

Brændvik, Sofie Emilie
Grønli, Elisabeth

Optimalisering av RNA-analyser; utprøving av Epstein-Barr virus- transformerte lymfoblastoide cellelinjer som kontrollmateriale

Optimization of RNA-analysis; testing Epstein-
Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines
as control material

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Mai 2022

Brændvik, Sofie Emilie
Grønli, Elisabeth

Optimalisering av RNA-analyser; utprøving av Epstein-Barr virus- transformerte lymfoblastoide cellelinjer som kontrollmateriale

Optimization of RNA-analysis; testing Epstein-Barr
virus-transformed lymphoblastoid cell lines as

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Bachelorprosjektet er utført i forbindelse med avslutning av Bioingeniørutdanningen ved NTNU i Trondheim. Tema for oppgaven ble gitt av Avdeling for medisinsk genetikk ved St. Olavs Hospital hvor alt laboratoriearbeid ble utført. Vi har lært at RNA er et svært krevende prøvemateriale på tross av sin svært begrensede størrelse.

Vi vil rette en takk til Avdeling for medisinsk genetikk for å ha tatt oss så godt imot og vist stor gjestfrihet. Vi vil takke for all lærdom vi har fått i denne perioden, både teoretisk og praktisk. En spesiell takk rettes til Eva Kathrine Svaasand for eksemplarisk veiledning på lab og under skriveprosessen. Du har motivert oss stort med din entusiasme for RNA og stadig påminning om hvor viktig dette arbeidet er for dere. Takk til Wenche Sjørnsen for gode, faglige innspill. Takk for at dere har tatt dere tiden til å lese gjennom oppgaven opptil flere ganger, og at dere har gitt konstruktive tilbakemeldinger, det setter vi stor pris på.

Vi vil også takke Toril Holien, en svært god prosessveileder som har gitt gode innspill på strukturering og rettskriving av oppgaven. Til slutt vil vi takke Marie Benner Lundbæk og Institutt for Klinisk og Molekylær medisin ved NTNU som har samarbeidet om dyrkning av cellelinjene slik at vi kunne gjennomføre prosjektet.

Sammendrag

Avdeling for medisinsk genetikk (AMG) på St. Olavs Hospital har behov for nytt kontrollmateriale til analyser av RNA. Gentesting kan utføres på RNA-nivå som et supplement til gentesting på DNA-nivå. Dette utføres som regel ved sekvensering av cDNA, og det er nødvendig med en normal kontroll som behandles på lik måte som pasientprøvene. Årsaken er at kontrollen skal kunne brukes som en referanse for pasientprøver. En referansesekvens er viktig fordi messenger-RNA (mRNA) kan settes sammen på ulike måter ved alternativ spleising og danne ulike transkripter. Dette kan forstyrre analyseringen ved at transkriptene danner en bakgrunnssekvens som kan forveksles med patogene varianter.

Denne oppgaven tar for seg en uttesting av humane lymfoblastoide B-cellelinjer fra Coriell Institutt i USA, for å finne ut om de kan brukes som normal kontroll. I forkant av bachelorprosjektet ble cellelinjene dyrket ved Institutt for Klinisk og molekylær medisin. Videre ble lymfocytene dyrket i korttidskultur av ansatte ved AMG. RNA ble isolert fra lymfocytene og cDNA-syntese ble utført. Vår oppgave har vært å amplifisere cDNA ved bruk av PCR og deretter sangersekvensere produktet for å identifisere baserekkefølgen. Sekvensene til cellelinjene har blitt sammenlignet med sekvensene til normale pasientprøver. Gelelektroforese ble utført som et kontrolltrinn underveis for å sikre at nok cDNA ble amplifisert ved PCR.

Resultatene viser at cellelinjene oppfører seg som normale pasientprøver ved at de viser de samme transkriptene og benigne variantene. Det er grunn til å tro at konsentrasjonen av RNA ikke har betydning for signalstyrke og kvalitet på sekvensene, men at RIN-verdi er mer avgjørende. Resultatene er basert på analyser av genene *NF1* og *PTCH1*, og de gir grunnlag for å gå videre med analysering av flere aktuelle gener. Videre må avdelingen validere cellelinjene for å kunne ta de i bruk som kontrollmateriale.

Abstract

The department of medical genetics (AMG) at St. Olavs Hospital need a new control for their analyzes on RNA. RNA-analysis is a form of genetic testing used as a supplement for analysis on DNA. Genetic testing is usually performed by sequencing cDNA, and it is crucial to have a control material that follows the samples through the whole process of analysis. The control must also have the ability to work as a reference sequence for normal samples to be compared with. It is important to have a reference sequence during these analyzes, because messenger-RNA (mRNA) can bind exons differently and end up in different transcripts through alternative splicing. This can disturb the analyzing process by creating a background-sequence that can be mistaken for a pathogenic variant.

This thesis argues if lymphoblastoid B-cell lines from Coriell Institute in the USA can be used as a normal control for analysing RNA. Prior to this bachelor project, the Institute of clinical and molecular medicine (IKOM) at NTNU have cultivated cells from the cell lines. Furthermore, the B-lymphocytes were cultivated in a short-term cell culture by employees at AMG. RNA was isolated from the cells and cDNA-synthesis was performed. Our assignment was to amplify cDNA during PCR, following sanger sequencing to identify the order of the nucleotides in the sequence. The sequence from the cell lines was compared to the sequence from normal patient samples. Gel electrophoresis was executed as a step for ensuring that enough cDNA was amplified from the PCR-reaction.

The results shows that the cell lines behave the same way as normal patient samples because they all show the same transcripts and benign variants in the genes we tested. There is reason to believe that the concentration of RNA does not affect the strength of the signal nor the quality of the sequences, but that the RIN-score is more decisive. The results we got from analysing on *NFI* and *PTCH1* gives reason to conduct the same tests on several other complex genes as well. Now the department must validate the cell lines before they can be incorporated as control for the routine work at the department.

Liste over forkortelser

AMG	Avdeling for medisinsk genetik
ddNTP	Dideoksynukleotider
dNTP	Deoksynukleotider
EBV	Epstein Barr virus
FBS	Føtalt bovins serum
IKOM	Institutt for Klinisk og molekylær medisin
LCL	Lymfoblastoide cellelinjer
mRNA	Messenger-RNA
<i>NF1</i>	Nevrofibromin 1-genet
NF1	Nevrofibromatose type 1
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
NTC	No template control
PB MAX	PB MAX Karyotyping
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PHA	Phytohemagglutinin
<i>PTCH1</i>	Patched 1-genet
PTCH1	Patched 1-proteinet
RFU	Relative fluorescence units
RIN	RNA Integrity Number
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SeqPilot	Sequence Pilot
SeqScanner 2	Sequence Scanner 2.0
sHH	Sonic Hedgehog-protein
SMO	Smoothened
T1	Transkript 1
T2	Transkript 2
UTR	Ikke-translatert region

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
Liste over forkortelser	iv
Innledning	1
<i>RNA</i>	<i>1</i>
<i>Spleising av RNA</i>	<i>2</i>
Alternativ spleising.....	<i>2</i>
Feilspleising.....	<i>2</i>
Dype intron-varianter	<i>3</i>
<i>Kontroller for genetiske analyser</i>	<i>3</i>
<i>Transformerte cellelinjer</i>	<i>3</i>
<i>Kortidskultur av prøver til RNA-analyse</i>	<i>4</i>
<i>Nevrofibromin 1</i>	<i>4</i>
<i>Patched 1</i>	<i>5</i>
<i>Problemstilling</i>	<i>6</i>
Materiale og metode	8
<i>Prøvemateriale</i>	<i>9</i>
Cellelinjer	<i>9</i>
Normale pasientprøver	<i>9</i>
<i>Cellekultur</i>	<i>9</i>
<i>RNA-isolering</i>	<i>12</i>
<i>Måling av konsentrasjon og kvalitet</i>	<i>12</i>
<i>One-step PCR</i>	<i>12</i>
<i>Two-step PCR</i>	<i>12</i>
<i>Gelelektroforese</i>	<i>13</i>
<i>Rensing av PCR produkt</i>	<i>14</i>
<i>Sangersekvensering</i>	<i>14</i>

<i>Kvalitetsvurdering</i>	15
<i>Analyseprogram og nett-ressurser</i>	16
<i>Analyse av NF1</i>	16
<i>Analyse av PTCHI</i>	17
Resultater	19
<i>Konsentrasjon og kvalitet på RNA</i>	19
<i>NF1</i>	20
Resultater fra gelelektroforese.....	20
Kvaliteten på rådata	21
Utprøving av cellelinjene på <i>NF1</i>	22
Bakgrunn i sekvensene	24
Er RNA-konsentrasjonen essensiell for resultatene?	25
<i>PTCHI</i>	26
Resultater fra gelelektroforese.....	26
Kvaliteten på rådata	27
Utprøving av cellelinjene på <i>PTCHI</i>	27
Diskusjon	29
Konklusjon og videre arbeid	32
Referanser	33
Vedlegg	37
<i>Vedlegg 1: Cellekulturoppsett 2</i>	37
<i>Vedlegg 2: Kvalitetsvurdering av oppsett 1</i>	38
<i>Vedlegg 3: Kvalitet av rådata for oppsett 2</i>	42
<i>Vedlegg 4: Kvalitet av rådata for oppsett 3</i>	45
<i>Vedlegg 5: Kvalitet av rådata oppsett for PTCHI</i>	48
<i>Vedlegg 6: Gelelektroforesebilder for oppsett 1</i>	49
<i>Vedlegg 7: Gelelektroforesebilde for oppsett 2</i>	52
<i>Vedlegg 8: Gelelektroforesebilder for oppsett 3</i>	53
<i>Vedlegg 9: Gelelektroforesebilder for oppsett på PTCHI</i>	54
<i>Vedlegg 10: Sekvenseringsresultater for oppsett 1</i>	56
<i>Vedlegg 11: Sekvenseringsresultater for oppsett 2</i>	59

<i>Vedlegg 12: Sekvenseringsresultater for oppsett 3</i>	61
<i>Vedlegg 13: Sekvenseringsresultater for PTCH1</i>	62

Innledning

Genetiske analyser kan utføres ved mistanke om en genetisk feil, enten på bakgrunn av symptomer eller dersom vedkommende kan være arvelig disponert. En gentest innebærer å analysere DNA for å undersøke om pasienten har en variant i et eller flere gener (1). En variant er en permanent endring i gensekvensen. Tidligere ble en slik endring omtalt som en mutasjon, men siden en forandring i DNA ikke alltid fører til sykdom, er variant et bedre beskrivende uttrykk. Det er forskjell på normale varianter og patogene varianter. Normale varianter er genetiske endringer som finnes hos flere personer i befolkningen, men som ikke medbringer kliniske problemer (2). En patogen variant er en endring i et eller flere gener som gjør vedkommende mer disponibel for en sykdom eller en lidelse (3). Genetiske analyser krever celler som inneholder DNA eller RNA. Til vanlig utføres analysene på DNA eller RNA isolert fra fullblod, men DNA kan også isoleres fra andre kilder som spytt, vev og fostervann. DNA er foretrukket prøvemateriale da RNA er mer ustabil og vanskeligere å jobbe med, men noen ganger er det nødvendig å analysere RNA.

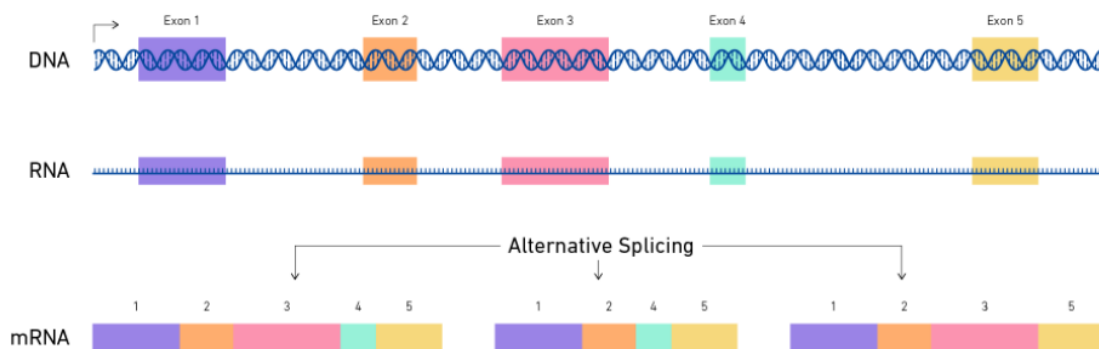
RNA

RNA er mer ustabil enn DNA. DNA-molekylet består av sukkeret deoksyribose, og RNA-molekylet består av ribose med en hydroksylgruppe der DNA kun har et hydrogen-atom. Hydroksylgruppen i RNA gjør molekylet mer reaktivt og derfor kan det lettere degraderes, noe som vil medføre dårlig kvalitet på analysen (4). Likevel er det enkelte analyser som er mer nyttig å utføre på RNA enn på DNA på grunn av informasjonen RNA kan gi. Analyse av RNA utføres ved tre ulike tilfeller. Det første tilfellet er dersom det er mistanke om at en påvist variant på DNA-nivå medfører feilspleising av RNA. Det andre tilfellet er hvis det ikke påvises en patogen variant i DNA, men pasienten har sterke symptomer som tyder på en genetisk sykdom. Dette kan være tilfeller hvor det foreligger dype intron-varianter som vil endre spleisingen. Det siste tilfellet er verifisering av funn av kopitalls-varianter, altså delesjon eller duplikasjon av en eller flere varianter.

Spleising av RNA

Alternativ spleising

Under transkripsjon vil RNA-polymerase lage pre messenger-RNA (mRNA) fra DNA. Eksoner i pre-mRNA vil kunne settes sammen på ulike måter ved alternativ spleising og danne ulike transkripter, altså spleise-isoformer. Alternativ spleising er en normal hendelse ved prosessering av mRNA. Et eksempel på alternativ spleising er vist i figur 1 hvor mRNA blir satt sammen på ulike måter. På denne måten kan én RNA-sekvens kode for flere ulike proteiner. Ulike transkripter kan uttrykkes i forskjellige vev (4).



Figur 1: Eksempel på prosessen alternativ spleising. mRNA vil settes sammen på ulike måter og danne forskjellige transkripter bestående av ulike eksoner og dermed kode for forskjellige proteiner. Figuren er hentet fra *Technology Networks* (5).

Feilspleising

For at spleisingen skal skje korrekt er det viktig at spleisesetet, det vil si overgangen mellom intron og ekson, gjenkjennes av spleise-maskineriet i cellene (6). Nukleotidene i starten og slutten av et intron er spesielt viktige for korrekt spleising. Mutasjoner i dette området kan føre til at deler av eksonet utelukkes fra transkriptet, og noen ganger kan det føre til dannelse av et nytt, kunstig spleisesete som igjen kan føre til at hele eller deler av eksonet ekskluderes under spleising (7).

Dype intron-varianter

Dype intron-varianter er mutasjoner som har oppstått i intron langt vekk fra eksonene. Mutasjonene kan føre til at det blir dannet et spleisesete i intronet som medfører at deler av intronet kan bli en del av mRNA (8). Dette kan enten føre til dannelse av ikke-funksjonelle proteiner eller at det ikke blir dannet noe protein under translasjon. Ved sekvensering av DNA vil som regel ikke mutasjoner dypt i intron oppdages, da PCR-primerne hovedsakelig er spesifikke for eksonene. Sekvensering av RNA gjør det mulig å detektere slike mutasjoner fordi det kan dannes et nytt spleisesete som fører til at RNA blir spleiset feil (6).

Kontroller for genetiske analyser

For å bekrefte at RNA-analyser utføres riktig, brukes en normalkontroll. Den normale kontrollen er viktig for å vurdere om metoden og reagensene fungerer som de skal. Dersom analytiske feil forekommer, vil dette påvirke både kontroll og prøver. I tillegg sammenlignes kontrollen med pasientprøvene som skal vurderes, med hensikten å kunne skille normale varianter fra feilspleiset mRNA. Et gen kan som nevnt gi flere ulike transkripter ved alternativ spleising og dermed kan flere varianter betegnes som normale. Kontrollen skal kunne brukes som en referansesekvens for pasientprøver.

Transformerte cellelinjer

Lymfoblastoide cellelinjer (LCL) brukes ofte i genetiske studier fordi de gir ubegrenset med DNA-materiale. En cellelinje er en cellekultur der cellene er manipulert slik at de har evne til å dele seg uendelig, eksempelvis ved hjelp av Epstein Barr virus (EBV) (9). EBV vil binde seg til B-lymfocytter via spesifikke reseptorer som finnes på celleoverflaten (10). Viruset har evnen til å gå inn i cellen og omprogrammere celleaktiveringen. En endring i celleaktivering fører til forandring i cellevekst, cellesyklus og innhold av proteiner og RNA i cellen. Omprogrammeringen av B-lymfocytten fører til et økt krav om energi, men også økt metabolisme og energiopptak for å tilfredsstille energikravet (11). EBV kan transformere B-lymfocytterne slik at de blir udødelige. Udødelige celler kan dyrkes i ubegrensede mengder og gi ubegrenset tilgang på RNA, noe som er nyttig for genetiske studier som dette.

Korttidskultur av prøver til RNA-analyse

En cellekultur er en kultur bestående av celler hentet fra en organisme, eksempelvis fra en blodprøve tatt av et menneske. Blodet kan tilføres et medium for å fremme vekst av lymfocytter kunstig (12). I en cellekultur vil cellene proliferere til de oppnår maksimal vekst. For at de skal kunne vokse videre må cellene fordeles i nye kulturer og tilsettes nytt vekstmedium. Etter et visst antall proliferasjoner vil ikke cellene klare å dele seg lenger. Dette skiller korttidskulturer fra transformerte cellelinjer. Bakgrunnen for dette er et fenomen kalt senescence, altså cellulær aldring. Cellulær aldring forårsakes blant annet av at telomerene, som er endene på kromosomene, vil forkortes litt etter hver proliferering. Til slutt vil telomerene bli så korte at cellene ikke lenger kan dele seg (13).

For å utføre analyser på RNA kan RNA isoleres fra T-lymfocytter dyrket opp i korttidskultur. Når RNA isoleres fra cellekulturen, vil RNA-transkriptene kunne bevares. Korttidskulturen kan tilsettes puromycin som hemmer nonsense-mediated mRNA decay (NMD). NMD ødelegger transkripter som er kortere enn normalt, noe som kan forårsakes av mutasjoner eller alternativ spleising. Puromycin medfører altså at transkripter av unormal lengde ikke ødelegges og dermed kan detekteres ved sekvensering. For å oppdage mulige degraderte transkript som kan være et resultat av feilspleising, er det essensielt at også disse transkriptene sekvenseres (14–16).

Nevrofibromin 1

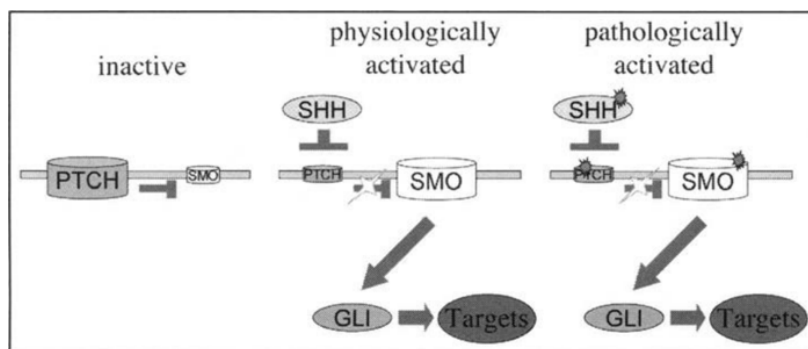
Nevrofibromatose type 1 (NF1) er et autosomt dominant syndrom som rammer 1:3000 individer i verden (17). Nevrofibromin 1-genet (*NFI*) koder for et protein kalt nevrofibromin, som hindrer ukontrollert celledeling, og dermed fungerer som en tumorsuppressor. Nevrofibromin binder enzymet GTPase (guanosintrifosfatase) og forsterker aktiviteten dens. GTPase hjelper et protein kalt Ras med å hydrolysere GTP (guanosintrifosfat) til GDP (guanosindifosfat) slik at Ras inaktiveres. Ras videreformidler signaler fra ulike membranreseptorer til cellekjernen og kan blant annet stimulere til celledeling. Siden nevrofibromin bidrar til å inaktivere Ras, er proteinet delaktig i å hindre ukontrollert celledeling som blant annet kan føre til dannelse av nevrofibromer (18,19).

Syndromet forårsakes av en mutasjon i *NF1*-genet på kromosom 17. Mutasjonen har tilnærmet komplett penetrans, og vil komme til uttrykk i mer eller mindre grad hos alle individer som har arvet den patogene *NF1*-varianten. For at symptomene forbundet med NF1 skal komme til uttrykk, må begge allelene være inaktivert. Tap av normal funksjon resulterer i økt celledeling og migrering som disponerer vedkommende for blant annet utvikling av tumorer. Klinisk observeres café-au-lait flekker, som er hyperpigmenterte hudlesjoner, hos 99% av alle pasienter med NF1. Diagnosen stilles vanligvis først klinisk og kan deretter bekreftes med en genetisk undersøkelse (19).

Rundt 50% av tilfellene av NF1 er nedarvede varianter av *NF1* i familien, mens 50% er nyoppstått (17). For at en forelder skal kunne videreføre tilstanden må vedkommende enten ha syndromet selv, eller at en mutasjon har oppstått i sperm- eller eggcellene. Tilfeller der kun enkelte celletyper har mutert gen kalles mosaikk og er noe man må ta hensyn til under utredning. Detekteres en mutasjon i *NF1* hos en av foreldrene, er det flere par som velger å teste fosteret for varianten fordi de eventuelt ønsker å ta abort. Det er ingen kurativ behandling for NF1 og sykdommen er progressiv. Ved slike tilfeller er testen tidskritisk og resultatet må være 100% riktig på bakgrunn av at abort er på agendaen (2).

Patched 1

Gorlin syndrom er et autosomt dominant syndrom forårsaket av mutasjoner med høy penetrans i genet kalt Patched1 (*PTCH1*) lokalisert på kromosom 9. *PTCH1* koder for et protein med samme navn, Patched1 (PTCH1), som fungerer som en tumorsuppressor for Sonic Hedgehog signalvei. Signalveien kontrollerer celledeling og proliferering i alle celletyper. Sonic Hedgehog-proteinet (sHH) kan binde PTCH1 som til vanlig binder proteinet Smoothed (SMO) og inhiberer det. sHH, PTCH1 og SMO er proteiner som finnes i cellemembranen i alle celler. SMO i aktiv tilstand, vil sende signaler som aktiverer GLI1-proteinet som kontrollerer proliferering av cellene. En mutasjon i *PTCH1* vil kunne medføre inaktivering av genet og SMO vil forbli aktivt og stimulere GLI1. Mutert *PTCH1* vil føre til ukontrollert aktivering av signalveien, som igjen kan føre til kreft (20). Figur 2 viser Sonic Hedgehog signalvei. Gorlin syndrom gir økt risiko for medfødte defekter i skjelett og hodeskalle, tidlig utvikling av hudkreft og utvikling av svulster (21).



Figur 2: Sonic Hedgehog signalvei og innvirkningen PTCH1 har både fysiologisk og patologisk. Smoothened (SMO) er inaktivt ved binding til Patched 1 (PTCH1). Når Sonic Hedgehog-protein (sHH) binder PTCH1 vil SMO bli aktivt og stimulere GLI. GLI kontrollerer celleprolifisering, og vil føre til økt celledeling når det er bundet til SMO. Figuren er hentet fra *Hedgehog-Gli Signaling in human disease* (20).

Problemstilling

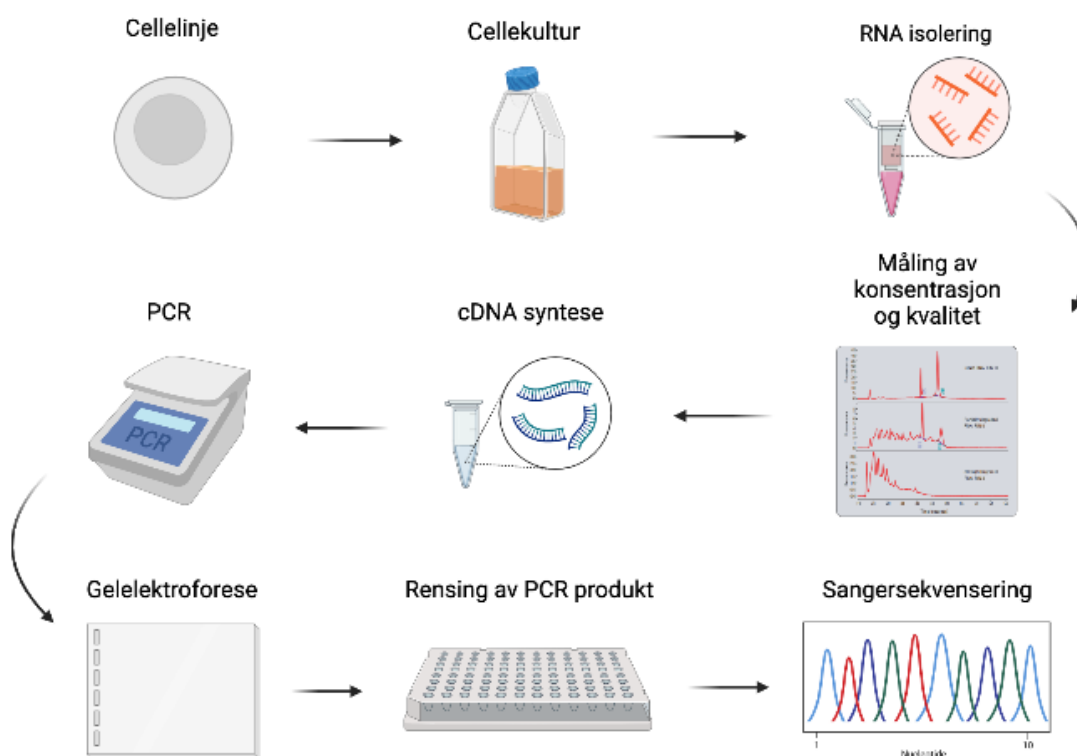
Til nå har avdeling for medisinsk genetikk (AMG) ved St. Olavs Hospital mottatt kontrollmateriale i form av heparinblod til RNA-analyser fra Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin, seksjon blodbank, noe de ikke lenger har tilgang på. Blodgiverne mottok et informasjonsskriv og måtte gi samtykke til prediktiv testing. De ble i tillegg tilbudt genetisk veiledning dersom det skulle forekomme patogene varianter hos vedkommende. Det har blitt mye diskutert hvorvidt det er etisk forsvarlig å benytte blodet til friske personer, da det ville oppstå etiske problemstillinger dersom patogene varianter skulle oppdages. Etter hvert oppstod det problemer med isoleringen av RNA, og det var mistanke om at årsaken var nytt utstyr hos blodbanken. Dermed ble det et ønske om at blodprøven skulle tas separat fra blodgivingen, noe som ikke var gjennomførbart. Det er derfor kritisk å finne en ny kilde til kontrollmateriale.

I forkant av bachelorprosjektet har avdelingen kjøpt to kommersielle cellelinjer fra Coriell Institutt i USA. Ideen om å kjøpe kommersielle cellelinjer og bruke de som kontrollmateriale kom fra en artikkel der cellelinjer ble brukt til å forske på *NFI*-genet (22). Hypotesen vår er at RNA fra cellelinjene vil vise samme egenskaper som RNA fra normale pasientprøver med hensyn på uttrykk av mRNA-transkript. Dette er essensielt for å kunne ta i bruk cellelinjene som kontrollmateriale.

For å teste hypotesen ble to gener valgt ut til RNA-analyse. RNA testes i første omgang for genet *NFI*, hvor analysen omfatter sekvensering av RNA og sekvensene til cellelinjene skal sammenlignes med normale pasientprøver. *NFI* analyseres ofte hos AMG og avdelingen har god oversikt over normale bakgrunner i sekvensene. Derfor ble *NFI* valgt ut til testing av cellelinjene, selv om det ikke brukes normalkontroller til analysering rutinemessig. Dersom cellelinjene viser seg å være lik normalprøver for *NFI*-analyser, er vi interesserte i å teste om det vil fungere for et annet gen, *PTCH1*. *PTCH1* er et gen som analyseres sjeldnere ved AMG og kontrollmateriale er viktig for å filtrere ut normal bakgrunn, i form av alternative transkript, fra feilspleiset RNA med klinisk relevans.

Materiale og metode

For å teste hypotesen ble det utført en omfattende analyse bestående av åtte trinn. I forkant av bachelorprosjektet ble celledyrking, RNA-isolering og cDNA-syntese utført av ansatte ved AMG. Cellelinjene ble dyrket i ulike cellekulturer og etter et par dager ble RNA isolert. Konsentrasjon og kvalitet på RNA ble målt før cDNA-syntesen ble gjennomført. Videre ble cDNA amplifisert med genspesifikke primere under en polymerasekjedereaksjon (PCR). For å bekrefte at nok cDNA hadde blitt amplifisert ble gelelektroforese utført, og før sangersekvensering ble PCR-produktet rensset. Under sangersekvenseringen ble sekvenser fremstilt slik at transkriptene til mRNA kunne studeres. Figur 3 viser en fremstilling av analysegangen.



Figur 3: Oversikt over prøvens gang fra cellelinje til sangersekvensering. Kjøpte cellelinjer ble dyrket fram i cellekultur. Cellene ble høstet fra cellekulturen og RNA ble isolert fra cellene. Konsentrasjonen av isolert RNA ble målt på instrumentet 2100 Bioanalyser (Agilent). Videre ble cDNA syntesert fra RNA og tilsatt primere for å igangsette en PCR-reaksjon. Etter PCR ble gelelektroforese og rensing av PCR-produkt gjennomført. Til slutt ble PCR-produktet sekvensert og sekvensene kunne analyseres i dataprogram. Figuren er laget i BioRender.com

Prøvemateriale

Cellelinjer

For å utvikle cellelinjene har Coriell Institutt brukt fullblod fra forskningsdeltakere, hvor lymfoblastene fra blodet ble infisert in vitro med EBV. Viruset har evnen til å transformere cellene slik at de blir udødelige. De udødelige cellene ble dyrket, og etter hvert som de vokste ble de fortynnet i nytt medium for å fremme videre vekst. Hvis cellelinjene ikke får nok næring i forhold til antall celler vil de nå et vekstplata og etter hvert dø (23). Cellene er altså udødelige så fremst de blir behandlet riktig. LCL er enkle å lage og krever lite vedlikehold (24). Cellelinjene som ble kjøpt inn var humane lymfoblastoide B-cellelinjer med navn GM14807 og GM14547. Cellelinje GM14807 stammer fra en 35 år gammel kvinne, og GM14547 er fra en 44 år gammel mann, der ingen av de hadde noen kjente sykdommer ved tidspunktet for prøvetaking.

Normale pasientprøver

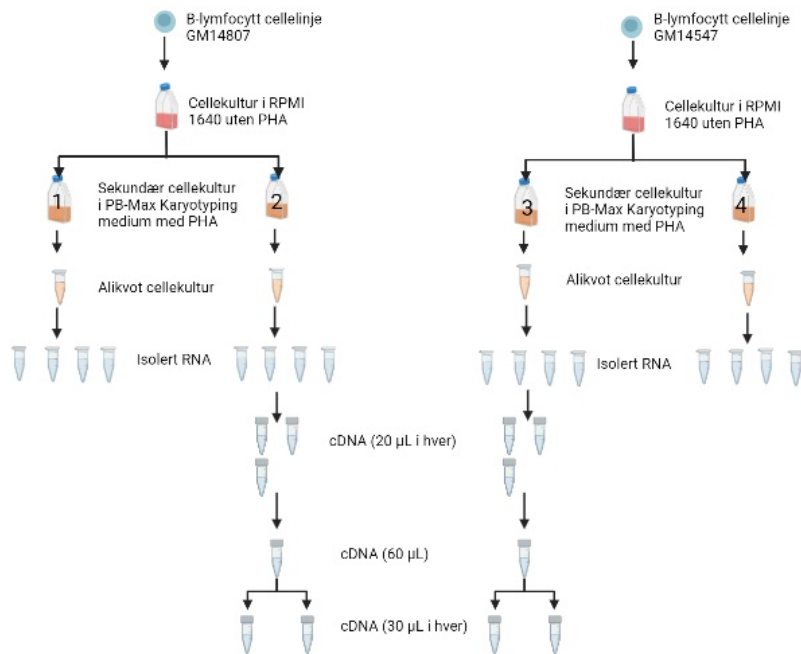
Fordi cellelinjene skulle utprøves som normal kontroll for pasientprøver, ble det benyttet prøver som tidligere har blitt testet uten patogene funn til sammenligning. Pasientprøvene besto av heparinblod som ble dyrket direkte i korttidskultur, hvor RNA ble isolert fra T-lymfocytter. For å aidentifisere prøvene ble de nummerert 1-5, hvor prøve 1-4 er prøver som tidligere har blitt analysert på *NFI* og prøve 5 som tidligere har blitt analysert på *PTCHI*. Foreløpig bruker AMG blodbankprøver som normale kontroller for sekvensering av cDNA, som også ble inkludert i det første oppsettet. Blodbankkontrollen ble behandlet på samme måte som pasientprøvene ved at det ble laget korttidskultur og isolert RNA fra T-lymfocytene.

Cellekultur

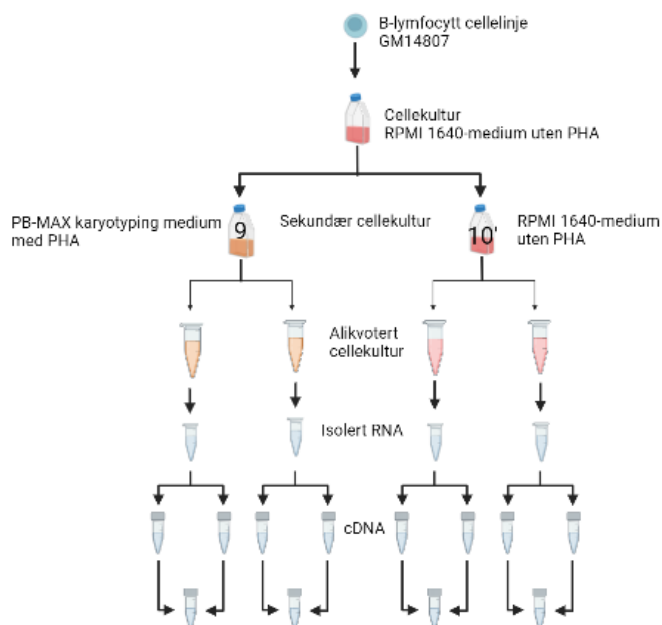
Dyrkning av cellelinjene ble utført ved Institutt for Klinisk og molekylær medisin (IKOM) på NTNU etter deres prosedyrer. AMG kunne ikke utføre dette arbeidet selv fordi det krevde ressurser og utstyr de ikke hadde tilgang til på dette tidspunktet. B-lymfocytter fra cellelinjen og Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-medium ble tilsatt en dyrkningsflaske. Mediet inneholder L-glutamin og 10% føtalt bovins serum (FBS) som fremmer vekst og sørger for at cellene blir mer levedyktige (25). Celledyrkingen hadde intensjonen å aktivere cellesyklus og celledeling slik at cellene kunne proliferere. Siden cellelinjene skulle

sammenlignes med pasientprøver var det essensielt at de fikk mest mulig lik behandling. Derfor ble cellene høstet og dyrket i en korttidskultur hos AMG med mediet PB MAX Karyotyping (PB MAX) som rutinemessig brukes på avdelingen. Mediet er spesielt tilpasset dyrking av lymfocytter i korttidskultur brukt til genetiske analyser (26). PB MAX er et optimalisert RPMI 1640-medium som inneholder FBS, L-glutamin og phytohemagglutinin (PHA). PHA er et protein som kan binde seg til cellemembranen på T-lymfocytter og videre stimulere cellene til økt metabolsk aktivitet og celledeling (27).

Alle cellekulturene ble høstet fra samme celledyrkning utført av IKOM med noen dagers mellomrom. Da cellene ble overført til korttidskultur var det enkelte detaljer som skilte de tre cellekulturoppsettene vist i figur 4a, 4b og vedlegg 1. Det ble laget én korttidskultur for hver cellelinje i første og andre cellekulturoppsett, mens i det tredje oppsettet ble det kun fokusert på cellelinje GM14807. Det tredje oppsettet tok for seg undersøkelse av om type medium eller bytte av medium underveis hadde innvirkning på celledyrkingen. Den ene korttidskulturen ble tilsatt PB MAX-medium og den andre ble tilsatt RPMI 1640-medium. 200 000 celler/mL medium ble tilsatt i første og tredje oppsett, hvor cellene ble høstet etter fire dager. I det andre oppsettet ble det tilsatt 400 000 celler/mL, og for å unngå at cellene skulle gå i metning ble de høstet etter to dager. Cellekulturoppsett 3 var det eneste oppsettet der cellene ble talt før høsting. Celletettheten ble $2.4 \cdot 10^5$ /mL i 10 mL PB MAX-medium og det ble estimert at det ble tilført ca 2.5 millioner celler per RNA-isolering. Det var forventet at 2.5 millioner celler skulle gi en RNA-konsentrasjon på 250 ng/ μ L. For RPMI 1640-mediet ble celletettheten $3.9 \cdot 10^5$ /mL i 10mL medium og estimert at 4 millioner celler ble tilført hver RNA-isolering. Forventet RNA-konsentrasjon fra 4 millioner celler var 400 ng/ μ L (28).



Figur 4a: Cellelinjene GM14807 og GM14547 dyrket i RPMI 1640 medium uten tilsatt PHA. Cellekulturene ble fordelt i to nye flasker hver. De ble tilsatt PB MAX Karyotyping-medium tilsatt PHA og navngitt med tallene 1-4. En gitt mengde av cellekulturen ble tatt ut og det ble isolert RNA fra alikvoten som ble tatt ut. Fra isolert RNA ble det laget cDNA av cellekultur 2 og 3. Tre alikvoter cDNA ble fordelt likt i to eppendorfrør med 30 µL cDNA i hvert rør. Figuren er laget i Biorender.com



Figur 4b: Cellelinjen GM14807 ble dyrket i RPMI 1640 medium uten tilsatt PHA. Cellekulturen ble fordelt i to nye flasker og tilsatt PB MAX Karyotyping-medium tilsatt PHA, Cellekulturene ble navngitt med tallene 9 og 10. Det ble tatt ut to alikvoter av hver cellekultur som videre ble brukt til isolering av RNA. Fra isolert RNA ble det laget cDNA som ble slått sammen til én alikvot. Figuren er laget i Biorender.com.

RNA-isolering

For å isolere RNA ble cellepelletten fra korttidskulturen tilsatt lysesbuffer, og lysatet ble ført gjennom en QIAshredder homogenizer kolonne (QIAGEN). Arbeidet ble utført manuelt, og eluatet ble satt på QIASymphony SP (QIAGEN) for rensing av eluat ved bruk av QIASymphony RNA-kit (QIAGEN) (28).

Måling av konsentrasjon og kvalitet

Til å måle kvaliteten og konsentrasjonen av RNA ble instrumentet 2100 Bioanalyser (Agilent) med Bioanalyser RNA 6000 Nano kit benyttet. Analysen målte konsentrasjonen av RNA i prøven ved bruk av fluorescens. Som et mål på kvalitet ble det oppgitt en «RNA Integrity Number-score» (RIN-verdi) på RNA fra 1-10. RIN-verdien gir en indikasjon på hvor intakt eller degradert RNA-et er, hvor 1 betyr at RNA er helt degradert, mens 10 betyr at det er helt intakt. Applikasjonen for standardisering av RNA-kvalitetskontroll viser til at hver avdeling må fastsette hva som er god nok kvalitet for sine analyser, og AMG har fastsatt en grense for RIN-verdien på ≥ 6 . Prøver med en RIN-verdi lavere enn 6 har for dårlig kvalitet og det vil være nødvendig med en ny blodprøve. Resultatene ble presentert i et elektroferogram, i tillegg til bånd på gelelektroforese (29,30).

One-step PCR

One-step PCR er en prosess hvor både cDNA-syntese fra RNA og genspesifikk PCR foregår samtidig. Metoden er en revers transkripsjon som bruker genspesifikke primere (Eurogentech) og one-step-kit SuperScript III One-step RT-PCR Systems With Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). SuperScript III RT har i oppgave å syntesere cDNA fra RNA. Platinum Taq High Fidelity er en DNA-polymerase som bygger sekvensen med dNTP-er. Metoden er beskrevet i EQS-prosedyre ID: 27580 (31) og ble brukt til amplifisering av *PTCH1*.

Two-step PCR

Til amplifisering av *NF1* ble det utført Two-step PCR som innebærer cDNA-syntese etterfulgt av PCR. Under cDNA-syntese ble SuperScript III First-Strand Synthesis system

(Invitrogen) brukt til å danne cDNA fra et RNA-templat ved revers transkripsjon. Fremgangsmåten for tillaging av cDNA er forklart i EQS-prosedyrer med ID: 27580 og arbeidsark med ID: 27337. PCR med genspesifikke primere (Eurogentech) og cDNA-syntese ble utført med Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Fremgangsmåte og PCR-program hentet fra EQS-prosedyre ID: 27572 og tilhørende arbeidsark med ID: 37694 (31–34).

Gelelektroforese

Gelelektroforese ble utført for å detektere og vurdere produktet etter PCR. For gelelektroforese på cDNA ble det brukt 1.2 % E-Gels agarosegel. cDNA-fragmenter er ofte lange, og av den grunn brukes en gel med lav prosent agarose slik at fragmentene kan vandre lettere gjennom gelen. I tillegg ble det brukt en størrelsesmarkør kalt DNA Molecular Weight Marker VII (Roche), som dekker området 359 til 8576 basepar (0.081 - 8.57 kbp). Størrelsesmarkøren inneholder DNA-fragmenter av ulik lengde slik at det er mulig å fastsette en omtrentlig lengde på fragmentet som analyseres på gel (35).

Hver prøve ble overført til hver sin brønn i gelen. Gelen består av et mikroskopisk nettverk av porer, og når det blir tilført strøm vil negativt ladde fragmenter vandre mot den positive elektroden på andre siden (4). Gelelektroforesen er utført i henhold til EQS prosedyre ID: 28183 (36). Gelen inneholder blant annet etidiumbromid, et mutagen som kan binde seg til DNA og fører til at DNA avgir lys når det blir utsatt for UV-stråling (37,38). Båndene vil dermed ikke være synlig for det blotte øyet. På laboratoriet ble instrumentet GeneFlash (Syngene) brukt for å visualisere resultatene med UV-lys.

Etter gelelektroforese ble «no template control» (NTC) vurdert. NTC skal kun inneholde reagens, og følger prøvene under PCR. Dersom NTC har amplifisert produktet kan det ikke med sikkerhet sies at båndene i prøvebrønnene stammer fra pasientens prøvemateriale eller om de skyldes kontaminasjon.

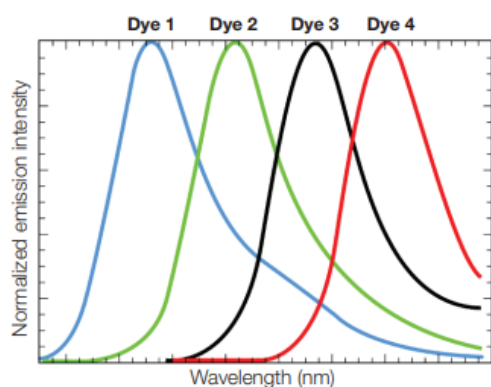
Rensing av PCR produkt

A'SAP er en enzymatisk løsning som ble brukt for å fjerne ubundne primere og nukleotider fra PCR-produktet. Som resultat ville bare PCR-produktet være til stede og klar for sekvensering. A'SAP består av eksonuklease og shrimp alkaline phosphatase (SAP). Rensingen ble utført i henhold til EQS-prosedyre ID: 27572 (32).

Sangersekvensering

Sangersekvensering innebærer en sekvenserings-PCR og kapillærelektroforese. Til sekvensering ble det brukt BigDye v3 (Applied Biosystems) som inneholder enzym, deoksynukleotider (dNTP) og dideoksynukleotider (ddNTP). dNTP og ddNTP er byggesteiner brukt til å lage nye sekvenser under sekvenseringen. Sekvenseringsproduktet måtte renses for ubundne dNTP og ddNTP med BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Fremgangsmåten for sekvenseringsreaksjonen og rensing er gitt i EQS-prosedyre ID: 27572 (32).

Kapillærelektroforese ble utført på 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) hvor sekvenseringsproduktet ble dratt gjennom en kapillær under påvirkning av ladning. Etter bestråling sendte hver av de fire fluoriserende nukleotidene ut signal i form av lys i hver sin farge. Se figur 5 for en visuell fremstilling. Fluorescenssignalene ble konvertert av en software i instrumentet til filtype .ab1 som videre ble brukt til kvalitetsvurdering i Sequence Scanner 2.0 (SeqScanner 2) og analysering i Sequence Pilot (SeqPilot) (32,39).



Figur 5: Illustrativ framvisning av hvordan de ulike nukleotidene avgir eksitasjonslys i ulike bølgelengder når de bestråles av laserlys under kapillærelektroforesen. Figuren er hentet fra *DNA sequencing by Capillary Electrophoresis Chemistry Guide 3. Edition* (Applied Biosystems) (39).

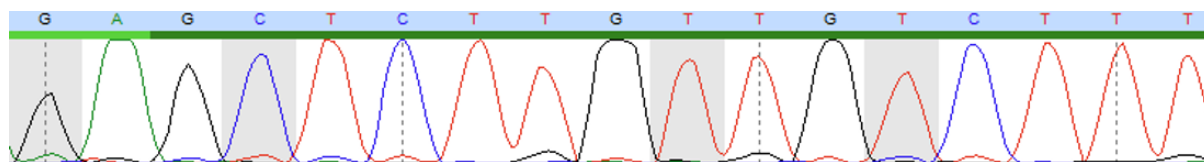
Kvalitetsvurdering

Før analysering var det nyttig å se på kvaliteten av sekvensene etter kapillærelektroforese. Sekvenser av dårlig kvalitet kan være vanskelig å analysere og medfører større sannsynlighet for feiltolkning. Derfor blir ofte prøver av dårlig kvalitet sekvensert på nytt. Til vurdering av kvalitet på rådata ble det benyttet SeqScanner 2 (Applied Biosystems). Det er ingen konkrete regler for vurdering av kvaliteten, fordi så mange faktorer er involvert i prøvegangen, men det er tatt utgangspunkt i følgende tre parametere basert på erfaring, litteratur og brukermanualer; signalstyrke, kvalitetsverdi og elektroferogram (40).

Signalstyrken beskriver fluorescenssignalenes intensitet. Signaler mellom 200 – 15 000 «relative fluorescence units» (rfu) er ansett som god nok styrke til at sekvensene kunne vurderes. For høye eller lave signaler kan gi dårlige sekvenser som gjør analyseringen vanskelig (32).

Kvalitetsverdien viser sannsynligheten for at en «base calling»-feil oppstår. En basecaller er den delen av analyseprogrammet som prosesserer fluorescenssignalene og konverterer signalene til en base i analyseprogrammet. En kvalitetsverdi på 20 betyr at programmet estimerer muligheten for at det blir konvertert feil base til 1%. Analyseprogrammet kalkulerer en kvalitetsverdi for hver base som blir konvertert fra fluorescenssignal og oppgir en samlet kvalitetsverdi som en QV20+-verdi (39).

Dataen fra DNA Analyser fremstilles som et elektroferogram i SeqPilot, hvor en visuell vurdering av kvaliteten kan foretas. Frekvensene representerer én nukleotid og A, T, C og G er representert med hver sin farge: se figur 6. Kvaliteten er god dersom frekvenstoppene er tydelige og det er klart skille mellom hver nukleotid (39).



Figur 6: Eksempel på et elektroferogram fremstilt i SeqPilot. Hver frekvenstopp representerer én nukleotid, hvor A, T, C og G har hver sin farge slik at de lett kan gjenkjennes.

Analyseprogram og nett-ressurser

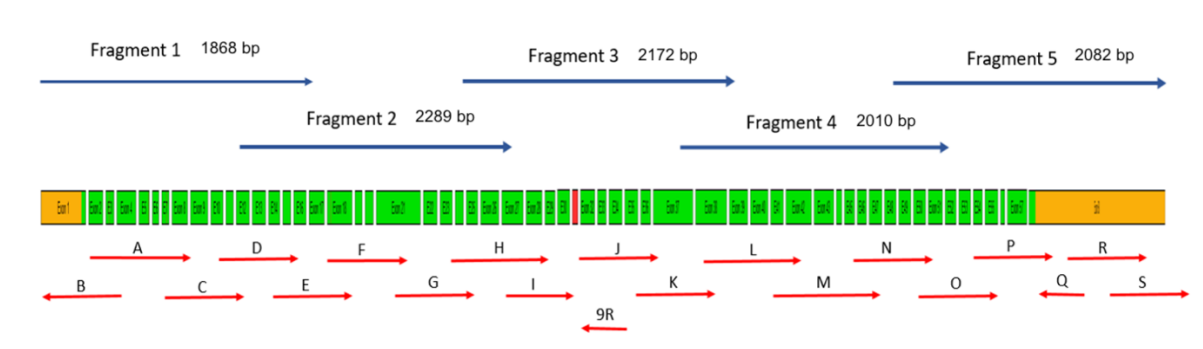
SeqPilot (JSI medical systems) er en analysesoftware bestående av flere moduler, hvor sangersekvensering benytter SeqPatient (41). Fra 3730 DNA Analyser ble sekvenseringsdata eksportert til SeqPilot og programmet kunne fremstille sekvensene i elektroferogram slik at det ble mulig å analysere dem. For å analysere prøver i SeqPilot kreves en referansesekvens. Til NF1 ble referansesekvensen ved navn NM_001042492.2 brukt, som inneholder ekson 31 og totalt 58 ekson. For PTCH1 ble NM_000264.3 brukt som referansesekvens, og inneholder ekson 10 og totalt 23 eksjoner. Sekvensen ble sammenlignet med referansesekvensen, og programmet ville oppdaget om de ikke samstemte. Programmet hadde mulighet til å gjenkjenne enkelte varianter og ga informasjon om at det ble funnet benigne varianter under analyseringen.

Alamut Visual Plus (Sophia Genetics) er et program som har oversikt over basesekvensene til hele det humane genomet. Programmet kan brukes til å undersøke spesifikke baser i humant genom (42). Softwaren har blitt brukt som et hjelpemiddel under studering av sekvensene i SeqPilot.

GnomAD er en nettside med oversikt over ulike data innsamlet fra ulike eksom- og genomsekvenseringer. Nettsiden kan brukes til å sjekke klassifikasjonen og frekvensen til ulike varianter med tanke på hvor ofte de forekommer i befolkningen (43).

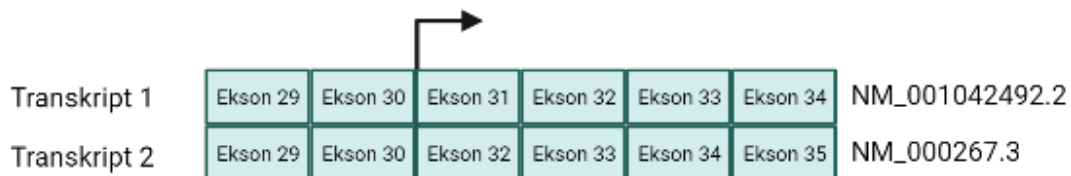
Analyse av *NF1*

NF1 er et stort gen bestående av 60 eksjoner, som er kodende del av DNA. Genet er for stort til en kontinuerlig amplifisering, og det må derfor deles opp i flere PCR-fragmenter før sekvensering. Figur 7 viser en oversikt over hvordan genet er delt inn i fem fragmenter, videre omtalt som short-fragmenter, og hvilke primere som dekker hvilket område. I tillegg viser pilene om primerne virker i forward eller revers retning. Størrelsen og kompleksiteten til genet gjør analyseringen og tolkningen komplisert, fordi det fører til en økt mutasjonsrate i spleiseområdene på genet. Det vil derfor ikke være tilstrekkelig å kun analysere DNA hos alle pasienter, da mange av mutasjonene befinner seg i langt inne i intronet som kun er mulig å detektere i RNA (14).



Figur 7: Oversikt over short-fragmentenes (1-5) og primernes (A-S) plassering. Fragmentene har ulike lengder oppgitt i basepar (bp). I tillegg vises retningen til primerne, forward (pil mot høyre) og revers (pil mot venstre). Figuren er modifisert og hentet fra EQS-prosedyre ID: 27580 (31)

Til vanlig analyseres fullblod ved sekvensering av *NF1* (44). *NF1* vil transkribes til to ulike mRNA-transkript som begge koder for proteinet neurofibromin. Begge transkriptene vil uttrykkes i like stor grad i lymfocytter i blodet. Transkript 1 (T1) inkluderer ekson 31, i motsetning til transkript 2 (T2) som mangler ekson 31. Siden transkriptene uttrykkes like sterkt vil spleisingen se ut som et leserammeskift under analysering i SeqPilot, selv om det egentlig ikke er det. Hvordan det vil se ut er illustrert i figur 8.

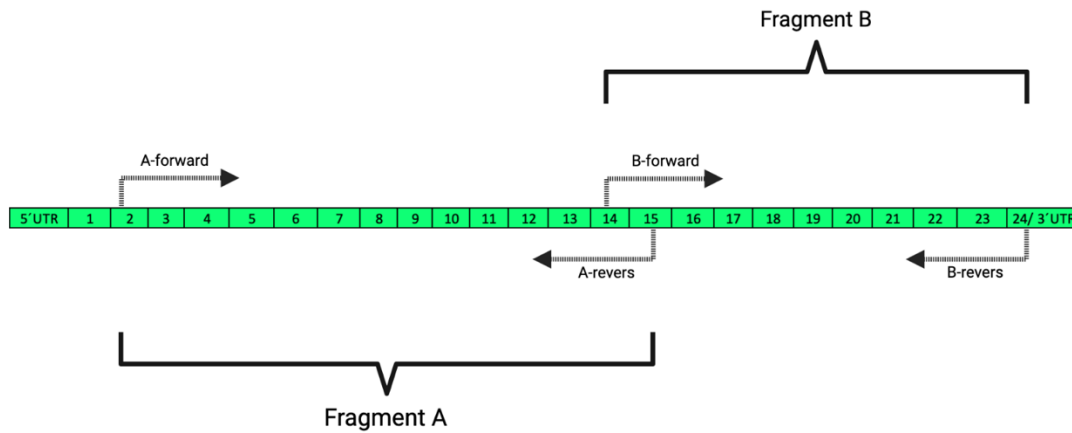


Figur 8: Figuren viser hvordan eksonene i *NF1* vil settes sammen i de ulike transkriptene T1 og T2. Pilen illustrerer hvor transkriptene er ulike. Øverst sees T1 med referanse NM_001042492.2 som har ekson 31, og nederst viser T2 med referanse NM_000257.3 som ikke har ekson 31. Figuren er laget i Biorender.com

Analyse av *PTCH1*

PTCH1 består av 23 eksoner som under analysering ble inndelt i to PCR-fragmenter, kalt A og B. Begge fragmentene har en forward- og en revers-primer. Posisjoneringen av primerene medfører at fragmentene overlappes og alle eksonene vil sekvenseres. Figur 9 viser en skjematisk fremstilling av eksonene i hvert fragment. Fragment A dekker ikke ekson 1 som følge av at sekvensene i eksonet vil ha mye bakgrunn på RNA. Bakgrunnen forårsakes av transkripter som er lavere uttrykt enn hovedtranskriptet. For at hele ekson 23 skal bli

sekvensert er revers-primere til B-fragmentet plassert i ekson 24, som ikke koder for noen aminosyrer og fungerer som ikke-translatert region (UTR).



Figur 9: Oversikt over de 24 eksonene i *PTCH1*. Genet deles inn i fragment A og B, som hver har sin forward og revers primer. Figuren er laget på Biorender.com

Fragment A er generelt mer problematisk å analysere fordi det dekker ekson 10. Ett av transkriptene i *PTCH1*, som mangler ekson 10 (NM_001354918.1) er svakt uttrykt i blodet. Dette vil sees som bakgrunn i ekson 10 under sekvensering. Hvordan transkriptene ser ut i forhold til hverandre etter alternativ spleising er vist i figur 10.



Figur 10: Figuren viser hvordan eksonene i *PTCH1* vil settes sammen i de ulike transkriptene.. Pilen illustrerer hvor transkriptene er ulike. Øverst sees transkript 1b med referanse NM_000264.3 som har ekson 10, og nederst viser transkript 8 med referanse NM_001354918.1 som ikke har ekson 10. Figuren er laget i Biorender.com

Resultater

Konsentrasjon og kvalitet på RNA

Konsentrasjonen og kvaliteten av RNA ble målt før cDNA ble syntesert. Bakgrunnen for dette er at man ønsker å redusere antall prøver med degradert RNA. Degradert RNA vil gjøre analysen upålitelig og noen ganger er det nødvendig med en ny blodprøve fra pasienten. Det ble utført måling av konsentrasjon og kvalitet på cellekultur 2 og 3 fra cellekulturoppsett 1, og på cellekultur 9 og 10 fra cellekulturoppsett 3. Bakgrunnen for dette er at disse cellekulturene skulle brukes videre til sangersekvensering av cDNA. Tabell 1 viser at begge cellelinjene har en RIN-verdi over 8, noe som indikerer at RNA er intakt og dermed av god kvalitet i cellekulturene for cellekulturoppsett 1. RNA-konsentrasjonen var gjennomsnittlig 55 og 42 ng/μL for henholdsvis GM14807 og GM14547, noe som var ganske mye lavere enn forventet basert på teoretisk estimert antall celler tilført hver RNA-isolering på 2.5 millioner celler. Tabell 2 viser resultater for cellekulturoppsett 3 der RNA-konsentrasjonen ble høyere for celledyrkingen i RPMI 1640-medium enn ved dyrking i PB MAX-medium.

Tabell 1: Cellekulturoppsett 1. Cellelinjene GM14807 og GM14547 ble sådd ut i PB MAX Karyotyping-medium. Det ble utført fire parallelle RNA-isoleringer fra hver dyrkingsflaske. Måling av RNA-konsentrasjon ble utført på 2100 Bioanalyzer (Agilent). Instrumentet gir en verdi på konsentrasjonen av RNA og RNA Integrity Number (RIN-verdi) fra 1-10, som sier noe om kvaliteten på RNA. Høy RIN-verdi indikerer god kvalitet.

Cellelinje	Medium	Parallell	Konsentrasjon (ng/μL)	RIN-verdi
GM14807	PB MAX	1	63	9.6
		2	65	9.8
		3	47	9.7
		4	43	8.8
GM14547	PB MAX	1	62	10
		2	44	9.8
		3	41	10
		4	22	9.5

Tabell 2: Cellekulturoppsett 3. Cellelinje GM14807 ble sådd ut i PB MAX Karyotyping-medium og RPMI 1640-medium i to separate utsåinger. Det ble utført to parallelle RNA-isoleringer fra hver dyrkingsflaske. Måling av RNA-konsentrasjon av ble utført på 2100 Bioanalyzer (Agilent). Instrumentet gir en verdi på konsentrasjonen av RNA og RNA Integrity Number (RIN-verdi) fra 1-10, som sier noe om kvaliteten på RNA. Høy RIN-verdi indikerer god kvalitet.

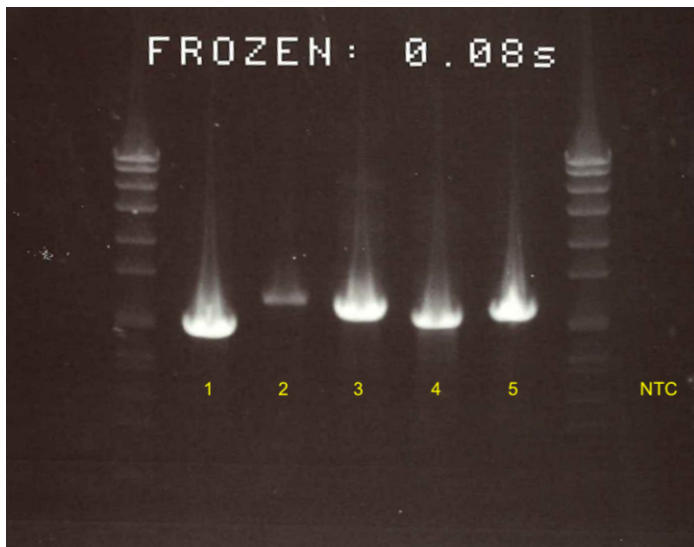
Cellelinje	Medium	Parallell	Konsentrasjon (ng/ μ L)	RIN-verdi
GM14807	PB MAX	1	152	10
		2	121	10
GM14807	RPMI 1640	1	415	10
		2	372	10

NFI

Resultater fra gelelektroforese

Gelelektroforese ble utført etter genspesifikk PCR for å bekrefte at det ble amplifisert nok cDNA. Dette er et kontrollpunkt for å hindre at prøvene sekvenseres dersom det ikke er tilstrekkelig med cDNA. NTC var med som en negativ kontroll og viste ingen bånd på gelen. Det betyr at reagensene ikke var kontaminert med DNA. Det ble laget duplikater av hver prøve for å sikre at minst én parallell var brukbar, med unntak av blodbankkontrollen som bare hadde en parallell.

Figur 11 viser et gelbilde av *NFI* for cellelinje GM14547, og illustrerer hvordan de ulike short-fragmentene vandrer i forhold til hverandre på gel. Fordi short-fragment 1 har færre basepar vil fragmentet vandre lengre på gel. Short-fragment 2 har generelt svakere bånd som kan tyde på at PCR-betingelsene ikke er optimale. Likevel har AMG valgt å beholde betingelsene slik at alle short-fragmentene kan behandles likt.



Figur 11: Gelbilde av alle short-fragmentene i *NF1*-genet for cellelinje GM14547 med cDNA fra cellekultur 3. Nummer 1-5 beskriver short-fragment 1-5. NTC og størrelsesmarkøren DNA Molecular Weight Marker VII er også tatt med.

Vedlegg 6-8 viser bilder fra gelelektroforesen fra de tre oppsettene av *NF1*, hvor hvert short-fragment visualiseres med hver sine gelbilder. Båndene har vandret omtrent likt, og det stemmer med at fragmentene er i samme størrelsesorden. Sterke bånd på alle short-fragmentene viser optimal PCR-reaksjon. Short-fragment 2 har svakere bånd, men har god nok kvalitet til å kunne sekvenseres. Short-fragment 4 har sterk bakgrunn som observeres som ekstrabånd under hovedproduktet ved forlenging av eksponeringstiden. Tilstedeværelsen av bånd på gel sees i cellelinjer, pasientprøver og blodbankkontrollen. Dette beviser at cellelinjene oppfører seg som forventet.

Kvaliteten på rådata

Vedlegg 2-4 viser en oversikt over kvalitetsparametere gitt i SeqScanner 2. Noen sekvenser har gjennomgående lavere QV20+ enn andre da spesifikke primere vil begrense lengden på noen fragmenter. Instrumentet gir en QV20+-verdi ut ifra hvor langt det kan lese en sekvens sammenhengende, og kortere sekvenser vil derfor ha lavere QV20+. Signalstyrken på de fleste sekvensene ble mellom 200 -15 000 rfu, noe som tilsvarer god kvalitet. Enkelte sekvenser har signalstyrker i det lavere sjiktet, men en høy QV20+ kan indikere tydelige sekvenser fordi 3730 DNA Analyzer har klart å lese av en sammenhengende basesekvens.

Under det første oppsettet måtte området som primer E dekker, bli analysert på nytt på 3730 DNA Analyzer fordi signalstyrken ble for lav. Selv om det fortsatt ikke ga resultater ble det

valgt å gå videre med analyseringen av de andre prøvene fordi området dekket av primer E ga sekvenser for de andre prøvene. Dette tyder på at det ikke var noe galt med primeren, kun reaksjonen mellom prøve 1 og primer E. For det siste oppsettet av *NFI* hadde området dekket av primer M og L for prøve GM14807 fra cellekultur 2 lave signaler. Primerne dekker deler av short-fragment 4 og derfor ble hele short 4 analysert på nytt i instrumentet. Dette ga bedre signaler og sekvensene kunne vurderes i SeqPilot.

Utprøving av cellelinjene på *NFI*

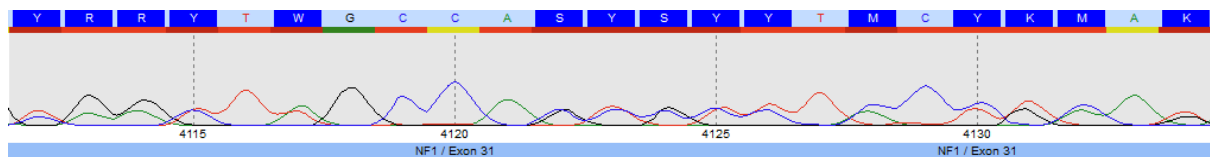
Hensikten med det første oppsettet var å teste hvordan cellelinjene oppførte seg i forhold til normale prøver. Siden det ble laget nye primerløsninger til *NFI*, var det viktig å ha med en tidligere sekvensert blodbankkontroll som en forsikring om at betingelsene for PCR og sekvensering fungerte optimalt. PCR-produkt fra alle short-fragmentene ble sekvensert for å skaffe et overblikk over hele *NFI*-genet.

Tabell 3: Tabellen viser en oversikt over normalvarianter og eventuelle bakgrunnssekvenser påvist i ulike prøver ved analysering av sekvenser. Ingen tekst i ruten vil si at prøven ikke har bakgrunn i den gitte primeren. Bakgrunnen i uthevet skrift er et viktig resultat og indikerer tilstedeværelse av både transkript 1 og 2.

Fragment	Primer	Resultat				
		GM14807	GM14547	Prøve 1	Prøve 2	Blodbank-kontroll
Short 1	B E1-4		c.702G>A		c.702G>A	c.702G>A
Short 2	E E16-20	Bakgrunn c.2034G>A	Bakgrunn	Ingen sekvens	Bakgrunn	Bakgrunn
Short 3	I E28-32	Bakgrunn	Bakgrunn	Bakgrunn	Bakgrunn	Bakgrunn
Short 4	L E37-38				Bakgrunn	
	M E38-42	Bakgrunn	Bakgrunn	Bakgrunn	Bakgrunn	
	N E41-45	Bakgrunn	Bakgrunn	Bakgrunn	Bakgrunn	
Short 5	O E43-45	Udefinert bakgrunn	Udefinert bakgrunn	Udefinert bakgrunn	Udefinert bakgrunn	Udefinert bakgrunn

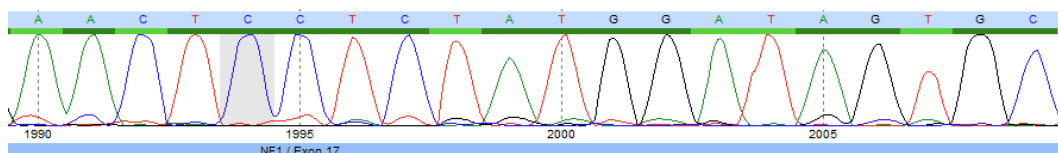
Tabell 3 viser en oversikt over relevante funn under sekvenseringen, som bakgrunn og eventuelle benigne varianter. Bakgrunn defineres som andre sekvenser enn hovedsekvensen, som observeres uten å justere aksene på elektroferogrammet i SeqPilot. Betegnelsen «ingen

bakgrunn» brukes dersom bakgrunnen ikke er sterk nok til at den er tydelig synlig. Resultatet som var nødvendig for å kunne utføre videre testing på cellelinjene, er markert med uthevet skrift. Dette er en bakgrunn i short-fragment 3-I som samsvarer med at et av transkriptene mangler ekson 31. Som nevnt tidligere forekommer dette i blodet da T1 og T2 uttrykkes i like stor grad. SeqPilot har tolket tilfellet som en benign variant i posisjon c.4112_4173, og visuelt vil det illustreres som et leserammeskift. Posisjonen til basene i genet betegnes som c., hvor c.1 er første kodende base i genet. Figur 12 viser et eksempel på slik bakgrunn.



Figur 12: Eksempel på bakgrunn oppfattet som et leserammeskift av SeqPilot (fra GM14547). Utklipp fra vedlegg 10.

Bakgrunn observeres også i short-fragment 2-E med start i ekson 17, som vises i figur 13. Det ble ikke registrert en sekvens for prøve 1 i short-fragmentet, og det er uvisst hva som har skjedd. Bakgrunnen i short-fragment 5-O er udefinert, det vi si at opphavet til bakgrunnen ikke er identifisert. Siden den er til stede og gjennomgående lik i alle prøvene, tas den i betraktning uansett. For en mer detaljert fremvisning av sekvensene brukt til vurdering av cellelinjene, se vedlegg 10.



Figur 13: Eksempel på bakgrunn i en sekvens. Her vises bakgrunn i short-fragment 2-E. Utklipp fra vedlegg 10

I tillegg til bakgrunn ble det detektert benigne varianter som forekom både i cellelinjene og i de normale prøvene. En benign homozygot variant ble funnet i posisjon c.702G>A i short-fragment 1-B hos GM14547, prøve 2 og blodbankkontroll. Varianten forekommer hos 62% av befolkningen, som forteller at det er en normalt forekommende variant (45). Hos GM14807 ble det funnet en benign homozygot variant i posisjon c.2034G>A. Varianten har en allelfrekvens på 38% (46).

Bakgrunn i sekvensene

Videre ble bakgrunn i cellelinjene sammenlignet med normale prøver. Prøvene hadde bakgrunn av ulik intensitet og ble nummerert som 1, 2, 3 og 4. Hovedsakelig var det funn av bakgrunn i short-fragment 2 og 4, og derfor ble de sekvensert på nytt. Dette forsøket ble utført uten blodbankkontroll, fordi det ikke ble ansett som nødvendig da det i oppsett 1 ble sjekket at alle primere fungerte og at sekvenseringen var korrekt utført.

Tabell 4: Resultat fra sekvensering med tanke på bakgrunn i prosent. Prøver med «-» betyr ingen funn og prøver med «x» betyr at de ikke er sekvensert for den primeren. Det ble tatt et valg om å sekvensere prøvene med de primerne hvor det var funnet bakgrunn.

Fragment	Primer	Sekvenseringsresultater					
		GM14807	GM14547	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
Short 2	E	7%	13%	12%	x	8%	x
	E16-20						
Short 4	L	-	-	x	6%	-	6%
	E37-38						
	M	22%	9%	x	6%	8%	6%
	E38-42						
	N	11%	26%	x	9%	-	14%
	E41-45						

Tabell 4 viser funn av bakgrunn ved sangersekvensering. For en mer detaljert framvisning av sekvensene, se vedlegg 11. Bakgrunnen oppgis i prosent og har blitt beregnet med formel 1.

$$\text{Formel 1: \% bakgrunn} = \frac{\text{laveste topp}}{\text{høyeste topp}} * 100\%$$

Siden kun et utvalg av nukleotidene har blitt tatt med til beregning, medfører det noe usikkerhet om beregnet prosent er gjeldende for alle nukleotidene. Prøvene som ble sekvensert med primer E viste bakgrunn i sekvensen. Prøvene sekvensert med primer M viste alle den samme bakgrunnen med start i c. 5610. Bakgrunnen er forårsaket et transkript som mangler ekson 39. Begge cellelinjene, i tillegg til prøve 2 og 4, har bakgrunn i short-fragment 4-N med start i c.6148. Et transkript som mangler ekson 42 er årsaken til bakgrunnen. Bakgrunnens styrke varierer i alle prøvene, men er jevnt over høyere i cellelinjene. Tabell 5 viser en oversikt over gjennomsnittlig signalstyrke for ulike prøver.

Tabell 5: Gjennomsnittlig signalstyrke oppgitt i «relative fluorescence units» (rfu) for short-fragment 2 og 4 i ulike prøver.

Primer	GM14807	GM14547	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
2-E	4289	2913	295	x	1883	x
4-L	x	x	x	813	x	1725
4-M	6698	7140	x	1547	5424	5640
4-N	669	6467	x	6820	x	3494

Er RNA-konsentrasjonen essensiell for resultatene?

Siden konsentrasjonen var så varierende ved cellekulturoppsettene, ble det spekulert i om forskjellen ville påvirke sekvensene selv om kvaliteten jevnt over var god. Cellekultur 10, som ble dyrket i RPMI 1640-mediet, hadde betydelig høyere konsentrasjon enn cellekultur 9 dyrket i PB MAX-mediet. I tillegg ble cellekultur 2 dyrket i samme medium som cellekultur 9, men med lavere RNA-konsentrasjon, tatt med. Som et sideforsøk ble det undersøkt om cellelinjen fortsatt viste T1 og T2 i short-fragment 3 i RPMI 1640-mediet uten PHA.

Tabell 6: Resultater fra sekvensering av GM14807 for short-fragment 4 i NF1 med cDNA fra cellekulturoppsett 3 der cellekultur 10 er dyrket i RPMI 1640-medium og cellekultur 9 er dyrket i PB MAX karyotyping-medium. I tillegg er cDNA fra cellekultur 2 dyrket i PB MAX karyotyping-medium brukt.

Fragment	Primer	Prøveresultater for GM14807		
		Cellekultur 2	Cellekultur 9	Cellekultur 10
Short 4	L E37-38	-	-	-
	M E38-42	7%	8%	7%
	N E41-45	5%	4%	10%

Tabell 6 viser sekvenseringsresultater fra det tredje oppsettet hvor GM14807 med ulike RNA-konsentrasjoner har blitt sekvensert for short-fragment 4. Alle cellekulturene viser bakgrunn i short-fragment 4-M og 4-N som følge av at henholdsvis ekson 39 og 42 mangler i et av transkriptene som er sekvensert. Bakgrunnen er ikke mye høyere i cellekultur 10, men litt høyere i short-fragment 4-N. Uansett ser det ikke ut til at konsentrasjonen har hatt en

innvirkning på mengden bakgrunn. Vedlegg 12 viser utklipp av sekvensene for dette oppsettet fra SeqPilot.

Den gjennomsnittlige signalstyrken for nukleotidene fra de ulike cellekulturene er vist i tabell 7. Cellekultur 10 dyrket i RPMI 1640-mediet hadde signalstyrker høyere enn cellekultur 2 og lavere enn cellekultur 9, som begge ble dyrket i PB MAX-mediet.

Tabell 7: Gjennomsnittlig signalstyrke oppgitt i relativ fluorescens units (rfu) i short-fragment 4 på GM14807. Alikvoter med RNA høstet fra tre ulike korttidskulturer der cellekultur 10 ble dyrket i RPMI 1640-medium og cellekultur 2 og 9 ble dyrket i PB MAX karyotyping-medium.

Primer	GM14807 Cellekultur 2	GM14807 Cellekultur 9	GM14807 Cellekultur 10
4-L	297	1934	617
4-M	724	777	310
4-N	532	1194	810

Short-fragment 3 ble sekvensert for å finne ut om transkriptet som mangler ekson 31 også vil være til stede i cellene dyrket i RPMI 1640-mediet. Som nevnt tidligere skal T1 og T2 være til stede hos alle pasienter, og derfor er det essensielt at dette detekteres i cellelinjene også når de er dyrket i et annet medium. I begge mediene ble det detektert at både T1 og T2 var til stede, ved en bakgrunn i short-fragment 3-I som samsvarer med at et av transkriptene mangler ekson 31.

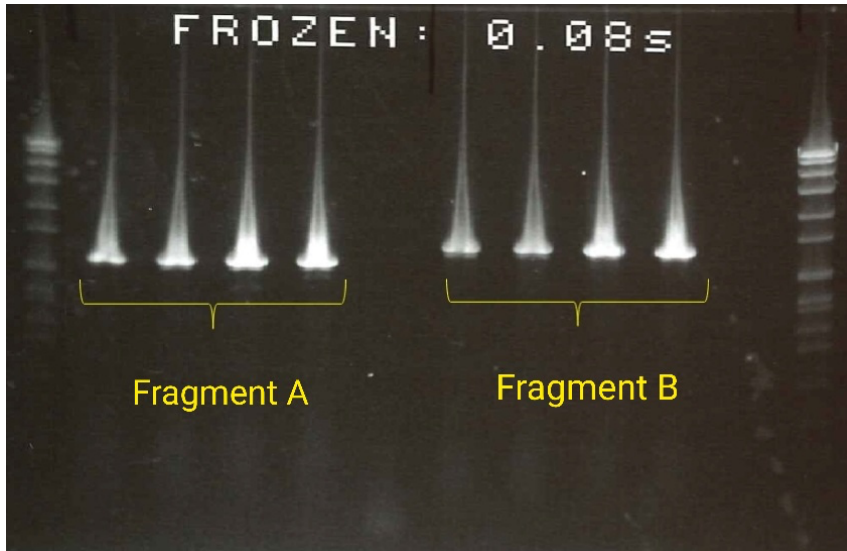
PTCHI

Resultater fra gelelektroforese

Gelelektroforese ble også her utført for å bekrefte at tilstrekkelig med cDNA ble amplifisert ved genspesifikk PCR. NTC er negativ og dermed kan resultatene godkjennes. Duplikater ble laget for alle prøvene for å sikre at produkt ble amplifisert i minst én av parallellene. Vedlegg 9 viser bilder fra gelelektroforese av *PTCHI*, hvor hver gel viser hvert fragment, A og B.

Sekvensene er like lange da båndene har vandret like langt. Båndene er sterke, noe som tyder på at det ble amplifisert tilfredsstillende mengde cDNA. Dersom eksponeringstiden forlegnes, kan det observeres ekstra bånd på gelbilde av fragment A. Fragment B har ingen ekstrabånd

på gel, men første parallell av prøve 5 viser et svakere bånd. Figur 14 viser et gelbilde av *PTCHI* som visualiserer hvordan fragment A og B vandrer på gelen. Det observeres at fragment A vandrer litt lenger enn fragment B, fordi A er et kortere fragment.



Figur 14: Bilde fra gelelektroforsese av *PTCHI* som viser hvordan fragment A vandrer i forhold til fragment B på samme gel. Bildet er hentet fra et tidligere oppsett på AMG.

Kvaliteten på rådata

Vedlegg 5 viser kvalitetsparameterne til *PTCHI* fra SeqScanner 2. Plasseringen av primerne vil avgrense produktets baselengde slik at QV20+ blir lavere for noen sekvenser.

Signalstyrken er gjennomgående høy for de fleste sekvensene, med unntak av GM14807 sekvensert med primer B-8S. For noen sekvenser er signalstyrken under 300 rfu, men fortsatt over minstekravet på 200 rfu.

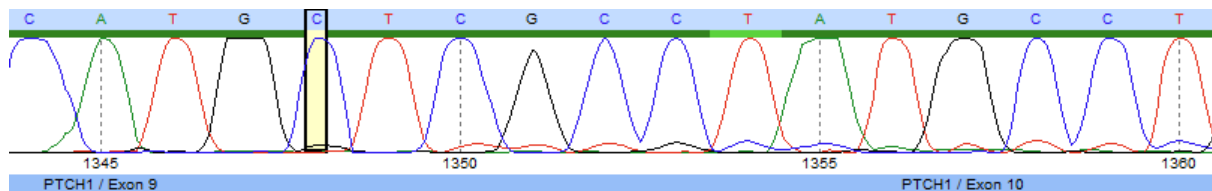
Utprøving av cellelinjene på *PTCHI*

I tillegg til analyse av *NFI* ble det også gjennomført et oppsett på *PTCHI* for å teste om cellelinjene også kunne sekvenseres for andre gener. *PTCHI* er et gen avdelingen ikke analyserer så ofte sammenlignet med *NFI*, og i tillegg viser sekvensene for genet mye normal bakgrunn. Det er derfor viktig med gode kontroller, slik at det er enkelt å skille patogene funn fra det normale under analysering. Det var ønskelig å finne ut om cellelinjene viser den samme bakgrunnen som pasientprøver. Prøve 5 har tidligere blitt analysert på *PTCHI* uten patogene funn, og brukes derfor til sammenligning som en normal prøve. Til sekvenseringen ble det valgt ut cellekultur 2 for GM14807 og cellekultur 3 for GM14547.

Tabell 8: Resultater fra sangersekvensering av *PTCH1* for cellelinje GM14807, GM14547 og prøve 5. Viser funn av bakgrunner og benigne varianter i fragment A og B.

Fragment	Primer	Resultat		
		GM14807	GM14547	Prøve 5
A	5S	Bakgrunn c.1686C>T	Bakgrunn	Bakgrunn c.1686C>T
B	13S	Bakgrunn	Bakgrunn	Bakgrunn
B	B-A		c.3944C>T	c.4080C>T

Tabell 8 viser at begge cellelinjene og prøve 5 har transkript som mangler ekson 10. Dette tydeliggjøres ved at sekvensene har en bakgrunn i ekson 10 med lik baserekkefølge som ekson 11 og bakgrunnen starter i posisjon c.1348. Et eksempel på hvordan bakgrunn i ekson 10 visualiseres i SeqPilot er vist i figur 15. Flere sekvenseringsbilder fra oppsett av *PTCH1* er vist i vedlegg 13. I tillegg har cellelinje GM14807 en benign heterozygot variant i posisjon c.1686 der nukleotid C er blitt byttet ut med T, og det samme har prøve 5. GM14547 har en benign heterozygot variant i c.3944 der C er blitt byttet ut med T. Begge cellelinjene og prøve 5 har også en bakgrunn i primer 13S som starter i ekson 23 og strekker seg over til ekson 24.



Figur 15: Eksempel på bakgrunn i ekson 10 i GM14807 (utklipp fra SeqPilot). Merket område er overgang mellom ekson 9 og ekson 10 i c.1348. De lave sekvenstopkene er bakgrunn forårsaket av et transkript som mangler ekson 10.. Bilde er et utklipp fra vedlegg 13.

Diskusjon

I dette prosjektet studerte vi hvilke mRNA-transkript cellelinjene viste, og om det stemte overens med normale pasientprøver for genene *NF1* og *PTCH1*. Utprøvingen av cellelinjene bekrefter at de oppfører seg som pasientprøver ved analyse av *NF1* eller *PTCH1*. Normale transkript som er forventet uttrykket i blodet, detekteres for begge genene i cellelinjene. T1 og T2 er til stede ved sekvensering av *NF1*, som viser at ekson 31 mangler i det ene transkriptet. For *PTCH1* viser cellelinjene på lik linje med pasientprøven, en bakgrunn som følge av at ekson 10 mangler. I tillegg ble det funnet andre normale bakgrunner som også detekteres i normale prøver. De benigne variantene som ble detektert i *PTCH1* og *NF1*, i både cellelinjer og normale prøver, er også et argument for at cellelinjene kan benyttes som kontrollmateriale. Kontrollen skal som nevnt også kunne brukes som en referansesekvens. Da er det til fordel at kontrollmaterialet viser normale funn som benigne varianter og kjente bakgrunner.

Cellelinjene utgår fra to voksne mennesker som var friske på tidspunktet blodprøven ble tatt. Det ble valgt cellelinjer fra personer i voksen alder fordi det er større sannsynlighet for at de ikke har patogene varianter som kan gjøre dem uegnet som normalkontroll. Dersom det var cellelinjer fra barn og unge som var friske når prøven ble tatt, er det større sannsynlighet for at de vil ha en uoppdaget patogen variant sammenlignet med voksne.

Bakgrunnene som ble detektert forekom i ulik styrke. Det ble observert at cellelinjene har gjennomgående høy bakgrunn. For å konstatere at dette er tilfellet må flere paralleller av cellelinjene for hver primer sekvenseres. Det må beregnes et forholdstall mellom prosent bakgrunn og signalstyrken på sekvensene. Først ut ifra forholdstallet er det mulig å si noe om det er sammenheng mellom bakgrunn og signalstyrke. Det kan være et bra funn, fordi det er ønskelig at bakgrunnen lett gjenkjennes i kontrollmateriale slik at den også lett kan konstateres som normal hvis den er til stede i pasientprøver. Dette ble ikke utført under prosjektet som følge av tidsbegrensinger, men det vil være relevant for avdelingen å se nærmere på etter prosjektslutt.

Cellelinjene sammenlignet med blodbankprøven, som er kontrollen benyttet inntil nå, viser sterkere bånd ved gelelektroforese. Dette betyr at mer PCR-produkt har blitt amplifisert hos cellelinjene. I tillegg ble flere bakgrunner detektert i cellelinjene som tidligere er nevnt som

et ønske for kontrollmateriale. Ulempen med blodbankkontroller er at prøvematerialet er av begrenset mengde, i motsetning til LCL som gir ubegrenset med prøvemateriale. Dessuten er blodbankprøvene tatt av ulike mennesker hvor noen prøver kan ha mye bakgrunn ved sekvensering, mens andre kan ha minimalt. Dermed blir kontrollmaterialet forskjellig fra gang til gang, og det er ikke mulighet for sammenligning av kontrollene fra de ulike analysene. Dette vil ikke være tilfelle ved bruk av RNA fra en cellelinje, da RNA-et vil stamme fra samme person. I tillegg er LCL enkle å lage og krever lite vedlikehold, sammenlignet med samarbeidet med blodbanken som krever en rekke tiltak.

Artikkelen som ideen om å bruke cellelinjer til kontrollmateriale baseres, bruker cellelinjer fra mennesker som har og ikke har påvist NF1, til å forske på *NF1* (22). En annen artikkel som understøtter hypotesen om at cellelinjer kan brukes som kontrollmateriale er en artikkel hvor det ble testet og bekreftet at cellelinjer kunne brukes som positive kontroller (47).

Cellekulturer med ulik konsentrasjon og kvalitet av RNA ble testet for å undersøke om konsentrasjonen var essensiell for sekvenseringsresultatene. Cellekultur 2 med lavest konsentrasjon og RIN-verdi, viste svakere bånd enn cellekultur 9 og 10. Likevel ble det amplifisert tilstrekkelig med produkt ved PCR. Hvorfor konsentrasjonen ble høyere for cellekultur 9 enn cellekultur 2, med tanke på at de begge er tilsatt PB MAX-medium er uvisst. Celletelling ble ikke utført på cellekultur 2 før RNA-isolering og det er derfor uvisst om mengden celler tilført er lik. Cellekultur 9 hadde en tetthet på $2.4 \cdot 10^5$ celler/mL, og basert på RNA-konsentrasjonen etter isolering kan det tenkes at cellekultur 2 hadde lavere tetthet. Cellekultur 10 hadde en betydelig høyere konsentrasjon av RNA. Årsaken til det kan være fordi cellekulturen hadde en tetthet på $3.9 \cdot 10^5$ celler/mL, og det derfor ble tilsatt flere celler i hver RNA-isolering. Trolig var tettheten høyere i cellekultur 10 fordi cellene trivdes bedre i RPMI 1640-mediet. Cellene ble ikke utsatt for et nytt medium, slik cellekultur 2 og 9 ble. Det kan tyde på at cellene trives bedre under konstante forhold, noe som kan skyldes at cellene har tilpasset seg vekstbetingelsene i RPMI 1640-mediet. Da cellene ble sådd ut i PB MAX-mediet kan det være at veksten stoppet opp. Selv om de to mediene er nokså like, kan det tenkes at cellene trenger litt tid for å tilpasse seg et nytt medium og at veksten ville ta seg opp etter en stund. Kanskje hadde konsentrasjonen blitt like høy dersom cellene ble dyrket i PB MAX-mediet fra starten. Hvilket av de to mediene som velges til dyrking av B-lymfocytter har trolig ikke noen betydning. Begge medier inneholder som nevnt FBS og L-glutamin. Den eneste forskjellen er at RPMI-1640-mediet ikke inneholder PHA. PHA vil i hovedsak

stimulerer T-lymfocytter, og mangelen på PHA vil ikke ha noen særlig innvirkning på B-lymfocyttenes proliferasjon, som vi vet.

Da cDNA fra cellekulturene ble sekvensert så det ut til at konsentrasjonen av RNA ikke hadde så stor innvirkning på mengden bakgrunn i sekvensene, som først antatt. Det kan se ut til at både høye og lave RNA-konsentrasjoner kan føre til lavere signalstyrker ved sangersekvensering. Sammenlignet med RNA fra cellekulturene dyrket i PB MAX-mediet, ble det ingen betydelig forskjell i den prosentvise bakgrunnen hos cellekultur 10, som ble dyrket i RPMI-1640-mediet. RNA fra de ulike cellekulturene hadde en RIN-verdi over 8, som betegner god kvalitet. Kanskje har ikke konsentrasjonen så stor betydning så lenge kvaliteten på RNA er tilstrekkelig.

For å vurdere om resultatene er pålitelige, må kvaliteten på sekvensene, kontrollpunktene underveis i prøvegangen og kontrollens resultat vurderes. Under det første oppsettet ble en blodbankkontroll inkludert for å sikre at analysen ble utført korrekt. For de kommende oppsettene ble det tatt et valg om å bare inkludere normale pasientprøver, da de ble ansett å kunne brukes som kontroller med tanke på at de tidligere var analysert for det aktuelle genet og bekreftet normale. Alle prøver, med unntak av blodbankkontrollen, ble satt opp med duplikater som innad har fungert som en kontroll for hverandre ved at de skal være like. Dette vil gi en indikasjon på metodenes og prøvematerialets stabilitet. I tillegg kunne den mest egnede parallellen velges til videre sekvensering basert på mengden amplifisert cDNA etter gelelektroforesen. Bakgrunnen for at det ikke ble laget duplikater av blodbankkontrollen var at det var mangel på kontrollmateriale. Det er også årsaken til at kontrollen ikke ble tatt med i de andre oppsettene. NTC er et av kontrollpunktene underveis og ble godkjent, noe som bekrefter at amplifisert cDNA i prøvebrønnene ikke skyldes kontaminasjon av reagensene. Konklusjonen vil være at sekvensene er representative for de ulike prøvene. Sekvensene ble ansett å være av god kvalitet, noe som understøtter at eventuelle funn er troverdige.

Cellelinjene ble testet på *NF1* og *PTCH1* med to ulike PCR-metoder, One-step og Two-step. RNA fra cellelinjene ble brukt direkte til cDNA-syntese og genspesifikk PCR ved One-step under analysering på *PTCH1*. Ved analysering på *NF1* ble Two-step brukt og de to reaksjonen foregikk separat. At RNA både kan brukes direkte og i separat cDNA-syntese og PCR underbygger at cellelinjene er robuste og stabile.

Konklusjon og videre arbeid

Under dette bachelorprosjektet skulle vi teste om lymfoblastoide cellelinjer kunne brukes som kontrollmateriale for RNA-analyser på gener som analyseres sjeldent. Utprøvingen skulle gi svar på om cellelinjene viste de samme funnene som vi også fant i normale pasientprøver. Resultatene viste at cellelinjene kan fungere som normale kontroller. De kan kontrollere at de ulike stegene i prøvegangen er utført riktig, men de kan også brukes som en referansesekvens under analysing av pasientprøver. Til nå har blodbankprøver blitt brukt som kontrollmateriale ved AMG. Dersom de velger å ta i bruk cellelinjene, vil kontrollmaterialet være mer forutsigbart. I tillegg vil tilgangen på prøvemateriale være større. Det ble undersøkt om RNA-konsentrasjonen hadde betydning for sekvenseringsresultatene, og det så ut til at kvaliteten på RNA hadde en større innvirkning på sekvenseringsresultatene enn RNA-konsentrasjonen. **Det kan konkluderes med at cellelinjene GM14807 og GM14547 kan tas videre til validering som kontrollmateriale for RNA-analyser ved AMG.**

På bakgrunn av den korte tidsrammen ble utprøvingen av cellelinjene begrenset til to gener. Videre arbeid vil bli å teste om cellelinjene fungerer som kontroller for andre gener som er aktuelle for cDNA-analyse. For at cellelinjene skal kunne tas i bruk må de gjennom en valideringsprosess. Under prosessen må dyrkningen av cellelinjene optimaliseres. Avdelingen må bestemme seg for om de ønsker å benytte ressurser fra IKOM ved NTNU, eller skaffe utstyr til å utføre celledyrkningen selv. I tillegg må cellelinjenes reproduserbarhet testes, med tanke på at kontrollmaterialet skal være stabilt. Dersom cellelinjene blir implementert som en normal kontroll i rutinen, må avdelingen også utforme nye og forbedre gamle prosedyrer.

Referanser

1. Gentesting [Internett]. Bioteknologirådet. [sitert 29. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.bioteknologiradet.no/temaer/gentesting/>
2. What is a gene variant and how do variants occur?: MedlinePlus Genetics [Internett]. [sitert 11. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/mutationsanddisorders/genemutation/>
3. Definition of pathogenic variant - NCI Dictionary of Genetics Terms - NCI. I 2012 [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/pathogenic-variant>
4. Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, mfl. Essential cell biology. Fourth edition. Garland Science; 2014.
5. Alternative Splicing: Importance and Definition [Internett]. Genomics Research from Technology Networks. [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.technologynetworks.com/genomics/articles/alternative-splicing-importance-and-definition-351813>
6. Lázaro C, Fernández-Rodríguez J, Serra E. Deep Intronic NF1 Mutations and Possible Therapeutic Interventions. I: Upadhyaya M, Cooper DN, redaktører. Neurofibromatosis Type 1: Molecular and Cellular Biology [Internett]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. s. 173–86. Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-3-642-32864-0_13
7. Jorde LB. Medical genetics. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 2016.
8. Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics. 4. utg. Garland Science; 2011.
9. Fossum S. cellelinjer. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/cellelinjer>
10. Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. I: Human Genetics [Internett]. s. 320–6. Tilgjengelig på: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00279094.pdf>
11. Mrozek-Gorska P, Buschle A, Pich D, Schwarzmayer T, Fechtner R, Scialdone A, mfl. Epstein–Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. Proc Natl Acad Sci. 6. august 2019;116(32):16046–55.
12. Introduction to Cell Culture - NO [Internett]. [sitert 5. april 2022]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html](https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html)
13. Freshney RI. Culture of Animal Cells. 6. Wiley-Blackwell; 2010.

14. Messiaen L, Wimmer K. Advances in Neurofibromatosis Research. I: Cunha KSG, Geller M, redaktører. Mutation Analysis of the NF1 Gene by cDNA-based Sequencing of the Coding Region. Nova Science Publishers, Inc.; 2012. s. 89–108.
15. Schmidt C. Metode; Korttidskultur T-lymfocytter, MedGen Lab ID: 25461 Revisjonsnummer 1.12.
16. Andreutti-Zaugg, C, Scott R, Richard I. Inhibition of Nonsense-mediated Messenger RNA Decay in Clinical Samples Facilitates Detection of Human MSH2 Mutations with an in Vivo Fusion Protein Assay and Conventional Techniques. Tilgjengelig på: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9242462/>
17. Gunder LM, Martin SA. Essentials of Medical Genetics for Health Professionals. Jones & Bartlett Learning; 2011.
18. Fossum S. ras-protein. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2021 [sisert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/ras-protein>
19. Rad E, Tee AR. Neurofibromatosis type 1: Fundamental insights into cell signalling and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;52:39–46.
20. Ruiz i Altaba A. Hedgehog-Gli Signaling in Human Disease [Internett]. Boston, MA: Springer US; 2006 [sisert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <http://link.springer.com/10.1007/0-387-33777-6>
21. Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis.* 25. november 2008;3(1):32.
22. Pemov A, Park C, Reilly KM, Stewart DR. Evidence of perturbations of cell cycle and DNA repair pathways as a consequence of human and murine NF1-haploinsufficiency. *BMC Genomics.* 22. mars 2010;11:194.
23. Scheinfeldt LB, Hodges K, Pevsner J, Berlin D, Turan N, Gerry NP. Genetic and genomic stability across lymphoblastoid cell line expansions. *BMC Res Notes.* 3. august 2018;11:558.
24. Hussain T, Mulherkar R. Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int J Mol Cell Med.* 2012;1(2):75–87.
25. Fetal Bovine Serum (FBS) - NO [Internett]. [sisert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs.html](http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs.html)
26. ThermoFisher. PB-MAX Karyotyping Media For heparinized whole blood samples [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document->

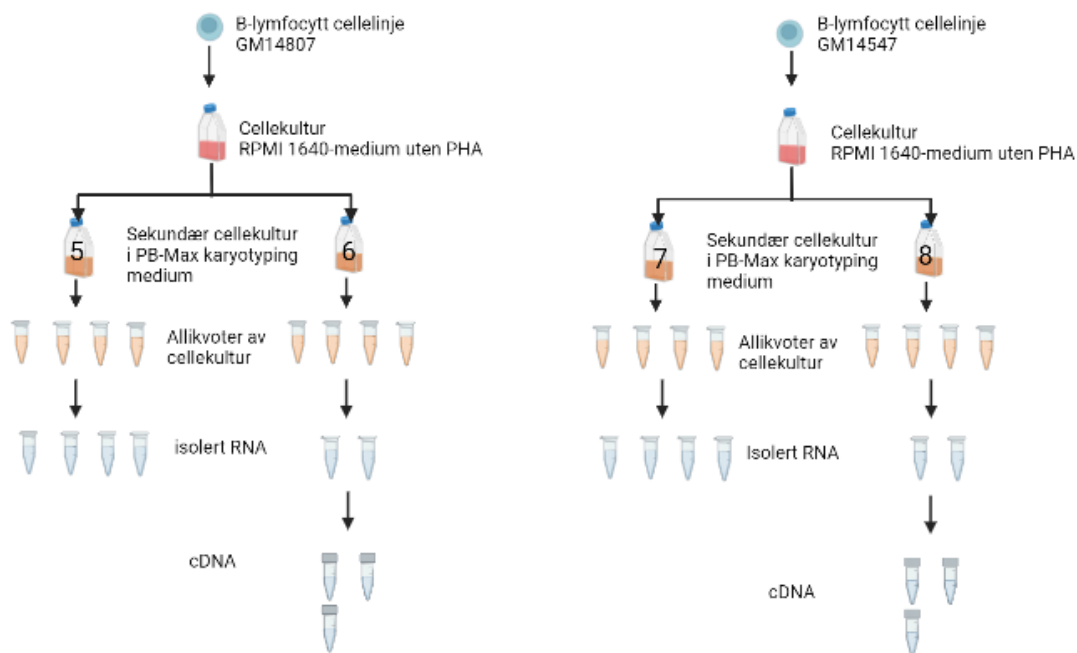
- connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0018538_PB-MAX_KaryotypingMedia_IFU.pdf
27. Movafagh A, Heydary H, Mortazavi-Tabatabaei SA, Azargashb E. The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran J Pharm Res IJPR*. 2011;10(4):895–903.
 28. QIASymphony RNA Handbook. QIAGEN; 2020.
 29. RNA Electrophoresis, RNA Integrity, Bioanalyzer RIN | Agilent [Internett]. [sitert 29. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-rna-kits-reagents/bioanalyzer-rna-analysis-228256>
 30. Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality (Application). Agilent Technologies; 2016.
 31. Schmidt C, Svaasand EK. Metode; RNA-analyser, AMG. ID:27580 Revisjonsnummer 2.3.
 32. Svaasand EK. Metode; Sangersekvensering, AMG. ID:27572 Revisjonsnummer: 2.6.
 33. Bye K. Arbeidsark; RNA, cDNA-syntese, MedGen Lab. ID:27337 Revisjonsnummer: 1.9.
 34. Svaasand EK. Arbeidsark; RNA, TwoStep sekvensering av NF1 cDNA, AMG. ID:37694 Revisjonsnummer: 1.9.
 35. E-Gel Thecnical Guide. Invitrogen;
 36. Schmidt C. Metode; Gelelektroforese, AMG. ID:28183 Revisjonsnummer: 1.7.
 37. mutagener. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2019 [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/mutagener>
 38. Gelelektroforese [Internett]. UIO - Institutt for Biovitenskap. [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gelelektrofor.html>
 39. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis: Applied Biosystems Chemistry Guide. 3. utg. ThermoFisher Scientific;
 40. Noguchi T, Bourdon V, Sobol H. About sequence quality: impact on clinical applications. *Genet Test Mol Biomark*. mai 2014;18(5):299–305.
 41. SEQPATIENT [Internett]. JSI medical systems. [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.jsi-medisys.de/products/sequence-pilot/seqpatient/>
 42. Alamut Visual Plus [Internett]. SOPHiA GENETICS. [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.sophiagenetics.com/platform/alamut-visual-plus/>

43. gnomAD [Internett]. [sitert 18. mai 2022]. Tilgjengelig på:
<https://gnomad.broadinstitute.org/>
44. Syndromer | Norsk portal for medisinsk-genetiske analyser [Internett]. [sitert 3. mai 2022]. Tilgjengelig på:
<https://genetikkportalen.no/?act=tilst&TgID=1&katID=22&TilID=247&PaID=127#panel>
45. 17-29508775-G-A | gnomAD v2.1.1 [Internett]. [sitert 10. mai 2022]. Tilgjengelig på:
https://gnomad.broadinstitute.org/variant/17-29508775-G-A?dataset=gnomad_r2_1
46. 17-29553485-G-A | gnomAD v2.1.1 | gnomAD [Internett]. [sitert 10. mai 2022].
Tilgjengelig på: https://gnomad.broadinstitute.org/variant/17-29553485-G-A?dataset=gnomad_r2_1
47. Yao R, Rich SA, Schneider E. Validation of Sixteen Leukemia and Lymphoma Cell Lines as Controls for Molecular Gene Rearrangement Assays. *Clin Chem.* 1. august 2002;48(8):1344–51.

Vedlegg

Vedlegg 1: Cellekulturoppsett 2

Figur 16 viser hvordan cellekulturoppsett 2 foregikk. Celler fra GM14807 og GM14547 ble dyrket og RNA ble isolert fra cellene. Syntesert cDNA fra dette oppsettet ble ikke brukt til sekvensering.



Figur 16: Cellelinjene GM14807 og GM14547 ble dyrket opp i RPMI 1640 medium uten PHA. Cellekulturene ble fordelt i to nye flasker hver. De ble tilsatt PB MAX Karyotyping-medium tilsatt PHA og navngitt med tall 5-8. Det ble tatt ut fire alikvoter av cellekulturen som ble brukt til å isolere RNA fra. Fra isolert RNA ble det laget cDNA av cellekultur 6 og 7. Det ble laget tre alikvoter cDNA fra hver kultur. Figuren er laget i Biorender.com.

Vedlegg 2: Kvalitetsvurdering av oppsett 1

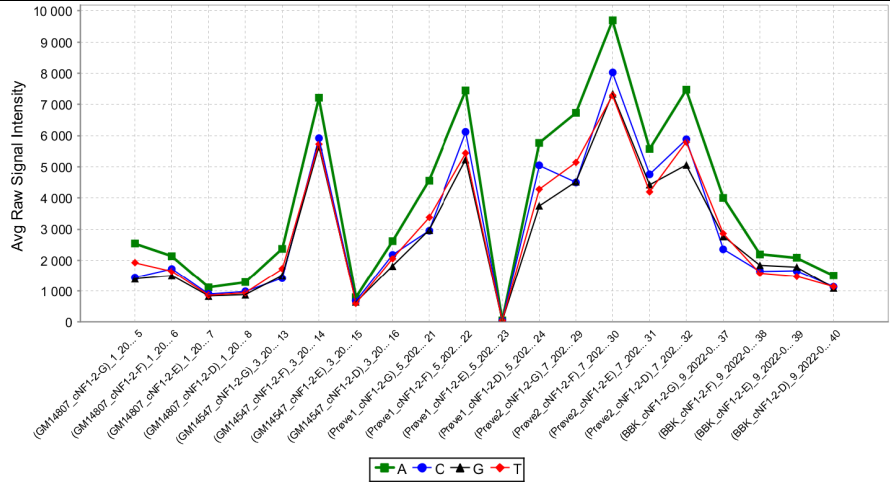
Tabell 9 viser diagrammer fra SeqScanner 2 brukt til vurdering av rådata av hvert short-fragment analysert i oppsett 1. Diagrammene viser gjennomsnittlig signalstyrke for hver nukleotid i ulike primere analysert på hver prøve og antall baser i sekvensen som har kvalitetsverdi over 20.

Tabell 9: Diagrammer for signalstyrke og kvalitetsverdi (QV) på rådata for hver short-fragment 1-5 i oppsett 1. Signalstyrke forteller noe om hvor sterk fluorescensen er for hvert nukleotid. Kvalitetsverdi oppgitt i QV20+ sier noe om hvor mange baser i sekvensen som har kvalitetsverdi over 20.

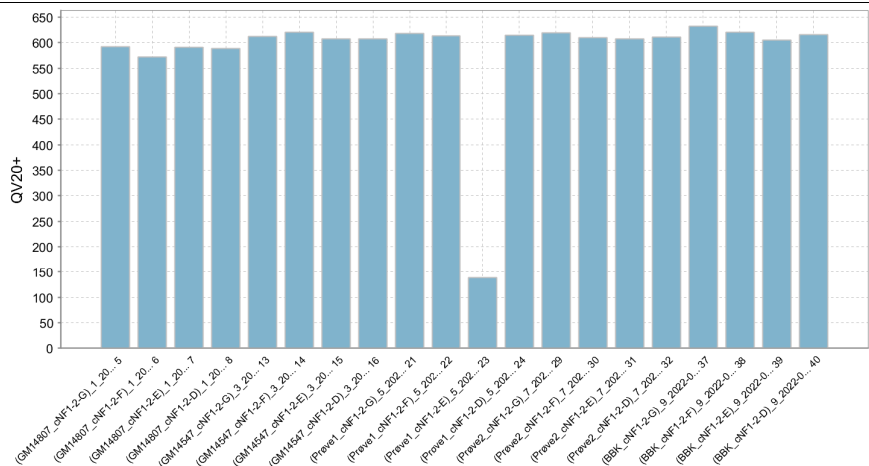
Fragment	Kvalitetsmål	Diagrammer fra Seqscanner 2.0
Short 1	Signalstyrke	
	QV20+	

Short 2

Signalstyrke

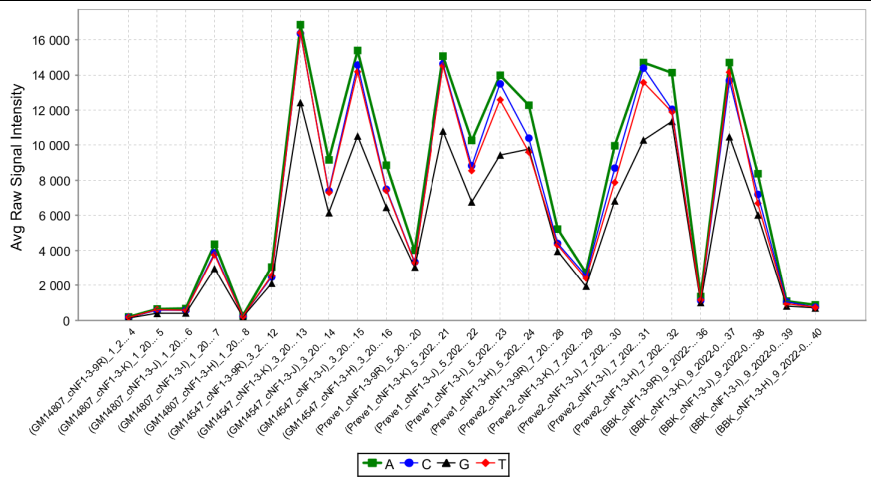


QV20+



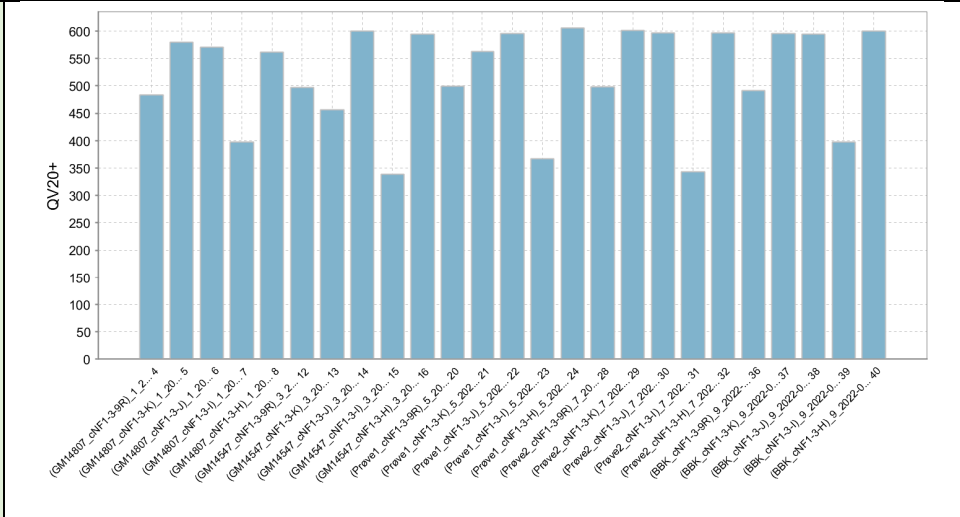
Short 3

Signalstyrke



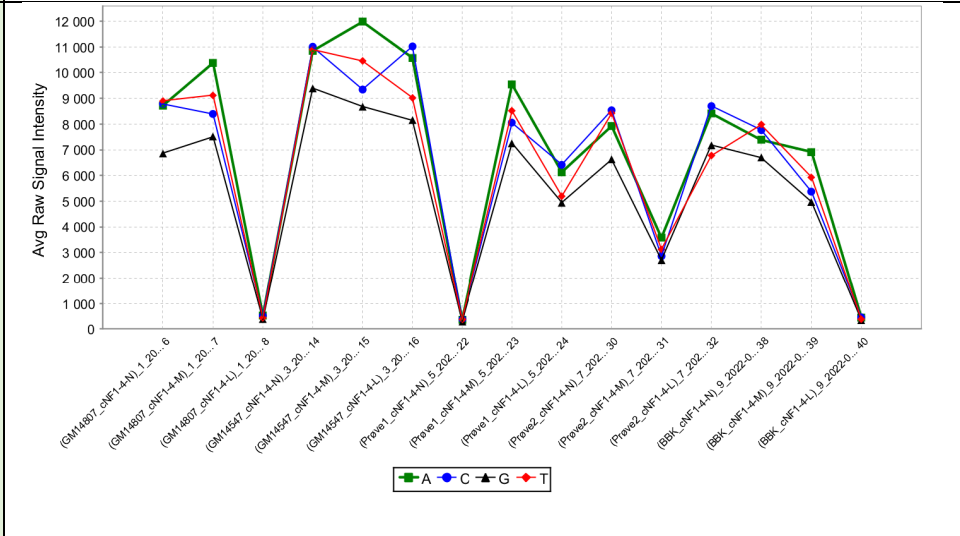
QV20+

QV20+



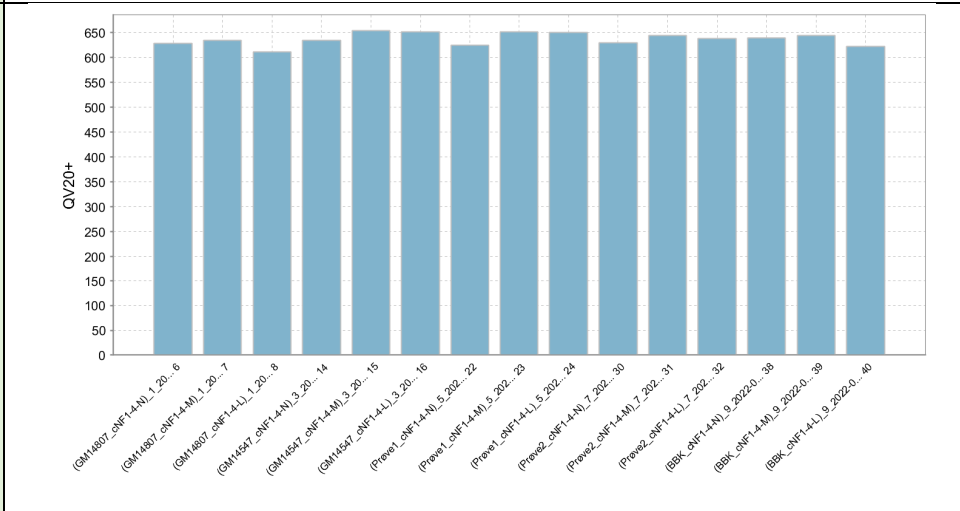
Short 4

Signalstyrke



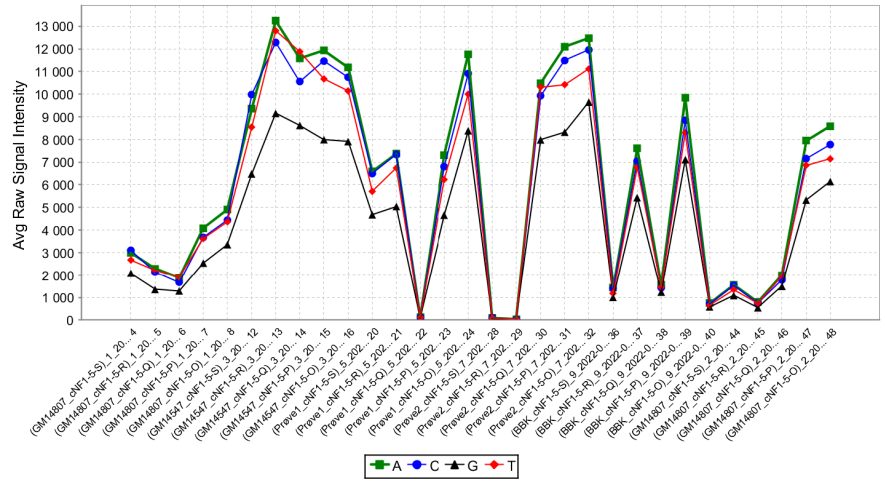
QV20+

QV20+

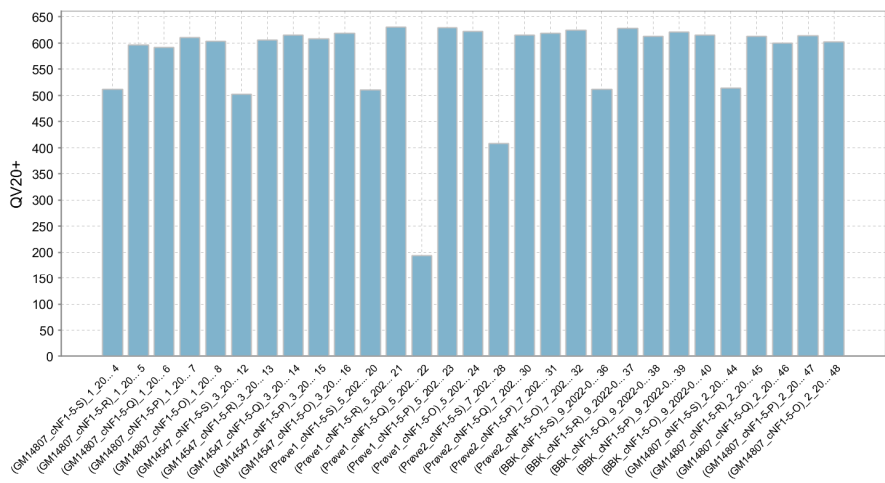


Short 5

Signalstyrke



QV20+



Vedlegg 3: Kvalitet av rådata for oppsett 2

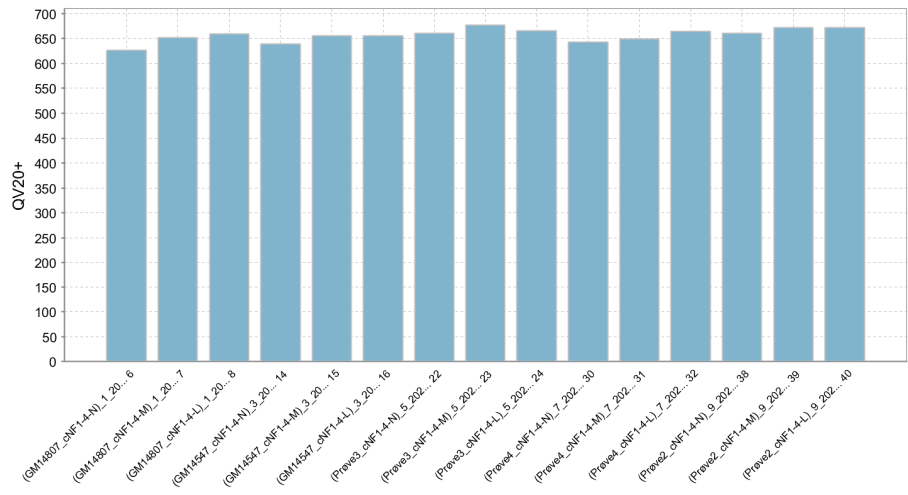
Tabell 11 viser diagrammer fra SeqScanner 2 brukt til vurdering av rådata for hvert short-fragment analysert i oppsett 2. Diagrammene viser gjennomsnittlig signalstyrke for hver nukleotid i ulike primere analysert på hver prøve og antall baser i sekvensen som har kvalitetsverdi over 20.

Tabell 10: Diagrammer for signalstyrke og kvalitetsverdi (QV) på rådata for hver short-fragment 2 og 4 analysert under oppsett 2. Signalstyrke forteller noe om hvor sterk fluorescensen er for hvert nukleotid. Kvalitetsverdi oppgitt i QV20+ sier noe om hvor mange baser i sekvensene som har kvalitetsverdi over 20.

Fragment	Kvalitetsmål	Diagram fra Seqscanner 2.0
Short 2	Signalstyrke	
	QV20+	

Short 2 omkjøring	Signalstyrke	
	QV20+	
Short 4	Signalstyrke	

QV20+



Vedlegg 4: Kvalitet av rådata for oppsett 3

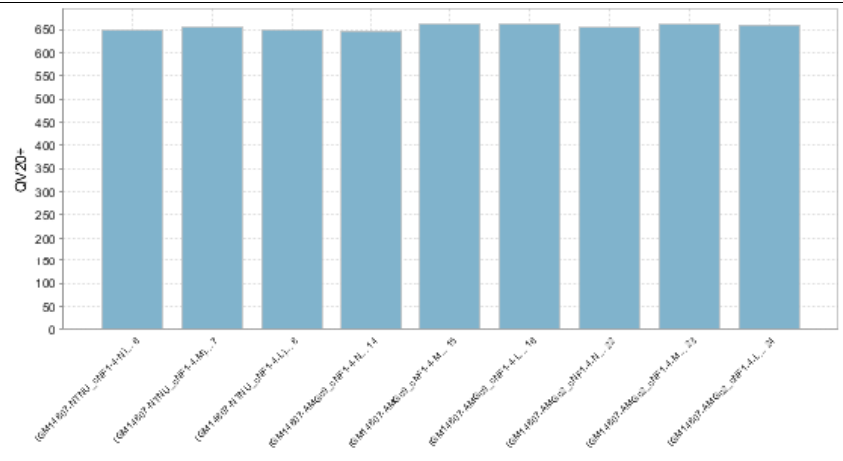
Tabell 12 viser diagrammer fra Seqscanner 2.0 som er brukt til vurdering av kvalitet på rådata for hvert short-fragment analysert i oppsett 3. Diagrammene viser gjennomsnittlig signalstyrke for hver nukleotid i ulike primere analysert på hver prøve og antall baser i sekvensen som har kvalitetsverdi over 20.

Tabell 11: Diagrammer for signalstyrke og kvalitetsverdi (QV) på rådata for hvert short-fragment 3 og 4 analysert under oppsett 3. Signalstyrke forteller noe om hvor sterk fluorescensen er for hvert nukleotid. Kvalitetsverdi oppgitt i QV20+ sier noe om hvor mange baser i sekvensen som har kvalitetsverdi over 20.

Fragment	Kvalitetsmål	Diagram fra Seqscanner 2.0
Short 3	Signalstyrke	
	QV20+	

Short 4	Signalstyrke	
	QV20+	
Short 4 omkjøring	Signalstyrke	

QV20+



Vedlegg 5: Kvalitet av rådata oppsett for *PTCHI*

Tabell 13 viser diagrammer fra Seqscanner 2.0 som er brukt til vurdering av kvalitet på rådata for *PTCHI*. Diagrammene viser gjennomsnittlig signalstyrke for hver nukleotid i ulike primere analysert på hver prøve og antall baser i sekvensen som har kvalitetsverdi over 20.

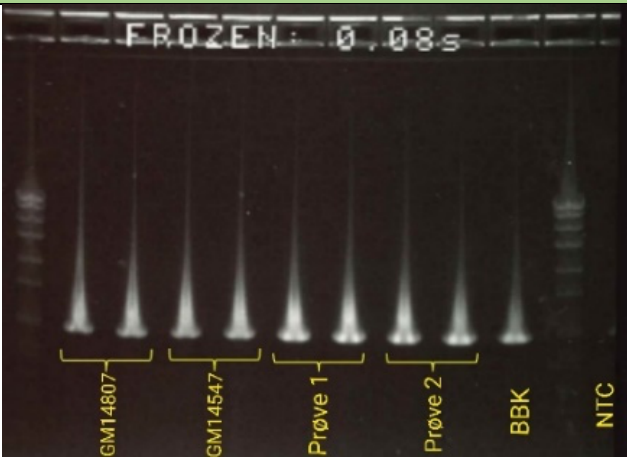
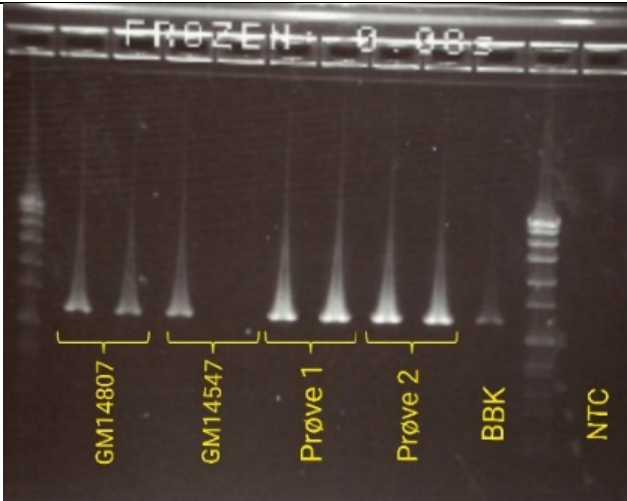
Tabell 12: Diagrammer for signalstyrke og kvalitetsverdi (QV) på rådata for *PTCHI*. Signalstyrke forteller noe om hvor sterk fluorescensen er for hvert nukleotid. Kvalitetsverdi oppgitt i QV20+ sier noe om hvor mange baser i sekvensen som har kvalitetsverdi over 20.

Gen	Kvalitetsmål	Diagram fra Seqscanner 2.0
<i>PTCHI</i>	Signalstyrke	
<i>PTCHI</i>	QV20+	

Vedlegg 6: Gelelektroforesebilder for oppsett 1

Tabell 14 viser gelelektroforesebilder for short-fragmentene analysert i oppsett 1. Ved å øke eksponeringstiden, økes intensiteten på lysstyrken, noe som gjør det mulig å se ekstrabånd på gelen for prøvene som skal sekvenseres for short-fragment 4.

Tabell 13: Bilder fra gelelektroforese for short-fragment 1-5 i oppsett 1. Bildene er tatt med eksponeringstiden 0.08 sekunder. Det ble også tatt gelbilder av short-fragment 4 med en eksponeringstid på 0.24 sekunder for å visualisere ekstrabånd tydeligere.

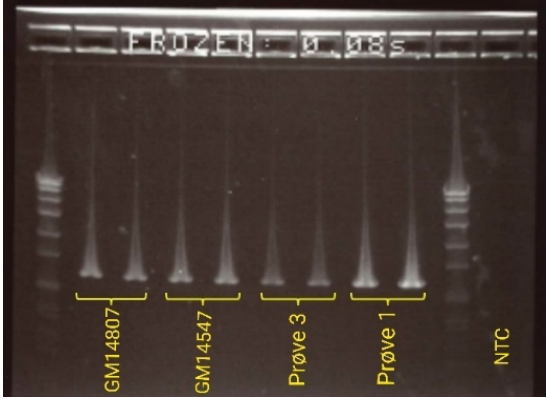
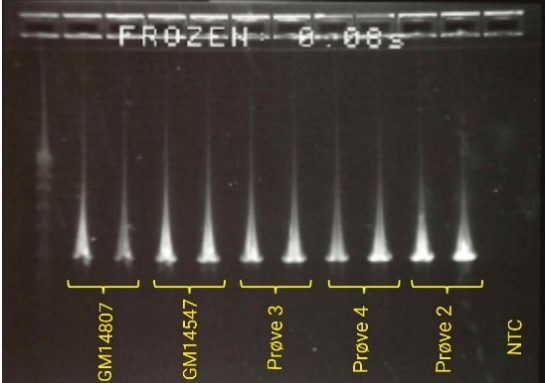
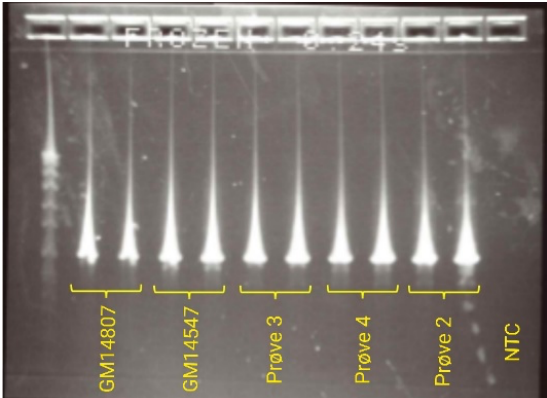
Fragment	Gelbilde fra gelelektroforese
Short 1	
Short 2	

Short 3	<p>FROZEN: 0.08s</p> <p>GM14807 GM14547 Prøve 1 Prøve 2 BBK NTC</p>
Short 4	<p>FROZEN: 0.08s</p> <p>GM14807 GM14547 Prøve 1 Prøve 2 BBK NTC</p> <p>FROZEN: 0.24s</p> <p>GM14807 GM14547 Prøve 1 Prøve 2 BBK NTC</p>
Short 5	<p>FROZEN: 0.08s</p> <p>GM14807 GM14547 Prøve 1 Prøve 2 BBK NTC</p>

Vedlegg 7: Gelelektroforesebilde for oppsett 2

Tabell 15 viser gelelektroforesebilder for short-fragmentene analysert i oppsett 2. Ved å øke eksponeringstiden, økes intensiteten på lysstyrken, noe som gjør det mulig å se ekstrabånd på gelen for prøvene som skal sekvenseres for short-fragment 4.

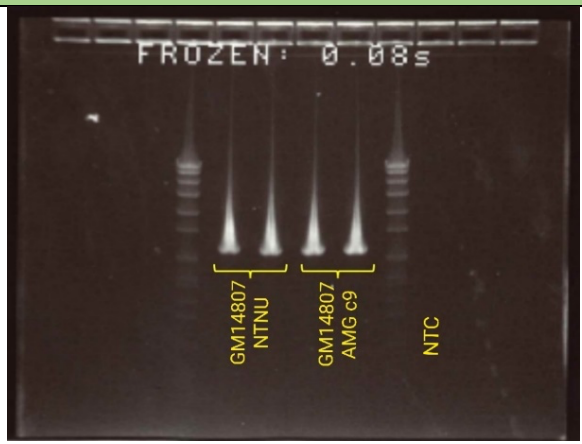
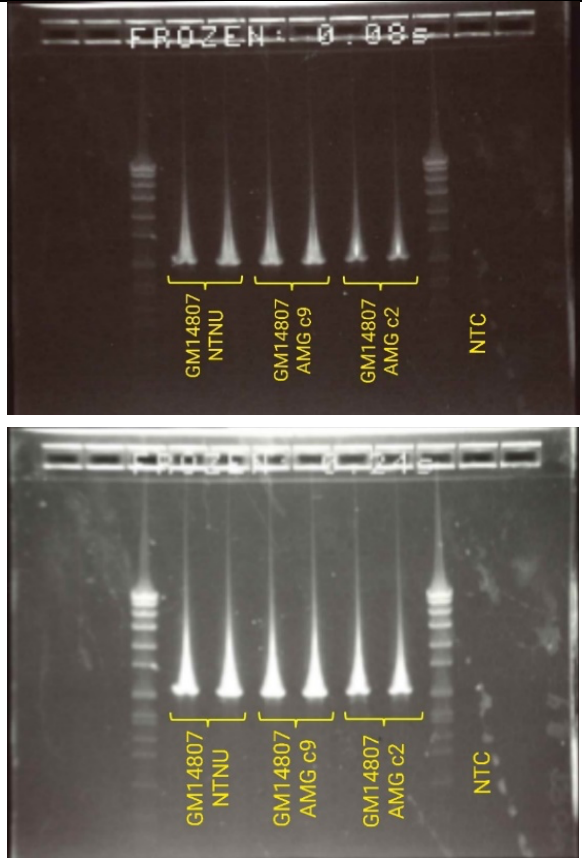
Tabell 14: Bilder fra gelelektroforese for short-fragment 2 og 4 analysert i oppsett 2. Bildene er tatt med eksponeringstiden 0.08 sekunder. Gelbilde av short-fragment 4 ble i tillegg tatt med en eksponeringstid på 0.24 sekunder for å visualisere ekstrabånd tydeligere.

Fragment	Gelbilde fra gelelektroforese
Short 2	
Short 4	
	

Vedlegg 8: Gelelektroforesebilder for oppsett 3

Tabell 15 viser gelelektroforesebilder for short-fragmentene analysert i oppsett 3. Ved å øke eksponeringstiden, økes intensiteten på lysstyrken, noe som gjør det mulig å se ekstrabånd på gelen for prøvene som skal sekvenseres for short-fragment 4.

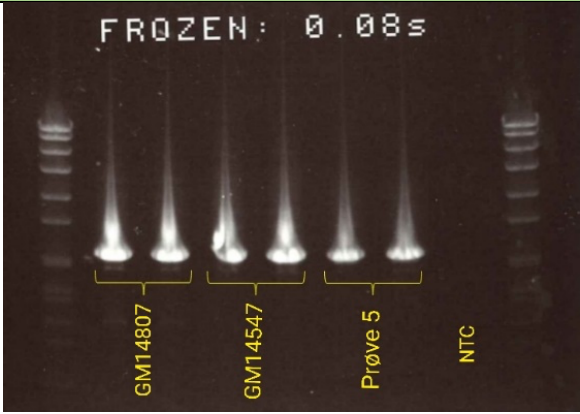
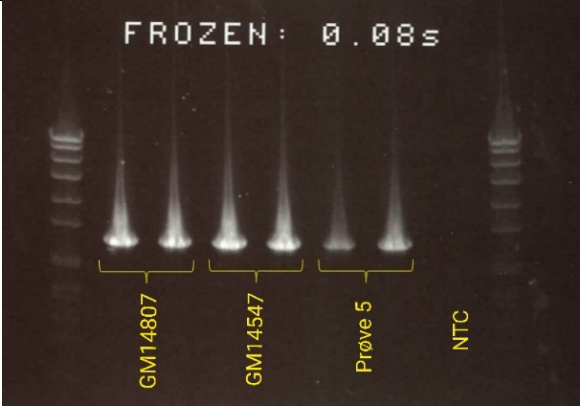
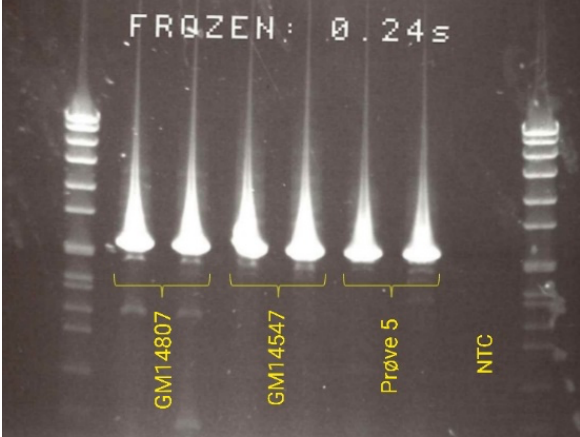
Tabell 15: Bilder fra gelelektroforese for short 3 og 4 analysert i oppsett 3. Bildene er tatt med eksponeringstiden 0.08 sekunder. Gelbilde av short 4 ble i tillegg tatt med en eksponeringstid på 0.24 sekunder for å visualisere ekstrabånd tydeligere.

Fragment	Gelbilde fra gelelektroforese
Short 3	
Short 4	

Vedlegg 9: Gelelektroforesebilder for oppsett på *PTCHI*

Tabell 17 viser gelelektroforesebilder for prøver analysert for *PTCHI*. Ved å øke eksponeringstiden, økes intensiteten på lysstyrken, noe som gjør det mulig å se ekstrabånd på gelen for prøvene som skal sekvenseres fragment B

Tabell 16: Bilder fra gelelektroforese fra analyseoppsett for *PTCHI*. Bildene er tatt med eksponeringstiden 0.08 sekunder. Gelbilde av fragment B ble i tillegg tatt med en eksponeringstid på 0.24 sekunder for å visualisere ekstrabånd tydeligere.

Fragment	Gelbilde fra gelelektroforese
A <i>PTCHI</i>	
B <i>PTCHI</i>	
	

Vedlegg 10: Sekvenseringsresultater for oppsett 1

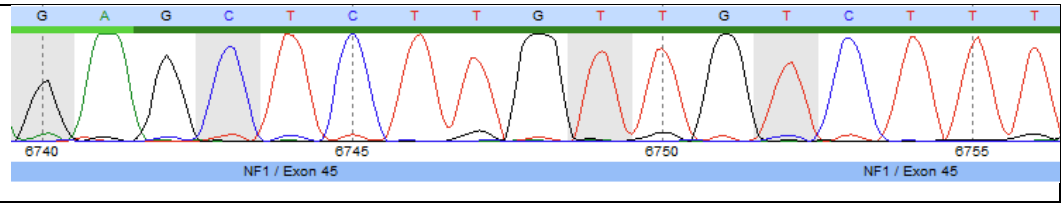
Tabell 18 viser sekvenseringsresultater for prøvene analysert under oppsett 1. Bildene er utklipp av sekvenser med funn av bakgrunn fra SeqPilot. Årsaken til bakgrunnen er definert i tabellen.

Tabell 17: Tabellen viser sekvenser med funn av bakgrunn i gitte primere for de aktuelle prøvene fra oppsett 1. Opphav for bakgrunnen er oppgitt. Sekvens-bildene viser samme bakgrunn for flere prøver.

Opphav	Prøve	Utklipp av sekvenser fra SeqPilot
Bakgrunn i short-fragment 2-E	GM14547	
	GM14807	
	Prøve 2	
Bakgrunn tolket som leserammeskift i short-fragment 3-I	GM14547	
	GM14807	
	Prøve 1	
Bakgrunn i short-fragment 4-M	GM14547	
	GM14807	

(Transkript som mangler ekson 39)	Prøve 1	
	Prøve 2	
Bakgrunn i ekson 42 i short-fragment 4-N (Transkript som mangler ekson 42)	GM14547	
	GM14807	
	Prøve 1	
	Prøve 2	
Udefinert bakgrunn i short-fragment 5-O	GM14547	
	GM14807	
	Prøve 1	

Prøve 2



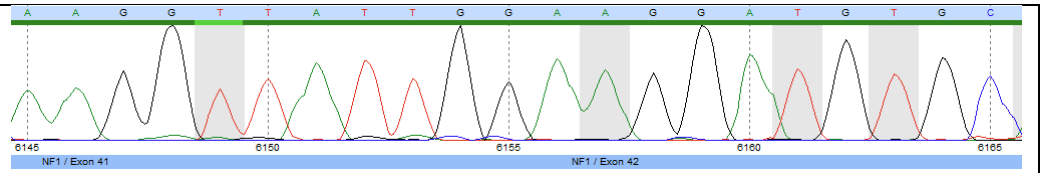
Vedlegg 11: Sekvenseringsresultater for oppsett 2

Tabell 19 viser sekvenseringsresultater for prøvene analysert under oppsett 2. Bildene er utklipp av sekvenser med funn av bakgrunn fra SeqPilot.

Tabell 18: Tabellen viser sekvenser med funn av bakgrunn i gitte primere for de aktuelle prøvene fra oppsett 2. Opphav for bakgrunnen er oppgitt. Sekvens-bildene viser samme bakgrunn for flere prøver

Primer	Prøve	Utklipp av sekvenser fra SeqPilot
Bakgrunn i primer 4-L i ekson 38	Prøve 2	
	Prøve 4	
Bakgrunn i primer 4-M i ekson 39	GM14807	
	Prøve 3	
	Prøve 4	
	Prøve 2	
Bakgrunn i primer 4-N i ekson 42	GM14547	
	GM14807	
	Prøve 4	

Prøve 2



Vedlegg 12: Sekvenseringsresultater for oppsett 3

Tabell 20 viser sekvenseringsresultater for prøvene analysert under oppsett 3. Bildene er utklipp av sekvenser med funn av bakgrunn fra SeqPilot.

Tabell 19: Tabellen viser sekvenser med funn av bakgrunn i gitte primere for de aktuelle prøvene fra oppsett 3. Opphav for bakgrunnen er oppgitt. Sekvens-bildene viser samme bakgrunn for flere prøver

Primer	Prøve	Utklipp av sekvenser fra SeqPilot
Bakgrunn i perimer 4-M i ekson 39	GM14807 c2	
	GM14870 c9	
	GM14807 c10	
Bakgrunn i primer 4-N i ekson 42	GM14807 c2	
	GM14807 c9	
	GM14807 c10	

Vedlegg 13: Sekvenseringsresultater for *PTCH1*

Tabell 21 viser sekvenseringsresultater for prøvene analysert for *PTCH1*. Bildene er utklipp av sekvenser med funn av bakgrunn fra SeqPilot.

Tabell 20: Tabellen viser sekvenser med funn av bakgrunn i gitte primere for de aktuelle prøvene analysert for *PTCH1*. Opphav for bakgrunnen er oppgitt. Sekvens-bildene viser samme bakgrunn for flere prøver

Opphav	Prøve	Utklipp av sekvenser fra SeqPilot
Primer 5S Ekson 10 c.1348	GM14807	
	GM14547	
	Prøve 5	
Bakgrunn i ekson 23 +24 Primer 13S	GM14807	
	GM14547	
	Prøve 5	
Benign variant Primer 5S Ekson 12 c.1686C>T	GM14807	
	Prøve 5	
Benign variant i ekson 23 c.3944 C>T	GM14547	

