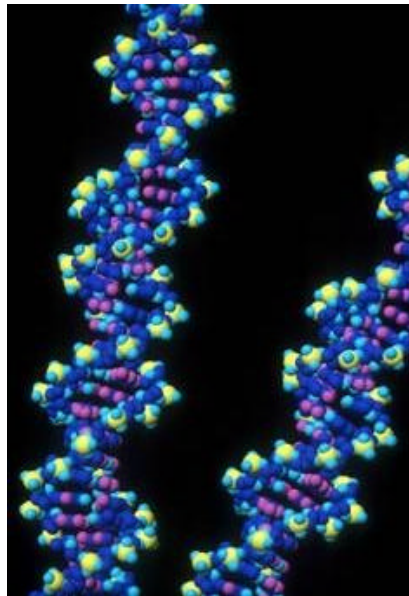




Høgskolen i Telemark

**Betydningen av LOH på 1p31 for celleproliferasjon i
infiltrerende brystcarcinom.**

Irene Tveiterås Øvestad



Masteroppgave i Natur-, helse- og miljøvern tilrettelagt for
bioingeniører, 2005

Fordypningsområde: Miljø og genetisk samspill



Avdeling for allmennvitenskapelige fag

Ordforklaringer/ forkortelser

AKT	Signalvei som fører til pAKT, påvirker transkripsjonsfaktorer
AP-1	Aktivator protein 1, included.
ARHI	Ras Homolog Gene family, member I/ Noey2
AST	Adjuvant Systemic Therapy
CGH	Comparativ Genome Hybridisering
DCIS	Ductal carcinoma in situ
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
GTP	Guanosine triphosphate
HES	Hematoxyline Eosin Safran
JNK	C- jun kinase 1: Mitogen Activated kinase 8.
Ki67	Kiel 67. Proliferasjonsmarkør. Involvert i celledyklus overgang fra G ₀ til G ₁ fase.
LMD	Laser Micro Dissector
LOH	Loss of Heterozygosity
MAI	Mitose Aktivitets Indeks
MAI10	Mitose Aktivitets Indeks med terskelverdi 10 (MAI < 10, gunstig og MAI >= 10, ugunstig)
p21 ^{CIP1/WAF1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor- 1A. (CDKN1A).
PCR	Polymerase chain reaction
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit alpha.
pMAPK	Fosforylert mitogen aktivert protein kinaser, også kalt ERK1/2 c raf Serine/ threonine kinase aktivert av RAS
RAS	GTP bindende protein.
STR	Short tandem repeats
TMA	Tissue micro arrays

Forord

Denne masteroppgaven er en del av min mastergradstudie ved Høgskolen i Telemark. Studiet er tilrettelagt for bioingeniører og ved oppstarten i 2003 var dette det første studiet i Norge som gjorde det mulig å oppnå en høyere grad med bakgrunn som bioingeniør. Elin Kure var en av initiativtakerne til studiet og fortjener honnør fordi hun har lagt til rette for at bioingeniører i Norge kan heve sin faglige kompetanse. Oppgaven tilsvarer en arbeidsmengde på 60 studiepoeng og er utarbeidet ved Avd. for Patologi, Stavanger Universitetssjukehus, i perioden august 2004 – november 2005.

Jeg vil takke prof. dr. med. Jan P.A. Baak ved Avd. for Patologi, Seksjon for kvantitativ og molekylærbiologisk patologi, som har vært min veileder. Han har vært svært entusiastisk for mitt initiativ til å heve min kompetanse innen molekylærbiologi. Sammen med overlege Kjell H. Kjellevold har han tilrettelagt for at det er mulig å drive med forskning på Avd. for Patologi. Min faglige veileder i arbeidet med oppgaven har vært Emiel A.M. Janssen. Jeg er svært takknemlig for den hjelp jeg har fått med å finne en interessant problemstilling og god veiledning underveis. Han har hjulpet meg med å legge mange byggesteiner til min molekylærbiologiske bakgrunn.

Jeg vil også takke Ivar Skalaland ved Seksjon for Immunhistokjemi for hans hjelp med å utføre de immunhistokjemiske analysene. Han har svært god innsikt i denne type analyser og hans kompetanse gjør vårt laboratorie til et av de beste i norden på dette feltet. Jeg vil også rette en takk til ledelsen ved Avd. for Patologi, Kjell H. Kjellevold og Siri Robberstad, som har innvilget de permisjonene som har vært nødvendige for å gjennomføre studiet.

Til slutt vil jeg takke min mann Tor Arne Øvestad for hjelp med korrekturlesing av oppgaven. Jeg er også svært takknemlig for at du hele tiden har vært positiv til mine studier. Takk også til våre tre sønner som har vist forståelse for at mor har hatt et hardt arbeidspress i perioder.

Innholdsliste

Ordforklaringer/ forkortelser	ii
Forord	iii
Sammendrag	1
1. Innledning	2
2. Problemstilling og hensikt med oppgaven	5
3. <i>Teori</i>	7
3.1 <i>ARHI</i> (også kalt <i>Noey2</i>)	7
3.2 Formalinfiksert parafininnstøpt vev	11
3.3 Isolering av genomisk DNA.	13
3.4 PCR	14
3.5 Laser mikrodisseksjon av tumorvev.	15
3.6 Konstruering av TMA blokker (Tissue micro array).	16
3.7 Immunhistokjemi.	17
3.8 Microsatellite analyser	18
4. <i>Materiale og metoder</i>	19
4.1 Studiepopulasjon	19
4.2 Isolering av DNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev	20
4.3 PCR	24
4.4 Laser mikrodisseksjon av parafininnstøpt tumorvev fra mamma	24
4.5 Konstruering av TMA (Tissue Micro array)	26
4.6 Immunhistokjemi	26
4.7 Microsatellite analyse	28
4.8 Analyseproblemer og optimalisering av metode	30
4.9 Statistisk analyse	35
5. <i>Resultater</i>	36
5.1 Microsatellite analyser	36
5.2 Immunhistokjemi på TMA-blokker	37
6. <i>Diskusjon</i>	43
<i>Referanser</i>	49

Vedleggsliste:	55
<u>Vedlegg 1</u>	
Konvensjonell metode for DNA -isolering av formalin-fiksert vev	56
<u>Vedlegg 2</u>	
Standard prosedyre fra Qiagen for isolering av genomisk DNA fra vev med "QIAamp DNA Micro kit"	57
<u>Vedlegg 3</u>	
Modifisert metode for ekstrahering av DNA v.h.a. Qiagen" QIAamp DNA micro kit"	60
<u>Vedlegg 4</u>	
Standard PCR-oppsett	59
<u>Vedlegg 5</u>	
Konstruering av TMA blokker med 6 x 7 vevssylindre, diameter 2.0 mm	61
<u>Vedlegg 6</u>	
Deparafinisering og farging av snitt til mikrodisseksjon.	63
<u>Vedlegg 7</u>	
Microsatellite analyser	64
<u>Vedlegg 8</u>	
Norske retningslinjer for adjuvant behandling ved brystkreft	65
<u>Vedlegg 9</u>	
Arbeidsskjema for TMA blokk (6 X 7 prøver)	66

Sammendrag

Brystkreft er den mest vanlige krefttypen blant kvinner i Norge. Ca. 60 % av disse er lymfeknute negative. På bakgrunn av tumor grad, størrelse og østrogen reseptor klassifiseres i dag 85 % av alle pre-menopausale lymfeknute negative brystkreft pasienter i høyrisikogruppen som får adjuvant behandling. Dette innebærer en stor grad av overbehandling for kun 30% av disse kvinner får spredning. Mitose aktivitets indeks (MAI) er en målestokk for proliferasjon og den sterkeste prognostiske faktor for lymfeknute-negative brystcarcinomer. For denne gruppen pasienter har en studie vist at sjansen for tilbakefall er 2,5 ganger større i gruppen MAI ≥ 10 enn i gruppen MAI < 10 [22]. En total genome DNA analyse i den samme studien viste korrelasjon mellom tap på kromosom 1p31 og MAI ≥ 10 . *ARHI/Noey2* er et maternalt imprintet tumor suppressor gen lokalisert til 1p31. LOH på det paternale allelet vil føre til fullstendig inaktivering av genet. Ekspresjon av dette genet har en bremsende effekt på cellevekst. I et forsøk på å finne en forklaring på hva som gjør MAI til en sterk prognostisk faktor ble det gjort LOH analyser med microsatellite markører på 1p31. Det ble brukt DNA fra formalinfiksert parafininnstøpt vev fra en gruppe pasienter med lymfeknute negative, infiltrerende, ductale brystcarcinom. I arbeidet med å isolere DNA ble det prøvd ut 3 forskjellige metoder. Det ble gjort immunhistokjemi på TMA snitt fra 420 pasienter med infiltrerende ductale brystcarcinom. Det ble brukt antistoff for noen av effektorene for *ARHI*, p21^{WAF1/CIP1}, cyclinD₁ og MAPK, i tillegg til østrogen og progesteron reseptor og Ki67. Det ble funnet en korrelasjon mellom LOH på 1p31 og nedsatt p21^{WAF1/CIP1}, men ingen korrelasjon mellom LOH på 1p31 og cyclinD₁ eller MAPK. Det ble heller ikke funnet noen korrelasjon mellom LOH på 1p31 og MAI. De immunhistokjemiske analysene viste at i gruppen med høy ekspresjon av cyclinD₁ var det like store grupper med positiv og negativ ekspresjon av p21^{WAF1/CIP1}. I tillegg ble det påvist en korrelasjon mellom negativ ekspresjon av Ki67 og positiv ekspresjon av cyclinD₁.

1. Innledning

Brystkreft er den mest utbredte kreftform blant kvinner i alderen 30-74 år. Pr i dag rammes 12 % av alle kvinner i Norge. Tall fra Kreftregisteret [1] viser at i 2003 var det 2694 nye brystkrefttilfeller i Norge. Litt over halvparten av tilfellene forekommer hos kvinner mellom 45 og 64 år. På tross av radikal kirurgi dør 20 – 30 % av disse pasientene p.g.a. metastaserende sykdommer.

Mammografiscreening av kvinner over 50 år medfører tidlig oppdagelse av sykdommen og sammen med adjuvant behandling vil dette øke overlevelsen. Adjuvant kjemoterapi og hormonbehandling øker overlevelsen hos pasienter med brystkreft. Behandlingen har imidlertid alvorlige bivirkninger for pasientene, og behandlingen er kostbar. Adjuvant behandling bør derfor kun gis til høyrisikopasienter. Ifølge "Sankt-Gallan consensus guidelines" anbefales det ikke Adjuvant Systemisk Terapi (AST) (Vedlegg 8) til pasienter i lavrisikogruppen, dvs. små, grad 1, østrogen reseptor positive tumorer [2]. Denne gruppen utgjør bare 15 % og det medfører at 85 % av alle premenopausale kvinner med lymfeknutenegative brystcarcinomer blir behandlet med AST. Siden det bare er 30 % som utvikler fjernmetastaser uten AST, utgjør dette en høy grad av overbehandling. Reproduserbarheten av tumorgrad er ikke god, selv blant eksperter på brystkreft diagnostikk. [3]. Det må derfor være et mål å finne bedre prognostiske faktorer som på en sikker måte gjør det mulig å skille pasientene i høy- og lav- risikogrupper. Det er også viktig å finne prediktive faktorer som kan forutsi om pasienten vil ha respons på den behandlingen som gis.

Det er funnet en rekke prognostiske faktorer for brystcarcinomer og flere av dem er direkte eller indirekte relatert til proliferasjon. Det er gjort mange studier som har klargjort den rollen de enkelte gener spiller ved celleproliferasjon. Prognose henger nøye sammen med

proliferasjonsaktivitet. Dette er en av de biologiske prosessene som er godt dokumentert for brystcancere [4,5,6,7,8]. Flere studier har vist at mitosetelling er den viktigste delen av en histologisk klassifisering. På grunn av mangel på nøyaktige protokoller har det vært problemer med reproduserbarheten. Baak *et al* har vist at telling av antall mitoser på en definert måte i det perifere område av tumoren, er en standardisert måling av MAI [10,11,12].

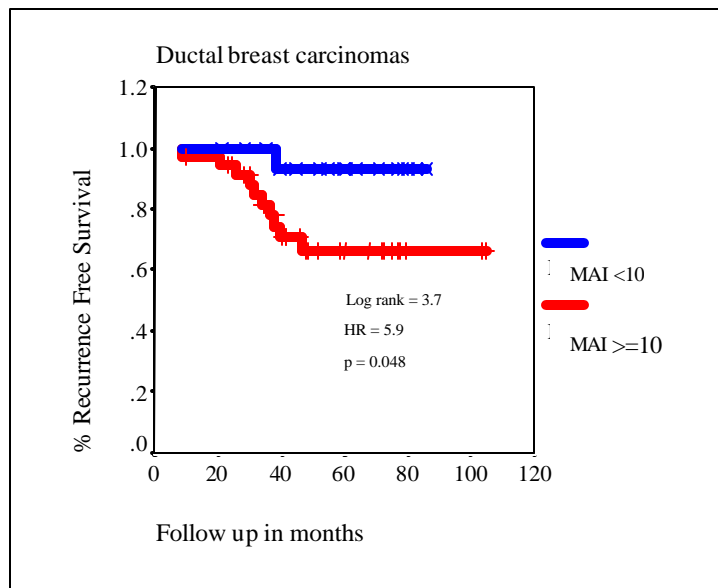
Mitoseaktivitetsindeksen (MAI) er det totale antall mitoser som telles i ti kontinuerlige synsfelt (40X objektiv, 0.75 numerisk aperture og synsfelt diameter 450µm som totalt gir en forstørrelse X 400) i det mest cellerike og minst differensierte område av tumoren [9].

Tellingene gjøres på 4µm tykke hematoxylin og eosin (H&E) fargede snitt. Ved å dele MAI, målt i en populasjon, i to grupper, med en terskelverdi på 10 (MAI<10 gunstig og MAI≥10 ugunstig), brukes benevnningen MAI10. Det er gjort flere retrospektive og prospektive studier hvor denne terskelverdien er brukt. Studiene viser at måling av mitoseaktiviteten, etter en slik standardisert metode og med terskelverdi 10, gjør den til den høyeste og mest reproduerbare prognostisk faktor sammen med lymfeknutestatus [12,13,14,15,16,17,18]. En stor prospektiv studie fra Nederland har evaluert MAI som den faktoren som har den høyest prognostiske verdi til å skille mellom høy- og lavrisikogrupper av lymfeknute negative brystcancerpasienter under 55 år [19]. Målingen er lett tilgjengelig, billig og reproduserbar. Den blir heller ikke påvirket av forlenget fikseringstid [20,21].

Den biologiske forklaringen på Mitose Aktiviteten og hva som gjør den til en så sterk prognostisk faktor er fremdeles ukjent. I en studie fra Nederland, utført av Janssen *et al*, ble det gjort total genome DNA analysering med comparative genome hybridisering (CGH) på 76 invasive lymfeknutenegative brystcancere [22]. Et av funnene var tap av allele på locus 1p31 som viste sterk korrelasjon til MAI≥10. Det ble også påvist en amplifikasjon på kromosomarm 3q som viste sterk korrelasjon til tilbakefall av sykdommen. Dette var den

sterkeste prognostiske faktoren i undersøkelsen. En hypotese er at denne økningen skyldes amplifisering av gen *PIK3CA* som er den katalytiske subenheten p110 alpha av p13-kinase, klasse 1a. P13-kinase er et transformeringsprotein påvirket av vekstfaktorer. Det har flere effektordomener og via PKB/AKT signalveien er det involvert i cellens bevegelighet, invasivitet og apoptosehemming.

Tap av 1p forekom i 43 % av brystcarcinomer med MAI ≥ 10 og bare i 17 % av tilfellene med MAI < 10 . Oppfølging av pasientene i gjennomsnittlig 46 måneder viste at i gruppen med MAI ≥ 10 var det 27/47 (57 %) av tilfellene som fikk residiv cancer. I gruppen med MAI < 10 var det 5/29 (17 %) av tilfellene som fikk residiv cancer (Figur 1).



Figur 1. Prosentvis antall pasienter uten tilbakefall i gruppene MAI < 10 og MAI ≥ 10

Disse tallene samsvarer godt med funnene om tap på kromosom 1p. Tap av et tumor suppressor gen på dette kromosomet kan føre til uregulert proliferasjon av tumorceller og resultere i høy MAI. En kandidat for et slikt gen er *ARHI* (også kalt *Noey2*) på 1p31. Genet ble lokalisert til dette kromosomet av Yu et al i 1999 [23], og Loss of Heterozygosity (LOH) analyser har vist

at *ARHI* er det mest vanlige delesjonsområde på allele 1p31 i bryst- og ovarie-tumorer [23, 24]. En LOH studie av Janssen et al på samme DNA som ble brukt i CGH-studien viste at det var en korrelasjon mellom LOH på 1p31 og MAI10 (Tabell 1) (upublisert data).

Tabell 1. Korrelasjon mellom LOH på 1p31 og MAI10 i tumorvev

		MAI10		Totalt
		MAI < 10	MAI >=10	
LOH på 1p31	nei	16	13	29
	ja	5	22	27
Totalt		21	35	56

På tross av den gode prognostiske verdien av MAI er det 17 % i gruppen MAI<10 som får lokale eller distale metastaser, og i gruppen MAI >= 10 er det 57 % som ikke får metastaser. MAI har vist seg å være en bedre prognostisk faktor enn østrogen reseptor og tumorgrad. For å gjøre den til en ideell predikator for å skille mellom høy- og lav-risikogrupper må en kartlegge flere genetiske hendelser som fører til at en celle får økt evne til proliferasjon og invasivitet.

2. Problemstilling og hensikt med oppgaven

I dag klassifiseres pre-menopausale lymfeknute negative pasienter i en lavrisiko gruppe på grunnlag av tumorstørrelse, grad og østrogen reseptor. Mitose aktivitets indeks (MAI) er en målestokk for proliferasjon. Når den brukes med terskelverdi 10 (MAI< 10, gunstig og MAI >=10, ugunstig), har både retrospektive og prospektive studier vist at MAI er en sterkere prognostisk faktor enn både tumor grad og østrogen reseptor for lymfeknute-negative

brystcarcinomer. I en total genome DNA analyse med CGH er det funnet korrelasjon mellom tap på kromosom 1p31 og MAI \geq 10 [22]. Studien viste også at sjansen for tilbakefall etter gjennomsnittlig oppfølging på 46 måneder var 2.5 ganger større i gruppen MAI \geq 10 enn for gruppen MAI $<$ 10. MAI er allikevel ikke ideell nok til å hindre overbehandling fordi 17 % med gunstig MAI får tilbakefall og 57 % med ugunstig MAI får ikke tilbakefall. Produkter fra tumor suppressor gener kan påvirke ukontrollert vekst ved inhibering av celle syklus.

ARHI/Noey2 er en kandidat for et tumor suppressor gen lokalisert til 1p31. *ARHI* er et maternalt imprintet gen og LOH på det paternale allelet vil føre til fullstendig inaktivering. I forsøk med cellekulturer ble det påvist at *ARHI* ekspresjon nedregulerer cyclinD₁ promotor og inducerer p21. Dette førte til hemming av cellvekst [23]. Det er også påvist at *ARHI* bremser celle proliferasjon via MAPK signalveien [35].

- Hensikten med denne oppgaven er:
- *Å forbedre den prognostiske verdien av MAI10 basert på utfallet av følgende analyser:*
- *Ved å påvise korrelasjon mellom LOH på 1P31 (ARHI) og MAI10 i en pasientgruppe av pre-menopausale lymfeknute negative kvinner med infiltrerende ductal brystcarcinom.*
- *Immunhistokjemiske analyser av ARHI sine effektorer for å undersøke på hvilken måte tap av ARHI påvirker proliferasjon.*
- *Ved å påvise LOH på locus 1p31 i tumorceller fra 94 pasienter med invasiv ductal brystcarcinom vil en beskrive inaktivering av ARHI.*
- *Ved bruk av immunhistokjemi på TMA-snitt med tumorvev fra 420 pasienter vil en forsøke å identifisere noen av de proteinene som denne type tumorceller produserer. Med semikvantitativ analysing av de immunhistokjemiske snittene vil en kartlegge*

hvilke proteiner disse cellene produserer for mye eller for lite av. Videre å detektere noen av signalveiene som ARHI påvirker. Dette kan være med på å gi en forklaring på hvorfor noen pasienter i gruppen MAI < 10 befinner seg i risikogruppen for å få tilbakefall av sykdommen og hvorfor ikke alle i gruppen MAI ≥ 10 får tilbakefall.

3. Teori

3.1 ARHI (også kalt Noey2)

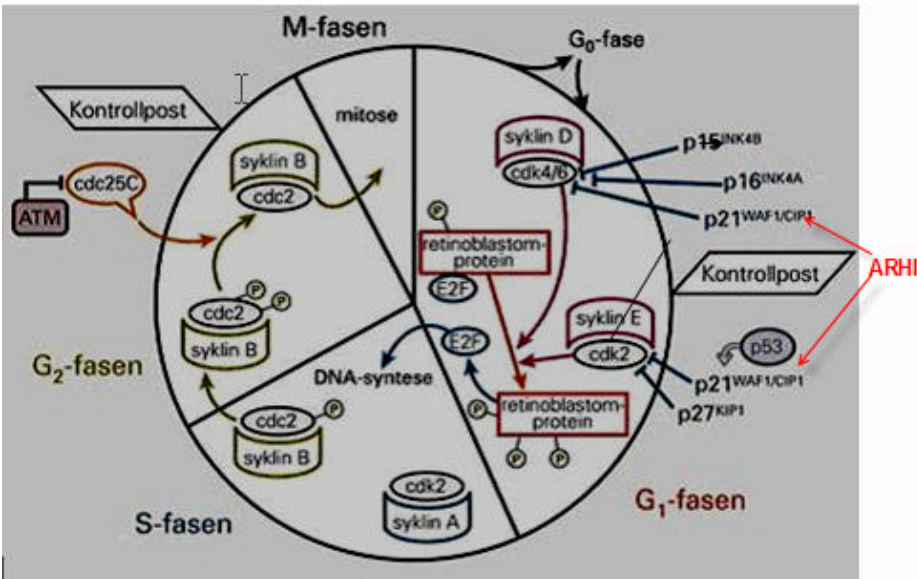
ARHI er et tumor suppressor gen som har 54 - 62 % aminosyre homologi med *Ras* og *Rap*. Det koder for et lite, 26kDa stort, GTP-bindende protein i *Ras*-superfamilien. Sammenligninger av proteinet med Rap-1A og H-Ras viser at det er store forskjeller i effektor domenet for dette proteinet, mens det GTP-bindende domenet er konservert. Dette samsvarer med at *ARHI* har lav intrinsic GTP-ase aktivitet sammenlignet med *Ras*, som er et onkogen, med høy GTP-ase aktivitet. *ARHI* er et av de først rapporterte tumor suppressorgen i *Ras*-superfamilien. I normale celler uttrykkes *ARHI* bare fra den paternale allele, fordi den maternale allele er imprintet [23]. *ARHI* genet strekker seg over 8 kb. Hele det genomiske fragmentet som dekker begge exonene, et intron og promotor regionen er sekvensert. Det er funnet tre potensielle CpG islands i promotor og exonene til *ARHI*. CpG island I og II er lokalisert til promotor region, mens CpG island III er lokalisert til den kodende region. Imprinting av genet skyldes metylering av disse [25, 26]. Det er ikke funnet DNA mutasjoner i selve sekvenskoden til *ARHI*, men via genetiske begivenheter som medfører LOH (tap av heterozygositet) på det funksjonelle, ikke imprintede allelet, er det funnet tap av *ARHI* ekspresjon i 40 % av ovarie og brystcancere. [24]. Tap av ekspresjon kan også fremkomme som resultat av epigenetiske mekanismer som DNA metylering, transkripsjonsregulering, deacetylering og metylering av histoner, [27, 28].

I 70 % av alle invasive brystcancere er *ARHI* nedregulert mot 40 % av alle DCIS (Ductal Carcinoma *in situ*) [57].

ARHI ekspresjon har en hemmende effekt på cellevekst. Ved å fremme reekspresjon av *ARHI* med transfeksjon ble veksten undertrykt i bryst- og ovarie - cancer cellelinjer.

Vekstundertrykkelsen var assosiert med induksjon av p21 (p21^{WAF1/CIP1}) som medførte nedregulering av cyclinD₁ promotor aktiviteten [23]. Denne funksjonen er studert *in vivo* i transgene mus med overekspresjon av *ARHI*. Høy ekspresjon av *ARHI* var assosiert med dårlig utviklede brystkjertler, nedsatt fertilitet, tap av neuroner og dårlig utviklet thymus [29].

Cyclin D₁ er et celle syklus regulator gen som spiller en avgjørende rolle ved utviklingen av flere kreft typer hos mennesker, herunder også bryst kreft [31, 61]. Det er ofte en overekspresjon av genet i prøver fra DCIS som medfører en høyere risiko for utvikling av infiltrerende ductal karsinom. p21 har vist seg å hemme celledeling ved inhibering av cyclinavhengige kinaser (Figur 2) [30]. Antall p21 molekyler bundet til cyclin-CDK (cyclin-cyclin dependent kinase) komplekset, bestemmer om det er aktivt. Et aktivt kompleks har bare et bundet molekyl, mens et inaktivt kompleks har bundet mange molekyler.



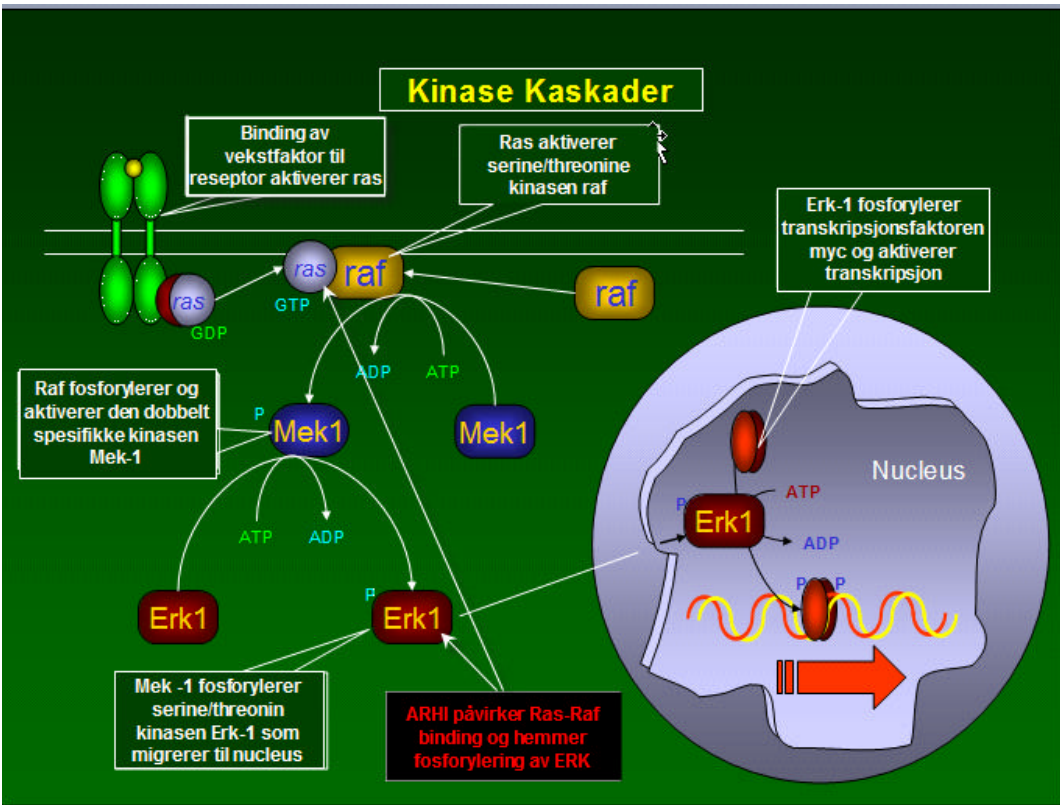
Figur 2. ARHI inducerer ekspresjon av p21 som virker som en negativ regulator på progresjon av cellyklus og medfører reduksjon i antall mitoser.[23]

En annen virkningsmekanisme for *ARHI* ekspresjon er nedsatt signaleffekt via MAP kinase kaskade (ras/mitogen aktivert proteinkinase vekstfaktor-aktiverte kaskade). MAPK (Mitogen aktiverte protein kinaser) er nøkkelpoteiner som er involvert i signaloverføring og forsterking av cellulær respons på stimuli. MAPK er en familie med serine/threonine kinaser. De utgjør den cytoplasmatiske forbindelsen mellom aktivert Ras på plasma membranen og regulering av genekspressjon. MAPK er også kjent som ERK (extracellular signal-regulated kinases).

Aktiverte MAPKer kan translokere til nucleus. Fordi aktiviteten til mange transkripsjonsfaktorer er regulert ved fosforylering, kan derfor MAPKer på denne måten påvirke transkripsjonsaktivitet. Transkripsjonsfaktoren AP1 er et viktig mål for MAPK kaskaden. Som transkripsjonsfaktor binder den seg til DNA og regulerer ekspresjonen av gener som er involvert i vekst, differensiering og celledød. En av mekanismene hvor AP1 inducerer celle syklus progresjon er ved å binde seg til og aktivere genen for cyclinD₁ [34].

Ekspresjon av *ARHI* blokkerer signaler frembrakt av vekstfaktorer ved å påvirke Ras-Raf bindingen, og hemme fosforylering av MAPK induisert av aktiv Raf-1 kinase. På denne måten

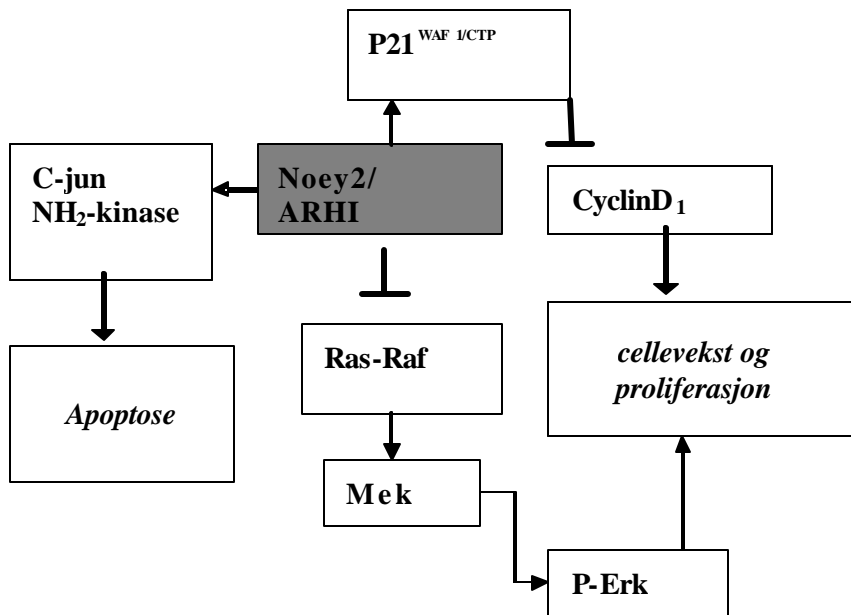
interfererer *ARHI* ekspresjon på signaler fra Ras-aktivert Raf-1 ved direkte hemming av Raf-1 kinase aktivitet, og Ras-GTP signaler omdirigeres til andre virkeområder for Ras [35]. Denne veksthemmingen er avhengig av en unik forlengelse av *ARHI* molekylets NH₂-terminal. Dette skaper en unik forskjell i forhold til oncogenet *Ras*. [36]. Etter fosforylering av MAPK danner det aktiverte proteinet dimere og translokteres fra cytoplasma til nucleus (Figur 3) [37].



Figur 3. *ARHI* hemmer fosforylering av Erk (MAPK) i MAP-kinase kaskaden. p-Erk (pMAPK) translokteres til nucleus og påvirker transkripsjonsfaktorer [35]

Ved å hemme MEK1 har eksperimenter med brystcancer celle linjer vist at aktivitet korrelerer med cellens proliferasjon og motilitet, men har ingen innflytelse på cellens invasivitet. [38;39].

ARHI ekspresjon kan også aktivere JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) og fremkalle apoptose gjennom en calpainavhengig og en caspase uavhengig mekanisme (Figur 4) [40].



Figur 4. Skjematisk oversikt over *ARHI* ekspresjon innvirkning på MAPK og JNK signalveier.

På tross av at en del av funksjonene til *ARHI* er avdekket er det fremdeles ukjent hvor i cellen genproduktet er lokalisert. Immunhistokjemiske analyser på prøver fra normalt brystvev har avdekket at *ARHI* ekspresjon i epitheliale celler er mest intens i cytoplasma og mer sjeldent og diffust i kjernen. Dersom genproduktet er tilstede i kjernen er fargeintensiteten mest intens på kjernemembranen [33].

3.2 Formalinfiksert parafininnstøpt vev

Formalinfiksert parafininnstøpt vev representerer en uvurderlig ressurs som materiale i retrospektive molekylære genetiske studier. Det kan imidlertid være vanskelig å utvinne DNA med god nok kvalitet fra dette vevet [41]. Når et vevspreparat mottas på Avdeling for patologi, er det ofte allerede lagt i bufret formalin (4 %) til fiksering. Etter en fikseringstid på opptil 48 timer gjør patologen en makroundersøkelse av preparatet. Det taes ut små deler av preparatet,

for eksempel en tumor, som en ønsker å undersøke nærmere. Denne biten legges i en plastbrikett og fremføres i en histologisk fremføringsmaskin over natten. Her går den gjennom flere væskebad av formalin, etanol, og xylene og ender til slutt i flytende parafinvoks. Denne prosessen medfører dehydrering, klaring og preparering av vevet. Væske og fett blir fjernet og erstattet med parafin. Vevsbiten taes ut av fremføringsmaskinen og støpes inn i en parafinblokk. Etter denne prosessen er vevet så hardt at det er mulig å skjære tynne snitt til mikroskopi og andre formål [42].

Fikseringstiden, den tiden det tar for formalin å trenge inn i alt vevet, vil avhenge av størrelsen på vevsbiten. I løpet av denne tiden vil DNA i cellene bli degradert av DNAser. DNA trådene brytes ned til dobbeltrådede fragmenter på 150-200 bp. En kan også få delvis nedbryting av den ene DNA tråden og fragmenter med et overheng av enkelttrådet DNA. Dette gjør amplifikasjon av DNA fra formalinfiksert vev vanskelig. Det fragmentet en ønsker å undersøke bør ikke overskride 200 bp [43]. Kvaliteten på DNA som ekstraheres fra parafinblokker med samme type vev vil variere fra blokk til blokk på grunn av forskjeller i fikseringstiden.

Formalinfiksering medfører sannsynligvis ingen vesentlige endringer i nukleærproteinene eller phosphodiester bindingene i DNA [44,45]. Det vil derimot medføre kryssbinding av histone molekyler i DNA dobbeltheliks og binding av histone molekyler til DNA. Ved DNA isolering vil disse bindingene forhindre at Proteinase K fordøyer proteinene fullstendig. På denne måten får en mindre DNA som lar seg amplifisere og det vil fremdeles være en del proteinrester i DNAet. Disse kryssbindingene vil være oppløselig ved oppvarming i hydrofilt miljø [46,47].

Total mastectomi av mamma var mest vanlig som kirurgisk behandlingsform for pasienter med brystcarcinomer i den tidsperioden som vevet ble samlet inn. Dette er store preparat som trenger lang fikseringstid og kan derfor medføre degradering av DNA. En tumor som ligger innimellom fettvev og bindevev i mamma preparatet, vil degraderes av DNAser før formalinen har trengt inn og fiksert vevet. Dette vil medføre lavmolekylær DNA som er svært fragmentert.

Bufret formalin (4 %) gir best fiksering av vev, men det er usikkert om dette ble brukt de første årene undersøkelsen omfatter. Mammavev består for det meste av fett og bindevev, i tillegg til en del kjertel vev. For å kunne isolere tilstrekkelig DNA, må en bruke relativt store mengder vev. Dette vil føre til at en også får økt konsentrasjon av stoffer som virker hemmende på PCR reaksjonen, slik som proteiner og lignende. Ved kirurgiske inngrep på brystkreftpasienter blir det fjernet et varierende antall lymfeknuter for å påvise om det er spredning av cancerceller til dette vevet. Dette er små vevsbiter som fikseres raskt i formalin og DNA vil ofte være godt bevart i disse preparatene. Lymfeknuter inneholder et stort antall lymfocytter som inneholder mye DNA. Det er derfor mulig å utvinne tilstrekkelig DNA fra små mengder vev.

3.3 Isolering av genomisk DNA.

Det finnes flere konvensjonelle teknikker for isolering av DNA fra formalinfiksert parafininnstøpt materiale. De fleste av disse benytter tre trinn: 1. Deparafinisering; 2. Fordøyelse av proteiner, 3. Rensing av nucleinsyrene fra proteinase oppløsningen. Til deparafinisering benyttes ofte xylene og alkohol for å løse opp voksen og reversere dehydreringen av vevet etter fremføringsprosessen. En alternativ metode er bruk av mikroovn til å smelte voksen. I noen prosedyrer hopper en over dette trinnet og tilsetter proteinase K direkte. Fordøyelse av proteinene med proteinase K blir mer effektivt etter deparafinisering og gir større utbytte av DNA. Forlenget innkuberingstid, tilsetning av mer proteinase K, samtidig som løsningen bearbeides mekanisk, er med på å øke DNA utbytte [41].

Det er flere kommersielt tilgjengelige kit til bruk for å isolere DNA fra formalinfiksert parafininnstøpt materiale. Et av dem er "QIAamp DNA micro kit" fra Qiagen [62]. Dette kit er egnet til å isolere små mengder DNA fra blod, vev, blodflekker og forskjellige typer materiale fra rettsmedisin. Wu *et al* har beskrevet en modifisert metode for utvinning av DNA fra formalinfiksert parafininnstøpt vev med "QIAamp DNA micro kit" fra Qiagen [44]. Metoden

benytter de samme reagensene som følger med kit. Ved å legge inn ett ekstra trinn med innkubering i 98 °C, før tilsetning av proteinase, vil en bryte en del av de kovalente bindingene mellom proteiner og DNA komplekser i det formalinfikserte DNAet. Forsøk viser at denne metoden gir signifikant forbedring av PCR amplifisering av genomisk DNA isolert fra formalinfiksert parafininnstøpt vev.

3.4 PCR

PCR gjør det mulig å amplifisere en liten mengde templat DNA i billionfold i løpet av noen få timer. Teoretisk kan metoden brukes med ekstremt små mengder av det opprinnelige DNA, helt ned til et molekyl. I løpet av en syklus i PCR reaksjonen varmes DNA først opp til 90-100 °C for å separere det dobbel trådede DNAet. DNA kjøles deretter raskt ned til 50-65 °C slik at korte enkeltrådede primere kan feste seg til sine komplementære sekvenser. Løsningen varmes deretter opp til 60-70 °C, og det blir syntetisert nye DNA tråder. DNA syntesen skjer ved at dNTP inkorporeres på den frie 3'OH enden på primeren ved hjelp av Taq polymerase. På denne måten blir det dannet to nye dobbeltrådede DNA molekyler som inneholder den sekvensen en ønsker å amplifisere. Hele syklusen repeteres og for hver ny syklus doubles mengden mål DNA. Dette innebærer en eksponentiell økning av det DNA fragment som en ønsker å amplifisere. En PCR reaksjonsblanding består av primere (forward og reverse), dNTP, TAQ polymerase, MgCl² og templat DNA. Disse titreres i en analysebuffer som er optimal for polymerase aktiviteten. For å få en optimal PCR reaksjon er det spesielt viktig å tilpasse primer konsentrasjonen, MgCl² konsentrasjonen, og mengde DNA templat, i hvert enkelt PCR oppsett. I tillegg er temperaturen og inkubasjonstiden ved de forskjellige trinnene viktig. Annealing temperaturen, som er den temperaturen hvor primere fester seg til templatet, er avhengig av smeltetemperaturen (T_m) for den enkelte primer. Feil temperatur på dette trinnet kan medføre at primer ikke fester seg til templatet og hindre amplifikasjon eller forårsake en uspesifikk

amplifisering. En PCR reaksjon bør blandes på is for å unngå at primere fester seg til enkeltrådet DNA uten at det er 100 % homologi. Dette vil gi et uspesifikt produkt.

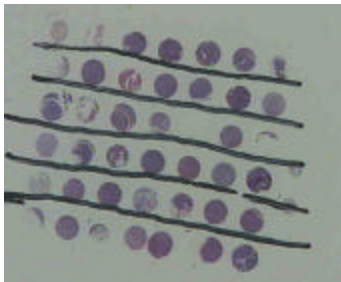
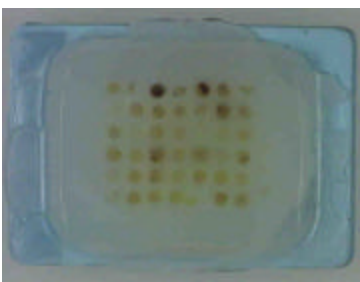
Det er vanskelig å utvinne DNA fra formalinfiksert parafin innstøpt vev med så god kvalitet at det lar seg amplifisere. Det vil ofte inneholde rester av proteiner. I tillegg vil det være fragmentert som følge av degradering i løpet av fikseringstiden. Dette skaper problemer når primere skal feste seg til templatet. Amplifisering av DNA isolert fra mikrodissekert vev vil være en spesiell utfordring. Små mengder utgangsmateriale medfører små mengder DNA. Det er derfor viktig at PCR reaksjonen er optimal for å få til en amplifisering.

3.5 Laser mikrodisseksjon av tumorvev.

Laser mikrodisseksjon gjør det mulig å isolere rene celle populasjoner uten kontaminasjon av omkringliggende celler [48]. Dette gir relativt små grupper med celler og medfører veldig lite utgangsmateriale til utvinning av DNA. Laserstrålen er kald og skader ikke DNA i cellene ved disseksjon og har ingen innvirkning på den videre analyseringen [49]. Cellene defineres ut fra morfologien etter mikroskopering av vev snittet. Det er mulig å skjære ut en populasjon av celler eller bare en enkelt celle. Det kan være et problem å bevare cellenes morfologiske detaljer på snittene som brukes til LMD. De kan ikke dekkes med dekkglass og dette medfører en lysbryting som gjør det vanskelig å se kontraster ved mikroskopering. Snittene bør være minimum 4 μm tykke for å kunne utvinne DNA fra det mikrodissekerte materialet. Et vev snitt som brukes til mikroskopi undersøkelse er vanligvis 1-3 μm . Mikroskopering av et snitt på 4-6 μm kan gjøre det vanskelig å identifisere cellene. Det er derfor ofte nødvendig å sammenligne HES fargede parafinsnitt fra samme vevet i et annet mikroskop for å finne de aktuelle cellegruppene en ønsker å skjære ut.

3.6 Konstruering av TMA blokker (Tissue micro array).

Tissue micro array er en parafinblokk som inneholder vev sylindere fra mange forskjellige pasientprøver. Instrumentet som brukes er et enkelt, manuelt laboratorieinstrument. To tynnveggede, skarpe, hule nåler brukes til å stanse ut en parafinsylinder fra en tom parafinblokk (mottakerblokk) og en vev sylinder fra en pasientprøve med parafininnstøpt vev (donorblokk). Nålen som stanser ut vev sylinderen har litt større diameter enn nålen som stanser ut parafinsylinderen. På denne måten vil vev sylinderen være tett omsluttet av parafin, når den plasseres i hullet etter den utstansede parafinsylinderen. Ved hjelp av to mikrometerskruer på nåleholderen, kan nålene beveges i X-Y retning med eksakt presisjon. På denne måten plasseres vevsylinderne på sirlige, rette linjer, og de ferdige TMA-snittene kan screenes hurtig og systematisk (Figur 5).



Figur 5. TMA blokk (t.v.) og TMA snitt (t.h.) .

Diameteren på nålene bestemmer hvor stor vev sylinder som stanses ut. Denne kan variere fra 0.6mm – 2.0mm. Teknikken gir mulighet for å analysere opptil hundre vevsprøver i et enkelt snitt. Analyser på et TMA-snitt kan utføres på både DNA, RNA og protein nivå. Dette kan være både *in situ* hybridisering og immunhistokjemi. Bruk av fullsnitt til screening er tidkrevende, kostbart og har stor grad av variasjon fra snitt til snitt. Arkivert, formalinfiksert parafininnstøpt vev som er brukt til å stille diagnostiske konklusjoner er svært verdifullt og

sjeldent. Uttak av en vev sylinder fra en parafinblokk er en skånsom måte å ta ut materiale på, og gir minimalt med ødeleggelse av vevet rundt [53,54].

Det er vanlig å ta ut en vevsbit (3-5mm tykk) til histologisk undersøkelse. Det vil være teoretisk mulig å skjære denne i 50-100 vev snitt, og dette vil gi materiale til maksimalt 100 analyser. Dersom blokken brukes optimalt til konstruering av Tissue micro array, er det mulig å ta ut opptil 200 "nålebiopsier", avhengig av størrelsen på tumor. På denne måten mangedobles antall analyser som kan utføres på en parafinblokk med tumorvev. På et enkelt snitt er det mulig å utføre immunhistokjemi på et stort antall prøver fra tumorvev. På denne måten kan en teste ut og optimalisere nye antistoffer, prober og protokoller. Fordi flere vevsprøver blir analysert på ett snitt, oppnås en hurtig evaluering av analysen som utføres. Man sparer også kostnader til reagenser og antistoffer. Det vil være små variasjoner i resultatene, som følge av at alle vevsprøvene behandles og farges under samme betingelser [50,51,55]. Flere studier konkluderer med at det er god korrelasjon mellom bruk av TMA og hele snitt. TMA er godt egnet som screening metode ved analysering av et stort antall tumorer [52,53,54].

3.7 Immunhistokjemi.

Immunhistokjemi kan være en teknisk komplisert analyse. Alle trinn i den prosessen et vevs preparat går gjennom er viktig for utfallet av undersøkelsen. Fikseringstiden i formalin bør være minst 24 timer for små preparat, og 48 timer for store preparat. Ufullstendig fiksering fører til at cellene krymper. Dette gjør det vanskelig for parafinen å trenge inn i cellene og erstatte vann, alkohol og xylen under fremføringsprosessen. Forsinket fiksering medfører autolyse av vevet som gjør det vanskelig å trekke konklusjoner ved bedømming av

fargereaksjonen på de immunhistokjemiske snittene. Ved å forlenge oppvarmingstrinnet under antigen retrieval prosessen, kan resultat av forlenget fikseringstid kompenseres.

Det er en fordel å benytte objektglass dekket med silan for å unngå at snittet løsner helt eller delvis ved oppvarmingen under antigen retrieval prosessen. Snitt som skal brukes til immunhistokjemi bør tørke over natten ved 37 °C, og deretter en time ved 60 °C.

Snitt som er skåret bør ikke lagres ved romtemperatur i mer enn noen få uker. De vil etter hvert tape en del antigener. Dette gjelder spesielt kjerne antigen, som for eksempel østrogen reseptor.

Dersom snittene skal oppbevares over lengre tid bør de fryses. Vev som er innstøpt i parafinblokker kan oppbevares ved romtemperatur uten å tape antigenitet.

Det er viktig å ikke bruke for tykke snitt til immunhistokjemi. Det fører til uspesifikk farging og en risiko for at vevsbiter løsner fra objektglasset under den immunhistokjemiske prosessen.

Ved bruk av monoklonale antistoff oppnåes høy sensitivitet og spesifisiteten kan forbedres med en god rensemetode. Polyklonale antistoff gir høy sensitivitet. En ny generasjon av monoklonale kaninantistoff gir høy spesifisitet og høy affinitet. Økt inkubasjonstid gjør det mulig å øke fortynningen av antistoffet og en får reduksjon av uspesifikke reaksjoner.

Endogenous peroxidase og pseudoperoxidase aktivitet sees ofte i vev som inneholder røde blodlegemer. Dette finner en ofte i myoglobin i muskelceller, i cytokrom i granulocytter og monocytter og i katalaser i lever og nyre. For å minske uspesifikk farging under den immunhistokjemiske fargeprosessen, behandles snittene med peroxidase blokkerings reagens [70].

3.8 Microsatellite analyser

I en microsatellite analyse benytter en seg av microsatellite markører, også kjent som STR (Short tandem repeats). STR er korte polymorfe DNA loci spredd over hele genomet. Dette kan

for eksempel være $(CA\dots CA)_n$, $(CAG\dots CAG)_n$, eller $(CATG\dots CATG)_n$ repetisjoner. I en microsatellite analyse amplifiseres et microsatellite locus med PCR v.h.a. en fluorescensmerket forward primer, og en umerket reverse primer. En LOH-studie sammenligner amplifiserte microsatellite markører fra tumorvev, med de samme markører fra normalt vev, hos samme individ. Dette synliggjøres ved at DNA fra normalt vev viser 2 alleler av den heterozygote microsatellite markøren. Dersom en gitt tumorprøve har gjennomgått LOH, vil den ene av de to allelene vise en lavere kurvetopp, eller den er helt fraværende [65,66]. PCR amplikonene separeres etter størrelse med kapillærelektroforese og det fargemerkede produktet identifiseres med fluorescens deteksjon.

Størrelsen på hvert DNA fragment er kalkulert ut fra fragmentets elektroforetiske mobilitet og vil derfor være avhengig av sekvenssammensettingen, i tillegg til antall basepar. Prøve fra normalt vev blir betraktet som en kontroll og sammenlignet med prøve fra tumorvev. Den relative forskjellen i høyden på kurvene som representerer de to allelene, allele ratio, blir utregnet for prøve og kontroll. Allelic imbalance er ratio av allele ratio for normal prøve og tumor prøve. LOH kalkuleres ut fra verdien av allelic imbalance og karakteriseres ved at betingelsene ≥ 1.5 eller ≤ 0.5 oppfylles.

Reproduserbarheten og presisjonen av resultatene er av større betydning enn den spesifikke lengden i antall basepar.

4. Materiale og metoder

4.1 Studiepopulasjon

Testpersonene i studien er hentet fra en database med 932 pasienter. Databasen består av kvinner i alderen 22-95 år med diagnosen "Infiltrerende brystcarcinom". Av disse er 54 %

lymfeknute negative. Med det menes at det ved mikroskopering ikke er påvist spredning av tumorceller til de undersøkte lymfeknutene.

De har alle vært pasienter ved Stavanger Universitetssykehus i tidsrommet 1976-1995, og har minst 6 måneders oppfølging. Median oppfølging er 116 (6 - 318) måneder. Materialet er formalinfiksert, parafininnstøpt tumorvev og normalt vev som er arkivert på Avdeling for Patologi, Stavanger Universitetssykehus. Parafinblokkene er lagret ved 10-15 °C.

Fra arkivet ble det hentet frem parafinblokker med normalt vev og blokker med tumorvev fra 120 pasienter i databasen. Disse ble brukt til utvinning av DNA. Til isolering av normalt vev ble det brukt lymfeknuter fra de pasientene hvor slikt materiale var tilgjengelig. Fra de øvrige pasientene ble pasientdatabasen for Avd. for Patologi, SUS (Sympathy) brukt til å finne annet tilgjengelig, cellerikt normalt vev. HES (Hematoxylin-Eosin-Safran) fargede snitt fra alle blokker som ble brukt til utvinning av normalt DNA ble mikroskopert, for å utelukke at det var tumorvev tilstede. Det ble laget 10 TMA-blokker med tumorvev fra 42 pasienter i hver, tilsammen 420. 120 av disse var de samme som ble brukt til isolering av tumor DNA. Etisk Komité, Helse Vest, Datatilsynet og Helsedirektoratet hadde på forhånd godkjent bruk av pasientmaterialet til studien.

4.2 Isolering av DNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt vev

For å isolere DNA fra parafinsnitt ble først parafinen fjernet. Deretter ble cellene lysert slik at celleinnholdet ble frigjort. Til slutt ble DNA felt i 98 % alkohol og salt.

Det ble prøvd ut 3 forskjellige metoder for å isolere DNA av høy nok kvalitet til at det lar seg amplifisere med PCR teknikk. Metode 1: Konvensjonell metode (Vedlegg 1), Metode 2: Prosedyre fra Qiagen for isolering av DNA fra parafininnstøpt vev med "QIAamp DNA micro kit" (Vedlegg 2) og Metode 3: Modifisert prosedyre for isolering av DNA fra parafininnstøpt vev med "QIAamp DNA micro kit" (Vedlegg 3).

Det ble brukt primere for et fragment fra *PTEN* (286 bp) i PCR (vedlegg 4, for å confirmere at DNA isolert med de forskjellige metodene lot seg amplifisere. DNA isolert fra EDTA-blod ved hjelp av "QIAamp DNA micro kit", ble brukt som positiv kontroll på PCR reaksjonene. Leica sledemikrotom (Leica SM 2000R) ble brukt til å lage snitt fra det parafininnstøpte vevet.

Etter uttak av vev til isolering av normalt DNA ble det laget et nytt vev snitt fra blokken med normalt vev. Dette ble brukt til mikroskopering for å kontrollere at det ikke forekom tumorceller etter uttak av snitt dypere ned i blokken.

Metode 1: DNA-isolert med konvensjonell metode .

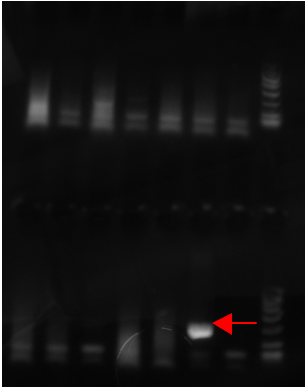
For å kunne isolere DNA fra en større mengde vev ble det benyttet en konvensjonell metode. Snittene ble avparafinisert med xylen og etanol. Proteinene ble deretter fordøyet i varme over natten etter tilsetning av proteinase K og Tris/EDTA-buffer. Nukleinsyrene ble til slutt rensset fra proteinase oppløsningen.

Fra 20 blokker med parafininnstøpt normalt mammavev ble det fra hver blokk skåret 5 vev snitt, tykkelse 10 µm. DNA ble isolert etter protokoll, (Vedlegg 1). Spektrofotometriske målinger viste at det var rikelige mengder DNA i prøvene.

DNA ble brukt til amplifisering av fragment (286bp). med standard PCR (Vedlegg 4). Etter elektroforese av PCR produktet, viste positiv kontroll tydelig bånd (286bp) på gelen, men DNA fra normalt mammavev viste bare diffuse bånd og primer-dimers (figur 6).

Det ekstraherte DNA ble deretter rensset ved hjelp av "Qiagen DNA purification kit".

Spektrofotometriske målinger viste at det var veldig lite DNA igjen etter rensing. Det ble ikke påvist amplifikasjon av fragment (286bp) etter standard PCR (vedlegg 4).

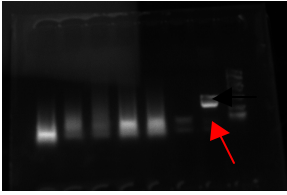


Figur 6. Agarosegel med bånd på DNA fra positiv kontroll (286 bp) (rød pil), og uten bånd på DNA fra vevsprøver.

Metode 2: Standard prosedyre for isolering av genomisk DNA fra vev med Qiagen, "QIAamp DNA micro kit"

Metodeprinsippet for kit er lysering av celler med Buffer ATL og Proteinase K. Lysatet overføres til en QIAamp Min Elute kolonne. Under sentrifugering av lysatet bindes DNA til silica-gel membranen i kolonnen. DNA renses ved tilsetning av 2 vaskebuffer, AW1 og AW2, med påfølgende sentrifugering. DNA utvinnes fra kolonnen ved tilsetning av dsH₂O eller Buffer AE.

Det ble plukket ut blokker med normalt lymfeknutevev fra 5 pasienter i databasen. Fra disse ble det skåret vev snitt, 10µm tykkelse, 5-10 mm². Dette ble overført til et eppendorfrør og brukt til å isolere DNA etter standard prosedyre fra Qiagen (Vedlegg 2). Spektrofotometriske målinger viste at det var DNA i prøvene. Etter amplifisering av fragment (286bp) med PCR, (Vedlegg 4), ble det ikke påvist bånd på agarosegel etter elektroforese av PCR produktet. Signalene var diffuse med stor grad av "smear" (Figur 7).



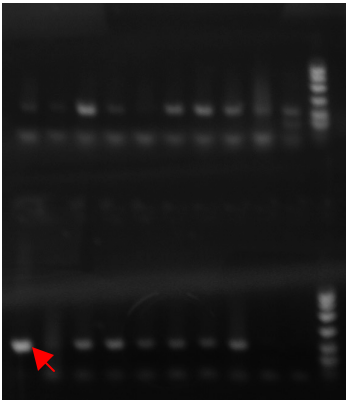
Figur 7. Agarosegel uten bånd etter PCR med DNA isolert med metode 2. Rød pil viser positiv kontroll (286 bp).

Metode 3: Modifisert prosedyre for isolering av genomisk DNA fra vev med Qiagen” QIAamp DNA micro kit”.

Metoden benytter de samme reagensene som ” QIAamp DNA micro kit”[44].

PCR maskin ble benyttet til varmeinnkubering.

DNA fra 20 parafinblokker med normalt vev ble isolert (Vedlegg 3). Etter amplifisering med PCR med primere for fragment (286bp), viste agarosegelen tydelige bånd på de fleste DNA prøver isolert med denne metoden. Figur 8 viser at de fleste prøvene ble amplifisert med primere for fragment (286bp) med denne metoden. Noen av prøvene har bånd med ”smear” og noen viser ingen bånd på agarosegelen.



Figur 8. Agarosegel som viser tydelige bånd på positiv kontroll (rød pil) (286 bp) og tydelige bånd på de fleste DNA prøver isolert med metode 3.

4.3 PCR

PCR- maskin, Flexigene TC412 (Techne), ble brukt til alle PCR kjøringene.

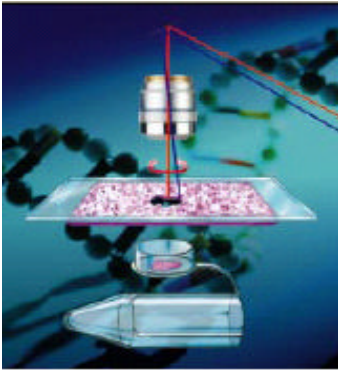
Det ble brukt HotMaster™ Taq DNA Polymerase og HotMaster Taq Buffer (Eppendorf) i PCR miksen.

PCR ble utført etter standard prosedyre. (Vedlegg 4)

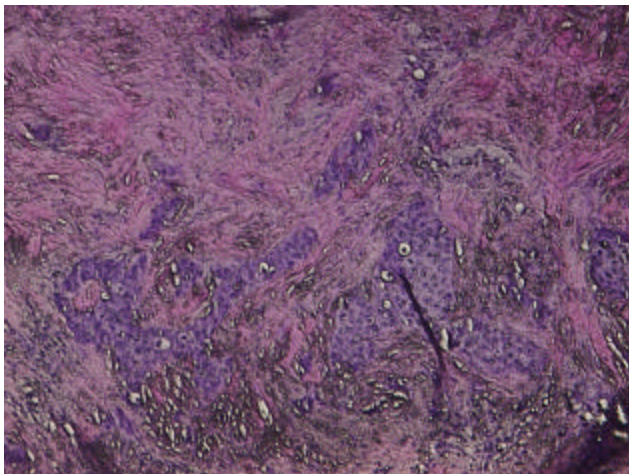
4.4 Laser mikrodiseksjon av parafininnstøpt tumorvev fra mamma

Leica Laser Microdissector (Figur10) ble brukt til å skjære ut populasjoner med tumorceller fra vev snitt [63]. Metode 3 (Vedlegg 3) ble brukt for isolering av DNA fra mikrodisekert vev med "QIAamp DNA micro kit". PCR med primere for fragment (153 bp) ble satt opp for å confirmere at det ekstraherte DNA lot seg amplifisere. Det ble tatt bilder av vev snittene før og etter laser mikrodiseksjonen (Figur 11 og 12). Leica sledemikrotom (Leica SM 2000R) ble brukt til å lage snitt fra det parafininnstøpte tumorvevet. For å unngå kontaminering ble knivbladet skiftet, og sledemikrotomen godt rengjort med støvsuger og cellostoffer, mellom hver prøve. Det ble skåret ett vev snitt, tykkelse 4-5µm, fra hver blokk med tumorvev. Vev snittet ble lagt på et objektglass dekket med plastmembran, spesiallaget for mikrodiseksjon (Membran Slides Pen-Membrane 2.0 µm, Leica). Det ble avparafinisert og farget ifølge prosedyre. (Vedlegg 6)

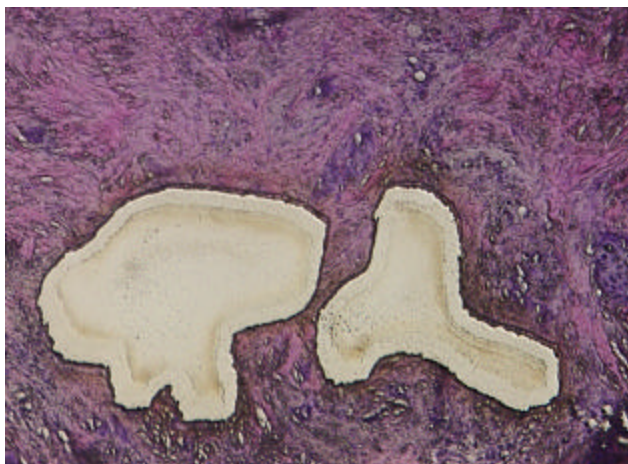
30 µl buffer ATL ble avpipetert i det åpne lokket på et eppendorfrør. Det åpne røret ble plassert i en holder under snittholderen på lasermikroskopet, slik at lokket med buffer vendte mot vev snittet. Mikroskop og laser ble innstilt. Når en cellegruppe ble skjært ut med laserstrålen, løsnet den sammen med plastmembranen fra objektglasset og falt ned i bufferen i lokket på eppendorfrøret (Figur 9).



Figur 9. Skjematisk fremstilling av laser mikrodisseksjon. Figur 10. Bilde av laser mikroskop.



Figur 11. Bilde av infiltrerende ductal brystkarsinom før laser mikro disseksjon



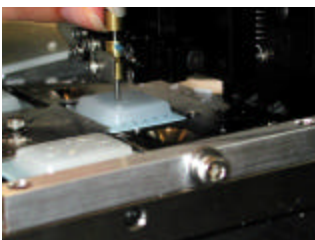
Figur 12. Snitt fra infiltrerende ductal brystcarinom etter laser mikro disseksjon.

4.5 Konstruering av TMA (Tissue Micro array)

Manual Tissue Arrayer fra Beecher Instruments ble benyttet til å lage TMA blokkene (Figur 13) [67].

En patolog hadde på forhånd mikroskopert HES fargede snitt fra hver parafinblokk med tumorvev og den invasive front av tumoren med flest mitoser, var avmerket. Ved å sammenligne snitt og tilhørende vevsblokk, kunne det aktuelle området på tumoren stanses ut fra donorblokken.

TMA blokkene ble konstruert ifølge protokoll (Vedlegg 5).



Figur13. TMA instrument fra Beecher Instruments.

4.6 Immunhistokjemi

Vev snitt (0.5-1.0,µm) fra 10 TMA-blokker med til sammen 420 sylindre fra tumorprøver ble brukt til immunhistokjemi. Snittene ble skåret på sledemikrotom (Leica SM 2000R) og lagt på objektglass behandlet med silan. Automatisk farging av snitt ble utført på "Dako Cytomation autostainer"[68]. Immunhistokjemi ble utført ved bruk av monoklonale antistoff. Tabell 2 viser lokalisering, klon og fortyning for de antistoff som ble brukt til immunhistokjemiske analyser i denne oppgaven, østrogen- og progesteron reseptor, p21, Ki67, CyclinD₁ og p42/44(pMAPK). Dako Antibody Diluent, SO809, ble brukt til å fortynne antistoffene.

For å minske bakgrunnsfargingen ble snittene først behandlet med Peroxidase Blocking Reagent (Dako Cytomation). ChemMate™ DAKO EnVision™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Dako Cytomation) ble brukt som visualiseringsmetode. Dette er en totrinns prosedyre der en først innkuberer vev snittene med optimalt fortynnet primærantistoff fra kanin eller mus. Deretter innkuberes de på nytt med et peroksidase-konjugert polymer reagens. Til slutt visualiseres reaksjonen med ChemMate™ DAB+Chromogen.

Dako TBS, tilsatt 0,05% Tween 20, ble brukt som vaskebuffer mellom de forskjellige trinnene. Antigen retrieval fremkom etter behandling i 3 min i trykk- koker. Hematoxylin (Dako Cytomation) ble brukt som kontrastfarge.

Det ble gjort en semikvantitativ vurdering av de immunhistokjemiske snittene. Det ble utført av to personer uavhengig av hverandre. Resultatene ble sammenlignet og der hvor det ikke var samsvar ble det gjort en ny vurdering ved bruk av stereomikroskop og diskusjon i fellesskap. Scoring av snitt med cytoplasmatisk farging ble delt inn i to grupper basert på følgende kriterier.

Negative: < 1 % positive celler og positive: > 1 % positive celler.

Snitt farget med antistoff med kjernefarging ble delt i grupper med prosentvis positive tumor celler etter følgende skala: <10 % positive celler, (11-50%) positive celler, og > 50 %.positive celler.

Tabell 2. Immunantistoffenes lokalisering, fortykning og klon.

Antistoff lokalisering	Antibody	Clon	Dilution	Code No	Company
Generelle	ER	6F11	1/60	NCL-ER-6F11	NCL
	PGR	PGR636	1/150	M3569	Dako
	Ki-67	MIB-1	1/100	M7240	Dako
MAPKsignalvei	ARHI	Rb polyclonal	1/200	721/2	Dr. Y. Yu
	p42/44	Rb mab	1/600	#4376	Cell Signaling
Cellecyklus	p21	4D10	1/25	NCL-WAF-1	NCL
	CyklinD1	SP4	1/100	RM-9104-S	NeoMarkers

4.7 Microsatellite analyse

Det ble utført microsatellite analyser på DNA fra 94 forskjellige pasienter. Analyser ble utført på de pasientene hvor en hadde både DNA fra tumor og normalt vev som viste positivt signal på agarosegelen etter amplifisering med primere for fragment, (286bp) (jfr. isolering av DNA, metode 3). Analyse av normal prøve og tumor prøve fra samme pasient ble utført parallelt. Det ble også gjort tilsvarende analysering av DNA isolert fra EDTA-blod fra 10 vilkårlige personer. Disse ble brukt som referanseprøver for å identifisere de aktuelle toppene etter kapillærelektroforesen, og som kontroll på reproduserbarheten av analysen.

Markørene D1S2829, *ARHI* (TA-repetisjon), D1S207, D1S430 og D1S464 ble valgt ut fra Genethon genetisk kart i NCBI [69] (Figur 14). Markørene som er valgt er ifølge NCBI mellom 70-85% heterozygote. Det ble satt opp PCR med primere for alle disse markørene med 5 DNA prøver fra normalt vev. Etter elektroforese av PCR produkt viste agarosegel ingen bånd etter amplifikasjon med primere for D1S2829 og TA repetisjon i *ARHI*. Videre analysering ble

derfor gjort med primere for markørene D1S207 (fragmentlengde, 140-172 bp), D1S430 (fragmentlengde, 167-189 bp) og D1S464 (fragmentlengde, 101-121 bp).

Følgende fluorescensmerket primere ble brukt for markørene i PCR oppsett (Vedlegg 3):

D1S207,

(Forward: CACTTCTCCTTGAATCGCTT , Reverse: GCAAGTCCTGTTCCAAGTCT)

D1S464,

(Forward: GCCTAAATTTCTTACACATCCTAAC , Reverse : TGTTTTAAACACCACAAATAAATGT) ,

og D1S430,

(Forward: TCCAGATTTAGTGTCATTTCCC , Reverse : CACTTACAGTAACAAGCCCCAG)

Geneanalyzer 3130xl og Genemapper ®Software, Version 3.7 (begge Applied Biosystems) [64]

ble brukt til fragmentseparering og LOH analysering.

PCR-produkt ble fortynnet og analysert på Geneanalyzer ifølge protokoll (Vedlegg 7).

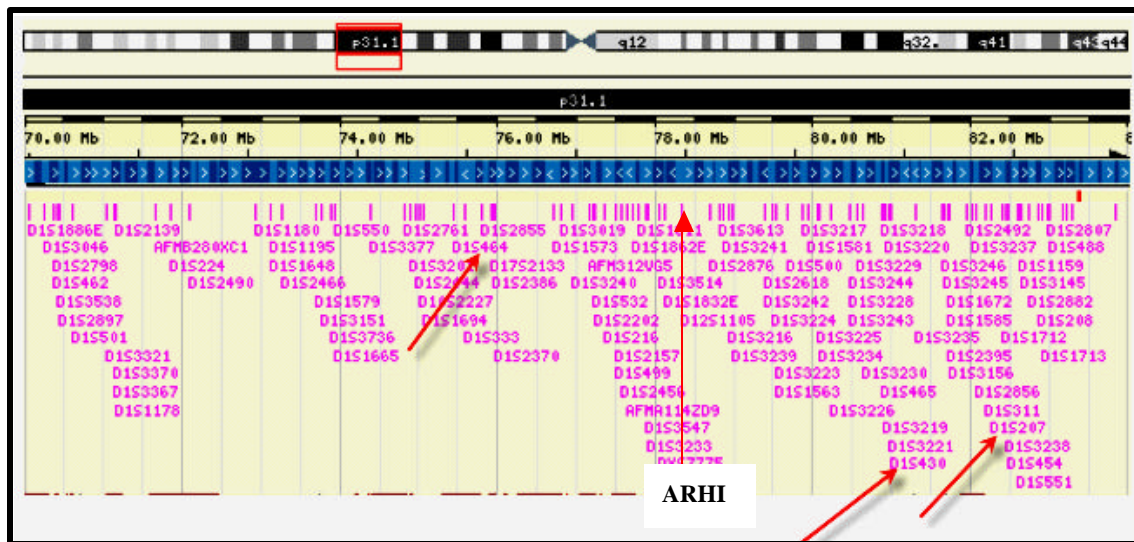
GS500 Liz (Applied Biosystems) ble brukt som size standard. Separering av DNA fragmentene

ble utført med polymer POP7 i 16 kanaler kapillærelektroforese med lengde 36 cm.

Som en kontroll på reproduserbarheten av analysen ble det analysert DNA fra samme

blodprøve i hver PCR kjøring. Den ble også analysert som en kvalitetskontroll på

fragmentsepareringen og analyseringen av LOH-data med Geneanalyzer.



Figur 14. Markørene D1S207, D1S430, D1S464 på kromosom 1p31, lokalisering på Genethon genetiske kart markert med røde piler [69].

4.8 Analyseproblemer og optimalisering av metode

Isolering av DNA

For å isolere normalt DNA ble det brukt lymfeknutevev i de tilfeller hvor dette var tilgjengelig.

På de øvrige pasientene ble det brukt annet tilgjengelig cellerikt vev.

PTEN er et tumor suppressor gen lokalisert til kromosom 10q23. Ved uttesting av DNA isolert med de forskjellige metodene, ble det brukt primere for et fragment (286 bp) av dette genet i PCR reaksjonene. Det viste seg å være vanskelig å få til amplifisering av DNA isolert med metode 1 og 2 med disse primere. For å være garantert å få til amplifisering av DNA fra formalinfiksert parafininnstøpt vev, bør ikke fragmentene overstige 150bp [43]. En av grunnene for at amplifiseringen mislyktes med metode 1 og 2, kan være at fragmentet på 286bp var for langt. Etter PCR med DNA isolert med metode 3 (Vedlegg 3), viste agarosegelen tydelige bånd på de fleste prøvene. Noen av prøvene viste bånd med "smear". Dette skyldes

rester av proteiner i DNAet. De prøvene som ikke viste bånd på agarosegelen kan skyldes at DNA var så fragmentert at det ikke lot seg amplifisere med primere for fragment (286bp).

PCR

PCR med primere for mikrosatellite markørene ble optimalisert for å få et spesifikt produkt som kunne analyseres på Geneanalyser 3130xl. For å finne den optimale primerkonsentrasjonen ble det laget PCR oppsett med DNA fra 5 normale vevsprøver og 2 fra tumorvev, med fortynningsrekke 1/10, 1/20, 1/50 av primer stockløsning (100pmol/μl) for markøren D1S207. Resultatet viste at PCR med primerkonsentrasjon 2 pmol/μl (sluttkonsentrasjon 0,1pmol/μl) gav tydelige bånd på agarosegelen uten ”primer- dimer” bånd. Denne fortynningen ble brukt til analysering med primere for alle markørene. HotMaster™ Taq DNA Polymerase (Eppendorf) ble brukt i PCR reaksjonen (Vedlegg 4). Ifølge produsenten krever ikke denne polymerasen justering av magnesium konsentrasjonen fordi konsentrasjonen i HotMaster Taq Buffer er optimalisert for alle mål DNA. Ifølge produsenten er optimal elongeringstemperatur 65 °C. For å få amplifisering av DNA fra mikrodisekert vev ble temperaturen optimalisert fra 72 °C til 65 °C. Annealingtrinnet ble forlenget fra 1 til 2 minutter.

Laser Mikro Disseksjon

Det var noen ganger vanskelig å identifisere de cellene som en ønsket å undersøke. Ved å mikroskopere et HES farget parafinsnitt i et annet mikroskop, ble det gjort sammenligninger med bilde av samme snitt i lasermikroskopet. På denne måten kunne områdene med cellegrupper som infiltrerte fettvev og bindevev pekes ut. Det var ikke ønskelig å få med tumorceller med morfologi som kunne mistenkes å være DCIS (ductal carcinoma in situ). Områder med stor grad av nekrose ble ikke skåret ut, og heller ikke områder med mye

leukocytinfiltrasjon. For å få et mest mulig representativt DNA fra tumorcellene, var det ønskelig å ikke få med mer enn 10 % normale celler i det laserdissekerte materialet.

Konstruering av TMA blokker

I denne oppgaven ble det valgt å stanse ut vev sylindere med diameter 2.0 mm. Ved å velge en så stor diameter er det større mulighet for at vevsbiten inneholder representativt materiale, kontra en sylinder med diameter 0,6mm. Det varierte hvor mye vev som var igjen i donorblokkene. Derfor var det en varierende lengde på sylindrene som ble stanset ut. For å tilpasse dybden av hullet i mottaker blokken, med lengden på vev sylindren, ble det brukt en dybdestopper med varierende størrelse. På denne måten ble sylindrene liggende i samme plan i TMA blokken.

Ved skjæring av snitt fra TMA-blokkene var det vanskelig å få snitt hvor alle tumorsylindrene var representert. Før et snitt skjæres fra en blokk må den først grovskjæres. Dette gjøres for å få den helt plan med kniven på mikrotomen. På denne måten får en et snitt som inneholder alt vev som er innstøpt i blokken. På grunn av variasjoner i lengden på vev sylindrene, var det viktig å være varsom med grovskjæring av TMA blokkene. Ved å grovskjære for mye kunne alt vevet fra enkelte sylindere bli skjært vekk, før det ble tatt ut et snitt. Vevet hadde også en tendens til å rulle seg sammen under skjæringen. Dette er et vanlig problem ved skjæring av snitt fra TMA blokker med vev sylindere på 2,0mm. En grunn kan være at parafinen i mottakerblokken ikke omslutter vev sylindrene så godt [56].

Immunhistokjemi

Ved manuell mikroskopering kan det være vanskelig å vurdere fargeintensiteten på immunhistokjemiske snitt på en standardisert måte. For å beskrive positiviteten på snittene ble det gjort en semi-quantitativ scoring. Det ble først gjort en subjektiv vurdering ved at 2

personer scoret snittene uavhengig av hverandre. Resultatet fra hver av scoringene ble deretter sammenlignet. I de tilfellene hvor det var uenighet ble det konkludert etter diskusjon.

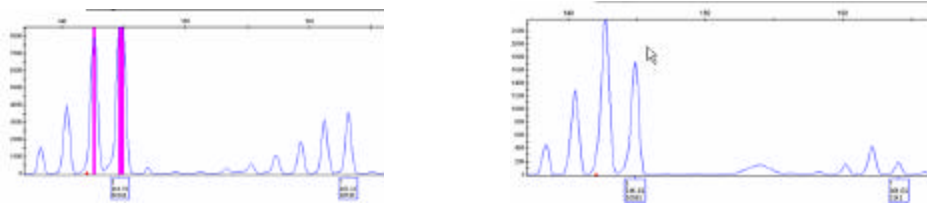
Det er ikke tatt med resultater på immunhistokjemisk analyse med antistoff for ARHI. Disse antistoffene var tilsendt fra Yinhua Yu, M.D. Anderson Institutt, Houston; Texas, USA. De var dessverre blitt ødelagt under transporten og analysene viste så dårlige resultater at det ble frarådet av Dr. Y. Yu å bruke dem i studien.

Microsatellite analyser

Det ble isolert DNA fra normalt vev og tumorvev fra tilsammen 120 pasienter. Etter uttesting av kvaliteten på DNA var det 94 kasus hvor DNA fra både tumorvev og normalt vev lot seg amplifisere. På en del av prøvene var det vanskelig å få til amplifisering av DNA fra både tumorvev og normalt vev, i PCR oppsett med primere for mikrosatellite markørene D1S207, D1S464 og D1S430. I de fleste tilfellene var det vanskelig å amplifisere DNA isolert fra tumorvev. Det ble brukt mye DNA ved optimalisering av PCR med primere for D1S207. Dette resulterte i at det ikke var nok DNA til å bruke på uttesting av primere for de andre markørene.

Det er derfor færre prøver med resultat for markørene D1S464 og D1S430 (Tabell 3)

Ved avlesning av toppene som fremkom etter separering av fragmentene fra microsatellite analysen med markør D1S207, ble det observert flere kunstige topper (stuttere) i etterfølgelsen av den virkelige toppen (Figur 15). Disse toppene er en følge av polymerasens ufullstendige replikering av DNA tråden. Taq polymerasen har ikke noen korrekturlesing og kan derfor "glemme" å sette inn noen basepar på enden av noen tråder. Disse biproduktene er 1-4 repetisjoner kortere enn den egentlige toppen og er mest fremtredende ved dinukleotidrepetisjoner fordi lengre repetisjonsenheter vil produsere færre "stuttere". Antall topper og intensiteten av dem er proporsjonal med antall repetisjoner i PCR produktet. Stuttere er vel karakterisert og reproducerbare.

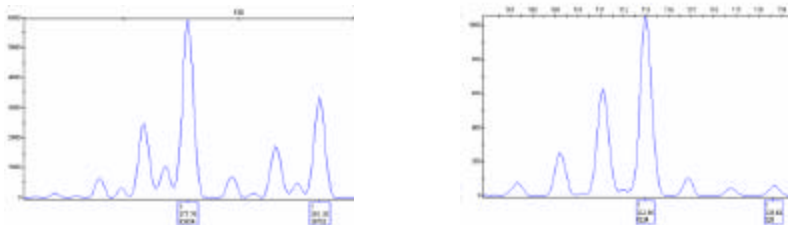


Figur 15. Topper karakterisert med stuttere Fragment fra normalt vev (t.v.) og tumor vev (t.h.) med primere for markør D1S207

Et annet fenomen som ble observert var topper som var delt på grunn av 3'A nukleotid vedheng utenfor templatet, også kalt "plus A" vedheng (Figur 16,17). Fenomenet er locus avhengig og påvirket av reaksjons betingelser. Både stuttere og "tail A" kan gjøre det vanskelig å identifisere den virkelige toppen [65].

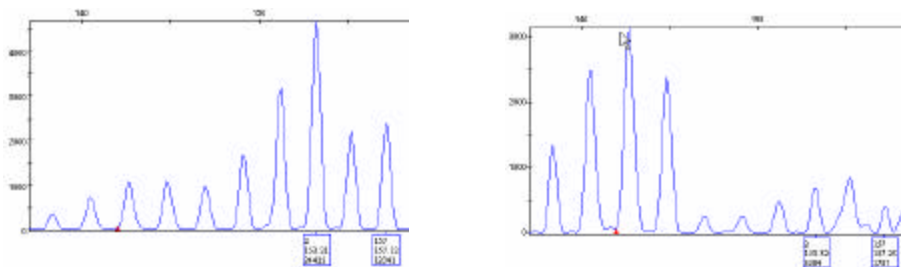


Figur 16. Topper karakterisert med "tail A" på venstre side av den egentlige kurven.. Fragment fra normalt vev (t.v.) og tumorvev (t.h.) med markør D1S430



Figur 17. Topper karakterisert med "tail A". Fragment fra normalt vev(t.v.) og tumorvev (t.h.) med markør D1S464

For markøren D1S207 ble det observert en kurveforskyvning på opptil 50 bp i DNA fra tumorvev hos 10 % av pasientene. Dette gjorde det vanskelig å sammenligne kurvene fra normalt vev og kurvene fra tumorvev (Figur 18).



Figur18. D1S207 Fragment fra normalt vev (t.v.) og fragment med forskjøvet kurve i tumorvev (t.h.).

På grunn av disse problemene ved avlesning av kurvene ble de i hvert enkelt tilfelle identifisert manuelt og ikke ved hjelp av dataprogram.

4.9 Statistisk analyse

SPSS 12.0 for Windows (SPSS, Chicago, USA) ble brukt til statistiske analyser. Kryss tabell mellom LOH forekomst og klinisk- patologiske parametre ble laget og testet for signifikans med Fisher`s eksakt test og Pearson kji-kvadrat test. To-sidet p verdier < 0.05 ble betraktet som signifikant.

Grenseverdier ($=T$) som tidligere beskrevet ble brukt som følgende: MAI ($T < 10$ eller $T \geq 10$), cyclin D₁ og Ki-67 ($T < 10\%$, $10\% \leq T < 50\%$ og $T > 50\%$), p21 og p42/44 (positiv og negativ), LOH (ja eller nei).

Recurrence- free survival (RFS) var tidsperioden fra primærtumor ble diagnostisert og frem til et eventuelt tilbakefall av sykdommen i form av fjerne metastaser. Frisk og i live eller død av andre årsaker, uten lokale eller fjerne metastaser, regnes som en ikke-hendelse. Med en hendelse menes, i live med fjern metastaser eller død av andre årsaker med fjern metastaser.

Pasientene ble scoret etter den siste registrerte patologiske undersøkelsen. Kaplan-Meier overlevelseskurver ble laget og sammenlignet med log-rank test.

5. Resultater

5.1 Microsatellite analyser

Tabell 3. Plassering av markørene på Genethon genetiske kart (NCBI) og antall informative prøver for hver markør

Markør	chromosom	Genethon Genetisk kart. (NCBI)	Tot.ant. Pas.	Ant. informative	% informative	Ant. LOH	% LOH
D1S207	1p31	117.60(cM)	73	63	86	36	57
D1S464	1p31	106.70(cM)	40	35	87	16	46
D1S430	1p31	113.00(cM)	38	23	60	17	74
Totalt	1p31			68		50	74

DNA fra normalt og tumor vev fra 94 kasus ble brukt i PCR med primere for markørene

D1S207 og D1S430 og 76 ble brukt i PCR med primere for D1S464.

Tabell 3 viser resultatet etter LOH analysering med primere for de forskjellige markørene. For markøren D1S207 var det 73 (63 %) som ble amplifisert. Av disse var 63 (86 %) informative, dvs. at de ikke var homozygote eller hadde en kurveforskyvning, og 36 (57 %) av disse viste LOH. For markøren D1S464 var det 40 prøver som ble amplifisert, 35 (87 %) var informative og 16 (46 %) viste LOH. For D1S430 var det 38 prøver som lot seg amplifisere, 23 (60 %) var informative og 17 (74 %) viste LOH. I gruppen totalt er det tatt med alle kasus hvor minst en av markørene var informative.

Tabell 4. Oversikt over prøver med LOH resultat for alle markørene

	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
D1S207	red	blue	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red	red
D1S430	red	blue	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
D1S464	blue	red	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue	blue

red	pos LOH
blue	neg LOH
yellow	homozygot
black	kurve.forskj.

Fra Tabell 4 kan vi lese mønsteret for LOH for alle 3 markørene i 31 prøver. Det er bare tatt med de kasus hvor det var informasjon fra alle markørene. Tabellen viser at i 71 % (22 av 31) av de informative prøvene er det et ensartet mønster hvor minst 2 av markørene er positiv eller negativ for LOH.

Kontrollene som ble tatt med i hvert PCR oppsett viste gode paralleller. Allele ratio på kontrollene med de forskjellige primere viste SD fra 0.04 til 0.20.

5.2 Immunhistokjemi på TMA-blokker

Tabell 5. Oversikt over immunantistoff lokalisert til kjernen analysert på TMA

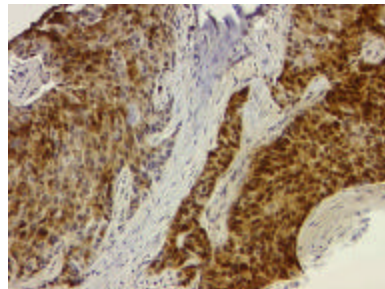
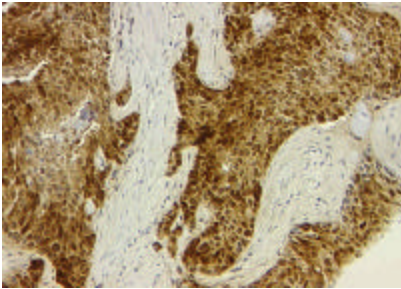
Antistoff	%Tumor i TMA	Immunfarging < 10 %	Immunfarging 10 – 50%	Immunfarging > 50%
HES	89			
ER	73	62 (20%)	14(5%)	229(74%)
PR	73	132(43%)	51(17%)	121(39%)
Ki67	80	192(57%)	111(33%)	22(7%)
p21	76	187(58%)	102(32%)	2(1%)
CyclinD1	82	60(17%)	94(27%)	191(55%)

Tabell 6. Immunantistoff lokalisert til cytoplasma

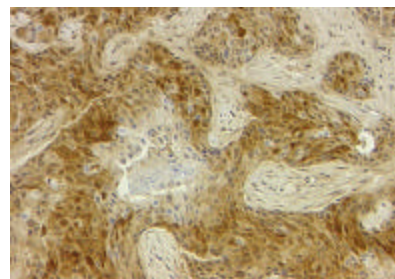
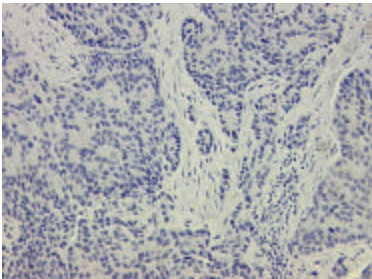
Antistoff	% Tumor i TMA	Immunfarging <1 % positive	Immunfarging > 1% positive
pMAPK	77	72 (22%)	252(78%)

Tabell 5 og 6 gir en oversikt over positivitet på immunfarging med antistoff lokalisert til hhv. kjernen og cytoplasma analysert på TMA -snitt. Kolonne 2 viser prosentvis hvor mange av sylindrene i TMAen som både inneholdt tumorvev, og hvor vev sylindren var representert på TMA snittet. I Tabell 5 viser kolonne 3, 4 og 5 resultatet av scoring på positiviteten for de forskjellige nukleære antistoffene i antall og prosentvis. Tabell 6 viser positiviteten på immunantistoff lokalisert til cytoplasma.

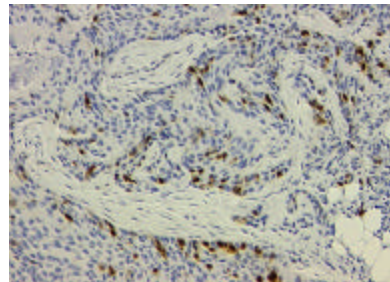
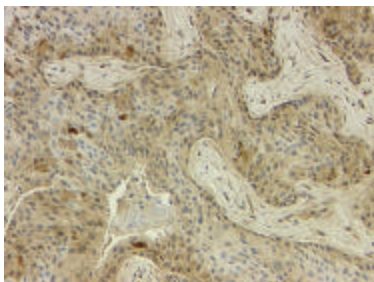
Figur 19-21 viser snitt med immunhistokjemisk farging på et kasus med LOH på 1p31.



Figur 19. Immunhistokjemisk farging med positiv reaksjon på antistoff mot østrogen reseptor (t.v) og progesteron (t.h.)



Figur 20. Immunhistokjemisk farging med negativ reaksjon på antistoff mot p21 (t.v.) og positiv reaksjon på antistoff mot cyclin D₁ (t.h.)



Figur 21. Immunhistokjemisk farging med positiv reaksjon på antistoff mot p42/44 (t.v.) og positiv reaksjon på antistoff mot Ki67 (t.h.).

Tabell 7. Resultater etter SPSS analysering med krysstabell for immunhistokjemisk farging med antistoff mot p21, cyclinD1, Ki67, p42/44, MAI10 og LOH på 1p31.

Immunhistokjemi	LOH på 1p31		2-sidet <i>p</i> -verdi
	Nei	Ja	
p21 negative < 10% positive	3	13	0,007
p21 positive >10% positive	24	16	
cyclinD1 negative <10% positive	2	12	0,272
cyclinD1 positive >10 % positive	15	33	
Ki67 negative < 10% positive	7	22	0,43
Ki67 positive >10% positive	10	17	
p42/44(MAPK) <1% positive	4	6	0,438
p42/44(MAPK) > 1% positive	13	40	
MAI <10	11	27	0,783
MAI >= 10	7	23	

Tabell 7 viser at det er en korrelasjon mellom immunhistokjemisk farging med LOH på 1p31 og p21, men ingen korrelasjon mellom immunhistokjemisk farging med cyclinD₁, Ki67, MAPK og LOH på 1p31. Den viser at det heller ikke er korrelasjon mellom LOH på 1p31 og MAI10.

Tabell 8. Krysstabell mellom LOH på 1p31 og immunhistokjemisk farging med p21.
Pearson kjiikvadrat p -verdi = 0.007.

		p21		Totalt
		negative	positive 1-100 %	
Er det LOH på 1p31	Nei	3	13	16
	Ja	24	16	40
Totalt		27	29	56

Tabell 8 viser krysstabell med LOH på 1p31 og immunhistokjemi med p21 antistoff. Det er en signifikant korrelasjon mellom disse variablene. LOH på 1p31 medfører nedsatt p21 protein i cellene.

Tabell 9. Krysstabell mellom immunhistokjemisk farging med p21 og Cyclin D₁.
Pearson kjiikvadrat p -verdi= 0.000.

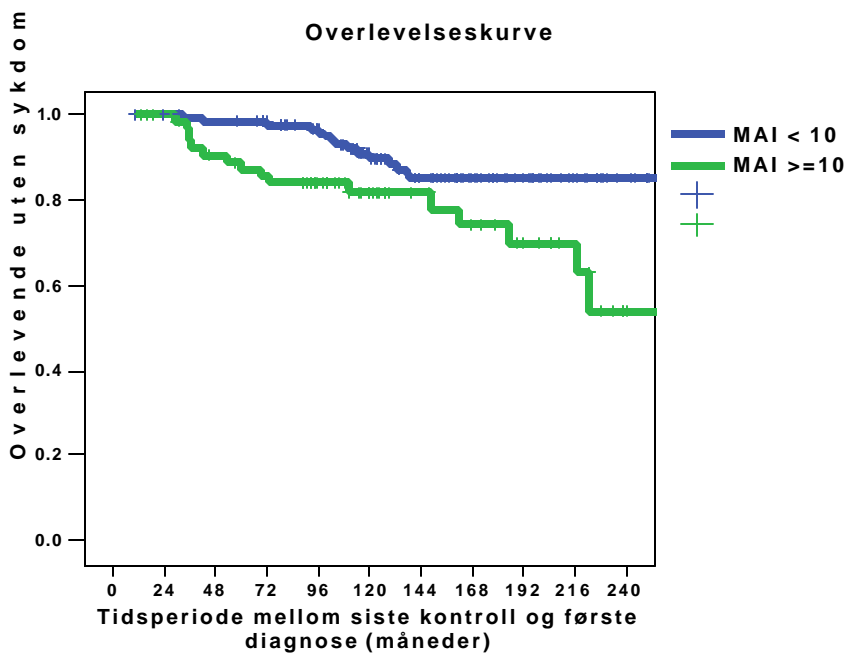
		Cyclin D ₁			Totalt
		< 10% positive celler	10-50 % positive celler	> 50 % positive celler	
p21	negative	46	51	81	178
	positive 1-100 %	7	29	94	130
Totalt		53	80	175	308

Tabell 9 viser at det er korrelasjon med snitt som er negativ for p21 og negativ for cyclinD₁. Tabellen viser også at gruppen med snitt som har overekspressjon av cyclinD₁ er jevnt fordelt mellom gruppene som er positiv eller negativ på p21.

Tabell 10. Krysstabell mellom snitt med immunhistokjemiske snitt antistoff mot Ki67 og cyclin D₁. Pearson kji kvadrat p -verdi = 0.000.

		Cyclin D ₁			Totalt
		< 10% positive celler	10-50 % positive celler	> 50 % positive celler	
Ki67	< 10% cells positive	21	50	105	176
	10-50 % cells positive	17	23	66	106
	> 50 % cells positive	11	7	3	21
Totalt		49	80	174	303

Tabell 10 viser krysstabell mellom immunhistokjemi på antistoff mot Ki67 og cyclinD₁. Det er sterk signifikans for omvendt korrelasjon mellom Ki67 og cyclinD₁. En stor del av snittene som har negativ scoring på Ki67 har positive scoring på cyclinD₁.



Figur 22. Kaplan-Maier overlevelseskurve for pasienter i gruppene MAI < 10 og MAI >= 10.

Figur 22 viser overlevelseskurve for pasienter fra Stavanger database med lymfeknutenegative, infiltrerende brystcarcinom. Median oppfølging er 116 (6 - 318) måneder. Etter 250 måneders oppfølging er det 88 % i gruppen MAI < 10 og 76 % i gruppen MAI >= 10 som ikke har fått tilbakefall.

6. Diskusjon

Vårt hovedmål med disse studiene var å påvise LOH på 1p31 i tumorvev fra lymfeknutenegative brystkreft pasienter og korrelere det med MAI som var målt i det samme vevet. For å gjøre en LOH analyse måtte vi isolere DNA med god nok kvalitet til at det lot seg amplifisere.

For å isolere DNA fra parafininstøpt vev ble 3 forskjellige metoder testet. Metode 1 og 2 egnet seg dårlig til isolering av denne type vev. Amplifisering med primere for et fragment på 286 bp viste ingen bånd på agarosegel etter elektroforese av PCR produktet. DNA isolert med metode 3 viste tydelige bånd på agarosegel etter amplifisering. Vi valgte å bruke denne metoden til isolering av DNA. Forsøk har vist at med denne metoden økes andelen DNA som lar seg amplifisere og gjør det mulig å amplifisere lengre amplikoner [44]. Metoden er i tillegg tidsbesparende, fordi den ikke trenger varmebehandling over natten.

Microsatellite markørene som er valgt for LOH analysen er lokalisert til 1p31. Dette er det aktuelle området hvor det med CGH teknikk er funnet en delesjon av DNA i tumorvev fra invasive ductale brystcarcinom [22]. I microsatellite analysen var det i enkelte tilfeller vanskelig å identifisere den reelle allele toppen. Kurvemønsteret var veldig uregelmessig og gjorde det vanskelig å skille stuttere fra den reelle kurven. Det antas at dette skyldes vanskeligheter med amplifisering av DNA fra formalinfiksert parafininstøpt vev på grunn av rester av proteiner i DNAet. Microsatellite analysen av DNA fra tumorvev viste noen ganger

en forskyvning av kurven på opptil 50 bp, i forhold til kurven fra normalt DNA. Dette viser at mange genomiske rearrangement i tumorvev gjør at det ikke alltid er like lett å tolke resultatene fra slike analyser. Microsatellite instability (MSI) er en følge av at polymerasens korrektur lesing har sviktet under DNA syntesen. Resultatet kan være at DNA fra tumorceller, som stammer fra samme vev, har forskjellig lengde på microsatellitene. Kurveforskyvningen som vi har observert kan være et resultat av DNA replikasjonsfeil. For å bekrefte eller avkrefte dette må fragmentet DNA sekvenseres.

Det er påvist LOH på 1p31 i to tidligere studier på ovarie og brystcarcinomer [23,24].

Konklusjonen på disse er at *ARHI* er i sentrum av en delesjon på dette allelet. I disse studiene er det brukt ovarie cancer celle linjer i tillegg til primære ovarie cancere og primære brystcancere.

I LOH studien til Peng *et al* [24] antas det at det er brukt frosset materiale i tillegg til DNA fra cellelinjer. Studien skiller ikke mellom DCIS og invasive brystcarcinom. Sammenligninger viser at i vårt materiale er det like stor prosent informative kasus, men prosent LOH er høyere for alle primere. I vår studie er det brukt DNA fra tumorceller som er skåret ut med LMD og det gir lite kontaminasjon av normale celler. Det er brukt et selektivt materiale fra lymfeknute negative ”infiltrerende ductale brystcarcinom”. Denne type cancere har høy grad av celleproliferasjon og invasivitet.

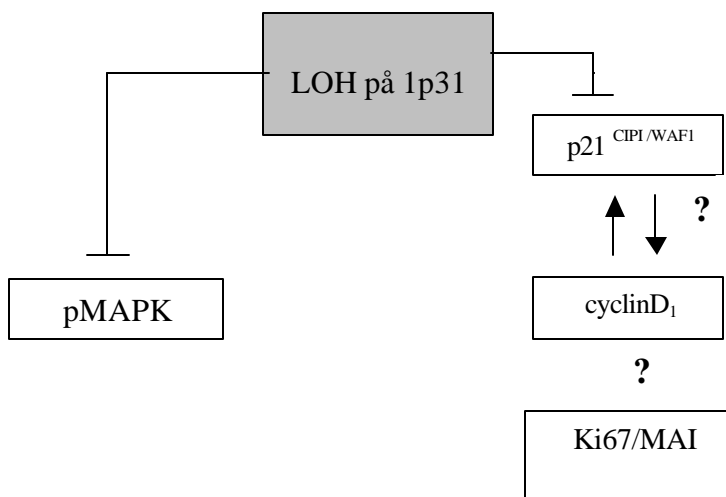
Østrogen reseptor er en vel etablert prediktiv faktor for lang overlevelse uten sykdomstilbakefall og økt sannsynlighet for å ha utbytte av endokrin terapi. Steroid reseptor analyser er standard prosedyre for brystkreftpasienter og bestemmelse av østrogen og progesteron reseptor innhold i tumorvev, brukes i norske retningslinjer for adjuvant behandling (vedlegg 7). Tabell 5 viser at 20 % av tumorene i vårt materiale er negative for østrogenreseptor mens 79 % er positive. For progesteron er fordelingen 56 % positive og 43 %

negative. En stor studie på brystcancere [58] viser den samme fordelingen når det gjelder disse markørene. Dette viser at vårt materiale er representativt.

Kaplan-Maier overlevelseskurve for pasienter fra Stavanger database viser at MAI10 er en god prognostisk faktor for pasientene fra denne databasen (Figur 22). Kurven har samme form som Kaplan-Maier overlevelseskurve for pasientene i studien til Janssen *et al* (Figur 1).

I undersøkelsen finner vi:

- Det er en signifikant korrelasjon mellom LOH på 1p31 og nedsatt p21 ($p=0.007$).
- Vi finner ingen signifikant korrelasjon mellom LOH på 1p31 og cyclin D₁ ($p=0,272$), men i gruppen med LOH på 1p31 er 64 % positive på cyclinD₁.
- Resultatet av våre immunhistokjemiske analyser viser at det er en signifikant korrelasjon mellom positive cyclinD₁ og negative Ki67.
- I gruppen med høy scoring på positivitet for cyclinD₁ er det lik fordeling mellom kasus som er positive for p21 og de som er negative.



Figur 23. Skjematisk tegning som viser noen av virkningene LOH på 1p31 kan ha på celleproliferasjon.

Av Figur 23 ser vi en mulig virkningsmekanisme for p21 på cellesyklus ved å inhibere på kinase aktiviteten til cyclinD₁ komplekset. En mulig feedback mekanisme styrer balansen mellom disse proteinene. Vi har vist at LOH på 1p31 medfører nedsatt p21, men vi har ikke funnet noen korrelasjon med LOH på 1p31 og cyclinD₁. Disse funnene stemmer ikke med den tidligere studien til Yu *et al* [23] hvor det er vist at i cellekultur virket *ARHI* ekspresjon veksthemmende ved induksjon av p21 som igjen medførte nedregulering av cyclinD₁ promotor aktiviteten. Vi fant en korrelasjon med lav p21 og lav cyclinD₁. De pasientene som hadde økt ekspresjon av cyclinD₁ var likt fordelt mellom gruppen som var positiv for p21 og negativ for p21. Våre funn underbygges av to andre studier. I studien til Rosen *et al* [33] fant de at det var en signifikant korrelasjon mellom lav *ARHI* ekspresjon og lav p21 ekspresjon. De fant at 70 % med lav *ARHI* ekspresjon hadde høy cyclinD₁ ekspresjon, men denne omvendte korrelasjonen viste ikke statistisk signifikans. Wang *et al* [57] har funnet at i en gruppe med nedregulert *ARHI* ekspresjon var det en høyere ekspresjon av cyclinD₁.

Med immunhistokjemi er det vist at 82 % av kasusene i pasientgruppen fra vår database har middels til sterk ekspresjon av cyclinD₁ og 58 % har ingen ekspresjon av p21.

In vitro forsøk med Western blot analysering på cellekulturer fra brystcancer cellelinjer viste en oppregulering av p21 når cyclinD₁ ekspresjon var induisert [66]. Dette viser at det er en balanse mellom cyclinD₁ som en positiv regulator av celle syklus og p21 som en negativ regulator. En mulig mekanisme er at balansen mellom disse to proteinene reguleres av en "feed-back" mekanisme hvor overekspresjon av cyclinD₁ fører til induksjon av p21. På denne måten arreteres celleproliferasjonen og cellene får anledning til å differensiere. Dersom ekspresjon av p21 opphører som en følge av LOH vil ikke lenger denne balansen opprettholdes. Celler med økt ekspresjon av cyclinD₁, som følge av amplifikasjon, vil mangle den nødvendige bremsen fra p21.

Vi fant korrelasjon mellom forhøyet cyclinD₁ ekspresjon og lav Ki67 ekspresjon. Ki67 er en kjent markør for prolifererende celler, proteinet er til stede i cellekjernen i alle fasene, også mitosefasen. Celler i hvilefasen, G₀, har ingen ekspresjon av Ki67.

Tidligere undersøkelser viser at 40-50 % av alle invasive brystcancere har overekspresjon av cyclinD₁[59,60]. Halvparten av disse kan skyldes amplifikasjon av cyclinD₁ genet og den andre halvparten kan skyldes stimulering fra aktivert østrogen. I vårt materiale er det en stor prosent som er østrogen reseptor positive. Denne type brystcancere er assosiert med høy differensiering og lav proliferasjon.

Nedsatt ARHI ekspresjon er forbundet med progresjon av brystcancere [32,57]. Denne nedreguleringen av ARHI kan være en følge av LOH på 1p31 eller en epigenetisk regulering av gen ekspresjonen [27,28]. Figur 23 viser en mulig mekanisme for at LOH på 1p31 kan føre til økt celleproliferasjon. Flere studier har vist at overekspresjon av cyclinD₁ fører til hemming av cellevekst og mye tyder på at dette skjer ved induksjon av p21 generert av cyclinD₁ [30,31]. Vi har påvist at LOH på 1p31 har ført til nedsatt p21. Manglende forekomst av p21 på grunn av LOH på 1p31 kan føre til at virkningen av overekspresjon av cyclinD₁, som følge av amplifikasjon, ikke blir nøytralisert. Dette kan medføre økt proliferasjon.

Det ble ikke funnet en korrelasjon mellom pMAPK og LOH. Det er vist at ekspresjon av *ARHI* påvirker Ras/Raf bindingen og hindrer aktivering av MAPK ved fosforylering [35] (Figur 4). I tillegg til Raf finnes det en rekke andre effektor proteiner som også fører til aktivering av RAS i MAPK kaskaden. Et av dem er P13K i AKT pathway. En manglende korrelasjon med LOH på 1p31 og MAPK kan skyldes at dette og andre effektor protein også påvirker MAPK kaskaden og fører til aktivert MAPK. Det finnes forskjellige antistoff mot pMAPK til bruk i immunhistokjemiske analyser. Vi har brukt det som er mest vanlig men det er mulig at et annet antistoff hadde gitt andre resultater.

Det ble ikke funnet noen korrelasjon mellom MAI10 og LOH på 1p31 i denne studien. I studien til Janssen *et al* (upublisert) ble det funnet en sterk korrelasjon mellom MAI og LOH. I denne studien ble det ikke gjort sammenligninger av DNA fra tumorvev og DNA fra normalt vev. Dette kan være en feilkilde fordi personer som er homozygote vil bli regnet i samme gruppe som personer med LOH. Resultatene våre viser at vi har flest informative kasus for markøren D1S207. Ut fra Genethon genetiske kart (Figur 7) er dette den markøren som ligger lengst vekk fra *ARHI*. For å bekrefte om en person har LOH er det ønskelig med informasjon fra minst to markører.

I det videre arbeidet må det gjøres flere microsatellite analyser med flere markører. For å få til amplifisering av DNA fra flere testpersoner, må PCR optimaliseres for de markørene som er brukt i denne oppgaven. Det vil da være nødvendig å isoleres mer DNA, både fra normalt vev og tumor vev.

Det er også ønskelig å gjøre immunhistologiske analyser på TMA snittene med antistoff for *ARHI*. Dette kan gi oss et bilde på hvor mange av våre kasus som er nedregulert for *ARHI* og en bedre pekepinn på om ekspresjon av *ARHI* påvirker MAI.

Referanser

1. Krefregisteret, Institutt for populasjonsbasert kreftforskning, *Kreft I Norge 2003*
2. Goldhirsch, A., W. Wood, and R. Gelber et al, *Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer*. J.Clin Oncol, 2003. 21: p. 3357-65.
3. ECGBSP, *Consistency achieved by 23 European pathologists from 12 countries in diagnosing breast disease and reporting prognostic features of carcinomas*, in *European Commission Group on Breast Screening Pathology*. 1999, Virch Arch 434. p. 3-10.
4. Van Diest, P.J., E. van der Wall, and J.P.A. Baak et al, *Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review*. Clinical pathology, 2004. 57: p. 675-681.
5. Bergers, E., P.J. vanDiest, and J.P.A. Baak et al, *Prognostic implications of different cell cycle analysis models of flow cytometric DNA histograms of 1301 breast cancer patients: Results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project*. Int J Cancer, 1997. 74: p. 260-69.
6. Sigurdsson, H., B. Baldetorp, and A. Borg et al, *Indicators of prognosis in node-negative breast cancer*. N.Engl J Med, 1990. 322: p. 1045-53.
7. Silvestrini, R., M.G. Daidone, and G. DiFronzo et al, *Prognostic implication of labeling index versus estrogen receptors and tumor size in node-negative breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1986. 7: p. 161-69.
8. Meyer, J., E. Friedmann, and M. McCrate et al, *Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labeling*. Cancer Research, 1983. 51: p. 1879-86.
9. Baak, J.P.A. *Manual of Quantitative Pathology in Cancer Diagnosis and Prognosis*. Springer-Verlag: Heidelberg, 1991; p.340-42
10. Lehr HA, Hansen DA, Kussick S et al. *Assessment of proliferative activity in breast cancer: MIB-1 immunohistochemistry versus mitotic figure count*. Hum Pathol. 1999 Nov;30(11):1314-20.
11. Manders, P., P. Bult, and C.G. Sweep et al, *The prognostic value of the mitotic activity index in patients with primary breast cancer who were not treated with adjuvant systemic therapy*. Breast Cancer Res Treat, 2003. 77: p. 77-84.

12. Groenendijk, R.P., P. Bult, and C.M. Noppen et al, *Mitotic activity index in interval breast cancers*. Eur J Oncol, 2003. 29: p. 29-31.
13. Baak, J.P.A., H vanDop, and P.H.J. Kurver et al, *The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer*. Cancer Research, 1985. 56: p. 374-82.
14. vanderLinden, J., J.P.A. Baak, and J. Lindeman et al, *Prospective evaluation of prognostic value of morphometry in patients with primary breast cancer*. J Clin Pathol, 1987. 40: p.302-6.
15. vanDiest, P.J. and J.P.A. Baak et al, *The morphometric multivariate prognostic index (MP) is the strongest prognosticator in pre menopausal lymph node negative and lymph node positive breast cancer patients*. Hum Pathol. 1991 Apr;22(4):326-30.
16. Jannink, I., P.J. vanDiest, and J.P.A. Baak et al, *Comparison of the prognostic value of mitotic activity index (MAI), random MAI (rMAI), M/V index and random M/V-index (rM/V-index) in breast cancer patients*. Hum Pathol, 1995. 26: p. 1086-92.
17. Collan, Y., L. Kumpusalo, and E. Pesonen et al, *Prediction of survival in breast cancer; evaluation of different multivariate models*. Anticancer Res, 1998. 18: p. 647-50.
18. DeJong, J.S., P.J. vanDiest, and J.P.A. Baak et al, *Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer*. Br J Cancer, 2000. 82: p. 368-73.
19. Baak, J.P.A., P.J. van Dienst, and F.J. Voorhorst et al, *Prospective multicenter validation of the independent prognostic value of the mitotic activity index (MAI) in lymph node negative breast cancer patients aged less than 55 years*. Journal of clinical oncology, 2005. 23(25): p. 5993-6001.
20. Bergers, E., I. Jannink, and P.J. vanDiest et al, *Influence of fixation delay on mitotic activity and flow cytometric % S-phase*. Hum Pathol, 1997. 28: p. 95-100.
21. Donhuijsen, K., U. Schmidt, and H. Hirsche et al, *Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delay in fixation*. Hum Pathol, 1990. 21: p. 709-14.
22. Janssen, E.A., J.P. Baak, and M.A. Guervos et al, *In lymph node - negative invasive breast carcinomas, specific chromosomal aberrations are strongly associated with high mitotic activity and predict outcome more accurately than grade, tumor diameter, and oestrogen receptor*. Journal Pathology, 2003. 201: p. 555-561.
23. Yu, Y., F. Xu, and H. Peng et al, *Noey2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas*. National Academy of Sciences, 1999. 96: p. 214-219.

24. Peng, H., F. Xu, and R. Pershad et al, *ARHI is the center of allelic deletion on chromosome 1p31 in ovarian and breast cancers*. Int J Cancer, 2000. 86: p. 690-694.
25. Luo, R.Z., et al., *Genomic structure and promotor characterization of an imprinted tumor suppressor gene ARHI*. Biochim Biophys Acta, 2001. 1519(3): p. 216-22.
26. Yuan, J., R.Z. Luo, and S. Fuji et al, *Aberrant methylation and silencing of ARHI, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers*. Cancer Research, 2003. 63(14): p. 4174-80.
27. Yu, Y., S. Fujii, and J. Yuan et al, *Epigenetic Regulation of ARHI in Breast and Ovarian Cancer Cells*. New York Academy of Sciences, 2003. 983: p. 268-277.
28. Fuji, S., R.Z. Luo, and J. Yuan et al, *Reactivation of the silenced and imprinted alleles of ARHI is associated with increased histone H3 acetylation and decreased histone H3 lysine 9 methylation*. Hum Mol Genet, 2003. 12(15): p. 1791-800.
29. Xu, F., W. Xia, and R.Z. Luo et al, *The Human ARHI Tumor Suppressor Gene Inhibits Lactation and growth in Transgenic Mice*. Cancer Research, 2000. 60: p. 4913-4920.
30. Xiong, Y., G.J. Hannon, and H. Zhang et al, *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. 16(366(6456)): p. 634-5.
31. Mommers, E.C., P.J.van Diest, A.M. Leonhart, et al. *Expression of proliferation and apoptosis-regulated proteins in usual ductal hyperplasia of the breast*. Hum. Pathol., 1998. 29: 1539-1545.
32. Hisathomi, H., K. Nagao, K. Wakita, et al. *ARHI/NOEY2 inactivation may be important in breast tumor pathogenesis*. Oncology, 2002. 62: 136-140.
33. Rosen, D.G., L. Wang, and A.N. Jain et al, *Expression of the tumor suppressor gene ARHI in epithelial ovarian cancer is associated with increased expression of p21 WAF1/CIP1 and prolonged progression-free survival*. Clinical Cancer Research, 2004. 10: p. 6559-6566
34. Lauren Pecorino. *Molecular Biology of cancer, Mechanisms, Targets and Therapeutics*. 2005, Oxford University Press.
35. Kroschewski, R., M. Beck, and S. Heinzer et al. *The Ras-like GTPase Noey2 (ARHI) acts as negative regulator of Raf-1 activity*. in *ELSO 2004*. 2004. Nice, France.
36. Luo, R.Z., et al., *ARHI is a Ras-related small G-protein with a novel N-terminal extension that inhibits growth of ovarian and breast cancers*. 2003.

37. Brunet, A., D. Roux, and P. Lenormand et al, *Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor- induced gene expression and cell cycle entry*. EMBO J, 1999. 18: p. 664-674.
38. Krueger, J.S., V.G. Keshamouni, and N. Atanashkova et al, *Temporal and quantitative regulation of mitogen activated protein kinase (MAPK) modulates cell motility and invasion*. Oncogene, 2001. 20: p. 4209-4218.
39. Seddighzadeh, M., J.N. Zhou, and U. Kronenwett et al, *ERK signaling in metaplastic human MDA-MB231 breast carcinoma cells is adapted to obtain high urokinase expression and rapid cell proliferation*. Clin Exp Metast, 1999. 17: p. 649-654.
40. Bao, J.J., X.F. Le, and R.Y. Wang et al, *Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase - independent calpain-dependent pathway*. Cancer Research, 2002. 62(24): p. 7264-72.
41. Coombs, N.J., A.C. Gough, and J.N. Primrose et al, *Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin -fixed tissue*. Nucleic Acids Research, 1999. 27(16).
42. Bancroft, John D.,Gamble, Marilyn, *Theory and practice of histological techniques*. Fifth edition. 2002, Churchill Livingstone, Harcourt publishers Limited. p.85-92.
43. Rudzki, Z., M. Zazula, and J. Stachura et al, *A technical note on Micosatellite DNA Instability Studied in archival Praffin-Embedded Tissues*. Pol J. Pathology, 2001. 54(4): p. 225-230.
44. Wu L., N. Patten, and C.T. Yamashiro et al, *Extraction and Amplification of DNA From Formalin -Fixed, Paraffin-Embedded Tissues*. Applied immunohistochemistry &Molecular Morphologi, 2002. 10(3): p. 269-273.
45. Hasekorn R, P. Doty et al. *The reaction of formaldehyde with polynukleotides*. J Biol Chem, 1961. 236: p. 2738-45.
46. Jackson V. *Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent*. Cell, 1978. 15: p. 945-54.
47. Orlando V., R. Paro. *Mapping Polycomb- repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin*. Cell, 1993. 75: p. 1187-98.
48. Lehmann, U., O. Bock, and S. Gloeckner et al, *Quantitative Molecular Analysis of Laser-Microdissected Paraffin-Embedded Human Tissues*. Pathobiologi, 2000. 68: p. 202-208.
49. Schutze, K. and G. Lahr et al, *Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells*. Nature Biotechnology, 1998. 16(737-742).

50. Mousses, S., A. Lallioniemi, and P. Kauraniemi et al, *Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays*. *Curr Opin Chem Biol*, 2001. 6: p. 97-101.
51. Kononen, J., L. Bubendorf, and A. Kallionie et al, *Tissue microarrays for high-throughput of tumor specimens*. *Nat MED*, 1998. 7: p. 767-768.
52. von Wasielewski, R., M. Mengel, and B. Wiese et al, *Tissue Array Technology for testing interlaboratory and interobserver Reproducibility of immunohistochemical Estrogen Receptor Analysis in a Large Multicenter Trial*. *Am J Clin Pathol.*, 2002. 118: p. 675-682.
53. Simon, R., M. Mirlacher, and G. Sauter et al, *Tissue microarrays for early target evaluation*. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2004. 1(1).
54. Hendriks, Y., P. Franken, and J.W. Dierssen et al, *Conventional and Tissue Microarray Immunohistochemical Expression Analysis of Mismatch Repair in Hereditary Colorectal Tumors*. *American Journal of Pathologi*, 2002. 162(2).
55. Milanes-Yearsley, M., E.H. Hammond, and T.F. Pajak et al, *A cost and time - effective method for correlative studies by regional and national cancer study group*. *Modern Pathology*, 2002. 15(12): p. 1366 - 1373.
56. Tan, Y., M.H. Hilmy, and H. Hung et al, *Initial experience with Tissue Microarray in a surgical Pathology Laboratory: Technical Considerations*. *The journal of Histotechnology*, 2004. 27(2): p. 113.
57. Wang L., A. Hoque, R.Z. Luo et al. *Loss of the expression of the Tumor Suppressor Gene ARHI Is Associated with Progression of Breast Cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2003. 9: p 3660-3666.
58. Mehrdad Nadji, MD; Carmen Gomez-Fernandez, MD; Parvin Ganjei-Azar, et al *Immunohistochemistry of Estrogen and Progesterone Receptors Reconsidered: Experience With 5,993 Breast Cancer*. 2005, *Am J Clin Pathol* 123(1):21-27.
59. Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, et al. *A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer*. 1996, *Br J Cancer*. Mar;73(6):728-34.
60. de Jong J.S., P.J. van Diest, R.J.A.M. Michalides, J.P.A. Baak et al. *Concerted overexpression of p21 and cyclinD₁ is associated with growth inhibition and differentiation in various carcinomas*. 1999, *Mol. Pathol*. 52: p. 78-83.
61. Mommers E.C., A.M. Leonhart, F. Falix et al. *Similarity in ekspression of cell cycle proteins between in situ and invasive ductal breast leasions of some differentiation grade*. 2001, *J. Pathol*. 194: 327-333.

62. QIAGEN GmbH Qiagen, in www.QIAGEN.com. Strasse 1,4074 Hilden,Germany.
63. Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Ernst-Leitz-Strasse, D-35578 Wetzlar, Germany.
64. Applied Biosystems, , www.appliedbiosystems.com, , USA: Foster City,CA 94404.
65. Applied Biosystems, *Evaluating Genetic Analysis Systems: Microsatellite Analysis*.
2004
66. Applied Biosystems *Loss of Heterozygosity (LOH) analysis, Getting started Guide*.
06.2005
67. Beecher Instruments, I., USA, in www.beecherinstruments.com,
support@beecherinstruments.com, Editor. 820 Hummingbird Court,Sun Prairie, WI 53590:
(608)837-8847.
68. Dako Cytomation, Poduktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Denmark.
www.dakocytomation.com
69. Ensembl Genome Browser, www.ensembl.org
70. Nordic immunohistochemical Quality Control, www.nordiqc.org

Vedleggsliste

Vedleggsliste:

Vedlegg 1: Konvensjonell metode for DNA-isolering av formalinfiksert vev

Vedlegg 2: Standard prosedyre fra Qiagen for isolering av DNA med "QIAamp DNA micro kit".

Vedlegg 3 Modifisert metode for ekstrahering av DNA v.h.a. Qiagen "QIAamp DNA micro kit".

Vedlegg 4: Standard PCR-oppsett

Vedlegg 5: Konstruering av TMA blokker med 6 x7 vevsylindre, diameter 2.0 mm.

Vedlegg 6: Deparafinisering og farging av snitt til microdisseksjon.

Vedlegg 7: Microsatellite analyser.

Vedlegg 8: Norske retningslinjer for adjuvant behandling ved brystkreft

Vedlegg 9: Arbeidsskjema for TMA blokk med 6 X 7 prøver.

Vedlegg 1

Konvensjonell metode for DNA-isolering av formalin-fiksert vev

Deparafinisering av snittene:

1. 2 x tilsetning av 1 ml xylene, vortexmiksing og sentrifugering i 5 min. Supernatanten kastes.
2. 2 x tilsetning av 1 ml etanol, vortexmiksing og 5 min sentrifugering. Supernatanten kastes.
3. 1 dråpe aceton tilsettes og det åpne røret innkuberes i varmeskap i 65 °C i noen få minutter.

Isolering av DNA:

1. Til hvert snitt tilsettes 100 µl Proteinase K fortynnet 3/100 med PK1 Tris EDTA buffer (1mM Tris pH 8.3, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20).
2. Løsningen vortexmikses og innkuberes over natt i 37 °C. Det er en fordel at løsningen bearbeides mekanisk noen ganger og tilsettes mer proteinase K underveis. På denne måten fordøyes proteinene bedre.
3. Løsningen kokes i 7 min., settes deretter på is i 3 min. og sentrifugeres i 30 sek. Supernatanten vil nå inneholde utfelt DNA.

Vedlegg 2

Standard prosedyre fra Qiagen for isolering av genomisk DNA fra vev med ”QIAamp DNA Micro kit”

1. En mikrotom rengjøres godt med cellestoff og knivbladet skiftes mellom hver prøve.
2. Et vevsnett, 5-10mm² og 8-10µm tykt, skjæres på rengjort mikrotom og legges i et varmebestandig mikrosentrifugerø (0,6µl).
3. 180µl ATL buffer tilsettes straks, og romtempereres
4. Tilsett deretter 20µl proteinase K og vortexmiks i 15s
5. Løsningen settes til innkubering i en varmeblokk eller et varmeskap, 56 °C, over natten.
6. Neste dag: Tilsett 200µl AL buffer til løsningen, vortexmiks i 15s. Det er viktig at løsningen blir helt homogenisert.
7. Tilsett deretter 200µl alkohol (96-100%) og bland i 15s på vortexmikser.
8. Innkuber løsningen ved romtemperatur (15-25 °C) i 5 min. Deretter en kort sentrifugering for å fjerne dråper på innsiden av lokket.
9. Overfør lysatet forsiktig til QIAamp MinElute kolonne og sentrifuger i et minutt v/8000 rpm. Plasser kolonnen i et reint 2 ml rør. Røret med gjennomstrømningsvæsken kastes.
10. QIAamp MinElute kolonnen åpnes forsiktig, tilsett 500µl AW1 buffer og sentrifuger v/800 rpm i et minutt. Røret med gjennomstrømningsvæsken kastes, og plasser kolonnen i et reint 2ml rør.
11. Gjenta pkt. 10 med tilsetting av AW2 buffer.

12. Kolonnen sentrifugeres deretter v/10000 rpm i 3 min for å tørke membranen. Plastrør med gjennomstrømningsvæke kastes.
13. Plasser kolonnen i et reint 1,5ml mikrosentrifugerør og tilsett 20-100 µl romtemperert AE buffer eller destillert sterilt vann, midt på membranen.
14. Inkuber i 5 min ved romteperatur (15-25 °C) og sentrifuger deretter v/10000 rpm i et minutt. Gjennomstrømningsvæsken i mikrosentrifugerøret vil nå inneholde utfelt DNA.

Vedlegg 3

Modifisert metode for ekstrahering av DNA v.h.a. Qiagen” QIAamp DNA micro kit”

1. Et vev snitt 5 - 10mm², 8 - 10µm tykkelse legges i et varmebestandig microsentrifugerør, 0,6 µl.
2. Tilsett 180 µl lysebuffer ATL og løsningen varmes opp til 98 °C i 15 min. Avkjøl deretter til værelsestemperatur.
3. Tilsett 20 µl Proteinase K og løsningen vortexmikses i 15 sek og innkuberes i 68 °C i 45 min. Avkjøl til værelsestemperatur.
4. Tilsett 200 µl buffer AL, vortexmiks i 15 sek. og innkuber i 72°C i 10 min. Avkjøl til værelsestemperatur.

Videre prosedyre er lik standard prosedyre fra Qiagen. (Vedlegg 2)

Standard PCR-oppsett

PCR-miks:

1. 5 µl DNA
2. 2µl (10 x Hot master Gold buffer)
3. 0,5µl dNTP (10mM)
4. 1,0 µl (2µM) Primer forward
5. 1,0 µl (2µM) Primer reverse,
6. 0,25µl Hot master Taq (5U/µl)
7. Fortynnes opptil 20 µl med dsH₂O.

PCR program:

Denaturering 96 °C i 5 min.

35 sykluser: 94 °C i 1 min, 55 °C i 2 min, 65 °C i 2 min, hold 70 °C i 10 min.

PCR-produkt fortynnet 10/12 µl med Loading dye.

Elektroforese med 150 v i 25 min. i 0,5 TBE buffer på 1 % agarosegel farget med SYBR ® Gold

Vedlegg 5

Konstruering av TMA blokker med 6 x 7 vevssylindre, diameter 2.0 mm

1. Mottakerblokker, dvs. tomme parafinblokker (2.8 x 2.2) cm, støpes og romtempereres.
Før støping av mottakerblokkene skjæres det små firkanter i plastkassetten som skal feste parafinblokken. På denne måten presses mer parafin gjennom plasten og fester blokken bedre slik at den ikke løsner så lett når det skal skjæres snitt.
2. Plastbrikettene varmes på forhånd i varmekammer i minst 30 min. Deretter legges de i en støpeform som fylles godt opp med flytende parafin. Etter avkjøling løsnes de fra formen, og inspiseres for sprekke-dannelser i parafinen. Disse må eventuelt kasseres.
Mottakerblokkene bør lages dagen før de skal brukes.
3. Parafinsylindere, diameter 2.0 mm, stanses ut av mottakerblokken ved hjelp av rød utstansingsnål
4. Vev sylindere, diameter 2.0mm, stanses ut med blå utstansingsnål, fra giverblokken.
5. Vev sylindere plasseres i mottakerblokken i det tomme hullet etter parafinsylindere.
Posisjonen for den enkelte vev sylinder noteres på et arbeidsskjema (Vedlegg9) med giverblokkens histologinummer og årstall. Her noteres også eventuelle bemerkninger om den utstansede vev sylindere.
6. Utstansing av parafinsylindere fra mottakerblokken bør skje fortløpende med utstansing av vev sylindere. Maskinen har litt drift og dersom alle de tomme hullene er laget på forhånd vil dette medføre problemer når vev sylindere skal plasseres i hullet.

7. Ved hjelp av en dybdestopper (forskjellige størrelser følger med instrumentet) kan en regulere hvor dypt hull en stanser ut fra mottakerblokken. Dette reguleres etter hvor mye vev som er igjen i giverblokken.
8. Vev sylindren plasseres i det tomme hullet i mottakerblokken. Siden vev sylindren har litt større diameter må den presses forsiktig ned. Alle sylindrene må være mest mulig i samme plan som mottakerblokken. De må ikke synke for langt ned eller stikke for langt opp. Dette vil medføre problemer når det skal skjæres snitt fra blokken.
9. En begynner å konstruere blokken fra det nederste høyre hjørne, posisjon A1.
10. Sylindrene plasseres mot venstre på y-aksen (avstand 0.5mm) til posisjon G1. Deretter beveges nålen tilbake til det nederste høyre hjørne og nålen flyttes en posisjon (0.5mm) på x-aksen og sylindrene plasseres fortløpende i posisjon på y-aksen A2-G2, deretter A3 - G3 osv, se arbeidsskjema (Vedlegg9).
11. Til slutt plasseres kontrollene med normalt vev i posisjon H langs X-aksen. 3 sylindere med diameter 1.0 mm plasseres langs x-aksen mellom radene med pasientprøver.
12. Når alle sylindrene er plassert legges den ferdige blokken med baksiden ned i varmeskap (37 °C) i 10 – 15 min.
13. Et objektglass presses forsiktig på overflaten av den varme blokken for å få den jevn og sylindrene mest mulig i samme plan.
14. Blokken legges deretter på varm støpeplate i 5 - 10 sek og avkjøles deretter til romtemperatur.
15. Legges i fryser i minst en halv time før det skjæres snitt.

Vedlegg 6

Deparafinisering og farging av snitt til mikrodisseksjon.

Materialer

Hematoxylin (Shandon instant hematoxylin, Thermo electron corporation)

Eosin (Eosin Y solution, alcoholic with phloxine B, Sigma Diagnostics)

Deparafinisering :

1. Xylene, 20s 3 x
2. 100% etanol, 30s 2 x
3. 95% etanol, 30s 2 x
4. 70% etanol, 30s 2 x

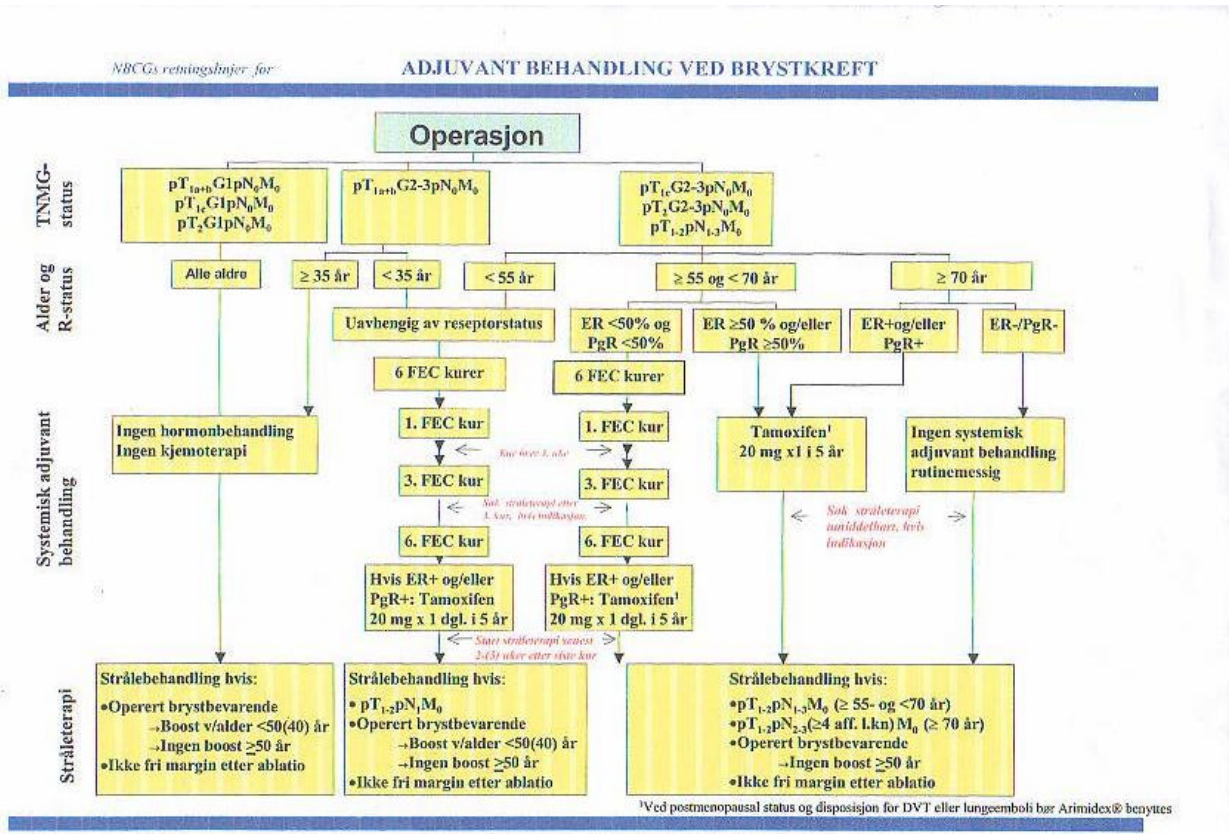
Farging med H & E – hurtigmetode:

5. H₂O 30 sek.
6. Hematoxyllin 1 min
7. H₂O 30 sek
8. Bluing agent (0.1 % NaOH) 30 sek.
9. 70 % etanol – 30 sek
10. 95 % etanol – 30 sek
11. Eosin løsning 30s
12. 70 % etanol 30s
13. 95 % etanol 30s
14. 100 % etanol – 30 sek. Lufttørkes

Microsatellite analyser

1. PCR-produkt etter amplifisering av DNA fra normale vevsprøver fortynnes $\frac{1}{4}$ med HPLC-vann. PCR produkt etter amplifisering av DNA fra tumorprøver brukes ufortynnet.
2. 2,0 μ l av fortynningen tilsettes 23,0 μ l nytint formamid og 0,5 μ l size standard (GS500 Liz, Applied Biosystems).
3. Analyseres på 3130xl Geneanalyser (ABI).

Norske retningslinjer for adjuvant behandling ved brystkreft



Vedlegg 9

Arbeidsskjema for TMA blokk (6 X 7 prøver)

Blokk:		TMA STAV 10/05						
Prosjektnavn:	LOH,Mammaprojekt,Stavanger				Laget av: Irene			
Prosjektansvarlig:	Emiel Janssen				Dato: 31/01.05			
Posisjon	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2								
3								*kontrol
4								*kontrol
5								*kontrol
6								