

10008, 10027 og 10028

Indusering av HaCaT-cellelinje med TNF- α for å studere oppregulering av IL-23 og mulig antiinflammatorisk effekt av dokosaheksaensyre

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy

Mai 2021

10008, 10027 og 10028

Indusering av HaCaT-cellelinje med TNF- α for å studere oppregulering av IL-23 og mulig antiinflammatorisk effekt av dokosaheksaensyre

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy
Mai 2021

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



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Vi har hørt mye om omega-3 sine positive helseeffekter, deriblant på psoriasis, og dette virket spennende å se nærmere på. Det var også stor interesse for genregulering og qPCR i gruppa, noe som var med på å utforme bacheloroppgaven. Det vil komme fram av denne oppgaven at arbeidet som er utført og beskrevet i gjennomføringsfasen har vært krevende. Dette har sammenheng med de strenge smitteverntiltakene under den pågående pandemien, noe som førte til at det var krevende både å planlegge og gjennomføre laboratoriearbeidet. Vi har i denne tiden lært mye om selvstendig arbeid, problemløsning og samarbeid på laboratoriet.

Vi vil gjerne rette en stor takk til vår veileder Gro Audveig Hagen Bjørnøy som har stått ved vår side gjennom tykt og tynt. Hun har gitt oss uvurderlig støtte underveis, og har alltid vært tilgjengelig for spørsmål. Vi vil også takke Jennifer Mildenberger fra Møreforskning for at hun bidro med en batch HaCaT-celler og hjelpsomme faglige råd. Til slutt vil vi takke Heidi Krantz Hanssen og Elias Vevang Fættén for god hjelp til korrekturlesing av oppgaven.

Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å undersøke om TNF- α kunne oppregulere ekspresjonen av IL-23 i HaCaT-celler. I tillegg ble forsøket gjentatt, men denne gangen parallelt med DHA-behandling av cellene. Dette for å studere om fettsyren kunne motvirke en eventuell oppregulering av IL-23. Induseringen varte i inntil tre timer, og for hver time ble cellene høstet og RNAet isolert. For å studere genekspresjonen ble RT-qPCR benyttet. Oppreguleringen av IL-23-ekspresjonen ble beregnet ved å bruke $\Delta\Delta C_t$ -metoden, med både referansegener og kontroller, og resultatene ble statistisk analysert. For å se om DHA hadde hatt en effekt, ble ekspresjonen av IL-23 også sammenlignet mellom prøvene med og uten DHA-behandling. Resultatene fra den statistiske analysen viste en signifikant oppregulering av IL-23 etter én times indusering av TNF- α . Denne oppreguleringen kunne ikke påvises hos cellene med DHA-behandling, men det var ikke en signifikant forskjell mellom oppreguleringen i prøvene med og uten DHA-behandling. En svakhet ved denne oppgaven var imidlertid at det lå for få paralleller av de ulike prøvene til grunn for å kunne si noe om repeterbarheten av forsøket.

Abstract

The aim of this study was to investigate if TNF- α could upregulate the expression of IL-23 in HaCaT cells. Additionally, the experiment was repeated, only this time the cells were treated with DHA in parallel to study if the fatty acid could prevent a potential upregulation of IL-23. The induction lasted up to three hours, where the cells were harvested once every hour followed by isolation of RNA. To study the gene expression, RT-qPCR was utilized. The upregulation of the IL-23 expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method, with both reference genes and controls, and the results were statistically analysed. Additionally, to see if DHA had an effect, the expression of IL-23 was compared between the samples with and without DHA treatment. The results from the statistical analysis showed a significant upregulation of IL-23 after one hour of induction with TNF- α . This upregulation could not be proven in the DHA treated cells, but there was no significant difference in the upregulation between the samples with and without DHA treatment. A weakness of this study was the few parallels of the different samples, it was therefore not possible to comment on the repeatability of the experiment.

Innholdsfortegnelse

Terminologi.....	1
Begrensninger	3
1 Innledning	4
2 Teori.....	6
2.1 Autoimmune sykdommer.....	6
2.1.1 <i>Psoriasis og dyrking av HaCaT-celler</i>	7
2.2 Genregulering	8
2.3 IL-23.....	10
2.4 Indusering med TNF-α.....	11
2.5 DHA	13
2.6 RT-qPCR.....	14
2.6.1 <i>Relativ genekspressjon og intern kontroll</i>	16
2.6.2 <i>Smeltepunktsanalyse</i>	18
2.6.3 <i>Primeroptimalisering</i>	19
2.7 Analysemetoder	20
3 Materialer og metoder.....	21
3.1 Cellekultivering.....	21
3.2 Indusering med TNF-α og behandling med DHA	22
3.2.1 <i>Indusering med TNF-α – optimaliseringsforsøk</i>	22
3.2.2 <i>Indusering med TNF-α og behandling med DHA – hovedeksperiment</i>	22
3.3 RNA-isolering.....	23
3.4 cDNA-syntese	23
3.5 RT-qPCR primere	24
3.6 RT-qPCR.....	24
3.7 Primeroptimalisering	25

3.7.1	<i>Hybridiseringstemperatur</i>	25
3.7.2	<i>Primerkonsentrasjon</i>	25
3.8	Framstilling av data	26
3.8.1	<i>Applied biosystemsTM 7500</i>	26
3.8.2	<i>Statistiske analyser</i>	26
3.8.3	<i>Genekspresjon</i>	27
4	Resultater	28
4.1	Optimalisering	28
4.1.1	<i>Hybridiseringstemperatur</i>	28
4.1.2	<i>Primerkonsentrasjon</i>	28
4.1.3	<i>Optimaliseringsforsøk</i>	29
4.2	Hovedeksperiment	30
4.2.1	<i>TNF-α industert HaCaT-celler uten DHA-behandling – framstilling av genekspresjon og statistisk analyse</i>	30
4.2.2	<i>TNF-α industerte HaCat-celler behandlet med DHA – framstilling av genekspresjon og statistisk analyse</i>	33
4.2.3	<i>Sammenligning av TNF-α industerte HaCaT-celler med og uten DHA-behandling</i>	35
5	Diskusjon	37
5.1	Cellekultivering	37
5.2	Optimalisering	38
5.2.1	<i>RT-qPCR</i>	38
5.2.2	<i>Hybridiseringstemperatur</i>	38
5.2.3	<i>Primerkonsentrasjon</i>	39
5.2.4	<i>Konsentrasjon av TNF-α og DHA, samt tidsintervaller for indusering</i>	40
5.2.5	<i>Optimaliseringsforsøk</i>	41
5.3	Hovedeksperiment	42
5.4	Videre forskning	47

6	Konklusjon.....	49
7	Litteraturliste.....	50
A.0	Vedlegg.....	57
A.1	Produkter.....	57
A.2	Prosedyrene.....	59
	A.2.1 Cellekultivering.....	59
	A.2.2 Indusering med TNF-α, optimaliseringsforsøk.....	61
	A.2.3 Indusering med TNF-α, hovedeksperiment	62
	A.2.4 RNA-isolering.....	64
	A.2.5 cDNA-syntese	66
	A.2.6 Optimalisering av temperatur	68
	A.2.7 Optimalisering av primerkonsentrasjon	71
	A.2.8 qPCR.....	75
A.3	Store tabeller og resultater	77
	A.3.1 Qubitanalyse av RNA-konsentrasjoner – optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment	77
	A.3.2 Qubitanalyse av cDNA-konsentrasjoner – optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment	79
	A.3.3 Primeroptimalisering for GAPDH, HPRT og IL-23	81
	<i>A.3.3.1 Optimalisering av hybridiseringstemperatur</i>	<i>81</i>
	<i>A.3.3.2 Optimalisering av primerkonsentrasjon.....</i>	<i>83</i>
	A.3.4 Smeltepunktsanalyser – temperaturoptimalisering, optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment	84
	<i>A.3.4.1 T_m-verdier fra temperaturoptimalisering ved 57°C</i>	<i>84</i>
	<i>A.3.4.2 T_m-verdier fra optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment.....</i>	<i>85</i>
	A.3.5 C_t-verdier – optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment	86
	<i>A.3.5.1 C_t-verdier fra optimaliseringsforsøk</i>	<i>86</i>
	<i>A.3.5.2 C_t-verdier fra hovedeksperiment med og uten DHA-behandling</i>	<i>86</i>

A.3.6 Statistisk analyse av resultater	88
<i>A.3.6.1 T-tester av ekspresjonen av referansegene i DHA-behandlede prøver sammenlignet med prøver uten DHA-behandling.....</i>	<i>88</i>
<i>A.3.6.2 T-tester av prøvene uten DHA-behandling med GAPDH og HPRT som referansegene.....</i>	<i>89</i>
<i>A.3.6.3 T-tester av prøvene med DHA-behandling med GAPDH og HPRT som referansegene.....</i>	<i>90</i>
<i>A.3.6.4 T-tester av DHA-behandlede prøver sammenlignet med prøver uten DHA-behandling.....</i>	<i>91</i>
A.3.7 Diagrammer for framstilling av genekspresjon – optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment	92
<i>A.3.7.1 Histogrammer og linjediagram for optimaliseringsforsøket.....</i>	<i>92</i>
<i>A.3.7.2 Linjediagram for prøvene uten DHA-behandling i hovedeksperiment</i>	<i>93</i>
<i>A.3.7.3 Linjediagram for prøvene med DHA-behandling i hovedeksperimentet.....</i>	<i>94</i>

Terminologi

ANA	Antinukleære antistoffer
AP	Aktivatorprotein
cDNA	Komplementær-DNA
C_t	Terskelsyklus
Cytokin	Signalmolekyler som produseres av immunceller for å starte en immunrespons.
DHA	Dokosaheksaensyre
EPA	Eikosapentaensyre
FBS	Fetal Bovine Serum
G9a	Eukromatin histonlysin N-metyltransferase 2
GAPDH	Gen for glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (G-3-PDH)
GLP	Glukagon-lignende-peptid
H3K9	Histon 3 lysine 9
HaCaT	Humane keratinocytter
HPRT	Gen for hypoksantinfosforibosyltransferase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor kappa b
LPS	Lipopolysakkarid
mRNA	budbringer-RNA
NF-κb	Nukleærfaktor kappa b
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PPARγ	Peroksisom proliferatoraktivert reseptor γ
RPMI-medium	Roswell Park Memorial Institute medium
RORγt	Retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t
ROX	6-karboksy-X-rhodamin
T_H	T-hjelpercelle
TNFR	Tumornekrosefaktor reseptor

TNF- α

Tumornekrosefaktor alfa

T_m

Smeltepunktstemperatur

Begrensninger

På grunn av koronasituasjonen ble det innført strenge kriterier for opphold på universitetet under laboratoriearbeidet. Dette innebar blant annet at laboratoriet bare var tilgjengelig på hverdager mellom klokken 08 og 16, og det var derfor vanskelig å planlegge arbeidet. Under dyrking og indusering av celler var det en utfordring å fordele tid på cellelaben mellom alle gruppene innenfor dette tidsrommet, og det var heller ikke mulig å være flere grupper på cellelaben samtidig. Like før påske ble reglene strammet ytterligere inn, noe som førte til at det ikke ble nok tid til å utføre flere analyser på DHA-behandlede celler.

Det ble utdelt et påbegynt RNeasy-kit som begrenset antall prøver som kunne RNA-isoleres. Antall paralleller per tidsintervall ble derfor bestemt ut ifra denne begrensningen. Under optimaliseringen av primere, metoder og tidsintervall, ble det benyttet en SYBR Green reaksjonsmiks med ROX. Det gikk imidlertid tomt for denne reaksjonsmiksen under det siste optimaliseringsforsøket, noe som førte til at det i dette forsøket måtte avgjøres hvilke tidsintervall som skulle analyseres. Leveringstiden på ny reaksjonsmiks med ROX var veldig lang, da leverandørene ikke hadde dette på lager. Det ble derfor, i samråd med veileder, avgjort å bestille SYBR Green uten ROX for å kunne fullføre forsøket før påske, selv om dette ville gå ut over resultatene.

1 Innledning

Autoimmune sykdommer er, på grunn av immunsystemets nøyaktighet, svært usannsynlige, men rammer likevel 5-7% av verdens befolkning (1, s. 229-234). Disse sykdommene har de siste årene hatt økt forekomst og fått mer fokus, men grunnen til den økende trenden er ikke helt kjent (2). En av de kroniske autoimmune sykdommene, som rammer omtrent 2% av Norges befolkning, er psoriasis. Dette er en tilstand der keratinocytene i overhuden deler seg unormalt raskt, noe som gjør huden tykk og plakkete. Utviklingen av psoriasis skjer hos mennesker som har arvelig anlegg for sykdommen, i kombinasjon med miljøfaktorer som stress, direkte skade på huden og noen medikamenter (3).

Det har i senere tid foregått mye forskning for å forstå reaksjonsveiene i cellene ved psoriasis, og et av cytokinene som har vist seg å framprovosere den autoimmune inflammasjonen som fører til økt celledeling, er interleukin-23 (IL-23). Cytokinet virker ikke direkte på keratinocytene, men stimulerer til produksjon av en del andre cytokiner som øker celleproliferasjonen, IL-23 har på grunn av sin avgjørende rolle i utviklingen av psoriasis, vist seg å være et mål for behandlingen av sykdommen (4, 5). Mange studier hevder at omega-3-fettsyrer, spesielt dokosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3), har antiinflammatorisk effekt, og kan potensielt benyttes i behandlingen av en rekke autoimmune sykdommer. Her kommer det blant annet fram at DHA kan inhibere ekspresjonen, og derfor produksjonen av IL-23 i inflammatoriske celler (6, 7).

Møre og Romsdal blir regnet som et av verdens fremste områder for produksjon av omega-3, og det finnes flere artikler om at fiskeoljer kan brukes for å behandle psoriasis. Det gjenstår fortsatt en del forskning på området for å forstå virkningen fiskeoljen har på psoriasis, men ettersom DHA har vist seg å hindre ekspresjonen av IL-23 ved psoriasis, virket det interessant å studere denne effekten (8, 9, 6). Problemstillingen i denne oppgaven var derfor å inducere en oppregulering av IL-23 i keratinocytter, lik den som skjer ved psoriasis, for så å se om den eventuelle oppreguleringen kunne hindres ved å behandle cellene med DHA. Dette ble løst ved å bruke manipulerede humane keratinocytter (HaCaT), en cellelinje som ofte brukes i *in vitro* studier av psoriasis, ettersom disse uttrykker de samme overflatemarkørene som isolerte keratinocytter og ikke dør etter få celledelinger (10). For å inducere en økt

ekspresjon av IL-23 ble et proinflammatorisk cytokin, kalt tumornekrosefaktor alfa (TNF- α), tilsatt mediet (11). Ekspresjonen av IL-23 ble analysert ved flere tidsintervaller, for å se om genet ble signifikant oppregulert etter induseringen. Deretter ble samme forsøk gjentatt, der cellene fikk vokse med og uten DHA, for å se om det kunne påvises en signifikant forskjell i uttrykket av IL-23 mellom cellene med og uten DHA-behandling. Oppgaven tar for seg relevant teori, etterfulgt av materialer og metoder for det eksperimentelle arbeidet, og resultater fra RT-qPCR-analysen samt statistiske utregninger. I diskusjonen knyttes resultatene opp mot teorien, og oppgaven avsluttes med en konklusjon, etterfulgt av litteraturliste og vedlegg.

2 Teori

2.1 Autoimmune sykdommer

Ved autoimmunitet aktiveres immunsystemet til å reagere mot kroppens egne vev, og har ikke lenger toleranse for kroppsegne antigene strukturer. Immunsystemet har veldig potente effektor-systemer, og hvis disse systemene påfører eget vev så mye skade at det utvikles sykdom, kalles det en autoimmun sykdom. I følge «Immunologi og immunologiske teknikker» er 5-7% av verdensbefolkningen rammet av autoimmune sykdommer (1, s.229-234). En studie fra USA (Dinse et al., 2020) ser en økende trend i antall individer rammet av autoimmune sykdommer på verdensbasis. Studien varte fra 1988 til 2012, med 14 211 deltagere, og tok for seg den vanligste markøren for autoimmunitet, som er antinukleære antistoffer (ANA). Grunnen til den økende trenden er noe ukjent, og en ser at mengde ANA varierer over tid, knyttet til etnisitet, kroppsmasseindeks, røyking og alkoholkonsum (2). Flere nye studier hevder at enkelte sosiale faktorer, miljøfaktorer og livsstilsfaktorer påvirker systemisk kronisk inflammasjon, som kan føre til blant annet autoimmun sykdom. De ulike faktorene kan hindre opphøring av en immunrespons og fremme en ikke-infeksiøs systemisk kronisk inflammasjon (12). Det er behov for mer forskning på området for å finne grunnene til den økende trenden samt en behandling (2).

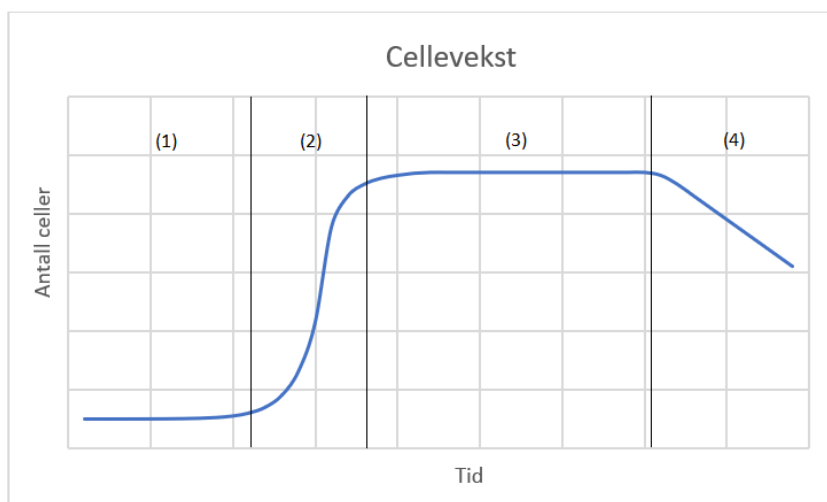
Hana Zelová og Jan Hošek (13) definerer inflammasjon som en organismes respons på infeksjon, kroppsfremmede antigener eller vevsskader. Kronisk inflammasjon beskrives som en tilstand som aktiverer immunkomponenter som er ulike fra en akutt immunrespons (12). Lymfocytter er en av celletypene som er involvert i utviklingen av den kroniske inflammasjonen som er utgangspunkt for mange autoimmune sykdommer (14). Seleksjonen av lymfocytene før de blir effektorceller er svært nøyaktig, og ute i kroppen er det veldig få peptider som presenteres for dem i store nok konsentrasjoner til å aktivere en autoimmun respons. Dette gjør autoimmune sykdommer svært usannsynlige, selv om disse sykdommene rammer relativt mange (1, s. 229-234). Lymfocytter både produserer og påvirkes av signalmolekyler som kalles cytokiner (15). For eksempel vil T-lymfocytter, også kalt T-celler, påvirke overhuden ved å skille ut TNF- α , som videre vil stimulere til produksjon av flere cytokiner, som IL-23 og IL-17 (11). Cytokinene kan virke stimulerende, men også hemmende på betennelsesreaksjoner, og er derfor viktige for å regulere immunresponsen.

Derfor brukes de også som mål for en del medisiner i behandlingen av autoimmune sykdommer (15).

2.1.1 Psoriasis og dyrking av HaCaT-celler

Psoriasis er en kronisk autoimmun sykdom som rammer 2-3% av verdensbefolkningen, og rundt 2% av Norges befolkning (3, 16). Tilstanden kommer av at cellene i overhuden deler seg uvanlig raskt, og den totale keratinproduksjonen blir høyere. Overhuden blir tykk og plakkete, og pasienten får det typiske psoriasisutslettet. Sykdommen kan utløses av stress og noen medikamenter, men utviklingen av sykdommen avhenger av at pasienten har et arvelig anlegg for psoriasis (3).

I *in vitro* studier av immunologisk og inflammatorisk respons ved psoriasis, er det vanlig å bruke HaCaT-celler. Dette er fordi keratinocytter, som utgjør størsteparten av huden, dør etter få celledelinger *in vitro* (10, 16). HaCaT er en cellelinje som uttrykker de samme overflatemarkørene som isolerte keratinocytter gjør, og de er adherente celler som vokser i monolag, som betyr at de foretrekker å feste seg til underlaget og vokse utover flaten (10). Cellene kan dyrkes med Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-medium) ved 37°C i et inkubatorskap med 5% CO₂ (17). For at HaCaT-cellene skal vokse optimalt, må mediet inneholde en rekke viktige komponenter som L-glutamin, HEPES-buffer, mercaptoetanol, fetal bovine serum (FBS), natriumpyruvat og antibiotika. L-glutamin er en essensiell aminosyre som er viktig for celleveksten, HEPES-buffer opprettholder fysiologisk pH, mercaptoetanol reduserer toksiske komponenter, FBS har en rekke nyttige funksjoner, natriumpyruvat er en karbonkilde og Penicillin-Streptomycin hindrer bakteriell kontaminasjon (18, 19, 20, 21, 22, 23). Det anbefales at cellene splittes i eksponentiell vekst, ved konfluens rundt 80 %, hvor de er mest levedyktige og ikke har begynt å gå over i dødsfase (se figur 1) (24, 25). HaCaT-celler har ikke egenskaper for å utvikles til kreftceller, og kan vokse lenge uten tilførsel av vekstfaktorer. Ved stimulering kan de differensiere, og vandre fram og tilbake mellom differensiert tilstand og opprinnelsestilstand (10).



Figur 1. Denne figuren viser en illustrasjon av vekstkurven til celler i en lukket kultur, altså en kultur som ikke kontinuerlig tilføres næring eller renses for avfallsstoffer. Kurven er inndelt i fire faser: lagfase (1), eksponentiell fase (2), stasjonær fase (3) og dødsfase (4). I lagfasen tilpasser cellene seg mediet og temperaturen ved å syntetisere proteiner og en rekke andre komponenter som er nødvendige for at cellene skal proliferere i mediet. Cellene går over i eksponentiell fase når de begynner å dele seg. Dette skjer ved at celledetallet doubles for hver generasjon. Etter hvert som celledettheten øker, blir det mindre tilgang på næringsstoffer og mer avfallsstoffer, noe som hemmer cellulær vekst. Som et resultat av dette, vil veksten gå over i stasjonær fase der det er ingen netto forandring i celledetallet. Celleveksten vil etter hvert avta grunnet opphoping av avfallsstoffer og mangel på næring, og cellene går over i dødsfase (26, s. 38-42).

2.2 Genregulering

Psoriasis og flere andre autoimmune sykdommer vil aktivere immunforsvaret, og føre til produksjon av proinflammatoriske cytokiner (3, 11, 15). Cytokinene er en del av komplekse signalmekanismer som både påvirker og påvirkes av genekspressjonen og genreguleringen i ulike celler (27). Genekspressjon er prosessen der DNAet blir oversatt til et RNA, som videre kan brukes til å produsere et funksjonelt protein med en viktig biologisk funksjon. Ikke alle celler har lik ekspresjon, og disse prosessene reguleres derfor ulikt. Dette gir et grunnlag for celledifferensiering, der celler med ulike funksjoner har ulik genregulering (28, s. 66). Noen gener blir uttrykt kontinuerlig og stabilt, kalt husholdningsgener, mens andre blir uttrykt etter behov (28, s. 66, 29). Ekspresjonen av ulike gener kan forekomme på ulike tidspunkt, men også som et resultat av ytre stimuli som for eksempel temperaturendringer, endring i næringstilgang, hormonell påvirkning og mange andre kjemiske signaler. Denne prosessen

der gener slås av og på som en respons på ulike signaler kalles genregulering og skjer på flere steg fra transkripsjon til RNA-prosessering (28, s. 66-67) (30, s. 271).

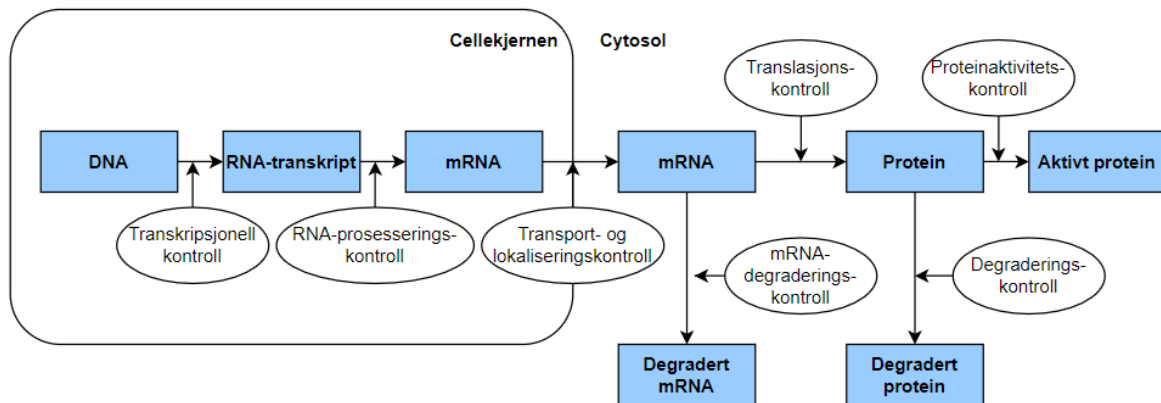
Nesten alle gener inneholder spesifikke sekvenser som regulerer transkripsjonen. 30-80 basepar oppstrøms for genet finnes det to kjente promotorsekvenser kalt TATA- og CAAT-boksen. Sekvensene gjenkjennes av generelle transkripsjonsfaktorer, som er sekvensspesifikke proteiner og en essensiell del av transkripsjonskomplekset.

Transkripsjonsfaktorene er viktige fordi RNA-polymerasen ikke gjenkjenner spesifikke sekvenser på DNAet, men danner interaksjoner med disse. En annen viktig sekvens, som finnes enten oppstrøms eller nedstrøms for mange gener, er enhancere. Aktivatorproteiner er regulatoriske proteiner som kan binde seg til enhancere. Disse proteinene samarbeider med transkripsjonsfaktorene og polymerasen for å initiere transkripsjonen, og er en viktig regulatorisk mekanisme for genreguleringen. For å stabilisere interaksjonen mellom aktivatorproteinet og initieringskomplekset, benyttes adapterproteiner. Eksempel på et aktivatormolekyl kan være et hormon som stimulerer cella til å produsere et spesifikt protein. Like viktig er det at DNAet er utstyrt med mekanismer som reduserer eller slår av ekspresjonen av ulike gener. Mekanismene består av sekvenser kalt repressorsekvenser, som binder såkalte repressorproteiner. Sekvensene blokkerer tilgangen til initieringskomplekset og slår derfor av ekspresjonen (28, s. 66-69) (30, s. 267-291).

En utfordring i genreguleringen er DNAets pakkestruktur. DNAet er tvunnet rundt en gruppe proteiner kalt histoner. Slike strukturer kalles nukleosomer. Histonproteinene kan blokkere promotorsekvensene og dermed hemme initieringen av genekspresjonen. Dette kan være et resultat av en mekanisme utviklet for å hindre unødig uttrykk av gener. Blokkeringen av promotorsekvensene kan utnyttes av aktivatorene og repressorene ved å skru av og på genene. Dette muliggjøres ved å benytte seg av såkalte kromatin remodelleringskomplekser. Kompleksene er enzymer som kan modifisere histonene og derfor gjøre DNAet mer eller mindre tilgjengelig for uttrykk, blant annet ved å kjemisk modifisere histonhalene (30, s. 188-189, 276-277).

Cytokinene, som spiller en viktig rolle i celle-celle signalisering og immunresponser, er høyt regulerte på transkripsjonelt nivå i kombinasjon med transkripsjonsfaktorene (27). Selv om transkripsjonell regulering er et viktig steg i genreguleringen, reguleres uttrykket i alle

stegene fra RNA, via budbringer-RNA (mRNA), til protein. Genreguleringsmekanismene består av mRNA-spleising, mRNA-transport og lokaliseringskontroll, mRNA-degraderingskontroll, translasjonskontroll, proteindegraderingskontroll og proteinaktivitetskontroll (se figur 2) (30, s.267-291). Det er derfor ingen garanti for at det uttrykte genet fører til et protein, og dermed en funksjon. Dette må derfor tas i betraktning ved en ekspresjonsanalyse hvor man kun ser på RNA-uttrykk (31).



Figur 2. Her vises de ulike stegene og mellomproduktene fra DNA i cellekjernen til protein i cytosol, som er med på å regulere genekspressjonen. Figuren viser også reguleringsmekanismene som kontrollerer stegene til ferdig produkt. Før transkripsjonen kan starte, må den transkripsjonelle kontrollen avgjøre om genet skal transkriberes. RNA-transkriptet må så gjennom en RNA-prosesseringskontroll, før det kan bli et ferdig mRNA. Fra mRNA til protein er det fem kontrollpunkt. Det første trinnet avgjør om mRNAet skal transporteres ut i cytoplasma. Her kan enten mRNAet bli degradert av mRNA degraderingskontrollen, eller translert til et protein i translasjonskontrollen. Proteinet kan bli degradert via degraderingskontrollen, eller aktivert til et funksjonelt protein i proteinaktivitetskontrollen (30, s. 271).

2.3 IL-23

Interleukin-23 er et cytokin som i hovedsak produseres av makrofager og dendrittceller i perifert vev, men også av keratinocytter ved den autoimmune tilstanden psoriasis. IL-23 består av to underenheter, p40 og p19. p40 er også en underenhet i IL-12, mens p19 bare finnes i IL-23, og kalles derfor IL-23A. Cytokinet er viktig for immunforsvarets respons på bakterie- og soppinfeksjoner, men kan i tillegg framprovosere autoimmun inflammasjon. Dette gjør at cytokinet kan være et relevant mål for behandlingen av autoimmune sykdommer

(32, 33). IL-23 er med på å øke keratinocyttoproliferasjonen ved psoriasis. Cytokinet virker ikke direkte på keratinocytter, men stimulerer T-celler til å bli patogene og produsere IL-17A og IL-22 (4, 5, 32, 33). IL-17A fører til produksjon av andre cytokiner som vil øke proliferasjonen. IL-22 induserer produksjon av antimikrobielle peptider hos keratinocytterne, og er en potent direkte stimulator av keratinocyttoproliferasjonen. For å sette i gang en respons på IL-23 hos keratinocytterne, er IL-17A og IL-22 avhengig av hverandre (4).

IL-23 styrer T-celleutviklingen bort fra en normal utvikling til T-hjelper 1 (T_H1)- eller T-hjelper 2 (T_H2)-celler, til fordel for en veldig proinflammatorisk undergruppe av T-hjelper 17 (T_H17)-celler (32, 33). I tillegg regulerer cytokinet vedlikeholdet og proliferasjonen av T_H17, og opprettholder fenotypen (5, 33). T_H17-celler ligger i ikke-lymfoid vev, og skal reagere raskt ved vevsskade eller eksponering for patogene inntrengere. Hvis disse cellene stimuleres av IL-23, med et par andre essensielle cytokiner til stede, vil de begynne å produsere blant annet IL-17A og IL-22, som vil føre til en inflammatorisk respons. Det hjelper derimot ikke å bare produsere inflammatoriske cytokiner. For å få en inflammatorisk effekt, må T_H17-cellene overkomme effekten av inhiberende cytokiner, som IL-27 og IL-2 (5).

IL-23 er avgjørende for de inflammatoriske funksjonene hos patogene T_H17-celler ved psoriasis, og fører til stimulering av patogenitet i modne T_H17-celler på flere måter. De viktigste av dem, er å indusere ekspresjon av effektorgener som koder for blant annet IL-22 og interferon gamma (IFN- γ), opprettholde ekspresjonen av genene for ROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t) og IL-17A, nedregulere ekspresjonen av gener for hemmende faktorer som IL-2 og IL-27, og forsterke sin egen funksjon ved å oppregulere ekspresjonen av genet for IL-23-reseptor (IL-23R) hos T-cellene (5).

2.4 Indusering med TNF- α

Tumornekrosefaktor alfa er blant de viktigste cytokinene i en rekke fysiologiske reaksjoner, og har som funksjon å påvirke biologiske prosesser som proliferasjon, differensiering, celledød og inflammasjon. TNF- α er et proinflammatorisk cytokin som kan produseres av mange ulike celler, deriblant keratinocytter, endotelceller og dendritiske celler. Uttrykket av TNF- α kan induseres av blant annet lipopolysakkarid (LPS), antigen, infeksjon, inflammasjon, IFN- γ og TNF- α (13). Hovedoppgaven til TNF- α er å rekruttere

inflammatoriske celler ved å starte produksjon av cytokiner eller kjemokiner, som vil trekke de medfødte immuncellene til infeksjonsstedet (34).

I en studie publisert i *Journal of Cell Science* (Turner et al., 2010), som tar for seg fysiologiske nivåer av TNF- α -stimulering av cellulære inflammasjonsresponser, ble det hevdet at graden av cytokinekspressjonen er avhengig av TNF- α -konsentrasjonen. I et 6-timers tidsintervall ble ulike konsentrasjoner av TNF- α testet, der det viste seg at en konsentrasjon på 10 ng/mL ga høyest ekspressjon (35). I en annen studie (Banno et al., 2004), der keratinocytter ble induisert med TNF- α over flere tidsintervaller, antydte resultatene at cytokinet initierte en rask immunrespons, og påvirket genreguleringen allerede etter 1 time (36).

Det humane genet for TNF- α inneholder komplementære sekvenser for blant annet transkripsjonsfaktorene aktivatorprotein 1 (AP-1), AP-2 og nukleærfaktor kappa b (NF- κ B). AP-1 og NF- κ B er de viktigste transkripsjonsfaktorene for produksjonen av proinflammatoriske cytokiner (13). Transkripsjonsfaktoren NF- κ B kan ved aktiv tilstand fungere som en transkripsjonsaktivator ved å passere kjerneporene i cellekjernen og binde seg til DNAet, som vil føre til transkripsjon av proinflammatoriske cytokiner og kjemokiner (34).

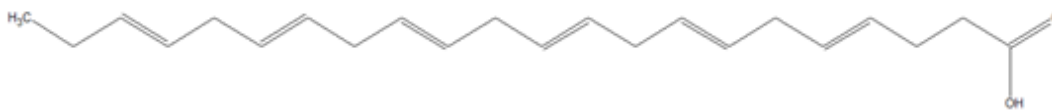
TNF- α kan oppregulere genekspressjonen av IL-23 i HaCaT, ved å aktivere transkripsjonsfaktorene NF- κ B og Histon 3 lysin 9 (H3K9). For å aktivere H3K9 samarbeider TNF- α med N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) om å ikke metylere H3K9, ved å bryte ned eukromatin histon lysin N-metyltransferase 2 (G9a) og glukagon-lignende peptid (GLP) som er H3K9 metyltransferaser. Dette fører til en økt produksjon av IL-23 og videre IL-17, som begge er viktige i autoimmune sykdommer (11).

TNF- α virker ved å binde seg til en av de transmembrane reseptorene tumornekrosefaktor reseptor 1 (TNFR1) eller tumornekrosefaktor reseptor 2 (TNFR2). Uttrykket av reseptorene styres av cytokiner, og reseptorene kan gjennom ulike signalveier føre til inflammasjon eller celledød, men også bevare normal celledødsforhold og produsere reaktanter. TNFR1 virker primært gjennom to ulike signalveier, og hvilken av de som dominerer avhenger av hvilke signalmolekyler og regulatoriske proteiner som er til stede, og styrken på dem. Den ene signalveien vil føre til økt uttrykk av proinflammatoriske gener, og den andre signalveien vil

føre til celledød. Det er ikke forsket like mye på TNFR2 som på TNFR1, og det finnes derfor lite kunnskap om hvilke egenskaper reseptoren har (13).

2.5 DHA

Dokosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3) er nødvendig for utvikling av nervevev, syn og hjernen hos foster (37, s. 26). Flere studier hevder at det er fordeler ved å innta omega-3-fettsyrer knyttet til inflammasjon (6, 7). Tilførsel av fiskeolje kan ha positiv effekt på atopisk eksem og leddgikt, og generelt på immunforsvaret (38, s. 162).



Figur 3. Molekylstrukturen til DHA ($C_{22}H_{32}O_2$) består av 22 karbonatomer, som er vanligst å finne hos marine dyr. Fettsyren er høyt flerumettet med 6 dobbeltbindinger (37, s. 15-17).

Normalkonsentrasjon for DHA i plasma hos friske individer er ifølge en kanadisk studie (Abdelmagid et al., 2015) 7,2-237,5 $\mu\text{mol/L}$ (39). DHA vil sammen med eicosapentaensyre (EPA, 20:5n-3) påvirke flere ledd i inflammasjonsprosessen. De reduserer kjemotakse hos leukocytter, inhiberer uttrykk av adhesjonsmolekyler, reduserer produksjonen av eikosanoider fra omega-6 og reduserer inflammatoriske cytokiner (40). De fleste omega-3-fettsyrene er antiinflammatoriske, i motsetning til omega-6-fettsyrer som oftest er proinflammatoriske (6). Fra DHA produseres det antiinflammatoriske forbindelser, kalt D-serie resolviner, som har i oppgave å nedregulere inflammasjon for å hindre systemisk eller kronisk inflammasjon (7).

I en studie (Kong et al., 2010) kommer det fram at DHA hindrer ekspresjonen av proinflammatoriske cytokiner, som IL-23, hos dendrittske celler ved å aktivere transkripsjonsfaktoren peroksisom proliferatoraktivert reseptor γ (PPAR γ) og inhibere NF- κ B. PPAR γ virker antiinflammatorisk og regulerer immunresponsen når den blir aktivert av umettede fettsyrer, som DHA. Det antas at grunnen til at DHA kan inhibere NF- κ B er ved å hindre nedbrytning av inhibitor kappa b (I κ B) (6). I κ B befinner seg i cytoplasma, men har egenskaper som kan frakte dem gjennom kjerneporene til DNA og blokkere bindingssetet til NF- κ B (13). Et forsøk med LPS-behandlede dendrittske celler, der halvparten var forbehandlet med DHA, ga resultater som viste at I κ B-konsentrasjonen var signifikant lavere

med bare LPS-behandling. LPS-behandling av dendrittiske celler vil stimulere de til å bli modne og skille ut cytokiner som IL-23 og TNF- α . Flere andre studier hevder også at DHA har antiinflammatorisk effekt, ved å inhibere produksjonen av IL-23 (6).

2.6 RT-qPCR

Mengden av ulike mRNA i cellene representerer transkripsjonsnivået av de ulike genene. På bakgrunn av dette kan man analysere genekspresjonen av spesifikke gener ved å se på mengden mRNA som befinner seg i cella. En høy konsentrasjon betyr høy ekspresjon og omvendt. RT-qPCR består av revers transkripsjon (RT) etterfulgt av kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR), også kjent som «real time PCR», og er en kvantitativ metode for å amplifisere og detektere små mengder RNA. Denne metoden har høy sensitivitet, spesifisitet og reproducerbarhet. Fordi qPCR amplifiserer DNA, blir RNAet syntetisert til komplementær-DNA (cDNA) ved hjelp av enzymet revers transkriptase i en prosess kalt cDNA-syntese. cDNAet blir så brukt som et templat for qPCR-reaksjonen (41).

For å amplifisere cDNAet i PCR, må det tilsettes en rekke komponenter som driver reaksjonene. Disse tilsettes i form av en mastermikts som vanligvis inneholder Taq DNA polymerase, nukleotider, spesifikke primere og MgCl₂. PCR er en tretrinnsprosess som gjentas i en syklus hvor temperaturen varierer i de ulike prosessene. I det første trinnet, kalt denaturering, økes temperaturen til varmeblokken opp til 96°C som fører til at DNA-trådene separeres. Trinnet to i syklusen kalles hybridisering hvor temperaturen senkes til 55-65°C. Dette øker affiniteten til primerne, noe som gjør at de kan binde til DNAet. Det benyttes to primere i reaksjonen fordi DNAet er antiparallelt, og sekvensen på begge trådene blir syntetisert motsatt vei i forhold til hverandre. Elongering er det siste trinnet og skjer ved 72°C, som er den optimale temperaturen for Taq-polymerase og fører til syntetisering av ny tråd (42).

qPCR-instrumentet består av en termosyklus med en reaksjonsblokk som kontrollerer temperaturen og derfor reaksjonene i prøvene, og et optisk deteksjonssystem som detekterer fluorescensen (43). Et vanlig fluorescerende molekyl som blir benyttet for å detektere amplifiseringen av PCR-produktene i prøvene er SYBR Green. SYBR Green er et fargestoff som interkaleres uspesifikt til dobbeltrådet DNA, og har et absorpsjonsmaksimum ved 497

nm og emisjonsmaksimum ved 520 nm. Ved interkalering øker fluorescensen 1000 ganger, noe som gjør det enkelt å detektere signalet. Under amplifiseringen økes mengde DNA i prøvene og derfor mengden SYBR Green som interkaleres. Mengden fluorescens målt blir derfor proporsjonal med mengden amplifiserte produkt (44).

6-karboksy-X-rhodamin (ROX) er en flouorfor med absorpsjonsmaksium ved 585 nm og emisjonsmaksimum ved 610 nm, og brukes som en passiv referansefarge i qPCR, altså et inert fargestoff som gir en intern referanse i hver brønn på PCR-brettet (45, 46). ROX inkluderes ofte i mastermiksen, og tilsettes derfor i samme konsentrasjon i alle brønner. Denne referansen påvirkes ikke av amplifikasjonen og fluorescenssignalet fra ROX vil derfor i teorien være konstant i hver brønn. Den interne referansen gir fluorescenssignalet fra SYBR Green noe å normaliseres opp imot, og gjør det dermed mulig å korrigere for forskjeller i konsentrasjon eller volum mellom brønnene. ROX gjør det også mulig å bruke de ytterste brønnene på et PCR-brett, noe som normalt ikke er anbefalt på grunn av mulige kanteffekter (45). Med kanteffekter menes det at prøvene applisert i brønnene på ytterkantene av PCR-brettet kan føre til mindre like resultater sammenlignet med resten. Dette kan skyldes flere faktorer, blant annet termisk gradient og fordampingsgrad, noe som er mer vanlig i eldre instrumenter (47).

Rapporteringsignalet i analysen blir normalisert med den passive referansen ved å dividere fluorescensen fra rapporteringssignalet med fluorescensen fra den passive referansen (se formel 1). Denne verdien kalles normalisert rapporteringsverdi, eller R_n .

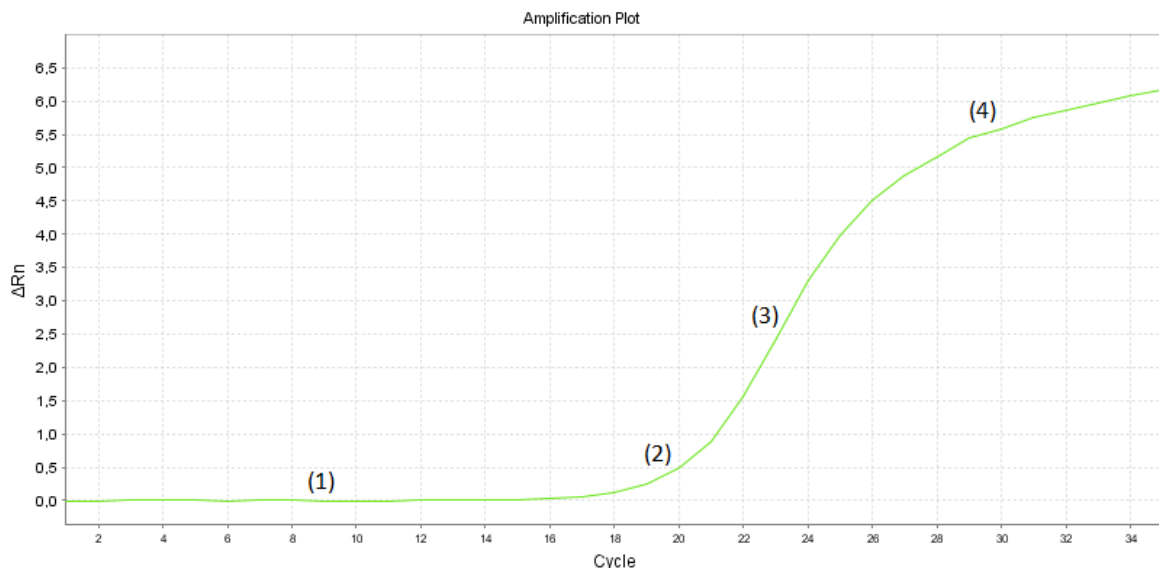
Rapporteringsignalet vil være fluorescenssignalet fra SYBR Green, mens det passive referansesignalet kommer fra ROX.

$$\text{Normalisert rapporteringsverdi } (R_n) = \frac{\text{rapportertingssignal}}{\text{passiv referansesignal}} \quad [\text{Formel 1}]$$

Videre blir den normaliserte rapporteringsverdien korrigert med bakgrunnsstøyen. Dette kalkuleres med å subtrahere bakgrunnsstøyen målt med den normaliserte rapporteringsverdien. Denne verdien kalles ΔR_n (se formel 2) (31).

$$\Delta R_n = R_n - \text{bakgrunnsstøy} \quad [\text{Formel 2}]$$

Resultatet fra en qPCR-analyse plottes inn i et diagram med mengden fluorescens på y-aksen og antall sykluser på x-aksen. Fluorescensen som måles vil gi en graf med fire faser: bakgrunnsfase, eksponentiell fase, interfase og platåfase (se figur 4). I den eksponentielle fasen øker det målte fluorescenssignalet eksponentielt. Terskelnivået er definert som mengden fluorescens som kreves for å overgå bakgrunnsstøyen, og derfor detektere signalet. Syklusen dette skjer ved kalles terskelsyklus eller C_T -verdien, og kvantifiserer mengden DNA i prøven. C_T -verdien er omvendt proporsjonal med mengden DNA i prøven fra start. En lavere C_T -verdi betyr derfor flere DNA-molekyler i prøven og en høyere verdi betyr færre DNA-molekyler (31, 41, 46). I en artikkel om optimalisering av RT-qPCR, indikerte resultatene at konsentrasjonen av DNA i prøven bør holdes mellom 10 pg og 400 pg/ μ l for å gi optimale resultater (48).



Figur 4. Denne figuren viser et eksempel på et amplifikasjonsplott av GAPDH analysert fra HaCaT cDNA. De fire fasene i amplifikasjonen er bakgrunnsfase (1), eksponentiell fase (2), interfase (3) og platåfase (4). I dette eksempelet var terskelnivået definert ved 0,079 ΔRn , og C_T -verdien var 17,46.

2.6.1 Relativ genekspresjon og intern kontroll

Når man skal se på genekspresjonen av et spesifikt gen, er et alternativ å se på den relative genekspresjonen mellom målgenet og et referansegene i behandlet og ubehandlet prøve. Dette for å utelukke en rekke feilkilder, som ulikt antall celler og total mengde ekstrahert RNA/DNA. Referansegene er normaliseringsgener som opprettholder konstant ekspresjon, gjerne uavhengig av ytre påvirkning, og kan derfor sammenlignes mellom prøvene. En relativ

kvantifisering av ekspresjonsnivåene krever ikke en kalibreringskurve eller standarder med kjente konsentrasjoner (29, 41).

For å finne den relative ekspresjonen, kalkulerer man forskjellen mellom C_t -verdiene med en metode kalt $\Delta\Delta C_t$ -metoden, eller $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metoden. Metoden ble utviklet av Kenneth Livak og Thomas Schmittgen, og innebærer at det benyttes en behandlet prøve og en ubehandlet kontrollprøve der genet av interesse og referansegenet blir analysert (41, 49).

$$\text{Relativ endring i genekspresjon (RQ)} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad [\text{Formel 3}]$$

$$\text{der: } \Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{behandlet}}} - \Delta C_{t_{\text{ubehandlet}}} \quad [\text{Formel 4}]$$

$$\Delta C_t = (C_{t_{\text{målgen}}} - C_{t_{\text{referansegen}}}) \quad [\text{Formel 5}]$$

For at denne metoden skal være gyldig, må det ifølge Livak og Schmittgen tas en rekke antagelser i anvendelsen av metoden. Amplifikasjonseffektiviteten av målgenet og kontrollen må være omtrent lik, noe som kan testes ved å se hvordan ΔC_t varierer med en fortynningsrekke (50). For kontrollene blir den relative genekspresjonen vanligvis satt som 1. Dette kan gjøres fordi $\Delta\Delta C_t$ i kontrollen er tilnærmet lik 0, og 2^0 er 1. Ved en statistisk analyse kan derfor den relative genekspresjonen i prøvene sammenlignes med 1 (50, 51). Logaritmiske verdier i datasettet kan føre til en skjev fordeling i distribusjonen og at verdiene viker fra regresjonslinjen. En lineær regresjon har flere forutsetninger, deriblant homoskedastisitet der verdiene er likt fordelt om en regresjonslinje der variansen er konstant (52). Metoden fraråder derfor bruk av rådata i statistiske analyser, da disse er logaritmiske verdier. C_t -verdiene blir transformert til lineære i $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metoden for å normalisere verdiene (50).

Livak og Schmittgen beskriver også seleksjonen av internkontroll og kalibrator for $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metoden. Hensikten med den interne kontrollen, som i dette tilfelle er referansegener, er å normalisere verdiene av mengde RNA tilsatt i prøvene. Standard husholdningsgener er vanligvis tilstrekkelige som referansegener for RT-qPCR (50). Husholdningsgenene koder gjerne for enkle metabolske funksjoner som er vitale for cellenes overlevelse, og vil derfor være upåvirket av mange eksterne faktorer. En av grunnene til at disse genene uttrykkes relativt konstant, er fordi disse ofte mangler nukleosomer (53). Husholdningsgenene som benyttes i dette forsøket er GAPDH og HPRT.

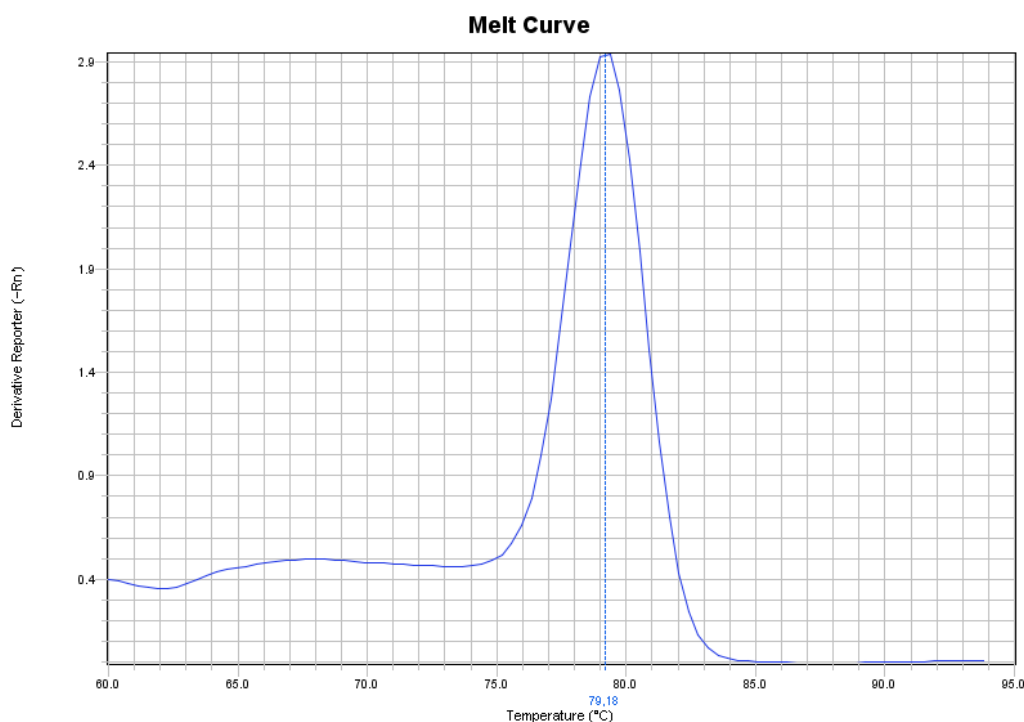
Produktet fra GAPDH-genet er glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenase (G-3-PDH), en viktig proteinfamilie som har essensielle funksjoner, deriblant i karbohydratmetabolismen i forbindelse med energiproduksjon i cellene (54). HPRT koder for en transferase kalt hypoksantinfosforibosyltransferase som spiller en aktiv rolle i nukleotidbergingen (55). Dette er en prosess for å berge baser og nukleosider etter degradering av DNA og RNA, for å konvertere dem tilbake til nukleotider (56).

I en artikkel (Bär et al., 2009) om utvelgelse og validering av ulike husholdningsgener for HaCaT-studier kommer det fram en rekke anbefalinger. For å unngå en rekke uforutsigbare endringer i den relative genekspressjonen, bør det i studier benyttes mer enn ett husholdningsgen. Både HPRT og GAPDH blir nevnt som vanlige kandidater for HaCaT-studier, men disse kan bli påvirket av ulike stimuli. GAPDH kan blant annet bli påvirket av hypoxia og mitogener, og kan være en upålitelig kandidat i kreft- og tumorprøver. HPRT ble beskrevet som en god kandidat, men at man må ta hensyn til et lavt ekspressionsnivå (57).

2.6.2 Smeltepunktsanalyse

Fordi SYBR Green binder seg uspesifikt til dobbeltrådet DNA, må spesifisiteten til amplifisering testes. Dette gjøres ved en smeltepunktsanalyse etter fullført PCR, for å bekrefte at det er amplifisert ett produkt og at ingen primer-dimere forstyrrer reaksjonene. En primer-dimer er et kompleks av to primere som har bundet seg til hverandre istedenfor til DNAet i prøven. Smeltepunktsanalysen utføres ved å øke temperaturen gradvis i prøvene for å la DNAet dissosiere fra hverandre. SYBR Green, som kun bindes til dobbeltrådet DNA, vil derfor gradvis slippe trådene. Som et resultat av dette vil fluorescensen gradvis synke. I smeltepunktskurven vil DNA fra samme produkt få samme smeltepunkt, mens uspesifikke produkter og primer-dimere vil få egne topper (58). For å bekrefte at de amplifiserte produktene er spesifikke, kan man utføre en agarose gelelektroforese med en DNA-ladder (46).

Etter utført smeltepunktsanalyse kan det oppstå små variasjoner innad i T_m -verdiene mellom parallellene. Her kan flere årsaker spille inn, blant annet oligonukleotidkonsentrasjonen, saltkonsentrasjonen, mismatches, SNP, og til og med SYBR Green (59). Små variasjoner i T_m -verdier trenger derfor ikke å bety uspesifikk amplifikasjon.



Figur 5. Denne figuren viser et eksempel på en smeltepunktsskurve av HPRT analysert fra HaCaT cDNA. Toppen på grafen angir høyest endring i fluorescenssignal. Det er ved denne temperaturen T_m blir definert, som i dette eksempelet er 79,18°C.

2.6.3 Primeroptimalisering

Optimalisering av valgte primerpar er viktig for å sikre en god amplifikasjon og hindre eventuelle problemer som primer-dimere, lav spesifisitet og ineffektivitet. Ved bruk av flere ulike primere i en multipleks analyse, er det viktig å optimalisere hybridiseringstemperatur og primerkonsentrasjon. Optimalisering av temperaturen gjøres fordi alle primerne vil analyseres ved samme hybridiseringstemperatur ved hver PCR-analyse. Dersom hybridiseringstemperaturen er for lav vil reaksjonene være uspesifikke, mens for høy temperatur vil føre til en lav effektivitet og derfor høye C_t -verdier (60).

Primerkonsentrasjonene optimaliseres for å hindre uspesifikk amplifikasjon, og den optimaliserte hybridiseringstemperaturen kan benyttes i analysen for å finne de best egnede konsentrasjonene. Det er vanlig å teste mellom flere konsentrasjoner, for eksempel mellom 100-500 nM. Den optimale konsentrasjonen er den laveste primerkonsentrasjonen som gir lavest C_t -verdi, med god overensstemmelse i T_m og amplifikasjonsplott (60).

2.7 Analysemetoder

7500 v2.3, er en programvare som kan benyttes sammen med instrumentet Applied Biosystems™ 7500 for å presentere dataene fra analysen. Ved å velge «kvantitativ analyse» og de aktuelle referansegenene, kalkuleres genekspressjonen automatisk til definerte resultater som RQ. Fluorescenssignalene fra analyseinstrumentet framstilles i grafer som viser styrken på signalet for hver syklus. Programvaren kan automatisk stille inn «baseline»-start og -slutt, der startsyklusen defineres som den første syklusen med stabilt fluorescenssignal. Sluttsyklusen er definert som den siste syklusen før fluorescenssignalet overgår bakgrunnsstøyen og øker over flere sykluser, noe som vil gi en amplifikasjonskurve lik de i figur 10 (vedlegg A.3.3.2). Denne kan manuelt overstyres dersom resultater ikke detekteres på grunn av lavere fluorescenssignaler eller andre avlesingsfeil. Avvikende resultater presenteres i en egen kvalitetskontrolltabell og tilhørende analyser «flagges» på grunn av blant annet høyt standardavvik mellom C_t -verdiene i paralleller, amplifikasjon i negativ kontroll, flere smeltepunktstopper og feil i «baseline»-algoritmen (46).

For å studere signifikante endringer i genuttrykk ble det i denne oppgaven brukt t-test. Testen forteller oss om resultatene i analysen kommer av tilfeldigheter eller ikke. Hvis resultatene ikke kommer av tilfeldigheter, kan det med en viss sikkerhet tyde på at det er en signifikant forskjell i genuttrykket. En t-test kan utføres som ensidig eller tosidig. Ensidig test brukes for å studere om den ene prøven gir signifikant høyere verdier enn den andre. Tosidig t-test brukes for å studere om de to prøvene gir signifikant ulike verdier. For utførelse av en t-test settes det opp to hypoteser, en nullhypotese (H_0) og en alternativ hypotese (H_1), der målet er å bevise H_1 . For ensidig t-test beholdes H_0 dersom det ikke er signifikant høyere genuttrykk i den ene prøven i forhold til den andre. Om H_0 forkastes, bevises H_1 , og det er derfor signifikant høyere genuttrykk i den ene av prøvene som testes. For tosidig t-test beholdes H_0 dersom det ikke er signifikantforskjell i genuttrykk for prøvene som testes opp mot hverandre. Om H_0 forkastes, bevises H_1 , og det er derfor signifikant forskjell i genuttrykk mellom prøvene som testes. Testen gjennomføres med et konfidensintervall som er avgjørende for med hvor stor sikkerhet man kan konkludere. Et signifikansnivå på 5% ($\alpha = 0,05$) vil gi et konfidensintervall på 95%. For å få mest mulig sikre svar, som er representative for hver gang forsøket gjentas, bør t-testene baseres på mange verdier (61, s. 77, 81-83, 95-101).

3 Materialer og metoder

I denne oppgaven ble det eksperimentelle arbeidet utført i to deler. Den første delen var optimalisering. Her inngikk primeroptimalisering, der det ble sett på optimal hybridiseringstemperatur og primerkonsentrasjon, og et optimaliseringsforsøk for å optimalisere indusering og RNA-isolering, og for å se om valgte tidsintervaller for indusering med TNF- α ga økt uttrykk av IL-23. Den andre delen var hovedeksperimentet, der genuttrykket av IL-23 ble studert ved tre tidsintervaller med og uten DHA-behandling, for å se om behandlingen ga en nedregulering av IL-23.

3.1 Cellekultivering

HaCaT-cellene (*AddexBio*, a.nr. T0020001) ble dyrket i celleflasker på 75 cm² i et inkubatorskap ved 37°C med 5% CO₂. Mediet som ble brukt var 500 mL RPMI 1640 medium (heretter kalt RPMI-medium) (*Gibco*, a.nr. 72400-047 og 21870-076) tilsatt 50 mL FBS (*Gibco*, a.nr. A3160801). Til dette ble det tilsatt 5 mL 1 M HEPES buffer solution (*Gibco*, a.nr. 15630-056), 5 mL 100 mM Sodium Pyruvate (*Gibco*, a.nr. 11360-039), 5,14 mL 29,20 mg/mL L-glutamine (*Corning*, a.nr. 25-005-Cl), 0,5 mL 50 mM 2-Mercaptoethanol (*Gibco*, a.nr. 31350-010) og 500 μ L Penicillin-Streptomycin (10 units/mL Penicillin, 10 μ g/mL streptomycin) (*Gibco*, a.nr. 15140-148).

Cellesplittingen ble utført aseptisk i LAF-benk. Først ble konfluensen sjekket i et invertert mikroskop. Gammelt medium ble fjernet, og cellene ble vasket to ganger med 5 mL HBSS (*HyClone*, a.nr. SH30588.02). Senere ble HBSS byttet ut med PBS (*Sigma-Aldrich*, a.nr. D8537-500ML). Deretter ble 1 mL 0,25% Trypsin-EDTA (*Gibco by Life Technologies*, a.nr. 25200-056) tilsatt, og fikk virke i 15-20 minutter under overvåking i invertert mikroskop. Når ca. 80% av cellene hadde løsnet fra bunnen, ble 5 mL medium tilsatt for å inaktivere trypsinen. Cellesuspensjonen ble overført til et Falconrør på 15 mL, og sentrifugert på 1200 rpm i 3 minutter. Røret ble tatt med inn i LAF-benk, supernatanten ble fjernet, og 2 mL medium ble tilsatt for å resuspendere cellepelletten. 4 mL medium ble tilsatt suspensjonen og blandet, til et totalt volum på 6 mL. Avhengig av konfluens og inkubasjonstid ble enten 2 mL cellsuspensjon overført til en ny celleflaske på 75 cm² med 18 mL medium for å få et

splitteforhold på 1:3, eller 1,2 mL celleduspensjon overført til en celleflaske med 18,8 mL medium for å få et splitteforhold på 1:5. Splitteforholdet er basert på at volumet av celleduspensjonen totalt var 6 mL, og at volumet som ble tatt ut derifra var 2 eller 1,2 mL. Se vedlegg A.2.1 for prosedyre, denne er inspirert av en prosedyre som ble brukt i cellekurset Anvend Bioteknologi 2020 (62).

3.2 Indusering med TNF- α og behandling med DHA

3.2.1 Indusering med TNF- α – optimaliseringsforsøk

Optimaliseringsforsøket ble utført i henhold til prosedyren i vedlegg A.2.2 for å se på genekspresjonen hos TNF- α -induserte HaCaT-celler ved ulike tidsintervall. Ved celletetthet på 70-80%, ble cellene sådd ut fra celleflaske til cellebrett. Det ble overført 0,25 mL celleduspensjon til hver brønn, og tilført 5,75 mL RPMI-medium. Den resterende celleduspensjonen ble tatt ut som prøve til optimalisering av temperatur og primerkonsentrasjon, og lagret i RNA-Later (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, a.nr. AM7021*) ved 4°C i kjøleskap før RNA-isolering. Cellebrettene ble satt til inkubasjon i 23 timer ved 37°C med 5% CO₂, for at cellene skulle feste seg til underlaget.

Etter inkubasjon, ble det tilsatt 10 ng/mL TNF- α (*PeproTech, a.nr. 300-01A-10UG*) til ti brønner. Medium ble først fjernet, så ble 1,2 μ L TNF- α og 6 mL RPMI-medium tilsatt. To brønner sto igjen som kontroller, og ble ikke behandlet med TNF- α . Cellene ble høstet i duplikat fra brønner med en times mellomrom, i fem timer. Dette ble gjort ved å ta av medium, vaske med HBSS, og tilsette 1,5 mL RNA-later. Så ble celleduske brukt for å løsne cellene, før innholdet i brønnene ble pipettert over i hvert sitt Falconrør. Rørene ble lagret over natten i kjøleskap på 4°C, før de ble sentrifugert på 1200 rpm i 5 min, og tatt med videre til RNA-isolering.

3.2.2 Indusering med TNF- α og behandling med DHA – hovedeksperiment

DHA (*Sigma-Aldrich*[®], a.nr. 53171) ble blandet med RPMI-medium til en konsentrasjon på 5 μ g/mL (15,22 μ mol/L), og godt blandet med vortexer. En studie (Serini et al., 2019) på behandling av HaCaT-celler med DHA hevdet at en konsentrasjon under 30 μ mol/L ikke er toksisk, og fører til økt cellevekst (63). Ved celletetthet på 90%, ble cellene sådd ut fra celleflaske til cellebrett. Det ble, i henhold til vedlegg A.2.3, overført 0,25 mL

cellesuspensjon til hver brønn på fire brett, tilført 5,75 mL RPMI-medium med og uten DHA i henhold til brønnoppsett (Figur 2, 3, 4 og 5 i vedlegg A.2.3). Brettene ble satt til inkubasjon i 24 timer ved 37°C med 5% CO₂, for at cellene skulle feste seg til underlaget.

Etter inkubasjon ble alle cellene løsnet fra brønnene på brett 1 med celledrape, og innholdet ble overført til hvert sitt Falconrør. Disse ble sentrifugert ved 1200 rpm i 3 min, og tatt videre til RNA-isolering. På brett 2, 3 og 4 ble medium fjernet i kontrollbrønnene, og de ble tilsatt 6 mL nytt romtemperert RPMI-medium med og uten DHA. For de resterende brønnene ble tilsvarende gjort, men før nytt medium ble tilsatt, ble det pipettert 1,2 µL TNF-α (10 ng/mL) over i brønnene. Innholdet i brønnene ble blandet lett. Brettene ble satt til inkubasjon ved 37°C med 5% CO₂. Hver time i 3 timer ble cellene på et nytt brett løsnet fra brønnene med celledrape, og innholdet ble overført til hvert sitt Falconrør. Disse ble sentrifugert ved 1200 rpm i 3 min, og tatt videre til RNA-isolering.

3.3 RNA-isolering

RNAet i prøvene ble isolert med RNeasy mini kit (*Qiagen, a.nr. 74104*). Prosedyren for RNA-isolering, inspirert av protokollen fra RNeasy Mini Handbook som heter «Protocol: Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology», ble fulgt (64, s.27-34) (se vedlegg A.2.4). Mengden RNA i prøvene etter isolering ble målt ved å bruke Qubit™ RNA HS Assay Kit (*Invitrogen, a.nr Q32855*) og Invitrogen™ Qubit® fluorometer, der prosedyren for Qubit™ RNA HS Assay Kit ble fulgt (se vedlegg A.2.4) (65, 66). I optimaliseringsforsøket ble det eluert to ganger med 20 µL. Prøvene ble videre fortynnet for å oppnå målbare Qubit-resultater på <1000 ng/mL. Elueringsvolumet ble endret til to ganger 40 µL i hovedeksperimentet.

3.4 cDNA-syntese

For å lage komplementær-DNA ble det brukt qScript™ cDNA Syntese kit (*Quantabio qScript™, a.nr. 95047-100*) (67). Prosedyren for cDNA syntese ble brukt (vedlegg A.2.5). Mengden RNA-templat som ble tilsatt fra de ulike brønnene er lagt ved som vedlegg A.3.1, og de prøvene som hadde en konsentrasjon over 1 µg per 15 µL ble fortynnet til verdier under 1 µg per 15 µL. Programmet som ble brukt i termosyklere var 22°C i 5 min, 42°C i 30

min og 85°C i 5 min. DNA-innholdet i prøvene ble målt etter cDNA-syntesen ved å bruke Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (*Invitrogen, a.nr. Q32231*) (68, 66).

3.5 RT-qPCR primere

Det ble brukt primere for GAPDH, HPRT og IL-23A, som er p19-underenheten i IL-23 (Tabell 1). Primersekvensene ble funnet på Origene, og bestilt fra Invitrogen (*Invitrogen, a.nr. 10336-022*). På Origene sine sider står det at primersekvensene fungerer godt med SYBR Green (69, 70, 71). Sekvensene ble undersøkt i NCBI primer-BLAST for å finne smeltepunktstemperatur og eventuell lav spesifisitet (72). Hybridiseringstemperaturene for IL-23, HPRT og GAPDH, vist i tabell 1, ble funnet i to ulike studier (73, 74).

Tabell 1. Denne tabellen viser en oversikt over sekvensene, smeltepunktstemperaturene og hybridiseringstemperaturene for de ulike primersettene som ble brukt.

Primersett	Sekvens (5'-3')	Smeltepunkt, T _m (°C)	Hybridiserings-temperatur (°C)
GAPDH	Forward sekvens: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	60,92	56,4
	Reverse sekvens: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	64,41	
HPRT	Forward sekvens: CATTATGCTGAGGATTTGGAAAGG	58,16	56,4
	Reverse sekvens: CTTGAGCACACAGAGGGCTACA	62,25	
IL-23A	Forward sekvens: GAGCCTTCTCTGCTCCCTGATA	61,02	58
	Reverse sekvens: GACTGAGGCTTGGAATCTGCTG	61,26	

3.6 RT-qPCR

For tillaging av qPCR ble det benyttet PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® Low Rox (*Quantabio, a.nr. 95074-250*) til optimaliseringen. Grunnet mangel på SYBR Green i optimaliseringsforsøket ble prøvene som sto i 3 og 5 timer ikke analysert, og bare en av

parallellene fra tid 1 ble analysert med HPRT som målgen. For tillaging av prøvene i hovedeksperimentet, ble det brukt PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® (*Quantabio, a.nr. 733-1381*). Volumene som ble brukt for de ulike komponentene avvek fra protokollen for SYBR Green reaksjonsmik, men volumene var optimalisert for laboratoriet og instrumentet (75). Mengden DNA-templat som ble tilsatt i PCR-brønnene er lagt ved i vedlegg A.3.2. Konsentrasjonen for primerne ble bestemt ut ifra primeroptimaliseringen, og qPCR-oppsettet for forsøket er lagt ved i vedlegg A.2.7. For gjennomføring av qPCR ble instrumentet Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR brukt, med forvarming til 95°C i 3 min for så å gjennomføre 35 sykluser med denaturering på 95°C i 15 sek, hybridisering på 57°C i 20 sek og elongering på 72°C i 30 sek. Programmet som ble brukt for smeltepunktanalyse var 95°C i 15 sek, 60°C i 1 min, 95°C i 30 sek og 60°C i 15 sek.

3.7 Primeroptimalisering

Primeroptimaliseringen ble utført før optimaliseringsforsøket og hovedeksperimentet for å finne de beste hybridiseringstemperaturene og primerkonsentrasjonene for de ulike genene.

3.7.1 Hybridiseringstemperatur

Det ble utført tre optimaliseringer for hybridiseringstemperatur på primersettene, først 58°C, deretter 59°C, og til slutt 57°C. Dette ble gjort i samarbeid med en annen bachelorgruppe der isolert cDNA fra HaCaT-celler ble brukt til å analysere GAPDH og IL-23, og cDNA isolert fra A549-celler ble brukt til å analysere HPRT. Se vedlagt prosedyre og brønnoppsett for qPCR-analysen i vedlegg A.2.6.

For å avgjøre om temperaturen var egnet, ble amplifikasjonsplottet og T_m-verdiene til produktene for hvert gen sammenlignet (figur 6, 7 og 8 i vedlegg A.3.3.1). Primerne ble analysert ved tre forskjellige hybridiseringstemperaturer før analysen ga samsvarende resultater innad i parallellene for hvert gen.

3.7.2 Primerkonsentrasjon

Den optimale primerkonsentrasjonen ble funnet ved å bruke prosedyren og brønnoppsettet i vedlegg A.2.7, med en hybridiseringstemperatur på 57°C. De ulike kombinasjonene av

primerkonsentrasjoner fra 300-500 nM ble sammenlignet på bakgrunn av reproduserbarhet i amplifikasjonskurvene innad i parallellene, C_t -verdiene og overensstemmelse i T_m -verdier fra smeltepunktanalysene.

3.8 Framstilling av data

3.8.1 *Applied biosystemsTM 7500*

Etter analysen med qPCR-instrumentet ble dataene fra alle analysene presentert i programvaren 7500 v2.3. Amplifikasjonsplottet og de tilhørende smeltepunktskurvene ble vurdert opp mot hverandre for å avgjøre spesifisiteten, og om prøvene skulle inkluderes eller ekskluderes. Prøver med avvikende T_m ble ekskludert fra analysen, i tillegg til prøver uten amplifikasjonskurver. Programvaren stiller automatisk inn baseline, og det kan derfor dukke opp amplifikasjoner som ikke detekteres. En manuell justering av sluttsyklus for disse prøvene ble utført i noen tilfeller for å se om de kunne bli detektert, og de ble deretter sammenlignet med parallellens T_m og C_t -verdi for å utelukke kontaminasjon, primer-dimere og uspesifikk amplifikasjon.

For å hente ut C_t -verdier for enkeltprøver, ble alle prøvene som hørte til et tidsintervall inkludert i programvaren 7500 v2.3, mens resterende ble ekskludert. Den tilhørende kontrollen ble registrert som referanse for prøvene og resultatene ble reanalysert. HPRT og GAPDH ble analysert separat mot målgenet for å kunne beregne genekspresjonen individuelt, slik at disse kunne bli sammenlignet og validert.

3.8.2 *Statistiske analyser*

C_t -verdiene fra RT-qPCR-analysene for optimaliseringsforsøket og hovedeksperimentet ble hentet ut fra programvaren, og skrevet inn i Microsoft® Excel®. ΔC_t -, $\Delta\Delta C_t$ -, og RQ-verdier ble regnet ut ved å bruke formel 3, 4 og 5. For å regne $\Delta\Delta C_t$ - og RQ-verdier ble gjennomsnittet av ΔC_t -verdiene benyttet, og for å få en mer oversiktlig framstilling av genekspresjonen, ble $\log_2 RQ$ regnet ut ved å ta 2-logaritmen av RQ-verdiene. I beregningen av standardavviket for $\log_2 RQ$, ble alle ΔC_t -verdiene benyttet for å regne $\log_2 RQ$ i stedet for å bruke gjennomsnittlige ΔC_t -verdier.

For å finne ut om referansegene ble påvirket av DHA-behandlingen, ble den gjennomsnittlige C_t -verdien for parallellene ved hver tid kalkulert og linearisert som 2^{-C_t} . Så ble analyseverktøyet «T-test» benyttet, og det ble valgt «tosidig fordeling» og «to utvalg med ulik varians». Kritisk p-verdi var 0,05, for å få et konfidensintervall på 95%. P-verdien for testene ble framstilt i tabell 24 (vedlegg A.3.6.1).

T-test ble også benyttet på RQ-verdiene for å beregne om resultatene ga statistisk signifikante svar. For å beregne om resultatene for de induserte og behandlede prøvene hadde statistisk signifikant høyere verdier enn kontrollverdien per tid, ble analyseverktøyet «T-test» benyttet. Der ble det valgt «ensidig fordeling» og «to utvalg med ulik varians». Hver parallell ble testet opp mot kontrollverdien på 1. Der parallellen viste nedregulering, ble t-testen benyttet for å se om kontrollen ga signifikant høyere verdier enn parallellen. For å beregne om det var statistisk signifikante forskjeller mellom prøvene som var likt behandlet, altså mellom parallellene, ble analyseverktøyet «T-test» benyttet. Der ble det valgt «tosidig fordeling» og «to utvalg med lik varians». For å beregne om resultatene for de prøvene som ikke var behandlet med DHA hadde statistisk signifikant høyere verdier enn de DHA-behandlede prøvene per tid, ble analyseverktøyet «T-test» benyttet, og det ble valgt «ensidig fordeling» og «to utvalg med ulik varians». Kritisk p-verdi var 0,05 for å få et konfidensintervall på 95%. P-verdien for alle testene ble framstilt i tabell 25 og 26 (vedlegg A.3.6.2), tabell 27 og 28 (vedlegg A.3.6.3), og tabell 29 (vedlegg A.3.6.4).

3.8.3 Genekspresjon

\log_2 RQ og standardavviket for hver av verdiene ble brukt til å lage histogrammer som framstiller genekspresjonen på en oversiktlig måte. Noen av grafene i histogrammet viser ikke standardavvik, noe som skyldes at grafen baseres på bare én parallell fordi den andre parallellen ble ekskludert i behandlingen av resultatene. I tillegg ble RQ-verdiene framstilt i linjediagrammer for å sammenligne resultatene med de ulike referansegene, og resultatene mellom prøvene med og uten DHA (figur 13 i vedlegg A.3.7.1, figur 14 i vedlegg A.3.7.2 og figur 15 i vedlegg A.3.7.3).

4 Resultater

Resultatene kommer fra en primeroptimalisering, der det ble funnet den beste hybridiseringstemperaturen og konsentrasjonen for de ulike primersettene, et optimaliseringsforsøk for å optimalisere metode og tidsintervaller, og et hovedeksperiment som besto av to deler. I den første delen ble HaCaT-cellene induisert med TNF- α , og i den andre delen ble cellene induisert med TNF- α og behandlet med DHA.

4.1 Optimalisering

4.1.1 Hybridiseringstemperatur

Ved 58°C ble det observert høye standardavvik mellom parallellene for IL-23, amplifikasjon i negativ kontroll (NTC) i begge kontrollene for GAPDH og i den ene kontrollen for HPRT. Det var også stor variasjon i T_m-verdiene for IL-23.

59°C ga høyt standardavvik i C_t-verdiene til HPRT, samt stor spredning i amplifikasjonsplottet og ulike T_m-verdier for produktene med henholdsvis GAPDH og HPRT. I tillegg ble det observert amplifikasjon i alle NTC for GAPDH, HPRT og IL-23, der det var flere smeltepunktstopper. Figur 9 (vedlegg A.3.3.1) viser en smeltepunktsskurve med flere topper i NTC for GAPDH. Ved denne hybridiseringstemperaturen så derimot IL-23 ut til å gi samsvarende T_m-verdier i alle brønnene, med unntak av NTC.

Når 57°C ble satt som hybridiseringstemperatur, ble det observert amplifikasjon i NTC for HPRT og GAPDH. C_t-verdiene for produktene i disse brønnene var mer enn 10 verdier høyere enn amplifikasjonsproduktet. Smeltepunktsskurvene til parallellene var samsvarende innad i hvert gen, og det ble observert bedre reproduserbarhet ved denne temperaturen enn ved 58 og 59°C som vist i figur 6, 7 og 8 (vedlegg A.3.3.1).

4.1.2 Primerkonsentrasjon

For GAPDH resulterte alle konsentrasjonene i samsvarende T_m-verdier. Alle NTC-brønnene ga amplifikasjon av produkter med høyere T_m-verdier enn for brønnene med DNA. Ved 300 nM forward og 300 nM reverse primer (300/300 nM) ga en av parallellene ingen

amplifikasjon av produktet. Amplifikasjonsplottene for de ulike konsentrasjonene ga like resultater innad i parallellene, bortsett fra for parallellene med 300 nM reverse primer.

HPRT ga også samsvarende T_m -verdier og ingen amplifikasjon i en av parallellene med konsentrasjonen 300/300 nM. En av parallellene på NTC med 400/400 nM ga amplifikasjon av et produkt med lavere T_m -verdi enn for brønnene med DNA. For brønnene med 500/300 nM og 500/400 nM var standardavviket for C_t -verdiene mellom parallellene over 0,5 sykluser. Figur 10 (vedlegg A.3.3.2) viser eksempler på smeltepunktsskurver og amplifikasjonsplott for to ulike konsentrasjoner av HPRT-primere med varierende resultat.

Det var ingen amplifikasjon i noen av brønnene med NTC for IL-23, og alle konsentrasjonene bortsett fra 300/500 nM ga samsvarende T_m -verdier. 300/500 nM hadde, i tillegg til ulike T_m -verdier, et høyt standardavvik. 300/300 nM og 300/500 nM ga høyere C_t -verdier enn de andre konsentrasjonskombinasjonene.

Tabell 2. Konsentrasjonen til primersekvansene for GAPDH, HPRT og IL-23, som ga de beste resultatene i optimaliseringen.

Primersett	Forward sekvens (nM)	Reverse sekvens (nM)
GAPDH	400	400
HPRT	500	500
IL-23A	400	300

4.1.3 Optimaliseringsforsøk

Prøvene som betegnes som K (kontroll) og T0 var ikke behandlet med TNF- α og ble høstet ved tid 0. Resten av prøvene ble behandlet med TNF- α . T1, også kalt tid 1, ble indusert i 1 time, T2, også kalt tid 2, i 2 timer og T4, også kalt tid 4, i 4 timer. C_t -verdiene fra qPCR-analysen er presentert i tabell 21 (vedlegg A.3.5.1). Smeltepunktsskurvene for flere av parallellene til IL-23 indikerte liten grad av spesifisitet, og for disse ble en av parallellene ekskludert.

Histogrammene som presenterer genekspressjonen av IL-23 med GAPDH som referanseggen (figur 11 i vedlegg A.3.7.1) og IL-23 med HPRT som referanseggen (figur 12 i vedlegg A.3.7.1) antyder at genet for IL-23 ved tid 2 og tid 4 har blitt oppregulert i parallell 1 og

nedregulert i parallell 2, i forhold til kontrollen. Det samme kommer fram i linjediagrammet (figur 13 i vedlegg A.3.7.1) som viser den relative endringen i genekspressjon.

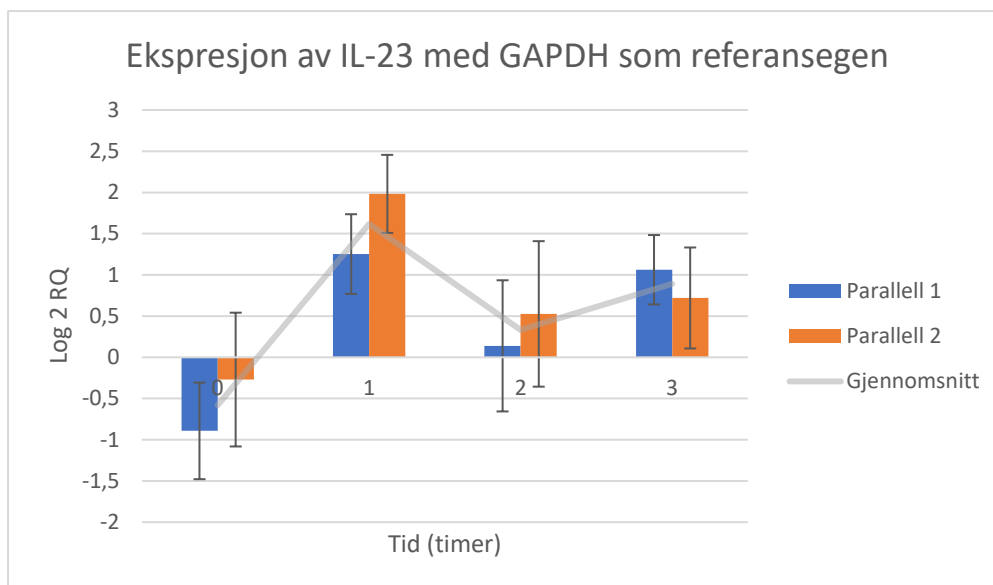
4.2 Hovedeksperiment

Cellene fra cellebrett 1 betegnes som T0 og tid 0, siden de ble tatt ut ubehandlet når resterende celler ble tilsatt TNF- α og RPMI-medium med og uten DHA. Cellene fra cellebrett 2 betegnes T1 og tid 1, og ble behandlet i 1 time. T2-cellene ble behandlet i 2 timer, og kalles også tid 2, og T3-cellene ble behandlet i 3 timer og kalles også tid 3. Kontrollen for cellebrett 1 betegnes som K1 og kontroll 1, kontrollen for cellebrett 2 betegnes som K2 og kontroll 2, kontrollen for cellebrett 3 betegnes som K3 og kontroll 3, og kontrollen for cellebrett 4 betegnes som K4 og kontroll 4. C_t -verdiene fra qPCR-analysen er presentert i tabell 22 og 23 (vedlegg A.3.5.2).

For å sammenligne referansegenene i DHA-behandlede og ubehandlede prøver, ble den gjennomsnittlige C_t -verdien for parallellene ved hver tid kalkulert og linearisert som 2^{-C_t} . Tabell 24 (vedlegg A.3.6.1) viser p-verdiene fra de tosidige t-testene utført mellom de behandlede og ubehandlede prøvene. T-testene viste at det ikke var signifikante forskjeller i ekspressjonen av referansegenene mellom DHA-behandlede og ubehandlede prøvene, med unntak av tid 3 med GAPDH som referansegen, med en p-verdi på 0,040.

4.2.1 TNF- α indusert HaCaT-celler uten DHA-behandling – framstilling av genekspressjon og statistisk analyse

For å framstille genekspressjonen av IL-23 med GAPDH som referansegen, ble 2-logaritmen av RQ, kalkulert fra C_t -verdiene til GAPDH og IL-23 fra tabell 22 (vedlegg A.3.5.2), presentert i figur 6. For prøvene ved tid 0 ble det observert en nedregulering av IL-23 med \log_2 RQ-verdier på -0,89 og -0,27. Etter 1 times indusering viste grafen en markant oppregulering med \log_2 RQ-verdier på 1,25 og 1,98. Genuttrykket har ved tid 2 gått ned til en mindre oppregulering med \log_2 RQ-verdier på 0,14 og 0,53, før den igjen ble oppregulert ved tid 3 med \log_2 RQ-verdier på 1,06 og 0,72.

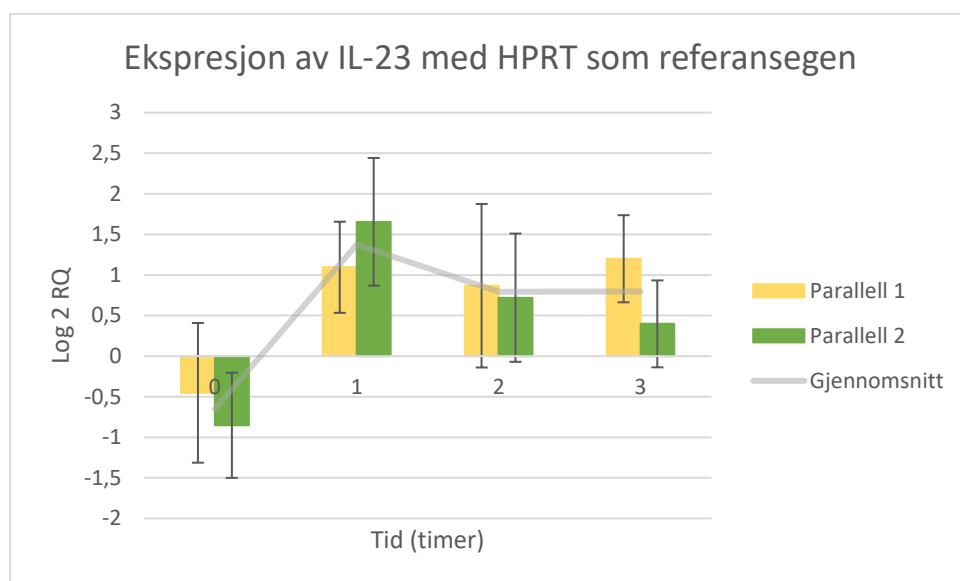


Figur 6. Framstilling av 2-logaritmen av den relative genekspressjonen for IL-23, med GAPDH som referansegen, fra hovedeksperimentet for prøvene som ikke ble behandlet med DHA, etter 1, 2 og 3 timers indusering med TNF- α . Prøvene fra tid 0 ble ikke behandlet med TNF- α . Stolpene er framstilt med standardavvik og en grå gjennomsnittslinje. For log₂ RQ-verdier gir nedregulering negative verdier og oppregulering gir positive verdier.

Det ble utført t-tester av RQ-verdiene med et signifikansnivå på 5%, for å se om det var en signifikant endring i ekspressjonen av IL-23 i forhold til referansegenene. Tabell 25 (vedlegg A.3.6.2) viser t-testene for prøvene som ikke ble behandlet med DHA, der GAPDH var referansegen. Ved tid 0 viste t-testene en signifikant endring i genuttrykket for parallell 1 i forhold til kontroll, med en p-verdi på 0,020, men ikke for parallell 2. For begge parallellene ved tid 1 viste t-testene en signifikant endring i forhold til kontroll, med p-verdier på 0,019 og 0,011. Testene viste ingen signifikant endring for parallellene ved tid 2 i forhold til kontroll, men for tid 3 viste t-testen for parallell 1 en signifikant endring i forhold til kontroll, med p-verdi 0,021. Det ble ikke funnet en signifikant forskjell innad i noen av parallellene.

For å framstille genekspressjonen av IL-23 med HPRT som referansegen i figur 7, ble 2-logaritmen av RQ, kalkulert fra C_t-verdiene til HPRT og IL-23 fra tabell 22 (vedlegg A.3.5.2). For prøvene ved tid 0 ble det observert en nedregulering av IL-23 med log₂ RQ-verdier på -0,45 og -0,85. Etter 1 times indusering viste grafen en markant oppregulering med log₂ RQ-verdier på 1,10 og 1,66. Det ble ved tid 2 observert oppregulering av genuttrykket, med log₂ RQ-verdier på 0,87 og 0,72. Ved tid 3 ble det observert en større forskjell mellom

parallell 1 og 2, med \log_2 RQ-verdier på 1,20 og 0,40, men gjennomsnittslinjen indikerte en lik oppregulering som ved tid 2.



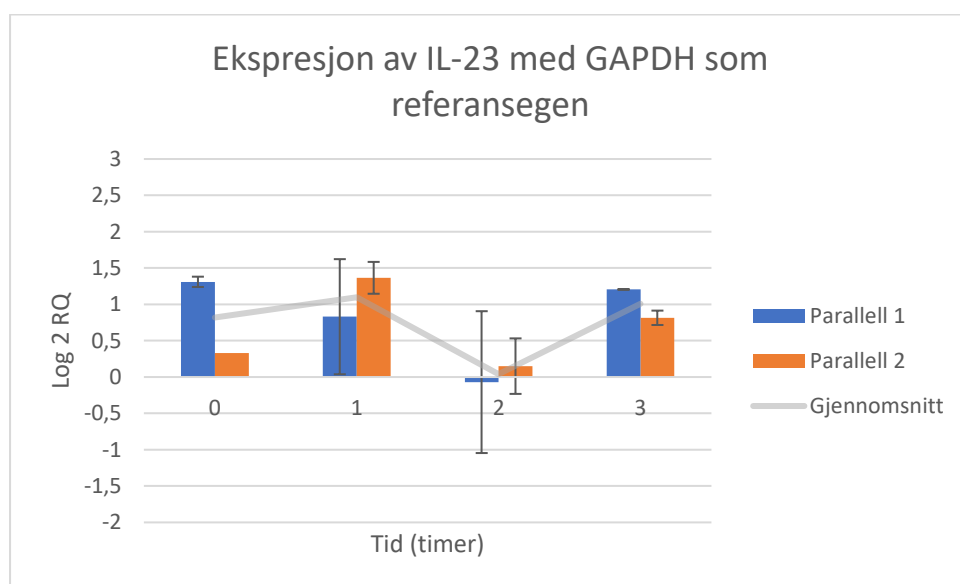
Figur 7. Framstilling av 2-logaritmen av den relative genekspresjonen for IL-23, med HPRT som referansegen, fra hovedeksperimentet for prøvene som ikke ble behandlet med DHA, etter 1, 2 og 3 timers indusering med TNF- α . Prøvene fra tid 0 ble ikke behandlet med TNF- α . Stolpene er framstilt med standardavvik og en grå gjennomsnittslinje. For \log_2 RQ-verdier gir nedregulering negative verdier og oppregulering gir positive verdier.

Tabell 26 (vedlegg A.3.6.2) viser t-testene for prøvene som ikke ble behandlet med DHA, der HPRT var referansegen. Ved tid 0 viste t-testene en signifikant endring i genuttrykket for parallell 2 i forhold til kontroll, med en p-verdi på 0,036, men ikke for parallell 1. For begge parallellene ved tid 1 viste t-testene en signifikant endring i forhold til kontroll, med p-verdier på 0,038 og 0,042. Testene viste ingen signifikant endring for parallellene ved tid 2 i forhold til kontroll, men for tid 3 viste t-testen for parallell 1 en signifikant endring i forhold til kontroll, med p-verdi 0,047. Det ble ikke funnet en signifikant forskjell innad i noen av parallellene.

Linjediagrammet i figur 14 (vedlegg A.3.7.2) viser en sammenligning av den relative genekspresjonen av IL-23 med henholdsvis GAPDH og HPRT som referansegen for prøvene uten DHA-behandling. Grafene viste like tendenser til oppregulering av IL-23 etter 1 times indusering med TNF- α , og deretter en redusering av oppreguleringen sett i forhold til tid 1.

4.2.2 TNF- α induerte HaCat-celler behandlet med DHA – framstilling av genekspressjon og statistisk analyse

For å framstille genekspressjonen av IL-23 med GAPDH som referansegen, ble 2-logaritmen av RQ, kalkulert fra C_t -verdiene til GAPDH og IL-23 fra tabell 23 (vedlegg A.3.5.2), presentert i figur 8. For prøvene ved tid 0 ble det observert en oppregulering av IL-23 med \log_2 RQ-verdier på 1,31 og 0,33. Etter 1 times indusering viste grafen en oppregulering med \log_2 RQ-verdier på 0,83 og 1,37. Genuttrykket ble ved tid 2 redusert i forhold til tid 1, med \log_2 RQ-verdier på -0,07 og 0,15, før det igjen ble oppregulert ved tid 3, med \log_2 RQ-verdier på 1,21 og 0,82.

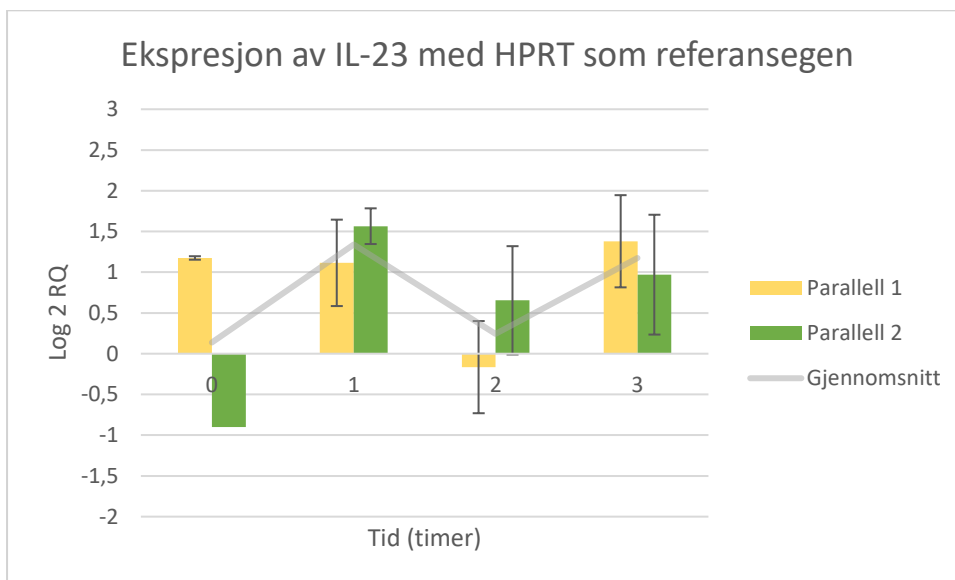


Figur 8. Framstilling av 2-logaritmen av den relative genekspressjonen for IL-23, med GAPDH som referansegen, fra hovedeksperimentet for prøvene som ble behandlet med DHA, etter 1, 2 og 3 timers indusering med TNF- α . Prøvene fra tid 0 ble ikke behandlet med TNF- α . Stolpene er framstilt med standardavvik og en grå gjennomsnittslinje. For \log_2 RQ-verdier gir nedregulering negative verdier og oppregulering gir positive verdier.

Tabell 27 (vedlegg A.3.6.3) viser t-testene for prøvene som ble behandlet med DHA, der GAPDH var referansegen. T-testene viste en signifikant endring for parallell 1 ved tid 0 i forhold til kontroll, med p-verdi 0,018, og den andre parallellen hadde ikke nok verdier til å utføre en t-test, ettersom det ene duplikatet ble ekskludert. Hverken ved tid 1 eller tid 2 viste testene en signifikant endring i forhold til kontroll. Ved tid 3 hadde parallell 1 ikke nok

verdier til å utføre en t-test, og t-testen for parallell 2 viste en signifikant endring i forhold til kontroll med p-verdi 0,036. Ved tid 0 var det ikke nok verdier til å utføre en t-test på parallellene for å se på forskjellen mellom dem. Innad i parallellene ved tid 1 og 2 ble det ikke funnet en signifikant forskjell. T-test av parallellene ved tid 3 viste en signifikant forskjell med p-verdi 0,024.

For å framstille genekspressjonen av IL-23 med HPRT som referansegen, ble 2-logaritmen av RQ, kalkulert fra C_t -verdiene til HPRT og IL-23 fra tabell 23 (vedlegg A.3.5.2), presentert i figur 9. Ved tid 0 ble det observert en oppregulering av IL-23 for parallell 1 og en nedregulering for parallell 2, med \log_2 RQ-verdier på henholdsvis 1,18 og -0,90. Etter 1 times indusering viste grafen en oppregulering med \log_2 RQ-verdier på 1,12 og 1,57. Parallell 1 ved tid 2 viste nedregulering og parallell 2 viste oppregulering, med \log_2 RQ-verdier på henholdsvis -0,16 og 0,65. For begge parallellene ved tid 3 ble det observert oppregulering, med \log_2 RQ-verdier på 1,38 og 0,97.



Figur 9. Framstilling av 2-logaritmen av den relative genekspressjonen for IL-23, med HPRT som referansegen, fra hovedeksperimentet for prøvene som ble behandlet med DHA, etter 1, 2 og 3 timers indusering med TNF- α . Prøvene fra tid 0 ble ikke behandlet med TNF- α . Stolpene er framstilt med standardavvik og en grå gjennomsnittslinje. For \log_2 RQ-verdier gir nedregulering negative verdier og oppregulering gir positive verdier.

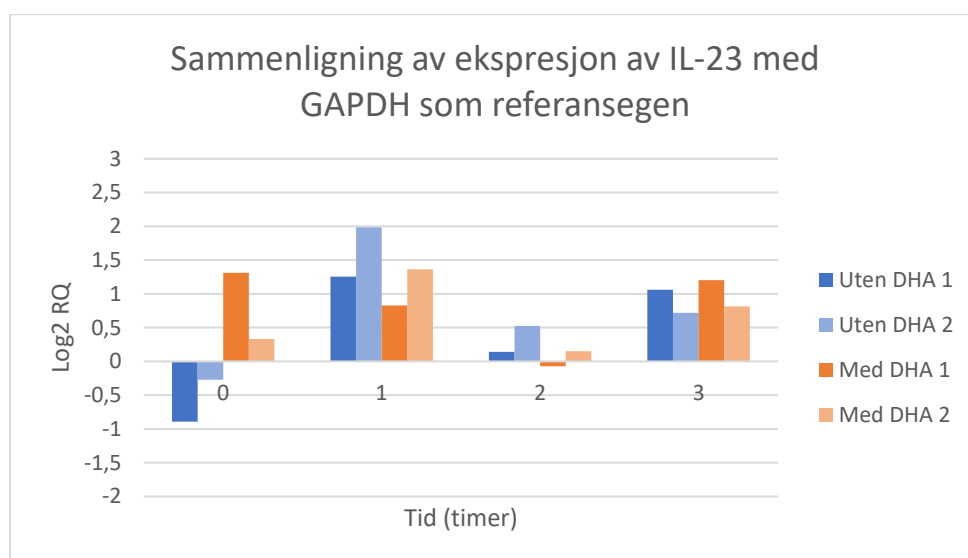
Tabell 28 (vedlegg A.3.6.3) viser t-testene for prøvene som ble behandlet med DHA, der HPRT var referansegen. For parallell 1 ved tid 0 viste t-testen en signifikant endring i forhold

til kontrollen med p-verdi 0,006, og for parallell 2 var det ikke nok verdier til å utføre en t-test opp mot kontroll. Hverken for tid 1, 2 eller 3 viste t-testene en signifikant endring av genuttrykket i forhold til kontrollen. Det var ikke nok verdier ved tid 0 til å utføre en t-test på parallellene. Innad i parallellene for tid 1, 2 og 3 ble det ikke funnet en signifikant forskjell.

Linjediagrammet i figur 15 (vedlegg A.3.7.3) sammenligner den relative genekspressjonen av IL-23 med henholdsvis GAPDH og HPRT som referansegen for prøvene med DHA-behandling. Grafene viste en lik tendens til redusering i genuttrykket av IL-23 fra tid 1 til tid 2, og deretter en økning i oppreguleringen ved tid 3.

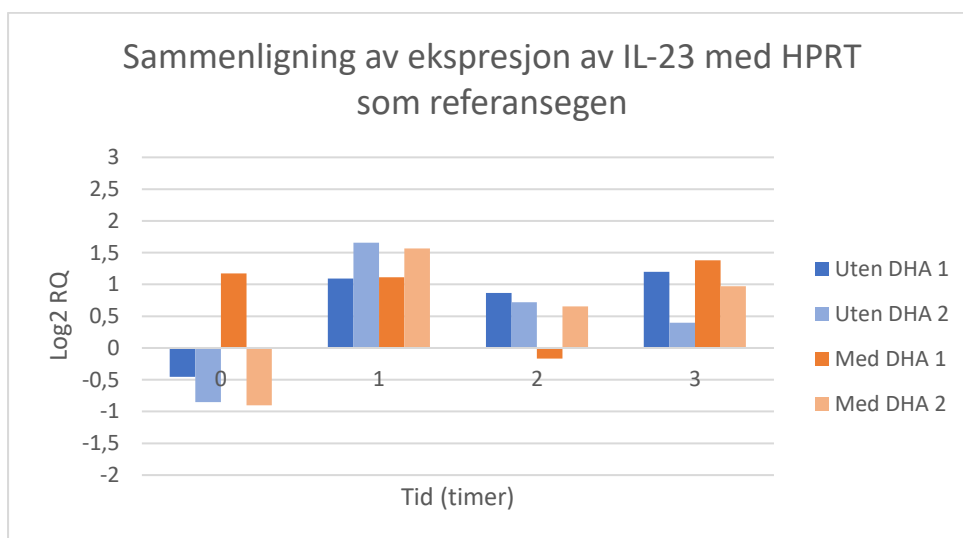
4.2.3 Sammenligning av TNF- α induserte HaCaT-celler med og uten DHA-behandling

For å sammenligne genekspressjonen av IL-23 mellom prøver med og uten DHA-behandling, ble 2-logaritmen av RQ-verdiene framstilt i en figur for hvert referansegen. Ekspressjonen av IL-23 med GAPDH som referansegen ble presentert i figur 10. Det ble observert ved tid 1 og 3 at ekspressjonen i de behandlede og ubehandlede prøvene hadde like tendenser, i motsetning til tid 0, der de ubehandlede prøvene viste nedregulering og de behandlede prøvene viste oppregulering. Ved tid 2 viste parallell 1 med DHA-behandling en nedregulering, i motsetning til de andre prøvene, som viste oppregulering.



Figur 10. Framstilling av 2-logaritmen for IL-23, med GAPDH som referansegen, i hovedeksperimentet, der prøvene som ble behandlet med og uten DHA sammenlignes. Prøvene fra tid 1, 2 og 3 ble indusert med TNF- α . Prøvene fra tid 0 ble ikke behandlet med TNF- α . For log₂ RQ-verdier gir nedregulering negative verdier og oppregulering gir positive verdier.

Ekspresjonen av IL-23 med HPRT som referansegen ble presentert i figur 11. Det ble observert ved tid 1 og tid 3 at ekspresjonen i de behandlede og ubehandlede prøvene hadde like tendenser, i motsetning til tid 0 og tid 2, der en av parallellene med DHA-behandling ikke samsvarte med de andre prøvene fra samme tid. Ved tid 0 viser en av parallellene med DHA-behandling oppregulering og de andre prøvene nedregulering. Ved tid 2 viser en av parallellene med DHA-behandling nedregulering når de andre viser oppregulering.



Figur 11. Framstilling av 2-logaritmen for IL-23, med HPRT som referansegen, i hovedeksperimentet, der prøvene som ble behandlet med og uten DHA sammenlignes. Prøvene fra tid 1, 2 og 3 ble induisert med TNF- α . Prøvene fra tid 0 ble ikke behandlet med TNF- α . For $\log_2 RQ$ -verdier gir nedregulering negative verdier og oppregulering gir positive verdier.

Tabell 29 (vedlegg A.3.6.4) viser t-tester som er gjort separat for hvert referansegen, på prøvene som ble behandlet med DHA i forhold til prøvene som ikke ble behandlet med DHA. Hverken ved tid 0, tid 1, tid 2 eller tid 3 ble det påvist en signifikant forskjell mellom prøver med og uten DHA-behandling for begge referansegenene.

5 Diskusjon

For å framprovosere en psoriasisreaksjon *in vitro*, ble HaCaT-celler indusert med TNF- α , der målet var å få en oppregulering av cytokinet IL-23. IL-23 er et viktig ledd for å øke keratinocyttoproliferasjonen i huden under psoriasis, og kan være et sentralt mål for behandlingen av sykdommen. DHA har i flere studier vist seg å ha en antiinflammatorisk effekt, og kan redusere ekspresjonen av proinflammatoriske cytokiner, som blant annet IL-23 (6, 7). De induserte cellene fikk derfor vokse i medium med og uten DHA, og genekspresjonen ble analysert for å studere om DHA hadde en effekt på reguleringen av IL-23.

5.1 Cellekultivering

Ved overtakelse av HaCaT-cellene ble det etter et par dagers dyrking observert at cellene hadde svært dårlig vekst. Det ble oppdaget at RPMI-mediet som ble benyttet ikke hadde tilsatt L-glutamin og HEPES-buffer, noe som kan ha vært grunnen til at cellene vokste dårlig (18, 19). Etter at cellene fikk nytt RPMI-medium med L-glutamin og HEPES-buffer, ble celleveksten betydelig bedre. Senere i forsøket ble det benyttet RPMI-medium med ferdig tilsatt L-glutamin og HEPES-buffer, som i likhet med de andre mediene som ble brukt fikk tilsatt resterende essensielle komponenter (20, 21, 22, 23).

Gjennom cellekultiveringen var konfluensen varierende på grunn av overvekst og redusert tilgang på næring over tid. Det viste seg å bli vanskelig å splitte cellene med jevne mellomrom grunnet begrenset tilgang på laboratoriet, og derfor nådde celleflaskene enkelte ganger en høy konfluens. Det ble forsøkt å kompensere for dette ved å splitte i ulike konsentrasjoner, basert på hvor lenge cellene måtte stå før neste celledeling. Etter cellene hadde vokst med for høy konfluens, ble lagfasen lengre enn vanlig. Likevel tok celleveksten seg opp etter hvert, men det er ikke mulig å se om cellene har tatt skade av for høy konfluens uten å utføre analyser på dette. Innen de ble sådd ut på cellebrett for indusering, hadde cellene en konfluens rundt 70%, noe som vil si at cellene sannsynligvis vokste tilnærmet eksponentielt (24).

5.2 Optimalisering

5.2.1 RT-qPCR

Volumene som ble anbefalt i protokollen til PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®, ble ikke tatt hensyn til ettersom det var optimalisert egne volum for laboratoriet og instrumentet som ble brukt (75). Volumene som ble brukt var også mindre, og det ble derfor spart på reagensene slik at kostnadene ble lavere og det ble mulig å analysere flere prøver.

Under primeroptimaliseringen ble det brukt under 400 pg/μL cDNA, en konsentrasjon som ble anbefalt i en bachelor som tidligere har blitt skrevet ved NTNU i Ålesund (48). For å oppnå ønsket konsentrasjon ble prøvene fortynnet i to omganger, noe som er en fordel når det er snakk om så lave konsentrasjoner. Det ble valgt å ikke optimalisere konsentrasjonen av cDNA, ettersom konsentrasjonen som ble brukt i primeroptimaliseringen ga gode resultater. Ved å ikke optimalisere cDNA-konsentrasjonen ble det også spart reagenser, noe som var en stor fordel ettersom reagensene var en av begrensningene for oppgaven.

IL-23 består av to underenheter, p19 og p40. p19 finnes, i motsetning til p40, bare i IL-23, og blir også kalt IL-23A. Ved å bruke primere for denne underenheten til å detektere ekspresjonen av cytokinet, blir ikke IL-12, som også består av underenheten p40, amplifisert (32, 33). Det sikres dermed at resultatene fra qPCR-analysen bare gjelder for IL-23.

Noen prøver ble ikke detektert i analysen, selv om amplifikasjonsplottet viste en eksponentiell graf. Dette skyldes at programvaren for qPCR-instrumentet automatisk stiller inn en baseline som baserer seg på signalene i de innledende syklusene. Ved å justere sluttsyklusen til en høyere C_t -verdi, ble noen av de udetekterte prøvene likevel detektert. For å sikre at det amplifiserte produktet i disse prøvene var spesifikke, ble de sammenlignet med parallellens T_m - og C_t -verdi.

5.2.2 Hybridiseringstemperatur

Hybridiseringstemperaturen ble optimalisert for å finne temperaturen der primerne er mest effektive og spesifikke for produktene som ble amplifisert. For å vurdere om de amplifiserte produktene var målproduktene, ble smeltepunktskurvene og T_m -verdiene studert. Hvis T_m -verdiene på produktene for et primersett varierte mye og smeltepunktskurvene så ut til å

representere ulike produkter i de ulike brønnene, ble temperaturen ansett som ikke egnet, og en ny temperatur ble testet.

58°C ble vurdert som en uegnet hybridiseringstemperatur grunnet høyt standardavvik i C_t -verdiene mellom parallellene for IL-23, amplifikasjoner i flere av de negative kontrollene og stor variasjon i T_m -verdiene for IL-23, som kan indikere uspesifikk amplifikasjon (58). Det ble, på grunn av samarbeid med en gruppe som optimaliserte et primersett for BECLIN, valgt å gå opp en grad for å se om 59°C ga bedre resultater, selv om hybridiseringstemperaturen som var oppgitt for primerne til referansegenene var 56,4°C. Ved denne temperaturen var det høyt standardavvik mellom C_t -verdiene til HPRT, stor spredning i amplifikasjonsplottene, samt ulike T_m -verdier og amplifikasjon i negativ kontroll for referansegenene. Figur 9 (vedlegg A.3.3.1) viser hvordan den ene smeltepunktskurven i NTC for GAPDH indikerer primer-dimere med en T_m -verdi på 62,24°C, som samsvarer med smeltepunktstemperaturen for primersettene (tabell 1). IL-23 så ut til å gi samsvarende resultater ved 59°C, men på grunn av at referansegenene ikke så ut til å gi tilfredsstillende svar her heller, ble primerne optimalisert ved 57°C. Det ble ved 57°C observert amplifikasjon i negative kontroller for begge referansegenene, men C_t -verdiene for produktene i disse brønnene var mer enn 10 verdier høyere enn amplifikasjonsproduktet og smeltepunktskurvene hadde flere topper. Dette kan indikere en kombinasjon av uspesifikk amplifikasjon og primer-dimere (60). Smeltepunktskurvene til parallellene for alle genene var samsvarende innad for genet, noe som tyder på spesifikk binding (58). Det ble for 57°C observert bedre reproduserbarhet enn ved 58 og 59°C, og derfor ble 57°C valgt som hybridiseringstemperatur.

5.2.3 *Primerkonsentrasjon*

Alle de negative kontrollene for GAPDH ga amplifikasjon, uavhengig av konsentrasjon. Disse hadde T_m -verdier som var lavere enn T_m -verdiene for produktet, og lå nærme smeltepunktstemperaturene for primersettet (tabell 1), noe som tyder på at signalet som ble detektert i brønnene for NTC kan ha vært primerdimere. Ettersom den ene av parallellene med 300/300 nM ikke ble detektert, ble det avgjort å ikke bruke 300 nM for hverken forward eller reverse primer. 400/400 nM var den laveste konsentrasjonskombinasjonen som ga samsvarende T_m -verdier og amplifikasjonsplott, og det ble derfor valgt å gå for denne.

En av brønnene med HPRT ga ingen amplifikasjon ved 300/300 nM, og derfor ble 300 nM ikke valgt for noen av primersekvensene her heller. En av parallellene for NTC ved 400/400 nM ga amplifikasjon med T_m-verdi nær smeltepunktstemperaturen til primerne, noe som kan tyde på at det her ble detektert primer-dimere (60). I tillegg ga brønnene for 500/300 nM og 500/400 nM høyt standardavvik mellom parallellene. Dette gjorde at det ble valgt å bruke 500/500 nM for primerne til HPRT, ettersom det var konsentrasjoner som så ut til å gi gode resultater under optimaliseringen.

For IL-23 var det bare konsentrasjonskombinasjonen 300/500 nM som ikke ga samsvarende resultater, og den ga i tillegg til 300/300 nM høyere C_T-verdier enn for andre konsentrasjoner. Dermed var 400/300 nM den laveste konsentrasjonskombinasjonen som så ut til å gi samsvarende resultater, og denne ble derfor valgt.

5.2.4 Konsentrasjon av TNF- α og DHA, samt tidsintervaller for indusering

Før induseringen og behandlingen av cellene, ble det valgt konsentrasjoner av TNF- α og DHA som baserte seg på verdier fra relevante studier. Journal of Cell Science publiserte en studie (Turner et al., 2010) som tok for seg TNF- α sin påvirkning på cellulære inflammasjonsresponsen. Tidsintervaller på opptil 6 timer med ulike konsentrasjoner ble testet, og viste at TNF- α påvirket ekspresjonen i høyest grad med 10 ng/mL (35). 10 ng/mL ble derfor valgt som konsentrasjon i denne oppgaven.

For å avgjøre hvilken konsentrasjon av DHA som skulle benyttes i mediet, ble studien (Abdelmagid et al., 2015) som hevdet at normalkonsentrasjonen i plasma er på 7,2-237,5 μ mol/L hos friske individer, og studien (Serini et al., 2019) som påviste at konsentrasjoner under 30 μ mol/L ikke er toksiske, lagt til grunn. Ut ifra dette ble konsentrasjonen 5 μ g/mL (15,22 μ mol/L) valgt, noe som er godt under toksiske verdier og innenfor verdiene i den kanadiske studien (39, 63).

Tidsintervallet for induseringen med TNF- α ble valgt før hovedeksperimentet. I en samtale med en forskningsgruppe som ble kontaktet tidlig i oppgaveplanleggingen, kom det fram at de, under sitt forsøk med HaCaT-celler, behandlet cellene med TNF- α i 3, 18 og 24 timer for å inducere en økt ekspresjon av IL-23. Grunnet et samarbeid med en kommersiell aktør kan ikke navn nevnes. Forskningsgruppens resultater ga ingen signifikant økning av IL-23, og det

ble derfor foreslått et forsøk med kortere tidsintervaller. Dette kan underbygges av en annen studie (Banno et al., 2004) der keratinocytter ble induisert med TNF- α over flere tidsintervaller. Resultatene antydte at cytokinet initierte en rask immunrespons, og påvirket genreguleringen allerede etter 1 time (36). På grunn av begrenset tilgang til laboratoriet var det ikke mulig å induisere i mer enn fem timer, og i optimaliseringsforsøket ble det derfor induisert med TNF- α i inntil 5 timer, der celler ble høstet hver time, for å se om det ble detektert en oppregulering av IL-23.

5.2.5 Optimaliseringsforsøk

Det ble i optimaliseringsforsøket anslått en konfluens på rundt 70% etter at cellene hadde vokst et døgn i brønn. TNF- α ble tilsatt direkte i brønn og deretter blandet med RPMI-medium, for å sikre at hver brønn fikk lik mengde TNF- α . Dette kan ha ført til at TNF- α ikke blandet seg jevnt i mediet, og muligens gitt et ustabilt uttrykk av IL-23 i cellene. Et alternativ hadde vært å tilsette TNF- α direkte i mediet før det ble tilsatt til brønnene, men da måtte løsningen vært helt homogen ved tilsetning til brønn for at alle brønnene skulle fått lik mengde TNF- α . For å se om måten å tilsette TNF- α på har noe å si for genuttrykket, burde ekspresjonen blitt sammenlignet mellom for eksempel 10 prøver der TNF- α ble tilsatt i mediet, og 10 prøver der det ble tilsatt direkte i brønnen. Dette ble bortprioritert grunnet begrensninger i antall prøver som kunne analyseres. Mengden TNF- α som skulle tilsettes var kalkulert etter 6 mL, som var mengden medium tilsatt til hver brønn. Mediet som ble tilsatt hadde kjøleskapstemperatur, noe som kan ha stresset cellene og påvirket resultatet ettersom 37 °C er optimal veksttemperatur for HaCaT-cellene (17). For å unngå at dette skulle bli en feilkilde ved neste induisering, ble mediet varmet opp til romtemperatur før det ble tilsatt i brønnene under hovedeksperimentet.

På grunn av begrenset tid på laboratoriet, var det ikke mulig å isolere RNA samme dag som cellene ble høstet. Derfor ble det besluttet å lagre de høstede cellene fra hver brønn i hvert sitt Falconrør med RNA-later over natten, noe som kan ha påvirket resultatet. I RNA-isoleringen ble det eluert to ganger med 20 μ L. Dette resulterte i høy RNA-konsentrasjon og prøvene måtte fortynnes i flere omganger for å gi målbare Qubit-resultater under 1000 ng/mL. Flere omganger med fortynning kan ha økt risikoen for kontaminasjon av RNaser (62, s.4). For å redusere enzymatisk aktivitet og motvirke eventuell nedbryting av RNA, ble prøvene plassert på is. Elueringsvolumet ble i hovedeksperimentet endret til to ganger 40 μ L, noe som

resulterte i at de fleste prøvene ikke trengte videre fortykning. Etter isolering av RNA ble prøvene lagret ved -20°C i 1,5 uke, i påvente av at cDNA-kitet skulle komme. Isolert RNA skal i utgangspunktet kunne lagres ved -20°C i opptil et år uten å bli degradert (64, s.76).

Grunnet mangel på SYBR Green med ROX for denne qPCR-analysen, ble bare resultatene fra tid 0, 2 og 4 framstilt. Resultatene fra analysen viste at IL-23 ble oppregulert i parallell 1 og nedregulert i parallell 2 i forhold til begge referansegene ved tid 2 og tid 4. Det er ingen klare grunner til hva dette skyldes, men under RNA-isoleringen har det blitt nevnt flere feilkilder som kan ha vært grunnen. Det kan også komme av feil i pipettering på qPCR-brettet, eller at flere paralleller av IL-23 ble ekskludert på grunnlag av smeltepunktsanalysen og dermed ga få verdier å regne på. Det er ingen sammenheng mellom parallell 1 for tid 2 og parallell 1 for tid 4, og det samme gjelder for parallell 2, derfor er det ikke sannsynlig at feilkilden ligger i behandlingen av prøvene på cellebrettet.

Selv om analysen ikke ga konklusive svar, det ble i samråd med veileder valgt å gå videre med 3 tidsintervaller i hovedeksperimentet, og dermed høsting av celler fra tid 0, 1, 2 og 3. Begrunnelsen for valg av 3 tidsintervaller var begrensning i antall prøver som kunne RNA-isoleres, og at valget da falt på indusering i inntil 3 timer var grunnet begrenset tilgang på laboratoriet og studien (Banno et al., 2004) som indikerte rask immunrespons (36).

5.3 Hovedeksperiment

Etter 24 timer på cellebrettet, ble det anslått en konfluens på omtrent 90%. Det ble også observert flere celler som ikke hadde festet seg til underlaget på cellebrettene når de skulle induseres med $\text{TNF-}\alpha$, både for cellene som vokste i medium med og uten DHA. I likhet med i optimaliseringsforsøket, ble $\text{TNF-}\alpha$ tilsatt direkte i brønn. Fjerning av medium førte også til at mange løse celler ble fjernet, noe som kan ha gitt mer $\text{TNF-}\alpha$ til cellene som hadde festet seg. Deretter ble det tilsatt 6 mL medium, for å oppnå lik konsentrasjon av $\text{TNF-}\alpha$ i alle brønnene. For å unngå å stresse cellene med kaldt medium, ble medieflasken satt i romtemperatur 1 time før indusering. Optimalt burde temperaturen på mediet vært 37°C , noe som ikke var mulig grunnet mangel på vannbad.

Under RNA isoleringen i hovedeksperimentet gikk det tomt for RPE-buffer. RNAet fra brønn K2 uten DHA og T1 med DHA sto på is i omtrent 1 time før mer RPE-buffer var tilgjengelig. RNA er ikke like stabilt som DNA, og kan ha blitt nedbrutt av enzymer (62, s.4). Qubit- og qPCR-resultatene viste derimot ingen tegn til at disse prøvene var blitt påvirket av dette.

I optimaliseringen ble det brukt SYBR Green reaksjonsmiks som inneholdt ROX. Det gikk imidlertid tomt for denne reaksjonsmiksen under optimaliseringsforsøket, og det var tomt på lager hos leverandøren når det skulle bestilles nytt. Grunnet lang leveringstid på denne reaksjonsmiksen og få dager igjen før laboratoriearbeidet måtte avsluttes, ble det avgjort å bestille en reaksjonsmiks uten ROX som kunne leveres innen noen dager.

Hovedeksperimentet ble derfor gjennomført uten ROX, noe som ikke var anbefalt ifølge protokollen for reaksjonsmiksen, og heller ikke med tanke på at optimaliseringen var utført med ROX. I tillegg førte fraværet av ROX til at resultatene fra analysen ikke var normalisert i forhold til forskjeller i volum og konsentrasjoner for hver brønn (45). Feilmeldingen «High standard deviation in replicate group» kom derfor opp oftere uten ROX i reaksjonsmiksen, slik at det måtte bekreftes at samme produkt hadde blitt amplifisert i alle brønnene ved å studere smeltepunktanalysen.

Ettersom T_m -verdiene kan variere ut ifra innholdet i reaksjonsmiksen, hadde det vært en stor fordel om samme reaksjonsmiks hadde blitt brukt i alle qPCR-analysene. Det kan ikke sies med sikkerhet at T_m -verdiene ikke har blitt påvirket av at det i hovedeksperimentet ble brukt en annen reaksjonsmiks, og dermed kan ikke T_m -verdiene fra hovedeksperimentet brukes for å avgjøre med sikkerhet om amplifiseringsproduktet var det samme som i optimaliseringen (60). Hadde det ikke vært begrensninger i antall prøver og tid på laboratoriet, burde primeroptimaliseringen og optimaliseringsforsøket blitt utført på nytt med reaksjonsmiksen uten ROX.

I t-testene for å validere referansegenene ble 2^{-C_t} -verdiene benyttet, i henhold til metoden som Schmittgen forklarer i sine kritiske steg for analyse av relativ genekspressjon (49). For statistiske analyser av ekspresjonen av IL-23, ble RQ-verdiene brukt. Begrunnelsen for å bruke RQ-verdiene er at det frarådes å bruke rådata fra analysen, da disse er logaritmiske verdier og påvirker normalfordelingen (50,52). T-testene for å beregne signifikans av ekspresjonen i induerte prøver med og uten DHA-behandling i forhold til kontrollprøver, ble

gjennomført med ensidig fordeling. Dette for å se om IL-23-ekspresjonen var signifikant høyere sammenlignet med kontrollen. For beregning av signifikans i ekspresjonen mellom parallellene, ble tosidig fordeling benyttet, ettersom det her ble sett på om parallellene var forskjellige fra hverandre. Prøver som hadde fått ulik behandling ble testet med antatt ulik varians, og prøver med lik behandling ble testet med antatt lik varians.

En viktig faktor som spiller inn på standardavvik og statistisk signifikans av genreguleringen, er antall prøver som ligger til grunn for resultatene (61, s. 82). Hver brønn med celler fra cellebrettet som ikke var DHA-behandlet, ble analysert to ganger med to paralleller, noe som til sammen ga fire paralleller per brønn. Fire paralleller er få verdier å basere en t-test på, og tilfeldige feil vil føre til store standardavvik. For prøvene med DHA-behandling var det enda færre paralleller på grunn av begrensningene. Resultatene tolkes derfor med en viss usikkerhet, i viten om at det ikke kan fastslås noe.

I valideringen av referansegenene viste t-testene for både GAPDH og HPRT at det ikke var en signifikant forskjell i ekspresjonen av genene mellom prøvene med og uten DHA-behandling, bortsett fra for GAPDH ved tid 3. Dette tyder på at ekspresjonen av GAPDH ikke var stabil under behandlingen, og at genet ikke var et like egnet referansegen som først antatt. Ettersom det for t-testen var flere feilkilder å ta hensyn til, blant annet at volum- og konsentrasjonsforskjeller i brønnene ikke ble normalisert uten ROX og at t-testen var basert på få verdier, ble det likevel valgt å bruke GAPDH som referansegen i tillegg til HPRT.

Framstillingen av genekspresjonen for prøvene som ikke var behandlet med DHA viser en oppregulering av IL-23 ved tid 1, tid 2 og tid 3 for begge referansegenene, og en nedregulering ved tid 0. T-testene viser imidlertid at bare oppreguleringen for begge parallellene ved tid 1 og den ene parallellen ved tid 3, var statistisk signifikant både med GAPDH og HPRT som referansegen. For tid 0 var nedreguleringen i genuttrykket i parallell 1 signifikant med GAPDH som referansegen, mens det med HPRT som referansegen var signifikant nedregulering i parallell 2. Det er bare for parallellene med signifikante endringer i genekspresjon at opp- eller nedreguleringen med 95% sikkerhet ikke var tilfeldig. For de andre parallellene kan det ikke med 95% sikkerhet fastslås at resultatene ikke kom av tilfeldigheter.

Resultatene viser altså at ekspresjonen av IL-23 gikk fra en statistisk signifikant nedregulering før indusering, til en statistisk signifikant oppregulering etter 1 time. Dette tyder på at induseringen med TNF- α har satt i gang en immunologisk respons som førte til økt ekspresjon av genet for IL-23 i HaCaT-cellene. Studien som så på TNF- α -induserte keratinocytter (Banno et al., 2004) fant også at immunresponsen, med regulering av genene for cytokiner, kom allerede etter en time (36). Etter 2 timer hadde oppreguleringen av genet minket, og det kan ikke lenger sies med 95% sikkerhet at oppreguleringen var signifikant. Parallellene ved tid 2 hadde store standardavvik, og det er derfor mulig at disse verdiene var «falskt lave». I så tilfelle ville genuttrykket egentlig havnet på verdier nærmere verdiene ved tid 1. Dette kan derimot ikke sies med sikkerhet, og verdiene kan også ha vært «falskt høye». Ved 3 timers indusering kan det virke som at IL-23 har blitt noe oppregulert igjen, men siden oppreguleringen bare var signifikant for én parallell, og det gjaldt forskjellige paralleller med de forskjellige referansegenene, kan ikke dette sies med like stor sikkerhet som hvis begge parallellene hadde vist en signifikant oppregulering. Usikkerheten i valideringen av GAPDH er også en faktor som kan ha påvirket resultatet, spesielt med tanke på at det var ved tid 3 det ble påvist en signifikant forskjell hos referansegenet. Det er derfor bare etter 1 times indusering med TNF- α det med 95% sikkerhet kan påstås at det har skjedd en oppregulering av IL-23 i HaCaT-cellene.

Ved behandling med DHA viser histogrammene oppregulering av IL-23 ved tid 1 og 3 for begge referansegenene. T-testene viser imidlertid at oppreguleringen ikke var statistisk signifikant, bortsett fra for parallell 2 ved tid 3 med GAPDH som referansegen. T-testen som ble utført for å se på signifikante forskjeller innad i parallellene for tid 3 med GAPDH som referansegen, viser at ekspresjonen av IL-23 var signifikant forskjellig mellom disse parallellene. Samtidig viste GAPDH seg å muligens ikke være optimalt som referansegen i dette eksperimentet, og det blir dermed vanskeligere å argumentere for at oppreguleringen for parallell 2 var signifikant. Ved tid 0 viser begge parallellene oppregulering med GAPDH som referansegen, mens det med HPRT så ut til å være en oppregulering for parallell 1 og en nedregulering for parallell 2. Oppreguleringen for parallell 1 ved tid 0 var statistisk signifikant med begge referansegenene, men for parallell 2 var det ikke nok verdier til å utføre t-tester med noen av referansegenene, og det kan derfor ikke påvises en opp- eller nedregulering. Histogrammet viser at ved tid 2 var ekspresjonen av IL-23 i parallell 1 nedregulert og parallell 2 oppregulert i forhold til kontroll med både GAPDH og HPRT som

referansegen. Ingen av t-testene for disse viser en statistisk signifikans av hverken opp- eller nedreguleringen. Dermed er det bare for parallell 1 ved tid 0 det er 95% sikkert at oppreguleringen ikke var tilfeldig. For de andre parallellene kan det ikke med 95% sikkerhet fastslås at resultatene ikke kom av tilfeldigheter.

Resultatene viser altså at det bare var en signifikant oppregulering av IL-23 før indusering med TNF- α , og at opp- og nedreguleringen av IL-23 etter 1, 2 og 3 timer ikke var signifikant på 5% signifikansnivå. For alle prøvene som ble behandlet med DHA lå det få paralleller til grunn for å vurdere signifikansen av opp- og nedreguleringen. Optimalt burde disse prøvene blitt analysert en gang til, for å få like mange paralleller som det var for prøvene som ikke ble behandlet med DHA. Dette var ikke mulig på grunn av begrensningene. Mange av prøvene hadde store standardavvik, så selv om grafene viser en betydelig oppregulering, kan verdiene ha vært «falskt høye». Det kan for disse prøvene ikke sies med sikkerhet at det har vært en oppregulering, men et høyt standardavvik kan også bety at ekspresjonen var mer oppregulert enn det grafen viser.

Hvis resultatene for prøver med og uten DHA-behandling sammenlignes separat, gir TNF- α -induseringen en oppregulering av IL-23 ved tid 1 som ikke kan påvises i cellene behandlet med DHA. Fordi ekspresjonen i DHA-behandlede HaCaT-celler ikke var signifikant oppregulert ved tid 1, kan dette tyde på at DHA har hatt en viss virkning på reguleringen av IL-23 hos HaCaT-cellene. Dette kan være fordi DHA har egenskaper som hindrer oppreguleringen av IL-23 ved å aktivere PPAR γ og inhibere NF- κ B, og har da motvirket TNF- α sin aktivering av NF- κ B (6). Det kan likevel ikke sies noe om hvordan DHA har påvirket genekspressjonen, eller om det med sikkerhet faktisk har motvirket oppregulering av IL-23 induert av TNF- α . Hvis prøver med og uten DHA-behandling sammenlignes som i figur 10 og 11, viser grafene en høyere grad av uregelmessigheter i ekspresjonen hos cellene med DHA-behandling, noe som kan komme av få paralleller. T-testen som setter disse prøvene opp mot hverandre, kan heller ikke påvise en statistisk høyere ekspresjon av IL-23 i prøvene som ikke var behandlet med DHA. Dermed er det ikke sikkert at DHA faktisk har hindret oppreguleringen av IL-23 i cellene, selv om det kan se sånn ut i framstillingen av resultatene.

Den raske oppreguleringen av IL-23 i HaCaT-cellene som skulle etterligne oppreguleringen i keratinocytter under inflammasjonsresponsen ved psoriasis, så ut til å ha skjedd innen 1 time etter indusering med TNF- α . Ved å redusere ekspresjonen av IL-23 vil ikke T_H17-celler stimuleres til å produsere cytokiner som vil kunne øke proliferasjonen hos keratinocytene (4, 5). Ettersom DHA kan ha gitt en reduksjon i ekspresjonen av IL-23 i HaCaT-cellene, er det mulig at oljen kan brukes til å behandle psoriasis i keratinocytter.

5.4 Videre forskning

Det var tydelig at det var for få paralleller, spesielt for prøvene som var behandlet med DHA, til å kunne stadfeste en signifikant forskjell i genuttrykket. For videre forskning vil det være lurt å ha flere paralleller fra hver brønn for å få lavere standardavvik, slik at t-testene kan brukes med større sikkerhet (61, s. 82).

Ettersom immunresponsen raskt endrer genuttrykket i cellene, kan det være fordelaktig med kortere tidsintervaller, noe som kan gi resultater som viser en mer gradvis endring i genekspresjonen (36). Selv om immunresponsen er rask, kan det hende at effekten av DHA på ekspresjonen av IL-23 er mer tydelig etter en lengre behandlingstid. Derfor kunne det også vært interessant å studere genuttrykket etter DHA-behandling over lengre tid. En optimalisering av konsentrasjon, både for TNF- α og DHA, kunne blitt gjort i videre forskning for å sikre tydelige resultater. Opptaket av DHA i cellene kunne også vært målt, for å bekrefte at oljen ble tatt opp og utnyttet. Da ville det også vært mulig å se om oljen ble oppbrukt i løpet av behandlingen, og om det burde vært tilført mer underveis.

I tolkingen av resultatene ligger bare T_m-verdiene av de amplifiserte produktene til grunn for å avgjøre spesifisiteten til primerne. En gelelektroforese kunne vært gjennomført for å bekrefte at primerne amplifiserte riktig produkt, og at primerspesifisiteten var god (46). Selv om riktig produkt amplifiseres er det likevel ikke sikkert at det økte genuttrykket, påvist i en qPCR-analyse, hadde ført til en immunrespons. På grunn av de mange trinnene i genreguleringen, er det ingen garanti for at det uttrykte genet fører til dannelsen av et aktivt protein (30, 31). Dette må tas i betraktning når det gjennomføres en ekspresjonsanalyse der man kun ser på mengden transkribert mRNA. Det kan derfor være aktuelt å analysere

proteinekspressjonen av IL-23 for å se den faktiske biologiske aktiviteten av responsen TNF- α induserer.

Det er gjort mange studier på den antiinflammatoriske effekten av omega-3-fettsyrer i fiskeoljer, deriblant DHA, og flere har bekreftet en positiv effekt (6, 38, 40). Derfor kan det være mulig at de mer sammensatte oljene som består av flere ulike omega-3-fettsyrer og andre essensielle komponenter styrker denne effekten, og at DHA alene bruker lengre tid på å inhibere NF- κ B. Videre forskning kunne blitt gjort på andre og mer sammensatte oljer for å se om dette hadde påvirket resultatet.

6 Konklusjon

Resultatene fra genekspressjonsanalysen av TNF- α -induserte HaCaT-celler som ikke var behandlet med DHA, viste en signifikant oppregulering av IL-23 etter 1 time med både GAPDH og HPRT som referansegen. Dette indikerer at TNF- α kan ha aktivert NF- κ B og H3K9, og dermed økt ekspresjonen av IL-23, som ved psoriasis. Oppreguleringen som ble observert etter 1 time stemmer i tillegg overens med studien på rask cytokinrespons i TNF- α -induserte keratinocytter (Banno et al., 2004). De induserte cellene behandlet med DHA, viste en høyere grad av variasjon i ekspresjonen, og ingen av tidsintervallene ga signifikant oppregulering. At oppreguleringen av IL-23 ikke var signifikant kan indikere at DHA har påvirket ekspresjonen av IL-23 ved å inaktivere NF- κ B, og hindre reaksjonene TNF- α induserte. En t-test viste derimot ingen signifikant forskjell i ekspresjonen av IL-23 mellom prøvene med og uten DHA-behandling, og det kan derfor ikke sies med sikkerhet at denne behandlingen har hatt en antiinflammatorisk virkning. For å kunne si med større sikkerhet at resultatene ikke viste tilfeldige feil, burde de vært basert på flere paralleller.

7 Litteraturliste

- 1 Lea, T. Immunologi og immunologiske teknikker. 3. utg. Bergen: Fagbokforlaget; 2006.
- 2 Dinse GE, Parks CG, Weinberg CR, Co CA, Wilkerson J, Zeldin DC, et al. Increasing Prevalence of Antinuclear Antibodies in the United States. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(6):1026-1035.
- 3 Langeland T. Psoriasis [Internett]. Oslo: Store medisinske leksikon; 13.02.2009 [oppdatert 11.03.2020; hentet 25.02.2021]. Tilgjengelig fra: [psoriasis – Store medisinske leksikon \(snl.no\)](#)
- 4 Rizzo HL, Kagami S, Phillips KG, Kurtz SE, Jaques SL, Blauvelt A. IL-23-Mediated Psoriasis-Like Epidermal Hyperplasia Is Dependent on IL-17A. *J Immunol.* 2011;186(3):1495-1502.
- 5 Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(9):585-600.
- 6 Kong W, Yen JH, Vassiliou E, Adhikary S, Toscano MG, Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family. *Lipids Health Dis.* 2010;9(1):12.
- 7 Abdolmaleki F, Kovanen PT, Mardani R, Gheibi-Hayat SM, Bo S, Sahebkar A. Resolvins: Emerging Players in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019;58:82-91.
- 8 Remme JF. Fett i verdensklasse [Internett]. Ålesund: Sunnmørsposten; 14.03.2008 [oppdatert 19.09.2012; hentet 12.05.2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.smp.no/meninger/article132646.ece>
- 9 Norsk Helseinformatikk AS. Psoriasis, egenbehandling [Internett]. Trondheim: Norsk Helseinformatikk AS; 16.05.2002 [oppdatert 02.11.2020; hentet 12.05.2021]. Tilgjengelig fra: [Psoriasis, egenbehandling - NHI.no](#)
- 10 Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:7435621.

- 11 Li H, Yao Q, Mariscal AG, Wu X, Hülse J, Pedersen E et al. Epigenetic control of IL-23 expression in keratinocytes is important for chronic skin inflammation. *Nat Commun.* 2018;9(1):1420.
- 12 Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019;25(12):1822-1832.
- 13 Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res.* 2013;62(7):641-651.
- 14 Farstad IN. Betennelse [Internett]. Oslo: Store medisinske leksikon; 13.02.2009 [oppdatert 16.11.2020; hentet 21.04.2021]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/betennelse>
- 15 Vikse J. Cytokiner [Internett]. Oslo: Store medisinske leksikon; 13.02.2009 [oppdatert 27.10.2020; hentet 21.04.2021]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/cytokiner>
- 16 Varma SR, Sivaprakasam T, Mishra A, Prabhu S, Rafiq M, Rangesh P. Imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in differentiated Human keratinocytes: Its evaluation using curcumin. *Eur J Pharmacol.* 2017;813:33-41.
- 17 Gurskaya NG, Pereverzev AP, Staroverov DB, Markina NM, Lukyanov KA. Chapter Thirteen – Analysis of Nonsense-Mediated mRNA Decay at the Single-Cell Level Using Two Fluorescent Proteins. I: Filonov GS, Jaffrey SR, red. *Methods in Enzymology.* New York: Academic Press; 2016. 291-314.
- 18 Thermo Fisher Scientific. L-Glutamine [Internett]. Waltham: Thermo Fisher Scientific [hentet 11.05.2021]. Tilgjengelig fra: [L-Glutamine in Cell Culture | Thermo Fisher Scientific - NO](#)
- 19 Thermo Fisher Scientific. HEPES [Internett]. Waltham: Thermo Fisher Scientific [hentet 11.05.2021]. Tilgjengelig fra: [HEPES | Thermo Fisher Scientific - NO](#)
- 20 Thermo Fisher Scientific. 2-Mercaptoethanol [Internett]. Waltham: Thermo Fisher Scientific [hentet 30.04.2021]. Tilgjengelig fra: [2-Mercaptoethanol \(thermofisher.com\)](#)
- 21 Thermo Fisher Scientific. Sodium Pyruvate (100 mM) [Internett]. Waltham: Thermo Fisher Scientific [hentet 30.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Sodium Pyruvate \(100 mM\) \(thermofisher.com\)](#)
- 22 Thermo Fisher Scientific. Penicillin-Streptomycin (5,000 U/mL) [Internett]. Waltham: Thermo Fisher Scientific [hentet 30.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Penicillin-Streptomycin \(5,000 U/mL\) \(thermofisher.com\)](#)

- 23 Thermo Fisher Scientific. What Does Fetal Bovine Serum Do? [Internett]. Waltham: Thermo Fisher Scientific [hentet 30.04.2021]. Tilgjengelig fra: [What Does Fetal Bovine Serum Do? | Thermo Fisher Scientific - NO](#)
- 24 Thermo Fisher Scientific. Cell Culture Basics Handbook [Internett]. Waltham: Thermo Fisher Scientific; 2020 [hentet 30.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Cell culture basics handbook \(thermofisher.com\)](#)
- 25 Merck. Cell Culture Fundamentals: Cell Types & Culture Characteristics [Internett]. Darmstadt: Merck; [hentet 14.05.2021]. Tilgjengelig fra: [Cell Types & Culture Characteristics : Cell Culture Fundamentals | Sigma-Aldrich \(sigmaaldrich.com\)](#)
- 26 Pepper IL, Gerba CP, Gentry TJ. Environmental Microbiology. 3. utg. Oxford: Elsevier; 2015.
- 27 Pro SC, Imedio AD, Santoso CS, Gan KA, Sewell JA, Martinez M et al. Global landscape of mouse and human cytokine transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(18):9321-9337.
- 28 Thieman WJ, Palladino MA. Introduction to Biotechnology. 3. utg. Essex: Pearson Education Limited; 2014.
- 29 Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* 2013;29(10):569-574.
- 30 Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K et al. Essential Cell Biology. 5 utg. New York: W. W. Norton & Company; 2019.
- 31 Adams PS. Data analysis and reporting. I: Dorak MT, red. Real-time PCR. Abingdon: Taylor & Francis Group; 2006. s. 39-62.
- 32 Tang C, Chen S, Qian H, Huang W. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology.* 2012;135(2):112-124.
- 33 Girolomoni G, Strohal R, Puig L, Bachelez H, Barker J, Boehncke WH et al. The role of IL-23 and the IL-23/T_H17 immune axis in the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31(10):1616-1626.
- 34 Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(4):453-472.

- 35 Turner DA, Paszek P, Woodcock DJ, Nelson DE, Horton CA, Wang Y et al. Physiological levels of TNF α stimulation induce stochastic dynamics of NF- κ B responses in single living cells. *J Cell Sci.* 2010;123(16):2834-2843.
- 36 Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of Tumor Necrosis Factor- α (TNF alpha) in Epidermal Keratinocytes Revealed Using Global Transcriptional Profiling. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32633-32642.
- 37 Olsen RL. Lipidkjemi med vekt på fisk. 4. utg. Tromsø: UiT Norges arktiske universitet; 2017.
- 38 Hjartåker A, Pedersen JI, Müller H, Andressen SA. Grunnleggende ernæringslære. 3utg. Oslo: Gyldendal akademisk; 2017.
- 39 Abdelmagid SA, Clarke SE, Nielsen DE, Badawi A, El-Sohemy A, Mutch DM et al. Comprehensive Profiling of Plasma Fatty Acid Concentrations in Young Healthy Canadian Adults. *PLoS One.* 2015;10(5):e0128167.
- 40 Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2015;1851(4):469-484.
- 41 Pfaffl MW. Relative quantification. I: Dorak MT, red. *Real-time PCR.* Abingdon: Taylor & Francis Group; 2006. s. 63-82.
- 42 Khan Academy. Polymerase chain reaction (PCR) [Internett]. California: Khan Academy; 2017 [hentet 05.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Polymerase chain reaction \(PCR\) \(article\) | Khan Academy](#)
- 43 Bio-Rad Laboratories. Introduction to qPCR Instrumentation [Internett]. California: Bio-Rad Laboratories; 23.12.2011 [hentet 05.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Introduction to qPCR Instrumentation | LSR | Bio-Rad](#)
- 44 Bio-Rad Laboratories. SYBR® Green for qPCR [Internett]. California: Bio-Rad Laboratories; [hentet: 05.04.2021]. Tilgjengelig fra: [SYBR Green for qPCR | Bio-Rad](#)
- 45 Shipley GL. An introduction to real-time PCR. I: Dorak MT, red. *Real-time PCR.* Abingdon: Taylor & Francis Group; 2006. s. 1-38.
- 46 Agilent Technologies. Introduction to Quantitative PCR [Internett]. California: Agilent Technologies; 2012 [hentet 16.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Microsoft Word - 70200.D.doc \(agilent.com\)](#)

- 47 Lundholt BK, Scudder KM, Pagliaro L. A Simple Technique for Reducing Edge Effect in Cell-Based Assays. *J Biomol Screen*. 2003;8(5):566-570.
- 48 Falkeid E, Pursti SM, Rigstad SN. Optimisation and validation of RT-qPCR assay for relative quantitation of reference genes and stress related regulatory genes in CHSE-214 cells [bacheloroppgave]. Ålesund: NTNU; 2019.
- 49 Schmittgen TD. Quantitative gene expression by real-time PCR: a complete protocol. I: Dorak MT, red. *Real-time PCR*. Abingdon: Taylor & Francis Group; 2006. s. 127-138.
- 50 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
- 51 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.
- 52 Lee DK. Data transformation: a focus on the interpretation. *Korean J Anesthesiol*. 2020;73(6):503-508.
- 53 Universitetet i Oslo. Gen [Internett]. Oslo: UiO Institutt for biovitenskap; 04.02.2011 [oppdatert 19.06.2020; hentet 16.04.2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gen.html>
- 54 NCBI. Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 1, mRNA [Internett]. Maryland: NCBI; 11.2014 [hentet: 05.04.2021]. Tilgjengelig fra: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002046.7
- 55 NCBI. Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), mRNA [Internett]. Maryland: NCBI; 06.2009 [hentet: 03.05.2021]. Tilgjengelig fra: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000194.3
- 56 Jeannotte R. METABOLIC PATHWAYS | Nitrogen Metabolism. I: Batt CA, Tortorello ML, red. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2. utg. Oxford: Academic Press; 2014. s. 544-560.
- 57 Bär M, Bär D, Lehmann B. Selection and Validation of Candidate Housekeeping Genes for Studies of Human Keratinocytes – Review and Recommendations. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(3):535-537.
- 58 Ponchel F. Real-time PCR using SYBR® Green. I: Dorak MT, red. *Real-time PCR*. Abingdon: Taylor & Francis Group; 2006. s. 139-154.

- 59 You Y. Understanding melting temperature (T_m) [Internett]. Coralville: Integrated DNA Technologies; 21.10.2013 [oppdatert 10.06.2016; hentet 08.05.2021]. Tilgjengelig fra: [Understanding melting temperature \(T_m\) \(idtdna.com\)](#)
- 60 Merck. Assay Optimization and Validation [Internett]. Darmstadt: Merck; [hentet 21.04.2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/assay-optimization-and-validation.html>
- 61 Helbæk M. Statistikk for kjemikere. 1. utg. Trondheim: Tapir Akademisk Forlag; 2001.
- 62 Bjørnøy GH. IBA prosedyre for stressrespons på CHSE-2020. Ålesund: NTNU; 2020 [oppdatert dato 02.09.20; hentet dato 23.04.21].
- 63 Serini S, Cassano R, Facchinetti E, Amendola G, Trombino S, Calviello G. Anti-Irritant and Anti-Inflammatory Effects of DHA Encapsulated in Resveratrol-Based Solid Lipid Nanoparticles in Human Keratinocytes. *Nutrients*. 2019;11(6):1400.
- 64 Qiagen. RNeasy® Mini Handbook [Internett]. Venlo: Qiagen; 10.2019 [hentet 08.04.2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
- 65 Life Technologies. Quick Reference Qubit® RNA Assay Kit [Internett]. Carlsbad: Life Technologies; 08.02.2013 [hentet 12.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Qubit RNA Assay Kit Quick Reference \(thermofisher.com\)](#)
- 66 Invitrogen. Instruction Manual Qubit® Fluorometer [Internett]. Carlsbad: Invitrogen; 2007 [hentet 12.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Qubit® Fluorometer \(thermofisher.com\)](#)
- 67 Quantabio. qScript® cDNA Synthesis Kit [Internett]. Beverly: Quantabio; 2018 [hentet 12.04.2021]. Tilgjengelig fra: [IFU-024.1 REV 02 95047 qScript cDNA Synthesis Kit \(quantabio.com\)](#)
- 68 Invitrogen. Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits [Internett]. Carlsbad: Invitrogen; 08.11.2017 [oppdatert 08.12.2020; hentet 12.04.2021]. Tilgjengelig fra: [Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits User Guide \(MAN0017455 Rev C.0\) \(thermofisher.com\)](#)
- 69 Origene. GAPDH Human qPCR Primer Pair (NM_002046) [Internett]. Rockville: Origene; [oppdatert 26.02.2021; hentet 18.04.2021]. Tilgjengelig fra: [GAPDH Human qPCR Primer Pair \(NM_002046\) – HP205798 | OriGene](#)
- 70 Origene. HPRT (HPRT1) Human qPCR Primer Pair (NM_000194) [Internett]. Rockville: Origene [oppdatert 26.02.2021; hentet 18.04.2021]. Tilgjengelig fra:

[HPRT \(HPRT1\) Human qPCR Primer Pair \(NM_000194\) – HP200179 | OriGene](#)

71 Origene. IL23 (IL23A) Human qPCR Primer Pair (NM_016584) [Internett]. Rockville: Origene [oppdatert 26.02.2021; hentet 18.04.2021]. Tilgjengelig fra:

[IL23 \(IL23A\) Human qPCR Primer Pair \(NM_016584\) – HP212280 | OriGene](#)

72 NCBI. Primer-BLAST [Internett]. Bethesda: NCBI [hentet 18.04.2021]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

73 Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer*. 2008;8:350.

74 Baird AM, Leonard J, Naicker KM, Kilmartin L, O’Byrne KJ, Gray SG. IL-23 is pro-proliferative, epigenetically regulated and modulated by chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2013;79(1):83-90.

75 Quantabio. PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® [Internett]. Beverly: Quantabio; 2018 [hentet 08.04.2021]. Tilgjengelig fra: [IFU-049.1 REV 02 95072 PerfeCTa SYBR Green FastMix \(quantabio.com\)](#)

A.0 Vedlegg

A.1 Produkter

Tabell 1. Tabellen viser en oversikt over artikkelnummer og leverandør for produkter.

Produkt	Artikkelnummer	Leverandør
2-Mercaptoethanol	31350-010	Gibco® by Life Technologies
Cellebrett	657160	Greiner Bio-one, cellstar®
Celleflaske 75 cm ²	734-2313	VWR®
Celleskrape	170808-233	VWR®
DHA	53171	Sigma-Aldrich®
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	D8537-500ML	Sigma-Aldrich®
Falconrør	352196	Falcon®
Fetal Bovine Serum One Shot™ format	A3160801	Gibco™
HaCat	T0020001	AddexBio Technologies
HBSS (1x)	SH30588.02	HyClone™
HEPES Buffer Souldution	15630-056	Gibco
Human TNF- α	300-01A-10UG	PeptoTech
L-glutamine	25-005-C1	Corning
Pencillin-Streptomycin	15140-148	Gibco® by Life Technologies™
PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® Low ROX	95074-250	Quantabio
PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®	733-1381	Quantabio
Primersekvenser	10336-022	Invitrogen

RNAlater™ Soln.	AM7021	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
RNeasy® Mini Kit (50)	74104	Qiagen
RPMI1640 (1X) + GlutaMAX™	21870-076	Gibco
RPMI1640 (1X) + GlutaMAX™	72400-047	Gibco
Sodium Pyruvate	11360-039	Gibco® by Life Technologies
Trypsin-EDTA (0,25%)	25200-056	Gibco by Life Technologies
qScript™ cDNA Synthesis Kit	95047-100	Quantabio qScript™
Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit	Q33231	Invitrogen
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Q32855	Invitrogen

A.2 Prosedyrene

A.2.1 Cellekultivering

Prosedyren er inspirert av en prosedyre som ble brukt i cellekurset i Anvend Bioteknologi 2020 (62).

Tillaging av medium

1. Til 500 mL RPMI-medium ble det tilsatt:
2. 0,5 mL Pen-Strep
3. 0,5 mL 2-Mercaptoetanol
4. 5,0 mL Natriumpyruvat
5. 50 mL Fetal Bovine Serum
6. Mediet ble vendt før bruk.

Splitting av celler

1. LAF-benken ble skrudd på 20 min før bruk. Overflatene ble sprayet med 70% etanol.
2. Konfluensen i celleflaskene fra inkubasjon ble studert i invertert mikroskop.
3. Flaskene ble tatt med inn i LAF-benken og gammelt medium ble fjernet.
4. Cellene ble vasket 2 ganger med 5 mL HBSS. HBSS ble senere i forsøksperioden byttet ut med PBS, da det ble tomt for HBSS på lageret.
5. 1 mL trypsin ble tilsatt og det ble sørget for at alle celler var dekt. Cellene ble trypsinert i 15-20 min, under observasjon i mikroskop.
6. Når 70-80% av cellene var løst fra overflaten, ble flaskene tatt tilbake i LAF-benken og tilsatt 5 mL medium for å stoppe trypsineringen.
7. Cellesuspensjonen ble blandet forsiktig og overført til Falconrør.
8. Røret ble sentrifugert på 1200 rpm i 3 min.
9. Supernatanten ble fjernet inne i LAF-benken.
10. 2 mL medium ble tilsatt for å løse pelleten, og forsiktig blandet ved å pipettere opp og ned.
11. 4 mL medium ble tilsatt til suspensjonen og blandet inn med pipetten.
12. 2 nye celleflasker med medium ble tillaget, og tilsatt suspensjon. Volumet av medium og suspensjon var avhengig av konfluens og inkubasjonstid. Ved optimal konfluens (70-80%) og 2 dagers inkubasjonstid, ble 18 mL medium og 2 mL suspensjon brukt.

Ved litt høy konfluens eller lengre inkubasjonstid, ble 18,8 mL medium og 1,2 mL cellesuspensjon brukt. Medium og cellesuspensjon ble blandet forsiktig inn ved å bevege på flaskene.

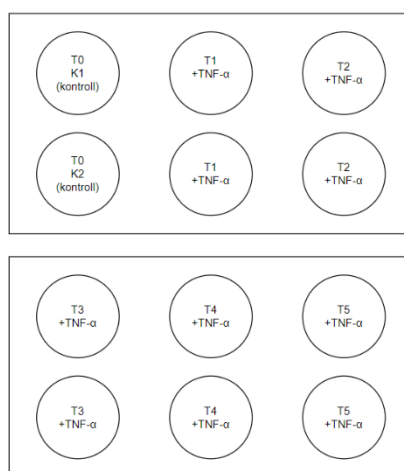
13. Kulturflaskene ble satt tilbake i inkubatoren.

I liten celleflaske (25 cm²)

1. LAF-benken ble skrudd på 20 min før bruk. Overflatene ble sprayet med 70% etanol.
2. Konfluensen i de gamle celleflaskene ble studert i invertert mikroskop.
3. Flaskene ble tatt med inn i LAF-benken og gammelt medium ble fjernet.
4. Cellene ble vasket 2 ganger med 3 mL PBS.
5. 0,5 mL trypsin ble tilsatt og det ble sørget for at alle celler var dekt. Cellene ble trypsinert i 10-15 min, under observasjon i mikroskop.
6. Når 70-80% av cellene var løsnet fra overflaten, ble flaskene tatt tilbake i LAF-benken og tilsatt 4 mL medium for å stoppe trypsineringen.
7. Cellesuspensjonen ble blandet forsiktig og overført til Falconrør.
8. Røret ble sentrifugert på 1200 rpm i 3 min.
9. Supernatanten ble fjernet inne i LAF-benken.
10. 3 mL medium ble tilsatt for å løsne pelleten, og forsiktig blandet ved å pipettere opp og ned.
11. 2 nye celleflasker med 6 mL medium ble tillaget. 1 mL av suspensjonen ble tilsatt i hver av de nye celleflaskene, og blandet forsiktig inn ved å bevege på flaskene.
12. Kulturflaskene ble satt tilbake i inkubatoren.

A.2.2 Indusering med TNF- α , optimaliseringsforsøk

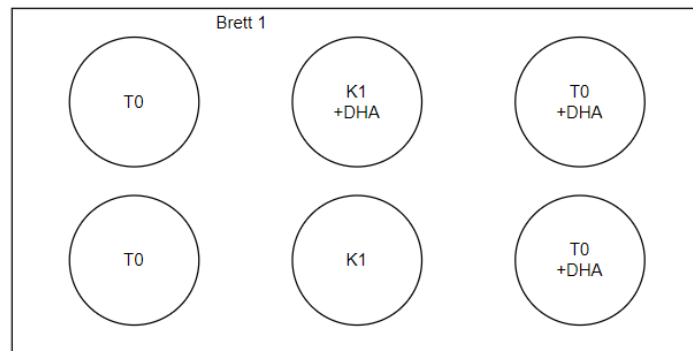
1. Ved konfluens i celleflasken på 70-80%, ble cellene sådd over på to brett med 6 brønner ved at 0,25 mL cellesuspensjon og 5,75 mL RPMI-medium ble tilsatt i hver sin brønn.
2. Resten av cellesuspensjonen ble sentrifugert, supernatanten ble fjernet, og pelleten ble resuspendert i 1 mL RNA Later. Røret ble satt i kjøleskap, denne prøven ble brukt til optimalisering av temperatur og primerkonsentrasjon.
3. Cellebrettene ble satt til inkubasjon i 37°C med 5% CO₂, i 23 timer.
4. Cellebrettene ble tatt ut fra inkubator og celleveksten ble studert i invertert mikroskop. Konfluensen ble anslått til 70%.
5. Mediet ble fjernet i to av brønnene (T0), og cellene ble vasket med 2 mL HBSS.
6. 1,5 mL RNA Later ble tilsatt til de to kontrollbrønnene. Celleskrape ble brukt for å løsne cellene fra bunnen av brønnene. Innholdet i brønnene ble pipettert over i hvert sitt Falconrør og satt i kjøleskap.
7. 1,2 μ L TNF- α (10 ng/mL) og 6 mL RPMI-medium ble tilsatt til 10 av 12 brønner, og innholdet ble blandet forsiktig med sirkelbevegelser i LAF-benken.
8. Brettene ble satt til inkubasjon.
9. Hver time, i 5 timer, ble medium fjernet i to behandlede brønner, cellene ble vasket med 2 mL HBSS, og tilsatt 1,5 mL RNA Later.
10. Celleskrape ble brukt for å løsne cellene fra bunnen av brønnene.
11. Innholdet i brønnene ble pipettert over i hvert sitt Falconrør og satt i kjøleskap. Før RNA-isolering ble rørene sentrifugert på 1200 rpm i 5 min.



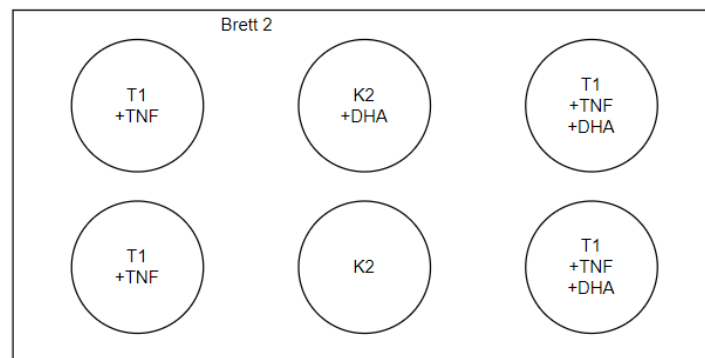
Figur 1. Brønnoppsett for optimaliseringsforsøket.

A.2.3 Indusering med TNF- α , hovedeksperiment

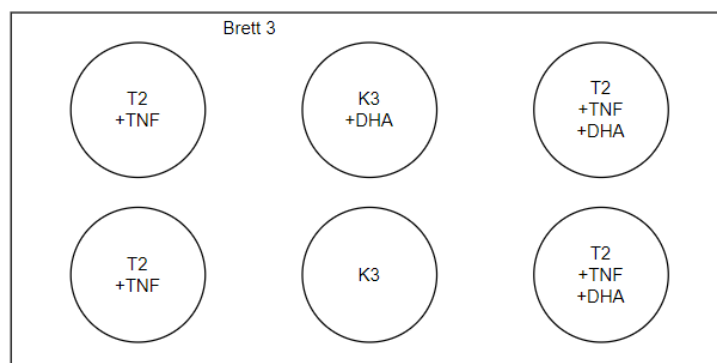
1. Det ble laget til RPMI-medium med 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DHA. I den første fortynningen ble det først laget medium med 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DHA ved å tilsette alt volumet fra DHA-beholderen til et Falconrør med 50 mL RPMI-medium. Dette ble blandet godt med en vortexer. For å få riktig konsentrasjon ble det pipettert 1,25 mL fra dette falconrøret over i et nytt Falconrør med 48,75 mL RPMI-medium.
2. Cellene ble sådd over på fire brett med 6 brønner ved at 0,25 mL celleduspensjon og 5,75 mL RPMI-medium med og uten DHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ble tilsatt i hver sin brønn (Figur 2, 3, 4 og 5). Celleflaskene hadde en konfluens på 90% når de ble sådd over på cellebrett.
3. Cellebrettene ble satt til inkubasjon i 37°C med 5% CO₂, i 24 timer.
4. Cellebrettene ble tatt ut fra inkubator og celleveksten ble studert i invertert mikroskop.
5. Celleskraper ble brukt for å løsne cellene fra bunnen av brønnene på brett 1 (Figur 2). Innholdet i brønnene ble pipettert over i hvert sitt Falconrør og sentrifugert på 1200 rpm i 3 min.
6. På hvert brett ble mediet fjernet i kontrollbrønnene, og det ble tilsatt 6 mL nytt RPMI-medium med og uten DHA i henhold til Figur 3, 4 og 5.
7. Til brønnene med TNF- α ble mediet fjernet og tilsatt 1,2 μL TNF- α (10 ng/mL) og 6 mL RPMI-medium (Figur 3, 4 og 5). Innholdet ble blandet forsiktig med sirkelbevegelser i LAF-benken.
8. Til brønnene med TNF- α og DHA ble mediet fjernet og det ble tilsatt 1,2 μL TNF- α (10 ng/mL) og 6 mL RPMI-medium med DHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figur 3, 4 og 5). Innholdet ble blandet forsiktig med sirkelbevegelser i LAF-benken.
9. De resterende brettene ble satt til inkubasjon.
10. Hver time, i 3 timer, ble celleskraper brukt for å løsne cellene fra bunnen av brønnene av ett brett.
11. Innholdet i brønnene ble pipettert over i hvert sitt Falconrør og sentrifugert på 1200 rpm i 3min.



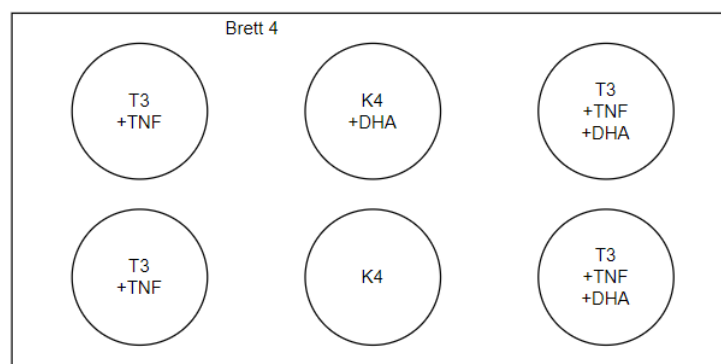
Figur 2. Brønnoppsett brett 1.



Figur 3. Brønnoppsett brett 2.



Figur 4. Brønnoppsett brett 3.



Figur 5. Brønnoppsett brett 4.

A.2.4 RNA-isolering

For å utforme prosedyren for RNA-isolering, ble RNeasy® Mini Kit (50) og protokollen fra RNeasy Mini Handbook som heter «Protocol: Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology», s.27-34, brukt (64). For å måle RNA-konsentrasjon ble Qubit™ RNA HS Assay Kit brukt (65). Instrumentet som ble brukt, var Invitrogen™ Qubit® fluorometer (65).

1. Supernatanten ble fjernet etter sentrifugering. Falconrøret ble knipset på for å løse opp cellepelletten.
2. 350 µL RLT lyseringsbuffer ble tilsatt, og røret ble vortexet i 1 min.
3. 350 µL 70% etanol ble tilsatt til alle rørene.
4. 700 µL av prøvene ble overført til hver sin RNeasy spinnkolonne i et samlerør.
5. Lokket på kolonnene ble lukket, og løsningene sentrifugert i 15 sek ved 8000x g (10 000 rpm). Væsken som hadde gått gjennom kolonnen og ned i samlerøret ble slått ut, og røret ble satt tilbake på kolonnen.
6. 700 µL Buffer RW1 ble tilsatt i kolonnen, lokket ble lukket, og løsningen ble sentrifugert i 15 sek ved 10 000 rpm for å vaske spinnkolonnemembranen. Væsken i samlerøret ble slått ut, og det ble satt tilbake på kolonnen.
7. 500 µL Buffer RPE ble tilsatt i RNeasy spinnkolonnen, lokket ble lukket, og løsningen ble sentrifugert i 15 sek ved 10 000 rpm. Væsken i samlerøret ble slått ut, før det ble satt tilbake på kolonnen.
8. 500 µL Buffer RPE ble tilsatt i RNeasy spinnkolonnen, lokket ble lukket, og røret ble sentrifugert i 2 min på 10 000 rpm.
9. Et nytt samlerør ble satt på kolonnen, og den ble sentrifugert ved 10 000 rpm i 1 min.
10. RNeasy spinnkolonnen ble plassert i et nytt Eppendorfrør på 1,5 mL. 20 µL RNase-fritt vann ble tilsatt midt på spinnkolonnemembranen, dette ble gjort to ganger. Lokket ble lukket, og røret sentrifugert ved 10 000 rpm i 1 min. Elueringsvolumet ble etter optimaliseringen endret til 2 ganger 40 µL på grunn av høy RNA-konsentrasjon.

Qubit RNA HS Assay

1. Working solution (WS) ble laget ved å tilsette RNA HS reagent og RNA buffer i forholdet 1:200 i et Qubit-rør for hver prøve.

2. 190 μL WS ble tilsatt i hvert sitt Qubit-rør, og 10 μL av hver standard ble tilsatt i hvert sitt rør. Dette ble inkubert i romtemperatur i 2 min.
3. Standardløsningene ble lest av ved å bruke «Qubit RNA» i Qubit™ Fluorometeret. «Run new calibration» ble valgt ved å trykke «Go», og standardene ble analysert ved å på nytt trykke «Go» for hver av standardene.
4. For å analysere prøvene ble 1 μL RNA tilsatt til 199 μL WS, og dette ble vortexet og puls-spunnet. Prøvene ble inkubert i romtemperatur i 2 min. Prøvene ble plassert i instrumentet og analysert ved å trykke «Go». Det ble justert for volum tilsatt RNA for å få svaret oppgitt i riktig konsentrasjon.
5. Verdiene for prøvene ble notert og de ble lagt i fryseren.

A.2.5 cDNA-syntese

Det ble brukt Quantabio sitt qScript™ cDNA Synthesis Kit (67) og Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (68). Instrumentet som ble brukt, var Invitrogen™ Qubit® fluorometer (66).

1. Alle frosne komponenter ble tint, vortexet og spunnet ned før lokket ble åpnet.
2. Alle komponentene ble plassert på is.
3. Følgende ble tilsatt til et PCR-rør på 0,2 mL:

Tabell 2. Volum av komponenter tilsatt i hver brønn.

Komponenter	Volum (µL)
RNA (10 pg til 1 µg total RNA)	Variabel
Nukleasefritt vann	Variabel
qScript Reaksjonsmiks (5X)	4,0
qScript RT	1,0
Totalt volum	20,0

4. Røret ble vortexet forsiktig, etterfulgt av 10 sekunder lett sentrifugering
5. Rørene ble plassert i en termosyklus med følgende program:

Tabell 3. Syklusprogram for cDNA-syntese.

Syklus	Tid (min)	Temperatur (°C)
1 syklus	5	22
1 syklus	30	42
1 syklus	5	85
Hold	∞	4

6. Programmet ble startet.

Qubit DNA HS Assay

1. 190 µL Working Solution (WS) ble tilsatt i to Qubit-rør, og 10 µL av hver standard ble tilsatt i hvert sitt rør. Dette ble inkubert i romtemperatur i 2 min.
2. En og en standardløsning ble plassert i Qubit™ Fluorometer, og programmet «Qubit dsDNA HS» ble brukt. «Run new calibration» ble valgt ved å trykke «Go», og standardene ble analysert ved å på nytt trykke «Go».

3. For å analysere prøvene ble 1 μ L DNA tilsatt til 199 μ L WS, og løsningen ble vortexet og puls-spunnet. Prøvene ble inkubert i romtemperatur i 2 min. Prøvene ble plassert i instrumentet og analysert ved å trykke «Go». Det ble justert for volum tilsatt cDNA for å få svaret oppgitt i rett konsentrasjon.
4. Verdien ble notert.

A.2.6 Optimalisering av temperatur

1. Primere fra stock (100 000 nM) ble fortynnet til 10 000nM, ved å blande 90 μL RNasefritt vann med 10 μL av primeren. Dette ble gjort både for forward og reverse primer for IL-23, GAPDH og HPRT.
2. Følgende komponenter ble tilsatt til hver brønn på et qPCR-brett (se tabell 4 og 7):

Tabell 4. Volum av reagens tilsatt i hver brønn. Dette avviker fra protokollen for SYBR Green reaksjonsmiks, men volumene er optimalisert for laboratoriet og instrumentet (75).

Komponent	Volum (μL)
SYBR Green	7,5
RNasefritt vann	5,5
Primer forward	0,75
Primer reverse	0,75
cDNA	0,5
Totalt volum	15

I brønnene merket «NTC» i brønnoppsettet (Tabell 7), ble det ikke tilsatt cDNA.

Disse brønnene var negativ kontroll.

3. Tilsetning av 0,75 μL primere i totalt 15 μL reaksjonsvolum ble gjort for å oppnå 500 nM konsentrasjon.
4. PCR-film ble lagt på brettet og strøket utover med en utstryker.
5. Væsken ble spunnet med en platesentrifuge i 30 sekunder.
6. Brettet ble plassert i Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR.
7. Instrumentet ble stilt inn med følgende oppsett:
 - a. 7500 (96 wells)
 - b. Quantitation – Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)
 - c. SYBR® Green Reagents
 - d. Standard (~ 2 hours to complete a run)
8. Følgende program med 35 sykluser ble brukt til amplifiseringen:

Tabell 5. Syklusprogram på qPCR for amplifisering.

Syklus	Tid (s, sekunder)	Temperatur (°C)
Denaturering	15	95
Hybridisering	20	Variabel (57-59)
Elongering	30	72

9. Etter fullført amplifisering ble det automatisk utført en smeltepunktsanalyse:

Tabell 6. Program på qPCR for smeltepunktsanalysen.

Steg	Tid (s, sekunder)	Temperatur (°C)
Steg 1	15	95
Steg 2	60	60
Steg 3	30	95
Steg 4	15	60

10. Resultatet ble lagret på en minnebrikke som en «7500 single experiment document».

Tabell 7. PCR-oppsett for optimalisering av temperatur.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C				NTC F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 6 µL	HaCaT F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	HaCaT F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	HaCaT F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	NTC F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 6 µL				
D				NTC F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 6 µL	HaCaT F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	HaCaT F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	HaCaT F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	NTC F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 6 µL				
E				NTC F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 6 µL	A549 F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	A549 F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	A549 F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 5,5 µL	NTC F: 0,75 µL R: 0,75 µL H2O: 6 µL				
F												
G												
H												

GAPDH
 HPRT
 IL-23
 SYBR Green reaction mix: 7.5 µL i hver brønn

A.2.7 Optimalisering av primerkonsentrasjon

1. Primere fra stock (100 000 nM) ble fortynnet til 3 000 nM, ved å blande 97 μL RNasefritt vann med 3 μL av primeren. Dette ble gjort både for forward og reverse primer for IL-23, GAPDH og HPRT.
2. Følgende komponenter ble tilsatt til hver brønn på et qPCR-brett:

Tabell 8. Volum av reagens tilsatt i hver brønn.

Komponent	Volum (μL)
SYBR Green	7,5
RNasefritt vann	Variabel
Primer forward	Variabel
Primer reverse	Variabel
cDNA	1
Totalt volum	15

I brønnene merket «NTC» i brønnoppsettet (Tabell 12 og 13), ble det ikke tilsatt cDNA. Disse brønnene var negativ kontroll.

3. Volum av forward og reverse primer ble tilsatt i henhold til brønnoppsettet (Tabell 12 og 13).

Tabell 9. Volum for de ulike primerkonsentrasjonene.

Primerkonsentrasjon (nM)	Volum (μL)
300	1,5
400	2
500	2,5

4. RNasefritt vann ble tilsatt slik at det var 15 μL i hver brønn.
5. PCR-film ble lagt på brettet og strøket over med en utstryker.
6. Væsken ble spunnet ned med en platesentrifuge i 30 sekunder.
7. Brette ble plassert i Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR.
8. Instrumentet ble stilt inn med følgende oppsett:
 - a. 7500 (96 wells)
 - b. Quantitation – comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)

- c. SYBR® Green Reagents
- d. Standard (~ 2 hours to complete a run)

9. Følgende program med 35 sykluser ble brukt til amplifisering:

Tabell 10. Syklusprogram på qPCR for amplifisering.

Syklus	Tid (s, sekunder)	Temperatur (°C)
Denaturering	15	95
Hybridisering	20	57
Elongering	30	72

10. Etter fullført amplifisering ble det automatisk utført en smeltepunktsanalyse:

Tabell 11. Program på qPCR for smeltepunktsanalysen.

Steg	Tid (s, sekunder)	Temperatur (°C)
Steg 1	15	95
Steg 2	60	60
Steg 3	30	95
Steg 4	15	60

11. Resultatet ble lagret på en minnebrikke som «7500 single experiment document».

Tabell 12. PCR-oppsett for GAPDH og IL-23.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		F: 300 nM R: 300 nM H2O: 3.5 µL	F: 300 nM R: 300 nM H2O: 3.5 µL	F: 400 nM R: 300 nM H2O: 3.0 µL	F: 400 nM R: 300 nM H2O: 3.0 µL	F: 500 nM R: 300 nM H2O: 2.5 µL	F: 500 nM R: 300 nM H2O: 2.5 µL	NTC F: 300 nM R: 300 nM H2O: 4.5 µL	NTC F: 300 nM R: 300 nM H2O: 4.5 µL			
C		F: 300 nM R: 400 nM H2O: 3.0 µL	F: 300 nM R: 400 nM H2O: 3.0 µL	F: 400 nM R: 400 nM H2O: 2.5 µL	F: 400 nM R: 400 nM H2O: 2.5 µL	F: 500 nM R: 400 nM H2O: 2.0 µL	F: 500 nM R: 400 nM H2O: 2.0 µL	NTC F: 400 nM R: 400 nM H2O: 3.5 µL	NTC F: 400 nM R: 400 nM H2O: 3.5 µL			
D		F: 300 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	F: 300 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	F: 400 nM R: 500 nM H2O: 2.0 µL	F: 400 nM R: 500 nM H2O: 2.0 µL	F: 500 nM R: 500 nM H2O: 1.5 µL	F: 500 nM R: 500 nM H2O: 1.5 µL	NTC F: 500 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	NTC F: 500 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL			
E		F: 300 nM R: 300 nM H2O: 3.5 µL	F: 300 nM R: 300 nM H2O: 3.5 µL	F: 400 nM R: 300 nM H2O: 3.0 µL	F: 400 nM R: 300 nM H2O: 3.0 µL	F: 500 nM R: 300 nM H2O: 2.5 µL	F: 500 nM R: 300 nM H2O: 2.5 µL	NTC F: 300 nM R: 300 nM H2O: 4.5 µL	NTC F: 300 nM R: 300 nM H2O: 4.5 µL			
F		F: 300 nM R: 400 nM H2O: 3.0 µL	F: 300 nM R: 400 nM H2O: 3.0 µL	F: 400 nM R: 400 nM H2O: 2.5 µL	F: 400 nM R: 400 nM H2O: 2.5 µL	F: 500 nM R: 400 nM H2O: 2.0 µL	F: 500 nM R: 400 nM H2O: 2.0 µL	NTC F: 400 nM R: 400 nM H2O: 3.5 µL	NTC F: 400 nM R: 400 nM H2O: 3.5 µL			
G		F: 300 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	F: 300 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	F: 400 nM R: 500 nM H2O: 2.0 µL	F: 400 nM R: 500 nM H2O: 2.0 µL	F: 500 nM R: 500 nM H2O: 1.5 µL	F: 500 nM R: 500 nM H2O: 1.5 µL	NTC F: 500 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	NTC F: 500 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL			
H												

GAPDH
 IL-23
 SYBR Green reaction mix: 7.5 µL i hver brønn

Tabell 13. PCR-oppsett for HPRT.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		F: 300 nM R: 300 nM H2O: 3.5 µL	F: 300 nM R: 300 nM H2O: 3.5 µL	F: 400 nM R: 300 nM H2O: 3.0 µL	F: 400 nM R: 300 nM H2O: 3.0 µL	F: 500 nM R: 300 nM H2O: 2.5 µL	F: 500 nM R: 300 nM H2O: 2.5 µL	NTC F: 300 nM R: 300 nM H2O: 4.5 µL	NTC F: 300 nM R: 300 nM H2O: 4.5 µL			
C		F: 300 nM R: 400 nM H2O: 3.0 µL	F: 300 nM R: 400 nM H2O: 3.0 µL	F: 400 nM R: 400 nM H2O: 2.5 µL	F: 400 nM R: 400 nM H2O: 2.5 µL	F: 500 nM R: 400 nM H2O: 2.0 µL	F: 500 nM R: 400 nM H2O: 2.0 µL	NTC F: 400 nM R: 400 nM H2O: 3.5 µL	NTC F: 400 nM R: 400 nM H2O: 3.5 µL			
D		F: 300 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	F: 300 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	F: 400 nM R: 500 nM H2O: 2.0 µL	F: 400 nM R: 500 nM H2O: 2.0 µL	F: 500 nM R: 500 nM H2O: 1.5 µL	F: 500 nM R: 500 nM H2O: 1.5 µL	NTC F: 500 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL	NTC F: 500 nM R: 500 nM H2O: 2.5 µL			
E												
F												
G												
H												



HPRT

SYBR Green reaction mix: 7.5 µL i hver brønn

A.2.8 qPCR

1. Primersettene for IL-23, GAPDH og HPRT ble fortynnet til 3 000 nM ved å blande 97 μL RNasefritt vann med 3 μL primer i hvert sitt Eppendorfrør.
2. Følgende komponenter ble tilsatt til hver brønn på et qPCR-brett:

Tabell 14. Volum av komponenter tilsatt i hver brønn. Dette avviker fra protokollen for SYBR Green reaksjonsmiks, men volumene er optimalisert for laboratoriet og instrumentet (75).

Komponent	Volum (μL)
Forward primer	variabel
Reverse primer	variabel
RNasefritt vann	variabel
SYBR Green	7,5
DNA templat	1
Totalt	15

3. PCR-film ble lagt på brettet og strøket utover med en utstryker.
4. Væsken ble spunnet ned med en platesentrifuge i 30 sekunder.
5. Brettet ble plassert i instrumentet Applied BiosystemsTM 7500 Real-Time PCR.
6. Instrumentet ble stilt inn med følgende oppsett:
 - a. 7500 (96 wells)
 - b. Quantitation – Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)
 - c. SYBR® Green Reagents
 - d. Standard (~ 2 hours to complete a run)
7. Følgende program med 35 sykluser ble brukt til amplifisering:

Tabell 15. Syklusprogram på qPCR for amplifisering.

Syklus	Tid (sek)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
Denaturering	15	95
Hybridisering	20	57
Elongering	30	72

8. Etter fullført amplifisering ble det automatisk utført en smeltepunktsanalyse:

Tabell 16. Program på qPCR for smeltepunktsanalysen.

Steg	Tid (sek)	Temperatur (°C)
Steg 1	15	95
Steg 2	60	60
Steg 3	30	95
Steg 4	15	60

9. Resultatet ble lagret på en minnebrikke som «7500 single experiment document».

A.3 Store tabeller og resultater

A.3.1 Qubitanalyse av RNA-konsentrasjoner – optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment

Tabell 17. RNA-konsentrasjoner målt med Qubit fra optimaliseringsforsøket og hovedeksperimentet. I optimaliseringsforsøket ble prøve T2(2) fortynnet i forholdet 1:2, med 7,5 μL RNA-prøve og 7,5 μL RNase-fritt vann for å oppnå en konsentrasjon under 1 μg pr. 15 μL . I hovedforsøket ble alle prøvene fortynnet i forholdet 1:3 bortsett fra K1 (uten DHA). For å fortynne disse prøvene ble det tilsatt 5 μL RNA-prøve og 10 μL RNase-fritt vann.

	$\mu\text{g/mL}$ (/1000 x200)	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$, (/1000)	μg pr. 15 μL , (x15)
Optimaliseringsforsøk			
T0	10,5	0,0105	0,1575
T1(1)	4,6	0,0046	0,069
T1(2)	49,2	0,0492	0,738
T2(1)	54,9	0,0549	0,8235
T2(2)	77,8	0,0778	1,167
T3(1)	38,8	0,0388	0,582
T3(2)	30,4	0,0304	0,456
T4(1)	44,5	0,0445	0,6675
T4(2)	34,1	0,0341	0,5115
T5(1)	37,7	0,0377	0,5655
T5(2)	60,3	0,0603	0,9045
K	54,0	0,054	0,81
Prøve uten DHA			
T0 (1)	140	0.140	2.1
T0 (2)	100	0.100	1.5
T1 (1)	160	0.160	2.4
T1 (2)	120	0.120	1.8
T2 (1)	140	0.140	2.1
T2 (2)	110	0.110	1.65
T3 (1)	110	0.110	1.65
T3 (2)	110	0.110	1.65
K1	51,6	0.0516	0.774
K2	130	0.130	1.95
K3	150	0.150	2.25
K4	100	0.100	1.5
Prøve med DHA			
T0 (1)	110	0.110	1.65
T0 (2)	170	0.170	2.55
T1 (1)	100	0.100	1.5
T1 (2)	120	0.120	1.8
T2 (1)	130	0.130	1.95
T2 (2)	150	0.150	2.25
T3 (1)	86,3	0.0863	1.29

T3 (2)	140	0.140	2.1
K1	140	0.140	2.1
K2	120	0.120	1.8
K3	160	0.160	2.4
K4	120	0.120	1.8

A.3.2 Qubitanalyse av cDNA-konsentrasjoner – optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment

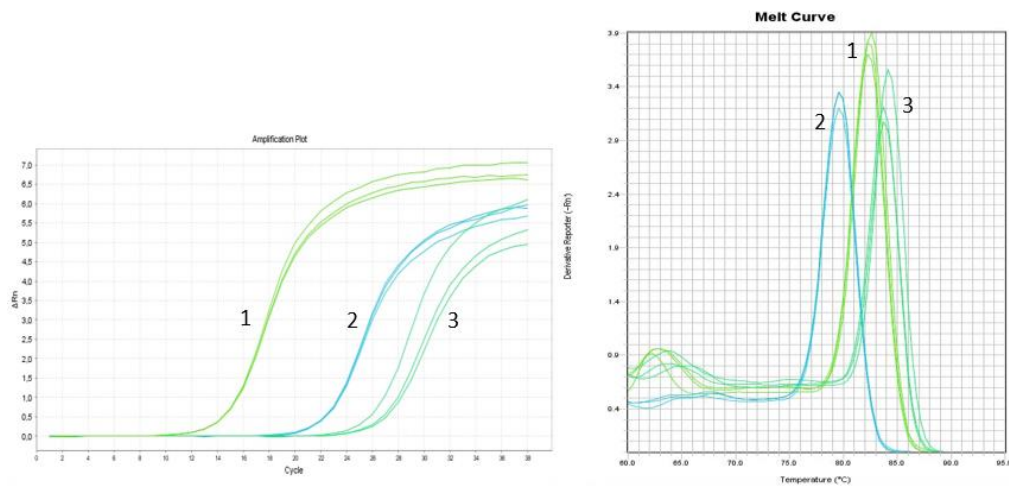
Tabell 18. Qubit-verdier av cDNA fra optimaliseringsforsøket og hovedeksperimentet med og uten DHA-behandling. 50 µL fra første fortykning ble fortennet med 50 µL vann.

	Qubit etter cDNA-syntese (µg/mL)	C1 (pg/µL)	1. fort. cDNA (µL)	1. fort. Vann (µL)	Qubit 2 (ng/mL)	Endelig konsentrasjon (pg/µL)
Optimaliseringsforsøket						
T0	8,12	8120	7,4	92,6	12,5	205
T1(1)	4,8	4800	12,6	87,4	13,4	268
T1 (2)	5,55	5550	10,8	89,2	13	260
T2 (1)	6,59	6590	9,2	90,8	12,3	246
T2 (2)	3,9	3900	15,4	84,6	12	240
T3(1)	5,61	5610	10,8	89,2	13,1	262
T3 (2)	4,84	4840	12,4	87,6	11,7	234
T4 (1)	5,21	5210	11,6	88,4	13,2	264
T4 (2)	5,51	5510	11	89	11,7	234
T5 (1)	5,37	5370	11,2	88,8	11,4	228
T5 (2)	8,77	8770	6,8	93,2	10,5	210
K	2,84	2840	21,2	78,8	9,97	199,4
Prøver uten DHA						
T0 (1)	4,46	4460	14	86	13,1	262
T0 (2)	5,24	5240	11	89	9,3	186
T1 (1)	6,19	6190	10	90	9,52	190,4
T1 (2)	2,95	2950	20	80	10,1	202
T2 (1)	7,64	7640	8	92	9,47	189,4
T2 (2)	6,72	6720	9	91	12,4	248
T3 (1)	5,53	5530	11	89	13,1	262
T3 (2)	2,57	2570	12	88	10,3	206
K1	11,2	11200	5	95	3,99	79,8
K2	7,71	7710	8	92	6,11	122,2
K3	5,39	5390	11	89	15,6	312
K4	5,52	5520	11	89	9,68	193,6
Prøver med DHA						
T0 (1)	2,63	2630	11	89	15,2	304
T0 (2)	3,94	3940	15	85	16,1	322
T1 (1)	4,03	4030	15	85	15,6	312
T1 (2)	4,98	4980	12	88	13,6	272
T2 (1)	6,15	6150	10	90	12,3	246
T2 (2)	4,27	4270	14	86	12,2	244
T3 (1)	4,67	4670	13	87	13,2	264
T3 (2)	5,39	5390	11	89	13,8	276
K1	2,87	2870	10	90	12,3	246
K2	3,6	3600	17	83	17,5	350

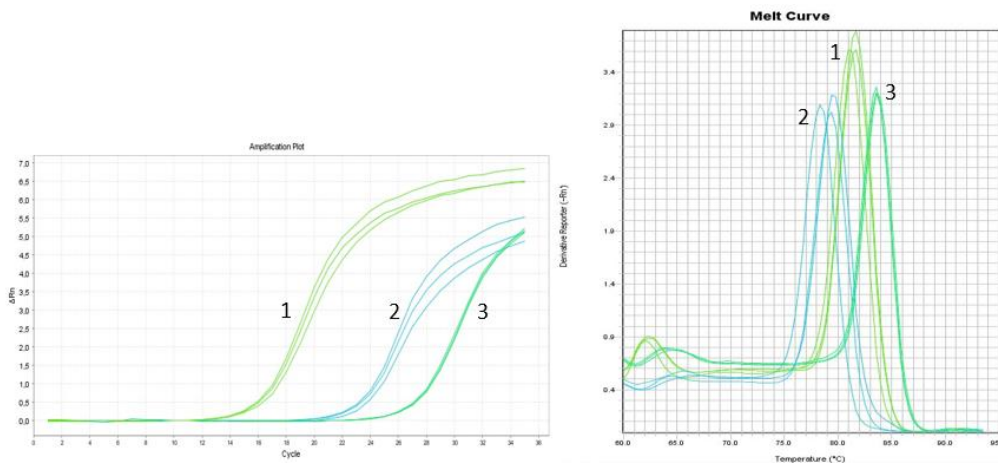
K3	7,22	7220	8	92	12,5	250
K4	3,51	3510	17	83	17,8	356

A.3.3 Primeroptimalisering for GAPDH, HPRT og IL-23

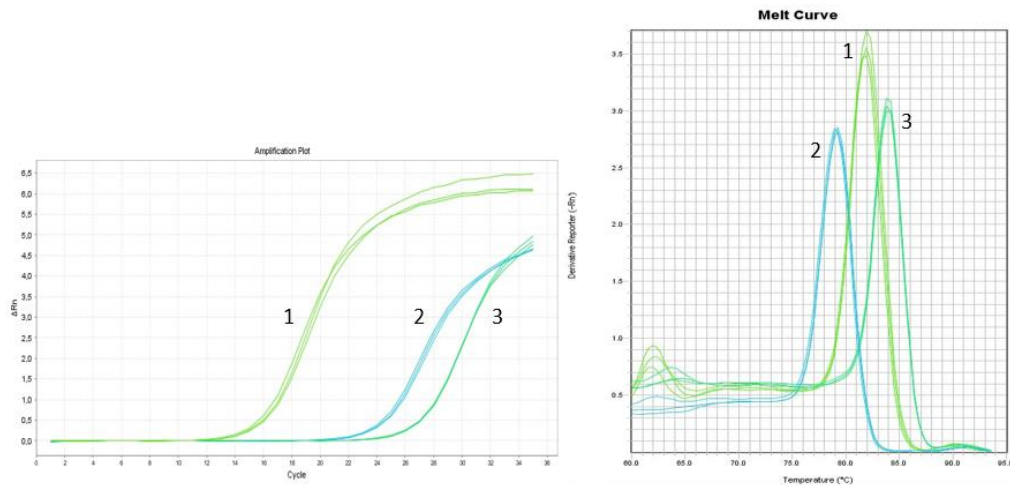
A.3.3.1 Optimalisering av hybridiseringstemperatur



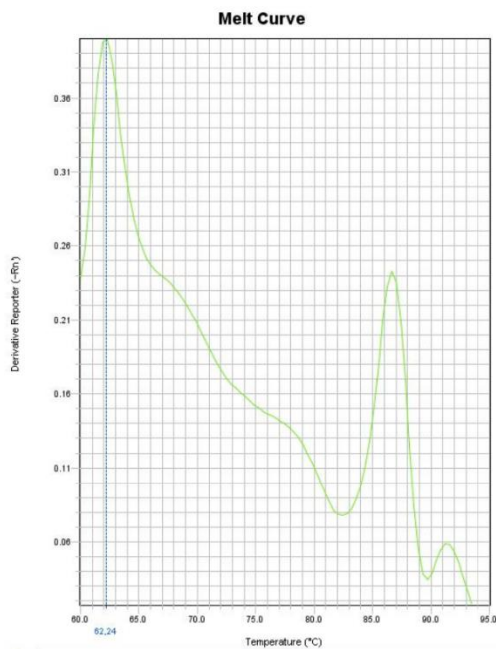
Figur 6. Amplifikasjonsplott og smeltepunktanalyse ved 58°C med GAPDH (1), HPRT (2) og IL-23 (3) som referansegen. Amplifikasjonsplottet er presentert med ΔRn mot syklusnummer, og smeltepunktskurven med $-Rn'$ mot temperatur i °C.



Figur 7. Amplifikasjonsplott og smeltepunktanalyse ved 59°C med GAPDH (1), HPRT (2) og IL-23 (3) som referansegen. Amplifikasjonsplottet er presentert med ΔRn mot syklusnummer, og smeltepunktskurven med $-Rn'$ mot temperatur i °C.

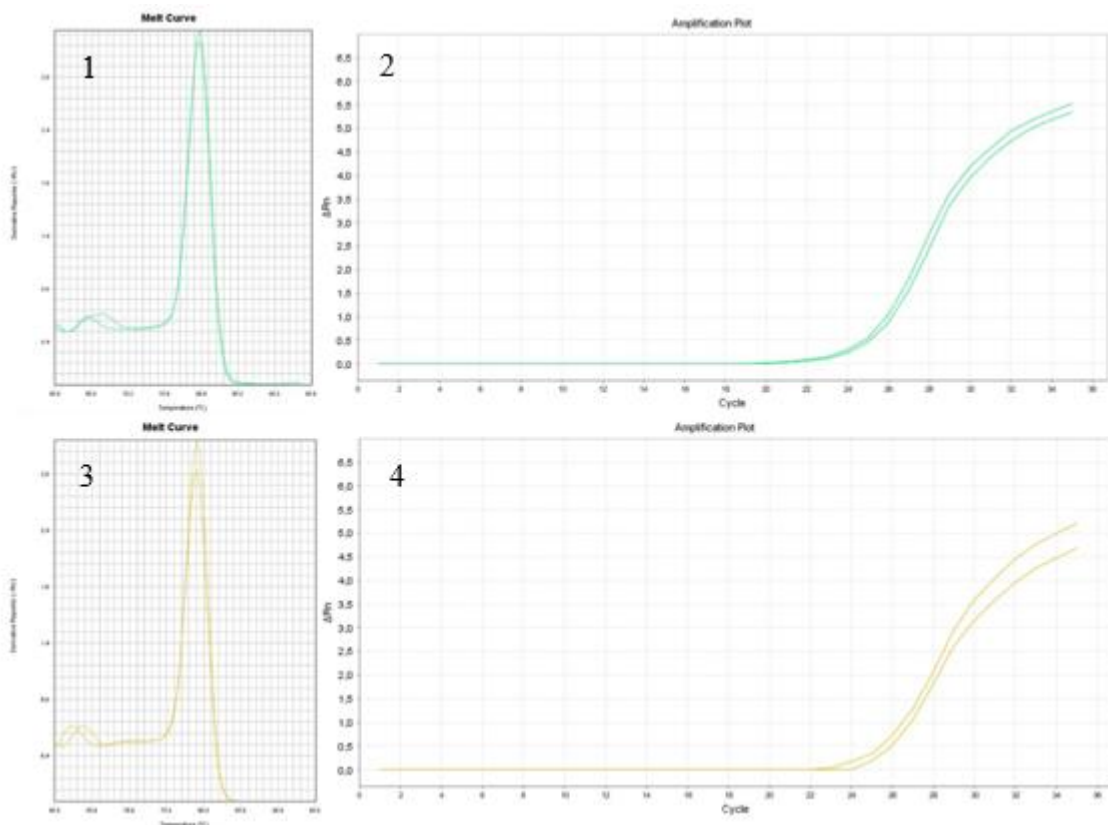


Figur 8. Amplifikasjonsplott og smeltepunktsanalyse ved 57°C med GAPDH (1), HPRT (2) og IL-23 (3) som referansegen. Amplifikasjonsplottet er presentert med ΔRn mot syklusnummer, og smeltepunktskurven med $-Rn'$ mot temperatur i °C.



Figur 9. Smeltekurve ved 59°C for NTC med GAPDH som referansegen. Smeltepunktskurven er presentert med $-Rn'$ mot temperatur i °C. Kurven viser 2 tydelige topper der den ene har en lav T_m -verdi på 62,24°C, og en mindre topp med høyere T_m -verdi på 86,5°C.

A.3.3.2 Optimalisering av primerkonsentrasjon



Figur 10. Eksempel på smeltepunktsskurve (1) og amplifikasjonsplott (2) for en primerkonsentrasjon som ble benyttet. Eksempel på smeltepunktsskurve (3) og amplifikasjonsplott (4) for en primerkonsentrasjon som ikke ble benyttet. 1 og 2 er HPRT ved 500/500 nM, og 3 og 4 er HPRT ved 300/300 nM.

A.3.4 Smeltepunktsanalyser – temperaturoptimalisering, optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment

A.3.4.1 *T_m*-verdier fra temperaturoptimalisering ved 57°C

Tabell 19. *T_m*-verdier fra temperaturoptimaliseringsforsøket oppgitt i °C. Verdiene kommer fra analysen med hybridiseringstemperatur på 57°C, der det ble brukt SYBR Green reaksjonsmiks med Low ROX.

	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3
GAPDH	81,72	81,9	81,9
HPRT	79,07	79,26	79,07
IL-23A	83,98	83,98	83,98

A.3.4.2 T_m-verdier fra optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment

Tabell 20. T_m-verdier fra hovedeksperimentet, med og uten DHA, oppgitt i °C. Prøvene med verdier som er markert i gult er ekskludert, enten på grunn av T_m-verdi, eller på grunn av C_T-verdi. For de tomme feltene ble prøven ekskludert i bearbeidingen av resultatene, eller ikke analysert.

Prøve	GAPDH				HPRT				IL-23A			
Optimaliseringsforsøk												
T0	81,27	81,65			78,99	79,18			83,74			
T1(1)	81,46	81,27			79,18	78,8			83,55	83,55		
T1(2)	81,46	81,46							83,74	83,36		
T2(1)	81,27	80,7			78,8	78,61			83,55	83,55		
T2(2)	81,65	81,46			78,99	79,18			83,74	83,55		
T4(1)	81,46	81,65			79,18	79,18			83,74			
T4(2)	81,46	81,65			79,18	78,99				83,17		
K	81,27	80,89			78,8	78,99			83,55	83,55		
Uten DHA												
Prøve	GAPDH				HPRT				IL-23A			
T0(1)	81,27	81,84	80,88	80,69	78,8	78,61	78,03	78,41	83,17	83,17	82,59	82,97
T0(2)	82,03	81,84	81,07	81,07	78,61	78,8	77,84	78,6	82,98	82,98	82,4	82,78
T1(1)	81,65	81,46	80,88	80,88	78,99	78,99	78,41	78,79	83,36	83,36	83,35	83,16
T1(2)	81,46	81,46	81,26	81,07	78,8	78,8	78,41	78,79	83,17	83,17	82,97	82,78
T2(1)	81,46	81,46	80,88	81,07	78,8	78,8	78,03	78,41	83,36	83,36	83,16	83,16
T2(2)	81,84	81,65	81,07	80,88	78,99	78,8	78,41		83,17	83,17	82,78	82,78
T3(1)	81,46	81,46	81,07	81,26	79,18	78,61	78,41	78,22	83,36	83,17	83,16	82,97
T3(2)	81,46	81,46	81,07	81,26	78,99	79,8		78,79	82,41	82,98	82,78	82,78
K1	81,27	81,08	80,88	80,88	78,61	78,61	78,41	78,41	82,98	82,79	82,78	82,78
K2	81,27	81,08	80,69	80,69	78,61	78,42	78,03	78,41	82,98	82,41	82,59	82,4
K3	80,89	80,89	80,5	80,88	78,23	78,04	78,03	77,84	82,79		82,59	82,59
K4	81,08	81,27	80,69	80,88	78,99	78,61	78,41	78,03	83,17	82,98	82,78	82,21
Med DHA												
prøve	GAPDH				HPRT				IL-23A			
T0(1)	80,88	80,69			78,22	78,22			83,16	82,97		
T0(2)	81,07	81,07			78,22	78,22				82,59		
T1(1)	81,07	80,88			78,41	78,41			83,16	83,16		
T1(2)	81,07	81,07			78,6	78,41			82,97	82,97		
T2(1)	80,88	81,07			78,98	78,41			82,97	82,97		
T2(2)	81,26	81,07			78,41	78,41			82,78	82,59		
T3(1)	81,07	80,69			78,41	78,22			83,16	82,97		
T3(2)	81,26	81,07			78,41	78,41			82,97	82,78		
K1	80,88	80,88			78,98				82,78	82,59		
K2	80,5	80,88			78,22	77,46			82,59	82,21		
K3	80,31	80,69			77,65	77,84			82,59	82,4		
K4	80,88	80,88			78,22	78,41			82,97	82,78		

A.3.5 C_t-verdier – optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment

A.3.5.1 C_t-verdier fra optimaliseringsforsøk

Tabell 21. C_t-verdier for optimaliseringsforsøket. For de tomme feltene ble prøven ekskludert i bearbeidingen av resultatene, eller ikke analysert.

Prøve	GAPDH		HPRT		IL-23A	
	C _{t1}	C _{t2}	C _{t1}	C _{t2}	C _{t1}	C _{t2}
T0	21,77	21,58	27,15	27,18	30,93	
T1(1)	21,04	20,93	26,84	26,94	30,26	30,69
T1(2)	20,93	20,8			29,82	30,09
T2(1)	21,18	21,02	26,36	26,59	29,81	29,8
T2(2)	20,93	20,97	26,33	26,38	30,53	30,46
T4(1)	20,64	20,68	26,2	26,1	29,39	
T4(2)	20,63	20,65	26,29	26,56		30,91
K	21,36	21,16	26,92	26,69	30,68	30,41

A.3.5.2 C_t-verdier fra hovedeksperiment med og uten DHA-behandling

Tabell 22. C_t-verdier for hovedeksperimentet for prøver som ikke er behandlet med DHA. For de tomme feltene ble prøven ekskludert i bearbeidingen av resultatene.

Prøve	GAPDH				HPRT				IL-23A			
	C _{t1}	C _{t2}	C _{t3}	C _{t4}	C _{t1}	C _{t2}	C _{t3}	C _{t4}	C _{t1}	C _{t2}	C _{t3}	C _{t4}
T0(1)	21,83	21,9	21,95	21,55	27,68	27,82	26,91	27,54	30,59	30,06	31,17	31,05
T0(2)	22,97	22,72	22,94	22,93	27,89	27,55	27,76	26,99	31,94	30,31	31,95	30,51
T1(1)	21,17	21,74	22,08	22,4	26,46	26,93	26,97	26,9	29,41	29,12	30,49	30,06
T1(2)	21,27	20,93	21,91	21,67	26,44	26,07	26,52	25,94	27,83	28,46	29,01	29,25
T2(1)	20,4	20,11	21,05	20,75	26,26	25,95	27,39	26,77	30,38	30,93	29,96	30,95
T2(2)	20,32	20,38	21,38	21,46	25,92	26,46	26,77		30,83	30,55	30,1	30,42
T3(1)	21,63	21,92	22,03	21,99	26,04	26,99	26,42	26,95	29,72	29,88	29,17	29,7
T3(2)	21,87	21,51	22,21	22,16	25,95	26,33		26,52	30,2	30,32	29,76	29,74
K1	22,22	22	22,11	22,21	27,6	27,45	27,38	27,07	28,92	30,54	29,66	31,49
K2	21,73	21,98	22,52	22,66	26,99	27,78	27,31	27,31	30,39	31,99	31,24	31,97
K3	19,9	20,21	20,65	20,91	25,82	25,29	25,89	25,61	30,95		30,3	30,56
K4	22,81	22,63	22,92	22,79	27,07	26,89	27,9	27,57	31,42	31,95	30,92	32,01

Tabell 23. C_t -verdier for hovedeksperimentet for prøver som er behandlet med DHA. For de tomme feltene ble prøven ekskludert i bearbeidingen av resultatene.

Prøve	GAPDH		HPRT		IL-23A	
	C_t1	C_t2	C_t1	C_t2	C_t1	C_t2
T0(1)	22,49	22,32	27,93	27,89	30,94	30,87
T0(2)	21,93	21,93	26,84	26,34		31,41
T1(1)	21,1	21,52	26,85	26,9	30,93	30,23
T1(2)	22,01	21,92	27,49	27,4	30,59	30,81
T2(1)	21,67	21,67	25,93	26,51	29,57	30,95
T2(2)	21,55	21,79	26,9	26,74	29,65	30,43
T3(1)	21,32	21,46	25,8	26,74	29,8	29,94
T3(2)	21,1	21,5	26,41	25,91	29,9	30,44
K1	21,16	20,99	26,19		30,36	31,41
K2	20,32	20,43	25,42	25,89	30,28	30,67
K3	21,37	21,93	26,59	26	30,22	30,12
K4	20,88	21,07	25,9	25,46	30,38	30,94

A.3.6 Statistisk analyse av resultater

Hypoteser for ensidig t-test:

H_0 : RQ-verdiene for prøvene er ikke signifikant høyere enn kontroll (prøve \leq kontroll)

H_1 : RQ-verdiene for prøvene er signifikant høyere enn kontroll (prøve $>$ kontroll)

Hypoteser for tosidig t-test:

H_0 : ingen signifikant forskjell mellom RQ-verdiene (2^{-C_t} -verdier for referansegener)

H_1 : signifikant forskjell mellom RQ-verdiene (2^{-C_t} -verdier for referansegener)

Ensidig fordeling: $p = \alpha$, $\alpha = 0,05$

Tosidig fordeling: $p = 2\alpha$, $\alpha = 0,025$

Ved $p \leq 0,05$ forkastes H_0 og H_1 påstås med 95% sikkerhet. Da vil det være signifikant forskjell i uttrykket av IL-23 mellom prøvene.

A.3.6.1 T-tester av ekspresjonen av referansegenene i DHA-behandlede prøver sammenlignet med prøver uten DHA-behandling

Tabell 24. P-verdier fra t-tester av referansegenene for prøver som er behandlet med DHA testet opp mot prøver som ikke er behandlet med DHA, med tosidig fordeling og antatt ulik varians, for å se om det er en statistisk signifikant forskjell mellom genuttrykket av referansegenet med og uten DHA-behandling. For prøven med P-verdi som er markert i fet skrift er det påvist signifikant forskjell i genuttrykket mellom prøvene.

GAPDH		HPRT	
Tosidig med antatt ulik varians		Tosidig med antatt ulik varians	
Prøver	P-verdi	Prøver	P-verdi
T0	0,877	T0	0,665
T1	0,943	T1	0,287
T2	0,138	T2	0,990
T3	0,040	T3	0,387
K	0,320	K	0,143

A.3.6.2 T-tester av prøvene uten DHA-behandling med GAPDH og HPRT som referansegen

Tabell 25. P-verdier fra t-tester av prøver, med GAPDH som referansegen, som ikke er behandlet med DHA testet opp mot kontrollen med ensidig fordeling og antatt ulik varians, og paralleller testet opp mot hverandre med tosidig fordeling og antatt lik varians. For prøvene med P-verdier som er markert i fet skrift er det påvist signifikant høyere verdier for genuttrykket i parallellen i forhold til kontroll, bortsett fra for tid 0, der det er påvist signifikant høyere verdier for genuttrykket i kontrollen i forhold til parallellen.

Ensidig med antatt ulik varians (mot kontroll)		Tosidig med antatt lik varians	
Prøver	P-verdi	Prøver	P-verdi
T0(1) mot 1	0,020	T0(1) mot T0(2)	0,238
T0(2) mot 1	0,395	T1(1) mot T1(2)	0,096
T1(1) mot 1	0,019	T2(1) mot T2(2)	0,519
T1(2) mot 1	0,011	T3(1) mot T3(2)	0,435
T2(1) mot 1	0,280		
T2(2) mot 1	0,128		
T3(1) mot 1	0,021		
T3(2) mot 1	0,057		

Tabell 26. P-verdier fra t-tester av prøver, med HPRT som referansegen, som ikke er behandlet med DHA testet opp mot kontrollen med ensidig fordeling og antatt ulik varians, og paralleller testet opp mot hverandre med tosidig fordeling og antatt lik varians. For prøvene med P-verdier som er markert i fet skrift er det påvist signifikant høyere verdier for genuttrykket i parallellen i forhold til kontroll, bortsett fra for tid 0, der det er påvist signifikant høyere verdier for genuttrykket i kontrollen i forhold til parallellen.

Ensidig med antatt ulik varians (mot kontroll)		Tosidig med antatt lik varians	
Prøver	P-verdi	Prøver	P-verdi
T0(1) mot 1	0,263	T0(1) mot T0(2)	0,437
T0(2) mot 1	0,036	T1(1) mot T1(2)	0,295
T1(1) mot 1	0,038	T2(1) mot T2(2)	0,732
T1(2) mot 1	0,042	T3(1) mot T3(2)	0,154
T2(1) mot 1	0,127		
T2(2) mot 1	0,138		
T3(1) mot 1	0,047		
T3(2) mot 1	0,173		

A.3.6.3 T-tester av prøvene med DHA-behandling med GAPDH og HPRT som referansegen

Tabell 27. P-verdier fra t-tester av prøver, med GAPDH som referansegen, som er behandlet med DHA, testet opp mot kontrollen med ensidig fordeling og antatt ulik varians, og paralleller testet opp mot hverandre med tosidig fordeling og antatt lik varians. For prøvene med P-verdier som er markert i fet skrift er det påvist signifikant høyere verdier for genuttrykket i parallellen i forhold til kontroll, og signifikant forskjell mellom parallellene. For T0(2) var det ikke nok verdier til å ta t-test opp mot kontrollen eller den andre parallellen. T3(1) hadde et standardavvik på 0, og det var derfor ikke mulig å ta t-test opp mot kontroll.

Ensidig med antatt ulik varians (mot kontroll)		Tosidig med antatt lik varians	
Prøver	P-verdi	Prøver	P-verdi
T0(1) mot 1	0,018	T0(1) mot T0(2)	Ikke nok verdier
T0(2) mot 1	Ikke nok verdier	T1(1) mot T1(2)	0,467
T1(1) mot 1	0,210	T2(1) mot T2(2)	0,911
T1(2) mot 1	0,055	T3(1) mot T3(2)	0,024
T2(1) mot 1	0,457		
T2(2) mot 1	0,324		
T3(1) mot 1	Ingen SD i T3(1)		
T3(2) mot 1	0,036		

Tabell 28. P-verdier fra t-tester av prøver, med HPRT som referansegen, som er behandlet med DHA, testet opp mot kontrollen med ensidig fordeling og antatt ulik varians, og paralleller testet opp mot hverandre med tosidig fordeling og antatt lik varians. For prøvene med P-verdier som er markert i fet skrift er det påvist signifikant høyere verdier for genuttrykket i parallellen i forhold til kontroll. For parallell 1 ved tid 0 var det ikke nok verdier til å ta t-test opp mot kontrollen eller den andre parallellen.

Ensidig med antatt ulik varians (mot kontroll)		Tosidig med antatt lik varians	
Prøver	P-verdi	Prøver	P-verdi
T0(1) mot 1	0,006	T0(1) mot T0(2)	Ikke nok verdier
T0(2) mot 1	Ikke nok verdier	T1(1) mot T1(2)	0,376
T1(1) mot 1	0,137	T2(1) mot T2(2)	0,333
T1(2) mot 1	0,051	T3(1) mot T3(2)	0,610
T2(1) mot 1	0,409		
T2(2) mot 1	0,213		
T3(1) mot 1	0,129		
T3(2) mot 1	0,186		

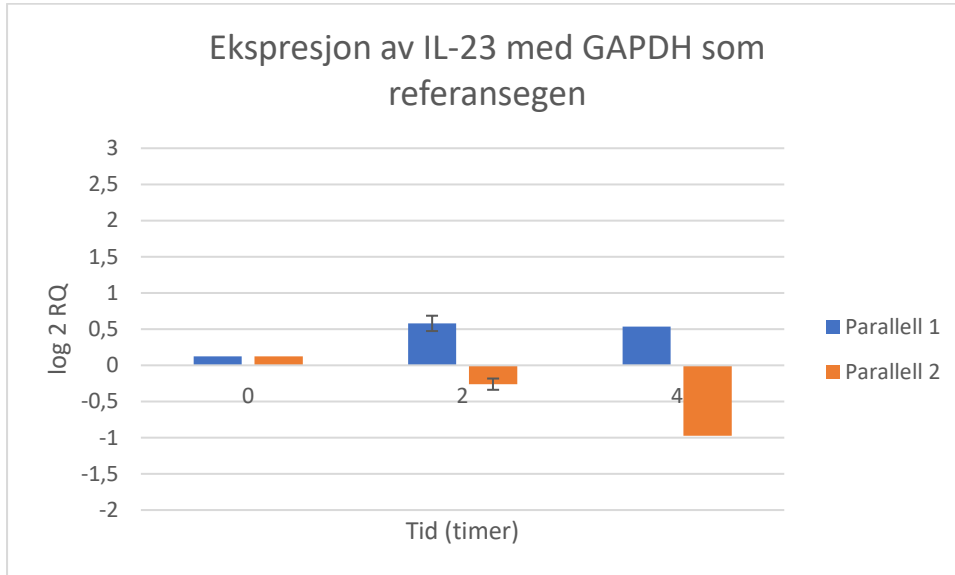
A.3.6.4 T-tester av DHA-behandlede prøver sammenlignet med prøver uten DHA-behandling

Tabell 29. P-verdier fra t-tester av prøver som er behandlet med DHA testet opp mot prøver som ikke er behandlet med DHA, med ensidig fordeling og antatt ulik varians. For prøven med P-verdier som er markert i fet skrift er det påvist signifikant høyere verdier for genuttrykket i ubehandlede prøver i forhold til behandlede prøver.

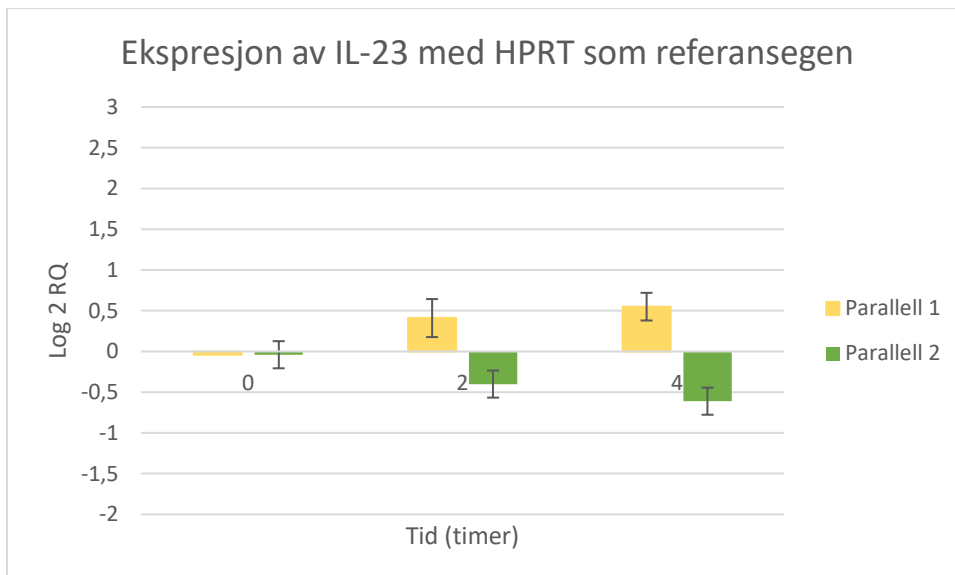
GAPDH		HPRT	
Ensidig med antatt ulik varians		Ensidig med antatt ulik varians	
Prøver	P-verdi	Prøver	P-verdi
T0	0,035	T0	0,115
T1	0,059	T1	0,335
T2	0,175	T2	0,122
T3	0,399	T3	0,185

A.3.7 Diagrammer for framstilling av genekspressjon – optimaliseringsforsøk og hovedeksperiment

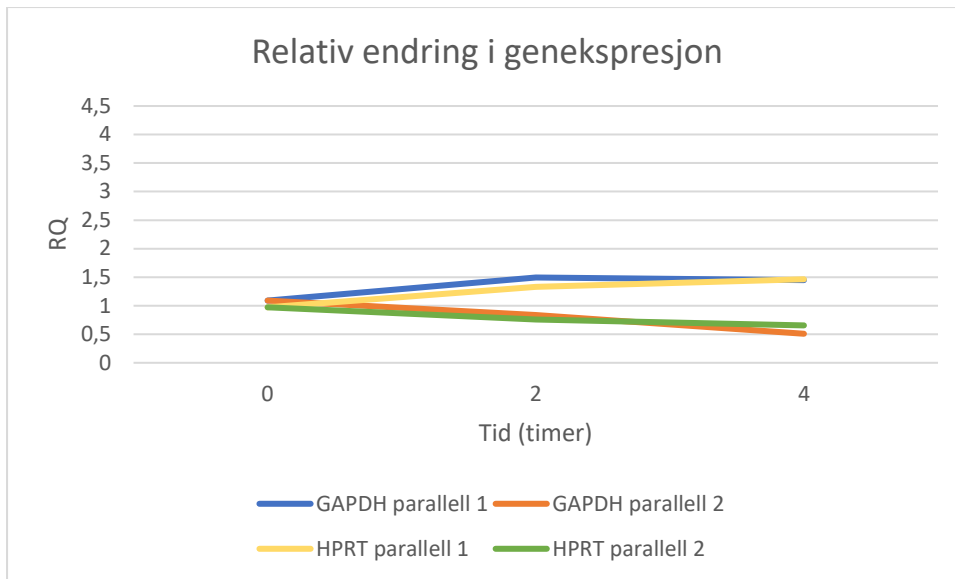
A.3.7.1 Histogrammer og linjediagram for optimaliseringsforsøket



Figur 11. Framstilling av 2-logaritmen av den relative genekspressjonen for IL-23 sett i forhold til GAPDH fra optimaliseringsforsøket, etter 2 og 4 timers indusering med TNF- α . Prøvene fra tid 0 er ikke behandlet med TNF- α .

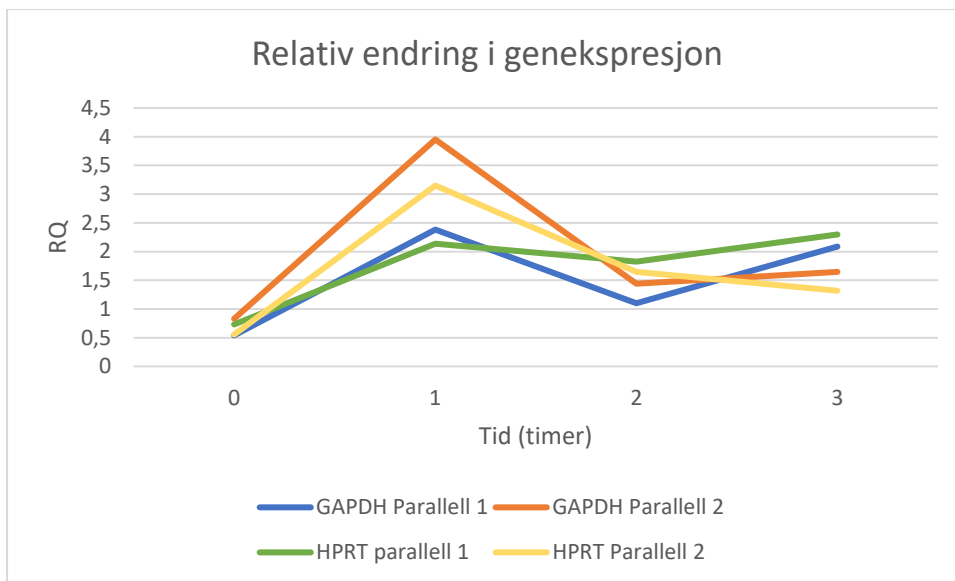


Figur 12. Framstilling av 2-logaritmen av den relative genekspressjonen for IL-23 sett i forhold til HPRT fra optimaliseringsforsøket, etter 2 og 4 timers indusering med TNF- α . Prøvene fra tid 0 er ikke behandlet med TNF- α .



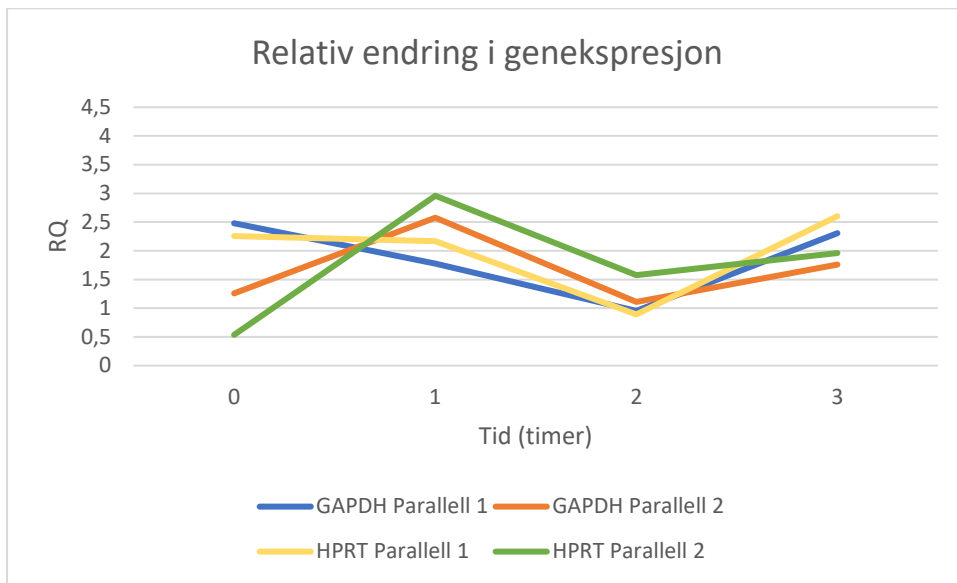
Figur 13. Framstilling av den relative genekspressjonen for alle prøvene fra optimaliseringsforsøket, etter 2 og 4 timers indusering med TNF- α . Prøvene fra tid 0 er ikke behandlet med TNF- α .

A.3.7.2 Linjediagram for prøvene uten DHA-behandling i hovedeksperiment



Figur 14. Framstilling av den relative genekspressjonen av IL-23 for alle prøvene som ikke ble behandlet med DHA i hovedeksperimentet, etter 1,2 og 3 timers indusering med TNF- α . Prøvene fra tid 0 er ikke behandlet med TNF- α .

A.3.7.3 Linjediagram for prøvene med DHA-behandling i hovedeksperimentet



Figur 15. Framstilling av den relative genekspresjonen av IL-23 for alle prøvene som ble behandlet med DHA i hovedeksperimentet, etter 1,2 og 3 timers indusering med TNF- α og behandling med DHA. Prøvene fra tid 0 er behandlet med DHA, men ikke med TNF- α .

