

Verdien av miRNA som biomarkør for kreft i prostata

Optimalisering av metode for RNA-isolering av formalinfiksert parafininnstøpt vev, samt undersøkelse av miRNA-uttrykk i ulik grad av prostatakraft

Sandra Amalie Dybos

Cellebiologi for medisinsk/teknisk personell

Innlevert: August 2012

Hovedveileder: Atle M. Bones, IBI

Medveileder: Haakon Skogseth, Institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi

FORORD

Masteroppgaven ble gitt ved Institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer (LBK), Faggruppe for morfologi, Tumorbiologisk forskningsgruppe. Oppgaven ble gjennomført i perioden august 2010 til august 2012. Masteroppgaven inngår som en del av 2-årig mastergrad i cellebiologi for medisinsk/teknisk personell ved NTNU, Trondheim.

Jeg ønsker å rette en stor takk til faglig veileder Haakon Skogseth for god oppfølging og mange utfordringer som har ført til personlig og faglig utvikling gjennom prosjektperioden. Jeg er svært takknemlig for ansvaret du har gitt meg, og setter stor pris på samarbeidet vi har hatt. Jeg ønsker også å takke førsteamanuensis Jostein Halgunset for gode tilbakemeldinger på det skriftlige produktet. Avdelingsingeniørene Toril Rolfseng og Anne Morgenstjerne Sundet fortjener også en stor takk for god veiledning på laboratoriet. Til slutt vil jeg takke mine medstudenter og andre ansatte ved LBK for gode faglige innspill og diskusjoner, og ikke minst mange hyggelige sosiale sammenkomster.

SAMMENDRAG

Prostatakreft er den kreftformen som hyppigst rammer norske menn og dødelighet på grunn av avansert kreft i prostata er et klinisk problem. For å forstå molekylære ulikheter som skiller progressiv sykdom fra ikke-progressiv sykdom, vil identifisering av nye biomarkører som kan bidra til å gi en mer korrekt prognose være med på å forenkle behandling av pasienter med prostatakreft, og det er svært ønskelig med bedre behandlingsmetoder enn det som finnes i dag.

miRNA er viktig under regulering av genuttrykk og det har vist seg at miRNA har en betydelig rolle under utvikling av kreft. Så langt er det bare et lite antall studier som har undersøkt uttrykk av miRNA relatert til prostatakreft. Målet med denne oppgaven var å utarbeide en optimal metode for isolering av total-RNA fra formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale til bruk i undersøkelse av miRNA i vev fra prostata. Videre ville det være interessant å undersøke hvilken miRNA-profil som uttrykkes i Gleason grad 3, 4 og 5 for å finne ut om det er forskjell i miRNA-profil knyttet til alvorlighetsgrad av prostatakreft.

Det ble tatt utgangspunkt i metode for isolering av total-RNA med *RecoverAll™ Nucleic Isolation Acid Kit* for formalinfiksert parafininnstøpt materiale, for å bedre utbytte total-RNA i vevsprøver fra prostata. Utprøving av ulike parametere som temperatur, inkubasjonstid med enzym, oppkutting av vevssylinder og homogenisering av vevssylinder ble gjennomført for å undersøke hvorvidt endringer kunne bidra til et bedre utbytte av RNA fra vevsmateriale som er formalinfiksert. Resultatene viser at optimal metode for isolering av RNA krever inkubasjon med enzymbehandling over natt (18 timer) for å få best utbytte RNA og høyest RIN-score. Ved isolering av RNA til analyse av miRNA er det tilstrekkelig med 3 timers inkubasjon med enzymbehandling, da mengde av kvantitert miRNA ser ut til å påvirkes i liten grad av inkubasjonstid over 3 timer. Mengde kvantitert miRNA i formalinfiksert materiale og ferskt materiale er tilnærmet likt, som betyr at formalinfiksert vevsmateriale kan benyttes på lik linje som ferskt materiale med hensyn på undersøkelse av miRNA.

Det kommer tydelig frem av resultatene at det er gjennomgående lave konsentrasjoner RNA til stede i vevsmaterialet, og det er tydelig at RNAet er svært degradert, noe som gjenspeiles i den generelt lave RIN-scoren. Til tross for dårlig kvalitet på isolert RNA ble det laget cDNA-bibliotek til bruk i sekvensering av miRNA i formalinfiksert vevsmateriale. cDNA-bibliotekene viste mye adapterdimer som er forstyrrende for sekvensering av miRNA, og på bakgrunn av den dårlige kvaliteten på RNAet og forstyrrende DNA-sekvenser i prøvene, var det ikke mulig å gjennomføre sekvensering.

ABSTRACT

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer among Norwegian men, and the mortality because of advanced prostate cancer is a major clinical problem. The identification of new biomarkers can help provide a more accurate prognosis if the molecular differences that characterize a non-progressive disease from progressive disease are understood. This can provide information that may improve treatment and may contribute to development of new treatment modalities.

miRNA is important in the regulation of gene expression and it has been shown that miRNA has a significant role in the development of cancer. So far, only a small number of studies have researched the expression of miRNA related to prostate cancer, and the aim of this study is therefore develop an optimal method for isolation of total RNA from formalin fixed paraffin embedded tissue (FFPE) to investigate miRNA in prostate tissue. Furthermore, it would be interesting to investigate the miRNA profile that is expressed in Gleason grade 3, 4 and 5 to see if there is a difference in miRNA profile associated with the severity of prostate cancer.

To improve the RNA concentration in prostate tissue samples, the protocol for total-RNA isolation based on *RecoverAll™ Nucleic Acid Isolation Kit* for FFPE was used. Testing of various parameters such as temperature, incubation time, cutting of the tissue cylinder and homogenization of the tissue cylinder was tested to see whether changes could give a better yield of RNA from formalin fixed tissue. The results show that the optimal method for isolation of RNA requires incubation with enzyme treatment overnight (18 hours) to get the best RNA concentration and highest RIN score. For miRNA analysis it is sufficient to isolate RNA with 3 hours incubation with enzyme treatment, and the quantified amount of miRNA does not seem to be affected by shorter incubation. The association between the amount quantified miRNA in formalin-fixed material and fresh frozen material is almost the same, which means that formalin fixed tissue can be used with the same premises as fresh frozen tissue to study miRNA.

The results show that there are low concentrations of RNA present in formalin fixed tissue, and it is clear that the RNA is very degraded, which is reflected in the generally low RIN score.

Based on the results obtained in the attempt to sequence miRNA, it is not possible to say anything about the miRNA profile expressed in Gleason grade 3, 4 or 5. The method requires further improvement before it is possible to say whether miRNA profile varies in different grades of prostate cancer or not.

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Innledning	1
1.1	Kreft	1
1.1.1	Prostata og prostatakreft	2
1.2	Biomarkører	11
1.3	miRNA – posttranskripsjonelle genregulatoriske RNA-molekyler	13
1.3.1	Transkripsjon og prosessering av miRNA	14
1.3.2	miRNA i kreft	16
1.3.3	miRNA som terapeutisk verktøy	20
2	Problemstilling	21
3	Materiale og metode	22
3.1	Prøvemateriale - formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale	22
3.1.1	Histologisk korrelering og utstansing av sylindere fra tumorområder	22
3.2	RNA-isolering	24
3.3	Bestemmelse av RNA-konsentrasjon og renhet	25
3.4	Undersøkelse av RNA-integritet	25
3.5	Rensing og oppkonsentrering av RNA	26
3.6	cDNA-syntese fra isolert total-RNA	27
3.6.1	Prinsipp for syntese av cDNA	28
3.7	Amplifikasjon og deteksjon av miRNA med qPCR	30
3.8	Bestemmelse av miRNA-profil ved hjelp av pyrosekvensering	33
4	Resultater	34
4.1	Enzymbehandling over natt gir optimal metode for RNA-isolering	34
4.1.1	Liten forskjell på kvantitert mengde miRNA, miR-23a og miR-27a, mellom enzymbehandling i 3 timer og 18 timer	36
4.1.2	Tilnærmet likt utbytte miRNA mellom formalinfiksert materiale og ferskt materiale	37
4.2	Lav RNA-konsentrasjon og RIN-score i formalinfiksert vevsmateriale	38
4.3	Sekvensering av miRNA krever RNA med høy kvalitet og konsentrasjon	39
5	Diskusjon	41
5.1	Fordeler med bruk av formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale	41
5.1.1	Kvalitetskontroll av tumorområder i vevsmaterialet	43
5.2	Optimal metode for isolering av RNA fra formalinfiksert materiale	44

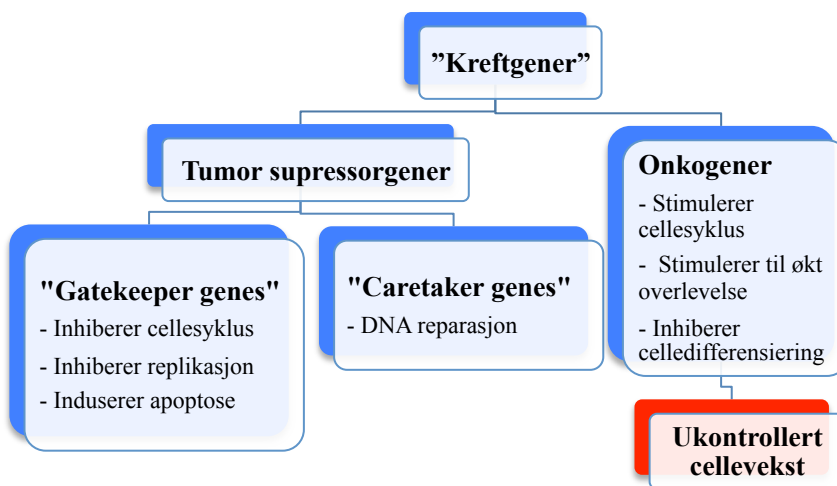
5.3	RNA-isolering til analyse av miRNA krever kortere inkubasjonstid	46
5.3.1	Liten forskjell i mengde kvantitert miRNA i formalinfiksert materiale sammenlignet med ferskt materiale	46
5.4	Utfordringer med påvisning av miRNA-profil ved hjelp av sekvensering	47
6	Konklusjon	49
7	Kilder	50
8	Vedlegg	55
	Vedlegg 1 – RNA-isolering fra formalinfiksert materiale med <i>RecoverAll™ Nucleic Acid Isolation Kit</i>	55
	Vedlegg 2 – Bruksanvisning NanoDrop-1000 Spektrofotometer for måling av RNA konsentrasjon og renhet.....	61
	Vedlegg 3 – Bruksanvisning Agilent Bioanalyser for undersøkelse av RNA-integritet	63
	Vedlegg 4 – Protokoll for rensing og oppkonsentrering av RNA	69
	Vedlegg 5 – Protokoll for tillaging av cDNA.....	70
	Vedlegg 6 – Protokoll for analyse med qPCR.....	73
	Vedlegg 7 – Protokoll for bruk av Uracil DNA glycosylase ved qPCR.....	79
	Vedlegg 8 – Resultater fra kvantitering av miR-23a og miR-27a med qPCR.....	80
	Vedlegg 9 – Påvisning av konsentrasjon og størrelse på cDNA før bruk i sekvensering	88

1 Innledning

1.1 Kreft

Kreft er en betegnelse på ukontrollert deling av ondartede celler som danner svulster og invaderer nærliggende vev. Kreft kan spres gjennom lymfe- og blodsystem og danne sekundære svulster på nye steder i kroppen. Kreftceller som har spredt seg kalles metastaser og mekanismen kalles metastasering. Denne mekanismen er svært uforutsigbar og gjør kreft så farlig og vanskelig å helbrede. Kreft skyldes genetiske faktorer, arv og miljø [1, 2].

Før en celle kan dele seg må den bestå en rekke kontrollpunkter som i hovedsak styres av kinaser, CDKs. Ved en krefttilstand fungerer ikke disse kontrollpunktene som de skal, og muterte celler, som under normale omstendigheter ville blitt sendt i apoptose, vil dele seg uhemmet. Mange regulatoriske faktorer skrur av og på gener som styrer ulike egenskaper i cellen. Skade på disse genene, som kalles som tumor supressorgener og onkogener, kan føre til kreft. Tumor supressorgener er gener som forhindrer at skadde celler videreføres i cellesyklus ved at skadde celler repareres eller styres i apoptose. Onkogener derimot, stimulerer til økt overlevelse hos cellene og økt uttrykk av onkogener kan føre til ukontrollert cellevekst [1, 3, 4]. Figur 1 viser en sammenheng mellom gener som kan føre til økt risiko for kreftutvikling.

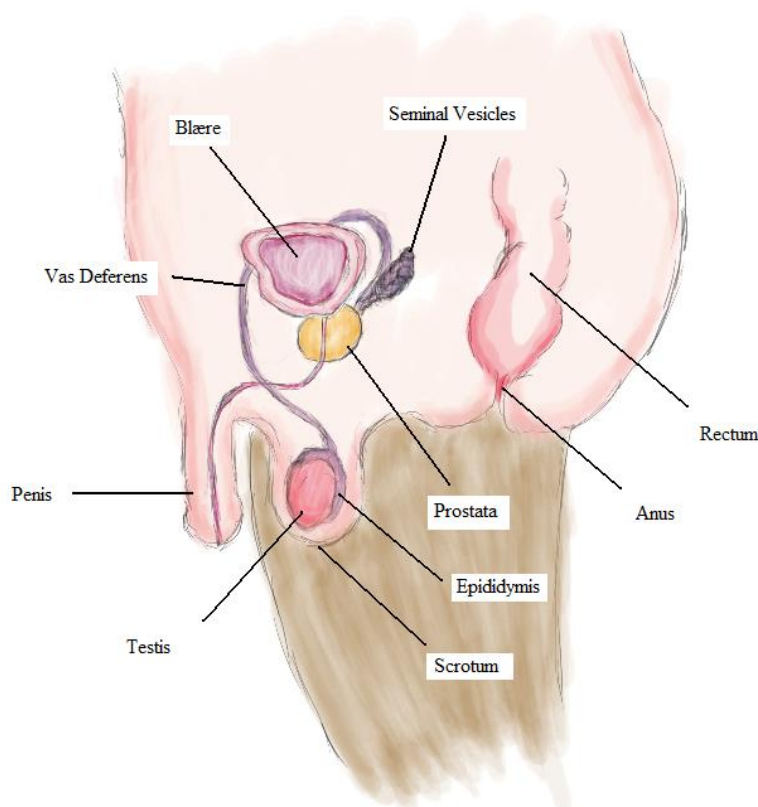


Figur 1: Noen gener kan knyttes direkte mot utviklingen av kreft. Disse er klassifisert som tumor supressorgener og onkogener som henholdsvis hemmer og fremmer kreftutvikling. Ved å inhibere cellesyklus og replikasjon av nye celler vil tumor supressorgener forhindre at skadde celler deles. Tumor supressorgener bidrar i reparasjon av skadde celler og induserer apoptose. Onkogener bidrar i utviklingen av kreft ved å stimulere cellesyklus til tross for skade på cellene. Mutasjoner og deregulering av tumor supressorgener og onkogener kan føre til økt risiko for kreftutvikling.

I 2009 fikk 27 520 personer i Norge diagnosen kreft, 14 792 av disse var menn og 12 728 var kvinner. Brystkreft er den kreftformen som forekommer hyppigst blant norske kvinner, med 2745 nye tilfeller i 2009. Prostatakreft er den kreftformen som forekommer hyppigst blant norske menn, med 4299 nye tilfeller i 2009 [5].

1.1.1 Prostata og prostatakreft

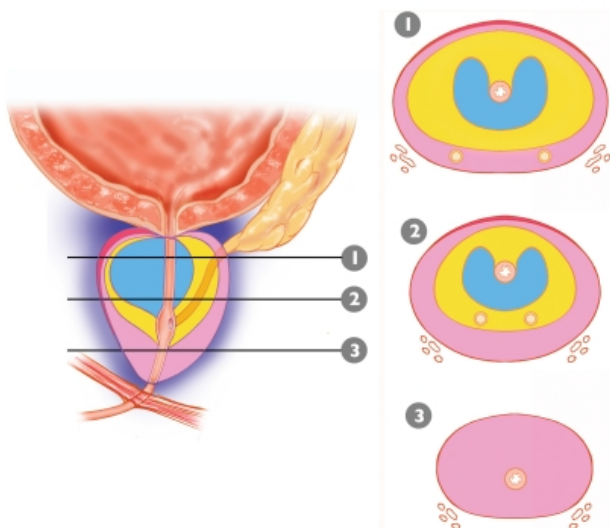
Prostata, også kalt blærehalskjertelen, omkranser første del av urinrøret like under blæren. Prostata er normalt sett på størrelse med en valnøtt, og kjertelens funksjon er å sekretere en næringsrik og pH-nøytral (pH ca. 6,6) sædvæske slik at sædcellene kan bevege seg fritt og overleve det sure miljøet i kvinnens skjede. Prostata er en av de viktigste eksokrine kjertler i kroppen, og den begynner å vokse under puberteten da testosteron nivået øker [6]. En illustrasjon av anatomisk plassering av prostata er gitt i figur 2.



Figur 2: Prostata omkranser første del av urinrøret, like under blæren. Prostata ligger foran endetarmen og skilles fra tarmen av et tynt bindevevslag. © 2012, Sandra Dybos

Prostata består av ulike celletyper, og de fleste krefttilfellene oppstår i de sekretoriske kjertelcellene i prostata. Prostata består også av glatt muskulatur, men kreft i disse cellene (leiomyosarcoma) forekommer svært sjelden. Prostatahyperplasi sarkom er en ekstremt sjelden form for prostatakreft som utgjør ca. 1 % av alle tilfeller. Denne kreftformen oppstår i fibromuskulær del av prostata [7].

Prostata kan deles inn i fire kjertelgrupper, indre sone, ytre sone, sentral sone og muskelsonen. Den indre gruppen omfatter ca. 20 små kjertler som omkranser urinrøret [6, 8]. Det er denne delen av prostata som kalles overgangssonen og utgjør ca. 5 % av volumet i normal prostata. En relativt vanlig tilstand for eldre menn er benign prostatahyperplasi (BPH) som er en godartet forstørrelse av prostata. Dette skyldes unormal vekst av vevet i overgangssonen og forekomsten er økende med alder. Om lag 50 % av alle menn over 60 år, samt 90 % av alle menn over 80 år, lider av denne tilstanden. Ved godartet forstørrelse av prostata følger kroniske vannlatingsplager som skyldes økende trykk på urinrøret og videre blæren, som en følge av den forstørrede prostatakjertelen. Godartet prostatahyperplasi kan behandles kirurgisk eller medikamentelt og må ikke forveksles med kreft i prostata. 20 % av krefttilfellene i prostata oppstår i overgangssonen [9, 10]. Den ytre kjertelgruppen omfatter 20-30 større, forgreinede kjertler som i hovedsak finnes i den bakerste delen av prostata. Denne kjertelgruppen kalles den perifere sonen og utgjør om lag 70 % av normal prostata. Det er i denne sonen de aller fleste krefttilfeller oppstår. Sentral sone i prostata utgjør ca. 25 % av normal prostatakjertel og omgir ejakuleringskanalen. Kreft i denne delen av prostata forekommer i 1-5 % av alle tilfeller og er meget alvorlig da det i mange tilfeller ses spredning til sædvesiklene. Muskelsonen, også kalt stroma, inneholder ingen kjertler, men består av muskler og bindevev [11]. Figur 3 viser inndelingen av de ulike sonene i prostata.



Figur 3: Inndeling av de forskjellige sonene som utgjør prostata er vist i ulike deler av kjertelen [12].

1) Øvre del av prostata består av et tynt lag fibromuskulær stroma, perifer sone, sentral sone og overgangssonen.

2) Midtre del av prostata består av et tynt lag fibromuskulær stroma, sentral sone, overgangssonen og en større del perifer sone.

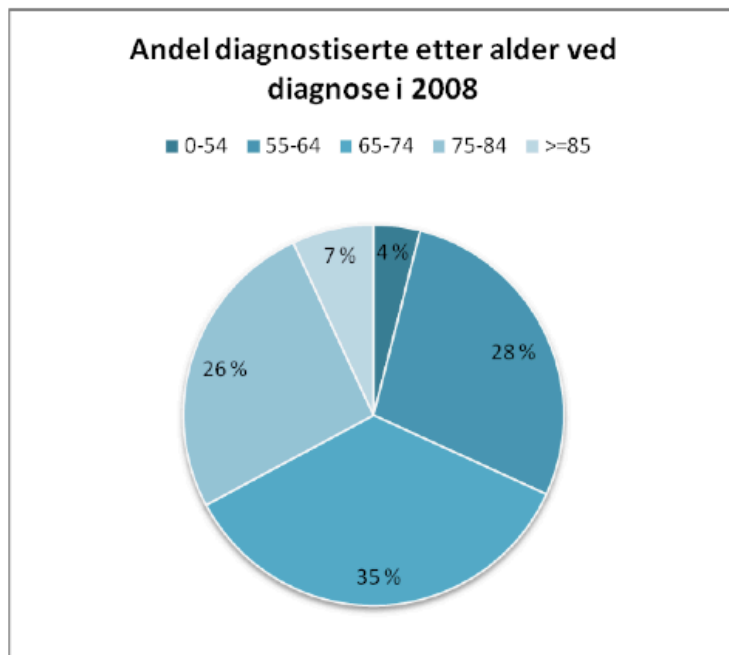
3) Nedre del av prostata består i hovedsak av perifersone.

Den anatomiske inndelingen av prostata deles også inn i fremre lapp, posterior lapp, lateral lapp og median lapp [11]. Tabell 1 viser sammenhengen mellom inndelingen av prostata og de korresponderende soner.

Tabell 1: Prostata deles inn i ulike lapper som korresponderer med soner. Med utgangspunkt i denne inndelingen klassifiseres komplikasjoner relatert til prostata [11].

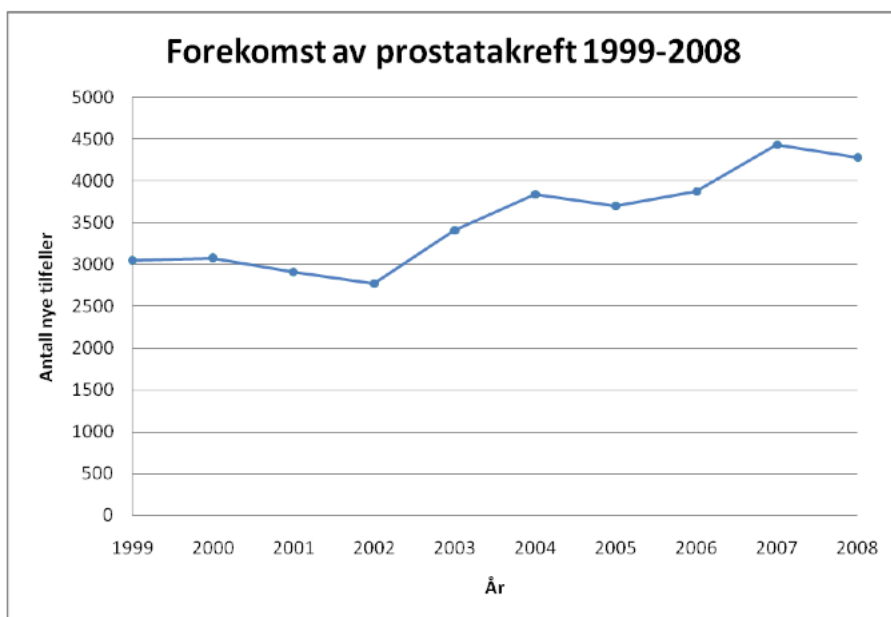
Lokalisasjon	Nærliggende sone
Fremre lapp	Korresponderer med overgangssonen
Posterior lapp	Korresponderer med perifer sone
Lateral lapp	Korresponderer med alle soner
Median lapp	Korresponderer med sentral sone

Kreft i prostata betegnes i 99 % av tilfellene som adenokarsinom, og oppdages oftest i den perifere delen av kjertelen. Kreft i prostata rammer i hovedsak eldre menn og om lag 90 % av de nyoppdagede tilfellene er blant menn over 60 år [5]. Figur 4 viser fordelingen av diagnostiserte etter alder.



Figur 4: Fordelingen av diagnostiserte vist etter alder. Den største andelen med diagnostisert kreft i prostata er mellom 65 og 74 år [13].

Prostatakreft er den kreftformen som hyppigst rammer norske menn og Norge er et av de landene som har høyest mortalitetsrate for kreft i prostata. Insidensen er økende og det er her i landet påvist nærmere 4400 nye tilfeller i året (per 2009) [5]. Figur 5 viser en oversikt over forekomsten av prostatakreft i Norge de siste ni årene.



Figur 5: Statistikken viser at forekomsten kreft i prostata er økende. En liten nedgang i antall nye tilfeller rundt år 2008 skyldes nedgang i antall innmeldte tilfeller, men det er allikevel grunn til å tro at insidensen er økende. Omlag 80 % av alle påviste tilfeller meldes inn til Kreftregisteret [13].

Forekomst av prostatakreft varierer fra land til land, noe som kan skyldes ulike rutiner for screening og innmelding av oppdagede tilfeller. USA er det landet som har høyest insidens og den afroamerikanske befolkningen er mest utsatt [9, 14]. Vest-Europa, Skandinavia, Canada og Oseania har også relativt høy insidens av prostatakreft sammenlignet med Øst-Europa, og Asia ser ut til å være minst utsatt [15]. Høyere levealder og mer aktiv diagnostisering er viktige årsaker til at stadig flere tilfeller av prostatakreft oppdages i Norge. I de fleste tilfeller er ikke kreft i prostata en spesielt aggressiv krefttype, men i noen tilfeller vokser svulsten fort og dette kan føre til metastase til omkringliggende vev. De fleste krefttyper vil fremkalle symptomer, men det vil ikke nødvendigvis kreft i prostata. De sterke symptomene kan komme først etter at svulsten har metastasert og vanligst er metastase til bein og lymfeknuter. I slike tilfeller vil dessverre sykdommen føre til døden i løpet av få år. Behandlingen for metastasert prostatakreft består i hovedsak av hormonbehandling og cellegift, da dette anses som lindrende for å opprettholde best mulig livskvalitet den siste levetiden [9].

Den relative totale overlevelsen av prostatakreft er økende [13]. Tall fra Kreftregisteret viser at i tidsperioden 1995-1999 var den relative overlevelsen på 68,4 % i motsetning til i tidsperioden 2005-2009 da den relative overlevelsen var på 87,0 %. Til tross for dette er prostatakreft den kreftformen som forårsaker flest antall dødsfall blant norske menn.

Gjennomsnittlig dør ca. 1200 menn i Norge av prostatakraft hvert år. Risikoen for kreft i prostata ved fylte 75 år er 12,7 % [13]. Til sammenligning med brystkreft, som er den hyppigste kreftformen blant kvinner, kommer det frem at prostatakraft har høyere insidens og mortalitetsrate. I 2009 ble det registrert 2745 tilfeller av brystkreft, i motsetning til 4299 tilfeller av prostatakraft [5].

Per i dag er diagnostisering av kreft i prostata hovedsakelig basert på pasientens plager, samt serumnivå av prostataspesifikt antigen, PSA (mest vanlig), eller Kallikrein-3, KLK3 [16, 17]. PSA og KLK3 er proteaser som syntetiseres av prostatavev. Kun en liten del av PSA lekker ut i blodbanen, men ved kreft i prostata vil nivået av PSA i serum øke. Dette gir grunnlag for at PSA kan brukes som biomarkør for deteksjon og overvåking av kreft i prostata. PSA er imidlertid ingen spesifikk markør da den også vil vise forhøyet serumnivå ved BPH og urinveissykdommer [18]. Screening av pasienter basert på PSA har redusert antall dødsfall forårsaket av prostatakraft med 20 %, men til gjengjeld er det høy risiko for overdiagnostisering på grunnlag av de tidligere nevnte årsaker [17, 19]. I tabell 2 er de ulike årsakene til utredning for prostatakraft presentert.

Tabell 2: De aller fleste utredes for prostatakrefte på grunn av PSA-nivå, dernest urinveissymptomer. Per i dag er ikke PSA en rutinemessig analyse, men veldig mange leger velger å måle PSA på sine pasienter som befinner seg i risikogruppen for prostatakrefte. Dette gjøres på grunn av fraværende av symptomer på sykdommen og ved påvisning i tidlig stadium er prognosen betraktelig bedre [9]. Mange menn er bevisst på prostataproblemer og ønsker selv å bli undersøkt. Utredelse pga. PSA er synkende fordi PSA ikke er en veldig spesifikk markør og forhøyede verdier er ikke enstydige med kreft. Tabellen viser en nedgang av "kun PSA" og en økning av "andre årsaker" i 2008. Dette skyldes en endring i innmeldingsskjemaet som ble gjort 1.10.08 og tallene har blitt påvirket av dette [13].

ÅRSAKER TIL UTREDNING AV PROSTATAKREFT

	2004	2005	2006	2007	2008
	Antall (%)	Antall (%)	Antall (%)	Antall (%)	Antall (%)
Tilfeldig funn v/TUR-P	322 (8,7)	317 (9,2)	277 (8,0)	241 (6,4)	221 (6,7)
Metastasemistanke	233 (6,3)	203 (5,9)	166 (4,8)	160 (4,2)	117 (3,5)
Kun PSA	1239 (33,6)	1121 (32,7)	1195 (34,3)	1343 (35,7)	725 (22,0)
Urinveissymptomer	986 (26,7)	962 (28,1)	979 (28,1)	1053 (28,0)	906 (27,5)
Palpasjonsfunn	447 (12,1)	390 (11,4)	442 (12,7)	411 (10,9)	382 (11,6)
Palpasjonsfunn og urinveissymptomer	302 (8,2)	305 (8,9)	269 (7,7)	272 (7,2)	207 (6,3)
Andre årsaker	144 (3,9)	123 (3,6)	126 (3,6)	250 (6,6)	577 (17,5)
Ikke oppgitt	14 (0,4)	7 (0,2)	25 (0,7)	37 (1,0)	161 (4,9)
Totalt	3687 (100)	3428 (100)	3479 (100)	3767 (100)	3296 (100)

Ved påvist forhøyet PSA vil neste steg være digital rektal undersøkelse av prostata og videre undersøkelse av histopatologisk prøve fra prostata. Dette oppnås vanligvis ved transrektal eller transperineal ultralydveiledet biopsi. Undersøkelse av vev fra prostata gjøres av patolog og eventuell påvist kreft graderes vha. Gleasonsystemet. Gleasonsystemet er utviklet av den amerikanske patologen Donald F. Gleason og beskriver vha. en tallverdi alvorlighetsgraden av biopsimaterialet [20]. Gleasongraderingen strekker seg fra 1-5 og tilsvarer henholdsvis høyt differensiert tumor og lavt differensiert tumor. Gleason score er summen av de to mest utbredte Gleasongrader i en prøve. Gleasonsystemet, Gleason score eller grad, brukes sammen med TNM-systemet (Tumor, lymph Node, Metastasis) for å diagnostisere vevsprøver fra prostata. TNM-systemet beskriver størrelse på tumor, spredning til regionale lymfeknuter og tilstedeværelse av metastaser. PSA og biopsi med videre Gleason gradering og TNM-klassifisering, vil til sammen gi et bilde på pasientens risiko for organbegrenset sykdom og eventuelt metastase til omkringliggende vev. På bakgrunn av disse opplysningene velges terapi [20-22].

1.1.1.1 Behandling av prostatakraft

Alternativene for behandling av lokalisert prostatakraft er i hovedsak radikal prostatektomi, stråling og hormonbehandling som alle kan anvendes på ulike måter og i kombinasjoner. Disse behandlingsmetodene viser lignende effekt, men ulike bivirkninger. Valg av behandlingsmetode baseres på pasientens preferanse, forventet levealder og tumorkarakteristikk. Vanligvis vil behandling med kurativ hensikt gis til menn med lang forventet levealder og høyt differensiert tumor [17, 21, 23]. Etter behandling brukes PSA-nivå som en indikator på hvorvidt behandlingen var vellykket og om sykdommen gir tilbakefall. Økning i PSA-nivå er første tegn på svikt etter behandling. For pasienter som er utsatt for tilbakefall er det anbefalt med androgen terapi. Denne typen behandling utføres i hovedsak for å motvirke produksjon og funksjon av hormoner som fremmer spredning av kreftcellene [21, 23]. Et alternativ for lav-risiko pasienter og eldre pasienter er aktiv overvåking der pasienten regelmessig følges opp, og livsstilsfaktorer som for eksempel sunt kosthold og mosjon kan være med på å holde livskvaliteten på et akseptabelt nivå [21, 24].

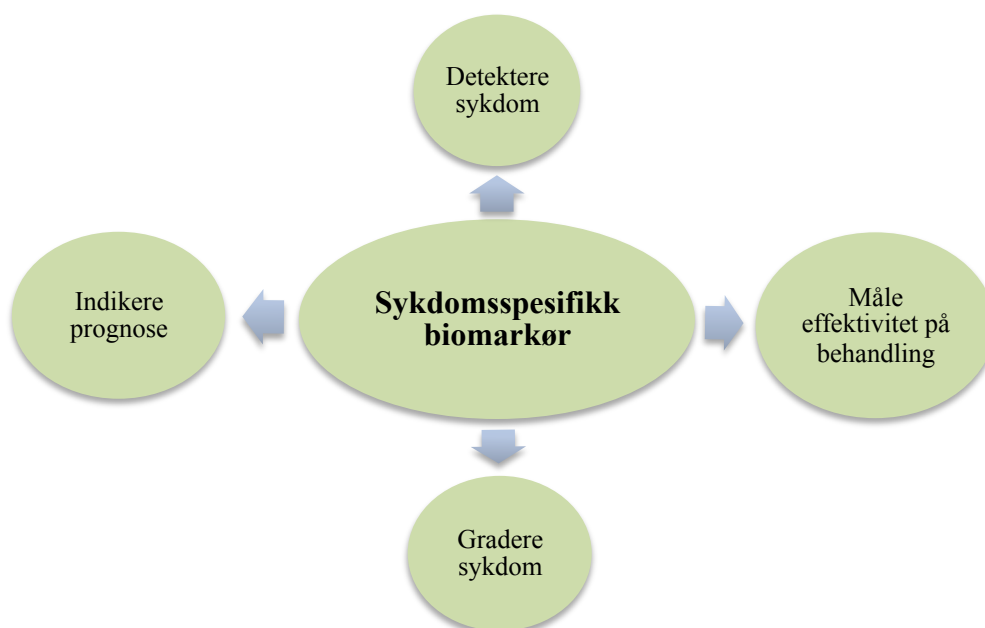
Fjerning av androgener skjer i hovedsak ved kastrering (testosteron eliminering) eller kirurgisk fjerning av testikler. Samme behandling kan også gis med palliativ hensikt til pasienter med dårlig prognose, i tilfeller der kreften har metastasert. Imidlertid er effekten av androgen ablasjon tidsbegrenset og de fleste pasientene gjennomgår videre sykdomsutvikling og utvikler hormonrefraktær prostatakraft [21, 23]. Gitt dette scenariet er det klart at bekjempelse av prostatakraft fortsatt representerer et uløst klinisk problem. En viktig utfordring for fremtiden vil være å finne en diagnostisk metode som sikkert kan identifisere aggressive krefttilfeller. Forståelse av molekylære forandringer som skiller progressiv sykdom fra ikke-progressiv sykdom vil forenkle videre behandling av pasienter med prostatakraft, og det er svært ønskelig med bedre behandlingsmetoder enn det som finner i dag. Identifikasjon av biomarkører som kan hjelpe til i vurderingen av pasientens prognose og gi opplysninger som forenkler valg av behandling, gir mulighet for utforming av nye terapeutiske metoder [25].

Mange studier har fremhevet potensialet av mikro-RNA (miRNA) som en ny diagnostisk eller prognostisk biomarkør. Resultater fra flere studier trekker frem spesifikke miRNA som er utstyrt med onkogene- og tumor suppressive funksjoner. Det er per i dag et fåtall studier som har undersøkt miRNA-uttrykk i prostatakraft, men det er holdepunkter for at miRNA kan bidra i utviklingen av nye biomarkører for kreft i prostata [25-29].

De siste årene har det blitt klart at endring i miRNA-uttrykk er et utbredt fenomen i utvikling av kreft hos mennesket, og det er naturlig å anta at disse molekylene spiller en vesentlig rolle i kreftutvikling. I noen tilfeller er uttrykket av utvalgte miRNA eller miRNA-profiler funnet å korrelere med ulike patologiske parametere som for eksempel tumorvekst, og har dermed vært til hjelp med å forutsi pasientens kliniske utfall eller respons på behandling [30, 31].

1.2 Biomarkører

En biomarkør brukes som en indikator på en biologisk tilstand. En biomarkør må ha en egenskap som gjør at den kan detekteres og vurderes i normale biologiske prosesser, sykdomsfremkallende prosesser eller i vurdering av respons på terapeutisk behandling. I medisinsk forskning kan en biomarkør for eksempel være et protein som uttrykkes i større eller mindre grad relatert til gitte biologiske prosesser som kan knyttes mot sykdom [32]. Figur 6 viser et diagram som skisserer ulike egenskaper som kan kjennetegne en sykdomsspesifikk biomarkør.



Figur 6: For å kunne klassifiseres som en sykdomsspesifikk biomarkør må ulike kriterier ligge til grunn. Det må ved hjelp av den potensielle biomarkøren være mulig å detektere eventuell sykdom, måle effektivitet på utført behandling, gradere påvist sykdom og gi en indikasjon på pasientens videre prognose. Eksempler på sykdomsspesifikke biomarkører kan være bestemte proteiner, antistoffer og hormoner.

Per i dag finnes det ingen god behandling av prostatakraft som har metastasert til omkringliggende vev. De fleste dødsfall som er forårsaket av denne sykdommen skyldes metastaser, som er svært motstandsdyktige mot konvensjonell terapi. Foreløpig er PSA, sammen med Gleason systemet og TNM-klassifisering, brukt for påvisning og overvåking av prostatakraft [20]. Vurderingen av Gleason score er en subjektiv vurdering av hver enkelt patolog og vil derfor ikke gi et objektivt mål på sykdommens stadium. Feil vurdering av pasientens diagnose og prognose vil bety at noen

pasienter ikke får riktig behandling, noe som kan få fatale konsekvenser. Den prognostiske verdien av økt PSA er begrenset, ettersom avansert prostatakraft i noen tilfeller kan være forbundet med svært lav eller normal PSA verdi. Det er derfor et stort behov for nye, mer spesifikke biomarkører som kan brukes til å forutsi kreftprogresjon ene og alene eller i tillegg til en aktuell biomarkør som PSA. Forskning viser at miRNA kan være en potensiell biomarkør for kreft i prostata og det er derfor ønskelig å undersøke dette nærmere [31, 33, 34].

1.3 miRNA – posttranskripsjonelle genregulatoriske RNA-molekyler

miRNA er små, enkelttrådede, ikke-kodende RNA-molekyler med en størrelse på omlag 19-24 nukleotider. miRNA er post-transkripsjonelle genregulatoriske sekvenser som bindes til 3' UTR på mRNA og hemmer translasjon eller fremmer degradering av mRNA. Dette gjør miRNA til en sentral del av RNAi der enzymkomplekser kløyver dsRNA til kortere fragmenter som ikke kan translateres [35, 36]. Hvert miRNA kan inhibere flere mRNA og direkte eller indirekte kontrollere uttrykket av flere tusen proteiner. miRNA kan operere alene eller sammen om å inhibere et mRNA. I hovedsak vil miRNA nedregulere aktiviteten til målgenet, men det er også eksempler der miRNA fremmer gentranslasjon [37].

Det første miRNA som ble oppdaget og beskrevet er Lin-4. Lin-4 ble påvist i *C. Elegans* i tilknytning til et studie på genet lin-14 som viste seg å reguleres av en kort RNA-sekvens som ble kodet av lin-4 genet. En RNA-sekvens på 61 nukleotider ble prosessert til en kortere sekvens på 22 nukleotider som inneholdt sekvenser som var delvis komplementære til 3'UTR av lin-14. Resultatet av denne mekanismen viste seg å være nødvendig for reguleringen av translasjonen av proteinet lin-14 [25, 38, 39]. Beskrivelse av Lin-4 ble publisert i 1993.

Sekvenslikhet i 5'-enden av et modent miRNA deler miRNA inn i familier. Det er ikke gitt at miRNA i samme familie kontrollerer de samme biologiske prosessene, dette er fortsatt en uavklart problemstilling [40].

miRNA er viktig i forståelsen av tumorutvikling, progresjon og metastase av kreft hos mennesket [41]. Uttrykket av miRNA i en organisme eller vev kan brukes til å bedre klassifisering, diagnose og prognose for humane maligniteter som for eksempel kreft. Sammenligning av miRNA-uttrykk mellom normale celler og kreftceller kan fortelle oss mye om cellens forandring under kreft [42].

Per i dag er det identifisert om lag 21 600 miRNA fra 168 ulike organismer. Av disse er 1900 miRNA identifisert i mennesker [43].

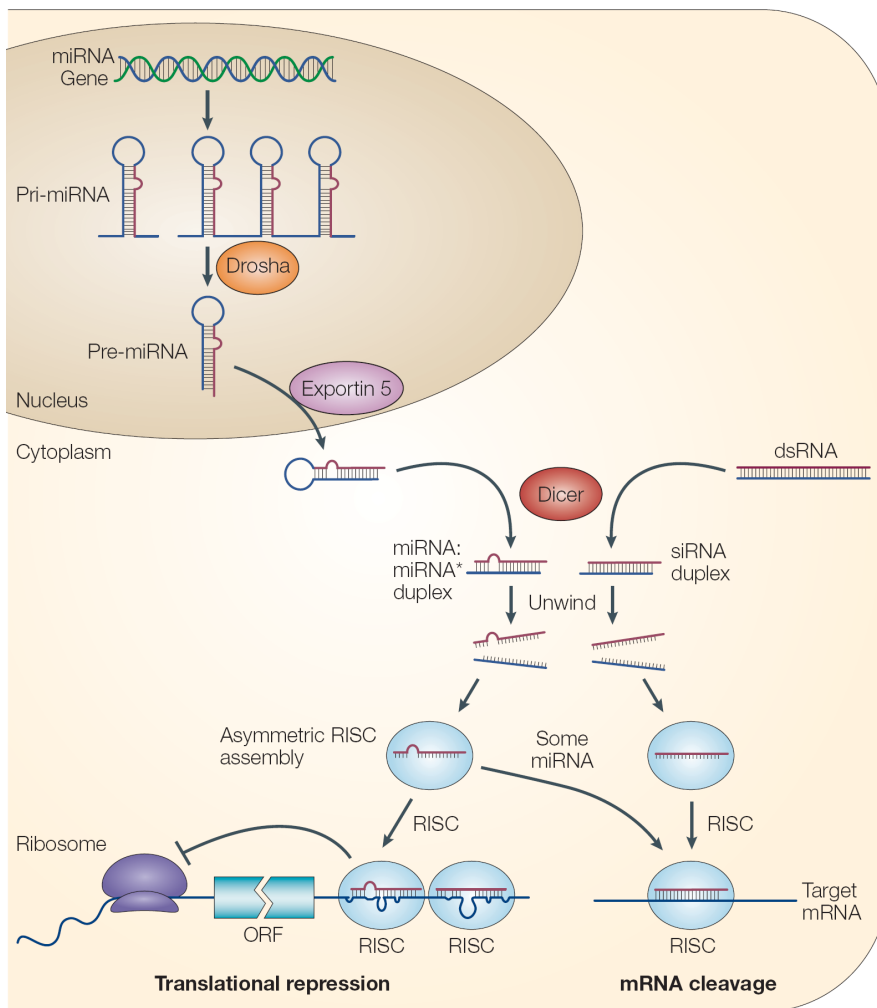
1.3.1 Transkripsjon og prosessering av miRNA

miRNA dannes ved transkripsjon og gjennomgår ulike posttranskripsjonelle modifikasjoner før det blir et modent miRNA som kan binde mRNA. Prosesseringen av miRNA skjer hovedsakelig i cytoplasma etter at det umodne miRNAet er transportert ut av kjernen.

miRNA transkriberes i kjernen av RNA-polymerase II, i første omgang som lengre pri-miRNA som blir prosessert av RNase III [44]. Videre vil Drosha komplekset og det dobbeltrådede RNA-bindende proteinet Pasha (DGCR8), forme hårnålstrukturen på omlag 70 nukleotider kalt pre-miRNA [38, 45]. Ved hjelp av RAN GTP-avhengig Exportin 5 transporteres pre-miRNA fra kjernen og ut i cytoplasma hvor det gjennomgår ytterligere prosessering. RNAsen Dicer kutter av "loopen" på hårnålstrukturen og danner et ufullkomment, dobbeltrådet miRNA-miRNA kompleks på omlag 22 nukleotider [31, 45, 46]. I dobbeltråden på omlag 22 bp, vil den modne miRNA-tråden overføres til miRISC (RNA induced silencing complex – likt som i RNAi signalvei) og den komplementære tråden degraderes [38, 46]. miRNA (i RISC) regulerer genuttrykk ved å bindes til mRNA ved 3'UTR (ORF). Dette kan føre til degradering av mRNA eller undertrykkelse av translasjon. Figur 7 viser en illustrasjon over de ulike trinnene i dannelsen av et miRNA.

miRNA kan bindes til mange ulike mRNA, og samme mRNA kan ha mange forskjellige miRNA bundet til seg. Bindingen mellom miRNA og mRNA trenger ikke være 100 % fullkommen for at miRNA skal kunne utøve sin funksjon. Dersom bindingen mellom miRNA og mRNA er omtrent 100 % fullkommen vil det føre til degradering av mRNA. Delvis komplementær binding med kun 6-8 baser, vil føre til inhibering av translasjon. Denne prosessen er mest vanlig og kalles genutslokking. Flere miRNA opererer ofte sammen om reguleringen av et mRNA og dersom flere miRNA bindes til mRNA samtidig vil det føre til en sterkere respons (nedregulering) enn dersom bare ett miRNA bindes [31].

miRNA omfatter omlag 5 % av transkriptomet hos mennesket, og dette gjør miRNA til en av de største klassene av genregulatorer. Det er estimert at ca. 1/3 av alle proteinkodende gener er mottakelige for miRNA [43].



Figur 7: Dannelse og funksjon av miRNA. miRNA transkriberes i kjernen som et lengre pri-miRNA der det videre formes i en hårnålsstruktur på om lag 70 nukleotider kalt pre-miRNA. Pre-miRNA transporteres ut i cytoplasma hvor det gjennomgår ytterligere prosessering, og det dannes et ufullkomment, dobbeltrådig miRNA-miRNA kompleks på om lag 22 nukleotider. Den modne miRNA-tråden i komplekset overføres til miRISC som kan binde mRNA og undertrykke translasjon [38, 40, 45].

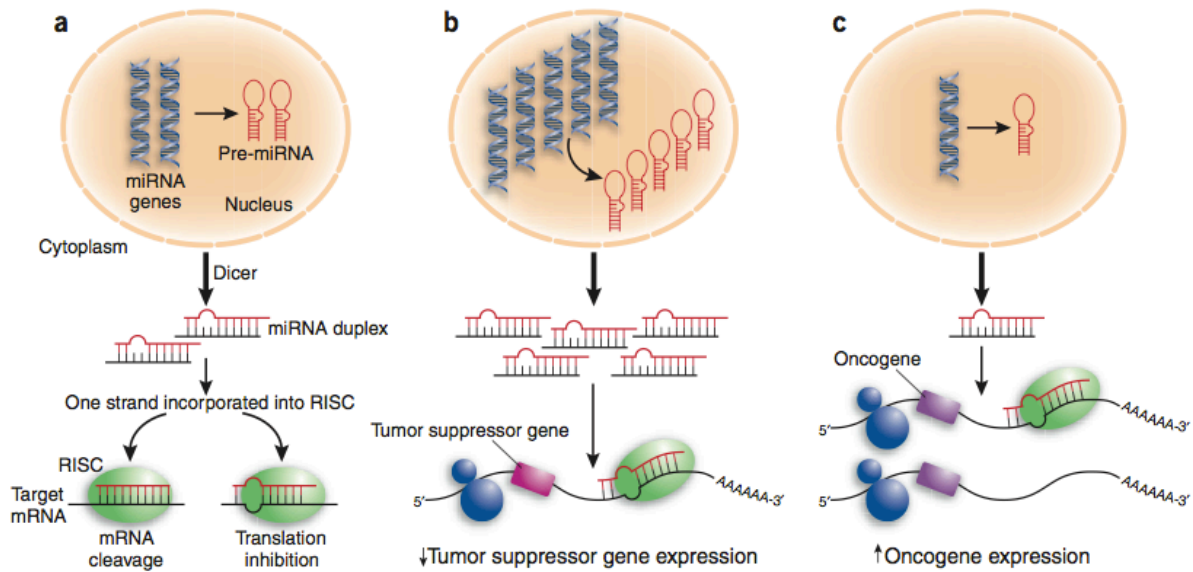
Etter hvert som det har blitt oppdaget flere miRNA, har det blitt nødvendig med et bestemt nomenklatursystem for å skille ulike miRNA fra hverandre. Ved navngivning av et miRNA settes først en prefix som forteller fra hvilken art det gitte miRNAet stammer fra. miRNA som er påvist hos mennesket benevnes med "hsa" som står for homo sapiens [47]. Videre gis et nummer som baserer seg på forskjellen i baserekkefølgen. Dersom det siste påviste miRNA er gitt navnet miR-144, vil det neste miRNA som oppdages få navnet miR-145. miRNA som kun skiller seg fra hverandre med 1-2 baser får tildelt suffixer som viser likheten mellom dem, for eksempel miR-23a

og miR-23b [47]. Det er også mulig at to miRNA består av samme sekvens, men stammer fra ulike loci. Hvis dette er tilfellet vil de få numeriske suffix, som for eksempel miR-6-1 og miR-6-2. Den modne sekvensen av et miRNA benevnes ”miR” og det umodne pre-miRNAet benevnes ”mir” [47].

1.3.2 miRNA i kreft

I normalt vev vil resultatet av miRNA som er bundet til mRNA, være undertrykkelse av genekspressjon. Dette skjer gjennom blokkering av proteintranslasjon eller endret mRNA-stabilitet. Under normale omstendigheter vil ikke binding av miRNA til mRNA føre til endringer i vekst, proliferasjon, differensiering eller apoptose. På grunn av denne genregulatoriske egenskapen er det svært interessant å undersøke miRNA-profil i ulike vev [42, 48]. miRNA er godt konservert i organismen, og miRNA-uttrykk kan hjelpe oss til å forstå en organisme eller et vevs regulatoriske nettverk, som i høy grad antas å kunne knyttes opp mot sykdom som kreft. miRNA har en sentral rolle i ulike cellulære prosesser som cellyklus, celledifferensiering og overlevelse/apoptose [49]. Kontroll av disse prosessene styres i såkalte fragile områder, områder i genomet som omtales som kreftassosierte områder. miRNA er vevsspesifikke, som vil si at endringer i miRNA-uttrykk i en spesifikk vevstype kan relateres til sykdom [42, 50].

Genekspressionsanalyser viser en generell deregulering av miRNA-uttrykk i prøver fra personer med kreft, samt at uttrykket varierer mellom ulike kreftformer [25, 51]. miRNA fungerer som genregulatorer i cellen og kan deles inn i to grupper, onkogene-miRNA (oncomirs) og tumor supressor-miRNA, som henholdsvis er funnet oppregulert og nedregulert i forbindelse med kreft [40]. Onkogene-miRNA og tumor supressor-miRNA regulerer cellens vekst, og ukontrollert celledeling kan oppstå dersom onkogene-miRNA forekommer i økt uttrykk, eller tumor supressive-miRNA nedreguleres [41]. Onkogene eller tumor-supressive egenskaper har blitt identifisert i flere ulike miRNA hos pasienter med kreft, basert på tap eller tilførsel av cellefunksjoner [52]. Figur 8 illustrerer ulike påvirkninger miRNA kan ha på cellen.



Figur 8: miRNA kan ha ulike påvirkninger på cellen. a) Under normal dannelse og funksjon av miRNA vil miRNA bindes til mRNA og forhindre transkripsjon eller føre til degradering av mRNA. b) Overuttrykk av miRNA som hemmer tumor supressorgener. miRNA fungerer som et onkogen og kan føre til kreftfremkallende endringer i cellen (økt proliferasjon, invasjon, angiogenese, økt overlevelse) ved å undertrykke tumor supressorer. c) Nedregulering av miRNA som hemmer onkogener. Ved mangel på miRNA som oppfører seg som tumor supressorer (ved å hemme onkogener) fører det til økt risiko for kreftutvikling ved at onkogenene uttrykkes i større grad enn normalt [53].

Det første bekræftelsen på at miRNA var involvert i kreftutvikling ble påvist i et studie som ble utført på pasienter med B-celle kronisk lymfatisk leukemi (CLL) i 2004 [54]. Det kom frem at i 68 % av tilfellene med CLL var miR-15 og miR-16 nærmest fraværende. Fravær av miR-15 og miR-16, som begge fungerer som tumor supressorer, fører til ukontrollert uttrykk av anti-apoptotisk protein BCL2 [54]. Videre ble det påvist at fravær av miR-15/miR-16 gruppen også forekommer i andre kreftformer som blant annet prostatakreft. I 85 % av tilfellene med prostatakreft er miR-15/miR-16 gruppen sterkt nedregulert [55]. Et annet eksempel på et miRNA som fungerer som tumor supressor er miR-101 som regulerer aktiviteten til enzymet EZ2H. EZ2H er en histonmetyl transferase og ved nedregulering av miR-101 vil enzymet EZ2H uttrykkes i høy grad. Ved lokalisert prostatakreft er et eller begge loci i genomet som koder for miR-101 somatisk tapt i 37,5 % av tilfellene. Det samme gjelder for 66,7 % av tilfellene med metastasert prostatakreft.

Dette tyder på at tap av miR-101 fører til kreftutvikling ved at cellens overlevelse og evne til metastase ikke blir kontrollert, men fremmet av enzymet EZ2H som er overuttrykt [56].

Flere miRNA har utpekt seg som tumor supressorer og eksempler på noen av disse som kan relateres til prostatakraft er vist i tabell 3.

Tabell 3: Flere miRNA er foreslått som potensielle tumor supressorer. Disse er funnet nedregulert i områder med kreft, sammenlignet med normalt vev. Et utdrag av noen miRNA som har utpekt seg som tumor supressorer relatert til prostatakraft er vist i tabellen under [54, 55, 57, 58].

miRNA som er gjennomgående nedregulert i områder med kreft, sammenlignet med normalt vev		
miRNA	Funksjon/beskrivelse	Kommentar
mir-145	Tumor supressor	Induserer apoptose.
miR-200 familien	Tumor supressor	Induserer apoptose, øker Notch signalisering.
miR-23a	Tumor supressor	Undertrykker celleproliferasjon.
miR-16	Tumor supressor	Regulator i cellesyklus. Tap av funksjon fører til økt uttrykk av BLC2.
miR-34 familien	Tumor supressor	Transkripsjonelt aktiverer av p53. Induserer apoptose og cellesyklus arrest. Undertrykkelse av ulike onkogener.
let-7a	Tumor supressor	Nedregulerer E2F2 og CCND2. Brukt i terapeutisk behandling. Demper cellevekst og migrasjon.

Mange miRNA er funnet oppregulert i områder med kreft, og basert på deres evne til å initiere og akselerere kreftutvikling omtales disse som oncomirs. Det første oncomir ble oppdaget i 2005 i et forsøk som demonstrerte at Myc (transkripsjonsfaktor) direkte var i stand til å øke uttrykket av polycistronisk gruppe miR-17/92 [59]. Økt uttrykk av miR-17/92 gruppen bidrar til økt kreftutvikling relatert til undertrykkelse av tumor supressorer som hemmer anti-apoptotiske proteiner [60]. Denne gruppen har vist seg å være oppregulert i mange kreftformer som blant annet brystkreft, lungekreft og prostatakraft [61]. Et annet miRNA med onkogen aktivitet er miR-21 som er uttrykt i høy grad i de fleste store kreftformene, deriblant prostatakraft [62]. Flere studier viser at miR-21 har betydning i utviklingen av tumor, apoptose, og invasjon. Dette bygger på undertrykkelse av ulike tumor supressorer som blant annet PTEN, PDCD4 og TPM-1 [63-65]. Tabell 4 viser et utvalgt av noen oncomirs som er relevante for prostatakraft.

Tabell 4: Noen miRNA er oppregulert i områder med kreft sammenlignet med normalt vev, disse kalles oncomirs. Noen miRNA som er fremhevet med onkogene egenskaper relatert til kreft i prostata er presentert i tabellen under [59, 61, 62].

miRNA som er gjennomgående oppregulert i områder med kreft, sammenlignet med normalt vev		
miRNA	Funksjon/beskrivelse	Kommentar
miR-106b	Oncomir	Regulerer tumor supressorene PTEN og E2F1.
miR-17/92	Oncomir	Inhiberer tumor supressorer som hemmer anti-apoptotiske proteiner.
miR-27a	Oncomir	Inhiberer Prohibitin.
miR-21	Oncomir	Undertrykkelse av ulike tumor supressorer.

1.3.2.1 miR-27a og miR-23a

miR-27a og miR-23a er to av flere miRNA som er utpekt som potensielle biomarkører for kreft i prostata.

miR-27a er et oncomir som funnet oppregulert i prøver med kreft sammenlignet med normale prøver [66]. Økt uttrykk av miR-27a fører til færre bindinger mellom mRNA og prohibitin, et protein som fungerer som en tumor supressor. miR-27a har større spesifisitet i binding til mRNA enn prohibitin og utkonkurrerer dermed bindingen til mRNA. Dette resulterer i økt risiko for ukontrollert cellevekst og kreftutvikling [66, 67].

miR-23a er en tumorsuppressor som under krefttilstander undertrykkes av den onkogene transkripsjonsfaktoren cMyc [68]. Undertrykkelse av miR-23a fører til økt uttrykk av mitokondriell glutaminase som er en nødvendig for energiomsetning i prolifererende celler [69].

1.3.3 miRNA som terapeutisk verktøy

miRNA regulerer genekspressjon ved å forhindre translasjon av bestemte mRNA, noe som gjør miRNA svært relevant i utvikling av terapeutisk behandling av prostatakreft [42].

Bruk av syntetisk miR-16 er et eksempel på hvordan miRNA kan fungere som terapeutisk verktøy. miR-16 er en tumor supressor, og uttrykket av miR-16 er nedregulert ved prostatakreft.

Nedregulering av miR-16 fører til økt uttrykk av CDK1 og CDK2 som er forbundet med kontroll av cellyklus og cellulær proliferasjon [70]. Celler med syntetisk miR-16 (cellelinjer) har blitt injisert i mus og resultatet viste betydelig nedgang i cellens evne til å metastasere. Dette indikerer at miR-16 hemmer tumorvekst ved å regulere uttrykket av CDK1 og CDK2. miR-16 kan være et potensielt miRNA til bruk i behandling av prostatakreft [71].

Det er imidlertid usikkert hvordan terapi basert på miRNA vil påvirke den generelle genreguleringen. Genekspressionsanalyser og proteomikkanalyser kan være med på å gi en bedre forståelse av hvordan miRNA regulerer translasjonen, både hos friske og syke mennesker [72].

2 Problemstilling

Dødelighet på grunn av avansert kreft i prostata er fortsatt et klinisk problem, og dette gjør at utvikling av alternative behandlingsmetoder er svært ønskelig. For å forstå molekylære ulikheter som skiller progressiv sykdom fra ikke-progressiv sykdom, vil identifisering av nye biomarkører som kan bidra til å gi en mer korrekt prognose være med på å forenkle behandling av pasienter med prostatakreft, og det er svært ønskelig med bedre behandlingsmetoder enn det som finnes i dag.

miRNA er viktig for regulering av genuttrykk, og det har vist seg at miRNA har en betydelig rolle under utvikling av kreft. Så langt er det bare et lite antall studier som har undersøkt uttrykk av miRNA relatert til prostatakreft. De resultater som er lagt frem er ikke konsekvent reproducerbare, noe som i stor grad kan skyldes at teknologien som benyttes ikke er optimalisert for denne typen analyse [73]. Det er grunn til å tro at avvikende miRNA-uttrykk kan påvirkes av ulike faktorer som tumorstadium, tidligere behandling, oppbevaring av prøvemateriale og teknikken som er benyttet for RNA-isolering [52, 74]. Forskjell i miRNA-uttrykk mellom normalt vev og vev med kreft kan ha prognostisk verdi og gi en bedre forståelse av hvilken rolle miRNA har i utvikling og progresjon av prostatakreft. Enkelte miRNA er funnet oppregulert (oncomirs) og andre nedregulert (tumor suppressorer) i forbindelse med kreft i prostata [75]. Endring i miRNA-uttrykk kan påvirke cellens fenotype og det funksjonelle uttrykk av enkelte gener som er involvert i ulike cellulære prosesser. Dette kan føre til økt vekst eller økt overlevelse hos cellene [52, 76].

Sett under ett, viser de gjennomførte studiene at miRNA er forskjellig uttrykt i vev fra kreftområder sammenlignet med normalt vev. Dette ligger til grunn for vurderingen av miRNA som potensielle biomarkører for prostatakreft [28, 42, 50, 52, 77]. På bakgrunn av dette kan miRNA være potensielle biomarkører for kreft i prostata og det er derfor ønskelig å etablere en god metode for isolering av total-RNA fra formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale som kan brukes for å undersøke miRNA i vev fra prostata. Det vil også være interessant å undersøke hvilken miRNA-profil som uttrykkes i gleason grad 3, 4 og 5 for å finne ut om det er forskjell i miRNA-profil knyttet til alvorlighetsgrad av prostatakreft.

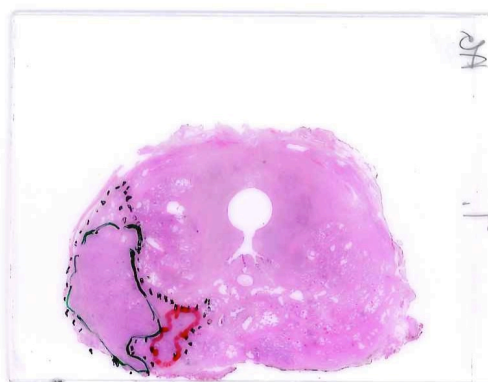
3 Materiale og metode

3.1 Prøvemateriale - formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale

Formalinfikserte vevsprøver fra prostata med ulik Gleason grad ble benyttet for optimalisering av metode for RNA-isolering, samt undersøkelse av miRNA-profil ved hjelp av sekvensering. Prøvene ble samlet inn gjennom et samarbeid mellom Regional forskningsbiobank Midt-Norge og Urologisk avdeling ved St. Olavs Hospital og er en del av et større samarbeid som har pågått siden 2002. Prøvene er tatt i forbindelse med reell kreftproblematikk og etter histologisk undersøkelse av patolog benyttes prøvene i ulike forskningsprosjekter. Godkjenning og samtykke for å benytte disse prøvene ble gitt av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, våren 2004.

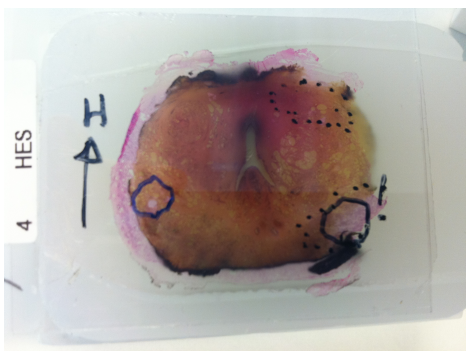
3.1.1 Histologisk korrelering og utstansing av sylindere fra tumorområder

Prøvematerialet som ble benyttet i prosjektet var fra prøver med ulik Gleason grad, og egnede snitt fra prostatavev med tumorområder i Gleason grad 3, 4 og 5 ble på forhånd vurdert av patolog som merket av tumorområdene. De utvalgte prøvene hadde gjennomgående tumor i tre snitt, snitt hvor samme tumormønster gjenspeiler seg i snittet før og etter det bestemte snittet. De snittene med størst tumorområde ble foretrukket. Figur 9 viser et bilde av et snitt av prostatavev som er farget med hematoxylin, eosin og safran (HES).



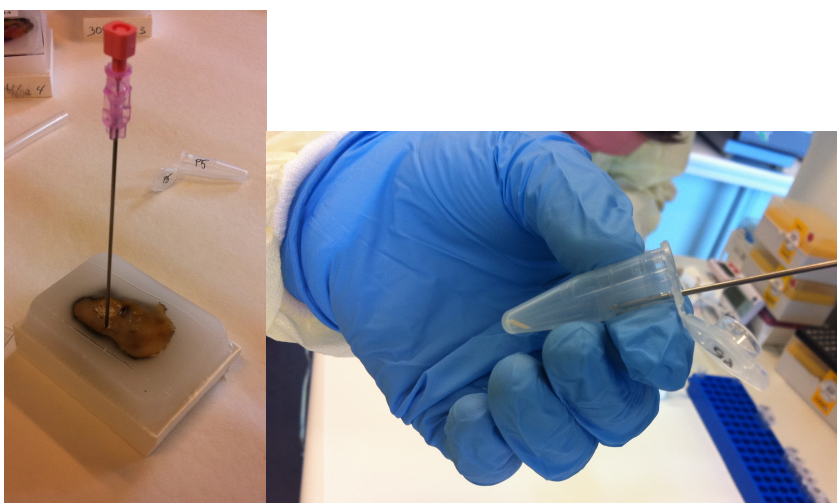
Figur 9: Snitt fra prostatakjertel farget med HES. Tumorområder er ringet rundt for lettere orientering. Det ble tatt utgangspunkt i snitt med markerte tumorområder for videre orientering i vevsblokk før utstansing. Snittene ble brukt for å lage bildemaler til utstansing av vevssylinder.

Det ble laget bildemaler av de utvalgte snittene for bruk under utstansing av vevssylindere. Snittene hydreres som en del av fremføringsprosessen og det vil føre til en vannansamling i vevet som gjør at størrelsen på snittene er litt større enn selve vevet som er støpt i parafin. Et bilde av et snitt med tilhørende vevsblokk er vist i figur 10. Bildemalen ble brukt for å lette orientering i vevsblokken ved utstansing av vevssylindere.



Figur 10: Prostatakjertel innstøpt i parafinblokk. Over blokken er det lagt et snitt som viser korrelasjonen mellom blokk og snitt.

Det ble stanset ut to vevssylindere fra hver blokk og disse ble overført til eppendorfrør for oppbevaring fram til isolering av RNA. Sylindene ble lagret i fryser ved -80°C . Figur 11 viser bilder fra den praktiske gjennomføringen av utstansing av vevssylindere.



Figur 11: Etter orientering av tumorområde i blokken stanses vevssylindere ut vha. en spinalkanyle. Vevssylindere overføres til et eppendorfrør for oppbevaring.

3.2 RNA-isolering

RNA-isolering fra formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale ble utført med *RecoverAll™ Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE*. Protokollen er vist i vedlegg 1. Prosedyre for isolering av total-RNA er utarbeidet av produsent (Ambion), samt at det er gjort noen modifiseringer for å forbedre kvalitet og øke konsentrasjonen på det isolert RNAet. Protokollen er basert på metodeutprøvinger hvor ulike parametere ble testet ut for å oppnå best utbytte RNA. RNA-isolering består av flere steg. Tabell 5 viser hovedstegene i en RNA-isolering.

Tabell 5: En RNA-isolering består av flere trinn. I første trinn fjernes parafin fra vevsbiten. Vevsbiten behandles videre med protease som spalter proteiner og peptider i prøven. Prøven overføres til et oppsamlingsrør med et glassfiberfilter som binder nukleinsyrene. Ulike vaskesteg fjerner uønskede komponenter i prøven. Prøven behandles med DNase som bryter ned bindingene i DNA til kortere sekvenser. Før eluering av isolert total-RNA vaskes prøven for å fjerne rester av kjemikalier og andre komponenter som kan forstyrre senere analyser. Isolert total-RNA elueres i eppendorfrør og lagres i fryser ved -80°C.

1. Deparafinering
2. Proteasebehandling
3. Binding av nukleinsyrer til kolonne
4. Ulike vaskesteg
5. Dnase-behandling
6. Ulike vaskesteg
7. Eluering av total-RNA

Ulike faktorer som vevstype, fikseringsmetode og lagringsbetingelser (før og etter isolering) vil påvirke utbyttet av total-RNA fra parafininnstøpt materiale. Generelt vil utbyttet være 50 % av det som kan ekstraheres fra ferskt vev [78]. For å øke utbyttet total-RNA fra formalinfiksert vevsmateriale kan det tenkes at oppkutting eller homogenisering av vevssylinderen før deparafinering kan bidra til bedre RNA-utbytte. Kutting og homogenisering er ikke en del av protokollen, men utføres allikevel for å prøve å øke RNA-utbyttet.

Den største utfordringen er den høye temperaturen som kreves for parafininnstøpning av vevsmateriale. Høy temperatur vil spalte både RNA og DNA til kortere fragmenter, men slik at RNA degraderes lettere enn DNA som er mer stabilt. DNA inneholder deoxyribose som er mindre

reaktivt enn sukkergruppen ribose som man finner i RNA. miRNA derimot, ser ikke ut til å la seg påvirke av temperaturbehandlingen [79, 80].

Arbeid med RNA skal foregå under sterile forhold i avtrekkskap, og alt utstyr som benyttes må være RNase-fritt. Alle prøvene ble videre analysert med NanoDrop og Bioanalyser for å undersøke RNA-konsentrasjon, renhet og integritet.

3.3 Bestemmelse av RNA-konsentrasjon og renhet

Konsentrasjon og renhet av total-RNA ble bestemt fotometrisk i et Nanodrop® ND-1000 spektrofotometer med måling av absorbans ved 260 nm. Protokoll for praktisk gjennomføring er vist i vedlegg 2.

To paralleller ble målt for hver prøve. Før analyse av prøvematerialet ble spektrofotometeret kalibrert med elueringsbufferen RNA er løst i. Denne ble benyttet som blank. NanoDrop har en nedre deteksjonsgrense på 2 ng/ul og en øvre deteksjonsgrense på 3000 ng/ul [81].

Absorbans ble også målt ved 230 nm og 280 nm, som påviser tilstedeværelse av henholdsvis kjemikalieforurensning og proteiner i prøven. Det beregnes en ratio som estimerer forholdet mellom nukleinsyrer og kontaminanter. Renheten på total-RNA blir oppgitt som en 260/230-ratio som er et mål på forholdet mellom nukleinsyrer og kjemikalier/reagenser i løsningen. Denne ratioen bør ligge i området $2,0 \pm 0,2$. Ratioen 260/280 bør ligge på ca. 2,0. Dersom denne er lavere kan det tyde på tilstedeværelse av proteiner, fenol eller andre kontaminanter i løsningen [81].

3.4 Undersøkelse av RNA-integritet

Kvaliteten av isolert total-RNA ble målt med kapillær gel-elektroforese i en Agilent 2100 Bioanalyser med Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Protokoll er gjengitt i vedlegg 3. En RNA-chip med et sett sammenkoblede mikrokanaler brukes for separering av nukleinsyrefragment ved hjelp av elektroforese. Prinsippet bak undersøkelsen er basert på separasjon av RNA-fragmenter ut i fra størrelse. Kitet som ble benyttet er beregnet for analyse av total-RNA og mRNA, og det kan brukes på RNA-konsentrasjoner mellom 25-500 ng/μl.

Chipen som brukes for separering av RNA-fragmenter har brønner for gel, prøver og størrelsesmarkør. I brønnene tilsettes en gel med fluorescerende fargemolekyler som fordeler seg i mikrokanalene. Videre tilsettes prøve (med markør) og størrelsesmarkør, før chipen plasseres i Bioanalyser. RNA-fragmentene separeres på størrelse og fargemolekylene i gelen vil bindes til

RNA og avgi fluorescens. Størrelsesmarkøren som benyttes inneholder fragmenter med kjent størrelse og konsentrasjon. Instrumentet lager selv en standardkurve som viser sammenhengen mellom separasjonstid (målt i sek) og størrelse på fragmentene. Ut i fra standardkurven og separasjonstiden beregnes størrelsen på RNA. For hver prøve tilsettes også en markør (intern kontroll) som inneholder et fragment med kjent størrelse. For hver målte prøve fremstilles et elektroferogram som viser sammenhengen mellom separasjonstid og fluorescensintensitet, samt et bilde som viser de ulike RNA-fragmentene separert i ulike bånd [82].

Grad av degradering oppgis som en RIN-verdi, RNA Integrity Number, og en rRNA 28s/18s-ratio. RIN-verdi angis som et tall mellom 1-10, der 1 vil si total degradering av RNA og 10 vil si helt intakt RNA. RIN-verdien betegnes også som ribosomal ratio da den beregnes på grunnlag av 18s/28s-ratioen. 18s og 28s er ribosomalt RNA av ulik størrelse og representerer to ulike topper i elektroferogrammet. Når ribosomalt RNA degraderes vil 18s/28s-ratioen avta og RIN-verdien synker [74].

3.5 Rensing og oppkonsentrering av RNA

Isolert total-RNA ble rensset og oppkonsentrert med kit fra Zymo, *RNA clean and concentrator* -25. Protokoll er gitt i vedlegg 4. Metoden er basert på rensing av RNA fra vannfase fulgt av sur fenolekstraksjon. Fast-spin kolonneteknologi gjør at RNA elueres i små volum (>25 ul). Eluert RNA er rent og kan brukes videre i andre analyser [83].

3.6 cDNA-syntese fra isolert total-RNA

For å kunne undersøke hvilke gener som på et gitt tidspunkt er uttrykt i en prøve benyttes teknikken kalt qPCR. For å kunne kjøre qPCR må man først lage cDNA. cDNA er en korrekt kopi av mRNA som er uttrykt i den gitte prøven man ønsker å undersøke. cDNA lages vha. enzymet revers transkriptase som syntetiserer enkelttrådig DNA med mRNA som templat. I og med at cDNA lages med mRNA som templat vil ikke cDNA inneholde introner, men kun kodende sekvenser. [84, 85] DNA er mer varmestabilt enn RNA og i en PCR-reaksjon, som krever høye temperaturer, vil RNA degraderes, og derfor benytter man cDNA i qPCR. For at DNA-polymerase skal kunne syntetisere DNA kreves en løsning som inneholder thymin, da DNA-polymerase ikke kan lese av uracil som finnes i RNA. Ved syntese av cDNA skal mengde RNA-input (antall ng) være lik for hver prøve, selv om utgangskonsentrasjonen på prøvene er ulike [85]. Maksimal input er 1000 ng. For å beregne mengde (ng) og volum input ble det tatt utgangspunkt i den prøven med lavest RNA-konsentrasjon og maksimalt volum input som tilsvarer 7 μ l. Under følger et eksempel på beregning av mengde RNA-input med laveste RNA-konsentrasjon på 32,7 ng/ μ l.

Mengde RNA-input ble beregnet på følgende måte:

$$\begin{aligned} \text{Mengde RNA-input [ng]} &= \text{laveste RNA-konsentrasjon} \times \text{maksimalt volum} \\ &= 32,7 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 7 \mu\text{l} \\ &= 228,9 \text{ ng} \end{aligned}$$

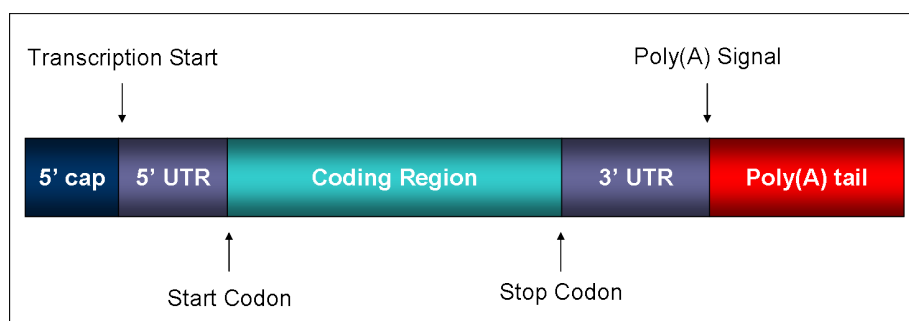
Videre beregnes volum input for hver enkelt prøve etter denne formelen:

$$\text{Volum input } [\mu\text{l}] = \text{max input [ng]} / \text{prøvekonsentrasjon [ng}/\mu\text{l}]$$

Det ble syntetisert cDNA fra prøver av ulik Gleason grad, som videre ble analysert med qPCR. cDNA-syntese ble utført ved hjelp av kitet *Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitrogen, Cat. No. 11752-050). Prosedyren er gitt i vedlegg 5.

3.6.1 Prinsipp for syntese av cDNA

Når et mRNA transkriberes vil det først dannes et pre-mRNA som inneholder introner. Pre-mRNAet prosesseres slik at intronene fjernes, en poly-A hale og en 5' metyl-guanin cap festes på. Figur 12 viser illustrasjon av et modent mRNA [86]. I cDNA-syntese benyttes ekstrahert RNA for å lage cDNA til bruk i qPCR.



Figur 12: mRNA prosesseres fra et pre-mRNA til et modent mRNA. Det modne mRNAet kan ekstraheres fra cellen og analyseres for å undersøke hvilke gener som på et gitt tidspunkt er uttrykt i en celle eller et vev. [86]

I en cDNA-syntese kan det benyttes ulike primere ut i fra hva man ønsker å kopiere. Oligo(dT)-primere hybridiserer til poly-A-halen på det modne mRNAet og benyttes vanligvis til cDNA-syntese av mRNA hvor man ønsker syntese av lange mRNA-sekvenser. Random hexamer-primere er uspesifikke, korte sekvenser på seks baser som kan binde seg ulike steder på mRNA. Denne typen primere benyttes dersom man ikke er helt sikker på hvor intakt RNAet som skal syntetiseres er, da det er sannsynlighet for at poly-A-halen kan være degradert. Sekvensspesifikke primere er primere man kan få designet som koder spesifikt for en gitt RNA-sekvens. Det er denne typen primere som benyttes ved undersøkelse av miRNA [87].

I selve reaksjonen trengs det ulike reagenser:

- Enzym-mix (Revers transkriptase og RNase Out)
- Reaksjons-mix (Oligo(dT)-primer, random hexamer, MgCl₂ og dNTP'er)
- RNase H
- RNasefritt Vann
- Primere (sekvensspesifikk primer for utvalgte miRNA)
- mRNA

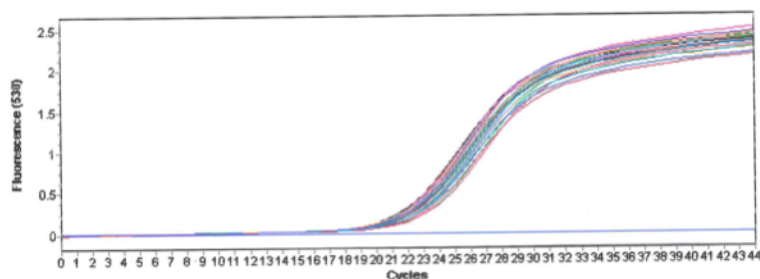
Under syntese av cDNA vil mRNA-templatet fjernes etter først syklus. Dette gjøres vha. enzymet RNase H som degraderer mRNA. Grunnen til dette er at man ønsker å danne dsDNA og da benyttes ssDNA som templat. Etter at RNA er fjernet vil det være enkelttrådet DNA igjen i prøven. Enkeltrådet nukleinsyrer er hydrofobe og har en tendens til å danne hårnålsstrukturer. DNA-polymerase benytter enkelttrådet DNA til å danne komplementær sekvens av ssDNA. Man sitter igjen med dsDNA med identisk sekvens som templat mRNA [85].

3.7 Amplifikasjon og deteksjon av miRNA med qPCR

Gjennom de siste årene har qRT-PCR blitt den mest brukte metoden for å studere miRNA. Metoden er rask, ekstremt sensitiv og gir en lineær deteksjon over flere størrelsesordener. qRT-PCR benyttes i hovedsak til amplifikasjon av dobbelttrådet DNA. Det er ikke sagt at DNA trenger å være startmaterialet for PCR. qRT-PCR er en metode som er utviklet for amplifisering og kvantitering av RNA etter syntese av cDNA. Teknikken består av to deler, cDNA-syntese ved hjelp av revers transkripsjon og etterfølgende amplifisering av spesifikke DNA molekyler ved hjelp av PCR [88].

Ved revers transkripsjon benyttes RNA som templat for å generere enkelttrådet DNA, komplementær til RNA (cDNA). cDNA fungerer videre som templat i PCR-reaksjonen. I den første syklusen av PCR vil enkelttrådet DNA amplifiseres vha. primere og Taq DNA-polymerase. (For andre metoder av mRNA-analyse som for eksempel Northern Blotting kan qRT-PCR benyttes for å kvantifisere mengden mRNA som var til stede i den originale prøven). Amplifikasjon vha. PCR er en eksponentiell metode og alle uttrykk i en prøve amplifiseres på like premisser. Forholdet mellom ulike konsentrasjoner i en prøve vil derfor være det samme etter qRT-PCR. Kvantitering av mRNA kan gjøres på to måter, relativ eller absolutt [88]. Prosedyre for qPCR er gitt i vedlegg 6 og vedlegg 7.

Ved qPCR foregår amplifikasjon og avlesning av prøve i samme PCR-rør. Etter hver syklus skjer en fotometrisk avlesning som gir en CT-verdi (Cycle Threshold) for hver enkelt prøve. CT-verdien forteller hvor mange sykluser som er nødvendig for å danne den mengde DNA-templat som kreves for å avgi nok fluorescens til å skille prøven fra bakgrunnsstøy. CT-verdien er omvendt proporsjonal med mengde DNA-templat i prøven, som betyr at en lav CT-verdi gjenspeiler en høy mengde miRNA i prøven. "Threshold" er den grensen som skiller fluorescens avgitt fra DNA-templat i prøven fra bakgrunnsstøy [88]. Denne grensen setter man selv når man lager et PCR-oppsett. CT-verdien er der kurven krysser threshold. En prøve med CT-verdi >40 betegnes som negativ. Eksempel på et amplifikasjonsplot er vist i figur 13.



Figur 13: Amplifikasjonsplot som viser grafisk fremstilling av kvantitert miR-27a.

For analyse med qPCR kreves en reaksjonsblanding som består av følgende reagenser:

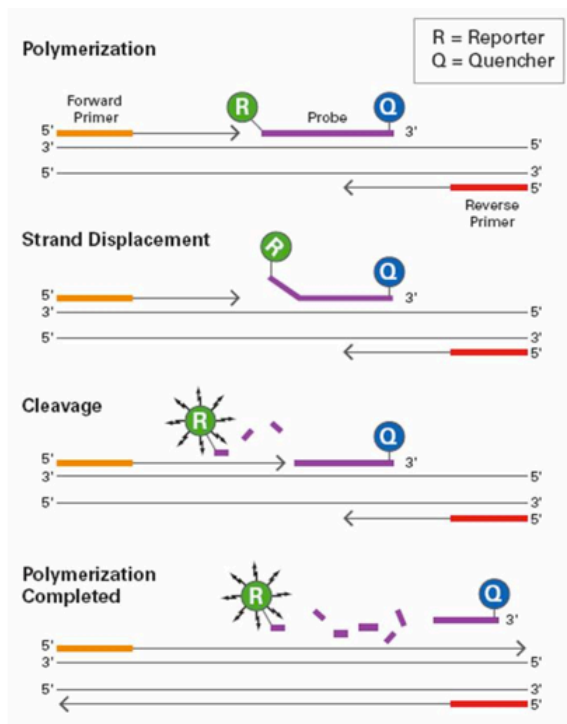
- Templat-DNA
- Primere, forward og revers
- Nukleotider
- Taq DNA-polymerase
- Buffer med Mg^{2+}
- TaqMan Probe, fluorescerende forbindelse

Det ble benyttet én reaksjonsblanding for hvert miRNA som skulle undersøkes. Basesekvensene for de benyttede primerene er vist i tabell 6.

Tabell 6: Basesekvensene for benyttede primere, spesifikke for miR-23a og miR-27a.

	miR-23a	miR-27a
Forward	CCGTGAAGGATCACATTGC	GCTTGATCCTTTCACAGTGG
Revers	GCCTCTCATGCTGACGAAT	GCCTCTCATGCTGACGAAT

Dersom målsekvens på cDNA er tilstede i prøven vil primere og prober bindes. Proben har en ”reporter dye” på 5’-enden og en ”quencher” på 3’-enden som bidrar til fluorometrisk deteksjon av mengde DNA i prøven. Quencheren forhindrer at proben avgir fluorescens, men etter hvert som DNA-polymerase syntetiserer ny DNA-tråd vil reporter dye spaltes av proben og avgir fluorescens [39]. Figur 14 viser hvordan deteksjon av PCR-produkt foregår.



Figur 14: Deteksjon av miRNA med TaqMan probe. Dersom målsekvens på cDNA er tilstede i prøven vil primere og prober bindes. Når både reporter og quencher er bundet til proben vil det ikke avgis fluorescens. Etter hvert som en ny DNA-tråd syntetiseres vil reporter dye spaltes av proben og avgi fluorescens [89].

Det er tre hovedsteg i en PCR-reaksjon, denaturering, hybridisering og polymerisering. I tabell 7 vises en oversikt over de ulike trinnene i PCR-reaksjonen med de innstillinger som ble benyttet under analyse av miRNA.

Tabell 7: I en PCR-reaksjon er det tre hovedsteg som repeteres i 40 sykluser. Denaturering av dsDNA, hybridisering av primere til komplementære baser på DNA og syntese av ny DNA-tråd hvor TaqMan probe bindes og DNA-polymerase syntetiserer ny DNA-tråd.

	Temperatur	Tid (hh.mm.ss)
Pre-inkubasjon - 1 syklus	95°C	00.10.00
Denaturering (ca. 95°C)	95°C	00.00.10
Hybridisering (50-65°C)	58°C	00.00.20
Syntese av ny DNA-tråd (72-74°C)	72°C	00.00.01
Nedkjøling - 1 syklus	40°C	00.00.30

3.8 Bestemmelse av miRNA-profil ved hjelp av pyrosekvensering

Ved hjelp av pyrosekvensering kan man identifisere nukleotidene i en DNA-sekvens. Metoden er basert på prinsippet ”sequencing-by-synthesis”. Enkeltrådet DNA (cDNA) syntetiseres til dobbeltrådet DNA vha. DNA-polymerase som hekter på fluorescensmerkede nukleotider. For hver syklus i sekvenseringen vil et fluorescensmerket nukleotid av samme base legges til. Polymerasen vil ved hjelp av enzymatisk spalting avgi et lyssignal for hver gang et nytt nukleotid hektes på. Lyssignalet registreres og lengden på signalet er proporsjonal med lysintensiteten, som vil fortelle hvor mange nukleotider av den gitte basen som er tilstede [90, 91]. Eksempelvis vil én enkelt base av Guanin (G), registreres som 1G. Dersom det er tre baser etter hverandre vil disse registreres som 3G. Basene leses av i en bestemt rekkefølge, T – A – C – G. Under følger et eksempel på hvordan en avlesning kan fortolkes.

Gitt at man har sekvensen TCCGGTTTG i en DNA-tråd som syntetiseres, vil verdiene for denne avlesningen bli slik: 1, 0, 2, 2, 3, 0, 0, 1.

I og med at avlesningen skjer etter hver nukleotid som er heftet på, er sannsynligheten for feil avlesning liten. Det er også liten sannsynlighet for feil innsetting av base, da nukleotidene er frie nukleotider i løsningen og ikke sammenkoblet i kjeder [92].

4 Resultater

4.1 Enzymbehandling over natt gir optimal metode for RNA-isolering

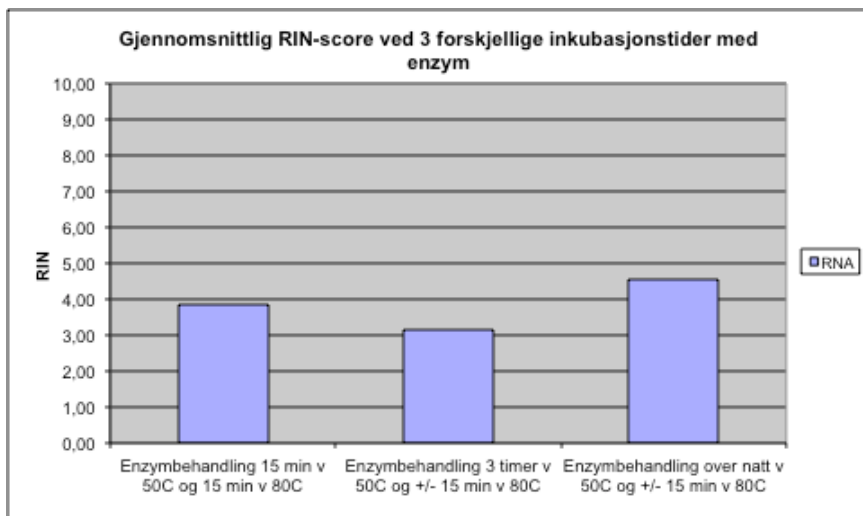
Ved optimalisering av metode for RNA-isolering av formalinfiksert parafininnstøpt materiale, basert på *RecoverAll™ Nucleic Isolation Acid Kit*, ble ulike parametere som inkubasjonstid, temperatur, oppkutting av vevssylinder og homogenisering av vevssylinder utprøvd for å bedre metoden slik at utbyttet RNA ble best mulig. Tabell 8 viser resultatene etter endring av ulike steg i isoleringsprotokollen som har ført frem til en optimal metode for isolering av RNA fra formalinfiksert parafininnstøpt materiale. Oppkutting og homogenisering av vevssylindere ble utført i forkant av RNA-isoleringen og er ikke en rutinemessig del av protokollen.

Tabell 8: Prostatavev fra samme pasient ble behandlet med ulike temperaturer (50°C og 80°C) og ulike inkubasjonstider med enzymbehandling (30 min, 3 timer og over natt) for å optimalisere metoden for RNA-isolering slik at utbytte RNA (konsentrasjon ng/μl) og RIN-score ble best mulig. Tabellen oppsummerer resultatene som viser at homogenisering av vevsprøve uten enzymbehandling gir dårligst RNA-utbytte og RIN-score, som betyr at enzymbehandling er avgjørende for å oppnå et optimalt resultat med hensyn på RNA-utbytte og RIN-score. Enzymbehandling over natt ved 50°C og +/- 15 min ved 80°C gir gjennomsnittlig best RNA-utbytte og høyest RIN-score, og resultatet ligger til grunn for valg av metode med enzymbehandling over natt for å oppnå optimalt RNA-utbytte og RIN-score.

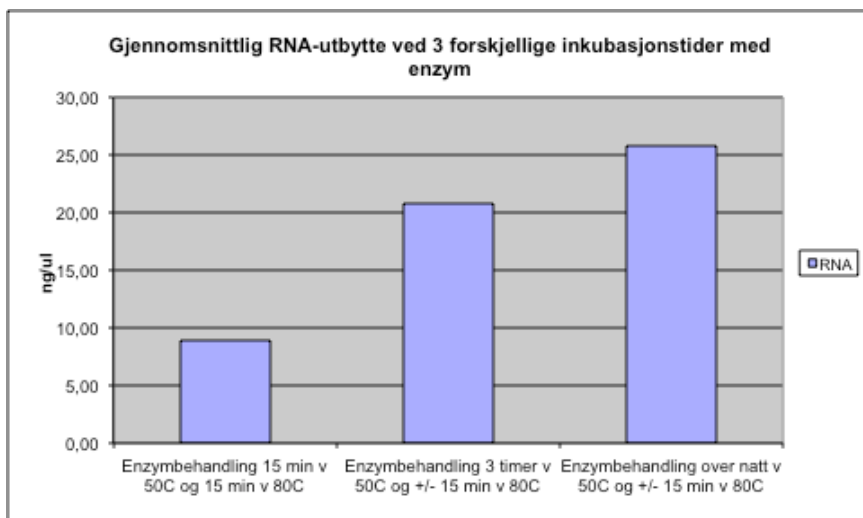
Oppkutting og homogenisering av vevssylinder ble utført for å undersøke hvorvidt dette øker utbyttet av RNA, men denne behandlingen ser ikke ut til å øke utbyttet RNA i noen grad.

ISOLERT TOTAL-RNA				
Prøve-ID	Konsentrasjon (ng/ul)	Ratio 260/230	Ratio 260/280	RIN score
p159 - Enzym 15 min v 50 C og 15 min v 80C	5,72	0,07	1,76	2,3
p159 - Homogenisering uten enzym	1,14	0,03	1,39	2,6
p159 - Homog. + enzym 15 min v 50C og 15 min v 80C	5,82	0,05	1,81	2,4
p159 - Enzym 15 min v 50 C og 15 min v 80C + homog	15,38	0,42	2,01	6,9
p159 - Enzym 3 timer v 50C	30,29	0,50	2,06	3,4
p159 - Homogenisering + enzym 3 timer v 50C	32,26	2,04	2,09	3,7
p159 - Enzym 3 timer v 50C + homogenisering	11,00	0,48	1,83	2,6
p159 - Kutting + enzy 3 timer + homogenisering	9,30	1,59	2,02	3,0
p159 - Enzym over natt v 50C	37,14	1,19	2,05	6,9
p159 - Enzym over natt v 50C + 15 min v 80C	36,92	1,12	2,04	3,4
p159 - Enzym over natt + homogenisering	10,69	0,09	2,10	2,7
p159 - Kutting + enzym over natt	19,52	0,34	2,11	6,0
p159 - Kutting + enzym over natt v 50C + homogenisering	20,96	0,08	2,05	4,4
p159 - Homogenisering + enzym over natt v 50C	10,69	0,09	2,10	6,4
p159 - Kutting + enzym over natt + 15 min v 80C	43,84	1,42	2,07	4,0
p159 - Kutting + enzym over natt v 50C + 15 min v 80C + homogenisering	26,83	0,80	2,05	2,7
Gjennomsnitt av:	Konsentrasjon (ng/ul)	RIN score		
Enzymbehandling 15 min v 50C og 15 min v 80C	8,97	3,85		
Enzymbehandling 3 timer v 50C og +/- 15 min v 80C	20,71	3,15		
Enzymbehandling over natt v 50C og +/- 15 min v 80C	25,82	4,54		

Grafisk fremstilling av resultatene i tabell 8 er vist i figur 15 og 16.



Figur 15: Ulike inkubasjonstider med enzymbehandling ble testet ut for å finne optimal metode for isolering av RNA fra formalinfiksert vevsmateriale. Gjennomsnittlig høyest RIN-score oppnås ved enzymbehandling over natt +/- 15 min, og den bestemte inkubasjonstiden inngår dermed i optimal metode for RNA-isolering. Den generelt lave RIN-scoren gjenspeiler den sterke degraderingen av RNA i formalinfiksert materiale, som er gjennomgående i alle prøver.



Figur 16: For å oppnå best mulig utbytte RNA (konsentrasjon ng/ul) fra formalinfiksert vevsmateriale ble ulike inkubasjonstider med enzymbehandling testet for å finne optimal metode for RNA-isolering. Høyest RNA-konsentrasjon (ng/ul) oppnås ved enzymbehandling over natt +/- 15 min, og den bestemte inkubasjonstiden inngår dermed i optimal metode for RNA-isolering.

4.1.1 Liten forskjell på kvantitert mengde miRNA, miR-23a og miR-27a, mellom enzymbehandling i 3 timer og 18 timer

For å vurdere hvor lang inkubasjonstid med enzymbehandling som er nødvendig for isolering av RNA til studier av miRNA, ble det ved hjelp av qPCR sammenlignet to utvalgte miRNA, miR-23a og miR-27a, fra prøver som ble enzymbehandlet i 3 timer og 18 timer. Tabell 10 viser resultatene fra RNA-isoleringen og qPCR. Vedlegg 8 viser PCR-oppsett, samt resultater fra kvantitering av miR-23a og miR-27a.

Tabell 10: Fire vevsprøver fra ulike pasienter ble enzymbehandlet i henholdsvis 3 timer og 18 timer for å undersøke hvorvidt uttrykket av to gitte miRNA (miR-23a og miR-27a) var forskjellig ut i fra tiden på enzymbehandlingen. Resultatene viser at det er svært liten forskjell i antall cykler kvantitert miRNA mellom prøver som ble enzymbehandlet i 3 timer og prøver som ble enzymbehandlet i 18 timer. Inkubasjonstiden med enzymbehandling ser ikke ut til å påvirke RIN-scoren i særlig stor grad, da denne er generelt lav uavhengig av inkubasjonstid med enzym.

Prøve-ID	Konsentrasjon (ng/ul)	RIN score	Cyklar av miR-23a (141 ng)	Cyklar av miR-27a (141 ng)
p149 - 3 t enzymbehandling	20,22	4,60	21,61	29,70
p149 - 18 t enzymbehandling	30,27	6,40	22,52	30,87
p154 - 3 t enzymbehandling	30,06	4,70	21,72	29,83
p154 - 18 t enzymbehandling	50,45	7,00	22,77	30,77
p156 - 3 t enzymbehandling	37,46	5,40	22,18	30,00
p156 - 18 t enzymbehandling	27,86	7,70	22,28	29,90
p159 - 3 t enzymbehandling	30,29	3,20	21,81	29,73
p159 - 18 t enzymbehandling	37,14	6,90	22,11	30,55
Gjennomsnitt av:	Cyklar:	Forskjell i antall cykler:		
Gjennomsnittlig cyklar av miR-23a for enzymbehandling i 3 timer	21,83	0,59		
Gjennomsnittlig cyklar av miR-23a for enzymbehandling i 18 timer	22,42			
Gjennomsnittlig cyklar av miR-27a for enzymbehandling i 3 timer	29,82	0,70		
Gjennomsnittlig cyklar av miR-27a for enzymbehandling i 18 timer	30,52			

For arbeid med miRNA vil enzymbehandling i 3 timer være tilstrekkelig da resultatene viser svært liten forskjell i mengde kvantitert miRNA ut i fra behandlingstid med enzym. Enzymbehandling i 3 timer kan dermed inngå som en del av optimal metode for isolering av RNA til bruk i undersøkelse av miRNA.

4.1.2 Tilnærmet likt utbytte miRNA mellom formalinfiksert materiale og ferskt materiale

For å vurdere hvorvidt formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale er egnet til bruk i undersøkelse av miRNA ble formalinfiksert materiale, enzymbehandlet i 3 timer, sammenlignet med ferskt materiale fra samme pasient. To utvalgte miRNA, miR-23a og miR-27a, ble kvantitert ved hjelp av qPCR og sammenlignet mellom formalinfiksert materiale og ferskt materiale. Resultatet er presentert i tabell 11 og i vedlegg 8.

Tabell 11: Parafininnstøpt vevsmateriale ble sammenlignet med ferskt materiale fra samme pasient med hensyn på to utvalgte miRNA, miR-23a og miR-27a. Resultatene viser svært liten forskjell i antall cykler kvantitert miRNA mellom formalinfiksert vevsmateriale og ferskt materiale. Det kommer tydelig frem av RIN-scoren at det formalinfikserte vevsmaterialet er svært degradert i forhold til ferskt materiale.

Prøve-ID	Konsentrasjon (ng/ul)	RIN score	Cyklar av miR-23a (141 ng)	Cyklar av miR-27a (141 ng)
p149 - 3 t enzymbehandling	20,22	4,60	21,61	29,70
p149 - ferskt materiale	369, 57	8,70	23,21	29,77
p154 - 3 t enzymbehandling	30,06	4,70	21,72	29,83
p154 - ferskt materiale	727, 44	9,40	22,38	29,00
p156 - 3 t enzymbehandling	37,46	5,40	22,18	30,00
p156 - ferskt materiale	431, 43	9,80	22,79	29,11
p159 - 3 t enzymbehandling	30,29	3,20	21,81	29,73
p159 - ferskt materiale	334, 74	8,30	22,69	29,29
Gjennomsnitt av:	Cyklar:	Forskjell i antall cykler:		
Gjennomsnittlig cyklar av miR-23a for parafininnstøpt materiale	21,83	0,94		
Gjennomsnittlig cyklar av miR-23a for ferskt materiale	22,77			
Gjennomsnittlig cyklar av miR-27a for parafininnstøpt materiale	29,82	0,53		
Gjennomsnittlig cyklar av miR-27a for ferskt materiale	29,29			

4.2 Lav RNA-konsentrasjon og RIN-score i formalinfiksert vevsmateriale

For å kunne undersøke miRNA-profil i vevsprøver med ulik gleason grad ble det isolert RNA med utarbeidet isoleringsmetode, og det ble målt RNA-konsentrasjon (ng/μl), renhet (ratio 260/230 og 260/280) og RIN-score på prøvematerialet. RIN-score ble kun målt i noen utvalgte prøver for å bevise at formalinfiksert materiale er svært degradert. Resultatene er presentert i tabell 12.

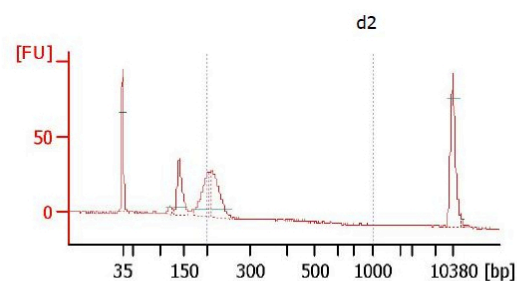
Tabell 12: RNA fra vevsprøver med Gleason grad 3, 4 og 5 ble isolert til bruk i undersøkelse av miRNA-profil i formalinfiksert vev fra prostata. Tabellen viser varierende konsentrasjon av RNA mellom de ulike gleason gradene, også varierende konsentrasjon innad i hver gleason grad. Vevsmaterialet er svært degradert, som bekreftes av lav eller ingen målbar RIN-score.

ISOLERT TOTAL-RNA				
Prøvenummer	Konsentrasjon (ng/ul)	Ratio 260/230	Ratio 260/280	RIN score
Gleason grad 5				
G5-1	61,46	1,92	2,00	1,20
G5-2	62,75	1,84	1,90	1,74
G5-3	33,36	0,59	1,95	2,30
G5-4	38,55	1,25	1,90	N/A
G5-5	25,00	0,25	1,88	N/A
G5-6	85,95	1,59	1,95	N/A
G5-7	22,65	0,80	1,90	2,30
G5-8	62,01	1,98	1,97	N/A
G5-9	16,28	1,21	1,80	2,85
Gleason grad 4				
G4-1	24,01	1,60	1,82	Ikke målt
G4-2	100,00	1,98	1,92	Ikke målt
G4-3	41,48	1,53	1,96	Ikke målt
G4-4	21,90	1,15	1,85	Ikke målt
G4-5	45,63	1,71	1,88	Ikke målt
G4-6	48,01	1,92	1,93	Ikke målt
G4-7	43,80	1,64	1,91	Ikke målt
G4-8	48,34	1,38	1,96	Ikke målt
Gleason grad 3				
G3-1	10,91	1,13	1,70	Ikke målt
G3-2	13,12	0,88	1,60	Ikke målt
G3-3	32,70	0,98	1,97	Ikke målt
G3-4	18,70	0,90	1,71	Ikke målt
G3-5	8,25	0,67	1,60	Ikke målt
G3-6	28,69	1,60	1,79	Ikke målt
G3-7	80,25	2,10	2,08	Ikke målt
G3-8	26,68	1,77	1,81	Ikke målt
G3-9	39,20	1,41	1,94	Ikke målt
G3-10	1,96	0,12	Negativ	2,40
G3-11	1,70	Negativ	Negativ	2,50
G3-12	23,71	0,43	1,70	N/A
G3-13	13,13	0,94	1,69	N/A

4.3 Sekvensering av miRNA krever RNA med høy kvalitet og konsentrasjon

For å undersøke miRNA-profil i formalinfiksert vevsmateriale fra prostata ble i første omgang tre utvalgte vevsprøver, G5-6, G5-7 og G5-8, forsøkt sekvensert. Prøvene som ble valgt ut hadde ulike konsentrasjoner, alle i gleason grad 5. Konsentrasjon (ng/μl), renhet (ratio 260/230 og 260/280) og RIN-score er presentert i tabell 12.

Tillaging av cDNA-bibliotek og påfølgende analyser ble utarbeidet av Norsk Sekvenseringscenter ved Universitet Oslo. De tre prøvene som ble analysert gav tilnærmet like resultater og et representativt bilde på resultatet er vist i figur 17. De resterende resultatene, samt et bilde fra analyse av RNA-fragmenter som viser ønsket RNA-profil, er vist i vedlegg 9.



Overall Results for sample 4 : d2

Number of peaks found: 5
Noise: 0,4
Corr. Area 1: 155,4

Peak table for sample 4 : d2

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5 411,3	Lower Marker
2	120	11,96	151,3	
3	140	115,35	1 247,1	
4	205	114,68	848,0	
5	210	135,60	977,4	
6	10 380	75,00	10,9	Upper Marker
7	12 048	0,00	0,0	

Figur 17: Gelbilde av prøve G5-7. Etter tillaging av cDNA-bibliotek ble prøvematerialet analysert med Agilent 2100 Bioanalyser for å undersøke konsentrasjon og størrelse på cDNA-fragmentene. Resultatet av analysen gir et gelbilde som viser grafisk og numerisk fremstilling av størrelse (basepar) på separerte cDNA-fragmenter, samt konsentrasjon (pg/μl) cDNA i hver størrelse. Bildet viser en topp på 35 basepar og en topp på 10 380 basepar som tilsvarende nedre og øvre markør som gjenspeiler første og siste topp i grafen. Nedre og øvre markør er justert i forhold til ladder. Metoden har en cut-off på 150 basepar. På 120 basepar er det en liten topp som tilsvarende adapterdimerer. Adapterdimerer er ganske like miRNA i størrelse, og tilstedeværelse av adapterdimerer vil føre til forstyrrelse i sekvenseringen og er dermed ikke ønsket i prøven. cDNA-

fragmenter av ønsket størrelsesorden vises med en topp på 140 basepar. Denne toppen tilsvarer cDNA fra miRNA med ligerte adaptere som teoretisk sett kunne vært benyttet i sekvensering, men på grunn av høyt antall adapterdimerer ble ikke sekvensering av prøvematerialet gjennomført.

5 Diskusjon

For å kunne undersøke miRNA i formalinfiksert parafininnstøpt vev, er det behov for en optimal metode for isolering av total-RNA. Det ble tatt utgangspunkt i *RecoverAll™ Nucleic Isolation Acid Kit* for formalinfiksert parafininnstøpt materiale, og ulike parametere ble testet ut for å optimalisere utbytte total-RNA. Det er kjent at RNA i formalinfiksert vev er svært degradert, derfor var det viktig at metoden skulle gi høyest mulig RIN-score. Resultatene viser at enzymbehandling over natt gir gjennomsnittlig best RNA-utbytte og høyest RIN-score. For undersøkelse av miRNA vil enzymbehandling i 3 timer være tilstrekkelig, da resultatene viser svært liten forskjell i mengde kvantitert miRNA ut i fra behandlingstid med enzym. For å vurdere hvorvidt formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale er egnet til bruk i undersøkelse av miRNA, ble formalinfiksert materiale, enzymbehandlet i 3 timer, sammenlignet med ferskt materiale fra samme pasient. To utvalgte miRNA ble kvantitert ved hjelp av qPCR, og resultatene viser svært liten forskjell i mengde kvantitert miRNA mellom formalinfiksert vevsmateriale og ferskt materiale.

Videre ble tre utvalgte vevsprøver forsøkt sekvensert for å undersøke miRNA-profil i vev fra prostata. Det ble laget cDNA-bibliotek som videre ble undersøkt med hensyn på DNA-konsentrasjon og størrelse. Resultatene viser prøvebibliotek som ikke kan sekvenseres på grunn av høy andel adapterdimerer.

5.1 Fordeler med bruk av formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale

Prøvene som ble benyttet i prosjektet er behandlet etter bestemt prosedyre fra Avdeling for patologi ved St. Olavs Hospital, og videre lagret under optimale betingelser. Det er svært viktig at prøvematerialet behandles på riktig måte for å bevare strukturen og organellene i vevet. Faktorer som fikseringsmetode, temperatur og pH kan være avgjørende for å unngå autolyse og det kreves optimal behandling av vevet for å kunne utføre etterfølgende undersøkelser som for eksempel qPCR. Det er kjent at formalin, som benyttes til fiksering av vevsprøver, tilfører en metylgruppe i vevet som legger seg mellom nukleinsyrene. Dette gjør at det dannes metylenbroer mellom aminogrupper i vevet og aminogruppene vil fragmenteres. DNA vil fragmenteres til sekvenser på omlag 300-400 basepar, og RNA vil fragmenteres til sekvenser på omlag 200 basepar. Dette vil imidlertid ikke påvirke uttrykket av miRNA, som er ca. 20 basepar langt. Det er kjent at miRNA er svært stabile og bevares godt i biologiske væsker, samt at de ikke brytes ned av DNaser eller RNaser [78, 79, 93].

Avdeling for patologi og medisinsk genetikk ved St. Olavs Hospital har gjennom mange tiår lagret diagnostisk vevsmateriale som er formalinfiksert og parafininnstøpt, noe som betyr at det i dag er tilgang på store mengder godt bevart vevsmateriale. Lagring av vevsmateriale i form av parafinblokker krever et stort lagringsvolum og det var derfor ønskelig å undersøke om det er mulig å dra nytte av den store mengden vevsmateriale som er tilgjengelig. Alternativt er bruk av ferskt vevsmateriale som krever mer arbeidskraft i form av ingeniører som kan ta hånd om det ferske materialet umiddelbart etter operasjon, og innsamling av ferskt vevsmateriale vil derfor bety en større økonomisk utgift, til sammenligning med bruk av formalinfiksert vevsmateriale som ligger tilgjengelig klart til bruk. En annen viktig fordel med formalinfiksert vevsmateriale som har blitt oppbevart i lang tid, er muligheten til oppfølging av de pasientene som tidligere har blitt operert. Dersom det foreligger vevsprøver som har blitt lagret i lang tid gir det mulighet til å spore opp de aktuelle pasientene, og undersøke kliniske data for å finne ut hvordan sykdomsforløpet faktisk gikk for seg. Noen pasienter får en stilt en relativt god prognose som betyr at sannsynligheten for å bli frisk er stor, men havner allikevel i et noe uforklarlig aggressivt sykdomsforløp. Årsaken til slike utfall er kan det være mulig å finne svar på med tilgang på prøvemateriale som sporer seg tilbake i tid. Det kan tenkes at molekylærbiologiske forskjeller, som for eksempel miRNA-profil, skiller pasienter med et aggressivt sykdomsforløp fra pasientene med et mildere sykdomsforløp, og det er slike spørsmål man kan finne svar på ved bruk av den store mengden tilgjengelig formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale. Mulighetene for spennende medisinsk forskning er store og det kan frembringe nyttig kunnskap av vesentlig betydning for dagens pasienter.

Patologilaboratoriens vevsarkiver representerer et betydelig potensiale for fremtidig medisinsk forskning, og på bakgrunn av den store tilgangen på vevsmateriale og den underbyggende teorien om at miRNA bevares godt i formalinfiksert materiale, ble det bestemt at formalinfiksert parafininnstøpt materiale skulle benyttes i dette prosjektet. Samtidig er det viktig å være bevisst i bruken av vevsmaterialet da dette er materiale som ikke kan gjenskaffes, og sannsynligheten er stor for at nye metoder som er tilpasset bruk av denne type materiale vil utvikles, og dermed er materialet svært verdifullt.

5.1.1 Kvalitetskontroll av tumorområder i vevsmaterialet

Alle vevsprøver som ble valgt ut til bruk i prosjektet var på forhånd vurdert av patolog som hadde markert tumorområder i snittene og Gleason gradert prøvematerialet. De prøvene som ble foretrukket hadde alle gjennomgående tumor i tre snitt, som betyr at samme tumormønster gjenspeiler seg i snittet før og snittet etter det utvalgte snittet. Disse prøvene ble foretrukket for å kvalitetssikre at vevssylinderen som ble stanset ut var fra det tumorområdet som var ønskelig, og de snittene med størst tumorområde ble foretrukket for å minimere sjansen for å stanse ut materiale fra uønsket område. Det ble laget bildemaler av de tilhørende snittene som var merket med tumorområder, til bruk for orientering i vevsblokken ved utstansing av vevssylinder.

For ytterligere kvalitetskontroll av prøvematerialet kunne det vært laget TMA-blokker (tissue microarrays) av de sylindrerne som ble stanset ut, for å være sikker på at materialet var stanset ut fra riktig område i blokken. Dette ville påkrevd en ekstra kostnad, men hadde underbygget Gleasongraderingen bedre enn å bare benytte bildemaler.

5.2 Optimal metode for isolering av RNA fra formalinfiksert materiale

For undersøkelse av miRNA i formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale må det først isoleres total-RNA. Metoden for isolering av total-RNA er basert på *RecoverAll™ Nuclei Acid Isolation Kit for FFPE*, men fordi protokollen ikke var optimalisert for best mulig utbytte RNA på intern lab, ble det gjort utprøvinger av ulike faktorer som inkubasjonstid med enzym, temperatur, oppkutting av vevssylinder og homogenisering av vevssylinder, for å undersøke om endring av disse faktorene ville bidra til å øke utbyttet og kvaliteten av det isolerte RNAet. Det ble ikke tatt hensyn til at det ble tatt ut ulik mengde vev til RNA-isolering, da det var ulik tykkelse på vevssylinderne.

Ved isolering av RNA fra parafininnstøpt vevsmateriale kunne det tenkes at RNA-utbyttet ville øke dersom vevsbiten ble homogenisert slik at parafinvoksen ble løst opp fra vevsbiten. Tidligere studier har benyttet denne teknikken med positive resultater, og flere produsenter av RNA-isoleringskit anbefaler homogenisering av vevssylinder [94, 95]. Resultatene viser imidlertid at homogenisering ikke øker RNA-utbyttet, heller tvert i mot. Dette kan forklares ved at under homogenisering knuses vevsbiten til pulver og det er lett for at noe vev kan forsvinne under de ulike vasketrinnene i isoleringsprosessen, da det er snakk om svært små mengder prøvemateriale. Det ble gjort forsøk på å kutte vevssylinderen i mindre biter før RNA-isolering, men heller ikke kutting ser ut til å økt utbyttet av RNA.

Under isolering av RNA er det nødvendig med enzymbehandling som inneholder proteaser som degraderer proteiner i prøven slik at disse kan spaltes ut. Det er ikke ønskelig med proteiner til stede i prøven, da proteiner er store komplekser som vil forstyrre videre arbeid med vevsmaterialet. Etter utprøving av ulike tidsintervaller med proteasebehandling ble det fastslått at enzymbehandling over natt (ca. 18 timer ved 50°C) gir det beste RNA-utbyttet og den høyeste RIN-scoren. Dette kan forklares med at proteasen krever en viss tid for å utøve maksimal aktivitet og det ble derfor målt RNA-konsentrasjon og RIN-score etter 3 timers enzymbehandling og 18 timer. Det kunne med fordel vært testet ut hvorvidt RNA-konsentrasjonen hadde blitt enda bedre dersom inkubasjonstiden ble forlenget til mer enn 18 timer, i og med at det var en tydelig konsentrasjonsforskjellen mellom 3 timer og 18 timer enzymbehandling. En annen faktor som da spiller inn er tidsperspektivet denne metoden vil kreve, og i og med at metoden er manuell er det dermed ikke sikkert at lengre inkubasjonstid er særlig lønnsomt likevel dersom RNA-utbyttet ikke er av betydelig større grad.

Resultatene viser at RNA i formalinfiksert vevsmateriale er svært degradert, noe som kan forklares med at under vevsfikseringen tilfører formalin en metylengruppe i vevet som bidrar til degradering av nukleinsyrene. Det er derfor ikke forventet særlig høy RIN-score, men det burde vært tatt høyde for at det også kan forekomme degradering av nukleinsyrene underveis i isoleringsprosedyren. Et

alternativ for å utelukke degradering underveis i isoleringsprosedyren er å tilsette beta-mercaptoethanol (BME) i lyseringsbufferen. BME vil ødelegge RNAsene i prøven og bidra til at prøven blir mer stabil.

Det ble ikke tatt hensyn til renhet (ratio 260/280 og 260/230) under optimalisering av metode. Resultatene viser at ratio 260/230, som bør ligge i området $2,0 \pm 0,2$, tidvis er for lav, noe som tyder på kontaminasjon av kjemikalier i prøvene. Ratio 260/280 er en indikasjon på hvorvidt det er proteiner til stede i prøven og denne ratioen bør ligge på ca. 2,0. Ut i fra resultatene er det tydelig at proteasen har fungert bra, da ratio 260/280 er gjennomgående god i alle prøver. For å bedre renheten på det isolerte RNAet burde det vært gjort forbedringer i metoden, for eksempel utprøvinger av vasketrinnene, slik at kjemikaliene ikke henger igjen i prøvene. Ved eluering av RNA er det viktig å bruke nok volum elueringsløsning slik at ikke RNAet henger igjen i kolonnen, og man kan heller oppkonsentrere eluatet i etterkant dersom man er redd for at det blir for stor fortynning. Det er også mulig å rense RNAet etter isolering, noe som kan være lurt for å unngå kontaminasjon som kan ødelegge for videre analyser.

Det benyttes Xylen som løsemiddel for å fjerne parafinvoks fra vevsbitene, og Xylen er et svært giftig løsemiddel som i aller høyeste grad burde vært unngått. Alternative løsemidler burde vært vurdert for å unngå den helseskadelige risikoen det medfører å arbeide med Xylen.

5.3 RNA-isolering til analyse av miRNA krever kortere inkubasjonstid

For kvantitering av miRNA i parafininnstøpt vevsmateriale, ble to utvalgte miRNA som er relevante i forhold til prostatakreft, miR-23a og miR-27a, undersøkt vha. qRT-PCR. Det ble isolert RNA med utarbeidet metode, og prøvematerialet ble enzymbehandlet med ulike tidsintervaller på 3 timer og 18 timer for å undersøke hvorvidt inkubasjonstiden er avgjørende for best mulig utbytte av miRNA. Resultatet viste at forskjellen i gjennomsnittet kvantitert miRNA mellom enzymbehandling i 3 timer og 18 timer er svært liten. Forskjellen i antall cykler mellom vevsmateriale behandlet i 3 timer og 18 timer er beregnet til 0,59 cykler for miR-23a og 0,70 cykler for miR-27a. Dette viser at på tross av ulik total RNA-konsentrasjon holdes mengde miRNA stabilt og intakt i vevet. Disse resultatene ligger til grunn for valg av protokoll for RNA-isolering, da målet med RNA-isoleringen var å benytte isolatet til undersøkelse av miRNA.

For å støtte valg av metode kunne metoden vært testet på flere miRNA for å undersøke om det gav samme resultat.

5.3.1 Liten forskjell i mengde kvantitert miRNA i formalinfiksert materiale sammenlignet med ferskt materiale

Det er en kjent sak at RNA i parafininnstøpt materiale er svært degradert, og dermed vil mengde isolert total-RNA være mye lavere enn i ferskfrosset materiale. Det var interessant å undersøke hvorvidt utbyttet av miRNA varierte mellom parafininnstøpt materiale og ferskt materiale, og formalinfiksert parafininnstøpt materiale ble sammenlignet med ferskt materiale med hensyn på kvantitet av to utvalgte miRNA, miR-23a og miR-27a. Det ble isolert total-RNA med optimalisert metode for RNA-isolering.

Resultatene viser godt utbytte av miRNA i både parafininnstøpt materiale og ferskt materiale. Forskjellen i gjennomsnittet kvantitert miRNA mellom parafininnstøpt materiale og ferskt materiale er svært liten, til tross for den store konsentrasjonsforskjellen i utgangspunktet. Forskjellen i gjennomsnittet kvantitert miRNA mellom formalinfiksert vev (enzymbehandlet i 3 timer) og ferskt vev er svært liten. Forskjellen i antall cykler mellom formalinfiksert vevsmateriale og ferskt vev er beregnet til 0,94 cykler for miR23a og 0,53 cykler for miR27a.

Med disse resultatene er det grunn til å anta at formalinfiksert vevsmateriale kan benyttes til analyse av miRNA på lik linje som ferskt materiale. Resultatet støtter også opp om teorien at miRNA er godt bevart i formalinfiksert materiale, noe som betyr at formalinfikserte vevsprøver kan benyttes til forskning på miRNA.

5.4 utfordringer med påvisning av miRNA-profil ved hjelp av sekvensering

For å studere miRNA-profil i formalinfiksert vev fra prostata ble RNA isolert med utarbeidet metode. Det ble målt konsentrasjon (ng/ μ l), renhet (ratio 260/230 og 260/280) og RIN score på det isolerte RNAet, som videre ble rensset og oppkonsentrert før tillaging av cDNA-bibliotek og sekvensering. For å kunne gjennomføre sekvensering må det lages et cDNA-bibliotek som undersøkes med hensyn på cDNA-konsentrasjon og størrelse. Resultatet, som er presentert i figur 17, viser et prøvebibliotek som ikke kan sekvenseres på grunn av høy andel adapterdimerer. Adapterdimerer er to adapterer festet til hverandre som blir amplifisert i PCR. Adapterdimerene er 120 basepar i størrelse og er uønsket i prøven da disse vil sekvenseres mye bedre enn de ønskede miRNA-fragmentene. Andelen sekvenserte adaptere vil være høyt og dette vil føre til forstyrrelse ved sekvensering av prøven. Det er et kjent problem at adapterdimerer vil forstyrre en korrekt sekvensering, og det er tidligere gjort forsøk på å eliminere adapterdimerer i cDNA-syntesen. Ved bruk av merkede nukleinsyrer som er komplementære til adaptersekvensen, kan overflødige adaptere bindes til merkede nukleinsyrer og elimineres ut av cDNA-biblioteket [96]. Dette kan være en løsning som er verdt å forsøke ved videre arbeid med metoden.

cDNA-biblioteket skal optimalt sett være på 140 basepar, da 140 basepar er korrekt størrelse på fragmentene i forhold til hva som er forventet av miRNA.

Den underbyggende årsaken til at det ikke lar seg gjøre å sekvensere vevsmaterialet er nok kvaliteten på utgangspunkt RNAet. Det ble gjort en clean-up for å prøve å fjerne de uønskede fragmentene, men i en clean-up mister man mye DNA og konsentrasjonen på de ferdige prøvene ble for lave til å sekvensere. En annen utfordring er det lave input materialet (lav konsentrasjon) som gjør det generelt vanskelig å lage et godt cDNA-bibliotek. miRNA er en vanskelig prep i og med at de er så like adapterene på størrelse.

Det er ikke mange som har jobbet med formalinfiksert materiale og sekvensering, og forskere og ingeniører på Norsk Sekvenseringssenter ved Universitetet i Oslo hadde ingen erfaring med denne typen prøvemateriale. Det er uklarheter i litteraturen om hvilke metoder som er optimale for miRNA-profilering av formalinfiksert vev, og et fåtall av de resultatene som er lagt fram er reproduserbare. Det er flere studier som har undersøkt miRNA med microarray, og det ble foreslått å undersøke miRNA-profil ved hjelp av microarray som et alternativ til sekvensering. Dette forslaget ble lagt til side etter samtale med fagpersonell, da det kom frem at det er stor sjanse for feil under avlesning av RNA-sekvenser, fordi det er vanskelig å skille degradert RNA fra miRNA i formalinfiksert materiale. Det kan bety at man får et resultat med mange falske positive miRNA som egentlig viser seg å være degradert mRNA som har hybridisert til arrayet.

Gjennom flere litteratursøk i PubMed kommer det fram at det ikke er publisert særlig mye om temaet sekvensering av miRNA i formalinfiksert vevsmateriale (per 7.8.12, søkeord: ”sequencing miRNA formalin fixed tissue”, antall treff: 3), og det er lite litteratur som kan underbygge de funnene som er gjort i denne oppgaven. Per i dag er sekvensering først og fremst en metode som benyttes i hovedsak til forskning, men metoden er under stadig utvikling og det satses sterkt på å dra nytte av sekvensering også til diagnostiske formål.

Forslag til en god start for videre arbeid med sekvensering av formalinfiksert vevsmateriale vil være å forbedre isoleringsmetoden for RNA ytterligere, for å undersøke om det er mulig å øke utbyttet RNA enda mer. Det kan tenkes at lengre inkubasjonstid med enzym (lengre enn 18 timer) vil bidra til å øke RNA utbyttet, som da gir et større input materiale (høyere konsentrasjon) i en eventuell sekvensering. Tilsetning av BME i lysesbufferen som benyttes i RNA isoleringen kan også være med på å øke utbyttet RNA, ved at BME degraderer eventuelle RNaser i prøven. Ved eluering av isolert RNA kan det være lurt å eluere et større volum, dette for å unngå at noe RNA sitter igjen i filteret. Disse forbedringspunktene kan være med på å øke kvaliteten av det isolerte RNAet, som vil forenkle tillagingen av cDNA-bibliotek, og videre forsøk på å sekvensere vevsmaterialet.

6 Konklusjon

Optimal metode for isolering av RNA fra formalinfiksert parafininnstøpt vevsmateriale krever inkubasjonstid med enzymbehandling over natt (ca. 18 timer) for å oppnå best utbytte RNA og høyest RIN-score. Ved isolering av RNA til analyse av miRNA er det tilstrekkelig med 3 timers inkubasjonstid med enzymbehandling, da mengde av kvantitert miRNA ikke ser ut til å påvirkes av inkubasjonstid over 3 timer. Forholdet mellom mengde kvantitert miRNA i formalinfiksert materiale og ferskt materiale er tilnærmet likt, som betyr at formalinfiksert vevsmateriale kan benyttes på lik linje som ferskt materiale med hensyn på undersøkelse av miRNA. Det kommer tydelig fram av resultatene at det er gjennomgående lave konsentrasjoner RNA til stede i formalinfiksert vevsmateriale, og det er tydelig at RNAet er svært degradert, noe som gjenspeiles i den generelt lave RIN-scoren.

Til tross for dårlig kvalitet på isolert RNA ble det laget cDNA-bibliotek til bruk i sekvensering av miRNA i formalinfiksert vevsmateriale. cDNA-bibliotekene viste mye adapterdimer som er forstyrrende for sekvensering av miRNA, og på bakgrunn av den dårlige kvaliteten på RNAet og forstyrrende DNA-sekvenser i prøvene var det ikke mulig å gjennomføre sekvensering.

Det kreves ytterligere metodeforbedringer før det er mulig å si noe om hvilken miRNA-profil i ulike grad av prostatakreft.

7 Kilder

1. Krefregisteret. *Fakta om kreft*. 2012; Available from: <http://www.krefregisteret.no/no/Generelt/Fakta-om-kreft/Hva-er-kreft/>.
2. Chambers A.F, G.A.C., MacDonald I.C, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nature, 2002. **2**: p. 9.
3. Hinds, P.W. and R.A. Weinberg, *Tumor suppressor genes*. Curr Opin Genet Dev, 1994. **4**(1): p. 135-41.
4. Stowers, S.J., et al., *The role of oncogenes in chemical carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1987. **75**: p. 81-6.
5. Krefregisteret. *Kreftstatistikk*. 2011; Available from: <http://www.krefregisteret.no/no/Registrene/Kreftstatistikk/>.
6. Valkenburg, K.C. and B.O. Williams, *Mouse Models of Prostate Cancer*. Prostate Cancer, 2011. **2011**.
7. Liu, A.Y. and L.D. True, *Characterization of prostate cell types by CD cell surface molecules*. Am J Pathol, 2002. **160**(1): p. 37-43.
8. Saraon, P., K. Jarvi, and E.P. Diamandis, *Molecular alterations during progression of prostate cancer to androgen independence*. Clin Chem, 2011. **57**(10): p. 1366-75.
9. Jeronimo, C., et al., *Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance*. Eur Urol, 2011. **60**(4): p. 753-66.
10. Garraway, I.P., et al., *Human Prostate Sphere-Forming Cells Represent A Subset of Basal Epithelial Cells Capable of Glandular Regeneration In Vivo*. Prostate, 2010. **70**(5): p. 491-501.
11. Lee, C.H., O. Akin-Olugbade, and A. Kirschenbaum, *Overview of prostate anatomy, histology, and pathology*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2011. **40**(3): p. 565-75, viii-ix.
12. Bonekamp, D., et al., *Advancements in MR Imaging of the Prostate: From Diagnosis to Interventions*. Radiographics, 2011. **31**(3): p. 677-703.
13. Prostatacancer, N.P.f., *Registerrapport: Prostatakreft i Norge 2004 - 2008*. Krefregisteret, 2008.
14. Hanchette, C.L. and G.G. Schwartz, *Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation*. Cancer, 1992. **70**(12): p. 2861-2869.
15. Leitzmann, M.F. and S. Rohrmann, *Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates*. Clin Epidemiol, 2012. **4**: p. 1-11.
16. Dhanasekaran, S.M., et al., *Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer*. Nature, 2001. **412**(6849): p. 822-826.
17. Andriole, G.L., et al., *Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial*. N Engl J Med, 2009. **360**(13): p. 1310-9.
18. Benson, M., et al., *Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer*. The Journal of urology, 1992. **147**(3 Pt 2): p. 815.
19. Schroder, F.H., et al., *Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study*. N Engl J Med, 2009. **360**(13): p. 1320-8.
20. Partin, A.W., et al., *Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 1997. **277**(18): p. 1445-1451.
21. Damber J.E, A.G. *Prostate Cancer*. 2008; Available from: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(08\)60729-1/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(08)60729-1/fulltext).
22. Partin, A., et al., *The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer*. The Journal of urology, 1993. **150**(1): p. 110.
23. Wilt, T.J., et al., *Systematic review: comparative effectiveness and harms of treatments for clinically localized prostate cancer*. Ann Intern Med, 2008. **148**(6): p. 435-48.

24. Saini, S., S. Majid, and R. Dahiya, *Diet, microRNAs and prostate cancer*. Pharmaceutical research, 2010. **27**(6): p. 1014-1026.
25. Calin, G.A., Carlo M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**: p. 9.
26. Wach, S., et al., *MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening*. Int J Cancer, 2012. **130**(3): p. 611-21.
27. Selth, L.A., W.D. Tilley, and L.M. Butler, *Circulating microRNAs - macro-utility as markers of prostate cancer?* Endocr Relat Cancer, 2012.
28. Watahiki, A., et al., *MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24950.
29. Leite, K.R., et al., *MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer-from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis*. Urol Oncol, 2011.
30. Fendler, A., et al., *miRNAs can predict prostate cancer biochemical relapse and are involved in tumor progression*. Int J Oncol, 2011. **39**(5): p. 1183-92.
31. Abba, M., G. Mudduluru, and H. Allgayer, *Micrnas In Cancer: Small Molecules, Big Chances*. Anticancer Agents Med Chem, 2012.
32. Wright, J.L. and P.H. Lange, *Newer potential biomarkers in prostate cancer*. Rev Urol, 2007. **9**(4): p. 207-13.
33. Selth, L.A., et al., *Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease*. Int J Cancer, 2011.
34. Gordanpour, A., et al., *MicroRNAs in prostate cancer: from biomarkers to molecularly-based therapeutics*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2012.
35. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs*. Genes & development, 2001. **15**(2): p. 188-200.
36. Zamore, P.D., et al., *RNAi:: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals*. cell, 2000. **101**(1): p. 25-33.
37. Gaken, J., et al., *A functional assay for microRNA target identification and validation*. Nucleic Acids Res, 2012.
38. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-4670.
39. Bartels, C.L. and G.J. Tsongalis, *MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 623-31.
40. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nature Reviews Genetics, 2004. **5**(7): p. 522-531.
41. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
42. Fiorucci, G., et al., *Cancer Regulator MicroRNA: Potential Relevance in Diagnosis, Prognosis and Treatment of Cancer*. Curr Med Chem, 2012. **19**(4): p. 461-74.
43. miRBase. *miRBase: the microRNA database*. 2011 June, 2012; Available from: <http://www.mirbase.org/>.
44. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-419.
45. Cullen, B.R., *Transcription and processing of human microRNA precursors*. Molecular cell, 2004. **16**(6): p. 861-865.
46. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005. **6**(5): p. 376-385.
47. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
48. Porkka, K.P., et al., *MicroRNA expression profiling in prostate cancer*. Cancer research, 2007. **67**(13): p. 6130.

49. Gregory, R.I. and R. Shiekhattar, *MicroRNA biogenesis and cancer*. *Cancer research*, 2005. **65**(9): p. 3509.
50. Sood, P., et al., *Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(8): p. 2746-51.
51. Nakajima, G., et al., *Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer*. *Cancer Genomics Proteomics*, 2006. **3**(5): p. 317-324.
52. Gandellini, P., M. Folini, and N. Zaffaroni, *Towards the definition of prostate cancer-related microRNAs: where are we now?* *Trends Mol Med*, 2009. **15**(9): p. 381-90.
53. Brenton, C.C.J.D. *Sizing up miRNAs as cancer genes*. 2005; Available from: <http://www.gene-quantification.de/caldas-brenton-micro-rna-2005.pdf>.
54. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
55. Bonci, D., et al., *The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities*. *Nat Med*, 2008. **14**(11): p. 1271-7.
56. Varambally, S., et al., *Genomic Loss of microRNA-101 Leads to Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2 in Cancer*. *Science*, 2008. **322**(5908): p. 1695-9.
57. Cannell, I.G. and M. Bushell, *Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability?* *Cell Cycle*, 2010. **9**(14): p. 2726-30.
58. Ji, Q., et al., *MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6816.
59. O'Donnell, K.A., et al., *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 839-43.
60. Mu, P., et al., *Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas*. *Genes Dev*, 2009. **23**(24): p. 2806-11.
61. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
62. Folini, M., et al., *miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 12.
63. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(2): p. 647-58.
64. Asangani, I.A., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer*. *Oncogene*, 2008. **27**(15): p. 2128-36.
65. Zhu, S., et al., *MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1)*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(19): p. 14328-36.
66. Fletcher, C.E., et al., *Androgen-regulated processing of the oncomir MiR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer*. *Hum Mol Genet*, 2012.
67. Lerner, M., et al., *MiRNA-27a controls FBW7/hCDC4-dependent cyclin E degradation and cell cycle progression*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(13): p. 2172-83.
68. Gao, P., et al., *c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 762-765.
69. Kroemer, G. and J. Pouyssegur, *Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(6): p. 472-82.
70. Liu, Q., et al., *miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(16): p. 5391-404.
71. Takeshita, F., et al., *Systemic Delivery of Synthetic MicroRNA-16 Inhibits the Growth of Metastatic Prostate Tumors via Downregulation of Multiple Cell-cycle Genes*. *Mol Ther*, 2010. **18**(1): p. 181-7.
72. Wang, V. and W. Wu, *MicroRNA-based therapeutics for cancer*. *BioDrugs*, 2009. **23**(1): p. 15-23.

73. Szafranska, A.E., et al., *Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling*. J Mol Diagn, 2008. **10**(5): p. 415-23.
74. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 126-39.
75. Prueitt, R.L., et al., *Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer*. Prostate, 2008. **68**(11): p. 1152-64.
76. Carlsson, J., et al., *A miRNA expression signature that separates between normal and malignant prostate tissues*. Cancer Cell Int, 2011. **11**(1): p. 14.
77. Tong, A., et al., *MicroRNA profile analysis of human prostate cancers*. Cancer gene therapy, 2008. **16**(3): p. 206-216.
78. Xi, Y., et al., *Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples*. Rna, 2007. **13**(10): p. 1668-74.
79. Abramovitz, M., et al., *Optimization of RNA extraction from FFPE tissues for expression profiling in the DASL assay*. Biotechniques, 2008. **44**(3): p. 417-23.
80. Ibberson, D., et al., *RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling*. BMC Biotechnol, 2009. **9**(1): p. 102.
81. Scientific, T. *Nucleic Acid Purity Ratios*. Available from: <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop 1000-&-NanoDrop 8000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>.
82. Technologies, A. *Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide*. 2001 [cited 2006 08/2006]; Available from: <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core Facilities/Data/R401-core/RNA6000Nanomanual.pdf>.
83. Research, Z. *RNA Clean & Concentrator™-25*. Available from: <http://www.zymoresearch.com/rna-purification/rna-clean-up/rna-clean-up-concentration/rna-clean-concentrator-25>.
84. Furuno, M., et al., *CDS annotation in full-length cDNA sequence*. Genome Res, 2003. **13**(6B): p. 1478-87.
85. Gubler, U. and B.J. Hoffman, *A simple and very efficient method for generating cDNA libraries*. Gene, 1983. **25**(2-3): p. 263-9.
86. Shabalina, S.A., A.Y. Ogurtsov, and N.A. Spiridonov, *A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(8): p. 2428-37.
87. Hu, L., et al., *Monitoring of cDNA microarray with common primer target and hybridization specificity with selected targets*. Biotechniques, 2002. **32**(3): p. 528, 530-2, 534.
88. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1559-82.
89. ASURAGEN. *AB TaqMan® Gene Expression Services*. 2012; [TaqMan Probe]. Available from: http://www.asuragen.com/services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx.
90. Margulies, M., et al., *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 376-80.
91. Ronaghi, M., et al., *Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release*. Anal Biochem, 1996. **242**(1): p. 84-9.
92. Illumina. *Illumina Sequencing Technology*. 2012; Available from: http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.
93. Li, J., et al., *Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells*. BMC Biotechnol, 2007. **7**: p. 36.
94. Chirgwin, J.M., et al., *Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease*. Biochemistry, 1979. **18**(24): p. 5294-9.

95. Shirzadegan, M., P. Christie, and J.R. Seemann, *An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(21): p. 6055.
96. Kawano, M., et al., *Reduction of non-insert sequence reads by dimer eliminator LNA oligonucleotide for small RNA deep sequencing*. Biotechniques, 2010. **49**(4): p. 751-5.

8 Vedlegg

Vedlegg 1 – RNA-isolering fra formalinfiksert materiale med *RecoverAll™ Nucleic Acid Isolation Kit*

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation

Kitet "RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation" er designet for å ekstrahere både RNA og DNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev. Etter deparafinering og proteasebehandling renses nukleinsyrene ved hjelp av et glassfiberfilter. Nukleasebehandlingen foregår i filteret før nukleinsyrene elueres.

Faktorer som påvirker utbyttet av RNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev

Utbyttet av RNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev kan variere mye og avhenger av hvilken type vev det er, fikseringsmetode og lagring av prøven (før og etter isolering). Generelt vil utbyttet være ca. 50% av det som kan ekstraheres ut fra ferskt vev.

Kryssbindinger som skjer mellom nukleinsyrer og proteiner under formalinfikseringen modifierer nukleinsyrene kjemisk og gjør at de fragmenteres lettere.

Hovedproblemet er for øvrig den høye temperaturen som kreves for parafininnstøpning. Den akselererer de kjemiske reaksjonene som modifierer RNA og DNA. Ved lagring forårsaker disse modifikasjonene fragmentering (RNA degraderes lettere enn DNA).

Optimal fikseringstid (i formalin) er 12- 24 timer. Vevet må være godt dehydrert ved innstøping for å være egnet til RNA isolering.

Forholdsregler knyttet til arbeid med RNA

Bruk avtrekkskap/sikkerhetsskap forbeholdt RNA-arbeid, pipettespisser for RNA osv. Før man starter husk å vaske benker, pipetter, skjæreutstyr (mikrotom, preparatnål) med en RNase dekontamineringsløsning. Bruk hansker og skift ofte (nukleaser i huden bryter ned RNA).

Hensikt

Prosedyren skal bidra til å kvalitetssikre Isolering av RNA, inklusive miRNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev.

Omfang

Prosedyren gjelder for studenter, stipendiater, ingeniører og forskere som er tilknyttet Regional Forskningsbiobank Midt- Norge eller Instituttgruppe for Anatomi, Patologi og Rettsmedisin.

Prosedyren omfatter:

Reagenser og utstyr

Fremgangsmåte

Preparering av bruksløsninger

Preparering av prøvemateriale

Protokoll for isolering av RNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev

Arbeidsbeskrivelse

Ansvar

Studenter, stipendiater, ingeniører og forskere som er tilknyttet Regional Forskningsbiobank Midt-Norge eller Instituttgruppe for Anatomi, Patologi og Rettsmedisin.

Reagenser og utstyr:

Mikrotom, preparatnål

Spinalkanyle, 1.2x90mm.

2 ml mikrosentrifugerør (RNase- Free 2.0ml Microfuge Tubes)

Rotostatorhomogenisator

Sterile fine-tip transfer pipetter

Thermomixer

Vortexmixer

Sentrifuge

Xylen

Absolutt alkohol (uten tilsetning)

Vann (sterilt)

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit

RNaseZAP til dekontaminering av utstyr

Digestion Buffer (romtemperatur)

Wash 1 konsentrat, tilsett 42 ml abs. alkohol før bruk (romtemperatur)

Wash 2/3 konsentrat, tilsett 48 ml abs. alkohol før bruk (romtemperatur)

Oppsamlingsrør (romtemperatur)

Filter (romtemperatur)

Isolation Additive (romtemperatur)

Elution Solution

Protease (-20°C)

10X Dnase Buffer (-20°C)

Dnase (-20°C)

Rnase A (-20°C)

NB! Utvis forsiktighet ved arbeid med kjemikalier - les sikkerhetsdatablad før bruk da flere av disse kjemikaliene kan være helseskadelige.

Fremgangsmåte

Preparering av bruksløsninger

Generelt for tillaging av bruksløsning: lag den mengde bruksløsning man trenger, samt til én ekstra prøve.

Wash 1 konsentrat, tilsett 42 ml abs. alkohol før bruk (romtemperatur). Denne tillages før første gangs bruk, holdbar i ...

Wash 2/3 konsentrat, tilsett 48 ml abs. alkohol før bruk (romtemperatur). Denne tillages før første gangs bruk, holdbar i ...

Preparering av prøvemateriale

To ulike metoder å preparere prøvematerialet:

Snitt:

NB! Skjær helst snittene samme dag som vevet skal deparafineres og proteasebehandles for å sikre høyest mulig utbytte av RNA.

Merk sterile 2 ml mikrosentrifugerør med prøvenummer.

Snitt bort overflaten på parafinblokka for å fjerne vevet som har vært utsatt for luft. Riss med preparatnåla rundt vevet før skjæring for å fjerne mest mulig parafin.

Skjær snitt med tykkelse 10 μm i 2 ml sterile mikrosentrifugerør (1-3 snitt).

NB! For å unngå tap av miRNA under deparafineringen, må snittene ha en tykkelse på minimum 10 μm .

Sylinder:

Merk sterile 2 ml mikrosentrifugerør med prøvenummer.

Bruk en spinalkanyle til å stanse ut vev fra parafinblokka, og legg prøven(e) i sentrifugerørene. Kan oppbevares i fryser ved -80°C .

Protokoll for isolering av RNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev

Deparafinering

I avtrekkskap:

Sett thermomixeren på 50°C .

Tilsett 1 ml xylen til prøven og vortex forsiktig.

Inkuber prøven i 3 min. ved 50°C (thermomixer) for å smelte parafin.

Sentrifuger i 2 minutter ved 14000 rpm (max speed). Hvis det ikke er dannet en pellet, kan man sentrifugere i ytterligere 2 minutter ved 14000 rpm.

Pipettér forsiktig av supernatanten (bruk fine-tip transfer pipette) uten å ødelegge den løse vevspelleten i bunnen av røret. La evt. litt xylen være igjen i røret sammen med prøven.

Vask prøven ved å tilsette 1 ml abs. alkohol til prøven og vortex for å fjerne rester av alkohol og for å fremskynde tørkeprosessen. Sentrifuger i 2 minutter ved 14000 rpm.

Pipettér av supernatanten.

Gjenta pkt. 6-7.

Sentrifuger en gang til for å kunne fjerne eventuelle rester av etanol i prøven.

Lufttørk pelleten i 15-45 minutter. Store biter trenger kanskje mer enn 45 minutter.

NB! Rester av alkohol kan hemme proteasen i neste trinn.

Proteasebehandling

Tilsett Digestion Buffer ($\leq 40\mu\text{m}$ 100 μl , 40-80 μm 200 μl) til hver prøve.

Tilsett 4 μl Protease til hver prøve.

Bland forsiktig, ikke vortex.

Inkubér prøven i 15 min ved 50°C (thermomixer), så 15 min ved 80°C. Unngå å fjerne vev når løsningen overføres til filteret.

STOPP- PUNKT!

Prøven kan nå fryses ved -20°C og tines på is ved en senere anledning.

Nukleinsyre isolering

	Volum av Digestion Buffer	
	100 μl	200 μl
Isolation additive	120 μl	240 μl
100 % etanol	275 μl	550 μl
Totalt	385 μl	790 μl

Tilsett Isolation Additive til hver prøve (se tabell ovenfor for volum).

Tilsett abs. alkohol til prøven. Mix ved å pipettere forsiktig opp og ned. Noen prøver vil være uklare.

Plassér et filter i et oppsamlingsrør.

Pipettér 700 μl av prøven over på filteret og lukk lokket (unngå å få med store biter av uoppløst vev, det vil tette filteret).

Sentrifugér ved 10000 rpm i 30- 60 sek. slik at prøven passerer gjennom filteret.

Nukleinsyrene sitter nå i filteret. Tøm oppsamlingsrøret og sett i filteret på nytt.

Gjenta pkt. 4- 6 til hele prøvevolumet har passert gjennom filteret.

Tilsett 700 μl Wash 1 til filteret.

Sentrifugér ved 10000 rpm i 10 sek.

Tøm oppsamlingsrøret og sett i filteret på nytt.

Tilsett 500 μl Wash 2/3 til filteret.

Sentrifugér ved 10000 rpm i 30 sek.

Tøm oppsamlingsrøret og sett i filteret på nytt.

Sentrifuger ved 10000 rpm i 30 sek. for å fjerne evt. gjenværende væske fra filteret.

DNase-behandling og eluering

Lag DNase mix:

Mengde (pr. prøve)	Komponent
6 µl	10 X DNase buffer
4 µl	DNase
50 µl	Vann (sterilt)

Tilsett 60 µl Dnase mix i sentrum av filteret

Lukk røret og la stå i 30 min. i romtemperatur (22-25°C).

Tilsett 700 µl Wash 1 til filteret.

Inkubér i 30- 60 sek. ved romtemperatur.

Sentrifuger ved 10000 rpm i 30 sek.

Tøm oppsamlingsrøret og sett i filteret på nytt.

Tilsett 500 µl Wash 2/3 til filteret.

Sentrifuger ved 10000 rpm i 30 sek.

Tøm oppsamlingsrøret og sett i filteret på nytt.

Gjenta pkt. 7-9.

Sentrifuger ved 10000 rpm i 1 min. for å fjerne evt. gjenværende væske fra filteret og plasser filteret i et nytt oppsamlingsrør.

Tilsett 60 µl Elution Solution i sentrum av filteret og lukk røret. La stå i 1 min.

Sentrifuger ved 14000 rpm i 1 min slik at elueringsløsningen passerer gjennom filteret.

Lagre ved -20°C eller kaldere.

Referanser

”RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation” Instruction Manual

Vedlegg 2 – Bruksanvisning NanoDrop-1000 Spektrofotometer for måling av RNA konsentrasjon og renhet

Hensikt

Prosedyren skal bidra til å gi informasjon om konsentrasjon og renhet på prøvematerialet ved isolering av RNA og DNA.

Omfang

Prosedyren gjelder for studenter, stipendiater, avdelingsingeniører og forskere som er tilknyttet Regional Biobank eller Faggruppe for Morfologi ved LBK.

Prosedyren omfatter:

Reagenser

Forberedelser

Prøvemateriale

Protokoll

Rapport

Arbeidsbeskrivelse

Ansvar

Prosedyren utføres av studenter, stipendiater, avdelingsingeniører eller forskere tilknyttet Regional Biobank og Faggruppe for Morfologi ved LBK.

Fremgangsmåte

Reagenser og utstyr

Sterilt vann

Løsning som RNA eller DNA er eluert i.

0,1 M HCl

Linsepapir

Forberedelser

Ha prøvematerialet, eluert DNA eller RNA, klart nedkjølt på is. Vask pidestallene med sterilt vann og tørk godt av før bruk.

Prøvemateriale

RNA eller DNA løst i en elueringsbuffer.

Protokoll

Åpne programvare ND-1000 3.1.2.

Velg Nucleic Acid for måling av DNA og RNA.

Det kommer opp en beskjed om å initialisere instrumentet med vann. Åpne armen og legg på 1,5-2 µl sterilt vann. Dette volumet skal også brukes ved blanking og måling av prøver. Legg armen forsiktig ned igjen og trykk OK.

Velg hvilken nukleinsyre som skal undersøkes på menyknapp merket "Sample type".

Tørk alltid av øvre og nedre pidestall med linsepapir før neste løsning legges på.

Blank ved å legge på 1,5-2 µl av løsningen RNA eller DNA er løst i, og trykk blank på menyen.

Mål så ett nytt volum av blanken som en prøve ved å trykke på menyknapp merket "Measure". Absorbansen skal ligge på ca 0 i hele spekteret. Hvis absorbansen ligger mellom -0,3-+0,3 kan det aksepteres. Hvis ikke, blank på nytt og mål.

Mål prøvene, gjerne to paralleller per prøve. Tørk av med linsepapir mellom hver prøve. Ved høye konsentrasjoner bør det vaskes med vann og tørkes av med tørt papir mellom hver prøve.

Etter siste prøve vaskes øvre og nedre pidestall med 0,1 M HCl og så sterilt vann. Tørk av med tørt linsepapir.

Rapport

Resultatene ligger i en rapport som kan skrives ut.

Lage rapport: Gå på "report" i menyen, så "save report" i neste meny. Lag gjerne en mappe med ditt navn eller prosjektnavn.

Referanser

NanoDrop ND-1000 Full-spectrum UV/Vis Spectrophotometer User's Manual

Vedlegg 3 – Bruksanvisning Agilent Bioanalyser for undersøkelse av RNA-integritet

RNA 6000 Nano Assay Protokoll (kit reorder no. 5067-1511)

Hensikt

Prosedyren skal bidra til å kvalitetssikre analysering av RNA-fragmenter isolert fra frossent vev. Hver RNA-Chip inneholder et sett sammenkoblede mikrokanaler som brukes til separering av nukleinsyre-fragment ved hjelp av elektroforese. Agilent RNA kit er designet for analyse av total-RNA (eukaryotisk og prokaryotisk) og mRNA.

Omfang

Prosedyren gjelder for studenter, stipendiater, avdelingsingeniører og forskere som er tilknyttet Regional Biobank eller Faggruppe for Morfologi ved LBK.

Prosedyren omfatter:

Utstyr levert som tilbehør til Bioanalyser

Reagenser og utstyr som følger kitet

Reagenser og utstyr som ikke følger kitet

Forberedelser

Prøvemateriale

Tillaging av gel

Tillaging av Gel-Dye mix

Tilsetting av Gel-Dye Mix, Nano marker, ladder og prøve

Rengjøring av elektroder etter run.

Arbeidsbeskrivelse

Ansvar

Prosedyren utføres av studenter, stipendiater, avdelingsingeniører eller forskere tilknyttet Regional Biobank og Faggruppe for Morfologi ved LBK.

Utstyr levert som tilbehør til Bioanalyser:

Chip priming stasjon

IKA vortex mixer

Reagenser og utstyr som følger kitet (5067-1511)

RNA Nano Chips

To vaskechips for elektrodene

En engangssprøyte tilpasset kitet

Spin filter

Eppendorf-rør (DNase/Rnase frie) for gel-dye mix.

Agilent RNA Ladder (gul topp, reorder no 5067-1529)

RNA Nano Dye Concentrate (blå topp, lysfølsomt)

Agilent RNA 6000 Nano Marker (grønn topp)

Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix (rød topp)

NB! Kitet inneholder DMSO. På grunn av at fargestoffet binder seg til nukleinsyrer, bør det behandles som et potensielt mutagen og håndteres med forsiktighet. Les HMS-datablad, bruk hansker og vernebriller/visir.



Utstyr og reagenser som ikke følger kitet:

RNaseZAP til dekontaminering av elektroder

RNase-fritt vann

Pipetter (10 µl og 1000 µl)

0,5 ml og 1,5 ml microsentrifugerør (RNase-frie)

Mikrosentrifuge ($\geq 300g$)

Varmeblokk for preparering av ladder

Stoppeklokke

Forberedelser

Preparering av ladder:

Sett varmeblokka på 70 °C.

Varmedenaturer ladder i 2 min på 70 °C.

Sett umiddelbart røret med ladder på is.

Alikvoter bruksportjoner i RNase-frie rør og frys ned i -80 °C fryser.

Ta reagensene ut av kjøleskap 30 min før bruk slik at de blir romtemperert.

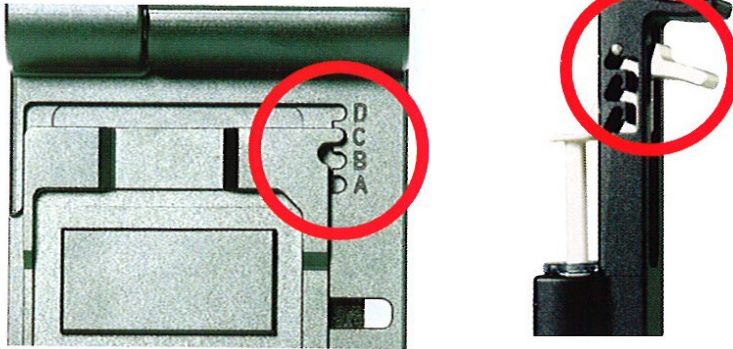
Slå på Bioanalyzer, velg program ”eukaryotic total RNA Nano Series II”.

Ta ut ladder og prøvene fra fryser og tin på is. Prøvene må ha en konsentrasjon som ligger mellom 25-500 ng/ µl for analysering av total RNA med nano-kitet. Ved høyere konsentrasjon må prøvene fortynnes. Ved lavere konsentrasjon kan RNA 6000 Pico kit brukes (50-5000 pg/µl).

Klargjør Chip Priming stasjon:

Skru på sprøyte og sett plata på posisjon C

Utløseren til sprøyta skal settes i øverste posisjon



Dekontaminer elektroder:

En av de to elektrode-rene chipene tilsettes 350 μ l RNaseZAP i en av brønnene.

Set chipen inn i Bioanalyser, lukk lokket, vent i 1 min og ta ut.

Tilsett 350 μ l RNase-fritt vann til den andre elektrode-rene chipen.

Plasser chipen i Bioanalyser i 10 sekunder.

Lufttørk

Prøvemateriale:

Isolert RNA i elueringsbuffer.

Tillaging av gel:

550 μ l RNA 6000 Nano Gel Matrix overføres til et spin filter.

Sentrifuger i 10 min v/1500 g

Fordel i porsjoner på 65 μ l i 0,5 ml RNase-frie rør som følger med kitet.

Oppbevares v/4 °C. Holdbar i 1 mnd.

Tillaging av Gel-Dye Mix:

Vortex RNA Nano 6000 Dye Concentrate i 10 sekund. Spinn ned og tilsett 1 μl til 65 μl av den ferdiglagede gelen.

Vortex løsningen godt og spinn røret ved 13000 g i 10 minutt.



Tilsetting av Gel Dye Mix, Nano marker, ladder og prøve:

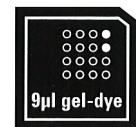
Sett en ny RNA 6000 Nano Chip i priming-stasjonen.

Pipetter 9.0 μl Gel Dye Mix i brønn merket G med ring rundt.



Sjekk at stempelet i sprøyta står på 1 ml og lukk lokket på priming stasjonen.

Trykk sakte ned sprøytstempelet til det festes under klemma.



Vent i nøyaktig 30 sekunder og løsne klemma.

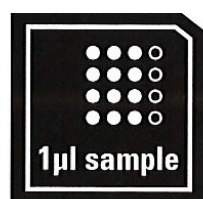
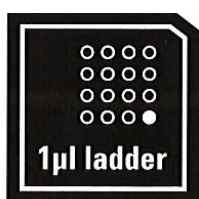
Vent i 5 sekund og trekk sakte stempelet til sprøyta tilbake til posisjonen på 1 ml.

Åpne primingstasjonen og tilsett 9 μl Gel Dye Mix til de to andre brønnene merket G (uten ring rundt).

Tilsett 5 μl av RNA 6000 Nano marker til alle brønnene det skal være prøve og ladder i. Tilsett 6 μl til de brønnene uten prøve.

Tilsett 1 μl ladder i brønn merket med stige.

Tilsett 1 μl prøve til hver av de 12 ubrukte brønnene.



Plasser chipen horisontalt i IKA vortex mixer og vortex i 1 min ved 2400 rpm.

Kjør chipen i Bioanalyser innen 5 min.

Rengjøring av elektroder etter run:

Tilsett 350 µl sterilt vann til rengjøringschip merket H₂O.

Rens i 10 sek og lufttørk.

Referanser

Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide, edition 04/2007, Agilent Technologies.

Vedlegg 4 – Protokoll for rensing og oppkonsentrering av RNA

Buffer Preparation

Before starting, add 48 ml 100% ethanol (52 ml 95% ethanol) to the 12 ml **RNA Wash Buffer** concentrate (R1017) or 96 ml 100% ethanol (104 ml of 95% ethanol) to the 24 ml **RNA Wash Buffer** concentrate (R1018).

Protocol

General procedure¹

total RNA (>17nt)

1. Add 2 volumes of **RNA Binding Buffer** to each volume of RNA sample³ and mix well.
2. Add 1 volume ethanol (95-100%) to the mixture from *Step 1* (e.g., 200 μ l ethanol and 200 μ l mixture), and mix well.

OR

small RNA elimination²

total RNA (>200nt)

- Mix 1 volume of **RNA Binding Buffer** with 1 volume ethanol (95-100%).
- Add 2 volumes of the adjusted buffer from *Step 1* to 1 volume of an RNA sample³ (e.g., 200 μ l mixture and 100 μ l RNA) and mix well.

3. Transfer the mixture from *Step 2* to the **Zymo-Spin™ IIC Column** in a **Collection Tube** and centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute⁴. Discard the flow-through.
4. Add 400 μ l **RNA Prep Buffer** to the column and centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute. Discard the flow-through.
5. Add 800 μ l **RNA Wash Buffer** to the column and centrifuge at $\geq 12,000 \times g$ for 30 seconds. Discard the flow-through. Repeat the wash step with 400 μ l **RNA Wash Buffer**.
6. Centrifuge the **Zymo-Spin™ IIC Column** in an emptied **Collection Tube** at $\geq 12,000 \times g$ for 2 minutes. Remove the **Zymo-Spin™ IIC Column** carefully from the **Collection Tube** and transfer it into an RNase-free tube.
7. Add $\geq 25 \mu$ l of **DNase/RNase-Free Water**⁵ directly to the column matrix and let stand for 1 minute at room temperature. Centrifuge at $10,000 \times g$ for 30 seconds. The eluted RNA can be used immediately or stored at -70°C .

Vedlegg 5 – Protokoll for tillaging av cDNA

Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR

(Invitrogen, Cat. No. 11752-050)

Hensikt

Superscript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR er designet for cDNA-syntese for kvantitativ RT-PCR. Prosedyren skal bidra til å kvalitetssikre cDNA-syntese fra total-RNA isolert fra vev og celler.

Omfang

Prosedyren gjelder for studenter, stipendiater, avdelingsingeniører og forskere som er tilknyttet Regional Biobank eller Faggruppe for Morfologi ved LBK.

Prosedyren omfatter:

Reagenser

Forberedelser

Prøvemateriale

Protokoll for cDNA-syntese

Arbeidsbeskrivelse

Ansvar

Prosedyren utføres av studenter, stipendiater, avdelingsingeniører eller forskere som er tilknyttet Regional Biobank eller Instituttgruppe for Anatomi, Patologi og Rettsmedisin ved LBK.

Fremgangsmåte

Reagenser

Superscript™ First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Cat. No. 11752-050)

Rør/Topp	Merket	Innhold
Svart	RT Enzyme Mix (inneholder Superscript™ III RT og RNaseOUT™)	100 µl
Blå	2X RT Reaction Mix (inneholder oligo(dT) ₂₀ (2.5 µM), random hexamer (2.5 ng/µl), 10 mM MgCl ₂ og NTP'er)	500 µl
Svart	E. Coli RNase H	50 µl
Blank	Water DEPC	1,25 µl

Forberedelser

Sett på to varmeblokker med temperatur på henholdsvis 25 °C og 50 °C.

Sett et varmeskap til 37 °C.

Ha en stoppeklokke for hånden.

Ha en isoporeske med is klar.

Ta opp rørene med reagenser og prøver som skal brukes og sett de på is for tining.

Mix og sentrifuger reagensene raskt før bruk og sett de på is.

Prøvemateriale

Isolert RNA fra fra celler og vev.

Protokoll

Følgende protokoll er optimalisert for syntetisering av cDNA for qRT-PCR. Vær oppmerksom på at inkubasjonstrinn ved 50 °C i 30 min. er anbefalt som et generelt startpunkt. Høyere temperatur (opp til 60 °C) kan brukes på vanskelige templat.

Kombiner følgende reagenser i kitet i et rør på is. For mange reaksjoner kan en mastermix uten RNA lages først.

2X RT Reaction Mix 10 μ l

RT Enzyme Mix 2 μ l

RNA (opp til 1 μ g) x μ l

DEPC-treated water til 20 μ l

Bland reagensene i røret forsiktig, og inkuber ved 25 °C i 10 min.

Flytt røret til varmeblokk som holder 50 °C, og inkuber i 30 min. Still om den andre varmeblokka fra 25 °C til 85 °C slik at den er klar til neste step.

Stopp reaksjonen ved å inkubere røret ved 85 °C i 5 min.

Tilsett 1 μ l E. coli RNase H og inkuber i varmeskapet ved 37 °C i 20 min.

Bruk fortynnet eller ufortynnet cDNA i qPCR, eller lagre prøven ved -20 °C

Referanser

Invitrogen, SuperScript™ III First Strand-Synthesis SuperMix for qRT-PCR

Vedlegg 6 – Protokoll for analyse med qPCR

LightCycler TaqMan Master (Cat. no 04 735 536 001)

Hensikt

LightCycler TaqMan Master er designet for PCR med bruk av LightCycler karusellbasert system.

Omfang

Prosedyren gjelder for studenter, stipendiater, avdelingsingeniører og forskere som er tilknyttet Regional Biobank eller Faggruppe for Morfologi ved LBK.

Prosedyren omfatter:

Utstyr

Reagenser

Forberedelser

Prøvemateriale

Negativ kontroll

Primere

Taqmanprobe

Protokoll for PCR-reaksjon

Arbeidsbeskrivelse

Ansvar

Prosedyren utføres av studenter, stipendiater, avdelingsingeniører eller forskere tilknyttet Regional Biobank og Faggruppe for Morfologi ved LBK.

Fremgangsmåte

Utstyr

LightCycler 2.0 instrument

LightCycler kapillærrør (20 µl)

LightCycler kjøleblokk

LightCycler karusell sentrifuge

Standard benksentrifuge

Nukleasefrie pipettespisser

Sterile nukleasefrie reaksjonsrør

Reagenser

“LightCycler TaqMan Master” inneholder:

Rør/Topp	Merket	Lagring
1a hvit topp	Enzym	Ved -15 til -25 °C
1 b rød topp	Reaksjonsmiks	Ved -15 til -25 °C
1 (rød topp etter tilsetning av 1a til 1b)	Mastermiks	Ved -15 til -25 °C. Mastermiksen kan alikvoterer og lagres i maksimum 3 mnd ved angitt temperatur.
2 fargeløs topp	Nukleasefritt vann	Ved -15 til -25 °C

Kitet lagres ved -15 til -25 °C fram til holdbarhetsdato. Unngå gjentatt tining og frysing

Forberedelser

Ha en stoppeklokke for hånden.

Ha en isoporeske med is klar.

Ta opp rørene med reagenser og prøver som skal brukes og sett de på is for tining.

Miks og sentrifuger reagensene raskt før bruk og sett de på is.

Prøvemateriale

Bruk opp til 500 ng cDNA syntetisert fra isolert RNA fra celler og ferskt vev per 20 µl reaksjon.

Negativ kontroll

Kjør alltid en negativ kontroll sammen med prøvene. Som negativ kontroll brukes nukleasefritt vann levert med kitet.

Primere

Bruk primere med en sluttkonsentrasjon på 0,1 – 1 µM. Den anbefalte startkonsentrasjonen er 0,5 µM.

Taqmanprobe

Anbefalt sluttkonsentrasjon ved tilsetning Hydrolysis prober er 0,05-0,1 µM.

Protokoll

Programmer instrumentet, LightCycler 2.0 før blanding av reaksjonsløsningene. Et LightCycler karusellbasert system som brukes med LightCycler TaqMan inneholder følgende program;

Pre-incubation: for aktivering av FastStart DNA polymerase og denaturering av DNA.

Amplification/amplifisering av mål DNA.

Cooling/kjøling av rotor og kammer.

Programmer LightCycler som angitt (parametre som ikke er oppgitt i tabellen settes til 0):

Analysis Mode	Cycles	Segment	Target Temperature ¹⁾	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation					
None	1		95°C	10 min ²⁾	none
Amplification					
Quantification	45 ³⁾	Denaturation	95°C	10 s	none
		Annealing	primer dependent ⁴⁾	20 – 40 s ⁵⁾	none
		Extension	72°C	1 s	single
Cooling					
None	1		40°C	30 s	none

¹⁾ Temperature Transition Rate/Slope is 20°C/sec.

²⁾ If high polymerase activity is needed in early cycles, you can sometimes improve results by extending the pre-incubation to 15 min.

³⁾ 45 cycles are suitable for most of the assays. Nevertheless, for a well optimized assay with steep amplification curves and early crossing points, even with low target concentrations, 40 cycles should be sufficient (resulting in a reduced assay time!).

⁴⁾ For initial experiments, set the target temperature 5°C below the calculated primer melting temperatures.

⁵⁾ For higher precision in target quantification experiments, in some cases it can be advantageous to choose relatively long annealing times, up to 45 s when amplifying sequences > 500 bp.

Parameter	Setting
-----------	---------

All LightCycler® Software Versions

Seek Temperature 30°C

LightCycler® Software prior to Version 3.5

Display Mode fluorescence channel F1 (for using a FAM-labeled hydrolysis probe)

Fluorescence Gains	Fluorimeter	Gain Value
	Channel 1 (F1)	1
	Channel 2 (F2)	15
	Channel 3 (F3)	30

LightCycler® Software Version 3.5

Display Mode fluorescence channel F1 (for using a FAM-labeled hydrolysis probe)

Fluorescence Gains Not required

- Ⓞ In data created with LightCycler® Software Version 3.5, all fluorescence values are normalized to a fluorescence gain of "1". This produces a different scale on the Y-axis than that obtained with previous LightCycler® software versions. This difference does not affect the crossing points or any calculated concentrations obtained.

Tilbered PCR miksen i et 1,5 ml reaksjonsrør for 20 µl ved å tilsette følgende reagenser i rekkefølgen oppgitt nedenfor, bland så forsiktig:

Component	Volum for en 20 µl reaksjon
Vann, nukleasefritt (rør 2)	9 µl
Primere/Prober10X kons	2 µl
Mastermiks 5x kons (rør 1)	4 µl
Total volum	15 µl

Mastermiks tilberedes ved å tilsette 10 µl fra rør 1a (enzym) til rør 1 b reaksjonsmiks for en 20 µl reaksjon. For å tilberede PCR miks for mer enn en reaksjon, multipliser mengden oppgitt under volum-kolonnen med antall prøver.

Sett riktig antall kapillærrør i kjøleblokka som tilhører LightCycler 2.0 For 20 µl reaksjon: Pipetter 15 µl PCR miks til hvert kapillærrør, tilsett så 5 µl prøve til hvert rør.

NB: husk negativ kontroll.

Lukk hvert kapillærrør med en topp som følger med.

Overfør kapillærrørene med prøver til karusellen, og sentrifuger karusellen i LC Carousel Sentrifuge.

Kjør ”Self test” programmet på LighCycler 2.0 før du setter i prøvene.

Sett i karusellen med prøvene og trykk start.

Referanser

LightCycler TaqMan Master. Version April 2006.

Vedlegg 7 – Protokoll for bruk av Uracil DNA glycosylase ved qPCR

Bakgrunnsinformasjon

PCR- produkter inneholder U i stedet for T, mens cDNA inneholder T. Uracil glycosylase bryter bindngene til Uracil, så da får man ødelagt eventuell forurensing med PCR- produkt i Light Cycleren. Det har vært et tilfelle av forurensing med PCR- produkt da det ble undersøkt for miR-23a, miR-27a og housekeepinggenet GAPDH. Dette gjelder da for kjøring med disse primerne og TaqMan- prober til disse mikro- RNAene.

Endringer i protokoll

Man kjører vanlig protokoll (se «Lightcycler Taqman Master»), men med følgende endringer:

PCR- miks v/ tilsetning av Uracil DNA glycosylase:

Dette gjelder pr. prøve. Man multipliserer med antall prøver (+1) for hvert mikroRNA man skal undersøke for.

Reagenser:	Mengde:
Vann, nukleasefritt (rør 2)	8,75µl
Uracil DNA glycosilase	0,25µl
Primer/probemix	2µl
Mastermix	4µl

Protokollen:

Ved bruk av Uracil DNA glycosylase kreves det to oppvarmingstrinn etter tilblanding i 10 minutter ved 40°C og 10 minutter ved 95°C.

Bland miksen og tilsett PCR- miks og prøve til glasskappilærene. Sett kapillærne i karusellen og sentrifuger som vanlig. Sett hele karusellen i varmeskap ved 40°C i 10 minutter og start LightCycleren. Det siste oppvarmingstrinnet ligger i programmet til maskinen, så det trenger man ikke bry seg om.

Anne Morgenstjerne Sundet – juni 2012

Vedlegg 8 – Resultater fra kvantitering av miR-23a og miR-27a med qPCR

LightCycler® Software Version 4.1



Report

User Developed or Modified Test Method

miRNA 23a ktrl og FFPE 149,154,156,159 RNA input 141 ng/ui 25.01.11

Experiment

Creation Date	1/24/2011 2:28:54 PM	Last Modified Date	1/25/2011 12:08:29 PM
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	1/25/2011 10:04:37 AM	End Time	1/25/2011 10:58:46 AM
Run State	Completed	Software Version	LCS4 4.1.1.21
Macro		Macro Owner	
Templates	GAPDH Taqman Meng 11.08.10		
Run Notes			

Programs

Program Name	pre-incubation					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20	0	0	0	None

Program Name	amplification					
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:10	20	0	0	0	None
58	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:01	20	0	0	0	Single

Program Name	cooling					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:30	20	0	0	0	None

Samples

Sample Count	25	LC Carousel ID		MPLC Batch ID	
Assay Cat. No.		Assay Lot No.		Color Comp ID	

Pos	Name	Repl. Of	Sample Notes
1	NTC		
2	p149 ktrl ferskt vev		
3	Repl. of p149 ktrl ferskt vev	2	
4	p149.2 FFPE 3t v 50C		
5	Repl. of p149.2 FFPE 3t v 50C	4	
6	p149.1 FFPE 18 t v 50C		

User Developed or Modified Test Method

Samples

Sample Count	25	LC Carousel ID		MPLC Batch ID	
Assay Cat. No.		Assay Lot No.		Color Comp ID	

Pos	Name	Repl. Of	Sample Notes
7	Repl. of p149.1 FFPE 18 t v 50C	6	
8	p154 ktrl ferskt vev		
9	Repl. of p154 ktrl ferskt vev	8	
10	p154.1 FFPE 3t v 50C		
11	Repl. of p154.1 FFPE 3t v 50C	10	
12	p154.2 FFPE 18t v 50C		
13	Repl. of p154.2 FFPE 18t v 50C	12	
14	p156 ktrl ferskt vev		
15	Repl. of p156 ktrl ferskt vev	14	
16	p156.1 FFPE 3t v 50C		
17	Repl. of p156.1 FFPE 3t v 50C	16	
18	p156.1 FFPE 18t v 50C		
19	Repl. of p156.1 FFPE 18t v 50C	18	
20	p159 ktrl ferskt vev		
21	Repl. of p159 ktrl ferskt vev	20	
22	p159 FFPE 3t v 5C		
23	Repl. of p159 FFPE 3t v 5C	22	
24	p159 FFPE 18t v 50C		
25	Repl. of p159 FFPE 18t v 50C	24	

Change History

Revision	Date	User	Reason

Relative Quantification - Monocolor

Group 1

Settings

Target	Channel	530	Color Compensation
	Program	amplification is a Quantification program with 45 cycles.	
Reference	Channel	530	Color Compensation
	Program	amplification is a Quantification program with 45 cycles.	
	Experiment Name	Same as Target	
	Correction Factor	1	Multiplication Factor 1

Target Samples

Pos	Inc	Name	Type	Crossing Point	Standard
1	<input checked="" type="checkbox"/>	NTC	Unknown		
2	<input checked="" type="checkbox"/>	p149 ktrl ferskt vev	Unknown	29.76	

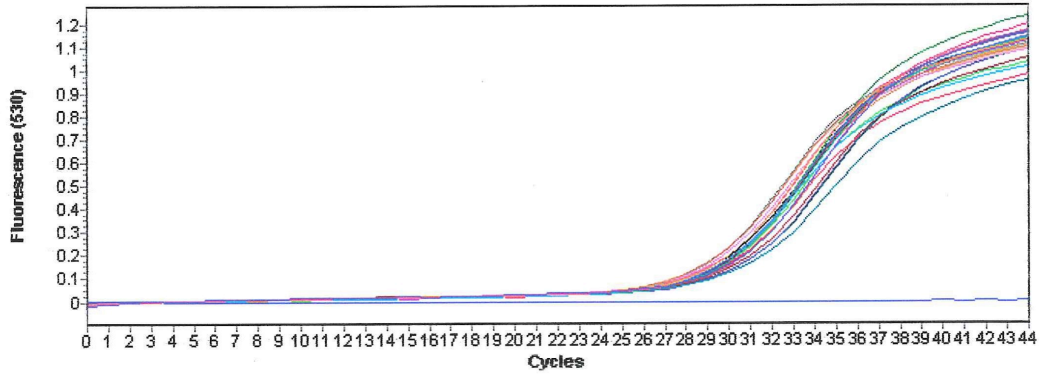
User Developed or Modified Test Method**Target Samples**

Pos	Inc	Name	Type	Crossing Point	Standard
3	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p149 ktrl ferskt vev	Unknown	29.78	
4	<input checked="" type="checkbox"/>	p149.2 FFPE 3t v 50C	Unknown	29.75	
5	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p149.2 FFPE 3t v 50C	Unknown	29.65	
6	<input checked="" type="checkbox"/>	p149.1 FFPE 18 t v 50C	Unknown	30.90	
7	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p149.1 FFPE 18 t v 50C	Unknown	30.83	
8	<input checked="" type="checkbox"/>	p154 ktrl ferskt vev	Unknown	29.03	
9	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p154 ktrl ferskt vev	Unknown	28.98	
10	<input checked="" type="checkbox"/>	p154.1 FFPE 3t v 50C	Unknown	29.85	
11	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p154.1 FFPE 3t v 50C	Unknown	29.80	
12	<input checked="" type="checkbox"/>	p154.2 FFPE 18t v 50C	Unknown	30.96	
13	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p154.2 FFPE 18t v 50C	Unknown	30.58	
14	<input checked="" type="checkbox"/>	p156 ktrl ferskt vev	Unknown	28.94	
15	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p156 ktrl ferskt vev	Unknown	29.28	
16	<input checked="" type="checkbox"/>	p156.1 FFPE 3t v 50C	Unknown	30.09	
17	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p156.1 FFPE 3t v 50C	Unknown	29.91	
18	<input checked="" type="checkbox"/>	p156.1 FFPE 18t v 50C	Unknown	29.90	
19	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p156.1 FFPE 18t v 50C	Unknown	29.90	
20	<input checked="" type="checkbox"/>	p159 ktrl ferskt vev	Unknown	28.99	
21	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p159 ktrl ferskt vev	Unknown	29.58	
22	<input checked="" type="checkbox"/>	p159 FFPE 3t v 5C	Unknown	29.89	
23	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p159 FFPE 3t v 5C	Unknown	29.57	
24	<input checked="" type="checkbox"/>	p159 FFPE 18t v 50C	Unknown	30.57	
25	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p159 FFPE 18t v 50C	Unknown	30.52	

User Developed or Modified Test Method

Target Amplification Curves

1: NTC	2: p149 ktrl ferskt vev	3: Repl. of p149 ktrl ferskt vev
4: p149.2 FFPE 3t v 50C	5: Repl. of p149.2 FFPE 3t v 50C	6: p149.1 FFPE 18 t v 50C
7: Repl. of p149.1 FFPE 18 t v 50C	8: p154 ktrl ferskt vev	9: Repl. of p154 ktrl ferskt vev
10: p154.1 FFPE 3t v 50C	11: Repl. of p154.1 FFPE 3t v 50C	12: p154.2 FFPE 18t v 50C
13: Repl. of p154.2 FFPE 18t v 50C	14: p156 ktrl ferskt vev	15: Repl. of p156 ktrl ferskt vev
16: p156.1 FFPE 3t v 50C	17: Repl. of p156.1 FFPE 3t v 50C	18: p156.1 FFPE 18t v 50C
19: Repl. of p156.1 FFPE 18t v 50C	20: p159 ktrl ferskt vev	21: Repl. of p159 ktrl ferskt vev
22: p159 FFPE 3t v 5C	23: Repl. of p159 FFPE 3t v 5C	24: p159 FFPE 18t v 50C
25: Repl. of p159 FFPE 18t v 50C		



Target Standard

Efficiency = 2.0

Reference Standard

Efficiency = 2.0

Summary



Report

User Developed or Modified Test Method

miRNA27a ktrl og FFPE, 149,154,156,159 RNA input 141 ng25.01.11

Experiment

Creation Date	1/25/2011 9:58:04 AM	Last Modified Date	1/25/2011 2:01:33 PM
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	1/25/2011 1:04:42 PM	End Time	1/25/2011 1:59:10 PM
Run State	Completed	Software Version	LCS4 4.1.1.21
Macro		Macro Owner	
Templates	miRNA 23a og 27a ktrl og FFPE 149,154,156,159 25.01.11 Run Protocol, miRNA 23a og 27a ktrl og		
Run Notes			

Programs

Program Name	pre-incubation					
Cycles	1	Analysis Mode	None			

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20	0	0	0	None

Program Name	amplification					
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification			

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:10	20	0	0	0	None
58	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:01	20	0	0	0	Single

Program Name	cooling					
Cycles	1	Analysis Mode	None			

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:30	20	0	0	0	None

Samples

Sample Count	25	LC Carousel ID		MPLC Batch ID	
Assay Cat. No.		Assay Lot No.		Color Comp ID	

Pos	Name	Repl. Of	Sample Notes
1	NTC		
2	p149 ktrl ferskt vev		
3	Repl. of p149 ktrl ferskt vev	2	
4	p149.2 FFPE 3t v 50C		
5	Repl. of p149.2 FFPE 3t v 50C	4	
6	p149.1 FFPE 18 t v 50C		

User Developed or Modified Test Method

Samples

Sample Count	25	LC Carousel ID		MPLC Batch ID	
Assay Cat. No.		Assay Lot No.		Color Comp ID	

Pos	Name	Repl. Of	Sample Notes
7	Repl. of p149.1 FFPE 18 t v 50C	6	
8	p154 ktrl ferskt vev		
9	Repl. of p154 ktrl ferskt vev	8	
10	p154.1 FFPE 3t v 50C		
11	Repl. of p154.1 FFPE 3t v 50C	10	
12	p154.2 FFPE 18t v 50C		
13	Repl. of p154.2 FFPE 18t v 50C	12	
14	p156 ktrl ferskt vev		
15	Repl. of p156 ktrl ferskt vev	14	
16	p156.1 FFPE 3t v 50C		
17	Repl. of p156.1 FFPE 3t v 50C	16	
18	p156.1 FFPE 18t v 50C		
19	Repl. of p156.1 FFPE 18t v 50C	18	
20	p159 ktrl ferskt vev		
21	Repl. of p159 ktrl ferskt vev	20	
22	p159 FFPE 3t v 5C		
23	Repl. of p159 FFPE 3t v 5C	22	
24	p159 FFPE 18t v 50C		
25	Repl. of p159 FFPE 18t v 50C	24	

Change History

Revision	Date	User	Reason

Relative Quantification - Monocolor

Group 1

Settings

Target	Channel	530	Color Compensation
	Program	amplification is a Quantification program with 45 cycles.	
Reference	Channel	530	Color Compensation
	Program	amplification is a Quantification program with 45 cycles.	
	Experiment Name	Same as Target	
Correction Factor	1	Multiplication Factor	1

Target Samples

Pos	Inc	Name	Type	Crossing Point	Standard
1	<input checked="" type="checkbox"/>	NTC	Unknown		
2	<input checked="" type="checkbox"/>	p149 ktrl ferskt vev	Unknown	23.21	

User Developed or Modified Test Method

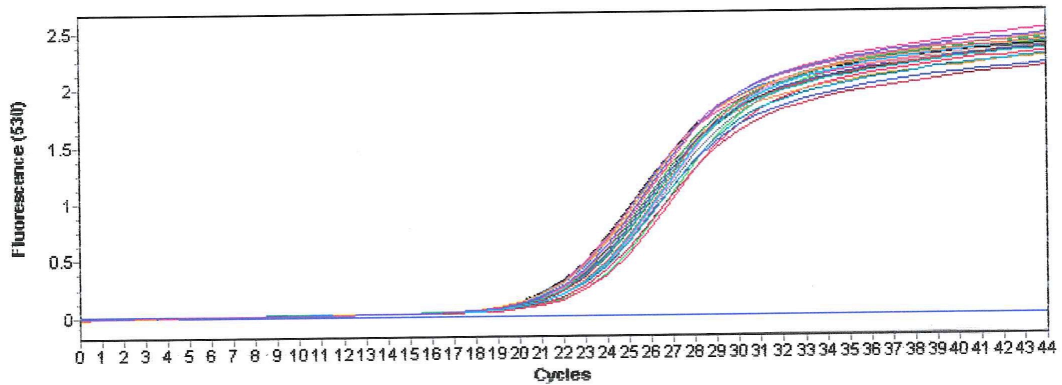
Target Samples

Pos	Inc	Name	Type	Crossing Point	Standard
3	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p149 ktrl ferskt vev	Unknown	23.21	
4	<input checked="" type="checkbox"/>	p149.2 FFPE 3t v 50C	Unknown	21.60	
5	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p149.2 FFPE 3t v 50C	Unknown	21.62	
6	<input checked="" type="checkbox"/>	p149.1 FFPE 18 t v 50C	Unknown	22.49	
7	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p149.1 FFPE 18 t v 50C	Unknown	22.55	
8	<input checked="" type="checkbox"/>	p154 ktrl ferskt vev	Unknown	22.44	
9	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p154 ktrl ferskt vev	Unknown	22.32	
10	<input checked="" type="checkbox"/>	p154.1 FFPE 3t v 50C	Unknown	21.77	
11	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p154.1 FFPE 3t v 50C	Unknown	21.66	
12	<input checked="" type="checkbox"/>	p154.2 FFPE 18t v 50C	Unknown	22.73	
13	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p154.2 FFPE 18t v 50C	Unknown	22.80	
14	<input checked="" type="checkbox"/>	p156 ktrl ferskt vev	Unknown	22.76	
15	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p156 ktrl ferskt vev	Unknown	22.81	
16	<input checked="" type="checkbox"/>	p156.1 FFPE 3t v 50C	Unknown	22.20	
17	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p156.1 FFPE 3t v 50C	Unknown	22.16	
18	<input checked="" type="checkbox"/>	p156.1 FFPE 18t v 50C	Unknown	22.30	
19	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p156.1 FFPE 18t v 50C	Unknown	22.26	
20	<input checked="" type="checkbox"/>	p159 ktrl ferskt vev	Unknown	22.69	
21	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p159 ktrl ferskt vev	Unknown	22.69	
22	<input checked="" type="checkbox"/>	p159 FFPE 3t v 5C	Unknown	21.81	
23	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p159 FFPE 3t v 5C	Unknown	21.80	
24	<input checked="" type="checkbox"/>	p159 FFPE 18t v 50C	Unknown	22.16	
25	<input checked="" type="checkbox"/>	Repl. of p159 FFPE 18t v 50C	Unknown	22.06	

User Developed or Modified Test Method

Target Amplification Curves

1: NTC	2: p149 ktrl ferskt vev	3: Repl. of p149 ktrl ferskt vev
4: p149.2 FFPE 3t v 50C	5: Repl. of p149.2 FFPE 3t v 50C	6: p149.1 FFPE 18t v 50C
7: Repl. of p149.1 FFPE 18t v 50C	8: p154 ktrl ferskt vev	9: Repl. of p154 ktrl ferskt vev
10: p154.1 FFPE 3t v 50C	11: Repl. of p154.1 FFPE 3t v 50C	12: p154.2 FFPE 18t v 50C
13: Repl. of p154.2 FFPE 18t v 50C	14: p156 ktrl ferskt vev	15: Repl. of p156 ktrl ferskt vev
16: p156.1 FFPE 3t v 50C	17: Repl. of p156.1 FFPE 3t v 50C	18: p156.1 FFPE 18t v 50C
19: Repl. of p156.1 FFPE 18t v 50C	20: p159 ktrl ferskt vev	21: Repl. of p159 ktrl ferskt vev
22: p159 FFPE 3t v 5C	23: Repl. of p159 FFPE 3t v 5C	24: p159 FFPE 18t v 50C
25: Repl. of p159 FFPE 18t v 50C		



Target Standard

Efficiency = 2.0

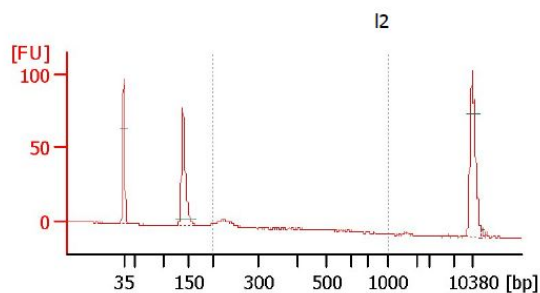
Reference Standard

Efficiency = 2.0

Summary

Vedlegg 9 – Påvisning av konsentrasjon og størrelse på cDNA før bruk i sekvensering

Før sekvensering må det lages et cDNA-bibliotek som blir analysert med Agilent Bioanalyser for å finne DNA-konsentrasjon og størrelse. Figur 1 viser bilde av hvordan et optimalt cDNA-bibliotek for analyse av miRNA skal se ut.



Overall Results for sample 7 : I2

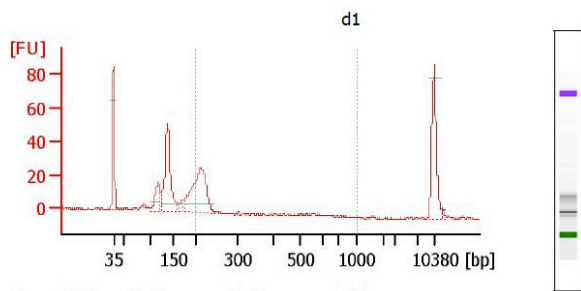
Number of peaks found: 2
Noise: 0,4
Corr. Area 1: 26,6

Peak table for sample 7 : I2

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/ μ l]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5 411,3	Lower Marker
2	138	164,96	1 809,2	
3	10 380	75,00	10,9	Upper Marker
4	12 059	0,00	0,0	

Figur 1: Optimalt cDNA-bibliotek analysert med Agilent Bioanalyser. Bildet viser tydelige avgrensede topper som tilsvarer nedre og øvre markør (35 basepar og 10 380 basepar), samt cDNA i korrekt størrelsesorden (ca. 140 basepar) i forhold til hva som er forventet av miRNA. Bildet viser ingen antydning til forstyrrelse av andre DNA-fragmenter, som gjør at prøven kan sekvenseres.

Figur 2 og figur 3 viser bilde av de to resterende prøvene, G5-6 og G5-8, som ble analysert med Agilent Bioanalyser som en del av forberedelse til sekvensering.



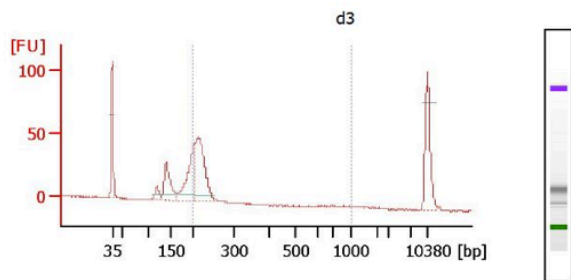
Overall Results for sample 3 : d1

Number of peaks found: 5
 Noise: 0,5
 Corr. Area 1: 109,5

Peak table for sample 3 : d1

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5 411,3	Lower Marker
2	117	64,10	833,0	
3	137	204,79	2 257,8	
4	171	14,27	126,7	
5	213	215,14	1 529,3	
6	10 380	75,00	10,9	Upper Marker
7	12 304	0,00	0,0	

Figur 2: Gelbilde av prøve G5-6. Etter tillaging av cDNA-bibliotek ble prøvematerialet analysert for å undersøke konsentrasjon og størrelse på cDNA-fragmentene. Bildet viser en tydelig avgrenset topp på 35 basepar og en tydelig avgrenset topp på 10 380 basepar som tilsvarer nedre og øvre markør. Mellom 117 basepar og 213 basepar er det flere sammenhengende topper som tilsvarer adapterdimerer og cDNA-fragmenter. På grunn av tilstedeværelse av adapterdimerer vil det ikke føre til en vellykket sekvensering, da antall adapterdimerer i prøven vil være svært høyt.



Overall Results for sample 5 : d3

Number of peaks found: 4
 Noise: 0,4
 Corr. Area 1: 249,9

Peak table for sample 5 : d3

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5 411,3	Lower Marker
2	118	27,46	351,3	
3	140	108,81	1 175,7	
4	205	151,29	1 116,5	
5	215	215,65	1 516,4	
6	10 380	75,00	10,9	Upper Marker

Figur 3: Gelbilde av prøve G5-8. Se figur 2 for nærmere forklaring.