

10011
10023
10029

DHA-indusert stressrespons i A549-celler med fokus på ekspresjonen av Beclin 1-genet

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy
Mai 2021

10011

10023

10029

DHA-indusert stressrespons i A549-celler med fokus på ekspresjonen av Beclin 1-genet

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

Kjære leser,

Bacheloroppgaven du nå skal få lese er skrevet av tre bioteknologistudenter fra Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Ålesund. Vi har i løpet av semesteret hatt en bratt læringskurve innen analysemetoder, forskning og samarbeid innad i gruppen og med ulike fagpersoner. utfordringer som følger av koronapandemien har ført til utallige timer på Teams der veiledning, samarbeid og sosiale digresjoner har funnet sted. Teams har gjort det mulig å jobbe i samme Word-dokument fra ulike geografiske lokasjoner, noe som har vært helt avgjørende for denne bacheloroppgaven. Vi har igjennom prosjektet lært oss å være fleksible med tanke på strenge koronatiltak, deling av cellelaboratoriet, digitalisering, samt ulike døgnrytmer, arbeidsmetoder, styrker og svakheter.

Vi vil gi en stor takk til veileder Gro Audveig Hagen Bjørnøy for faglig veiledning og personlig oppmuntring igjennom hele prosessen. Takk til medstudenter for godt samarbeid, samt venner og familie som har gitt sosial støtte og omsorg. Til slutt vil vi også rette en stor takk til de som har korrekturlest oppgaven.

Sammendrag

Lungekreft av typen NSCLC (non-small cell cancer) er en alvorlig og potensielt dødelig diagnose med få effektive og gode behandlingstilbud. Kunnskap om hvordan naturlige ressurser som omega-3 flerumettede fettsyrer påvirker kreftcellene er viktig for fremtidig behandling av denne typen lungekreft på en mer skånsom og effektiv måte. Cellelinjen A549 ble brukt for å studere apoptose i celler kultivert med en omega-3 fettsyre, nærmere bestemt DHA (docosahexaenoic acid), i ulike konsentrasjoner over én og to cellesykluser i henholdsvis 22 og 44 timer. Apoptose ble studert ved analyse av uttrykket til det autofagiregulierende genet Beclin 1, som har blitt knyttet til apoptotiske signalveier i kreftceller.

Cellene ble dyrket i 22 og 44 timer med konsentrasjonene 0, 50 og 100 $\mu\text{g/ml}$ DHA. To cellebrett ble benyttet i studien, der hver konsentrasjon hadde to paralleller innad på brettet. Genekspresjonen av Beclin 1 i cellene dyrket med DHA ble sammenliknet med genekspresjonen av Beclin 1 i kontrollprøvene uten DHA. Dette ble gjort for å studere om cellene gikk i apoptose ved å hemme uttrykket av Beclin 1.

Analyse av genekspresjonen til Beclin 1 ble utført ved hjelp av 7500 Real Time PCR System hvor genuttrykk ble regnet ut i form av $\Delta\Delta\text{Ct}$ - og $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -metoden. Videre ble det benyttet t-test og grafisk fremstilling av resultat for å bestemme om cellene var på vei mot apoptose. Det var høye standardavvik innad i parallellene og små differanser mellom kontroll og DHA-påvirkede cellers genekspresjon. Prøvene til brett på 22 timer viste en nedregulering av Beclin 1 ved 50 $\mu\text{g/ml}$, mens prøvene på 100 $\mu\text{g/ml}$ viste svak oppregulering. Brett på 44 timer viste gradvis nedregulering av Beclin 1 ved begge konsentrasjonene. Det stilles spørsmålsteget ved resultatenes pålitelighet grunnet begrensninger i oppgaven. Konklusjonen er derfor lav til ingen effekt av DHA på A549-celler (NSCLC) over 22 og 44 timer ved konsentrasjoner på 50 og 100 $\mu\text{g/ml}$.

Abstract

NSCLC (non-small cell lung cancer) is a serious and potentially fatal diagnosis with few effective and viable treatment options. Knowledge of how natural resources such as omega-3 polyunsaturated fatty acids affect cancer cells is important for future treatment of this type of lung cancer in a more gentle and effective manner. The A549 cell line was used to study apoptosis in cells cultured with an omega-3 fatty acid, more specifically DHA (docosahexaenoic acid), at various concentrations over one and two cell cycles for 22 and 44 hours respectively. Apoptosis was studied by analyzing the expression of the autophagy regulatory gene Beclin 1, which has been linked to apoptotic signaling pathways in cancer cells.

The cells were cultured for 22 and 44 hours at concentrations of 0, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ DHA. Two cell trays were used in the study, where the respective tray of each concentration contained two parallels. The gene expression of Beclin 1 in the cells cultivated with DHA was compared with the expression of Beclin 1 in the control samples without DHA. This was done to study whether inhibiting the expression of Beclin 1 caused the cells to enter apoptosis.

Analysis of gene expression of Beclin 1 was performed using the 7500 Real Time PCR system in which gene expression was calculated in accordance with the $\Delta\Delta\text{Ct}$ and $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ methods. Further, t-test and graphical representation of the result were used to determine whether the cells were moving toward apoptosis. There were high standard deviations within the parallels and small differences between the control and DHA-affected cells' gene expression. The samples from the 22-hour cell tray showed a downregulation of Beclin 1 at 50 $\mu\text{g/ml}$, while the samples at 100 $\mu\text{g/ml}$ showed a minor upregulation. The samples from the 44-hour cell tray showed a gradual downregulation of Beclin 1 at both concentrations. The reliability of the results is questioned due to limitations in the study. The conclusion is therefore low to no effect of DHA on A549-cells (NSCLC) over 22 and 44 hours at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	III
TERMINOLOGI OG FORKORTELSER	1
BEGRENSNINGER	3
1.0 INNLEDNING	4
2.0 TEORI	6
2.1 LUNGEKREFT	6
2.2 A549 KREFTCELLER.....	6
2.3 CELLEVEKST OG CELLEDØD	7
2.4 BECLIN 1-GENET OG GENEKSPRESJON	9
2.5 DHA	11
2.6 qPCR.....	13
2.6.1 Funksjon og prinsipp.....	13
2.6.2 Relativ kvantifisering	15
2.6.3 Normaliseringsgen	15
2.6.4 Tolkning av resultat.....	16
3.0 MATERIALE OG METODE	19
3.1 CELLEKULTIVERING.....	19
3.2 INKUBASJON MED DHA	19
3.2.1 Lysing og preparering av prøvemateriale.....	21
3.2.2 Stabilisering og lagring av cellulært RNA	21
3.3 ANALYSE AV GENEKSPRESJON PÅ qPCR	21
3.3.1 Optimalisering på qPCR.....	21
3.3.2 Analyse av prøver på qPCR	23
3.4 UTREGNING OG BEHANDLING AV INNSAMLET DATA	25
3.4.1 Hvordan resultatet blir tolket i programmet	25
3.4.2 T-test og grafisk fremstilling av resultat	25
4.0 RESULTAT	27
4.1 GRAFISK FRAMSTILLING AV GENUTRYKKET I A549 CELLENE	27
4.1.1 Amplifikasjonsplott.....	27
4.1.2 Grafisk framstilling av smeltepunksanalyse.....	29
4.2 CT-VERDIER.....	31
4.3 STATISTISK UTREGNING AV INNSAMLET DATA.....	33
4.3.1 T-test	33

4.3.2 Grafisk fremstilling av resultat	34
5.0 DISKUSJON	38
5.1 CELLEKULTIVERING.....	38
5.2 TILSETTING AV OG INKUBASJON MED DHA	38
5.3 PREPARERING, OPTIMALISERING OG ANALYSE AV PRØVEMATERIALET TIL QPCR.....	39
5.3.1 Kritiske punkter i laboratoriearbeidet	40
5.4 ANALYSE AV GENUTTRYKK PÅ QPCR.....	44
5.4.1 Analyse av genuttrykk til normaliseringsgen	46
5.4.2 Analyse av genuttrykk til Beclin 1	47
5.5 VIDERE FORSKNING	49
6.0 KONKLUSJON	51
LITTERATURLISTE	52
A.0 VEDLEGG	58
A.1 REAGENSER	58
A.2 PROSEDYRER OG MALER	59
A.2.1 Prosedyre for arbeid på celledlaboratoriet	59
A.2.2 Cellekultivering	61
A.2.3 Tillaging av medium med DHA	63
A.2.4 Isolering av mRNA.....	64
A.2.5 Prosedyre for måling av Qubit (RNA og DNA)	66
A.2.6 Konsentrasjon av RNA og cDNA	69
A.2.7 cDNA-syntese.....	70
A.2.8 Optimalisering av qPCR.....	71
A.2.9 Temperaturoptimalisering oppsett på plate.....	72
A.2.10 Primeroptimalisering oppsett på plate	73
A.2.11 Prosedyre for preparering av prøver til qPCR.....	75
A.2.12 Prosedyre for bruk av qPCR-instrument	77
A.2.13 Prøver 22 timer oppsett på plate	79
A.2.14 Prøver 44 timer oppsett på plate	80
A.3 A549-CELLER	81
A.4 DATA PRESENTERT I TABELLER OG GRAFER	82
A.4.1 Vurdering av brett 1 og 2.....	82
A.4.2 Data hentet direkte fra programvaren for brett inkubert i 22 og 44 timer	83
A.4.3 Amplifikasjonsplott for de ulike qPCR brettene benyttet i optimalisering og analyse av prøvene	93
A.4.4 Smeltepunktskurvene for de ulike qPCR brettene benyttet i optimalisering og analyse av prøvene..	97
A.4.5 Beregning og grafisk framstilling av normaliseringsgen.....	104
A.4.6 Beregning og fremstilling av grafer basert på ΔCt -, $\Delta\Delta Ct$ - og $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -verdier.....	106
A.4.7 Utførte hypotesetester vha. uavhengig t-test.....	109

Terminologi og forkortelser

A549 – Småcellet lungekarsinom (cellelinje)

Adherent – Cellene vokser festet til en overflate ved hjelp av overflateproteiner.

AMPNC – Amplification in negative control

Apoptose – Programmert eller induert celledød

Autofagi – Programmert resirkulering av cellekomponenter

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 (proteinfamilie)

cDNA – complementary DNA/komplementært DNA

Ct – Cycle threshold/Syklus terskelverdi

DHA – Docosahexaenoic acid/Docosahexaensyre

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

E – Amplification efficiency/Amplifiseringseffekt

FBS – Fetal Bovine Serum

GAPDH – D-glyceraldehyde 3-phosphat dehydrogenase

Homeostase – Stabile fysiske og kjemiske forhold i og rundt en celle

HIGHSD – High standard deviation in replicate group

HPRT – Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase

In vitro – Undersøkelser på laboratoriet utenfor organismen

In vivo – Undersøkelser i organismen

kDa – kiloDalton ($1 \text{ kDa} = 1,67 \times 10^{-24} \text{ kg}$)

mTOR – mammalin target of rapamycin

MTP – Multiple Tm peaks

n-3 PUFA – Omega-3 poly unsaturated fatty acid (flerumettet fettsyre)

n-6 PUFA – Omega-6 poly unsaturated fatty acid (flerumettet fettsyre)

NSCLC – Non-small cell cancer/ Ikke-småcellet lungekarsinom

NTC – No template control

OUTLIERRG – Outlier in replicate group

Passasjennummer – Antall ganger cellekultur har blitt splittet.

PCR – Polymerase chain reaction

PI3K – Phosphatidylinositol-3-kinase

qPCR – quantitative polymerase chain reaction/real time PCR

Reagens – Benyttes i denne studien som et samlebegrep for kit som qScript™ cDNA Synthesis Kit og PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® Low ROX

SCLC – Small cell lung cancer/Småcellet lungekarsinom

Templat – cDNA, DNA og RNA som er nukleotidsekvensen som amplifiseres i PCR

Tm – Smeltepunktstemperatur til primer

Begrensninger

Koronapandemi

Bacheloroppgaven er skrevet i en tid med stor usikkerhet grunnet pågående koronapandemi. Dette førte til uforutsigbarhet for muligheten av praktisk arbeid på laboratoriet, da nedstenging kunne komme på kort varsel. Tiltak grunnet Covid-19 førte til senere oppstart enn forventet og mindre tid på laboratoriet grunnet ny nedstenging. Den pågående pandemien har ført til manglende reagens hos leverandører, som også bidro til vanskeligheter med å planlegge og gjennomføre bachelorprosjektet. Stresset dette har ført med seg kan ha påvirket avgjørelsene som ble tatt gjennom prosjektet på laboratoriet.

Manglende reagens og leveringstid

Etter planen skulle bacheloroppgaven gjennomføres mellom uke 6 – 10, men grunnet feil leveranse og manglende reagens ble arbeidet på laboratoriet forlenget til uke 11. Først ble det levert feil Beclin 1-primer, etter feil hos leverandør. Fra feilen ble oppdaget til den riktige primeren kom tok det omtrent en uke. Ved bestilling av reagens ble det bestilt inn for lite DHA. Leverandør av DHA hadde lite DHA på lager ved første bestilling og i frykt for lang leveringstid i påvente av mer DHA ble det kun bestilt det leverandøren hadde på lager ved første bestilling. Dette førte til usikkerhet om prosjektet kunne gjennomføres med DHA og ved hvilke konsentrasjoner som var mulig. Under optimaliseringen gikk det tomt for qScript™ cDNA Synthesis Kit og PerfeCTa® SYBR® Green Low ROX. Dette førte til forlenget ventetid for analyse av prøvene. Da det skulle bestilles mer PerfeCTa® SYBR® Green Low ROX var det tomt på lageret til leverandør. Det måtte derfor bestilles et annet qPCR-kit uten ROX, som ikke er egnet for qPCR-instrumentet, for at det skulle være mulig å gjennomføre qPCR-analysen. Manglende reagens og lang leveringstid førte til at prosjektet på laboratoriet ble gjennomført over en lengre tidsperiode enn forventet, samt at flere prosesser ikke ble gjennomført. Prosjektet på laboratoriet ble på grunn av begrensningene kun gjennomført én gang, selv om det var ønskelig å repetere det for å validere resultater med høyere pålitelighet. Det ble ikke gjennomført optimalisering av cDNA-konsentrasjon grunnet reagens- og tidsbegrensninger, noe som førte til manglende standardkurve for cDNA-konsentrasjon.

1.0 Innledning

Kreft er en sykdom som rammer mange mennesker over hele verden og fører til flere millioner dødsfall hvert år. Det er ikke bare personen som får kreftdiagnosen som blir påvirket, men også familie, venner og samfunnet for øvrig. En av krefttypene det er mest utfordrende å behandle er lungekreft. Mange som får lungekreft sliter med alvorlige bivirkninger og tilbakefall under og etter behandling. Både kvinner og menn rammes av lungekreft og de vanligste årsakene til lungekreft er tobakksrøyking, passiv røyking og luftforurensing fra miljø og arbeidsplasser (1).

Et sunt kosthold og en sunn livsstil har vist seg å spille en viktig rolle i forebyggingen av kreft. Både på nasjonal og internasjonal basis er omega-3 (n-3) flerumettede fettsyrer (PUFA) fra marine produkter definert som en viktig del av et sunt kosthold (2, 3). Tidligere forskning har vist at marine omega-3 fettsyrer, som DHA (docosahexaenoic acid), også har en positiv effekt på kreft, inkludert lungekreft. Dette vises ved at apoptose induseres i kreftcellene, mens friske celler forblir uskadd (4). Dette kan potensielt være en stor fordel for dagens behandling hvor både kreftceller og friske celler blir skadet av cellegift og stråling (5).

Effekten marine flerumettede fettsyrer har på lungekreftceller kan forskes på ved å benytte A549-celler (6). Det er mulig å se ved hvilke konsentrasjoner, behandling og eksponeringstid fettsyren har best effekt. Tidligere studier har vist apoptose hos kreftceller etter 24 timer eksponeringstid med flerumettede fettsyrer i vekstmediet. Dette kommer fram ved å se på genuttrykket som styrer apoptose eller autofagi i cellene (5).

I denne bacheloroppgaven er det sett på hvilken effekt den marine omega-3 fettsyren DHA kan ha på reguleringen av Beclin 1-genet som bidrar i reguleringen av autofagi i humane celler. Dette blir undersøkt ved å behandle A549-celler med et egnet vekstmedium med en DHA-konsentrasjon på 0, 50 og 100 µg/ml over én og to cellykluser (22 og 44 timer) *in vitro*. Studien ble gjennomført ved å se på genuttrykket ved hjelp av en qPCR-analyse. Det ble bestemt at optimaliseringsprosessen av qPCR i større grad ble inkludert i oppgaven, for å synliggjøre ulikheter på qPCR-resultater analysert med og uten den passive referansefargen ROX.

Oppsettet i denne bacheloroppgaven starter med en relevant teoridel som leder over til materialer og metoder som er benyttet. Deretter blir resultatene presentert og drøftet videre i diskusjonsdelen. Oppgaven avsluttes med en konklusjon, litteraturliste og vedlegg.

2.0 Teori

2.1 Lungekreft

Kreft er en sykdom som på verdensbasis forårsaker opp mot 9 millioner dødsfall hvert år (7). Lungekreft skal være den krefttypen som gir høyest dødelighet per dags dato. Fra kreftdiagnosen blir oppdaget er det i gjennomsnitt en overlevelsesrate på fem år (5). Lungekreft kan deles inn i «small cell lung cancer» (SCLC) og «non-small cell lung cancer» (NSCLC). Der omtrent 15% er SCLC og 75-85% er NSCLC. Den behandlingen som tilbys pasienter med lungekreft er cellegift, stråling, kirurgi og palliativ behandling. Mange med lungekreft sliter med alvorlige bivirkninger etter behandling. Det forskes på behandling av lungekreft for å kunne øke sjansen for overlevelse (5, 7). Fokuset på utnyttelsen av marine ressurser til medisinsk bruk har økt de siste årene. Flere artikler og forskningsresultater viser at n-3 flerumettede fettsyrer, spesielt DHA, enten alene eller sammen med ulike kreftmedisiner gir en økt cytotoxisk effekt på kreftceller *in vitro* (4, 8-10). De ulike celledrepende og cytotoxiske effektene varierer, men felles for disse er at de påvirker cellens genekspresjon (Figur 4). På denne måten kan utvalgte gener som reguleres i forbindelse med apoptose undersøkes nærmere ved hjelp av qPCR-analyse og spesifikke primere for å få bekreftet eller avkreftet den cytotoxiske effekten DHA har på kreftceller (4, 11). qPCR-analysen bruker spesifikke primere for å detektere gennuttrykket til aktuelle gener. Et av disse genene er Beclin 1 som bidrar i reguleringen av autofagi i cellen, der nedregulering av genet har blitt knyttet til apoptotiske prosesser (5).

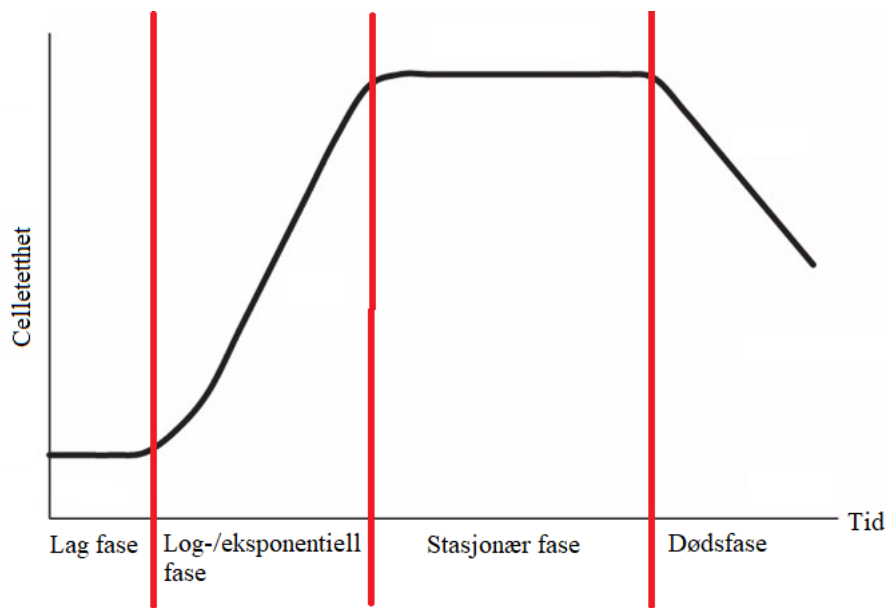
2.2 A549 kreftceller

A549 er en human kreftcellelinje som i 1972 ble hentet ut fra lungen til en 58 år gammel mann. Cellene har strukturelle og morfologiske likheter med alveoler type II-epitelceller og defineres som NSCLC (6, 12). Humane lunger er bygget opp av et tynt lag epitelceller som danner alveoler. Det er i alveoler luftutvekslingen skjer mellom lungene og blodet (13). Epitellaget er bygd opp av to typer celler, type I og type II. Det antas at type I-celler utgjør omtrent 96% av epitellaget. Type II-celler er progenitorceller for type I-celle og produserer surfaktant (14). Cellelinjen A549 er egnet i forskning på lungekreft og type II-epitelceller. Forskning på lungekreft, spesielt NSCLC er av stor interesse, da NSCLC er den mest vanlige formen for lungekreft (5).

A549-celler vokser i adherent monolag festet til en overflate *in vitro*, der én cellyklus tilsvarer 22 timer (15). Cellene er egnet for å vokse beskyttet fra lys ved en temperatur på 37°C med en CO₂ konsentrasjon på 5% (16, 17). Både temperatur og CO₂-konsentrasjon er tilpasset for å etterligne cellenes naturlige vekstvilkår *in vivo* (13). Et egnet vekstmedium er Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) ferdig blandet med F-12 Nutrient Mixture (Ham) og GlutaMAXTM-1. Mediet er egnet for pattedyrceller, deriblant humane epitelceller. Mediet har en høy konsentrasjon av glukose, aminosyrer og vitaminer som er viktig for å skape optimale vekstforhold for cellene. For å tilføre cellene viktige proteiner, lipider og andre vekstkomponenter tilsettes 10% Fetal Bovine Serum (FBS). For å forhindre bakteriell vekst og kontaminasjon av cellene, tilsettes det antibiotika i form av Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml). Penicillin-Streptomycin beskytter cellene spesielt mot gram-positive og gram-negative bakterier (18, 19).

2.3 Cellevekst og celledød

For å kunne vokse og dele seg må A549-celler opprettholde en viss celletetthet. Alle celler sender ut og mottar signaler fra omgivelsene sine. I en multicellulær organisme, som mennesket, reguleres denne kommunikasjonen nøye for å imøtekomme alle behovene til organismen. Dette oppnås ved celledisagregasjon der den enkelte cellen skiller ut signalmolekyl på overflaten, som reseptorer på den samme cellen eller en annen celle fanger opp. Celledisagregasjonen kan foregå på ulike måter ved hjelp av parakrin, synaptisk, autokrin eller endokrin signalisering (20). Dersom cellene har for stor avstand fra hverandre vil cellene ikke klare å kommunisere, noe som vil føre til at vekst hemmes og apoptose fremmes (21). Videre vil det være utfordrende å opprettholde optimale forhold for cellene dersom veksten skulle bli for tett da dette vil føre til mangel på næring og areal, samt økt mengde avfallsstoffer i miljøet rundt. Cellene burde derfor splittes ved en konfluens på ca. 70-90% i sen eksponentiell fase. For å anslå hvilket stadium cellene er på gjennom et vekstforsøk kan vekstkurve benyttes. Vekstkurven i *Figur 1* beskriver lag-, log-, stasjonær- og dødsfase.



Figur 1: Illustrasjonen av en normal vekstkurve som beskriver cellenes vekst, laget i Paint. Lag fase starter fra cellene blir tilført mediet og tilvenner seg sitt nye miljø. I log-/eksponentiell fase har cellene tilgang på næring og vokser ved å doble seg ved hver deling $[2n]$. I stasjonær fase har cellene tilgang på næring, men med flere celler minker arealet og mengden avfallsstoffer øker. I denne fasen er det like mange celler som deler seg som celler som dør. I dødsfasen er det blitt så mange celler at de mangler plass og næring for å oppnå videre vekst. Cellene går derfor inn i en dødsfase. Splitting av celler bør gjøres i sen eksponentiell fase, for å vite at cellene har hatt optimale vekstvilkår og kunne overføre nok celler for å kunne opprettholde kommunikasjonen mellom dem (22).

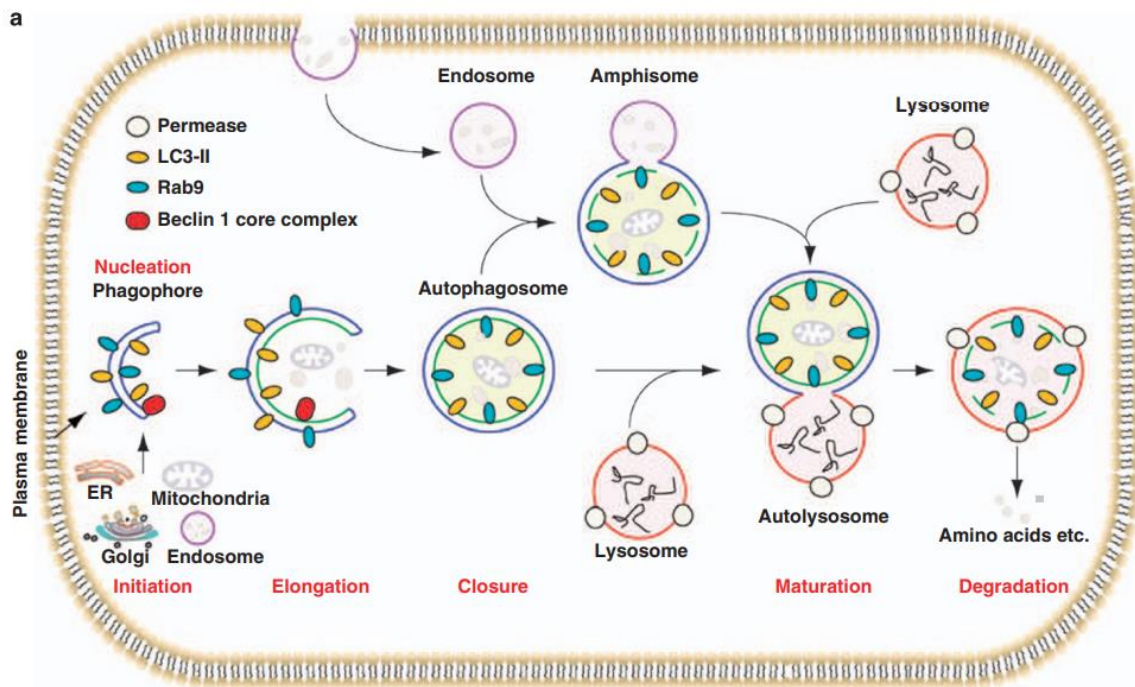
Ved å utsette cellene for stressorer av ulike arter vil den stasjonære fasen og dødsfasen kunne inntre tidligere enn vanlig. Dette er ønskelig når en ser på responsen kreftceller har på ulike medisiner, kreftcelledrepende eller hemmende stoffer. I normale friske celler kan cytotoxisk, genotoksisk og mekanisk stress føre til overekspressjon av apoptotiske gen som forårsaker celledød. I kreftceller derimot blir overekspressjonen av disse genene ofte forhindret eller annullert, enten av mutasjoner i genene eller ved å forhindre transkripsjon eller translasjon av genet (23). Dersom de apoptotiske genene likevel uttrykkes utligner kreftceller dette ved å overuttrykke gener som koder for antiapoptotiske proteiner i Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) familien. Dersom kreftcellene baserer overlevelsen sin på det antiapoptotiske Bcl-2 uttrykket vil kreftcellene dø hvis Bcl-2 uttrykket hindres (23).

Apoptose og autofagi er begge viktige prosesser som bidrar til å opprettholde homeostase både innad i cellen og i organismen for øvrig. Apoptose er et cellulært selvdestruksjonsprogram som er utviklet for å fjerne overflødige, syke eller skadede celler. Prosessen inneholder en rekke signalveier som fører til aktivering av en proteasefamilie kalt caspaser (Figur 4). Aktivering av caspasene vil lede til en kaskadereaksjon hvor proteasene

kløyver cellulære proteiner og fører til de morfologiske og biologiske endringene som forbindes med apoptose (23-25). I motsetning til apoptose er autofagi en mekanisme cellene benytter seg av for å resirkulere cellekomponenter, der nedbrutte komponenter blir fraktet til andre steder i cellen etter behov (26). Likevel kan autofagi i noen tilfeller lede til celledød. Det er dokumentert at samme type stress som påføres cellene kan stimulere til både apoptose og autofagi (27). Forståelsen av de eksakte signalveiene innen autofagi som leder til celledød er begrenset. Det er ikke tydelig kartlagt enda og det er derfor utfordrende å kunne si noe eksakt om hvordan DHA kan føre til hemming av transkripsjonen av Beclin 1-genet, som igjen kan føre til apoptose.

2.4 Beclin 1-genet og genekspressjon

Beclin 1-genet blir uttrykt i humane vev og koder for Beclin 1-proteinet som bidrar i reguleringen av autofagi ved å påvirke dannelsen av autofagolysosom. Genet er å finne på kromosom 17q21 og er delt inn i 12 ekson og 11 intron (5, 28, 29). Autofagi reguleres av totalt 16 gener i menneskekroppen, og Beclin 1 er ett av disse genene. Beclin 1 er en komponent i phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signalvei. Ved aktivering av PI3K blir det satt i gang en kaskadereaksjon. Kaskadereaksjonen aktiverer Akt (serin/threonin kinase), som videre aktiverer mammalin target of rapamycin (mTOR), PI3K/Akt/mTOR-signalvei. Dette er en av mange signalveier med kofaktorer som påvirker autofagi i cellen. Akt og mTOR er også sentrale ved forskning og forståelsen av autofagi. Et annet interesseområde innen forskning er autofagi og PI3K sin rolle innenfor dannelsen av kreftceller og i behandling av kreft (5, 28). Autofagi starter med dannelse av en dobbelmembran i cytoplasma rundt en eller flere cellekomponenter som skal brytes ned. Vesikkelen som dannes av membranen kalles et autofagosom. Beclin 1 og PI3K spiller en sentral rolle i formasjonen av membranen, se *Figur 2* (28). Videre dannes et autolysosom ved at et lysosom fusjonerer med autofagosomet. Innholdet i autolysosomet blir brutt ned ved hjelp av lysosomal hydrolase. Når lysosomal hydrolase har brutt ned komponentene blir det frigjort nukleotider, aminosyrer og fettsyrer som cellene benytter til videre energiproduksjon eller oppbygging av nye cellekomponenter. Autofagi gjør det mulig for både kreftceller og friske celler å overleve under forhold med lite næring og stress (30, 31).

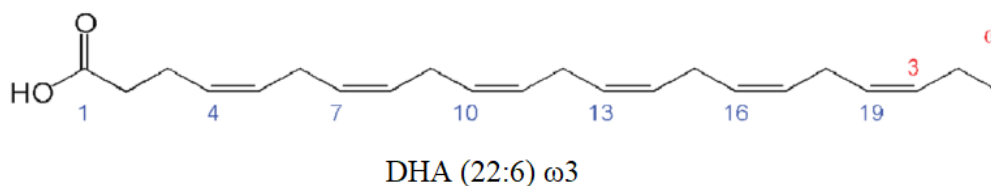


Figur 2: Illustrasjon av ulike måter cellen kan benytte seg av autofagi. Beclin 1 er merket rødt og er en komponent i membrandannelse til autofagolysosom. Det er flere komponenter som Rab9 og LC3-II som påvirker dannelsen av autofagolysosom. Disse komponentene blir ikke beskrevet i denne bacheloroppgaven. Illustrasjonen viser også veien videre til autofagi inne i cellen der cellekomponentene blir brutt ned og resirkulert. Illustrasjonen er hentet fra rapporten «The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis» (29).

Cellen kan gå i apoptose ved ulike kofaktorer eller mutasjoner som kan føre til overstimulering eller hemming av autofagi. En vanlig mutasjon i kreftceller er i gen p53 og PTEN. Disse mutasjonene er i gen som påvirker PI3K/Akt/mTOR-signalvei. Hvordan mutasjonen i p53 og PTEN påvirker reguleringen av autofagi og apoptose er enda ikke avklart. Som vist i Figur 4 er det mange kritiske punkter i signalveiene som kan regulere autofagiaktiviteten. Dermed kan regulering av spesifikke trinn og faktorer føre til at cellen går inn i apoptose ved å hemme autofagi. Nedregulering/hemming av Beclin 1-uttrykket fører til at PI3K blir hemmet. Ved å hemme PI3K vil ikke kaskadereaksjoner med Akt/mTOR bli gjennomført og cellen vil gå inn i apoptose. Det gjenstår fortsatt mye forskning på regulering av autofagi og kofaktorer som påvirker autofagi og apoptose, men felles for kunnskapen per dags dato er Beclin 1 sin oppgave i dannelsen av autofagosom (5, 30). En av metodene for å hemme transkripsjonen av Beclin 1-genet kommer fra det marine miljøet, der blant annet DHA er en viktig komponent (4).

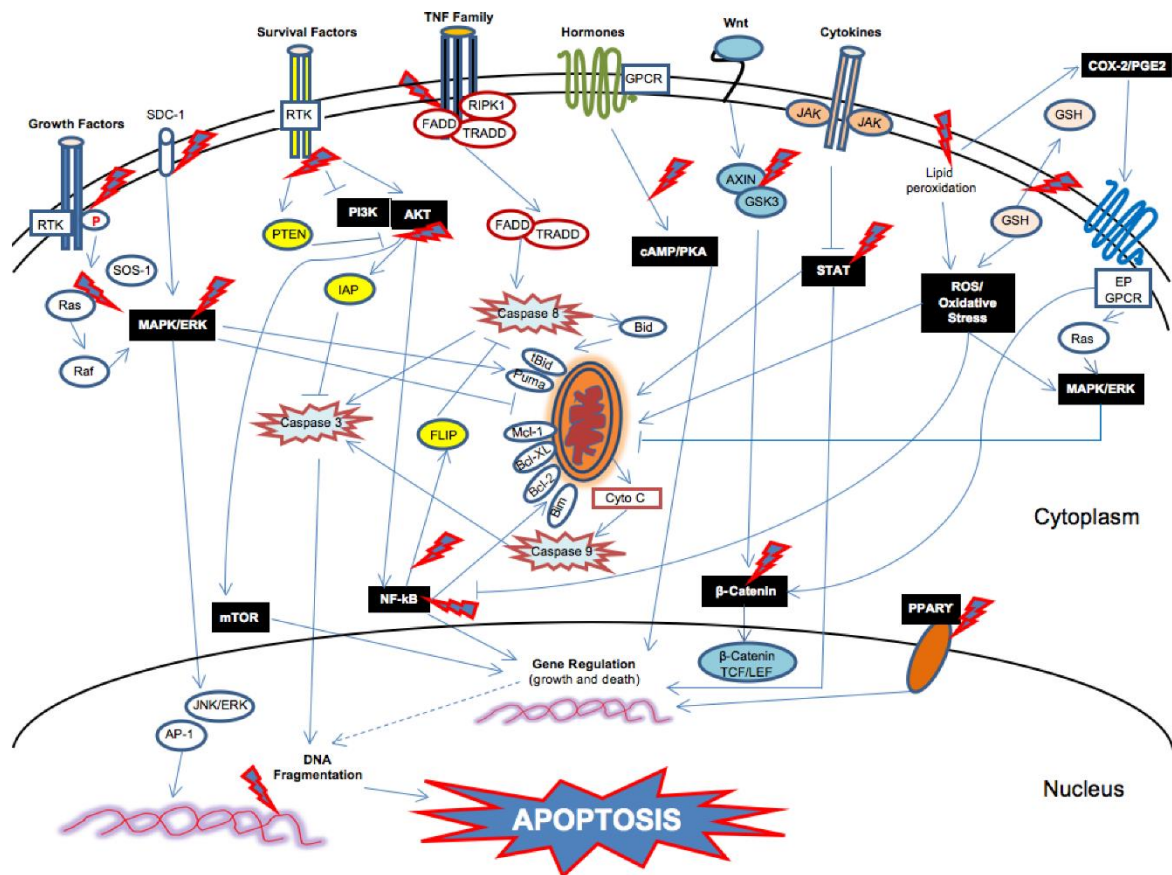
2.5 DHA

Docosahexaenoic acid (DHA 22:6, n-3) er en marin n-3 PUFA (omega-3 flerumettet fettsyre, se *Figur 3*) det finnes mye forskning rundt. Det er godt dokumentert at marine n-3 PUFA, spesielt EPA (eicosapentaenoic acid) og DHA, har en selektiv cytotoxisk effekt på ulike typer kreftceller, inkludert lungekreft, uten å skade friske celler rundt (4).



Figur 3: Illustrasjon av oppbygningen av docosahexaenoic acid (DHA) laget i ChemSketch. Den består av en lang karbonkjede med totalt 22 karboner hvor 6 av bindingene er dobbeltbindinger (22:6). Til venstre i figuren er fettsyrens karboksylgruppe (COOH) og til høyre er fettsyrens metylgruppe (CH₃). Fettsyren har betegnelsen n-3 (ω₃) ved at den siste dobbeltbindingen er på det tredje siste karbonet fra metylgruppen (32).

DHA har en veldokumentert antiinflammatorisk effekt, i motsetning til n-6 PUFA (omega-6 flerumettet fettsyre) som har en proinflammatorisk effekt. Disse effektene har blitt linket til hvilke typer eikosanoider som er mulig å avlede fra n-3 og n-6 PUFA i cellen. Det viser seg at disse fettsyrefamiliene har motsatte effekter også på kreftceller. Der antiinflammatoriske eikosanoider avledet fra n-3 PUFA hemmer tumorcellevekst, invasjon/metastase og angiogenese, vil eikosanoider avledet fra n-6 PUFA ha motsatt effekt. I tillegg til omdannelse til eikosanoider kan de marine n-3 PUFA også metabolisere til resolviner og protinsiner, som er signalmolekyl ofte forbundet med kraftige antiinflammatoriske og immunregulerende responser. I tillegg til de biologiske virkningene av eikosanoider og andre metabolitter har det blitt vist at DHA kan inhibere n-6 PUFA ved å hemme omdanningen til inflammatoriske eikosanoider (10).



Figur 4: Illustrasjon av flere apoptotiske signalveier n-3 PUFA kan påvirke i kreftceller. Reguleringen av genekspressjon som hemmer cellevekst og fremmer apoptose er sentral for de illustrerte kaskadereaksjonene. En av kaskadereaksjonene som blir illustrert er PI3K/Akt/mTOR-signalvei. Illustrasjonen er hentet fra rapporten «Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Cell Therapy» (33). Forkortelser relevant for denne oppgaven er beskrevet under Terminologi og forkortelser.

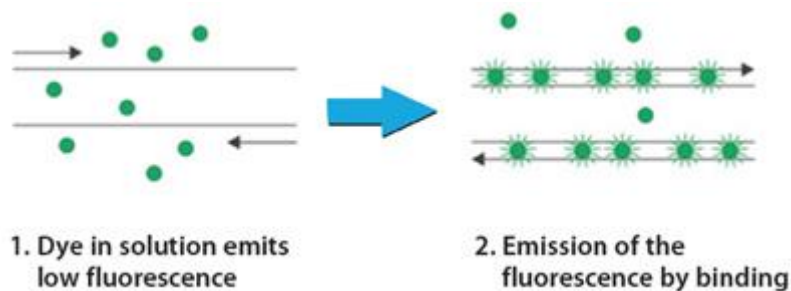
Flere hundre gener som bidrar i biologiske prosesser har vist seg å bli regulert på ulike måter, enten direkte eller indirekte, av n-3 og n-6 PUFA (Figur 4). n-3 PUFA sin evne til å indusere apoptose hos kreftceller har delvis blitt tilskrevet cellenes økte følsomhet for lipidoksidasjon. PUFA har stort potensiale for oksidasjon og god evne til å øke nivået av sekundære oksidasjonsprodukter innad i en celle. I tillegg har forskning vist at den cytotoxiske effekten n-3 PUFA har på tumorceller, blir helt eller delvis blokkert ved tilstedeværelse av antioksidanter (10). I og med at også n-6 PUFA er utsatt for autooksidasjon kan det antas at peroksiderte produkter av n-3 og n-6 PUFA har ulike biologiske egenskaper (10). Det finnes indikasjoner i tidligere studier at apoptose kan induseres i kreftceller ved å hemme Beclin 1-transkripsjonen ved hjelp av DHA (5). For å kunne se nærmere på effekten DHA har på reguleringen av genekspressjon, benyttes gjerne metoder som qPCR (34).

2.6 qPCR

2.6.1 Funksjon og prinsipp

PCR (Polymerase chain reaction) er en analysemetode for å undersøke tilstedeværelse av gener eller endringer i genekspressjon ved hjelp av templat (cDNA, DNA eller RNA). Metoden gir spesifikke resultat, selv ved små mengder templat. PCR forgår i brønner på et brett eller i strips hvor innholdet består av mastermiks, primer, prøve og nukleasefritt vann. Prøven settes så med lokk inn i et PCR-instrument. Hovedprinsippet bak PCR er å kunne amplifisere prøvemateriale ved hjelp av temperaturforskjeller. Amplifiseringen skjer i tre steg; denaturering, annealing og elongering. Prøvematerialet denatureres ved en høy temperatur på 95°C. I annealing-fasen festes primere til nukleotidsekvensen og starter avlesningen. Her er det viktig at temperaturen og primerkonsentrasjonen er optimalisert. I den siste fasen, elongering, dannes det hydrogenbindinger mellom ny og gammel nukleotidsekvens ved en temperatur på 72°C. Disse tre stegene skjer i en syklus som gjentas mellom 20-50 ganger. Antall sykluser i analysen bestemmes ut fra analysemateriale og laboratorium (34, 35).

Det finnes flere måter å detektere gener i en PCR. En metode bruker produktene fra PCR i gelelektroforese. En annen metode er ved bruk av qPCR (quantitative polymerase chain reaction/real time PCR). Disse metodene kan også kombineres for å enten validere primerprodukt på gel før analyse på qPCR, eller å evaluere av qPCR-produkt på gel etter analyse. qPCR benyttes ofte ved undersøkelser av genekspressjon og innen diagnostikk. Ved bruk av qPCR blir amplifikasjonen av templat detektert etter hver syklus ved hjelp av fluorescens fra en spesifikk probe eller et uspesifikt fluorescerende fargestoff i et qPCR-instrument. Det finnes mange ulike varianter av prober og uspesifikke fluorescerende fargestoff. I denne oppgaven blir det fokusert på SYBR Green, da det var dette som ble benyttet. I tillegg til SYBR Green kan EvaGreen® og LCGreen® benyttes som uspesifikke fargestoff. Felles for disse er at fargestoffet festes til alle dobbeltrådede nukleotidsekvenser som blir dannet under qPCR, som vist i *Figur 5* (34, 35). Fordelen ved å benytte SYBR Green er at den er like sensitiv og mer økonomisk enn probe. SYBR Green egner seg også til analyser med små mengder prøvemateriale (36, 37).



Figur 5: Figuren viser SYBR Green fritt i løsningen og bundet til en dobbeltrådet nukleotidsekvens. På figuren er SYBR Green merket med grønne sirkler. Til venstre (1.) er SYBR Green fritt i løsningen sammen med enkeltrådet nukleotider og SYBR Green blir ikke fluorescensert ved deteksjon av qPCR-instrumentet. Til høyre (2.) viser hvordan SYBR Green er festet til dobbeltrådet nukleotidsekvenser, der SYBR Green fluorescerer når qPCR-instrumentet analyserer qPCR-brettet. Illustrasjonen er hentet fra «Universal SYBR Green qPCR Protocol» (38).

SYBR Green kan kjøpes i form av mastermikser med og uten ROX. ROX er et passivt fargestoff som fluorescerer med stabil fluorescens igjennom alle syklusene. I qPCR kan små forskjeller i pipettering, luftbobler, fingermerker eller ulik fluorescens fra brønnen føre til store forskjeller i fluorescens og potensielt ugyldige resultater. For å motvirke små forskjeller innstilles qPCR-instrumentet til å detektere ROX. Ved å gjøre dette vil qPCR-instrumentet kunne normalisere ROX-fluorescensen i de ulike brønnene opp mot hverandre og på denne måten utlikne forskjeller i volum. I tillegg benytter instrumentet ROX for å definere bakgrunnsstøy, spesielt i innledende sykluser hvor fluorescensen til støyen er høyere enn for qPCR-produktene. qPCR-instrumentet bruker fluorescens fra ROX til å normalisere fluorescens fra qPCR-produktet, noe som kurvene R_n og ΔR_n i amplifikasjonsplottene baserer seg på. (39).

For at det skal kunne foregå en amplifikasjon må det være ulike komponenter til stede i qPCR-brønnen. I dag finnes det ferdigblandede mastermikser bestående av alle generelle komponenter som må være til stede. En mastermikser med SYBR Green kan bestå av reaksjonsbuffer, nukleotider (dATP, dCTP, dGTP og dTTP), $MgCl_2$, Taq DNA Polymerase, SYBR Green I-fargestoff og stabiliseringsenzymer (34, 40). For å kunne undersøke genekspressjonen blir det tilsatt primere som er innledende sekvenser til målgen (Beclin 1) og normaliseringsgen (GAPDH og HPRT). For primerenes nukleotidsekvens se *Tabell 3*. Nuklease- eller RNasefritt vann benyttes for å oppnå likt volum i alle brønnene og i stedet for templat i NTC (no template control).

2.6.2 Relativ kvantifisering

Ved undersøkelser av mRNA-uttrykk er det i hovedsak relativ kvantifisering som blir benyttet. Dette gir et innblikk i hvordan uttrykket av mRNA varierer mellom ulike prøver i stedet for å kartlegge det totale uttrykket av et bestemt gen, i en bestemt prøve, ved absolutt kvantifisering. For å kunne si noe om hvordan prøvene varierer i forhold til hverandre må resultatene normaliseres. Dette gjøres ved hjelp av en eller flere interne kontroller som danner et bakgrunnsteppe for sammenlikningen av prøvene (41). Ofte kalles disse nullprøver eller kontrollprøver. Disse prøvene skal representere det gjennomsnittlige eller normale uttrykket av utvalgte målgen og normaliseringsgen i de cellene som skal undersøkes. Genuttrykket til stressede eller behandlede celler vil kunne sammenliknes med uttrykket til kontrollcellene. På denne måten vil uttrykkene kunne sammenlignes, og det vil bli mulig å se hvordan uttrykket av målgen avviker fra kontrollcellen ved ulike stressorer eller behandlinger.

2.6.3 Normaliseringsgen

Normaliseringsgen er gener som blir uttrykt med liten variasjon i ulike celletyper og under ulike miljøbetingelser. Det finnes mange ulike normaliseringsgen, felles for dem er at de uttrykker essensielle og grunnleggende funksjoner i en celle for at cellen skal kunne leve. Dette innebærer at uttrykket av normaliseringsgen i hovedsak skal være likt i alle prøver uavhengig av stressorer og behandling. I kvantitative analyser, som qPCR, fungerer derfor normaliseringsgen som en intern standard både i relativ og absolutt kvantifisering (42). I denne typen kvantitative analyser benyttes gjerne tre eller flere normaliseringsgen for å minske variasjon og skjevhet i resultatene. Igjennom flere studier har det vist seg at normaliseringsgen kan vise en variasjon ut ifra celletype og behandling. Derfor er det viktig å validere ulike normaliseringsgen for nye analyser. Det mest stabile normaliseringsgenet blir benyttet til utregning av genekspresjonen (43, 44). Ved bruk av qPCR er det viktig å optimalisere primerene for normaliseringsgen og målgen for å kunne studere endringer i genekspresjonen. Normaliseringsgen bør i tillegg valideres for å kunne gi troverdige resultater (45). Normaliseringsgenene som benyttes i denne studien er GAPDH (D-glyceraldehyde 3-phosphat dehydrogenase) og HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase).

GAPDH er et enzym som spiller inn på glykolysen. I glykolysen skapes det næring til cellene ved at glukose brytes ned til pyruvat. Det har vært oppdaget svært lite mutasjoner i dette genet over tid, noe som gjør GAPDH er egnet som et normaliseringsgen (46).

HPRT er et viktig enzym i «the salvage pathway». «The salvage pathway» er en prosess i kroppen der nedbrutte nukleotider resirkuleres for å bygge opp nye nukleotider. På denne måten klarer kroppen å bruke komponenter på nytt (47).

Ved undersøkelser av mRNA i celler må prøvematerialet prepareres i tråd med prosedyrer for isolering av mRNA. mRNA som representerer graden av genuttrykk i en celle er i seg selv ustabil og vil brytes raskt ned grunnet tilstedeværelse av RNaser i de fleste miljøer. Det vil derfor være nødvendig å stabilisere mRNAet. Dette kan oppnås ved å syntetisere cDNA som et separat trinn før analyse på qPCR, kalt to-trinns qPCR. Ett-trinns qPCR er også en mulighet dersom isolert og rensert mRNA kan overføres hurtig til qPCR-instrumentet og analyseres med det samme (48). Syntesen av cDNA baserer seg på at eluat med mRNA tilsettes oligo (dt) primere spesifikke for mRNA ved anealing til poly-A hale. Revers transkriptase enzym initierer deretter syntese av komplementær DNA (cDNA) tråd. Videre kan ulike metoder benyttes for å få et rent cDNA produkt uten uracil-baser. En av de mest benyttede metodene er enzymatisk nedbrytning av mRNA tråden, etterfulgt av DNA-syntese som denne gangen benytter cDNA-tråden som templat (49).

2.6.4 Tolkning av resultat

Resultatene fra qPCR blir bearbeidet ut fra Ct-verdier og ulike grafer, hovedsakelig amplifikasjonsplott og smeltepunktsskurve. Kurven i amplifikasjonsplottet viser fluorescens i reaksjonen per syklus. Fluorescensen er proporsjonal med mengde qPCR-produkt i qPCR-brønnen. Smeltepunktsskurven gir en indikasjon på produktet dannet i analysen. Flere toppe i smeltepunktsskurven viser at det har blitt dannet flere produkter. Prøveresultater med kun en høy og spiss topp ved en temperatur mellom 80-90°C, antas å være ønsket spesifikt qPCR-produkt. En lav og flat topp ved en lavere temperatur antas å være primer-dimer og ved høyere temperaturer blir det antatt som andre uspesifikke produkter. I amplifikasjonsplottet blir fluorescens som er detektert plassert på y-aksen som Rn (fluorescens til produkt normaliser opp mot referansefarge) eller ΔRn (fluorescens til qPCR-produkt minus bakgrunnsstøy normalisert opp mot referansefarge). Dersom flere qPCR-brett skal

sammenliknes burde det gjøres innstillinger som tillater programvaren å normalisere fluorescens til begge brettene på likt grunnlag. Kurven i amplifikasjonsplottet blir delt inn i log fase, eksponentiell fase og platå fase, som en vekstkurve. Har kurven en tydelig stigning i eksponentiell fase, kan dette indikere en optimal fordobling av produkt for hver syklus [2n], dette tilsvarer 100% amplifikasjonseffekt (E) (50-52).

2.6.4.1 Ct og $\Delta\Delta Ct$

Fra programvaren til qPCR-instrumentet hentes det ut Ct-verdier for å kunne vurdere forskjeller i genekspresjon ved ulike betingelser som behandling eller tidsintervall. Ct-verdi er verdien der grafen i amplifikasjonsplottet krysser terskelverdi. Terskelverdien blir satt over baseline (antall sykluser i begynnelsen av qPCR-analysen som kun detekterer bakgrunnsstøy) og i genets eksponentielle fase for å kunne bestemme genuttrykket. Terskelverdien settes individuelt for hvert gen i analysen. Differansen mellom normaliserte Ct-verdier i de ulike prøvene, brukes i utregning av endring i genekspresjon. En lav Ct-verdi indikerer høy konsentrasjon av cDNA i prøven, mens en høy Ct-verdi indikerer lavere konsentrasjon av cDNA i prøven. (53, 54). For å kunne regne ut den eksakte genekspresjonen er det nødvendig å vite amplifikasjonseffekten (E) til genene. Amplifikasjonseffekten beskriver hvor mange nye kopier av cDNAet som blir dannet under en syklus i PCR-instrumentet. Som nevnt tilsvarer en E på 100% en eksponentiell vekst med fordobling for hver syklus [2n]. For å oppnå E på 100% må primere, PCR-oppsett, mastermiks og cDNA konsentrasjon optimaliseres og valideres for hver enkelt analyse. En E på mellom 90-100% er ønskelig for gyldig resultat. For å kunne bestemme eksakt E for analysen blir det ofte benyttet en standardkurve basert på kjente, fortynnede konsentrasjoner av cDNA (55).

Det finnes flere ulike metoder for å regne ut endring i genekspresjonen under relativ kvantifisering. En av metodene er ved bruken av $\Delta\Delta Ct$ -metoden (også kalt $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden). $\Delta\Delta Ct$ -metoden brukes for å beregne endring i genuttrykk ved hjelp av relativ endring (fold change) av målgen opp mot ett normaliseringsgen. For å kunne benytte $\Delta\Delta Ct$ -metoden må qPCR-oppsettet være riktig optimalisert slik at genene i analysen har en E på 100%. Ved å ha en E på 100% blir den logaritmiske verdien $\Delta\Delta Ct$ gjort lineær ved bruk av 2 som grunntall ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden er utarbeidet av Livak og Schmittgen (37). Livak og Schmittgen forutsetter at alle genene i analysen har lik E og at normaliseringsgenet har en stabil

genekspresjon. Normaliseringsgen skal teoretisk sett gi en $\Delta\Delta Ct$ på 0 som gir en relativ endring på 1 ($2^0 = 1$). Formelen for $\Delta\Delta Ct$ er:

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{målgen})} - Ct_{(\text{normaliseringsgen})}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{behandlet})} - \Delta Ct_{(\text{ubehandlet})}$$

Normaliseringsgen kan valideres ved hjelp av statistiske verktøy for å finne det best egnede normaliseringsgenet til analysen. Validering av normaliseringsgen utføres ved å regne ut gjennomsnitt og standardavvik mellom triplettene samt utføre t-test på lineære verdier for gjennomsnittlig Ct -verdier (2^{-Ct}). Det normaliseringsgenet som gir minst signifikant forskjell innad i normaliseringsgenet blir ofte ansett som best egnet ($P > 0,05$). I tillegg kan gjennomsnitt og standardavvik benyttes for å se på stabiliteten til normaliseringsgenet (37, 56).

2.6.4.2 t-test

For å kunne sammenlikne kvantitative observasjoner, som Ct -verdier for målgen, benyttes gjerne t-test. Ct -verdien må først normaliseres opp mot best egnet normaliseringsgen, for så å gjøres om til lineære verdier ved hjelp av $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Dette gjøres for å minske variasjoner innad i triplettene (37). T-testen kan avgjøre om resultater er signifikant forskjellig eller ikke, og egner seg for analyser både innad i et datasett for å avgjøre om datasettet viser korrekte verdier, eller mellom datasett for å sammenlikne forskjeller. Ved testing må en hypotese fremstilles. Denne hypotesen kan være ensidig eller tosidig, avhengig av hvilken type t-test som skal utføres. En tosidig hypotesetest tar utgangspunkt i sammenlikning av to ulike datasett hvor $H_0: \mu_{\text{datasett A}} - \mu_{\text{datasett B}} = 0$ og $H_1: \mu_{\text{datasett A}} - \mu_{\text{datasett B}} \neq 0$. H_0 beskriver at datasettene er like, mens H_1 beskriver at datasettene er ulike. Denne testen kan utføres med ulike konfidensnivå, hvor 95% er det som tas utgangspunkt i, for å godkjenne hvilken av hypotesene som er korrekt. Videre tas en avgjørelse om det er antatt lik eller ulik varians mellom datasettene. Dersom det er to datasett som av ulike årsaker utføres under ulike forhold vil det i hovedsak være antatt ulik varians (57). For å utføre t-tester benyttes ofte programmer som Microsoft Excel.

3.0 Materiale og metode

3.1 Cellekultivering

A549-celler (ATCC, a.nr CCL-185) ble dyrket i 75 cm² celleflasker med Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1X + glutamax, Gibco, a.nr 31331-028) tilsatt 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, a.nr A3160801) og 0,1 % PenStrep (penicillin 10000 U/ml og streptomycin 10000 µg/ml, Gibco, a.nr 15140-148). Videre vil denne blandingen omtales som «DMEM» da det aldri ble benyttet DMEM uten overnevnte tilsetninger. Cellene ble dyrket i inkubatorskap på 37 °C med 5% CO₂.

Ved bruk av invert mikroskop ble det bestemt om cellene var i eksponentiell fase. Ved splitting til nye celleflasker var ønsket konfluens mellom 70-90%. Cellene ble så splittet i LAF-benk under aseptiske forhold. Gammelt medium ble fjernet og cellene vasket med 2x5 ml HBSS 1X (HyClone, a.nr SH30588.02). For å løsne cellene ble det tilsatt 1 ml 0,25% trypsin (Gibco, a.nr 25200-056). Etter å ha sørget for at alle cellene ble dekket med trypsin, ble flasken stående til inkubasjon på benken i 8-10 minutter før den ble undersøkt i invert mikroskop. Ved oppnådd konfluens på 20% (80% løsnet) ble det tilsatt 4 ml DMEM for å inaktivere trypsinet.

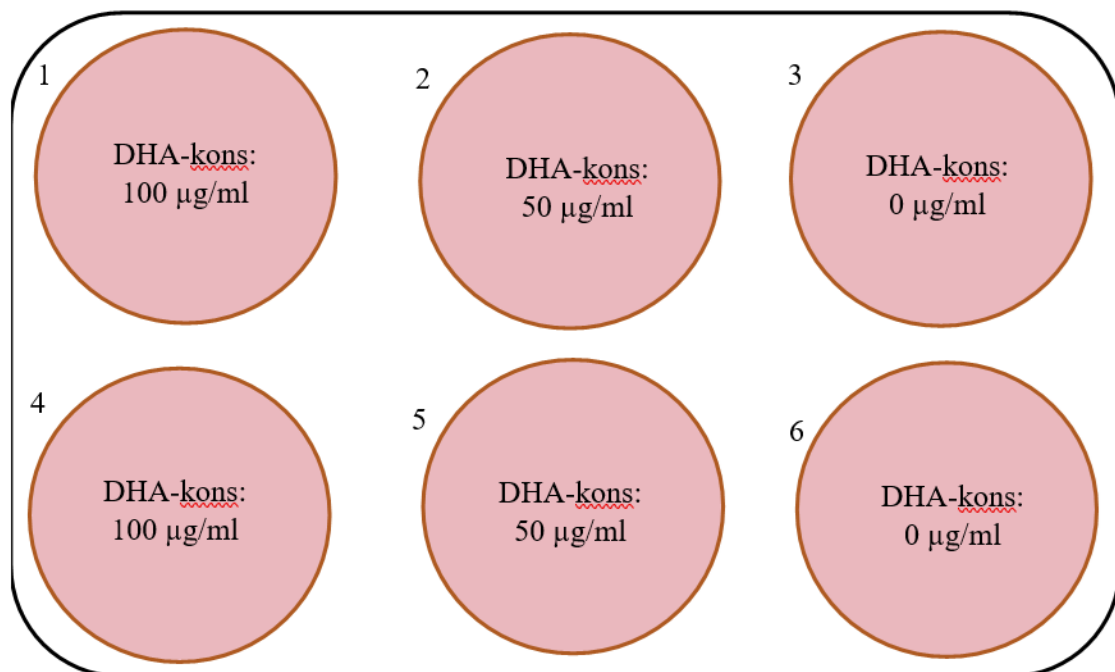
Hele volumet ble overført til et 15-ml falconrør som ble sentrifugert på 1200 rpm i 3 min. Tilbake i LAF-benk ble supernatant fjernet før det ble tilsatt 1 ml DMEM for å løsne opp pellet. Det ble så tilsatt ytterligere 5 ml DMEM. Beregnet mengde cellesuspensjon og DMEM ble så overført i nye flasker til totalvolum på 20 ml per flaske. Det ble totalt gjennomført 12 cellesplittings hvor startkultur hadde passasjennummer 252 og sluttkultur hadde passasjennummer 264. For mer detaljert beskrivelse av cellekultivering, se vedlegg A.2.2.

3.2 Inkubasjon med DHA

Før inkubasjon med DHA ble cellene i 75 cm²-flasker splittet over i cellebrett med seks brønner, hvor hver brønn hadde et volum på 9,6 cm². Det ble benyttet samme fremgangsmåte som beskrevet under *3.1 Cellekultivering* og vedlegg A.2.2. Det ble overført 0,2 ml av cellesuspensjonen og 5,8 ml DMEM til hver brønn på cellebrett.

DMEM med de to ulike konsentrasjonene av DHA ble klargjort i LAF-benk. 10 mg flytende DHA (Sigma-Aldrich, a.nr 6217-54-5) ble pipettert over i et falconrør med 50 ml DMEM som gav en konsentrasjon på 200 µg/ml. Det ble deretter sterilfiltrert 7 ml og 14 ml av blandingen over i hver sine falconrør. Til falconrøret med 7 ml ble det tilsatt 21 ml DMEM til et totalvolum på 28 ml med 50 µg/ml DHA. Til falconrøret med 14 ml ble det tilsatt 14 ml DMEM til et totalvolum på 28 ml med 100 µg/ml DHA. Falconrørene ble deretter pakket inn i aluminiumsfolie og fryst ned. Falconrørene med 50 µg/ml og 100 µg/ml DHA ble tatt opp fra fryseren og tint i romtemperatur rett før tilsetning i brønn. For en mer detaljert beskrivelse se vedlegg A.2.3.

Etter at cellene fikk festet seg i brønnene og kommet opp til en konfluens på omkring 35-40% ble det tilsatt rent DMEM i brønn 3 og 6. DMEM med tilsatt DHA i konsentrasjonen 50 µg/ml ble tilsatt i brønn 2 og 5 og DMEM med tilsatt DHA i konsentrasjonen 100 µg/ml i brønn 1 og 4, se *Figur 6*. Samme fordeling ble gjort på to brett der hensikten var å se på effekten av DHA i ulike konsentrasjoner etter én og to cellykluser på henholdsvis 22 og 44 timer.



Figur 6: Figuren viser oppsettet av DHA-konsentrasjon fordelt på brettet. Begge brettene hadde samme oppsett. I brønn 1 og 4 ble det tilsatt DMEM med 100 µg/ml DHA, brønn 2 og 5 ble det tilsatt DMEM med 50 µg/ml DHA og i brønn 3 og 6 ble det tilsatt DMEM uten DHA. Brønn 3 og 6 fungerer som kontrollprøver i analysen. Illustrasjon laget i Paint.

3.2.1 Lysering og preparering av prøvemateriale

Cellebrettene ble tatt ut av inkubatorskap etter 22 og 44 timer for analyse av genekspressjon, som indikasjon på apoptose induisert av DHA. Utover konsentrasjon av DHA og antall timer i inkubatorskap, har brettene blitt behandlet likt. Brettene ble observert i invert mikroskop for å undersøke konfluens og morfologi etter 22 og 44 timer. Gammelt medium ble fjernet og cellene ble vasket med 1 ml HBSS før brettene ble satt på is. Cellen ble lysert direkte i brønn ved hjelp av RLT-buffer fra RNeasy mini kit (Qiagen, a.nr 74104) og inkubert i 10 minutter før protokoll for RNeasy ble fulgt. For detaljert beskrivelse av fremgangsmåte se vedlegg A.2.4.

3.2.2 Stabilisering og lagring av cellulært RNA

Isolert RNA ble lagret i eppendorfrør sammen med RNasefritt vann benyttet i siste trinn i RNeasy. Eppendorfrøret ble oppbevart i fryseren på -20°C. Prøvene ble lagret i fryseren i seks til sju dager før cDNA-syntese ble utført. Rett før syntese av cDNA ble prøvene tatt ut og satt på is. Det ble benyttet Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, a.nr Q32855) for å måle RNA-konsentrasjonen i prøvene for å kunne overføre riktig mengde til cDNA-syntese. Qubit-verdiene og volumet som ble overført kan ses i vedlegg A.2.6. RNA konsentrasjonen overført til cDNA-syntese var mellom 1 µg – 10 pg, som tilsvarer volumet 2,5 µl -15 µl. Ved syntese av cDNA ble qScript cDNA Synthesis Kit (Quantabio, a.nr 95047-100) benyttet. I PCR-strips ble mastermiks fra cDNA-syntese kitet, RNasefritt vann og RNA tilført til et totalvolum på 20 µl. Se vedlegg A.2.7 for utfyllende fremgangsmåte for cDNA-syntese. Prøvene ble lagt direkte i fryseren på -20°C i påvente av qPCR-analyse.

3.3 Analyse av genekspressjon på qPCR

3.3.1 Optimalisering på qPCR

Alle optimaliseringer ble utført i tråd med prosedyrer, se vedlegg A.2.8 - A.2.10, bortsett fra optimaliseringen av cDNA-konsentrasjon, hvor reagenser og tid ikke strakk til. For innstillinger på qPCR-instrument se vedlegg A.2.12.

3.3.1.1 Temperaturoptimalisering og kontroll av primer- og cDNA-funksjonalitet

Primerene ble testet for å sjekke funksjonalitet, og ved hvilken temperatur de fungerte best. Den første optimaliseringstesten ble gjort ved 58°C, den neste ved 59°C og den siste ved 57°C. Temperaturoptimaliseringen på 57°C viste optimale resultater og ble derfor brukt

videre i primeroptimaliseringen og analysen av prøvene. Avgjørelser som ble tatt i løpet av qPCR-optimaliseringen ble basert på vurderinger av reproduserbarhet, T_m-verdi, Ct-verdi samt tolkning av kurvene i amplifikasjonsplott og smeltekurvene for å unngå primer-dimere og uspesifikke produkter. Primerene ble fortynnet fra 100000 nM til 10000 nM ved å lage en løsning med 90 µl RNasefritt vann og 10 µl konsentrert primer. Endelig konsentrasjon av benyttet primer ble 500/500 nM. Disse fortynnede primerene ble lagret i fryser til videre bruk. Mengde cDNA i brønnene ble bestemt etter vurdering av Qubit-resultater av prøvene. Endelig konsentrasjon av benyttet cDNA ble mellom 100-400 pg/µl. Mengder av de ulike reagensene i hver qPCR-brønn ble som beskrevet i *Tabell 1*.

Tabell 1: Innholdet av reagenser i hver qPCR-brønn i temperaturoptimaliseringen. Alle qPCR-brønnene inneholdt til sammen 15µl reagenser. NTC-brønner som ikke inneholdt cDNA, inneholdt 0,5 µl mer RNasefritt vann for volumkompensasjon. Se vedlegg A.2.9.

	Med cDNA	NTC (negativ kontroll)
Fortynnet FWD primer	0,75 µl	0,75 µl
Fortynnet RWD primer	0,75 µl	0,75 µl
SYBR Green mastermiks med ROX	7,5 µl	7,5 µl
RNasefritt vann	5,50 µl	6 µl
cDNA	0,5 µl	-
Totalt	15 µl	15 µl

PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® Low ROX (Quantabio, ar.nr 95074-250) ble brukt under hele optimaliseringsprosessen.

3.3.1.2 Primerkonsentrasjonsoptimalisering

Primerkonsentrasjonene som ble benyttet i qPCR-analysen ble bestemt ut fra resultatene under primeroptimaliseringen med anealingtemperatur på 57°C og 35 sykluser. 35 sykluser er standard for qPCR-analyser utført på universitetets laboratorium. Primerkonsentrasjonene det ble testet for var mellom 300 – 500 nM. Det ble testet for ulike konsentrasjoner på de ulike primersettene (forward og reverse). Det ble brukt to qPCR-brett under primeroptimaliseringen, da det ble optimalisert for totalt tre primersett. Se vedlegg A.2.10 for oppsettet på qPCR-brettene for primerene til GAPDH, HPRT og Beclin 1.

3.3.1.3 Optimalisering av cDNA-konsentrasjon

Optimalisering av cDNA-konsentrasjon ble ikke utført grunnet begrensninger gjennom studien, som begrenset tilgang på både SYBR Green med ROX og tid på laboratoriet (se *Begrensninger*). Det ble bestemt at cDNA-konsentrasjonen var godkjent så lenge den var mellom 100 – 400 pg/μl. Det ble derfor forsøkt å få cDNA-konsentrasjonen til 300 pg/μl (58).

3.3.2 Analyse av prøver på qPCR

cDNA ble fortynnet til en konsentrasjon mellom 0,134 – 0,345 μg/ml (134 – 345 pg/μl) for å oppnå en konsentrasjon under 400 pg/μl, se vedlegg A.2.6. cDNA ble fortynnet til et totalt volum på 100 – 200 μl. Primerene (Thermo Fisher Scientific, a.nr 10336-022) som ble benyttet i analysen ble fortynnet fra 100000 nM til 3000 nM. Fortynnet primer ble videre fortynnet til ønsket konsentrasjoner på 500 nM, 400 nM og 300 nM, se oppsettet i vedlegg A.2.13 og A.2.14 for benyttede konsentrasjon. Ved fortynning av cDNA og primer ble fortynningsformelen benyttet:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

C_1 = konsentrasjon til løsning 1

V_1 = volum til løsning 1

C_2 = konsentrasjon til løsning 2

V_2 = volum til løsning 2

Primersettene og RNasefritt vann ble blandet separat for å minske risiko for feilpipettering over på qPCR-brett. Alle reagens som ble pipettert over i qPCR-brettet ble vortexet og sentrifugert før pipettering. Dette ble gjort som et sikkerhetstrinn for at løsningen skulle være homogen. I hver brønn ble det pipettert 7,5 μl PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® (Quantabio, a.nr 95072-250), 6,5 μl primermiks (tilsvarer 1,5 -2,5 μl primer), 1 μl cDNA og RNasefritt vann til qPCR-brønnen hadde et totalvolum på 15 μl. 15 μl i hver brønn er standard volum i qPCR-analyser utført på universitetets laboratorium, da dette avviker fra protokollen til SYBR Green FastMix (59). For en detaljert mengde av reagensene se oppsett i vedlegg A.2.13 og A.2.14. Den samme personen gjorde alle pipetteringene på samme brett for å forminske en variasjon i qPCR-analysen. qPCR-analysen ble utført på 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems 7500 instrument, Applied Biosystems Corporation Business) etter

qPCR-programmet beskrevet i *Tabell 2*. Videre i bacheloroppgaven blir 7500 Real Time PCR System omtalt som «qPCR-instrumentet».

Tabell 2: Presentasjon av innstillingene for analysen på qPCR-instrumentet som er benyttet i denne bacheloroppgaven. Tabellen viser temperaturen, tid og antall sykluser til de ulike stegene i qPCR-analysen. Annealingtemperatur ble bestemt ved temperaturoptimalisering og 35 sykluser er standard ved universitetslaboratorium. De andre verdiene er standard for qPCR-instrumentet.

	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Aktivering av polymerase	95°C	10 min	1
Amplifisering	95°C	15 sek	35
	57°C	1 min	
Smeltekurve	95°C	15 sek	1
	60°C	1 min	
	95°C	30 sek	

Primeren til målgenet Beclin 1 ble bestemt ut fra en tidligere forskningsrapport som benyttet seg av analyse på qPCR, men på en annen human kreftcellelinje enn A549 (60). For å verifisere at primeren kodet for det humane Beclin 1-genet ble sekvensene testet i NCBI Blast.

Tabell 3: Tabellen viser primerene benyttet i denne studien. I denne tabellen viser primerene for de ulike genene, om de benyttes som målgen eller normaliseringsgen (primer type), leseretningen til primeren og nukleotidsekvensen. Leseretningen er FWD (forward primer) og RWD (reverse primer). Nukleotidsekvensen er listet opp i leseretning 5'-3'.

Primer	Primer type	Leseretning	Nukleotidsekvens (5' - 3')
Beclin 1	Målgen	FWD	AGC CAG CCC CTG AAA CTG
		RWD	CTG CCA CTA TCT TGC GGT TCT
GAPDH	Normaliseringsgen	FWD	GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G
		RWD	ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A
HPRT	Normaliseringsgen	FWD	CAT TAT GCT GAG GAT TTG GAA AGG
		RWD	CTT GAG CAC ACA GAG GGC TAC A

3.4 Utregning og behandling av innsamlet data

3.4.1 Hvordan resultatet blir tolket i programmet

Grafer, baseline og terskelverdi ble analysert i 7500 software v2.3. 7500 software v2.3 er qPCR-instrumentets behandlingsprogram av data og blir videre i bacheloroppgaven omtalt som «programvaren». Baseline og terskelverdi ble automatisk satt av programvaren, men ble kontrollert manuelt. qPCR-instrumentets baseline ble anslått til å være riktig. Terskelverdien ble manuelt flyttet i det logaritmiske amplifikasjonsplottet (ΔR_n). Terskelverdien ble satt til å ligge over bakgrunnsstøyen og i starten av den eksponentielle fase. Det ble satt individuell terskelverdi for hvert gen. Hver kurve ble vurdert individuelt og opp mot de biologiske triplettene. Triplettene ble vurdert opp mot amplifikasjonsplottet og smeltepunktskurven for å se på reproduserbarhet og nøyaktighet mellom prøvene. I amplifikasjonsplottet er det ønskelig å oppnå en sigmoid kurve, også kalt S-kurve (50). Ct-verdi mellom 15-30 sykluser for genet er antatt å være gyldig (11). Forskjellen i Ct-verdi innad i tripletten skal ikke være mer enn 0,3 sykluser for å vise reproduserbarhet (61). For at resultater i form av Ct-verdier skal være gyldige ved amplifikasjon i NTC, skal Ct-verdiene i NTC ha en differanse på ≥ 5 sykluser fra andre prøver med templat (62). Dataene for Ct-verdi og smeltepunkt (T_m) ble hentet ut fra programvaren.

3.4.2 T-test og grafisk fremstilling av resultat

Ct-verdier fra analysen ble systematisert i tabeller og ført inn i Microsoft Excel. For normaliseringsgenene (GAPDH og HPRT) ble det regnet ut gjennomsnittlig Ct-verdi og standardavvik for hver triplett. For å finne ut om normaliseringsgenet hadde en signifikant forskjell innad i datasettet ble Ct-verdien gjort lineær (2^{-Ct}) før det ble utført t-test. Gjennomsnitt og standardavvik ble videre benyttet til å vurdere stabiliteten til normaliseringsgenet. Ct-verdiene fra Beclin 1 ble normalisert opp mot best egnet normaliseringsgen (GAPDH) og benyttet for å regne ut ΔCt og $\Delta \Delta Ct$. Videre ble verdiene omregnet til lineære størrelser i form av $2^{-\Delta \Delta Ct}$ for å kunne utføre t-test. T-testene ble gjennomført med antatt lik varians mellom parallellene innad i hver konsentrasjon med 0, 50 og 100 $\mu\text{g/ml}$ DHA og med antatt ulik varians mellom konsentrasjonene 0 og 50 $\mu\text{g/ml}$, 0 og 100 $\mu\text{g/ml}$ samt 50 og 100 $\mu\text{g/ml}$, alle innenfor samme tidsintervall. Hypotesetesten som er benyttet beskrev nullhypotese (H_0) som beviser likhet mellom prøvene og alternativ hypotese (H_1) som beskrev signifikant forskjell mellom prøvene. Signifikansnivå ble satt til 5% som innebærer at nullhypotese vil forkastes dersom t-test gir en P-verdi på eller under 0,05. I dette

tilfellet vil den alternative hypotesen aksepteres. I tillegg til t-tester ble resultatet, i form av $\Delta\Delta C_t$ -verdier, fremstilt grafisk. Alle t-tester og grafiske fremstillinger av resultat ble utført i Microsoft Excel, med unntak av grafer hentet direkte fra programvaren.

4.0 Resultat

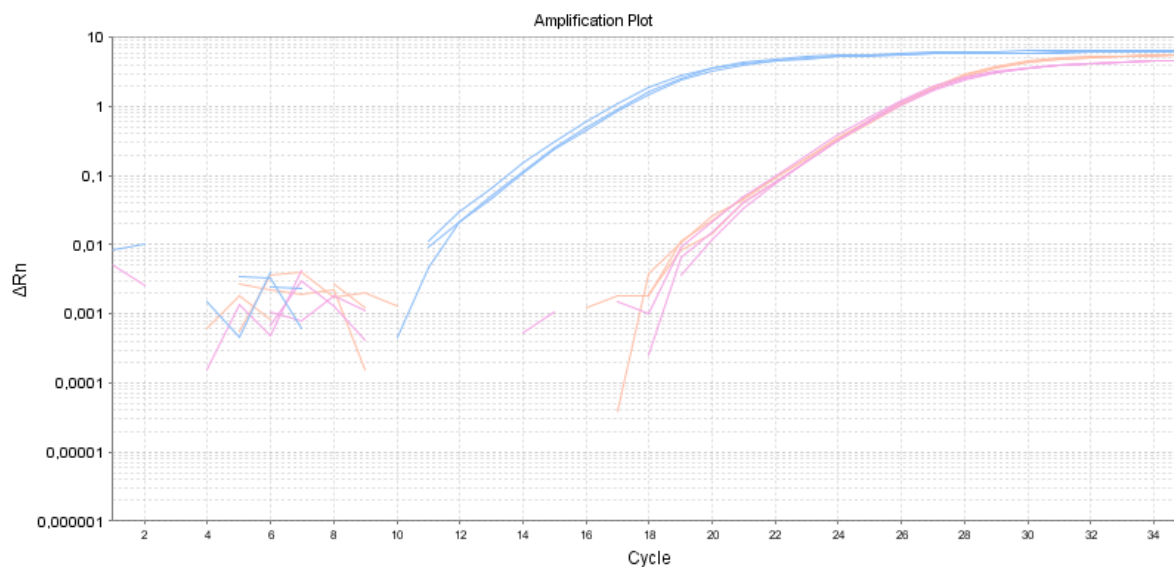
Resultatene som presenteres er hentet fra to cellebrett med 6 brønner hver, der cellene har blitt behandlet med en DHA-konsentrasjon på 0, 50 og 100 $\mu\text{g/ml}$ over én og to cellesykluser. Det ble hentet ut to prøver fra celleflasken merket null 1 og null 2. Mengde cellesuspensjon og antatt konfluens etter 22 og 44 timer er presentert i *Tabell 19* (vedlegg A.4.1). Brettene ble merket med tallet 1 og 2, samt brønnene på hvert brett med merket med respektive tall fra 1-6. Ved overføring til qPCR-brett ble det benyttet 3 paralleller per brønn fra cellebrettet, som tilsvarer 6 paralleller per konsentrasjon av DHA per tidsintervall.

Resultat i form av Ct-verdier og Tm er hentet ut fra programvaren, er presentert i *Tabell 20* og *Tabell 22* (vedlegg A.4.2). I tabellene blir resultatene presentert etter brønn på qPCR-brettet, prøve, DHA-konsentrasjon, målgenet, innhold i brønnene (cDNA eller NTC), Ct-verdi og Tm1-Tm3. GAPDH blir vurdert som det mest stabile og egnede normaliseringsgenet. HPRT blir derfor ikke tatt med i videre bearbeiding av resultatene. Flere av brønnene på qPCR-brettet har blitt merket av programvaren grunnet høyt standardavvik mellom tripllettene (HIGHSD), amplifikasjon i NTC (AMPNC), flere topper i smeltepunktanalysen (MTP) og uteligger (OUTLIERRG), dette er presentert i *Tabell 21* og *Tabell 23* (vedlegg A.4.2). Grafisk framstilling av resultatene fra optimaliseringen og prøvene er presentert i form av amplifikasjonsplott i vedlegg A.4.3 og smeltepunktskurve i vedlegg A.4.4.

4.1 Grafisk framstilling av genuttrykket i A549 cellene

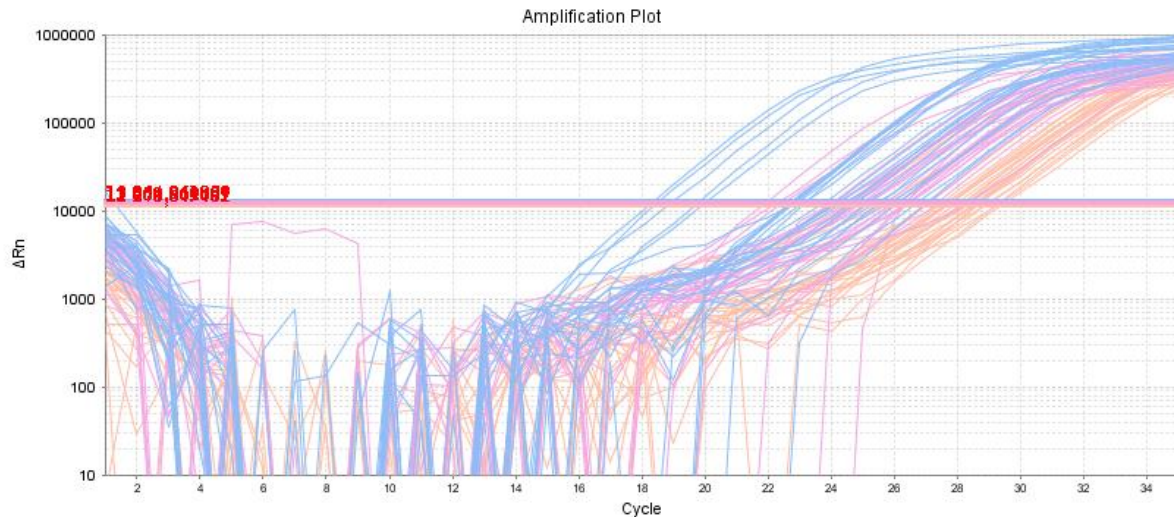
4.1.1 Amplifikasjonsplott

Amplifikasjonsplottene er hentet direkte ut fra programvaren. Amplifikasjonsplottet viser mengde fluorescens (ΔR_n) etter hver syklus i qPCR-analysen. *Figur 7* viser et optimalt logaritmisk amplifikasjonsplott for temperaturoptimaliseringen for genene GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje). Hvert gen ble analysert i tripletter. Ved de innledende syklusene og under terskelverdien er grafen usammenhengende og delt, dette defineres som bakgrunnsstøy (terskelverdien er ikke merket på figuren). SYBR Green mastermiks med ROX ble benyttet i analysen av prøvene i *Figur 7*.



Figur 7: Grafen viser fluorescens (ΔRn) ved temperatur 57 °C logaritmisk for GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje). Grafen er hentet fra temperaturoptimaliseringen og viser hvordan et optimalt amplifikasjonsplott ser ut. Her ble det benyttet qPCR-kit SYBR Green med ROX.

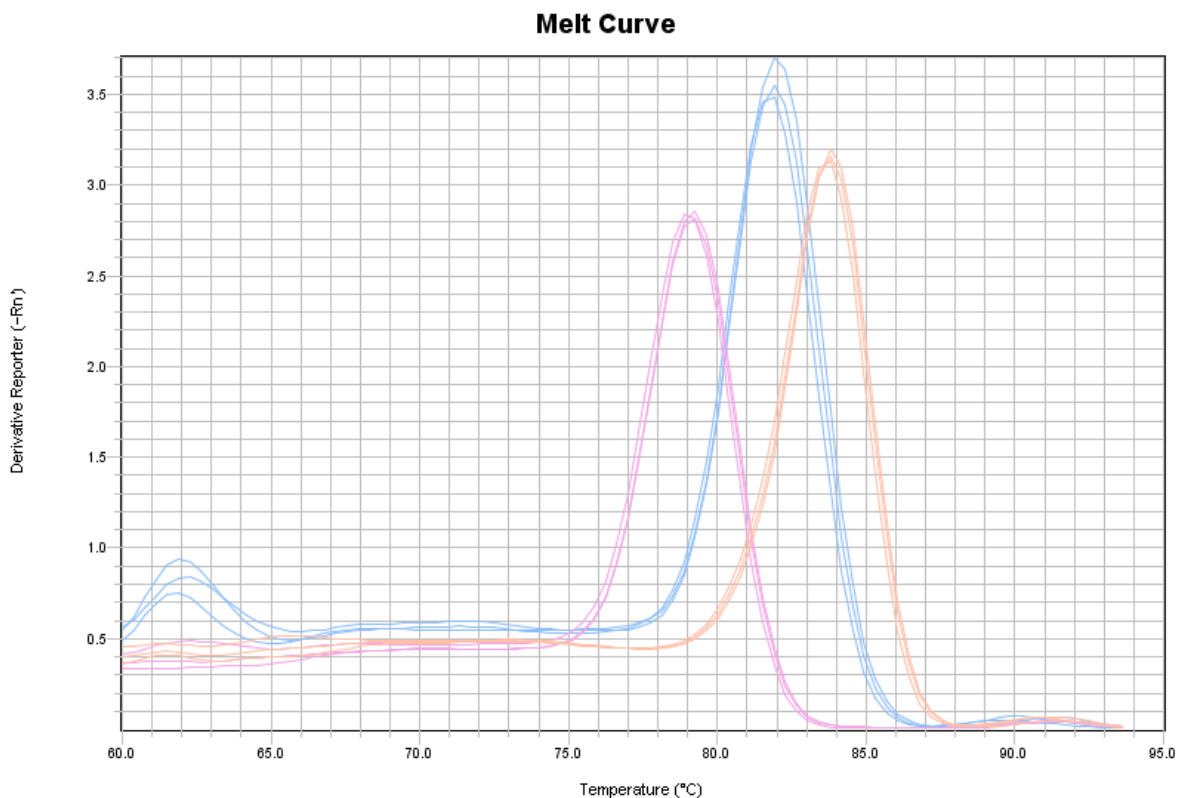
Figur 8 viser fluorescensen etter hver syklus i brett på 22 timer. For eksakte Ct-verdier, se Tabell 20 (vedlegg A.4.2). I amplifikasjonsplottet er det en rosa kurve med en flat topp mellom syklus 5-9 som tilsvarer brønn H10 på qPCR-brettet. Fluorescens detektert fra H10 viser en unormal kurve ved begge brettene som er undersøkt i analysen, se Figur 19 og Figur 21 (vedlegg A.4.3). Genene viser stor variasjon i Ct-verdi mellom prøvene og tripllettene ved begge tidsintervall, se Tabell 20 og Tabell 22 (vedlegg A.4.2). Amplifikasjonsplottet i Figur 8 er analysert med SYBR Green mastermiks uten ROX. qPCR-instrument som analysen ble utført på er ikke optimal for analyser med SYBR Green mastermiks uten ROX.



Figur 8: Grafen viser resultatet til prøvene på brett på 22 timer. Genene GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) er merket med ulik farge. Fluorescens (ΔR_n) til qPCR-produktet på y-aksen etter antall sykluser på x-aksen. Her er prøvene for null 1, null 2 og NTC tatt med i amplifikasjonsplottet. Rosa graf med flatt toppunkt ved Ct-verdi mellom 5-9 er fra brønn H10. Terskelverdi er merket med horisontal linje ved ΔR_n 1000. Det er blitt benyttet et qPCR-kit SYBR Green uten ROX under denne qPCR-analysen.

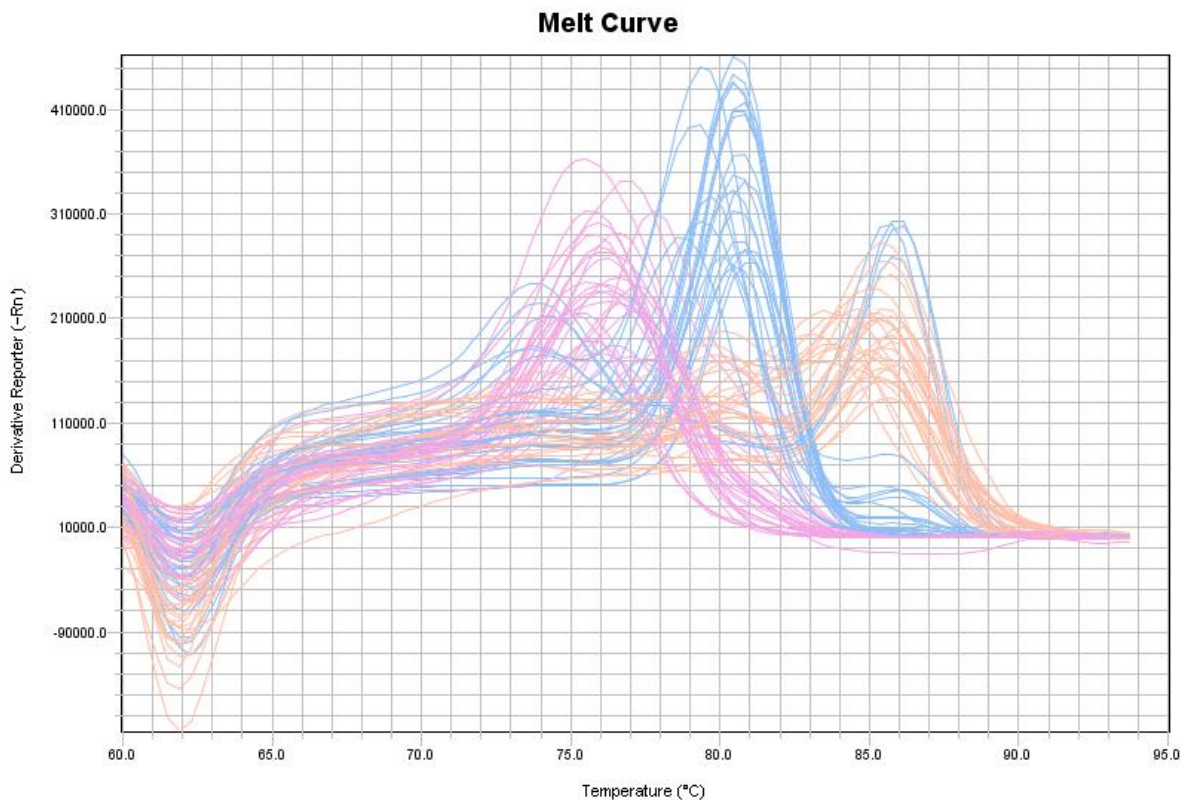
4.1.2 Grafisk framstilling av smeltepunksanalyse

Figur 9 viser smeltepunktskurvene til produkter dannet under temperaturoptimalisering på qPCR-instrumentet, fremstilt ved anealingtemperatur 57°C . Kurvene blir fremstilt av deriverte fluorescens ($-\dot{R}_n$) på y-aksen opp mot temperatur på x-aksen. Fluorescensen til genene GAPDH (blå), HRPT (rosa) og Beclin 1 (oransje) viser en spiss topp uten skulder, som viser at det kun er dannet et produkt i brønnene. Kurvene til GAPDH har et lite, flatt toppunkt ved temperatur mellom $60-65^{\circ}\text{C}$.



Figur 9: Grafene viser smeltepunktskurven til GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) ved en temperatur på 57°C etter temperaturoptimalisering. Grafene er brukt som et eksempel på en fin smeltepunktskurve ved qPCR-analyse. Grafen blir presentert med derivert fluorescens (-Rn') på y-aksen og temperatur (°C) på x-aksen. Genene ble analysert i tripletter hvor Tm1 til GAPDH er 81.904°C, 81.715°C og 81.904°C, HPRT er 79.072°C, 79.26°C og 79.072°C og Beclin 1 er 83.603°C, 83.792°C og 83.792. Det ble benyttet SYBR Green med ROX.

Figur 10 viser smeltepunktskurven til alle prøvene på brett på 22 timer. De tre genene det er testet for (GAPDH, HPRT og Beclin 1) viser lite spesifikk dannelse av qPCR-produkt. Det er spredning innen temperatur med temperaturdifferanse på 2,1°C for Tm1 i GAPDH, 2,3°C for Tm1 i HPRT og 2,1°C for Tm1 i Beclin 1. Flere av grafene har flere registrerte Tm-verdier, se *Tabell 20* (vedlegg A.4.2) for eksakte Tm-verdier for brett på 22 timer. Beclin 1-grafene har en skulder før den danner et toppunkt ved 85°C. Alle grafene har en bølgedal ved temperatur 60-65°C, som antas å være bakgrunnsstøy. Prøvene som er detektert i *Figur 10* er fra qPCR-analyse med SYBR Green mastermiks uten ROX.



Figur 10: Grafen viser smeltepunktskurven til GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) for prøvene fra brett på 22 timer. Den deriverte fluorescens (-Rn') er presenter på y-aksen opp mot temperatur (°C) på x-aksen. Smeltepunktskurven til alle qPCR-brønnene er presentert. Alle grafene har en dalende kurve i starten (bakgrunnsstøy). Ingen av genene viser entydigtopp punkt ved lik Tm. Beclin 1 har en tydelig skulder før Tm på ved 85°C. Analysen er gjennomført med et qPCR-kit SYBR Green uten ROX.

4.2 Ct-verdier

Ct-verdiene fra programvaren som er tatt med i videre beregninger er presentert i *Tabell 4* og *Tabell 5*. Ct-verdiene for null 1, null 2 og NTC er utelatt på grunn av sammenlikning innad på brettet, da brønnene uten DHA blir benyttet som kontrollprøver. Verdiene for null 1, null 2 og NTC er presentert i *Tabell 20* og *Tabell 22* (vedlegg A.4.2).

Tabell 4 presenterer Ct-verdiene for brett på 22 timer. Tabellen beskriver hvilket gen som er analysert, prøvenummer, DHA-konsentrasjon prøvene er behandlet med og den enkelte prøves Ct-verdi, i tillegg til gjennomsnitt av og standardavvik til tripllettene. Programvaren har merket prøve 2,3 Ct₁ med verdi på 27,93 for Beclin 1 grunnet for stort standardavvik fra de andre Ct-verdiene i samme tripllett. Ct-verdiene til GAPDH ligger mellom 22,85 og 25,69, og prøvene med størst standardavvik innad i tripllettene er prøvene 2,3 (0,8853) og 2,5 (0,7365). Ct-verdiene til HPRT ligger mellom 24,38 og 28,41, og prøvene med størst standardavvik innad i tripllettene er prøvene 2,3 (1,5904) og 2,2 (1,3715). Ct-verdiene til

Beclin 1 ligger mellom 27,00 og 29,49, og prøvene med størst standardavvik innad i tripllettene er prøvene 2,2 (0,8658) og prøve 2,6 (0,6601). Prøve 2,3 (brønn F10) er merket av programvaren med høyt standardavvik innad i tripletten.

Tabell 4: Tabell viser Ct-verdiene til tripllettene for qPCR-brønnene på brett på 22 timer. Kolonnen lengst til venstre er hvilket gen som er testet, etterfulgt av prøvenummer, DHA-konsentrasjon i brønnene, Ct-verdier, Ct-verdienes gjennomsnitt og standardavvik. Beclin 1 har en merket (gul) Ct-verdi grunnet høyt standardavvik, innad i tripletten merket av programvaren.

Gen	Prøve	DHA-kons.	Ct ₁	Ct ₂	Ct ₃	Gjennomsnitt	Standardavvik
GAPDH	2,3	0	25,69	24,76	23,92	24,79	0,8853
GAPDH	2,6	0	22,89	23,33	22,96	23,06	0,2364
GAPDH	2,2	50	25,38	25,66	24,64	25,23	0,5270
GAPDH	2,5	50	24,44	24,25	23,08	23,92	0,7365
GAPDH	2,1	100	22,92	22,98	22,85	22,92	0,0650
GAPDH	2,4	100	24,27	23,87	23,40	23,85	0,4354
HPRT	2,3	0	28,41	26,4	25,27	26,69	1,5904
HPRT	2,6	0	25,32	26,23	24,38	25,31	0,9250
HPRT	2,2	50	26,55	27,43	24,75	26,24	1,3715
HPRT	2,5	50	25,97	26,54	26,4	26,26	0,4030
HPRT	2,1	100	27,21	25,77	26,55	26,51	0,7208
HPRT	2,4	100	26,17	24,85	24,54	25,19	0,8655
Beclin 1	2,3	0	27,93	28,94	28,96	28,61	0,5889
Beclin 1	2,6	0	27,68	28,32	27,00	27,67	0,6601
Beclin 1	2,2	50	29,49	28,56	27,76	28,60	0,8658
Beclin 1	2,5	50	27,71	28,35	28,31	28,12	0,3585
Beclin 1	2,1	100	27,61	28,56	27,49	27,89	0,5862
Beclin 1	2,4	100	28,7	29,32	28,68	28,90	0,3638

Tabell 5 presenterer Ct-verdier hentet fra programvaren for brett på 44 timer, som er tatt med i videre beregninger. Tabellen viser hvilket gen som er analysert, hvilken DHA-konsentrasjon cellene er behandlet med og de ulike detekterte Ct-verdiene i tripllettene, i tillegg til gjennomsnitt av og standardavvik i tripllettene. Prøvene 1,5 og 1,6 er merket grå grunnet feilmarkering under preparering av prøvematerialet. Ct-verdiene til GAPDH ligger mellom 16,61 og 20,38, og prøvene med størst standardavvik innad i tripllettene er prøvene 1,5 (0,4378) og 1,3 (0,3785). Ct-verdiene til HPRT ligger mellom 20,53 og 24,80, og prøvene med størst standardavvik innad i tripllettene er prøvene 1,3 (0,4692) og 1,2 (0,4025). Ct-verdiene til Beclin 1 ligger mellom 22,67 og 30,51, og prøvene med størst standardavvik innad i tripllettene er prøvene 1,3 (3,5390), 1,5 (1,1174) og 1,4 (1,7200).

Tabell 5: Tabellen viser oversikt over Ct-verdiene til tripllettene for qPCR-brønnene på brett på 44 timer. Kolonnen lengst til venstre er hvilket gen som er testet etterfulgt av prøvenummer, DHA-konsentrasjon i brønnen og Ct-verdier, Ct-verdienes gjennomsnitt og standardavvik. Prøve 1,5 og 1,6 er merket med grå grunnet feilmarkering under preparering av prøvematerialet.

Gen	Prøve	DHA-kons.	Ct ₁	Ct ₂	Ct ₃	Gjennomsnitt	Standardavvik
GAPDH	1,3	0	17,2	17,11	17,17	17,16	0,0458
GAPDH	1,6	0	19,89	19,78	20,04	19,90	0,1305
GAPDH	1,2	50	18,45	18,56	18,61	18,54	0,0819
GAPDH	1,5	50	20,01	19,66	19,14	19,60	0,4378
GAPDH	1,1	100	16,61	16,63	16,62	16,62	0,0100
GAPDH	1,4	100	20,38	20,35	19,71	20,14	0,3785
HPRT	1,3	0	21,32	20,7	21,62	21,21	0,4692
HPRT	1,6	0	24,25	23,92	23,75	23,97	0,2542
HPRT	1,2	50	21,75	22,51	21,9	22,05	0,4025
HPRT	1,5	50	23,84	23,5	24,8	23,67	0,2404
HPRT	1,1	100	21,22	20,53	20,77	20,84	0,3503
HPRT	1,4	100	23,74	23,01	23,63	23,46	0,3936
Beclin 1	1,3	0	24,15	24,64	30,51	26,43	3,5390
Beclin 1	1,6	0	26,75	26,8	27,49	27,01	0,4136
Beclin 1	1,2	50	25,49	25,86	27,15	26,17	0,8715
Beclin 1	1,5	50	26,24	27	28,44	27,23	1,1174
Beclin 1	1,1	100	22,67	23,17	23,13	22,99	0,2778
Beclin 1	1,4	100	27,84	26,13	29,57	27,85	1,7200

4.3 Statistisk utregning av innsamlet data

4.3.1 T-test

For å vurdere om paralleller innen samme DHA-konsentrasjon (0, 50 og 100 µg/ml DHA) og tidsintervall var like, ble det utført t-test. Alle t-tester utført i denne forbindelse viste ingen signifikant forskjell mellom paralleller ($P > 0,05$). Grunnet feilmarkering av prøver (1,5 og 1,6) ble det ikke utført t-test innad i to av konsentrasjonene på brettet som stod i 44 timer, da det var umulig å bestemme hvilken prøve resultatet stammet fra. For analyse som inkluderer alle gyldige datasett, se vedlegg A.4.6. Ct₁-verdi for prøve 2,3 har blitt ekskludert fra videre bearbeiding da denne ble flagget som uteligger av programvaren, se *Tabell 21* (vedlegg A.4.2).

T-test mellom konsentrasjonene av DHA ble utført for å bestemme om uttrykk av Beclin 1 er forskjellig innenfor samme tidsintervall, men med ulike konsentrasjoner av DHA. Her ekskluderes igjen verdier som nevnt over. Det kommer frem av t-tester at det ikke er signifikant forskjell i noen av prøvene som stod i 22 timer hvor forskjell mellom 0 µg/ml og 50 µg/ml ($P = 0,17$), 0 µg/ml og 100 µg/ml ($P = 0,08$) og 50 µg/ml og 100 µg/ml ($P = 0,06$) ble kalkulert. Heller ikke i prøvene som stod i 44 timer viste signifikante forskjeller hvor 0

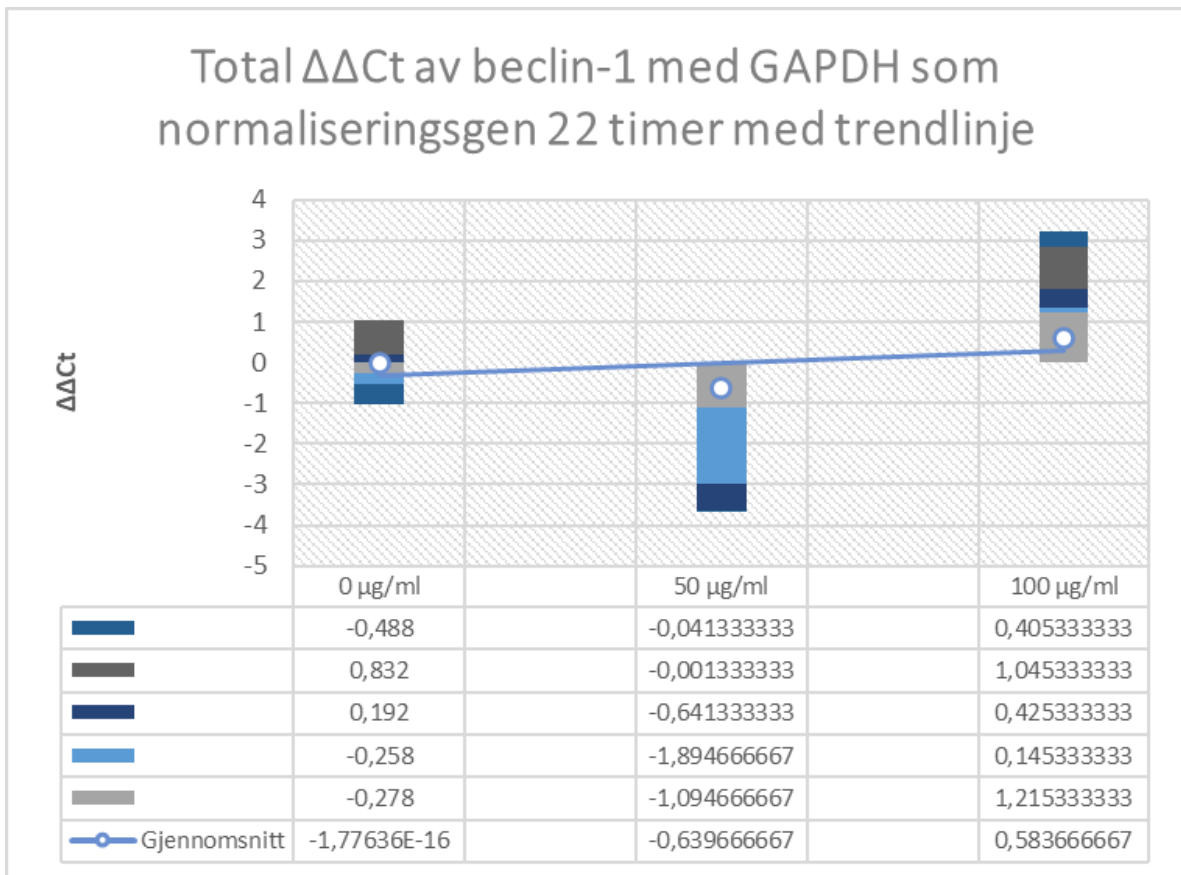
$\mu\text{g/ml}$ og $50 \mu\text{g/ml}$ ($P = 0,7$), $0 \mu\text{g/ml}$ og $100 \mu\text{g/ml}$ ($P = 0,16$) og $50 \mu\text{g/ml}$ og $100 \mu\text{g/ml}$ ($P = 0,18$) ble kalkulert. For utregninger gjort i Excel se vedlegg A.4.7.

For å sammenlikne uttrykket av Beclin 1 i like konsentrasjoner, men over ulikt tidsintervall ble t-tester utført mellom prøvene som stod i 22 og 44 timer. Her også er overnevnte prøver ekskludert fra beregningene. Ved $0 \mu\text{g/ml}$ ($P = 0,14$) og $50 \mu\text{g/ml}$ ($P = 0,21$) var det ikke forskjell på 5% signifikansnivå, mens det ved $100 \mu\text{g/ml}$ ($P = 0,01$) var signifikant forskjell i prøver som hadde stått i 22 og 44 timer.

4.3.2 Grafisk fremstilling av resultat

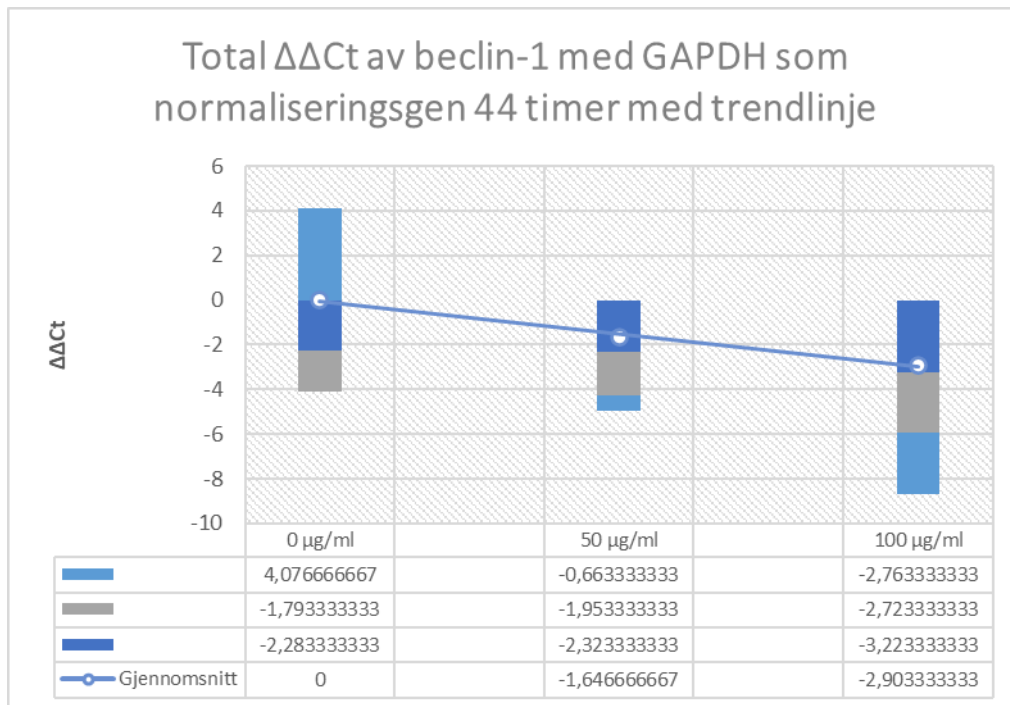
Resultatene av genuttrykket er presentert i tre figurer (*Figur 11-13*) hvor uttrykket av Beclin 1 ved de ulike konsentrasjonene av DHA ses opp mot hverandre innenfor samme tidsintervall og mellom tidsintervallene. Det er i tillegg lagt inn en trendlinje på de to første figurene basert på snittet av målingene for hver konsentrasjon av DHA for å tydeliggjøre eventuell trend i uttrykket av Beclin 1.

Figur 11 og *Figur 12* er basert på det normaliserte, logaritmiske uttrykket av Beclin 1; $\Delta\Delta\text{Ct}$ -verdier hvor positive verdier indikerer økning i genuttrykk i forhold til kontrollprøven, mens negative verdier indikerer nedregulering i uttrykket, se vedlegg A.4.6. Etter 22 timer viser ikke søylene en trend, men basert på trendlinje av snittverdiene er det en svak positiv utvikling. Dette innebærer et totalt sett økt uttrykket av Beclin 1-genet. Ved $0 \mu\text{g/ml}$ ligger prøvene rett rundt 0-1 mens det ved $50 \mu\text{g/ml}$ vises en drastisk nedgang og mye større variasjon mellom parallellene. Ved $100 \mu\text{g/ml}$ vises det samme, men her i positiv retning. Stolpene i figuren viser nedregulering av Beclin 1 fra 0 – $50 \mu\text{g/ml}$, mens det viser oppregulering av uttrykket fra 0 og 50 – $100 \mu\text{g/ml}$.



Figur 11: Stablet stolpediagram av verdiene for brett på 22 timer. Verdier fra de ulike konsentrasjonene vises på x-aksen mens $\Delta\Delta Ct$ vises på y-aksen. I første søyle, som er verdier for 0 $\mu\text{g/ml}$, er øverste mørk blå farge - 0,49. I andre søyle som er verdien for 50 $\mu\text{g/ml}$ -0,04 osv. Trendlinje av gjennomsnittet viser en svak oppregulering av genuttrykket til Beclin 1. Stolpene viser i snitt 0 i $\Delta\Delta Ct$ -verdi for kontrollprøvene med 0 $\mu\text{g/ml}$, mens det ved 50 $\mu\text{g/ml}$ viser en gjennomsnittlig nedgang i $\Delta\Delta Ct$. Ved 100 $\mu\text{g/ml}$ viser det en økning av genuttrykket og kun positive $\Delta\Delta Ct$ -verdier.

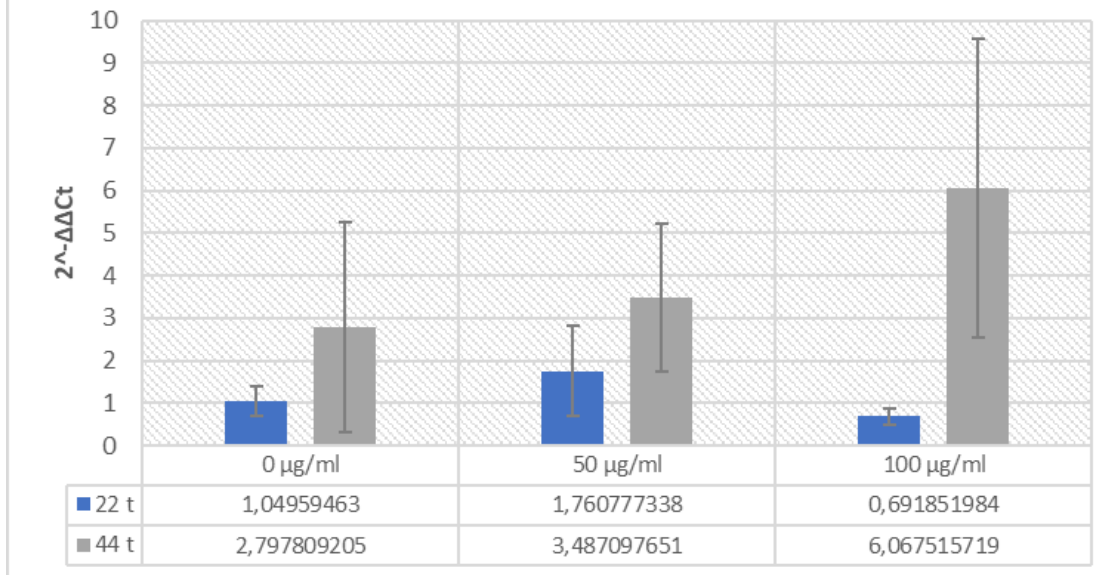
Etter 44 timer er figuren noe annerledes og med færre verdier enn hos 22 timer, grunnet feilmarkering av prøver. Trendlinjen forteller at uttrykket av Beclin 1 er totalt sett nedregulert, noe stolpene i figuren også indikerer i og med at alle verdiene er negative, se vedlegg A.4.6.



Figur 12: Stablet stolpediagram av verdiene for brett på 44 timer. I første søyle, som er verdier for 0 $\mu\text{g/ml}$, er lys blå farge 4,08. I andre søyle som er verdien for 50 $\mu\text{g/ml}$ -0,663 osv. Verdier fra de ulike konsentrasjonene vises på x-aksen mens $\Delta\Delta Ct$ vises på y-aksen. Trendlinje av gjennomsnittet viser en nedregulering av genuttrykket til Beclin 1. Stolpene viser i snitt 0 i $\Delta\Delta Ct$ -verdi for kontrollprøvene med 0 $\mu\text{g/ml}$ mens det ved 50 og 100 $\mu\text{g/ml}$ viser en gjennomsnittlig gradvis nedgang i $\Delta\Delta Ct$ hvor alle verdiene er negative.

I Figur 13 sammenliknes uttrykk av Beclin 1 for de ulike konsentrasjonene mellom 22 og 44 timer ved hjelp av lineære verdier ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Gjennomsnittet av gyldige målinger vises sammen med standardavvik for hver konsentrasjon i hvert tidsintervall, se vedlegg A.4.6. Ved bruk av lineære størrelser vil verdier over 1 på y-aksen indikere nedregulering av genuttrykk og verdier under 1 indikere oppregulering. Det kommer frem av figuren at prøvene på 44 timer generelt sett har en større nedregulering av genuttrykket enn prøvene på 22 timer. Prøvene på 44 timer har også større sprik i verdiene og dermed større standardavvik sammenliknet med prøvene på 22 timer. På 22 timer er det kun 50 $\mu\text{g/ml}$ som viser tegn til nedregulering. For nøyaktige verdier se vedlegg A.4.6.

Gjennomsnittlig uttrykk av Beclin 1 pr.
konsentrasjon av DHA for 22 og 44 timer
med standardavvik



Figur 13: Gjennomsnittet av $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -verdier for hver konsentrasjon benyttet for å sammenlikne resultatene mellom prøven med ulik konsentrasjon av DHA som stod i 22 (blå) og 44 (grå) timer. Nedregulering av gen vises i form av verdier over 1, mens oppregulering av gen vises som verdier under 1. Standardavvik vises i form av feilfelt på stolpene.

5.0 Diskusjon

5.1 Cellekultivering

Cellelinjen viste gjennom hele studien god vekst uten kontaminasjon, se vedlegg A.3 for bilder tatt i invert mikroskop. Ved dyrking i celleflasker var det i hovedsak jevn cellevekst, mens det i brønner på cellebrett viste noe ujevn vekst, som gjorde det utfordrende å bestemme konfluens. Det var i hovedsak en tendens til tettere cellevekst i kantene av brønnene, det ble derfor anslått konfluens i form av et intervall. I rapporter fra liknende studier (5, 8), har det blitt brukt antall celler for å anslå konfluens i brønner, mens det i denne studien har blitt anslått konfluens i form av observert og antatt prosent. Konfluensen kan derfor ikke benyttes som en kvantitativ analysemetode. Forskjeller i konfluens mellom brønner med ulik konsentrasjon av DHA vil derfor bli vanskelig å tilskrive noe annet enn en normal forskjell i cellevekst, med mindre forskjellen er veldig stor. Likevel kan fordelingen av cellesuspensjon i brønnene, samt uhomogenisert cellesuspensjon, være årsak til varierende konfluens. Det ble derfor kontrollert at suspensjonen var homogen ved å blande godt og pipettere nøyaktig gjennom cellekultiveringen og splittingen. Det ble likevel oppdaget samme ujevne konfluens i brønnene som dermed ikke tilskrives unøyaktighet ved blanding og tilsetning av cellesuspensjon i brønner.

Ujevn konfluens førte til at det over flere cellykluser ble større sprik i konfluens mellom brønnene som i utgangspunktet var ujevn. En av årsakene til dette kan tilskrives variasjoner i antall celler overført til brønner. Dersom det blir overført for få celler vil kommunikasjonen mellom cellene bli vanskeligere. For lav celledensitet kan resultere i at det enten vokser sakte eller at de ikke overlever i det hele tatt (20).

5.2 Tilsetning av og inkubasjon med DHA

Cellene ble kultivert over 22 og 44 timer, noe som tilsvarer én og to cellykluser med konsentrasjonene 0 µg/ml, 50 µg/ml og 100 µg/ml. Dette ble kun utført en gang grunnet mangel på reagenser samt restriksjoner og nedstenging av laboratoriene ved NTNU i Ålesund grunnet Covid-19.

Før tilsetning av DHA ble cellebrettene tatt ut av inkubasjon ved omtrentlig konfluens på 35-40% etter omtrent 28 timer fra de ble sådd ut. Da A549-cellene vokser bundet til en overflate var det ønskelig å la cellene feste seg og så vidt starte på eksponentiell fase i celleveksten, før

DHA ble tilsatt. Grunnen til dette var at det ville vært vanskelig å si om endringer i genuttrykk utelukkende skyldes tilsetningen av DHA, eller om det skyldes at cellene ikke hadde festet seg. Ved at cellene ikke har rukket å feste seg har de ikke de samme forutsetningene for kommunikasjon og motstandskraft mot stressfaktorer i denne fasen av cellesplittingen (20). Mediet ble fjernet og DMEM med DHA i de ulike konsentrasjonene tatt ut av fryseren og tilsatt i brønnene like etter mediet hadde tint. Dette innebærer at tilsatt medium var rundt 0-4°C, noe som kan spille inn på cellenes evne til å vokse normalt da dette er langt under den optimale temperaturen for cellene, som er 37°C. Konsentrasjonene av DHA ble valgt på bakgrunn av tidligere studier beskrevet i artikler med like, eller liknede kreftceller. Disse viste at 50 µg/ml og 100 µg/ml DHA var foretrukket konsentrasjoner for å få en tydelig reduksjon i uttrykket av Beclin 1-genet uten at cellene døde. Tidsintervallet på én og to cellesykluser ble også valgt på bakgrunn av artikler som beskrev ulikt uttrykk av Beclin 1-genet ved ulike tidsintervall, men med samme konsentrasjon av DHA. Kontrollprøver på hvert cellebrett inneholdt ikke DHA (5, 8).

Begge brettene hadde omtrent lik konfluens etter inkubasjon i 22 timer, se *Tabell 19* (vedlegg A.4.1). Dette kan tyde på at brettene har hatt like vekstbetingelser under det første intervallet. Fra 22 timer til 44 timer hadde konfluensen økt med 15-40%. Vanskeligheter ved å anslå nøyaktig konfluens kan tilskrives subjektive vurderinger og ujevn vekst over tid. Økningen i konfluens kan tyde på at cellene har hatt gode vekstvilkår, med tilstrekkelig næring tilgjengelig. Den ujevne veksten kan skyldes hvor i brønnen cellene har festet seg, ulik veksthastighet og stress som ble påført cellene ved å være ut av inkubatorskapet da det ble sjekket konfluens. Som nevnt tidligere har cellene med like vekstbetingelser likevel vist seg å vokse noe ulikt over tid. Ut ifra konfluens er det ikke mulig å si om DHA har hatt en innvirkning på opp-/nedregulering av Beclin 1. Det går derimot an å anta at cellene ikke har gått direkte i apoptose, ved at brønnene har fått en høyere konfluens. Den høyeste konfluensen på brettet var 80%, som kan tyde på at A549-cellene fortsatt er i eksponentiell fase. Endring i genekspressjon kan derfor med liten sannsynlighet skyldes vekstvilkår og mangel på næring i brønnene.

5.3 Preparering, optimalisering og analyse av prøvematerialet til qPCR

Etter cellene hadde inkubert med DHA i 22 og 44 timer startet prepareringen av cellene for analyse på qPCR (vedlegg A.2.4 – A.2.7). Mediet ble fjernet og cellene ble vasket med HBSS

før brettene ble satt på is og lyseringsbuffer ble tilsatt. Ved at mediet ble fjernet og cellene vasket, kan celler som var døde eller av andre grunner ikke satt fast i cellebrønnen ha blitt fjernet. Dette kan ha påvirket resultatet av genekspresjonen da disse cellene potensielt kunne vært i gang med apoptose og dermed resultert i et genuttrykk som representerte dette.

Årsaken til at cellene likevel ble vasket og lysert direkte i brønnen i stedet for å ha dem over i eppendorfrør først, er tiden fra cellene tas ut av inkubatorskap på 37 °C og 5 % CO₂ og til genekspresjonen stanses ved lysering kortes ned. Dette forkortet tiden de adherente cellene ville hatt på å endre genuttrykk som følge av opphold i stressende omgivelser utenfor inkubatorskap. Ved å gjøre det på denne måten kan det i større grad utelukkes opp- eller nedregulering av genuttrykk på bakgrunn av stress forårsaket av miljøendringer som romtemperatur og %CO₂ (20).

5.3.1 Kritiske punkter i laboratoriearbeidet

Celledyrking er ikke en eksakt kunst. Det ble erfart i løpet av cellekultivering og splittingen at cellene hadde ujevn veksthastighet og konfluens under dyrkningsprosessen. Ved å visuelt beregne konfluens av cellene i flasker og i brønner oppstår det en feilkilde i det at konfluens bestemmes ved et anslag. Vurderingen av konfluens vil derfor være anslått på unøyaktig grunnlag og vil kunne være subjektiv. For å finne et mer nøyaktig anslag på hvor mange celler som var til stede i den aktuelle brønnen kunne cellene blitt talt i mikroskop eller det kunne blitt anslått celledetthet ved bruk av spektrofotometri. Det er flere årsaker til at dette ikke ble gjort; for å stanse endringer i genekspresjonen raskest mulig og som et tiltak for å begrense arbeidstid på laboratoriet, grunnet den pågående pandemien og dens begrensninger. Feil eller unøyaktig anslag av konfluens kan påvirke videre bearbeiding av prøvemateriale da blant annet RNeasy mini kit som ble benyttet har en øvre grense for antall celler (63). Det ble likevel bestemt at cellene skulle lyses direkte i brønnene på cellebrettet til tross for ukjent antall celler i brønnen. Denne avgjørelsen ble tatt på bakgrunn av RNeasy-protokollen som sier at det kan lyses direkte i dyrkningsbeholderen så lenge antall celler ikke overstiger $1 \cdot 10^7$ (63). Originalprotokollen beskriver i tillegg omtrentlig hvor mange celler det er plass til i forskjellige beholdere. Ut fra disse tallene ble det avgjort at antall celler i brønnene høyst sannsynlig ikke vil overstige grensen på $1 \cdot 10^7$ celler (63).

Ved overføring av lyserte celler til RNeasy-spinnkolonne kan noe av RNAet i prøvene ha gått tapt dersom for stort volum ble pipettert over på membranen. Spinnkolonnen til RNeasy mini

kitet har en begrenset kapasitet på 700 µl per sentrifugering. Ved større volum er det derfor fordelaktig å filtrere flere ganger, da for stort volum kan føre til at RNA kan gå tapt. Ved overføringen av lyserte celler ble det overført i to omganger fra de løsningene som oversteg 700 µl. På slutten av isoleringsprosessen av RNA ble det benyttet 20 og 30 µl RNasefritt vann i to omganger for å sørge for at membranen ble tilstrekkelig vasket og alt RNA overført i eppendorfrør samtidig som at volumet ikke overskred ønsket maksimalvolum. Ved for lave mengder RNasefritt vann kan RNA bli hengende igjen i membranen grunnet utilstrekkelig eluering, og ved for stort volum i elueringsprosessen kan eluatet i for stor grad bli fortynnet. Bare en brøkdel av cellulært RNA i en celle er mRNA, og mengden mRNA til målgenet er dermed enda mindre (64). Da det finnes lite av målgenet er det også lite som skal til for at noe går tapt. RNA kan gå tapt i form av rester hengende i pipettespissen etter pipettering, ved fordamping og dersom RNA hang fast i spinnkolonnen etter eluering.

RNA er som tidligere nevnt veldig sårbart for å bli nedbrutt av RNaser, både cellulære som frigis ved lysering av celler og RNaser fra andre miljø (20). For å unngå å utsette RNAet for degradering av RNaser ble det brukt RNasefrie filterpipettespisser, RNasefritt vann og engangshansker. RNA kan likevel ha blitt degradert i tidsrommet mellom lysering av cellene og syntese av cDNA, noe som kan resultere i redusert mengde brukbart cDNA i løsningen. Gjennom RNA-isoleringen og syntesen av cDNA ble det tatt grep for å minke sannsynligheten for degradering av RNA. Det eluerte RNAet ble fryst ned før cDNA-syntese. Ved å fryse ned prøvene elimineres også faren for fordamping, som kan forekomme dersom prøvene oppholder seg i romtemperatur uten lokk. Det kunne også vært mulig å gå direkte videre med omforming av RNAet til cDNA. Etter syntese av cDNA kan prøvene fyses ned eller gå direkte over i qPCR-analyse. cDNA kan også brytes ned av nukleaser, men cDNAets høye stabilitet og den lave temperaturen ved frysing regnes hverken nedbryting av RNA eller cDNA som en sannsynlig kilde til avvik i resultatene. Ved måling av cDNA-konsentrasjonen på Qubit før pipettering over til qPCR-brett, ble det bekreftet tilstedeværelse av tilstrekkelig mengde cDNA. Det ansees derfor at tilstedeværelse av cDNA ikke er kilde til feil i analysen.

Ved Qubit-målinger på cDNA se *Tabell 9* (vedlegg A.2.6) er det en differanse i konsentrasjon på 0,156 µg/ml. Brettet på 22 timer er det brettet med lavest cDNA-konsentrasjon, noe som kan ha ført til høyere Ct-verdi og flere merkede brønner fra programvaren. Brett på 22 timer har tydelig en høyere Ct-verdi enn brettet på 44 timer, både for GAPDH og Beclin 1. Prøvene

på brettene har blitt behandlet helt likt under cellekultivering, preparering og analysering, noe som kan tyde på Ct-verdiens differanse kan skyldes variasjon i cDNA-konsentrasjon eller pipetteringsfeil. Ved en lavere konsentrasjon av cDNA trengs det flere sykluser før fluorescensen til qPCR-produktet overstiger bakgrunnsstøyen. Ifølge *Tabell 21* og *Tabell 23* (vedlegg A.4.2) har brett på 22 timer fått flere merknader for høyt standardavvik mellom tripllettene (HIGHSD) og flere smeltepunktstopper (MTP) enn brett på 44 timer. Ct-verdiene til brett på 22 og 44 timer er fortsatt innenfor en gunstig Ct-verdi mellom 15-30 sykluser (11). Nullprøvene, NTC og HPRT er utelatt fra denne vurderingen da brønnene uten DHA på cellebrettene ble benyttet som kontrollprøver og GAPDH som normaliseringsgen.

I analysen på qPCR viser programvaren til avvik i Ct-verdiene ved merkinger som indikerer høyt standardavvik mellom tripllettene. Dette kan komme av lav konsentrasjon av cDNA som ble benyttet i analysen av prøvene. Det ble benyttet 1 µl cDNA i hver qPCR-brønn, noe som ansees for å være et lite volum. Ved pipettering av så små mengder kan det lett forekomme feil som resultat av variasjoner i volum. Dette er under anbefalt mengde cDNA på 5 – 10 µl, men innenfor anbefalt konsentrasjon på 1pg – 100 ng ifølge originalprotokollen til benyttet SYBR Green mastermiks (59). Dette ble ikke fulgt, da det var fastsatt en annen standard for volum på qPCR-instrumentet på universitetets laboratorium. Samme person gjorde alle pipetteringene på brettet, der pipettespissen ble skiftet mellom hver brønn for å forhindre kontaminasjon. I tillegg ble alle pipetteringene kontrollert av en medstudent. Skifte av pipettespisser kan ha ført til små volumforskjeller ved pipettering da noe kan henge igjen i eller på pipettespissen. Prøvene som ble pipettert kan også ha blitt hentet fra ulike steder i røret med fortynnet cDNA, som kan føre til ulikheter i konsentrasjonen, dersom løsningen ikke var tilstrekkelig homogen. Det kan derfor ikke med sikkerhet sies at det er lik cDNA-konsentrasjon i alle qPCR-brønnene fra samme prøve.

Ved nærmere vurdering av Ct-verdier for Beclin 1-primeren, kommer det frem at det er denne primeren som i hovedsak danner flere produkter ved lavere cDNA-konsentrasjoner. Dette kan ses ved at brett på 22 timer har fått flere merknader for dannelse av flere smeltepunktstopper enn brett på 44 timer, se *Tabell 21* og *Tabell 23* (vedlegg A.4.2). Det kan tyde på at primeren har lettere for å danne flere produkter under qPCR-analyse ved lave cDNA-konsentrasjoner. Primerens lengde og nukleotidsammensetning kan føre til primer-dimer, men under optimaliseringen viste grafene spesifikt produkt (*Figur 23-25* i vedlegg A.4.4) og det antas derfor at denne feilkilden har liten påvirkning på resultatene. GAPDH er

mye brukt i tidligere forskning, som innebærer at denne primeren sannsynligvis er bedre utviklet og dermed mer stabil enn Beclin 1. Beclin 1-primeren benyttet i denne studien er som tidligere nevnt hentet fra en studie gjort på humane kreftceller. NCBI blast-søk på primeren ga resultatet human primer for Beclin 1, men både stabiliteten og spesifisiteten til primeren er noe usikker da den ikke er forsket så mye på. Ettersom flere studier presenterer ulike Beclin 1-primersekvenser er det usikkert hvilke primere som er best egnet for A549-cellenne.

Under temperatur- og konsentrasjonsoptimalisering viste alle primerene spesifisitet. Det ble utført tre temperaturoptimaliseringer, på 58°C, 59°C og til slutt på 57°C.

Smeltepunktskurvene under optimaliseringene ga alle primerene bare én topp, noe som tyder på at resultatet var spesifikt og at det ikke ble dannet uspesifikke produkt eller primer-dimere ved tilstedeværelse av cDNA. Ved primeroptimaliseringen fikk GAPDH dannet et uspesifikt produkt i NTC, se *Figur 23-25* (vedlegg A.4.4). Tm-verdiene på 58°C og 59°C var derimot ikke samsvarende i tripllettene, reproduserbarheten ansees derfor som lav. I 57°C-optimaliseringen lå Tm-verdiene på samme temperatur, noe som indikerer god reproduserbarhet. Det ble derfor bestemt at 57°C var den beste temperaturen å analysere prøvene på. Under optimalisering av primerkonsentrasjon ble det konkludert med at følgende konsentrasjoner ga optimalt amplifikasjonsplott: 400/400nM for GAPDH, 500/500nM for HPRT og 400/300nM for Beclin 1, se *Figur 17* og *Figur 18* (vedlegg A.4.3). Grafene til disse konsentrasjonene viste god reproduserbarhet, i motsetning til andre analyserte konsentrasjoner. Høy reproduserbarhet kan vises ved en differanse i Ct-verdi lik eller mindre enn 0,3 sykluser. Ulike kilder varierer mellom hvor mange sykluser som godtar resultatet som reproduserbart. qPCR-instrumentet gir en merknad ved en differanse på 0,5 sykluser, mens Thermo Fisher har satt 0,3 sykluser som største godtatte differanse (61). Ved primeroptimaliseringen ble 0,3 sykluser tatt som utgangspunkt, grunnet få varsler fra qPCR-instrumentet. I tillegg til reproduserbarhet innen Ct-verdier vurderes også amplifikasjonsplott. Det er ønskelig at grafen i amplifikasjonsplottet skal gi en sigmoid kurve (S-kurve) (50). Konsentrasjonene som ble valgt hadde en tydelig S-kurve og var tilnærmet identiske. Dette indikerte dannelse av spesifikke qPCR-produkt under analysen.

Ved optimalisering av primere ble det kun analysert på qPCR-instrumentet for å fastslå optimal temperatur for primere og primerkonsentrasjon. Dette gir imidlertid kun en indikasjon om primerene danner spesifikke produkter eller ikke. For å undersøke dette nærmere kunne det blitt utført en analyse ved hjelp av gelelektroforese. Ved å studere

båndene fra gelelektroforesen kunne det blitt identifisert om hvert primerpar ga ett eller flere produkt (ett eller flere bånd), størrelsen på produktet (kDa) og anslått mengde produkt (tykkelse på bånd). Dette kan være praktisk for å validere primere tidlig i prosessen. Dette ble ikke utført i denne bacheloroppgaven, grunnet begrensninger av reagenser og laboratorietid.

Under optimaliseringen ble det benyttet cDNA-konsentrasjoner mellom 100-400 pg/μl. cDNA-konsentrasjonsoptimalisering blir vanligvis gjort for å finne den konsentrasjonen som gir mest spesifikt qPCR-produkt og for å danne en standardkurve for ulike cDNA-konsentrasjoner. Optimalisering anses som viktige trinn fordi SYBR Green er et uspesifikt fluoriserende fargestoff og vil binde seg til alle dobbeltrådede produkter som dannes. En standardkurve er ikke et krav ved bruk av qPCR med SYBR Green, men den benyttes for å regne ut amplifiseringseffekten (E). I denne studien kunne en standardkurve, fra en konsentrasjonsoptimalisering av cDNA, vært benyttet til å finne fluorescensen til qPCR-produktet ved gitte cDNA-konsentrasjoner. Med slik data kunne det vært mulig å korrigere for pipetteringsfeil, da ROX ikke var til stede i mastermiksen under analysen av prøvene.

Gjennom hele optimaliseringen på qPCR-instrumentet ble det brukt en SYBR Green mastermiks som inneholdt ROX, et reagens qPCR-instrumentet var optimalisert og kalibrert for. Ettersom det i den endelige analysen ble brukt SYBR Green mastermiks uten ROX, noe qPCR-instrumentet ikke er optimalisert eller kalibrert for, vil resultatene ha store unøyaktigheter og være upålitelige. SYBR Green mastermiks uten ROX ble brukt fordi laboratoriet gikk tom for SYBR Green mastermiks med ROX. Dette var den beste erstatningen som var tilgjengelig for å få fullført analysen.

5.4 Analyse av genuttrykk på qPCR

Under analysering av prøvene ble det, som nevnt, brukt SYBR Green mastermiks uten ROX. ROX motvirker variasjon i prøvene, da små forskjeller i pipettering kan gi stort utslag på resultatet. qPCR-instrumentet ble innstilt på «No reference dye» under analysen, men det var fortsatt betydelig mer bakgrunnsstøy som ble detektert enn ved bruk av ROX. En annen faktor å ta med er at SYBR Green uten ROX ikke er egnet, da det spesifikke qPCR-instrumentet som ble benyttet trenger en referansefluorescens. Usikkerheten til qPCR-instrumentets evne til deteksjon uten passiv referansefluorescens anses derfor som en stor feilkilde i denne analysen. Dette kan ha ført til større variasjon mellom prøvene. Grafene og

Ct-verdiene ble vurdert og terskelverdi ble satt manuelt etter studentenes beste evne. Verdiene som ble tatt med videre i studien er ikke optimale da Ct-verdiene har en større variasjon ($\geq 0,3$ sykluser), og prøvene har flere smeltepunktstopper, enn det som vanligvis godtas. Resultatene er blitt tatt med videre for å kunne undersøke sammenhenger og endringer i genekspresjonen til tross for større variasjoner i Ct-verdier. Analysen bør likevel gjennomføres på nytt med SYBR Green med ROX for å kunne si med sikkerhet om det har skjedd en nedregulering av Beclin 1. Ved å sammenligne kurvene i amplifikasjonsplottet i *Figur 7* og *Figur 8* kommer det frem at intervallene for ΔRn -verdiene fra optimaliseringen (0,001-10) og fra analysen av prøvene (10-1 000 000) ikke samsvarer. Årsaken til dette er ukjent, men en mulighet er at qPCR-instrumentet under analysen av prøvene ikke hadde ROX for å normalisere volumforskjeller og redusere bakgrunnsstøy.

Hver konsentrasjon har mellom 3-6 paralleller, der flere av parallellene var merket fra qPCR-instrumentet, se *Tabell 21* og *Tabell 23* (vedlegg A.4.2). For å kunne bruke resultatene videre i beregningene ble det bestemt å beholde alle triplettene selv om triplettene hadde en større variasjon enn 0,5 sykluser, som er den innstilte verdien til qPCR-instrumentet. Prøve 2,3 for Beclin 1 (brønn F10) ble ekskludert grunnet merknad om uteligger på grunn av høyt standardavvik fra de andre prøvene innenfor samme triplett (OUTLIERRG). Brønn F10 ble kun merket på brett på 22 timer, dermed antas det at feilkilden ligger i brønnens innhold og ikke deteksjonssvakhet i qPCR-instrumentet. Denne prøven har en differanse på en syklus i motsetning til de to resterende prøvene i tripletten som har like Ct-verdier. OUTLIERRG kan skyldes kontaminasjon av qPCR-brønnen, ulikt volum i qPCR-brønnen grunnet pipettering eller dårlig forsegling av qPCR-brettet. qPCR-brettet ble forseglet med en plastfilm for å forhindre fordamping av reagens og kontaminasjon. Videre ble qPCR-brettet sentrifugert for å sørge for at alt innholdet var i bunnen av qPCR-brønnene ved analysen. Likevel kan luftbobler forstyrre målingen av fluorescensen dersom de er til stede i løsningen under analysen.

Flere av brønnene på qPCR-brettet har blitt merket av programvaren. To av merkingene er flere smeltepunktstopper og amplifikasjon i NTC. Dannelse av flere smeltepunktstopper indikerer dannelse av flere produkt. I analysen av prøvene ble alle NTC-brønnene og noen Beclin 1-brønner merket med flere smeltepunktstopper, se *Tabell 21* og *Tabell 23* (vedlegg A.4.2) og *Figur 27* og *Figur 29* (vedlegg A.4.4). For brett på 22 timer kan det ha blitt dannet flere produkt grunnet lavere cDNA-konsentrasjon, som nevnt tidligere i diskusjonen.

Amplifikasjon i NTC fungerer som en negativ kontroll, ved at qPCR-brønnene inneholder RNasefritt vann og ikke cDNA. I NTC-brønnene skal det teknisk sett ikke dannes produkt. Detektert qPCR-produkt i NTC over terskelverdien kan være en indikasjon på forurensing i prøven, men det kan også tenkes i denne analysen at bruken av SYBR Green mastermix uten ROX spiller en rolle. Dersom det er en differanse mellom Ct-verdiene for NTC og Ct-verdiene for prøver med cDNA på fem eller flere sykluser blir prøven antatt som gyldig (62). Ved en mindre differanse blir prøvene i hovedsak ansett som ugyldige. Det vil dermed være vanskelig å si noe om hvilket qPCR-produkt som er dannet i brønnene med cDNA kontra NTC, da prøvene potensielt kan være kontaminerte. Smeltepunktskurven til GAPDH i NTC dannet en liten topp ved 75°C og 85°C, der GAPDH med cDNA har topp mellom 81-83°C, se *Figur 27* (vedlegg A.4.4). GAPDH i NTC ga også et lite toppunkt ved 85°C under primeroptimaliseringen, se *Figur 25* (vedlegg A.4.4). Her kan det antas at det er blitt dannet primer-dimer og annet uspesifikt produkt i NTC basert på temperaturdifferansen og ulike smeltepunktstopper og -kurver. NTC med Beclin 1-primer viser ingen tydelig forskjell på smeltepunktskurvene fra prøver med templat for samme primer. Brett på 44 timer hadde Beclin 1 temperaturdifferanse på 3°C, men grafen viser ingen tydelige skiller i smeltepunktskurven, se *Figur 29* (vedlegg A.4.4). Alle prøver med Beclin 1-primeren viser en tydelig skulder i smeltepunktskurven. Skulder kan tyde på dannelse av uspesifikt qPCR-produkt når normalisert Rn og derivert fluorescens ($-Rn'$) plott blir vurdert. Ved optimaliseringen var disse skuldrene ikke synlige, noe som kan tyde på at Beclin 1-primerene under analysen av prøvene hadde lettere for å danne uspesifikke produkt. Uspesifikke produkt kan komme av en annen mastermix-sammensetning og cDNA-konsentrasjonen. Ved å studere smeltepunktskurvene er det tydelig at på brett som har stått i 22 timer har en mindre differanse mellom skulderen og smeltepunktstoppen enn ved brett som har stått i 44 timer. Dette styrker antagelsen om at lav cDNA-konsentrasjon fører til en høyere dannelse av uspesifikke produkt.

5.4.1 Analyse av genuttrykk til normaliseringsgen

Resultatene fra analysen av normaliseringsgenene skulle i teorien ikke være påvirket av DHA-konsentrasjon eller inkubasjonstid (42). Det kom, som tidligere nevnt, frem i analysen av prøvene at Ct-verdiene for normaliseringsgenene konsekvent var lavere på brett på 44 timer både for GAPDH og HPRT. Dette skyldes sannsynligvis den generelt høyere cDNA-

konsentrasjonen i prøvene som sto i 44 timer (se vedlegg A.2.6), ettersom Ct-verdier synker jo høyere cDNA-konsentrasjon det er i qPCR-brønnene.

Ettersom bare ett av genene skulle brukes til $\Delta\Delta\text{Ct}$ -beregningen var målet å finne det best egnede og mest stabile normaliseringsgenet. Tosidige t-tester med antatt lik varians ble utført separat for prøvene til GAPDH og HPRT, hvor lineære verdier ($2^{-\text{Ct}}$) ble brukt som anbefalt av Dorak (56). P-verdiene for GAPDH ($P = 0,04$) og HPRT ($P = 0,02$) indikerer at det er statistisk signifikant forskjeller i begge datasettene, se *Tabell 24* og *Tabell 25* (vedlegg A.4.5). Ingen av disse normaliseringsgenene var derfor, på bakgrunn av t-test, egnet for å bruke til $\Delta\Delta\text{Ct}$ -beregning for Beclin 1. Det ble derfor tatt en vurdering på grunnlag av genenes reproduserbarhet ved bruk av Ct-verdiens gjennomsnitt og standardavvik innad i triplettene, som anbefalt av Livak og Schmittgen (37). Ved å plote verdiene inn i en graf i Microsoft Excel kom det fram at GAPDH konsekvent hadde lavere standardavvik mellom triplettene enn HPRT, uavhengig om det var prøver som hadde stått i 22 timer eller 44 timer. Det ble derfor konkludert med at GAPDH ga de mest stabile og brukbare resultatene. Disse resultatene kombinert med GAPDH sin veldokumenterte bruk, ble det bestemt at GAPDH skulle benyttes som normaliseringsgen i $\Delta\Delta\text{Ct}$ -beregningen.

5.4.2 Analyse av genuttrykk til Beclin 1

Under prepareringen av prøvematerialet og analysen på qPCR kom det frem at noen av prøvene og dermed også Ct-verdiene ikke kunne benyttes i videre bearbeiding av resultater, grunnet feilmarkering og en uteligger markert av programvaren til qPCR-instrumentet. Til tross for feilmarkeringene viser resultatet at alle prøvene som er grå er negative, noe som indikerer nedregulering. Som nevnt tidligere er det likevel ikke optimalt å bearbeide resultater fra denne studien. Det ble i tillegg laget for få paralleller, grunnet begrensninger på reagenser og tid på laboratoriet. Overnevnte årsaker danner grunnlag for at resultater fra denne studien er mindre pålitelig. Ved hver konsentrasjon av DHA for hvert tidsintervall var hensikten å få mange nok paralleller til å kunne si noe om resultatene med større sikkerhet. Da analysen på qPCR ble gjennomført kun én gang vil resultatene, på tross av P-verdi under 0,05, være upålitelige.

For å regne ut opp-/nedregulering av Beclin 1 ble Livak og Schmittgen metoden benyttet (37). Livak og Schmittgen metoden baserer seg på at primerens E er 100 %, ved bruk av tallet

2 som grunntall for å regne ut den lineære genekspressjonen. I denne oppgaven ble det antatt at qPCR-prosessen gir en 100% fordobling av qPCR-produkt. Denne antakelsen er basert på grafene i amplifikasjonsplottet, se *Figur 20* og *Figur 22* (vedlegg A.4.3), da det mangler standardkurve for å bestemme nøyaktig E ut fra. Grafene til GAPDH og Beclin 1 er parallelle for brett på 22 og 44 timer, der Beclin 1 har en høyere Ct-verdi enn GAPDH. Beclin 1 på brett på 44 timer har en svakere overgang til eksponentiell fase, som kan skyldes deteksjon av bakgrunnsstøy og høye Ct-verdier. Ved høye Ct-verdier er det en større sannsynlighet for dannelse av uspesifikke produkt, som tidligere nevnt. Grafen gir kun en indikasjon på E. Denne indikasjonen gjør at E ble satt til 100%, da det vil være vanskelig å skulle anta den eksakte verdien. En forutsetning for å benytte Livak og Schmittgen metoden er en felles E-verdi for hver primer (37).

Videre ble de lineære verdiene benyttet i t-test. Som vist i vedlegg A.4.7 viser ingen av P-verdiene innad i hver konsentrasjon av DHA i samme tidsintervall signifikant forskjell ved et konfidensnivå på 95%. Det er likevel ikke et pålitelig resultat med tanke på at det kun ble brukt tre verdier per datasett i analysen. Ved t-test mellom konsentrasjoner av DHA på samme brett ble det heller ikke påvist noen signifikant forskjell, noe som tyder på at det ikke er en signifikant endring i genekspressjonen til Beclin 1. Tester mellom cellebrettene som stod i 22 og 44 timer, viser ingen signifikant forskjell med unntak av prøvene med 100 µg/ml DHA ($P = 0,01$). Dersom det hadde blitt benyttet t-test med 90% konfidensnivå ville flere av resultatene vist seg å være signifikant forskjellig. Ved å gjøre dette vises det til at det er 10% sannsynlighet for at resultatene skyldes tilfeldigheter. Dette er med andre ord ikke med på å skape pålitelighet i tolkning av resultater, men heller at resultatene blir preget av flere tilfeldigheter og dermed blir mindre pålitelig. Bruken av t-test, tolkningen og påliteligheten til den statiske metoden har blitt mye diskutert (65, 66). Det handler i hovedsak om å undersøke om det er en korrelasjon mellom to datasett. Dersom de korrelerer innenfor et bestemt intervall blir de sett på som ikke statistisk signifikant forskjellig. Et aspekt som må tas med i vurderingen av dette er at ikke alt som korrelerer har sammenheng på det grunnlaget man ønsker å sammenlikne. Det vil i så fall innebære at P-verdier ikke nødvendigvis er den eneste gjeldende i avgjørelsen om resultater er pålitelige eller ikke. Dette kommer frem i sammenlikningen av de to brettene på 22 og 44 timer. Da prøvene på hvert av brettene er normalisert opp mot prøver på samme brett og ikke en felles prøve vil det ikke egentlig være sammenlikningsgrunnlag. Dette styrker grunnlaget for å se på P-verdi for prøvene med 100 µg/ml DHA fra begge brett opp mot hverandre ($P = 0,01$) som upålitelig.

I grafene som viser $\Delta\Delta C_t$, se *Figur 11* og *Figur 12*, er det synlig at samme konsentrasjon (100 $\mu\text{g/ml}$) viser veldig ulike verdier. For brett på 22 timer viser det utelukkende positive verdier mens det for brett på 44 timer viser utelukkende negative verdier. Det er likevel ikke nødvendigvis et korrekt resultat da det ble benyttet færre paralleller for brettet som stod i 44 timer. Trendlinjene til grafene for begge brettene viser motstridende trender, hvor brett på 22 timer viser en positiv trend, altså at mengde mRNA for Beclin 1 øker, mens brett på 44 timer viser negativ trend som tilsier at mengde mRNA for Beclin 1 synker. I hovedsak betyr dette at etter 22 timer, én cellyklus, øker uttrykket av Beclin 1 mens det etter 44 timer, to cellykluser, reduserer uttrykket av Beclin 1. I og med at brettene på 22 og 44 timer ikke er normalisert opp mot de samme prøvene vil sammenlikning av prøvene på tvers av brett være upålitelige, se *Figur 13*. Årsaken til at prøvene kun ble normalisert mot kontroll innad på brettene var for å kunne vurdere genekspresjonen med bakgrunn i at cellene har hatt helt lik behandling. Da verdiene i *Figur 13* er lineære ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) vises uttrykket ved at verdier under 1 tilsvarer nedregulering, hvor verdier over 1 tilsvarer oppregulering. Det kommer tydelig fram at det er et mye større standardavvik i prøver på 44 timer kontra prøver på 22 timer, noe som er med på å skape usikkerhet rundt resultatene med tanke på pålitelighet.

5.5 Videre forskning

I denne studien er det stor usikkerhet om Beclin 1 har blitt nedregulert i A549-cellene. For å kunne få pålitelige resultater og kunne validere dem bør analysen utføres med flere paralleller med like konsentrasjoner og tidsintervall, samt utføre komparative analysemetoder. En forutsetning for pålitelig resultat ved videre forskning er at analysen blir utført med samme SYBR Green mastermiks som qPCR-instrument er kalibrert og optimalisert for, gjennom både optimalisering og analyse av prøver. Det bør i tillegg benyttes flere normaliseringsgen. For videre forskning kan det også undersøkes om andre konsentrasjoner av DHA vil ha en annen effekt på cellene. Det bør optimaliseres for tiden det tar for nytt medium å nå ønsket temperatur på 37°C for å legge dette til i tidsintervallet. Komparative analyser som kan utføres er proteinkspresjon og cDNA på gelelektroforese, se på cellyklus ved hjelp av flowcytometri og spektrofotometri. Ved å gjennomføre disse analysene kan det være mulig å få en større forståelse av effekten DHA har på lungekreftcellene A549 *in vitro*.

I en tidligere studie (5) som benyttet samme type celler og behandlet cellene med samme DHA-konsentrasjon på 50 µg/ml i 24 timer har cellene fått en tydelig nedregulering av proteinuttrykket av Beclin 1. Rapporten beskriver tester på cellens levedyktighet etter samme behandling. Resultatet rapporten kommer frem til er at behandling med 50 µg/ml DHA i 24 timer fører til at kreftcellene går inn i apoptose og har en reduksjon av Beclin 1-proteinet. n-3 blir derfor foreslått som en potensiell komponent for å behandle kreft (5). Dette kan underbygge funn i denne studien som beskriver at Beclin 1-genet blir nedregulert etter én cellesyklus med 50 µg/ml DHA. Det er også verdt å ta med i vurderingen at mengde mRNA i en celle ikke nødvendigvis samsvarer med mengde protein som mRNAet koder for. Ved behandling av kreft er det ønskelig å se negative trender over såpass korte tidsintervaller som har blitt utført i denne studien. En kreftsvulst *in vivo* vil ikke kunne forsvinne etter én og to cellesykluser, men testing *in vitro* kan gi en indikasjon på hva som kan føre til hemming av vekst samt død av kreftceller. Resultater oppnådd i denne studien indikerer at DHA kan ha en hemmende eller nedregulerende effekt på Beclin 1, som i tidligere forsøksrapporter er knyttet opp mot autofagi og apoptose (5, 8, 9).

Med en lungekreftdiagnose av typen NSCLC gir i dag en lav sannsynlighet for å kunne leve lenge (5). Mange blir plaget av alvorlige bivirkninger under og etter behandling. Ved videre forskning på behandling av lungekreft ved bruk av n-3, da spesielt DHA, kan det være en mulighet for en mer skånsom og økonomisk behandling. Behandling av kreftceller ved hjelp av DHA har vist seg å ha en cytotoxisk effekt på kreftceller uten å samtidig skade friske celler. Dette kan forhåpentligvis gi en høyere overlevelseshastighet og mildere bivirkninger for personer som lever med eller har hatt lungekreft. Dersom denne typen behandling kan fungere enten alene eller sammen med eksisterende kreftmedisin, vil det gagne både personen med kreft og samfunnet som helhet.

6.0 Konklusjon

Analysen av genekspressjon til Beclin 1-genet hos A549-celler, dyrket i ulike konsentrasjoner av DHA på 22 og 44 timer ved bruk av qPCR, viser liten forskjell mellom prøvene. Til tross for at resultatene ikke ga noen signifikant forskjell mellom prøvene innad i hvert brett, viser trendlinjen til genekspressjonen en svak oppregulering på brett på 22 timer, mens det på brett på 44 timer viser en svak nedregulering. Prøvene til brett på 22 timer viser en nedregulering ved 50 µg/ml, mens prøvene på 100 µg/ml viser oppregulering. Brett på 44 timer viser gradvis nedregulering av begge konsentrasjoner. Sett bort fra prøvene på 100 µg/ml fra brett på 22 timer indikerer alle prøvene nedregulering av Beclin 1-uttrykket. Dette er likevel ikke pålitelige resultater da få paralleller ble analysert og SYBR Green mastermiks ble endret underveis. En forutsetning for pålitelige resultater er å benytte samme SYBR Green mastermiks, gjennom hele prosessen, som er egnet for qPCR-instrumentet. For å få en bedre forståelse av uttrykket av Beclin 1, kan proteinekspressjonen undersøkes ved gelelektroforese. En slik analyse kan bidra til å validere resultater fra qPCR. Oppsummert indikerer resultatene lav til ingen effekt av DHA på A549-celler (NSCLC) over 22 og 44 timer ved konsentrasjoner på 50 og 100 µg/ml.

Litteraturliste

1. Woodman C, Vundu G, George A, Wilson CM. Applications and strategies in nanodiagnosis and nanotherapy in lung cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2021;69:349-64.
2. Helsedirektoratet. Kostrådene og næringsstoffer: 2.3. Fett Oslo: Helsedirektoratet; 2016 [cited 2021 10.05]. Available from: <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer/inntak-av-naeringsstoffer/fett>.
3. World Health Organisation. Interim Summary of Conclusions and Dietary Recommendations on Total Fat & Fatty Acids Geneva: WHO; 2008 [cited 2021 10.05]. Available from: https://www.who.int/nutrition/topics/FFA_summary_rec_conclusion.pdf.
4. Zajdel A, Wilczok A, Tarkowski M. Toxic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in human lung A549 cells. *Toxicology in Vitro*. 2015;30(1, Part B):486-91.
5. Yao Q, Fu T, Wang L, Lai Y, Wang Y, Xu C, et al. Role of autophagy in the ω -3 long chain polyunsaturated fatty acid-induced death of lung cancer A549 cells. *Oncol Lett*. 2015;9(6):2736-42.
6. Townsend MH, Anderson MD, Weagel EG, Velazquez EJ, Weber KS, Robison RA, et al. Non-small-cell lung cancer cell lines A549 and NCI-H460 express hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase on the plasma membrane. *Onco Targets Ther*. 2017;10:1921-32.
7. Ko J, Winslow MM, Sage J. Mechanisms of small cell lung cancer metastasis. *EMBO Molecular Medicine*. 2021;13(1).
8. Pettersen K, Monsen VT, Hakvåg Pettersen CH, Overland HB, Pettersen G, Samdal H, et al. DHA-induced stress response in human colon cancer cells – Focus on oxidative stress and autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;90:158-72.
9. Mahéo K, Vibet S, Steghens JP, Dartigeas C, Lehman M, Bougnoux P, et al. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: A role for lipoperoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005;39(6):742-51.
10. Berquin IM, Edwards IJ, Chen YQ. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Letters*. 2008;269(2):363-77.
11. Kamphuis W, Schneemann A, van Beek LM, Smit AB, Hoyng PF, Koya E. Prostanoid receptor gene expression profile in human trabecular meshwork: a quantitative real-time PCR approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(13):3209-15.
12. Martin A, Sarkar A. Overview on biological implications of metal oxide nanoparticle exposure to human alveolar A549 cell line. *Nanotoxicology*. 2017:1-12.

13. Olav Sand, Øystein V. Sjaastad, Egil Haug, Gjølle JG. *Menneskekroppen* 3ed. Oslo: Gyldendal 2018. 665 p.
14. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*. 1998;243(2):359-66.
15. Sundararajan R, Salameh T, Camarillo IG, Prabu RR, Natarajan A, Sankaranarayanan K. 10 - Irreversible electroporation: a drug-free cancer treatment. In: Sundararajan R, editor. *Electroporation-Based Therapies for Cancer*: Woodhead Publishing; 2014. p. 219-43.
16. ThermoFisherScientific. DMEM/F-12 thermofisher.com2021 [cited 2021 19.04]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11320033#/11320033>.
17. Jian M, Yunjia Z, Zhiying D, Yanduo J, Guocheng J. Interleukin 7 receptor activates PI3K/Akt/mTOR signaling pathway via downregulation of Beclin-1 in lung cancer. *Molecular Carcinogenesis*. 2019;58(3):358-65.
18. ThermoFisherScientific. Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) thermofisher.com2021 [cited 2021 19.04]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15140122#/15140122>.
19. Ahamed M, Akhtar MJ, Siddiqui MA, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, et al. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology*. 2011;283(2):101-8.
20. Bruce Alberts KH, Alexander Johnson, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Walter P. *Essential cell biology*. Fifth ed. New York: W. W. Norton & Company; 2019. 734 p.
21. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(12):a006080.
22. Tronsmo A. *Innføring i mikrobiologi*. Oslo: Universitetsforlaget; 2016.
23. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*. 2013;23(12):620-33.
24. Rimul GF. Celledød, aktivering av caspase 3, og NGFIB-forflytning i cellelinjene PC12 og CV1. UiO DUO vitenarkiv. 2007.
25. Jäger R. Targeting the death machinery in mammary epithelial cells: Implications for breast cancer from transgenic and tissue culture experiments. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007;63(3):231-40.

26. Wang F, He Z. Chapter 9 - Axon Maintenance and Degeneration. In: Rubenstein JLR, Rakic P, editors. Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections. Oxford: Academic Press; 2013. p. 177-89.
27. Fan Y-J, Zong W-X. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Chin J Cancer*. 2013;32(3):121-9.
28. Jiang Z-F, Shao L-J, Wang W-M, Yan X-B, Liu R-Y. Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep*. 2012;39(1):259-67.
29. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):571-80.
30. Levine B. Autophagy and cancer. *Nature*. 2007;446(7137):745-7.
31. Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, et al. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro*. 2013;27(6):1762-70.
32. Olsen Ragnar L. *Lipidkjemi med vekt på fisk 4*, editor: Norges Arktiske Universitet 2017.
33. D'Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *J Clin Med*. 2016;5(2).
34. van Pelt-Verkuil E, te Witt R. Principles of PCR. In: van Pelt-Verkuil E, van Leeuwen WB, te Witt R, editors. *Molecular Diagnostics: Part 1: Technical Backgrounds and Quality Aspects*. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 131-215.
35. Yao Y, Nellåker C, Karlsson H. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Molecular and Cellular Probes*. 2006;20(5):311-6.
36. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*. 2003;3(1):18.
37. 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):402-8.
38. Merck: Sigma-Aldrich. Universal SYBR Green qPCR Protocol n.d. [cited 2021 21.04]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html>.

39. SignaGenLaboratories. What Is ROX And Why Use It In qPCR? signagen.com2021 [cited 2021 19.04]. Available from: <https://signagen.com/blog/2019/05/20/what-is-rox-and-why-use-it-in-qpcr/>.
40. Quantabio. PerfeCTa SYBR Green FastMix quantabio.com2021 [cited 2021 19.04]. Available from: <https://www.quantabio.com/perfecta-sybr-green-fastmix>.
41. Čikoš Š, Bukovská A, Koppel J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*. 2007;8(1):113.
42. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. 1999;75(2):291-5.
43. Lin J, Redies C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development Genes and Evolution*. 2012;222(6):369-76.
44. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002;3(7):research0034.1.
45. Ragni E, Viganò M, Rebullà P, Giordano R, Lazzari L. What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2013;17(1):168-80.
46. Seidler NW. Basic Biology of GAPDH. In: Seidler NW, editor. *GAPDH: Biological Properties and Diversity*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. p. 1-36.
47. Townsend MH, Robison RA, O'Neill KL. A review of HPRT and its emerging role in cancer. *Medical Oncology*. 2018;35(6):89.
48. Wacker MJ, Godard MP. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *J Biomol Tech*. 2005;16(3):266-71.
49. Pray LA. The Biotechnology Revolution: PCR and the Use of Reverse Transcriptase to Clone Expressed Genes. *Nature Education*. 2008;1((1):94).
50. Merck: Sigma-Aldrich. Assay Optimization and Validation n.d. [cited 2021 22.03]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/assay-optimization-and-validation.html?fbclid=IwAR3d-QqiWNlynYl0ilNkGq9rZPpyNkQDWqtzjmwRXBfkce5d8f1RuDrbn24>.
51. Agilent Technologies. Introduction to Quantitative PCR, Methods and Applications Guide 2016 [cited 2021 22.04]. Available from:

https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf.

52. Life technologies. Real-time PCR handbook 2012 [cited 2021 22.03]. Available from: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>.

53. Thermo Fisher Scientific. Real-time PCR: understanding Ct. thermofisher.com. 2016. Available from: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>.

54. Staff M. Interpretation of qPCR curve shapes: Medical Laboratory Observer - MLO; 2015 [cited 2021 22.04]. Available from: <https://www.mlo-online.com/home/article/13008268/interpretation-of-qpcr-curve-shapes>.

55. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(6):e45-e.

56. Dorak MT. Real-time PCR. New York: Taylor & Francis Group; 2006.

57. Helbæk M. Statistikk for kjemikere. Bergen: Fagbokforlaget; 2016.

58. 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. Ålesund: Norges teknisk-vitenskapelige universitet (NTNU); 2019.

59. Quantabio. PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®. Beverly: Quantabio; 2018 [cited 2021 04.05]. Available from: https://www.quantabio.com/media/contenttype/IFU-049.1_REV_02_95072_PerfeCTa_SYBR_Green_FastMix.pdf.

60. Koneri K, Goi T, Hirono Y, Katayama K, Yamaguchi A. Beclin 1 Gene Inhibits Tumor Growth in Colon Cancer Cell Lines. *Anticancer Research*. 2007;27(3B):1453.

61. Thermo Fisher Scientific. A Normal Amplification Curve thermofisher.com.n.d. [cited 2021 20.04]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/normal-amplification-curve.html>.

62. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*. 2015;3:9-16.

63. Qiagen. RNeasy® Mini Handbook: Quiagen; 2012.

64. Qiagen. How much RNA does a typical mammalian cell contain? : Quiagen; n.d. [cited 2021 10.05]. Available from: <https://www.qiagen.com/dk/resources/faq?id=06a192c2-e72d-42e8-9b40-3171e1eb4cb8&lang=en>.
65. Amrhein V, Greenland S, McShane B. Scientists rise up against statistical significance. *nature*. 2019.
66. Nahm FS. What the P values really tell us. *Korean J Pain*. 2017;30(4):241-2.
67. Thermo Fisher Scientific. Qubit® RNA HS Assay Kits 2015.
68. Thermo Fisher Scientific. Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits User Manual. Orlando: Thermo Fisher Scientific,; 2020.
69. Quantabio. qScript cDNA Synthesis Kit n.d. [cited 2021 02.03]. Available from: <https://www.quantabio.com/qscript-cdna-synthesis-kit>.

A.0 Vedlegg

A.1 Reagenser

Tabell 6: Tabellen viser hvilke reagenser og kit som ble benyttet under kultivering av celler, preparering, optimalisering og analyse av prøvemateriale. Inkludert i tabellen er artikkelnummer og leverandør.

Reagens	Artikkelnummer	Leverandør
A549	CCL-185	ATCC®
Celleflasker	734-2313	VWR
Cellebrett	657 160	Cellstar
Falconrør (15 ml)	352196	Falcon
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	31331-028	Gibco by Life Technologies
Fetal Bovine Serum (FBS), Qualified, One Shot	A3160801	Gibco by Life Technologies
HBSS	SH30588.02	HyClone™
Penicillin Streptomycin	15140-148	Gibco by Life Technologies
Trypsin-EDTA (0,25%)	25200-056	Gibco by Life Technologies
Docosahexaenoic acid (DHA)	6217-54-5	Sigma-Aldrich
RNeasy® Mini Kit	74104	Qiagen
Etanol	NO02257442	Univar Solutions AS
Qubit RNA HS Assay Kit	Q32855	invitrogen by Thermo Fisher Scientific
qScript cDNA Synthesis Kit	95047-100	Quantabio
Qubit 1X dsDNA Assay Kit	Q33231	invitrogen by Thermo Fisher Scientific
PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® (optimalisering)	95074-250	Quantabio
Primer	10336-022	invitrogen by Thermo Fisher Scientific
PerfeCTa® SYBR® Green FastMix® (analysen)	95072-250	Quantabio

A.2 Prosedyrer og maler

A.2.1 Prosedyre for arbeid på cellelaboratoriet

Prosedyren for arbeid på cellelaboratoriet som ble fulgt. Det er viktig å opprettholde prosedyren for å forhindre kontaminasjon av cellelinjen og hindre spredning av cellemateriale ut i omgivelsene. Prosedyren er utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag ved NTNU i Ålesund.

1. Ta på skotrekk før cellelaboratoriet entres.
2. Dersom skiltet for UV-lys henger på døren skal UV-lyset skrus av umiddelbart, når cellelaboratoriet entres. UV-lys kan gi brannskader på huden, derfor er det viktig å ikke oppholde seg i rom med UV-lys.
3. Skru på LAF-benken 15 min før bruk, for å oppnå optimal luftstrøm.
4. Ta på labfrakk, munnbind og sette opp langt hår i strikk. Munnbind brukes grunnet koronatiltak eller ved forkjølelses symptomer.
5. Vask/desinfiser hendene før hansker tas på. Spray hanskene og frakkearmene grundig med 70% etanol.
6. LAF-benken skal sprayes med 70% etanol, før den skrus på. Alt som blir lagt inn i LAF-benken skal sprayes godt med 70% etanol.
7. Kommer det væske på LAF-benkens overflate under arbeidet skal dette tørkes opp og vaskes med papir sprayet med 70% etanol, umiddelbart.
8. Planlegg arbeidet i LAF-benken for å forhindre at luftstrømmen brytes av bevegelse inn og ut av LAF-benken. Alt som skal benyttes i forsøket sprayes med 70% etanol og settes inn i LAF-benken før arbeidet starter. Hansker og armer skal sprayes med 70% etanol før LAF-benken entres.
9. Viktig å ha så få gjenstander som mulig inne i LAF-benken samtidig.
10. Cellefalsker og cellebrett skal aldri åpnes på utsiden av LAF-benken. Pipettespisser skal være i emballasjen/holder når den ikke er i bruk. Ta alltid på lokket så fort så mulig etter bruk.
11. Ikke ta direkte på serologiske pipetter. Bruk kun emballasjen om det er behov for å bevege på serologiske pipetten. Viktig for å unngå kontaminasjon.
12. Lokk som blir tatt av skal legges med åpningen ned mot LAF-benken. Lokket settes på åpningen igjen, så fort arbeidet i flasken/brettet er gjennomført.

13. Kun jobb med én cellelinje i LAF-benken om gangen. Viktig for å forhindre krysskontaminasjon.
14. Aldri bruk pipettespissen i flere ulike beholdere eller la pipettespissen stå i beholderen. Pipettespissen legges i original emballasje/spill-beger etter bruk. Brukte pipettespisser og innholdet i spill-beger kastes i biohazard-beholder etter arbeid i LAF-benk er ferdig.
15. Unngå kontakt mellom pipettespiss og flaskeåpning. Dette gjøres for å forhindre kontaminasjon.
16. Være stille ved arbeid i LAF-benken for å forhindre distraksjoner og kontaminasjon.
17. Utfør arbeider i LAF-benken så for og kontrollert så mulig.
18. Plasser cellene tilbake i inkubatoren når arbeidet er ferdig.
19. Vask LAF-benk med 70% etanol og fjern alle gjenstander i LAF-benken. Brukte pipettespisser og spill/avfall blir kastet i biohazard-beholder. Sett på coveret til LAF-benken og skru på UV-lyset. Forlat laboratoriet så for så mulig etter at UV-lyset er skrudd på. UV-lyset skrur av automatisk etter innstilt tid.

A.2.2 Cellekultivering

Prosedyren beskriver fremgangsmåten for dyrking og splitting av A549-cellen. Det ble splittet mellom 75 cm² og brett med seks brønner. Prosedyren er utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag ved NTNU i Ålesund.

1. Bland klart 500 ml DMEM med 50 ml 10% FBS og 500 µl 0,1% PenStrep.
2. Bestem konfluens i flaske ved å se på cellene i invert mikroskop. Cellene har de beste vilkårene for splitting ved en konfluens mellom 70% og 90%.
3. Ta celleflasken inn i LAF-benken.
4. Sug av gammelt medium med pipette-pistol.
5. Vask cellene med 2x5 ml HBSS.
6. Tilsett 1 ml trypsin 0,25% og sørg for at alle cellene blir dekket.
7. Inkuber i ca. 8 minutter.
8. Se på cellene i invert mikroskop. Ved oppnådd konfluens på 20% (80% har løsnet) skal det tilsettes 4 ml DMEM i LAF-benk.
9. Overfør hele volumet til et 15 ml falconrør.
10. Sentrifuger på 1200 rpm i 3 min.
11. Tilbake i LAF-benk suges supernatant av.
12. Tilsett 1 ml DMEM til falconrøret med pellet og pipetter opp og ned for å løsne pellet.
13. Tilsett ytterligere 5 ml og bland til suspensjonen er homogen.
14. Merk celleflasker med celletype, dato, passasjennummer, navn og eventuell annen info for å kunne skille dem fra hverandre.
15. Overfør beregnet mengde cellesuspensjon og DMEM over i ny celleflaske slik at totalvolum blir 20 ml.
16. I *Tabell 7* illustreres mengde cellesuspensjon overført ved bruk av 75 cm² celleflasker og hvilke resultat som ble observert.
17. Cellene dyrkes i inkubatorskap på 37 °C og 5% CO₂.

Tabell 7: Tabellen viser en oversikt over mengde cellesuspensjon/DMEM som ble overført til nye 75 cm² flasker fra den opprinnelige konfluens. Ved flere splittinger ble det sett en trend på konfluens etter 48 timer.

Opprinnelig konfluens ved cellesplitting	Overført mengde av cellesuspensjon/DMEM	Konfluens i ny flaske etter 48 timer
70-75%	1 ml/ 19 ml	60%
85-90%	0,6 ml/ 19,4 ml	60%

A.2.3 Tillaging av medium med DHA

Prosedyren for tillaging av medium med DHA beskriver metoden som ble benyttet for å lage DMEM med DHA med ulike konsentrasjoner.

1. Arbeid i LAF-benk og merk alle rørene godt med korrekt konsentrasjon.
2. 50 ml DMEM overføres til et 50 ml falconrør.
3. 10 mg DHA overføres til samme falconrør. Konsentrasjonen er nå 200 µg/ml.
4. Sterilfiltrer 7 ml og 14 ml av blandingen over i hvert sitt 50 ml falconrør.
5. Til falconrøret med 7 ml tilsettes 21 ml DMEM, dette tilsvarer et totalvolum på 28 ml med konsentrasjon av DHA på 50 µg/ml.
6. Til falconrøret med 14 ml tilsettes 14 ml DMEM, dette tilsvarer et totalvolum på 28 ml med konsentrasjon av DHA på 100 µg/ml.
7. Pakk rørene inn i aluminiumsfolie for å forhindre oksidasjon av fettsyren.
8. Frys ned alle rørene med medium med DHA.

A.2.4 Isolering av mRNA

Prosedyre beskriver hvordan RNA ble isolert fra cellene. Prosedyren er hentet fra RNeasy® Mini Handbook, fourth Edition, s. 23-28 er benyttet. RNeasy® Mini Handbook (63) ble hentet utdelt ved celledyrkningsforsøk i faget Anvendt bioteknologi ved Instituttet for biologiske fag ved NTNU i Ålesund.

Fra flaske

1. Overfør 0,2 ml celleduspensjon + 5,8 ml DMEM til hver brønn på to ulike brett og merk brettene 1 og 2. Overfør i tillegg 3 ml celleduspensjon til et falconrør til nullprøver.
2. Overfør 11 µl av prøven fra falconrøret over i et Bürker tellekammer. Lag paralleller og tell antall celler. Spinnkolonnen har en membrankapasitet på $1 \cdot 10^7$ celler. Tilfør så nærme opp mot $1 \cdot 10^7$ celler til to eppendorfrør.
3. Sentrifuger eppendorfrøret i 5 min i 300g/400 rpm for å danne pellet.
4. Ta av supernatant (medium). Viktig å fjerne alt medium. Medium kan inhibere lyseringsbufferen.
5. Pelleten løsnes ved å flikke litt på røret. Tilsett 350 µl RTL (lyseringsbuffer) til hvert eppendorfrør og vortex i 1 min. Tilsett et volum (anslått 355 µl) med 70% etanol (dehydrerer RNA og legger grunnlag for spesifikk binding til membranen). Bland ved å pipettere opp og ned noen ganger. Fortsett videre på punkt 6.

Fra brett

1. Ta brettet ut av inkubasjonsskap og anslå konfluens i alle brønnene.
2. Fjern medium og vask med 1 ml HBSS i LAF-benk.
3. Sett brettet på is og tilsett 600 µl RLT-buffer (lyseringsbuffer). La brettet inkubere på is i maks 10 min (for å unngå degradering av mRNA).
4. Tilsett et volum (anslått til 650 µl) med 70% etanol. Bland ved å pipettere opp og ned noen ganger. Fortsett videre på punkt 6.
6. Overfør hele volumet med pipette (max 700 µl), inkludert utfelling, til RNeasy-spinnkolonne som er plassert i en 2 ml collection tube.
7. Lukk lokket på kolonnen og sentrifuger i 15 sek ved $\geq 8\ 000\ G / \geq 10\ 000\ rpm$. Slå ut væsken som har samlet seg i collection tube og sett den tilbake på kolonnen.

8. Dersom totalvolum overskrider 700 μ l, overfør resterende volum av cellesuspensjonen til kolonnen og gjenta forrige trinn.
9. Tilsett 700 μ l buffer RW1 (vasker membranen og fjerner ikke spesifikt bunnede biomolekyler) til RNeasy-spinnkolonnen. Lukk lokket og sentrifuger i 15 sek ved $\geq 8\,000\text{ G} / \geq 10\,000\text{ rpm}$ for å vaske spinnkolonnemembranen. Slå ut væsken som samler seg i collection tube og sett den tilbake på kolonnen.
10. Tilsett 500 μ l buffer RPE (fjerner i hovedsak salter fra tidligere buffere) til RNeasy-spinnkolonnen. Lukk lokket og sentrifuger i 15 sek ved $\geq 8\,000\text{ G} / \geq 10\,000\text{ rpm}$ for å vaske spinnkolonnemembranen. Slå ut væsken som samler seg i collection tube og sett den tilbake på kolonnen.
11. Tilsett 500 μ l buffer RPE til RNeasy-spinnkolonnen. Lukk lokket og sentrifuger i 2 min ved $\geq 8\,000\text{ G} / \geq 10\,000\text{ rpm}$ for å vaske spinnkolonnen.
12. Plasser ny collection tube på kolonnen og sentrifuger i 1 min ved $\geq 8\,000\text{ G} / \geq 10\,000\text{ rpm}$.
13. Plasser RNeasy-spinnkolonnen i nytt 1,5 ml eppendorfrør. Tilsett 30 μ l RNasefritt vann direkte på spinnkolonnemembranen. Tilsett midt på membranen. Lukk lokket og sentrifuger i 1 min ved $\geq 8\,000\text{ G} / \geq 10\,000\text{ rpm}$ for å eluere RNA.
14. Tilsett 20 μ l RNasefritt vann direkte på spinnkolonnemembranen. Tilsett midt på membran. Lukk lokket og sentrifuger i 1 min $\geq 8\,000\text{ G} / \geq 10\,000\text{ rpm}$ for å eluere RNA.
15. Renset RNA kan lagres ved -20° eller -70° opptil et år uten at det bli degradert.
16. Mål RNA konsentrasjonen ved hjelp av Qubit før dannelse av cDNA.

A.2.5 Prosedyre for måling av Qubit (RNA og DNA)

A.2.5.1 Prosedyre for Qubit på RNA

Prosedyren er hentet fra originalprotokollen til «Qubit HS Assay Kit» s. 3-6 (67). I denne prosedyren er mengde reagens blitt regnet ut spesifikt for denne studien.

1. Sett frem Qubitrør og merk toppen. Det trens to Qubitrør til standard og et Qubitrør for hver prøve som skal analyseres. Viktig å skrive på lokket og ikke på sidene.
2. Lag Working solution (Ws) etter tabellen under. Lag nok Ws til alle prøver og standarder.

Tabell 8: Ut fra tabellen er det regnet ut mengde reagens i μl som skal til for å lage Ws til ett, fire, åtte og ti Qubitrør. Dette er inkludert Qubitrør til standard og prøvene som skal analyseres.

	Working solution (μl)	Ws til 4 Qubitrør (μl)	Ws til 8 Qubitrør (μl)	Ws til 10 Qubitrør (μl)
RNA Br buffer	199	796	1 592	1 990
RNA Br reagens	1	4	8	10
Totalt	200	800	1 600	2 000

3. Lag standardene ved å tilsette 190 μl Ws til hvert Qubitrør merket standard 1 og 2. Tilsett 10 μl med standard til merket Qubitrør. Qubitrøret skal ha et totalvolum på 200 μl . Vortex i 2-3 sek. Ikke lag bobler.
4. Inkuber i romtemperatur i 2 minutter.

Kalibrering av Qubit

5. Skru på apparatet og velg «RNA», så velges «RNA: High Sensitivity». Trykk videre på «Read Standards».
6. Sett standard 1 inn i apparatet og trykk «Read standard». Husk hvordan Qubitrøret sto i Qubit-apparatet for å kunne sette de andre Qubitrørene samme vei. Avlesningen tar ca. 3 sek. Fjern så standard 1.
7. Sett inn standard 2 og trykk «Read standard». Fjern standarden. Apparatet er nå kalibrert.

Qubit av prøvene

8. Tilsett 195-199 Ws til hvert av Qubitrørene merket for prøve. Tilsett resterende volum med riktig prøve (i forhold til merkingen), slik at Qubitrøret får et totalvolum på 200 μ l.
9. Vortex i 2-3 sek og inkuber i romtemperatur i 2 minutter.
10. Sett en og en prøve inn i apparatet og trykk «Run sample». Ved avlesning still inn apparatet etter mengde prøve som er i løsningen (1-5 μ l) ved å trykke på + og -.
11. Gjenta til alle prøvene er avlest.

A.2.5.2 Prosedyre for Qubit på cDNA

Prosedyren er fra originalprotokollen til «Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits» s. 3-5 (68).

1. Sett frem Qubitrør og merk toppen. Det trengs Qubitrør to til standard og et Qubitrør for hver prøve som skal analyseres. Viktig å skrive på lokket og ikke på sidene.
2. Lag standardene ved å tilsette 190 μ l Working solution (Ws) (ferdig blandet i kitet) til hvert Qubitrør merket standard 1 og 2. Tilsett 10 μ l med standard til merket Qubitrør. Qubitrøret skal ha et totalvolum på 200 μ l. Vortex i 2-3 sek. Ikke lag bobler.
3. Inkuber i romtemperatur i 2 minutter.

Kalibrering av Qubit

4. Skru på apparatet og velg «1X dsDNA High Sensitivity (HS)». Trykk så videre på «Read Standards & run samples».
5. Sett standard 1 inn i apparatet og trykk «Read standard». Husk hvordan Qubitrøret sto i Qubit-apparatet for å kunne sette de andre Qubitrørene samme vei. Avlesningen tar ca. 3 sek. Fjern så standard 1.
6. Sett inn standard 2 og trykk «Read standard». Fjern standarden. Apparatet er nå kalibrert.

Qubit av prøvene

7. Tilsett 195 μl -199 μl Ws til hvert av Qubitrørene merket for prøve. Tilsett resterende volum med riktig prøve (i forhold til merkingen), slik at Qubitrøret får et totalvolum på 200 μl .
8. Vortex i 2-3 sek og inkuber i romtemperatur i 2 minutter.
9. Sett en og en prøve inn i apparatet og trykk «Run sample». Ved avlesning still inn apparatet etter mengde prøve som er i løsningen (1-5 μl) ved å trykke på + og -.
10. Gjenta til alle prøvene er avlest.

A.2.6 Konsentrasjon av RNA og cDNA

Følgende tabell viser Qubit-verdier målt i forbindelse med preparering av prøvematerialet til analyse på qPCR.

Tabell 9: Tabellen gir en oversikt over konsentrasjonene til RNA og cDNA målt på Qubit. Verdiene av RNA konsentrasjon ga utgangspunkt for mengde (μ l) RNA som ble overført til cDNA-syntese. cDNA-konsentrasjonen fra Qubit ble brukt til å beregne fortykningene til cDNA-konsentrasjon som ble tilsatt qPCR-brettet.

Konsentrasjonene har μ g/ μ l og μ g/ml som benevnning.

Prøve	RNA konsentrasjon	Mengde RNA til cDNA	cDNA konsentrasjon	Fortynnet cDNA konsentrasjon
	μ g/ μ l	μ l	μ g/ml	μ g/ml
Null 1	0,0357	9	3,63	0,345
Null 2	0,0413	9	3,9	0,210
1.1	0,1984	5	6,97	0,262
1.2	0,392	2,5	2,73	0,256
1.3	0,232	4	10,7	0,181
1.4	0,1948	5	9,41	0,290
1.5	0,388	2,5	4,1	0,169
1.6	0,324	2,5	7,15	0,148
2.1	0,0972	10	11,5	0,148
2.2	0,0544	15	15,5	0,134
2.3	0,1376	7	8,22	0,151
2.4	0,136	7	7,65	0,162
2.5	0,1036	7	5,98	0,197
2.6	0,1088	7	5,64	0,209

A.2.7 cDNA-syntese

Prosedyren er hentet fra originalprotokollen for «qScript cDNA Synthesis Kit» fra leverandøren sin hjemmeside 02.03.2021 (69), der produktets protokoll på side 1 er blitt fulgt. I denne utgaven er det regnet ut reagenser benyttet i denne studien.

1. Tin alle fryste reagenser og sett de på is, inkludert qScript RT. Vortex og sentrifuger reagensene for å samle innholdet før det brukes.
2. Lag mastermiks som vist i *Tabell 10*

Tabell 10: Tabellen viser mengde i μl av qScript Reaction, Mix (5X), qScript RT) som benyttes ved en, to og 14 reaksjoner. Mengde RNA-prøve og RNasefritt vann varierer utifra RNA-konsentrasjon. RNasefritt vann benyttes for å gi et sluttvolum på totalt 20 μl per brønn.

	Enkel reaksjon	2 reaksjoner	14 reaksjoner
RNA-prøve	Varies	Varies	Varies
RNasefritt vann	Varies	Varies	Varies
qScript Reaction Mix (5X)	4 μl	8 μl	56 μl
qScript RT	1 μl	2 μl	14 μl
Totalt volum	20 μl	40 μl	280 μl

3. Tilfør 5 μl mastermiks til bønnene i PCR-strips. Mastermiks tilføres en RNA-konsentrasjon på 1 μg – 10 pg. Bestem mengde RNA-prøve som skal overføres vha. Qubit. Tilfør RNasefritt vann slik at totalt volum blir 20 μl i PCR-strips. (NB: lag oversikt over hvilken prøve som er i hvilket rør!)
4. Vortex forsiktig og sentrifuger i 10 sekunder for å samle innholdet.
5. Plasser stripsen i en thermal cycler og kjør med program som vist i *Tabell 11*.
6. Mål konsentrasjonen av cDNA på Qubit.

Tabell 11: Tabellen viser programmet som ble benyttet i en thermal cycler for å syntetisere cDNA.

	Temp	Tid
1 syklus	22°C	5 min
1 syklus	42°C	30 min
1 syklus	85°	5 min
	4°C	Hold

A.2.8 Optimalisering av qPCR

Følgende prosedyre beskriver tillaging av qPCR-brett brukt under temperaturoptimalisering og primeroptimalisering. Prosedyren ble hentet fra laboratoriet på NTNU i Ålesunds in-house prosedyrer.

1. Ta ut reagenser fra fryser og oppbevar SYBR Green mastermik, cDNA og primere på is eller i fryser, mens det ikke er i bruk.
2. Tilsett reagenser i brønnene som vist i vedlegg A.2.9.
3. Dekk over qPCR-brønnene med en plastfilm og sentrifuger.
4. Fortsett som vist i vedlegg A.2.12 for å utføre analyse.
 - a. Avvik fra A.2.12: Bruk ønsket temperatur, ikke nødvendigvis 57°C.
5. Utfør temperaturoptimalisering på forskjellige temperaturer til den optimale temperaturen er funnet. Start på 58°C og test videre på 59°C og 57°C dersom resultat ikke er tilfredsstillende.
6. For utførelse av primerkonsentrasjonsoptimalisering, gjennomfør punkt 1 til 4, men tilsett reagenser som vist i vedlegg A.2.10 og bruk optimalisert temperatur.

A.2.9 Temperaturoptimalisering oppsett på plate

Tabell 12: Tabellen viser qPCR-brettet som ble benyttet under temperaturoptimalisering. Rutene i kolonne 1 og 2 er beskrivelser av innhold, mens det kun er brønn C4-C8, E4-E8 og F4-F8 som ble benyttet i analysen. Det ble benyttet tre primere i denne studien. Innholdet i qPCR-brønneren var likt for hver temperatur det ble testet for.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	GAPDH	FWD RWD ddH ₂ O cDNA SYBR		0,75 µl 0,75 µl 6 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 5,5 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 5,5 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 5,5 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 5,5 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 6 µl			
D												
E	HPRT	FWD RWD ddH ₂ O cDNA SYBR		0,75 µl 0,75 µl 6 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 5,5 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 5,5 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 5,5 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 5,5 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 6 µl			
F	Beclin 1	FWD RWD ddH ₂ O cDNA SYBR		0,75 µl 0,75 µl 6 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 6 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 6 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 6 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 6 µl 7,5 µl	0,75 µl 0,75 µl 6 µl			
G												
H												

A.2.10 Primeroptimalisering oppsett på plate

Tabell 13: Tabellen viser qPCR-brettet som ble benyttet under primeroptimalisering for HPRT og Beclin. Der prøvene merket med volum (μl) til primersetter FWD (forward) og RWD (reverse), RNasefritt vann (ddH₂O), prøve (cDNA) og SYBR Green mastermiks som er benyttet under optimaliseringen. Primerene er merket med konsentrasjon i nM og volumet dette tilsvarte etter fortytning.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B	FWD (0,00) RWD (0,00) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 300 (1,5 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 300 (1,5 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 300 (1,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 300 (1,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl	}			
C	FWD (0,00) RWD (0,00) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 400 (2 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 400 (2 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 400 (2 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 400 (2 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl				
D	FWD (0,00) RWD (0,00) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 500 (2,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 500 (2,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 500 (2,5 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 500 (2,5 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl				
E	FWD (0,00) RWD (0,00) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 300 (1,5 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 300 (1,5 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 300 (1,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 300 (1,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl				
F	FWD (0,00) RWD (0,00) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 400 (2 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 400 (2 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 400 (2 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 400 (2 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl				
G	FWD (0,00) RWD (0,00) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 500 (2,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 500 (2,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 500 (2,5 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 500 (2,5 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl NTC 7,5 μl				
H													

Tabell 14: Tabellen viser qPCR-brettet som ble benyttet under primeroptimalisering for GAPDH. Der prøvene merket med volum (μl) til primersetter FWD (forward) og RWD (reverse), RNasefritt vann (ddH_2O), prøve (cDNA) og SYBR Green mastermiks som er benyttet under optimaliseringen. Primeren er merket med konsentrasjon i nM og volumet dette tilsvarte etter fortykning.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	FWD (nM) RWD (nM) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 300 (1,5 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 300 (1,5 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 300 (1,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 300 (1,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 $\mu\text{l NTC}$ 7,5 μl	300 (1,5 μl) 300 (1,5 μl) 3,5 μl 1 $\mu\text{l NTC}$ 7,5 μl	} GAPDH		
C	FWD (nM) RWD (nM) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 400 (2 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 400 (2 μl) 3 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 400 (2 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 400 (2 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 $\mu\text{l NTC}$ 7,5 μl	400 (2 μl) 400 (2 μl) 2,5 μl 1 $\mu\text{l NTC}$ 7,5 μl			
D	FWD (nM) RWD (nM) ddH ₂ O Template SYBR-Green	300 (1,5 μl) 500 (2,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	300 (1,5 μl) 500 (2,5 μl) 2,5 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 500 (2,5 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	400 (2 μl) 500 (2,5 μl) 2 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 μl 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 $\mu\text{l NTC}$ 7,5 μl	500 (2,5 μl) 500 (2,5 μl) 1,5 μl 1 $\mu\text{l NTC}$ 7,5 μl			
E												
F												
G												
H												

A.2.11 Prosedyre for preparering av prøver til qPCR

Prosedyren beskriver preparering av primere og reagens til qPCR-analysen. Det blir forklart eksakt hva som ble utført i denne studien med tanke på fremgangsmåte og mengde reagens. Fremgangsmåten er utarbeidet fra originalprotokoll til PerfeCTa® SYBR® Green Fast Mix® (59) og prosedyrer for qPCR-analyse på Institutt for biologiske fag ved NTNU i Ålesund.

1. Fortynn cDNA til konsentrasjon til omtrent 300 pg/μl (0,300 μg/ml) med et totalvolum på 100 – 200 μl. Skriv ned cDNA-konsentrasjonen for de ulike prøvene. Viktig at cDNA-konsentrasjonene er under 400 pg/μl.
2. Ta frem tre eppendorfrør for å lage primermiks og ha i reagens som i *Tabell 15*:

Tabell 15: I tabellen er en oversikt over eppendorfrør med fortynnet primermiks. Volumet (μl) av FWD (forward primer) eller RWD (reverse primer) og RNasefritt vann, samt totalvolum.

Eppendorfrør	Primer	FWD	RWD	RNasefritt vann	Totalt
1	Beclin	45 μl		105 μl	300 μl
			39 μl	111 μl	
2	HPRT	54 μl		96 μl	300 μl
			54 μl	96 μl	
3	GAPDH	45 μl		105 μl	300 μl
			45 μl	105 μl	

3. Vortex og sentrifuger eppendorfrørene.
4. Finn frem qPCR-brett, pipetter og pipettespisser.
5. Finn frem SYBR Green mastermiks, fortynnet primere, RNasefritt vann og fortynnet cDNA. Sett alle reagensene på is.
6. Vortex og spinn ned alle reagensene før bruk.
7. Tilsett de ulike reagensene til brønnene ved å følge oppsettet i vedlegg A.2.13 eller A.2.14, avhengig av hvilken analyse som skal utføres. Pipetter de største volumene først, som fortynnet primermiks eller SYBR Green mastermiks, for å forhindre fordampning av små volum. Total volumet i qPCR-brønnen skal være 15 μl.
8. Sett qPCR-brettet inn i qPCR-instrumentet og still inn qPCR-instrumentet etter *Tabell 16*.

Tabell 16: Presentasjon av innstillingene for analysen på qPCR-instrumentet som er benyttet i denne bacheloroppgaven. Tabellen viser temperaturen, tid og antall sykluser for de ulike stegene i qPCR-analysen. Annealingtemperatur ble bestemt ved temperaturoptimalisering og 35 sykluser er standard ved universitetslaboratorium. De andre verdiene er standard for qPCR-instrumentet.

	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Aktivering av polymerase	95°C	10 min	1
Amplifisering	95°C	15 sek	35
	57°C	1 min	
Smeltekurve	95°C	15 sek	1
	60°C	1 min	
	95°C	30 sek	

A.2.12 Prosedyre for bruk av qPCR-instrument

I den følgende prosedyren beskrives setup-innstillingene i 7500 Software v2.3 som ble fulgt i denne studien. Prosedyren ble opprinnelig gitt muntlig av faglærer.

1. Plasser brettet inn i qPCR-instrumentet.
2. Start ny analyse.
3. Experiment properties
 - a. Gi eksperimentet et navn.
 - b. Velg instrumentet som skal utføre analysen, $\sqrt{7500}$ (96 Wells).
 - c. Velg hvilken type program som skal kjøres, $\sqrt{\text{Quantitation} - \text{Comparative } C_T}$ ($\Delta\Delta C_T$).
 - d. Velg hvilket reagens som skal brukes til å detektere målgenet, SYBR Green Reagents.
4. Plate Setup
 - a. Define Targets and Samples.
 - i. Velg «Targets», Beclin 1, GAPDH og HPRT.
 - ii. Velg «Samples», prøvenummer, f.eks. 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 og NTC.
 - b. Assign Targets and Samples.
 - i. Fordel riktige Targets og Samples til riktig brønn på qPCR-brettet.
 - ii. Velg hvilke brønner som er NTC.
 - iii. Velg relative kvantifiseringsinnstillinger, 1.3/2.3 som referanse, GAPDH som endogen kontroll.
 - iv. Velg farge som brukes som passiv referanse, er SYBR Green valg tidligere vil ROX automatisk bli valgt med mindre det blir spesifikt valgt vekk. Brukes SYBR Green mastermiks med ROX, la «ROX» stå. Brukes SYBR Green mastermiks uten ROX, velg «None».
5. Run Method
 - a. Graphical View.
 - i. Velg reagensvolumet i brønnene, 15 μl .
 - ii. Tilpass hvor mange sykluser som skal utføres, 35.
 - iii. Tilpass «Cycling Stage Step 2» temperaturen, 57°C.
 - iv. Legg til «Melt Curve Stage» om ønskelig.

6. Dobbeltsjekk innstillingene som er utført.
7. Trykk på «Start Run».
8. Når analysen er utført, eksporterer filen på ønsket måte, for eksempel ved hjelp av USB.

A.2.13 Prøver 22 timer oppsett på plate

Tabell 17: Tabellen viser innholdet av primermiks (forward og reverse primer blandet med ddH₂O), SYBR Green mastermiks (SYBR) og cDNA fra prøve i de ulike qPCR-brønnene til qPCR-analysen på brett på 22 timer. Primerenes konsentrasjon er 400/400nM for GAPDH, 500/500nM for HPRT og 400/300nM for Beclin 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl			
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med			
B	ddH ₂ O		GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix			
	Prøve		Null 1 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	2.1 (1 µl)	2.1 (1 µl)	2.2 (1 µl)	2.2 (1 µl)	2.3 (1 µl)	2.3 (1 µl)	Null 1 (1 µl)
	SYBR		7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl
C	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl		6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med		Med
	ddH ₂ O		GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix		HPRTmix
D	Prøve		2.4 (1 µl)	2.4 (1 µl)	2.5 (1 µl)	2.5 (1 µl)	2.6 (1 µl)	2.6 (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)		HPRTmix
	SYBR		7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl		Null 2 (1 µl)
													7.5 µl
E	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl		6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med		Med
	ddH ₂ O		HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix		HPRTmix
F	Prøve		2.4 (1 µl)	2.4 (1 µl)	2.5 (1 µl)	2.5 (1 µl)	2.6 (1 µl)	2.6 (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)		HPRTmix
	SYBR		7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl		2.2 (1 µl)
													7.5 µl
G	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl		6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med		Med
	ddH ₂ O		Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix		HPRTmix
H	Prøve		Null 1 (1 µl)	Null 1 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	2.1 (1 µl)	2.1 (1 µl)	2.2 (1 µl)	2.2 (1 µl)	2.3 (1 µl)	2.3 (1 µl)	2.3 (1 µl)
	SYBR		7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl
													7.5 µl
I	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl		6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med		Med
	ddH ₂ O		Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix		HPRTmix
J	Prøve		2.4 (1 µl)	2.4 (1 µl)	2.5 (1 µl)	2.5 (1 µl)	2.6 (1 µl)	2.6 (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)		2.4 (1 µl)
	SYBR		7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl		7.5 µl
													7.5 µl
K	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl		6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med		Med
	ddH ₂ O		Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	HPRTmix		HPRTmix
L	Prøve		Null 1 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	2.1 (1 µl)	2.1 (1 µl)	2.3 (1 µl)	2.3 (1 µl)	2.5 (1 µl)	2.5 (1 µl)	2.6 (1 µl)		2.6 (1 µl)
	SYBR		7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl		7.5 µl
													7.5 µl

A.2.14 Prøver 44 timer oppsett på plate

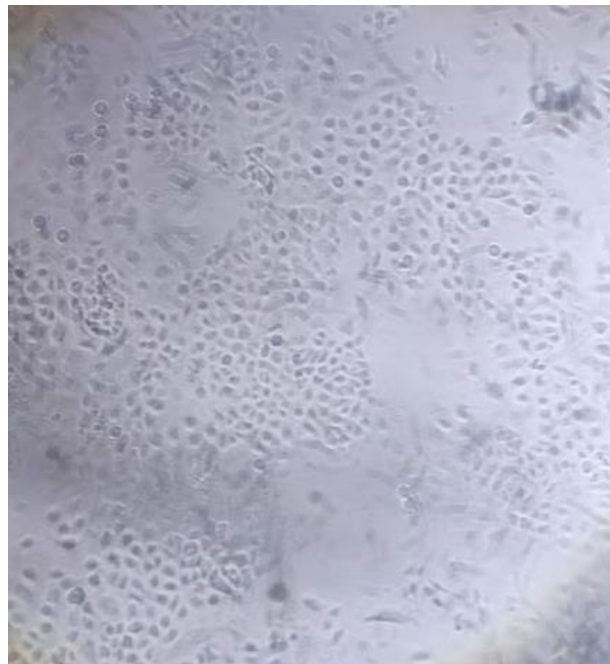
Tabell 18: Tabellen viser innholdet av primermiks (forward og reverse primer blandet med ddH₂O), SYBR Green mastermiks (SYBR) og cDNA fra prøve i de ulike qPCR-brønnene til qPCR-analysen på brett på 44 timer. Primerenes konsentrasjon er 400/400nM for GAPDH, 500/500nM for HPRT og 400/300nM for Beclin 1.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl			
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med			
	ddH ₂ O		GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix			
	Prøve		Null 1 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	1.1 (1 µl)	1.2 (1 µl)	1.3 (1 µl)	1.4 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.6 (1 µl)			
B	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
	ddH ₂ O		GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	HPRTmix
	Prøve		Null 1 (1 µl)	Null 1 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	1.1 (1 µl)	1.1 (1 µl)	1.2 (1 µl)	1.2 (1 µl)	1.3 (1 µl)	1.3 (1 µl)	Null 1 (1 µl)
C	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl		6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med		Med
	ddH ₂ O		GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix	GAPDHmix		HPRTmix
	Prøve		1.4 (1 µl)	1.4 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.6 (1 µl)	1.6 (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)		Null 2 (1 µl)
D	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
	ddH ₂ O		HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix
	Prøve		Null 1 (1 µl)	Null 1 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	1.1 (1 µl)	1.1 (1 µl)	1.2 (1 µl)	1.2 (1 µl)	1.3 (1 µl)	1.3 (1 µl)	1.1 (1 µl)
E	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl		6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med		Med
	ddH ₂ O		HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix	HPRTmix		HPRTmix
	Prøve		1.4 (1 µl)	1.4 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.6 (1 µl)	1.6 (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)		1.2 (1 µl)
F	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med
	ddH ₂ O		Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	HPRTmix
	Prøve		Null 1 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	1.1 (1 µl)	1.1 (1 µl)	1.2 (1 µl)	1.2 (1 µl)	1.3 (1 µl)	1.3 (1 µl)	1.3 (1 µl)
G	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl		6,5 µl
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med		Med
	ddH ₂ O		Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix		HPRTmix
	Prøve		1.4 (1 µl)	1.4 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.6 (1 µl)	1.6 (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)	NTC (1 µl)		1.4 (1 µl)
H	FWD		6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	
	RWD		Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	Med	
	ddH ₂ O		Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	Beclin-mix	HPRTmix	HPRTmix	
	Prøve		Null 1 (1 µl)	Null 2 (1 µl)	1.1 (1 µl)	1.2 (1 µl)	1.3 (1 µl)	1.4 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.6 (1 µl)	1.5 (1 µl)	1.6 (1 µl)	
	SYBR		7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	

A.3 A549-celler



Figur 14: Bilde av A549 cellene inkubert i DMEM uten DHA med en antatt konfluens på 70%. A549 cellene er studert igjennom et invert mikroskop.



Figur 15: Bilde av A549 cellene inkubert i DMEM med DHA i 44 timer med en antatt konfluens på 75%. A549 cellene er studert igjennom et invert mikroskop

A.4 Data presentert i tabeller og grafer

Observasjoner og utdrag av resultater fra analysen gjennomført i denne studien blir presentert i følgende vedlegg. Resultatene blir presentert i form av tabeller, amplifikasjonsplott, smeltepunktsskurve og grafer. Amplifikasjonsplott, smeltepunktsskurve og tabeller i vedlegg A.4.2 – A.4.4 er hentet direkte fra programvaren. Utregninger i form av gjennomsnitt, standardavvik og t-test er utført i Microsoft Excel og presentert i tabeller og grafer.

A.4.1 Vurdering av brett 1 og 2

Følgende tabell beskriver konfluens i cellebrettene før og etter tilsetning med DHA.

Tabell 19: Presentasjon av brettene som ble brukt i analysen. Brett med brønner 2.1-2.6 ble inkubert med medium med DHA i 22 timer og brett med brønner 1.1-1.6 inkubert i 44 timer. Tabellen viser hvilken brønn, tilsatt cellesuspensjon (Cellesusp.) i brønnen. Brettene inkuberte i ca. 28 timer til en konfluens på 30 – 40 % ble bestemt og medium med DHA ble tilsatt (DHA-kons). Etter inkubasjon med DHA i 22 timer ble konfluens til brønnen i begge brettene antatt, der det ble valgt å benytte brett 2.1-2.6 til 22 timers intervall og brett 1.1-1.6 til 44 timer intervall. Knf står for konfluens, der konfluens ved tilsetning av DHA etter 22 timer (Knf. 22t) og etter 44 (Knf. 44t) er tatt med.

Brønn	Cellesusp.	DHA-kons	Knf. ved DHA tilsetning	Knf. 22t	Knf. 44t
2.1	0,2 ml	100 µg/ml	30 – 40%	40 %	
2.2	0,2 ml	50 µg/ml	30 – 40 %	45 %	
2.3	0,2 ml	0 µg/ml	30 – 40 %	55 %	
2.4	0,2 ml	100 µg/ml	30 – 40 %	45 %	
2.5	0,2 ml	50 µg/ml	30 – 40 %	50 %	
2.6	0,2 ml	0 µg/ml	30 – 40 %	55 %	
1.1	0,2 ml	100 µg/ml	30 – 40 %	40 – 50 %	60 %
1.2	0,2 ml	50 µg/ml	30 – 40 %	40 – 50 %	70 %
1.3	0,2 ml	0 µg/ml	30 – 40 %	40 – 50 %	70 %
1.4	0,2 ml	100 µg/ml	30 – 40 %	40 – 50 %	55 %
1.5	0,2 ml	50 µg/ml	30 – 40 %	40 – 50 %	75 %
1.6	0,2 ml	0 µg/ml	30 – 40 %	40 – 50 %	80 %

A.4.2 Data hentet direkte fra programvaren for brett inkubert i 22 og 44 timer

Dataene for Ct-verdi og smeltepunktstemperatur (Tm) for brettene er hentet ut programvaren og presentert i tabeller. Tabellene gir en oversikt over qPCR-brønn, prøve, hvilket gen det har vært detektert for og om det er cDNA i prøven (Unknown) eller om det er NTC.

Tabell 20: Tabellen viser Ct-verdier og Tm for brettet som har inkubert med DHA i 22 timer ved 37°C og 5% CO₂. Kolonnene lengst til venstre viser hvilken brønn (Well) på qPCR-brettet prøven (Sample) var i. Prøvene er merket 2.x hvor tallet 2 er hvilket brett og x beskriver brønn på brett på 22 timer. For hver prøve er det beskrevet hvilken DHA-konsentrasjon (DHA) cellene ble inkubert med, hvilket gen (Target) det ble detektert for og om brønnen inneholdt cDNA (Unknown) eller NTC (Task). I de fire siste kolonnene til høyre er Ct-verdien og Tm1-Tm3 presentert. Ikke alle prøvene hadde flere Tm. Dataene er presentert på engelsk, grunnet direkte hentet ut fra programvaren. Kolonnen med DHA-konsentrasjon er lagt til originaltabell og ΔCt-verdi er tatt bort, da den regnes ut i Microsoft Excel.

Well	Sampel	DHA	Target	Task	Ct	Tm1	Tm2	Tm3
A2	Null 1	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,1765	80,4536		
A3	Null 2	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	25,9929	85,9458	73,8251	
A4	2.1	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	22,8522	80,643		
A5	2.2	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	24,6422	79,3173		
A6	2.3	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	24,9198	80,4536		
A7	2.4	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	23,3979	80,643		
A8	2.5	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	23,0816	80,4536		
A9	2.6	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	22,9574	80,643		
B2	Null 1	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,8813	80,8324		
B3	Null 1	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	20,1944	81,0218		
B4	Null 2	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	18,6357	81,0218		
B5	Null 2	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	18,4798	80,643		
B6	2.1	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	22,9193	80,643	74,0145	
B7	2.1	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	22,9754	80,4536		
B8	2.2	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	25,3794	79,1279		
B9	2.2	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	25,6554	78,7492		
B10	2.3	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	25,6942	79,6961		
B11	2.3	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	24,7558	79,5067		

B12	Null 1	0 µg/ml	HPRT	Unknown	24,08	76,8553		
C2	2.4	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	24,2679	80,0749		
C3	2.4	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	23,8714	80,643		
C4	2.5	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	24,441	80,4536		
C5	2.5	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	24,2538	80,643		
C6	2.6	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	22,8947	80,8324		
C7	2.6	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	23,3299	80,643		
C8	NTC		GAPDH	NTC	27,1908	85,9458	73,8251	
C9	NTC		GAPDH	NTC	26,3472	85,9458	74,2039	
C10	NTC		GAPDH	NTC	26,8843	85,567	73,8251	
C12	Null 2	0 µg/ml	HPRT	Unknown	21,9304	75,5296		
D2	Null 1	0 µg/ml	HPRT	Unknown	24,2755	77,2341		
D3	Null 1	0 µg/ml	HPRT	Unknown	24,784	77,6129		
D4	Null 2	0 µg/ml	HPRT	Unknown	22,3592	77,8022		
D5	Null 2	0 µg/ml	HPRT	Unknown	22,5306	78,181		
D6	2.1	100 µg/ml	HPRT	Unknown	27,2093	77,2341		
D7	2.1	100 µg/ml	HPRT	Unknown	25,7687	75,3402		
D8	2.2	50 µg/ml	HPRT	Unknown	26,5538	75,719		
D9	2.2	50 µg/ml	HPRT	Unknown	27,4284	75,3402		
D10	2.3	0 µg/ml	HPRT	Unknown	28,4113	74,9615		
D11	2.3	0 µg/ml	HPRT	Unknown	26,4031	76,0978		
D12	2.1	100 µg/ml	HPRT	Unknown	26,5518	76,4765		
E2	2.4	100 µg/ml	HPRT	Unknown	26,1723	75,9084		
E3	2.4	100 µg/ml	HPRT	Unknown	24,8469	76,4765		
E4	2.5	50 µg/ml	HPRT	Unknown	25,9723	76,4765		
E5	2.5	50 µg/ml	HPRT	Unknown	26,5413	76,2872		

E6	2.6	0 µg/ml	HPRT	Unknown	25,3212	76,8553		
E7	2.6	0 µg/ml	HPRT	Unknown	26,2324	76,0978		
E8	NTC		HPRT	NTC	24,9739	76,6659		
E9	NTC		HPRT	NTC	24,6757	76,4765		
E10	NTC		HPRT	NTC	25,0029	76,0978		
E12	2.2	50 µg/ml	HPRT	Unknown	24,7462	75,9084		
F2	Null 1	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,1856	83,8626	80,4536	72,3101
F3	Null 1	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,4643	84,6201	80,0749	73,257
F4	Null 2	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	26,0979	83,4838		
F5	Null 2	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	26,9949	84,052		
F6	2.1	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,6136	85,567	79,6961	
F7	2.1	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,559	83,8626	73,257	
F8	2.2	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	29,4908	85,3777	73,4464	
F9	2.2	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,562	85,3777	80,0749	
F10	2.3	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,9323	85,7564	74,0145	
F11	2.3	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,9384	84,9989	72,6888	
F12	2.3	0 µg/ml	HPRT	Unknown	25,274	75,719		
G2	2.4	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,7045	85,567	72,8782	
G3	2.4	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	29,3152	73,4464	79,8855	83,2944
G4	2.5	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,7138	84,9989		
G5	2.5	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,3481	85,567	80,2643	
G6	2.6	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,6835	85,7564		
G7	2.6	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,3225	85,3777		
G8	NTC		BECLIN	NTC	28,6654	85,9458	73,257	
G9	NTC		BECLIN	NTC	29,3435	85,9458	71,3631	
G10	NTC		BECLIN	NTC	28,1837	85,567	76,4765	
G12	2.4	100 µg/ml	HPRT	Unknown	24,5372	75,9084		
H2	Null 1	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	24,507	85,1883	80,643	

H3	Null 2	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	25,5595	83,105		
H4	2.1	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,487	85,567		
H5	2.2	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,7582	85,3777	80,2643	
H6	2.3	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,9613	85,3777		
H7	2.4	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,6785	85,9458	79,8855	
H8	2.5	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	28,3061	85,1883	72,6888	
H9	2.6	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	26,9966	85,3777		
H10	2.5	50 µg/ml	HPRT	Unknown	26,4013	75,719		
H11	2.6	0 µg/ml	HPRT	Unknown	24,3799	76,0978		

Tabell 21: QC summary for brett på 22 timer (kvalitetskontroll til qPCR-brettet) hentet direkte fra programvaren, resultatene er derfor presentert på engelsk. Totalt inneholdt qPCR-brettet 96 brønner der 81 av qPCR-brønnene ble benyttet i analysen. Det skjedde en merknad i totalt 63 av 81 brønner med prøve. I qPCR-analysen ble det testet for tre ulike gen (GAPDH, HPRT og Beclin 1) i totalt 9 ulike prøver. I tabellen blir merknad (Flag) presentert med forkortelser i kolonnen til venstre, etterfulgt av en forklarelse (Name), hvor mange qPCR-brønner merknaden skjedde i (Frequency) og i hvilken qPCR-brønn i kolonnen helt til høyre (Locations).

Flag	Name	Frequency	Locations
AMPNC	Amplification in negative control (NTC)	9	C8, C9, C10, E8, E9, E10, G8, G9, G10
BADROX	Bad passive reference signal		
BLFAIL	Baseline algorithm failed		
CTFAIL	Ct algorithm failed		
EXPFAIL	Exponential algorithm failed		
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	48	A2, A3, A5, A6, A8, B2, B3, B4, B5, B8, B9, B10, B11, C4, C5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, E2, E3, E6, E7, E12, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12, G6, G7, G12, H2, H3, H4, H5, H6, H9, H11
MTP	Multiple Tm peaks	23	A3, B6, C8, C9, C10, F2, F3, F6, F7, F8, F9, F10, F11, G2, G3, G5, G8, G9, G10, H2, H5, H7, H8
NOAMP	No amplification		
NOISE	Noise higher than other in plate		
NOSIGNAL	No signal in well		
OFFSCALE	Fluorescence is offscale		
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	2	A3, F10
SPIKE	Noise spikes		
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed		
ZPR	Zero passive reference		

Tabell 22: Tabellen viser Ct-verdier og Tm for brettet som har inkubert med DHA i 44 timer ved 37°C og 5% CO₂. Kolonnene lengst til venstre viser hvilken brønn (Well) på qPCR-brettet prøven (Sample) var i. Prøvene er merket 1.x hvor tallet 1 er hvilket brett og x beskriver brønn på brett på 44 timer. For hver prøve er det beskrevet hvilken DHA-konsentrasjon (DHA) cellene ble inkubert med, hvilket gen (Target) det ble detektert for og om brønnen inneholdt cDNA (Unknown) eller NTC (Task). I de fire siste kolonnene til høyre er Ct-verdien og Tm1-Tm3 presentert. Ikke alle prøvene hadde flere Tm. Dataene er presentert på engelsk, grunnet direkte hentet ut fra programvaren. Kolonnen med DHA-konsentrasjon er lagt til originaltabell og ΔCt-verdi er tatt bort, da den regnes ut i Microsoft Excel.

Well	Sample	DHA	Target	Task	Ct	Tm1	Tm2	Tm3
A2	Null 1	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	18,9363	81,086		
A3	Null 2	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	17,8878	81,2743		
A4	1.1	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	16,6232	81,086		
A5	1.2	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	18,6077	81,086		
A6	1.3	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	17,1678	80,7095		
A7	1.4	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,7059	81,4626		
A8	1.5	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,1357	81,2743		
A9	1.6	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	20,0395	81,2743		
B2	Null 1	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,3026	81,4626		
B3	Null 1	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,7629	81,2743		
B4	Null 2	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	18,2945	81,4626		
B5	Null 2	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	18,2843	81,2743		
B6	1.1	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	16,6082	81,4626		
B7	1.1	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	16,6311	81,4626		
B8	1.2	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	18,4496	81,086		
B9	1.2	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	18,5558	81,6508		
B10	1.3	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	17,1964	81,4626		
B11	1.3	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	17,1146	80,8978		
B12	Null 1	0 µg/ml	HPRT	Unknown	22,9189	77,8855		
C2	1.4	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	20,3838	81,086		
C3	1.4	100 µg/ml	GAPDH	Unknown	20,3478	81,6508		

C4	1.5	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	20,0107	81,8391		
C5	1.5	50 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,6579	81,6508		
C6	1.6	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,8934	81,6508		
C7	1.6	0 µg/ml	GAPDH	Unknown	19,7752	81,6508		
C8	NTC		GAPDH	NTC	26,3719	86,7341	74,6849	
C9	NTC		GAPDH	NTC	26,6022	86,7341	74,6849	
C10	NTC		GAPDH	NTC	25,9707	86,7341	74,4966	
C12	Null 2	0 µg/ml	HPRT	Unknown	22,1953	78,0737		
D2	Null 1	0 µg/ml	HPRT	Unknown	23,8004	78,4503		
D3	Null 1	0 µg/ml	HPRT	Unknown	24,5434	78,4503		
D4	Null 2	0 µg/ml	HPRT	Unknown	22,1691	78,6385		
D5	Null 2	0 µg/ml	HPRT	Unknown	22,5476	78,8268		
D6	1.1	100 µg/ml	HPRT	Unknown	21,2225	78,8268	82,5922	
D7	1.1	100 µg/ml	HPRT	Unknown	20,529	82,9687	78,8268	
D8	1.2	50 µg/ml	HPRT	Unknown	21,7544	78,8268		
D9	1.2	50 µg/ml	HPRT	Unknown	22,5104	78,6385		
D10	1.3	0 µg/ml	HPRT	Unknown	21,3191	78,4503		
D11	1.3	0 µg/ml	HPRT	Unknown	20,7026	78,0737		
D12	1.1	100 µg/ml	HPRT	Unknown	20,7708	78,0737	81,4626	
E2	1.4	100 µg/ml	HPRT	Unknown	23,7399	78,6385		
E3	1.4	100 µg/ml	HPRT	Unknown	23,0081	78,6385		
E4	1.5	50 µg/ml	HPRT	Unknown	23,8379	78,8268		
E5	1.5	50 µg/ml	HPRT	Unknown	23,4972	78,8268		
E6	1.6	0 µg/ml	HPRT	Unknown	24,2473	78,6385		
E7	1.6	0 µg/ml	HPRT	Unknown	23,92	78,8268		
E8	NTC		HPRT	NTC	25,6465	76,9441		
E9	NTC		HPRT	NTC	24,4236	76,9441		
E10	NTC		HPRT	NTC	26,26	76,7559		

E12	1.2	50 µg/ml	HPRT	Unknown	21,9015	77,8855		
F2	Null 1	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	25,6295	85,2279	80,7095	
F3	Null 1	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	25,6809	84,8514	80,8978	
F4	Null 2	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	25,9462	83,7218		
F5	Null 2	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	31,3194	74,3084	82,4039	
F6	1.1	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	22,6666	83,5335		
F7	1.1	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	23,1667	83,3452		
F8	1.2	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	25,4895	83,3452		
F9	1.2	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	25,8551	82,9687		
F10	1.3	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	24,1459	83,3452		
F11	1.3	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	24,6402	82,9687		
F12	1.3	0 µg/ml	HPRT	Unknown	21,6243	78,0737		
G2	1.4	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,8384	82,9687		
G3	1.4	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	26,1318	83,7218		
G4	1.5	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	26,2379	83,3452		
G5	1.5	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	26,9983	83,157		
G6	1.6	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	26,7497	83,7218		
G7	1.6	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	26,7985	83,5335		
G8	NTC		BECLIN	NTC	29,8758	86,3575	73,9318	
G9	NTC		BECLIN	NTC	28,6183	86,3575		
G10	NTC		BECLIN	NTC	28,3979	85,7927	73,1788	
G12	1.4	100 µg/ml	HPRT	Unknown	23,6348	78,0737		
H2	Null 1	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	29,8856	72,2374		
H3	Null 2	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	34,8453	61,8827	71,8609	89,5581
H4	1.1	100 µg/ml	BECLIN	Unknown	23,1303	82,4039		
H5	1.2	50 µg/ml	BECLIN	Unknown	27,147	81,2743	71,6726	
H6	1.3	0 µg/ml	BECLIN	Unknown	30,5081	81,086	71,8609	

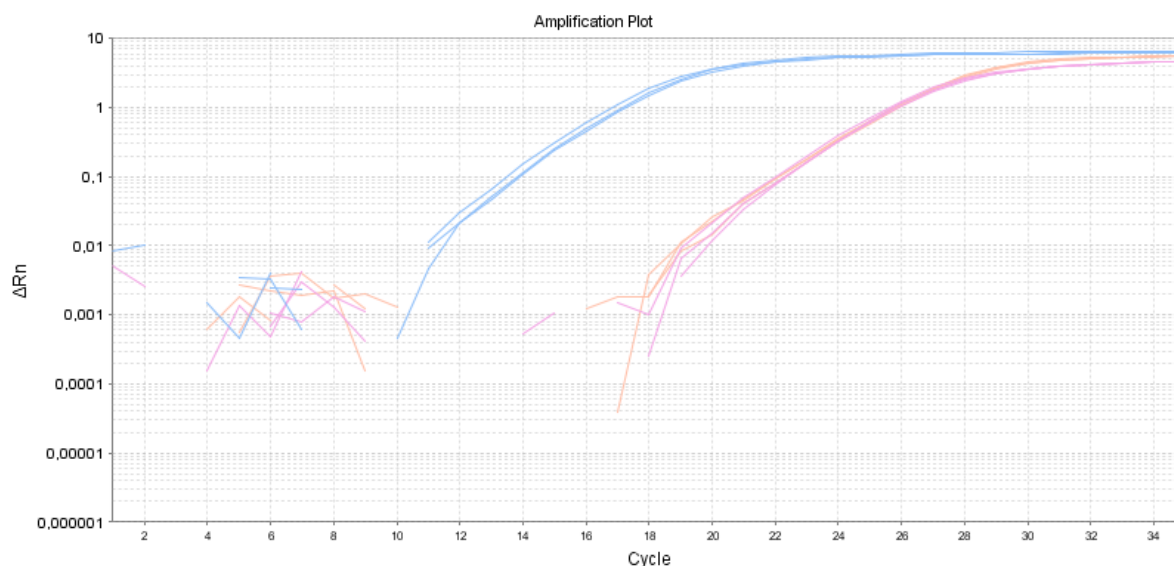
H7	1.4	100 μg/ml	BECLIN	Unknown	29,5693	81,4626	69,9782	
H8	1.5	50 μg/ml	BECLIN	Unknown	28,4422	81,6508	70,1665	
H9	1.6	0 μg/ml	BECLIN	Unknown	27,4879	81,6508	72,2374	
H10	1.5	50 μg/ml	HPRT	Unknown	24,7989	77,8855		
H11	1.6	0 μg/ml	HPRT	Unknown	23,7545	77,3207		

Tabell 23: QC summary for brett på 44 timer (kvalitetskontroll til qPCR brettet) hentet direkte fra programvaren, resultatene er derfor presentert på engelsk. Totalt inneholdt qPCR-brettet 96 brønner der 81 av qPCR-brønnene ble benyttet i analysen. Det skjedde en merknad i totalt 38 av 81 brønner med prøve. I qPCR-analysen ble det testet for tre ulike gen (GAPDH, HPRT og Beclin 1) i totalt 9 prøver. I tabellen blir merknad (Flag) presentert med forkortelser i kolonnen til venstre, etterfulgt av en forklarelse (Name), hvor mange qPCR-brønner merknaden skjedd i (Frequency) og i hvilken qPCR-brønn i kolonnen helt til høyre (Locations).

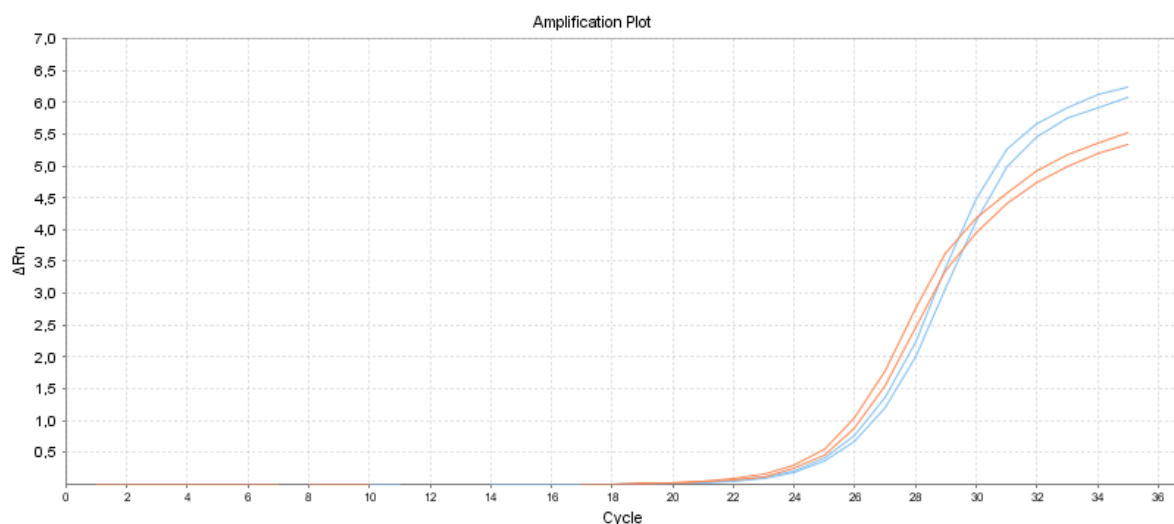
Flag	Name	Frequency	Locations
AMPNC	Amplification in negative control (NTC)	9	C8, C9, C10, E8, E9, E10, G8, G9, G10
BADROX	Bad passive reference signal		
BLFAIL	Baseline algorithm failed		
CTFAIL	Ct algorithm failed		
EXPFAIL	Exponential algorithm failed		
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	24	B12, D2, D3, E4, E5, F2, F3, F4, F5, F8, F9, F10, F11, G2, G3, G4, G5, H2, H3, H5, H6, H7, H8, H10
MTP	Multiple Tm peaks	17	C8, C9, C10, D6, D7, D12, F2, F3, F5, G8, G10, H3, H5, H6, H7, H8, H9
NOAMP	No amplification		
NOISE	Noise higher than other in plate		
NOSIGNAL	No signal in well		
OFFSCALE	Fluorescence is offscale		
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	2	A3, H2
SPIKE	Noise spikes		
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed		
ZPR	Zero passive reference		

A.4.3 Amplifikasjonsplott for de ulike qPCR brettene benyttet i optimalisering og analyse av prøvene

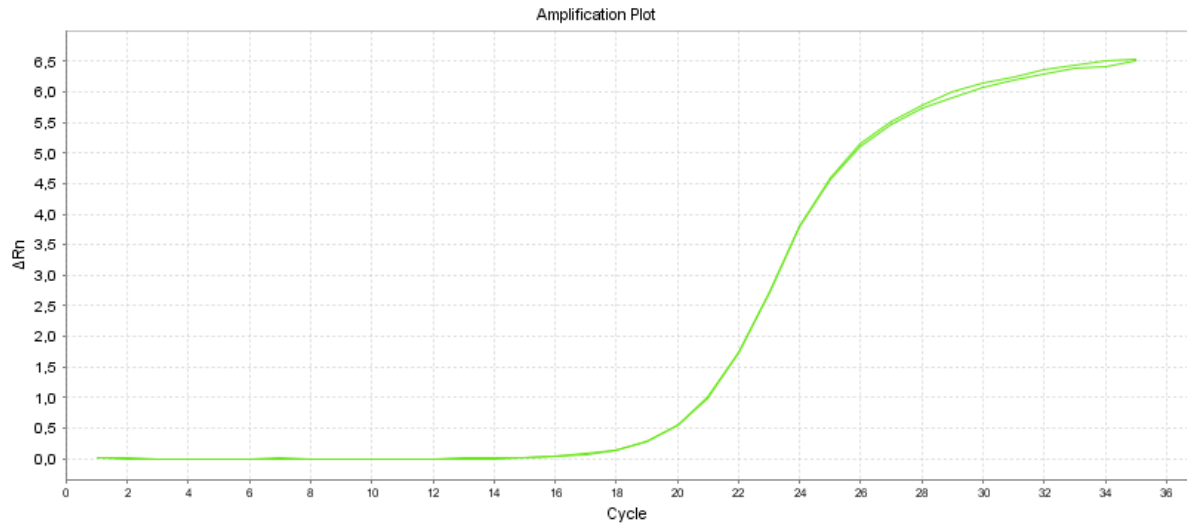
Resultatene er presentert i amplifikasjonsplott er hentet direkte fra programvaren. Der fluorescensen (ΔRn) på y-aksen etter antall sykluser på x-aksen. Amplifikasjonsplottene blir presentert logaritmisk eller lineært. Resultat er hentet fra optimalisering og analyse.



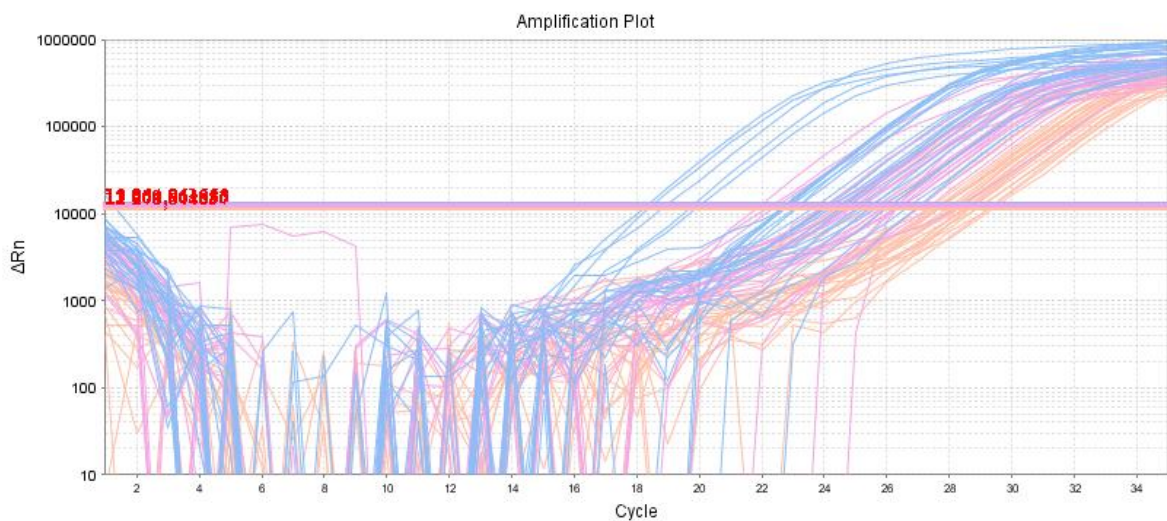
Figur 16: Grafen viser en fluorescens (ΔRn) ved temperatur 57 °C logaritmisk for GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje). Grafen er hentet fra temperaturoptimaliseringen og viser hvordan et optimalt amplifikasjonsplott ser ut. Her ble det benyttet qPCR-kit SYBR Green med ROX.



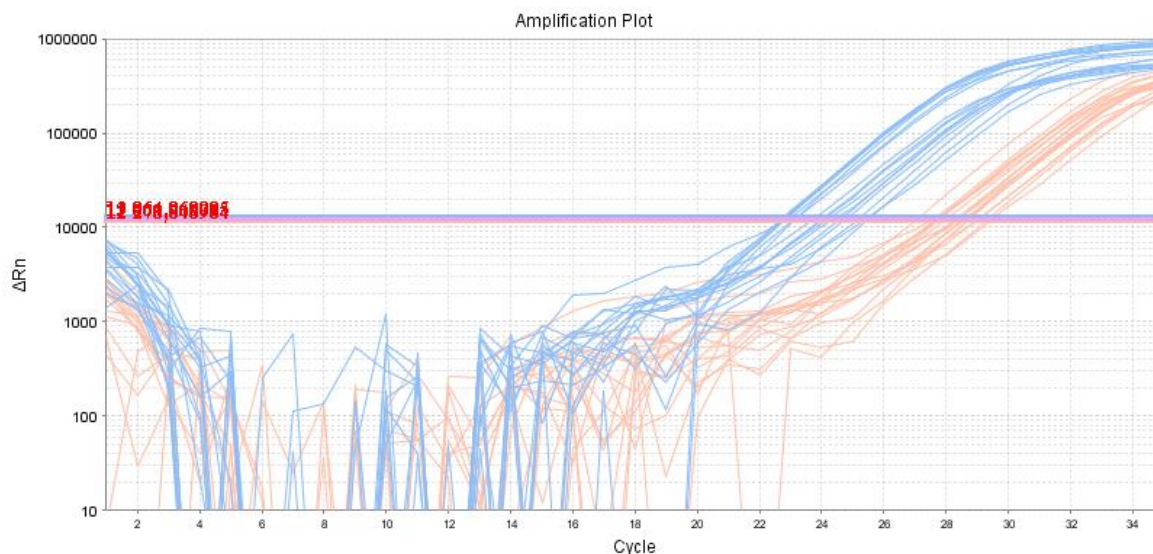
Figur 17: Grafene viser amplifikasjonsplottet til primeroptimaliseringen av HPRT (oransje) med en konsentrasjon på 500/500nM og Beclin 1 (blå) med en konsentrasjon på 400/300 nM med fluorescens (lineær) i ΔRn på y-aksen og antall sykluser på x-aksen. Konsentrasjonene ble ut fra vurdering av amplifikasjonsplott, smeltepunktanalyse og T_m . Grafen er vist i lineært format for å vise en optimal S-kurve. Under primeroptimaliseringen ble det benyttet qPCR-kit SYBR Green med ROX.



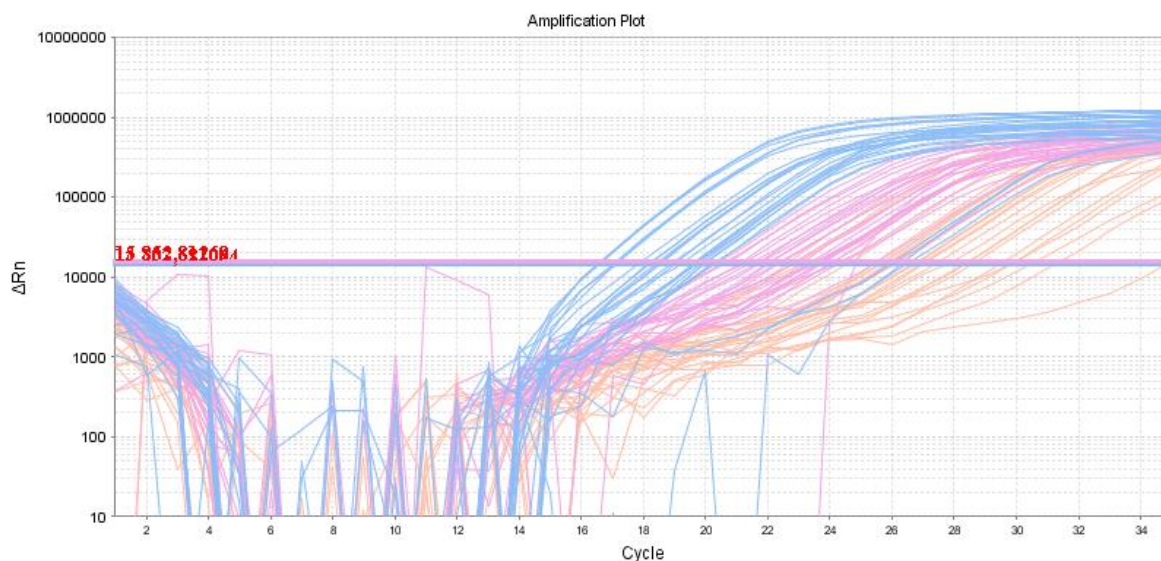
Figur 18: Grafen viser amplifikasjonsplottet til primeroptimaliseringen av GAPDH (grønn) med en konsentrasjon på 400/400 nM der fluorescens (lineær) i ΔRn på y-aksen og antall sykluser på x-aksen. Konsentrasjonene ble vurdert ut ifra amplifikasjonsplott, smeltepunktanalyse og T_m . Grafen er vist i lineært format for å vise en optimal S-kurve. Under primeroptimaliseringen ble det benyttet qPCR-kit SYBR Green med ROX.



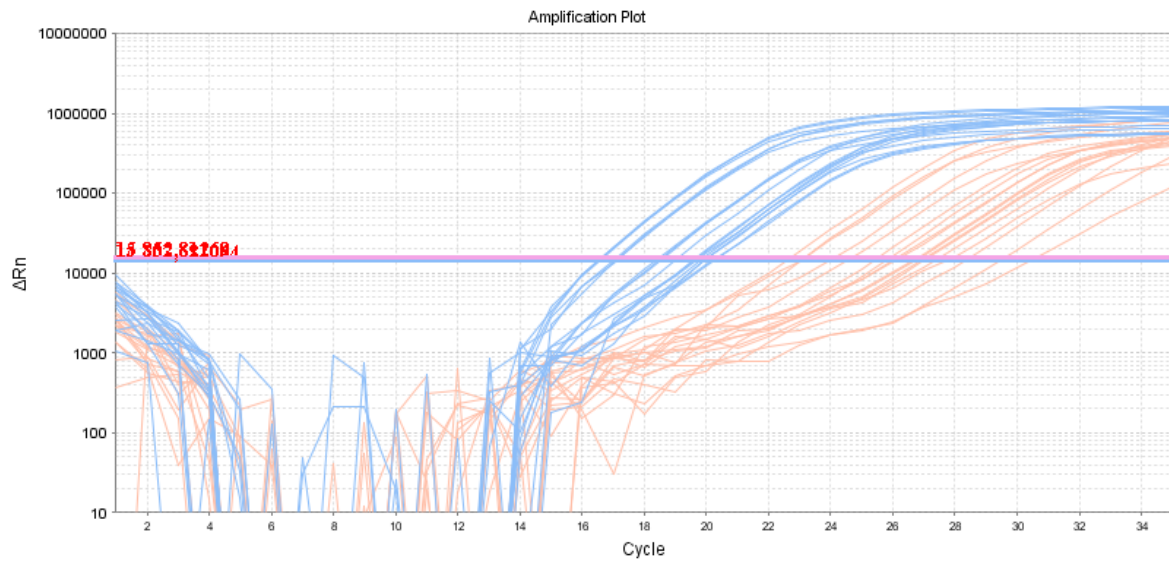
Figur 19: Grafene viser resultatet til prøvene på brett på 22 timer. Genene GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) er merket med ulike farger. Fluorescens (ΔRn) logaritmisk til qPCR-produktet på y-aksen etter antall sykluser på x-aksen. Her er prøvene for null 1, null 2 og NTC er tatt med i amplifikasjonsplottet. Rosa graf med flatt toppunkt med Ct-verdi mellom 5-9 er fra brønn H10. Terskelverdi er merket med horisontal linje ved ΔRn 1000. Det er blitt benyttet et qPCR-kit SYBR Green uten ROX under denne qPCR-analysen.



Figur 20: Grafene viser resultatet til prøvene på brett på 22 timer. Gene GAPDH (blå) og Beclin 1 (oransje) er merket med ulik farge. Fluorescens (ΔRn) logaritmisk til qPCR-produktet på y-aksen etter antall sykluser på x-aksen. Her er prøvene for null 1, null 2, NTC og HPRT utelatt i amplifikasjonsplottet, da disse prøvene ikke ble benyttet ved utregning av genekspressjonen. Terskelverdi er merket med horisontal linje ved ΔRn 1000. Det er blitt benyttet et qPCR-kit SYBR Green uten ROX under denne qPCR-analysen.



Figur 21: Grafene viser resultatet til prøvene på brett på 44 timer. Genene GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) er merket med ulik farge. Fluorescens (ΔRn) logaritmisk til qPCR-produktet på y-aksen etter antall sykluser på x-aksen. Her er prøvene for null 1, null 2 og NTC er tatt med i amplifikasjonsplottet. Rosa graf med flatt toppunkt med Ct-verdi mellom 1-4 og 11-14 er fra brønn H10. Terskelverdi er merket med horisontal linje ved ΔRn 1000. Det er blitt benyttet et qPCR-kit SYBR Green uten ROX under denne qPCR-analysen.

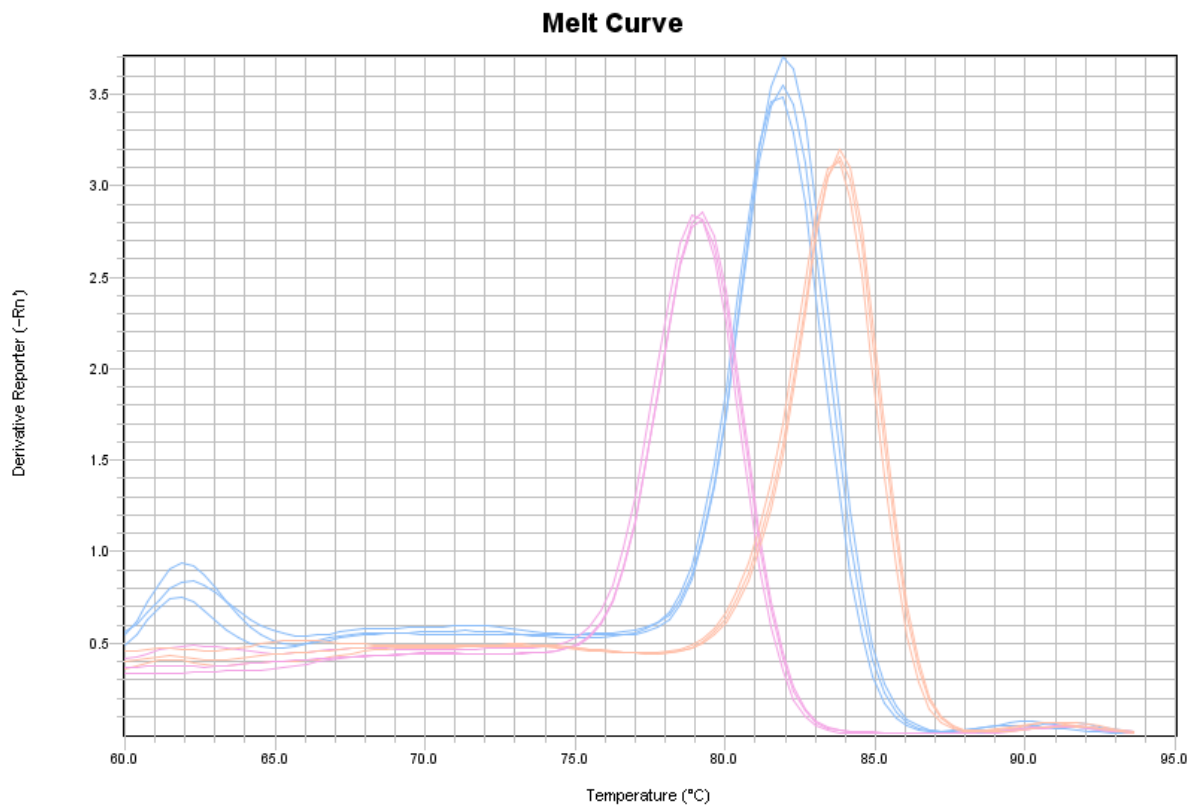


Figur 22: Grafene viser resultatet til prøvene på brett på 44 timer. Genene GAPDH (blå) og Beclin 1 (oransje) er merket med ulik farge. Fluorescens (ΔRn) logaritmisk til qPCR-produktet på y-aksen etter antall sykluser på x-aksen. Her er prøvene for null 1, null 2, NTC og HPRT utelatt i amplifikasjonsplottet, da disse prøvene ikke ble benyttet ved utregning av genekspressjonen. Terskelverdi er merket med horisontal linje ved ΔRn 1000. Det er blitt benyttet et qPCR-kit SYBR Green uten ROX under denne qPCR-analysen.

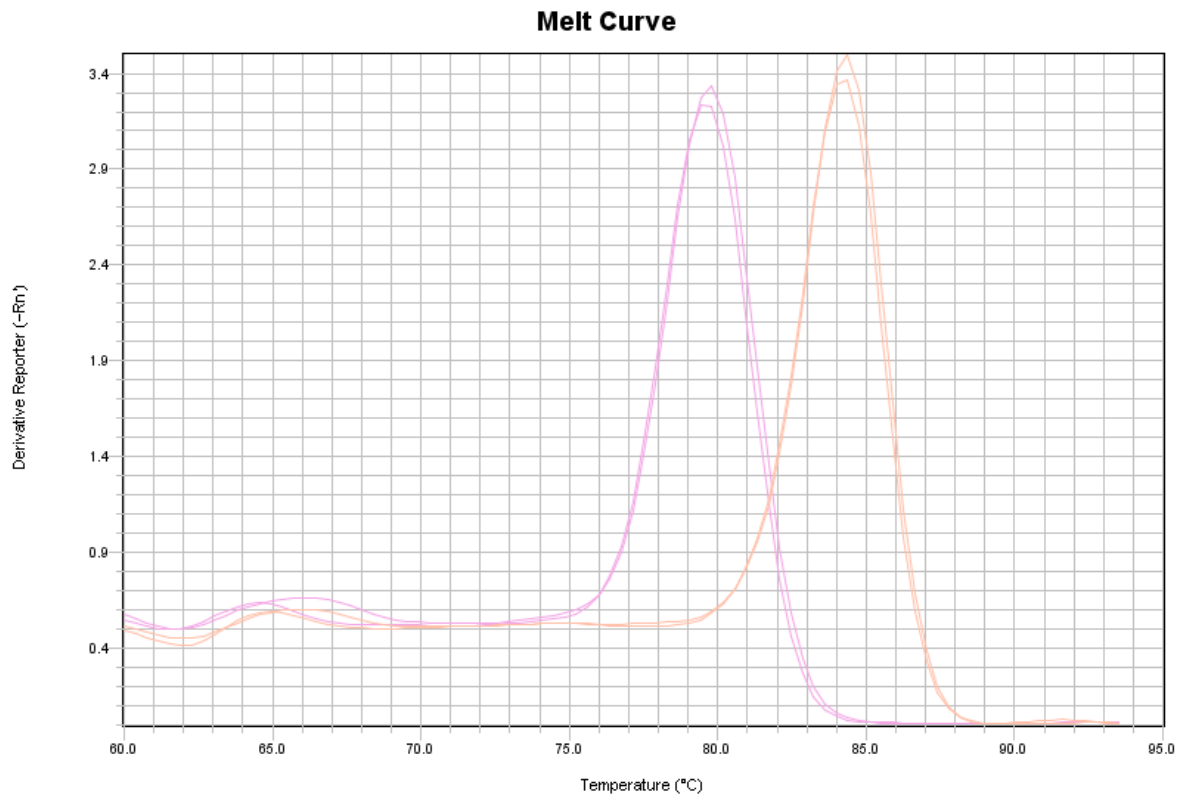
A.4.4 Smeltepunktskurvene for de ulike qPCR brettene benyttet i optimalisering og analyse av prøvene

Presentasjon av resultatene fra optimalisering og analysen i form av smeltepunktskurve.

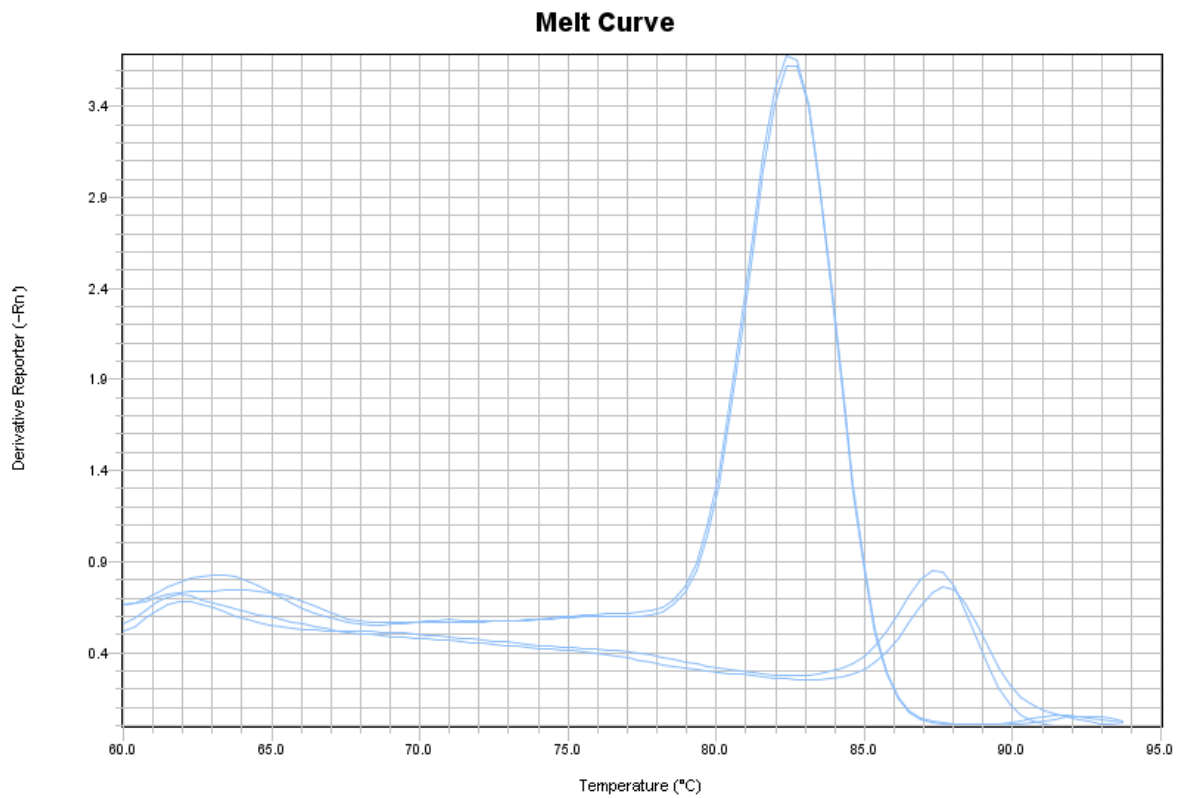
Smeltepunktskurven er presentert med derivert fluorescens ($-Rn'$) på y-aksen og temperatur på x-aksen.



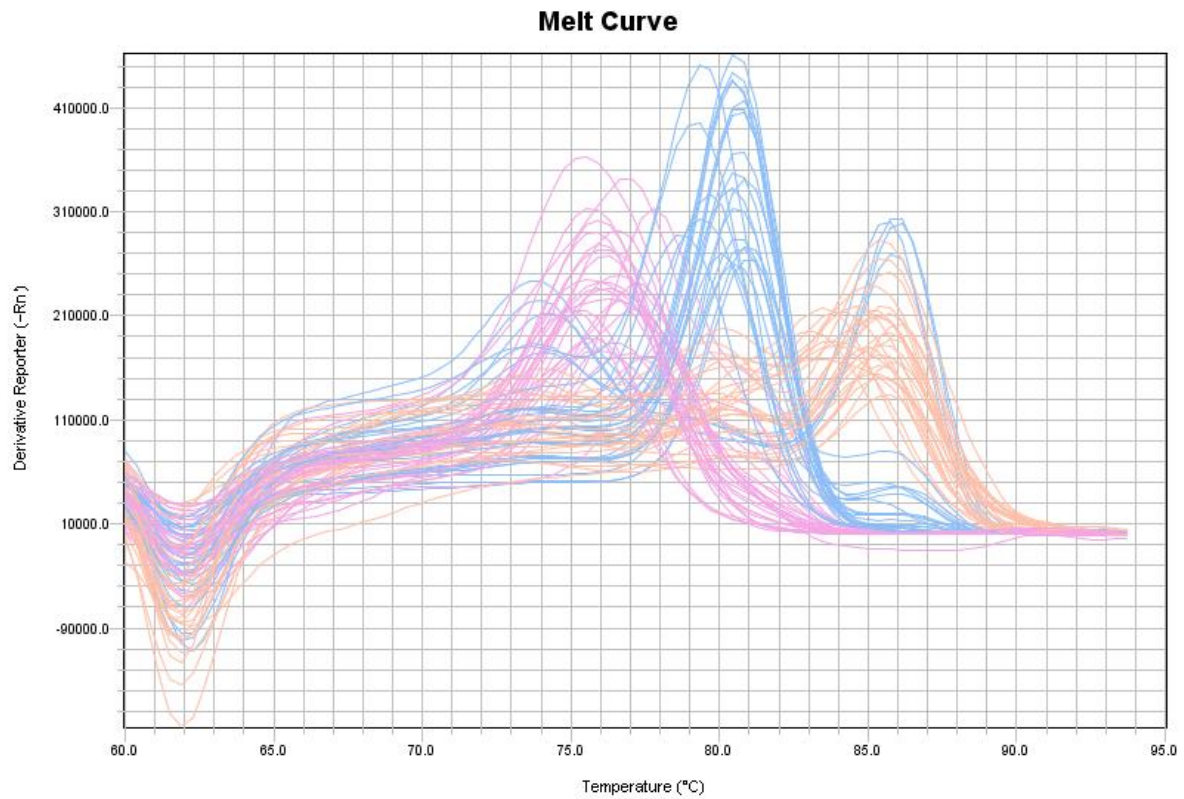
Figur 23: Grafene viser smeltepunktskurven til GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) ved en temperatur på 57°C etter temperaturoptimalisering. Grafene er brukt som et eksempel på en optimal smeltepunktskurve ved qPCR-analyse. Grafen blir presentert med derivert fluorescens ($-Rn'$) på y-aksen og temperatur (°C) på x-aksen. Genene ble undersøkt i tripletter hvor $Tm1$ til GAPDH er 81.904°C, 81.715°C og 81.904°C, HPRT er 79.072°C, 79.26°C og 79.072°C og Beclin 1 er 83.603°C, 83.792°C og 83.792. Det ble benyttet qPCR-kit SYBR Green med ROX.



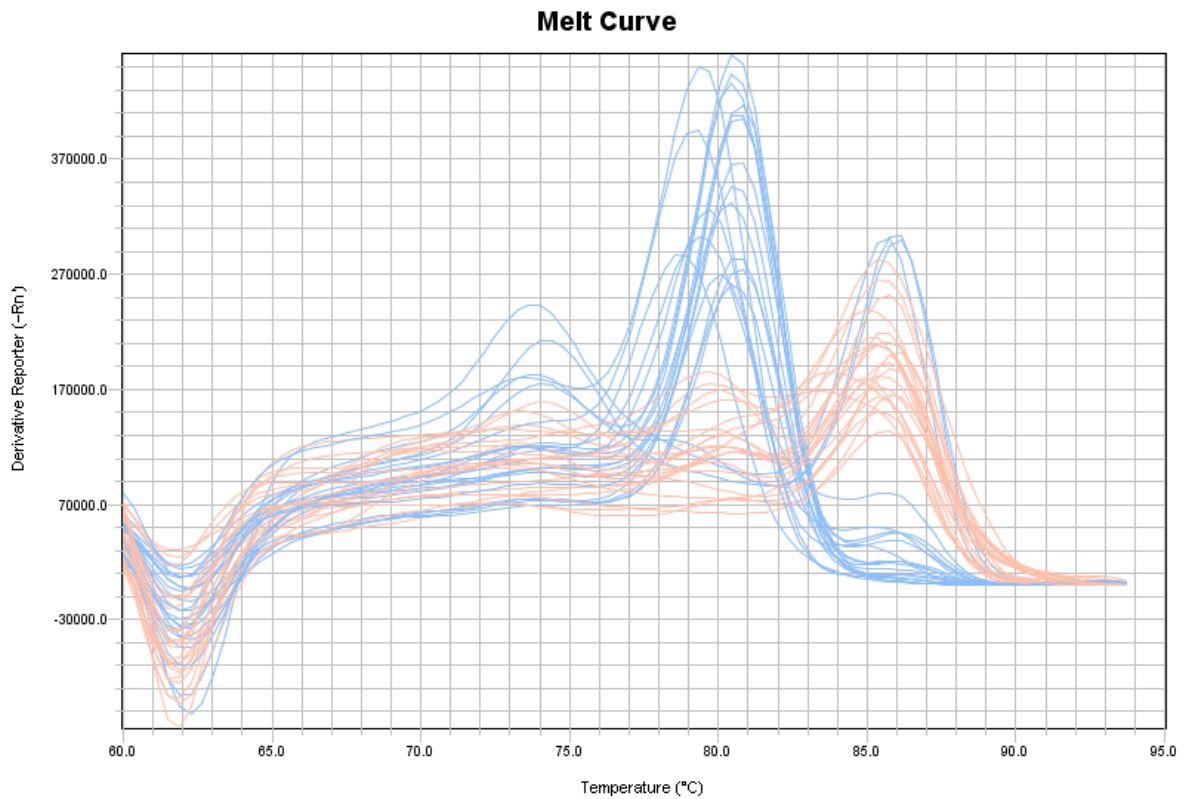
Figur 24: Smeltepunktsskurven til HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) under primerkonsentrasjonsoptimalisering. HPRT hadde en konsentrasjon på 500/500 nM og Beclin 1 med en konsentrasjon på 400/300 nM. qPCR-kit SYBR Green med ROX er benyttet under denne optimaliseringen. Det ble ikke dannet produkt i NTC for HPRT eller Beclin 1. Resultatet er presentert med derivert fluorescens ($-Rn'$) på y-aksen opp mot temperatur (°C) på x-aksen.



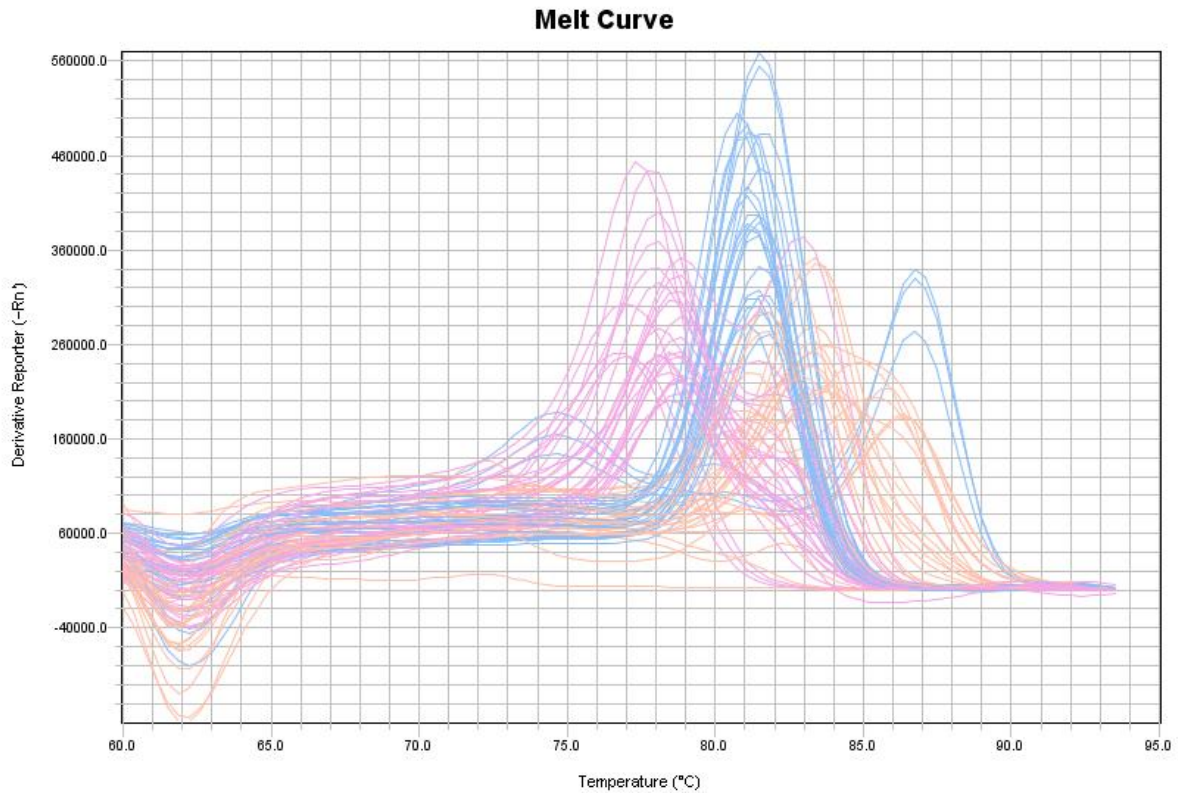
Figur 25: Smeltepunktskurven til prøve og NTC med GAPDH med en konsentrasjon på 400/400 nM. På y-aksen blir den deriverte fluorescensen (-Rn') presentert opp mot temperatur (°C) på x-aksen. Kurven med en høy topp ved 82,54°C er fra brønn med cDNA og liten topp ved 87, 5°C er fra brønner med NTC. Det er blitt benyttet qPCR-kit SYBR Green med ROX under den qPCR-optimaliseringen.



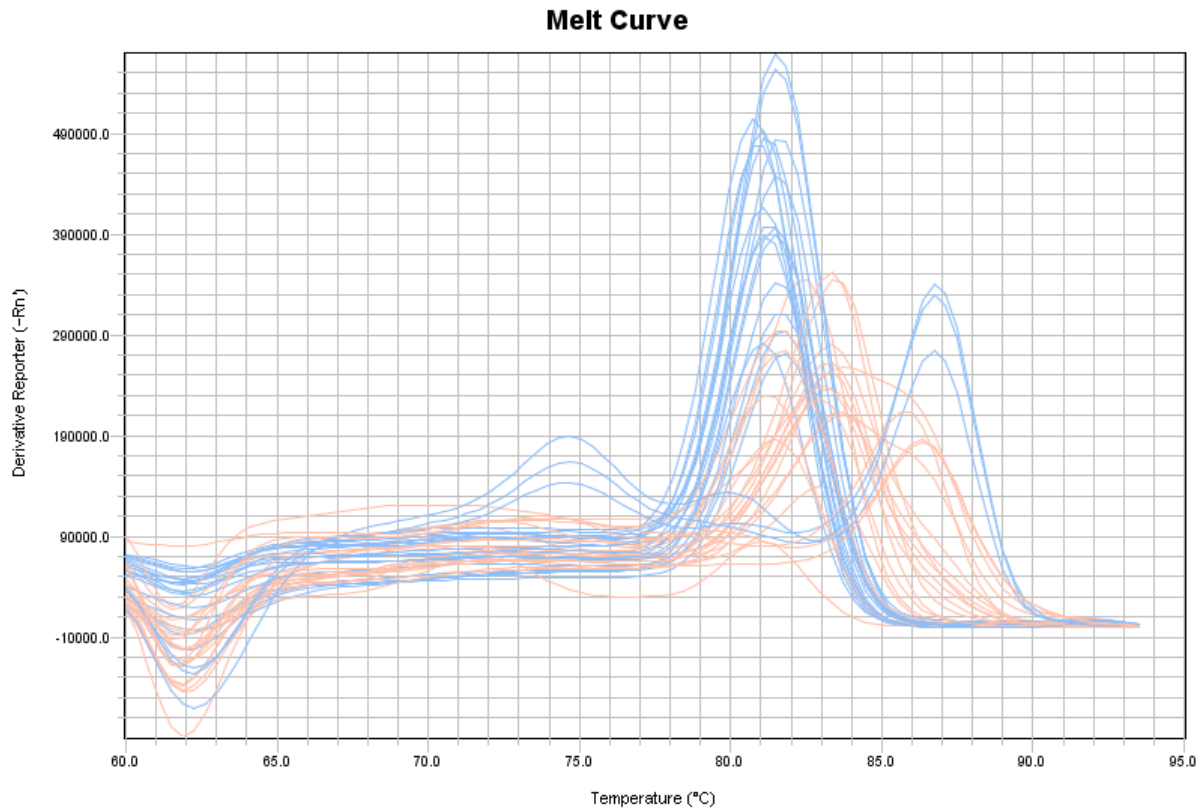
Figur 26: Grafen viser smeltepunktskurven til GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) for prøvene på brett på 22 timer. Den deriverte fluorescens (-Rn') er presentert på y-aksen opp mot temperatur (°C) på x-aksen. Smeltepunktskurven til alle qPCR-brønnene er presentert. Alle grafene har en dalende kurvene i starten (bakgrunnsstøy). Ingen av genene viser entydigtopp punkt ved lik T_m. Beclin 1 har en tydelig skulder før T_m på ved 85°C. Analysen er gjennomført med et qPCR-kit SYBR Green uten ROX.



Figur 27: Smeltepunktsskurvene er for GAPDH og Beclin 1 samt primerenes NTC fra brett på 22 timer. Der den deriverte fluorescensen (-Rn) er presentert på y-aksen og temperatur (°C) på x-aksen. Null 1, Null 2 og HPRT er utelatt fra denne smeltepunktsskurven, da disse ikke var med i vurderingen eller beregningen av genekspressjonen til Beclin 1. GAPDH med topp mellom 70-75°C og 85-95°C er detektert fra qPCR-brønner med NTC, som viser primer-dimer og uspesifikt qPCR-produkt. Beclin 1 viser dannelse av skulder fram til Tm1 på omtrent 85-86°C. Det ble benyttet et qPCR-kit SYBR Green uten ROX.



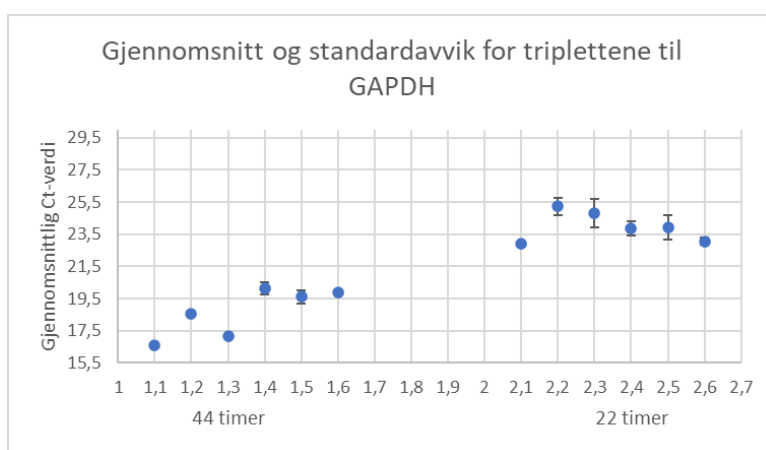
Figur 28: Grafen viser smeltepunktskurven til GAPDH (blå), HPRT (rosa) og Beclin 1 (oransje) for prøvene på brett på 44 timer. Den deriverte fluorescens ($-Rn'$) er presenter på y-aksen opp mot temperatur ($^{\circ}C$) på x-aksen. Smeltepunkt kurven viser qPCR-produktet til alle detekterte qPCR-brønner. Alle grafene har en dalende kurvene i starten, som er bakgrunnsstøy. Ingen av genene viser entydig tydelig toppunkt ved lik T_m . Beclin 1 har en tydelig skulder før T_m mellom $74-86^{\circ}C$. HPRT har T_{m1} mellom $77-83^{\circ}C$. GAPDH har en T_{m1} mellom $80-86^{\circ}C$. Analysen er gjennomført med et qPCR-kit SYBR Green uten ROX.



Figur 29: Smeltepunktskurvene er for GAPDH og Beclin 1 samt primerenes NTC fra brett på 44 timer. Der den deriverte fluorescensen (-Rn) er presentert på y-aksen og temperatur (°C) på x-aksen. Null 1, Null 2 og HPRT er utelatt fra denne smeltepunktskurven, da disse ikke var med i vurderingen eller beregningen av genekspressjonen til Beclin 1. GAPDH med topp mellom 73-77°C og 85-90°C er NTC, som viser primer-dimer og uspesifikt qPCR-produkt. Det ble benyttet et qPCR-kit SYBR Green uten ROX.

A.4.5 Beregning og grafisk framstilling av normaliseringsgen

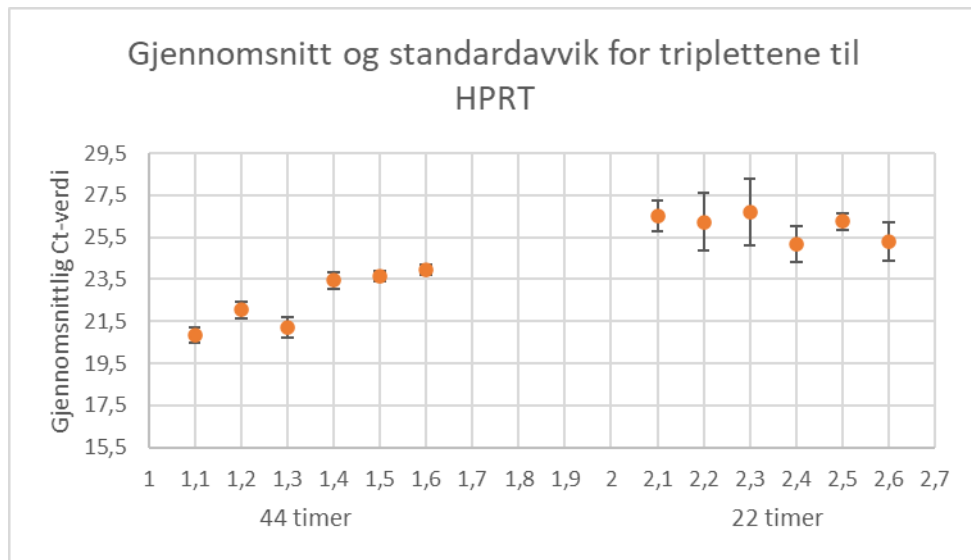
Følgende grafiske framstillinger viser gjennomsnitt og standardavvik til normaliseringsgenene. Denne informasjonen ble benyttet til å bedømme det mest stabile normaliseringsgenet. *Tabell 24* og *Tabell 25* viser t-tester utført på verdier innad i normaliseringsgenene. *Figur 30* og *Figur 31* viser triplettens gjennomsnitt og standardavvik. Tabellene, t-testene og diagrammene ble produsert i Microsoft Excel.



Figur 30: I punktdiagrammet blir gjennomsnitt og standardavvik for triplettene til GAPDH presentert. Y-aksen viser gjennomsnittlig Ct-verdi mens x-aksen viser hvilken celledyrkningsbrønn prøvene er hentet fra og hvor lenge de ble inkubert med DHA.

Tabell 24: Tabellen presenterer resultatet av en t-test utført på 2^{-Ct} -verdiene til triplettene til GAPDH. T-testen er utført med to utvalg med antatt like varianser, hvor utvalg 1 er prøver som har inkubert i 22 timer (blå verdier) og utvalg 2 er prøver som har inkubert i 44 timer (gule verdier). Med en p-verdi på 0,04 kommer det frem at det er en statistisk signifikant forskjell på verdiene i disse to datasettene.

Gen	Brønn	DHA kons.	Ct	Ct	Ct	gj. Snitt	2 ^{-Ct}	t-Test: To utvalg med antatt like varianser			
22 t	GAPDH	2,3	0	25,69	24,76	23,92	24,79	0,000000034			
22 t	GAPDH	2,6	0	22,89	23,33	22,96	23,06	0,000000114			
22 t	GAPDH	2,2	50,0	25,38	25,66	24,64	25,23	0,000000025	Gjennomsnitt	7,162E-08	3,7529E-06
22 t	GAPDH	2,5	50	24,44	24,25	23,08	23,92	0,000000063	Varians	1,686E-15	1,4188E-11
22 t	GAPDH	2,1	100,0	22,92	22,98	22,85	22,92	0,000000126	Observasjoner	6	6
22 t	GAPDH	2,4	100	24,27	23,87	23,40	23,85	0,000000066	Gruppevarians	7,095E-12	
									Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
44 t	GAPDH	1,3	0	17,2	17,11	17,17	17,16	0,000006828	fg	10	
44 t	GAPDH	1,6	0	19,89	19,78	20,04	19,903333	0,000001020	t-Stat	-2,3938004	
44 t	GAPDH	1,2	50,0	18,45	18,56	18,61	18,54	0,000002624	P(T<=t) ensidig	0,0188565	
44 t	GAPDH	1,5	50	20,01	19,66	19,14	19,603333	0,000001255	T-kritisk, ensidig	1,8124611	
44 t	GAPDH	1,1	100,0	16,61	16,63	16,62	16,62	0,000009928	P(T<=t) tosidig	0,037713	
44 t	GAPDH	1,4	100	20,38	20,35	19,71	20,146667	0,000000861	T-kritisk, tosidig	2,2281389	



Figur 31: I punktdiagrammet blir gjennomsnitt og standardavvik for tripllettene til HPRT presentert. Y-aksen viser gjennomsnittlig Ct-verdi mens x-aksen viser hvilken celledyrkningsbrønn prøvene er hentet fra og hvor lenge de ble inkubert med DHA.

Tabell 25: Tabellen presenterer resultatet av en t-test utført på 2^{-Ct} -verdiene til tripllettene til HPRT. T-testen er tatt på to utvalg med antatt like varianser, hvor utvalg 1 er prøver som har inkubert i 22 timer (blå verdier) og utvalg 2 er prøver som har inkubert i 44 timer (gule verdier). Med en p-verdi på 0,02 kommer det frem at det er en statistisk signifikant forskjell på verdiene i disse to datasettene.

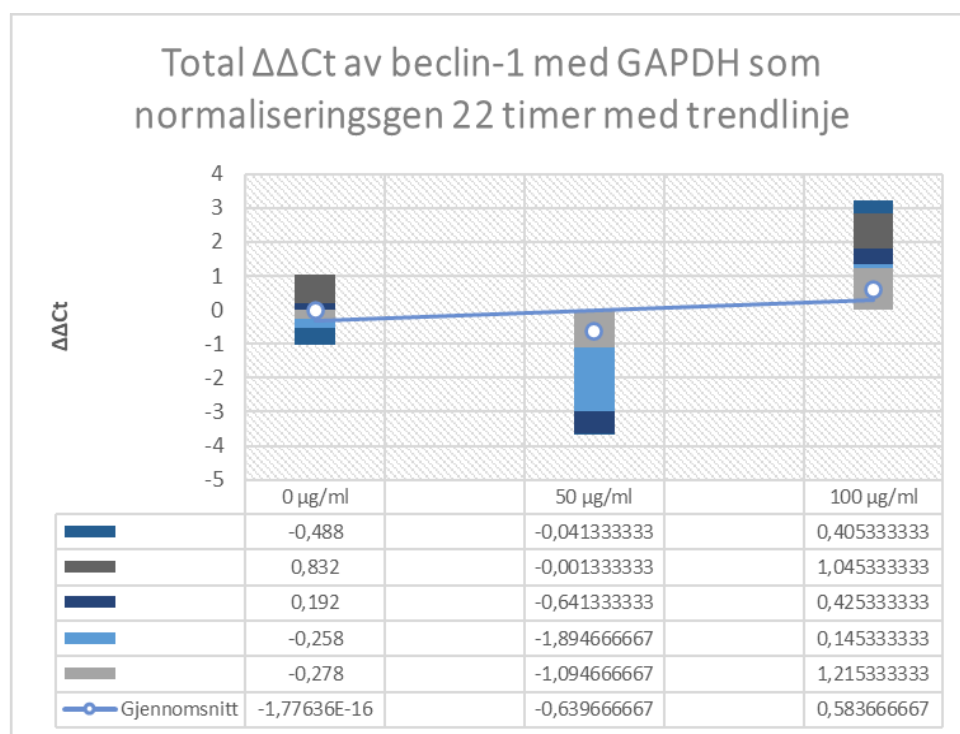
Gen	Brønn	DHA kons.	Ct	Ct	Ct	gj. Snitt	2^{-Ct}	t-Test: To utvalg med antatt like varianser			
22 t	HPRT	2,3	0	28,41	26,4	25,27	26,69	0,0000000092			
22 t	HPRT	2,6	0	25,32	26,23	24,38	25,31	0,0000000240			
22 t	HPRT	2,2	50,0	26,55	27,43	24,74	26,24	0,0000000126	HPRT		
22 t	HPRT	2,5	50	25,97	26,54	26,4	26,26	0,0000000125	Gjennomsnitt	1,5835E-08	2,327E-07
22 t	HPRT	2,1	100,0	27,21	25,77	26,55	26,51	0,0000000105	Varians	5,3736E-17	3,955E-14
22 t	HPRT	2,4	100	26,17	24,85	24,54	25,19	0,0000000262	Observasjoner	6	6
									Gruppevarians	1,9801E-14	
									Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
44 t	HPRT	1,3	0	21,32	20,7	21,62	21,21	0,0000004113	fg	10	
44 t	HPRT	1,6	0	24,25	23,92	23,75	23,97	0,0000000607	t-Stat	-2,6692126	
44 t	HPRT	1,2	50,0	21,75	22,51	21,9	22,05	0,0000002298	P(T<=t) ensidig	0,01176216	
44 t	HPRT	1,5	50	23,84	23,5	24,8	23,67	0,0000000749	T-kritisk, ensidig	1,81246112	
44 t	HPRT	1,1	100,0	21,22	20,53	20,77	20,84	0,0000005328	P(T<=t) tosidig	0,02352432	
44 t	HPRT	1,4	100	23,74	23,01	23,63	23,46	0,0000000867	T-kritisk, tosidig	2,22813885	

A.4.6 Beregning og fremstilling av grafer basert på ΔCt -, $\Delta\Delta Ct$ - og $2-\Delta\Delta Ct$ -verdier

Resultat fra qPCR-analyse er bearbejdet og presentert i form av tabeller med tilhørende stablet stolpediagram under tabell. Alle beregninger og grafiske fremstillinger er utført i Microsoft Excel.

Tabell 26: Tabell over verdier fra brett på 22 timer benyttet for å danne stablet stolpediagram. Verdiene er normalisert genuttrykk i form av $\Delta\Delta Ct$. Negative verdier indikerer nedregulering av genuttrykk og positive indikerer oppregulering. Gjennomsnittet av prøvene er benyttet til å lage trendlinje og illustreres i form av «dotter» på stolpene. Verdi med strek over illustrerer parallell for prøve 2,3 som er utelukket fra resultat. For å kunne sammenlikne stolpene ble dermed ikke første prøve for 50 eller 100 $\mu g/ml$ tatt med i beregningen. Alle prøver unntatt -1,288 er tatt med i beregning av gjennomsnitt.

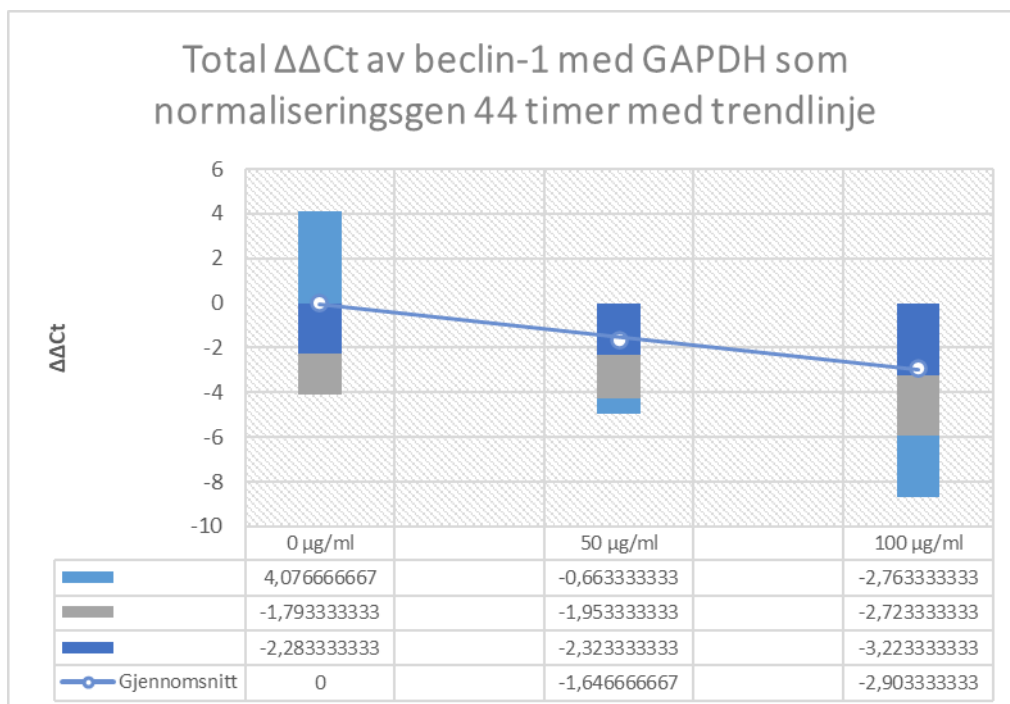
$\Delta\Delta Ct$ 22 timer							gj.snitt
0 $\mu g/ml$	-1,288	-0,278	-0,258	0,192	0,832	-0,488	-1,77636E-16
50 $\mu g/ml$	-0,1646667	-1,0946667	-1,8946667	-0,6413333	-0,0013333	-0,0413333	-0,639666667
100 $\mu g/ml$	0,26533333	1,21533333	0,14533333	0,42533333	1,04533333	0,40533333	0,583666667



Figur 32: Stablet stolpediagram av verdiene for brett på 22 timer. Verdier fra de ulike konsentrasjonene vises på x-aksen, mens $\Delta\Delta Ct$ vises på y-aksen. I første søyle, som er verdier for 0 $\mu g/ml$, er øverste mørk blå farge -0,49. I andre søyle som er verdien for 50 $\mu g/ml$ -0,04 osv. Trendlinje av gjennomsnittet viser en svak oppregulering av genuttrykket til Beclin-1. Stolpene viser i snitt 0 i $\Delta\Delta Ct$ -verdi for kontrollprøvene med 0 $\mu g/ml$, mens det ved 50 $\mu g/ml$ viser en gjennomsnittlig nedgang i $\Delta\Delta Ct$. Ved 100 $\mu g/ml$ viser det en økning av genuttrykket og kun positive $\Delta\Delta Ct$ -verdier

Tabell 27: Tabell over verdier fra brett på 44 timer benyttet for å danne stablet stolpediagram. Verdiene er normalisert genuttrykk i form av $\Delta\Delta Ct$. Negative verdier indikerer nedregulering av genuttrykk og positive indikerer oppregulering. Gjennomsnittet av prøvene er benyttet til å lage trendlinje og illustreres i form av «dotter» på stolpene. Verdier markert med grått felt er utelukket fra resultat da disse var feilmarkert og umulig å skille fra hverandre. For å kunne sammenlikne stolpene ble dermed ikke de tre siste prøvene 100 $\mu\text{g/ml}$ tatt med i beregningen. Alle prøver unntatt de som er grå ut er tatt med i beregning av gjennomsnitt.

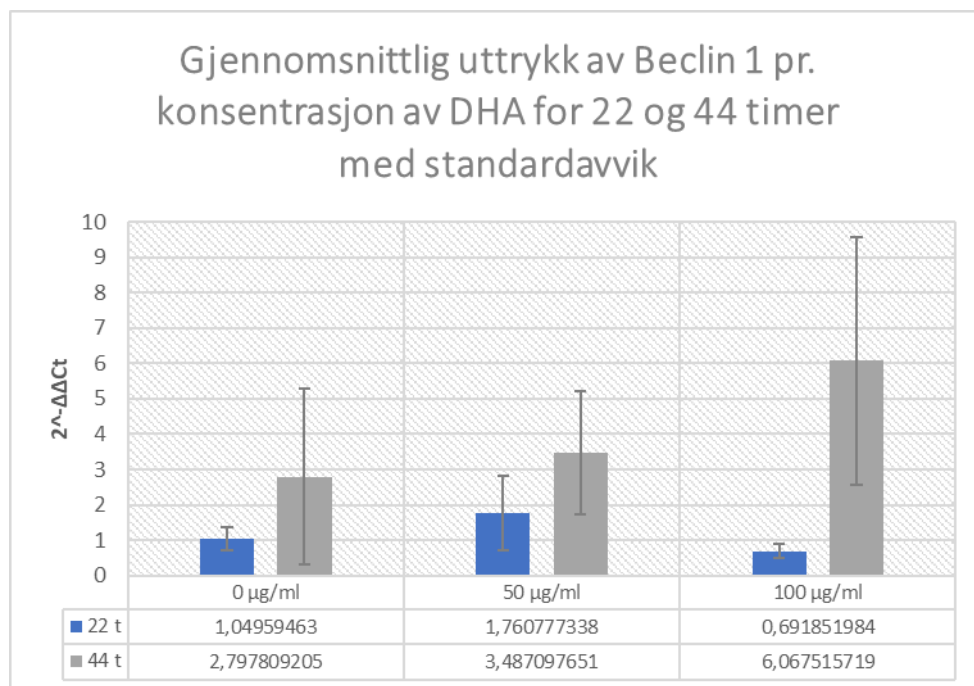
$\Delta\Delta Ct$ 44 timer							gj,snitt
0 $\mu\text{g/ml}$	-2,2833333	-1,7933333	4,07666667	-2,4266667	-2,376666667	-1,6866667	0
50 $\mu\text{g/ml}$	-2,3233333	-1,9533333	-0,6633333	-2,6366667	-1,876666667	-0,4366667	-1,6466667
100 $\mu\text{g/ml}$	-3,2233333	-2,7233333	-2,7633333	-1,58	-3,29	0,15	-2,9033333



Figur 33: Stablet stolpediagram av verdiene for brett på 44 timer. I første søyle, som er verdier for 0 $\mu\text{g/ml}$, er lys blå farge 4,08. I andre søyle som er verdien for 50 $\mu\text{g/ml}$ -0,663 osv. Verdier fra de ulike konsentrasjonene vises på x-aksen mens $\Delta\Delta Ct$ vises på y-aksen. Trendlinje av gjennomsnittet viser en nedregulering av genuttrykket til Beclin-1. Stolpene viser i snitt 0 i $\Delta\Delta Ct$ -verdi for kontrollprøvene med 0 $\mu\text{g/ml}$ mens det ved 50 og 100 $\mu\text{g/ml}$ viser en gjennomsnittlig gradvis nedgang i $\Delta\Delta Ct$ hvor alle verdiene er negative.

Tabell 28: Tabell over verdier fra brett på 22 og 44 timer benyttet for å danne stablet stolpediagram. Verdiene er lineært normalisert genuttrykk i form av $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Verdier over 1 indikerer nedregulering av genuttrykk og verdier under 1 indikerer oppregulering. Gjennomsnittet av prøvene er benyttet til å lage stolpediagram. Verdi med strek over illustrerer parallell for prøve 2,3 som er utelukket fra resultat. I tillegg er verdier markert med grått felt utelukket fra resultat, da disse var feilmarkert og umulig å skille fra hverandre. Standardavvik ble beregnet for å illustrere feilfelt i stolpediagram.

22 t	$2^{-\Delta\Delta Ct}$							gj.snitt	stdev
0 µg/ml	2,44189303	1,21251282	1,1958198	0,87539133	0,56174995	1,40249925		1,04959463	0,33196575
50 µg/ml	1,12090706	2,13563732	3,71836055	1,55977003	1,00092462	1,02906444		1,76077734	1,05216632
100 µg/ml	0,83200648	0,43067356	0,90417045	0,74466666	0,48453294	0,75506182		0,69185198	0,19115577
44 t	$2^{-\Delta\Delta Ct}$							gj.snitt	stdev
0 µg/ml	4,86801405	3,46614818	0,05926538	5,3764976	5,19335435	3,21912069		2,79780921	2,47305958
50 µg/ml	5,00487256	3,87268278	1,58373761	6,21893124	3,67225608	1,35347352		3,48709765	1,74285628
100 µg/ml	9,33942243	6,60396893	6,78963177	2,9896985	9,78112222	0,90125046		6,06751572	3,50624403



Figur 34: Stolpediagram av gjennomsnittet av verdiene for brett på 22 (blå) og 44 (grå) timer satt opp mot hverandre. Verdier fra de ulike konsentrasjonene vises på x-aksen mens $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vises på y-aksen. Standardavvik vises som feilfelt på stolpene. I og med at prøvene ikke er normalisert opp mot samme kontroll, vil de ikke kunne sammenliknes. Det viser likevel en tydelig generell oppregulering i brett på 44 timer, men desto større standardavvik kontra brett på 22 timer med nedregulering på 50 µg/ml og oppregulering på 100 µg/ml, men med mindre standardavvik på hele brettet.

A.4.7 Utførte hypotesetester vha. uavhengig t-test

Følgende viser t-tester utført i forbindelse med bearbeiding av resultat fra analyse på qPCR.

Alle beregninger er utført i Microsoft Excel.

Tabell 29: T-test med tabell over verdier for kontrollprøver (0 µg/ml DHA) fra brett på 22 timer. Parallell for prøve 2,3 med strek over er utelukket fra testen. Tosidig t-test med antatt lik varians er utført med lineære verdier $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mellom kontrollprøver for å anslå om det er signifikante forskjeller innen samme konsentrasjon mellom ulike brønner på cellebrettet. P-verdi er merket med oransje.

22t		2 ^{^-ΔΔCt}			t-Test: To utvalg med antatt like varianser		
0 µg/ml	brønn 2,3	2,44189303	1,21251282	1,1958198			
0 µg/ml	brønn 2,6	0,87539133	0,56174995	1,40249925		brønn 2,3	brønn 2,6
					Gjennomsnitt	1,20416631	0,94654684
					Varians	0,00013933	0,18051218
					Observasjoner	2	3
					Gruppevarians	0,12038789	
					Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
					fg	3	
					t-Stat	0,81335078	
					P(T<=t) ensidig	0,2377858	
					T-kritisk, ensidig	2,35336343	
					P(T<=t) tosidig	0,47557159	
					T-kritisk, tosidig	3,18244631	

Tabell 30: T-test med tabell over verdier for 50 µg/ml DHA fra brett på 22 timer. Tosidig t-test med antatt lik varians er utført med lineære verdier $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mellom prøver for å anslå om det er signifikante forskjeller innen samme konsentrasjon mellom ulike brønner på cellebrettet. P-verdi er merket med oransje.

22t		2 ^{^-ΔΔCt}			t-Test: To utvalg med antatt like varianser		
50 µg/ml	brønn 2,2	1,12090706	2,13563732	3,71836055			
50 µg/ml	brønn 2,5	1,55977003	1,00092462	1,02906444		brønn 2,2	brønn 2,5
					Gjennomsnitt	2,32496831	1,19658637
					Varians	1,71357582	0,09912474
					Observasjoner	3	3
					Gruppevarians	0,90635028	
					Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
					fg	4	
					t-Stat	1,4516226	
					P(T<=t) ensidig	0,11011999	
					T-kritisk, ensidig	2,13184679	
					P(T<=t) tosidig	0,22023999	
					T-kritisk, tosidig	2,77644511	

Tabell 31: T-test med tabell over verdier for 100 µg/ml DHA fra brett på 22 timer. Tosidig t-test med antatt lik varians er utført med lineære verdier $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mellom prøver for å anslå om det er signifikante forskjeller innen samme konsentrasjon mellom ulike brønner på cellebrettet. P-verdi er merket med mørk oransje.

22t		2 ^{^-} ΔΔCt			t-Test: To utvalg med antatt like varianser	
100 µg/ml	brønn 2,4	0,83200648	0,43067356	0,90417045		
100 µg/ml	brønn 2,1	0,74466666	0,48453294	0,75506182	brønn 2,4	brønn 2,1
					Gjennomsnitt	0,7222835 0,66142047
					Varians	0,06507917 0,02349391
					Observasjoner	3 3
					Gruppevarians	0,04428654
					Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0
					fg	4
					t-Stat	0,35421198
					P(T<=t) ensidig	0,37053187
					T-kritisk, ensidig	2,13184679
					P(T<=t) tosidig	0,74106375
					T-kritisk, tosidig	2,77644511

Tabell 32: T-test med tabell over verdier for 0, 50 og 100 µg/ml DHA fra brett på 22 timer. Tosidig t-test med antatt ulik varians er utført med lineære verdier $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mellom konsentrasjonene for å anslå om det er signifikante forskjeller på samme cellebrett. P-verdi er merket med mørk oransje. Første t-test viser 0 mot 50 µg/ml, midterste viser 0 mot 100 µg/ml og siste viser 50 mot 100 µg/ml.

22t	2 ^{^-} ΔΔCt						t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser	
0 µg/ml	2,44189303	1,21251282	1,1958198	0,87539133	0,56174995	1,40249925	0 µg/ml	50 µg/ml
50 µg/ml	1,12090706	2,13563732	3,71836055	1,55977003	1,00092462	1,02906444	Gjennomsnitt	1,04959463 1,76077734
100 µg/ml	0,83200648	0,43067356	0,90417045	0,74466666	0,48453294	0,75506182	Varians	0,11020126 1,10705397
							Observasjoner	5 6
							Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0
							fg	6
							t-Stat	-1,564838
							P(T<=t) ensidig	0,08432845
							T-kritisk, ensidig	1,94318028
							P(T<=t) tosidig	0,1686569
							T-kritisk, tosidig	2,44691185
							t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser	
							0 µg/ml	100 µg/ml
							Gjennomsnitt	1,04959463 0,69185198
							Varians	0,11020126 0,03654053
							Observasjoner	5 6
							Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0
							fg	6
							t-Stat	2,13296255
							P(T<=t) ensidig	0,03844703
							T-kritisk, ensidig	1,94318028
							P(T<=t) tosidig	0,07689407
							T-kritisk, tosidig	2,44691185
							t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser	
							50 µg/ml	100 µg/ml
							Gjennomsnitt	1,76077734 0,69185198
							Varians	1,10705397 0,03654053
							Observasjoner	6 6
							Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0
							fg	5
							t-Stat	2,44842596
							P(T<=t) ensidig	0,02902434
							T-kritisk, ensidig	2,01504837
							P(T<=t) tosidig	0,05804868
							T-kritisk, tosidig	2,57058184

Tabell 33: Tabell over verdier for kontrollprøver (0 µg/ml DHA) fra brett på 44 timer. Grunnet feilmarkering av prøver kan ikke t-test utføres da det ikke er sikkert at utvalget er korrekt. Det er derfor ingen datasett å teste brønn 1,3 mot.

44 t		2 ^{ΔΔCt}					
0 µg/ml	brønn 1,3	4,86801405	3,46614818	0,059265377			
0 µg/ml	brønn 1,6	5,3764976	5,19335435	3,21912069			
Prøver i grått skal utelukkes fra analyse da disse ikke er sikkert at tilhører den brønnen de er beskrevet som (brønn 1,6 og 1,5 ble begge benevnet som 1,5 og det er dermed ikke sikkert hva som er hva)							
T-test er dermed ikke mulig							

Tabell 34: Tabell over verdier for kontrollprøver (0 µg/ml DHA) fra brett på 44 timer. Grunnet feilmarkering av prøver kan ikke t-test utføres da det ikke er sikkert at utvalget er korrekt. Det er derfor ingen datasett å teste brønn 1,2 mot.

44 t		2 ^{ΔΔCt}					
50 µg/ml	brønn 1,2	5,00487256	3,87268278	1,583737611			
50 µg/ml	brønn 1,5	6,21893124	3,67225608	1,353473524			
Prøver i grått skal utelukkes fra analyse da disse ikke er sikkert at tilhører den brønnen de er beskrevet som (brønn 1,6 og 1,5 ble begge benevnet som 1,5 og det er dermed ikke sikkert hva som er hva)							
T-test er dermed ikke mulig							

Tabell 35: T-test med tabell over verdier for 100 µg/ml DHA fra brett på 44 timer. Tosidig t-test med antatt lik varians er utført med lineære verdier 2^{-ΔΔCt} mellom prøver for å anslå om det er signifikante forskjeller innen samme konsentrasjon mellom ulike brønner på cellebrettet. P-verdi er merket med mørk oransje.

44 t		2 ^{-ΔΔCt}			t-Test: To utvalg med antatt like varianser	
100 µg/ml	brønn 1,4	9,33942243	6,60396893	6,78963177		
100 µg/ml	brønn 1,1	2,9896985	9,78112222	0,901250463	brønn 1,4	brønn 1,1
					7,57767438	4,55735706
					2,33643482	21,5561956
					3	3
					11,9463152	
					0	
					4	
					1,07024009	
					0,1723968	
					2,13184679	
					0,34479359	
					2,77644511	

Tabell 36: T-test med tabell over verdier for 0, 50 og 100 µg/ml DHA fra brett på 44 timer. Tosidig t-test med antatt ulik varians er utført med lineære verdier $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mellom konsentrasjonene for å anslå om det er signifikante forskjeller på samme cellebrett. P-verdi er merket med mørk oransje. Første t-test viser 0 mot 50 µg/ml, midterste viser 0 mot 100 µg/ml og siste viser 50 mot 100 µg/ml.

44 t	$2^{-\Delta\Delta Ct}$							t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
0 µg/ml	4,86801405	3,46614818	0,05926538	5,3764976	5,19335435	3,21912069				
									0 µg/ml	50 µg/ml
50 µg/ml	5,00487256	3,87268278	1,58373761	6,21893124	3,67225608	1,35347352		Gjennomsnitt	2,79780921	3,48709765
								Varians	6,1160237	3,037548
100 µg/ml	9,33942243	6,60396893	6,78963177	2,9896985	9,78112222	0,90125046		Observasjoner	3	3
								Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	0
								fg	4	4
								t-Stat	-0,3946084	
								P(T<=t) ensidig	0,35663401	
								T-kritisk, ensidig	2,13184679	
								P(T<=t) tosidig	0,71326802	
								T-kritisk, tosidig	2,77644511	
								t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
									0 µg/ml	100 µg/ml
								Gjennomsnitt	2,79780921	6,06751572
								Varians	6,1160237	12,2937472
								Observasjoner	3	6
								Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	0
								fg	6	6
								t-Stat	-1,617234	
								P(T<=t) ensidig	0,07847758	
								T-kritisk, ensidig	1,94318028	
								P(T<=t) tosidig	0,15695515	
								T-kritisk, tosidig	2,44691185	
								t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
									50 µg/ml	100 µg/ml
								Gjennomsnitt	3,48709765	6,06751572
								Varians	3,037548	12,2937472
								Observasjoner	3	6
								Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	0
								fg	7	7
								t-Stat	-1,4747717	
								P(T<=t) ensidig	0,09188719	
								T-kritisk, ensidig	1,89457861	
								P(T<=t) tosidig	0,18377438	
								T-kritisk, tosidig	2,36462425	

Tabell 37: T-test med tabell over verdier for 0 µg/ml DHA fra brett på 22 timer opp mot samme konsentrasjon fra brett på 44 timer. Tosidig t-test med antatt ulik varians er utført med lineære verdier $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mellom prøver for å anslå om det er signifikante forskjeller innen samme konsentrasjon mellom ulike tidsintervall. Grå verdier er ikke inkludert i t-test grunnet feilmarkering. P-verdi er merket med mørk oransje.

22t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$						t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
0 µg/ml	2,44189303	1,21251282	1,195819797	0,87539133	0,56174995	1,40249925			
								22 t	44 t
44 t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$						Gjennomsnitt	1,04959463	3,48709765
0 µg/ml	4,86801405	3,46614818	0,059265377	5,3764976	5,19335435	3,21912069	Varians	0,11020126	3,037548
							Observasjoner	5	3
							Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
							fg	2	
							t-Stat	-2,3964485	
							P(T<=t) ensidig	0,06938967	
							T-kritisk, ensidig	2,91998558	
							P(T<=t) tosidig	0,13877933	
							T-kritisk, tosidig	4,30265273	

Tabell 38: T-test med tabell over verdier for 50 µg/ml DHA fra brett på 22 timer opp mot samme konsentrasjon fra brett på 44 timer. Tosidig t-test med antatt ulik varians er utført med lineære verdier $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mellom prøver for å anslå om det er signifikante forskjeller innen samme konsentrasjon mellom ulike tidsintervall. Grå verdier er ikke inkludert i t-test grunnet feilmarkering. P-verdi er merket med mørk oransje.

22t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$						t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
50 µg/ml	1,12090706	2,13563732	3,718360547	1,55977003	1,00092462	1,02906444			
								22 t	44 t
44 t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$						Gjennomsnitt	1,76077734	3,48709765
50 µg/ml	5,00487256	3,87268278	1,583737611	6,21893124	3,67225608	1,35347352	Varians	1,10705397	3,037548
							Observasjoner	6	3
							Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
							fg	3	
							t-Stat	-1,5778647	
							P(T<=t) ensidig	0,10635143	
							T-kritisk, ensidig	2,35336343	
							P(T<=t) tosidig	0,21270287	
							T-kritisk, tosidig	3,18244631	

Tabell 39: T-test med tabell over verdier for 100 µg/ml DHA fra brett på 22 timer opp mot samme konsentrasjon fra brett på 44 timer. Tosidig t-test med antatt ulik varians er utført med lineære verdier $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mellom prøver for å anslå om det er signifikante forskjeller innen samme konsentrasjon mellom ulike tidsintervall. P-verdi er merket med mørk oransje.

22t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$						t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
100 µg/ml	0,83200648	0,43067356	0,904170446	0,74466666	0,48453294	0,75506182			
								22 t	44 t
44 t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$						Gjennomsnitt	0,69185198	6,06751572
100 µg/ml	9,33942243	6,60396893	6,78963177	2,9896985	9,78112222	0,90125046	Varians	0,03654053	12,2937472
							Observasjoner	6	6
							Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
							fg	5	
							t-Stat	-3,7499123	
							P(T<=t) ensidig	0,00664746	
							T-kritisk, ensidig	2,01504837	
							P(T<=t) tosidig	0,01329492	
							T-kritisk, tosidig	2,57058184	

