NTNU

FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

Finnes det en sammenheng mellom mikroRNA-21 og tumorsuppressorene PTEN, BTG2 og PDCD4 i prostatavev?

Is there a connection between microRNA -21 and tumor suppressors PTEN, BTG2 and PDCD4 in prostate tissue?

Av / by

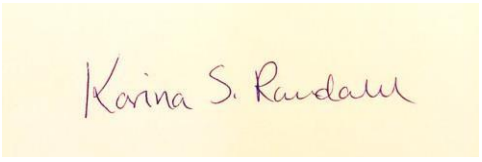
Oda Holter Hågensen og Karina Svanem Ramdahl

Trondheim, 2018

I Forord

Dette bachelorprosjektet ble gitt av Jostein Halgunset i samarbeid med medisinstudent Erik Wiik, som en del av et større forskningsprosjekt. Laboratoriearbeidet ble utført ved Biobank 1 sitt RNasefrie forskningslaboratorium, St. Olavs og CMIC (Cellular & Molecular Imaging Core facility), NTNU. Takk til bioingeniørene ved Biobank 1 og CMIC for opplæring, hjelp og gode råd underveis. Spesielt takk til Erik og Jostein for god veiledning, spesielt ved mikroskopering og som viktige kontaktpersoner dersom noe var usikkert underveis.

Trondheim, 10. august 2018



Oda Holter Hågensen

Karina Svanem Ramdahl

II Sammendrag

miRNA er små deler av DNA som ikke koder for proteiner, men som i stedet festes til mRNA og kan regulere syntesen av proteiner ved å hemme translasjonen. miR-21 har en slik basesekvens at den kan bindes til mRNA for visse tumorsuppressorer, noe som gjør at det kan være knyttet opp mot utviklingen av kreft. Formålet med oppgaven var å finne ut om det er noen sammenheng mellom miR-21 og endret uttrykk av de tre ulike tumorsuppressorene PTEN, PDCD4 og BTG2 i prostatavev.

I dette prosjektet ble miR-21 detektert ved in situ hybridisering (ISH), mens de tre tumorsuppressorene ble detektert ved immunhistokjemi (IHC). Prøvematerialet som ble benyttet var formalinfiksert, parafininnstøpt prostatavev fra ti ulike pasienter. Blokkene ble sekvensielt snittet og fra hver pasient ble fire snitt farget med ISH og tre snitt med IHC, én for hver tumorsuppressor. De snittene som skulle sammenlignes var snittet rett etter hverandre. Dette er viktig for å få de samme kjertlene farget med de ulike metodene. Etter farging ble snittene vurdert ved mikroskopering.

Ved ISH-fargingen var at det mest atrofiske kjertler som ble positive, men også noen kjertler med irregulært fortykket epitel. Tumorvev var negativt. Etter hvert ble det funnet mønster som tydet på at de atrofiske kjertlene som lå i betente områder var de som ble farget oftest.

Det var vanskelig å finne noe klart mønster i uttrykket av tumorsuppressorene, og vi fant ingen sammenheng mellom uttrykket av miR-21 og de utvalgte tumorsuppressorene. Dette betyr at miR-21 trolig ikke inhiberer translasjonen av mRNA som koder for disse tumorsuppressorene. Det er mer sannsynlig at miR-21 inngår i en mer kompleks reguleringsmekanisme, og at denne kan være av betydning ved regenerasjon etter vevsskade med betennelse, noe som igjen kan utgjøre en forløper for kreft.

III Abstract

miRNA are small fractions of DNA which does not encode for proteins, but instead may attach to mRNAs. In that way, the miRNA contributes to regulate the protein synthesis by inhibiting the mRNA translation. miR-21 has the ability to suppress or degrade certain tumor suppresors and then contribute to cancer development. The purpose of this project is to see if there is any connection between microRNA-21 and a change in expression of the tumor suppressors PTEN, PDCD4 and BTG2 in prostate tissue.

In this project, miRNA-21 was detected and stained using in-situ hybridization (ISH), while the three tumor suppressors were detected with immunohistochemistry (IHC). The tissue sample used in the project was formalin-fixed paraffin-embedded prostate tissue from ten different patients. The sections were cut sequentially. For each patient, four sections were stained with in-situ hybridization and three sections were stained with immunohistochemistry, one section for each tumor suppressor. It is important that the sections stained with both in situ hybridization and immunohistochemistry are cut sequentially, because the two methods are being compered. After staining the sections were evaluated with microscopy.

The first thing that we noticed of the results from the ISH-staining, was that most of the positive stained glands was atrophic, but also glands with thickened epithelial layer was positive, while tumor glands was negative. Later a pattern was found that indicated that the atrophic glands lying in inflamed areas were the ones who got positively stained most often. As for the tumor suppressors, it was hard to find a clear pattern of in which glands they were expressed, nor was there any connection between which glands who got positive stained with ISH, and negative with IHC.

The results showed that there was no connection between miR-21 and the selected tumor suppressors, which means that miR-21 most likely do not affect mRNA who encodes for these tumor suppressors. It is more likely that miR-21 is associated with inflammations than tumor suppressors and precursors to cancer.

IV Innholdsfortegnelse

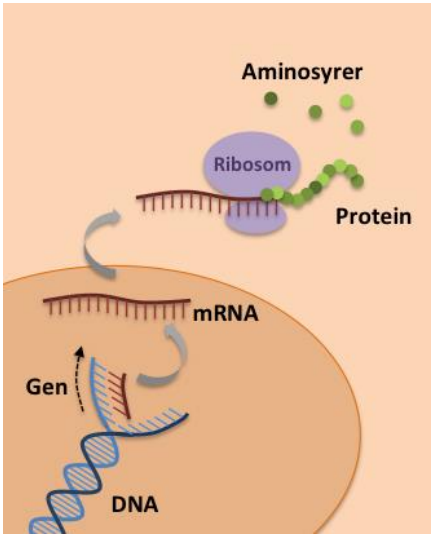
I Forord I
II Sammendrag II
III Abstract III
IV Innholdsfortegnelse IV
1. Innledning 1
1.1 DNA og dets funksjon 1
1.2 Kreftutvikling og prostatakreft 2
1.3 MikroRNA 3
1.4 miR-21 og kreftutvikling 6
1.5 BTG2 7
1.6 PTEN 9
1.7 PDCD4 10
1.8 Formålet med oppgaven 12
2. Materiale og metode 13
2.1 Materiale 13
2.1.1 Prøvemateriale 13
2.1.2 Kontroll In situ hybridisering 13
2.1.3 Kontroll Immunhistokjemi 14
2.2 In situ hybridisering 15
2.2.1 Prinsipp 15
2.2.2 Reagenser 16
2.2.3 Utstyr 16
2.2.4 Fremgangsmåte 16
2.3 Immunhistokjemi 18
2.3.1 Prinsipp 18
2.3.2 Reagenser 19
2.3.3 Utstyr 20
2.3.4 Fremgangsmåte 20
3 Resultater 21
3.1 Resultater, ISH 21
3.1.1 Hva farges med hvilken farge 21
3.1.2 Utprøvinger 21
3.1.3 Fargeresultater 22

3.2 Resultater, IHC 25
3.2.1 Hva farges med hvilken farge 25
3.2.2 Fargeresultater 25
3.3 Sammenligning av snitt farget med ISH og IHC 27
4. Diskusjon 29
4.1 Generelt 29
4.2 ISH og miR-21 29
4.3 miR-21 og betennelse 30
4.4 Sammenhengen mellom miR-21 og tumorsuppressorer 30
4.5 Begrensninger 32
5. Konklusjon 33
6. Referanser 34
7. Vedlegg 37
7.1 Vedlegg 1: Oversikt over snitt farget med IHC 1
7.2 Vedlegg 2: miRNA ISH protokoll, miRCURY LNA 1
7.3 Vedlegg 3: 4_ Immunohistochemical detection of EGFR 1
7.4 Vedlegg 4: Protokoll, IHC 1

1. Innledning

1.1 DNA og dets funksjon

DNA er kroppens arvestoff og finnes i hver enkelt celle. DNA-molekylet bygges opp av to tråder med nukleotider. Hvert nukleotid består av en fosfatgruppe, et sukkermolekyl og en nitrogenbase (1). Nitrogenbasene binder trådene sammen ved at nitrogenbaser på den ene DNA-tråden er komplementære med nitrogenbasen på den andre, og dette kalles hybridisering. Et gen er en sekvens i DNAet som inneholder den informasjonen som er nødvendig for at cellen skal kunne produsere et bestemt protein (2). DNA gir grunnlaget for all informasjon om hvordan genene våre uttrykkes. Når en celle skal lage et spesifikt protein, vil DNA-dobbelttråden åpnes og genet som koder for det spesifikke proteinet blir tilgjengelig for oversettelse. Oversettelsen av gener heter transkripsjon, og er første del av proteinsyntesen, prosessen hvor proteiner blir dannet fra DNA (figur 1.1). Under transkripsjonen blir det dannet en ny tråd, kalt mRNA, som er komplementær med én av de to trådene i DNA. mRNA passerer gjennom kjernemembranen, fra cellekjernen, og ut i cytoplasma hvor det blant annet finnes ribosomer. Ribosomer er organeller hvor translasjon foregår, der hvor nukleotidsekvensen på mRNA oversettes om til ferdige proteiner (3).



Figur 1.1: Illustrasjon av proteinsyntesen. DNA-dobbelttråden åpnes og genet kopieres til et mRNA. mRNAet fraktes ut fra cellekjernen, festes til et ribosom og protein dannes. Hentet fra: http://www.bioteknologiradet.no/filarkiv/2010/07/Arv_og_genetikk2.jpg

1.2 Kreftutvikling og prostatakreft

I kroppen skjer det stadig dannelse av nye celler gjennom celledeling som erstatter skadde eller slitte celler. Det er flere mekanismer som bidrar til nydannelse og reparasjon av celler, men hvis disse mekanismene forstyrres kan det føre til endringer i celler og vev. Dersom endringer i cellen er stor nok, kan det føre til at cellen utvikler seg til en kreftcelle.
Kreft kjennetegnes ved at cellene deler seg ukontrollert og oppstår når celler som har gjennomgått uheldige endringer får inntre i cellesyklus og dele seg til nye celler med samme endring. Kreftceller har ofte utviklet egenskaper som gjør at cellen unngår apoptose, og disse cellene vil samtidig ikke lenger bare vokse på sin egen lokalisasjon, men vil vokse inn i nærliggende celler og vev (4).
Endringer i celler som kan føre til kreftutvikling kan komme av mutasjoner. En mutasjon er en endring i nukleotidsekvensen i DNA og kan oppstå dersom cellen eksponeres for skadelige agens, som for eksempel stråling eller kjemikalier. Oftest oppstår mutasjon i en celle helt tilfeldig. Tilfeldige mutasjoner oppstår fordi det er begrensninger i presisjon under DNA-replikasjonen. For hver 10^9 eller 10^{10} nukleotid som kopieres blir det innsatt feil nitrogenbase. Som oftest er det ikke av stor betydning dersom en enkeltcelle muterer og får endrete egenskaper. Disse cellene blir som regel programmert til å inntre i apoptose slik at cellen dør. Større betydning har det dersom celler muterer og ikke går i apoptose, men heller deler seg og gir opphav til datterceller med samme mutasjonsfeil. Det er ofte dette som fører til kreft (4).

Prostatakreft oppstår som regel i epitelcellene i prostatakjertlene (5). PIA (proliferative inflammatory atrophy) og PIN (prostatic intraepithelial neoplasia) er områder i prostata som når de ses under vevsmikroskopering, kategoriseres som forstadier, fordi det er en risiko for at cellene i disse områdene skal utvikle seg til kreftceller (4). PIA er en tilstand hvor områder i prostata er betente og cellene er atrofiske, det vil si mindre enn normalt. PIN er områder hvor cellene er atypiske, men fortsatt har en intakt basalmembran. Når basalmembranen ødelegges og cellen vokser inn i andre vev, betegnes området som kreft (6).
Kreft i prostata er den vanligste kreftformen hos menn, og hyppigheten øker med alderen. Forløpet av prostatakreft varierer veldig fra pasient til pasient. Kreft som er lite aggressiv kan være ufarlig og pasienten vil kunne leve i mange år uten å merke noe til sykdommen, mens noen kreftformer er svært aggressive og kan i verste fall være dødelig. Den vanligste måten å oppdage prostatakreft på er ved PSA-screening, en prøve som måler mengden prostata spesifikt antigen (PSA) i blodet, da PSA ofte er forhøyet ved kreft i prostata. De siste årene

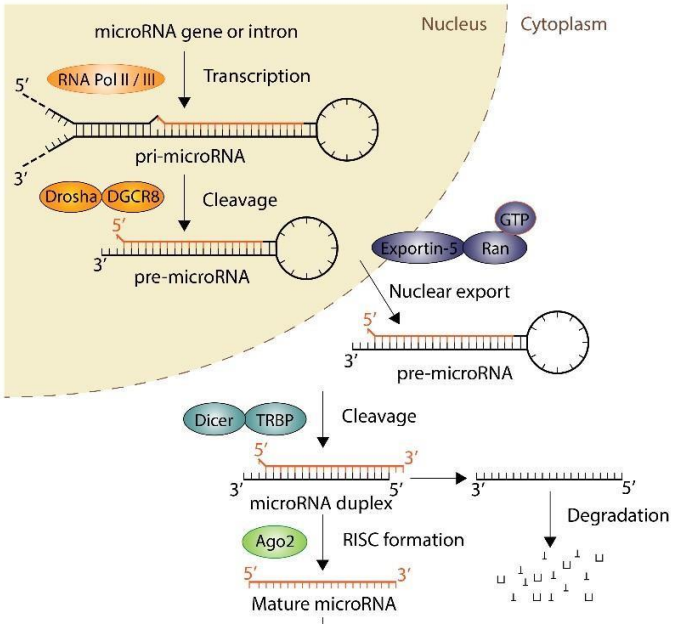
har man sett at denne testen ofte oppdager lavrisikokreft, som fører til at disse mennene må gjennomgå unødvendig behandling, som oftest er operasjon og fjerning av prostata. Det er derfor behov for en bedre og sikrere måte å diagnostisere og gradere prostatakreft på (5).

1.3 MikroRNA

MikroRNA, skrives miRNA, er et produkt av gener som ikke koder for proteiner. Etter flere trinn blir miRNA omdannet til 19-25 nukleotider lange, enkelttrådete RNA-sekvenser. Dannelsen av miRNA starter i cellekjernen ved at genet som koder for miRNA blir transkribert og en enkelttrådet RNA-tråd dannes, hvor denne tråden er en del lengre enn det ferdige miRNAet. Langs enkelttråden er det en basesekvens som er komplementær med en annen basesekvens på samme RNA-tråd, og disse kan hybridiseres til hverandre. Når disse basesekvensene hybridiseres, blir det dannet en struktur som ser ut om en hårnål med lange ender, pri-miRNA (figur 1.2). (7, 8).

Figur 1.2: Pri-miRNA, hårnålsstruktur med lange ender. Hentet fra: https://bitesizebio.com/23238/mysterious-mirnas-an-introduction-to-micrornas/

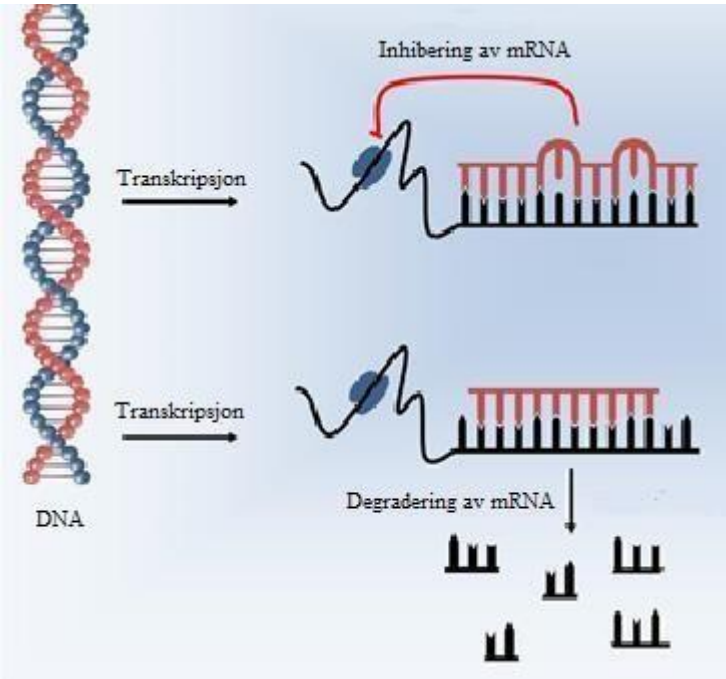
Den dobbelttrådete sekvensen på pri-miRNA gjenkjennes av ribonukleasen Drosha, som kutter av en del av den ene enden til pri-miRNA. Det dannes et mindre fragment som kalles pre-miRNA. pre-miRNA blir fraktet ut av cellekjernen ved hjelp av et transportprotein-kompleks. Dette komplekset fungerer også som en kontrollstasjon, hvor bare pre-miRNA med riktig lengde og struktur blir gjenkjent og sendt ut i cytoplasmaet. I cytoplasma gjenkjenner proteinkomplekset Dicer pre-miRNAet og kutter av hårnålsstrukturen. Det som nå gjenstår er en kort dobbelttrådet sekvens, miRNA-duplex. Deretter splitter Dicer dobbelttråden til to enkelttråder, hvorav den ene er det ferdige miRNAet. I cytoplasma finnes et proteinkompleks som kobler seg til miRNA, og på denne måten er det dette komplekset som bestemmer hvilken tråd av miRNA-duplex, som blir valgt. Det er den tråden som har den svakeste, eller den minst stabile 5'-enden, som bindes til proteinkomplekset i cytoplasma. Dermed dannes RNA-induced silencing complex (RISC). Den gjenværende tråden av miRNA-duplex, som ikke er en del av RISC, blir degradert (figur 1.3). (7, 8).



Figur 1.3: Skjematisk illustrasjon av miRNA-biogenesen og dannelsen av miRNA. Genet som koder for miRNA blir transkribert, og den nye tråden foldes som en hårnål. En ende kuttes av og tråden transporteres ut i cytoplasma. Her kuttes den andre enden av, og dobbeltråden splittes til to enkelttråder, hvor den ene kobles til RISC og den andre degraderes. Hentet fra: https://www.vectorbiolabs.com/mirna-aav-adenovirus/

miRNA kan bidra til å kontrollere en mengde genuttrykk i kroppens celler, ved å regulere hvilke mRNA som får sin basesekvens lest av til proteiner under translasjon. miRNA og de andre komponentene i RISC-komplekset hybridiseres til komplementære baser på mRNA, men effekten av dette avhenger av hvor komplementær miRNA er med basesekvensen på mRNAet. Etter at RISC er blitt hybridisert til mRNA aktiveres én av to mekanismer: Inhibering av translasjon eller degradering (figur 1.4). Som regel er ikke basene på et miRNA perfekt komplementære mot en basesekvens på mRNA, men RISC fester seg og regulerer proteinsyntesen likevel. For eksempel kan de 8 første basene være komplementære, men deretter kan det komme 3 baser på miRNA som ikke er komplementære med de 3 neste på mRNA, før de neste basene igjen er komplementære. Slik kan det være flere steder på en RISC-mRNA kobling, da dannes små kuler/bobler på miRNA, hvor basene ikke er hybridisert med andre baser. Ved dette tilfelle skjer en inhibering. Under inhibering blir ikke mRNA translatert så lenge RISC er koblet til tråden, men translasjonen fortsetter om RISC kobles fra. Ved denne mekanismen kan også mRNA fungere som en pausestasjon for miRNA, ved at det

oppholder miRNA i et RISC-kompleks fra å festes til andre mRNA. Dersom alle basene på miRNA er helt komplementære med basesekvensen på mRNAet destabiliseres mRNAet og degraderes, og de proteinene det kodet for blir ikke produsert. Om mengden miRNA som kan festes til akkurat denne ene typen mRNA er stor nok, blir alt av det samme mRNA degradert, og det genet som mRNA er transkribert av vil ikke uttrykkes i denne cellen og dermed heller ikke proteinet genet koder for. Når RISC er koblet fra mRNA eller etter en degradering, er RISC fritt i cytoplasma og klar for å feste seg til et nytt mRNA, på denne måten kan få miRNA regulere et stort antall, og også flere ulike mRNA (7, 9).



Figur 1.4: Illustrasjon over de ulike måter miRNA kan kobles til mRNA og utfallet av dem. Hentet fra: http://heart.bmj.com/content/early/2015/04/09/heartjnl-2013-305402

Det er oppdaget i overkant av 1000 ulike miRNA i menneskekroppens celler og for å holde rede på dem blir de navnsatt med nummer. Navnsettingen skjer som følge av rekkefølgen de blir oppdaget i, men er også basert på basesekvenslikhet mellom de ulike miRNA. Et eksempel: Dersom miR-21 hadde vært det sist oppdagede og registrerte miRNA, og det ble funnet en ny type miRNA som ikke var sekvensielt lik miR21, hadde denne fått navnet miR-22. Blir det funnet et miRNA som kun har noen få baser i forskjell fra det forrige oppdagede, altså at de sekvensielt er ganske like, vil miR-21 få navnet miR-21a og det nye miR-21b (10).

1.4 miR-21 og kreftutvikling

Flere studier har vist at endringer i miRNA-uttrykk viser sammenheng med kreftutvikling. Endret uttrykk av visse miRNA er påvist i forbindelse med kreftutvikling i flere organ, deriblant også prostata. Det er rapportert at det finnes flere miRNA som har endret uttrykk ved kreft, og et av disse er miR-21. (11)

For at endret uttrykk av miR-21 skal ha funksjonell betydning for utvikling av kreft, må det endrede nivået av miR-21 føre til endret uttrykk av proteiner som er involvert i viktige prosesser som for eksempel proliferasjon eller differensiering. Det vil bidra til å underbygge og støtte ideen om at miR-21 kan bidra til utvikling av kreft i prostata dersom vi kan vise endring av miRNA'et og samtidig endret nivå av proteiner som reguleres av dette.

Proteiner kan detekteres og påvises ved bruk av immunhistokjemi, se avsnitt 2.3.1 for nærmere beskrivelse av metode. I utvelgelsen av proteiner som skulle bli påvist med immunhistokjemi var det tre kriterier:

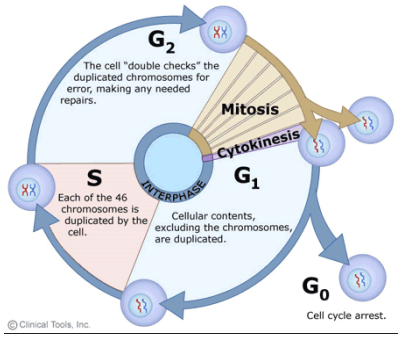
- Proteinet må kodes av gener med en mRNA-sekvens som miR-21 kan binde seg til
- Proteinet bør være involvert i prosesser som kontrollerer at cellen ikke kan utvikle seg til en kreftcelle. Proteinet bør da bidra til å regulere for eksempel proliferasjon eller differensiering
- Det kan skaffes antistoff mot det bestemte proteinet slik at proteinet kan påvises ved immunhistokjemi

Basert på disse tre kriteriene ble det valgt ut tre kandidat-proteiner som var innenfor de økonomiske mulighetene til prosjektet. Valget falt på de tre proteinene PTEN, BTG2 og PDCD4. Disse ble valgt ut fordi alle er uttrykt normalt i prostata, i ulik grad.

1.5 BTG2

Cellesyklus er den prosessen hvor DNA blir replikert og cellen deler seg til to nye datterceller, hvor de nye cellene får samme genom som morcellen. Cellesyklus deles inn i flere faser;

- **G1-fase:** Her vokser cellen og denne fasen er kontrollpunkt for at cellen kan inntre i S-fase. Indre og ytre miljø overvåkes. Uten de nødvendige ekstracellulære signaler (mitogener) går ikke cellen videre til neste fase
- **S-fasen:** Her replikeres DNA
- **G2-fase:** Kontrollpunkt før inngang i M-fasen, som sørger for at kun celler som ikke er skadet kan inntre i neste fase
- **M-fasen:** I denne fasen foregår celledelingen, mitose (12)



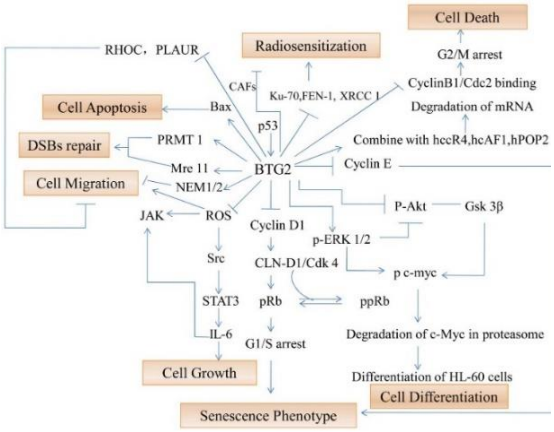
Figur 1.5: Oversikt over ulike faser i cellesyklusen. Hentet fra: https://www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics/cellcycle-mitosis-meiosis

Sykliner er regulatoriske proteiner som er viktige for at en celle skal inntre i neste fase i cellesyklusen. De deles inn i fire grupper avhengig av hvilken fase i cellesyklusen de regulerer. For eksempel kalles sykliner i M-fase for M-syklin og de bidrar til at cellen kan forlate G2-fase og inntre i M-fase. Sykliner kan ikke alene bidra til at en celle inntrer i neste fase, den må kompleksbindes til en gruppe enzymer kalt syklin-avhengige kinaser (cdk). Cdk er inaktive og har ikke enzymatisk effekt når de ikke er i kompleks med sykliner. Når de aktiveres av sykliner, vil dette komplekset fosforylere og aktivere proteiner og regulatoriske faktorer som er viktige for å starte neste fase i cellesyklusen (13, 14).
Sykliner og cdk-komplekser må ha tilgang til proteiner og regulatoriske faktorer for at de skal fosforylere disse. pRb (retinoblastoma protein) er et protein som har en inhiberende funksjon i G1-fasen slik at celler ikke får replikert sitt genom ukontrollert. pRb binder seg til regulatoriske faktorer og inhiberer deres funksjon og gjør de utilgjengelig for syklin/cdk-kompleks. En celle kan ikke inntre i S-fasen og får heller ikke replikert DNA dersom det ikke

er aktive regulatoriske faktorer til stede. Det er da viktig at pRb blir inhibert og frigir faktorene hvis cellen skal fortsette cellesyklusen. Komplekset mellom sykliner og cdk fosforyler pRb og gjør at pRb frigir regulatorisk faktor den er bundet til, og dermed kan cellen fortsette til DNA-replikasjon (14). Syklin D1 er en viktig regulator som bidrar til at cellen kan komme seg fra G1-fasen over i S-fasen. Det gjøres ved at syklin D1 kompleksbindes til et cdk, og komplekset fosforylerer og inhiberer pRb (14).

En tumorsuppressor som er viktig for regulering av cellesyklusen er BTG2 (BTG anti-proliferation factor 2). Denne tumorsuppressoren har antiproliferative egenskaper, som innebærer at celler med DNA-skade hindres fra å replikere og dele seg (15). Når en celle blir skadet, eksempelvis via mutasjon eller ioniserende stråling, fører det til økt produksjon av proteinet p53, som er viktig for at celler med skade skal tas ut av cellesyklus eller dø via apoptose (16). p53 regulerer også produksjon av BTG2. Selv om funksjonen til BTG2 fortsatt er delvis ukjent, er det kjent at BTG2 inhiberer syklin D1, som medfører at syklin D1-cdk-kompleks ikke kan inhibere pRb, og transkripsjonsfaktorer blir da ikke frigitt. Dermed blir cellen tatt ut av cellesyklus og kan ikke inntre i S-fasen.

Flere studier har vist at BTG2 er nedregulert i flere typer kreft, blant annet ved prostatakreft. Ved lave konsentrasjoner av BTG2 ses økt nivå av syklin D1, noe som kan medføre at pRb inhiberes. Det kan medføre at celler som burde blitt tatt ut av cellesyklusen på grunn av skade, ikke blir det og cellen får replikert ødelagt genom og deretter kan dele seg. Når skadde celler får dele seg ukontrollert, kan det bidra til kreftutvikling (17-19).



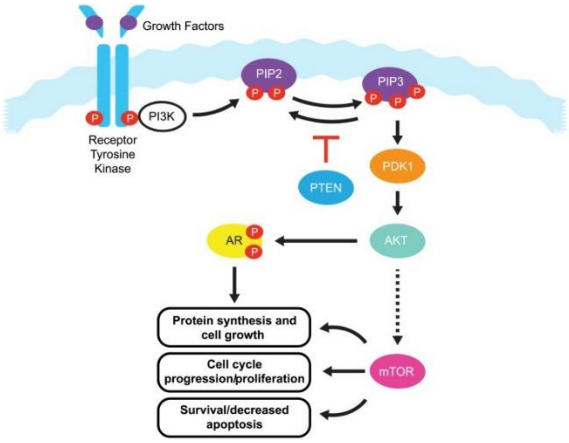
Figur 1.6: Illustrasjon som viser hvilke funksjoner BTG2 har i en celle. Her vises at BTG2 inhiberer syklin D1, som resulterer i at pRb ikke inhiberes og cellen kan ikke replikere DNA, men blir satt i cellearrest. Hentet fra: https://www.spandidos-publications.com/ijo/46/2/459

1.6 PTEN

Pi3K er en signalvei som stimulerer celler og fremmer celleproliferasjon, cellevekst og celleoverlevelse ved å sende ut signaler som hindrer celler fra å gå i apoptose (20). Denne signalveien foregår i flere trinn. Det starter med det transmembrane membranproteinet reseptor tyrosin kinase (RTK), som har utstikkere både intracellulært og ekstracellulært, får bundet til seg et signalmolekyl ekstracellulært (21). Når et signalmolekyl binder seg til RTK, skjer det en serie av fosforyleringer intracellulært av blant annet RTK og enzymet Pi3-kinase (Pi3K). Fosforylert Pi3K vil fosforylere et annet molekyl kalt fosfatidylinositol-4,5-difosfat (PIP2), som da omdannes til fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3). Videre fosforylerer PIP3 Akt og aktiverer Akt (22). Fosforylert Akt har flere proteiner det fosforylerer og aktiverer, som proteinene Bad og Tor. Bad sørger for at cellen går i apoptose ved å binde seg til proteinet Bcl2, som har som funksjon å hindre at cellen går i apoptose. Når Bad fosforyleres av Akt, frigis Bcl2 og dermed blokkeres signalet som gjør at cellen kan inntre i apoptose. Aktivert Tor stimulerer til økt proteinsyntese og hindrer proteindegradering, noe som resulterer i cellevekst (23).

Pi3K-signalvei er essensiell for cellevekst og overlevelse, og dersom det oppstår en forstyrrelse av denne signalveien, kan det føre til kreftutvikling. PTEN (phosphatase and tensin homolog) er en tumorsuppressor som har til oppgave å regulere denne signalveien. PTEN fungerer som en negativ regulator for Pi3K-signalveien. Det foregår ved at PTEN defosforylerer og fjerner et fosfat fra PIP3, som da omdannes tilbake til PIP2 (22). Dette stopper den videre fosforyleringskaskaden og medfører at Akt ikke blir aktivert. Dermed blir heller ikke cellen stimulert til vekst og proliferasjon, men programmeres istedenfor til apoptose (24). PTEN er viktig for å kontrollere cellevekst og proliferasjon og hindre kreftutvikling. (20, 25)

En mutasjon eller en endring av genet som koder for tumorsuppressoren PTEN og som resulterer i at PTEN sin funksjon endres eller mistes, kan bidra til prostatakreft. Det skyldes at tap av den negative regulatoriske effekten av PTEN fører til hyperaktivering av Akt. Hyperaktivt Akt er forbundet med ukontrollert celleproliferasjon, nedsatt apoptose og større sjanse for kreftutvikling (22, 26).



Figur 1.7: Oversikt over Pi3K-signalvei og hvordan PTEN kan inhiberer videre signalaktivering. Hentet fra: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775430/

1.7 PDCD4

PDCD4 (programmed cell death gene 4) kan fungere som en tumorsuppressor ved å regulere flere mekanismer som er viktig for translasjon, og er trolig involvert når en celle programmeres til apoptose. PDCD4 er antatt å utøve to funksjoner, selv om dens spesifikke rolle som tumorsuppressor ikke er helt klarlagt enda:

- Inhibere proteintranslasjon ved å binde seg til transkripsjonsfaktorer viktig for translasjon av mRNA
- Inhibere aktivitet av AP-1.

Studier viser at PDCD4 inhiberer translasjon av mRNA ved at det binder seg til en transkripsjonsfaktor, eIF4A, som er viktig for at translasjonen skal begynne. Dermed blir denne faktoren hemmet og translasjonen av mRNAet blir ikke satt i gang. Selv om det er oppdaget av PDCD4 kan binde seg til mRNA, er det ikke blitt identifisert eksakt hvilke mRNA som er naturlige mål for PDCD4. Det er oppdaget av PDCD4 kan binde seg til mRNA som koder for p53 og inhibere translasjon. p53 er viktig for at celler skal settes i cellearrest eller inntre apoptose når de har DNA-skade, og ved å forstyrre denne balansen kan det føre til at celler med skade får overleve. Det er slike celler som kan føre til kreftutvikling (27).

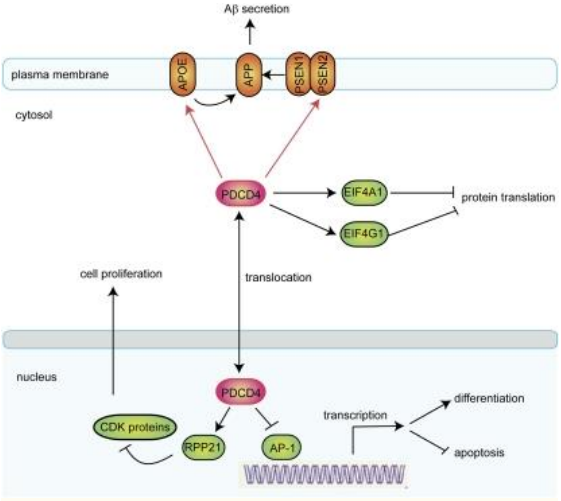
AP-1 (activating protein-1) er en samlebetegnelse på transkripsjonsfaktorer som bindes til samme sted på DNA og som er ansett å spille en viktig rolle for kreftutvikling. Det er et kompleks av transkripsjonsfaktorer, som når det aktiveres av ytre stimuli, som eksempelvis vekstfaktorer eller cytokiner, regulerer og bestemmer hvilke gener som skal bli uttrykt. AP-1 bidrar til å kontrollere og regulere flere prosesser som differensiering, proliferasjon og

apoptose, avhengig av hvilke signaler det blir stimulert av. Økt nivå av AP-1 fører til økt transkripsjon av målgenet, og dermed er det viktig at AP-1 reguleres for å unngå kreftutvikling. Dersom AP-1 for eksempel formidler vekstsignaler ukontrollert, kan det føre til at cellen vokser ukontrollert og igjen kan utvikle seg til en kreftcelle, så det er viktig at AP-1 inhiberes når den skal (28-30).

Nedsatt uttrykt mengde av PDCD4 er blitt satt i sammenheng med utvikling av flere typer kreft, deriblant i lunger og lever, hvor nedreguleringen blir linket til økt ekspresjon av miR-21, som binder seg til mRNA som koder for PDCD4. Nedregulering av PDCD4 påvirker celler i hovedsak på to måter, hvor begge er antatt å føre til kreftutvikling:

- Flere studier har vist av nedsatt PDCD4 øker cellulær motilitet og tumoren sin evne til å vokse inn i nærliggende vev. Det kan skyldes at PDCD4 ikke tilstrekkelig inhiberer AP-1sin aktivitet.
- Nedsatt uttrykk av PDCD4 kan også føre til dysregulering av DNA-skaderesponsen ved å inhibere viktige mRNA (31).

En studie har vist at ved nedsatt differensiering av prostatavev, er det også nedsatt uttrykk av PDCD4. Desto mindre differensiert prostatakreftcellene er, desto lavere er mengden uttrykt PDCD4 og desto høyere nivå av PSA. Det er foreslått at aggressiviteten av prostatakreft kan være relatert til nivå av PDCD4 (32, 33).



Figur 1.8: Illustrasjon som viser hvordan PDCD4 inhiberer translasjon og transkripsjon, ved å binde seg til eIF4A og AP-1. Hentet fra: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3044851/

1.8 Formålet med oppgaven

Formålet med oppgaven er å finne ut om det finnes noen sammenheng mellom miR-21 og endret uttrykk av tre utvalgte tumorsuppressorene PTEN, PDCD4 og BTG2 i vevssnitt fra totale prostataektomier. Metodene som benyttes vil være in situ hybridisering, forkortet ISH, og immunhistokjemi, forkortet IHC. Dersom et område uttrykker miR-21, mens samme område ikke uttrykker tumorsuppressorene, kan dette bety at miR-21 inhiberer translasjonen.

2. Materiale og metode

2.1 Materiale

2.1.1 Prøvemateriale

For at det skal være lovlig å utføre forskning på humanbiologisk materiale må prosjektet godkjennes av en regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Denne bacheloroppgaven er del av et større prosjekt godkjent av REK i Midt-Norge, REK-nr: 2016/1598. Hovedprosjektet som denne oppgaven er en del av, går ut på å undersøke og kartlegge biologien i områder som er mistenkt for å være forløpere til kreft i prostata. Det gjøres ved bruk av ulike biologiske metoder og kan gi kunnskap om hvordan kreftceller utvikler seg fra å være ikke-farlige til en muligens dødelig diagnose.
Prøvematerialet brukt i prosjektet var histologiske snitt fra formalinfiksert, parafininnstøpt prostatavev fra 10 ulike anonyme pasienter, operert med total prostatektomi ved St Olavs hospital i årene 2016 og 2017, for påvist prostatakreft. Vevsmaterialet inneholdt både benigne celler og strukturer, premaligne lesjoner og områder med kreftceller. Snittingen ble utført på Cellular & Molecular Imaging Core facility (CMIC) ved NTNU. Hver av de 10 blokkene ble snittet slik at det ble tre sekvensielle snitt rett etter hverandre i fire ulike serier, altså 12 snitt fra hver pasientblokk. Snittene ble merket 1,2 eller 3 avhengig av hvilket nummer det hadde i den sekvensielle snittingen, og i tillegg merket med serienummer A, B, C eller D. Alle ti blokker hadde snitt merket med A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, D1, D2, og D3.
Alle sekvensielle snitt merket med «2» (A2, B2, C2, D2) ble farget med in situ hybridisering, mens noen av snittene merket med «1» og «3» ble farget med immunhistokjemi. Oversikt over hvilke snitt som ble farget med immunhistokjemi ligger i vedlegg 1.

2.1.2 Kontroll In situ hybridisering

Ved in situ hybridisering ble det brukt positiv og negativ kontroll. Den negative kontrollen, «Scramble-miR», er laget slik at proben ikke er komplementær med kjente RNA i vevet og derfor skal den normalt ikke binde noen farge til vevet. (34).
Som positiv kontroll ble det brukt en probe for «U6», en gruppe snRNA (small nuclear RNA) som befinner seg i cellekjernen. snRNA er regulatorisk RNA som spiller en viktig rolle under transkripsjon. I en aktiv celle finnes det mye U6, og derfor har denne proben mange målseksvenser og den vil normalt alltid gi sterk farge til deler av vevet (35). TMA (tissue

microarray) er en systematisk samling av små vevsprøver fra mange ulike pasienter i én og samme parafinblokk. Snitt fra TMA-blokker ble brukt til positivt kontrollmateriale, noe som sikrer at U6-proben har målsekvenser å feste seg til (36). For hver runde med ISH ble det farget en negativ og en positiv kontroll, for å kontrollere at prosedyren og reagensene var tilfredsstillende.

2.1.3 Kontroll Immunhistokjemi

Til immunhistokjemi ble det brukt en positiv og en negativ kontroll i hver runde med farging. Vevet som ble benyttet til positiv kontroll var ulik for hvert antistoff, grunnet proteinekspresjonen og uttrykk av respektive antigen i hvert enkelt vev. For BTG2 ble det benyttet snitt av cerebellum som positiv kontroll, for PDCD4 snitt av prostata og for PTEN snitt av testikler. De positive kontrollene ble behandlet som en vanlig pasientprøve og ble dermed farget med de respektive antistoffene. Som negativ kontroll ble det brukt prostatavev for alle tre antistoffene. Negative kontroller ble behandlet som en pasientprøve, men ble tilsatt fortynningsbuffer istedenfor primærantistoff.

2.2 In situ hybridisering

2.2.1 Prinsipp

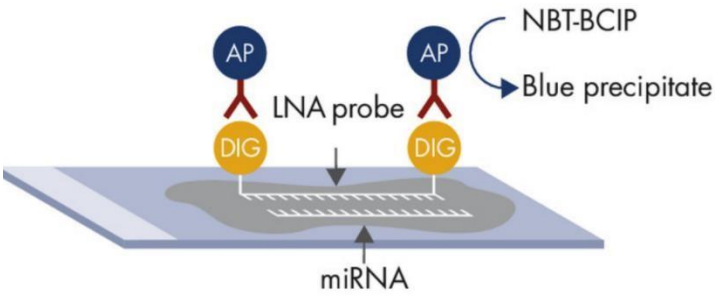
In situ er latin og betyr «på sitt opprinnelige sted», mens begrepet hybridisering innebærer at komplementære basesekvenser pares mot hverandre og fører til at det disse basene er festet til, vil bindes sammen. ISH er en metode som benyttes for å detektere og visualisere spesifikke basesekvenser direkte i celler og vevssnitt. Metoden kan detektere både DNA- og RNAsekvenser (37). Den spesifikke sekvensen man er på utkikk etter, blir detektert ved hjelp av en tråd med baser som er komplementær med den spesifikke basesekvensen man vil identifisere, en probe (38). I prosjektet ble kitet «miRCURY LNA microRNA ISH» benyttet. Dette kitet inneholder tre ulike prober: Digoxigenin (DIG)-merket probe rettet mot miR-21 i prostatavev, DIG-merket Scrambled-microRNA-probe og en 5'-DIG-merket probe rettet mot U6 snRNA (39).

Prober er ofte merket med et signalmolekyl som i reaksjon med et passende substrat gir en farget utfelling som viser hvor i vevet proben har festet seg. Signalmolekylet kan enkelte ganger være antigener, mens andre ganger radioaktive- eller fluorescerende stoffer (40). I dette tilfellet var probene merket med antigen kalt digoxigenin. Alle tre probene er modifisert og endret med LNA. LNA står for "locked nucleic acids" og sørger for høyere affinitet og dermed sterkere binding mellom probe og komplementær DNA- eller RNA-sekvens i vevet, sammenliknet med bruk av tradisjonelle DNA- eller RNA-prober som ikke er modifisert på denne måten (41).

Metoden inneholder flere trinn og kitet ulike reagenser som er viktige for fargeresultatet. RNA i formalinfiksert, parafininnstøpt materiale kan være vanskelig å få bundet fordi det er maskert, og må derfor avmaskeres. Proteinase-K er en løsning som benyttes til avmaskering av miRNA-sekvenser i prostatavevet, slik at probene kan hybridiseres til disse sekvensene. Probe blir pipettert på snittene og hybridiseres til komplementære baser i vevet. Anti-DIG-antistoff som er konjugert sammen med alkalisk fosfatase (AP) gjenkjenner digoxigenin på proben og fester seg til denne. Alkalisk fosfatase på anti-DIG-antistoffet vil omdanne de løselige substratene «5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride» (NBT/BCIP) i NBT/BCIP-tablett om til et uløselig presipitat, en utfelling. Utfellingen får en mørkeblå farge, som vises i vevet ved mikroskopering (39). Se figur 2.1 for illustrasjon.

Temperatur er en viktig faktor for binding mellom probe og komplementær sekvens. Dersom temperaturen på vannbad og hybridisering er for høy, vil ikke proben feste seg like godt til vevet, da høy temperatur gjør at bindingene mellom nitrogenbasene brytes opp. For høy

temperatur kan derfor føre til svak eller ingen farging, og gir et falskt negativt resultat. Ved lavere temperaturer vil proben feste seg lettere, men dersom temperaturen er for lav, vil proben feste seg uspesifikt og kan vise falskt positive resultater. Grunnen til at det er slik er at en probe kan være komplementær med flere RNA-sekvenser i vevet, ved å senke temperaturen vil probene også kobles til RNA som er mindre komplementær med proben enn miR-21. Falskt negative resultater kan også oppstå dersom prøvematerialet kontamineres av RNase, som kutter RNA-trådene og gjør dem ugjenkjennelige for proben (42).



Figur 2.1: Skjematisk illustrasjon over hvordan miRNA-21 detekteres i prostatavev ved hjelp av "miRCURY LNA microRNA ISH-kit". (39)

2.2.2 Reagenser

Se vedlegg 2 side 3-4, 6-9 for liste over reagenser og hvordan de lages.

2.2.3 Utstyr

Se vedlegg 2 side 3 og 9.

2.2.4 Fremgangsmåte

Protokoll som medfulgte dokumentet «miRNA ISH protokoll, miRCURY LNA» (vedlegg 2) ble brukt til utførelsen av farging med ISH. Før start ble det gjort endringer på protokollen:

- Temperatur på vannbad og på hybridiseringsmaskin ble satt til 55°C.
- Dehydreringstrinnet i punkt 5 ble strøket

- Denaturering av probene i punkt 6 ble gjort på forhånd. Da ble større mengder av de tre probene «Mir-21», «Scramble-miR» og «U6» fortynnet, alikvotert i mindre mengder, fryst ned og tint rett før bruk.
- Kjernefarging i punkt 15 ble begrenset til ett minutt.

ISH ble utført på RNasefri lab, med hansker på til enhver tid, for å unngå kontaminering med RNase.

- To runder med farging ble utført som beskrevet. Mikroskopering av snittene viste at fargingen var for svak og protokollen ble endret flere ganger, med en ny utførelse etter hver endring.
- Dehydrering, punkt 5, ble innført for å gjøre pipettering av probe og pålegging av dekkglass enklere, og for å unngå at proben ble fortynnet med væsken som lå på vevet før pipettering.
- Nye prober ble fortynnet da de som ble brukt var gamle.
- Flere eksperimentelle utprøvinger ble gjort:
  - Et snitt ble tilsatt probe med miR-145 fordi denne proben har gitt farge ved tidligere farginger med ISH
  - U6 ble tilsatt et prøvesnitt og ikke TMA-snitt, for å se om vevet var optimalt
  - Et snitt ble tilsatt miR21-probe med dobbel konsentrasjon, 100 nM, for å finne ut om den konsentrasjonen som var brukt tidligere var for lav
  - Et snitt ble tilsatt dobbel mengde miR21-probe, 120µL, for å finne ut om mengden var for liten.
  - Et TMA-snitt ble tilsatt miR21-probe, for å se om proben var optimal, og prøvematerialet ikke.
- Det ble utført tre runder med farging hvor temperatur på vannbad og hybridiseringen ble endret. Den første runden ble utført med temperaturer på 53°C, den andre på 51°C og den tredje på 49°C.

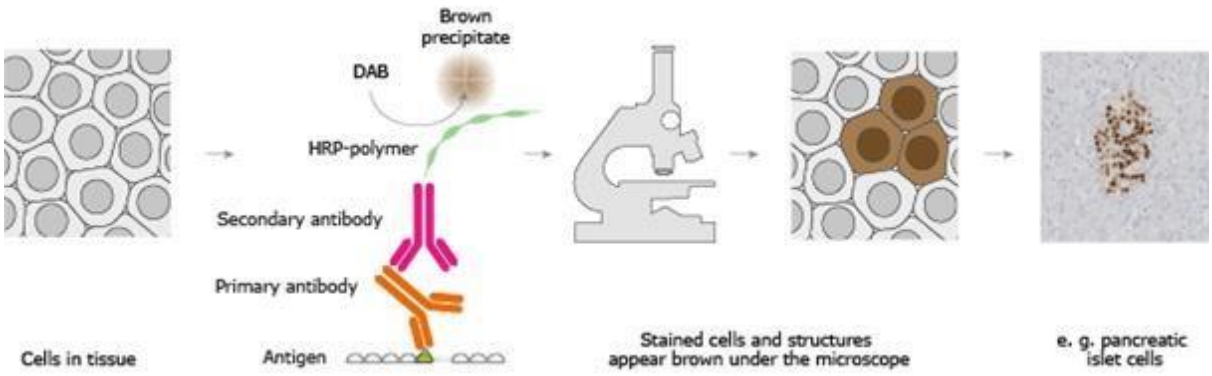
Det ble bestemt at dehydrering skulle gjeninnføres, de nye probene skulle brukes, og hybridiseringtemperatur og vannbad skulle være 51°C.

De 40 snittene som skulle vise tilstedeværelsen av miR-21, ble farget og mikroskopert.

2.3 Immunhistokjemi

2.3.1 Prinsipp

Immunhistokjemi er en immunologisk metode som innebærer bruk av antistoffer for å detektere antigene strukturer i vev (43). Antigene strukturer, også kalt epitoper, kan være proteiner, karbohydrater, nukleinsyrer og lipider (44). Det brukes som oftest to antistoffer- et primærantistoff og et sekundærantistoff. Primærantistoffet, som kan være monoklonalt eller polyklonalt, binder seg til epitoper i vevet. Deretter inkuberes snittene med et sekundærantistoff som binder seg til primærantistoffet. Sekundærantistoffet er konjugert med et signalmolekyl som utvikler en fargeendring i vevet i kontakt med passende substrat. Fargen kan ses i mikroskopet og viser derved hvor i vevet antistoffene har festet seg. For at sekundærantistoffet skal kunne binde seg til primærantistoffet, må det stamme fra et annet dyr enn det dyret primærantistoffet kommer fra. Dersom primærantistoffet stammer fra kanin, kan sekundærantistoffet stamme fra eksempelvis mus. Signalmolekyler som er festet til sekundærantistoff er ofte fluorescerende forbindelser eller enzymer. Et enzym som ofte benyttes som signalmolekyl til sekundærantistoffet, er horseraddish peroxidase (HRP). HRP omdanner substratet 3,3' Diaminobenzidine (DAB) til en brun utfelling som ved mikroskopering vil vise hvor primærantistoffet har bundet seg (45). Prinsipp er vist i figur 2.2.



Figur 2.2: Prinsipp for immunhistokjemi med primær- og sekundærantistoff, ved bruk av HRP som signalmolekyl og DAB som substrat. (45)

Ved bruk av formalinfiksert, parafininnstøpt vevsmateriale kan antigene epitoper bli farget svakt eller ikke i det hele tatt, som følge av at fiksering med formalin kan maskere epitopene.

Når epitopene er maskerte, er de utilgjengelige for primærantistoff, som ikke binder seg (45). For å demaskere epitopene, blir snittene behandlet med varme. Varmebehandlingen baseres på bruk av kokemedie (bufferløsning) og høy temperatur. Varmekilder kan være mikrobølgeovn, trykkoker eller vannbad. I prosjektet ble vannbad benyttet som varmekilde. Kokemediets pH er en viktig faktor for optimal demaskering og gjenvinning av epitoper, og derfor ble det gjort forsøk med to ulike bufferløsninger, med henholdsvis pH 6 og pH 9. For enkelte antistoffer har ikke pH så stor betydning for resultatet, mens for andre antistoffer kan pH ha stor innvirkning. Bufferløsninger som inneholder EDTA og som har en pH i området mellom 8 og 10 gir oftest mer effektiv demaskering enn citrat-buffer med pH rundt 6. Ulempen med EDTA og høy pH er at snittene kan falle av objektglassene eller få endret morfologi, og bør brukes der epitopene ikke blir godt nok demaskert ved bruk av citrat og pH 6 (46).

2.3.2 Reagenser

Tabell 2.1: Oversikt over reagenser med tilhørende leverandør som ble benyttet til immunhistokjemi.

Reagens	**Leverandør**
Tissue Clear	Sakura
Absolutt etanol	VWR
96% etanol	VWR
80% etanol	
Target Retrieval Solution (TRS), pH 9	DAKO
Target Retrieval Solution (TRS), pH 6	DAKO
EnViosion^{TM} FlexWash Buffer (20X)	DAKO
Dako Pen	DAKO
Peroxidase Blocking Solution	DAKO
HRP-labelled polymer mouse anti-rabbit	DAKO
DAB-chromogen	DAKO
DAB- substratebuffer	DAKO
Hematoxylin Dako Real Antibody Diluent	DAKO
Hematoxylin	

2.3.3 Utstyr

- PT-link
- Tissuemount monteringsmedie
- Fuktekammer
- Super Frost objektglass

2.3.4 Fremgangsmåte

Det ble tatt utgangspunkt i utlevert protokoll (vedlegg 3), men den ble endret for å passe antistoffene som skulle brukes til prosjektet, endelig protokoll vises i vedlegg 4.
Før farging ble vaskebufferen (2000mL) fortynnet. Det ble målt opp EnVision Wash Buffer (100mL) og destillert vann (1900mL) som ble blandet i et begerglass. For å justere pH til 7,6 ble konsentrert HCl tilsatt dråpevis under kontinuerlig kontroll ved hjelp av pH-meter. Vaskebuffer ble overført til plastflasker for oppbevaring. Før bruk ble vaskebufferen helt over i sprutflasker.

Det ble først gjort utprøvingsrunder med de tre ulike antistoffene for å finne ut hvilken fortynning på antistoffet og hvilken pH på forbehandlingen som skulle brukes. Som utgangspunkt ble det brukt pakningsvedlegg og publiserte artikler for å se hva som var anbefalt for hvert enkelt antistoff.
Snittene som ble farget under utprøving ble mikroskopert og dette ble bestemt:

- PDCD4 fortynnes 1:250 og forbehandles i pH 6
- PTEN fortynnes 1:50 og forbehandles i pH 9
- BTG2 fortynnes 1:25 og forbehandles i pH 9.

Ti snitt ble farget med hvert antistoff. Farging ble utført i tre separate omganger.

3 Resultater

3.1 Resultater, ISH

3.1.1 Hva farges med hvilken farge

Snitt som farges med miR-21-ISH skal vise i hvilke celler miR-21 uttrykkes, ved at vev som uttrykker miR-21 farges kraftig blått og all vevstruktur farges rosa (tabell 3.1 og figur 3.1). Siden all vevstruktur farges rosa, også der det uttrykkes miR-21, vil cellene som uttrykker miR-21 i noen tilfeller se lilla ut.

Tabell 3.1: Viser hva som farges og med hvilke farger, i snitt farget med miR-21-ISH.

Hva farges:	**Farge:**
Vevstruktur	Rosa
Vev hvor miR-21 uttrykkes	Kraftig blå/lilla

3.1.2 Utprøvinger

For å få optimale resultater ved bruk av fargemetoden miR-21-ISH ble det gjort utprøvinger av ulike temperaturer (tabell 3.2). Snitt farget ved høy temperatur (55°C og 53°C) ble ikke tilstrekkelig farget. Snitt farget ved 51°C ble vurdert til å være godt nok, mens snitt farget ved 49°C viste tendenser til uspesifikk farging.

Tabell 3.2: Viser fargeresultat ved utprøvinger av temperatur.

Temperatur	**Fargeresultat**
55°C	Snittene farges rosa, ingen blåfarge.
53°C	Snittene farges rosa, antydninger til svak blåfarge.
51°C	Snittene farges både rosa og blå
49°C	Snittene farges både rosa og blå, men kraftigere og hyppigere blå enn ved 51°C.

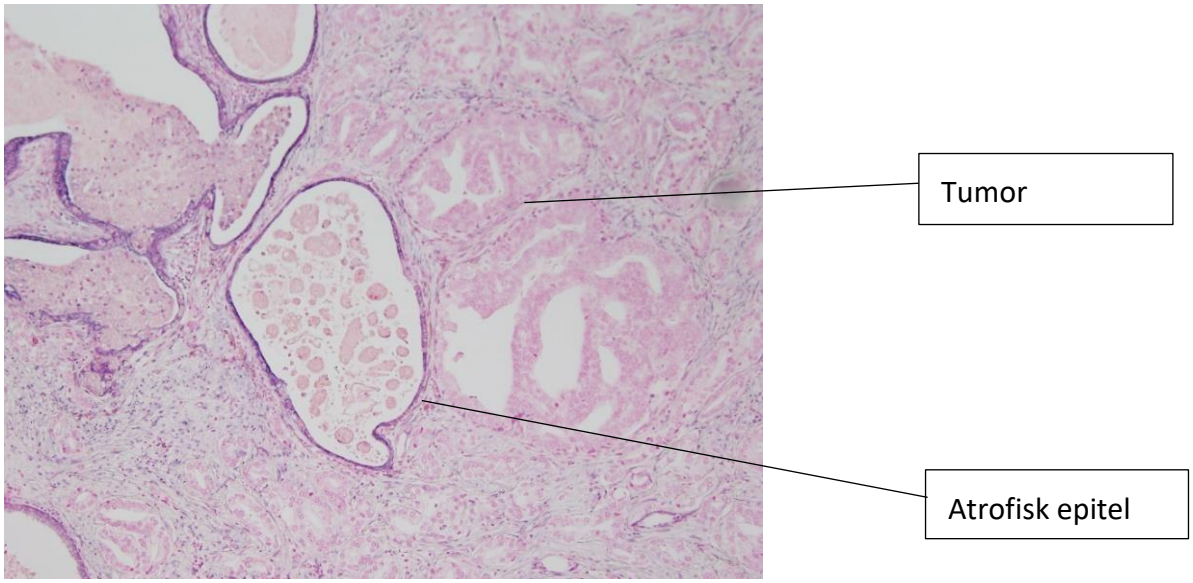
3.1.3 Fargeresultater

Mikroskopering av snittene etter farging viser tendenser av hvilke typer vev som uttrykker miR-21(tabell 3.3). Atrofisk epitel i dilaterte kjertler farges ofte (figur 3.1). Også kjertler med fortykket epitel farges ved en del tilfeller. Normale kjertler (figur 3.1) og tumorvev (figur 3.2a /3.2b) farges ikke. Kjertler i betente områder med lymfocytter rundt blir farget, uavhengig av hvilken type kjertel (figur 3.3).

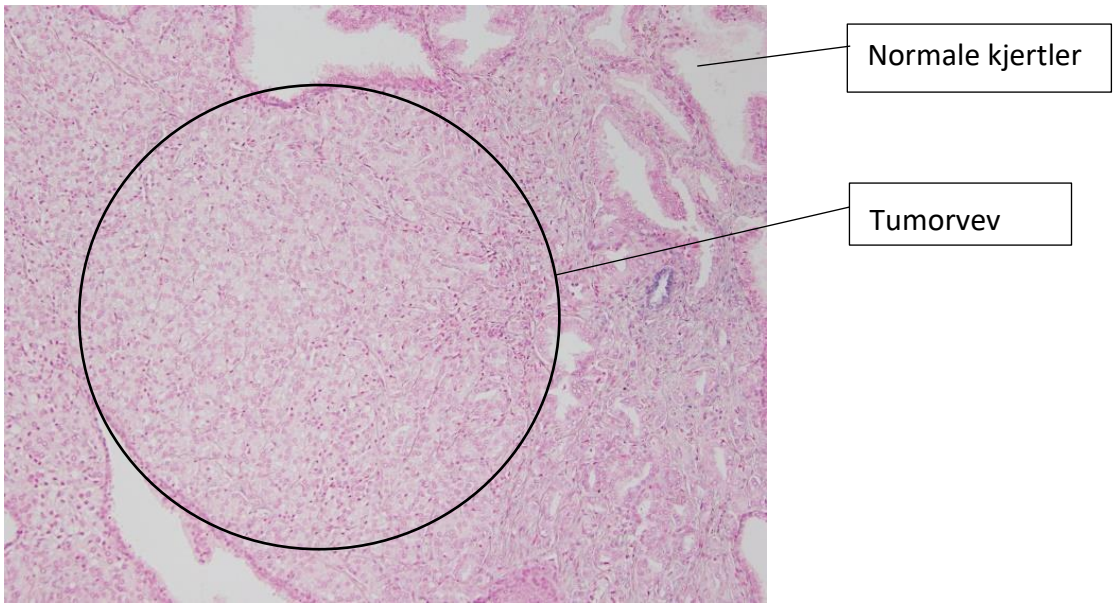
Tabell 3.3: Oversikt over hvilke vevstyper som farges blå og uttrykker miR-21 i snitt farget med miR-21-ISH.

Type vev:	**Fargeresultat*:**
Normale kjertler	Farges ikke blå
Atrofisk epitel i dilaterte kjertler	Farges blå
Kjertler med fortykket epitellag	Farges blå/ikke blå
Tumorvev	Farges ikke blå
Kjertler i betente områder	Farges blå

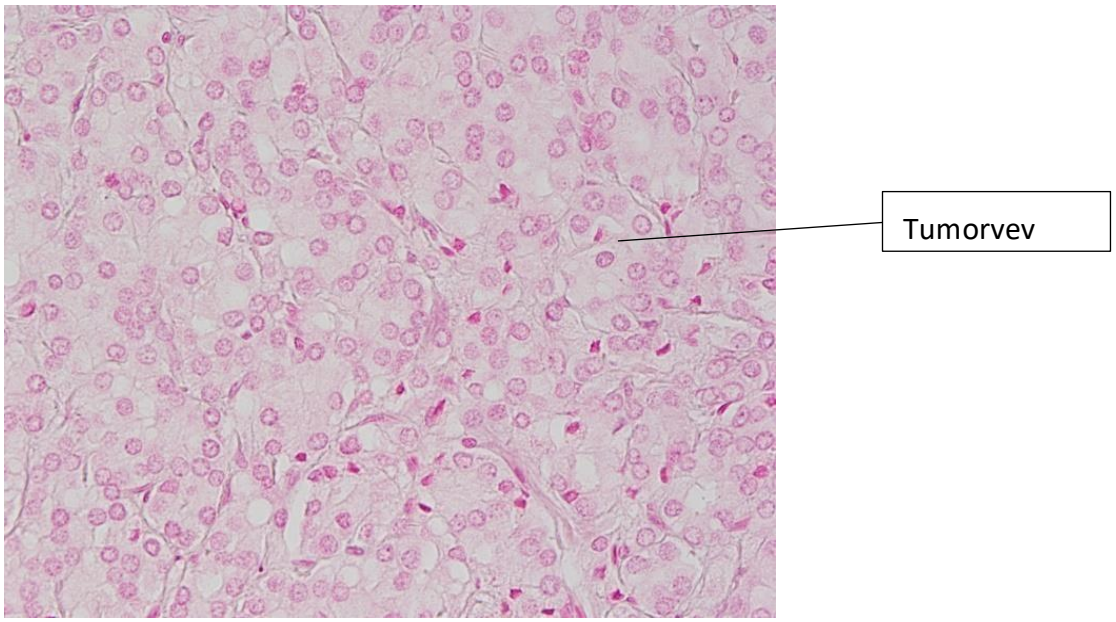
(*=Legg merke til at fargeresultatet ikke er slik på alle tilfeller av aktuell vevstype, men er basert på tendenser.)



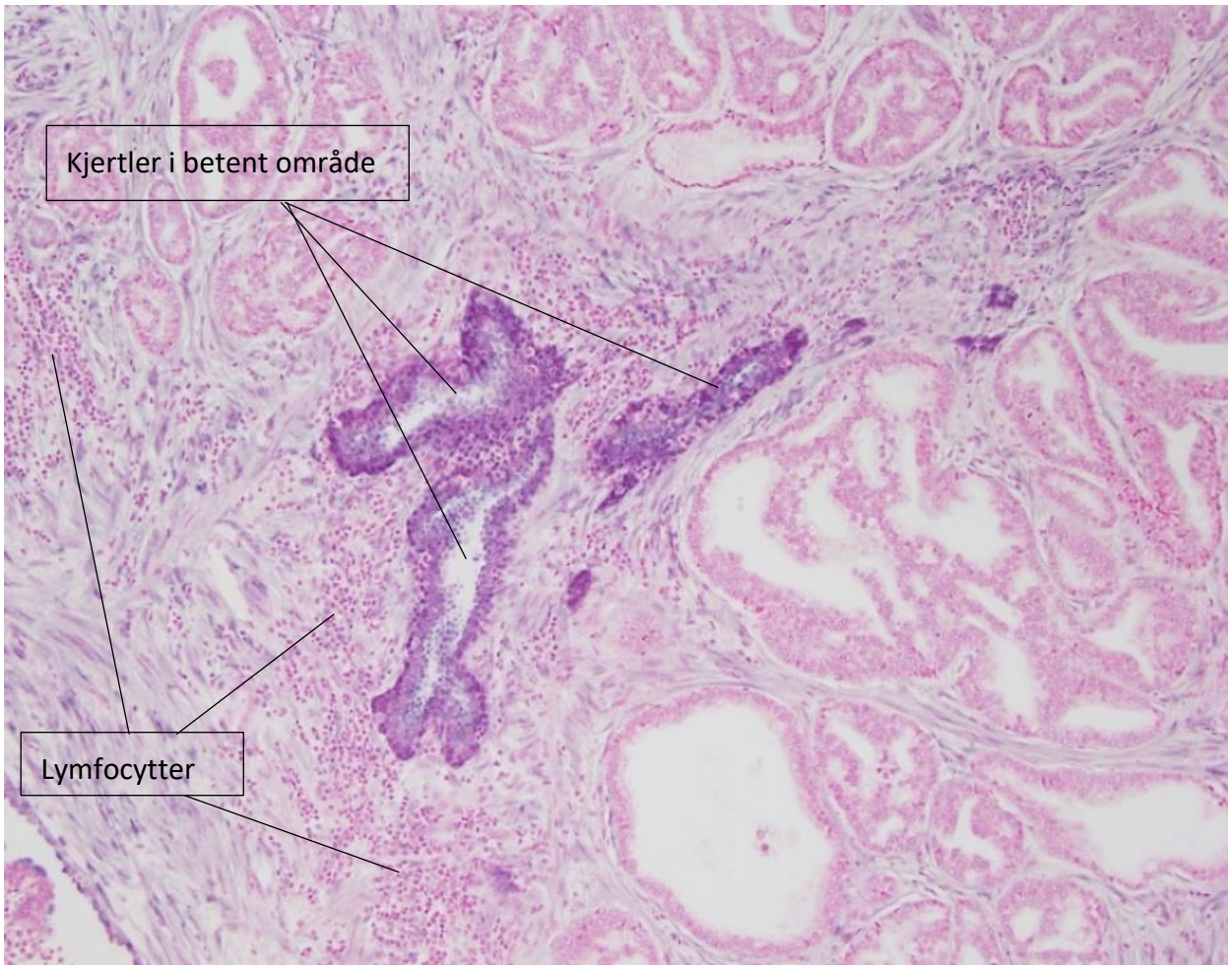
Figur 3.1 Prostata farget med miR-21-ISH som viser positiv reaksjon i det atrofiske epitelet i dilaterte kjertler. Andre områder, med tumor, er negative. 100x forstørrelse.



Figur 3.2 a: Prostata farget med miR-21-ISH som viser tumorvev og normale kjertler med negativ reaksjon, 100x forstørrelse.



Figur 3.2 b: Prostata farget med miR-21-ISH som viser tumorvev med negativ reaksjon, 400x forstørrelse.



Figur 3.3: Prostata farget med miR-21-ISH som viser positiv reaksjon i epitel i reaktivt pregede kjertler, omringet av lymfocytter, 100x forstørrelse.

3.2 Resultater, IHC

3.2.1 Hva farges med hvilken farge

Snitt som farges med IHC skal vise i hvilke celler de ulike tumorsuppressorene uttrykkes, ved at vev som uttrykker den aktuelle tumorsuppressor farges brunt, mens vevstruktur farges svakt blå (tabell 3.4) (figur 3.4).

Tabell 3.4: Viser hva som farges og med hvilke farger, i snitt farget med IHC.

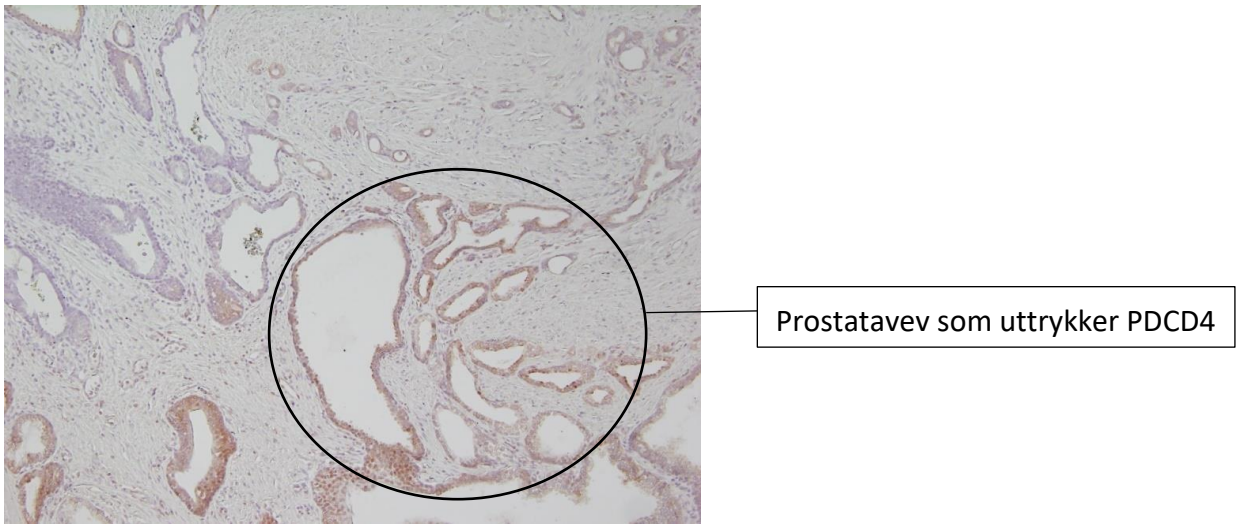
Hva farges:	**Farge:**
Vevstruktur	Svak blå
Vev hvor den aktuelle tumorsuppressor uttrykkes	Brunt

3.2.2 Fargeresultater

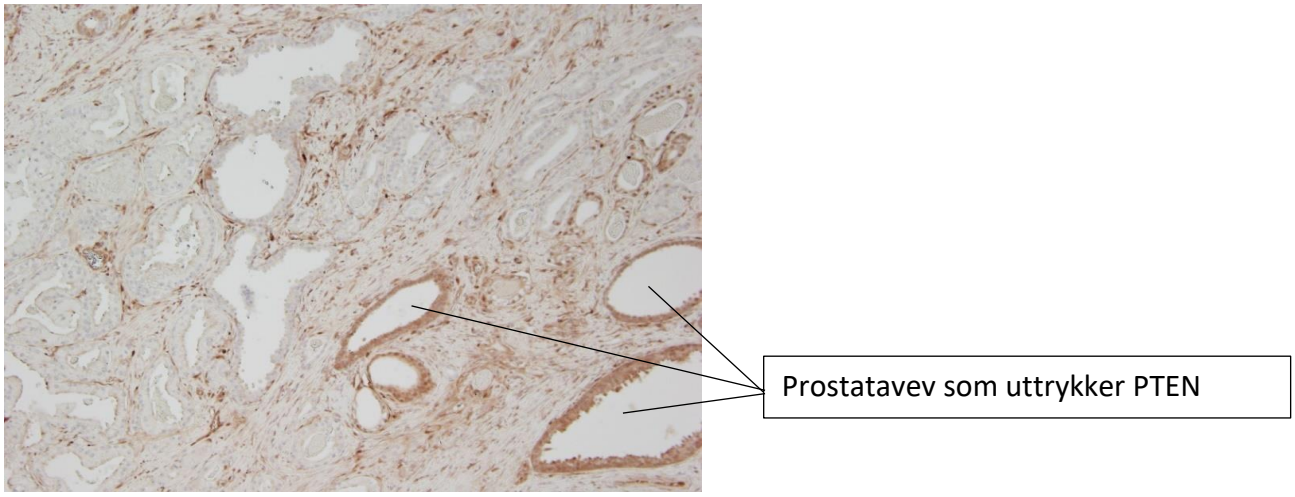
I snitt farget med IHC med finnes det både vev som har blitt farget og ikke farget, blant alle de tre ulike tumorsuppressorene. Det sees ingen tendenser av fargingen som viser i hvilke typer kjertler de ulike tumorsuppressorene uttrykkes eller ikke uttrykkes. De eneste tendensene som er å se i disse snittene er at sekret i lumen av kjertlene i snitt farget med BTG2 er farget. Se figur 3.6.

Tabell 3.5: Oversikt over hvilke tendenser som finnes i snitt farget med IHC.

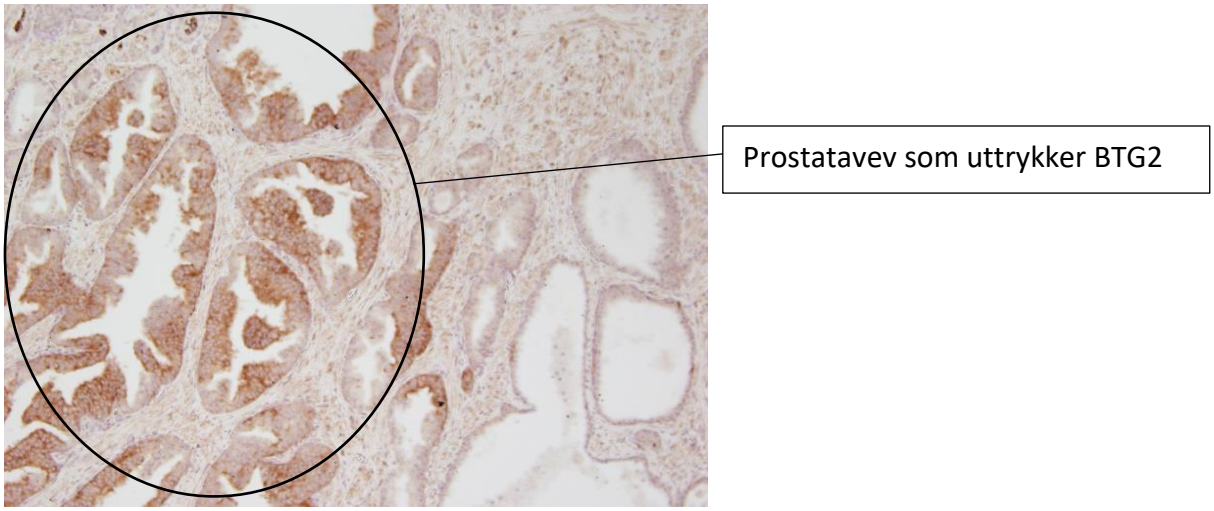
Tumorsuppressor som uttrykkes	**Tendenser som sees**
PDCD4	Ingen tendenser
PTEN	Ingen tendenser
BTG2	Ingen tendenser blant kjertler
BTG2	Sekret i lumen farges



Figur 3.4: Prostata farget med IHC, PDCD4, 100x forstørrelse.



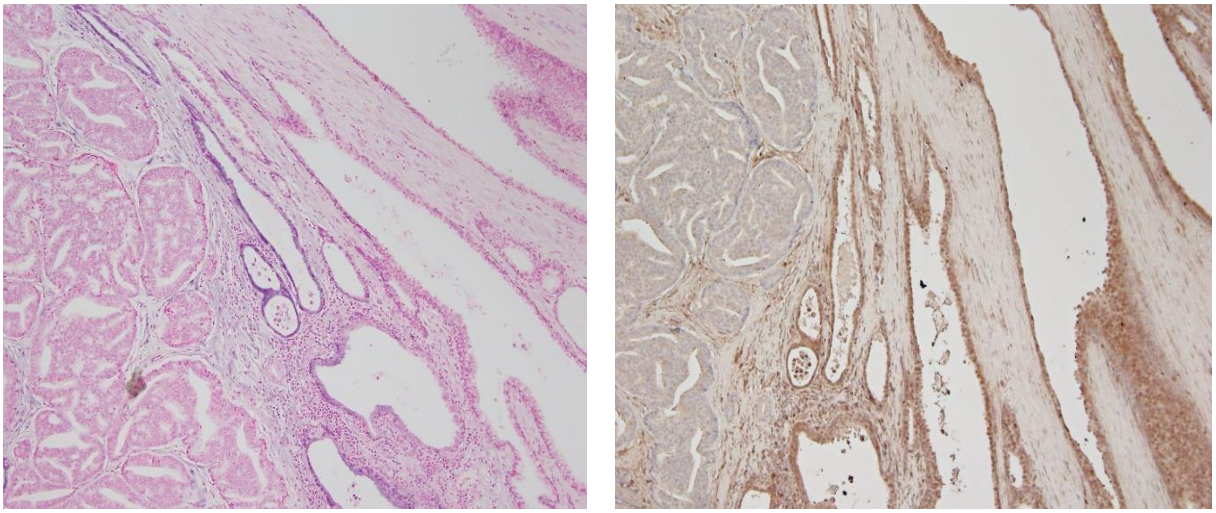
Figur 3.5: Prostata farget med IHC, PTEN, 100x forstørrelse.



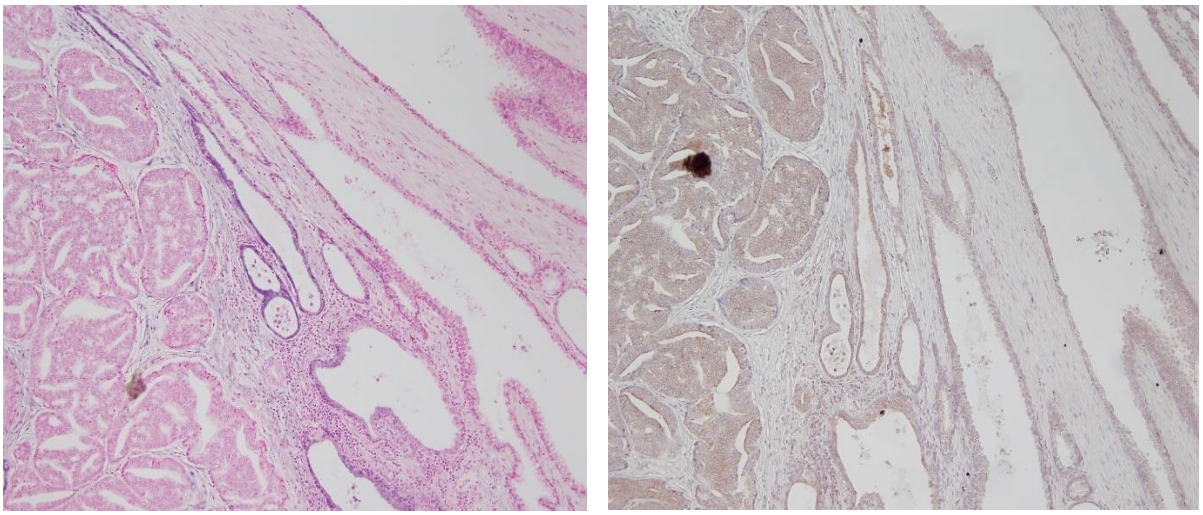
Figur 3.6: Prostata farget med IHC, BTG2, 100x forstørrelse.

3.3 Sammenligning av snitt farget med ISH og IHC

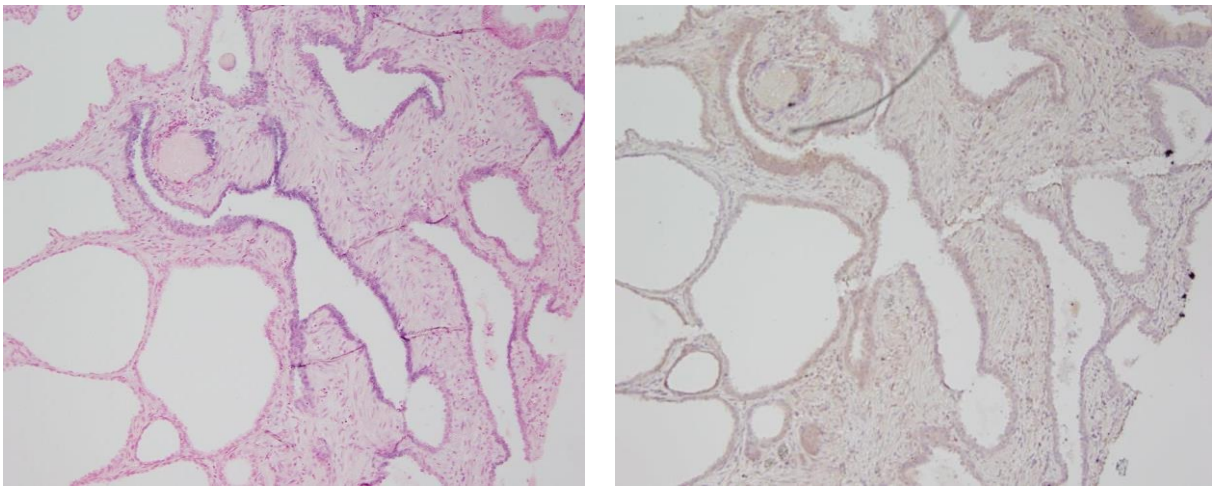
Ved å finne det samme området av prostata på snitt farget med IHC som i snitt farget med ISH vil man kunne se om de ulike tumorsuppressorene uttrykkes eller ikke uttrykkes i det vevet hvor miR-21 uttrykkes. Det sees ingen tydelig sammenheng mellom hvor miR-21 og tumorsuppressorene uttrykkes eller ikke.



Figur 3.7: Prostata farget med miR-21-ISH, 100x forstørrelse (t.v.). Samme område i prostata farget med IHC med antistoff mot PTEN, 100x forstørrelse (t.h.).



Figur 3.8: Prostata farget med miR-21-ISH, 100x forstørrelse (t.v.), samme område i prostata farget med IHC med antistoff mot PDCD4, 100x forstørrelse (t.h.).



Figur 3.9: Prostata farget med miR-21-ISH, 100x forstørrelse (t.v.), Samme område av prostata farget med IHC med antistoff mot BTG2, 100x forstørrelse (t.h.).

4. Diskusjon

4.1 Generelt

Kontroller ble farget korrekt, noe som gir grunn til å tro at fargeprosedyrene ble riktig utført og at fargeresultatene er troverdige. Noen av de fargede snittene har varierende kvalitet, som svak farging i kantene, riper i vevet, luftbobler i monteringsmiddel og monteringsmiddel rundt dekkglasset, men dette er ikke ødeleggende for mikroskoperingen og resultatet. Noe av dette kan komme av at begge prosedyrene inneholder flere punkter som er kritiske med tanke på uttørking da tørket vev ikke tar til seg farge. Riper i vev, luftbobler og søl skyldes at metoden ikke var godt nok øvet inn enda, men disse feilene ble bedret underveis i prosjektet.

4.2 ISH og miR-21

Under ISH spiller temperatur en viktig rolle. Under utprøvingen fant vi at svak farging av positiv kontroll og prøver kom av for høy temperatur under hybridisering. Jo lengre sekvens av proben som er komplementær til miR-21 i snittet, desto sterkere er bindingen, og høyere temperatur trengs for å løsne proben fra RNA-molekylet. Ved ISH vil man ikke at proben skal løsne fra basesekvensen den er tiltenkt, da det er proben som fargekomplekset kobles til senere. Temperaturen ble senket med 2 grader for hver testrunde, da det skal svært liten forskjell på temperatur til for at proben ikke løsner også der det fins sekvenser den er mindre komplementær med. Om dette skjer vil det føre til uspesifikk farging, da andre sekvenser enn miR-21 også farges. Utfordringer med temperaturen kan komme av at hybridiseringsmaskinen viser en temperatur på skjermen, men er oppvarmet til en høyere temperatur enn det den ble stilt inn på.

Under mikroskopering ble det sett etter spesifikke mønster over hvilke typer kjertler i prostatavevet som viste positiv reaksjon ved miRNA-21-ISH. Det som først slo oss var at atrofiske kjertler og kjertler med uregelmessig fortykket epitel, som tidligere er vist kan ha en sammenheng med forstadier til kreft var de som viste uttrykk av miR-21 oftest (47). Dette var allikevel ikke en absolutt regel, da enkelte normale kjertler også ble positive. Enkelte ganger ble deler av en kjertel farget, noe som tyder på at det finnes variasjoner også innad i en kjertel. I tillegg ble ikke alle atrofiske kjertler farget, dette gjør at man lurer på om miR-21 har den sammenhengen med forstadier til kreft som man i starten trodde.
En tendens som viste seg å være ganske pålitelig var at tumorceller ikke ble farget, altså uttrykker ikke tumorceller miR-21. Våre observasjoner antyder altså at miR-21 uttrykkes i

forstadier til kreft, men ikke i kreftceller. Dette er absolutt verd å ta med seg videre i forskningen på miR-21 og dets opptreden i ulikt vev.

4.3 miR-21 og betennelse

Mange av kjertlene som uttrykte miR-21 lå omringet av lymfocytter, noe som tyder på betennelse. At miR-21 har en sammenheng med betennelse er vist i tidligere forskning, men hvorfor det er en sammenheng er ikke kjent (48). Det er funnet at uttrykket av miR-21 øker kraftig når det sendes ut pre-inflammatoriske signaler i cellen. Disse signalene kommer av infeksjon i cellen, som stimulerer cellene til å starte en betennelsesreaksjon. Dette kan tyde på at mengden miR-21 i cellene øker for å være med på å reparere celleskade grunnet infeksjon. (48).

Det er slik at betennelse i vev setter i gang reparasjonsprosesser som øker celleproliferasjon i det betente området. Tidligere forskning viser at celler ved forstadier til prostatakreft i mange tilfeller er hyperproliferative, befinner seg i betente områder og har atrofisk utseende (6). Dette tyder på at både betennelse og kjertler med atrofisk epitel kan ha en sammenheng med forstadier til prostatakreft. Det er kjent fra andre organer at langvarig kronisk betennelse har en sammenheng med forstadier til kreft, og det kan tenkes at det også er slik i prostata. Vi fant at miR-21 uttrykkes oftest i atrofisk epitel i betente områder, noe som passer med tidligere rapporter om en mulig rolle for miR-21 ved utviklingen av forstadier til kreft i prostata.

4.4 Sammenhengen mellom miR-21 og tumorsuppressorer

miRNA er små ikke-kodene RNA som er vist kan ha betydning for utvikling av kreft, ved å påvirke uttrykket av flere proteiner, deriblant tumorsuppressorer. Flere studier har vist at nivået av miR-21 er oppregulert i flere tilfeller prostatakreftvev i forhold til prostatavev uten kreft (49, 50).

Noen atrofiske kjertler uttrykker både miR-21 og PTEN, mens andre kjertler uttrykker PTEN, men ikke miR-21, mens enkelte kjertler ble funnet å uttrykke verken miR-21 eller PTEN. Det synes altså ikke å foreligge noen enkel sammenheng, noe som vil si at miR-21 ikke uten videre hindrer all produksjon av PTEN. Da flere studier har kommet frem til at PTEN inhiberes av miR-21, ble det forventet at dette prosjektet skulle komme frem til samme resultat, noe det faktisk ikke gjorde (51).

Studier har vist at miR-21 kan regulere uttrykket av PDCD4 ved å binde seg til og inhibere mRNA som koder for PDCD4 (31). PDCD4 viser samme tendens som ved PTEN, at samme kjertel som sterkt uttrykker miR-21 samtidig uttrykker PDCD4, mens noen kjertler uttrykker enten bare miR-21 eller bare PDCD4, mens andre kjertler uttrykker bare PDCD4. En studie viser at PDCD4 er mindre uttrykt ved nedsatt differensiering av prostatavev. Ved dette funnet er det foreslått at alvorlighetsgrad på prostatakreft er relatert til nivå av PDCD4 (33).

Det er vist at høyt uttrykk av miR-21 kan undertrykke nivå av BTG2 (52). Undersøkelse av sammenheng mellom kjertler som uttrykker miR-21 og BTG2, viser samme resultat som de to øvrige tumorsuppressorene. Det er ingen klar tendens til at kjertler som uttrykker miR-21, ikke uttrykker BTG2. Noen kjertler uttrykker både miR-21 og BTG2, noen kjertler bare en av dem og andre kjertler ingen.

Dersom hypotesen om at miRNA-21 degraderer mRNA som koder for de utvalgte tumorsuppressorene og dermed kan være en pådriver til prostatakreft stemmer, burde man forvente at kjertler som uttrykker miR-21 viser redusert uttrykk av respektive tumorsuppressorer. Ut ifra vårt prosjekt er det ikke mulig å konkludere med noen enkel sammenheng mellom mengden miR-21 og endret proteinuttrykk av de PTEN, PDCD4 og BTG2.

Det viser seg å ikke være noen enkel sammenheng mellom nivået av miR-21 og mengden av de tre tumorsuppressorene. Noen proteiner og tumorsuppressorer har lang levetid i en celle, mens andre igjen har kort. Dersom proteinet har lang levetid og produseres i lav konsentrasjon, kan cellen uttrykke proteinet selv om miRNA hindrer dannelsen av nye proteiner i cellen. Det henger sammen med at proteinene som ble dannet før miRNA ble uttrykt i cellen fortsatt vil være der etter at miRNAet uttrykkes. Enkelte miRNA vil ha større innflytelse på regulereringen av mRNA enn andre.
Det kan være at ideen om at økt mengde av et bestemt miRNA fører til lavt uttrykk av de proteinene denne miRNA inhiberer, er for enkel og sammenhengen i virkeligheten er mer kompleks. Kanskje kan transkripsjon av proteinkodede gener være koplet til produksjon av miRNA som kan hemme translasjon av samme mRNA, som et ledd i en mer komplisert reguleringsprosess for å finjustere uttrykket av de relevante proteinene, med større presisjon enn det som de pretranskripsjonelle mekanismene tillater alene. Dette er en hypotese som kan være en mulighet å undersøke nærmere i fremtidige prosjekter.

4.5 Begrensninger

Det er flere begrensninger i dette prosjektet, noe som kan medføre at resultatene potensielt er usikre. Den største begrensningen er at det er få pasienter med i prosjektet. For å verifisere og kontrollere at resultatene er til å stole på burde studien inkludert flere pasienter. Det er naturlig biologisk variasjon mellom pasientene og deres kreftforløp. Enkelte pasienter er rammet av mer aggressivt forløpende prostatakreft enn andre, noe som gjenspeiles i forskjeller i prostatavevet. I alminneligheten er det slik at jo større variasjon det er mellom pasientene, desto større må undersøkelsen være for å ha rimelig sjanse til å komme frem til robuste resultater. Behandling av vevsblokker før snitting, altså fiksering med formalin, innstøping i parafin og farging av snitt, er ikke godt standardisert, noe som fører til at det oppstår forskjeller mellom de ulike snitteblokkene. Også slik teknisk variasjon kan gi misvisende resultater dersom undersøkelsen er liten.

5. Konklusjon

Vår undersøkelse har ikke påvist noen klar sammenheng mellom uttrykk av miR-21 og PTEN, BTG2 og PDCD4 i vev fra totale prostataektomier. Det kan skyldes at sammenhengen mellom mRNA og miRNA er mer komplisert enn en enkel suppresjon. Vårt prosjekt var en liten studie og en større studie, med flere pasienter, kunne vist sammenhenger som vi ikke finner. Til tross for dette ble det gjort interessante funn. Det kan være en mulig sammenheng mellom områder med vevsskade, inflammasjon og regenerasjon og tumorutvikling, da miR-21 oftere ble uttrykt i inflammatoriske områder enn i områder uten. Selv om vi i dette prosjektet ikke fant en tydelig sammenheng, vil videre forskning på miR-21 i prostata være av interesse, spesielt sammenhengen mellom miR-21 og betennelse.

6. Referanser

1. Martinsen L. DNA Store Norske Leksikon [Internett].Oslo: Universitetet i Oslo; 2018 [Hentet 10.07.18] Available from: https://snl.no/DNA. .
2. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. DNA and Chromosomes In: Morales M, editor. Essential Cell Biology 4. New York og Oxford Garland Science 2013. p. 180-1.
3. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. From DNA to Protein: How Cells Read the Genome In: Morales M, editor. Essential Cell Biology 4. New York og Oxford Garland Science 2013. p. 224-5.
4. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Cell Communities: Tissues, Stem Cells, and Cancer. In: Morales M, editor. Essential Cell Biology 4. New York og Oxford Garland Science 2013. p. 714-5.
5. Angelsen A. Overforbruk av PSA-test hos friske menn. Tidsskr Nor Legeforen. 2013 2018.04.01]; 16(133):[1678 p.].
6. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate : Implications for Prostatic Carcinogenesis. The American Journal of Pathology. 1999;155(6):1985-92.
7. Weiss CN, Ito K. Chapter Three - A Macro View of MicroRNAs: The Discovery of MicroRNAs and Their Role in Hematopoiesis and Hematologic Disease. In: Galluzzi L, Vitale I, editors. International Review of Cell and Molecular Biology. 334: Academic Press; 2017. p. 99-175.
8. MacFarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Current Genomics. 2010;11(7):537-61.
9. Bartel DP. MicroRNAs. Cell. 2004;116(2):281-97.
10. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. Nucleic acids research. 2004;32(Database issue):D109-11.
11. Ribas J, Lupold SE. The role of miR-21, an androgen-regulated MicroRNA, in prostate cancer. In Androgen-Responsive Genes in Prostate Cancer: Regulation, Function and Clinical Applications. Vol. 9781461461821. Springer New York. 2013. p. 285-305. Available from, DOI: 10.1007/978-1-4614-6182-1_18
12. Universitet i Oslo. Cellesyklus [Internett] Oslo: Universitetet i Oslo; 01.02.11 [Oppdatert 12.04.18; hentet 23.07.18] [Available from: https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/c/cellesy.html
13. Khan Academy. Cell cycle regulators [Internett] u. å Hentet 04.07.18 [Available from: https://www.khanacademy.org/science/biology/cellular-molecular-biology/stem-cells-and-cancer/a/cell-cycle-regulators
14. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. The Cell-Division Cycle In: Morales M, editor. Essential Cell Biology 4. New York og Oxford: Garland Science p. 604-8, 11-16.
15. Weizmann Institute of Science. BTG2 Gene Cards [Internett] u.å Hentet 04.07.18 [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BTG2. .
16. National Center for Biotechnology Information (US). Genes and Disease [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 1998-. The p53 tumor suppressor protein.[Hentet 01.07.18] Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22268/

17. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. Molecular Cancer. 2007;6:24-.
18. Cell Signaling Technology. Cell Cycle G1/S Checkpoint Signaling Interactive Pathway [Internett] 2002 [Hentet 18.07.18][Available from: https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-cell-cycle/cell-cycle-g1-s-checkpoint-signaling-interactive-pathway/pathways-cc-g1s
19. Connell-Crowley L, Harper JW, Goodrich DW. Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. Molecular Biology of the Cell. 1997;8(2):287-301.
20. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. Oncogene. 2008;27:5527.
21. Aarnes H. Cellesyklus [Internett]Oslo: Universitetet i Oslo; 2017 [Oppdatert 20.03.17; hentet 29.07.18] [Available from: https://snl.no/cellesyklus.
22. Phin S, Moore MW, Cotter PD. Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer. Frontiers in Oncology. 2013;3:240.
23. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Cell Signaling In: Morales M, editor. Essential Cell Biology 4. New York og Oxford Garland Science 2013. p. 555-6.
24. Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. Oncogene. 2008;27:5443.
25. U.S. Department of Health & Human Services. PTEN Gene [Internett] Hentet 01.08.18 [Available from: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN
26. Jamaspishvili T, Berman DM, Ross AE, Scher HI, De Marzo AM, Squire JA, et al. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. Nature reviews Urology. 2018;15(4):222-34.
27. Wedeken L, Singh P, Klempnauer K-H. Tumor Suppressor Protein Pdcd4 Inhibits Translation of p53 mRNA. The Journal of Biological Chemistry. 2011;286(50):42855-62.
28. Shen Q, Uray IP, Li Y, Krisko TI, Strecker TE, Kim HT, et al. The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. Oncogene. 2007;27:366.
29. Karin M, Liu Z-g, Zandi E. AP-1 function and regulation. Current Opinion in Cell Biology. 1997;9(2):240-6.
30. Yang H-S, Jansen AP, Nair R, Shibahara K, Verma AK, Cmarik JL, et al. A novel transformation suppressor, Pdcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-κB or ODC transactivation. Oncogene. 2001;20:669.
31. Wedeken L, Ohnheiser J, Hirschi B, Wethkamp N, Klempnauer K-H. Association of Tumor Suppressor Protein Pdcd4 With Ribosomes Is Mediated by Protein-Protein and Protein-RNA Interactions. Genes & Cancer. 2010;1(3):293-301.
32. Dong B, Shi Z, Wang J, Wu J, Yang Z, K F. IL-6 Inhibits the Targeted Modulation of PDCD4 by miR-21 in Prostate Cancer. 2015 [Hentet 27.07.18] [Available from: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134366
33. Dong B, Shi Z, Wang J, Wu J, Yang Z, Fang K. IL-6 Inhibits the Targeted Modulation of PDCD4 by miR-21 in Prostate Cancer. PloS one. 2015;10(8):e0134366.
34. Chaudhuri AD, Yelamanchili SV, Fox HS. Combined fluorescent in situ hybridization for detection of microRNAs and immunofluorescent labeling for cell-type markers. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2013;7:160.
35. Valadkhan S, Gunawardane LS. Role of small nuclear RNAs in eukaryotic gene expression. Essays in biochemistry. 2013;54:79-90.

36. Jawhar NMT. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. Annals of Saudi Medicine. 2009;29(2):123-7.
37. Moench TR. In situ hybridization. Molecular and Cellular Probes. 1987;1(3):195-205.
38. In Situ Hybridization (ISH) The National Center for Biotechnology Information [Hentet 02.05.18] [Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techish/.
39. Qiagen. miRCURY LNA miRNA ISH Optimization Kits (FFPE) Qiagen.com u.å [Hentet 15.04.18]]. Available from: https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/primer-sets/mircury-lna-mirna-ish-optimization-kits/#productdetails.
40. Jensen E. Technical review: In situ hybridization. Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007). 2014;297(8):1349-53.
41. Exiqon. Locked Nucleic Acid (LNA™) Technology Exiqon.com u.å [Hentet 16.04.18] [Available from: http://www.exiqon.com/lna-technology.
42. Cai T, Schmitt ME. [12] - Characterization of Ribonuclease MRP Function. 2001 2001/01/01/ [Hentet 10.03.18]. In: Methods in Enzymology [Internet]. Academic Press; [135-42]. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687901425419.
43. Drew CP, Shieh W-J. Chapter Ten - Immunohistochemistry. Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2: Academic Press; 2015. p. 109-15.
44. Burtis CA, Bruns DE. Immunochemial Techniques In: Burtis CA, Bruns DE, editors. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 7. Missouri Saunders 2015. p. 237.
45. The Human Protein Atlas. Immunochemistry [Internett] The Human Protein Atlas; u.å [Hentet 05.05.18] [Available from: https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry
46. Myers R. Technical Brief of Heat Induced Epitope Retrieval [Internett] Leica Biosystems u.å [Hentet 02.04.18] [Available from: https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/technical-brief-of-heat-induced-epitope-retrieval/.
47. Bostwick DG. Premalignant lesions of the prostate. Semin Diagn Pathol. 1988;5(3):240-53.
48. Sheedy FJ. Turning 21: induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response 2015 [
49. Yang Y, Guo J-X, Shao Z-Q. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2017;10(1):87-91.
50. Folini M, Gandellini P, Longoni N, Profumo V, Callari M, Pennati M, et al. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. Molecular Cancer. 2010;9:12-.
51. Qi L, Bart J, Tan LP, Platteel I, Sluis Tvd, Huitema S, et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. BMC Cancer. 2009;9:163-.
52. Coppola V, Musumeci M, Patrizii M, Cannistraci A, Addario A, Maugeri-Sacca M, et al. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. Oncogene. 2013;32(14):1843-53.

7. Vedlegg

Vedlegg 1: Oversikt over snitt farget med IHC

Vedlegg 2: miRNA ISH protokoll, miRCURY LNA

Vedlegg 3: 4_ Immunohistochemical detection of EGFR.

Vedlegg 4: Protokoll, IHC

7.1 Vedlegg 1: Oversikt over snitt farget med IHC

PTEN:

Blokknr	Sekvens
B1	B1
B2	B1
B3	D1
B4	B1
B5	C1
B6	C1
B7	B1
B8	D1
B9	C1
B10	B1

PDCD-4:

Blokknr	Sekvens
B1	B3
B2	B3
B3	D3
B4	B3
B5	C3
B6	C3
B7	B3
B8	D3
B9	C3
B10	B3

BTG2:

Blokknr	Sekvens
B1	A1
B2	D1
B3	C1
B4	A1
B5	A1
B6	A1
B7	C1
B8	B1
B9	A1
B10	A1

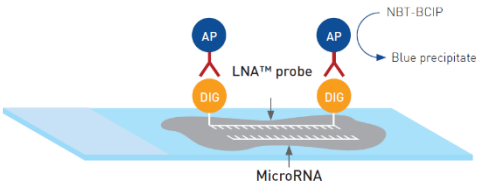
7.2 Vedlegg 2: miRNA ISH protokoll, miRCURY LNA

miRNA ISH protokoll, miRCURY LNA

Hensikt og omfang

miRCURY LNA™ mikroRNA ISH kit inneholder reagenser og anbefalinger som sikrer best mulig utgangspunkt for vellykkede miRNA in situ hybridiseringer på formalinfiksert parafininnstøpt vev. Kitet inneholder digoxigenin-merkede prober for ønsket miRNA , en dobbelt DIG-merket Scramble-miR som negativ kontroll, og en 5'-DIG merket probe mot U6 snRNA for utprøvingene i forhold til oppsett av protokoll. Kitet inneholder også en formamid-fri hybridiseringsbuffer utviklet spesielt for miRCURY LNA™. I kitet er det også proteinase K som kan brukes til å optimalisere Proteinase-K behandling.

Process*	Step	Equipment	Time	Temperature
Deparaffination	1	Slide rack and Jars	40 min.	Room Temperature
Proteinase-K	2	Hybridizer	10 min.	37°C
In situ hybridization	4	Hybridizer	60 min.	50-60°C
Stringent washes	6	Water bath	30 min.	50-60°C
Blocking	8	IHC staining racks	15 min.	Room Temperature
Anti-DIG/AP	9		60 min.	
AP reaction	11	IHC staining racks in Oven	120 min.	30°C
Counter stain	14	IHC staining racks	10 min.	Room Temperature
Dehydration	16	Slide rack and Jars	10 min.	
Mounting	17		5 min.	



Prosedyren omfatter:

- HMS
- Kjemikaliehåndtering
- Avfallshåndtering
- RNase-fritt arbeid
- Utstyr
- Reagenser
- Forberedelser

- Protokoll

Ansvar

Prosedyren utføres av studenter, stipendiater, ingeniører eller forskere som er tilknyttet Biobank1. Brukere av forskningslaboratoriet skal være godkjent av avdelingssjef, samt ha gjennomgått en grundig opplæring av fagansvarlig bioingeniør.

Arbeidsbeskrivelse

HMS

Før prosedyren kan utføres, skal alle brukere ha opplæring i HMS og arbeidsrutiner ved laboratoriet. Les EQS prosedyre {{EQSDocument 35839}}. Arbeid med denne protokollen skal utføres i avtrekkskap på rom 231.04.042 så langt det lar seg gjøre. For arbeid utenfor skap, skal vernebriller benyttes. Før arbeid med kjemikalier skal sikkerhetsdatablader leses. Disse finnes på laboratoriet i ringperm, eller i det elektroniske stoffkartoteket EcoOnline.

Kjemikaliehåndtering

Les EQS prosedyre{{EQSDocument 35839}}

Avfallshåndtering

Les EQS-prosedyre {{EQSDocument 1575}}

RNAse-fritt arbeid

For arbeid i laboratoriet, les {{EQSDocument 35839}}

(Her beskrives hvem som har det overordnede ansvaret for oppgavene som beskrives i dokumentet)

Utstyr og reagenser

Kit

miRCURY LNA™ microRNA ISH

Optimization Kit (FFPE) # 90000, 90001, 90002, 90003, 90004, 90005, 90007, 90008, 90009

January 2016

Reagenser som følger med Kit

Reagenser levert i kit 90008 fra Exiqon	Volum	Conc	RNA T$_m$	Lokasjon
LNA™ microRNA probe, double-DIG-labeled	40 uL	25 uM	87 °C	-80 C fryser 231.04.045
LNA™ scrambeled microRNA probe, double-DIG-labeled	40 uL	25 uM	87 °C	-80 C fryser 231.04.045
LNA™ U6 snRNA probe 5' DIG-labeled	40 uL	0,5 uM	84 °C	-80 C fryser 231.04.045
microRNA ISH buffer (2x)				Kjøleskap 231.04.042
Proteinase-K, lyophilized				-20 fryser 231.04.042

Utstyr som ikke følger med kit

Utstyr som ikke er levert i kit	Firma	Artikkelnr	Lokasjon
DAKO hybridizer			Benk 231.04.042
Inkubatorskap			231.04.042
Varmeblokk			231.04.042
Fuktekammer			Overskap 3 231.04.042
Superfrost Plus slides			Underskap ved mikrotom 231.04.042
Dekkglass	VWR	631-1574	Underskap ved mikrotom 231.04.042
Fargetrau med lokk uten innsats	VWR	630-0347	Overskap 1 231.04.042
Flaske rund med skrulokk	VWR	215-1595	Overskap 1 231.04.042
Ståglass:Fargekrukke torp 10 stk	VWR	631-0698	Overskap 1 231.04.042
Non-stick RNase free mikrosentifugerør			Skuffer 231.04.044
Vector laboratories Immedge pen	Bioteam	NC9545623	Underskap ved mikrotom 231.04.042
Autoklaveposer PP	VWR	129-9602	Sjekk avfallsposene 231.04.042
Hybrislip Hybridization Covers	Sigma	H0784-100EA	Overskap 3 231.04.042
Hybridizer humidity control slips	DAKO	S2452	Overskap 3 231.04.042
Dekkglass 50X24 mm	VWR	631-1574	Underskap ved mikrotom 231.04.042
RNasefrie sterile rør og pipettespisser	Eppendorf og VWR		Skuffer 231.04.044

Reagenser som ikke følger med kit

Reagenser som ikke er levert i kit	Firma	Artikkelnr	Lokasjon
Sheep anti-DIG-AP	Roche	11093274910	Kjøleskap 231.04.042
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche	11 585 762 001	Kjøleskap og fryser 231.04.042
Sheep Serum	Jacksom Immunoresearch	013-000-121	Kjøleskap 231.04.042
NBT/BCIP ready-to-use tablets	Roche	11697471001	Kjøleskap 231.04.042
Rubber cement, Fixogum	VWR	ICNA11FIXO0125	231.04.042 Bestilt!
Nuclear counter stain Nuclear Fast Red™	Vector Laboratories	H-3403	Overskap 3 231.04.042
Mounting medium Histokitt	VWR	HECH41025010	231.04.042
RNase Zap	Ambion		Underskap vask 231.04.042
Xylene			Brannskap 231.04.042
Etanol absolutt	Antibac	570436	Brannskap 231.04.042
Etanol rektifisert	Antibac	5501139	Brannskap 231.04.042
PBS Tablets 100 mL	VWR	E404-100 TABS	Overskap 3 231.04.042
SSC 20X buffer	VWR	J60561.AK	Overskap 3 231.04.042
1M Tris-HCl, PH 7,5	Sigma	T2319-1L	Overskap 2 231.04.042
0,5 M EDTA PH8,0	Ambion	AM9260 G	Overskap 3 231.04.042
5M NaCl	Ambion	AM9760G	Overskap 3 231.04.042
Tween-20	Sigma	P1379	Overskap 3 231.04.042
For å lage DEPC Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma	D5758-50 ml	Kjøleskap 231.04.042
For KTBT-buffer Tris-HCl	Sigma	T3253-100g	CMIC
For KTBT-buffer NaCl	Sigma	S3014-500g	Overskap 3 231.04.042
For KTBT-buffer KCl	Sigma	P9541-500g	Overskap 2 231.04.042
DEPC-treated water, 1 L	VWR		Overskap 3 231.04.042
Levamisol hydrochloride	Sigma (FLUKA)	31742-250 mg	Overskap 3 231.04.042

Prøve

Formalinfiksert parafininnstøpt vev.

Kritiske punkt for analysen

Kritiske hybridiseringsbetingelser

- miRNA kopi antall
- Probe konsentrajson
- Stringency wash
- Intensiteten til signalene

Falske negative eller svak farging:

microRNA degradert i vevet av ulike årsaker:

- Preanalystiske variabler (degradert før fiksering, fikseringstid, blokk lagring osv.)
- Analytiske årsaker (RNase kontaminering under preparering, snitting eller underveis i prosedyren)

Avmaskering

- For svak avmaskering og miRNA i vevet er ikke tilgjengelig (kan være pga for lang formalinfiksering)
- For kraftig avmaskering og miRNA er vasket ut i løsningen.
- For kort tid i xylene, eller uren xylen.

Andre analytiske tilpasninger:

- Feil temperatur på stringent wash (SSC vask)
- Feil konsentrasjon på prober og reagenser (må tilpasses ulike vev)
- Snittykkelse, det anbefales 5-7 µm av Eiqon.

miRNA kan være så lavt uttrykt at metoden ikke kan detektere det (ISH ikke sensitiv nok)

Falske positive

- Feil konsentrasjon på probe (DIG-merket)
- For høy konsentrasjon på antistoffet (AP-konjugert anti-DIG)
- Antistoffet er uspesifikt bundet til endogent AP (Alkalisk fosfatase)
- Feil temperatur i stringent vask (SSC vask).
- Uspesifikk binding til familiære miRNA med nesten samme sekvens.

Forberedelser

1. Løsninger som lages i forveien (holdbare i minst 6 mnd - 1 år)

DEPC-vann

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
Diethylpyrocarbonate	0,1 %	1 ml	231.04.042
Millipore Q vann		1 L	Hente på ISB

Må autoklaveres for å deaktivere DEPC.

TRIS-HCl, 10 mM

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
1M TRIS-HCl PH 7,5	10 mM	10 µl	231.04.042 oversk 2
DEPC vann		990 µl	231.04.042 oversk 3

Proteinase K, 20 mg/ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
Proteinase K, 12 mg	20 mg/ml	12 mg	231.04.042 -20 C
TRIS-HCl	10 mM	600 µl	231.04.042 oversk 3

Fordel 10 ul i alikvoter og frys i -20C.

10 X blokkeringsbuffer

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
10 x blokkeringsbuffer fra DIG Wash and Block Buffer Set	10 X	2 ml	231.04.042 -20 C

Konsentrert blokkeringsbuffer fordeles i sterile rør a 1 ml og fryses i -20 C.

100 mM Levamisol

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
Levamisol 240,75 g/mol	100 mmol	250 mg	231.04.042 oversk 3
DEPC vann		10,4 ml	231.04.042 oversk 3

OBS, giftig ved svelging! Lages i avtrekk. Overføres celledyrkningsflaske. Hvis den begynner å gulne, lag ny.

Sheep Serum, 60 mg/ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
Sheep serum	60 mg/ml		231.04.042 -20 C etter fortynning
DEPC vann		10 ml	231.04.042 oversk 3

Sheep serum inneholder Natriumazid! Bruk avtrekk. Fordeles i 250 µl alikvoter og fryses i -20 C.

Proteinase K-buffer

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
1 M TRIS-HCl, P7,5	5 mM	5 ml	231.04.042 oversk 2
0,5 M EDTA	1 mM	2 ml	231.04.042 oversk 3
5 M NaCl	1 mM	0,2 ml	231.04.042 oversk 3
DEPC vann		Tilsett opp til 1000 ml	231.04.042 oversk 3

Lages i glassflaske og autoklaveres. Lag gjerne halv løsning.

5 X SSC

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
20 X SSC	5 X	250 ml	231.04.042 oversk 3
DEPC vann		750 ml	231.04.042 oversk 3

Lages i glassflaske og autoklaveres.

1 X SSC

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
20 X SSC	1 X	50 ml	231.04.042 oversk 3
DEPC vann		950 ml	231.04.042 oversk 3

Lages i glassflaske og autoklaveres.

0,2 X SSC

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
20 X SSC	0,2 X	10 ml	231.04.042 oversk 3
DEPC vann		990 ml	231.04.042 oversk 3

Lages i glassflaske og autoklaveres.

PBS PH 7,4:

Tabletter i overskap 3 rom 231.04.042 1 tablett per 100 mL DEPC vann, autoklaver.

PBS-T

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
PBS PH 7,4		300 ml	231.04.042 oversk 3
Tween 20		300 µl	231.04.042 oversk 3

Lages i steril flaske, autoklaveres.

KBTB buffer

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
TRIS-HCl	50 mM	7,9 g	Lån hos CMIC
NaCl	150 mM	8,7 g	231.04.042 oversk 3
KCl	10 mM	0,75 g	231.04.042 oversk 3
DEPC vann		Tilsett opp til 1000 ml	231.04.042 oversk 3

Lages i glassflaske og autoklaveres.

2. Løsninger som lages samme dag

Proteinase K, 20 µg/ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
Proteinase-K, 20 mg/ml	20 µg/ml	15 µl	231.04.042 -20 C
Proteinase K buffer		15 ml	231.04.042 Kjølesk

1 X Hybridiserings mix buffer

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
microRNA ISH buffer	1:1	500 µl	231.04.042 Kjølesk
DEPC-vann	1:1	500 µl	231.04.042 oversk 3

Ved krystallinsering av buffer, varm opp til 50-60 °C og rist kraftig.

Denaturering av prober

Probene er frosset i rør med 10 µl i hvert. Alikvoter probene i mindre porsjoner i low-bind rør.
Tin de aktuelle prober og pippeter ut minste volum i 1,5 ml RNasefrie low-bind eppendorfrør til oppsettet. Merk utgangsrør med strek for å markere antall ganger brukt og sett røret umiddelbart tilbake i fryser.

Denaturer probene i 4 min. ved 90 °C. Spinn raskt ned og tilsett hybridiserings mix buffer som angitt i fortynningsskjema. Fortynnet og denaturert probe som ikke blir brukt kan fryses ned igjen.

Reagens	Kons.	Mengde	Plassering
Scramble miR, 25 µM	50 nM	Fort 1:500 med hyb mix buffer 1+499	231.04.045 -80 C
miR probe etter ønske	20-80 µM	I henhold til konsentrasjon funnet etter utprøving.	231.04.045 -80 C
U6 snRNA control probe, 0,5 µM	1 nM	Fort 1:500 med hyb mix buffer 1+499	231.04.045 -80 C

1 X Maleric acid, 20 ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
10xMaleric acid fra DIG Wash and Block Buffer Set	1 X	2 ml	231.04.042 Kjølesk
DEPC-vann		18 ml	231.04.042 oversk 3

1 X blokkeringsløsning, 20 ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
10 X blokkeringsløsning	1 X	2 ml	231.04.042 -20 C
1 X Maleric acid		17,6 ml	231.04.042 Kjølesk
Sheep serum		400 µl	231.04.042 -20 C

Obs: Sheep serum inneholder Natriumazid! Bruk avtrekk ved tilsetting.

Sheep anti-DIG-AP, 1:800, 8 ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
1 X blokkeringsløsning		8 ml	nylaget
Sheep anti_DIG-AP	1:800	10 µl	231.04.042 Kjølesk

AP-substratløsning, 10 ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
NTB/BCIP tabletter		1 tablett	231.04.042 kjølesk
DEPC vann		10 ml	231.04.042 oversk 3
Levamisole 100 mM		20 µl	231.04.042 oversk 3

Løs tablett i 10 mL DEPC-vann før tilsetting av Levamisole. Beskyttes mot lys!

3. Glassutstyr

Kar, ståglass og dekkglass bakes i 180 ^{0}C over natt for å ødelegge enzymaktivitet. Pakk inn i aluminiumsfolie og lagre til bruk.

4. Andre forberedelser

Sett på vannbad på samme temperatur som hybridiseringstemperatur (49 ºC, 53 ºC, 55 ºC eller annen) dagen i forveien og sett inn SSC-bufferene som skal brukes, tidlig på morgenen. Kontroller temperatur med termometer.
Ta ut og tin 1 rør proteinase K 20 mg/ml
Sett på hybridisator 37 °C og fukt Hybridizer humidity control slips med DEPC vann.
Sett varmeblokk på 90 °C.

Fyll buffere i ståglass for romtemperering.

Protokoll

1. Snitting:
   Forbered vannbad med RNase fritt vann og vannbad. Bruk alltid en ny ren kniv ved snitting på godt rengjort mikrotom. Snittene skal ha en tykkelse på 4 µm. Snittene tørkes 1-2 timer i romtemperatur, så opptil 1 uke i kjøleskap før bruk. Rett før protokollen (gjerne dagen før) settes snitt i varmeskap, 60 °C (over natt), så i romtemperatur.

2. Deparafinering
   1. Xylene 10 min
   2. Xylene 10 min
   3. Xylene 10 min
   4. Absolutt etanol skyll 10 ganger
   5. Absolutt etanol skyll 10 ganger
   6. Absolutt etanol 5 min
   7. 96 % etanol skyll 10 ganger
   8. 96 % etanol 5 min
   9. 70 % etanol skyll 10 ganger
   10. 70 % etanol 5 min
   11. PBS (ståglass) 2-5 min

Tørk forsiktig rundt snittet og lag en ring med Vector Immedge penn.

⚠ Xylen er helseskadelig. Deparafineringsrekka må settes opp inne i avtrekksskap. Bruk hansker til enhver tid!

3. Avmaskering

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
Proteinase-K, 20 mg/ml	20 µg/ml	15 µl (7,5 µl)	231.04.042 -20 C fryser
Proteinase K buffer		15 ml 7,5 ml)	231.04.042 kjølesk

- Lag proteinase-K løsning rett før bruk som angitt. Lag gjerne halv løsning dersom det er 7 snitt eller færre.
- Pipetter 1000 µl per snitt, og inkuber snittene i DAKO Hybridizer ved 37 °C i 20 min.

4. PBS vask
   Overfør snittene til et ståglass med PBS, romtemperert og vask x 2 (bruk samme glass) Still om temperaturen på hybridiseringsmaskinen til hybridiseringstemperatur (49 ºC, 53 ºC, 55 ºC eller annen).

5. Dehydrering
    1. 70 % etanol skyll 10 ganger
    2. 70 % etanol 1 min
    3. 96 % etanol skyll 10 ganger
    4. 96 % etanol 1 min
    5. Abs etanol skyll 10 ganger
    6. Abs etanol 1 min.

Lufttørk snittene på rent papir i 15 min. Man kan fortsette prosedyren etter 15 min. lufttørking eller oppbevare de mørkt i romtemperatur til neste dag.

6. Denaturering

Still varmeblokk på 90 °C, hvis det ikke allerede er gjort i starten av prosedyren. SSC-buffere (5x, 1x og 0,2x) bør allerede være forvarmet til ønsket hybridiseringstemperatur (49 ºC, 53 ºC, 55 ºC eller annen).

Probene er alikvotert i små mengder. Tin de aktuelle prober og pipetter ut minste volum i 1,5 ml RNasefrie low bind eppendorfrør. Merk utgangsrør med strek for å markere antall ganger brukt, og sett røret umiddelbart tilbake i fryser.

Lag hybridiserings mix buffer 1:1 som angitt i fortynningsskjema.

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
microRNA ISH buffer	1:1	Lages etter antall	231.04.042 kjølesk
DEPC-vann	1:1	Lages etter antall	231.04.042 oversk 3

Denaturer probene i 4 min ved 90 °C. Spinn raskt ned og tilsett hybridiserings mix buffer.

Reagens	Kons.	Mengde	Plassering
Scramble miR, 25 µM	50 nM	Fort 1:500 med hyb mix buffer 1+499	231.04.045 -80 C
miR probe etter ønske	20-100 nM	I henhold til konsentrasjon funnet under utprøving.	231.04. 045 -80 C
U6 snRNA control probe, 0,5 µM	1 nM	Fort 1:500 med hyb mix buffer 1+499	231.04. 045 -80 C

7. Hybridisering:

Fortynn probene etter fortynningsskjema over. Legg snittene flatt og tilsett 50-60 µl probe, bruk et dekkglass som passer til snittet. Legg dekkglass på og trykk eventuelle luftbobler forsiktig ut. Øk mengde probe om det brukes større dekkglasss.

Hybridiser snittene i Dako hybridizer i 60 min ved bestemt hybridiseringstemperatur (49 ºC, 53 ºC, 55 ºC eller annen). Fjern dekkglass, og

sett snittene i 5 X SSC-buffer i RT i 5 min. Tin blokkeringsløsning og saueserum. Sett hybridiseringsmaskinen på 30 ºC.

8. SSC vask

Forbered reagenser til trinn 9, slik at disse kan klargjøres under SSC vasken.

Vask snittene i forvarmede SSC buffere i 56 °C i vannbad (helst med ristefunksjon) som angitt under:

1. 5X SSC 5 min
2. 1X SSC 5 min
3. 1X SSC 5 min
4. 0,2X SSC 5 min
5. 0,2X SSC 5 min
6. 0,2X SSC 5 min
7. PBS RT

9. Blokkering

1 X Maleric acid, 20 ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
10xMaleric acid fra DIG Wash and Block Buffer	1 X	2 ml (1 ml)	231.04.042 Kjøleskap
DEPC-vann		18 ml (9 ml)	231.04.042 oversk 3

1 X blokkeringsløsning, 20 ml

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
10 X blokkeringsløsning	1 X	2 ml (1 ml)	231.04.042 -20 C
1 X Maleric acid		17,6 ml (8,8 ml)	231.04.042 kjølesk
Sheep serum		400 µl (200 µl)	231.04.042 -20 C

1. Lag maleric acid og blokkeringsløsning som angitt i tabell. Fortynn anti-DIG-AP som angitt i tabell.
2. Legg på 800 µl blokkeringsløsning på hvert snitt og inkuber i 15 min i RT i fuktekammer.
3. Forbered substratreaksjonen: tilsett 10 ml DEPC-vann til en NTB/BCIP tablett (se under AP substratreaksjon) og beskytt mot lys (løsningen trenger litt tid på å løse seg)

10. Antistoffreaksjon

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
1 X blokkeringsløsning		8 ml (4 ml)	nylaget
Sheep anti_DIG-AP	1:800	10 µl (5 µl)	231.04.42 kjøleskap

1. La blokkeringsløsningen renne av og tilsett 500 µl anti-DIG-AP, 1:800
2. Inkuber i DAKO hybridizer ved 30 °C i 30 min.

11. PBS-T vask:

Vask i PBS-T 3X3 min i ståglass.

12. AP substratreaksjon

Når NBT/BCIP tabletten er løst i DEPC vann, tilsettes Levamisole etter skjema under.

Reagens	Konsentrasjon	Mengde	Plassering
NTB/BCIP tabletter		1 tablett	231.04.042 kjølesk
DEPC vann		10 ml	231.04.042 oversk 3
Levamisole 100 mM		20 µl	231.04.042 oversk 3

Tilsett 400 µl substrat til hvert snitt og inkuber i DAKO hybridizer ved 30 °C i 120 min. Beskytt mot lys under reaksjonen.

13. Stopp av substratreaksjon

Stopp med å inkubere 2X5 min i KTBT buffer i ståglass i RT.

14. Vask

Vask i springvann 2X1 min (her er det ikke fare for kontaminering)

15. Kjernefarging

Kjernefarg i Nuclear Fast Red i 2 min i ståglass.
Skyll godt av i springvann.

16. Dehydrering

Dehydrer snittene i nye spritbad.
1. 70 % etanol skyll 10 ganger, skift og la stå 1 min
2. 96 % etanol skyll 10 ganger, skift og la stå 1 min
3. Abs etanol skyll 10 ganger, skift og la stå 1 min

4. Xylen (ståglass) 2 min Xylen er helseskadelig!

17. Legg opp snittene direkte fra xylen med rikelig med histokit monteringsmedium og dekkglass.

Referanser

miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE) Instruction manual v3.0

7.3 Vedlegg 3: 4_ Immunohistochemical detection of EGFR

2018 - MOL3101

Exercise 4 Immunohistochemical detection of EGFR.

Scientific responsible: Sverre H. Torp
Technicians: Kathrin Torseth, Camilla Bjørk-Setsaas, Ingunn Nervik, Borgny Ytterhus and Unn Granli.

Learning outcomes

Demonstrate good knowledge of immunohistochemistry, including the pretreatment, and demonstrate basic skills in performing IHC in the laboratory.
Demonstrate good skills in how to interpret the results of the immunohistochemical staining of samples and controls.

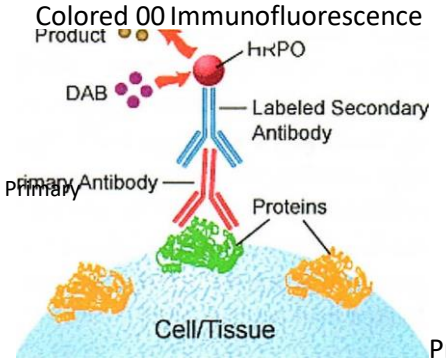
Brief introduction:

Immunohistochemistry (IHC) is a powerful method for visualizing the distribution and localization of cellular components such as proteins or other macromolecules (antigens) in tissue sections or cells using antibody-antigen interactions, known as immunostaining or immunodetection. The IHC technique was invented in the 1940s (Coons, Creech, & Jones, 1941) and is widely used in health care and pathology. The method is an important tool to identify abnormal cells in diseases such as cancer or to stratify patients for optimized treatment regimes.
The choice of primary antibody is critical to the success of the IHC experiment. The most important feature of the primary antibody is its specificity for the target antigen. The antigen-antibody complex is then detected either directly, through a label that is directly conjugated to the primary antibody, or indirectly, using a labeled secondary antibody. The antibody is visualized using either a fluorescent label or an enzyme that converts a soluble substrate into an insoluble chromogenic product.

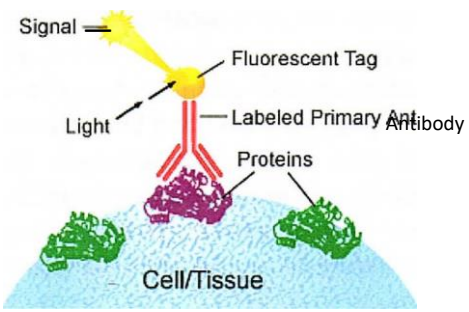
Indirect Immunohistochemistry

Direct Immunohistochemistry

Colored 00 Immunofluorescence



Product



00

Figure 1:Illustration of indirect IHC and direct IHC (immunofluorescence).
(https://www./einco.com/immunohistochemistry-protoco/)

2018 - MOL3101

Methods:

Deparaffinization of slides with formalin-fixated paraffin-embedded (FFPE) cell pellets.
Heat-induced epitope-retrieval (HIER).
Immunohistochemistry (IHC)
Counterstaining
Microscopic interpretation of the staining

Materials:

Tissue sections of cell lines and controls.
Reagents for deparaffinization and counterstaining (incl. hematoxylin)
Dako REAL™ EnVision™ Detection System (Envision)(K5007/
Target Retrieval Solution (TRS) pH 9 (Dako, 1<8004) EnVision™

wash buffer pH 7.6 (Dako, K8007)

EGFR rabbit mAb (D38B1) (cell Signaling #4267)

Preparation of cellblocks and sections (already prepared):

The EGFR-cells were pelleted by centrifugation for 10 min at 3000 rpm. The supernatant were discarded and the cells were resuspended with 5 drops of human plasma. (1 drop of erythrocin were added for visualization of the cells in the paraffin block.) 1 drop of thrombin was added to the cells to start the coagulation process. The cell clots were wrapped in lens paper and then inserted into the tissue processing/embedding cassettes.

The cell clots were processed in a tissue processer before embedding in paraffin. Because melted paraffin is hydrophobic, the water in the samples must be removed before they can be infiltrated with the paraffin wax. The water in the specimen is therefore progressively replaced by alcohol in a process where the specimens are immersed in a series of ethanol solutions of increasing concentration until pure, water-free alcohol is reached (70 % - 80 % - 96 % - 100 % - 100 % - 100 %). Since wax and ethanol also are immiscible, we therefore have to use an intermediate solvent that is fully miscible with both ethanol and paraffin wax. This solvent (Tissue-Clear) will displace the ethanol in the tissue, before it finally will be displaced by molten paraffin wax. The tissue now may be infiltrated with a suitable histological wax. The paraffin infiltrated samples then were formed into paraffin blocks and sectioned into 4 gm sections using a microtome. The sections were placed onto Superfrost™ slides that have a positively charged surface that aids the attachment of the sections to the slides. Before deparaffinization the sections needs to be heated over night at 37 ^{o}c

Day 1:

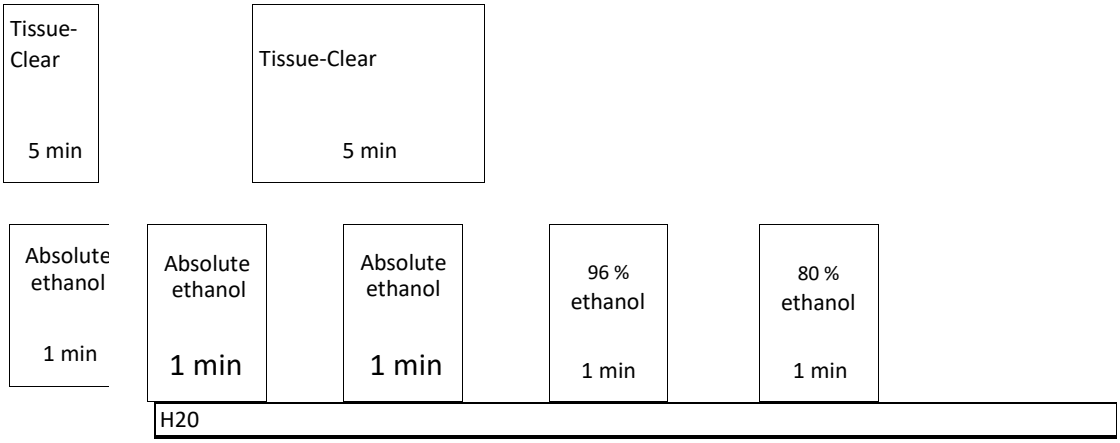
1. Deparaffinization and rehydration.

Deparaffinization is required when using paraffin-embedded sections. Before proceeding with the staining protocol, the slides must be deparaffinized and rehydrated. Incomplete removal of paraffin from the tissue sections can lead to poor staining of the sections.

Procedure.

Start by turning on the PT-link and start the pre-heating program. The PT-link will be used later for the Heat-induced epitope-retrieval (HIER).

1. Heat the sections in a heating cabinet at 60 ^{o}c for 1 hour.
2. Prepare the deparaffinization solutions according to the figure below.
3. Transfer the sections to the first glass jar containing Tissue Clear and proceed with the following procedure.



2. Heat-induced epitope-retrieval (HIER):

The tissue and cells have been fixated with formalin in order to provide excellent preservation of both morphology, cytology and tissue architecture. Formaldehyde binds covalently to the proteins in the tissue and forms large aggregates of proteins. This crosslinking of proteins will mask the epitopes and thus hinders the binding of the antibody to the epitope. Heat-induced epitope-retrieval (HIER) is a process that uses heat combined with different buffers to demask or recover the antigen reactivity in formalin-fixated paraffin-embedded tissue or cells. The HIER process reverses the chemical modifications in the tissue mediated by the formaldehyde. Although the mechanisms of the HIER process is not completely understood, it's believed that the thermal energy in the HIER process breaks the cross-links between the proteins and that the buffer helps to remove the complex bound calcium ions. Thus, the buffers used in HIER often contain calcium chelators such as citrate and EDTA. The HIER treatment also contributes to the rehydration of the tissue and thereby helps the penetration of the antibodies. It also leads to a certain denaturation of the proteins that also helps to reveal hidden epitopes.

Procedure.

1. After the deparaffinization, the sections can be stored in 1-120 until the Target Retrieval Solution (TRS) in the PT-link is pre-heated to 85 ^{0}C.

2. Transfer the sections into the Target Retrieval Solution (TRS) pH 9 (Dako, K8004).

3. Start the PT-link.

4. PT-link program:
    a. Heating to 97 ^{0}C for 20 min.
    b. Cooling to 65 ^{0}C.

5. Make the wash buffer:
    a. Dilute the EnVision™ wash buffer pH 7.6 (Dako, K8007) by diluting the 20 x wash buffer 1:20 in H20 (1 liter).

6. Wash: Wash the sections in 1 x wash buffer, 2 x 10 min.

7. While the sections are in the wash buffer, take one section at a time and draw a circle around the tissue using the Dako Pen (Dako, S2002). Use a tissue cloth to wipe off the wash buffer without touching the tissue. Put them back in the wash buffer afterwards.

- NB! Keep tissue sections moist at all times.

3. Immunohistochemistry (IHC).

Procedure.

1. Make the primary antibody (EGFR rabbit mAb (D38B1), Cell Signalling , #4267)) dilution: Dilute the antibody 1:100 in Dako REAL^{TM} Antibody Diluent (Dako, S2022).

2. Blocking unspecific antibody binding sites: Place the sections in the stain tray and immediately cover the sections with 100 1-Il Peroxidase blocking solution (Dako, K4011/ S2023) and incubate for 5 min at room temperature.

3. Wash: Wash twice with 1 x Wash Buffer.

4. Binding of primary antibody: Apply 100 gl of the diluted primary antibody to each section.

5. Incubate the sections over night at 4 ^{o}c (in a fridge).

Day 2:

Immunohistochemistry (IHC) procedure, continued

6. Wash: Wash the sections twice in 1 X Wash Buffer.

7. Binding of secondary antibody: Apply 100 1-Il of HRP-labelled polymer mouse anti-rabbit (Dako, K5007) and incubate for 30 min at room temperature.

8. Make 3 ml DAB-solution by diluting 20 1.11 of DAB-chromogen per 1 ml DAB substrate buffer (Dako, 1<5007).

9. Wash: Wash the sections twice with 1 x Wash Buffer.

10. Staining: Apply 150 1.11 of DAB solution to each section and incubate for 5 minutes at room temperature. After 5 minutes, add 150 Bil more of the DAB-solution to each section and incubate for additional 5 minutes.

11. Pour the DAB-solution in a waste bottle and transfer the sections to a jar with water.

12. Wash the sections twice in water. The sections can be stored in water until you start with the counterstaining.

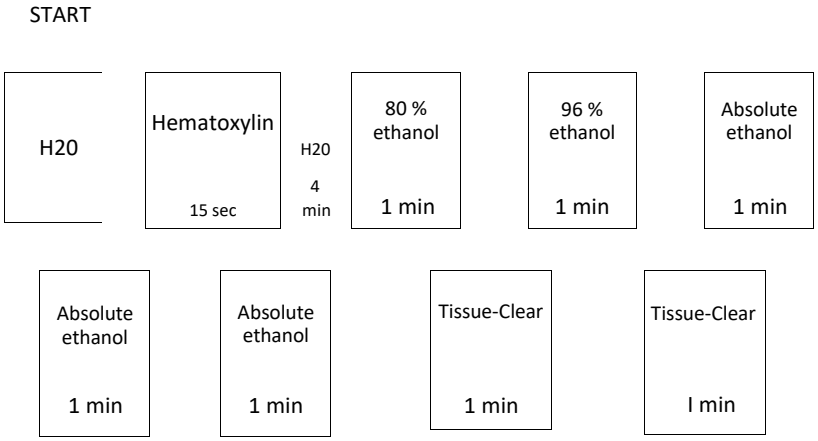
4. Counterstaining with hematoxylin.

In order to study the exact localization of the stained epitopes relative to the tissue- or cellular morphology, the immunohistochemical staining process is often concluded with a nuclear staining procedure. The most common type of counterstain used for FFPE samples is hematoxylin that stains the cell nuclei in a dark bluish color. Oxidized hematoxylin in combination with aluminum ions form an active metal—dye complex that stains the nuclei red by binding to lysine residues on the nuclear histones. This is in contrast to other nuclear stains that label the nucleic acids. The red color is converted to the familiar blue color when the section is washed in a weak alkali solution like tap water. This procedure is known as "blueing".
The hematoxylin solution we use today consists of: hematoxylin, glycerol, glacial acetic acid, periodic acid and aluminum sulfate.

Procedure.

1. Prepare the counterstain solutions according to the figure below.

2. Transfer the sections to the first glass jar containing 1-120 and proceed with the following procedure.



5. Mounting.

After immunohistochemical staining, mounting media are used to adhere a coverslip to a tissue section. The mounting media are important in order to protect the specimen and the staining from physical damage. Mounting media also play an important role in improving the clarity and contrast of an image during microscopy.

1. Add an appropriate amount of TissueMount mounting media (Sakura) to the middle of the tissue section and carefully place a coverslip on top.

2. The sections are now ready for microscopic evaluation.

6. Microscopy and scanning.

- We will help you with the microscopic evaluation the digital scanning of the sections.

For the lab report:

For the paper:

Describe the principle for immunohistochemical detection of EGFR and discuss the microscopic evaluation of the different samples.

Include pictures of the stained samples.

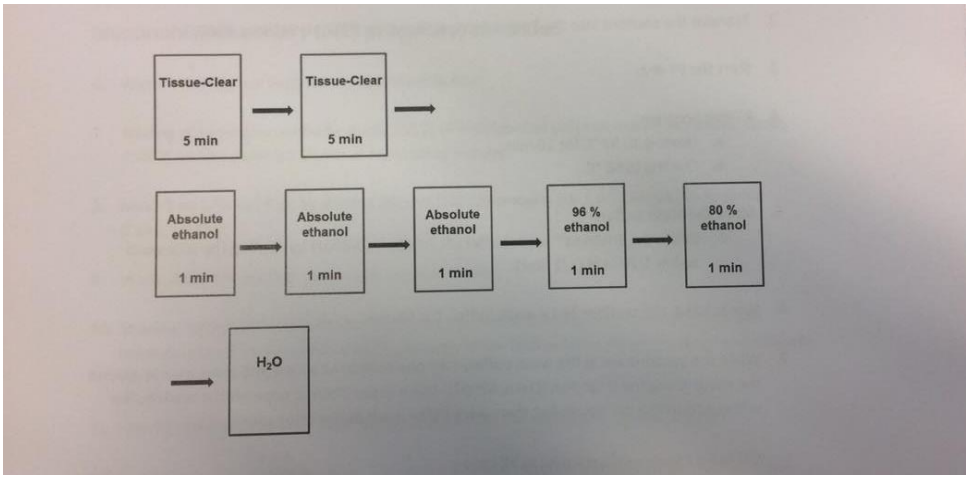
7.4 Vedlegg 4: Protokoll, IHC

IHC protokoll

Detektering av PTEN, PDCD-4 og BTG2

Deparafinering og rehydrering

1. Sett snitt i varmeskap og start oppvarming av PT-Link.
2. Deparafinering: 1 time og 15 minutter i varmeskap.
3. Rehydrering:



4. Snitt kan oppbevares i vann til neste steg (til PT-Link er 85C).

Forbehandling med Heat-induces epitope-retrieval (HIER)

5. Overfør snitt fra vann til Target Retriveal Solution (TRS) (PDCD-4 i pH 6, PTEN og BTG2 i pH 9).
6. Start PT-Link(varmes opp til 97C, kjøles ned til 65 C).
7. Vask snitt i 1x vaskebuffer, 2x10 minutter.
8. Mellom vaskene: tørk bort vaskebufferen rundt vevet, bruk Dako Pen og tegn en sirkel rundt vevet.

Immunhistokjemi (IHC)

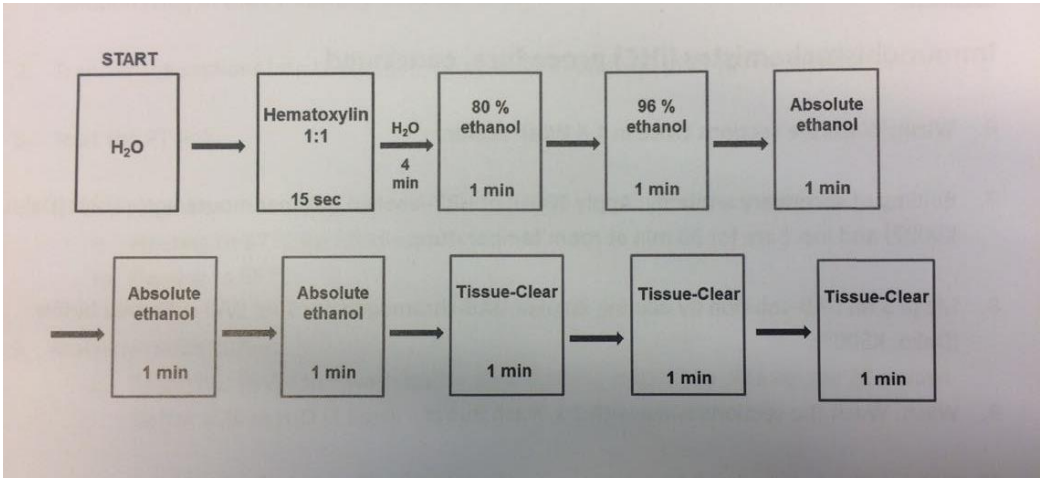
9. Mens snittene står i vaskebuffer: Fortynn antistoff med fortynningsbuffer(PDCD-4: 1:250, PTEN: 1:50, BTG2 1:25).
10. Blokkering: Påfør 100 µL Peroxidase blocking solution, inkuber i 5 minutter, romtemperatur.
11. Vask to ganger med 1x vaskebuffer.
12. Primærantistoff: Påfør 100 µL fortynnet primærantistoff på hvert snitt, Inkuber i 1 time, romtemperatur.
13. Vask to ganger med 1x vaskebuffer.
14. Sekundærantistoff: Påfør 100 µL HRP-labelled polymer mouse anti-rabbit og inkuber i 30 minutter, romtemperatur.
15. Lag nok DAB-løsning i forhold til antall snitt.

Fortynn 20 µL DAB-kromogen per 1 mL DAB-substratbuffer

16. Vask to ganger med 1x vaskebuffer.
17. Farging, **utføres i avtrekkskap**: Påfør 150 µL DAB-løsning på hvert snitt, inkuber 5 minutter, romtemperatur. Etter 5 minutter: Påfør enda 150 µL DAB-løsning til snittene, inkuber i nye 5 minutter.
18. Hell DAB-løsning over i egen avfallsbeholder og overfør snittene til vannkar.
19. Vask snittene to ganger med vann. Her kan de bli oppbevart til de skal kontrastfarges.

Kontrastfarging

20. Kontrastfarges med hematoxylin



Montering:

21. Lim på dekkglass med TissueMount.