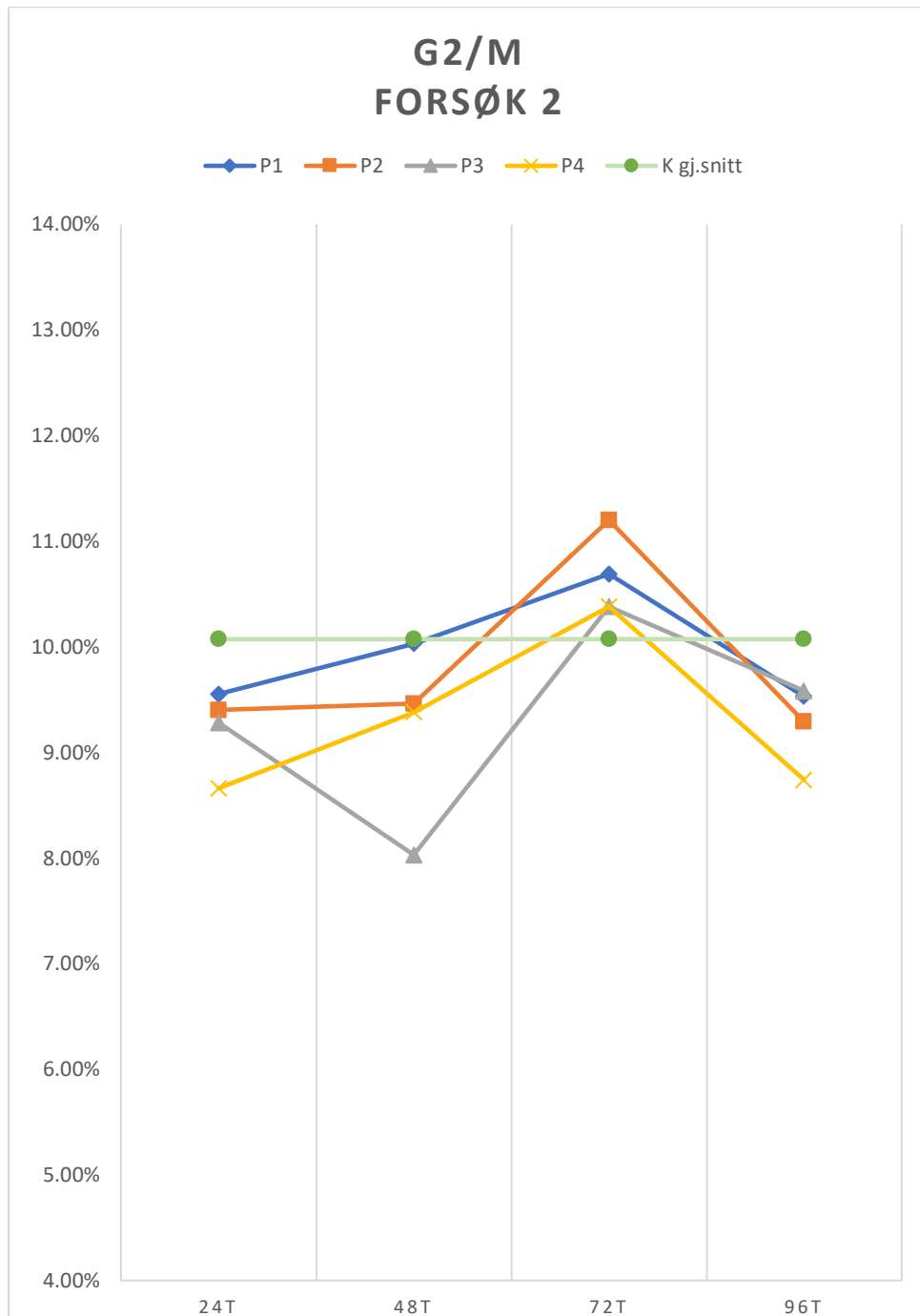
Figur 16: Figuren viser prøveresultatene fra forsøk 2 fra flowcytometeret i cellesyklusfase S grafisk. Den grønne grafen viser gjennomsnittet av kontrollene i forsøk 2. Stressintervallene er plassert langs X-aksen og de prosentvise verdiene langs Y-aksen. De resterende fire grafene; p1-p4 representerer de ulike parallellene i hvert av stressintervallene. I alle tidspunktene er det liten spredning i prøveresultatene (punktene ligger tettere).



Figur 17: Figuren viser prøveresultatene fra forsøk 1 fra flowcytometeret i cellesyklusfase G2/M grafisk. Den grønne grafen viser gjennomsnittet av kontrollene i forsøk 1. Stressintervallene er plassert langs X-aksen og de prosentvise verdiene langs Y-aksen. De resterende fire grafene; p1-p4 representerer de ulike parallellene i hvert av stressintervallene. I alle tidspunktene er det stor spredning i prøveresultatene (punktene ligger spredt).



Figur 18: Figuren viser prøveresultatene fra forsøk 2 fra flowcytometeret i cellyklusfase G₂/M grafisk. Den grønne grafen viser gjennomsnittet av kontrollene i forsøk 2. Stressintervallene er plassert langs X-aksen og de prosentvise verdiene langs Y-aksen. De resterende fire grafene; p1-p4 representerer de ulike parallellene i hvert av stressintervallene. I alle tidspunktene er det liten spredning i prøveresultatene (punktene ligger tettere).



7 Litteraturliste

1. Optimisation and validation of RT-qPCR assay for relative quantitation of reference genes and stress related regulatory genes in CHSE-214 cells [Bachelor]. Ålesund: NTNU; 2019.
2. Holck P, Hauge A. homeostase Oslo: Store norske leksikon; 2020 [oppdatert 18.03.20; sitert 10.03.20]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/homeostase>.
3. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Essential cell biology. 4 utg. USA: Taylor & Francis Inc; 2014.
4. Fisher T. Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture [sitert 10.05.20]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>.
5. Microfluidic Methods for Molecular Biology. Switzerland: Springer Nature; 2016.
6. Fossum S. Fluorescens Oslo: Store norske leksikon; 2009 [oppdatert 8.07.19; sitert 10.05.20]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/fluorescens>.
7. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. ENDOCRINOLOGY OF THE STRESS RESPONSE. Annual Review of Physiology. 2005;67(1):259-84.
8. Hannibal KE, Bishop MD. Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, and Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation. Physical Therapy. 2014;94(12):1816-25.
9. Stroth N, Holighaus Y, Ait-Ali D, Eiden LE. PACAP: A master regulator of neuroendocrine stress circuits and the cellular stress response. Ann N Y Acad Sci. 2011;1220(1):49-59.
10. Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. Dialogues Clin Neurosci. 2006;8(4):383-95.
11. Iwama GK, Vijayan MM, Forsyth RB, Ackerman PA. Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. American Zoologist. 1999;39(6):901-9.
12. Kültz D. Evolution of cellular stress response mechanisms. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology.
13. Barton BA. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids I. Integrative and Comparative Biology. 2002;42(3):517-25.
14. Jacob P, Hirt H, Bendahmane A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. Plant Biotechnology Journal. 2017;15(4):405-14.
15. Gu X, Hao Y, Wang X. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Poult Sci. 2012;91(4):790-9.
16. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2019;20(11):665-80.
17. Archana PR, Aleena J, Pragna P, Vidya MK, Niyas PAA, Bagath M, et al. Role of Heat Shock Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. J Dairy Vet Anim Res. 2017;5(1):13-9.
18. Yang VW. The Cell Cycle. In: Johnson LR, Kaunitz JD, Said HM, Ghishan FK, Merchant JL, Wood JD, editors. Physiology of the Gastrointestinal Tract. 5 utg: Academic Press; 2012. s. 451-71.
19. The Cell Cycle, Mitosis and Meiosis: University of Leicester; [sitert 19.04.20]. Tilgjengelig fra: <https://www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics/cellcycle-mitosis-meiosis>.
20. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. Toxicology. 2002;181:475-81.

21. Lannan CN, Winton JR, Fryer JL. Fish cell lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*. 1984;20(9):671-6.
22. Nikolic M, Sustersic T, Filipovic N. In vitro Models and On-Chip Systems: Biomaterial Interaction Studies With Tissues Generated Using Lung Epithelial and Liver Metabolic Cell Lines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2018;6(120).
23. Carter M, Shieh J. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. 2 utg: Academic Press; 2015.
24. Olsvik PA, Lie KK, Jordal A-EO, Nilsen TO, Hordvik I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*. 2005;6(1):21.
25. Bols NC, Ganassin RC, Tom DJ, Lee LEJ. Growth of fish cell lines in glutamine-free media. *Cytotechnology*. 1994;16(3):159-66.
26. Ryan LA, Seymour CB, O'Niell-Mehlenbacher A, Mothersill CE. Radiation-induced adaptive response in fish cell lines. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2008;99(4):739-47.
27. Common Cell Culture Problems: Poor Cell Growth: Sigma Aldrich; [siteret 20.04.20]. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-culture/poor-cell-growth.html>.
28. Livik M. Et eksperimentelt studium av kreftceller fra livmorhals - Strålesensitivitet, effektutvikling og cGMP nivåer [Master]. Tromsø: Universitetet i Tromsø; 2008.
29. Cell Dissociation with Trypsin: Sigma Aldrich; [siteret 28.03.20]. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-dissociation-with-trypsin.html>.
30. Citalan-Madrid AF, Cabral-Pacheco GA, Martinez-de-Villarreal LE, Villarreal-Martinez L, Ibarra-Ramirez M, Garza-Veloz I, et al. Proteomic tools and new insights for the study of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2019;24(1):637-50.
31. Nunez R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Curr Issues Mol Biol*. 2001;3(3):67-70.
32. Sreetharan S, Thome C, Tsang KK, Somers CM, Manzon RG, Boreham DR, et al. Micronuclei formation in rainbow trout cells exposed to multiple stressors: Morpholine, heat shock, and ionizing radiation. *Toxicology in Vitro*. 2018;47:38-47.
33. Cell cycle analysis using multiparameter flow cytometry: Miltenyi Biotec; [siteret 20.04.20]. Tilgjengelig fra: <https://www.miltenyibiotec.com/NO-en/applications/flow-cytometry-applications/cell-cycle-analysis.html>.
34. Covarrubias R, Ismahil MA, Rokosh G, Hamid T, Accornero F, Singh H, et al. Optimized protocols for isolation, fixation, and flow cytometric characterization of leukocytes in ischemic hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;317(3):H658-H66.
35. Alles J, Karaiskos N, Praktijnjo SD, Grosswendt S, Wahle P, Ruffault P-L, et al. Cell fixation and preservation for droplet-based single-cell transcriptomics. *BMC Biology*. 2017;15(1):44.
36. Cell Cycle Analysis in Fixed Cells: Thermo Fisher Scientific; [siteret 09.04.20]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-assays-reagents/cell-cycle-assays-flow-cytometry/cell-cycle-analysis-fixed-cells.html>.
37. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*. 2006;1(3):1458-61.
38. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016;2016(7).

39. Goftar MK, Kor NM, Kor ZM. DNA intercalators and using them as anticancer drugs. *IJABBR*. 2014;2(3):811-22.
40. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines *Methods*. 2010;50(4):1-5.
41. Basic Principles of RT-qPCR: Thermo Fisher Scientific; [sitert 13.04.20].
Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>.
42. Fossum S. polymerasekjedereaksjon: Store Norske Leksikon; 2020 [oppdatert 17.03.20; sitert 13.04.20]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/polymerasekjedereaksjon>.
43. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(108).
44. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013;3(3):71-85.
45. Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, B.Decallonne, Bouillon R, C.Mathieu. The use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression. *J biomol Tech*. 2003;14(1):33-43.
46. Yu-Bao L, En-dong B, Zhi-liang W, Ru-qian Z. Detection of HSP mRNA Transcription in Transport Stressed Pigs by fluorescence Quantitative RT-PCR. *Agricultural Sciences in China*. 2007;6(3):361-7.
47. Weng Z, Fluckiger A-C, Nisitani S, Wahl MI, Le LQ, Hunter CA, et al. A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(21):12334-9.
48. Li J, Li T-x, Ma Y, Zhang Y, Li D-y, Xu H-r. Bursopentin (BP5) induces G1 phase cell cycle arrest and endoplasmic reticulum stress/mitochondria-mediated caspase-dependent apoptosis in human colon cancer HCT116 cells. *Cancer Cell International*. 2019;2019(19):130.
49. Zhang M, Wang A, Xia T, He P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF- κ B in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicology Letters*. 2008;179(1):1-5.

