

Endre Nergaard Todnem

Påvisning av miR-145 i FFPE- materiale undersøkt med in-situ- hybridisering

Bacheloroppgave i Bachelor i bioingeniørfag

Veileder: Jostein Halgunset

Mai 2019

Endre Nergaard Todnem

Påvisning av miR-145 i FFPE-materiale undersøkt med in-situ-hybridisering



Bacheloroppgave i Bachelor i bioingeniørfag
Veileder: Jostein Halgunset
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Forord

Dette er en avsluttende oppgave som er en del av en bachelorgrad i bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet. Oppgaven ble gjennomført som et metodeutviklingsprosjekt i regi av Avdeling for patologi ved St. Olavs hospital i samarbeid med Biobank 1. Det praktiske arbeidet er gjennomført ved Biobank 1's RNA-laboratorium i Laboratoriesenteret, St. Olavs hospital.

Arbeidet har vært interessant og berikende. Selve prosedyren var relativ langvarig og teknisk krevende, men svært lærerik.

Jeg vil gjerne takke alle som har bidratt i arbeidet med denne oppgaven. En stor takk rettes til faglig- og prosessveileder Professor Jostein Halgunset og til faglig veileder Stud. Med. Eirik Nesje Wiik for uvurderlig hjelp og veiledning under laboratoriearbeidet og skriveprosessen. Jeg vil også takke fagbioingeniør Toril Rolfseng for god hjelp med tilrettelegging av laboratoriearbeidet, og fagansvarlig bioingeniør Kristin Tvette for god hjelp med preparater og alternativ farging av vev.

Trondheim 19.05.2019



Endre Nergaard Todnem

Sammendrag

Denne bacheloroppgaven inngår i et metodeutviklingsprosjekt som ble utført i regi av avdeling for patologi ved St. Olavs hospital i samarbeid med Biobank 1. Arbeidet ble utført ved laboratoriet til Biobank 1, Laboratoriesenteret.

Målet med oppgaven var å benytte in-situ-hybridisering til å påvise miR-145 i vev fra ulike organer for å undersøke hvilke celler som inneholder dette spesifikke miRNA-et.

I flere vitenskapelige artikler er det rapportert sammenheng mellom miR-145 og utvikling av kreft, og det har blitt antydnet at miR-145 kan spille en rolle i utviklingen av kreft.

Hensikten med forsøket var å kartlegge utbredelsen av miR-145 i ulike vevstyper, og analysen ble derfor utført på snitt fra forskjellige organer. Målet var å finne ut om miR-145 kan påvises i snittene, og observere hvilke celler som uttrykte dette.

Gjennomføringen av prosedyren tok cirka 7,5 timer og ble utført 17 ganger. Prosedyren på prøvematerialet ble gjennomført i perioden 11.03- 09.04.2019. Det ble farget snitt fra 134 forskjellige FFPE-vevsblokker fra 11 typer vev.

Vi fant at glatt muskulatur, myofibroblaster og myoepitel alltid uttrykte miR-145. Fibroblaster ga varierte resultater. Normale epitelceller uttrykte oftest ikke miR-145, men i nærheten av granulasjonsvev fant vi positiv reaksjon i noen av epitelcellene. Tumorceller viste varierende resultater. Cellene var primært negative i karsinomer i colon og mamma, samt i osteosarkom og meningeom, mens de var positive i urotelial svulster, pleomorft adenom og kondroid syringom. I ventrikkeltanser og mesoteliom varierte resultatene fra snitt til snitt.

Resultatene viser at miR-145 uttrykkes i stromale celler, mens uttrykk i tumorceller varierer fra organ til organ og fra snitt til snitt.

Abstract

This bachelor thesis is part of a method development project conducted by the Department of Pathology at St. Olavs Hospital in cooperation with Biobank 1. The work was carried out at the laboratory of Biobank 1, Laboratorienesenteret.

The purpose of the experiment was to use in-situ-hybridization to detect miR-145 in tissue from different organs to investigate which cells contained this specific miRNA.

Several scientific journals have reported a connection between miR-145 and the development of cancer, and it has been suggested that miR-145 might play a part in the development of cancer.

The purpose of the investigation was to map the distribution of miR-145 in different kinds of tissue, therefore the analysis was done on sections from different organs. The aim was to discover if miR-145 could be detected in the sections, and to observe which cells expressed this. The completion of the procedure took ca. 7,5 hours, and it was done 17 times. The procedure was done during the period of 11.03-09.04.2019. During this period sections from 134 different FFPE tissue blocks from 11 kinds of tissues were stained.

We discovered that smooth muscle, myofibroblasts and myoepitel always expressed miR-145. Fibroblasts varied in their expression. Normal epithelial cells usually did not express miR-145, but close to granulation tissue we discovered positive reactions from some of the epithelial cells. The tumor cells showed varied expression of miR-145. The cells were primarily negative in carcinoma in colon and mamma, as well as in osteosarcoma and meningioma, while they were positive in urothelial tumor, pleomorphic adenoma and chondroid syringoma. In gastric cancer and mesothelioma the results varied between sections.

The results show that miR-145 is expressed in stromal cells, while the expression in tumor cells varies between different organs and different sections.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract.....	iii
Innholdsfortegnelse	iv
1. Innledning.....	1
2. Teori	3
2.1 Generelt om MiRNA	3
2.1.1 Oppbygning av miRNA.....	3
2.1.2 Dannelse av miRNA.....	3
2.1.3 Navnsetting av miRNA	4
2.1.3 Funksjonen til miRNA.....	5
2.2 Kort om Mir-145	6
2.3 Måling av miRNA	6
2.3.1 Northern blot og miRNA mikromatrise.....	6
2.3.2 Polymerasekjedereaksjon (PCR)	7
2.3.3 In-situ-hybridisering	9
2.3.4 Hybridiseringsprober	10
2.4 Teoretisk bakgrunn for metoden	11
2.4.1 Forberedelse til hybridisering.....	11
2.4.2 Hybridisering og farging	12
2.4.3 Bevaring av preparat.....	13

3. Materiale og metode	14
3.1 Utstyr og prøvemateriale	14
3.1.1 Innkjøpte reagenser.....	14
3.1.2 Maskiner	15
3.1.3 Labutstyr	16
3.1.4 Prøvemateriale	17
3.2 Metode	19
3.2.1 Snitting	19
3.2.2 Deparafinering	19
3.2.3 Avmaskering.....	20
3.2.4 PBS-vask	20
3.2.5 Hybridisering	20
3.2.6 SSC-vask	21
3.2.7 Blokkering	22
3.2.8 Antistoffreaksjon	22
3.2.9 PBS-T vask	22
3.2.10 AP substratreaksjon	22
3.2.11 Stopp av substratreaksjon	23
3.2.12 Vask med springvann	23
3.2.13 Kjernefarging.....	23
3.2.14 Dehydrering	24
3.2.15 Montering	24
4. Resultater	25
4.1 Observasjoner i snitt	25
4.2 Bilder av fargede snitt	28

5. Diskusjon.....	34
5.1 Observasjoner i snitt.....	34
5.2 Metodeforskjeller.....	35
5.3 Resultatenes relevans.....	37
5.4 Feilkilder ved miRNA ISH.....	38
5.4.1 Mulige feilkilder.....	38
5.4.2 Feilkilder oppdaget under forsøket.....	39
6. Konklusjon	40
7. Referanser.....	41
8. Vedleggsliste	44

1. Innledning

En av de viktigste beslutningene som skal tas når et forskningsprosjekt starter er hvilke metode(r) som skal brukes. Gjennom tidene har det blitt utarbeidet mange metoder for å teste og kvantifisere nytt og gammelt prøvemateriale. I en tid der vi ofte arbeider med forskningsobjekter som er for små for det menneskelige øye, er dette valget viktigere enn noen gang. Benyttes feil metode kan dette medføre unødvendig bruk av tid og ressurser, og det kan gi resultater som er enten mangelfulle, ufullstendige, eller rett og slett feil.

Et relativt nytt prøvemateriale er mikro-RNA (miRNA), som ble oppdaget på 90-tallet, og som vi fortsatt har lite spesifikk kunnskap om. MiRNA er korte, ikke-kodende RNA-molekyler som er en del av kroppens genregulering. Mye er ukjent om miRNA, og mange forskningsprosjekter er derfor relatert til miRNA (1). Den mest brukte metoden for testing av miRNA er kvantitativ revers transkriptase polymerasekjedereaksjon (RT-qPCR). I denne metoden blir miRNA omgjort til komplementært DNA (cDNA) ved bruk av enzymet revers transkriptase. I vevsvæsker kan dette ofte gjøres direkte, men i vev må miRNA-et først hentes ut av cellene. Dette cDNA-et masseproduseres så ved bruk av en prosess der dobbeltrådig DNA splittes opp til enkeltråder, nytt DNA dannes ved hver tråd, som igjen splittes opp. Dette gjøres gjennom en tretrinns prosess som gjentas flere ganger. I teorien vil mengde cDNA fordobles ved hver repetisjon, men i praksis er reaksjonen mindre effektiv. Løsningen vil også inneholde en stor mengde prober, små komplementære RNA-biter, som har blitt merket med et fluorescerende molekyl. For hver repetisjon måles fluorescens, og ut fra resultatene blir mengde miRNA i prøven beregnet (2).

Dette prosjektet omhandler metodeutvikling, der tilstedeværelse av miRNA måles kvalitativt ved in-situ-hybridisering. Metoden er i dag lite brukt i kartlegging av miRNA i vev. I de fleste forsøk benyttes PCR siden den er kvantitativ, rask og presis. Tanken bak dette forsøket er at in-situ-hybridisering kan gi informasjon som PCR ikke kan: mengden miRNA i *cellene* (3).

Det er en stor forskjell på hva ulike metoder faktisk måler. Under PCR blir cellene ødelagt og blandet sammen, og i andre metoder som mikromatrise eller northern blot kan i tillegg flere prøver blandes sammen for å få nok materiale. Dette betyr at en måler den totale mengden miRNA i hele vevsprøven. Siden vev er heterogent, mistes informasjonen om hvilke celler miRNA kommer fra.

Under in-situ-hybridisering brukes en nukleinsyretråd, en probe, med en sekvens som er komplementær til det miRNA-et en ønsker å studere. Denne proben kan binde seg til eventuelle målsekvenser i et vevssnitt ved hybridisering. Proben har blitt merket med en kjemisk gruppe som i neste omgang kan kobles til et visualiseringssystem som igjen gir opphav til en synlig reaksjon i snittet. Denne fargereaksjonen observeres så ved mikroskopisk undersøkelse. Dette gjør at vevets komposisjon beholdes, og en kan måle cellenes uttrykk av miRNA semi-kvantitativ (med øyemål). Forskjellen mellom disse metodene er altså at de første, PCR, mikromatrise og northern blot måler *vevets* innhold av miRNA, mens ISH måler *cellenes* innhold av miRNA (3).

I dette forsøket utføres in-situ-hybridisering med mål å påvise miR-145 i vev fra ulike organer.

Problemstilling:

Hensikten med oppgaven er å kartlegge utbredelsen av miRNA type hsa-mir-145 i vev med celleendringer i ulike organer, med fokus på om miRNA uttrykkes i normalt stroma og/eller epitel, og om det kan påvises i ulike tumorceller.

2. Teori

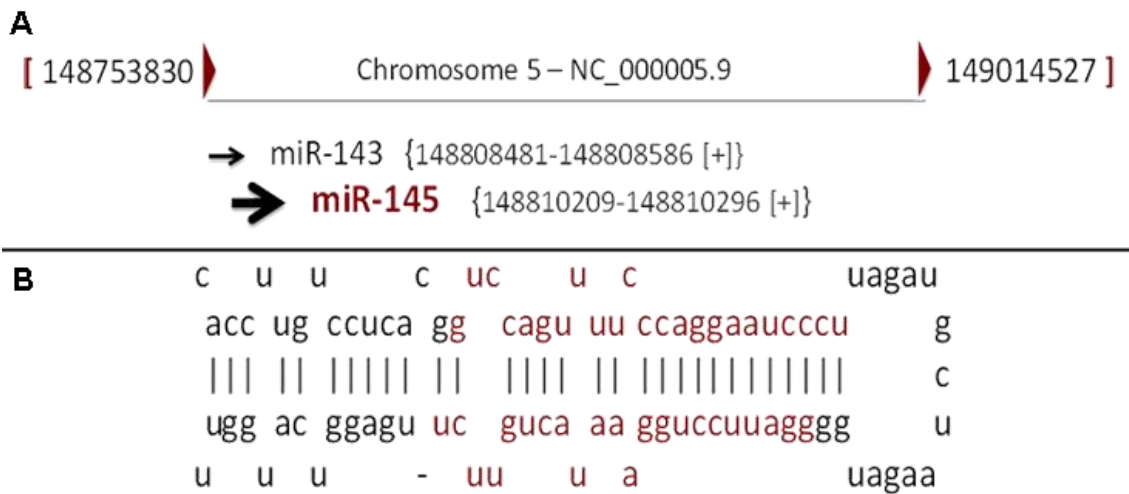
2.1 Generelt om MiRNA

2.1.1 Oppbygning av miRNA

MiRNA er korte RNA-kjeder som består av cirka 22 nukleotider (eksakt antall kan variere). De koder ikke for proteiner, men er viktige post-transkripsjonelle regulatorer. Tross omfattende forskning er det fortsatt mye som er ukjent. Det har blitt oppdaget over 2000 sekvenser i det humane genom som er antatt å kode for miRNA, men på grunn av at det er ulike meninger om hva som defineres som miRNA, kan antallet av disse som faller under definisjonen miRNA muligens minke i framtiden (1).

2.1.2 Dannelse av miRNA

MiRNA dannes ved at miRNA-gener transkriberes av enzymet RNA-polymerase II til primær miRNA (pri-miRNA). Disse splittes (av enzymet Drosha ribonuclease III) i mindre kjeder på 70-100 nukleotider kalt forløps-mikro-RNA (pre-miRNA). Disse forløpsmolekylene danner en stamme-løkke-struktur («Stem-loop structure») der to deler av en enslig RNA/DNA-tråd danner en dobbel helix-struktur (ved kobling mellom komplementære baser) som ender i en løkke med uparede nukleotider (se figur 1). Forløpsmolekylene fraktes ut av kjernen og inn i cytoplasma der de splittes ytterligere av enzymet Dicer ribonuclease og omdannes til modne (ferdige) enkeltrådede miRNA-kjeder (1).



Figur 1: A: Lokasjon av genet for mir-145 på kromosom 5q32.
 B: Stamme-løkke-strukturen til mir-145, med modent miR-145 i rødt (4).

2.1.3 Navnsetting av miRNA

Når et nytt miRNA blir oppdaget gis forbindelsen et navn bestående av prefiks miR og et tall, der tallet er nummeret i rekkefølgen de ble navngitt i (og vanligvis også er ordenen det ble oppdaget i). Organismen det finnes i blir antydnet med et tre bokstavers prefiks først i navnet. Prefikset «miR» antyder at det er modent miRNA, og prefikset «mir» brukes om genet som koder for miRNA-et, samt den delen av et umodent pre-mikro-RNA som blir til et modent miRNA (1).

MiRNA-et som undersøkes i denne oppgaven har det fulle navnet hsa-miR-145, der hsa står for «homo sapiens» og betyr at det er funnet hos mennesker. Nummeret 145 betyr at dette er miRNA nummer 145 til å bli navngitt.

2.1.3 Funksjonen til miRNA

MiRNA er antatt til å regulere transkripsjonen av mange av genene i kroppen, med ulike anslag på hvor stor innflytelse de har. Et anslag er at de regulerer transkripsjonen til cirka 60 % av de proteinkodende genene i kroppen, et annet er at de påvirker cirka 80 % av alle kodende genene i menneskekroppen (5, 6). De regnes derfor som en viktig del av kroppens reguleringsmekanismer. MiRNA fungerer ved at de binder seg til mRNA (budbringer-RNA) og leder enzymer som kan inhibere transkripsjonen eller bryte ned mRNA-et dit. I planter kan de hjelpe immunsystemet ved å binde seg til RNA-virus eller transgener (gener som har blitt flyttet fra en organisme til en annen). MiRNA-et vil da blokkere avlesningen av RNA-et de har bundet seg til, og dette vil ikke uttrykkes. Denne prosessen kalles RNA interferens («RNA silencing») (7).

Mesteparten av kunnskap om miRNA er relatert til deres påvirkning på sykdommer og sykdomsutvikling, men mye tyder på at de kan brukes som biomarkører eller til å påvirke mekanismer i kroppen. Det er vist at flere miRNA har endret uttrykk i kreftvev i forhold til i vanlig vev, og ut fra dette tror flere forskere at de kan brukes til både å påvise og påvirke kreftceller (8-10). MiRNA kan også brukes til å reparere celledskader. Forskere har eksperimentert med å bruke miR-219 til å reparere nerveskader hos mus. Forskerne brukte først kjemikalier til å skade fettlaget rundt aksonene i nervecellene, noe som førte til lammelser, og injiserte så miR-219 i cerebropinalvæsken til musene. Resultatet av dette forsøket var at skaden ble delvis reparert, og at noe av funksjonen til lemmene ble gjenopprettet (11). Denne teknologien er imidlertid fortsatt langt unna å kunne brukes på mennesker. Siden vi fortsatt har lite informasjon om effekten og virkningen av miRNA, er det vanskelig å forutsi hva som er mulig og ikke mulig.

Mengden og sammensetningen av miRNA kan være forskjellig hos ulike individer, spesielt hvis de har levd under ulike forhold. I et forsøk fikk torskeegg og torskeyngel utvikle seg under ulike temperaturer, og etter utvikling ble de flyttet til vann med «normal» temperatur. Fiskene som hadde utviklet seg under forskjellige temperaturer hadde signifikant ulik sammensetning av miRNA, og ut fra dette konkluderte forskerne med at utvikling under ulike temperaturer endrer miRNA-profilen til fiskene både på kort og lang sikt (12).

2.2 Kort om Mir-145

Det har blitt antydnet at miR-145 kan ha en sammenheng med kreftutvikling, da flere undersøkelser har rapportert om nedregulering av miR-145 i vev fra kreftsvulster (9, 13-16). Eksperimentelle forsøk har også vist at miR-145 kan nedregulere enkelte onkogener (gener som er involvert i celledeling og cellevekst, og som derfor er essensielle i utviklingen av kreft) (9). Spørsmål om hvorvidt miR-145 kan ha en funksjon som tumorsuppresser har blitt stilt, og også om den kan fungere som en biomarkør.

2.3 Måling av miRNA

2.3.1 Northern blot og miRNA mikromatrise

Northern blot var den første metoden for påvisning av miRNA, og anses fortsatt som en pålitelig metode, om enn en metode som tar lang tid og forbruker mye prøvemateriale. Den innebærer bruk av elektroforese til å separere komponentene i en prøve etter størrelse, og disse overføres deretter til en membran og fikseres. Prober komplementære til ønsket miRNA tilsettes membranen, og disse hybridiseres (danner dobbeltrådig molekyl). Ubundet probe vaskes vekk, og membranen med probe-miRNA-kompleks blir tørket og analysert. Denne metoden viser både mengde og størrelse på miRNA-et en ser etter.

Mikromatrise («microassay») er den mest effektive metoden hva tidsbruk angår, men den er mindre nøyaktig enn flere andre alternativer. I denne metoden omdannes RNA til cDNA med revers transkriptase. Det ferdige cDNA-et merkes med en fluoriserende forbindelse, og prøven tilsettes matrisen. Matrisen består av hundrevis av mindre områder der bestemte prober er festet i overflaten. Ulike områder har ulike prober, og miRNA i prøven vil hybridisere med komplementære prober. Siden alle probene i samme område er like, skilles miRNA etter type, og flere hundre ulike miRNA kan bindes. En måler hvor sterk fluorescensen er i hvert område, og ut fra dette beregnes hvor mye miRNA som er bundet i punktet. Slik kan en måle uttrykket av ulike miRNA i

samme analyse. Resultatene fra analyser utført ved denne metoden må vanligvis konfirmeres ved bruk av andre metoder før de kan anses som troverdige (3, 17).

2.3.2 Polymerasekjedereaksjon (PCR)

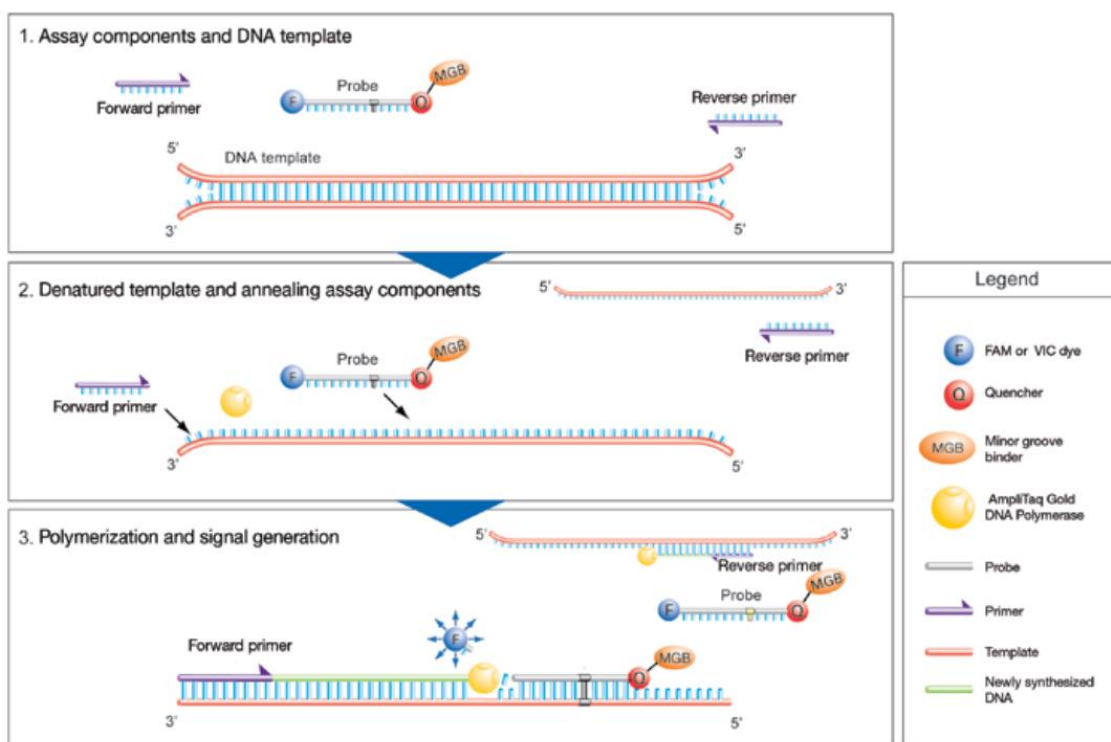
Metoden som brukes mest i dag er kvantitativ revers transkriptase polymerasekjedereaksjon (RT-qPCR), på engelsk «quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction». Den er en kombinasjon av metodene kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR) og revers transkriptase polymerasekjedereaksjon (RT-PCR).

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en metode for å klonere store mengder DNA på kort tid, og virker på svært små mengder DNA. Før PCR tilsettes prøven med det ønskede DNA-et til en løsning som inneholder DNA polymerase (enzymer som lager DNA-tråder), Mg^{2+} -ioner, samt nukleotider og primere (korte DNA-fragmenter som induserer syntesen av DNA). Selve PCR-prosessen består av tre trinn. I det første trinnet varmes løsningen opp til 95 °C, noe som gjør at det dobbeltrådige DNA-et denatureres (dobbeltrådig DNA splittes til to tråder). Temperaturen senkes så i neste trinn til mellom 37-50 °C, og ved denne temperaturen binder primerne seg til de komplementære endene på DNA-trådene. I det tredje trinnet økes temperaturen og polymeriseringen skjer. Når polymeriseringen er ferdig vil enzymene ha laget en ny DNA-tråd for hver primer. På denne måten vil mengde DNA nesten fordobles for hver utføring. Denne metoden kan brukes på svært små mengder DNA, og kan oppdage og reprodusere DNA-tråder selv om mengden DNA i prøven er under 1 picogram (2, 3).

I metoden RT-PCR blir enzymet revers transkriptase (RT) brukt til å lage cDNA ut fra RNA. Dette virker også på miRNA. Etter dette trinnet er metoden lik vanlig PCR, der cDNA-et blir klonet på samme måte som gDNA (genomisk DNA) i PCR (3).

Hverken PCR eller RT-PCR viser mengden DNA/RNA i originalprøven, og for å måle mengden brukes qPCR / RT-qPCR. I denne metoden merkes nydannet DNA med fluorescerende materiale. Slik merking oppnås enten ved tilsetning av et stoff som binder seg til dobbeltrådet DNA, som derved blir fluorescerende, eller ved å bruke prober merket med et fluorescerende molekyl som er plassert på proben slik at fluorescensen hemmes. Proben binder seg til en spesifikk basesekvens på DNA-tråden,

men når DNA-polymeriserings-prosessen i neste syklus når fram til proben, spaltes fluorokromen av og blir frigjort fra den fluorescens-hemmende innflytelsen. Dermed øker den totale mengden fluorescens i reaksjonsblandingen, noe som leses av som et (i prinsippet) eksponentielt økende signal fra syklus til syklus, men slik at økningen kommer raskere jo mer av det aktuelle DNA/RNA den opprinnelige prøven inneholdt. Prober er mer spesifikke enn fargestoff og derfor oftere brukt. Etter hver repetisjon måles fluorescens, og ut fra resultatene lages en graf. Ved å sammenlikne grafen med en standardkurve fra en kjent mengde DNA kan en regne ut hvor mye DNA/RNA den originale prøven inneholder (3).



Figur 2: Illustrasjon av kvantitativ PCR fra brosjyre: «TaqMan Gene Expression Assay solutions» fra Thermo Fisher. (18)

2.3.3 In-situ-hybridisering

I denne oppgaven blir miRNA påvist ved in-situ-hybridisering, en annen og lite brukt metode. Denne metoden baseres på hybridisering mellom miRNA og prober laget av komplementære gensekvenser. Denne metoden blir forklart senere i oppgaven, men kort oppsummert består den av tre hovedprosesser. Først tilsettes probe til et prøvesnitt som deretter plasseres i en hybridisator slik at miRNA og probe kan hybridiseres. Deretter tilsettes et enzymkonjugert antistoff som binder seg til et antigen som proben er merket med. Så tilsettes et substrat for enzymet som er bundet til antistoffet. Substratet er valgt slik at det frigjør et uløselig, farget reaksjonsprodukt når enzymet virker på det, typisk ved spaltning av substratmolekylet. Derved dannes det et farget kompleks av substrat, antistoff, probe og det ønskede miRNA-et, og ved å observere komplekset i lysmikroskop kan en se hvor i vevet miRNA uttrykkes (3).

En viktig fordel ved denne metoden er at vevets originale struktur blir bevart. I andre metoder blandes ulike typer vev sammen. Dersom analysen utføres på en blanding av flere ulike vevstyper er det ikke mulig for forskerne å vite hvor det relevante miRNA-et kommer fra, både når det gjelder celler og vev. Som følge av dette mistes mye informasjon som kan være viktig for å forstå sammenhengen mellom uttrykk av miRNA og effekten det har på kroppen. In-situ-hybridisering gjør at en kan skille celler og vevstyper som inneholder miR-145 fra de som ikke gjør det. Siden vev er heterogent, er det typisk viktig å skille mellom ulike celletyper (3).

Et prosjekt brukte in-situ-hybridisering for å detektere miR-21 i tumorvev fra prostata. Resultatet viste at tumorcellene ikke uttrykte miRNA-et, mens celler i stroma uttrykte det (19). Analysemetoder som PCR og mikromatrise kan ikke detektere dette siden vevets oppbygning blir ødelagt under disse metodene.

2.3.4 Hybridiseringsprober

En hybridiserings-probe er en tråd av DNA eller RNA som er komplementær med en DNA/RNA-tråd som en ønsker å påvise. Proben har blitt merket slik at det er mulig å observere den senere. Tidligere ble probene merket med radioaktive molekyler, nå brukes fluorescerende merking. Prober kan også merkes med molekyler som kan binde seg til et annet molekyl. Sistnevnte vil enten ha egenfarge eller la seg påvise ved en kjemisk reaksjon. I denne undersøkelsen ble det brukt prober merket med steroidet digoxigenin (DIG), som betyr at probene kan binde seg med andre molekyler som kan binde seg til DIG (3, 20).

DIG brukes fordi det kun finnes hos plantefamilien *Digitalis* (reverbjelleslekta), og antistoff mot dette vil sjelden kryssreagere med antigen fra andre organismer. (21)

Som positiv kontroll i forsøket ble det brukt U6 snRNA-prober («small nuclear RNA») merket med DIG-antigen, kalt «*LNA U6 snRNA probe 5` DIG-labeled*». Denne proben består av ikke-kodende deler av u6 snRNP («small nuclear ribonucleoprotein»). Denne RNA-sekvensen finnes i de fleste organismer og har vært relativt uendret i mange generasjoner, noe som tyder på at den spiller en essensiell rolle. Den finnes i kjernen i nesten alle celletyper i menneskekroppen, noe som gjør at den fungerer godt som positiv kontroll. (22, 23)

Den negative kontrollen som ble brukt under forsøket var Scrambla miR-205-prober merket med DIG-antigen. Disse probene er endret slik at de ikke har et komplementært RNA-transkript til en eneste miRNA-sekvens. Disse vil da ikke binde seg spesifikt, og all farge på negativt snitt vil være uspesifikt bundet og representere bakgrunnsstøy.

Probene i dette forsøket ble kjøpt fra produsent, og alikvotert i rør (3 µl i hvert), og plassert i fryser. Før utførelse av protokollen ble disse fortynnet til ønsket konsentrasjon (50 nM for negativ kontroll og miR-145, 2 nM for positiv kontroll), alikvotert i nye rør, og lagt i fryser.

2.4 Teoretisk bakgrunn for metoden

2.4.1 Forberedelse til hybridisering

Vevsblokker ble snittet på forhånd. Snittene ble deretter satt i varmeskap over natten for å fjerne innstøpingsmediet parafin. Prosedyren startet når snittene ble satt i xylen for å fjerne rester av parafin. Xylen er ikke løselig i vann, derfor må det skylles godt i absolutt etanol før rehydrering.

Deretter ble snittene avmaskert (alternativt pre-digestion), som innebærer at proteinase K kløyver peptidbindingene som er ved siden av karboksylsyrergruppen i alifatiske eller aromatiske aminosyrer med blokkerte alfa-aminogrupper. Enzymet er også svært uspesifikt, noe som betyr at det bryter ned de fleste former for proteiner.

Proteinase K ble tilsatt for å utføre flere oppgaver. Enzymet vil fasilitere en generell nedbrytning av proteiner i vevet, og en viktig funksjon er å ødelegge mulige protein-antigen og inaktivere endonukleaser (enzymmer som spalter DNA/RNA). Ved in-situ-hybridisering vil proteinase K også brukes til «hente ut» miRNA. Under fiksering vil formalin danne kryssbindinger mellom proteinene og dekke for miRNA-trådene som probene skal feste seg til. Ved at proteinene kuttes bort, eksponeres miRNA-et i vevet igjen, og hybridiseringen kan finne sted (17).

PBS er en fosfat-bufret saltvannsløsning («phosphate buffered saline»), som lages ved at en gitt mengde PBS-tabletter løses i DEPC-vann. DEPC-vann er vann som er helt uten urenheter. Vannet som ble brukt (Millipore Q rensset vann) er svært rent, men for å fjerne RNaser tilsettes diethylpyrocarbonate som vil inhibere alle RNA-enzymmer.

Løsningen autoklaveres slik at DEPC omgjøres til vann, CO₂ og etanol, og de to siste fordamper under autoklaveringen.

2.4.2 Hybridisering og farging

Under hybridiseringen kobles miR-145 og miRNA-probene sammen til et dobbeltrådig molekyl. Siden proben er merket med DIG, vil komplekset ha evnen til å binde seg med DIG-antistoff.

Ikke alle probene vil binde seg riktig, ettersom de kan danne komplekser med RNA som ikke er helt komplementære. Snittene vaskes med løsninger av natriumklorid og natriumsitrat (SSC, «saline sodium citrate») med forskjellige konsentrasjoner, for å fjerne all ubundet probe og probe bundet til andre RNA-sekvenser.

Stringens («stringency») defineres som hvor komplementære to ulike RNA/DNA-tråder må være for å kunne hybridiseres under bestemte forhold som temperatur, saltkonsentrasjon og pH. Ved høy stringens må alle nukleobasene i tråden være komplementære, mens ved lavere stringens kan det foregå hybridisering selv om trådene ikke er helt komplementære. Stringens bestemmes av temperatur og saltkonsentrasjon. Derfor kan en variere stringens ved å variere disse. Jo høyere stringens er, jo mer spesifikk er reaksjonen. I dette tilfellet vil stringens bestemmes av konsentrasjonen av SSC, ettersom temperaturen er konstant (3).

Høy konsentrasjon av salt (SSC) gir lav stringens, mens lavere konsentrasjon gir høyere stringens. Under vasken gikk objektglassene fra lav til høy stringens, og det ble vasket flere ganger (lenger tid) jo høyere stringens var. Vask i løsning med lav stringens (5XSSC) vasker bort ubundet probe og hybridiseringsbuffer, men har liten effekt på uønskede hybridiseringsprodukter. For å fjerne disse vaskes det med løsninger med høyere stringens (1XSSC og 0,2SSC), som er i stand til å fjerne uspesifikt bundet probe.

Etter vask ble blokkeringsløsning tilsatt snittene. Blokkeringsløsning inneholder proteiner som ikke kan binde seg til antigen (DIG) eller antistoff-prober (DIG-merket). Disse tilsettes for å binde seg til andre mulige bindingssteder, for å hindre at det oppstår uspesifikke bindinger med antistoff i snittet. Løsningen blokkerer for uønskede bindingssteder, for å sikre at antistoffet og senere substratet kun binder seg til probene (3).

Anti-DIG ble tilført til snittene. Anti-DIG binder seg til DIG i kompleksene, som inneholder to DIG-molekyler. Kompleksene består dermed av et miR-145-molekyl, en DIG-merket probe og to anti-DIG antistoff. Antistoffet som ble brukt var sau anti-DIG-AP. Dette er et antistoff fra sau som er spesifikt for DIG antigen og som har fått bundet til seg alkalisk fosfatase (AP).

Alt ubundet anti-DIG i snittet ble vasket bort med PBS-T, som er PBS tilsatt Tween (en emulgator og surfaktant). PBS-T blokkerer også uspesifikke antistoff-reaksjoner og protein-protein interaksjoner, og fungerer på samme måte som blokkeringsbufferen. Dette reduserer uspesifikk farging under substratreaksjonen.

Et substrat dannet fra BCIP/NBT-tabletter ble tilført løsningen og reagerte med enzymet alkalisk fosfatase i komplekset. Det nye komplekset har en egenfarge og kan observeres i et lysmikroskop, og en kan observere mengde og plassering av miR-145.

Substratreaksjonen ble stoppet ved å vaske bort ubundet substrat.

2.4.3 Bevaring av preparat

Etter farging av miR-145 ble resten av vevet farget, for lettere å kunne observere og gjenkjenne vevsmønsteret i snittet. Under denne prosedyren ble det brukt «Nuclear Fast Red», som binder seg til nukleinsyrer og farger kjerner røde og cytoplasma lys rosa. Snittene ble dehydrert fordi monteringsmediumet er hydrofobt og ikke vil fungere riktig om det er vann i vevet. Snittene ble oppbevart i xylen for å hindre uttørking. Xylen ble brukt fordi det er hydrofobt, og fordi brytningsindeksen til xylen og fiksert vev er tilnærmet lik, og dette gjør at xylen har liten effekt på klarheten til snittet i mikroskop. I tillegg fjernet xylen den vannavstøtende tusjen brukt under forsøket, kalt «ImmEdge PEN». Dekkglass ble montert over snittet for å beskytte mot mekanisk skade.

Monteringsmedium ble brukt til å feste glasset og bevare vevets tilstand, ved å hindre nedbrytning og uønskede kjemiske reaksjoner i vevet. Det er viktig at monteringsmediet er klart og gjennomsiktig, og med en brytningsindeks så nær vevets egen brytningsindeks som mulig.

3. Materiale og metode

3.1 Utstyr og prøvemateriale

3.1.1 Innkjøpte reagenser

«LNA U6 snRNA probe 5` DIG-labeled»

«LNA scrambled microRNA probe, double-DIG-labeled»

«hsa-miR-145-5p miRCURY LNA»

QIAGEN proteinase K

«microRNA ISH buffer»

Saueserum

Kaliumklorid

PBS-tabletter

SSC buffer (20X)

«0,5 M EDTA pH 8,0, RNase-free»

Natriumklorid

«Levamisole»

«Trizma®hydrochloride buffer solution»

Histokitt medium

«Tween 20»

100 % etanol

96 % etanol

70 % etanol

NBT/BCIP tabletter («5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine / 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine»)

Diethylpyrokarbonat

«Dig Wash and Block Buffer Set»

«Anti-Digoxigenin-AP-conjugate»

«Fixo Gum Rubber Cement mounting adhesive»

3.1.2 Maskiner

Hybridisator

Det ble brukt DAKO hybridizer under denne protokollen.

Vannbad

Det ble brukt et stort vannbad til oppbevaring av ståglass og flasker med SSC-løsninger, og et lite vannbad under snitting. Det lille vannbadet ble fylt med springvann, og et fargetrau med DEPC-vann ble satt oppi. Ferske snitt ble lagt i DEPC-vannet og deretter plassert på objektglass.

Varmeblakk

En Grant QBD2 varmeblakk innstilt på 90 °C ble brukt under tillaging av prober.

Mikrotom

Det ble brukt en Leika RM2255 rotasjonsmikrotom under snittingen, og innstillingen for tykkelsen på hvert snitt var 4,0 µm.

Vannrensesystem

Millipore Q vann ble laget på stedet ved bruke av vannrensesystem «Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System».

3.1.3 Labutstyr

Fuktekammer

Avtrekkskap

Objektglass

Dekkglass

RNasefrie, sterile rør og pipettespisser

RNasefrie non-stick mikrosentrifugerør

«Superfrost Plus Slides»

Inkubatorskap

Fargetrau med lokk

Ståglass med lokk for 8 stykker

Pinsett

«RNase away™»

Vannavstøtende tusj

3.1.4 Prøvemateriale

Egnede vevsblokker ble identifisert ved søk i diagnosearkivet ved Avdeling for patologi, St Olavs hospital (SymPathy ®) på aktuelle kombinasjoner av T-kode og M-kode (SNOMED-kodeverket) og hentet fra blokklageret.

Søkene resulterte typisk i mange preparater, og disse ble nærmere vurdert ut fra diagnoseformuleringen for å finne noen som syntes å være egnede. Fra disse ble så én blokk valgt ut fra mikroskopisk vurdering av snittet.

Formelt ble prosjektet registrert som et metodeutviklingsprosjekt i samarbeid mellom Avdeling for patologi og Biobank1. Ingen personidentifiserbar informasjon ble registrert i prosjektet og det ble derfor ikke søkt om godkjenning som forskningsprosjekt.

Tabell 1: Oversikt over de ulike vevstypene som var del av undersøkelsen, og søkekriteriene som ble brukt i SymPathy.

Type vev	Beskrivelse	Søkekriterier	
Urotelial kancer	Vev fra urinveisslimhinne med kreft i overgangsepitel	T74*	M812*
Colon adenokarsinom	Vev fra tykktarm med epitelial kreft	T67*	M81403
Mammakanser	Vev fra mamma med epitelial kreft	T04*	M814*
Meningeom	Svulst fra hjernehinne eller hinne rundt ryggmarg, i prinsipp godartet	TX11*	M953*
Ventrikkelkanser	Vev fra magesekk med epitelial kreft	T63*	M814*
Osteosarkom	Ondartet beinsvulst i skjelettet	*	M918*
Mesoteliom	Svulst utgått fra mesotel, plateepitel som kler indre, serøse hulrom	*	M905*
Pleomorft adenom	Heterogen svulst som stammer fra en spyttkjertel	T55*	M894*
Kondroid syringom	Heterogen svulst som stammer fra en svettekjertel	T01*	M894*
Intramuskulært lipom	Svulst utgått fra fettvev som har oppstått innimellom muskelceller	*	M8856*
Granulasjonsvev	Nydannet vev som dannes ved reparasjon av sår eller annen skade	*	M45020

(* betyr «hvilke som helst tegn»)

3.2 Metode

3.2.1 Snitting

Disse forberedelsene ble gjort dagen før, enten alene, eller i løpet av protokollen. Av vevsblokkene ble det framstilt snitt med tykkelse på 4 μm , og det ble laget to snitt fra hver blokk. Et snitt ble sendt til HE-farging ved Avdeling for patologi, og på det andre ble det utført miRNA ISH. Under hver økt ble det laget 18 snitt til sammen: 8 HE-snitt, 8 ISH-snitt og 2 kontroller (negativ og positiv) til ISH-snittene. Kontrollsnittene ble snittet fra en av vevsblokkene, og alle snittene ble samlet i to stativer, et til HE-farging og et til ISH. Snitt som skulle hybridiseres ble satt i varmeskap på 60 °C over natten, mens snitt til HE-farging ble stående i et fargetrau over natten for å tørke, og satt i kjøleskap inntil de skulle farges.

3.2.2 Deparafinerings

Deparafinerings ble utført etter dette oppsettet:

1. Xylen sto i 10 min
2. Xylen sto i 10 min
3. Xylen sto i 10 min
4. Absolutt etanol skyllet 10 ganger
5. Absolutt etanol skyllet 10 ganger
6. Absolutt etanol sto i 5 min
7. 96 % etanol skyllet 10 ganger
8. 96 % etanol sto i 5 min
9. 70 % etanol skyllet 10 ganger
10. 70 % etanol sto i 5 min
11. PBS (ståglass) sto i 2-5 min

Mens snittene sto i løsningene ble det gjort forberedelser til senere trinn: Hybridisatoren ble stilt inn på 37 °C og luftfuktighetskontrollslipsene ble fuktet. Proteinase K 20 mg/ml ble tatt ut, tint, og brukt til å lage proteinase K 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ løsning,

Ståglass og småflasker ble fylt med løsning (PBS, PBS-T, KTBT-buffer, 5 XSSC, 1XSSC og 0,2XSSC), og glass og flasker som skulle stå i vannbad ble forseglet med et plastdekke under lokket før de ble satt i vannbadet.

3.2.3 Avmaskering

Snittene ble tatt ut av ståglasset med PBS, og bufferløsning rundt snittet ble tørket av. En vannavstøtende tusj ble brukt til å lage en ring rundt snittene, en dakoring. Deretter ble objektglassene lagt i hybridisatoren, og 1000 µl proteinase K 20 µg/ml løsning ble pipettert på snittet.

Hvert snitt lå 20 min i hybridisatoren. De ble tatt av i samme rekkefølge og med samme tidsintervall som de ble lagt på. De ferdige snittene ble overført til et nytt ståglass med PBS.

3.2.4 PBS-vask

Etter at det siste objektglasset ble satt i ståglasset med PBS, sto alle glassene i 3 min. Deretter ble PBS-løsningen tømt ut og ny PBS-løsning fylt på. Objektglassene sto 3 min i denne løsningen. Prober til neste trinn ble tatt ut fra fryser til tining.

3.2.5 Hybridisering

Objektglassene ble tatt ut av ståglasset. Hvert snitt ble tilsatt 75 µl probe (eller 50 µl hvis snittet var lite), og et varmebehandlet dekkglass ble lagt på. Eventuelle luftbobler ble presset forsiktig ut, og et dekkende lag lim ble lagt langs kantene. Etter at limet på alle dekkglassene var stivnet, ble objektglassene overført til hybridisatoren som var forvarmet til 55 °C. Etter 60 min ble de tatt ut, og lim og dekkglass ble fjernet.

Objektglassene ble deretter plassert i ståglass med 5XSSC buffer (romtemperert).

Ved slutten av dette trinnet ble et eppendorfrør med 2 ml 10Xblokkeringsløsning og et eppendorfrør med 400 µl saueserum 60 mg/ml hentet ut fra fryseren til tining.

3.2.6 SSC-vask

Etter at objektglassene hadde stått i 5XSSC-bufferen i 5 min, ble de overført til ståglass i vannbadet. Rekkefølgen for vasken var følgende:

1. 5XSSC sto i 5 min
2. 1XSSC sto i 5 min
3. 1XSSC sto i 5 min
4. 0,2XSSC sto i 5 min
5. 0,2XSSC sto i 5 min
6. 0,2XSSC sto i 5 min

Ved hvert bytte til løsning med lavere konsentrasjon ble ståglassene tatt ut, og objektglassene flyttet over. Ble det byttet til en løsning med samme konsentrasjon, ble løsningen i ståglasset helt ut mens objektglassene ble holdt tilbake, og løsningen ble erstattet med ny fra flasken. Deretter ble ståglasset med objektglassene satt tilbake i vannbadet.

Etter at den siste oppvarmede bufferen var brukt ble objektglassene satt i et romtemperert ståglass med PBS, som ble flyttet til hybridisatoren.

Under SSC-vasken ble reagenser til senere trinn laget. 2 ml «Maleic Acid» fra DIG-settet ble fortynnet med 18 ml DEPC-vann, og 17,6 µl av denne ble tatt ut og blandet med 10Xblokkeringsløsning og sauserum for å danne 20 ml 1Xblokkeringsløsning. Fra denne ble 8 ml tatt ut og blandet med 10 µl «Sheep anti_DIG-AP150 U». Et tildekket reagensrør med 10 ml DEPC-vann ble tilsatt en avkjølt tablett med substratet NTB/BCIP, lagt på benken og vendt inntil tablettene var helt oppløst. Løsningen ble deretter tilsatt 20 µl levamisole 100 mM. Den ferdige substratløsningen forble tildekket inntil den ble brukt.

3.2.7 Blokkering

Objektglassene ble tatt ut og preparert individuelt. Først ble overflødig buffer fjernet ved at objektglasset ble banket forsiktig i bordet, og dakoringen ble kontrollert for å sikre at den var hel og tørr. Eventuell væske ble tørket vekk, og eventuelle hull i dakoringen ble tettet. Deretter ble objektglasset lagt vannrett i et fuktekammer og 800 µl 1Xblokkeringsløsning ble pipettert på snittet. Det ble notert hvor lang tid hver preparering tok, for å ta hensyn til dette i neste trinn, slik at hvert snitt ble liggende 15 min i fuktekammeret.

3.2.8 Antistoffreaksjon

Objektglassene ble tatt ut av fuktekammeret i samme rekkefølge og med samme tidsintervall mellom hvert glass som da de ble lagt inn. Blokkeringsløsningen fikk renne av og eventuell væske på dakoringen ble tørket av. Objektglasset ble lagt på hybridisatoren og 500 µl anti-DIG-AP 1:800 ble pipettert på snittet. Det ble notert hvor lang tid hver preparering tok. Objektglassene lå i hybridisatoren (30 °C) i 30 min.

3.2.9 PBS-T vask

Objektglassene ble tatt ut av hybridisator i samme rekkefølge og tidsintervall som de ble lagt inn, og plassert i et ståglass med PBS-T. Etter at siste objektglass var plassert i ståglasset sto de i 3 min, før løsningen ble helt ut og erstattet med ny, romtemperert PBS-T. Dette ble gjentatt, slik at snittene sto 3 min i tre ulike PBS-T-løsninger.

3.2.10 AP substratreaksjon

Objektglassene ble tatt ut, bufferen fikk renne av og dakoring ble tørket, og objektglassene ble lagt på hybridisatoren (30 °C). Det ble pipettert 400 µl substratløsning på hvert snitt, og lokket ble satt på så snart alle objektglassene var klargjort for å beskytte reaksjonen mot lys.

3.2.11 Stopp av substratreaksjon

Etter at snittene hadde stått 2 timer i hybridisatoren, ble objektglassene overført til et ståglass med KTBT-buffer. Her sto de i 5 min, før de ble overført til et nytt ståglass med KTBT-buffer, der de også sto 5 min. Begge bufferne hadde romtemperatur.

3.2.12 Vask med springvann

Objektglassene ble overført til et stativ og satt i en beholder med rennende vann i cirka 2 min.

3.2.13 Kjernefarging

Objektglassene ble overført til et ståglass med «Nuclear Fast Red». Med en gang det første objektglasset var overført, ble en klokke med ett minutts nedtelling startet. Resten av objektglassene ble overført til ståglasset med like stort tidsintervall mellom dem. Med en gang nedtellingen var fullført, ble det første objektglasset tatt ut, og de øvrige objektglassene ble tatt opp med samme tidsintervall som da de ble satt ned i løsningen. Det er viktig at objektglassene ikke står for lenge for å unngå at snittene farges for sterkt, noe som gjør det vanskelig å observere eventuell farging av miR-145. Etter at objektglassene var tatt ut av «Nuclear Fast Red» ble de plassert i et stativ og skylt i rennende vann.

3.2.14 Dehydrering

Etter at ubundet «Nuclear Fast Red» var vasket vekk, ble stativet overført til et fargetrau med 70 % alkohol, og en dehydreringsprosess startet, vist under:

1. 70 % etanol skyllet 10 ganger
2. 70 % etanol sto i 1 min
3. 96 % etanol skyllet 10 ganger
4. 96 % etanol sto i 1 min
5. Absolutt etanol skyllet 10 ganger
6. Absolutt etanol sto i 1 min

Objektglassene ble overført til et ståglass med xylen der de ble oppbevart inntil de var montert.

3.2.15 Montering

Snittene ble tatt opp fra xylen og påført histokit monteringsmedium og dekkglass.

Objektglassene ble tørket i noen minutter, før de ble overført til et objektglassbrett og lagret.

4. Resultater

Resultatene fra forsøkene er vist i tabell 2 og figur 3-18

4.1 Observasjoner i snitt

Tabell 2: Resultater av farging av ulike vev. Positiv tilsier farging (tilstedeværelse av miR-145), og negativ tilsier ikke farging (fravær av miR-145).

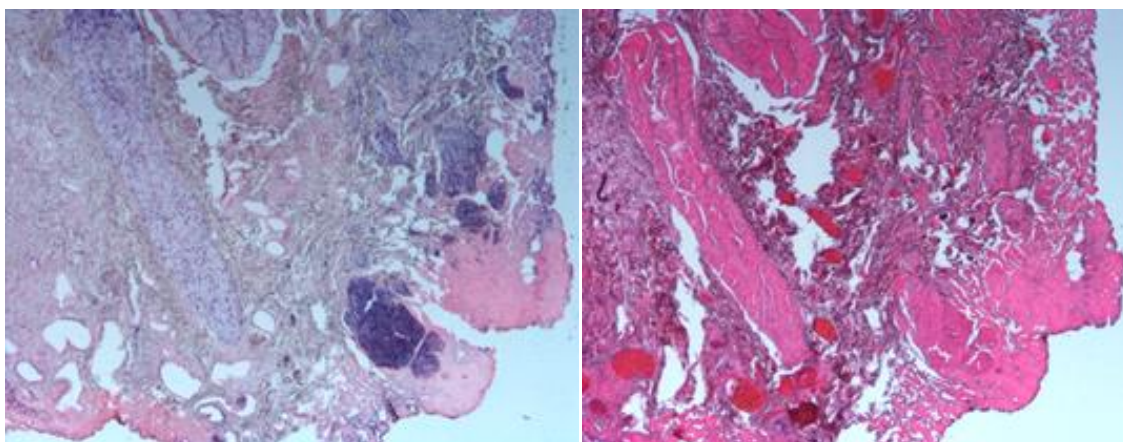
Vevstype	Observert resultat
Urotelial kancer	Tumorceller var positive i kjerne og negative i cytoplasma. Fibroblaster i stroma ble positivt farget, og glatt muskulatur var tydelig positiv med farging både i kjerne og cytoplasma. Blant epitelcellene var noen negative, mens andre var positive. Det var ikke et helt tydelig skille mellom de to typene, men de positive hadde en klar tendens til å være atypiske (neoplastisk). Epitelet som var mer atypisk hadde positive kjerner og negativt cytoplasma, mens mindre atypisk tumorepitel var negativt både i kjerne og cytoplasma. Unormalt epitel forekom vanligvis i form av for tykt epitellag, som da inneholdt for mange celler. Mobile celler var negative.
Colonkanser	Tumorceller var negative både i kjerne og cytoplasma. Noen celler i tumorvevet var positivt farget, men disse var innesluttete stromaceller. Stroma inneholdt fibroblaster som var svakt positive og flere avlange myofibroblaster som var positivt farget. Glatt muskulatur var tydelig positiv, med farging både i kjerne og cytoplasma. Det var tydelig forskjell i styrken på fargen i de tre typene muskellag. Styrken på fargingen var, i synkende rekkefølge: Det ekte muskellaget, slimhinnemuskellaget og muskellag rundt blodkar. Alle muskellag var imidlertid klart positive. Epitecellene var negative både i kjerne og cytoplasma.
Osteosarkom	Tumorceller var negative både i kjerne og cytoplasma for mesteparten av snittene. Unntaket var ett snitt der tumorcellene var positive i kjernen. I stroma ble noen få celler i bindevevet positivt farget i kjernene. Dette var stort sett myofibroblaster. Glatt muskulatur var tydelig positiv, med farging både i kjerne og cytoplasma.

Meningeom	Majoriteten av snittene hadde tumorceller som var negative både i kjerne og cytoplasma, men noen snitt hadde tumorceller som var svakt positive i kjernen. I et enkelt snitt viste en del tumorceller tydelig positiv farging. Den glatte muskulaturen rundt blodårer var positiv, med farging både i kjerne og cytoplasma.
Mesoteliom	Tumorceller var negative både i kjerne og cytoplasma. Fibroblastene i stroma var stort sett negative, men det var noen få myofibroblaster som var positive. Glatt muskulatur rundt blodårer var positiv, med farging både i kjerne og cytoplasma. Epiteloide celler var negative både i kjerne og cytoplasma, og det samme var de mobile cellene i stroma.
Ventrikkelskanser	Tumorceller var negative både i kjerne og cytoplasma i de fleste snittene, men noen snitt hadde tumorceller som var svakt positive i kjernen. I stroma ble fibroblaster positivt farget i kjernen. Glatt muskulatur var tydelig positiv, med farging både i kjerne og cytoplasma. Normalt epitel var negativt, mens noen snitt hadde tumorepitel som var svakt positivt i kjernene. De mobile cellene var negative både i kjerne og cytoplasma.
Mammakanser	Mesteparten av snittene hadde tumorceller som var negative både i kjerne og cytoplasma, men to av snittene hadde tumorceller der kjernene var positive. I stroma var glatt muskulatur rundt blodårer tydelig positiv med farging både i kjerne og cytoplasma. Mesteparten av fibroblastene var negative både i kjerne og cytoplasma, men myofibroblaster var positivt farget. Kjertelepitel var delvis farget. De fleste av cellene var negative både i kjerne og cytoplasma, men myoepitelet ble positivt farget i kjernene. De mobile cellene var negative både i kjerne og cytoplasma.
Pleomorft adenom	Tumorceller var svakt positive, og kjertelepitel var delvis farget. De fleste av cellene var negative både i kjerne og cytoplasma, men myoepitelet ble positivt farget i kjernene. Siden mange av tumorcellene var utgått fra myoepitel, var det mange av dem. Tumorceller utgått fra myoepitel hadde samme farge som tumorcellene med preg av vanlig epitel. I stroma var glatt muskulatur rundt blodårer tydelig positiv med farging både i kjerne og cytoplasma.
Kondroid syringom	Majoriteten av snittene viste tumorceller der kjernene var positive og cytoplasma negativt, men i cirka en tredjedel av snittene var tumorcellene helt negative. Det var noe positiv farging i fibroblaster i stroma, mest hos myofibroblaster. Glatt muskulatur var tydelig positiv, med farging både i kjerne og cytoplasma. Det vanlige epitelet var negativt, mens myoepitel var positivt farget. Mobile celler var negative både i kjerne og cytoplasma.

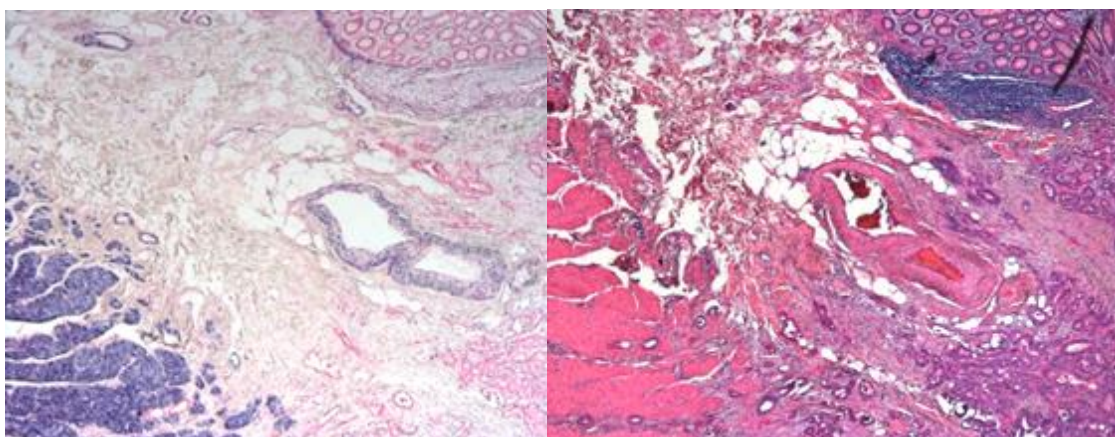
Intramuskulært lipom	I disse snittene så vi kun på muskelkomponenten. Utbredelsen av farge i muskelcellene varierte litt fra snitt til snitt. De fleste hadde positive kjerner, men mengden av kjerner som ble farget varierte noe fra snitt til snitt. Cytoplasma var negativt. Muskelcellene rundt blodårer var positive både i kjerne og cytoplasma.
Granulasjonsvev	Stroma inneholdt mye fibroblaster som ble positivt farget, der spesielt reaktive fibroblaster ble kraftig positivt farget. Glatt muskulatur var tydelig positivt, med farging både i kjerne og cytoplasma. De fleste av hudepitelcellene var positive i kjerne og negative i cytoplasma. Kjertelepitel var delvis farget, der myoepitelet var positive i kjernen og vanlige kjerneepitelceller var negative både i kjerne og cytoplasma. Mobile celler var negative både i kjerne og cytoplasma.

Glatt muskulatur, myofibroblaster og myoepitel ble alltid farget. Fibroblaster varierte noe, og det var ofte både positive og negative celler i samme snitt. Normale epitelceller var vanligvis negative, men ikke i alle snitt. Det var stor variasjon i farging av tumorcellene, fra ingen til tydelig farge.

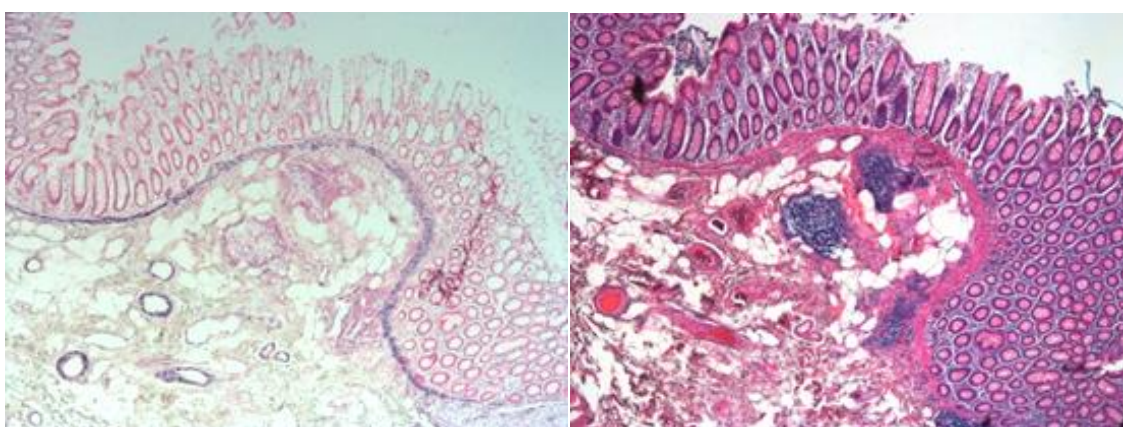
4.2 Bilder av fargede snitt



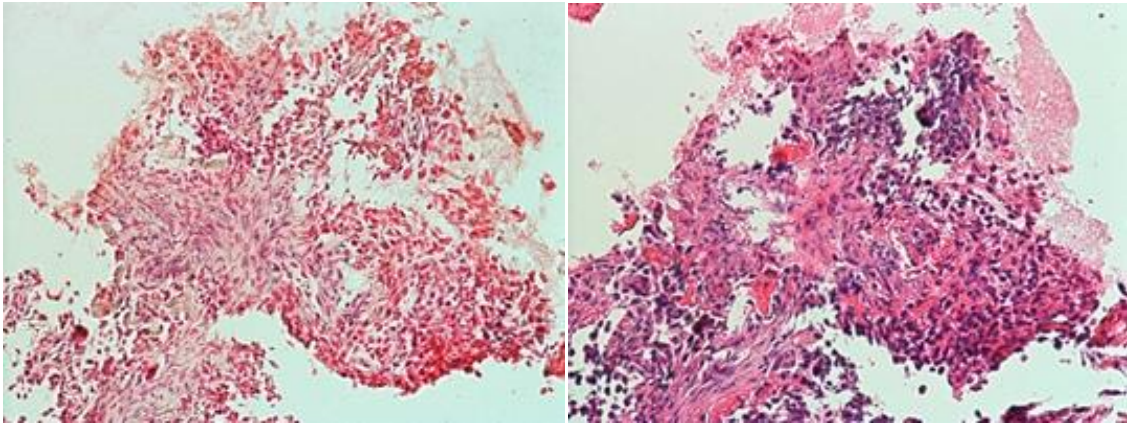
Figur 3: Urotel, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



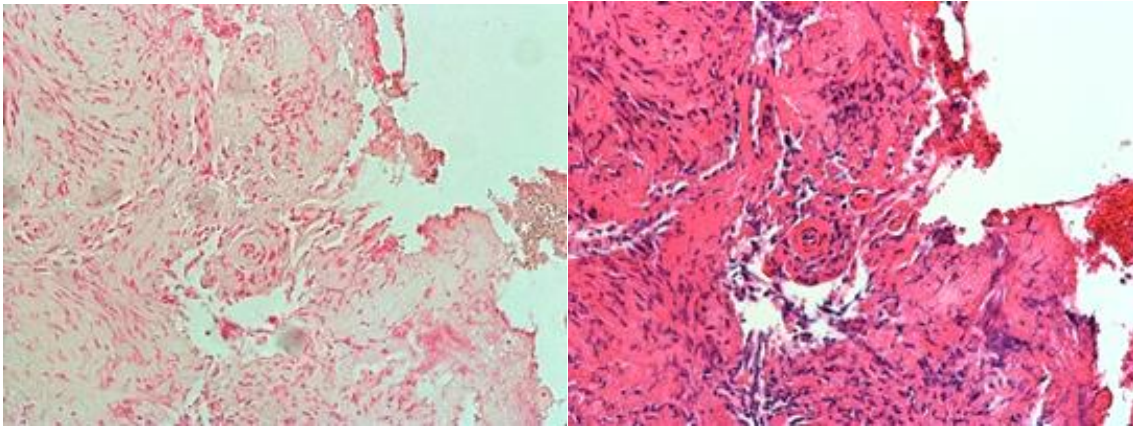
Figur 4: Vev fra colon, farget med ISH (venstre) og HE (høyre). Her vises det ekte muskellaget, slimhinnemuskellet og blodkar, alle positive.



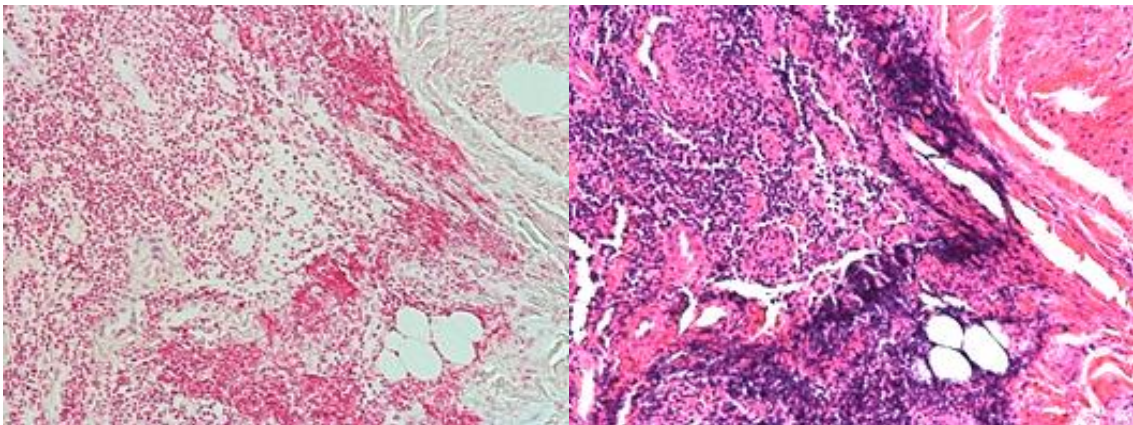
Figur 5: Vev fra colon, farget med ISH (venstre) og HE (høyre). Samme snitt og delvis samme område som i figur 4, tarmveggen er synlig.



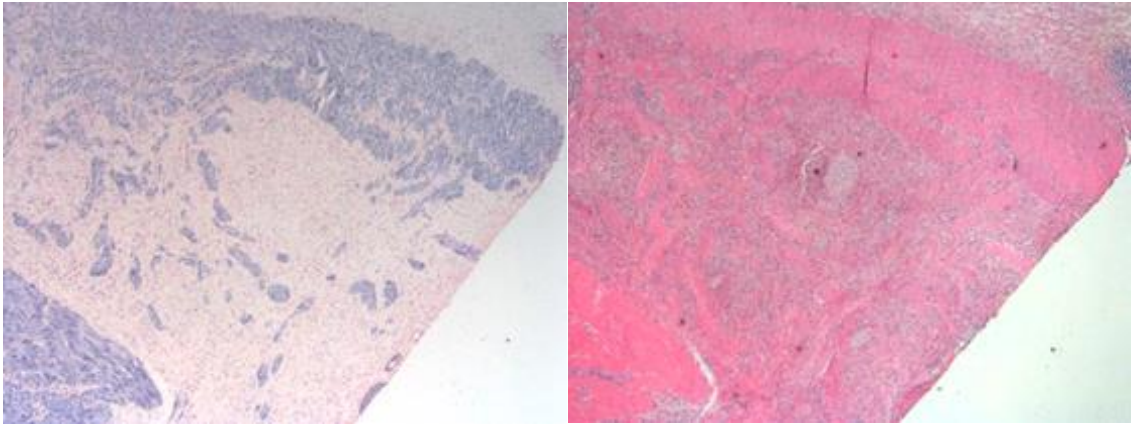
Figur 6: Vev fra osteosarkom, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



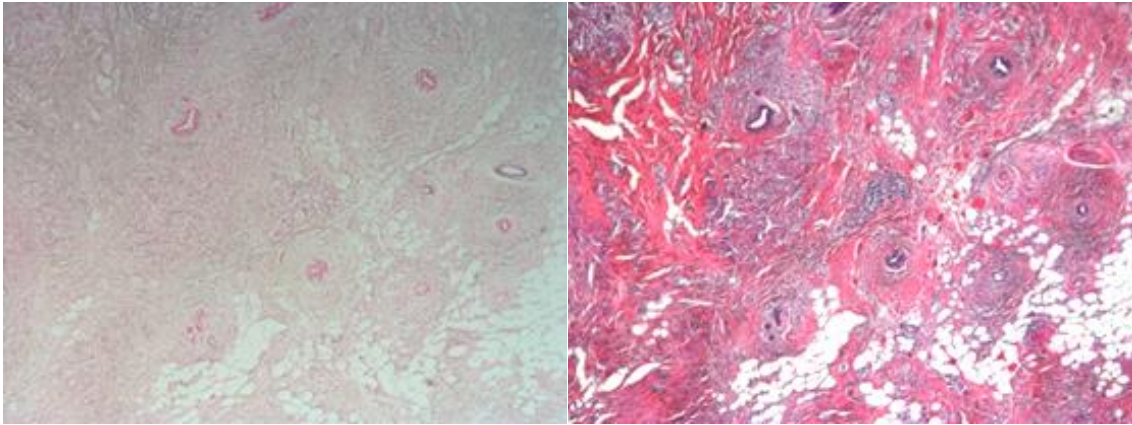
Figur 7: Vev fra meningeom, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



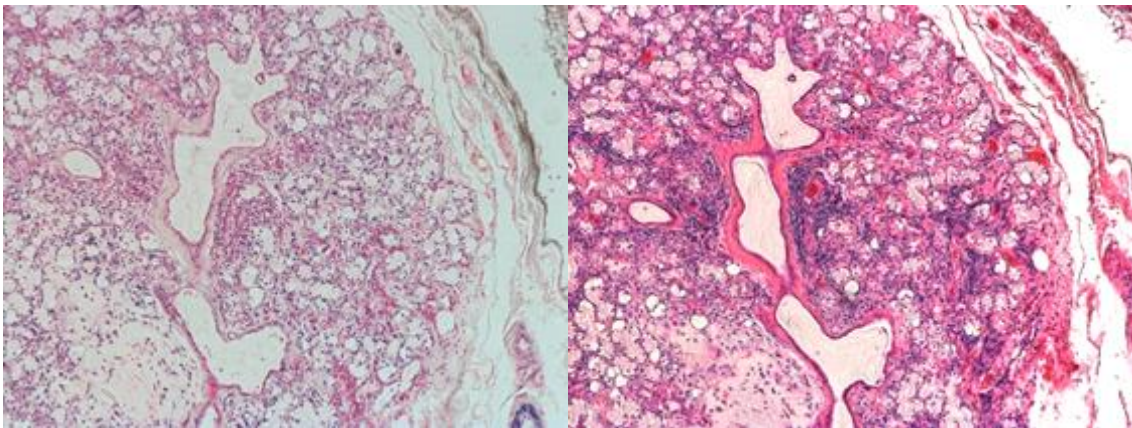
Figur 8: Vev fra mesoteliom, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



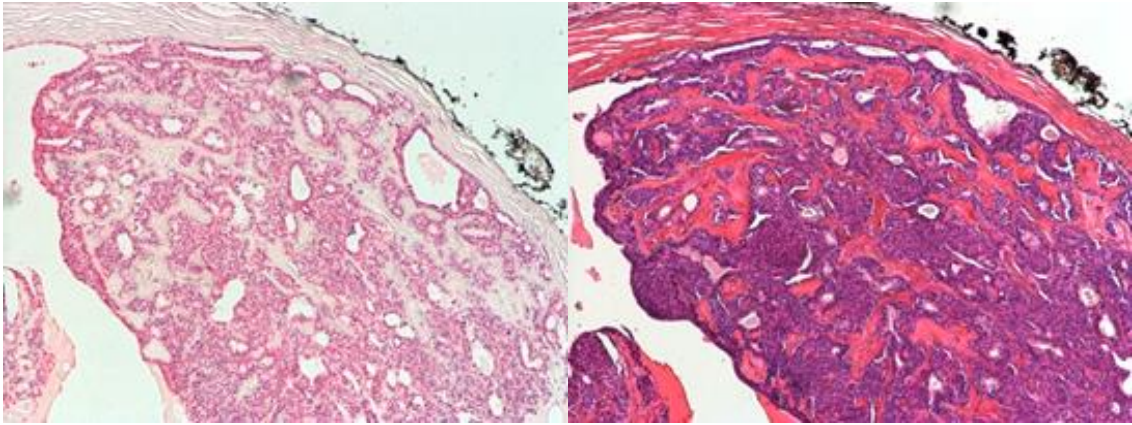
Figur 9: Vev fra ventrikkel, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



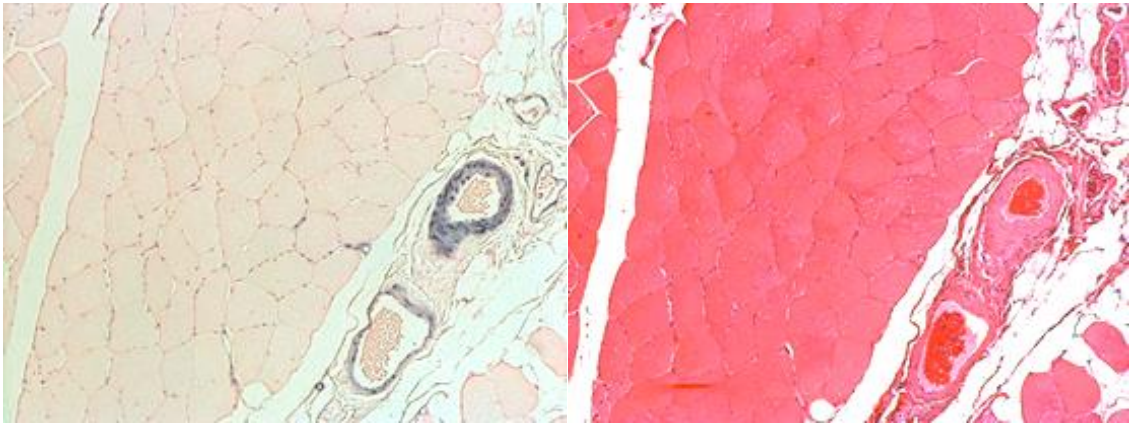
Figur 10: Vev fra mamma, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



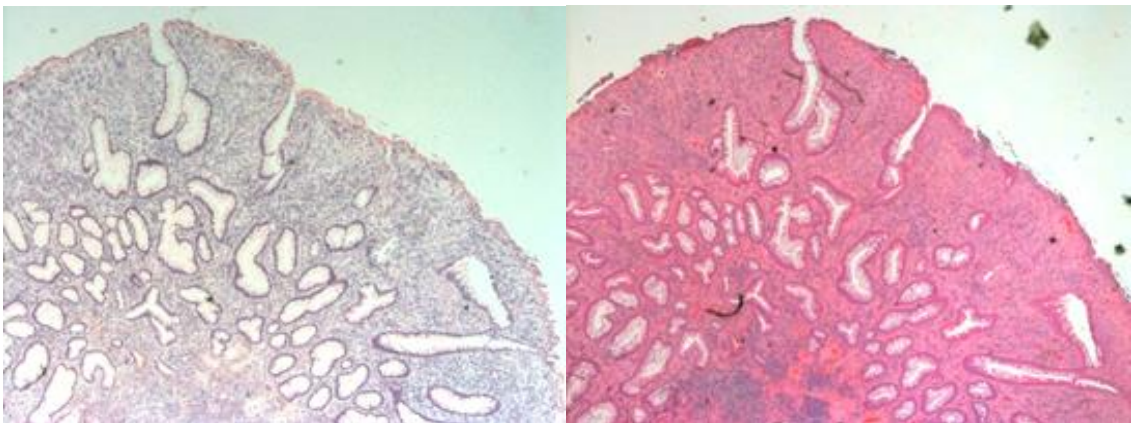
Figur 11: Vev fra pleomorft adenom, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



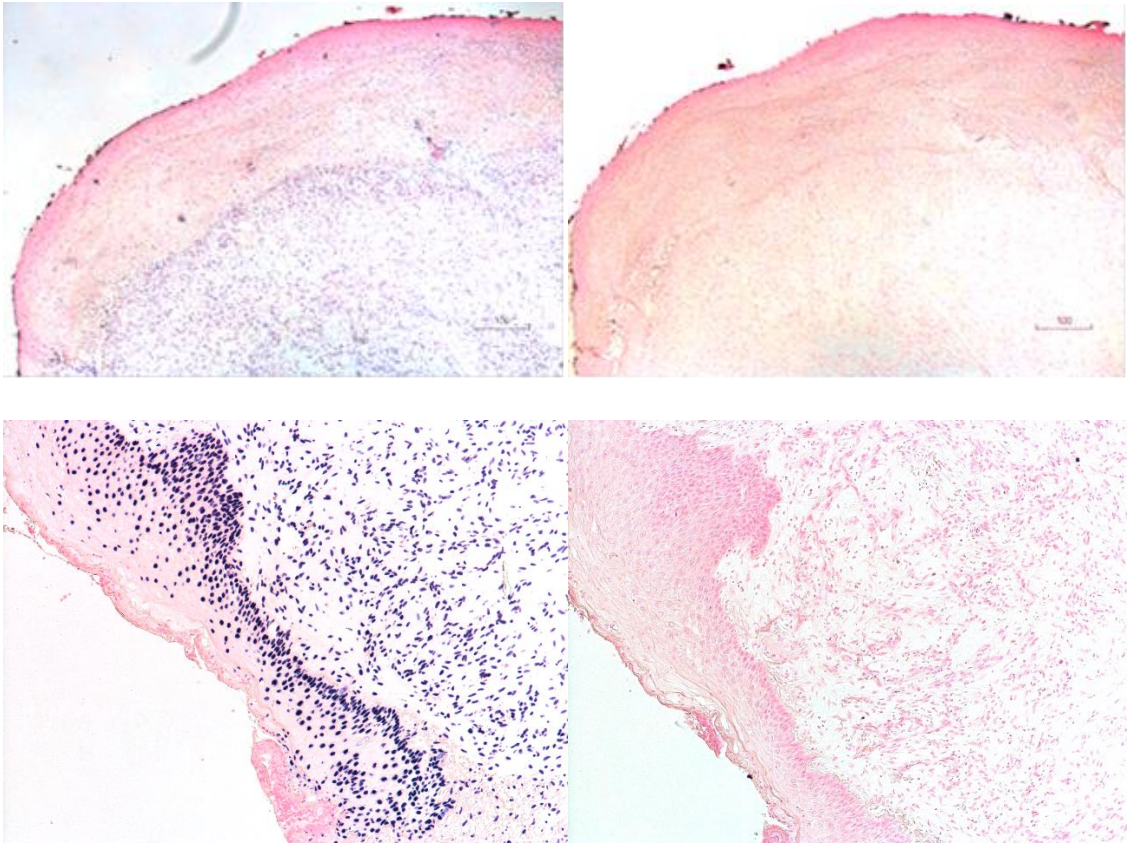
Figur 12: Vev fra kondroid syringom, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



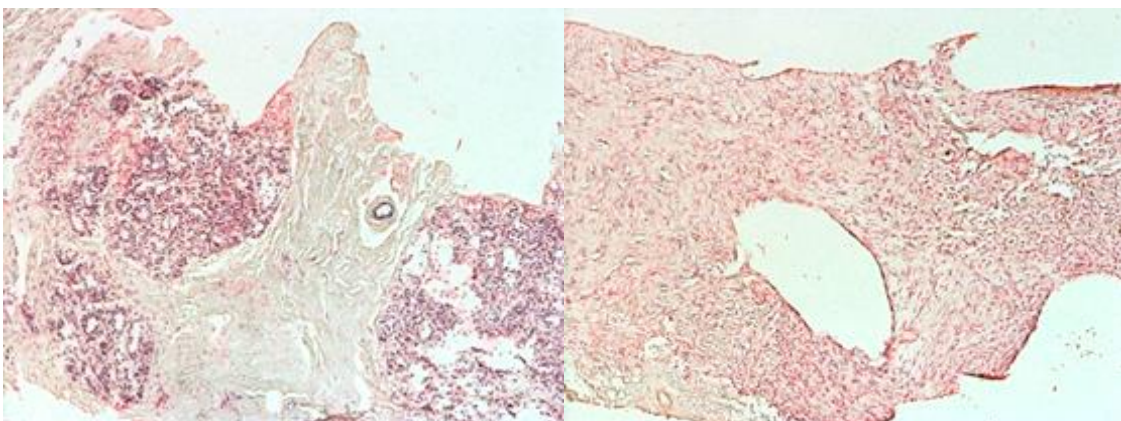
Figur 13: Vev fra intramuskulært lipom, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



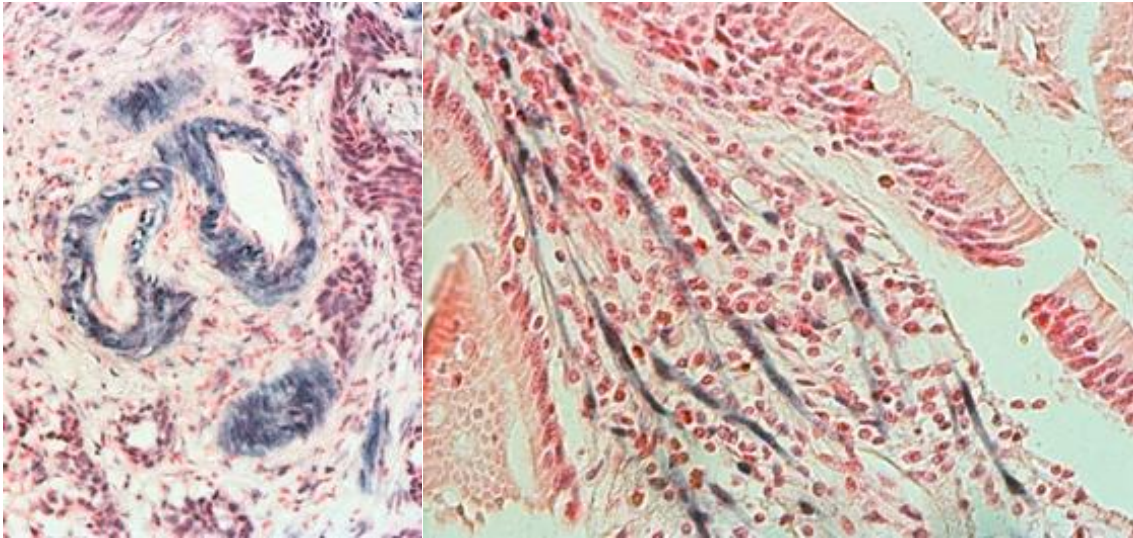
Figur 14: Granulasjonsvev, farget med ISH (venstre) og HE (høyre).



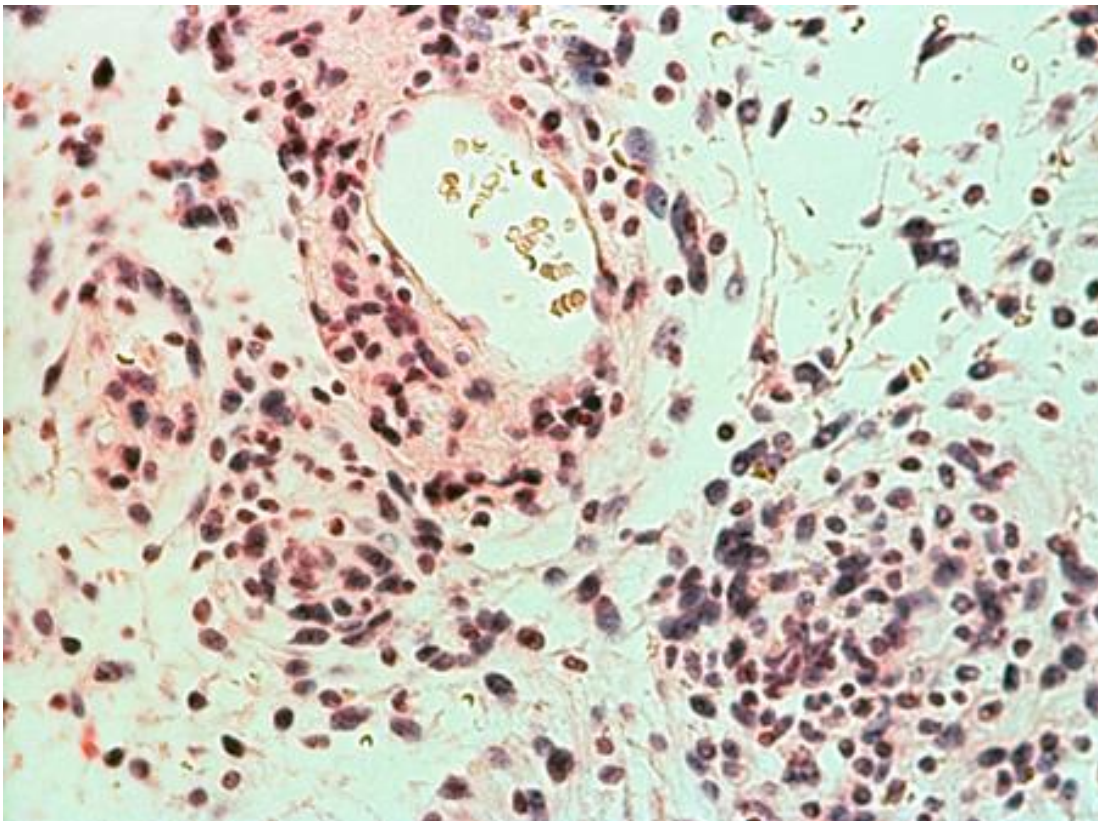
Figur 15: Fire ulike kontrollsnitt (fra to ulike vevsblokker), alle farget med ISH. Positive kontroller til venstre, negative kontroller til høyre. De to øverste snittene er fra samme blokk, og de to nederste snittene er fra samme blokk.



Figur 16: Brystvev og osteosarkom. Snitt med positive tumorceller. Farget med ISH. Brystvev (venstre) og osteosarkom (høyre).



Figur 17: Blodkar (venstre) og stromaceller mellom tumorceller (høyre). Farget med ISH.



Figur 18: Vev fra meningeom, tumorceller er positive. Farget med ISH.

5. Diskusjon

5.1 Observasjoner i snitt

En gjennomgående observasjon er at glatt muskulatur ble farget i alle snittene, der cellene er positive både i kjerne og cytoplasma. Tverrstripet skjelettmuskulatur ble også farget, men kun i kjernen. Det var imidlertid kun prøvene fra intramuskulært lipom som inneholdt denne typen muskulatur. Fibroblaster ble ofte farget i kjernene, og myofibroblaster ble alltid farget i kjernene. Ingen av disse to ble farget i cytoplasma, og farging av fibroblaster varierte i snittet, der noen celler var positive og andre negative. Fibroblaster er celler som danner bindevev og kan bli til myofibroblaster.

Myofibroblaster er et mellomstadium mellom fibroblaster og glatt muskulatur. De har også kontraktile egenskaper, som vil si at de kan trekke seg sammen (kontraksjon). Siden dette er et tydelig fellestrekk kan en anta at det er sammenheng mellom cellers kontraktile egenskaper og uttrykk av miR-145.

Kreftcellene varierte en del i resultater, ikke bare mellom ulike vevstyper, men også mellom ulike snitt av samme vevstype. Tumorceller som var utgått fra celler som uttrykte miR-145, myoepitelceller, uttrykte selv miR-145. Dette var imidlertid den eneste sammenhengen mellom tumorceller og uttrykk av miR-145 som ble påvist. Det ble heller ikke funnet noen sammenheng mellom de ulike styrkene på fargingen av de ulike tumorcellene.

Pleomorft adenom er en blandingssvulst med tumorceller fra både myoepitel og vanlig epitel. I de fleste snitt med myoepitel ble dette farget mens vanlig epitel ikke ble farget. Ut fra dette kan det være rimelig å anta at celler fra myoepitel ble sterkere farget enn celler fra vanlig epitel, men dette kom ikke frem av resultatene våre. I snittene fra pleomorft adenom var de ulike typene tumorceller omtrent like positive, uten klart skille mellom dem i styrke på fargingen.

Snittene fra urotelial kancer hadde positive tumorceller, samt både positive og negative epitelceller. De positive epitelcellene hadde imidlertid en tendens til å virke irregulære, så det er mulig at kun tumorcellene ble positivt farget, mens normalt epitel var helt negativt. Forskjellene var ikke tilstrekkelige til å trekke noen slutninger.

Det viktigste resultatet fra farging av tumorprøver er at det var et klart skille mellom tumor- og stromacellene i uttrykk av miR-145. Der tumorcellene varierte fra vev til vev og snitt til snitt, viste stromacellene stort sett samme resultat i alle snittene. I tillegg var tumorcellene ofte mye svakere positive enn de fargede stromacellene. Totalt var det flere snitt med negative tumorceller enn positive, og det var klare forskjeller mellom vevsprøver fra ulike organer.

5.2 Metodeforskjeller

Det er viktig å påpeke at ISH gir annen informasjon enn PCR, mikromatrise og northern blot. Ved bruk av de sistnevnte metodene får en kun informasjon om vevet som helhet, uten å skille mellom ulike celletyper. Det som måles er total mengde miRNA i vevet, men ikke hvilke celler det kommer fra, eller hvordan miRNA er fordelt i og mellom disse cellene. Ved bruk av ISH gjøres denne informasjonen lett tilgjengelig. ISH gir imidlertid ikke samme informasjon om mengde miRNA som PCR. Informasjonen en får ved å bruke ISH er kvalitativ, der vi kan se hvor i snittene det er farget og slik vite hvor det finnes miRNA. Ved å observere hvor sterkt cellene er farget kan vi anslå hvor mye miRNA de inneholder i forhold til andre fargede celler, og få et inntrykk av forskjellene i cellenes produksjon av miRNA. Denne informasjonen er imidlertid kun semi-kvantitativ, da det ikke er faste tall vi finner ved denne metoden.

ISH er slik en metode som gir kvalitativ informasjon om fordelingen av miRNA i cellene, og PCR gir kvantitativt informasjon om mengde miRNA i vevet. PCR er også mye mer sensitiv enn ISH, og vil reagere på små mengder miRNA som ikke vil detekteres ved ISH. Siden PCR og ISH gir svært ulik informasjon, vil det være nyttig å kombinere dem. Da kan PCR gi et kvantitativt mål på hvor mye miRNA som vevsprøven inneholder, mens ISH viser hvilke celler som uttrykker dette miRNA-et, samt om det er i kjerne og/eller cytoplasma. Dette kan gi et mer fullstendig bilde av det en ønsker å forstå, og en unngår at resultater feiltolkes på grunn av mangel på relevant informasjon.

Det er flere måter vevets sammensetning kan endre seg på, men den mest relevante endringen er når det oppstår en svulst. En svulst oppstår når det dannes tumorceller, celler som deles seg uhemmet. Dette betyr at i vevsprøver fra svulster vil tumorcellene ha forskjøvet vevets normale komposisjon. For eksempel kan en vanlig vevsprøve bestå av 30 % epitel og 70 % stroma mens en vevsprøve fra en svulst kan bestå av 70 % epitel og 30 % stroma. Hvis epitelceller og stromaceller har ulikt uttrykk av en type miRNA, vil endringen i vevskomposisjonen føre til at mengden miRNA i de to vevsprøvene blir forskjellig.

En PCR-analyse vil kun måle mengden miRNA i hele vevsprøven. Hvis dette miRNA-et ikke er uttrykt, eller lavt uttrykt, i epitelceller, vil økningen i antall epitelceller føre til at analysen måler en mindre mengde miRNA i vevsprøven enn i en prøve fra friskt vev. Hvis en ikke tar hensyn til dette vil det se ut som om mengden miRNA i cellene har minket, selv om den faktisk er uendret. En endring i vevet kan slik bli tolket som en endring i cellene. Hvis det ble foretatt en in-situ-hybridisering i dette eksempelet, ville denne vist at det er samme innhold av det aktuelle miRNA både normalt epitel og tumorceller. Det ville vært klart at resultatet ikke skyldes en endring i cellene.

5.3 Resultatene relevans

Det har tidligere blitt funnet en sammenheng mellom tumorutvikling og redusert mengde miR-145 (9, 13-16). Flere av disse undersøkelsene brukte metoder som PCR og mikromatrise, uten å oppdage eventuelle endringer i vevskomposisjonen. En framsatt hypotese er at endringen skyldes en nedregulering av miR-145 i kreftcellene. Ut fra resultatene fra ISH brukt i denne oppgaven, kan en stille spørsmål om sammenhengen mellom kreftceller og endring i mengde miR-145 er reell.

Tidligere undersøkelser har rapportert om nedregulering av miR-145 i kreftvev i blant annet tykktarm, bryst og bukhole. Vår undersøkelse viste imidlertid at i disse vevstypene uttrykkes vanligvis ikke miR-145, verken i normale epitelceller eller kreftceller. Det er i stedet stromaceller som produserer miR-145 i vevet. Det er mulig at endringen av miR-145 i vev påvist i tidligere undersøkelser ikke var et resultat av at kreftcellene hadde endret uttrykk av miR-145, men at kreftcellenes proliferasjon hadde endret forholdet mellom ulike typer celler. Hvis kreftcellene ikke uttrykker miR-145, vil det ved bruk av PCR gi samme resultat som om mengde miR-145 i cellene hadde minket.

Ut fra dette bør eventuelle forsøk for å undersøke en mulig sammenheng mellom kreft og nedregulering av miRNA inkludere en metode for å oppdage og eventuelt korrigere for vevsendringer, og effekten disse vil ha. Slik kan en unngå at endringer i vevets totale miRNA feiltolkes. Da vil endringer som oppstår som følge av forandringer i vevets sammensetning ikke tolkes til å komme fra cellenes indre. Et godt alternativ er å utføre en in-situ-hybridisering i tillegg til PCR, for å finne mengden miRNA i vevsprøvene, og også påvise hvilke celler som inneholder miRNA-et.

5.4 Feilkilder ved miRNA ISH

5.4.1 Mulige feilkilder

Mulige preanalytiske feilkilder ved miRNA ISH kan være at vevet har blitt degradert før fiksering, at det ikke har blitt brukt nok tid under fikseringen, eller at vevsblokkene har blitt lagret feil.

En feilkilde kan være at snittet har blitt kontaminert med RNase. Dette kan skje direkte under preparering, snitting eller under prosedyren. Hvis snittet kontamineres med RNase vil disse enzymene bryte ned miRNA, både i snittet og eventuelt i probene. Hvis miRNA-et er ødelagt, vil vi få et falskt negativt resultat. Av denne grunn renses alt utstyr godt, enten ved at det vaskes med RNase-away, eller ved at det bakes i ovn på 180 °C. Alle reagenser som brukes, både innkjøpte og selvlagde, er helt frie for RNase.

For svak eller for sterk avmaskering kan også være en feilkilde. Hvis avmaskeringen er for svak vil ikke miRNA-et i vevet være tilgjengelig for probene. Hvis avmaskeringen er for sterk kan miRNA i snittet løsne og forsvinne ut i løsningen. Riktig styrke på avmaskering er derfor viktig.

En feilkilde kan være at snittene blir liggende for kort tid i xylen, eller at xylen-løsningen er uren. For kort tid i xylen kan føre til at parafin blir liggende igjen i snittet, og uren xylen kan føre til at det blir liggende igjen artefakter i snittet.

Det er også viktig at stringent vask har riktig temperatur og konsentrasjon. Stringent vask utføres for å fjerne uspesifikke bindinger, så feil stringens vil ha store følger. Ved for lav stringens kan snittet inneholde uspesifikke hybridiseringsprodukter som vil gi falskt positivt resultat. For høy stringens kan føre til at de ønskede miR-145-kompleksene fjernes, som vil gi falskt negativt resultat.

Feil konsentrasjon av prober, antistoff og reagenser er mulige feilkilder. For lav konsentrasjon av prober eller reagenser kan gi for lite kompleksdannelse til å få et synlig resultat, og snittet blir falskt negativt. For høy konsentrasjon av antistoff eller probe kan føre til kryssreaksjoner og uspesifikke bindinger som vil gi falskt positivt resultat. Relatert til dette er størrelsen på snittet, som må passe til mengden og

konsentrasjonen av probe/antistoff og andre reagenser. Hvis snittet er for stort kan det bli for lite antistoff/probe/reagens til å dekke alt, noe som vil føre til falskt negativt svar.

Generelt er alle uspesifikke bindinger mulige feilkilder. MiRNA som har nesten lik sekvens som ønsket miRNA kan danne bindinger med prober. Også endogent AP kan danne bindinger med antistoff. Begge eksemplene vil gi falske positive resultater.

Menneskelige feil kan skje under analysen, for eksempel at snitt ligger for lenge eller for kort i løsninger, eller at dekkglass eller annet skraper i snittet.

5.4.2 Feilkilder oppdaget under forsøket

Underveis i forsøket ble det prøvd å endre på avmaskeringsprosessen ved å øke konsentrasjonen av proteinase K løsning og forlenge avmaskeringstiden. Dette fungerte ikke, da snittene løste seg opp og ble ubrukelige.

Flere av de tidlige positive kontrollsnittene var svakt farget, og det ble derfor laget ny U6-løsning med høyere konsentrasjon. Den nye løsningen med U6-prober var imidlertid defekt, da alle positive kontroller fra løsningen ble negative. Dette skjedde under farging av mesoteliom, der nesten alle snittene hadde negative tumorceller. Feilen ble oppdaget da vi studerte blodkarene og fant at disse ble positivt farget. Siden alle snittene hadde blodkar, ble blodkar i vevet brukt som en intern kontroll. Hvis et snitt var helt negativt fant vi et blodkar, og konstaterte at dette var positivt. Slik visste vi at snittet ikke var negativt grunnet feil under protokoll. Akkurat hva som gikk galt med den ene batchen er usikkert, og den ble kastet.

6. Konklusjon

Undersøkelsen viste at miR-145 er systematisk uttrykt i kontraktile celler som glatt muskulatur, fibroblaster og myoepitel. Uttrykk av miR-145 i tumorceller er variabel.

Viktig kunnskap som ikke ville blitt avdekket ved bruk av PCR, ble påvist ved hjelp av in-situ-hybridisering (ISH). Ved å benytte ISH kan en påvise hvilke celler som uttrykker et spesifikt miRNA, og hvor stor andel av cellene som gjør det.

I fremtidig kartlegging av uttrykk av miRNA bør det alltid tas hensyn til vevets sammensetning. Denne undersøkelsen har vist at in-situ-hybridisering kan brukes til dette formålet.

7. Referanser

- (1) Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Dongen S, Bateman A, Enright AJ. *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D140-D144.
- (2) McMurry J. *Fundamentals of organic chemistry*. 7 utg. Belmont: Brooks/Cole; 2011.
- (3): Crocker J, Murray PG. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. 2 utg. Chichester: Wiley; 2003.
- (4) Sachdeva M., Mo YY. *MIR145 (microRNA 145)* [Internett]. Durham: Southern Illinois University School of Medicine [oppdatert 30.04.19; hentet 17.05.19]. Tilgjengelig fra: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR145.html
- (5) Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. *MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(10):1712.
- (6) Lu J, Clark AG. *Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression*. *Genome Research*. 2012; 22(7):1243-1254.
- (7) Liu S-R, Zhou J-J, Hu C-G, Wei C-L, Zhang J-Z. *MicroRNA-Mediated Gene Silencing in Plant Defense and Viral Counter-Defense*. *Front Microbiol*. 2017;8:1801.
- (8) Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. *Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer*. *Oncogene*. 2008;27(12):1788-93.
- (9) Hart M, Wach S, Nolte E, Szczyrba J, Menon R, Taubert H, Hartmann A, et al. *The proto-oncogene ERG is a target of microRNA miR-145 in prostate cancer*. *FEBS J*. 2013;280(9):2105-16.
- (10) Dybos SA, Flatberg A, Halgunset J, Viset T, Rolfseng T, Kvam S, Skogseth H. *Increased levels of serum miR-148a-3p are associated with prostate cancer*. *APMIS*. 2018;126(9):722-732.

- (11) Wang H, Moyano AL, Ma Z, Deng Y, Lin Y, Zhao C, Zang L, et al. *miR-219 Cooperates with miR-338 in Myelination and Promotes Myelin Repair in the CNS*. Dev Cell. 2017;40(6):566-582.
- (12) Bizuayehu TT, Johansen SD, Puvanendran V, Toften H, Babiak I. *Temperature during early development has long-term effects on microRNA expression in Atlantic cod*. BMC Genomics. 2015;16(1):305.
- (13) Quan Y, Huang X, Quan X. *Expression of miRNA-206 and miRNA-145 in breast cancer and correlation with prognosis*. Oncol Lett. 2018;16(5):6638-42.
- (14) Zhang Y, Wen X, Hu XL, Cheng LZ, Yu JY, Wei ZB. *Downregulation of MIR-145-5p correlates with poor prognosis in gastric cancer*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(14):3026-30.
- (15) Boufrajech M, Zhang L, Jain M, Patel D, Ellis R, Xiong Y, He M, et al. *miR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3*. Endocrine Relat Cancer. 2014;21(4):517-31.
- (16) Xing AY, Wang B, Shi DB, Zhang XF, Gao C, He XQ, Liu WJ, Gao P. *Deregulated expression of miR-145 in manifold human cancer cells*. Exp Mol Pathol. 2013;95(1):91-7.
- (17) Wang B, Xi Y. *Challenges for MicroRNA Microarray Data Analysis*. Microarrays. 2013;2(2):34-50.
- (18) ThermoFisher Scientific. *TaqMan Gene Expression Assay solutions* [Internet]. Waltham: ThermoFisher Scientific. [hentet 17.05.19]. Tilgjengelig fra: <http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/taqman-gex-brochure.pdf>
- (19) Hågensen OH, Ramdahl KS. «*Finnes det en sammenheng mellom mikro RNA-21 og tumorsuppressorene PTEN, BTG2 og PDCD4 i prostatavev?*» [bacheloroppgave]. Trondheim: NTNU; 2018.
- (20) Cook DJ, Warren PJ. *Cellular Pathology- an introduction to techniques and application*. 3 utg. Banbury: Scion Publishing Limited; 2015.

(21) Nuovo G, Red. *In Situ Molecular Pathology and Co-Expression Analyses*. 1. Utg. Cambridge: Academic Press; 2013.

(22) Brow DA, Guthrie C. *Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals*. Nature. 1988;334(6179):213-8.

(23) The human protein atlas. *LSM2* [Internett]. Stockholm: The human protein atlas; [hentet 19.05.19]. Tilgjengelig fra <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000204392-LSM2/tissue>

8. Vedleggsliste

Vedlegg 1	Tabell over innkjøpte kjemikalier
Vedlegg 2	Tabell med oppskrifter på løsninger med lang holdbarhet
Vedlegg 3	Tabell med oppskrifter på løsninger med kort holdbarhet

