

Forord

Denne avsluttende bacheloroppgaven for bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) er skrevet i samarbeid med Biobank 1 og Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital. Derfor vil jeg rette en stor takk til de ansatte fra begge institusjoner, for å dele sin kunnskap og vise interesse for oppgaven og meg personlig. Jeg vil spesielt takke fagbioingeniør Toril Rolfseng for uvurderlig hjelp, veiledning og støtte med praktisk gjennomføring av laboratoriearbeidet.

Arbeidet med bacheloroppgaven har vært svært spennende, lærerikt og utfordrende. Den har vært spennende og lærerik fordi den gav meg mulighet til å fordype meg i en problemstilling jeg synes er spennende og som jeg kan lære mye av. Den var utfordrende fordi den krevde store mengder praktisk arbeid, og innhenting av kunnskap som normalt sett patologer sitter på. Jeg er svært takknemlig for all ny kunnskap og den økte interessen for patologi og molekylærmedisin.

Jeg vil rette en stor takk til faglig- og prosessveileder Professor Jostein Halgunset for nøye og god veiledning, for å vise engasjement og tålmodighet, og for å gi inspirasjon til hvordan problemstillingen kunne belyses. Den siste personen jeg vil takke er stud. med. Erik Nesje Wiik for praktisk opplæring i ISH-prosedyren.

Helene Bakkemyr

Helene Bakkemyr

Sammendrag

Hensikten med prosjektet var å utføre *in situ* hybridisering for å undersøke lokalisasjonen til spesifikke mikroRNA-molekyler i vevsområder med celleforandringer og betennelsesreaksjon. Dette ble utført for vevsområder med celleforandringer som kondroid syringeom, pleomorf adenom, adenokarsinom, infiltrerende karsinom, nyrecellekarsinom, og granulasjonsvev. Fokuset i oppgaven er å undersøke hvor miRNA-molekylene miR-143 og miR-145 er lokalisert i vevsområdene, og om det potensielt er en korrelasjon mellom dem og kreftutvikling.

miRNA er små RNA-sekvenser som virker å være en kritisk del av cellenes reguleringsystem, og de antas å være involvert ved en rekke sykdommer. De er spesielt assosiert med kreft, da det antas at de fungerer som tumorsuppressorer. På grunn av dette har interessen for å tilegne seg mer kunnskap om de økt betraktelig det siste tiåret, og derfor er det mange studier som undersøker akkurat dette. De fleste studier går ut på å kvantifisere ekstrahert miRNA-materiale ved hjelp av qPCR. Fra studiene som benytter PCR-teknikker viser resultatene at vev med celleforandringer har lavere mengde av miRNA-molekyler enn vev som ikke er tumoraffisert. Disse studiene undersøker bare mengden av miRNA-molekylene og ikke hvor de er lokalisert i vevsområdene, derfor er det mye usikkerhet om resultatene virkelig er reelle. En metode som potensielt kan minske denne usikkerheten er *in situ* hybridisering (ISH), som er en semi-kvantitativ metode og baserer seg på hybridisering mellom en probe og nukleinsyren som skal undersøkes. På denne måten kan lokalisasjonen til miRNA-molekylene undersøkes i vevet (1–8).

ISH-proseduren utføres manuelt, med maks antall prøver på ti og en tidsbruk på minst syv og en halv time. Det viser seg at siden ISH er en manuell metode, har den mange mulige feilkilder som kan skape relativt store individuelle forskjeller i kvalitet mellom prøvesnittene.

Selv om ISH er en relativt usikker metode med mange mulige feilkilder, virker det som at miR-143 og miR-145 normalt produseres i celler med kontraktile egenskaper, som muskelceller, myofibroblaster og myoepiteliale celler. Ved kreft eller betennelsestilstander viser det seg at produksjon av miR-145 kan foregå i andre celler, som i epiteliale celler nærliggende tumoraffisert vevsområde eller myoepiteliale tumorceller i benigne tumorer og ved tilfeller av infiltrerende karsinom av typen NST. Hvorvidt miR-145 kan produseres i andre krefttyper gir

ikke denne oppgaven svar på, og dette må undersøkes ytterligere. Ut ifra lokalisasjonen til miRNA-molekylene kan det tenkes at miR-145 er spesielt viktig for utvikling av tumorstroma og tumorinvasjon.

Resultatene i denne oppgaven vil ikke ha noen direkte effekt på diagnostisering eller behandling av kreft, men kan være et springbrett for videre forskning innenfor temaet.

Abstract

The aim of the project was to carry out *in situ* hybridization to investigate the location of specific microRNA molecules in tissue regions with cell transformation and inflammatory response. The tissue regions used in this project had cell neoplasm such as chondroid acidoma, pleomorphic adenoma, adenoma carcinoma, renal cell carcinoma and granulation tissue. The focus of the thesis is to investigate where the miRNAs miR-143 and miR-145 are located in the tissue areas, and whether there is a potential correlation between them and cancer development.

miRNAs are small RNA sequences that appear to be a critical part of the cell's regulatory system and are believed to be involved in a variety of diseases. They are especially associated with cancer, as they are believed to act as tumor suppressors. Because of this, interest in acquiring more knowledge about them has increased significantly over the past decade, and there are therefore many scientific studies examining just this. Most scientific studies are based on quantifying extracted miRNAs using qPCR. The results generally shows that tissue regions with cell neoplasm have lower amounts of miRNA molecules than non-tumor-associated tissues. By using the PCR method, they only examine the amount miRNA molecules and not their location in the tissue region, so there is a lot of uncertainty as to whether the results are real. There is one method that can potentially reduce this uncertainty, and that is *in situ* hybridization which is a semi-quantitative method based on hybridization between a probe and the nucleic acid to be investigated. In this way, the location of the miRNA molecules can be examined in the tissue sample (1–8).

The ISH procedure is performed manually, and takes at least seven and a half hour. The method has a capacity of ten tissue samples per analysis. It turns out that since ISH is a manual method, it has many possible sources of error that can create relatively large individual differences in quality between the sample sections.

Although ISH is a relatively uncertain method with many possible sources of error, it appears that miR-143 and miR-145 are normally produced in cells with contractile properties, such as muscle cells, myofibroblasts and myoepithelial cells. However, in cancer or inflammatory conditions, production of miR-145 may occur in other cells, such as epithelial cells adjacent to

the tumor affected tissue region or myoepithelial tumor cells in benign and in cases of infiltrating carcinoma of the type NST. The question whether miR-145 can be produced in other types of cancer is not answered in this thesis, and needs further investigation. From the location of the miRNA molecules, it is conceivable that miR-145 is important for the development of tumor stroma and tumor invasion.

The results from this thesis will have no direct effect on the diagnosis or treatment of cancer, but may be a stepping stone for further research within the topic of miRNA molecules and their correlation to cancer.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	IV
1 INNLEDNING	2
2. TEORI	5
2.1 miRNA	5
2.1.1 Oppbygging, dannelse og funksjon til miRNA	5
2.1.2 miRNA interferens	5
2.1.3 Nomenklatur	6
2.2 IN-SITU HYBRIDISERING	6
2.2.1 RNA In-situ hybridisering	6
2.3 HISTOLOGI	8
2.3.1 Nyre	8
2.3.2 Generell struktur i GI-tractus	9
2.3.3 Hud	9
2.3.4 Mammae	10
2.3.5 Spyttkjertler	10
2.3.3 Tumorhistologi	10
2.3.3.1 Nyrecellekarsinom	11
2.3.3.2 Adenokarsinomer i GI-kanalen	11
2.3.3.3 mamma infiltrerende karsinom	12
2.3.3.4 Kondroid syringom	12
2.3.3.5 Pleomorft adenom	12
3 MATERIALE & METODE	13
4 RESULTATER	16
4.1 NYRECELLEKARSINOM	17
4.2 GRANULASJONSVEV	19
4.3 ADENOKARSINOM	20
4.4 KONDROID SYRINGOM	22
4.5 INFILTRERENDE KARSINOM	23
4.6 PLEOMORFT ADENOM	25
5 DISKUSJON	26
5.1 METODENS VALIDITET OG RELIABILITET	26
5.2 RESULTATENES BETYDNING	27
5.3 VIDERE ARBEID OG BETYDNING FOR KREFTDIAGNOSTISERING OG BEHANDLING	29
6 KONKLUSJON	30
7 REFERANSELISTE	31
VEDLEGG 1: FORTYNNING AV PROBER	33
VEDLEGG 2: REAGENSHEFTE	34

1 Innledning

I de siste årene har interessen for å undersøke de ikke-proteinkodende områdene av DNA økt betraktelig. Disse områdene i DNA ble før sett på som noe uten spesiell funksjon, og derfor kalt for «søppel-DNA». DNA er veldig enkelt sagt en mal for hva organismen skal bestå av, altså hvilke proteiner som skal uttrykkes for å danne et individ, samt når og hvor og i hvilken mengde. Så hva gjør egentlig de områdene som ikke leder til proteindannelse? Det er mye som tyder på at molekylene, RNA-molekyler, som dannes fra områdene har blant annet direkte funksjon i modifisering av proteinsyntesen i celler og vev. Dette betyr at området som ikke koder for et protein, regulerer proteinsyntesen. RNA-molekylene dannes gjennom en prosess kalt transkripsjon. RNA-molekyler er enkelt forklart en kopi av selve malen, altså DNA. Hovedforskjellen mellom RNA-molekyler fra de proteinkodende områdene og de fra de ikke-proteinkodende områdene, er at de førstnevnte utløser en prosess som heter translasjon. Ved translasjon vil oppskriften i RNA-molekylene omgjøres til et produkt, altså proteiner. Dette betyr at RNA-molekylene fra de ikke-proteinkodende områdene ikke blir brukt som en oppskrift, da de selv vil ha en direkte biokjemisk funksjon. En klasse slike RNA-molekyler er mikroRNA (miRNA), som er relativt små RNA-sekvenser funnet i alle eukaryote livsformer. MiRNA-molekyler utgjør en relativt liten, men kritisk del av et stort reguleringssystem, og de antas å være involvert ved en rekke sykdommer. Derfor har interessen for miRNA eksplodert i det siste tiåret, og flere tusen miRNA er allerede identifisert, men hvilke funksjoner de har og hvilke mekanismer de inngår i, er i stor grad ukjent (1,2).

En type sykdom miRNA ofte assosieres med er kreft. Kreft oppstår når cellenes signal- og kontrollsystemer forstyrres i den grad at cellene kan dele seg ukontrollert. Forandringen fra normale celler til invasive kreftceller er en tidkrevende prosess som består av flere trinn. Prosessen består hovedsakelig av genforandringer, også kalt mutasjoner, i gener som er viktige for cellenes cellyklusregulering, DNA-reparasjon, apoptose, angiogenese, cellemotilitet, signaloverføring, differensiering, celle-til-celle-interaksjoner og telomerase-aktivitet. Mutasjonene oppstår på grunn av feil under replikasjon av DNA ved påvirkning fra både indre og/eller ytre faktorer. Replikasjon er den prosessen der DNA kopieres til to DNA-molekyler før selve celledelingen (3).

Flere miRNA-molekyler er antatt å være såkalte tumorsuppressorer. Dette betyr at de forhindrer utvikling av kreft ved å regulere proteinsyntese av proteiner som fremmer celledeling. Derfor er det hensiktsmessig å tilegne seg ny kunnskap om miRNA, da det kanskje kan føre til mer spesifikke kreftmarkører og kanskje bedre behandlingsalternativer. For tiden er det mange studier som undersøker korrelasjonen mellom miRNA-mengde og ulike typer kreft. Hypotesen i studiene består som oftest av spørsmålet om miRNA faktisk fungerer som tumorsuppressorer, og om de kan benyttes som kreftmarkør eller som mål for behandling. For det meste har det blitt benyttet metoder der RNA-molekylene ekstraheres ut av vevet og kvantifiseres ved bruk av sanntids revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (Real-Time qRT-PCR) eller enkel revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-PCR) sammen med *in vitro* hybridiseringsteknikker. PCR er en metode som gir en eksponentiell produksjon av spesifikke DNA-sekvenser fra prøvematerialet. Standard PCR kan ikke alene kvantitere DNA-materialet, da den bare amplifiserer. Derfor benyttes det som oftest en hybridiseringsmetode for kvantifisering av PCR-produktet. Dette betyr at PCR-produktet bindes til en komplementær nukleotidsekvens konjugert med en markør, og signalstyrken som er proporsjonal med mengde avleses. For å kunne benytte PCR på RNA-sekvenser må de omgjøres til DNA-sekvenser (cDNA) før PCR utføres. Dette gjøres ved hjelp av revers transkriptase, som er et enzym som kan omdanne RNA til cDNA. Standard PCR er veldig tidkrevende, og det blir derfor oftere brukt en annen type PCR som kalles for sanntids PCR. Sanntids PCR baserer seg på samme prinsipp som standard PCR, men har i tillegg en form for markør som vil gi et signal ved dannelse av DNA-sekvensene. Dette signalet vil være direkte proporsjonal med mengden DNA-sekvens i PCR-materialet, og dermed kan mengden måles underveis i PCR-prosessen. Resultatene viser som oftest at mengden av enkelte miRNA-molekyler er lavere i vev med celledforandringer enn i normalt vev. Dermed konkluderes det med at miRNA-molekylene har betydning for dannelse av kreft. Men ved å benytte metoder som baserer seg på ekstrahert materiale og PCR vil bare mengden miRNA i vev med celledforandringer i forhold til mengden i normalt vev undersøkes, og ikke spesifikt hvilke celler dette gjelder. Informasjon om hvilke celler som produserer de ekstraherte miRNA-molekylene er vesentlig for å kunne avgjøre om resultatene fra disse studiene har en biologisk relevans for kreftutvikling. Dette fordi store deler av resultatene kan komme fra andre celler enn selve kreftcellene. Derfor er det nødvendig å undersøke om kreftcellene i utgangspunktet produserte miRNA-molekylene, og om forskjellen i mengde faktisk er reell for tumorvevet (1,4-

7). Andre undersøkelser som også er utført med tanke på miRNA er, *in vivo* «gain-of-function» og «loss-of-function». Dette betyr at miRNA-molekylenes funksjon undersøkes ved å enten inaktivere de eller tilsette de i levende organismer, ofte mus eller rotter. Ved å undersøke effekten av de genetiske modifikasjonene vil heller ikke miRNA-molekylenes celle-spesifisitet undersøkes, men resultatet kan gi en indikasjon på hvilken rolle miRNA-molekylene har i organismen (1,2,8).

En metode som potensielt kan tette kunnskapshullet om miRNA-molekylenes celle-spesifisitet er *in situ* hybridisering (ISH). Ved ISH inkuberes vevet med en syntetisk nukleinsyresekvens som er komplementær til det miRNA som er av interesse. Den syntetiske sekvensen er konjugert med en markør, for eksempel et antigen, som i neste omgang lar seg visualisere i mikroskopet (2). Resultatene som oppnås ved ISH er semi-kvantitativ, men gjør det mulig å observere de ulike cellenes produksjon av miRNA-molekyler. Dette gir informasjon om hvilke celler som produserer miRNA-molekylene og i hvor stor grad de blir produsert (1).

miR-145 og miR-143 er to miRNA-molekyler som transkriberes sammen, og som det er utført flere studier av for å undersøke deres korrelasjon til kreftutvikling. Fra flere av de tidlige studiene der det er utført undersøkelser av mengde ekstraherte molekyler og *in vivo* «gain-of-function» og «loss-of-function», tyder resultatene på at miR-145 og miR-143 fungerer som tumorsuppressorer i epitelceller, og de har vært betraktet som gode kandidater til kreftbehandling. Dette blir i dag vurdert som usikkert, fordi en del resultater fra nyere *in situ* og *in vivo* studier tyder heller på at miR-145 og miR-143 produseres i stromale celler istedenfor epitelceller. Det er derfor hensiktsmessig å redusere usikkerheten rundt miR-145 og miR-143 ved å undersøke hvilke celler som produserer og påvirkes av de, og hvordan de tar del i regulering av celledeling (1,4–7). Dette skal denne oppgaven bidra med ved å benytte ISH til å påvise og kartlegge utbredelsen av miR-145 og miR-143 i vev med celleendringer, og om det potensielt er en korrelasjon mellom dem og kreft.

2. Teori

2.1 miRNA

2.1.1 Oppbygging, dannelse og funksjon til miRNA

MiRNA er små dobbeltrådede RNA-molekyler på 21 til 28 basepar, som har regulatorisk funksjon ved post-transkripsjonell regulering. De små miRNA-molekylene dannes fra større dobbeltrådede RNA-molekyler ved hjelp av endonukleaser som er spesifikke for dobbeltrådet RNA, også kalt Dicer-enzymene. De store RNA-molekylene transkriberes fra gener som ikke koder for proteiner. Det primære transkriptet er et langt RNA-molekyl som danner komplementære baseparbindinger med seg selv, og derav gi den en hårklemmestruktur. Inne i cellekjernen vil løkken fra hårklemmestrukturen fjernes ved hjelp av enzymet Drosha. Når løkken er fjernet, fraktes RNA-molekylet gjennom kjernemembranen og ut i cytoplasma. Der brytes fosfodiesterbindinger mellom nukleotidene i RNA-molekylet av Dicer-enzymene, som da danner miRNA-molekylet (9).

2.1.2 miRNA interferens

MiRNA-interferens er den regulatoriske prosessen miRNA tar del i. For at miRNA skal ha en inhiberende funksjon på translasjon, dannes komplekset «RNA-induced Silencing Complex» (RISC) som består av enkelttrådet miRNA og ribonukleoprotein-partikler. RISC kan inhibere translasjon ved at basene til miRNAet binder seg til relativt komplementære basesekvenser i proteinkodende RNA-molekyler. Om basesekvensene er komplementær med RNAet brytes det ned, mens om paringen bare er delvis forblir RISC bundet til RNAet og fysisk blokkerer transkripsjonsprosessen (9).

2.1.3 Nomenklatur

Et nyopplagget miRNA molekyl vil få tildelt et navn bestående av tre eller fire bokstavprefikser for å betegne arten, prefiks miR og et tall som oftest er valgt ut fra rekkefølgen de blir oppdaget i. Et eksempel er hsa-miR-102, der «hsa» står for *homo sapiens*. Om det dobbeltrådig RNA-molekylet som er forløperen til miRNA skal navnesettes, benyttes prefiks mir istedenfor miR (10).

2.2 *In-situ* hybridisering

In-situ hybridisering (ISH) er en teknikk som muliggjør deteksjon av nukleinsyrer i vevspreparater og andre cellepreparater (10).

Selve hybridiseringen utnytter nukleinsyresekvensenes evne til å danne komplementære baseparbindinger med andre nukleinsyresekvenser. Hybridisering benyttes til å feste en probe konjugert med en markør til en DNA eller RNA sekvens ekstrahert ut fra (*In-vitro*) eller i selve prøvematerialet (*in-situ*) (2).

2.2.1 RNA *In-situ* hybridisering

Det formalinfikserte og parafinstøpte vevet som skal undersøkes må gjennomgå en rekke forbehandlinger som skal gjøre vevet og cellene mer tilgjengelige og miljøet i vevspreparatet optimalt for løsningene som skal benyttes, før RNA ISH kan gjennomføres. Forhandlingene består hovedsakelig av deparafinering, rehydrering og proteasebehandling. Proteasebehandlingen gjør RNA mer mottakelig for hybridisering ved at enzymene bryter ned og fjerner proteiner. Dette bidrar til å øke permeabilitet og fjerner eventuelle proteiner bundet til RNA. RNA, og dermed også probene, kan danne sekundære strukturer, så det kan være hensiktsmessig med varmebehandling av både vevsmateriale og prober. Dette må utføres med forsiktighet for å unngå denaturering av dobbeltrådig DNA, da probene kan ende opp med å feste seg til genet istedenfor RNA-molekylet. Under selve hybridiseringen er det en rekke faktorer som det må tas hensyn til. Hovedfaktorene som påvirker hybridiseringens stringens (stringens er et mål på kvaliteten til hybridiseringsreaksjonen) er temperatur, saltkonsentrasjon, guanin- og cytosininnhold, formamidkonsentrasjon og lengden til proben. Jo kortere proben er, desto høyere er

sannsynligheten for uspesifikk binding av proben. En optimal saltkonsentrasjon bidrar til å stabilisere hybridene ved å senke basenes løselighet, mens formamid har den motsatte effekten og bryter opp hydrogenbindingene. Mengden guanin og cytosin påvirker hybridstabiliteten ved at guanin og cytosin danner sterkere bindinger mellom hverandre enn adenin og uracil (guanin og cytosin bindes med tre hydrogenbindinger, mens tymin og uracil bindes bare med to). Dermed fører større mengder med guanin og cytosin til høyere hybridstabilitet. Temperaturen bør være så nært smeltepunktet som mulig for å unngå hybridisering mellom sekvenser med lav homologi. Faktorenes optimum varierer for hver enkelt ISH-metode, og derfor er det nødvendig å gjennomføre prøverunder hvor faktorene testes ut før gjennomføring av forsøket. Etter endt hybridisering er det viktig å vaske bort ubundne prober og bryte uspesifikke bindinger for å optimalisere resultatet. For å oppnå dette må preparatene vaskes i løsninger med formamid og saltcitrat (SSC). Det kan være nødvendig med videre behandling, som tilsetning av substrater eller andre løsninger som trengs for å oppnå signal, av preparatene ut ifra hvilken markør som benyttes. En type markør som ofte brukes er immunenzymatiske markører, som utnytter antistoffenes egenskap til å binde seg til antigener. Denne typen markører består som oftest av antistoff konjugert med et enzym som kan gjøre om et fargeløst substrat til et fargestoff. (2,10).

Ved RNA ISH er det også viktig å unngå kontaminering av enzymklassen RNaser og benytte objektglass med bindemidler for å unngå tap av vev. Kontaminering av RNaser fører til nedbrytning av RNA i vevsprøven og kan gi falskt negativt ISH resultat. For å unngå dette må alt av utstyr som tåler varmebehandling, varmebehandles ved minimum 250°C, og annet utstyr vaskes med kjemisk deaktivator. I tillegg autoklaveres alle løsninger etter behandling med diethylpyrocarbonat (DEPC). DEPC inaktiverer RNaser ved å kovalent modifisere aminosyrene histidin, lysin, cystein og tyrosin i enzymene og andre proteiner i løsningene. Aktiv DEPC kan også påvirke vevspreparatene i ISH, og må derfor inaktiveres ved autoklaving (10).

2.3 Histologi

Generelt deles organer inn i to bestanddeler: Parenchym og stroma. Parenchym er den funksjonelle delen av organet og inneholder celler som utøver organets hovedfunksjon, mens stroma er alt av struktur og celler rundt parenchymet. Stroma bidrar til å opprettholde organets struktur, form og bevegelse, og består hovedsakelig av ekstracellulær matriks (kollagen, proteoglykaner, elastin, retikulære fibre og glykoproteiner), stromale celler, blodkar, nerver og forskjellige typer kanaler. Celletypene som finnes i stroma er hovedsakelig fibroblaster og immunceller, om celler i blodkar, nerver og andre kanaler ikke inkluderes. Fibroblastene har som funksjon å produsere ekstracellulær matriks, og er derfor viktige for stromaoppbygning og vedlikehold. Immuncellene bidrar i betennelsesreaksjoner i vevet (11).

2.3.1 Nyre

Nyrene kan deles opp i to lag, nyrebarken og nyremargen. Nyrebarken er den ytre delen av nyrene, hvor glomerulus, Bowmans kapsel, urinspalte, proksimale tubulus, macula densa, distale tubulus, afferent og efferent arteriole kan observeres. Bowmans kapsel er bygd opp av et parietalt lag med plateepitel og et visceralt lag med podocytter. I glomerulus finnes det også enda en celletype, mesangialceller. Hulrommet i Bowmans kapsel leder ut i proksimale tubulus, som består av enlaget kubisk epitel dekket med mikrovilli. Proksimale tubulus går over til Henlessløyfe. Henlessløyfe deles inn i en nedovergående del og en oppgående del, som igjen deles inn i tykk og tynn del. I nyrebarken er det for det meste den tykke nedovergående og oppgående delene som observeres i histologiske snitt. Det kan være vanskelig å skille mellom Henselssløyfe og kapillærer i histologiske snitt, men veggen i Henselssløyfe skal normalt sett være litt tykkere. Den tykke oppgående delen av Henselssløyfe går over i distale tubulus. Distale tubulus består av enlaget kubisk epitel dekket av korte mikrovilli. Rundt selve nyrevevet ligger det en fibrøs kapsel som kan observeres i histologiske preparater av nyrebarken. I nyremargen er det samlør og tubulussystemet som kan observeres (12).

2.3.2 Generell struktur i GI-tractus

Generelt består GI-tractus av fire forskjellige lag: mucosa, submucosa, muscularis externa og adventitia. Mucosa består av epitelceller, et lag med bindevev (lamina propria) og et lag med glatt muskelceller (muscularis mucosae). I lamina propria kan kjertler, lymfekar og lymfepolikler observeres. Under mucosa ligger submucosa, som er et bindevevslag som omgir mucosa. I submucosa kan det observeres kjertler, nerveplaksus, lymfe- og blodkar, litt ut ifra om det er ventrikkel, tynntarm eller tykktarm. Muscularis externa er to lag med glatt muskulatur som ligger under submucosa. Laget med glatt muskulatur deles i to forskjellige lag ut ifra retningen til muskelcellene, et indre sirkulært lag og et ytre longitudinalt lag. Adventitia består av kun bindevev som binder GI-tractus til nærliggende vev (13).

2.3.3 Hud

Generelt består huden av tre lag: Epidermis, dermis og subcutis. Epidermis er det ytterste laget som består av keratinisert flerlaget epitelceller, i tillegg til negler, hår og utførsels ganger fra kjertler. Epidermis kan deles opp i fem lag: stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum og stratum basale. Stratum corneum er et lag av døde og keratiniserte celler uten kjerne. Stratum lucidum er bare tilstede i områder med tykk hud, og består av 4-7 cellelag med delvis degraderte kjerner. Under stratum corneum ligger stratum granulosum som er et 3-5 cellelag tykt lag med avlange og relativt flate celler med kjerner. Stratum spinosum er normalt det tykkeste laget i epidermis, og består hovedsakelig av keratinocytter som har et manglekantet utseende. Stratum basale er det nederste laget som ligger mot dermis, og er et enkelt lag av sylindrisk-kubiske celler. Dermis ligger mellom epidermis og subcutis, og består av elastokollagenøst bindevev med blodkar, nerver og nerveender. Under dermis ligger subcutis som hovedsakelig er et lag av løst fibret bindevev og fett i varierende mengder (12).

2.3.4 Mammae

Mammae består av omkring 15 til 20 lober, som omtales som lobus i entall. Hver lobus består av mindre enheter som kalles for lobuli, og har sine egne utførselsganger som føres ut til sinus lactiferus hvor melken kan lagres. Kjertelvev i hvilefase består hovedsakelig av epitel med myoepiteliale celler liggende mellom seg. Når kjertelvevet aktiveres utvikles melkekjertlene som kalles for alveoli. Alveoliene består av kubisk epitelceller (alveolare celler) som er omgitt av myoepiteliale celler. Myoepiteliale celler har som funksjon å tømme alveoli ved å kontrahere (12).

2.3.5 Spyttkjertler

Spyttkjertler er eksokrine kjertler med varierende sammensetning av mukøse og serøse kjertelceller. At kjertelcellene er serøse betyr at de produserer et sekret som er tyntflytende med relativ høy mengde enzymer, mens mukøse kjertelceller produserer et mer tyktflytende sekret med høyt polysakkaridinnhold. Generelt vil spyttkjertler plassert lengre ut mot munnåpningen inneholde større mengder mukøseceller enn spyttkjertlene lengre bak i munnhulen, der ørespyttkjertelen (Glandula parotis) bare består av serøse kjertelceller (13).

2.3.3 Tumorhistologi

Det er viktig å ta hensyn til at kategorisering av tumortyper aldri er fullstendig, og mange tumortyper kan tilhøre flere kategorier.

Maligne tumorer kan grovt deles inn i tre kategorier ut ifra hvilket embryonale lag tumorcellene utvikles fra: Karsinom, sarkom og lymfo-hematopoetiske neoplasmer. Karsinomer oppstår i epitelceller fra de embryonale lagene endoderm og ektoderm. Det som kjennetegner karsinomer i histologiske preparater er at kreftcellene bryter gjennom sin basalmembran og trenger inn i ikke-epitelvevet. Selve kreftcellene har et varierende epitellignende utseende. Sarkomer oppstår i mesenchymale celler, det vil si celler som stammer fra det embryonale laget mesoderm. Dette betyr at sarkomer oppstår i vev som ikke består av epitelceller. I sarkomer kan ikke gjennomvekst av basalmembran brukes som malignitetskriterium. Selve kreftcellene har et veldig varierende utseende ut i fra hvilke celler og organ de oppstår i, men blir ofte observert

som mer eller mindre spindelformet. Lymfo-hematopoetiskeneoplasmer oppstår fra celler som har opphav i mesoderm. Kreftcellene i denne kategorien er ofte celler som oppholder seg i kroppsvæsker, som blod og lymfe, og de vil derfor ikke bli vurdert histologisk men cytologisk (14)

2.3.3.1 Nyrecellekarsinom

Den vanligste krefttypen i nyrer er klarcellet nyrecellekarsinom, etterfulgt av papillært nyrecellekarsinom. De klarcellede nyrecellekarsinomene er vaskulære og oppstår som oftest i epitelceller fra proksimale tubulus. Kreftcellene kan kjennetegnes ved at de er relativt store, og cytoplasma er klart med rikelige mengder med glykogen og lipider. Om det ikke benyttes fargestoffer direkte rettet mot glykogen og lipidene, forblir cytoplasma typisk ufarget i histologiske preparater. Papillært nyrekarsinom kan kjennetegnes ved at tumoren har en ujevn struktur bestående av mange utløpere. Kreftcellenes utseende varierer mye fra kreftcellene i klarcellet nyrekarsinom. Ut ifra krefttypenes utseende kan papillært nyrecellekarsinom deles inn i to undergrupper: type 1 og type 2. Kreftcellene i type 1 er små celler med høy N/C-ratio, og sfærisk formet cellekjerner. I type 2 er kreftcellene store celler med lavere N/C-ratio, eosinofil cytoplasma og sfærisk formet cellekjerner (14,15).

2.3.3.2 Adenokarsinomer i GI-kanalen

Den vanligste krefttypen i den gastrointestinalkanalen (GI-kanalen) er adenokarsinomer, som oppstår fra kjertelvevet. Adenokarsinomer i ventrikkelen kan grovt deles opp i to kategorier, intestinal type og diffus type. Den intestinale typen danner en direkte tumormasse av kjertelelementer som skiller ut intestinal mucin. I motsetning til den intestinale typen danner ikke den diffuse typen noe direkte, avgrenset tumormasse, men vil heller gi en fortykkelse i selve tarmveggen. Det diffuse tumorvevet består hovedsakelig av signetringceller. Sighetringceller kjennetegnes ved at de har en eller flere store mucinvakuoler som presser cellekjernen ut mot cellens cellemembran (14,16).

2.3.3.3 mamma infiltrerende karsinom

Infiltrerende karsinom er en krefttype som oppstår i brystvevet hos kvinner og i noen tilfeller hos menn. Denne tumortypen deles inn i to underklasser ut ifra om de oppstår i cellene til melkegangene eller melkekjertlene. De som oppstår fra celler i melkegangene betegnes som duktale karsinomer. Denne typen danner tumorer med høyere tetthet enn resten av brystvevet når den infiltrerer fibrøst- og fettvev i brystet. Duktale karsinomer kan igjen deles opp i to typer, der den mest vanlige er «No Special Type» (NST) og den mer sjeldne er medullær type. Tumorene som oppstår fra celler i melkekjertlene betegnes som lobulær karsinomer. Ved denne typen vil tumorcellene ligge diffust rundt i vevet, og danner derfor ikke en tumor med kjennbart tettere masse enn normalt brystvev (14,17).

2.3.3.4 Kondroid syringom

Kondroid syringom er benign neoplasme som oppstår fra celler i svettekjertler og svetteganger i hud. De består som oftest av epiteliale strukturer i mikrotubulært eller mer løsmasket strukturer (mesangiale) mønster. I noen tilfeller av kondroid syringom kan også «skygge»-celler av hårfollikler og sebocytter observeres. Stroma til kondroide syringom vil ofte være fibroblastisk, mukoid, og ved sjeldne tilfeller osteoid (14,18).

2.3.3.5 Pleomorft adenom

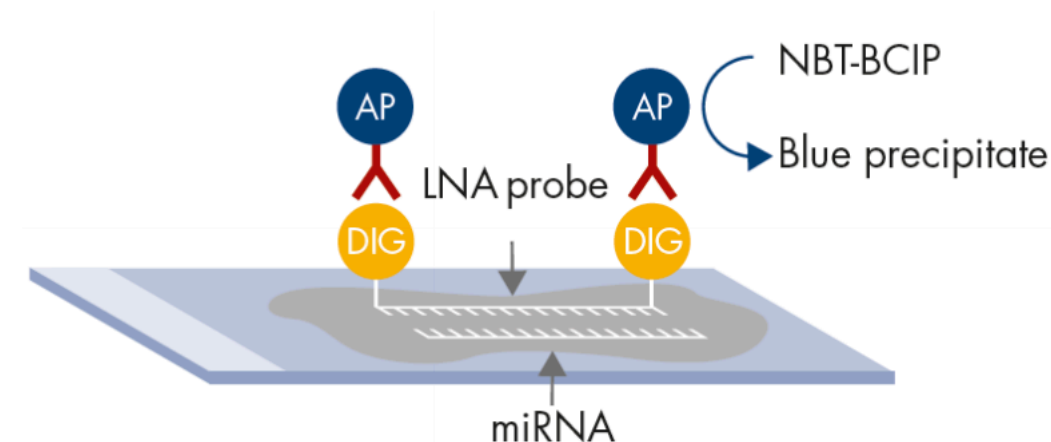
Pleomorft adenom er i de fleste tilfeller benign neoplasme bestående av epiteliale og myoepiteliale elementer, med stor individuell variasjon i oppbygning av stroma, som oppstår i spyttkjertler. Tumorer av denne typen er typisk innkapslet i et tynt fibrøst lag som kan observeres mikroskopisk, og karakteriseres ved å ha en veldig variabel sammensetning og vekst. Det er også vanlig å finne mindre tumorøyer med i nærheten av hovedtumoren (13,14).

3 Materiale & metode

Metoden baserer seg på miRCURY LNA miRNA ISH Optimization Kit fra produsenten QIAGEN. Settet består av tre digoxigenin(DIG)-merkede prober: en probe for kjent miRNA, Scramble-miR probe som benyttes som negativ kontroll, og U6 snRNA probe som positiv kontroll. Det inneholder også proteinase K og tilhørende buffer.

Digoxigenin festet til proben er hentet fra planter, og er bare én del av markøren. For å kunne detektere miRNA i vevet må det flere deler til. Siden digoxigenin er hentet fra plante og ikke pattedyr, vil antistoffer fra pattedyr binde seg til digoxigenin med antigen-antistoff-binding. Derfor blir det tilsatt pattedyr-antistoffer konjugert med enzymet alkalisk fosfatase (AP), som vil binde seg til digoxigenin og potensielt produsere et farget produkt ut fra egnede substrater. Substratene som tilsettes ved denne metoden er 4-nitro-blue tetrazolium (NTB) og 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate (BCIP), som vil bli konvertert til et mørkt blått NBT-BCIP presipitat.

Proteinase K benyttes i prosedyren for å gjøre det lettere for proben å komme i kontakt med miRNA i vevet (19).



Figur 3- 1: Viser prinsippet til miRCURY LNA miRNA ISH Optimization Kit. Etter protease K-behandling av vevssnittene, tilsettes de DIG merkede LNA probene som vil da hybridiseres med sine respektive miRNA-molekyler. Etter hybridiseringen tilsettes AP som er konjugert med anti-DIG, som da vil feste seg til DIG. For å danne fargestoffet tilsettes substratene NTB og BCIP som vil bli omdannet til et blått presipitat (19).

For å beskytte vevspreparatene fra RNAsaser, ble ISH og alle forberedelser til ISH utført i et RNase-fritt laboratorium.

Vevssnitting og forberedning av probe-løsninger har fortrinnsvis blitt utført én dag i forveien av selve ISH-prosedyren. Vevsblokkene ble snittet til 4µm tykke vevssnitt ved hjelp av rotasjonsmikrotom instrumentet LEIKA RM2255 med registreringsnummer 6186 og vannbadet LEICA HI1210, og montert på Menzel-glass SUPERFROST PLUS fra Thermo SCIENTIFIC. Ved bruk av varmeblokken QBD2 fra produsenten Grant, ble probe-løsningene varmebehandlet (4 min, 90°C), for deretter å bli fortynnet fra 25µM til 50nM (Se Vedlegg 1: Fortynning av probe) ved tilsats av tilpasset volum hybridiseringsbuffer. De fortynnede probe-løsningene ble deretter alikvotert (375µL) til DNA-LoBind eppendorfrør og fryst ned (-18°C).

Før ISH kunne gjennomføres ble vevssnittene deparafinert, rehydrert og avmaskert.

Deparafinering ble utført ved å varmebehandle (60 °C) vevssnittene over natt, før kjemisk behandling med xylen (3 x 10 min) i fargekar. Da xylen er svært giftig, ble deparafinering utført i avtrekkskap. Til rehydrering av vevssnittene ble fargekar med løsningene absolutt etanol (skylte 10 x 2 og vasket i 5 min), 96% etanol (skylte 10 ganger og vasket i 5 min) og 70% etanol (skylte 10 ganger og vasket i 5 min) benyttet. Samtidig med deparafinering og rehydrering ble proteinase K-løsningen (20µg/mL) laget.

Vevssnittene fra fargekaret med 70% etanol ble overført til et ståglass med PBS. Deretter ble ét og ét vevssnitt ført inn i inkuberingsinstrumentet DAKO hybridizer. Samtidig som dette ble gjort ble vevssnittene ringet rundt med DAKO-tusj og tilsatt nylaget proteinase K-løsning (20µg/mL, 1000µL) ved hjelp av automatpipette (100-1000µL), før inkubering ble igangsatt (20 min, 37°C). Etter endt inkubering ble vevssnittene vasket i to omganger med PBS i et nytt ståglass. Etter vask med PBS fikk vevssnittene påført probe-løsning (75µL) ved hjelp av automatpipette (20-200µL) og før de ble dekket med passende varmebehandlet dekkglass. For å unngå uttørring av vevssnittene ble spalten mellom dekkglasset og objektglasset tettet med Flexgum, før ny runde med inkubasjon (60 min, 53°C). Fjernet dekkglass og Flexgum av vevssnittene før de ble satt i et ståglass med romtemperert 5 x SSC-buffer (25%, 5 min). Overførte videre vevssnittene til tre forskjellige og forvarmede SSC-buffere: 5 x SSC (25%, 5 min, 53°C), 1 x SSC (5%, 2 x 5 min, 53°C) og 0,2 x SSC (1%, 3 x 5 min, 53°C), for deretter å bli overført til et nytt ståglass med romtemperert PBS. Vevssnittene ble lagt inn i et fuktekammer samtidig som de ble ringet rundt

med DAKO-tusj på nytt. Før inkuberingsstart (15 min, romtemperatur) ble de påført nylaget blokkeringsløsning (5%, 800 μ L) ved hjelp av en automatpipette (100-1000 μ L). Fjernet blokkeringsløsningen og tilsatte nylaget anti-DIG-AP-løsning (500 μ L) ved hjelp av automatpipette (100-1000 μ L) før ny runde med inkubering i DAKO hybridizer (30 min, 30°C). Overførte vevssnittene til et ståglass med PBS-T (3 x 3min), for deretter føre de tilbake til DAKO hybridizer. Der ble de tilsatt nylaget substrat-løsning (400 μ L) ved hjelp av en automatpipette (100-1000 μ L) før inkubering (120 min, 30°C) med lysbeskyttelse. Vevssnittene ble deretter vasket med KTBT (2x5min) i et ståglass, for så å bli skylt i rennende springvann (2 min). For å skape fargekontraster i vevet, ble vevssnittene farget med kjernefargen Nuclear Fast Red (1 min) og skylt i rennende springvann.

Vevspreparatene måtte dehydreres og klarnes før de kunne monteres. Vevet ble dehydrert ved bruk av løsningene 70% etanol (skylt 10 ganger, vasket i 1 min), 96% etanol (skylt 10 ganger, vasket i 1 min) og absolutt etanol (skylt 10 ganger, vasket i 1 min). Overførte vevspreparatene til et ståglass med xylen, som fjernet rester av lim og DAKO-tusj. Monterte vevssnittene ved bruk av TissueMount og dekkglass, her var det viktig å unngå dannelse av luftbobler. Fjernet eventuelle luftbobler ved å bruke en finger eller en trepinne til å presse luftboblene vekk fra vevssnittet. De ferdig monterte vevspreparatene ble lagt flatt og lysskjermet inne i avtrekkskapet til tørk, da det kan være rester av xylen på vevspreparatene. Resultatet fra ISH ble undersøkt ved bruk av mikroskopet Nikon ECLIPSE 50i med påkoblet kamera og tilhørende dataprogram «Infinity».

For tillaging av løsninger som benyttes i prosedyren, se vedlegg 2: Reagenshefte.

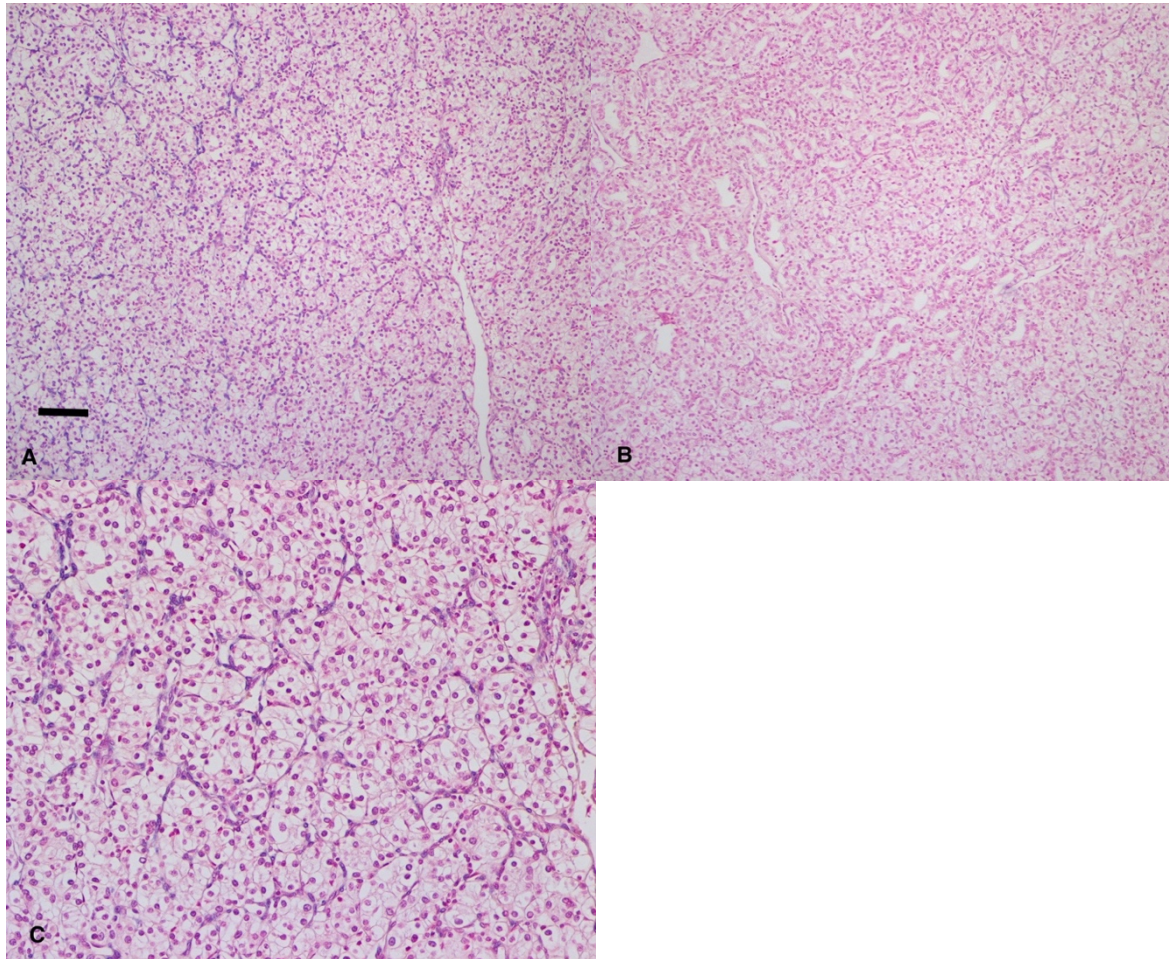
4 Resultater

Kontrollresultatene for U6 er positiv ved alle analyserunder, mens kontrollresultatene for SCR er negativ ved alle analyserunder.

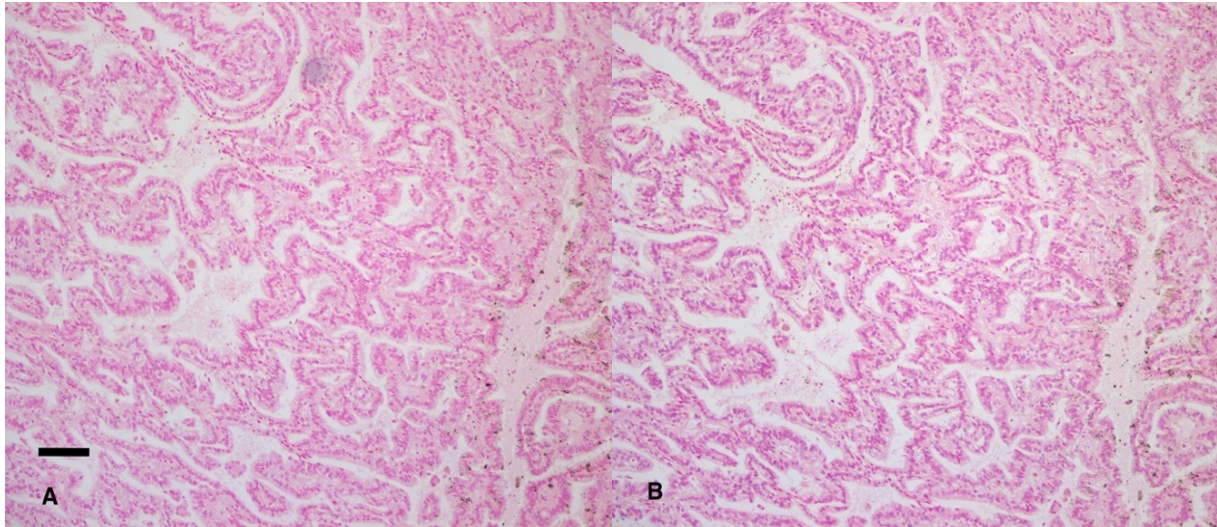
Generelt ved denne undersøkelsen er det observert at miR-143 gir et svakere hybridiseringssignal enn miR-145 i samme vevs- og celletype. Det viser seg at det også er store ansamlinger av lymfocytter og leukocytter, som er negative for begge miRNAer, i nærheten av tumor i alle vevssnittene. Alle vevssnitt inneholder områder med glatt muskulatur, der det observeres hybridiseringssignal fra både miR-143 og miR-145 i muskelcellenes cytoplasma og cellekjerne. Det er heller ingenting som tyder på at det er noen forskjell i hybridiseringssignal i glatt muskulatur mellom tumorområdet og området uten tumoraffeksjon.

4.1 Nyrecellekarsinom

Det er observert hybridiseringssignaler i fibroblaster fra både miR-143 og miR-145 i klarcellet nyrecellekarsinom, men signalet fra miR-143 er relativt svakere enn det fra miR-145. Det virker også som at hybridiseringssignalene er relativt sterkere i tumors ytterkant enn lengre inn i tumor. I nyrevev med papillært nyrecellekarsinom er det hverken hybridiseringssignaler fra miR-143 eller miR-145 i annet enn den glatte muskulaturen i tunica media i blodkarene.



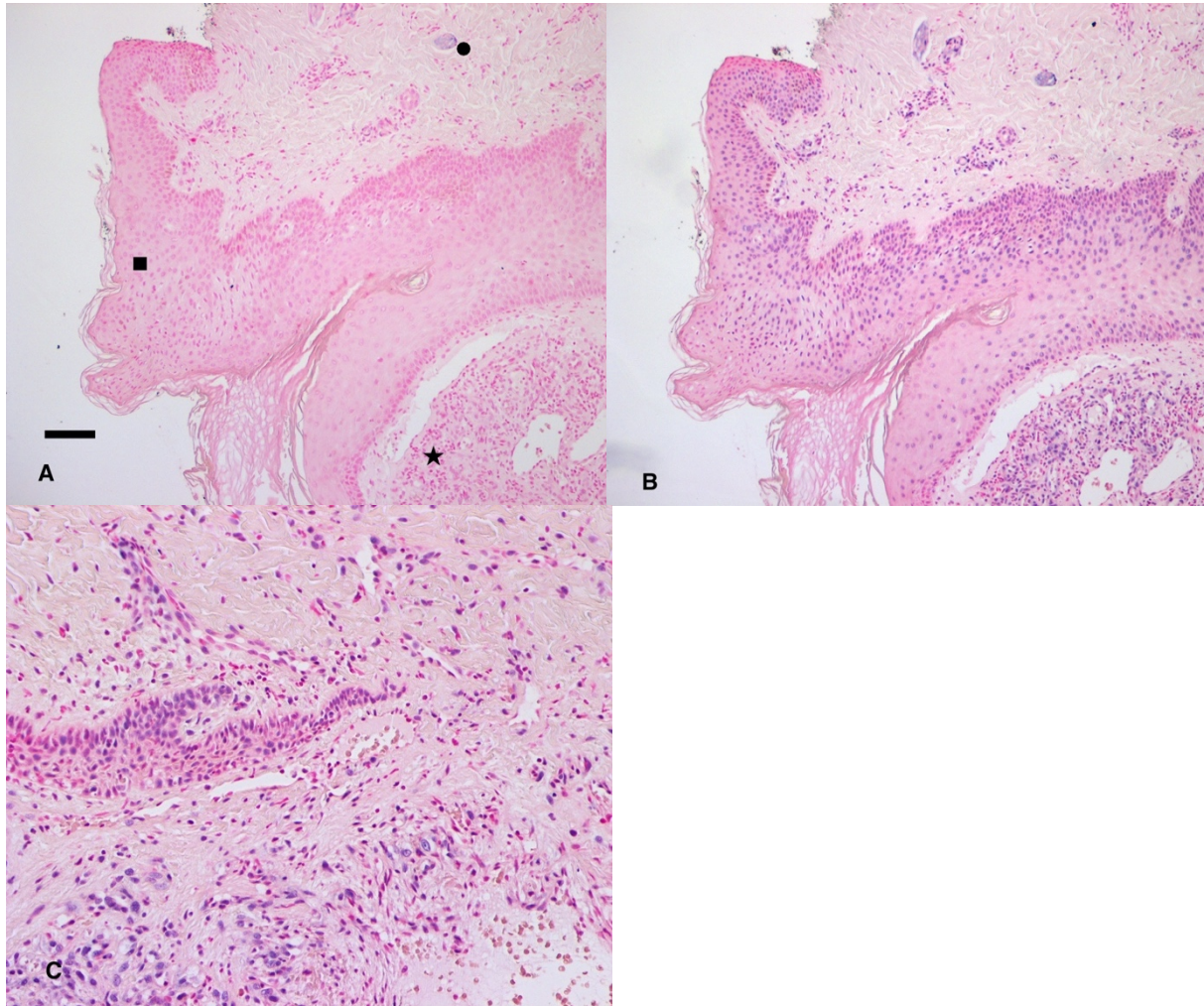
Figur 4- 1: : Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsområder fra nyre med klarcellet nyrecellekarsinom. A. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser sterkt hybridiseringssignal fra miR-145 i reaktivt stroma. B. vevsområde med tumoraffeksjon som viser antydning til hybridiseringssignal fra miR-143 i reaktivt stroma. Streken i bildet representerer 0,1mm i A og B. C. Samme vevssnitt som A, men ved dobbelt forstørrelse. Dermed vil streken representere 0,05mm i C. Det kan tydelig observeres hybridiseringssignal fra miR-145 i langstrakte cellekerner, som kan gjenkjennes som myofibroblaster. I tillegg kan det observeres større mengde immunceller, som leukocytter og lymfocytter, i vevsområdet.



Figur 4- 2: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsområder fra nyre med papillært nyrecellekarsinom. A. Vevs område med tumoraffeksjon uten noen form for hybridiseringssignal fra miR-145. B. vevs område med tumoraffeksjon uten noen form for formhybridiseringssignal fra miR-143. Streken i bildet representerer 0,1mm i A og B.

4.2 Granulasjonsvev

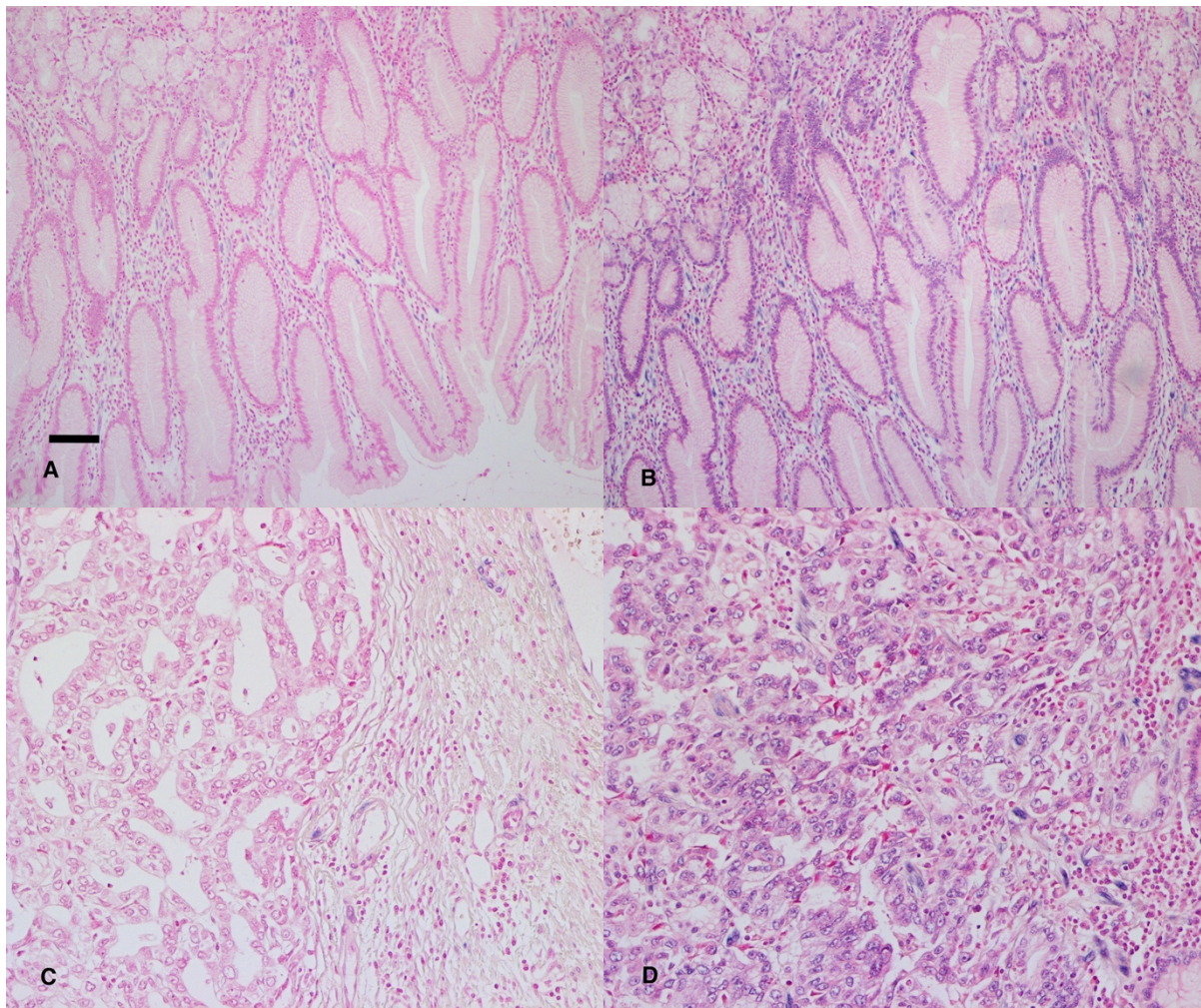
I granulasjonsvevet observeres det stor forskjell i hybridiseringsresultatene mellom miR-143 og miR-145. miR-145 gir hybridiseringssignaler i cellekjernene til epitelcellene i epidermis, epiteliale celler i granulasjonsvevet, fibroblaster, kondrocytter og celler i ytre rotkjede i hårfollikler. I motsetning gir ikke miR-143 noen andre hybridiseringssignaler enn de i glatt muskulatur.



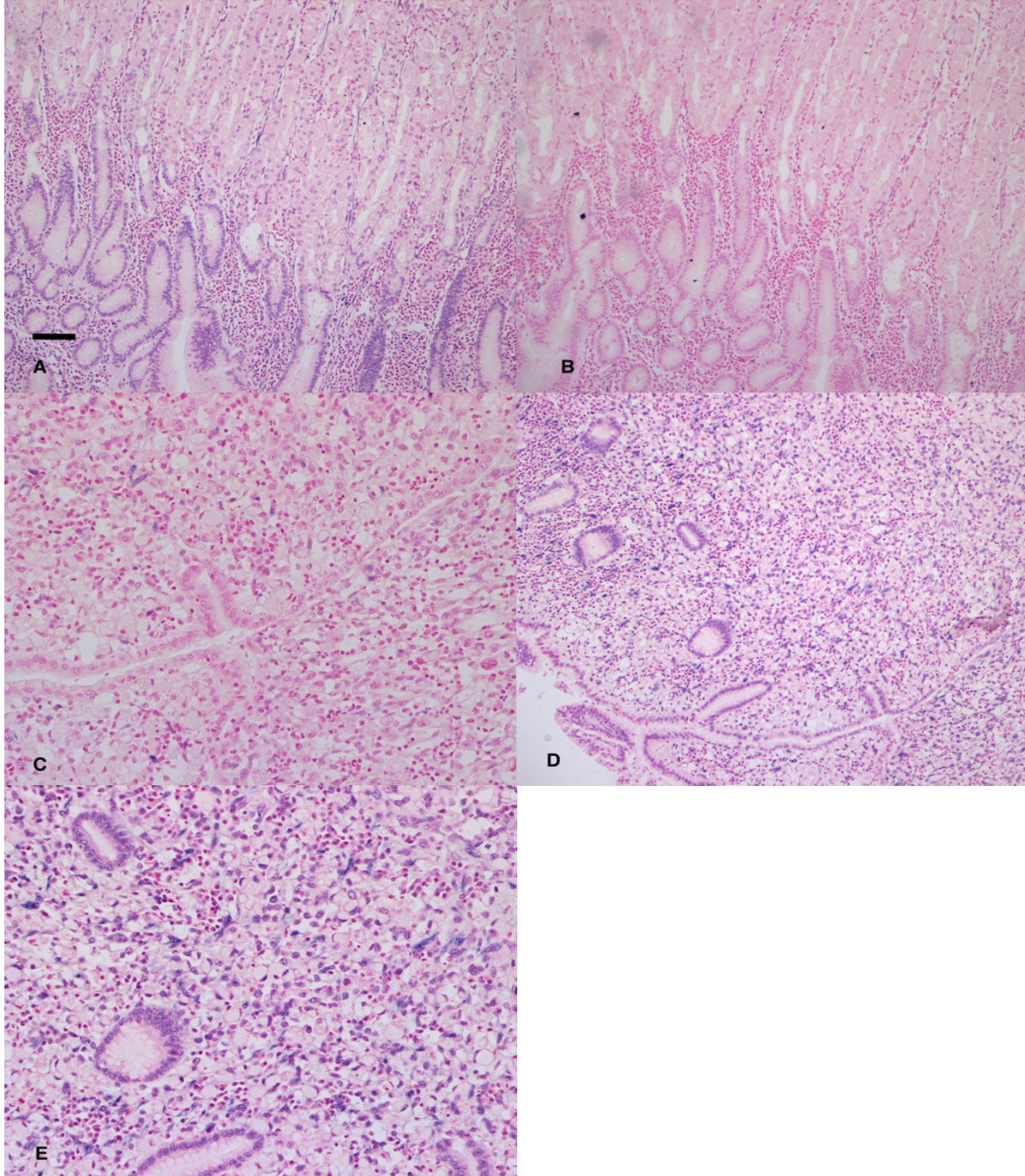
Figur 4- 3: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsrområder fra hud med granulasjonsvev. Firkanten i bildet representerer epidermis, sirkelen representerer blodkar, og stjernen representerer granulasjonsvevet. A. Vevsrområde med tumoraffeksjon uten antydning til hybridiseringssignal fra miR-143 i granulasjonsvevet og epidermis, men kan observere hybridiseringssignal fra miR-143 i cytoplasma og cellekjerner til glatt muskelceller i blodkarene. B. vevsrområde med tumoraffeksjon som viser hybridiseringssignal fra miR-145 i cellekjernene til epiteliale celler i granulasjonsvevet, myofibroblaster, kondrocytter, epitelcellene i epidermis, og cellene i ytre rotkjede i hårfolliklene. Streken i bildet representerer 0,1mm i A og B. C. Samme vevssnitt som B, men ved dobbelt forstørrelse. Dermed vil streken representere 0,05mm i C. Det kan tydelig observeres hybridiseringssignal fra miR-145 i cellekjernene til om lag halvparten av de stromale cellene. I tillegg kan det observeres større mengde immunceller, som leukocytter og lymfocytter, i vevsrområdet.

4.3 Adenokarsinom

I vevssnittene bestående av både normalt ventrikkelvev og adenokarsinom av enten diffus type eller intestinal type er hybridiseringssignaler fra miR-143 bare observert i cytoplasma og cellekjernen til glatte muskelceller. Hybridiseringssignalene fra miR-145 er derimot også i normale epitelceller i nærheten av tumorområdene, myofibroblaster i reaktivt stroma, og i selve tumorcellene til begge typer. I tumorcellene er hybridiseringssignalene svakere enn i de nærliggende normale epitelcellene.



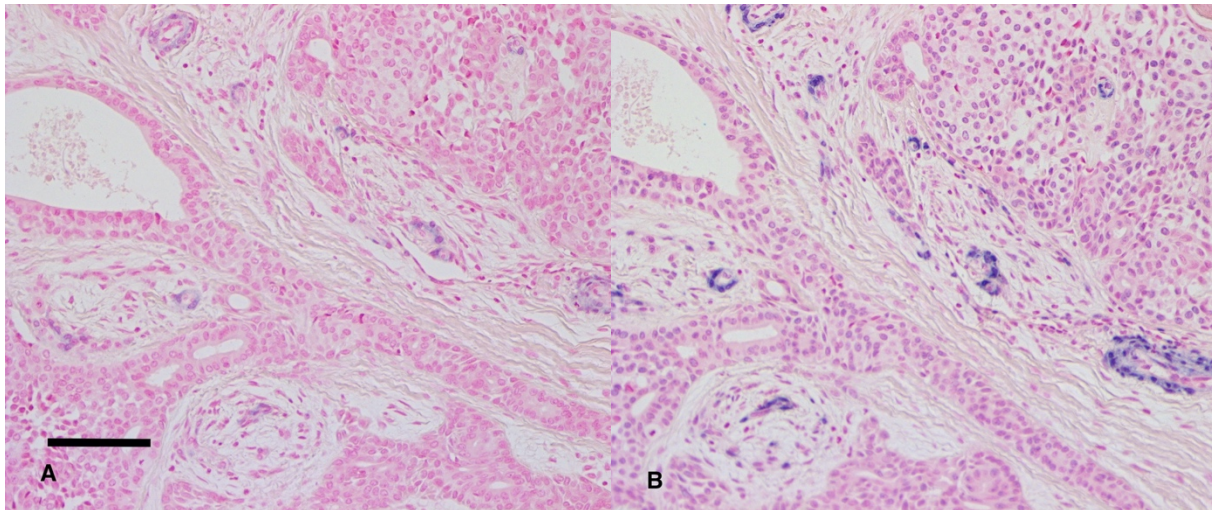
Figur 4- 4: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsområder fra ventrikkel med adenokarsinom av intestinal type. A. Vevsområde uten tumoraffeksjon ved nærliggende tumor som viser ingen antydning til hybridiseringssignal fra miR-143. B. Vevsområde uten tumoraffeksjon ved nærliggende tumor som viser hybridiseringssignal fra miR-145 i cellekjernene til epitelcellene. Streken i bildet representerer 0,1mm i A og B. C. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser ingen antydning til hybridiseringssignal fra miR-143. D. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser hybridiseringssignal fra miR-145 i cellekjernene til kreftcellene og myofibroblastene. Både C og D er tatt ved dobbelt forstørrelse og dermed vil streken representere 0,05mm i C og D. Det kan i tillegg observeres en større mengde immunceller, som leukocytter og lymfocytter, i vevsområdene.



Figur 4- 5: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsrområder fra ventrikkel med adenokarsinom av diffus type. A. Vevsrområde uten tumoraffeksjon ved nærliggende tumor som viser hybridiseringsignal fra miR-145 i cellekjernene til epitelcellene. B. Vevsrområde uten tumoraffeksjon ved nærliggende tumor som viser ingen antydning til hybridiseringsignal fra miR-143. C. Vevsrområde med tumoraffeksjon som viser ingen antydning til hybridiseringsignal fra miR-143. D. Vevsrområde med tumoraffeksjon som viser hybridiseringsignal fra miR-145 i cellekjernene til kreftcellene og myofibroblastene. Streken i bildet representerer 0,1mm i A, B, C og D. E. Samme vevssnitt som D, men ved dobbelt forstørrelse. Dermed vil streken representere 0,05mm i E. Det kan tydelig observeres hybridiseringsignal fra miR-145 i cellekjernene til kreftcellene og myofibroblastene. I tillegg kan det observeres større mengder immunceller, som lymfocytter og leukocytter i vevsrområdet.

4.4 Kondroid syringom

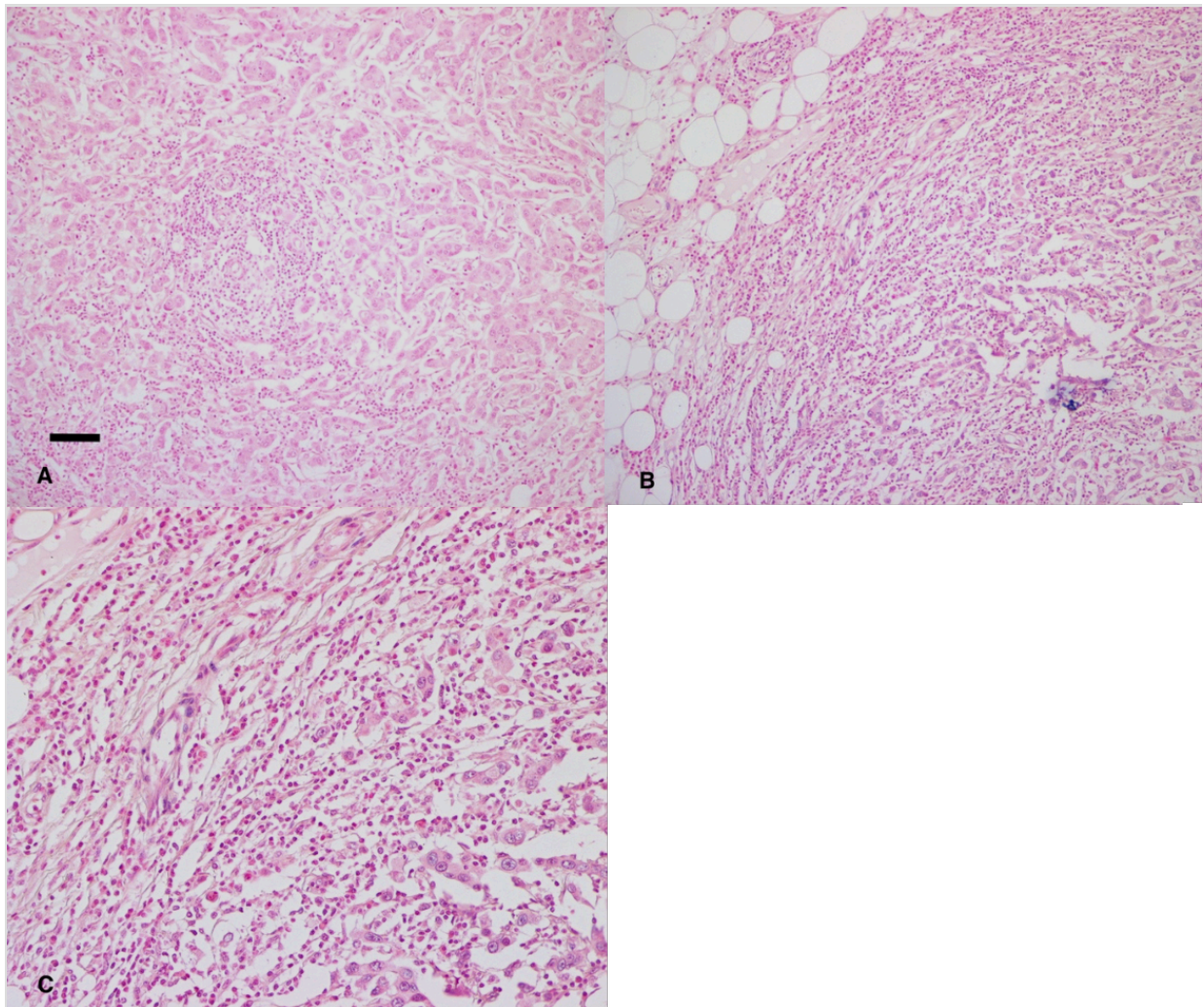
Hud med kondroid syringom viser store forskjeller i produksjon av miR-143 og miR-145. miR-145 gir hybridiseringsignal i myoepiteliale celler, fibroblaster og tumorceller, som miR-143 ikke gir antydninger til.



Figur 4- 6: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsområder fra hud med kondroid syringom. A. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser ingen antydning til hybridiseringssignal fra miR-143 i annet enn cytoplasma og cellekjerner til glatt muskelceller i blodkarene. B. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser hybridiseringssignal fra miR-145 cellekjernene til myoepiteliale celler, myofibroblaster og epiteliale tumorceller, i tillegg til cellekjerner og cytoplasma til glatt muskelceller. Streken i bildet representerer 0,1mm i A og B. Det kan også observeres større mengde immunceller, som leukocytter og lymfocytter, i vevsområdene.

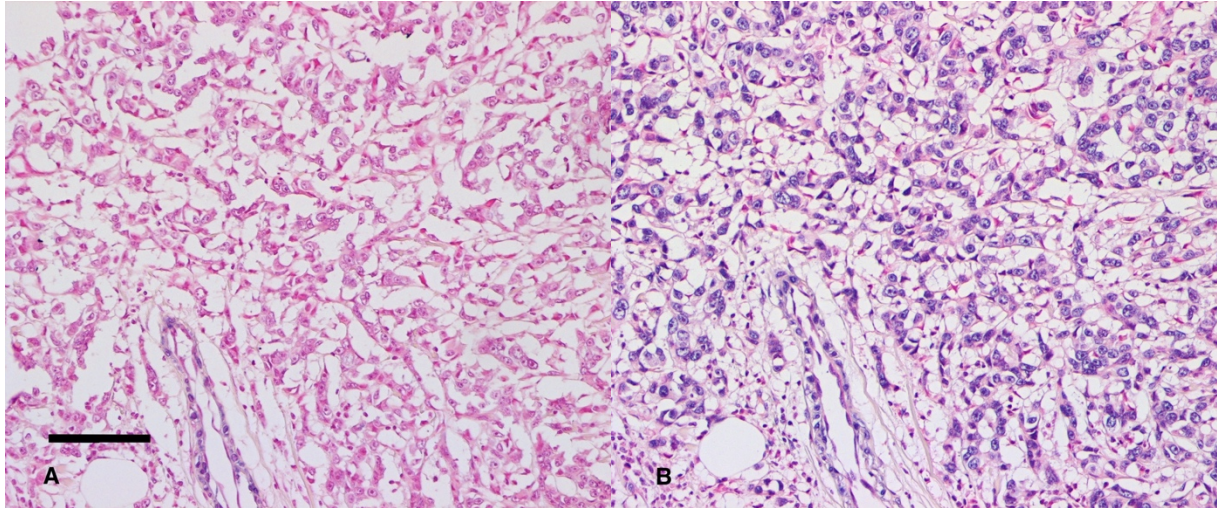
4.5 Infiltrerende karsinom

I brystkrefttilfellene varierer hybridiseringsresultatene mellom de forskjellige typene infiltrerende karsinomer. miR-143 gir hybridiseringssignaler i myofibroblaster og myoepitel nærliggende normal brystkjertel-lobulus i tilfellene med medullær infiltrerende karsinom, men ikke i de andre typene. Hybridiseringssignalene fra miR-145 vises også i cellekjernene til myofibroblaster og myoepiteliale celler nærliggende normal brystkjertel-lobulus, og dette forekommer i alle typer infiltrerende karsinomer for miR-145. I tillegg er det hybridiseringssignal med et heterogent mønster fra miR-145 i cellekjernene til kreftcellene til infiltrerende karsinom av typen NST.

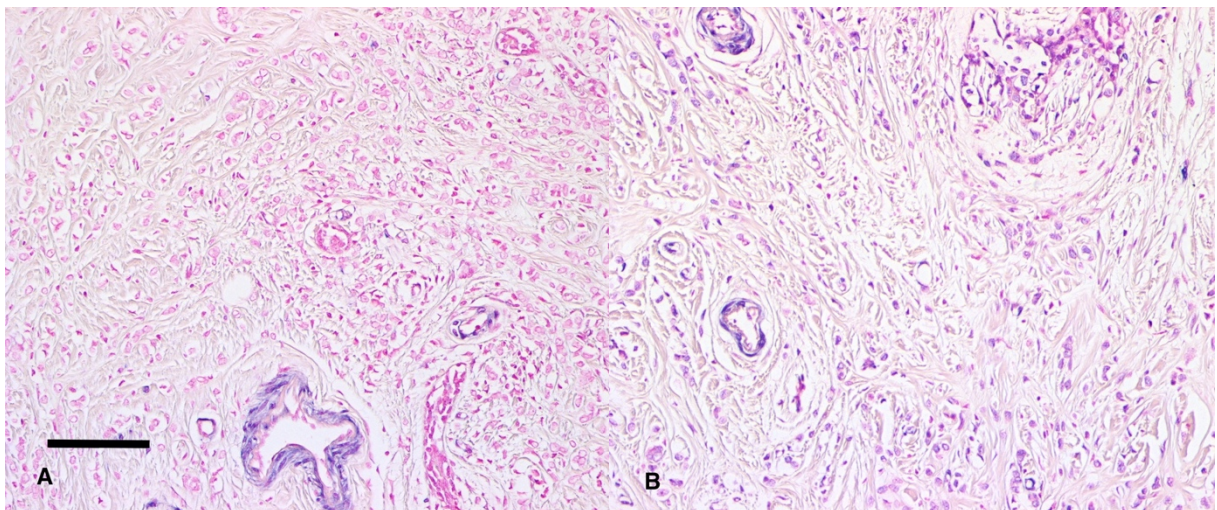


Figur 4- 7: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsområder fra bryst med infiltrerende karsinom av lobulær type. A. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser ingen antydning til hybridiseringssignal fra miR-143 i annet enn cytoplasma og cellekjerner til glatt muskelceller i blodkarene. B. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser hybridiseringssignal fra miR-145 cellekjernene til myoepiteliale celler og myofibroblaster i tillegg til cellekjerner og cytoplasma til glatt muskelceller. Streken i

bildet representerer 0,1mm i A og B. C. Samme vevssnitt som B, men ved dobbelt forstørrelse. Dermed vil streken representere 0,05mm i C. Det kan observeres hybridiseringssignal fra miR-145 i cellekjerne til myoepiteliale celler og myofibroblaster i C. I tillegg kan det observeres større mengder immunceller, som leukocytter og lymfocytter, i vevsområdet.



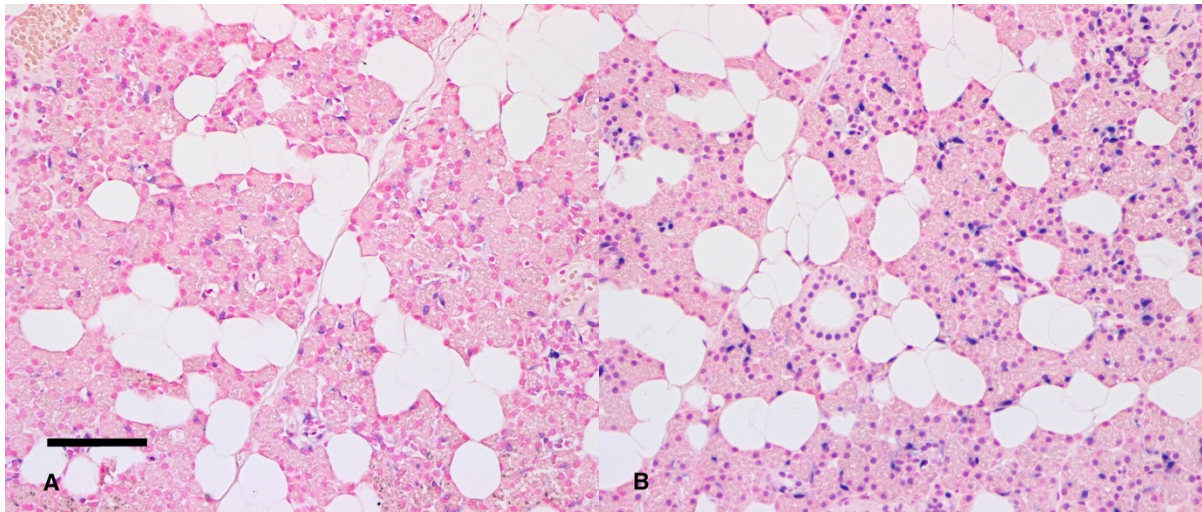
Figur 4- 8: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsområder fra bryst med infiltrerende karsinom av type NST. A. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser ingen antydning til hybridiseringssignal fra miR-143 i annet enn cytoplasma og cellekjerne til glatt muskelceller i blodkarene. B. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser hybridiseringssignal fra miR-145 i cellekjernene til myoepiteliale celler, myofibroblaster og om lag halvparten av de epiteliale tumorcellene, i tillegg til cellekjerne og cytoplasma til glatt muskelceller. Streken i bildet representerer 0,1mm i A og B. Det kan også observeres større mengde immunceller, som leukocytter og lymfocytter, i vevsområdene.



Figur 4- 9: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsområder fra bryst med infiltrerende karsinom av medullær type. A. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser antydning til hybridiseringssignal fra miR-143 i cellekjernen til myofibroblaster og myoepiteliale celler, i tillegg til cytoplasma og cellekjerne til glatt muskelceller i blodkarene. B. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser hybridiseringssignal fra miR-145 i cellekjernene til myoepiteliale celler og myofibroblaster, i tillegg til cellekjerne og cytoplasma til glatt muskelceller. Streken i bildet representerer 0,1mm i A og B. Det kan også observeres større mengde immunceller, som leukocytter og lymfocytter, i vevsområdene.

4.6 Pleomorft adenom

Hybridiseringssignaler fra både miR-143 og miR-145 observeres i kjernen til myoepiteliale celler og myofibroblaster i spyttkjertelområder uten tumoraffeksjon, men miR-145 vises også i epitelceller nærliggende tumorvevet. I selve tumorområdet viser det seg at det bare er miR-145 som gir hybridiseringssignal med et heterogent mønster i tumorcellenes cellekjerner.



Figur 4- 10: Viser hybridiseringsresultater for miR-143 og miR-145 i vevsområder fra ørespyttkjertel med pleomorft adenom. A. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser antydning til hybridiseringssignal fra miR-143 i cellekjernen til myofibroblaster og myoepiteliale celler. B. Vevsområde med tumoraffeksjon som viser hybridiseringssignal fra miR-145 cellekjernene til myoepiteliale celler, myofibroblaster og om lag halvparten av de epiteliale tumorcellene. Streken i bildet representerer 0,1mm i A og B.

5 Diskusjon

5.1 Metodens validitet og reliabilitet

ISH har mange potensielle feilkilder, og det er derfor viktig å foreta både positive og negative kontroller for å prøve å sikre at signalene i prøvesnittene er et resultat av hybridiseringsreaksjonene. Ved dette forsøket ble SCR brukt som negative kontroll og U6 som positive kontroll. Det samlede resultatet til kontrollene kan indikere at kvaliteten til utførelsen og reagenser/løsninger er høy. Dermed kan det antas at signalene i vevssnittene er et reelt uttrykk for hybridiseringsreaksjoner, men selv med disse kontrollresultatene kan ikke dette sies med sikkerhet. Hovedkilden til denne usikkerheten er manglende kontroll av probe-løsningenes kvalitet. Probene skal fra produsent være av høy kvalitet, men transport, lagring og fortynningsprosedyrene kan påvirke kvaliteten uten at det oppdages. Om probene ikke er av tilnærmet optimal kvalitet kan uspesifikke bindinger mellom prober og andre vevskomponenter oppstå og gi falskt hybridiseringssignal. Et annet problem kan være at probene ikke greier å binde seg til vevskomponentene og gi et falskt negativt resultat. På grunn av dette bør resultater fra ISH-undersøkelser verifiseres ved andre, komplementære metoder.

De benyttede kontrollene SCR og U6 kontrollerer heller ikke individuelle forskjeller mellom vevssnittene forårsaket av tilfeldige og menneskelige feil som lett kan oppstå, da ISH er en manuell metode. Det er tydelig at det er flere trinn i ISH-metoden som er spesielt utsatt for tilfeldige og systematiske feil forårsaket av personen som utfører metoden. Trinnene der løsningene påføres ved hjelp av automatpipette er noen av de som er spesielt utsatt, da det er umulig ved bruk av denne metoden å påføre løsningene til alle vevssnittene samtidig. Dette kan resultere i variasjon i inkubasjonstid, noe som kan påvirke hybridiseringsresultatet. På grunn av dette må det arbeides så raskt som mulig for å unngå for store forskjeller, noe som igjen kan føre til at det oppstår flere tilfeldige feil som ufullstendig tildekning og uttørring av områder i vevssnittene. En annen kilde til individuelle forskjeller i hybridiseringsresultater mellom vevssnittene er kvaliteten til biopsivevet. Det kan på ingen måte garanteres at biopsivevet har blitt behandlet på akkurat samme måte fra de tas ut av organet til de er ferdig fiksert, selv om det skal være relativt gode prosedyrer for dette. Ikke-optimal behandling av biopsivevet kan føre til degradering av miRNAene, noe som kan resultere i misvisende resultat. Mellom vevssnittene ble det observert lignende tendenser i hybridiseringsresultatene, spesielt for glatt muskelvev. Dette

kan antyde at probe-løsningene har vært av tilnærmet samme kvalitet gjennom alle analyserunder av ISH, men det kan ikke garantere at de har bundet seg til riktige vevskomponenter.

5.2 Resultatenes betydning

Hybridiseringsresultatene for begge miRNAene har både forskjeller og likheter mellom vevstypene, og mellom tumorområder og områder uten tumoraffeksjon. Det som går igjen i hybridiseringsresultatene er at glatt muskelceller er positive for begge miRNAene i både cytoplasma og cellekjerne i alle prøvesnittene. Dermed kan det virke som at celler med kontraktile egenskaper, som muskelceller, myofibroblaser og myoepiteliale celler, er de cellene som hovedsakelig og kanskje normalt inneholder miRNAene miR-143 og miR-145. Dette er ikke sikkert siden probene kan ha bundet seg til de kontraktile vevskomponentene istedenfor sine respektive miRNA-molekyler. Generelt ser det også ut til at cellene inneholder en større mengde miR-145 enn miR-143. Forskjellen i mengden mellom miRNAene er ikke helt som forventet. Ut ifra teorien (innledning, s. 5) om opprinnelsen og dannelsen av miR-143 og miR-145, så skal ikke mengden variere i så stor grad som hybridiseringsresultatene tilsier. Det kan være mange grunner til denne mengdevariasjonen. En grunn kan være at miR-143 er et mer ustabil molekyl og vil i stor grad degraderes etter splittelse fra miR-145, eller før eventuell fiksering av biopsivevet. Det at miR-143 kan være mer ustabil enn miR-145 kan kanskje komme av at miR-143 er avhengig av å være bundet til andre molekyler for å opprettholde sin stabilitet, eller så kan det være en ukjent prosess som regulerer mengden miRNA i miRNA-prosesseringen. En annen grunn kan være at miR-143 er mindre tilgjengelig enn miR-145, og hybridiseringen blir dermed mer utfordrende. Det kan også tenkes at mengdevariasjonen kan ha oppstått som et resultat av en systematisk feil, som forskjell i kvaliteten til probe-løsningene. For å prøve å utelukke systematiske feil burde forsøket gjennomføres på nytt med nye probe-løsninger, og eventuelt en kontroll som sikrer probe-løsningenes kvalitet. I tillegg til ISH burde det utføres tilleggsundersøkelser ved bruk av metoder som kan kvantifisere mengden miRNA. Om det viser seg at mengdevariasjonen ikke kommer fra noen tekniske feil, kan det være hensiktsmessig å undersøke årsaken for å oppnå mer kunnskap om miRNAene. Det viser seg også at det meste av hybridiseringssignaler forekommer i cellekjernene til cellene, med unntak av i glatt muskulatur hvor det også er signal i cellenes cytoplasma. Dette er ikke helt som forventet ut ifra teorien om

hvor miRNAene har sin funksjon (teorikapittel 2.1.1 og 2.1.2, s. 6). Hybridiseringssignalene kan antyde at både miR-143 og miR-145 har en funksjon i cellekjernen hos enkelte celler, og ikke bare i cytoplasma som tidligere antatt. Dermed kan det hende at deres regulatoriske funksjon kanskje er mer rettet mot preRNA eller gener, og ikke mRNA. Det er vanskelig å si akkurat hvorfor disse resultatene er oppnådd ved bare bruk av ISH, og det kan bare spekuleres over hva årsaken er. I de tilfellene med hybridiseringssignaler fra miR-145 i kreft-/tumorcellene, kan det virke som at kreft-/tumorcellene med hybridiseringssignal har utviklet seg i en mer myoepitelial retning enn de uten hybridiseringssignal.

I en del av tumorene er det antydning til at mengden av miRNAene i stromale celler øker jo lengre ut mot ytterkanten av tumor de befinner seg. Denne mengdegradienten kan ha oppstått på grunn av økt stromal aktivitet i ytterkanten av tumorene, og dermed kan det antas at miRNAene er viktige for dannelse av tumorstroma. Akkurat hvorfor miRNAene kan være viktige for tumorstroma dannelse er det vanskelig å si noe om, men kanskje de fremmer dannelse av stromale komponenter eller signalmolekyler som er nødvendige for tumorvekst. Det kan også være at det bare ser ut som at det er økt mengde miRNA i cellene på grunn av økt mengde fibroblaster i området, og hybridiseringssignalet bare virker sterkere. En annen grunn kan være at dette har oppstått som et resultat av en feilkilde. Det kan være at probe-løsningen eller andre løsninger benyttet ved metoden ikke har blitt fordelt jevnt utover i vevet, men siden dette er en tendens som går igjen er det mindre sannsynlig. At det er tilfeller der det ser ut som at epitelceller nærliggende tumor danner miR-145, kan komme av at kreftcellene i tumor produserer signalstoffer som påvirker epitelcellene til å produsere miR-145. Hvorfor det er hensiktsmessig at epitelcellene starter å produsere miR-145 er det vanskelig å si noe om, men det kan være at dette fremmer dannelse av tumorstroma eller legger til rette for tumorinvasjon. Dette er litt merkelig siden epitelcellene ikke er kjent for å danne komponenter til stroma, så hvorfor påvirkes de og hvorfor bare i enkelte tilfeller? Det kan være at dette bare er en fordel for enkelte krefttyper, eller så kan dette være et fenomen innenfor en viss fase av tumordannelsen. Siden det antas at miRNAene normalt produseres i celler med kontraktile egenskaper, kan det også tenkes at de er viktige for akkurat disse egenskapene. Kanskje miRNAene, da spesielt miR-145, har som funksjon å fremme tumorinfiltrering. Det kan også tenkes at produksjonen av miRNAene ikke har noen direkte sammenheng med kreft og tumordannelse, men oppstår på grunn av en betennelsesreaksjon. I alle prøvesnittene ble det observert større ansamlinger av immunceller,

som tyder på at det er en betennelsesreaksjon i prøvesnittene. Det kan da være at hybridiseringssignalene som er oppnådd for miR-143 og miR-145 er et resultat av betennelsesreaksjonen og ikke kreftdannelsen. Dette kan bety at det er immuncellene som skiller ut signalstoffer som påvirker nærliggende cellers produksjon av miRNAene, uten å produsere dem selv. Dermed vil miRNAene ha en funksjon i betennelsesreaksjoner og ikke i tumordannelse som tidligere diskutert. Funksjonen kan være å oppnå produksjon av andre signalmolekyler som kanskje vil tiltrekke flere immunceller til betennelsesområdet, og/eller gjøre ferden gjennom vevet lettere for de. Det er ikke mulig å fastslå om hybridiseringsresultatene kommer av betennelse eller kreft ved bare bruk av ISH, så i denne oppgaven kan det bare spekuleres rundt dette. Det kan være hensiktsmessig å utføre lignende forsøk i større skala og med rent betennelsesvev for å prøve å utelukke dette, før det fortsettes med kreftvev videre.

5.3 Videre arbeid og betydning for kreftdiagnostisering og behandling

Ut ifra hybridiseringsresultatene kan det virke som at redusert mengde av miR-143 og miR-145 ikke har en sammenheng med kreftutvikling, som resultatene fra tidligere studier med PCR-teknikker tyder på. Dette fordi hybridiseringsresultatene antyder at miR-143 og miR-145 ikke produseres i normale epitelceller eller kreftceller, men heller i stromale celler. Dermed ser det ut til at det ikke er kreftcellenes endring i fenotype som forårsaker miRNA reduksjonen, men heller endringen i celledannelsen i vevsområdet grunnet kreft eller betennelsesreaksjon. På grunn av dette dukker spørsmålet om miR-145 og miR-143 faktisk er tumorsuppressorer som tidligere antatt. For om de har en funksjon som tumorsuppressor burde de være tilstede i normale epitelceller, og ikke i kreftceller.

Hvilken betydning disse resultatene vil ha for fremtidig kreftdiagnostisering og behandling er vanskelig å si, og det kommer veldig an på resultatene fra eventuelle videre undersøkelser. Om det viser seg at miRNAene, spesielt miR-145, er viktige for dannelse av tumorstoma, kan kanskje inhibering av miRNAene i beste fall føre til nedbremsing av tumorutvikling. Resultatene kan kanskje også benyttes innenfor diagnostisering for å skille mellom ulike stadier i tumorutviklingen om det viser seg at miR-145 er en viktig komponent i tumorinvasjon. Den viktigste betydningen hybridiseringsresultatene her vil ha er å gi et grunnlag for videre forskning innenfor temaet.

6 Konklusjon

Resultatene i denne oppgaven antyder at miR-143 og miR-145 normalt produseres i celler med kontraktile egenskaper, som muskelceller, myofibroblaster og myoepiteliale celler, men at kreft eller betennelsestilstander kan påvirke dette. Ved kreft eller betennelsestilstander viser det seg at produksjonen av miR-145 kan foregå i epiteliale celler nærliggende tumoraffisert vevsområde eller myoepiteliale tumorceller i benigne tumorer og ved tilfeller av infiltrerende karsinom av typen NST. Hvorvidt miR-145 kan produseres i andre krefttyper gir ikke denne oppgaven noe svar på, og dette må undersøkes ytterligere. miR-145 kan vise seg å være viktig for dannelse av stromale komponenter i tumorvevet og kan potensielt på denne måten bidra til tumorutvikling og tumorinvasjon.

Det er mye usikkerhet rundt hybridiseringsresultatene fra ISH grunnet mange mulige feilkilder og manglende kontroller. ISH kan fortsatt gi viktig informasjon, men det er sterke og svake sider ved alle metoder, og ingen enkeltundersøkelse kan gi definitive svar, men funn må bekreftes ved ytterligere undersøkelser – med samme og andre metoder. For å forbedre ISH burde det i første omgang utvikles bedre og flere kontroller og tilleggsundersøkelser som dekker de fleste usikkerheter, men i det lengre løp burde metoden automatiseres.

Som de fleste andre vitenskapelige undersøkelser gir denne flere spørsmål enn svar. Noen av spørsmålene som burde besvares er om det faktisk er de aktuelle miRNAene som gir hybridiseringsutslag, og om det er noen korrelasjon mellom de og tumorinvasjon. Det er også viktig å undersøke et større antall prøvesnitt for å virkelig kunne undersøke tendensene nevnt tidligere i denne oppgaven.

Resultatene i denne oppgaven vil ikke ha noen direkte effekt på diagnostisering eller behandling av kreft, men bekrefter et behov for videre forskning innenfor temaet.

7 Referanseliste

1. Kent OA, McCall MN, Cornish TC, Halushka MK. Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* juli 2014;42(12):7528–38.
2. David P. Clark, Nanette J. Pazdernik. *Molecular Biology*. 2. utg. Elsevier Science; 2012. 62–85, 163–191 s.
3. Kåresen R, Wist E, Reppe A. *Kreftsykdommer: en basisbok for helsepersonell* [Internett]. Norbok. Oslo: Gyldendal akademisk; 2000 [sitert 11. april 2020]. 25–41 s. Tilgjengelig på: https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2008110400117
4. Almeida MI, Calin GA. The miR-143/miR-145 cluster and the tumor microenvironment: unexpected roles. *Genome Med* [Internett]. 17. mars 2016 [sitert 11. april 2020];8. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797185/>
5. Johannessen C, Moi L, Kiselev Y, Pedersen MI, Dalen SM, Braaten T, mfl. Expression and function of the miR-143/145 cluster in vitro and in vivo in human breast cancer. *PLoS ONE*. 2017;12(10):e0186658.
6. Xing X, Li Z. [Expression of miR-143 and miR-145 and their functional study in gastric carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. januar 2015;18(1):50–3.
7. Guoping M, Ran L, Yanru Q. miR-143 Inhibits Cell Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Targeting GATA6. *Oncol Res*. 23. august 2018;26(7):1023–9.
8. Neil A. Campbell, Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, mfl. *Biology: A Global Approach*. 10. utg. Pearson; 2015. 371–444, 461–462 s.
9. D. Peter snustad, Michael J. Simmons. *Genetics*. 6. utg. John Wiley & Sons; 2012. 6–10, 197–199, 541–544, 590–592 s.
10. John Crocker, Paul G. Murray. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. 2. utg. John Wiley & Sons; 2003.
11. Abraham L. Kierszenbaum. *Histology and Cell Biology: an Introduction to Pathology*. 3. utg. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders; 2012. 1–149 s.
12. Igor Jokic. *Histologi*. 1. utg. Elnesvågen: Dalefag; 2007. 53–142 s.
13. Wah Cheuk, John K.C. Chan. *Diagnostic Histopathology og Tumors: Salivary gland Tumors*. 2. utg. Bd. 1. Churchill Livingstone; 2000. 231–309 s.
14. Thomas C. King. *Elsevier's Integrated Pathology*. 1. utg. 2007.
15. John N. Eble, Robert H. Young. *Diagnostic Histopathology of Tumors: Tumors of the urinary tract*. 2. utg. Bd. 1. Churchill Livingstone; 2000. 475–565 s.
16. Jeremy R. Jass. *Diagnostic Histopathology of Tumors: Tumors of the intestines*. 2. utg. Bd. 1. Churchill Livingstone; 2000. 369–409 s.

17. Ian O. Ellis, Sarah E. Pinder, Andrew H.S. Lee, Christopher W. Elston. Diagnostic Histopathology of Tumors: Tumors of the breast. 2. utg. Bd. 1. Churchill Livingstone; 2000. 865–930 s.
18. Mark A. Hurt, Daniel J. Santa Cruz. Diagnostic Histopathology of Tumors: Tumors of the skin. 2. utg. Bd. 2. Churchill Livingstone; 2000. 1357–1472 s.
19. QIAGEN. miRCURY LNA miRNA ISH Optimization Kits (FFPE) Handbook [Internett]. 2019. Tilgjengelig på: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=fd8cfa08-ae2-41c0-b847-2666ff0f63d8&lang=en>

Vedlegg 1: Fortynning av prober

Probene fortynnes etter materialet fra tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over probe konsentrasjoner, ønsket konsentrasjon til forsøket, hvor mange μL probe som er tilgjengelig, fortynning, og hvor mye buffer som må tilsettes for å oppnå ønskede konsentrasjoner.

Probe	Konsentrasjon (μM)	Volum (μL)	Ønsket konsentrasjon (nM)	Fortynning	Volum buffer (μL)
Scramble	25	3	50	1:500	1497
miR-probe	25	3	50	1:500	1497
U6	0,05	3	1	1:500	1497

Vedlegg 2: Reagenshefte

Oversikt over løsninger som må lages før ISH kan gjennomføres. Løsningene som autoklaveres er holdbar i minst 6 måneder i kjøleskap, resten av løsningene burde lages samme dag eller fryses ved -18°C.

Tabell 1: DEPC-vann*

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
Dietylpyrokarbonat (DEPC)	>97%	1 mL
Milli-Q vann	0,097%	1 L

*Autoklaveres

Tabell 2: 1 x hybridiserings mix buffer

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
microRNA ISH buffer	-	500 µL
DEPC-vann	0,097%	500 µL

Tabell 3: TRIS-HCL, 10 mM

Reagens	Konsentrasjon	pH	Mengde
TRIS-HCL	1 M	7,5	10 µL
DEPC-vann	0,097%	-	990 µL

Tabell 4: Proteinase K, 20 mg/mL

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
Proteinase K	100%	20 mg
TRIS-HCL	10 mM	600 µL

Tabell 5: Proteinase K-buffer*

Reagens	Konsentrasjon	pH	Mengde
TRIS-HCL	1 M	7,5	5 mL
EDTA	0,5 M	-	2 mL
NaCl	5 M	-	200 µL
DEPC-vann	0,097%	-	992,8 mL

*Autoklaveres

Tabell 6: 20 mL, 1 x Maleric acid

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
Maleinsyre fra DIG Wash and Block buffer	10 x	2 mL
DEPC-vann	0,097%	18 mL

Tabell 7: 1 x blokkeringsløsning, 20 mL

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
Blokkeringsløsning	10 x	2 mL
Maleinsyre	1 x	17,6 mL
Serum fra sau	60 mg/mL	400 µL

Tabell 8: Sau anti-DIG-AP, 8 mL

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
Blokkeringsløsning	1 x	8 mL
Sau anti-DIG-AP	-	10 µL

Tabell 9: Levamisole, 100 mM

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
Levamisole	240,75 g/mol	250 mg
DEPC-vann	0,097%	10,4 mL

Tabell 10: AP-substratløsning, 10 mL

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
NTB/BCIP tabletter	-	1 tablett
DEPC-vann	0,097%	10 mL
Levamisole	100 mM	10 µL

*Løs tablettene i DEPC-vann før Levamisole tilsettes. Beskyttes mot lys!

Tabell 11: Fosfatbuffersalt (PBS), pH 7,4*

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
Fosfatbuffersalt-tabletter	0,01 M	1 tablett
DEPC-vann	0,097%	200 mL

*Autoklaveres

Tabell 12: PBS-Tween*

Reagens	Konsentrasjon	pH	Mengde
PBS	0,01M	7,4	300 mL
Tween 20	?	-	300 µL

*Autoklaveres

Tabell 13: 5 x SSC*

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
SSC	20 x	250 mL
DEPC-vann	0,097%	750 mL

*Autoklaveres

Tabell 14: 1 x SSC*

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
SSC	20 x	50 mL
DEPC-vann	0,097%	950 mL

*Autoklaveres

Tabell 15: 0,2 x SSC*

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
SSC	20 x	10 mL
DEPC-vann	0,097%	990 mL

*Autoklaveres

Tabell 16: KBTB-buffer*

Reagens	Konsentrasjon	Mengde
TRIS-HCL	50 mM	7,9 g
NaCl	150 mM	8,7 g
KCl	10 med mer	0,75 g
DEPC-vann	0,097%	Opp til 1000mL

*Autoklaveres

