



Høgskulen på Vestlandet

BIO160 Bacheloroppgave og Plakat Gruppe B - Bioingeniør

BIO160

Predefinert informasjon

Startdato:	24-03-2021 12:43	Termin:	2021 VÅR
Sluttdato:	26-03-2021 12:00	Vurderingsform:	Bestått/ikke bestått
Eksamensform:	Bacheloroppgave (skriftlig i gruppe)		
Flowkode:	203 BIO160 1 O 2021 VÅR		
Intern sensor:	Aluhild Alette Bjørkum		

Deltaker

Naun:	Jakob Tangen Olsen
Kandidatnr.:	234
HVL-id:	571919@hvl.no

Informasjon fra deltaker

Egenerklæring *: Ja
**Inneholder besvarelsen
konfidensielt
materiale?:** Nei
**Jeg bekrefter at jeg har
registrert
oppgavetittelen på
norsk og engelsk i
StudentWeb og vet at
denne vil stå på
vitnemålet mitt *:** Ja

Gruppe

Gruppenavn: B6
Gruppenummer: 6
**Andre medlemmer i
gruppen:** Nasra Mohamed Omar, Hannah Emilie Torp Huesser

Jeg godkjenner autalen om publisering av bacheloroppgaven min *

Ja

Er bacheloroppgaven skrevet som del av et større forskningsprosjekt ved HVL? *

Nei

Er bacheloroppgaven skrevet ved bedrift/virksomhet i næringsliv eller offentlig sektor? *

Nei



BACHELOROPPGAVE

Proteinmarkører i humant serum etter simulert nattskift,
undersøkt med nyere proteomiske metoder

Protein markers in human serum after simulated
nightshift, investigated with newer proteomic methods

Hannah Hvesser

Jakob Tangen Olsen

Nasra Omar

Bioingeniørutdanningen

Institutt for bio- og kjemiingeniørfag

Veiledere: Alvhild Alette Bjørkum og Even Birkeland

26.03.2021

Sammendrag

I et pågående forskningsprosjekt ledet av dr. sci. Alvhild Alette Bjørkum, studeres cellulære effekter i humant blodserum etter bl.a. søvnmangel ved nattskiftarbeid, med proteomiske- og systembiologiske metoder. Forskningsgruppen har detektert endringer i 34 proteiner i humant blodserum etter en 6-timers simulert søvndeprivasjonsnatt (SD-natt) (Bjørkum et al., 2020, submitted). Også i et tidligere bachelorprosjekt ved HVL med noe annen proteomisk metodikk enn i Bjørkum et al. 2020, ble det identifisert signifikante endringer i 11 proteiner i humant blodserum, etter en simulert SD-natt (Bergesen et al., 2019). Forandringer kvantitativt og kvalitativt i proteiner i kroppsvæsker, celler og vev forårsaket av cellulært stress etter nattskiftarbeid kan assosieres og trolig bl.a. relateres til nedsatt immunforsvar og sykdommer assosiert med nattarbeid over tid (Amlaner et al., 2009; Ma et al, 2018; O'Callaghan et al. 2019; Pinotti et al., 2010). I tillegg, i en tidligere genekspressjonsstudie i humane blodgener involvert i immunsystemet, ble stressrespons og DNA-skadereparasjon uttrykt differensielt (mange nedregulerte) etter 60 timers langvarig våkenhet = SD (Pellegrino et al., 2012).

I vårt bachelorprosjekt var hensikten å identifisere nye, og evt. re-verifisere, signifikant relativt endrede proteiner som kan egne seg som proteinmarkører for cellostress ved nattskiftarbeid. Også ulike bioteknologisk -og molekylærbiologisk assosierte programvarer i kombinasjon med bioinformatiske- og systembiologiske databaser ble benyttet på våre proteomiske data i denne studien av differensielt uttrykte proteiner i humant blodserum, etter 6 timers søvndeprivasjon i en simulert nattskiftnatt. Blodserum fra tidligere bachelorprosjektet ble analysert. Forsøkspersonene sov fra 22:00 til 07:00 neste morgen for kontrollnatten, og for søvndeprivasjonsnatten var de våkne fra 22:00 til 04:00 om morgenen. Prøvetaking med veneblod ble tatt 4:00 fra alle deltakerne (Bergesen et al., 2019), og blodserum fra prøvetakingen ble analysert med en nyere metode på et massespektrometer ved The Proteomics Unit at the University of Bergen (PROBE). Etter kjøring på det nye massespektrometeret og med nyere Tandem Mass Tag (TMT)-merkings metode, ble det identifisert kvantitative signifikante endringer i totalt 63 proteiner, der 25 av disse var oppregulert, og 38 var nedregulert. De 63 signifikant endrede proteinene deltok i totalt 31 molekylære funksjoner, og 229 biologiske prosesser. Proteinendringene etter 6 t søvnmangel på natt kunne knyttes til ulike patologiske tilstander, slik som hjerte- og karsykdommer, Alzheimers, og ulike typer kreft, slik som prostata- og brystkreft. De respektivt opp- og

nedregulerte proteinene er representert i distinkte/bestemte biologiske prosesser og fører slik til endring i disse, som f.eks. immunrelaterte prosesser, koagulasjonsprosesser og metabolisme.

Nøkkelord: Søvn, søvndeprivasjon, blodserum, proteomikk, patologiske tilstander, og kreft.

Abstract

In an ongoing research project led by dr. sci. Alvhild Alette Bjørkum cellular effects are studied in human serum after lack of sleep as during night shift work, using proteomics- and systems biological methods. The research group has detected changes in 34 proteins in human blood after a 6-hour simulated sleep deprivation night (SD night) (Bjørkum et al. 2020, submitted). Likewise, in a previous bachelor project at HVL with a somewhat different proteomic methodology than in Bjørkum et al. 2020, significant changes in 11 proteins in human blood serum were identified, after a simulated SD night (Bergesen et al., 2019). Changes quantitatively and qualitatively in proteins in body fluids, cells and tissues caused by cellular stress after night shift work can be associated and probably related to e.g. impaired immune system and diseases associated with night shift work over a certain period of time (Amlaner et al., 2009; Ma et al, 2018; O'Callaghan et al. 2019; Pinotti et al., 2010). In addition, in one earlier gene expression study in human blood genes involved in the immune system, stress response and DNA damage repair was differentially expressed (many downregulated) after 60 h prolonged wakefulness = SD (Pellegrino et al., 2012).

In our bachelor project, the purpose was to identify new, and possibly re-verify, significantly altered proteins that can be used as protein markers for cell stress during night shift work. Also, various biotechnology and molecular biology associated software in combination with bioinformatics and systems biology databases have been used on our proteomic data in this study of differentially expressed proteins in human blood serum after 6 hour sleep deprivation, in a simulated night shift night. Blood serum from a previous bachelor project was analysed. Study participants slept from 22:00 until 7:00 next morning in the control condition, during sleep deprivation they were awake from 22:00 until 4:00 in the morning. Venous blood was carefully sampled at 4:00 from all participants (Bergesen et al., 2019), and blood serum from the sampling was analysed with a newer method on a mass spectrometer at The Proteomics Unit at the University of Bergen (PROBE). After running the samples on the

new mass spectrometer and with the newer Tandem Mass Tag (TMT) labelling method, quantitative significant changes were identified in a total of 63 proteins, of which 25 were upregulated and 38 were downregulated. The 63 significantly altered proteins participated in a total of 31 molecular functions and 229 biological processes. The protein changes indicated that 6 hours of sleep deprivation at night could be linked to various pathological conditions, such as cardiovascular disease, Alzheimer's, and various types of cancer, such as prostate- and breast cancer. The respective up and down-regulated proteins are represented in distinct/specific biological processes and thus lead to changes in these, such as e.g. immune-related processes, coagulation processes and metabolism.

Keywords: Sleep, sleep deprivation, blood serum, proteomics, pathological conditions, and cancer.

Forord

Denne bacheloroppgaven er et avsluttende prosjekt ved bioingeniørutdanningen ved Høgskulen på Vestlandet (HVL), våren 2021. Prosjektet har dreid seg om å finne og identifisere signifikant endrede proteiner med nyere proteomiske metoder i humant blodserum, etter cellulært stress ved en simulert søvndeprivasjonsnattskiftnatt (SD-natt). Arbeidet ble utført vha. systembiologiske programvarer og metoder med databaser for identifisering av proteiner, og prosesser disse proteinene involveres i. Det ble detektert kvantitative proteinendringer i blodserum (opp- eller nedregulert etter en 6 timers SD-natt sammenlignet med kontrollnatt) som kunne påvirke aktuelle prosesser.

Prosjektet har vært noe utfordrende grunnet vanskeligheter med å møte gruppen fysisk på skolen grunnet COVID-19. Gruppen har håndtert dette bra, med god gruppedynamikk og kommunikasjon hele veien gjennom hyppige digitale møter. Utfordringene har forberedt oss på fremtidig arbeidsliv, der krevende situasjoner gjerne er en del av hverdagen. Gjennom prosjektarbeidet har vi tilegnet oss nyttige kunnskaper innenfor prosjektarbeid, gruppeprosess, proteomikk, søvn og skiftarbeid.

Vi vil først og fremst takke veilederen vår, dr. sci. Alvhild Alette Bjørkum, for meget god veiledning gjennom hele prosjektperioden. Din iver, kunnskap og ditt engasjement rundt vår oppgave har gjort prosjektperioden veldig spennende og lærerik. Vi takker for gode tilbakemeldinger, konstruktiv kritikk, og for høy tilgjengelighet. Videre vil vi gi en stor takk til vår biveileder, dr. sci. Even Birkeland, for å ha gjennomført analyseringen av serumprøvene ved PROBE, og for å veilede oss gjennom bruk av ulike web-verktøy og bruk av databaser. Takk for at du har delt dine kunnskaper og for å ha fulgt med oss i prosessen. Til slutt vil vi takke vår prosessveileder, lektor Turid Aarhus Braseth, for å ha hjulpet oss på veien med gruppeprosessen, med gode samtaler og refleksjoner, der du har delt nyttige verktøy som vi som bachelorgruppe har hatt god nytte av.

Bergen 26.03.21

Innhold

Sammendrag	1
Abstract	2
Forord	4
1. Innledning	8
1.1 Søvn.....	10
1.1.1 Hva kjennetegner søvn?.....	10
1.1.2 Søvnstadier	10
1.1.3 Døgnrytme	13
1.1.4 Søvnmangel	14
1.2 Protein og proteinsyntese	16
1.3. Cellulær stressrespons og proteinendringer	18
2. Material og metode	21
2.1 Måleprinsipp	21
2.1.1 Proteomikk.....	21
2.1.2 Massespektrometri.....	22
2.1.3 Tandem Mass Tag (TMT) markering	23
2.1.4 Bioinformatikk.....	25
2.2 Søvndeprivasjonsforsøket	26
2.2.1 Praktiske forhold i forsøket	26
2.2.2 Prøvemateriale	27
2.2.2.1 Prosedyre for håndtering av prøvematerialet.....	27
2.3 Analysering av proteinprøvene	27
2.3.1 Fortynning	27
2.3.2 BCA protein assay	28

2.3.3 Trypsinering.....	29
2.3.4 C18 cleanup	29
2.3.5 Fraksjonering	30
2.3.6 HPLC og massespektrometrisk analyse med Orbitrap Q Exactive	31
2.3.7 Søking av rådata og normalisering.	32
3. Resultat.....	33
3.1 Korrelasjonsanalyse	33
3.2 Signifikant endrede proteiner etter 6-timers søvndeprivasjon	35
3.2.1 Signifikant oppregulerte og nedregulerte protein etter søvndeprivasjon.....	36
3.3. Protein-Protein interaksjon (STRING) mellom endrede proteiner etter søvndeprivasjon	38
3.3.1. Protein-Protein interaksjon (STRING) for oppregulerte protein etter søvndeprivasjon	38
3.3.2. Protein-Protein interaksjon (STRING) for nedregulerte protein etter søvndeprivasjon	40
3.3.3 Molekylære funksjoner og biologiske prosesser fra STRING for endrede protein etter søvndeprivasjon	41
3.4. Funksjonell gen-anrikningsanalyse (GSEA) i databasen WebGestalt.....	43
3.4.1 Funksjonell anrikningsanalyse i OMIM sykdomsdatabase	44
3.4.2 Funksjonell anrikningsanalyse i KEGG 2019 biologisk signalvei database	45
4. Diskusjon.....	46
4.1 Dataanalyse og statistikk.....	46
4.2 Søvndeprivasjon påvirker uttrykket av kreftrelaterte proteiner	47
4.3 Plate- og koagulasjonsprosesser påvirkes av søvndeprivasjon.....	48
4.4 Immunrelaterte prosesser forstyrres etter søvndeprivasjon	49
4.5 Søvndeprivasjon endrer uttrykket av proteiner relatert til metabolske sykdommer	50
4.6 Samlet vurdering	51

5. Konklusjon	52
6. Referanseliste	53
7. Ordliste	61
8. Vedlegg	63

1. Innledning

Denne oppgaven bygger videre på et pågående forskningsarbeid der det blir undersøkt cellulære effekter ved stresseksposering, som bl.a. søvnmangel ved simulert skiftarbeid. Andre ulike fenotyper av stress som kan gi cellulært stress, og som undersøkes og har vært undersøkt i forskningsgruppen, er bl.a. ved magnetfelt- og radiobølge-eksponering som barn utsettes for ved MR-undersøkelser, og hyperbar trykk-eksponering som ved dykking (Bjørkum et al., 2017). Forskningsarbeidet går ut på måle endret uttrykk av proteiner i kroppsvæsker (serum og spytt) vha. proteomiske analysemetoder, og studere hvilke cellulære prosesser og signalveier disse endrede proteinene deltar i, ved hjelp av systembiologiske metoder og databaser. Med proteomiske metoder og slike systembiologiske verktøy søker en å identifisere og kartlegge endring i så mange proteiner som mulig, som igjen kan peke mot endrede cellulære prosesser og signalveier, som igjen på sikt mulig kan lede til sykdom. Det finnes per i dag ingen gunstige måter å vurdere grad av søvntap hos mennesker, og hensikten med prosjektet er å finne ut om det finnes proteiner, evt. hvilke proteiner, som kan være aktuelle som biomarkører/proteinmarkører og gi en proteinprofil for søvnmangel. Søvndeprivasjon har det siste tiåret i økende grad blitt studert med -omics metoder/discovery-based methods, for å kartlegge endringer i cellulære og molekylære nettverk, mekanismer og signalveier i modelldyr, så vel som hos menneske (O’Callaghan et al. 2019, Ma et al. 2018)

Det har tidligere blitt detektert signifikante endringer i 34 proteiner i humant serum i blod, etter en simulert nattskift-natt, der 14 av proteinene ble oppregulert, og 20 nedregulert (Bjørkum et al., 2020, submitted). Forskningsgruppen viste også at 16 av de 34 proteinene ble signifikant endret hos alle forsøkspersonene, og at disse kan knyttes til cellulære funksjoner som er assosiert med patologiske tilstander. Bjørkums forskningsgruppe og tidligere bachelorstudenter ved HVL har også med enkeltanalytt-metoder og modifiserte proteomiske metoder, med og uten fraksjonering av serum, funnet signifikante endringer i flere proteiner, etter en simulert nattskiftnatt (Alsvåg og Stange 2003, Ingebriksen et al. 2004, Holm et al. 2005, Gulbrandsøy og Rødset 2016, Bergesen et al., 2019). Også endringer i bestemte salivære proteiner etter tilsvarende søvnmangel er rapportert fra samme gruppe (Padøy et al. 2007, Myrmel et al. 2008 og Meling et al. 2017).

Søvnmangel ved nattskiftarbeid kan knyttes opp til flere patologiske tilstander, slik som nedsatt immunforsvar, kreft og hjerte-karfunksjoner, bl.a. relatert til koagulasjons- og plateprosesser (Bjørkum et al., 2020 submitted), og også forstyrrelser i tarmsystemet og i hjerte-karsykdommer (Bjorvatn, 2019). Nattskiftarbeid øker søvnbehov og mentale endringer, som ustabilitet og irritabilitet, og nedsatt konsentrasjonsevne, samt nedsatt arbeidsytelse. Studier viser også at søvnmangel kan føre til økt antall arbeidsulykker, både med økning i fare for å skade seg selv, men også pasienter/andre (Bjørkum et al, 2004, Vedaa et al., 2020).

Det finnes flere ulike proteomiske analysemetoder/massespektrometriske (MS) metoder, og ulike merkemetoder. I denne oppgaven kombineres MS-analyser med en merkemetode som kalles TMT, noe som er nytt i forhold til tidligere proteomiske studier i forskningsgruppen. Tandem Mass Tag (TMT) er en kjemisk reagens-metode der det kan merkes opp mot 16 ulike serumprotein-prøver på samme tid, og dette gjør at det relative proteinuttrykket kan måles, som skjer i massespektrometri-kjøring med enkeltprøve mot enkeltprøve (dvs. endring i proteinuttrykket mellom kontroll og søvnmangel) (Kingsmore, 2006). Metoden kan gi ny kunnskap innenfor feltet, fordi den har høyere effektivitet, prøvegjennomstrømming og økt deteksjonsfølsomhet for bl.a. hydrofile proteiner (Tsai et al., 2019).

Vårt prosjekt går ut på å identifisere flere endrede proteiner, og eventuelt re-verifisere tidligere proteiner i humant blodserum, som er signifikant endret etter en simulert nattskiftnatt, med nyere proteomiske metoder (massespektrometri). Vi har kjørt prøver på et nytt massespektrometer på PROBE (Orbitrap Eclipse), og benyttet en nyere protein-merkemetode, TMT-metode. Vår problemstilling søker å kartlegge hvilke proteiner som endrer seg i humant serum etter 6-timers søvndeprivasjon, analysert med nyere kombinerte proteomiske metoder, dvs. TMT-merkemetode og massespektrometri. Vårt hovedspørsmål er: Hvilke proteiner endres kvantitativt etter denne simulerte nattskiftnatten på 6 timer, og hva kan disse endringene reflektere av cellulært endrede prosesser og mekanismer etter en slik akutt og kortvarig søvnmangel? Kanskje kan slike endrede cellulære prosesser og mekanismer reflektert i endret proteinuttrykk øke forståelsen av den cellulære bakgrunnen til endrede fysiologiske mekanismer og prosesser, samt øke forståelsen for den cellulære bakgrunnen for, og årsakssammenhenger til patologiske tilstander ved søvnmangel, både på kort og lang sikt.

1.1 Søvn

1.1.1 Hva kjennetegner søvn?

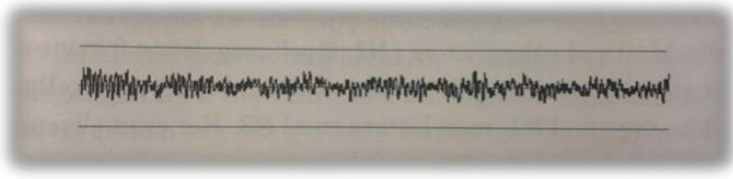
Søvn er en hviletilstand der kroppen er avslappet og reagerer mindre på sanseinntrykk. Det som kjennetegner søvn, er muskelavspenning/lavere/svakere muskeltonus, og nedsatt reaksjon på informasjon fra omgivelsene. En sovende person lar seg vekke dersom påvirkningen fra omgivelsene er sterk nok, eller at påvirkningen er ulik det den pleier å være. En bevisstløs person lar seg derimot ikke vekke uansett hvor sterk påvirkningen er.

Hjernen fungerer annerledes under søvn enn i våken tilstand, og dette kan man registrere med elektroencefalografi, EEG, som måler hjernebølgene (Ursin, 1996). EEG er en del av polysomnografi, som er den klassiske objektive metoden for søvnregistrering. Det blir plassert elektroder i hodebunnen og andre steder ellers på kroppen. Enkelte av elektrodene gjør det mulig å registrere hjernes aktivitet (EEG) under alle bevissthetstilstander i søvn og våkenhet, og andre elektroder registrerer muskelspenningen (elektromyografi, EMG) og øyebevegelser (elektro-okulografi, EOG) (Bjorvatn, 2019). Hjernens aktivitet kan tolkes og klassifiseres i søvnstadier, ved å studere bølgelengden og amplitude i elektroencefalogrammene (Ursin, 1996). Under søvn er amplitude aktiviteten i EEG høyere, og hjernebølgene som måles i frekvensene er mer langsomme enn ved våkenheten. Dette forårsakes av at mange nerveceller utlader seg, eller er aktive synkront under søvn, ettersom spenningene adderer seg og bølgene blir høye (Ursin, 1996). Søvn har betydning for alle kroppens celler og organer, og god søvn både kvantitativt og kvalitativt, på riktig tid av døgnet, er avgjørende for å kunne fungere optimalt, både når det gjelder konsentrasjonsevnen, hukommelsen, humøret og ikke minst mental og psykiske tilstand (Bjorvatn, 2019).

1.1.2 Søvnstadier

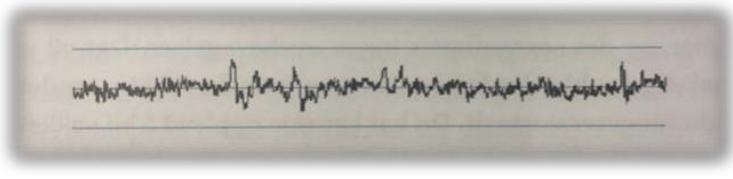
Ved hjelp av polysomnografi deles søvnen inn i fire ulike søvnstadier; N1, N2, N3 og REM. Stadiene skilles fra hverandre ved å registrere hjerneaktivitet, muskelspenninger og øyebevegelser (Bjorvatn, 2019). Ved våkenhet er hjernebølgene raske i frekvens og har lav høyde (amplitude). Muskelspenningene i kroppen er varierende, men den er som oftest høy under våkenhet. Så lenge øynene er åpne, sees øyebevegelser. Dersom en lukker øynene i

våken tilstand, endres hjernebølgene litt, men frekvensen er fremdeles rask og amplituden (høyden på hjernebølgene) er lav (Bjorvatn, 2019). Figur 1



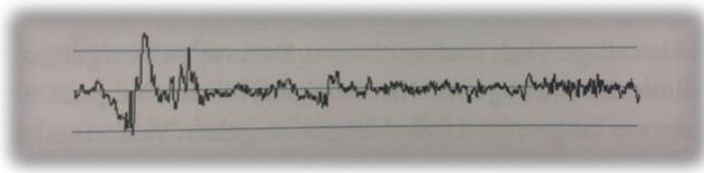
Figur 1: Hjernebølger i våken tilstand. Figuren illustrerer typiske hjernebølger under våkenhet (Bjorvatn, 2019)

N1; som tidligere ble kalt for søvnstadium 1, er overgangsfasen mellom søvn og våkenhet. Hjernebølgene blir langsommere, og det kan sees langsomme, rullende øyebevegelser på utskriften fra den polysomnografiske undersøkelsen. Ved dette søvnstadiet er vekketerskelen lav; dvs. at det er lett for å vekkes. Når man sover normalt befinner man seg i dette stadiet i mindre enn 5 % av tiden man sover. Personer som blir har søvnlidelser viser ofte en økning i mengden av N1, på bekostning av andre søvnstadier (Bjorvatn, 2019). Figur 2



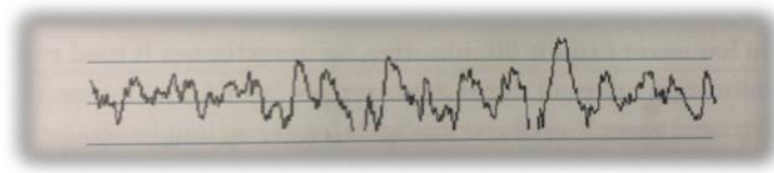
Figur 2: Hjernebølger i N1. Figuren viser normale hjernebølger i N1 (Bjorvatn, 2019)

N2; som tidligere ble kalt for søvnstadium 2, er det vanligste søvnstadiet, og omfatter rundt halvparten av den totale søvnmengden. N2 blir gjerne kalt for lett søvn, og i dette stadiet er hjernebølgene langsommere i frekvens, og høyere i amplitude, enn under våkenhet. Innimellom kan man registrere karakteristiske søvnspindler, som er raske (økt frekvens), kraftige svingninger. Slike søvnspindler som K-komplekser er store, langsomme svingninger (høyere amplitude og lavere frekvens). Muskelspenningen varierer, men den er ofte redusert ift. ved våkenhet og i N1. Ved dette N2-stadiet forsvinner øyebevegelsene, og vekketerskelen er middels; dvs. at det er vanskeligere å bli vekket enn i N1, men lettere enn i N3 (Bjorvatn, 2019). Figur 3



Figur 3: Hjernebølger i N2. Figuren illustrerer typiske hjernebølger i N2 (Bjorvatn, 2019)

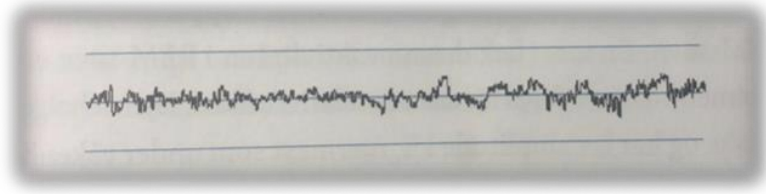
N3, som tidligere ble inndelt i søvnstadium 3 og 4, omfatter dyp søvn (deltasøvn). EEG domineres da av langsomme hjernebølger med høy amplitude. Dyp søvn regnes for å være den viktigste søvnen for å bli uthvilt og fungere bra neste dag. Deltabølger må ses i minimum 20 % av tiden for at søvnen skal regnes som dyp søvn (N3). Muskelspenningen er redusert i de tidligere søvnstadiene, og det er ingen øyebevegelser. I dette søvnstadiet er det vanskelig å bli vekket, og dersom en blir vekket vil det ta tid før en fungerer som normalt. Under dyp søvn skiller kroppen ut veksthormoner, og av den grunn har denne søvnen spesiell betydning for normal vekst og utvikling. Det er ved de første 3-4 timene av søvnperioden N3 kan ses, uavhengig av når en legger seg. Rundt 20-25% av den totale søvnlengden er dyp søvn, og når en er i underskudd på søvn; øker denne andelen. Mengden dyp søvn reduseres gradvis med alderen og eldre mennesker har ingen tilstedeværelse av dette søvnstadiet. Reduksjonen i dyp søvn med årene er uunngåelig, ettersom det er en del av den normale aldringsprosessen (Bjorvatn, 2019). Figur 3



Figur 4: Hjernebølger i N3. Figuren viser hjernebølgene ut i dyp søvn (Bjorvatn, 2019)

REM er en forkortelse for rapid eye movements og kjennetegnes blant annet av hurtige øyebevegelser. Stadiet utgjør omtrent like stor del av søvnperioden som dyp søvn; ca. 20-25%. Hjernebølgene under REM er relativt raske og har lav amplitude. De likner på N1, noe som kan tyde på at hjernen er ganske våken under REM-søvn. I dette stadiet er muskelspenningen på sitt laveste sammenliknet med de andre søvnstadiene, og også lavere enn ved dyp søvn. Ofte ses lange perioder med nærmest total muskelavspenning/svært lav muskeltonus/spenning, og vekketerskelen er på nivå med N2. Den første fasen ved REM-søvn kommer vanligvis etter rundt 90 minutter inn i søvnen, og deretter ses REM rundt 90-

minutters intervall i løpet av natten. REM-søvnen blir også kalt for drømmesøvn, fordi de fleste drømmene forekommer i denne søvnfasen. Vi drømmer i alle stadier, men har mest livlige, eller såkalte «vivid»-drømmer, i REM-søvn (Bjorvatn, 2019). Figur 5



Figur 5: Hjernebølgen i REM. Figuren illustrerer hvordan hjernebølgen ser ut i REM (Bjorvatn, 2019)

1.1.3 Døgnrytme

Søvn lengden og søvndybden reguleres av ulike faktorer, bl.a. av homeostatisk faktor (søvnbehovet), cirkadian faktor (døgnrytmen), og ulike atferdsfaktorer som stimulerer hjernen til å holde seg våken (Bjorvatn, 2013). Ved hovedsak er det den cirkadiane faktoren som både angir lengden på søvnen og avgjør hvor trøtt en føler seg ved leggetid.

Alle cellene i kroppen har såkalte klokkegener, og hoved ansamlingen av nerveceller som styrer den cirkadiane faktoren ligger dypt inne i hypothalamus i hjernen i et område som kalles nucleus suprachiasmaticus (SCN) (Heier, 2011). SCN er forbundet gjennom nervene til netthinnen i øyet, og når øyet eksponeres for lys, vil aktiviteten i SCN øke. Dette fører til at en blir mer våken (Heier, 2011), og lyset er dermed den viktigste faktor for regulering av døgnrytmen. Den andre viktige faktoren for døgnrytmeregulering er tidspunkt for matinntak og måltider.

Økt aktivitet i SCN fører også til dempet aktivitet for en annen gruppe celler i en liten kjertel i hjernen som kalles epifysen. I epifysen foregår produksjon av et hormon som kalles melatonin, som har som funksjon å fremme tretthetsfølelse (Heier et al, 2011). Ved økt aktivitet i SCN vil aktiviteten med melatoninreseptorene dempes, som igjen fører til at melatoninproduksjonen dempes og en vil oppleve å bli mer våken (Bjorvatn, 2013).

Utskillelsen av melatonin stiger fra begynnelsen på natten og er høyest ved et tidspunkt i døgnrytmen som kalles nadir. Nadir inntreffer to til tre timer før en våkner om morgenen, omtrent kl. 5 om natten. Ved denne tiden vil kroppstemperaturen og aktiveringsgraden nå sitt

laveste punkt, som betyr at en er på sitt trøtteste. Nattskiftarbeidere opplever derfor ofte å være svært trøtte rundt kl. 5 om natten, men at de blir mer våkne videre utover morgenen (Bjorvatn, 2013). Siden en opplever å være på sitt trøtteste ved nadir, er dette tidspunktet det er vanligst at ulykker inntreffer på arbeidsplasser med nattskiftarbeid.

Den homeostatiske faktoren spiller en viktig rolle for søvnens dyphetsgrad; jo lengre en er i våken tilstand- jo større blir søvnbehovet, og jo dypere blir søvnen (Heier et al, 2011). Ved å holde seg våken kan en bygge opp den homeostatiske faktoren, slik at deltabølgene blir langsommere og søvnen blir dypere (Bjorvatn, 2013). Dette forutsetter at en legger seg til et tidspunkt som gjør det lettere for kroppen å sovne, mtp. den indre biologiske klokken. Hvis en legger seg tidlig om morgenen når det ellers er naturlig å våkne, vil en gjerne oppleve at søvnen ikke blir sammenhengende. Den vil heller være kort og overfladisk (Bjorvatn, 2013), selv om den homeostatiske faktoren er bygget opp. Nattskiftarbeidere som legger seg kl. 8 sover dermed ofte mellom fem og seks timer; de legger seg på en tid av døgnet det ellers er naturlig å være våken, med fullt dagslys og med mye støy rundt seg (Bjorvatn, 2013).

Andre relevante faktorer som påvirker søvnreguleringen, er ulike atferdsfaktorer. Hjernen er avhengig av å bli stimulert for at en skal holde seg våken, selv om den cirkadiane- og den homeostatiske faktoren tilsier at en skal være i våken tilstand. Dette skjer gjennom f.eks. sosiale faktorer der en kommuniserer med andre, eller andre atferdsfaktorer som å kjøre bil, høre på musikk, drikke koffeinholdige drikker, og trening. Ved mangel på stimuli vil hjernen slite med å opprettholde en våken tilstand, og dette forklarer hvorfor en kan sovne under f.eks. et langvarig møte (Bjorvatn, 2013).

1.1.4 Søvnmangel

Søvndeprivasjon betyr påført søvnmangel (Heier et al, 2011), og kan deles inn i kroniske og akutte tilstander, der kroniske tilstander er søvndeprivasjon med varighet i mindre enn fire uker, og kroniske tilstander er med varighet i mer enn fire uker. Forsøk med søvndeprivasjon hos mennesker har resultert i små fysiske endringer; etter åtte døgn uten søvn har det blitt påvist lett nystagmus (raske, rykkvise øyebevegelser), hender som skjelver, øyelokk som henger, en får utydelig uttale, og hodet kjennes «tungt» å holde oppe. Søvndeprivasjon hos rotter som forsøksdyr har derimot påvist store endringer i livsviktige funksjoner; slik som i

hormonproduksjon, stoffskifte og i hjerteaksjon. Likevel har forskjellene mellom mennesker og dyr i disse forsøkene vært så store at det ikke kan trekkes konklusjoner fra forsøkene med dyr til effekten søvndeprivasjon har på mennesker (Heier et al, 2011).

De fysiske forandringene hos mennesker etter søvndeprivasjon er beskjedne, men de mentale forandringene er mer markante. Etter at et menneske utsettes for søvndeprivasjon i ca. 3 døgn vil en kjenne seg søvngig og trøtt, og en kan kjenne seg humørsyk, irritert og vanskeligheter med å konsentrere seg (Heier, 2011). Dersom søvndeprivasjonen går over en lengre periode (over 4 døgn), kan de mentale forandringene bli større, som f.eks. hallusinerer og paranoia (Heier et al, 2011).

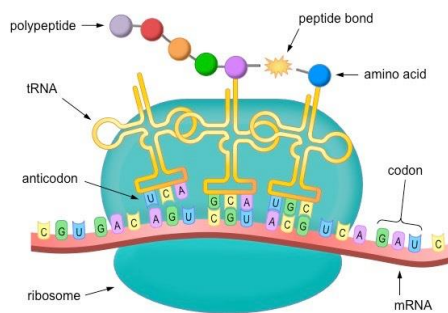
Søvnapné er en lidelse der søvnen er forstyrret av oppvåkninger gjennom natten, og regnes dermed som en type søvndeprivasjon. Lidelsen forbindes med hyppige pustestopp, ofte grunnet tørrhet i munnen og hodepine. Søvnapné deles inn i sentral (CSA) og perifer/obstruktiv (OSA). Ved CSA vil tidsrommene med pustestopp skje uten at en forsøker å trekke pusten, og det forårsakes vanligvis av områdene i sentralnervesystemet (CNS) som regulerer rytmen på pustingene (Lehmann, 2018). Dette kan f.eks. skyldes sykdom i hjernen, men søvnapné av denne typen er veldig sjelden. OSA er langt mer hyppig enn CSA, og i Norge har 1 av 6 voksne denne forekomsten. Disse er ofte snorkere, og det kommer av at bløtvevet blokkerer de øvre luftveiene hele veien ned til lungene, og luftveiene blir helt stengt i minst 10 sekunder (Lehmann, 2018). Noen pasienter med søvnapné har ingen tilstedeværelse av dyp søvn, og pasienter med denne tilstanden er i økt risiko for å involveres i f.eks. trafikkulykker eller arbeidsulykker. For å behandle denne tilstanden anbefales det å henvises til spesialister innen området, f.eks. leger innenfor øre-nese-hals, lunge, søvnspesialister, eller nevrologer (Bjørvatn, 2013).

Søvndeprivasjon hos nattskiftarbeidere er en av flere årsaker til at oppmerksomheten reduseres og at arbeidsytelsen blir dårligere, og forskning tyder på at risikoen for arbeidsulykker blir større ved nattskiftarbeid (Bjørkum, 2004). Årsaken er at bl.a. at graden av konsentrasjon, produktivitet og sikkerhet blir dårligere, grunnet faktorer som redusert immunforsvar, dårlig søvnkvalitet, mangel på dyp søvn, og at søvnen blir forskjøvet ift. døgnrytmen.

1.2 Protein og proteinsyntese

Proteiner er organiske molekyl bygget opp av kjeder av aminosyrer, som gir celler form, struktur, og er avgjørende for deres funksjon (Alberts et al., 2014).

Proteinsyntesen er prosessen som danner nye protein, fra Deoksyribonukleinsyre (DNA) i cellekjernen, til ferdig produsert protein i cytosol. DNA i cellekjernen og respektive gener inneholder koder for spesifikke protein. Via transkripsjon vil en del av DNA-tråden i et gen kopieres med RNA polymerase, og danne pre-messenger-ribonukleinsyre (Pre-mRNA), som inneholder både intron- og ekson ribonukleotidsekvenser. Ved hjelp av pre-mRNA prosessering fjerner enzymer intronene i pre-mRNA og danner ferdig mRNA som kun består av ekson, med mRNA-sekvens som koder for protein. mRNA transporteres så via kjerneporer ut i cytosol, og mRNA-tråden binder seg til et ribosom som syntetiserer protein (Gråbøl-Undersrud, 2020).

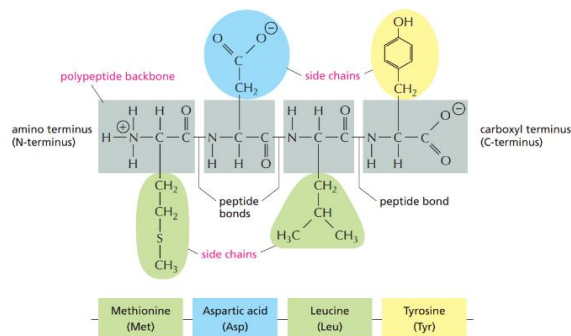


Figur 6. Translasjon i ribosomet. En trio av ribonukleotider i mRNA kalles et kodon og koder for en bestemt aminosyre. Ribosomer holder tRNA-molekyl med antikodon på plass, slik at aminosyrene kan bindes sammen til en voksende aminosyrekjede (Cornell, 2016).

Dette skjer ved hjelp av en annen type RNA kalt transfere-RNA (tRNA), som leser den genetiske koden i mRNA og kobler aminosyrer sammen i riktig rekkefølge. Det finnes 61 typer tRNA som gjenkjenner forskjellige tripletter i mRNA, og fester på korrekt aminosyre. Proteinsyntese i ribosom fra oppskriften i mRNA kalles translasjon (Fig. 6)

20 forskjellige aminosyrer med ulike kjemiske egenskaper brukes til proteinsyntese i humane celler, og via kovalente peptidbindinger bindes de i ribosomene sammen til unike aminosyresekvenser, og danner biologisk aktive proteiner, som f.eks. insulin (Alberts et al., 2014). En aminosyre består av et sentralt karbonatom (α -karbonet) bundet til en aminogruppe

($-\text{NH}_3^+$), en syregruppe ($-\text{COO}^-$), et hydrogenatom og en sidekjede. Sidekjedene, også kalt R-gruppen, gir hver aminosyre sin unike egenskap. Noen sidekjeder er upolare og hydrofobe, noen er positivt- eller negativt ladet, og noen kan være kjemisk reaktive (Fig. 7).



Figur 7. Polypeptidkjede på fire aminosyrer bundet sammen av peptidbånd. Sidekjeder bundet til sentral α -karbonet gir hver aminosyre unike egenskaper og avgjør proteinets struktur og funksjon (Alberts et al., 2014).

En organiserer proteinets oppbygning og organisering i flere nivåer. Disse nivåene er ikke uavhengig, men er sammen med på å etablere den tredimensjonale strukturen av hele proteinet (Alberts et al., 2014). Et proteins primære struktur betegnes som rekkefølgen av aminosyrer i polypeptidkjeden. Neste organiseringsnivå er proteinets sekundærstruktur, som består av lokale foldinger av polypeptidkjeden, inkludert α -helikser, β -flak og ustrukturerte regioner. Tertiærstrukturen beskriver den tredimensjonale konformasjonen, dannet av en hel polypeptidkjede mellom N- og C-terminalen, inkludert sekundærstrukturer. Hvis proteinmolekylet dannes som et kompleks av mer enn en polypeptidkjede, betegnes dette som proteinets kvartære struktur.

Det produseres over 100 000 ulike proteiner med unik funksjon i humane celler, og hos voksne med normal vevsfordeling utgjør proteinene omtrent halvparten av den organiske massen (Sand et al., 2006). Den biologiske funksjonen til et spesifikt protein avhenger av oppbygning, kjemiske egenskaper, fosforylering og difosforylering og hvordan det binder seg til andre molekyler (Alberts et al., 2014). Proteiner har kort sagt en viktig betydning for mesteparten av cellenes funksjoner. Eksempler på proteiners generelle funksjoner er å virke som enzymer som katalyserer brudd av kovalente bindinger, eller dannelse av nye bindinger. Videre gir strukturproteiner mekanisk støtte til celler og vev, og transportprotein bærer små molekyler eller ioner. Andre protein funksjoner er å generere bevegelse, lagre aminosyrer,

fungere som reseptor, regulere gener eller fungere som hormon. Flere neurotransmittere er også proteiner og muliggjør synaptisk signalering i hjernen slik at en kan tenke, lære og huske (Alberts et al., 2014).

Små forandringer av temperatur, pH eller ionesammensetning i løsningen rundt proteinene kan påvirke deres form og funksjon, og større påvirkning kan endre proteinets konformasjon så mye at proteinegenskapene i cellen forandres totalt (Sand et al., 2006). Ved søvnmangel vil endrede nivå av bestemte proteiner, eller aggregering av feilfoldede protein, aktivere ulike stressrespons-signaleringsystemer i en celle for å motvirke celledød (Naidoo et al., 2008). Eksempelvis vil økt nivå av feilfoldede proteiner i endoplasmatiske retikulum (ER) gi ER-stress og aktivere en signalvei kalt unfolded protein response (UPR), som begrenser proteinbelastningen ved å oppregulere ER-chaperoner og dempe proteintranslasjonen.

Akutt søvnmangel (6 timer) hos unge mus fører til induksjon av UPR, og søvndeprivasjon og påfølgende økt eller redusert protein uttrykk kan dermed gi endringer av bestemte intracellulære signaliseringsnettverk og signalveier.

UPR responsen på søvnmangel er derimot svekket hos eldre mus, noe som fører til økt produksjon av proapoptotiske proteiner og celledød. Bjørkums forskningsgruppe har i den upubliserte artikkelen «Human blood serum proteome changes after 6 hours of sleep deprivation at night» funnet signifikant endring i 34 proteiner i humant serum etter kun 6 timers søvndeprivasjon (Bjørkum et al., 2020, submitted), og vår studie her følger opp dette.

1.3. Cellulær stressrespons og proteinendringer

Cellulær stressrespons (CSR) er en forsvarsreaksjon utløst når celler påvirkes av ekstraordinære faktorer, f.eks. temperaturendringer som deformerer makromolekyler, som proteiner eller DNA (Kültz, 2005). Responsen forsøker å motvirke stressindusert skade, øke toleransen for slike skader midlertidig, eller fjerne ødelagte celler via apoptose. Cellene reagerer på CSR ved å aktivere stressrespons-gener og lage beskyttende stressproteiner som chaperoner, som bidrar til korrekt folding av deformerte proteiner. CSR kan på denne måten bidra, sammen med cellulær homeostase respons (CHR), til cellulær adaptasjon mot skadelige miljøendringer. I humane celler finnes også ubiquitin-proteasome-systemet (UPS) som bidrar

til å eliminere feilfoldede proteiner ved hjelp av å binde disse kovalent til proteinet ubiquitin. En modelldyrstudie viser at eldre mus, i motsetning til yngre, ikke klarer å øke nivå av ubiquitin tilstrekkelig ved cellulær stressrespons ved 6 timers søvnmangel. Feilfoldede proteiner blir dermed ikke fjernet like effektivt hos eldre mus, og det fører til økt risiko for celledød, eller apoptose hos eldre mus med søvndeprivasjon (Naidoo, 2009). Studien viser dermed en mulig sammenheng mellom søvnmangel som gir endret cellulær stressrespons, og dermed endringer i musenes proteom, noe som nettopp kan være cellulære endringer som kan ligge til grunn for utvikling av demenssykdom som Alzheimers sykdom.

Det er kjent at uregelmessig arbeidstid som skiftarbeid kan forstyrre biologiske rytmer og gi søvnmangel og cellulær stressrespons, som igjen kan gi helseplager eller sykdommer. Søvnmangel er bl.a. assosiert med økt risiko for gastrointestinale problemer, hjerte- og karsykdommer, visse typer kreft og psykiske lidelser (Bjorvatn, 2019).

Det er publisert endring i utskillelse av stoffer som bl.a. katekolaminer, kortisol, melatonin og stresshormoner ved søvnmangel, som igjen kan føre til endringer i blodtrykk, hjerterytme, metabolisme og gi økt kreft risiko (Waage et al., 2007).

En studie fra 2019 med eksponering av nattlig togstøy viste også at støynivå på 54 dB i 8 dager, som gjennomsnittlig gav 2 timers søvndeprivasjon, førte til proteomiske endringer mot en prooksidativ, proinflammatorisk og pro-trombotisk fenotype. Det gir et molekylært grunnlag for å forklare blant annet den økte kardiovaskulære risikoen og stoffskifteproblemer ved søvnmangel (Herzog et al., 2019).

Flere andre studier viser også at søvnmangel kan gi cellulær stressrespons der proteinuttrykket i cellene endres, bl.a. studien fra 2020 av Bjørkum m.fl. (Bjørkum et al., 2020 submitted). Etter søvndeprivasjon i 6 timer ble det i denne studien målt signifikant endring i 34 proteiner i humant serum, hvorav 3 av proteinene endret seg mer enn 1,5 ganger (Histon H4, protein s100-A6 og Keratin, type II cytoskjelett 6A). Histoner H4 spiller en vesentlig rolle i DNA pakking (Alberts et al., 2014) og protein i S100 familien er involvert i celledifferensiering (*S100A6 [Homo sapiens] – Gene – NCBI, u.å.*). Endringer i disse proteinene kan indikere at ulike cellulære mekanismer i cellene som transkripsjon og celledifferensiering er affisert av stress på cellene etter søvnmangel. I tillegg er flere endrede proteiner i studien assosiert med ulike typer kreft, eksempelvis protein tilknyttet POTE-genfamilien (Vekariya et al., 2019).

Slik kan kanskje søvndeprivasjon dermed ha flere uheldige cellulære effekter i humane celler som kan lede aktiviteten i cellene mot ulike krefttilstander.

Også i en modelldyr-studie med proteomisk analyse av rotteserum ved kronisk søvnmangel ble det vist store endringer i rottenes proteom (Ma et al., 2018). I 117 av 309 målte proteiner var endringen mer enn 1,8 ganger etter 16 timers (16:00-08:00) søvndeprivasjon per dag i 6 uker. Dette tyder på høyt nivå av stress på cellene ved søvnmangel, slik at en betydelig andel av proteinene som ble målt enten hadde blitt opp eller nedregulert. Studien avdekket en sammenheng mellom alvorlig kronisk søvnmangel, cellulær stress respons og endring i serumproteinnivå assosiert med endringer i energiomsetning, kardiovaskulær- og nevralfunksjon hos rottene.

Resultatene fra de nevnte humane- og dyrestudier viser at proteomiske analyser i humant serum kan øke kartleggingen av endret proteinuttrykk ved søvnmangel. Proteomiske analyser kan dermed også angi hvilke cellulære protein signaliseringsnettverk og signalveier intracellulært som endres etter søvndeprivasjon, og dermed beskrive de biologiske og fysiologiske endringene og -virkningene av søvnmangel. Proteomiske analyser i serum kan dermed gi kunnskap om ulike cellulære stressresponser og de cellulærbiologiske virkningene av søvnmangel, og i tillegg gi kunnskap om mulige proteinbiomarkører for søvnmangel som på sikt kanskje kan brukes klinisk.

2. Material og metode

2.1 Måleprinsipp

2.1.1 Proteomikk

Proteomikk er studiet av proteomet, som er det komplette settet med proteiner uttrykt av en organisme, vev eller en celle. Proteiner utgjør store deler av levende organismer, og har mange viktige funksjoner. Begrepet proteom beskriver hele proteininnholdet i celler, kroppsvæsker, vev og organismer. Målet med proteomikken er å sikre en fullstendig oversikt over alle proteiner en organisme kan produsere, funksjon og strukturen til disse proteinene, og proteinenes interaksjoner med hverandre og andre molekyler i cellen (Martinsen & Kristensen, 2020).

I prinsippet kan proteomikk angis som alle metoder som blir brukt til anrikning, rensing, separasjon, deteksjon og karakterisering av proteiner. Det blir benyttet kromatografi og gelelektroforese for separasjon av proteiner, men for identifisering og kvantitering av proteiner blir det benyttet massespektrometri (Hagen, 2013).

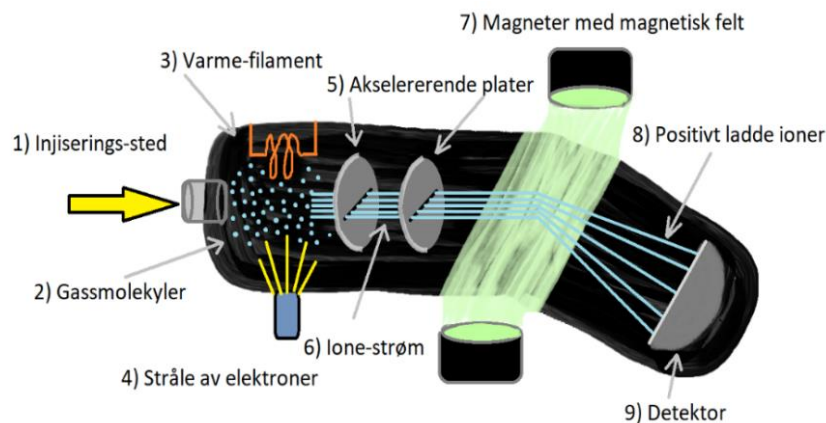
Til nå er det ingen enkle måter å vurdere graden av søvntap hos mennesker, og det er startet en studie for å identifisere en molekylær biomarkør for søvndrift. Biomarkører er assosiert med cellulære og molekylære mekanismer for sykdom og en tilstand. Biomarkører kan være årsaksrelatert til en sykdom og/eller være signal om en patologisk tilstand. De best etablerte metodene til å overvåke molekylære endringer i søket etter en biomarkører er de genomiske metodene, som omfatter cDNA-mikroarrays. Nå i etterkant har bruken av proteomikk (storskalaundersøkelse av proteiner) økt. Årsaken til at man velger å studere proteomet i stedet for genomet, fordi det har vist seg at bare ca. 10 prosent av genomet bidrar direkte til sykdomspatogenesen, og en enda mindre brøkdel av genomet er faktisk potensielle mål for terapi. I tillegg vil genuttrykksmetoder der en måler mRNA også være mangelfulle da mange av disse oppskriftene for sine respektive proteiner aldri blir uttrykt som proteiner. Proteiner utgjør 98 prosent av alle molekylene i cellen, og deltar og utgjør også signalisering i cellene, i tillegg til å ha strukturelle funksjoner, er deltar i viktige fysiologiske prosesser, også posttranslasjonelle modifikasjoner av aktuelle proteiner, som f.eks. endrede proteiner etter søvnmangel, som også kan være potensielle kandidater som biomarkør for søvnlighet.

Proteomet er veldig dynamisk og reagerer på en rekke av intra- og ekstracellulære miljøsignaler, i motsetningen til genomet som er veldig stabilt og relativt uforanderlig. Det finnes mange proteomiske tilnærminger som kan benyttes til å identifisere en biomarkør.

2.1.2 Massespektrometri

Et atom/molekyl kan forekomme i forskjellige varianter; dvs. det kan ha like kjemiske egenskaper, men ulike fysiske egenskaper (Chang et al., 2014). Disse kalles isotoper av atomet/molekylet. Et eksempel er hydrogen; hydrogenatomet har som regel 1 proton i kjernen, men noen hydrogenatom kan ha 1 nøytron i tillegg til protonet, og er dermed et isotop (Holtebekk et. al., 2019). For beregning av massen til slike atomer/molekyler er massespektrometri den mest nøyaktige metoden (Chang et al., 2014), og denne metoden brukes bl.a. til identifisering av proteiner i kroppsvæsker og vev. Metoden er velegnet for å identifisere så mange proteiner som mulig i f. eks. en kroppsvæske som blodserum, for å fange opp hvilke proteiner som får endret uttrykk, dvs. vil bli opp- eller nedregulert etter et simulert nattskiftarbeid.

I figur 8 er det skissert hvordan et massespektrometer kan se ut. Det deles inn i fire hoveddeler; et prøveinjiserings-sted (1), et ionekammer, en massanalysator med magnetiske felt (7), og en detektor (9).



Figur 8. Massespektrometer. Prøvematerialet (gass) injiseres ved injiserings-stedet (1) og blir så tilført elektroner med svært høy energi (4). Dette gjør at gassmolekylene mister et elektron og blir ionisert. De positivt ladde ionene blir så akselerert av to motstående plater (5) og vandrer så i en strøm gjennom disse til et magnetisk felt (7). Det magnetiske feltet avbøyer ionene i en bestemt retning (8), og retningen bestemmes ut fra ionenes molekylmasse til ladning-ratio (m/z). Ionene detekteres så av en detektor (9).

Prøvematerialet som benyttes kan enten være i fast form, væske eller gass, men dersom en skal benytte moderne teknikker med ionisering, må prøvematerialet først gjøres om til gassform. Dette kan gjøres ved at f.eks. prøvematerialet bli truffet av en stråle med elektroner som har høy energi (se pkt. 4 i figur 8) (Holtebekk et. al., 2018). Ved at høyenergi-elektronene og gass-atomene/-molekylene kolliderer med hverandre, blir det dannet positive ioner ved at det løsner et elektron fra hvert atom/molekyl. Ionene akselereres av to ladde plater som står mot hverandre (se pkt. 5 i figur 8), og passerer raskt gjennom platene. Videre vandrer ionene gjennom et sterkt magnetisk felt (se pkt. 7 i figur 8), som avbøyer ionene i en bestemt retning.

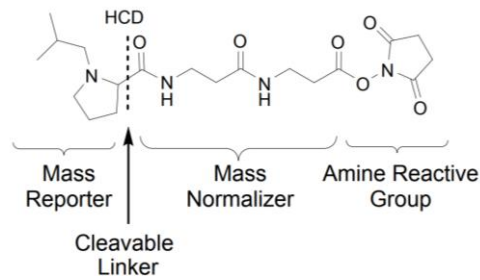
Det er massen til ionene som avgjør hvor stor/liten avbøyningen er; jo større masse, jo mindre avbøyning, og jo mindre masse, jo større avbøyning. Dvs. ionene skilles fra hverandre i form av deres «masse (m) til ladning (z)-ratio» (m/z). Dette betyr at en kan skille ioner med samme ladning og ulik masse fra hverandre (Bishop et. al., 2013). Ionene blir så detektert av en detektor, og hver type ion detekteres som en strøm (Chang et. al., 2014). Detektoren gjør det mulig å anslå store mengder isotoper, fordi den genererte strømmen er direkte proporsjonal med antall ioner. De detekterte ionene blir videre illustrert i et massespektrum på en datamaskin, der x-aksen illustrerer (m/z)-ratio og y-aksen illustrerer strømmen av ioner.

I vårt prosjekt ble det benyttet et nytt massespektrometer (MS) kalt Q Exactive HF, fra ThermoFishersom (Thermo Fisher Scientific, 2013).

2.1.3 Tandem Mass Tag (TMT) markering

Metoden Tandem Mass Tag (TMT) er en kjemisk reagens merking som kan benyttes til analyse av makromolekyler (proteiner, peptider og nukleinsyrer) i serumprøver ved bruk av tandem massespektrometri (MS) (A. Thompson et al., 2003).

Etter trypsinering ble de 8 kontrollprøvene og de 8 søvnmangelprøvene i forsøket merket med en av 16 unike Thermo Scientific™ TMTpro Mass Tag Labeling reagens før alle prøvene ble blandet sammen (*ThermoScientific TMTpro™*, 2019). Hvert reagens i et TMT-sett har en unikt sammensatt kjemisk struktur (Fig. 9).



Figur 9. Tandem Mass Tag (TMT) merkemethode. Funktionelle regioner i TMT-reagensstrukturen. Hvert reagens i et TMT-sett har en kjemisk struktur sammensatt av en amino-reaktiv N-hydroksysuccinimid-estergruppe som kan binde seg til proteiner, en massenormaliseringsregion, en unik masserapporterregion på 126-134Da og et cleavable linker området (også kalt MS/MS-fragmenteringssted). Peptidioner i den lineære ionefellen i et orbitrap massespektrometer kan fragmenteres med høy nøyaktighet ved hjelp av higher-energy C-trap dissociation (HCD), og slik blir det mulig med bedre peptidsekvensering i proteomiske analyser der TMT-reagens benyttes (Olsen et al., 2007).

TMT-reagenssettet kan merke opp til 16 forskjellige serumprotein prøver, og for hver prøve vil en unik reporter masse på 126-134Da i lav masse regionen av MS/MS-spekteret brukes til å måle det relative proteinuttrykket under peptidfragmentering. En kan dermed måle relativt proteinendringsuttrykk fra kontroll til søvnmangeltilstand for proteinene som ble indentifisert i massespektrometri analysen. Den unike TMT-merkingen gjør også at analysen får økt prøvemultipleksing for relativ protein kvantifisering, altså økt evne til å analysere økning eller reduksjon av mengde proteiner presist og effektivt.

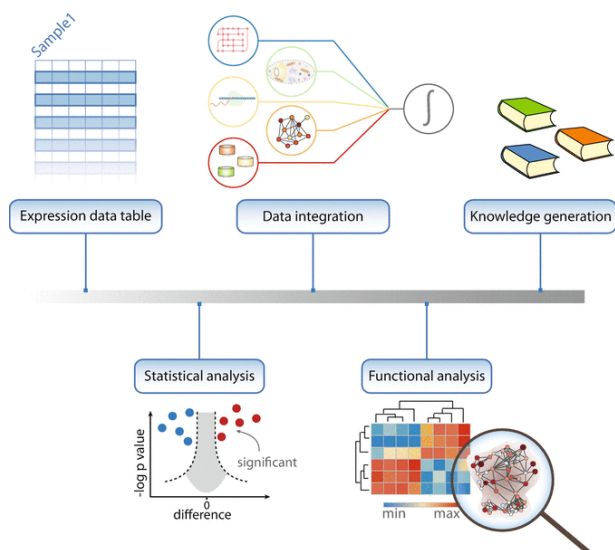
Dette kan gir oss mer og trolig sikrere datamateriale til systembiologiske analyser av endrede proteiner og deres deltagelse i affiserte proteinnettverk og dermed større mulighet for potensiell utvikling av proteinbiomarkører og proteinmarkørprofil (Kingsmore, 2006). I tillegg gir TMT-merking økt deteksjonsfølsomhet for visse analytter som hydrofile protein sammenlignet med proteinanalyser uten TMT-merking (Tsai et al., 2019).

I dette forsøket ble den sammenslåtte prøven analysert på et høyopløselig Orbitrap LC-MS / MS massespektrometer, og dataanalyse ble brukt for indentifisering og slik relativ kvantifisering av de indentifiserte proteinene.

2.1.4 Bioinformatikk

Bioinformatikk er fagfeltet der en bruker databaser, programvareverktøy og statistikk til å tolke komplekse data fra biologiske eksperimenter som proteomiske massespektrometri analyser (Agostino, 2013). Ved riktig bruk av bioinformatikk kan en behandle, visualisere, analysere og lagre store mengder informasjon uten å bli overveldet.

Dette forsøket benyttet en bioinformatikkplattformen Protein Discoverer 2.5 (ThermoFisher) og Perseus for analyse av proteinendringer etter søvndeprivasjon. Slik fikk vi oversatt kvantitative omics-rådata fra massespektrometri analysen til biologiske funn som kan ha klinisk betydning.



Figur10. En typisk proteinanalyse i Perseus med konvertering av rådata til informasjon og kunnskap (Tyanova & Cox, 2018). Statistikk, korrelasjonsanalyse og data integrasjon ble brukt til å gi biologisk relevante treff for de signifikant endrede proteinene etter søvnmangel. Resultatene fra den funksjonell proteinanalysen ble videre behandlet i ulike eksterne databaser, som igjen gav kunnskap om hvordan proteinendringene ved søvndeprivasjon er tilknyttet for eksempel kreft.

Resultatene fra den funksjonelle proteinanalysen i Perseus ble videre behandlet i de ulike eksterne databasene og søkeverktøyene STRING, WebGestalt, OMIM og KEGG. Databasene sammenlignet vår data mot tidligere publisert materiale og gav kunnskap om hvordan endrede proteinene er tilknyttet biologiske prosesser, molekylære funksjoner og ulike sykdommer. I STRING søkeverktøyet brukte vi SwissprotID til å generere protein tilknytningsnettverkene. I de systembiologiske databasene WebGestalt, OMIM og KEGG valgte vi overrepresentasjonsanalyse (ORA) og brukte gensymbol funnet vha. Perseus, se resultat kapitlet for fremgangsmåte.

2.2 Søvndeprivasjonsforsøket

2.2.1 Praktiske forhold i forsøket

Dette er et pågående forskningsprosjekt av tidligere bacheloroppgaven (Bergesen et al. 2019). Ved dette prosjektet var det åtte deltakere hvor alle var kvinner. For en forsøksperson bestod forsøksperioden av en kontrollnatt og en søvndeprivasjonsnatt, i tillegg til uken før kontrollnatten og søvndeprivasjonsnatten. Den tidligere bacheloroppgaven (Bergesen et al 2019) gjennomført to forsøksbolker som gikk over 48 timer. De Første 24 timene var det kontrollnatt, hvor deltakerne sov fra kl. 22.00 til neste morgen kl. 07.00. De andre 24 timene var det søvndeprivasjonsnatt. I denne perioden måtte forsøkspersonene holde seg våken mellom kl. 22.00 og kl. 04.00 og etter kl. 04.00 kunne de sove til kl. 07.00. Både ved kontrollnatten og søvndeprivasjonsnatten ble det satt av tider for blodprøvetaking. Tidene var satt kl. 22.00, kl. 04.00 og kl. 10.00. Forsøkspersonene fikk infoskriv om selv prosjektet; de reglene og kravene som var satt på forhånd for å kunne oppnå optimale og representative resultater. De åtte deltakerne skrev også under på et skjema om informert samtykke, og dette skjema er lagt ved som vedlegg, se vedlegg 1. Det ble også anvendt et spørreskjema som hver av deltakerne fylte ut. Spørreskjemaet og hva deltakerne svarte er lagt ved som vedlegg, se vedlegg 2 og 3. I tillegg fikk deltakerne også informasjon om at de kunne trekke seg når som helst fra forsøket dersom de måtte ønske seg.

I forsøksperioden ble det satt av krav til at forsøkspersonene skulle prøve å normalisere døgn- og søvnrytmen. De måtte legge seg til samme tid hver dag og stå opp til samme tid hver dag, også var det viktig at de ikke la seg for seint. Forsøkspersonene måtte i tillegg holde et sunt og regulert kosthold under forsøksperioden. Koffeininntak skulle unngås fra kl.17.00 til kl.09.00 påfølgende dag. Grunnen til dette var for å stabilisere døgnrytmen og unngå forstyrrelser og forskyvninger. Alkohol og røyk var ikke tillatt under forsøksperioden. For at kroppen skulle få tid til å roe seg ned og hvile før leggetid var det et krav om at forsøkspersonene ikke skulle være fysisk aktivitet etter kl. 17.00. Krav til forsøkspersonene og de søvnhygieniske reglene finnes i punktvis i vedlegg 5 og 6.

2.2.2 Prøvemateriale

Prøvemateriale som ble brukt i prosjektet er serumrør med tilsetning. Før blodprøvetakingen måtte deltakeren ligge i ro ca. 15 minutter. På kontrollnatten og søvndeprivasjonsnatt ble det utført venøs blodprøvetaking 22:00, 04:00 og 10:00. Prosedyrene som ble benyttet er lagt som vedlegg. Vedlegg 4 og vedlegg 7 omhandler de praktiske forhold rundt blodprøvetakingen og behandling av prøvene.

2.2.2.1 Prosedyre for håndtering av prøvematerialet

Blodprøvene stå og koagulerte i 45 minutter før de ble sentrifugert i 10 minutter ved 3000 rpm(1500G). Deretter ble serumet av pipettert. Serumet fra hver deltaker (forsøksperson) ble fordelt (aliquotert) i 3 polypropylenrør merket med ID, navn og dato. I hver rør var det 300 µl. Prøvene ble fort fryst ned i -20 °C før de ble transportert videre til PROBE, og her ble prøvene fryst ned i -80 °C.

2.3 Analysering av proteinprøvene

2.3.1 Fortynning

Av hver deltaker ble det tatt 6 prøver, og hver prøve ble aliquotert over i tre polypropylenrør. Videre i dette prosjektet ble det kun brukt ett 300 µl polypropylenrør per prøvetakingstidspunkt. Etter at prøvematerialet ble tint ble det blandet godt ved hjelp av en vortex mikser. Fra de tinte aliquotene ble det totalt pipettert 50 µl fordelt på to Eppendorfrør, altså 25 µl i hver Eppendorfrør. Den ene Eppendorfrøret skulle brukes til analysen, mens den andre var backup. Dette ble gjort for å unngå å tine prøvemateriale flere ganger, da det kan påvirke prøve kvaliteten. Prøvene i Eppendorfrørene ble fortynnet 1:50 med ionefritt vann, få proteinkonsentrasjon tilnærmet 1 µg/µl. Alt ble blandet godt ved hjelp av vortex mikser.

2.3.2 BCA protein assay

Det ble utført BCA protein assay for å bestemme proteinkonsentrasjonen i det fortynnende prøvematerialet. 96-brønnsplate ble benyttet, og i brønn A1-A6 og B1-B6 ble det laget to identiske standardrekker ved å følge tabell 1.

Tabell 1. BCA protein assay. Tabellen viser hvor mye tilsatt av ionefritt vann, bovine IgG og lysis buffer til de ulike brønnene for tillaging av de to identiske standardrekkene.

Brønn nr.	A1, B1	A2, B2	A3, B3	A4, B4	A5, B5	A6, B6
Vann	10	8	6	4	2	0
Bovine IgG	0	2	4	6	8	10
Lysis Buffer	5	5	5	5	5	5

De fortynnende proteinprøvene ble applisert til 96-brønnsplaten og det ble applisert 10 µl fortynnet prøvemateriale og samme mengde reagens for hver forsøksperson til hvert prøvetakingstidspunkt. Det ble benyttet seks brønner for hver forsøksperson, siden det var seks prøvetakingstidspunkt; 22:00, 04:00 og 10:00. Etter appliseringen av prøvene ble det først laget standardkurvet av tabell 1 og deretter ble det tilsatt 200µl av en blanding av Bicinchoninic acid og kobbersulfat (BCA/CuSO₄) til hver brønn. Prøvene ble først lysegrønn etter tilsetning av kobbersulfat og BCA men etter litt tid gikk prøvene over til en lillafarge. Fargen forteller noe om proteinkonsentrasjon i prøven, de prøvene med mørkeste lilla hadde høyest proteinkonsentrasjon. Videre ble platen satt i varmeskap ved 37°C i 30 min tildekket med lokk og plastfilm. Thermo Scientific Multiskan FC var plateleseren som ble benyttet for å bestemme proteinkonsentrasjonen i de fortynnende proteinprøvene. Etter at platen ble inkubert i 30 min så ble den plassert i plateleseren Thermo Scientific Multiskan FC for avlesning av proteinkonsentrasjon. Det ble beregnet proteinkonsentrasjon for å kontrollere at de fortynnende proteinprøvene hadde en proteinkonsentrasjon som var innenfor standardkurven. Det som indikerte bruken av BCA protein assay var at de fortynnende proteinprøvene inneholdt en optimal proteinkonsentrasjon og kunne dermed benyttes til videre trypsinering og analysering. Prosedyren for BCA protein assay er lagt ved som vedlegg, se vedlegg 8.

2.3.3 Trypsinering

20 μl ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) av det fortynnede prøvematerialet ble varmedenaturert før prøvene ble analysert på massespektrometri. Først ble det fortynnede prøvematerialet overført til nye Eppendorfrør, også ble det tilsatt 20 μl buffer i alle prøvene. Prøvene ble så inkubert i romtemperatur mens de ble mikset i Eppendorfmikser i 5 minutter. I neste steg ble det tilsatt 2 - 4 μl 100mM DiTHioThreiol (DTT) for å oppnå 10 mM DTT løsning. Prøvene ble så varmet opp i 6 minutter ved 95 grader i en Eppendorfmikser og deretter kjølt ned i romtemperatur. For cystein alkalisasjon ble 6 μl 200mM Jodacetamid tilsatt for å unngå dannelsen av disulfidbro. Prøvene ble igjen inkubert en time i mørke i romtemperatur. Det ble inkubert i mørket fordi at Jodacetamid, som er et alkyleringsmiddel, er ustabil og lys sensitiv. For å unngå protease alkalisasjon i prøvene ble det tilsatt 0.9 – 1.8 μl 100mMDTT, og ble inkubert ved romtemperatur i 10 minutter. Videre ble det tilsatt 55 – 110 μl buffer. Det gjenstod kutting av proteinene til peptider; og til dette tilsatt man trypsin i en mengde som var omtrent 50 ganger lavere enn mengden protein i prøvene. Hvis prøven inneholdte ca. 100 μg protein, ble det tilsatt 2 μg av protease a med en konsentrasjon på 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Det var viktig at pH stabiliserte seg mellom nøytral/rundt 7 og 8. Prøvene ble så inkubert ved 37 grader over natten (16 timer) i et varmeskap. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 10 % TFA, til en konsentrasjon på 0,5 %-1% som medførte at trypsin sluttet å virke. Prosedyren for trypsinering er lagt ved som vedlegg, se vedlegg 9.

2.3.4 C18 cleanup

C18-cleanup er en metode for å fjerne salter og rense proteiner etter at proteinene har blitt behandlet med ulike metoder, dvs. filter aided sample preparation (FASP). I denne oppgaven ble C18-cleanup brukt for å fjerne salter og urea i bufferen fra trypsineringen. Prosedyren startet med en Oasis 96-brønns plate, samt en 96-brønns avfalls-plate. Det ble tilsatt 500 μl 80% ACN, 0,1% FA for å aktivere små kolonner i 96-brønns plater. og denne ble deretter sentrifugert i 200 x g i 1 min, og eluatet ble kastet. Videre ble patronene vasket i to omganger (ref. vedlegg 10).

200 μl av de trypsinerte proteinprøvene ble alikvotert til sine respektive brønner, og videre sentrifugert og vasket i flere omganger, til vaskeprosessen ble gjennomført totalt 3 ganger

(ref. vedlegg 10). Elueringssteget foregikk ved at prøvematerialet ble eluert i en 96-brønns elueringsplate, og så tilsatt 100 µl 80 % ACN, 0,1 % FA, og videre sentrifugert ved 150 x g i 3 minutter, og elueringen ble gjennomført 2 ganger, uten at det eluerte prøvematerialet ble kastet.

Det eluerte prøvematerialet ble overført til Eppendorf-rør og fryst i -80 °C i 15 min. Prøvene ble deretter frysetørket av en Centrivap frysetørker (Kansas City, MO, USA). Etter frysetørkingen ble prøvene løst i 1 % FA og 2 % ACN. Prosedyren for C18-cleanup er lagt ved som vedlegg, se vedlegg 10.

2.3.5 Fraksjonering

Fraksjonering er en prosess som nettopp fraksjonerer prøvemateriale etter for eksempel protein/peptid størrelse eller annen type fraksjonering som her vha. pH. Fraksjoneringen i denne analysen ble gjort ved en fraksjoneringsmetode vha. pH. Dette ble gjort på et offline HPLC-system; Agilent 1200, der offline HPLC betyr at HPLC-instrumentet ikke var direkte koblet til massespektrometeret. Fraksjoneringen foregikk ved at prøvematerialet først ble løst i en buffer, med 10mM ammoniumformiat som ble mikset med LC/MS eluent. pH ble justert til ønsket pH-verdi (pH = 7,9) ved å tilsette NaOH og vha. et kalibrert pH-meter.

Videre ble det laget et nytt buffer med ACN-vann; Acetonitril blandet med 100ml vann. Denne bufferen er direkte koblet til HPLC-instrumentet (ref. vedlegg 11).

Prøvematerialet ble alikvotert til brønner på en 96-brønns plate (Eppendorf Deepwell plates, Protein Lobind), og deretter ble det kjørt blankprøver, som kun besto av «loading» buffer, etterfulgt av kjøring med TMT-merket prøvemateriale. Prosedyren for fraksjonering er lagt ved som vedlegg, se vedlegg 11.

2.3.6 HPLC og massespektrometrisk analyse med Orbitrap Q Exactive

High pressure liquid chromatography (HPLC), væskekromatografi, er en metode som benyttes for å separere ulike komponenter i en prøve, slik at en kan måle kun ønsket analytt fra prøvematerialet (Harris, 2019). I HPLC blir prøvematerialet ført gjennom instrumentet ved hjelp av trykk, noe som bidrar til at retensjonstiden blir kortere. Et HPLC-instrument består av et injiserings-område, en mobil fase, kolonne med kolonneovn, en høytrykkspumpe og en detektor. Den mobile fasen er gjerne en eluent, og jo sterkere eluenten er, jo kortere blir retensjonstiden. En slik eluent kan f.eks. være en vandig buffer med bestemt pH, og organisk løsemiddel. Dette for å kunne endre på styrken til eluenten i den mobile fasen (Harris, 2019). HPLC-systemet på Orbitrap Q Exactive MS er et online-HPLC-system, dvs. det er direkte koblet til massespektrometeret.

Hver prøve ble frysetørket i en Centrivap Concentrator (Labconco) og oppløst i 2% ACN, 1% FA. Omtrent 0,5 µg peptider fra hver fraksjon ble injisert i et Ultimate 3000 RSLC-system. (Thermo Scientific), koblet til er Orbitrap Q-Exactive HF massespektrometer utstyrt med en EASY-spray-ionekilde (Thermo Scientific). Prøvene ble injisert og avsaltet på en forkolonne (Acclaim PepMap 100, 2 cm × 75 µm i.d. nanoViper-kolonne, pakket med 3 µm C18 kuler som kolonnepakkemateriale) ved en strømningshastighet på 3 µl /min i 5 minutter med 0,1% TFA. Peptidene ble separert under en bifasisk ACN-gradient fra to nanoflow UPLC-pumper (strømningshastighet på 0,200 µl /min) på en 50 cm analytisk kolonne (PepMap RSLC, 50 cm × 75 µm id EASY-spray kolonne, pakket med 2 µm C18 kuler/kolonnepakkemateriale (Thermo Scientific). Løsemiddel A var 0,1% FA i vann, og løsningsmiddel B var 100% ACN. Massespektrometeret ble kjørt i datavhengig (Data Dependent Aquisit7ion, DDA) innstilling for automatisk å veksle mellom full skanning i de to massespektrometrene (MS/MS). Q-Exactive HF Tune 2.4 og Xcalibur 3.0. MS-spektre ble satt til i skanneområdet/intervallet 375-1500 m/z med oppløsning på 60 000 ved m/z 200, mål for automatisk forsterkningskontroll (AGC) ble satt til 3e6, og maksimal injeksjonstid (IT) ble satt til 50 ms. De 12 mest intense eluerende peptidene over intensitetstærskelen 6e4, og ladetilstandene to eller høyere, ble sekvensielt isolert for fragmentering av høyere energi kollisjon dissosiasjon (HCD) og ervervelse av MS2 til en normalisert HCD kollisjonsenergi på 32%, mål AGC-verdi på 1e5, oppløsning R = 60 000, og IT på 110 ms. Forløperisolasjonsvinduet ble satt til

1,6 m / z med en isolasjonsforskyvning på 0,3 og en dynamisk ekskludering på 30 s. Låsemasse (445.12003 m / z) intern kalibrering ble brukt, 27 og isotopekskludering var aktiv.

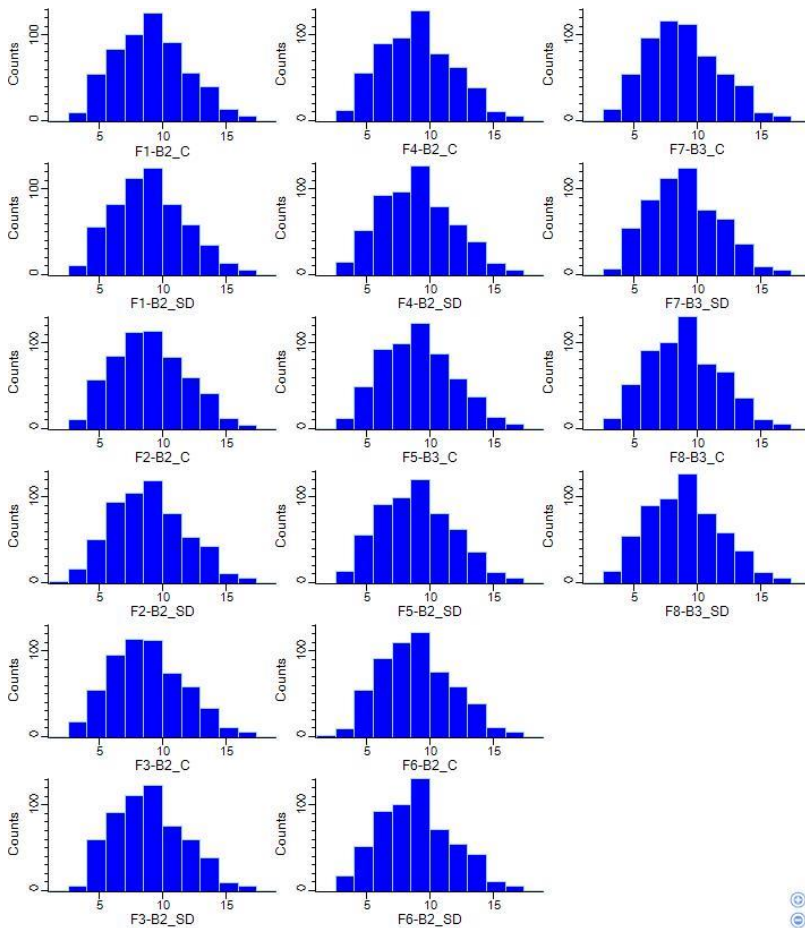
2.3.7 Søkning av rådata og normalisering.

Rådataene fra masse spektrometeret ble søkt opp mot databasene Sequest HT og MS Amanda ved bruk av Proteome Discoverer 2.5. Fasta filen brukt til søket ble lastet ned fra uniprot.org 02.02.2021 (Human 20396 entries). Alle data ble normalisert ved bruk av den totale peptidmengden. Dette beregner den totale summen av intensitets verdien for hver TMT kanal over alle peptider identifisert i en fil. Den tar deretter kanalen med den høyeste totale intensitet som referanse og korrigerer alle intensiteter i alle andre kanaler med en konstant faktor per kanal, så til slutt er den totale intensiteten den samme for hver kanal.

3. Resultat

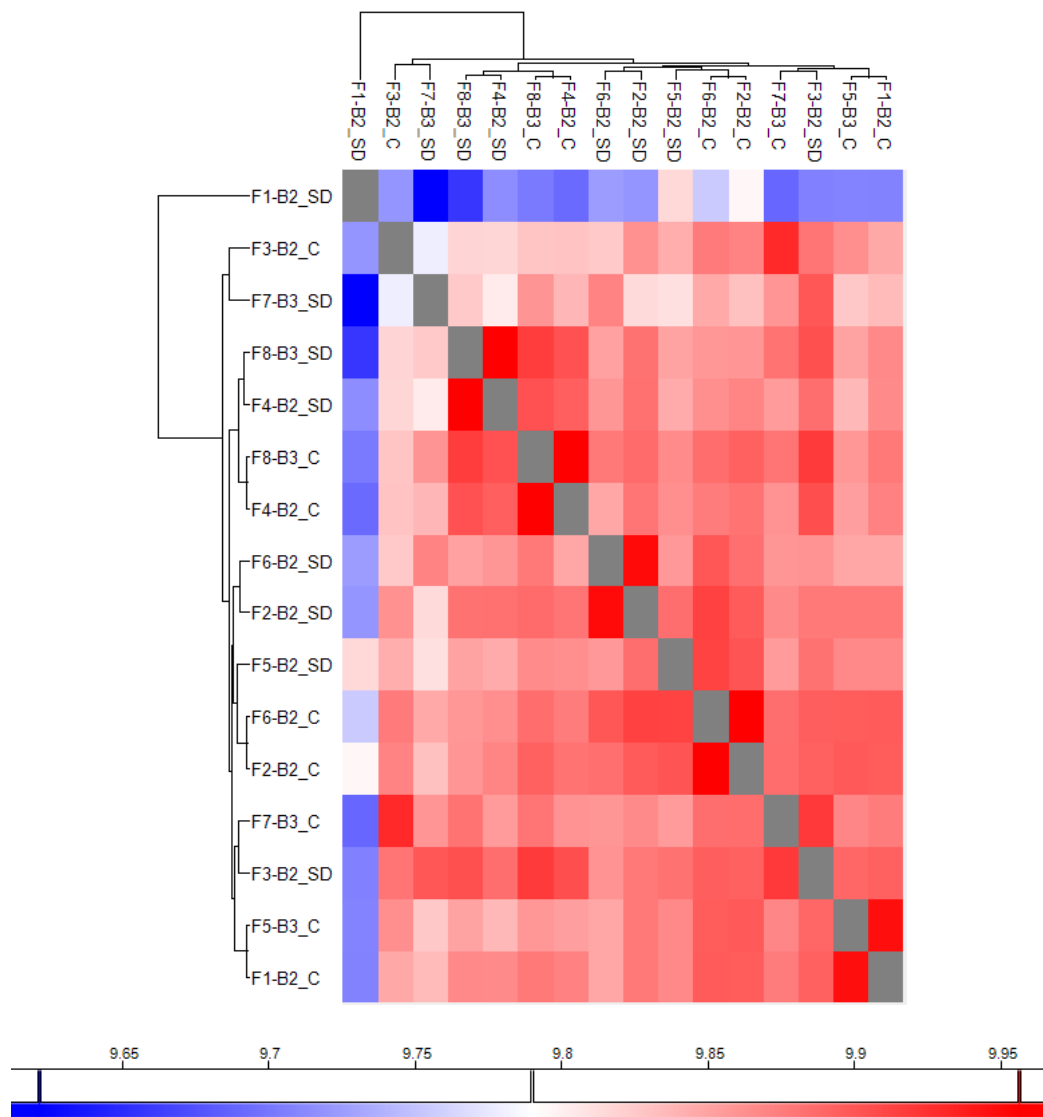
3.1 Korrelasjonsanalyse

Dataene fra proteinanalysen, dvs. massespektrometridataene i Perseus, var normalfordelt og tilnærmet t-fordelt (Fig. 11), selv om datasettet var relativt lite (8 deltakere og 16 proteinserumprøver). En kunne ut fra i multipel-hypotesetesting i Perseus anta at resultatene fulgte en underliggende t-sannsynlighetsfordeling. Hypotesetestingskorreksjon ble gjort ved hjelp av en permutasjonsbasert tilnærming (FDR), der en byttet og «permitterte» verdier i datasettet. På denne måten simulerte programmet et «sterkere» datasett slik at en parametriske test kunne benyttes (Tyanova & Cox, 2018). Intensitetsplottene var normalfordelt (Fig. 11), som betyr at de ikke hadde blitt påvirket av f.eks. forurensning eller andre analytiske feilkilder.



Figur 11. Intensitetsplott. Intensitet representerer ulike peptid-ion langs x-aksen, mens counts angir antall peptid-ion som har denne intensiteten langs y-aksen. F1 til F8 står for forsøksperson 1 til 8, B angir batch, C står for kontrollprøve og SD står for søvndeprivasjonsprøve.

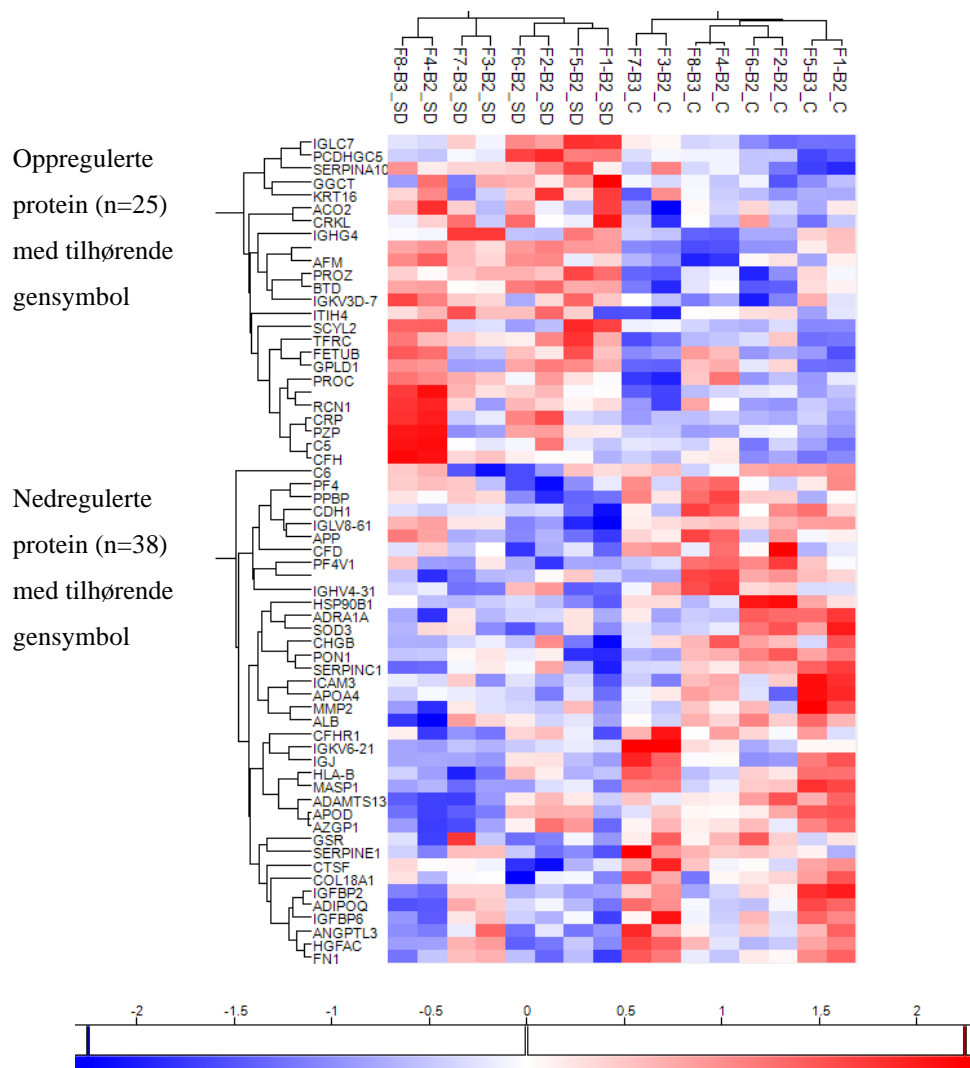
For å se hvor godt hver prøve i datasettet korrelerte med de andre prøvene ble det utført en Pearssons korrelasjons analyse i data programmet Perseus. Resultatet (Fig. 12) viser at korrelasjonskoeffisientene (R^2 -verdien) mellom de ulike protein-serumprøvene var mellom 0,96 og 0,995.



Figur 12. Korrelasjonsanalyse mellom serumproteinprøver. Korrelasjonsanalyse ble utført i dataprogrammet Perseus mellom de ulike serumproteinprøvene. F1 til F8 står for forsøksperson 1 til 8, B angir batch, C står for kontrollprøve og SD står for søvndeprivasjonsprøve. Blå farge viser en korrelasjonskoeffisient (R^2) på 0,96, hvit farge på 0,98, og rød farge på tilnærmet lik 1. Grå felt viser de ulike proteinprøvene mot seg selv. Samtlige korrelasjonskoeffisienter var på mer enn 0,96, noe som viser bra korrelasjon mellom protein i serumprøvene. Det tyder på adekvat kvalitet på den proteomiske analysen av proteinprøvene.

3.2 Signifikant endrede proteiner etter 6-timers søvndeprivasjon

Det ble identifisert totalt 590 proteiner i humant blodserumprøvene etter TMT-merking, fraksjonering og proteomisk massespektrometri-analyse. Ved bruk av tosidig paret *t*-test i Perseus med *p*-verdi 0,05 var 63 av de 590 identifiserte proteinene kvantitativt signifikant endret etter 6 timers søvnmangel. Av de 63 proteinene var 25 signifikant oppregulerte og 38 signifikant nedregulerte. Ved hjelp av Perseus-programvaren ble også relativ grad av endring i proteinuttrykk beregnet, og i tillegg ble identifikasjonsnummer konvertert til offisielle gensymboler.



Figur 13. Signifikant endrede proteiner etter 6-timers søvndeprivasjon på natt. F1-F8 = forsøksperson nr. 1-8, B = batch, C = kontroll, SD = søvndeprivasjon. Den nyere proteomiske massespektrometri-analysen og databehandlingen i Perseus viser 25 oppregulerte og 38 nedregulerte proteiner, etter simulert 6-timers søvndeprivasjon. Figuren viser også gensymbolet til 60 av de 63 signifikant endrede proteinene. Rød angir grad av oppregulert protein, og blå for nedregulert protein mellom kontroll og 6 t søvn deprivasjon på natt. Hvit angir liten grad av endring.

3.2.1 Signifikant oppregulerte og nedregulerte protein etter søvndeprivasjon

Foldendring, altså relativ endring i signifikant endrede protein, ble beregnet og angitt for signifikant oppregulerte og nedregulerte protein, se vedlagt Excel-fil. Foldendring viser endret proteinkonsentrasjon i serum mellom kontrollprøver og 6-timers søvndeprivasjons prøver for de ulike proteinene (Tab. 2).

Tabell 2. Signifikant oppregulerte protein etter 6 t søvndeprivasjon på natt. Oppregulerte protein (25) i humant serum og grad av endret proteinkonsentrasjon etter 6 timers søvndeprivasjon. F.eks. for C-reactive protein viser foldendring at det ble økning i serumproteinkonsentrasjon på 143,5% fra kontrollprøve til søvndeprivasjonsprøve. Tabellen viser også proteinenes offisielle navn angitt med SwissprotID og respektive gensymbol. Samtlige p-verdier for de oppregulerte proteinene var $p \leq 0,05$.

Oppregulerte protein (25) etter 6 timers søvndeprivasjon				
SwissprotID	Gensymbol	Proteinets navn	Foldendring	p-verdi
P02741	CRP	C-reactive protein	2.435	0,0061
P20742	PZP	Pregnancy zone protein	1.781	0,0212
P01742	-	Immunoglobulin heavy variable 1-69	1.617	0,0001
O75223	GGCT	Gamma-glutamylcyclotransferase	1.615	0,0315
P01861	IGHG4	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	1.505	0,0246
P46109	CRKL	Crk-like protein	1.471	0,0238
Q9Y5F6-2	PCDHGC5	Isoform 2 of Protocadherin gamma-C5	1.436	0,0125
A0M8Q6	IGLC7	Immunoglobulin lambda constant 7	1.415	0,0035
Q99798	ACO2	Aconitate hydratase, mitochondrial	1.398	0,0416
P01714	-	Immunoglobulin lambda variable 3-19	1.374	0,0008
P08779	KRT16	Keratin, type I cytoskeletal 16	1.322	0,0416
Q6P3W7	SCYL2	SCY1-like protein 2	1.309	0,0241
P43251	BTD	Biotinidase	1.255	0,0009
P22891	PROZ	Vitamin K-dependent protein Z	1.241	0,0007
Q15293	RCN1	Reticulocalbin-1	1.220	0,0137
Q9UGM5	FETUB	Fetuin-B	1.190	0,0188
P02786	TFRC	Transferrin receptor protein 1	1.181	0,0002
P04070	PROC	Vitamin K-dependent protein C	1.171	0,0166
Q9UK55	SERPINA10	Protein Z-dependent protease inhibitor	1.169	0,0046
P80108	GPLD1	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	1.165	0,0452
P43652	AFM	Afamin	1.164	0,0013
A0A0C4DH55	IGKV3D-7	Immunoglobulin kappa variable 3D-7	1.137	0,0061
Q14624-2	ITIH4	Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	1.126	0,0500
P08603	CFH	Complement factor H	1.090	0,0117
P01031	C5	Complement C5	1.085	0,0219

Tabell 3. Signifikant nedregulerte protein etter 6 t søvndeprivasjon på natt. Nedregulerte protein (38) i humant serum og grad av endret proteinkonsentrasjon etter 6 timers søvndeprivasjon. F.eks. for Zinc-alpha-2-glycoprotein viser foldendring at det ble reduksjon i serumproteinkonsentrasjon på 5,55% fra kontrollprøve til søvndeprivasjonsprøve. Tabellen viser også proteinenes offisielle navn angitt med SwissprotID og respektive gensymbol. Samtlige p-verdier for de oppregulerte proteinene var $p \leq 0,05$.

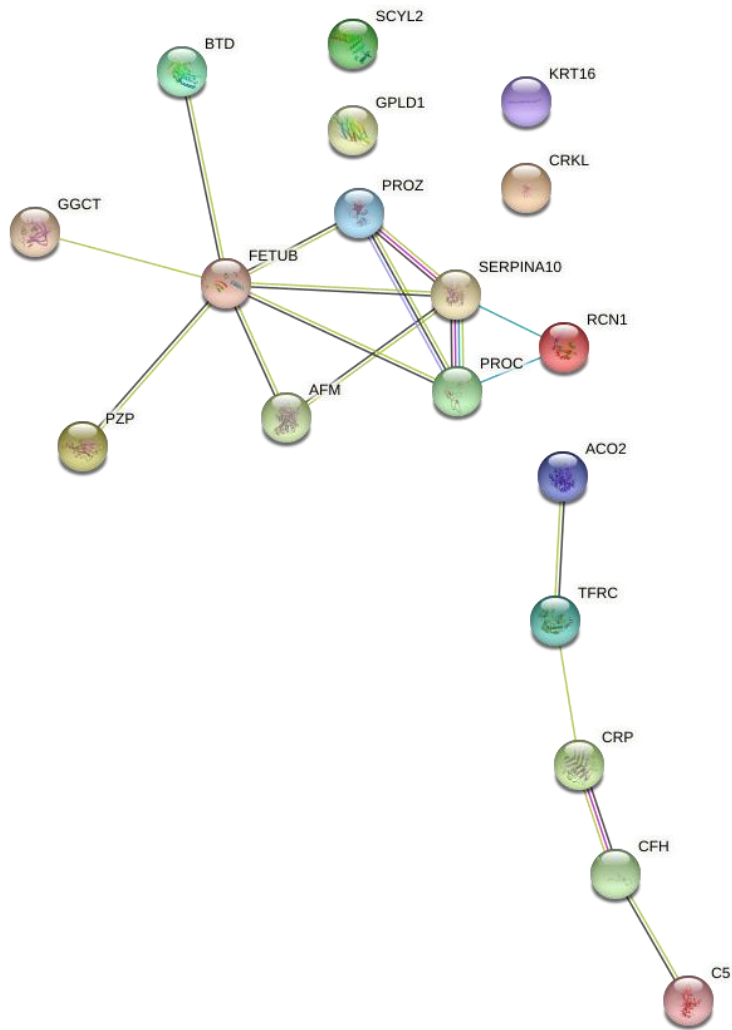
Nedregulerte protein (38) etter 6 timers søvndeprivasjon				
SwissprotID	Gen navn	Proteinets navn	Foldendring	p-verdi
P25311	AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0.945	0,0391
P13671	C6	Complement component C6	0.942	0,0373
P02768	ALB	Albumin	0.925	0,0288
P00746	CFD	Complement factor D	0.919	0,0222
P05067	APP	Amyloid-beta precursor protein	0.918	0,0366
P02775	PPBP	Platelet basic protein	0.915	0,0190
P02776	PF4	Platelet factor 4	0.899	0,0430
P02751-1	FN1	Isoform 1 of Fibronectin	0.893	0,0135
P01008	SERPINC1	Antithrombin-III	0.890	0,0191
P12830	CDH1	Cadherin-1	0.890	0,0030
P35348-3	ADRA1A	Isoform 3 of Alpha-1A adrenergic receptor	0.889	0,0293
Q76LX8	ADAMTS13	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13	0.889	0,0051
Q9Y5C1	ANGPTL3	Angiopoietin-related protein 3	0.884	0,0151
P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase	0.879	0,0394
P48740-2	MASP1	Isoform 2 of Mannan-binding lectin serine protease 1	0.876	0,0002
P06727	APOA4	Apolipoprotein A-IV	0.875	0,0386
P24592	IGFBP6	Insulin-like growth factor-binding protein 6	0.866	0,0221
P32942	ICAM3	Intercellular adhesion molecule 3	0.866	0,0482
P05090	APOD	Apolipoprotein D	0.864	0,0264
Q04756	HGFAC	Hepatocyte growth factor activator	0.851	0,0283
P05121	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor 1	0.849	0,0136
P10720	PF4V1	Platelet factor 4 variant	0.847	0,0056
P05060	CHGB	Secretogranin-1	0.846	0,0100
A0A087WSY4	IGHV4-31	Immunoglobulin heavy variable 4-30-2	0.843	0,0275
P14625	HSP90B1	Endoplasmic	0.841	0,0060
P39060	COL18A1	Collagen alpha-1(XVIII) chain	0.832	0,0337
P01591	IGJ	Immunoglobulin J chain	0.822	0,0308
P08294	SOD3	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.802	0,0286
Q15848	ADIPOQ	Adiponectin	0.801	0,0356
P01825		Immunoglobulin heavy variable 4-59	0.798	0,0149
Q9UBX1	CTSF	Cathepsin F	0.796	0,0150
P00390	GSR	Glutathione reductase, mitochondrial	0.793	0,0355
P27169	PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	0.783	0,0203
P18065	IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2	0.749	0,0171
Q03591	CFHR1	Complement factor H-related protein 1	0.742	0,0176
A0A0C4DH24	IGKV6-21	Immunoglobulin kappa variable 6-21	0.731	0,0308
P01889	HLA-B	HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain	0.684	0,0081
A0A075B610	IGLV8-61	Immunoglobulin lambda variable 8-61	0.630	0,0286

3.3. Protein-Protein interaksjon (STRING) mellom endrede proteiner etter søvndeprivasjon

Det ble gjort en protein-protein interaksjonsanalyse med STRING-biologisk database, både for signifikant nedregulerte og oppregulerte protein etter søvndeprivasjon (Szkarczyk et al., 2018). Søk i STRING-protein assosiasjonsnettverket ble brukt til å samle, score og vurdere alle offentlig tilgjengelige kilder til protein-protein-interaksjon, både fysiske og indirekte (Szkarczyk et al., 2019). I tillegg ble STRING brukt til å kartlegge biologiske prosesser og molekylær funksjoner de 63 signifikant endrede proteinene deltar i eller utgjør deler av.

3.3.1. Protein-Protein interaksjon (STRING) for oppregulerte protein etter søvndeprivasjon

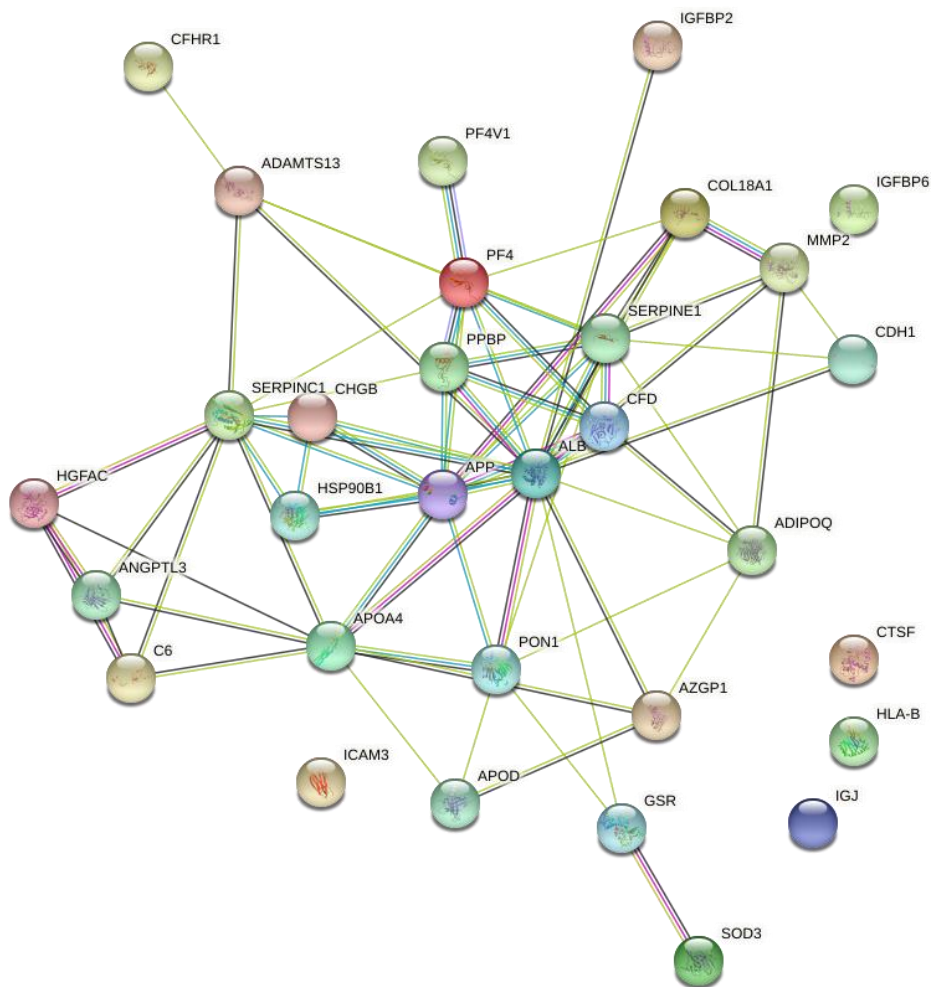
Det var 17 interaksjoner til stede mellom de 25 oppregulerte proteinene etter søvndeprivasjon (18 protein ble gjenkjent av databasen). Forventet antall interaksjoner i et tilfeldig utvalg av 18 proteiner var 2, noe som ga en protein-protein interaction score (PPI) på: $3.18e-11$. En lav PPI antydte at proteinene i dette forsøket hadde flere interaksjoner seg imellom enn det som var forventet for et tilfeldig sett med proteiner. Resultatet indikerte at proteinene var biologiske forbundet, som en gruppe.



Figur 14. Oppregulerte proteiner. Oversikt over interaksjoner mellom de signifikant oppregulerte proteinene ved bruk av STRING biologisk database. Proteinene ble identifisert med gennavn (Tab. 2). De ulike linjene mellom proteinene i analysen hadde ulik betydning mtp. protein-protein interaksjon. Lyseblå og lilla viser kjente interaksjoner mellom proteinene, mens grønn, rød og blå viser sannsynlige interaksjoner basert på genanalyse. Svart linje viser koekspressjon, og lyseblå viser homologi mellom proteinene. Lysegrønn (lime) linje indikerte «textmining», noe som betydde at proteinene dukket opp i samme vitenskapelige tekster.

3.3.2. Protein-Protein interaksjon (STRING) for nedregulerte protein etter søvnprivasjon

Det var 73 interaksjoner mellom de 38 oppregulerte proteinene etter søvnprivasjon (31 protein ble gjenkjent av databasen). Forventet antall interaksjoner i et tilfeldig utvalg av 38 proteiner var 15, noe som gav en protein-protein interaktion score (PPI) på: $< 1.0e-16$. En liten PPI antydnet at proteinene i dette forsøket hadde flere interaksjoner seg imellom enn det som var forventet for et tilfeldig sett med proteiner. Resultatet indikerte at proteinene var biologisk forbundet, som en gruppe.



Figur 15. Nedregulerte proteiner. Oversikt over interaksjoner mellom de signifikant nedregulerte proteinene ved bruk av STRING biologisk database. Proteinene ble identifisert med gennavn (Tab. 3). De ulike linjene mellom proteinene i analysen har ulik betydning mtp. protein-protein interaksjon. Lyseblå og lilla viser at det er kjente interaksjoner mellom proteinene mens grønn, rød og blå viser forutsagte interaksjoner. Svart linje viser koekspressjon, og lyseblå viser homologi mellom proteinene. Lysegrønn (lime) linje indikerer «textmining», noe som betyr at proteinene dukker opp i samme vitenskapelige tekster.

3.3.3 Molekylære funksjoner og biologiske prosesser fra STRING for endrede protein etter søvndeprivasjon

Tabell 4. De mest signifikant endrede biologiske prosesser for de 63 endrede proteinene. Biologiske prosesser for protein-nettverkene vist i figur 14 og 15 ble beregnet ved hjelp av funksjonell anrikingsanalyse i STRING-databasen og sortert etter korrigert p-verdi. Det ble gjort funn av at de 63 signifikant endrede proteinene deltok i totalt 229 biologiske prosesser, se vedlagt Excel-fil.

Biologiske prosesser	Antall matchende protein i nettverket	p-verdi korrigert
Regulering av respons på eksternt stimulus	18	1.40e-08
Positiv regulering av immunsystemprosessen	17	2.24e-08
Respons på stress	29	2.24e-08
Regulering av immunsystemprosessen	19	1.80e-07
Respons på stimulus	41	1.80e-07
Multiorganismeprosess	23	2.02e-06
Regulering av forsvarsrespons	13	2.38e-06
Regulering av forsvarsresponsen i immunsystemet	22	3.01e-06
Humoral immunrespons	9	3.01e-06
Respons på eksternt stimulan	21	3.01e-06
Respons på annen organisme	16	3.01e-06
Forsvarsrespons mot annen organisme	14	3.01e-06
Forsvarsrespons	16	3.71e-06
Regulering av cellevandring	13	3.71e-06
Respons på oksygenholdig forbindelse	17	3.71e-06
Regulering av respons på stimulus	27	5.49e-06
Regulering av inflammatorisk respons	9	1.55e-05

Biologiske prosesser for protein nettverkene ble beregnet ved hjelp av protein-protein funksjonell anrikingsanalyse i STRING. Tabellen er sortert etter korrigert p-verdi, også kalt False Discovery Rate (FDR), beregnet i STRING ved hjelp av Benjamini-Hochberg-prosedyren (Benjamini & Hochberg, 1995). De 63 signifikant endrede proteinene deltok i totalt 229 biologiske prosesser, for komplett tabell se vedlagt Excel fil.

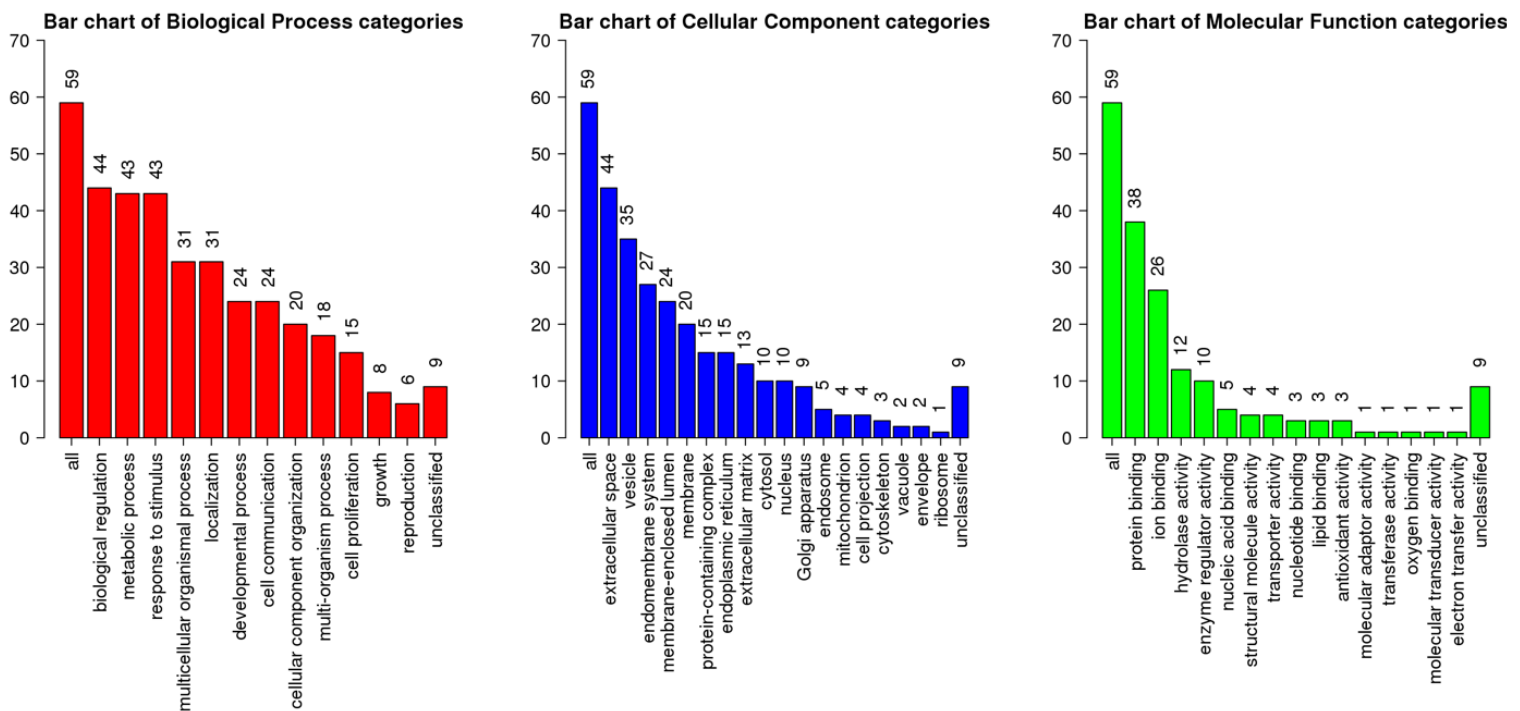
Tabell 5. De mest signifikant endrede molekulære funksjoner for de 63 endrede proteinene. Molekulære funksjoner for protein-nettverkene vist i figur 14 og 15 ble beregnet ved hjelp av funksjonell anrikingsanalyse i STRING-databasen, og sortert etter korrigert p-verdi. Det ble gjort funn av at de 63 signifikant endrede proteinene deltok i totalt 31 molekulære funksjoner, se vedlagt Excel-fil.

Molekulære funksjoner (STRING)	Antall matchende protein i nettverket	Korrigert p-verdi
Signalisering via reseptorbinding	18	2.05e-06
Heparinbinding	8	2.05e-06
Endopeptidashemmer aktivitet	7	1.24e-05
Enzyminhibitor aktivitet	8	0.00013
Serine-type endopeptidasehemmer aktivitet	5	0.00013
Kjemokinaktivitet	4	0.00019
CXCR cellegiftreseptorbinding	3	0.00027
Reseptorligandaktivitet	8	0.00034
Molekulær funksjonsregulator	15	0.00036
Lav-tetthets lipoproteinpartikkelreseptor binding	3	0.00046
Antioksidant aktivitet	4	0.00073
Endopeptidaseaktivitet	7	0.00075
Proteinbinding – identiske protein	14	0.00083
Serine-type endopeptidaseaktivitet	5	0.0010
Celleadhesjonsmolekyl binding	5	0.0016
Cytokinaktivitet	5	0.0020
Protein binding	29	0.0021

Molekulære funksjoner for protein-nettverkene ble beregnet ved hjelp av protein-protein funksjonell anrikingsanalyse i STRING. Tabellen er sortert etter korrigert p-verdi, også kalt False Discovery Rate (FDR), beregnet i STRING ved hjelp av Benjamini-Hochberg-prosedyren (Benjamini & Hochberg, 1995). De 63 signifikant endrede proteinene deltok i, eller er assosiert med, totalt 31 molekulære funksjoner, for komplett tabell se vedlagt Excel fil.

3.4. Funksjonell gen-anrikningsanalyse (GSEA) i databasen WebGestalt

Biologiske prosesser, cellulære komponenter og molekylære funksjoner for de 63 signifikant endrede proteinene etter 6-timers søvndeprivasjon ble beregnet vha. funksjonell gen-anrikningsanalyse (GSEA) i databasen WebGestalt (WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit) (Liao et al., 2019). Av de endrede proteinene (63) er over 40 av disse kategorisert i biologisk regulering og i metabolske prosesser. For cellulære komponent-/enhets-kategoriene er mellom 15 til 35, dvs. over halvparten (av de 63), kategorisert i vesikkel, endomembran-system, membran- og membranlukkede lumen-kategoriene. I tillegg er molekylære funksjoner affisert ved endring fra 26-38 (av de 63 proteinene) endret etter en simulert nattskift natt, dvs. 6 t våkenhet sammenlignet med kontrollnatten, der en sov de samme 6 timene på natten. Ut ifra figuren (Fig. 16) ser en eksempelvis at 44 av de endrede proteinene deltar i biologisk regulering, 28 i ionebinding og 27 er assosiert med endomembran-systemet.



Figur 16. Funksjonell gen anrikningsanalyse (GSEA) i WebGestalt. Biologiske prosesskategorier, kompartmentkategorier og molekylære funksjons-kategorier for de 63 signifikant endrede proteinene etter søvndeprivasjon, beregnet vha. funksjonell anrikningsanalyse (ORA-genontologi) av gen oppgitt i tabell 1. og 2. i databasen WebGestalt. Analysen ble gjort med referansesett genomet for homo sapiens og FDR signifikans nivå <0,05.

Det ble det også utført funksjonell anrikningsanalyse i WebGestalt ved bruk av OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) sykdomsdatabase og KEGG 2019 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) referanse kunnskapsbase. OMIM gir innsikt i gen-fenotype-forholdet i celler, og gir informasjon om sykdommer som muligens kan knyttes til de proteomiske endringene ved søvndeprivasjon (Amberger et al., 2015). KEGG 2019 benytter PATHWAY-kartlegging, som egner seg til å kartlegge sammenhengen mellom gener relatert til proteinendringene etter søvndeprivasjon, interaksjoner mellom molekyler og sykdommer (Kanehisa et al., 2008).

3.4.1 Funksjonell anrikningsanalyse i OMIM sykdomsdatabase

Tabell 6. Sykdomsdatabase. Sykdommer assosiert med de signifikant endrede proteinene etter 6-timers søvndeprivasjon, beregnet vha. funksjonell anrikningsanalyse (ORA-disease) i WebGestalt av gen oppgitt i tabell 2. og 3. opp mot databasen OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). Analysen ble gjort med referansesett genomet for homo sapiens og p-verdi <0,05.

Gen-sett	Sykdomsbeskrivelse	p-verdi
608089	Livmorkreft	0.0049714
603075	Aldersrelatert makulær degenerasjon (AMD) (1)	0.0049714
167000	Eggstokkreft, inkludert epitel	0.0059635
143890	Hyperkolesterolemi	0.0069548
104300	Alzheimer sykdom	0.010913
176807	Prostatakreft	0.012887
114480	Brystkreft	0.023694

Resultatet (Tab. 6) indikerer at 6-timers søvndeprivasjon endrer kvantitativt bestemte proteiner, som i tidligere studier er assosiert med sykdommer som Alzheimer, hjerte kar sykdommer (hyperkolesterolemi), synssvekkelse (AMD) og ulike former for kreft.

3.4.2 Funksjonell anrikingsanalyse i KEGG 2019 biologisk signalvei database

Tabell 7. PATHWAY-kartlegging av de signifikant endrede proteinene etter 6-timers søvndeprivasjon. Beregnet vha. funksjonell anrikingsanalyse (ORA-PATHWAY) i WebGestalt av gen oppgitt i tabell 2. og 3. opp mot databasen KEGG 2019 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Analysen ble gjort med referansesett genomet for homo sapiens og p-verdi <0,05.

Gen sett	Beskrivelse	p-verdi
hsa04610	Komplement- og koagulasjonskaskader	1.2240e-9
hsa05150	Staphylococcus aureus infeksjon	0,000098673
hsa04918	Skjoldbruskhormonsyntese	0,0041154
hsa05100	Bakteriell invasjon av epitelceller	0,0041154
hsa04977	Fordøyelse og absorpsjon av vitaminer	0,0049169
hsa04062	Chemokine signalvei	0,0091568
hsa04933	AGE-RAGE signalvei i diabetiske komplikasjoner	0,0092399
hsa05020	Prionsykdommer	0,010284
hsa05219	Blærekreft	0,013941
hsa04979	Kolesterolmetabolisme	0,020319

Resultatet (Tab. 7) indikerte at 6-timers søvndeprivasjon endret proteiner som kunne knyttes til sykdommer som infeksjoner, prionsykdommer og blærekreft. I tillegg kunne endringene i proteomet etter søvnmangel knyttes til biologiske signalveier som koagulasjonskaskaden, hormonsyntese og kolesterolmetabolisme.

4. Diskusjon

4.1 Dataanalyse og statistikk

For å bestemme variasjonene i identifiserte proteiner fra humanserum-proteomet mellom kontrollprøvene og søvndeprivasjonsprøvene, var det nødvendig å utføre statistiske tester for å avgjøre om de relative nivåendringene i identifiserte proteiner som ble observert var statistisk signifikante. Signifikanstester ble derfor brukt for å finne ut om dataene fra resultatmålingene var fordelt/normalfordelt slik at resultatene ikke skyldtes tilfeldige variasjoner eller analytiske feilkilder (Helbæk, 2001; Tyanova et al., 2016).

Resultatene i Perseus var normalfordelt og tilnærmet *t*-fordelt (Fig. 11), selv om datasettet er relativt lite med 8 deltakere, 16 proteinserumprøver og mange variabler (590 protein). Multippel-hypotesetesting og hypotesetestingskorreksjon i Perseus løser problemet med få deltagere med en permutasjonsbasert tilnærming (FDR). Ved bytting og permittering av verdier simulerer programmet et sterkere datasett slik at en parametrisk test kan benyttes (Tyanova & Cox, 2018). Det er gunstig da ikke-parametriske tester ikke utnytter informasjonen i et datasett like godt som parametriske tester (Helbæk, 2001). Siden dataene var normalfordelt ble paret tosidig *t*-test med *p*-verdi 0,05 brukt som signifikanstest siden denne testen egner seg til å studere differanser ($x_{d,i}$) mellom relative (forholdstall) proteinkonsentrasjoner i 6-timers søvndeprivasjonsnatt og kontrollnatt. Ved bruk av paret *t*-test i Perseus med *p*-verdi 0,05 var 63 av de 590 identifiserte protein signifikant endret etter søvnmangel. Dette indikerer at kun 6-timers søvndeprivasjon en natt gir relativt store endringer i proteomet i cellene.

Korrelasjonsanalysen i Perseus mellom de ulike protein serumprøvene gav 225 korrelasjonskoeffisientener (R^2) som alle var 0,96-0,995. Dette viser god korrelasjon mellom protein nivået i de ulike prøvene, noe som tyder på at prøveopparbeidelsen og kvaliteten på utførelsen av den proteomiske analysen var god.

4.2 Søvndeprivasjon påvirker uttrykket av kreftrelaterte proteiner

I 2007 la International Agency for Research on Cancer (IARC) vekt på at skiftarbeid er en sannsynlig risikofaktor for kreft (Bjorvatn, 2019). Epidemiologiske studier avdekket også en sammenheng mellom nattskift arbeid og en 50-100% høyere forekomst av brystkreft (Touitou et al., 2017). I tillegg har kort søvnvarighet pga. nattskiftarbeid blitt koblet til kreft i tarmen (C. L. Thompson et al., 2011) og mulig økt risiko prostatakreft (Papantoniou et al., 2015).

Dette stemmer godt overens med funn i gen funksjonelle anrikningsanalysen (GSEA) i denne bacheloroppgaven. Resultatene fra WebGestalt ved bruk av OMIM og KEGG 2019 databasene indikerer at 6 timers søvndeprivasjon kan påvirke humant serum-proteomet og kjente signalveier i humane celler på en måte som kan relateres til kreftsykdommer. Spesielt genene CDH1 og MMP2 og tilhørende proteiner kunne i KEGG 2019 og OMIM relateres til ulike former for kreft, mens genene CRKL, FN1 og HSP90B1 spilte en rolle i biologiske pathways tilknyttet kreft. Det er også kjent at C-reactivt protein (CRP) som inflammatorisk biomarkør i enkelte tilfeller kan knyttes til kreft (Rasmussen et al., 2017). Hvis en tar utgangspunkt i CDH1 som et eksempel kan en i tabell 3 se at proteinet er noe nedregulert etter 6 timers søvndeprivasjon. Protein i kadherin familien (CHD) fungerer som celleadhesjonsproteiner som gir celler evnen til å feste seg til hverandre (Bjørkum et al., 2020 submitted) og er tilknyttet molekylære funksjoner som celleadhesjonsmolekyl binding og kategorien fem proteiner av våre endrede serumproteiner bla klassifisert under (Tab 4.). I tumorer fungerer kadherin som molekylær barriere som hemmer spredning av kreftceller og transkripsjonsundertrykkelse/hemming av transkripsjon av dette proteinet er en årsak til invasivt lobulært brystkarsinom (Xiao et al., 2019). Slik kan endringer i serumproteinnivå av protein i kadherinfamilien kobles opp mot mulig økt risiko for brystkreft ved søvndeprivasjon, og som reflekteres i endring i kreftassosierte proteiner i humant blodstrøm etter så kortvarig søvnmangel som en natts søvndeprivasjon, eller søvnmangel på 6 timer.

Funksjonell anrikningsanalyse (GSEA) i databasen WebGestalt viste at 15 av de signifikant endrede proteinene i humant blodserum deltar i den biologiske prosesskategorien regulering av celleproliferasjon, og 8 deltar i vekstregulering i samme klassifikasjonskategori (Fig. 16). Aktivering eller endring av mange signalveier assosiert med cellevekst- og cellesyklusrelaterte proteiner kan bidra til kreftutvikling (Feitelson et al., 2015), så en kan kartlegge om alle/flere av disse proteinene også deltar i kreftrelaterte prosesser, slik som

kadherin, både mht. de respektive proteiner som ble klassifisert i vår studie, og tilsvarende funn i aktuell kreftlitteratur og kreftassosiert litteratur relatert til søvnmangelstudier, både humant og på modelldyr. Dette viser hvordan databasene OMIM og KEGG 2019 kan kartlegge og klarlegge sammenhengen mellom proteinendringer ved søvndeprivasjon, interaksjoner mellom molekyler og kreftsykdommene brystkreft, livmorkreft, eggstokkreft, prostatakreft og blærekreft.

4.3 Plate- og koagulasjonsprosesser påvirkes av søvndeprivasjon

Blodplater har viktige funksjoner i bl.a. primær homeostase. Blodplatene fester seg til skadeområdet, og aggregerer slik at det dannes en blodplateplugg som kan dekke skadestedet, og over tid forhindre ytterligere blødning (McKenzie, 2014). Tidligere studier har vist at søvndeprivasjon påvirker flere signalveier i viktige prosesser med plater og koagulasjon, som kan knyttes til sirkulasjonsrelaterte patologiske tilstander (Bjørkum et al., 2020 submitted). I Bjørkum et al. 2020 var bl.a. at proteiner som deltar i komplementaktivering, blodkoagulasjon, fibrinolyse og generering av kininer, ble nedregulert etter en 6-timers søvndeprivasjonsnatt, noe som mulig kunne føre til økt koagulasjon, og dermed økt fare for ev. blodpropp og sirkulatoriske hendelser som f.eks slag og infarkt, som er sirkulasjonsrelaterte sykdommer med høy forekomst i befolkningen. Andre studier har gjort liknende funn, der søvnmangel kan føre til hyperkoagulasjon, som videre kan relateres til kardiovaskulære sykdommer, slik som sirkulatoriske sykdommer nevnt over, og f.eks. koronararteriesykdom (Pinotti et al., 2010).

I vårt prosjekt ble det også vist proteomiske endringer som indikerer at søvnmangel kan ha innvirkning på viktige funksjoner i signalveier for plateaggregering og koagulasjon. Vitamin K-avhengig protein C var en av flere koagulasjonsfaktorer som ble funnet oppregulert etter en simulert nattskiftnatt, og plate faktor 4 (PF4) var et av flere protein som ble funnet nedregulert. Nedregulering av et slikt protein kan mulig føre til økt koagulasjon (Bjørkum et al., 2020 submitted), som igjen kan føre til sirkulasjonsrelaterte patologiske tilstander. Signalvei-kartlegging i analyseverktøyet WebGestalt ble satt opp mot databasen KEGG (ref. tabell 7), og viser at en 6-timers søvndeprivasjonsnatt kan påvirke flere signalveier i koagulasjon- og komplementkaskader. Dette støtter opp under tidligere funn om at søvnmangel, både akutt og kronisk, gir økt forekomst av hjerte-karsykdom (Nagai et al., 2010).

4.4 Immunrelaterte prosesser forstyrres etter søvndeprivasjon

Immunsystemet er kroppens forsvar mot smittestoffer og består av ulike typer immunologiske organer og celler, samt løselige proteiner og hver celle type og ulike immunrelaterte proteiner har egne virkemåter og deltar i ulike systemiske (via blod og lymfe bla) og cellebiologiske signalveier i bekjempelse av ulike typer smittestoffer (Tor Lea, 2006). Tidligere studier har vist at etter seks timer søvnmangel kan føre til nedsatt immunforsvar og dermed økt risiko for infeksjoner og sykdom (Majde & Krueger, 2005). Tilstrekkelig søvn er like avgjørende for å opprettholde langvarig helse som kosthold og trening. Det ble påvist i flere studier at personer som sover mindre enn 6 timer hver natt har økt risiko for å utvikle fremtidig hjerte-karsykdommer og diabetes (Amlaner et al., 2009).

Det ble gjort studier på mennesker med søvndeprivasjon for å se hvilken effekt søvnmangel har på det medfødte immunsystemet. Det ble lagt vekt på antallet og aktiviteten av sirkulerende hvite blodlegemer og inflammatoriske mediatorer. Funnene var blant annet at ved søvndeprivasjon økte monocytene, nøytrofiler også C-reaktivt protein. Økt antall nøytrofile granulocytter og monocytter er påvist ved stress, inflammasjoner og særlig ved infeksjoner. Dette tyder på at søvndeprivasjon kan ha innvirkning på immunfunksjonen (Amlaner et al., 2009).

I vårt prosjekt ble det også gjort funn som indikerer at søvnmangel kan ha innvirkning på immunsystemet. C-reaktivt protein var en av de 25 oppregulerte proteinene med størst relativ kvantitativ endring som ble funnet etter en simulert nattskift natt. Som vist på tabell 2 så har CRP en økning i serumkonsentrasjon på 143,5% fra kontrollprøve til søvndeprivasjons prøve. Konsentrasjonen til CRP kan raskt stige fra 100 til 1000 ganger over vanlig nivå ved betennelsestilstander og bakterieinfeksjoner. Av den grunn er CRP en biomarkør benyttet hyppig i helsetjenesten som markør for betennelse og infeksjonstilstand.

CRP sin rolle er blant annet å binde seg til fosfatidylkolin på nekrotiske celler og bidra til fagocytose (Husøy, 2021), og dette kan tyde på at akutt søvndeprivasjon gir aktivert cellulær stressrespons som følge av celledskade.

Andre proteomiske endringer kan videre tyde på en prooksidativ, proinflammatorisk og proapoptotisk endring i cellene. Gamma-glutamylcyclotransferase (GGCT) med foldendring dvs. relativ endring fra kontrollnatten til søvndeprivasjonsnatten på 1,615 kan indusere frigjøring

av cytokrom c fra mitokondrier med resulterende induksjon av apoptose (UniProt, u.å.) og glutation-reduktase (GSR) med foldendring 0,793 er et kritisk molekyl for å motstå oksidativt stress (Couto et al., 2016). Det er mulig at denne typen proteomiske endringer kan gi (nedsatt og) redusert immunforsvar som en effekt av kun 6 timers søvnmangel.

4.5 Søvndeprivasjon endrer uttrykket av proteiner relatert til metabolske sykdommer

Epidemiologiske studier har vist at søvndeprivasjon øker risikoen for metabolske sykdommer som fedme og type 2 diabetes og fører til endringer i betennelsesveier som kan gi metabolsk dysfunksjon (Cedernaes et al., 2015). Dette skjer blant annet fordi søvntap endrer DNA-metylering i hele genomet i fettvev og gir endringer i proteiner forbundet med adipogenese (fettcelledannelse).

Våre funn dvs. identifiserte og kvantitativt endrede proteiner etter søvnmangel i denne studien analysert med genfunksjonell anrikningsanalyse (GSEA), viste at totalt 43 av de 63 signifikant endrede proteinene også fra tidligere studier er assosiert med å regulere biologiske prosesser som nettopp metabolske prosesser (Fig. 16). Resultatene fra WebGestalt ved bruk av OMIM og KEGG 2019 databasene indikerer at 6 timers søvndeprivasjon kan påvirke proteomet og signalveier i humane celler slik at det kan relateres til kolesterolmetabolisme, diabetes og absorpsjon av vitaminer. Blant annet genene APOD, APOA4, BTD og ANGPTL3 og tilhørende proteiner kunne i KEGG 2019 og OMIM relateres til metabolsk relaterte forstyrrelser, mens genene FN1, MMP2 og SERPINE1 relateres signalvei i diabetiske komplikasjoner. Avvikende apoD-ekspressjon er assosiert med forstyrret lipidmetabolisme og Apolipoprotein D avsetning påvises i plakk i hjernen til pasienter med Alzheimer (Perdomo & Dong, 2008).

Proteinet Apolipoprotein A4 fungerer som akutt metthetsfaktor og bidrar til glukosehomeostase (Kohan et al., 2015), så nedreguleringen i tabell 3 kan kobles til sultfølelse. De 43 signifikant endrede proteinene tilknyttet metabolsk regulering, inkludert apolipoproteinene D og A4, kan dermed være med på å beskrive hvordan søvndeprivasjon kan gi metabolsk dysfunksjon, diabetes type 2 og sykdommer som Alzheimers.

4.6 Samlet vurdering

Resultatene fra OMIM og KEGG 2019 i Tab. 6 og 7 samsvarte med tidligere studier blant annet fra Bjørkum og medarbeidere (Bjørkum et al., 2020 submitted), modelldyrstudier (Ma et al., 2018; Naidoo et al., 2009), epidemiologiske studier (Cedernaes et al., 2015; C. L. Thompson et al., 2011) og oversiktsartikler (O’Callaghan et al., 2019).

Eksempelvis var det i Bo Ma og medarbeideres forsøk med proteomisk analyse av rotteserum et nært forhold mellom kronisk søvnmangel, endringer av serumproteiner og metabolske/kardiovaskulære dysfunksjoner (Ma et al., 2018). I deres studie ble det også nevnt at endret ekspresjonsnivå til enkelte protein kunne indusere celledress og vevskade, inkludert hjerteinfarkt, iskemi, betennelse, apoptose og oksidativt stress. Dette stemmer godt overens med våre funn og dermed kan en si at dataene i bacheloroppgaven støttet opp mot tidligere forskning mtp. søvndeprivasjon, kvantitative proteinendringer, biologiske veier og sykdom.

Endringer i proteomet ved søvnmangel kan også bidra til å forstyrre utskillelsen av hormoner (f.eks. Skjoldbruskkjertelstimulerende hormon), påvirke nevroendokrin funksjon og forstyrre melatoninrytme (Ma et al., 2018). Det tyder på at identifiseringen av protein assosiasjonsnettverk koblet til døgnrytmisk og homeostatisk søvnregulering i fremtiden kan bidra til diagnose og persontilpasset behandling av søvnforstyrrelser (Bjørkum et al., 2020 submitted; O’Callaghan et al., 2019). Dette underbygger at serumproteinendringer ved søvnmangel og døgnrytmeforstyrrelse ved nattskiftarbeid er felt som bør forskes videre på.

5. Konklusjon

I denne bacheloroppgaven ble det indentifisert 590 protein i de humane blodserumprøvene etter TMT-merking, fraksjonering, og proteomisk massespektrometri-analyse. Totalt 63 av disse proteinene var kvantitativt signifikant endret etter 6 timers søvndeprivasjon på natt.

Funksjonell protein og gen-anrikningsanalyse i databasene STRING, WebGestalt, OMIM og KEGG 2019 indikerte at serumproteinendringer ved 6 t søvndeprivasjon kunne påvirke biologiske veier og føre til ulike patologiske tilstander. Resultatene tydet på at søvnmangel kunne knyttes til sykdommer som Alzheimer, prionsykdommer, hjerte-kar sykdommer (hyperkolesterolemi), diabetes, synssvekkelse (AMD) og ulike typer kreft som brystkreft. I tillegg kunne endringene i proteomet etter søvnmangel påvirke biologiske veier som koagulasjonskaskaden, hormonsyntese, metabolisme og immunrelaterte prosesser.

Mange gener og tilhørende protein kunne i anrikningsanalysene kobles mot de cellulært endrede prosessene, eksempelvis kunne transkripsjonsundertrykkelse av celleadhesjonsprotein i kadherin familien (CDH1) være årsak til brystkarsinom (Xiao et al., 2019). De proteomiske endringene kunne også tyde på en prooksidativ, proinflammatorisk og proapoptotisk endring i cellene, noe som tyder på aktivert cellulær stressrespons. Litteratursøk viste at funnene våre var sett i tidligere studier, som bl.a. fra Bjørkum og medarbeidere (Bjørkum et al., 2020 submitted), modelldyrstudier (Ma et al., 2018; Naidoo et al., 2009) og epidemiologiske studier (Cedernaes et al., 2015; C. L. Thompson et al., 2011). Endringer i proteomet ved søvnmangel kunne også bl.a. påvirke nevroendokrin funksjon og hormonproduksjon (Ma et al., 2018), og det tyder på at identifiseringen av protein assosiasjonsnettverk koblet til døgnrytmisk og homeostatisk søvnregulering i fremtiden kan bidra til diagnose og av søvnforstyrrelser (Bjørkum et al., 2020 submitted; O'Callaghan et al., 2019).

Resultatene i bacheloroppgaven indikerte altså en årsakssammenheng mellom søvndeprivasjon på natt, kvantitative proteinendringer i serum, og patologiske tilstander som kreft og Alzheimers. Serumproteinendringer ved søvnmangel pga. nattskiftarbeid er felt som bør forskes videre på.

6. Referanseliste

- Agostino, M. (2013). *Practical bioinformatics*. Garland Science.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Essential cell biology* (4th ed.). Garland Science.
- Alvsvåg, SK., Stange, E. (2003). Proteinekspresjon etter søvndeprivasjon. BUC/HIB, Biomedical Laboratory Sciences Program, Bergen, NO and Rogalansforskning/International Research Institute Stavanger (IRIS), Stavanger, NO.
- Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Schiettecatte, F., Scott, A. F., & Hamosh, A. (2015). OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D789–D798. [Internett] [Hentet 17.03.2021] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1093/nar/gku1205>
- Amlaner, C. J., Fuller, P. M. (2009). Sleep Research Society: *Basics of sleep guide* (2th ed). Westbrook Corporate Center.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. [Internett] [Hentet 12.03.2021] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1111/j.25176161.1995.tb02031.x>
- Bergesen, J.I., Nybakk, J.N., Sande, S. (2019). Proteinmarkører for cellestress ved nattskiftarbeid. (Bacheloroppgave). Høgskulen på Vestlandet.
- Bishop, M. L., Fody, E. P., & Schoeff, L. E. (2013). *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations* (7th ed.). Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Bjorvatn, B. (2013). *Bedre søvn: En håndbok til deg som sover dårlig* (2. utg.). Fagbokforl.
- Bjorvatn, B. (2019). *Skiftarbeid og søvn: Slik mestrer du nattarbeid og uregelmessig arbeidstid*. Fagbokforl.
- Busk, S.A., Skogland, K., (2009). *Inflammation and Sleep*. BUC/HIB, Biomedical Laboratory Sciences Program, Bergen, NO and Dept. of Neurology, Harvard University and Children's Hospital, Boston, USA.
- Bjørkum, A.A., Carrasco, D.A., Berven, F., Sinha, R.D., Rosendahl, K., Birkeland, E., Stuhr, L [manuscript submitted for publication (2020)]: Human blood serum proteome changes after 6 hours of sleep deprivation at night.

- Bjørkum, A. A., Oveland, E., Stuhr, L., Havnes, M. B., Berven, F., Grønning, M., & Hope, A. (2017). Fast hyperbaric decompression after heliox saturation altered the brain proteome in rats. *PLOS ONE*, *12*(10), e0185765. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185765>
- Bjørneboe, G.-E. (2017). Store Medisinske Leksikon: *biomarkører*. [Internett] [Hentet 12.02.2021] Tilgjengelig fra <https://sml.snl.no/biomarkører>
- Cedernaes, J., Schiöth, H. B., & Benedict, C. (2015). Determinants of Shortened, Disrupted, and Mistimed Sleep and Associated Metabolic Health Consequences in Healthy Humans: *Diabetes*, *64*(4), 1073–1080. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.2337/db14-1475>
- Chang, R., Goldsby, K. A. (2014). General chemistry: The essential concepts, Mc Graw Hill, seventh edition, 2014.
- Cornell, B. (2016). Bioninja: *Overview of Translation*. [Internett] Tilgjengelig fra <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/27-dna-replication-transcri/translation.html>
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology & Medicine*, *95*, 27–42. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in cancer biology*, *35*(Suppl), S25–S54. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Guldbrandsøy, J., Rødset S. (2016). Changes in human blood serum proteome after 6 hours of sleep deprivation at night. BUC/HiB, Biomedical Laboratory Sciences Program, Bergen, NO.
- Gråbøl-Undersrud, E. (2020). Store norske leksikon: *Proteinsyntese*. [Internett] Tilgjengelig fra <http://snl.no/proteinsyntese>
- Hagen, L. (2013). Proteomikk - snart klart for klinikken? *Bioingeniøren*, *3*, 24-27.

- Harris, D. C., & Lucy, C. A. (2019). *Quantitative chemical analysis* (10 utg.). W. H. Freeman and Company.
- Heier, M. S. (2011). *Søvn og døgnrytme*. Cappelen Damm akademisk.
- Helbæk, M. (2001). *Statistikk for kjemikere*. Tapir. [Internett] Tilgjengelig fra [https://www.nb.no/search?q=oaiid:"oai:nb.bibsys.no:990122719934702202"&mediatype=bøker](https://www.nb.no/search?q=oaiid:)
- Herzog, J., Schmidt, F. P., Hahad, O., Mahmoudpour, S. H., Mangold, A. K., Garcia Andreo, P., Prochaska, J., Koeck, T., Wild, P. S., Sørensen, M., Daiber, A., & Münzel, T. (2019). Acute exposure to nocturnal train noise induces endothelial dysfunction and pro-thromboinflammatory changes of the plasma proteome in healthy subjects. *Basic Research in Cardiology*, *114*(6), 46. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0753-y>
- Holtebekk, T., Bjørnstad, T., Linder, J. (2019). Store norske leksikon: *Isotop* [Internett] [Hentet 12.02.2021] Tilgjengelig fra <https://snl.no/isotop>
- Holtebekk, T., Uggerud, E., Wibetoe, G., (2018). Store norske leksikon: *Massespektrometer* [Internett] [Hentet 12.02.2021] Tilgjengelig fra <https://snl.no/massespektrometer>
- Holm, I, Kirkevoll, M, Kroksveen, AC, Sætersdal, EK. (2005). BUC/HIB, Proteomiske analyser ved cellulært stress. Biomedical Laboratory Sciences Program, Bergen, NO.
- Husøy, A. M. (2021). Store medisinske leksikon: *CRP – C-reaktivt protein*. [Internett] Tilgjengelig fra http://sml.snl.no/CRP_-_C-reaktivt_protein
- Ingebrigtsen, H. B., Kolstad, H., Myhr, I., M. (2004). Reduksjon i heat shock protein 70 i humant serum etter søvndeprivasjon målt med en ELISA metode. BUC/HIB, Biomedical Laboratory Sciences Program, Bergen, NO, 2004.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Katayama, T., Kawashima, S., Okuda, S., Tokimatsu, T., & Yamanishi, Y. (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment: *Nucleic Acids Research*, *36*(Database issue), D480-484. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1093/nar/gkm882>
- Kingsmore, S. F. (2006). Multiplexed protein measurement: Technologies and applications of protein and antibody arrays: *Nature reviews. Drug discovery*, *5*(4), 310–320. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1038/nrd2006>

- Kohan, A. B., Wang, F., Lo, C.-M., Liu, M., & Tso, P. (2015). ApoA-IV: Current and emerging roles in intestinal lipid metabolism, glucose homeostasis, and satiety. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(6), G472–G481. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00098.2014>
- Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, 67, 225–257. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635>
- Lehmann, S. (2018) Helse Bergen: *Søvnapné hos voksne*. [Internett] [Hentet 28.02.2021] Tilgjengelig fra <https://helse-bergen.no/nasjonalt-kompetansetjeneste-for-sovnsykdommer-sovno/sovnapn-hos-voksne>
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E. J., Shi, Z., & Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: Gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W199–W205. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1093/nar/gkz401>
- Ma, B., Chen, J., Mu, Y., Xue, B., Zhao, A., Wang, D., Chang, D., Pan, Y., & Liu, J. (2018). Proteomic analysis of rat serum revealed the effects of chronic sleep deprivation on metabolic, cardiovascular and nervous system. *PLOS ONE*, 13(9), e0199237. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199237>
- Majde, J. A., Krueger, J. M. (2005). Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology: *Links between the innate immune system and sleep*. *J Allergy Clin Immunol*
- Martinsen, L., & Kristensen, T. (2019). Store Norske Leksikon: Proteomikk [Internett] [Hentet 12.02.2021] Tilgjengelig fra <https://snl.no/proteomikk>
- Mckenzie, S., B. (2014). *Clinical Laboratory Hematology* (2. Ed.), Edinburgh Gate
- Meling, I., F. (2017). Changed protein expression in saliva after 6 hours of sleep deprivation at night - a proteomic and systems biological study. Department of Biomedical Laboratory Sciences and Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Business Administration, Western Norway University of Applied Sciences, Bergen, NO, 2017.
- Mosendane, T., Mosendane, T., Raal, F. J. (2008). Shift work and its effects on the cardiovascular system: *Cardiovascular Journal of Africa*, 19(4), 210–215.

- Myrmel, S.L., Varnes, B.K., Nilsen-Nygaard, J. (2008). Endring av alpha-amylaseaktivitet i humant saliva etter lett søvndeprivasjon. BUC/HIB, Biomedical Laboratory Sciences Program, Bergen, NO.
- Nagai, M., Hoshida, S., Kario, K. (2010). NCBI: Sleep duration as a risk factor for cardiovascular disease- a review of the recent literature. [Internett] Tilgjengelig fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2845795/>
- Naidoo, N. (2009). Cellular stress/the unfolded protein response: Relevance to sleep and sleep disorders. *Sleep Medicine Reviews*, 13(3), 195–204. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1016/j.smr.2009.01.001>
- Naidoo, N., Ferber, M., Master, M., Zhu, Y., & Pack, A. I. (2008). Aging Impairs the Unfolded Protein Response to Sleep Deprivation and Leads to Proapoptotic Signaling. *The Journal of Neuroscience*, 28(26), 6539–6548. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5685-07.2008>
- Naidoo Nirinjini. (2011). Potential of Proteomics as a Bioanalytic Technique for Quantifying Sleepiness. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 7(5 Suppl), S28–S30. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.5664/JCSM.1354>
- NAPI. (u.å.). *Orbitrap Eclipse*. [Internett] [Hentet 15. februar 2021], Tilgjengelig fra <https://www.napi.uio.no/ms-instruments/university-of-bergen-%28probe%29/orbitrap-eclipse.html>
- NCBI. (u.å.). *S100A6 [Homo sapiens] – Gene*. [Internett] [Hentet 01.02.2021] Tilgjengelig fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=6277>
- O’Callaghan, E. K., Green, E. W., Franken, P., & Mongrain, V. (2019). Omics Approaches in Sleep-Wake Regulation. I H.-P. Landolt & D.-J. Dijk (Red.), *Sleep-Wake Neurobiology and Pharmacology* (s. 59–81). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2018_125
- Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., & Mann, M. (2007). Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nature Methods*, 4(9), 709–712. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1038/nmeth1060>
- Padøy, T., Haugland, G., Magnussen, G. (2007) Endring av immunoglobulin A i humant saliva ved lett søvndeprivasjon målt med ELISA metode. Biomedical Laboratory Sciences Program, Bergen, NO.

- Papantoniou, K., Castaño-Vinyals, G., Espinosa, A., Aragonés, N., Pérez-Gómez, B., Burgos, J., Gómez-Acebo, I., Llorca, J., Peiró, R., Jimenez-Moleón, J. J., Arredondo, F., Tardón, A., Pollan, M., & Kogevinas, M. (2015). Night shift work, chronotype and prostate cancer risk in the MCC-Spain case-control study. *International Journal of Cancer*, *137*(5), 1147–1157. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1002/ijc.29400>
- Perdomo, G., & Dong, H. H. (2008). Apolipoprotein D in Lipid Metabolism and Its Functional Implication in Atherosclerosis and Aging. *Aging (Albany NY)*, *1*(1), 17–27.
- Pinotti, M., Bertolucci, C., Frigato, E., Branchini, A., Cavallari, N., Baba, K., Contreras-Alcantara, S., Ehlen, J. C., Bernardi, F., Paul, K. N., & Tosini, G. (2010). Chronic sleep deprivation markedly reduces coagulation factor VII expression. *Haematologica*, *95*(8), 1429–1432. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.022475>
- Rasmussen, L. J. H., Schultz, M., Gaardsting, A., Ladelund, S., Garred, P., Iversen, K., Eugen-Olsen, J., Helms, M., David, K. P., Kjær, A., Lebech, A.-M., & Kronborg, G. (2017). Inflammatory biomarkers and cancer: CRP and suPAR as markers of incident cancer in patients with serious nonspecific symptoms and signs of cancer. *International Journal of Cancer*, *141*(1), 191–199. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1002/ijc.30732>
- Romundstad, P., R. (2020). Store norske leksikon: *Interaksjon* [Internett] [Hentet 19.03.2021] Tilgjengelig fra <https://sml.snl.no/interaksjon>
- Sand, O., Sjaastad, Ø. V., Haug, E., Bjålie, J. G., & Toverud, K. C. (2006). *Menneskekroppen: Fysiologi og anatomi* (2. utg.). Gyldendal akademisk.
- STRING (u.å.): *functional protein association networks*. [Internett] [Hentet 13. mars 2021], Tilgjengelig fra <https://string-db.org/>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. von. (2019). STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, *47*(Database issue), D607–D613. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

- ThermoScientific TMTpro™. (2019).
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A44520>
- ThermoScientific TMTpro™ (2013). Q Exactive Plus: Hybrid, quadrupole-orbitrap mass spectrometer. [Internett] Tilgjengelig fra <https://planetorbitrap.com/>
- Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A. K. A., & Hamon, C. (2003). Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS: *Analytical Chemistry*, 75(8), 1895–1904. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1021/ac0262560>
- Thompson, C. L., Larkin, E. K., Patel, S., Berger, N. A., Redline, S., & Li, L. (2011). Short duration of sleep increases risk of colorectal adenoma: *Cancer*, 117(4), 841–847. <https://doi.org/10.1002/cncr.25507>
- Tor, L. (2006). Immunologi og immunologiske teknikker (3.utg.). Fagbokforlaget
- Touitou, Y., Reinberg, A., & Touitou, D. (2017). Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life Sciences*, 173, 94–106. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.02.008>
- Tsai, C.-F., Smith, J. S., Krajewski, K., Zhao, R., Moghieb, A. M., Nicora, C. D., Xiong, X., Moore, R. J., Liu, T., Smith, R. D., Jacobs, J. M., Rajagopal, S., & Shi, T. (2019). Tandem Mass Tag Labeling Facilitates Reversed-Phase Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Hydrophilic Phosphopeptides. *Analytical chemistry*, 91(18), 11606–11613. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01814>
- Tyanova, S., & Cox, J. (2018). Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. I L. von Stechow (Red.), *Cancer Systems Biology: Methods and Protocols* (s. 133–148). Springer. [Internett] Tilgjengelig fra https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1_7
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13(9), 731–740. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>

- Ursin, R. (1996). *Søvn: En lærebok om søvnfysiologi og søvnsykdommer*. Cappelen akademisk forl.
- Uniprot. (u.å.). *Gamma-glutamylcyclotransferase (GGCT)*. [Internett] [Hentet 20.03.2021] Tilgjengelig fra <https://www.uniprot.org/uniprot/O75223>
- Vedaa. Ø., Harris, A., Waage, S., Bjorvatn, B., Thun, E., Buchvold, H.V., Djupedal, I. L. R., Pallesen, S., (2020) NCBI: A longitudinal study on the association between quick returns and occupational accidents. [Internett] [Hentet 22.03.2021] Tilgjengelig fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7737807/>
- Vekariya, U., Rawat, K., Saxena, R., & Tripathi, R. K. (2019). Identification of MΦ specific POTE expression: Its role in mTORC2 activation via protein-protein interaction in TAMs. *Cellular Immunology*, 335, 30–40. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.10.010>
- Waage, S., Pallesen, S., & Bjorvatn, B. (2007). Skiftarbeid og søvn. *Tidsskrift for Norsk psykologforening*, 44(4), 428-433.
- Xiao, B., Kuang, Z., Zhang, W., Hang, J., Chen, L., Lei, T., He, Y., Deng, C., Li, W., Lu, J., Qu, J., Zhou, Q., Hao, W., Sun, Z., & Li, L. (2019). Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 3 (GRIK3) promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by regulating SPDEF/CDH1 signaling. *Molecular Carcinogenesis*, 58(7), 1314–1323. [Internett] Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1002/mc.23014>

7. Ordliste

Biomarkør – Biomarkører er stoffer i biologiske materiale som kan påvises i en kropp/celle og som kvalitativt og/eller kvantitativt forteller noe om organismens tilstand (Bjørneboe, 2017) (Bjørneboe, 2019).

Cirkadian faktor – Dette er døgnrytmefaktor, som sier noe om døgnrytmen (Bjorvatn, 2013).

Chaperon – Dette er proteiner som hjelper andre proteiner med å folde seg korrekt, i tillegg så hindrer de aggregering av andre proteiner (Alberts et al., 2014).

Deltasøvn – deltasøvn, også kalt for slow wave-søvn er dyp søvn. Hjernebølgene er langsomme, og amplituden er høy. Deltasøvn er karakteristisk for N3 (Bjorvatn, 2019).

Histon – Histoner er en gruppe proteiner. De finnes i cellekjernen bundet til DNA-et. Histonene har en funksjon ved å pakke inn og beskytte DNA-et mot mekanisk skade (Alberts et al., 2014).

Homeostase – Homeostase er den komplekse fysiologiske prosessen som kroppen bruker for å stoppe en blødning ved skade (McKenzie, 2014).

Homeostatisk faktor – Dette er en døgnrytmefaktor, som sier noe om hvor lenge man har vært våkne (søvnbehovet) (Bjorvatn, 2013).

Interaksjon – Interaksjon betyr samhandling; og dette skjer når to faktorer eller prosesser på virker hverandre (Romundstad, 2020).

Melatonin – Melatonin er et hormon som kroppen trenger for å regulere døgnrytmen. Dette skyldes ut i epifysen, som er en liten kjerne i mellomhjernen (Bjorvatn, 2013).

Neurotransmittere – Neurotransmittere er et signalstoff som hjelper nervecellene til å kommunisere. Dette skilles ut av nerveceller og diffunderer over til målcellen i bestemte kontaktområder som kalles synapser. I synapsen har målcellene reseptorer for transmittermolekylene (Sand et al., 2006).

Polysomnografi – polysomnografi er objektiv søvnregistrering. Den gjør mulig å registrere hjernens elektriske aktivitet (EEG), muskeltonus (EMG), og øyebevegelser (elektro-okulografi, EOG) (Ursin, 1996).

Sentrale nervesystemet – Sentralnervesystemet (CSN) består av hjernen og ryggmargen, i motsetningen til det perifere nervesystemet som består av en rekke nerver som går parvis ut fra ryggmargen og de nederste delene av hjernen (Sand et al., 2006).

Søvnspindler – Dette er en rytmisk aktivitet og er karakteristisk for N2. Søvnspindler er raske, kraftige svingninger som blir sett ved elektroencefalografi, EEG. Den mest vanlige bølgefrequensen er 12-14 Hz (Bjorvatn, 2019).

8. Vedlegg

Vedlegg 1: Forespørsel om deltagelse i forskningsprosjektet

Stressrelaterte genuttrykks- og proteinuttrykksforandringer i ulike kroppsvæsker ved ulike former for fysisk og psykisk stress. Versjon 2 ved Bjørkum pr. 23.04.2019 Tilbakemelding ad REK-id (2019/253)



FORESPØRSEL OM DELTAKELSE I FORSKNINGSPROSJEKTET

STRESSRELATERTE GENUTRYKKS- OG PROTEINUTRYKKSFORANDRINGER I ULIKE KROPPSVÆSKER VED ULIKE FORMER FOR FYSISK OG PSYKISK STRESS.

Bakgrunn/mål: Dette er et spørsmål til deg om å delta i et forskningsprosjekt for å undersøke mulige endringer i genuttrykk og proteinuttrykk i kroppsvæsker og eventuelt hvite blodceller ved ulike fysiske og psykiske påkjenninger/stress som kan lede til cellulært stress.

Slike situasjoner kan være søvnmangel ved skiftarbeid (maks 3-6 timer redusert nattesøvn, kortere nattskift enn vanlig nattskiftarbeid, kun en natt), inneklima (spesielt lys, temperatur og luftfuktighet inkludert "elektrosmog" dvs. arbeid i rom med mye elektriske utstyr), eksamensstress og stress ved innlæring av blodprøvetaking.

Hvem kan delta: Frivillige voksne, selverklært friske, ikke røkende, ikke medisinerede forsøkspersoner av begge

HVA INNEBÆRER PROSJEKTET?

Aktuelle kroppsvæskeprøver som kan tas er humant blodserum/plasma, spytt og urinprøve (muligens munncelleprøve) som vil bli tatt etter gjeldende prosedyrer og retningslinjer, kun en prøve i hver prøvesituasjon f.eks. før og etter en stressrelatert situasjon. I kontroll og stressrelaterte situasjoner som ved 6 t søvnmangel på natt vil typisk prøveperioden gå over maksimalt 48 timer. Du kan avbryte deltagelsen på et hvilket som helst tidspunkt uten at det vil påvirke gjennomføringen av undersøkelsen.

Sikkerhet: Prøvetaking vil bli tatt etter gjeldende prosedyrer og retningslinjer. Risiko ved blod-, urin og spyttprøver ansees som svært liten, men dersom smerter, ubehag, påkjenninger, uhell eller komplikasjoner oppstår, vil prøvetakingen avbrytes og du vil få tilbud om oppfølging av lege.

Vi vil også orientere muntlig om studien og be om skriftlig samtykke. Det skal sikre at viktig informasjon er gitt i tråd med internasjonale regler for forskningsetikk. Prosjektet er vurdert og godkjent av Den regionale komité for medisinsk forskningsetikk i Helseregion Vest (REK III).

I prosjektet vil vi innhente og registrere opplysninger om deg som stressrelaterte proteiner fra kroppsvæsker som blodserum. Disse dataene vil bli anonymisert og dataene kun sammenlignet mellom kontroll og testsituasjon gruppevis (Single subject experimental design, SSED, der testpersonen er sin egen kontroll). Dersom en finner andre sykdomsrelaterte proteiner av klinisk betydning vil deltager bli kontaktet av ansvarlig lege i prosjektet.

MULIGE FORDELER OG ULEMPER

Fordeler med å være med i dette prosjektet er at du vil lære om betydningen av søvn og døgnrytme som er viktig for best mulig funksjon f.eks. ang. hukommelse og læring samt god fysisk og psykisk helse både på kort og lang sikt. Ulemper som ved et nattskift anses å være innenfor normal variasjon av stress selv om en klart vil

FRIVILLIG DELTAKELSE OG MULIGHET FOR Å TREKKE SITT SAMTYKKE

Det er frivillig å delta i prosjektet. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke.

Dersom du trekker deg fra prosjektet, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner. Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til prosjektet, kan du kontakte

Førsteamanuensis, Dr. scient. Alvhild Alette Bjørkum, Bioingeniørutdanningen, Høgskulen på Vestlandet,

aab@hvl.no tlf. 55 587627 ELLER SMS til 97673388

Professor, Dr. med. og overlege Karen Rosendahl, Radiologisk avdeling, Seksjon for barn, Haukeland Universitetssykehus

karen.rosendahl@helse-bergen.no tlf. 55 975221 alternativt

HVA SKJER MED OPPLYSNINGENE OM DEG?

Opplysningene som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med prosjektet. Du har rett til innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg og rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene som er registrert. Du har også rett til å få innsyn i sikkerhetstiltakene ved behandling av opplysningene.

Alle opplysningene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjenner opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger gjennom en navneliste. Det er kun prosjektleder Alvhild Alette Bjørkum og autoriserte personer som Prof. Dr. med Karen Rosendahl som har tilgang til denne listen.

Opplysningene om deg vil bli anonymisert eller slettet fem år etter prosjektslutt.

DELING AV DATA OG OVERFØRINGER TIL UTLANDET

Ved å delta i prosjektet, samtykker du også til at analyser av genuttrykk og proteinuttrykk i kroppsvæsker og eventuelt hvite blodceller etter stressrelaterte situasjoner kan skje på nasjonale plattformer som Probe ved BBB, UiB (<https://www.uib.no/rg/probe>) for slike analyser og tilsvarende analyseplattformer i utlandet som Proteome Sciences (<https://www.proteomics.com/>) med analytisk laboratorium i Frankfurt, Tyskland.

Dette kan være land med lover som ikke tilfredsstillende europeisk personvernlovgivning. Prosjektleder vil sikre at dine opplysninger blir ivaretatt på en trygg måte.

Koden som knytter deg til dine personidentifiserbare opplysninger vil ikke bli utlevert.

Alle genomiske- og proteomiske data som skal publiseres internasjonalt i dag krever at rådata tilgjengeliggjøres, selvsagt som fullstendig anonymiserte data. Dette er standardprosedyre ved publisering av slike data Se Bjørkum et al. 2017 samt at NFR og EU Horizon krever dette se «Forskningsetikk,

personvernprosesser ved HVL v/Heidi Skramstad 30 jan. 2019 og prosjektleder/Bjørkum's eksempel på dette publisert i 2017: (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185765>) utdrag siste setning i abstract: Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD006349

HVA SKJER MED PRØVER SOM BLIR TATT AV DEG?

Prosjektet er vurdert og godkjent av Den regionale komité for medisinsk forskningsetikk i Helseregion Vest (REK III). Alle opplysninger om deg, informasjon fra blodprøver, samt lagrete blod- og spyttprøver, vil bli oppbevart på vanlig måte, ihht. gjeldende regelverk for lagring av helsedata, samt i en egen forskningsdatabase ved HVL og spesifikk forskningsprosjektbiobank på Haukeland Universitetssykehus og eller HVL. Disse prøvene vil analyseres for stressrelaterte proteiner før og etter en stressituasjon som en simulert nattskiftnatt. Kun spesielt autoriserte personer vil ha tilgang til opplysningene som gjelder deg. Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres. Ved prosjektets slutt, vil navnet ditt bli slettet fra forskningsdatabasen.

Ved ytterligere spørsmål, kontakt

Prøvene som tas av deg skal oppbevares i en forskningsbiobank tilknyttet prosjektet.

Prøver fra blod, spytt og urin vil bli lagret i **Biobank for Cellestress** på Haukeland Universitetssykehus og eller HVL (Kronstad). HVL er ansvarshavende for Biobanken.

Biobanken opphører ved prosjektslutt.

Som nevnt over: Ved å delta i prosjektet, samtykker du også til at analyser av genuttrykk og proteinuttrykk i kroppsvæsker og eventuelt hvite blodceller etter stressrelaterte situasjoner kan skje på nasjonale plattformer som Probe ved BBB, UiB (<https://www.uib.no/rg/probe>) for slike analyser og tilsvarende analyseplattformer i utlandet som Proteome Sciences (<https://www.proteomics.com/>) med analytisk laboratorium i Frankfurt, Tyskland.

Dette kan være land med lover som ikke tilfredsstillende europeisk personvernlovgivning. Prosjektleder vil sikre at dine opplysninger blir ivaretatt på en trygg måte.

FORSIKRING

Det foreligger nødvendig forsikring av forskningsdeltakere i samsvar med helseforskningsloven § 50, jf. Forskrift om organisering av medisinsk og helsefaglig forskning § 3 bokstav d. Pasientskadeerstatningsordningen gjelder bl.a. dersom helsepersonell står for prøvetakingen i prosjektet.

GODKJENNING

Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk har vurdert prosjektet, og har gitt godkjenning REK (2019/253).

Etter ny personopplysningslov har forskningsansvarlig institusjon som her er Høgskulen på Vestlandet (HVL) og prosjektleder Alvhild Alette Bjørkum et selvstendig ansvar for å sikre at behandlingen av dine opplysninger har et lovlig grunnlag. Dette prosjektet har rettslig grunnlag i EUs personvernforordning artikkel 6 nr. 1a og artikkel 9 nr. 2a og ditt samtykke.

Du har rett til å klage på behandlingen av dine opplysninger til Datatilsynet.

KONTAKTOPPLYSNINGER

Dersom du har spørsmål til prosjektet kan du ta kontakt med

Førsteamanuensis, Dr. scient. Alvhild Alette Bjørkum, Bioingeniørutdanningen, Høgskulen på Vestlandet,

aab@hvl.no tlf. 55 587627 ELLER SMS til 97673388

Professor, Dr. med. og overlege Karen Rosendahl, Radiologisk avdeling, Seksjon for barn, Haukeland Universitetssykehus

karen.rosendahl@helse-bergen.no tlf. 55 975221 alternativt

Personvernombud ved institusjonen er Halfdan Mellbye personvernombudet@hvl.no eller halfdan.mellbye@sands.no

JEG SAMTYKKER TIL Å DELTA I PROSJEKTET OG TIL AT MINE PERSONOPPLYSNINGER OG MITT BIOLOGISKE MATERIALE BRUKES SLIK DET ER BESKREVET

Sted og dato

Deltakers signatur

Deltakers navn med trykte bokstaver

(Bergesen et al. 2019)

Vedlegg 2: Spørreskjema til forsøkspersonene

Spørsmål til forsøkspersonene:

Navn: _____ ID: _____

Kjønn: _____

Alder: _____

Høyde: _____

Vekt: _____ (Dette er frivillig å nevne)

1. Hvor er du i menstruasjonssyklus? (Dagen du får menstruasjon blir regnet som dag 1)
Dag nr: _____ (Det er frivillig om du vil svare på dette).
2. Går du på p-piller?
3. Røyker du til vanlig? Røyker du under forsøket?
4. Inntak av alkohol, kaffe, te og/eller brus siste døgnet og under forsøket? Eventuelt ja, hva?
5. Har du spist proteinrikt og fettriikt måltid siste døgnet og under forsøket? Eventuelt ja, hva?
6. Hvor mange timer sover du til vanlig pr. natt, ca.? Hvor mange timer sov du i natt, ca.?
7. Hvor stresset er du? Angi et tall på en skala fra en til ti, der en står for lavest stressnivå: ____
8. Er du syk under forsøket? Har du vært syk den siste uken?
9. på en skala fra en til fem hvor fysisk aktiv du er, der en står for lavest fysisk aktivitet:

(Haugland, Magnussen, & Torun, 2007)

Vedlegg: 3 Informasjon om forsøkspersonene

Tabellen under illustrerer hva forsøkspersonene, F1 til F8 har svart på i spørreskjemaet som er vist i vedlegg 2. Inntak av alkohol, energidrikker, brus, kaffe/te og inntak av proteinrikt & fettriakt måltid siste døgnet også under forsøket står under andre merknader.

Tabell 1: Informasjon om forsøkspersonene

Deltager	Kjønn	Alder	Høyde (cm)	Vekt (kg)	Røyker	P-piller	Stressnivå	Fysisk aktivitet	Syk i forsøksperioden	Søvn til vanlig	Søvn kontrollnatt, Somnolyf	Andre merknader
F1	Kvinne	23	170	67	Nei	Nei	4	3	Nei	7-9 t	6 t 28 min	Kaffe, Pepsi Max + pizza, egg
F2	Kvinne	22	169,5	60	Nei	Ja	6	4	Nei	7,5 t	6 t 50 min	Pizza, egg
F3	Kvinne	22	166	60	Nei	Ja	5	5	Nei	7-8 t	5 t 57 min	Kaffe, te, Cola Zero + pizza, egg
F4	Kvinne	22	160	55	Nei	Ja	4	5	Nei	7-8 t	8 t 16 min	Pepsi Max, te + pizza, egg
F5	Kvinne	57	170	82	Nei	Nei	3	2-3	Omgangssyke 17.-19.04 (en uke før forsøk), men frisk til kontrollnatt og SD-natt	6,5 t	6 t 49 min	Kaffe, te + pizza, laks, egg
F6	Kvinne	24	173	78	Nei	Nei	3	3	Nei	7 t	6 t 16 min	Red Bull, kaffe + egg, pizza
F7	Kvinne	21	168	60	Nei	Ja	3	3	Nei	6-8 t	7 t 31 min	Laks, egg, pizza
F8	Kvinne	29	175	100	Nei	Nei	5	2	Nei	7 t	7 t 24 min	Kaffe + laks, pizza, egg

(Bergesen et al. 2019)

Vedlegg 4: Følgende regler gjelder ved prøvetaking og behandling av prøvene

1. Hver deltager vil motta et identifikasjonsnummer (F1, F2 etc.) for å sikre anonymitet.
2. Glassene må merkes med identifikasjonsnummer for deltager og prøvetidspunkt (klokkeslett og dato). Prøvetidspunktet må angis nøyaktig på minuttet.
3. Deltaker må ligge minst 15 minutter før prøvetakingen.
4. Prøvene skal plasseres i frys ved -20°C umiddelbart etter prøvetaking, for så at prøvene skal fryses ved -80°C innen 96 timer.
5. Prøvene skal transporteres kjølig og på en sikker og trygg måte.

(Haugland et al., 2007, s.50-52)

Vedlegg 5: Søvnhygieniske regler som skal følges under forsøksperioden

1. Mosjon er bra for både kropp og sinn – men senest 3 timer før leggetid. Mosjoner gjerne utendørs i dagslys.
2. Dagslys: minst 30 minutt dagslys daglig, helst morgen eller i løpet av formiddagen.
3. Regelmessig døgnrytme. Stå opp og gå i seng til samme tid hver dag.
4. Viktig: soverommet skal kun brukes til å sove på; ikke arbeidsrom, TV-titting og lignende.
5. Ha frisk luft og passelig temperatur på soverommet. Ikke for varmt (ideelt 17 °C).
6. Ha det mørkt på soverommet. Mørke gardiner. Unngå sterkt lys dersom du våkner om natten (for eksempel ikke slå på taklampen). Helst støyfritt, bruk eventuelt ørepropper.
7. Et lite, lett måltid i god tid før du går i seng. Du skal ikke være sulten, men heller ikke spise store, tunge måltider de siste timene før leggetid.
8. Unngå koffein: kaffe, cola, Red Bull og andre koffeindrikke før kl. 0900 og ikke etter kl. 1700.
9. Ikke alkohol og røyking under søvnforsøket.
10. Roe ned: fysisk og psykisk nedtrapping de siste to timene før man skal sove. Rolig fysisk aktivitet. Helst sitte stille, lese bok eller avis, se fjernsyn, strikke eller en annen rolig hobby.

(Haugland et al., 2007, s.48-49)

Vedlegg 6: Under kontrollnatt og søvndeprivasjonsnatt må man forholde seg til følgende

1. Man må være i liggende stilling mellom kl.21.45 og kl.07.00. Dette medfører at man må legge seg kl.21.45, og stå opp kl.07.00 den påfølgende dagen. Man kan ikke spise mellom kl.21.45 og kl.07.00.
2. Man kan ikke tygge tyggegummi eller drops, da dette stimulerer spyttproduksjonen.
3. Søtningsmidler (sukkerfrie produkter) bør unngås under hele forsøket.
4. Man kan ikke ha drukket alkohol minst 12 timer før.
5. Om man pusser tennene må dette gjøres minimum en time før salivaprøven skal tas.
6. Man bør unngå å stå opp i løpet av natten, dersom det ikke er nødvendig.
7. Man må ikke spise større måltider, eller mat med høyt innhold av sukker og syre den siste timen før prøven tas.

Under søvndeprivasjonsnatt gjelder også følgende:

1. Man kan se TV, men bør unngå stimulerende programmer, som skrekkfilmer. Men minimalt med TV-titting.
2. Man kan lese bøker/blader e.l.
3. Man kan ikke spille TV-spill/PC-spill/brettspill.
4. Det må være mørkt i rommet fra kl. 22.00. Kun svak belysning er lov.
5. Mellom kl. 04.00 og kl. 07.00 vil deltager kunne sove.

(Haugland, et al., 2007, s. 49-50)

Vedlegg 7: Prosedyre for blodprøvetaking

1. Prøvetaking forberedelser
2. Pasienten skal ligge, og armen skal ligge stødig, avslappet og nedover slik at rørene blir fylt fra bunnen og opp.
3. Plasser stasen på oversiden av armen, stram, finn årene og hvor man vil ta prøven og løs stasen. Vask punksjonsstedet med desinfeksjon.
4. Finn frem nål, grønn nål burde holde, eller bytt til svart hvis åren er tynn.
5. Stram stasen rett før man skal ta prøven, fjern beskyttelsen på nålen, ta prøven med en 15 graders vinkel og med overflaten på nålen skal vendes opp.
6. plasser så valgt rør i kanyleholderen og løs stasen når du får blodsvar.
7. Fyll ett fullblodsrør uten tilsetning 5,5ml.
8. Fjern røret når det er fullt og vend det 8-10 ganger før det plasseres i stativet.
9. Når prøvetakningen er ferdig, ta en bomullsdott og legg forsiktig over punksjonsstedet og ta nålen forsiktig ut uten å legge press på bomullen.
10. Sikrer nålen ved ett håndsteknikk vekk fra pasienten og kast den i stikkende-skjærende avfall.
11. Merk alle glassene med en gang med pasientens identifikasjonsnummer, prøvetakings dato og klokkeslett.
12. Prøvene skal koagulerer i 45min pluss/minus 5min.
13. Sentrifuger prøvene i romtemperatur i 10 min ved 3000rpm (1500G).
14. Pipetter ut serum (NB: uten hemolyse eller klott), fordel serumet i alikvoter/ paralleller i 300 µL polypropylenrør som tåler -80°C. Skal ha tre paralleller fra hver prøve, to til PROBE/Biobanken og ett til å ha som reserve.
15. Merk rør med en vannfast tusj som tåler -80°C.
16. Frys og oppbevar prøven ved -20°C øyeblikkelig etter prøvetaking.
17. Flytt prøvene så til -80°C ved frys på PROBE innen 96 timer.

(Bergesen et al. 2019)

Vedlegg 8: prosedyre for BCA protein assay

(Lierpad)

BCA Protein Assay (Pierce)

This assay does not tolerate reducing reagents like DTT, GSH and beta-mercaptor ethanol – for this use the BioRAD assay buffer. It does however tolerate SDS and other ionic detergents.

Into A1 – A6

And B1 – B6 of a 96 well plate, pipette in μl :

	0	1	2	3	4	5
Water	10	8	6	4	2	0
Bovine IgG	0	2	4	6	8	10
Lysis Buffer	5	5	5	5	5	5

*The amount and type of lysisbuffer used here should be matched to the sample. 5 μl sample should be used for samples that are expected to be

of a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, such that the OD values obtained fall within the most linear part of the standard curve. For more concentrated samples, use less.

** IgG 1 mg/ml aliquots in -20°C freezer

*** in general use IgG standards – if using BSA standard provided with the kit, make sure to note that your measurements will be read as μg BSA units in contrast to other μg measurements used in the lab.

Into other wells, pipette: 10 μl water

5 μl sample*

set these up in duplicates

In a Universal, mix

BCA Solution

(10 ml)

Copper Sulphate solution

(0.2 ml)

In a 50:1 ratio

Volumes will depend on how much you need.

2 μl 24 μg → 2 μl + 3 μl BSA
4 μl + 1 μl BSA

Spe BSA-S

Spe BSA-Pierce

10.2ml

50

11:10

→ 1.5 μl sample + 3.5 μl BSA

Add 200 μ l of the BCA/CuSO₄ solution to each well.

Put the plate in the plate reader, mix the plate 3 x 10s on "High"

Cover the plate (with a P2 Tip box lid, these are in the box with the 96well plates).

Put it in the 37 ° Incubator for 30 min.

Wipe the bottom of the plate well to remove condensation.

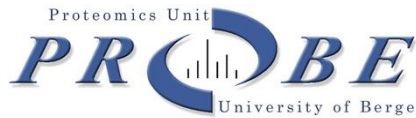
Ping any bubbles in the wells with a yellow tip.

Read the plate in the plate reader on "BCA Protein Assay" under "Open Existing" menu.

Determine protein concentration in mg/ml IgG units

by linear regression in Excel: Draw a graph like this:

Vedlegg 9: Prosedyre for trypsinering, PROBE



Proteomics Unit at University of Bergen

Department of Biomedicine, University of Bergen, Jonas Lies vei 91

N-5009 Bergen. Ph. +47 55586368

Heat Denaturation Digestion Protocol

Heat digestion:

Add **10 – 20 µl buffer** (*see right panel*), and incubate at RT in Eppendorf mixer for 5 min (slow agitation).

Reduction

Add **2 -4 µl 100 mM DTT** (*see right panel*), to achieve a 10 mM DTT solution.

Heat

Heat sample for 6 minutes at 95°C in an Eppendorf mixer. Let sample cool down to room temperature.

Alkylation

Add **3 – 6 µl 200 mM IAA** (*see right panel*) for cysteine alkylation, and incubate for 1h at RT in the dark

(Note: Iodoacetamide is unstable and light-sensitive. Prepare solutions immediately before use and perform alkylation in the dark. If iodoacetamide is present in limiting quantities and at a slightly alkaline pH, cysteine modification will be the exclusive reaction. Excess iodoacetamide or non-buffered iodoacetamide reagent can also alkylate amines (lysine, N-termini), thioethers (methionine), imidazoles (histidine) and carboxylates (aspartate, glutamate)).

Buffer: 50mM Tris/1mM CaCl₂:

Add **0.61g Tris** (art. no. 252859, Sigma-Aldrich) and **15mg CaCl₂ x 2H₂O** (art. no. 21097, Sigma-Aldrich, stabilize trypsin) to about 90ml dH₂O. Correct the pH to 7.8-8 with HCl and adjust the volume to 100ml. Store the solution at 4 °C.

100 mM DTT in MilliQ water:

Add **15.4 mg DTT** (DiThioThreitol, art. no. D-9163, Sigma-Aldrich) to 1ml dH₂O. (1M solution (154 mg/ml) may be aliquoted and kept in freezer).

200 mM IAA in MilliQ water:

Add **18.5 mg IAA** (Iodoacetamide, art. no. I-6125, Sigma Aldrich) to 0.5ml MilliQ water (must be freshly made and kept in the dark).

To avoid unwanted protease alkylation, **add 0.9 – 1.8**
 μ l 100 mM DTT, and incubate 10 min. at room
temperature.

Digestion



Sample dilution

Add **55 – 110 µl buffer** (the urea concentration is now reduced to 1M).

Trypsin addition for proteolysis

Add trypsin in amount about 50 times lower than the amount of protein in the sample. If the sample contains approx. Ex 100 µg protein, add 2µg of protease a 0.5 µg/µl. Check pH with a litmus paper. pH needs to be neutral/around 7 to 8. Incubate samples at 37 °C overnight (16h) on a thermo-shaker or in a heat cabinet.

Stock of trypsin a 0.5 µg/µl (Promega, art. no. V 5111);

Dissolve one ampoule (20 µg trypsin porcine powder) in 40 µl Promega resuspension buffer (50 mM HAc).

To make aliquots of Trypsin Porcine a 1µg per 10µl (Promega, art. no. V 5111);

Dissolve one ampoule (20 µg trypsin porcine powder) in 200 µl 50 mM acetic acid (resuspension buffer supplied from Promega). The trypsin concentration in this stock solution is then 0.1 µg/µl.

Aliquot a 10µl may be frozen at -20 °C for 1-2 months in aliquots. Trypsin stock solution may be diluted in buffer before use.

Acidification

In this final step, acidify with 10% TFA (trifluoroacetic acid) to a 0.5-1% final concentration of TFA (check with a litmus paper). Add 150-200 µl 0.1% TFA to dilute the sample to approx. 300µl. Proceed with desalting on OASIS C18, and dry in freezevac.

Vedlegg 10: Oasis protocol (C18 cleanup)

General notes: Method to de-salt and clean up sample after protein digestion from various digestion methods i.e filter aided sample preparation (FASP), in gel and in solution digestion. Some sample fractionation methods does not require C18 cleanup.

Equipment needed:

- Oasis 96 well cartridge plate
- 96 well waste plate
- 96 well elution plate
- Used Oasis 96 well cartridge and elution plate for balance when centrifuging.
- Appropriate centrifuge for plates
- Acetonitrile, Formic acid, Trifluoroacetic acid, MQ water.
- Pipettes

OASIS C18 cleanup:

NB! Your sample should not be added before step 5. Make sure that the solutions you add to the cartridge flows through. If not, the cartridge could be damaged, change cartridge. If you want to measure protein concentration on Nanodrop after Oasis, make sure step 9 and 10 is done with FA and not TFA.

1. Place Oasis 96 well cartridge plate into waste plate.
2. Activate cartridges by adding 500 μ L 80% ACN, 0.1% FA. 200 x g - 1 min. Discard flow trough
3. Wash cartridges by adding 500 μ L 0.1% TFA. 200 x g – 1 min. Discard flow trough
4. Repeat step 3 by adding 500 μ L 0.1% TFA. 200 x g – 1 min. Discard flow trough
5. Addition of 300 μ L sample. 150 x g – 3 min. Discard flow trough
6. Wash by adding 500 μ L 0.1% TFA. 200 x g – 1 min. Discard flow trough
7. Wash by adding 500 μ L 0.1% TFA. 200 x g – 1 min. Discard flow trough
8. Wash by adding 500 μ L 0.1% TFA. 200 x g – 1 min. Discard flow trough
9. Elute sample in 96 well elution plate. 100 μ L 80% ACN, 0.1% FA. 150 x g – 3 min.
KEEP FLOW THROUGH!

10. Elute sample in 96 well elution plate. 100 μ L 80% ACN, 0.1% FA. 200 x g – 1 min **KEEP FLOW THROUGH!**
11. Dry the samples in SpeedVac. To speed up the process put samples in - 80°C for 15 minutes.
12. When the samples are dried add 1% FA, 2% ACN

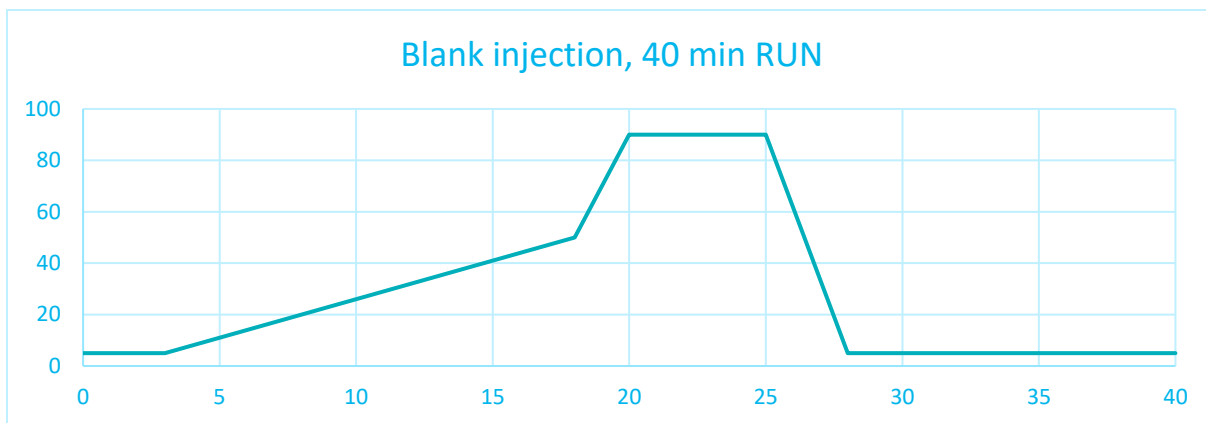
Vedlegg 11: High pH Reverse Phase Fractionation of TMT labelled peptides using Agilent 1200 HPLC

HPLC: Agilent 1260 with autosampler, fraction collector, UV detector (2 μ l flow cell), flow sensor operated in micro mode (max 100ul/min), and 100 μ L loading loop

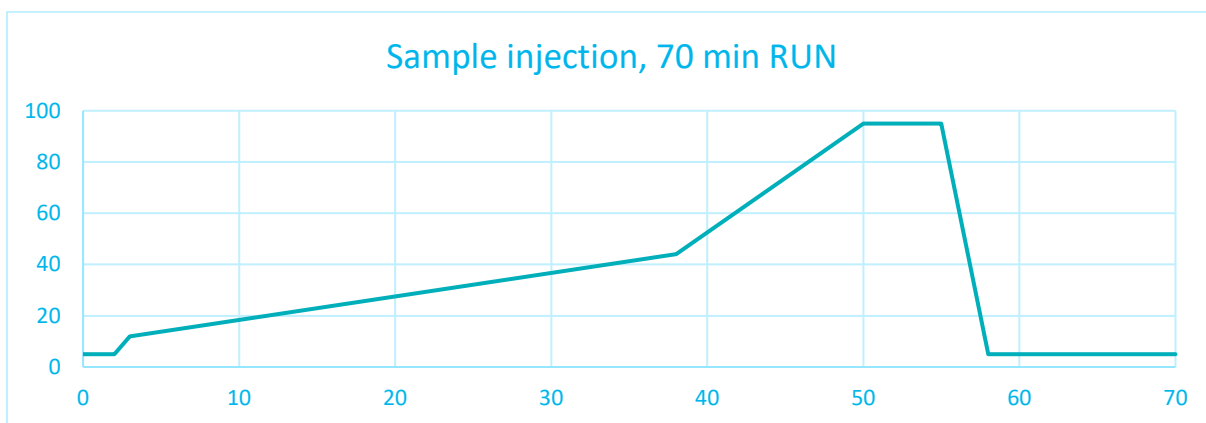
1. **Ammonium Formate 10M Stock:** 3.15g ammonium formate, dissolve and adjust to 5ml with MilliQ water
2. **Buffer A1:** 10mM Ammonium Formate, pH7.9: Mix 1 ml Ammonium formate 10M stock with 999 ml LC/MS grade water.
Adjust pH as required by adding (in 50 ul aliquots) 1.0 N NaOH using calibrated pH meter. Takes approximately 200-250 ul of NaOH to reach pH 7.9.
3. **Buffer B1:** 90:10 ACN-water: Mix 900 ml Acetonitrile (LC/MS grade) with 100 ml water (LC/MS grade).
4. **Loading Buffer:** Buffer A1
5. **96 well plates:** Eppendorf® Deepwell plates, Protein LoBind, 96 wells, 500 μ l capacity (P/N EP0030504119, Sigma Aldrich)
6. **Autosampler vials:** QuanRecovery with MaxPeak HPS 12 x 32 mm Screw Neck Vial, 300 μ L V-shaped (P/N 186009186, Waters Inc.)
7. **Column:** XSELECT CSH C18 3.5 μ m 1.0x150mm Column (P/N: 186005251, Waters)
8. **Blank injection:** Loading buffer
9. **Sample injection:** Desalted and dried sample, 40-70 μ g dissolved in 50-80 μ l Loading buffer. Load 35-65 μ g peptides.

LC gradients

Blank injection: Flow = 50 μ l/min, UV wavelength = 220 nm, inject 5 μ l loading buffer and run the following gradient (minutes (% B1)-etc): 0(5)-3(5)-18(50)-20(90)-25(90)-28(5)-40(5)



TMT sample: Flow = 50 μ l/min, UV wavelength = 220 nm, maximum injection volume, 100 μ l, run following gradient: 0(5)-2(5)-3(12)-38(44)-50(95)-55(95)-58(5)-70(5)



Fraction collection, 13 fractions

RT (min)	Timebased (min)	Timeslices
5	6	Yes
11	2.7	Yes
38	8	Yes
54	Off	