



KANDIDATEXAMENSARBETE
15 HP
STOCKHOLM, SVERIGE 2022

Mitokondriens dynamik i olika glukoskoncentra- tioner

**KTH Kandidatexamensarbete
rapport**

Edvin Löthgren and Anna Melnichenko

Abstract

Mitochondrial dynamics is still a rather unexplored area but with potential to become an important factor in the understanding and classifying of cells' behavior. This report aims to determine if differences exists for mitochondrial movement and fraction of fission and fusion events between MDCK II cells with different access glucose. Specifically cells in environments that corresponds to the complete lack of glucose ranging to blood sugar levels resembling those of untreated diabetes where studied.

The experiments indicates that a statistically significant difference exists for the speed distribution between cells in media with 0, 1000 and 3300 mg/L glucose while no considerable difference could be observed in fraction of fission and fusion events. The EMEM control group and the high (3300 mg/L) glucose DMEM showed similar behaviour in mitochondrial dynamics while the cells treated with 0 glucose DMEM and low (1000mg/L) glucose DMEM deviated from this pattern expected to be interchangeable with the normal media.

Limitations such as the amount of data and the programs used for analysis leads to a larger uncertainty factor in the results and should therefore be considered mainly as an initial indication for further studies.

Keywords

Bachelor Thesis, Mithochondria Dynamichs, Mitometer, High Bloodsugar, Diabetes

Abstract

Mitokondriens dynamik är ett ännu relativt outforskat område men skulle kunna vara en viktig faktor i att förstå och klassificera cellers beteenden. Denna rapport avser fastställa om betydande skillnader finns hos mitokondriers rörelse och andel som genomgår fission och fusion då värdcellen befinner sig i olika koncentrationer av glukos, specifikt sådana som motsvarar avsaknad av glukos i blodet och ohälsosamma blodsockernivåer liknande sådana som uppnås av obehandlad diabetes.

I undersökningen ges en först indikation att statistiskt signifikant skillnad förekommer hos hastighetsfördelningen mellan celler som befinner sig i cellmedium innehållande 0, 1000 och 3300 mg/L glukos medan ingen betydande skillnad kunde uppvisas i andel fissions och fusionsevent. Vidare uppvisades större likhet mellan celler i vanligt EMEM-cellmedium och låglukos-DMEM med tillsatt koncentration 3300 mg/L snarare än det med 1000 mg/l tillsatt glukos.

Till följd av begränsningar som datamängd och analysredskap är osäkerhetsfaktorn stor och resultatet ovan bör ses som en första indikation och vägledning för framtida undersökningar inom området.

Nyckelord

Kandidatexamensarbete, Mitokondriedynamik, Mitometer, Högt blodsocker, Diabetes

Acknowledgements

Vi vill rikta ett tack till vår handledare Hjalmar Brismar för att ha formulerat och tillhandahållit oss det projekt som är vårt kandidatexamensarbete. Vidare vill vi också ge ett speciellt tack till Linnea Påvénius, Sebastian Bauer och alla duktiga medlemmar i Brismar Group som har hjälpt oss sätta upp experiment, fördjupat vår insikt i laboratoriearbete och i allmänheten svarat på alla tänkbara frågor som dykt upp under projektet. Slutligen vill vi också tacka examinator Carlota Canalias och Martin Viklund som granskat rapporten.

Författare

Edvin Löthgren (eglo@kth.se) och Anna Melnichenko (annameln@kth.se)
Civilingenjör i Teknisk Fysik
KTH Kungliga Tekniska Högskolan

Plats för projekt

Stockholm Solna, Sverige
Science for Life Laboratory

Examinator

Carlota Canalias Alba Nova
KTH Kungliga Tekniska Högskolan

Supervisor

Hjalmar Brismar
Science for Life Laboratory
KTH Kungliga Tekniska Högskolan

Contents

1	Introduktion	1
1.1	Bakgrund	1
1.2	Problem	2
1.3	Syfte	2
1.4	Mål	2
1.5	Begränsningar	2
1.6	Outline	3
2	Metod	4
2.1	Cellodling	4
2.2	Mikroskopi	5
2.3	Modeller och program för analys	6
2.3.1	Bildbehandling innan	6
2.3.2	Mitometer	7
2.3.3	Statistiska metoder	7
3	Arbetet	8
4	Resultat	9
4.1	Förändring över tid	9
4.2	Jämförelse mellan koncentrationer	12
4.3	Fission och fusionsevent i olika koncentrationer	17
5	Slutsats	18
5.1	Diskussion	18
5.1.1	Skillnader och likheter mellan grupper	18
5.1.2	Begränsningar och potentiella felkällor	19
5.2	Framtida arbete	20
5.3	Avslutande ord	21
	References	22
A	Experimentell loggbok	26

B	Utökad data	29
B.1	Fördelning av förskjutning	29
B.2	Jämförelse över tid övriga koncentrationer	29
B.3	Jämförelse mellan koncentrationer för övriga tidpunkter	30
B.4	Fission och fusionsevent vid övriga tidpunkter	34

1 Introduktion

1.1 Bakgrund

Diabetes är en av de ledande dödsorsakerna hos människan och över 422 miljoner världen över uppskattas ha sjukdomen [10]. Höga blodsockernivåer som är en direkt följd av sjukdomen är toxiskt för kroppens celler vilket gör det av intresse att studera processer i cellens inre, speciellt organellen som står för den huvudsakliga omsättningen av glukos, mitokondrien. Mitokondrien är den del av cellen där den aeroba ämnesomsättningen sker med den viktiga energikällan ATP som slutprodukt. Idag är det känt att mitokondrien använder en del av den energi den producerar till att själv röra sig inom cellen. Vad som ger upphov till denna komplexa dynamik är ännu relativt outforskat [9] och en stor del av forskningen inom ämnet har främst riktat in sig på neuronmitokondrier, där dynamiken liknar men inte fullständigt representerar dynamiken i andra celltyper [2]. Att kartlägga upphovet till mitokondriers dynamik, så som att studera hur stor inverkan tillgången till glukos har, kan leda till utökad forskning inom en rad stora sjukdomar, inte minst diabetsforskningen [7]. Ett exempel på detta är att skillnader i riktning och hastighet har påvisats hos trippelnegativ bröstcancer, ER/PR positiv bröstcancer och vanliga bröstceller [8].

En mitokondrie varierar i storlek och form beroende på vilken typ av värdcell den befinner sig i och kan anta allt från punktformer till avlånga cylinderstrukturer [1]. Som visas i figur 2.1 är mitokondrierna som studerats i denna undersökning huvudsakligen av den senare typen och rör sig med en hastighet omkring 0.1 $\mu\text{m/s}$ i normal miljö (se sektion 4.2). Deras varierande form, tillsammans med förekomsten av fissions- och fusionsevent, gör det svårt att särskilja och följa enskilda mitokondrier under en tidsserie vilket är essentiellt för att bestämma hastighet, riktning och form hos dessa organeller. Med hjälp av flourescence mikroskopi kan vi följa mitokondriernas dynamik över tid. Ett konfokalmikroskop kan generera en upplösning på upp till 200 nm, med hjälp av denna teknik kan vi följa mitokondrierna och identifiera strukturella och dynamiska förändringar. Dessa bilder kan analyseras med hjälp av en deep learning algorithm kallad Mitometer som segmenterar och följer mitokondrien

i en bildserie. Mitometer är ett nyare open source-program som är anpassat för objektspårning av mitokondrier vilket skiljer sig från mertalet av de nuvarande trackingalgoritmerna som har svårt att hantera den komplexa rörelsen [8].

1.2 Problem

Mitokondriemotilitet och dynamik är har indikerats vara viktiga i sjukdomsmekanismerna underliggande flera patologier. Att identifiera skillnader mellan hälsosamma och sjuka rörelsemönster kan öppna dörrar för nya medicinska targets och behandlingsmöjligheter.

1.3 Syfte

Syftet med projektet är att undersöka mitokondriedynamik då de yttre förhållandena går från normala till något som mer efterliknar kroppens tillstånd hos någon som lider av obehandlad diabetes.

1.4 Mål

Målet med projektet är att statistiskt beskriva hur parametrarna medelhastighet, total förskjutning fusion och fission hos mitokondrier i en levande cell beror på den koncentration glukos cellen har tillgång till och hur den utvecklas över tid.

1.5 Begränsningar

Då kandidatexamensarbetet löper under en begränsad tid och parallellt med andra kurser tillkommer flera tidsbegränsade faktorer. Bland annat kommer datamängden från utförda experiment begränsas till vad som hinner mätas på plats i laboratoriet samt vad som effektivt kan behandlas av de program och analysredskap som beskrivs i 3.3. Vidare utförs all analys på egna laptops vilka inte alltid har processorkraft och minne för att hantera analysredskapen, som på grund av att det är nytt ännu inte är optimerat.

1.6 Outline

I kommande sektion presenteras metoden med kort teoretisk bakgrund innehållande avsnitt om hur celler har beretts, mätts och slutligen analyserats. Därefter följer ett kort avsnitt om hur det praktiska arbetet genomfördes och sedan det resultat projektet mynnat ut i. I resultatdelen jämförs först höga och normala koncentrationers hastighet över tid för att avgöra vilka tidpunkter som är av intresse att analysera. Detta följs med en jämförelse mellan de olika glukuskoncentrationernas hastighet och förskjutning där det avgörs om statistiskt signifikant skillnad förekommer. Slutligen tillkommer en kort analys om antalet fissions- och fusionsevent påverkas av glukoskoncentration. Rapporten avslutas med slutsatser och diskussion gällande resultatet samt förslag om framtida arbete inom området.

2 Metod

2.1 Cellodling

I projektet har huvudsakligen Madin-Darby canine kidney cells (MDCK II), stabilt transfecterade med GFP localiserat till mitokondriernas innermembran, används för experimenten. Cellerna hålls nedfrysta i ca -180 °C för att de så nära som möjligt ska återspegla en cell i dess naturliga miljö. Någon vecka innan experimenten planerats tas cellerna upp ur frysen och genomgår en upptiningsprocess. Cellerna värms i ett 37 °C vattenbad och blandas sedan försiktigt ner i EMEM (blandat med 1% streptomycin, 1% L-glutamin och 5% FBS) cellmedium. Blandningen centrifugeras sedan för att koncentrera levande friska celler i botten av provröret och möjliggöra avlägsnandet av supernatant. De friska cellerna löses sedan upp i önskad mängd medium i en filtrerad T25 cell culture flask. Nästkommande dag byts cellmediet ut mot nytt medium.

De upptinade cellerna förvaras i ett inkubator där temperatur och koldioxidhalt hålls på en miljö som ska återspegla kroppsförhållanden, 37 °C, 5% CO₂ och 90% luftfuktighet. Antalet celler ökar exponentiellt då varje enskild individ efter en viss tid delar sig till två och därför behöver delas upp regelbundet för att skapa utrymme för dem att växa (benämns split i resten av rapporten samt i loggbok). Split genomförs då cellkulturen börjar uppta nästan hela arean i den behållare de förvaras i, strax innan de blir konfluenta. Mediet från flaskan avlägsnas och cellerna tvättas med phosphate buffered saline (PBS). Därefter tillförs en mindre mängd trypsin för att bryta de bindningar cellerna har upprättat med flaskans insida så att cellerna flyter fritt, jämt fördelade i vätskan. Mer media tillförs och blandas runt och önskad andel överförs till en ny behållare som inkuberas till nästa split. Split genomförs alltid i samband med de experiment som utfördes i projektet för att effektivt kunna så ut celler av de som inte överförts till den nya behållare.

För experimenten sås celler ut i en 4-well cellculture plate. Varje brunn innehåller 200 µl media och ett tusental celler som kultiveras i 1-3 dagar innan mätning.

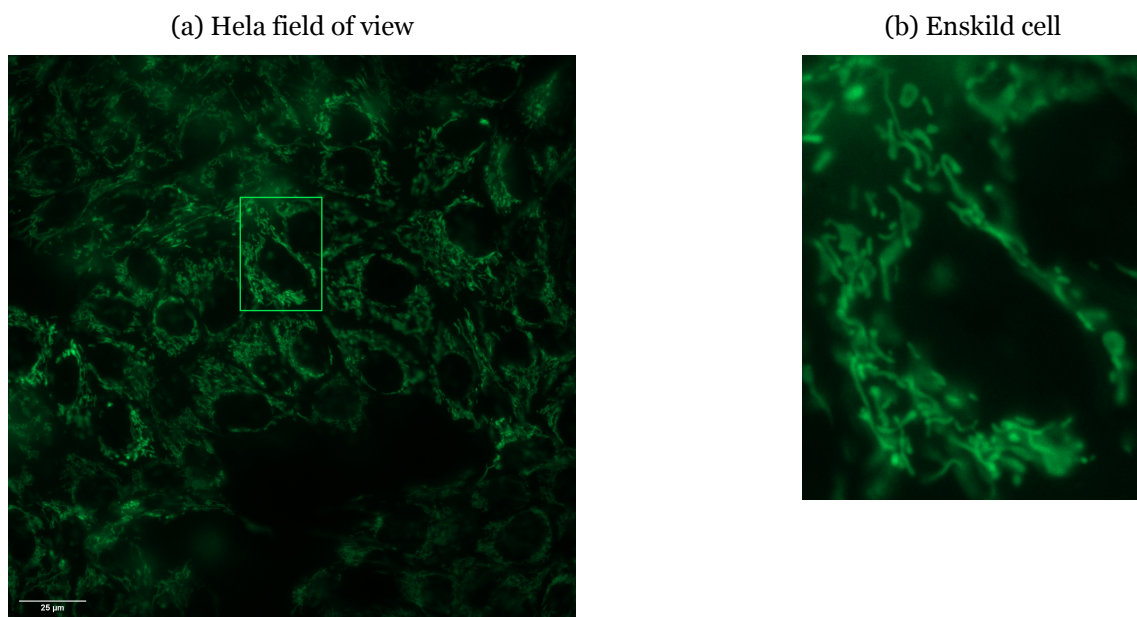
Innan provet läggs i mikroskopet byts mediet ut. I en kontrollbrunn tillförs vanligt EMEM som tidigare, medan i de övriga brunnarna tillförs det snarlika låglukos DMEM-mediat tillsammans med olika mängder koncentrerat glukos så att de tre brunnarna innehåller 0, 1000 och 3300 mg glukos per liter. För att hålla en jämn osmolalitet mellan cell och medium vid lägre än normala mängder glukos, tillförs motsvarande mängd mannitol som inte metaboliseras [11].

All behandling av celler genomförs i en steril miljö under dragskåp. Alla celler, kemikalier och material som används tillhandahålls av SciLife som köper in och förvarar det enligt sedvanlig process.

2.2 Mikroskopi

För mätningar används ett Zeiss LED Colibri 7 flourescerande mikroskop. Denna typ av mikroskop exciterar ett protein som sitter omkring mitokondrierna i cellen med hjälp av en laser. Proteinet utsänder sedan ett ljus med längre våglängd vilken kan registreras [12]. Våglängden hos lasern är anpassad för att inte excitera någon övrig del av cellen så att det utsända ljuset enbart ger mitokondriernas form mot svart bakgrund.

Figure 2.1: MDCK II celler från en kontrollgrupp timme 0



Mikroskopet ger en upplösning på omkring 0.1 micron per pixel vilken lämpar sig bra för trackingalgoritmen som beskrivs nedan. Bildserien sparas sedan i .czi-filformat.

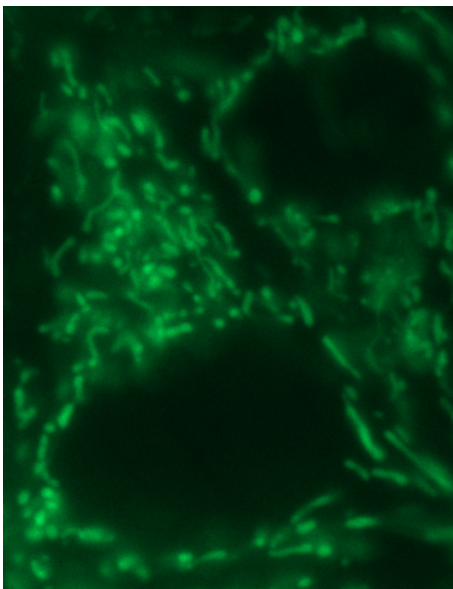
2.3 Modeller och program för analys

2.3.1 Bildbehandling innan

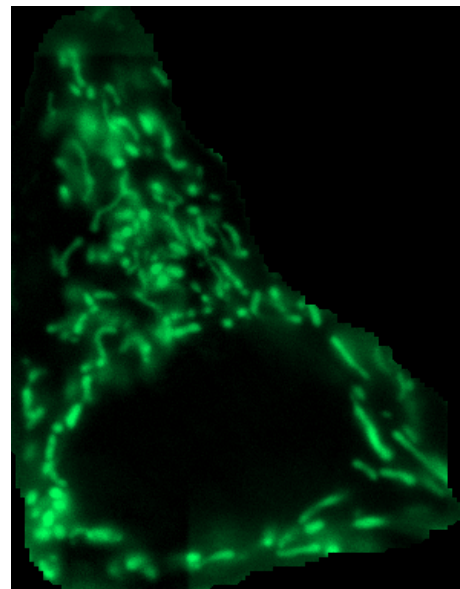
Bildserien öppnas som en hyperstack i Fijis bildbehandlingsprogram ImageJ. I programmet används den inbyggda funktionen "Subtract Background" för att avlägsna bakgrundsbrus. Vidare justeras brightness, contrast samt min och max-pixelvärden med hjälp av funktionen "Adjust Brightness/Contrast" för att få en bättre signal-to-noise ratio. För att alla mätningar ska behandlas lika nyttjas ImageJ:s auto-adjust funktion som automatiskt optimerar parametrarna för den givna bilden. Optimeringen baseras på att ImageJ låter en given andel pixlar bli helt mättade (med andra ord de svagaste/starkaste pixlarna blir helsvart/helvita) [6]. Alla celler som omfattas av resultatet har genomgått exakt samma behandling.

Figure 2.2: Utskuren cell från omg brunn vid timme 0

(a) Icke-behandlad



(b) Behandlad



2.3.2 Mitometer

Mitometer är ett open source-program för analys av mitokondriebildserier taget med fluorescencemikroskopi. Programmet utför objektbaserad segmentering och tracking av mitokondrier givet en bildserie i tiff-format samt pixelstorlek och tid mellan frames. Programmet kan hantera både 2D och 3D bilder och returnerar för varje detekterad mitokondrie (varje registrerat spår) en fördelning över hastigheter, förskjutning och förekommen fission och fusion.

2.3.3 Statistiska metoder

Wilcoxon rank sum test användes för att se om olika koncentrationer skilde sig ifrån varandra. Testet användes då datan inte var normalfördelad och vilket indikeras av quantile-quantileplottarna i resultatdelen, figur 4.1. Histogrammen som visas i resultatdelen visar på att datan har samma fördelning och då grupperna är helt klart oberoende varandra kan det icke parametriska Wilcoxon rank sum test användas. Alla celler från en koncentration, 0, 1000, 3300 mg/L plus en kontrollgrupp med normalt EMEM-media delas in i en grupp. Denna uppdelning görs då en blodsockernivå på upp till ca 1000 mg/L anses vara normalt för majoriteten av friska vuxna människor medan över 3300 mg/L är långt över rekommenderade nivåer och är ofta en indikation på diabetes [5]. Vidare motsvarar 1000 mg/L ungefär glukoshalten i kontrollgruppen med normalt EMEM-media och de båda grupperna jämfördes med varandra för att kontrollera hur bra det går att byta ut standardmediat mot låglukos DMEM.

För visualisering av data användes violin plottar samt plottar över medelvärden för alla celler i samma koncentration. Förberedelsen av data genomfördes genom att ta tidsmedelvärdet för varje spår av mitokondrier i en cell för hastighetsanalys. Förskjutningsdatat förbereddes genom att maximal förskjutningen för varje spår räknades ut och sparades. Fusion och fission analyserades genom att ta antalet händelser per koncentration och tidpunkt genom antalet spår för den koncentrationen och tidpunkten i syfte att jämföra frekvenserna mellan de olika koncentrationerna.

3 Arbetet

Ett antal mätningar har genomförts vid olika tillfällen enligt loggbok (bilaga 1) varav en mätning (2022/03/28-29) gav önskad skärpa och hade levande friska celler under hela 48-timmarsperioden. Vid varje tillfälle togs omkring 150 st bilder med jämna mellanrum under ett tidsspann på 1 min, vilket upprepas för varje brunn på cellplattan. Brunnarna såddes ursprungligen med några tiotusental celler och fick i regel växa till 85% konfluens. En av de fyra brunnarna innehöll en kontrollgrupp med celler i standard EMEM 5% FBS-media och följande tre brunnar innehöll det snarlika lågglukos-mediet DMEM med 5% FBS och 0, 1000 respektive 3300 mg tillsatt koncentrerat glukos. I brunnarna med lägre koncentration glukos än normalt tillfördes mannitol enligt 2.1.

Varje intervall sparades som en bildserie och alla behandlades på samma sätt enligt metod. Därefter valdes 5-7 celler ut från varje koncentration och tidpunkt som samtliga kördes genom mitometer och data för hastighet och förskjutning vid varje given tidpunkt samt förekommande fission och fusionsevent sparades ner som textfiler. Slutligen jämfördes datan mellan celler, tidpunkter och koncentrationer genom att plottas sida vi sida som violin plot och notera parvisa p-värden genom parvisa Wilcoxon rank sum tests enligt 2.3.3.

4 Resultat

En linjär modell applicerades på den insamlade datan och residualerna för modellen visade sig inte vara normalfördelade. Nedan i figur 4.1a och 4.1b matchas datan i en quantile-quantileplot för 1000 mg över tid samt för olika glukosmängder vid tiden 24h. Figurerna visar att datan ej är normalfördelad. Från histogrammen för de olika glukosmängderna efter 0 och 24 timmar bedömdes det att de olika glukosmängderna är likartat fördelade.

Figure 4.1: Q-Q plot för normalitetstest

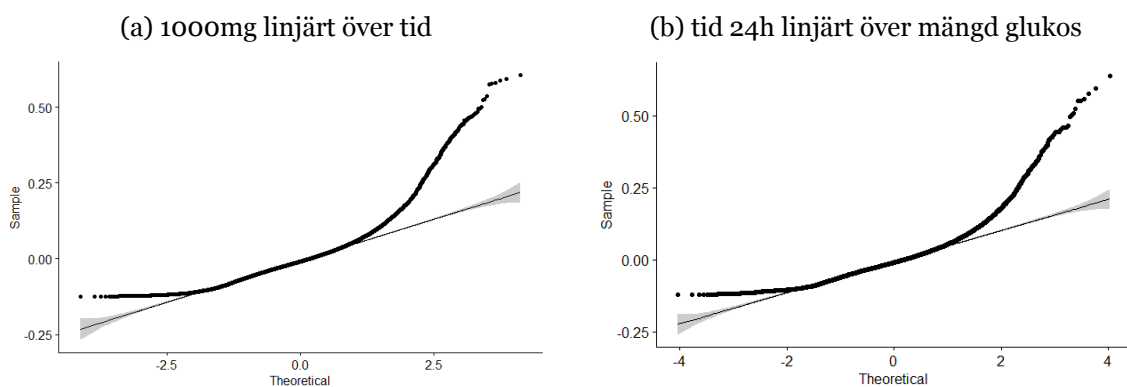
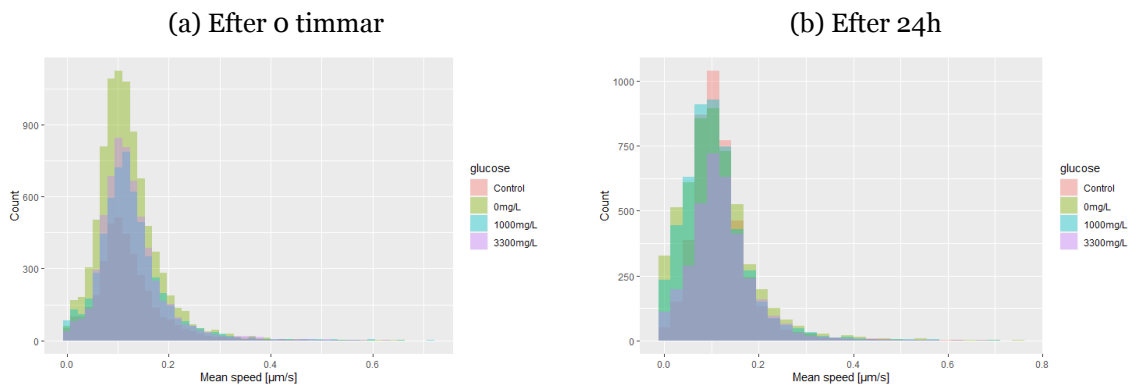


Figure 4.2: Medelhastigheter för olika koncentrationer plottade i histogram



4.1 Förändring över tid

Figur 4.3 och 4.4 illustrerar samtliga cellers medelhastighet under enmunitsintervallet inom 1000 och 3300 mg/L-grupperna vid olika tidpunkter över 24 timmar. Övriga grupper skillnader över tid redogörs i figur B.2 och B.3 i Bilaga B. Tabell 4.1 respektive 4.2 ger Wilcoxon signed-rank test mellan de olika

tidpunkterna där ett p-värde mindre än 0.05 ansågs signifikant. Vidare redogörs medelvärdet för samtliga mitokondrier inom given koncentration över tid med standardavvikelse i figur 4.5.

Figure 4.3: Hastighetsfördelning för olika tidpunkter, DMEM med 3300 mg/L glukos

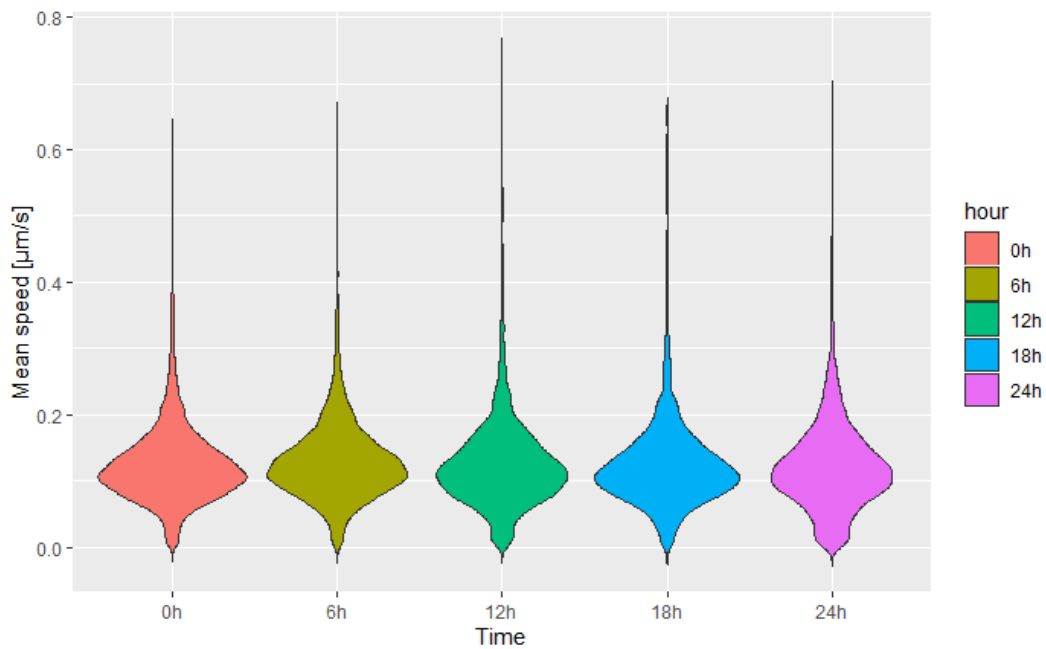


Table 4.1: Wilcoxon rank sum test for 3300 mg/L över tid

	0h	6h	12h	18h
6h	2.1e-6	-	-	-
12h	0.1599	5.2e-8	-	-
18	0.0264	3e-9	0.3634	-
24	0.0024	4.8e-11	0.1355	0.5968

Figure 4.4: Hastighetsfördelning för olika tidpunkter, DMEM med 1000 mg/L glukos

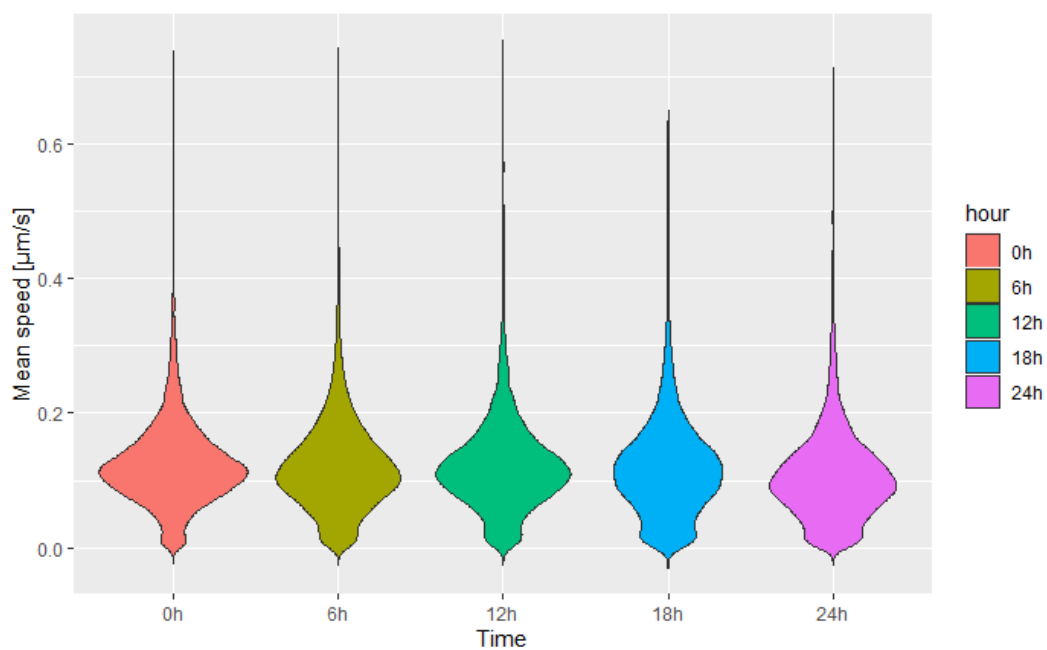
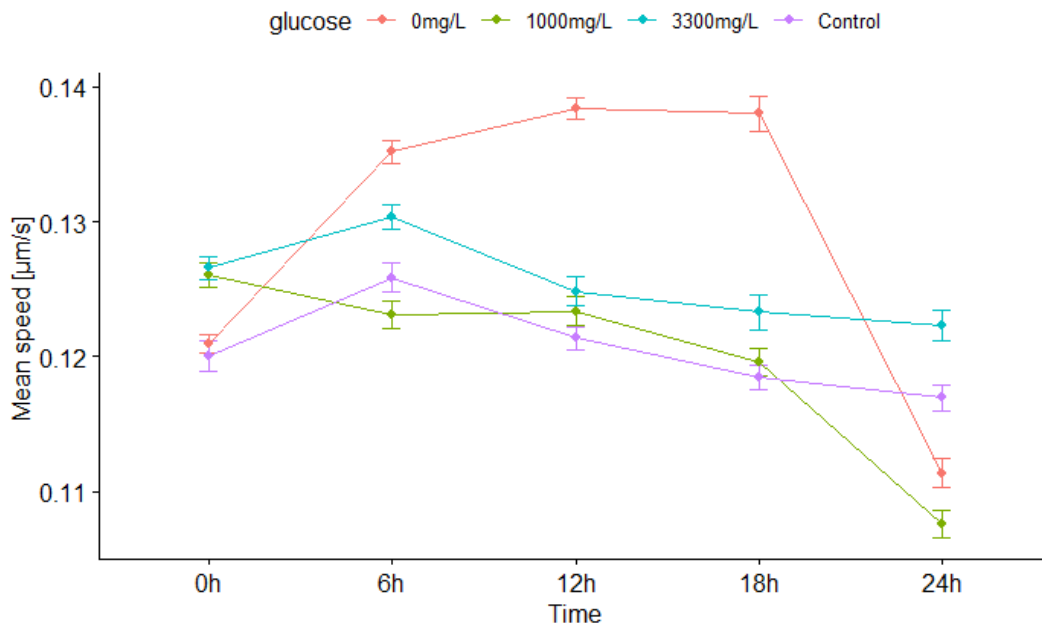


Table 4.2: Wilcoxon rank sum test över tid för 1000 mg/L

	0h	6h	12h	18h
6h	0.00065	-	-	-
12h	0.00330	0.63935	-	-
18	2.2E-10	0.00234	0.00100	-
24	< 2E-16	<2E-16	<2E-16	<2E-16

Figure 4.5: Medelhasighet inom koncentration över tid



4.2 Jämförelse mellan koncentrationer

Då signifikant skillnad uppmättes mellan 0 och 24 timmar i 3300 mg koncentrationen betraktas dessa tidpunkter i kommande jämförelser. Figur 4.6 och 4.7 uppvisar fördelningen av medelhastighet medan figur 4.8 och 4.9 uppvisar fördelningen av maximal förskjutning under enminutersintervallet för de olika grupperna.

Figure 4.6: Fördelning av hastighet inom olika koncentrationer vid timme 0

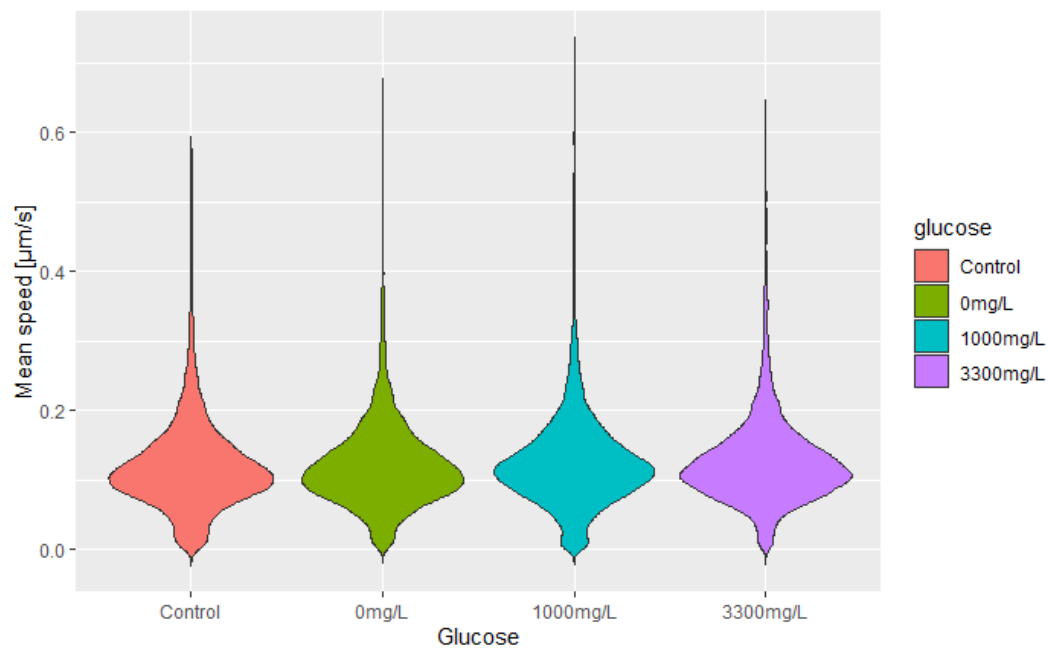


Table 4.3: Wilcoxon rank sum test for hastighetsfördelning mellan olika koncentration vid timme 0

	Control	0 mg/L	1000 mg/L
0 mg/L	0.13	-	-
1000 mg/L	2.1e-8	1.7e-7	-
3300 mg/L	2.6e-9	1.1e-8	0.83

Figure 4.7: Fördelning av hastighet inom olika koncentrationer vid timme 24

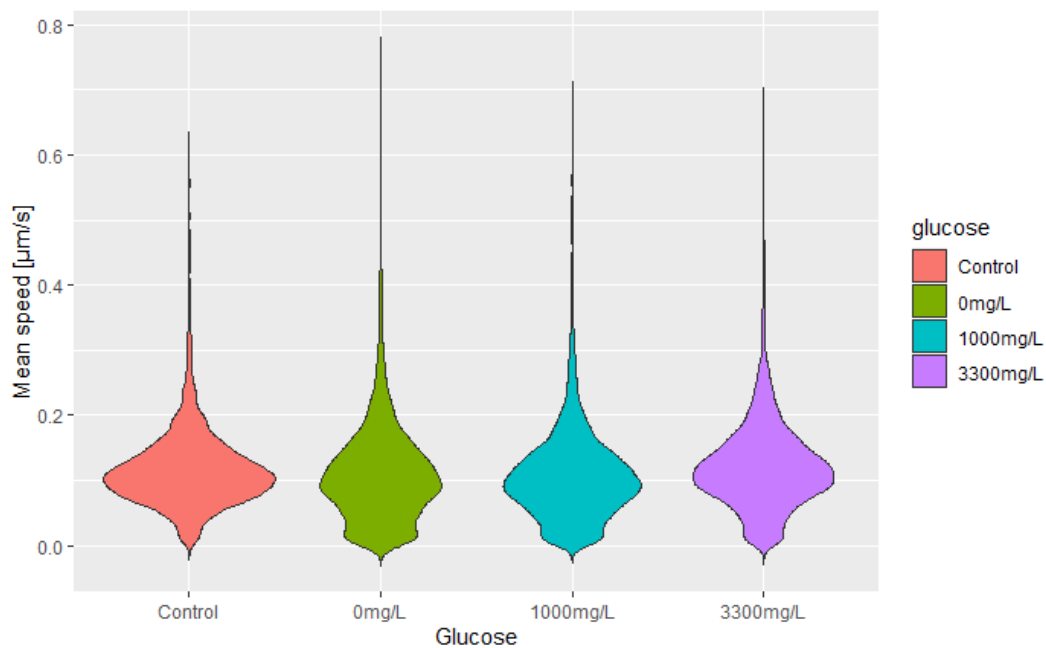


Table 4.4: Wilcoxon rank sum test for hastighetsfördelning mellan olika koncentrationer timme 24

	Control	0 mg/L	1000 mg/L
0 mg/L	9.8e-15	-	-
1000 mg/L	<2.6e-16	0.09371	-
3300 mg/L	0.00016	<2.6e-16	<2.6e-16

Figure 4.8: Fördelning av maximal förskjutning under en minut inom olika koncentrationer vid timme 0

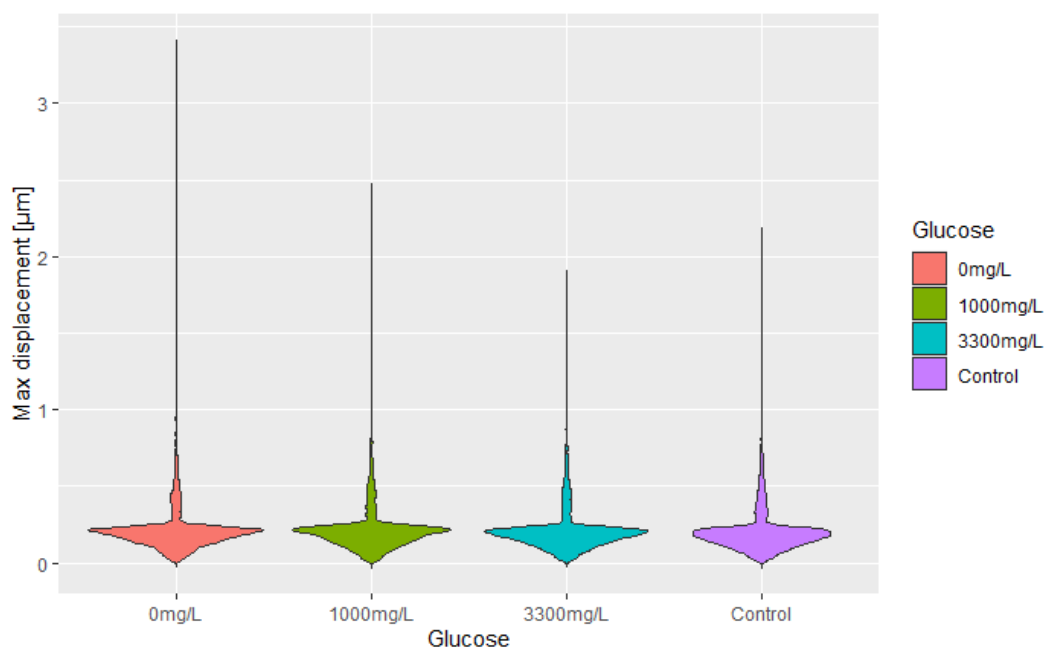


Table 4.5: Wilcoxon rank sum test for fördelning av förskjutning mellan olika koncentration vid timme 0

	Control	0 mg/L	1000 mg/L
0 mg/L	0.22	-	-
1000 mg/L	8.3e-9	1.8e-9	-
3300 mg/L	<2e-16	<2e-16	5.1e-6

Figure 4.9: Fördelning av maximal förskjutning under en minut inom olika koncentrationer vid timme 24

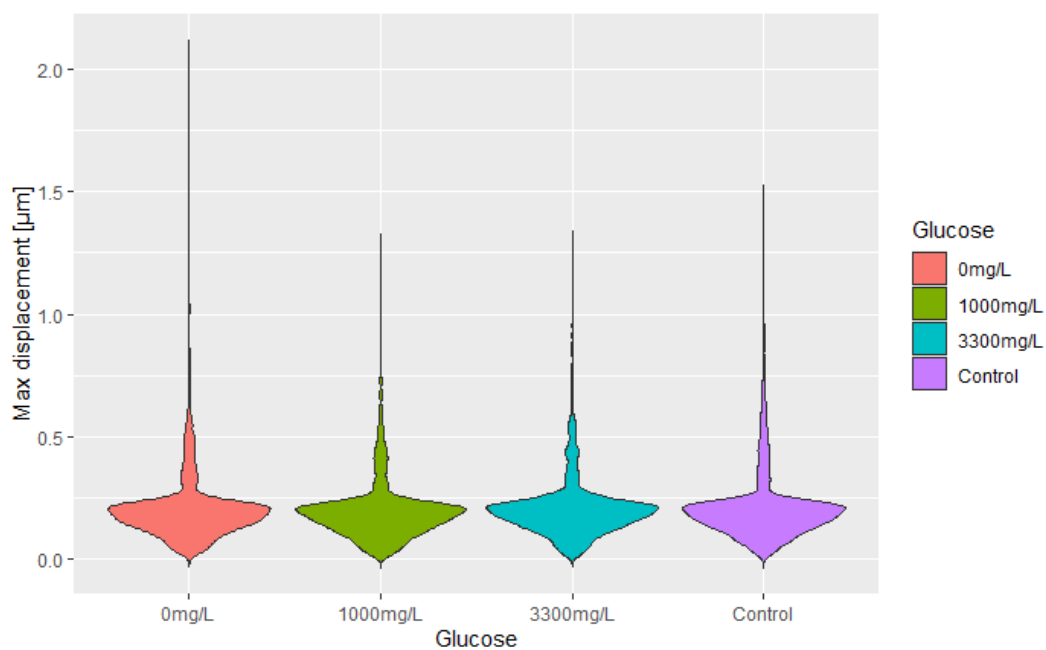


Table 4.6: Wilcoxon rank sum test för fördelning av förskjutning mellan olika koncentration vid timme 24

	Control	0 mg/L	1000 mg/L
0 mg/L	0.00492	-	-
1000 mg/L	0.00036	1.2e-9	-
3300 mg/L	0.08034	2.1e-5	0.05377

4.3 Fission och fusionsevent i olika koncentrationer

Figure 4.10: Andel fission och fusionsevent vid timme 0

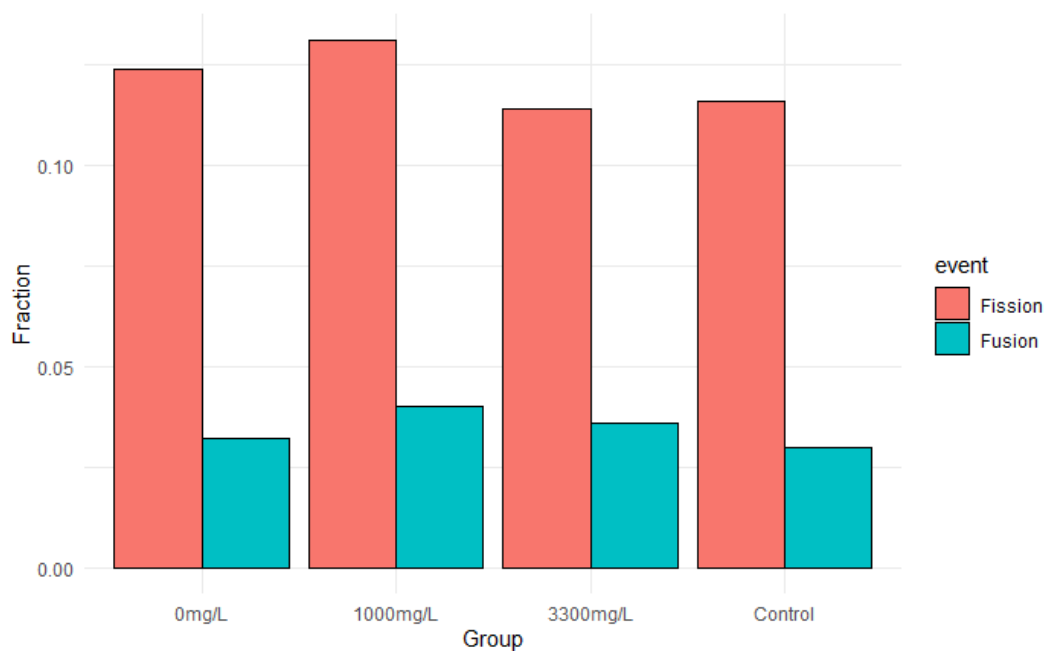
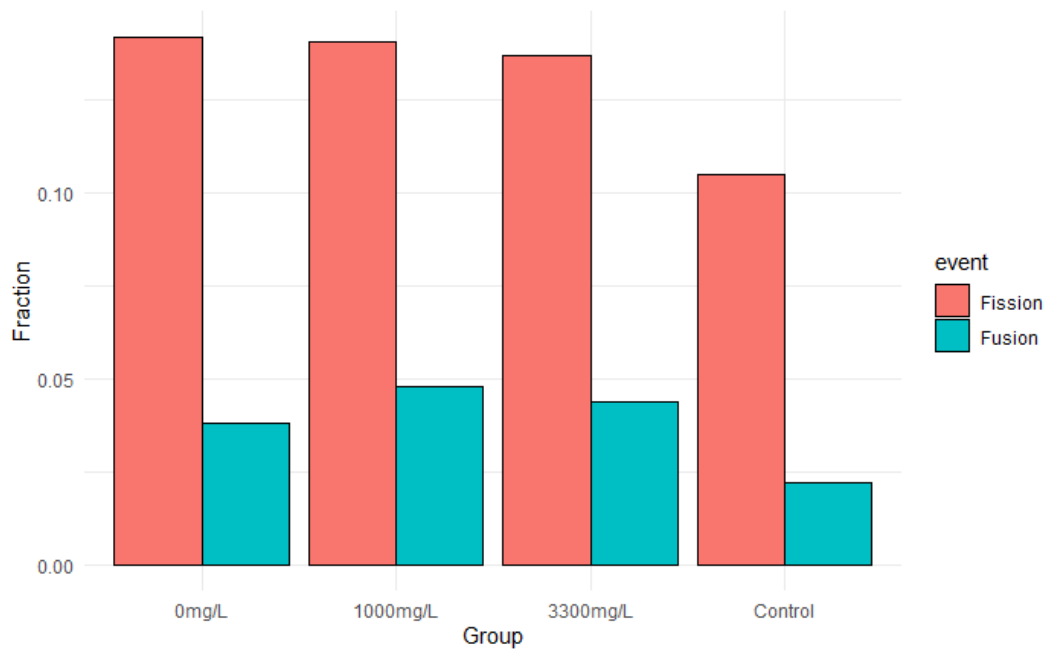


Figure 4.11: Andel fission och fusionsevent vid timme 24



5 Slutsats

5.1 Diskussion

5.1.1 Skillnader och likheter mellan grupper

Vid timme 0 har varje grupp precis gått från identiska miljöer till olika glukoskoncentrationer och fördelning av hastigheter samt maximal förskjutning förväntades vara lika över dem alla. Wilcoxon-testerna indikerade att likheter för hastighetsfördelningen enbart fanns mellan kontrollgruppen och 0 mg/L, samt 1000 och 3300 mg/L-koncentrationerna. I övrigt uppvisades statistiskt signifikant skillnad. För fördelningen av förskjutning var $p > 0.05$ enbart för kontrollgrupp och 0 mg/L-gruppen. I figur 4.6 och 4.8 observerades dock att violin-plottarna för de olika koncentrationerna har grovt sett samma form, vilket ger en svagare indikation på att förhållanden vid timme 0 ändå var lika och de låga p-värdena kan vara en produkt av outliers att icke-parametriska tester av lägre styrka. Efter 24 timmar syns en tydlig förändring av fördelningarna i violin-plottarna mellan samtliga koncentrationer förutom i kontrollgruppen, som i stort behåller samma form som tidigare. I tabell 4.1 observeras förändring av rörelsebeteende tydligt då signifikant skillnad nästan enbart observeras för tidpunkter med mer än 6 timmars mellanrum för 3300 mg/L -gruppen. Detta förstärks dock inte av tabell 4.2 där 1000 mg/L-gruppen uppvisade signifikant skillnad uppskattas mellan nästa alla tidpunkter. Det är dock viktigt att poängtera att statistisk signifikant skillnad inte är ekvivalent med biologisk signifikant skillnad där en variation i hastighet av storleksordning $0.001 \mu\text{m/s}$ inte har särskilt stor betydelse i cellen men kan fortfarande räknas som signifikant statistiskt sätt. Med detta i åtanke kan det observeras av figur 4.5 att det främst är 0 mg/L-gruppen som skiljer sig från övriga grupper.

En ytterligare intressant observation är att 3300 mg/L och kontrollgrupperna efterliknade varandra vid timme 24, vilket indikeras av tabell 4.4 och 4.6 samtidigt som deras totala medelvärden över tid förändrades på samma sätt, figur 4.5. Enligt antagandet skulle 1000 mg/L vara den grupp som efterliknade kontrollgruppen.

Andelen fissions och fusionsevent ligger i regel mellan 10-14 respektive 2-4%. Ingen markant skillnad uppvisades mellan koncentrationer men det observerades att samtliga event ökade något efter 24 timmar med kontrollgruppen som undantag.

5.1.2 Begränsningar och potentiella felkällor

Mitometer är ett nytt och ännu inte fullständigt optimerat program. Därmed uppkommer vissa problem i form av lång analysid och systembuggar som fortfarande behöver förbättras. Bildserierna som används som indata i Mitometer måste vara av mycket god kvalité för att programmet effektivt ska kunna segmentera alla mitokondrier. Då cellerna som skärs ut ofta är av varierande kvalité har även precisionen av deras behandling varierat. Mitometer gör det möjligt att jämföra originalbildserien med en bildserie som enbart innehåller de registrerade mitokondrierna. Från detta har det observerats att för vissa celler klumpas flera mitokondrier ihop och räknas som en enda stor organel medan andra, för ögonen tydligt distinkta mitokondrier, registreras som bakgrundsbrus. Det är inte heller ovanligt att upptäckta mitokondrier registreras som bakgrundsbrus för några enskilda frames för att sedan åter igen dyka upp och registreras som nya mitokondrier. Slutligen har det också förekommit fall då ett mycket stort antal mitokondrier har registrerats längs kanterna på de utskurna cellerna, vilket troligvis enbart är delar av andra cellers mitokondrier eller bakgrundsbrus som längs den skarpa kanten ser ut att vara ett enskilt objekt. Programmet erbjuder ett verktyg för att manuellt ta bort registrerade spår av följda mitokondrier men funktionen behöver ytterligare förbättring för att vara effektiv nog.

Då medelvärden över samtliga frames i varje tidsserie samt totala medelvärden över alla mitokondrier i respektive koncentration låg till grund för resultatet kan det antas att flera av de ovannämnda bristerna har korrigerats för under analys av hastighet och förskjutning. Formförändring blir dock ett omedelbart problem och har därför exkluderats från rapporten. Felregistreringar i fission och fusionsevent

är inte heller otänkbart men har bedömts vara i minoritet och därför inkluderats.

Celler är ljuskänsliga och en längre period av ljusexponering leder till att celler blir defekta och dör [3]. Dessutom leder ofta ljusexponering till att mitokondrierna förlorar sin fluorescerande förmåga (så kallat photobleaching) [4] vilket leder till sämre bildkvalité och därmed begränsade möjligheter att följa mitokondrier med Mitometer. Det är inte orimligt att tänka att dessa två faktorer kan ha bidragit till att statistisk signifikans mellan proven observerats efter 24 timmar. Jämförelse mellan koncentrationer antas ha påverkats i samma grad då de alla utsätts för samma ljusexponering. Nya mätningar gjordes på ett annat område inom samma prov efter 27 timmar men Mitometer misslyckades med att behandla bilderna i två av koncentrationerna.

Ytterligare en begränsande faktor har varit datamängden. Trots att den begränsade tidsfaktorn var känd i början av projektet hade det ändå räknats med att tre mätningar av MDCK II skulle ligga till grund för resultatet. Enbart en användbar mikroskoptagning genomfördes i projektet och för varje tidpunkt och koncentration har 5-7 av de bäst upplösta cellerna skurits ut och behandlats enligt metod. Då Mitometer registrerar och följer mitokondrier med olika precision för små skillnader i bildkvalitén har detta lett till att fördelningarna innehåller många outliers, vilket indikeras av samtliga violin-plottar. Signifikansen av dessa outliers skulle troligtvis minskas om fler mikroskoptagningar vid andra tillfällen utförts och lika påtaglig statistisk signifikant skillnad behöver nödvändigtvis inte ha påvisats.

5.2 Framtida arbete

För att kunna dra säkra slutsatser skulle experimentet behöva upprepas med en större mängd data, eventuellt med längre tidsintervall mellan varje mätning och åter genomföra ett byte av område efter 24 timmar för att undvika photobleaching. På denna data är det också rimligt att åter utföra omfattande normalitetstest för att kontrollera möjligheten att utföra parametriska statistikttester som t-tester, vilka anses kraftfullare än de icke-parametriska testerna. Vidare skulle

det troligtvis också vara av intresse att studera Mitometer mer ingående för möjligheten att optimera och automatisera analysprocessen.

5.3 Avslutande ord

Mitometer är ett starkt redskap för att segmentera och följa mitokondrier men programmet har fortfarande en viss väg att gå. Brister som tidigare diskuteras ställer höga krav på kvalitén på indata och tid det tar att processa, analysera och spara ner resultaten är alldeles för lång för att mer storskaliga analyser kan genomföras.

Trots stora mängder potentiella felkällor ger ändå resultaten en första indikation på att statisk signifikant skillnad finns för mitokondrier vars värdceller har olika god tillgång på glukos, vilket kan ses som en uppmaning till fortsatt forskning inom området.

References

- [1] Anesti, Vasiliki and Luca, Scorrano. “The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton”. In: *BBA Bioenergetics* 1757 (5–6 2006), pp. 692–699. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.04.013>.
- [2] Chang, Diane T.W. and Reynolds, Ian J. “Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons”. In: *Progress in Neurobiology* 80 (5 2006), pp. 241–268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.09.003>.
- [3] Dahle, Jostein et al. “Cooperative effects of photodynamic treatment of cells in microcolonies”. In: *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (5 1997), pp. 1773–1778. DOI: [10.1073/pnas.94.5.1773](https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1773).
- [4] Demchenko, Alexander P. “Photobleaching of organic flourophores: quantitative characterization, mechanisms, protection”. In: *Methods and Application in Flourescence* 8 (2 2020).
- [5] Diabetes.co.uk. *Blood Sugar Level Ranges*. 2022. URL: https://www.diabetes.co.uk/diabetes_care/blood-sugar-level-ranges.html (visited on 04/19/2022).
- [6] Ferreira, Tiago and Wayne, Rasband. *ImageJ User Guide IJ1.46r*. 2012. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (visited on 04/18/2022).
- [7] Kwak, Soo Heon et al. “Mitochondrial metabolism and diabetes”. In: *Journal of Diabetes Investigation* 1 (5 2010), pp. 161–169. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/2Fj.2040-1124.2010.00047.x>.
- [8] Lefebvre, Austin E. Y. T. et al. “Automated segmentation and tracking of mitochondria in live-cell time-lapse images”. In: *Nature Methods* 18 (2021), pp. 1091–1102. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01234-z>.

- [9] Mandal, Amrita et al. “ Retrograde Mitochondrial Transport Is Essential for Organelle Distribution and Health in Zebrafish Neurons”. In: *Journal of Neuroscience* 41 (7 2021), pp. 1316–1320. DOI: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1316-20.2020>.
- [10] Organisation, World Health. *Diabetes Fact Sheet*. 2021. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (visited on 03/28/2022).
- [11] Savva, Michalakis. *Fluids and Electrolytes*. Pharmaceutical Calculations. Springer, Cham., 2019. ISBN: 9783030203351. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-20335-1_10.
- [12] Spring, Kenneth R. and Davidson, Micheal W. *Introduction to flourescence Microscopy*. URL: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy> (visited on 04/21/2022).

Bilagor

Innehåll bilagor

A	Experimentell loggbok	26
B	Utökad data	29
B.1	Fördelning av förskjutning	29
B.2	Jämförelse över tid övriga koncentrationer	29
B.3	Jämförelse mellan koncentrationer för övriga tidpunkter	30
B.4	Fission och fusionsevent vid övriga tidpunkter	34

A Experimentell loggbok

Observera inlägg märkta med (SB) och (LP) avser labbarbete utfört för annan dylik undersökning inom området vilken genomförs parallellt med det här projektet och huvudsakliga resultat därifrån inkluderas inte i rapporten

2/2

Deltog i split av odlade celler och förberedandet av cell för undersökning samt introducerandes till fluorescerande mikroskop

14/2

Deltog i upptining av celler. Bland annat förbereddes en flaska med MDCK II för kommande mitosisexperiment (SB)

15/2

Första split av tidigare upptinade celler

18/2

Tilldelades tidigare upptinad flaska MDCK II, passage 23 för övning av cellsplit

21/2

Split 1/10 övningsflaska MDCK II, passage 24

23/2

Split 1/10 övningsflaska MDCK II, passage 25

25/2

Split 1/10 övningsflaska MDCK II, passage 26

4/3

Tilldelades ny flaska med MDCK II för glukosexperiment + split av nämnd flaska, passage 16

7/3

Split passage 17 + utsådd i fyra brunnar för glukosexperiment nästkommande dag, 20 000 celler per brunn

9/3

Utför glukosexperiment med koncentrationer 10, 100 och 1000 mg glukos + en kontroll EMEM-media utan tillsatt glukos. Cellerna fick ligga i koncentrationen 1 timme innan experimentet. 166 antal bilder togs under enminuts-intervaller med 1 timme vila däremellan, det hela upprepades under totalt 7 timmar

10/3

1st release för utsådd mitosisexperiment nästkommande dag (SB)

2nd release för utsådd mitosisexperiment, idag (SB)

Split 1/20 av flaska för glukosexperiment, passage 18

14/3

Split 1/10 av MDCK II + utsådd för glukosexperiment (20 000 celler per brunn i fyra brunnar), passage 19

15/3

Treatment 1 av mitosisexperiment torsdag (SB)

16/3

Split 1/10 av MDCK II + ny utsådd för glukosexperiment nästkommande dag, passage 20

Gammal utsådd defekt, kasserades

Release av treated cells för mitosisexperiment onsdag (SB)

17/3

Utsådd för glukosexperiment defekt, kasserades och experiment sköts upp

21/3

Split 1/10 av MDCK II, passage 21 (utförd av SB)

23/3

Split 1/10 av MDCK II, passage 22 (utförd av SB)

25/3

Split 1/20 av MDCK II, passage 23

Split 1/20 av MDCK II för mitosisexperiment, passage 23 (SB)

28/3

Split 1/20 av MDCK II, passage 24

Split 1/20 av A498, passage 11 (LP)

1st treatment onsdagsdiskar (SB)

Utsådd 5 respektive 10k celler i 8-well cell plate för mitosisexperiment (SB)

Uppsättning av glukosexperiment. 150 bilder togs under med ca 0.37 sekunders mellanrum följt av vila i 352 min. Detta upprepade 8 ggr. Följande koncentrationer analyserades: kontroll, 0, 1000 och 3300 mg.

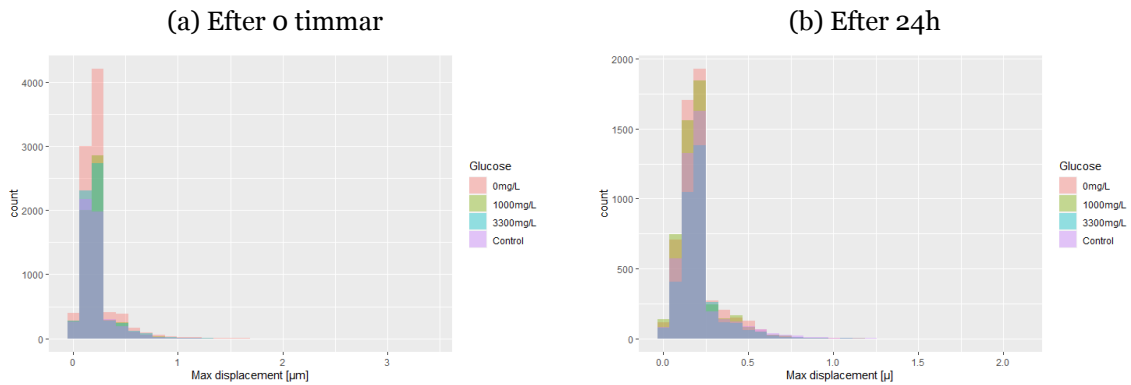
29/3

Ny position valdes för samtliga brunnar vid timme 27 av föregående dags experiment då cellerna i nuvarande position började visa tecken på photobleaching samt ohälsosamma celler, troligen efter den långa ljusexponeringen. Experimentet fick därefter fortgå som tidigare.

B Utökad data

B.1 Fördelning av förskjutning

Figure B.1: Maximal förskjutning för olika koncentrationer plottade i histogram



B.2 Jämförelse över tid övriga koncentrationer

Figure B.2: Hastighetsfördelning för olika tidpunkter kontrollgrupp

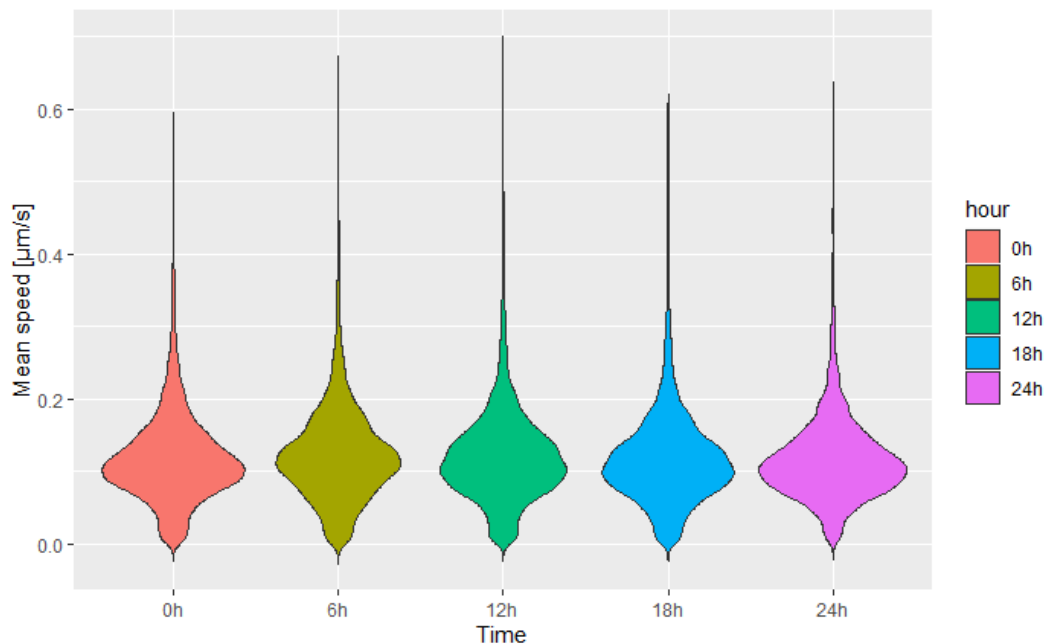
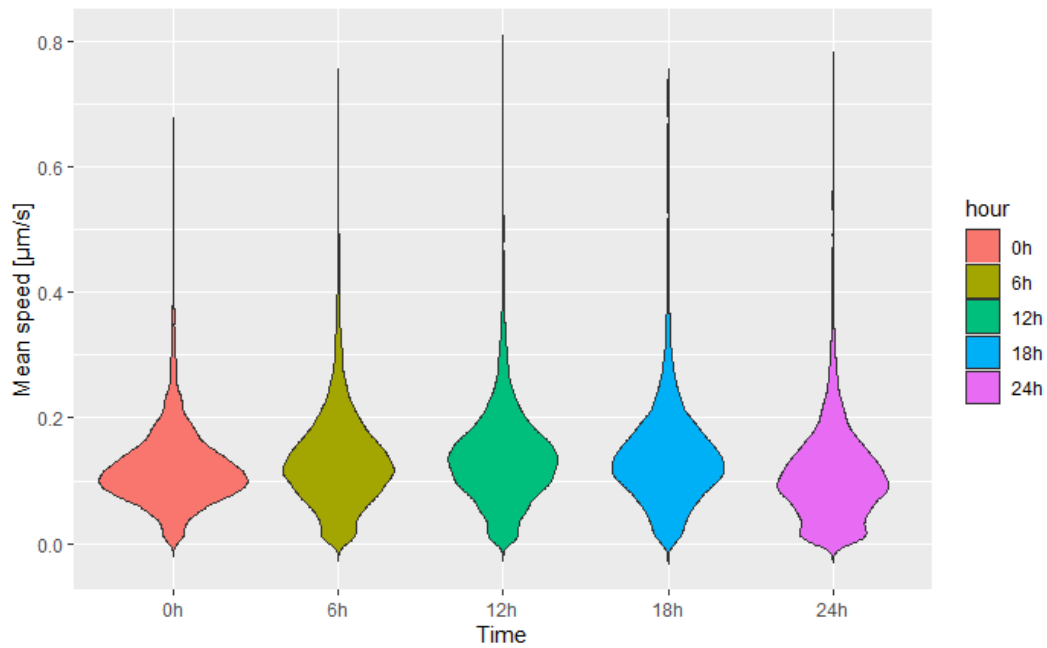


Figure B.3: Hastighetsfördelning för olika tidpunkter, DMEM med 0 mg/L glukos



B.3 Jämförelse mellan koncentrationer för övriga tidpunkter

Figure B.4: Fördelning av hastighet inom olika koncentrationer vid timme 6

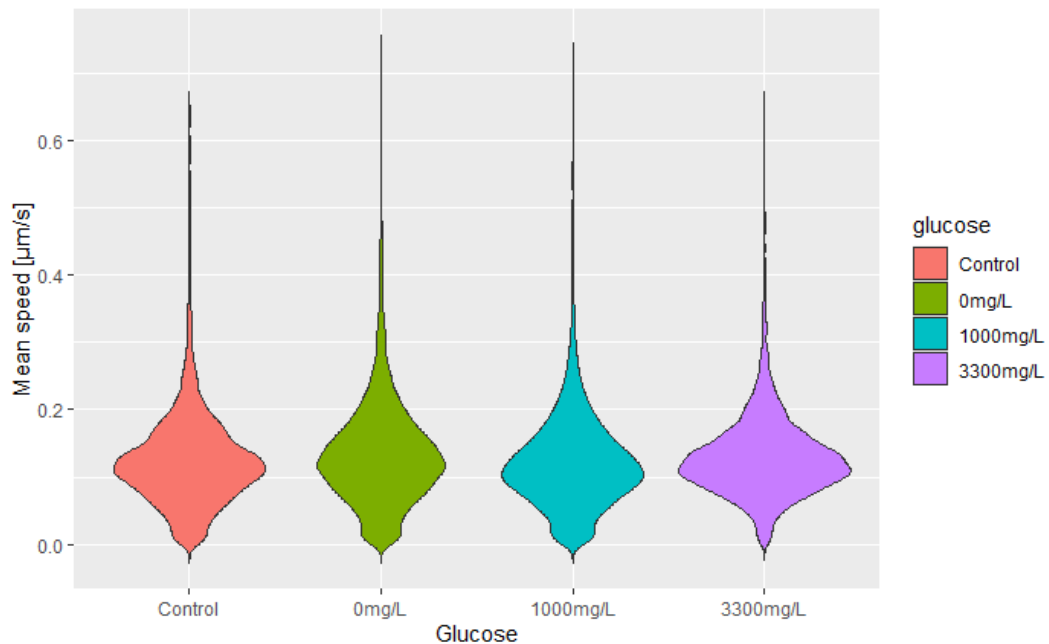


Figure B.5: Fördelning av hastighet inom olika koncentrationer vid timme 12

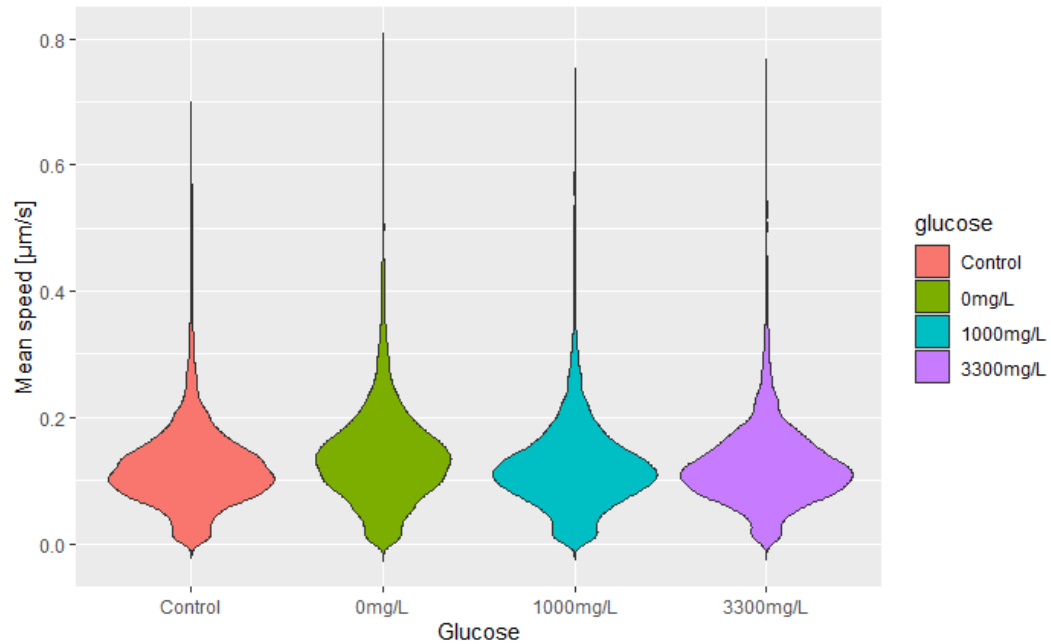


Figure B.6: Fördelning av hastighet inom olika koncentrationer vid timme 18

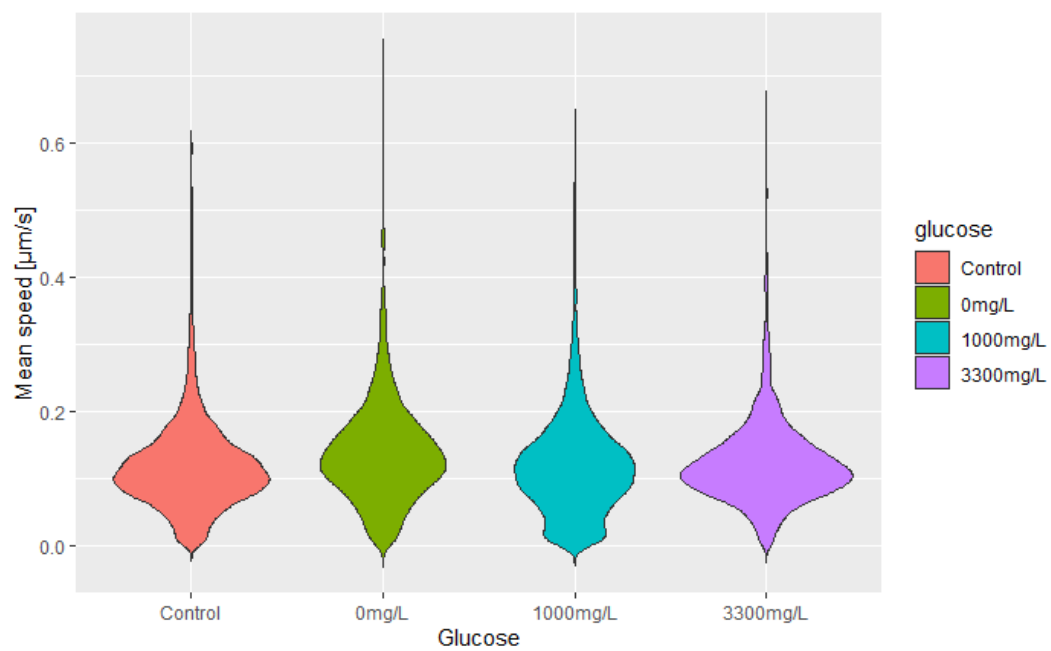


Figure B.7: Fördelning av maximalförskjutning under en minut inom olika koncentrationer vid timme 6

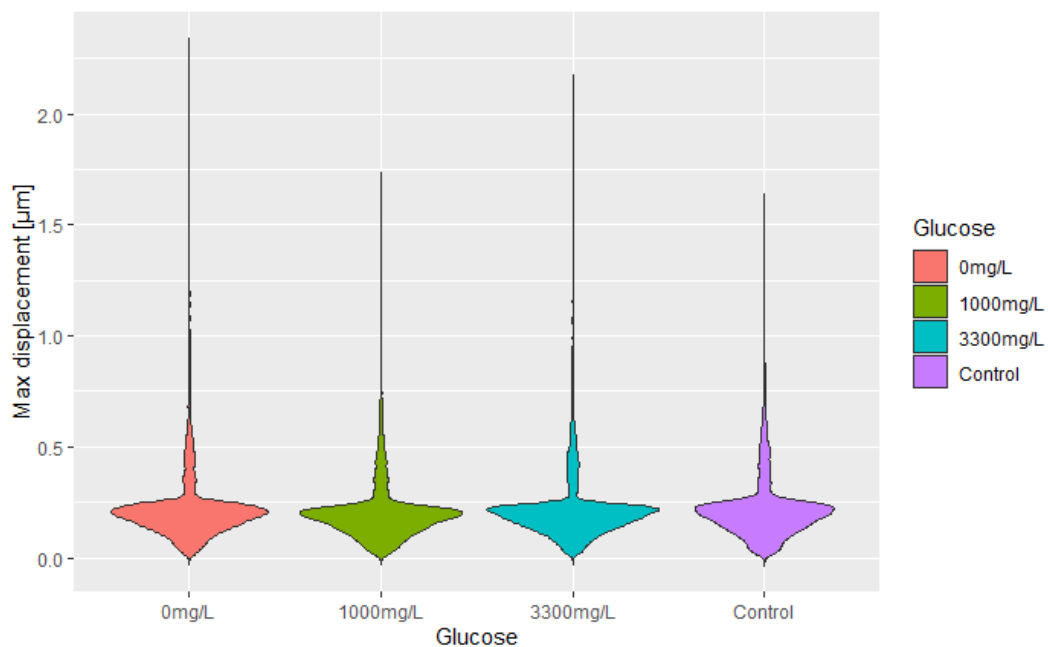


Figure B.8: Fördelning av maximalförskjutning under en minut inom olika koncentrationer vid timme 12

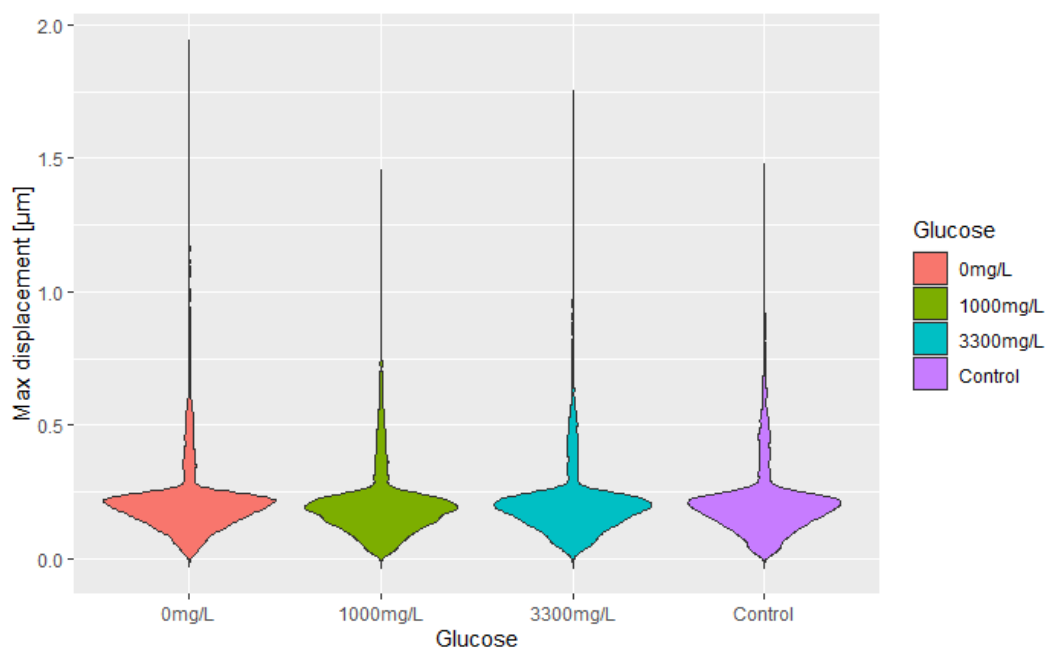
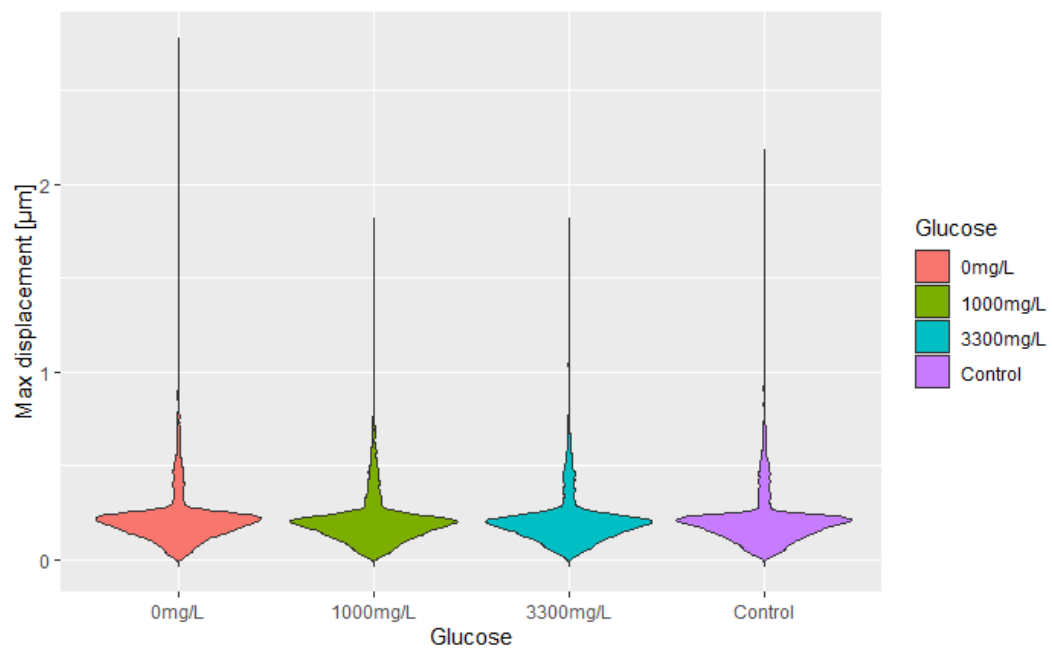


Figure B.9: Fördelning av maximalförskjutning under en minut inom olika koncentrationer vid timme 18



B.4 Fission och fusionsevent vid övriga tidpunkter

Figure B.10: Andel fission och fusionsevent vid timme 6

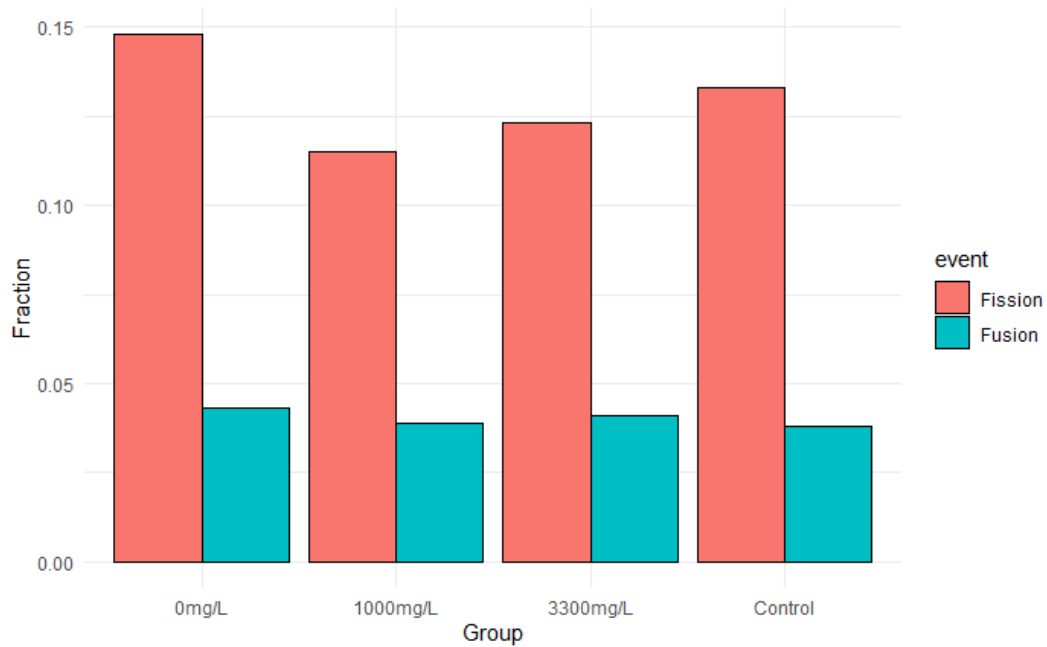


Figure B.11: Andel fission och fusionsevent vid timme 12

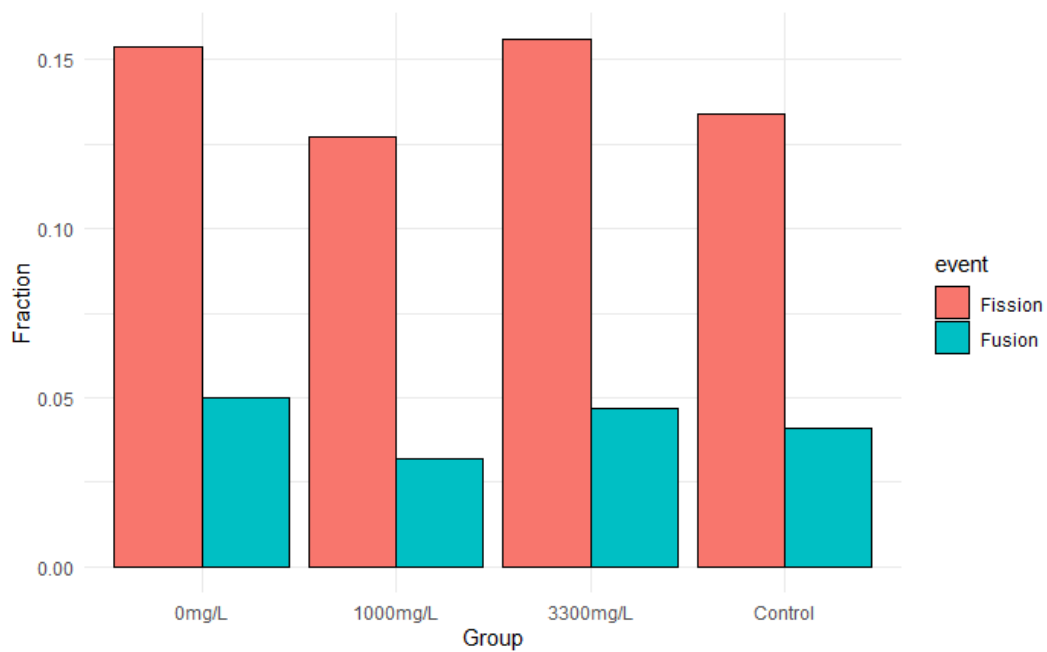


Figure B.12: Andel fission och fusionsevent vid timme 18

