

Mastergradsoppgave

Catherine Stenstad

Karakterisering av de molekylære markørene *BRAF V600E* og miRNA *let-7a* i KAM-Studien



Høgskolen i Telemark

Institutt for allmennvitenskaplege fag

Masteroppgave i Natur-, helse- og miljøvern tilrettelagt for
bioingeniører, 2011

Karakterisering av de molekylære markørene
BRAF V600E og miRNA *let-7a*
i KAM-Studien



Catherine Stenstad

Høgskolen i Telemark 2011
Fakultet for allmennvitenskapelige fag
Institutt for natur-, helse- og miljøvern
Hallvard Eikas plass
3800 Bø

<http://www.hit.no>

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng.

© Rettigheter etter lov om åndsverk: Catherine Stenstad

Trykket ved Høgskolens kopisenter i Bø

Omslagsillustrasjon: Catherine Stenstad

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved Seksjon for Molekylærpatologi og Laboratorium for Molekylæronekologi ved Oslo Universitetssykehus, Kreftsenteret, Ullevål i perioden juli 2009 - oktober 2011. Masteroppgaven inngår som ein del av mastergraden i natur-, helse- og miljøvern, tilrettelagt for bioingeniører ved Høgskolen i Telemark, avdeling Bø.

En stor takk går til veilederne mine, Elin Kure og Astrid Marie Stangeland som har gjort det mulig å gjennomføre denne masteroppgaven. Tusen takk for all hjelp gjennom hele prosessen.

Takk til Mona Sæbø ved Høgskolen i Telemark for veiledning og god hjelp.

Takk til Hiroko Solvang ved Institutt for Kreftforskning for hjelp med statistiske analyser.

Siden jeg har jobbet i full stilling som bioingeniør ved Sentrallaboratoriet på Radiumhospitalet i tillegg til arbeidet med masteroppgaven, har det til tider vært nokså travle dager. Så takk til ledelsen ved Sentrallaboratoriet som gav meg permisjon deler av første studieår. Og en ekstra takk til Kirsti Vangsnes som har ordnet fri og avspaseringsdager når jeg har hatt behov for det. Ellers må jeg takke alle gode kollegaer ved sentrallaboratoriet for støtte, oppmuntring og tro på at oppgaven skulle bli ferdig.

Takk til Magnhild Fjeldvær for fint samarbeid gjennom hele masterstudiet, og med deler av laboratoriearbeidet i forbindelse med masteroppgaven.

Og takk til Ingunn for mange viktige og nødvendige samtaler om faglige og ikke-faglige masterrelaterte problemer, og om hvor drømmeturene med sekk uten masteroppgave skal gå. Blir det på ski eller uten ski? Ja takk, begge deler!

Og selvfølgelig en spesiell takk til familie og venner som har bidratt på ulike måter, for all støtte i tykt og tynt gjennom hele prosessen som ble litt lengre og mer komplisert enn planlagt.

Bø, November 2011

Catherine Stenstad

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	IV
Abstract	V
Ordliste	VI
Hensikten med oppgaven	VII
1 Innledning	1
1.1 Kreft og kreftutvikling	1
1.1.1 Tumorsupressorgener og proto-onkogener	2
1.1.2 Ytre faktorer som påvirker cellen	3
1.2 Kolorektal cancer	3
1.2.1 Insidens av kolorektal cancer	3
1.2.2 Utvikling av kolorektal cancer fra normalvev til tumorvev	5
1.2.3 Sporadisk og arvelig kolorektal cancer	6
1.3 RAS/RAF/MAPK-signalveien	7
1.4 BRAF	8
1.4.1 BRAF mutasjon versus alder, kjønn og sigaretttrøyk	10
1.5 Micro-Ribonucleic Acid (miRNA)	11
1.5.1 MicroRNA biogenesen	12
1.5.2 miRNA, kreft og genekspressjon	14
1.5.3 miRNA let-7	16
1.6 Taqman teknologi	16
2 Materiale og metoder	18
2.1 Studiepopulasjonen	18
2.2 Snitting av ferskfrosset vev	20
2.3 Hematoxylin/Eosin (HE) farging av vevssnitt	20
2.4 Prosentandel tumorvev	21
2.5 DNA og RNA kvantifisering	21
2.5.1 Kvalitet og kvantitets vurdering av DNA og RNA	21
2.5.2 Bioanalyser	22
2.6 BRAF mutasjonsanalyse	22
2.6.1 DNA isolering	22
2.6.2 BRAF V600E multipleks real-time PCR	22
2.6.3 Internkontroll RNase P	23
2.6.4 Tolking av amplifiseringskurver	23
2.6.5 Statistisk analyse	24
2.7 Ekspresjonsanalyse miRNA let-7a	25
2.7.1 Isolering av RNA	25
2.7.2 Real-time-PCR DPYD IVS14+1G>A	25
2.7.3 DNase behandling	25
2.7.4 Revers transkripsjons PCR	26
2.7.5 Endogen kontroll RNU 48	26
2.7.7 Real-time PCR let-7a	27

2.7.8 Statistisk analyse	27
3 Resultat	28
3.1 BRAF V600E	28
3.1.1 Mutasjonsfrekvens	28
3.1.2 Fordeling av BRAF V600E mutasjon i forhold til kjønn og røykestatus	29
3.2 miRNA let-7a	30
4 Diskusjon	33
4.1 BRAF V600E	33
4.2 miRNA let-7a	37
5 Konklusjon	39
6 Referanser	40
7 Appendiks	45
7.1 Flowskjema arbeid	45
7.2 Prosedyrer	45
7.3 Materialer	54
7.4 Tillegg til resultat	55

Sammendrag

BRAF er et proto-onkogen som koder for BRAF proteinet. Proteinet er viktig i RAS/RAF/MAPK-signalveien, og regulerer cellevekst, celledeling og apoptose. *BRAF V600E* er en kjent somatisk mutasjon i kolorektal cancer. I denne studien ble frekvensen av *BRAF V600E* mutasjon i tumorvev fra pasienter i Kolorektal Arv og Miljø (KAM)-studien undersøkt. Det ble også sett på om det var en sammenheng mellom mutasjonsfrekvensen og faktorene alder, kjønn og røykestatus.

miRNA er små enkeltrådede ikke-kodende RNA-molekyler som er viktige i genregulering. Forandringer i genekspresjonen til miRNA har blitt observert i mange ulike krefttyper inkludert kolorektal cancer. Det ble utført genekspresjonssanalyse av miRNA *let-7a* for å undersøke om det var forskjell i genekspresjonen mellom normal- og tumorvev fra kolorektal cancer pasienter.

Studiepopulasjonen består av 139 pasienter fra KAM-studien. Vevsprøver fra normal- og tumorvev ble snittet på frysemikrotom før isolering av DNA og RNA. Real-time PCR ble brukt for å detektere *BRAF V600E* mutasjon. miRNA *let-7a* ble detektert ved revers transkriptase PCR og real-time PCR. Statistiske analyse av data fra begge undersøkelsene ble utført tilslutt.

Resultatene fra studien viser en høyere frekvens av mutert *BRAF V600E* sammenlignet med andre studier. Sannsynligheten er høyere for å ha mutasjonen om man er kvinne. Forholdet mellom alder, røykestatus og mutert *BRAF V600E* viser ingen signifikant forskjell. Genekspresjonsanalysen av miRNA *let-7a* viser ingen signifikant forskjell mellom normal- og tumorvev.

Abstract

BRAF is a proto-oncogene encoding the BRAF protein. This protein is an important protein in the RAS/RAF/MAPK-signaling pathway and regulates cell growth, cell division and apoptosis. *BRAF V600E* is a known somatic mutation in colorectal cancer. The frequency of *BRAF V600E* mutation was examined in tumor tissue from patients in the Kolorektal Arv og Miljø (KAM)-study. The correlation between the frequency of *BRAF V600E* mutation and the factors; age, gender and cigarette smoking was also investigated.

miRNAs are small single-stranded non-coding RNA molecules that are important in gene regulation. Changes in the expression profile of miRNA have been observed in many different tumor types, including colorectal cancer. It was performed a gene expression analysis of miRNA *let-7a* to investigate whether there are differences in gene expression levels between normal- and tumor tissues from colorectal cancer patients.

The study population consists of 139 patients from the KAM-study. Samples from normal- and tumor tissues were cut on a microtome followed by isolation of DNA and RNA. Real-time PCR analysis was used to detect the *BRAF V600E* mutation. miRNA *let-7a* was detected by reverse transcriptase PCR and real-time PCR. Statistical analysis of the data was conducted.

The study shows a higher frequency of mutated *BRAF V600E* compared with other studies. The probability of getting the mutation is higher for females. The relationship between age, smoking status and mutated *BRAF V600E* shows no significant correlation in this study. The gene expression level of miRNA *let-7a* shows no significant correlation between normal- and tumor tissues.

Ordliste

AA	Aromatiske aminer
ACF	Unormale kryptofokuser
Adenokarsinom	Svulst som utgår fra kjertelceller
Angiogenese	Nydannelse av blodårer
CIMP	Epigenetiske metylering av CpG island metylator phenotype
CIN	Kromosomal instabilitet
DGCR8	DiGeorge syndrom critical region 8 protein (Pasha)
EGF	Epidermal vekst faktor
EGFR	Epidermal vekstfaktor reseptor
HNPCC	<u>H</u> ereditary <u>n</u> onpolyposis <u>c</u> olorectal <u>c</u> ancer/arvelig ikke-polypøs kolorektal cancer
hsa-miRNA	Homo sapiens - miRNA
KAM studien	<u>K</u> olorektal <u>A</u> rv og <u>M</u> iljø studien
Karsinoid	Svulst utviklet fra nevroendokrine celler
KRAS	Proteinet V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog/KRAS, viktig i RAS/RAF/MAPK signalveien. Kodet for av <i>KRAS</i> genet.
Lymfom	Svulst utviklet fra celler i lymfesystemet
MiRNA	Micro-Ribonucleic Acid
<i>MLH1</i>	MutL homolog 1 gen
MMR	<u>M</u> ismatch <u>r</u> epair
MSI	Mikrosatelittinstabilitet
Mucosa	Slimhinne, dekker kroppens indre flater.
ORF	Open reading frame
UUS	Ullevål Universitetssykehus
PAH	Polysykliske aromatiske hydrokarboner
pri-miRNA	<u>P</u> rimary-microRNA (primær-microRNA)
pre-miRNA	<u>P</u> recursor-microRNA (forløper-microRNA)
RISC	RNA induced silencing complex
Sarkom	Svulst utviklet fra bindevev, musklatur, ben- og bruskvev
Spinocellulære karsinom	Svulst utviklet fra plateepitel celler i hud/slimhinner
STHF	Sykehuset Telemark Helseforetak
Transversjon	Basepar substitusjonsmutasjon som resulterer i purin (adenin eller guanine) erstattes med pyrimidin (thyminen eller cytosine) eller omvendt.

Hensikten med oppgaven

KAM-studien er en populasjonsbasert kohortstudie.

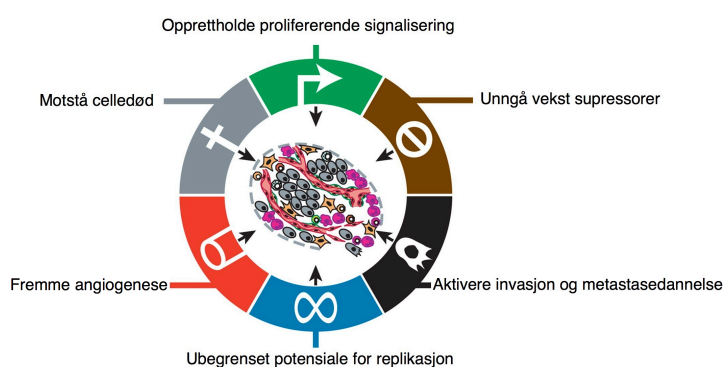
Masteroppgaven har to hovedhensikter:

1. Undersøke frekvensen av *BRAF V600E* mutasjoner i tumorvev fra kolorektal cancer pasienter som inngår i KAM-biobank materialet, og undersøke om det er en sammenheng mellom frekvensen av mutasjonen *BRAF V600E* og faktorer som alder, kjønn og røyking.
2. Undersøke om det er forskjell i genekspresjonen av miRNA *let-7a* mellom normal- og tumorvev fra kolorektal cancer pasienter som inngår KAM-biobank materialet.

1 Innledning

1.1 Kreft og kreftutvikling

Kreft (cancer) er en sykdom som karakteriseres ved ukontrollert celledeling, der et økende antall unormale celler med unormalt utseende og oppførsel danner en tumor. En benign (godartet) tumor karakteriseres ved at den ikke sprer seg til omliggende vev eller danner metastaser. En malign (ondartet) tumor vokser derimot raskt, uregelmessig og inn i nærliggende vev der tumorcellene spres med lymfesystemet til andre steder i kroppen og kan danne metastaser (Pierce 2003). Utviklingen fra en normal celle til en kreftcelle er en trinnvis prosess, og fellesnevneren er genetiske endringer som fører til endring i reguleringsmekanismene for cellevekst og celledeling. For å få en forståelse for bakgrunnen til neoplastiske sykdommer, er det foreslått ulike kjennetegn ved kreft som omfatter seks biologiske egenskaper som er ervervet i løpet av tumorutviklingen (Hanahan and Weinberg 2000): Opprettholdelse av prolifererende signalisering i cellen, unngå apoptose, motstå vekst-supressorer, fremme angiogenese, aktivere invasjon og metastasedannelse og ha et ubegrenset potensiale for replikasjon (figur 1.1).



Figur 1.1: Seks ulike kjennetegn som er karakteristisk i en kreftcelle. Modifisert figur fra (Hanahan and Weinberg 2000).

Kreftcellens karakteristiske egenskaper varierer med krefttypen. Den mest fundamentale egenskapen til en kreftcelle er evnen til å opprettholde konstant cellevekst. Under normale forhold vil cellen ha strenge reguleringsmekanismer som kontrollerer cellens vekst- og delingssyklus, dette for å sikre en normal homeostase og funksjon. Kreftcellen vil ha en endret regulering av signalveier i cellen, ett eksempel på dette er endringer i RAS/RAF/MAPK-signalveien som er påvist i blant

annet kolorektal cancer. For å unngå apoptose, ser man ofte at en kreftcelle har defekter i tumorsupressorgener som styrer apoptose. Det er også funnet genetiske endringer som øker angiogenesen, motstår vekst-supressorer og aktiverer invasjon og metastasedannelse. Fremskritt det siste tiåret har ført til to nye kjennetegn. Det ene er justering av energimetabolismen i cellen, som sørger for tilstrekkelig energi til cellens vekst- og delingsprosess. Den andre er cellens evne til å unngå immunsystemets naturlige overvåkingssystem ved å deaktivere signaler som immunsystemet sender ut for å eliminere kreftcellen (Hanahan and Weinberg 2011).

1.1.1 Tumorsupressorgener og proto-onkogener

Mutasjoner i tumorsupressorgener og proto-onkogener er en kjent årsak til kreft. Tumorsupressorgenene er viktige i reguleringen av cellevekst, og koder blant annet for proteiner som motvirker ukontrollert celledeling. Normalt virker tumorsupressorgenene som bremsere i reguleringen av cellevekst, og en mutasjon som inaktiverer og/eller endrer disse genenes normale uttrykk vil kunne føre til unormal celledeling og utvikling av kreft. Tumorsupressorgenet *TP53* som koder for proteinet p53, er et viktig genregulerende protein med sentrale roller i kontroll og regulering av cellyklus, og et av det mest vanlige muterte gener i kreftceller. Dette genet kalles ofte for «guardian of the genome». Mutasjonsfrekvensen for *TP53* hos pasienter med kolorektal cancer ligger på rundt 50-75 %. Et annet tumorsupressorgen som vi finner mutert i ca. 80 % av sporadiske tilfeller av kolorektal cancer er adenomatous polyposis coli (*APC*) genet. Dette genet påvirker Wnt signalveien, og regulerer celledeling (Faber, Kirchner et al. 2009; Sæbø and Furu Skjelbred 2009; Calvert and Frucht 2010).

Mens tumorsupressorgener normalt har en virkning i regulering av cellevekst, koder proto-onkogener for proteiner som stimulerer signaloverføring i cellen og innvirker på celledeling og vekst. En mutasjon i et proto-onkogen vil gi et kreftfremkallende onkogen som fører til økt eller overuttrykt genaktivitet. Slike mutasjoner blir ofte referert til som «gain of function mutations» og fører til økt celledeling og ukontrollert cellevekst. *RAS* er et proto-onkogen som koder for RAS protein, det finnes ulike ras proteiner (*HRAS*, *KRAS* og *NRAS*). *RAS* mutasjoner er funnet i opptil 50 % av sporadisk kolorektal cancer, der mutasjoner i *KRAS* viser seg å være den mest hyppige (Calvert and Frucht 2002). *RAS*-proteinene er sentrale i intracellulære signalveier som formidler signaler fra membranreseptorer til kjernen. Signalveien kan stimulere cellen til deling, og en

mutasjon i *RAS* genet kan gi overaktivt RAS protein med ukontrollert celledeling som resultat. *BRAF* genet er også et proto-onkogen som koder for BRAF proteinet, som er en viktig del av RAS/RAF/MAPK-signalveien (Calvert and Frucht 2002; Chial 2008). miRNA er små enkeltrådede RNA-molekyler som er med på å regulerer genuttrykket i cellen, disse kan være både tumorsuppressorgener og proto-onkogener (Goel and Boland 2010).

1.1.2 Ytre faktorer som påvirker cellen

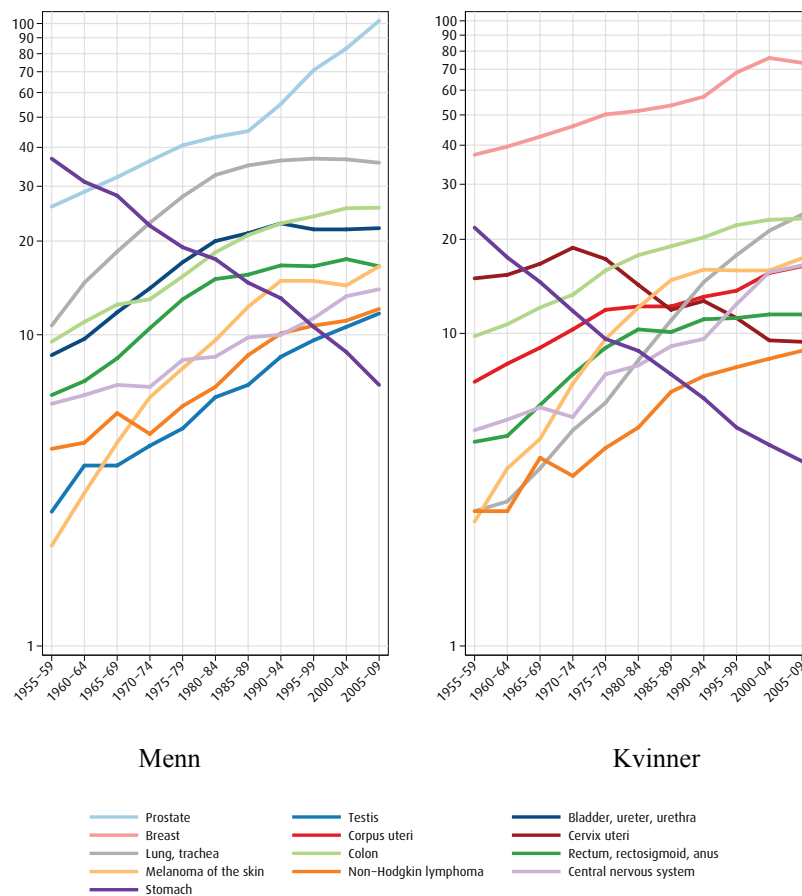
Studier viser at mer enn 85 % av kolorektal cancer-tilfellene har sammenheng med ytre miljøfaktorer. Det finnes en rekke karsinogener som kan være en medvirkende årsak til kreft. Karsinogenene deles henholdsvis i tre grupper; kjemiske, fysiske og biologiske. Ulike typer stråling som UV- og røntgenstråling er fysiske karsinogener. Blant de biologiske karsinogenene finner vi virus. Sigarettøyk har lenge vært kjent som et kjemisk karsinogen, og inneholder en mengde karsinogene stoffer. Disse stoffene kan danne DNA-addukter, som kan føre til irreversibel genetisk skade og varige mutasjoner. Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) og aromatiske aminer (AA) er noen av stoffene i sigarettøyk som danner DNA-addukter (Sæbø, Skjelbred et al. 2006).

1.2 Kolorektal cancer

1.2.1 Insidens av kolorektal cancer

Kolorektal cancer er den hyppigste kreftformen i Norge etter prostatakreft og brystkreft. Det er også den tredje mest vanlige kreftformen i verden, uavhengig av kjønn. Av de 2405 nye tilfellene av kolorektal cancer i Norge i 2009 er 1086 menn og 1319 kvinner. Disse tallene samsvarer med tall på verdensbasis der kvinner også har jevnt over litt høyere insidenstall enn menn. Det er ulikheter mellom insidensen av forskjellige krefttyper i utviklingsland og industriland, tendensen er at industrilandene har en større hyppighet av kolorektal cancer. Kolorektal cancer inkluderer svulster i både tykktarm og rektum, der 98 % av svulstene er adenokarsinomer, de øvrige er spinocellulære karsinomer, karsinoider, lymfomer og sarkomer.

Ser man på tall fra Kreftregisteret over insidensen av kolorektalcancer i 5-årsperioder fra registreringen startet i 1954 er det en tydelig økning (figur 1.2). I perioden 1955-59 er det rapportert 221 tilfeller av kolorektal cancer for menn og 267 for kvinner, disse tallene har økt jevnlig, til henholdsvis 1098 tilfeller for menn og 1265 for kvinner i perioden 2005-2009. Samtidig som insidensen har steget har også overlevelsesraten steget fra 35,6 % i 1970-75 til 58,1 % i 2005-2009 for menn, og 38,7 % i 1970-75 til 62,6 % i 2005-2009 for kvinner. Forekomsten av kolorektal cancer er mest framtrede for personer over 50 år. Land som er i ferd med å gå over til vestlig diett ofte bestående av mat med høyt kaloriinnhold, animalsk fett og proteiner sammen med lite fiber har økende insidens av kolorektalcancer. Høyt inntak av rødt kjøtt, lavt inntak av frukt og grønnsaker, samt lite fysisk aktivitet og overvekt er assosiert med økt risiko for kolorektal cancer. Alkohol og sigarettøyk er også forbundet med en økt risiko for kolorektal cancer (Kreftregisteret 2009; Sæbø and Furu Skjelbred 2009; <http://globocan.iarc.fr> 2010).



Figur 1.2: Tidstrenden for alder-standarisert insidens rate (verden) i Norge for utvalgte kreft typer (semi-logaritmisk skala). Figur fra Cancer in Norway 2009 (Kreftregisteret 2009).

1.2.2 Utvikling av kolorektal cancer fra normalvev til tumorvev

Utviklingen av kolorektal cancer er en flertrinnsprosess der fellesnevneren er at sykdommen er genetisk betinget og har gjennomgått genetiske endringer. Genetiske endringer kan oppstå i alle deler av genomet, og bestå i alt fra kromosomale endringer til basepar endringer, og kan føre til genetisk instabilitet. Genetisk instabilitet er en tidlig drivkraft i kreftutviklingen og interaksjoner mellom flere faktorer er avgjørende for vekst, invasjon og spredning. Adenom-karsinom-sekvensen har de siste tiårene vært en modell for trinnvis utvikling av kolorektal cancer, men nyere kunnskap har vist at det finnes flere veier og forstadier til kolorektal kreft (Fearon and Vogelstein 1990; Søreide 2007).

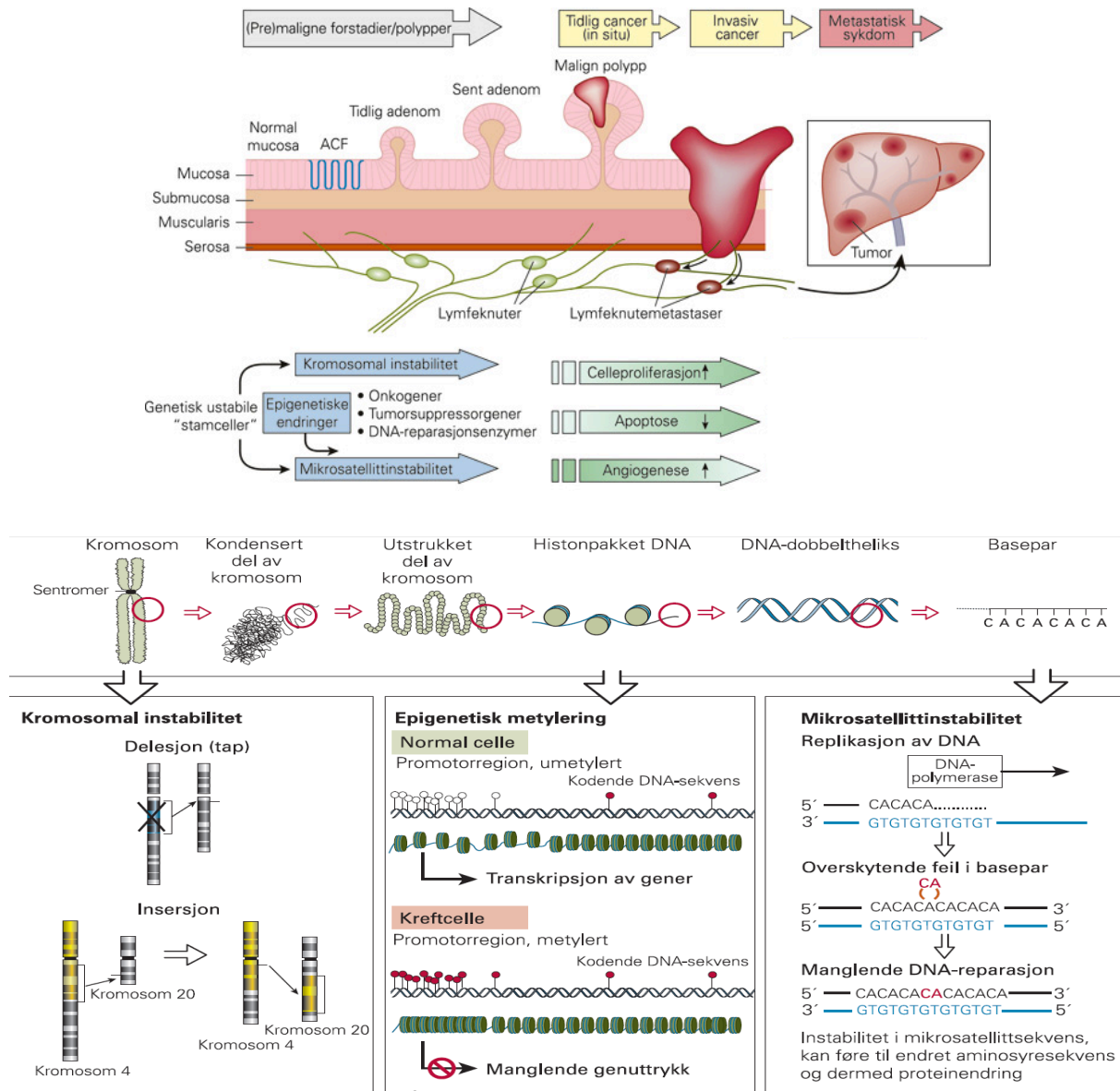
Tidlige (pre) maligne endringer antas å oppstå i tykktarmslimhinnens fordypninger, også kalt krypter. Tykktarmens slimhinne regenereres hyppig og den høye proliferasjonsraten gir økt risiko for mutasjoner ettersom celledelinger kan føre til endringer i DNA. Eksponering fra blant annet metabolitter, toksiske stoffer og bakterieflora i tarmen påvirker epitelcellene i tykktarmen.

I unormale kryptfokuser (ACF) finnes morfologiske og genetiske endringer som man finner igjen i adenomer og tumorer. Utviklingen foregår via flere pre-maligne forstadier som adenomer, til maligne polypper som utvikler seg til invasiv og ofte til kolorektal cancer med metastaser. Tre hovedveier synes å drive utviklingen; Kromosomal instabilitet (CIN), mikrosatelittinstabilitet (MSI) og epigenetiske metylering av CpG island metylator phenotype (CIMP) (figur 1.3).

CIN kjennetegnes ved endret kromosomantall utover de 46 kromosomene i hver enkelt somatisk celle, og er ofte representert ved delesjoner og/eller insersjoner. En mutasjon i *APC* gen som er knyttet til arvelig kolorektal cancer er assosiert med CIN, og opptrer tidlig i kreftutviklingen.

MSI oppstår ofte når feil antall baser bygges inn i DNA, og dette ikke blir reparert. Mikrosatelitter er repeterende sekvenser, og på grunn av DNA-polymerasens problemer med å replikere slike sekvenser, er de spesielt utsatt for feil under replikasjonen. Mutasjoner i mismatch repair enzymes (MMR) er årsaken til arvelig ikke-polypøs kolorektal cancer (HNPCC).

Epigenetisk metylering er assosiert med endring i tilgjengeligheten gjennom strukturelle forandringer som hypo eller hyper-metylering av områder på DNA. CpG-øyer er områder i genomet med høy forekomst av cystein (C) og guanin (G) som ofte ligger nær geneses promotorregioner. Metylering av CpG-øyer hindrer dermed genets uttrykk av proteiner. I flere tilfeller av sporadisk kolorektal cancer er det vist uvanlig høy forekomst av CIMP. Det er også sett en sammenheng mellom CIMP og forekomst av *BRAF* mutasjoner (Søreide 2007).



Figur 1.3: Utvikling av kolorektal cancer fra normalmucosa til invasiv tumor. Kromosomal instabilitet, epigenetisk metylering og mikrosatellitt instabilitet kan føre til økt celleproliferasjon og angiogenese samt hindre cellens naturlige apoptose. Modifisert figur fra (Søreide 2007).

1.2.3 Sporadisk og arvelig kolorektal cancer

Av kolorektal cancer tilfellene utgjør sporadisk ca. 70 % og arvelig betinget ca. 30 % (Souglakos 2007). Sporadiske mutasjoner skyldes somatiske mutasjoner, det vil si mutasjoner i kroppsceller og ikke i kjønnsceller. Somatiske mutasjoner vil bare ha betydning for det enkelte individ og ikke være genetisk arvelig. Forekomsten av somatiske mutasjoner i kolorektal cancer er hyppigere for personer

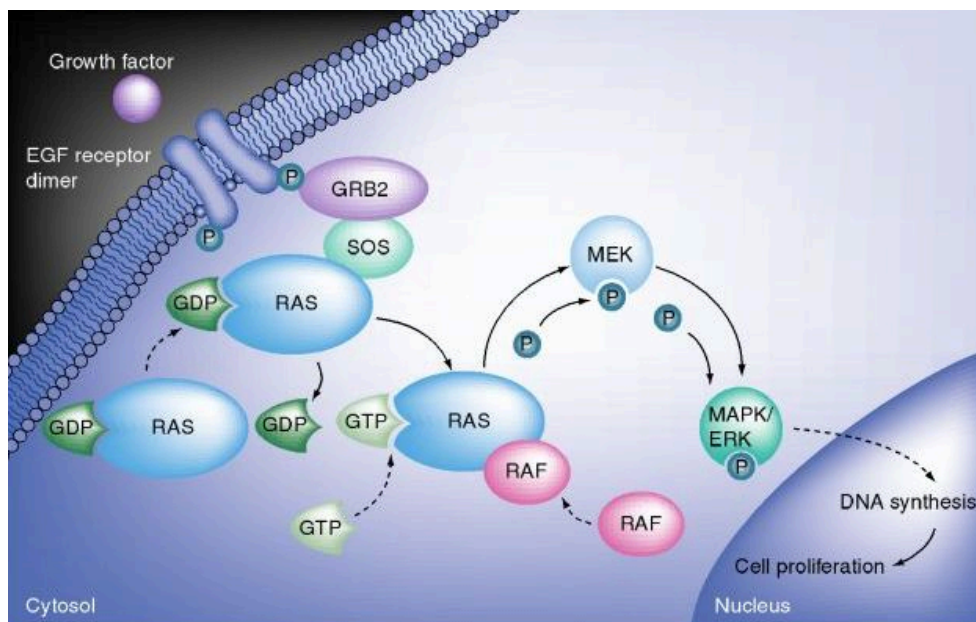
over 50 år, enn for yngre aldersgrupper. *BRAF V600E* mutasjon har vist seg å være en markør som kun er funnet i tumorvev, noe som tyder på at det er en sporadisk hendelse under tumorutviklingen (Souglakos 2007). *BRAF V600E* mutasjon kan sammen med MLH1-metyleringsstatus kan være med på å ekskludere HPNCC i utredning av arvelig kontra sporadisk kolorektal cancer (Solberg Lavik and Sjursen 2009).

Den vanligste formen for arvelig tarmkreft er Lynch syndrom også kalt hereditær ikke-polypøs kolorektal cancer (HNPCC), som er forårsaket av feil i et av fire DNA mismatch reparasjonsenzymmer (MLH1, MSH2, MSH6 eller PMS2). Familiær polypose er en av de andre kjente formene for arvelig kolorektal cancer, der den hyppigste årsaken er feil i enten *APC* genet (Familiær adenomatøs polypose; FAP) eller *MUTYH* genet (MUTYH-polypose), (Souglakos 2007; Solberg Lavik and Sjursen 2009).

1.3 RAS/RAF/MAPK-signalveien

RAS/RAF/MAPK-signalveien er en av cellens mange signalveier, og har som funksjon å overføre signaler fra ekstracellulært miljø til cellens kjerne. I kjernen blir spesifikke gener aktivert, blant annet gener som er med på å regulere cellevekst, celledeling, angiogenese og apoptose. RAS-familien består av HRAS, NRAS og KRAS. RAS proteinet er medlem av en stor familie av små, guanosindifosfat GDP/guanosintrifosfat GTP-bindende proteiner. RAS proteinet er aktivt når GTP er bundet, og inaktivt når GDP ikke er bundet. Ved aktivering fosforyleres GDP til GTP, ved at en fosfatgruppe hektes på GDP og danner GTP. Inaktivering skjer ved defosforylering av en fosfatgruppe i GTP, slik at det dannes GDP. Proteiner som har bundet GDP/GTP, kalles G-protein.

I en normal celle blir aktiviteten til BRAF regulert av vekstfaktorer, cytokiner og hormoner som binder seg til spesifikke reseptorer på celleoverflaten. Signalkaskaden starter ved at en ligand, for eksempel epidermal vekst faktor (EGF) binder seg til epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR) i cellemembranen. Dette medfører fosforylering av den intracellulære delen av reseptoren, som aktiverer «guanine exchange factors» (GEF) som SOS. GEF binder seg til reseptoren ved hjelp av adaptor proteinet GRB-2. Når GRB-2 komplekset binder seg til EGFR blir SOS aktivert, og fosforylerer og aktiverer KRAS og BRAF. Mitogen-aktivert protein kinase (MAPK) ligger nedstrøms for RAS i signalveien. Aktivering av MAPK skjer gjennom spesifikk fosforylering av både en threonin residue og en tyrosin residue, som er separert av en enkel aminosyre. MAPK regulerer videre aktiviteten til transkripsjonsfaktorer som resulterer i genekspressjonsforandringer (figur 1.4), (Lodish 2003; Dibb, Dilworth et al. 2004).



Figur 1.4: RAS-RAF-MAPK signalveien. Signalkaskaden kan aktiveres av EGFR binding til EGFR reseptor, videre aktiveres RAS, RAF og MAPK ved forflysning som igjen stimulerer cellens transkripsjon. Figur fra (Y Kim, Xu et al. 2011)

1.4 BRAF

BRAF er et proto-onkogen, som koder for serin/threonin-proteinkinase BRAF. RAF familien består av ARAF, BRAF og CRAF, som er tre isoformer. BRAF proteinet er en kinase som er en del av RAS-RAF-MAPK-signalveien og er hovedaktivatoren for MAPK. BRAF har en avgjørende rolle for cellens signaloverføring fra cellemembranen til kjernen og er viktig for cellevekst, celledeling, cellebevegelse og apoptose. *BRAF* har cytogenetisk lokalisasjon 7q34, det vil si kromosom 7, lang arm (q), område 32, og genet består av 18 ekson. Den mest vanlige mutasjonen er lokalisert i ekson 15 på nukleotid posisjon 1799, har navnet g.1799T>A (p.V600E), og er funnet i opp til 90 % av alle *BRAF* mutasjoner i kolorektal cancer (Vandrovcova, Lagerstedt-Robinson et al. 2006). *V600E* er en transversjon av thymin til adenin i codon 600, og fører til substitusjon av aminosyren glutamat for valin, dette proteinet har ti ganger så stor kinaseaktivitet som ved normal aktivitet. En mutasjon i *BRAF V600E* fører til at BRAF proteinet er konstant aktivt, og det vil derfor sende signaler nedstrøms gjennom hele signalveien uten tilstedeværelse av en eventuell vekstfaktor. Dette fører til ukontrollert tumorvekst og overlevelse samt dårlig respons på anti-EGFR terapi. BRAF er lokalisert nedstrøms KRAS i RAS/RAF/MAPK-signalveien, og aktivert KRAS fører derfor til aktivering av BRAF (Dibb, Dilworth et al. 2004).

Det har de seneste årene blitt gjort en rekke studier av *BRAF V600E* mutasjon i kolorektal cancer. Mange studier er gjort i forbindelse med at *BRAF* er satt i sammenheng med prognostiske faktorer, metyleringsstatus, røykestatus, og behandling av kolorektal cancer. Mutasjonsfrekvensen til *BRAF V600E* varierer mellom 3 % og 27 %, hovedandelen ligger på rundt 10 % (tabell 1.1), (Rozek, Herron et al. 2010).

Tabell 1.1: Oversikt over 11 utvalgte studier, som har analysert *BRAF V600E* i sin studiepopulasjon.

Artikkel	Metode	Studiepopulasjon	<i>BRAF V600E</i> mutert
Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer (Samowitz, Albertsen et al. 2006).	Sekvensiering	Populasjons-basert studie 1271 kolorektal cancer (CRC) pasienter, North-California	9.7 % (123/1271)
Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer (Di Nicolantonio, Martini et al. 2008).	Sekvensering	113 CRC pasienter behandlet med cetuximab/panitumumab, Italia/Sveits	10 % (11/113)
Epigenetic-Genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF and P53 pathways in colorectal carcinoma (Suehiro, Wong et al. 2008).	Sekvensering	208 CRC pasienter, Hong Kong/USA	6.5%
BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer (Yokota, Ura et al. 2011).	PCR	319 CRC pasienter, Japan	4.7 % (15/319)
The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients (Farin˜ a-Sarasqueta, van Lijnschoten et al. 2010).	Real-time PCR	106 stage II CRC pasienter kun behandlet med kirurgi og 258 stage III CRC pasienter behandlet med kjemoterapi, Nederland	22 % Stage II 19 % Stage III
Effects of <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> , and <i>PIK3CA</i> mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis (De Roock, Claes et al. 2010).	AD Real-time PCR	773 CRC pasienter behandlet med cetuximab og kjemoterapi, fra 7 europeiske land	4.7 % (36/761)
Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type <i>KRAS</i> metastatic colon cancer (Laurent-Puig, Cayre et al. 2009).	AD Real-Time PCR	173 CRC pasienter, Frankrike	3 % (4/171)
Frequency of <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , and <i>NRAS</i> mutations in colorectal cancer (Vaughn, Zobel et al. 2011).	Real-time PCR	<i>BRAF V600E</i> undersøkt i <i>KRAS</i> wt populasjon, USA	15,2% (78/513)
Prevalence and Heterogeneity of <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , and <i>PIK3CA</i> Mutations in Primary Colorectal Adenocarcinomas and Their Corresponding Metastases (Baldus, Schaefer et al. 2010).	Sekvensering	100 CRC pasienter, Tyskland	7% (7/100)
<i>KRAS</i> codon 61, 146 and <i>BRAF</i> mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in <i>KRAS</i> codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer (Loupakis, Ruzzo et al. 2009).	Sekvensering	87 CRC pasienter, Italia	15% (13/87)
Cigarette Smoking and colorectal cancer risk by Molecularly Defined Subtypes (Limsui, Vierkant et al. 2009).	Real-time PCR	Populasjons basert cohort studie, kvinner 55-69 år, 555 pasienter med CRC, Iowa (USA)	27 % (152/555)

BRAF mutasjonsanalyse kan ha flere roller i klinisk sammenheng. Tilstedeværelse av *BRAF* mutasjon kan være med på å skille sporadisk kolorektal cancer fra Lynch syndrom, da *BRAF* mutasjon opptrer svært sjeldent i Lynch syndrom (Sharma and Gulley 2010). En *BRAF* mutasjon kan bekrefte en dårlig prognose ved kolorektal cancer-tilfeller som er mikrosatelitt stabile. Mutert

BRAF er forbundet med dårlig respons på behandling med epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR), (Benvenuti, Sartore-Bianchi et al. 2007; Suehiro, Wong et al. 2008; Sharma and Gulley 2010)

1.4.1 *BRAF* mutasjon versus alder, kjønn og sigarettøyk

Det er kjent at det er en sammenheng mellom forekomsten av kolorektal cancer og alder, og kolorektal cancer og kjønn (Bray, Wibe et al. 2007; Kreftregisteret 2009). Sigarettøyk er ikke antatt å være direkte relatert til kolorektal cancer slik forskning viser at for eksempel lungekreft er, men mange studier viser at det er en sammenheng mellom sigarettøyk og kolorektal cancer. Det antas at man må være utsatt for sigarettøyk over lengre tid og ha en røykehistorie på mer enn 40 år, for at det skal føre til utvikling av kolorektal cancer. Alder og kjønn spiller også en rolle i utviklingen av kolorektal cancer (Giovannucci 2001; Sæbø, Skjelbred et al. 2006).

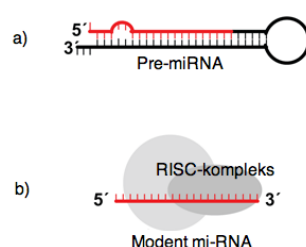
MSI er assosiert med sigarettøyk i sporadiske kolorektal cancer. De fleste tilfeller av mikrosatelitt ustabilitet har utbredt metylering av CpG-øyer (CIMP), og mange av disse tumorene har *BRAF V600E* mutasjon. Det er sett en sammenheng mellom økt risiko for kolorektal cancer med CIMP og/eller *BRAF V600E* mutasjon (Samowitz, Albertsen et al. 2006).

BRAF mutasjon er vist å ha en sammenheng med faktorene sigarettøyk og kjønn. Sannsynligheten for at menn har *BRAF* mutasjon er lavere enn hos kvinner. Menn som røyker har derimot en større sjanse for mutert *BRAF* enn kvinner som aldri har røykt (Rozek, Herron et al. 2010).

1.5 Micro-Ribonucleic Acid (miRNA)

Micro-Ribonucleic Acid (miRNA) ble først oppdaget i 1993 under en studie av *lin-14* genet i *C.elegans* (Lee, Feinbaum et al. 1993). Siden den gang har miRNA vært et aktivt forskningsfelt, og antallet kjente miRNA vokser stadig. I september 2010 var antallet kjente miRNA i det humane genom 1048, i september 2011 har tallet steget til 1424 ([www.mirbase.org/September 2011](http://www.mirbase.org/September%202011)). miRNA er anslått til å regulere 30 % av alle uttrykte transkript i det humane genomet, noe som gjør miRNA til den største klassen av genregulatorer (Slaby, Svoboda et al. 2009). miRNA grupperes i familier etter sekvenslikhet i 5`enden av modent miRNA, men hvorvidt miRNA innen samme familie har samme biologiske funksjon er uvisst (He and Hannon 2004).

miRNA er små enkeltrådede ikke-kodende RNA-molekyler med en lengde på 21-25 nt som deltar i sekvensspesifikk genregulering. miRNA undertrykker proteintranslasjonen ved å binde seg til 3`untranslated regions (3`UTR) på spesifikke mRNA. I denne prosessen er miRNA helt avhengig av multiproteinkomplekset, RNA induced silencing complex (RISC) som hjelper miRNA med komplementær binding til mRNA. Et bestemt miRNA kan på denne måten regulere hundrevis av målgener, og et spesifikt målgen kan reguleres av flere ulike miRNA. miRNA har vist seg å være en sentral regulator av genekspressjonen og styrer mange biologiske prosesser som differensiering, celledøds, metabolisme og apoptose. Man antar derfor at miRNA har en sentral rolle i sykdomsutvikling. Studier indikerer at miRNA kan virke som tumorsupressor gener og onkogener, og kan ha en sentral rolle i kreftutvikling. Det er sett at miRNA har ulik ekspressjon mellom tumorvev og normalvev (Lu, Getz et al. 2005). Forandringer i ekspressionsprofilen til miRNA har blitt observert i mange ulike tumortyper, inkludert kolorektal cancer (He and Hannon 2004).

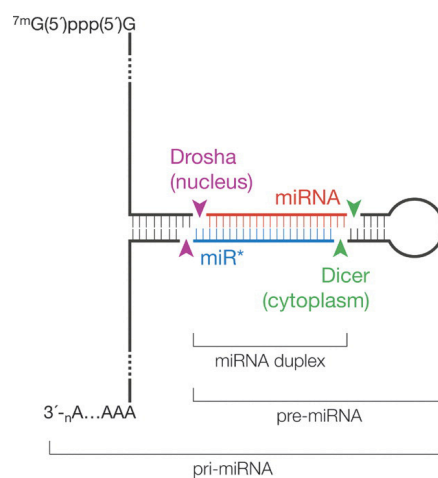


Figur 1.5: a) Pre-miRNA (precursor-miRNA) som danner en hårnålstruktur og er forstadiet til det modne miRNA. b) Modent mi-RNA koblet sammen med RISC-komplekset (Schwarz 2006).

1.5.1 MicroRNA biogenesen

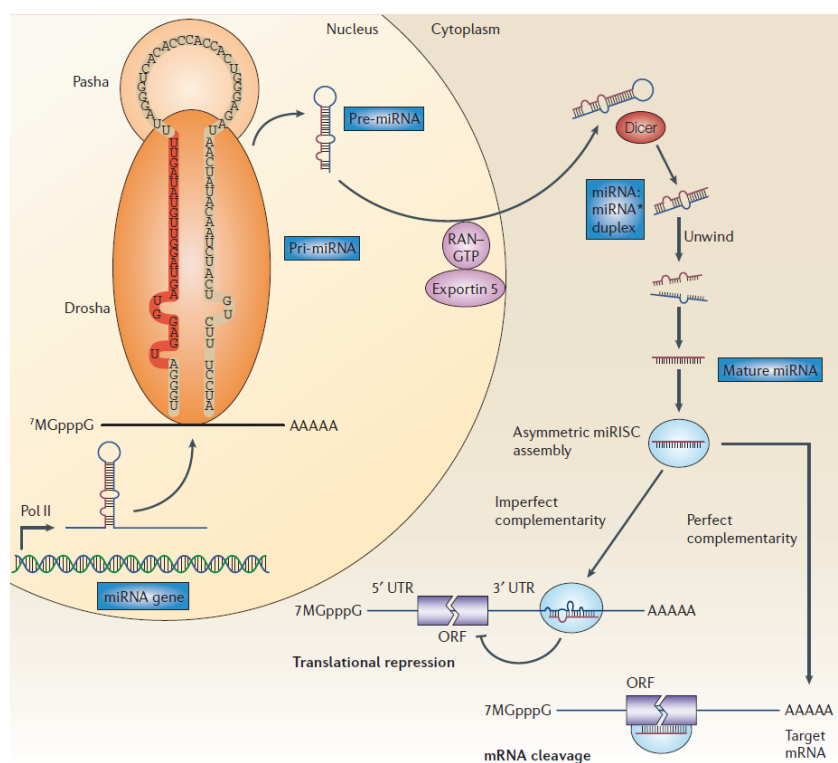
Biogenesen av miRNA er en enzymatisk flertrinnsprosess. De fleste humane miRNA finnes i intron i protein-kodende eller i ikke-kodende sekvenser, i ekson eller i overgangsområder mellom ekson og intron (Rodriguez, Griffiths-Jones et al. 2004; Zeng 2006). miRNA blir transkribert av RNA polymerase II i cellekjernen til primære transkript pri-miRNA (Lee, Kim et al. 2004; Borchert, Lanier et al. 2006). Pri-miRNA består av en eller flere miRNA transkripter, hvert miRNA-transkript er en hårnålstruktur (stem loop) på ca.33 bp. I likhet med mRNA-transkripter har pri-mRNA en 5' 7-methyl guanosin ($^7\text{MGpppG}$) på 5'enden og en poly-A hale (AAAAAA) på 3'enden (Cai, Hagedorn et al. 2004). Transkripsjons-reguleringen til pri-miRNA er ikke fullt kartlagt, men man vet at miRNA er lokalisert innen intron og kan bli regulert gjennom deres promotorer (He and Hannon 2004). Pri-miRNA blir deretter prosessert i kjernen av RNAases III enzymet Drosha og dens co-faktor DGCR8. Drosha/DGCR8 fjerner de flankerende elementene og danner pre-miRNA (figur 1.6). Pre-miRNA består av 60 - 70 nt som danner en perfekt hårnålsstruktur med 2-nt overheng på 3'enden. Pre-miRNA blir deretter transportert fra kjernen til cytoplasma ved hjelp RAN-GTP og eksportin 5 (Bohnsack, Czaplinski et al. 2004; He and Hannon 2004). Pre-miRNAs overheng på to nukleotider på 3'enden av pre-miRNA er en avgjørende struktur for at exportin 5 skal gjenkjenne pre-miRNA (Kim 2005).

I cytoplasma blir pre-miRNA prosessert av RNase III enzymet Dicer. Dicers prosessering resulterer i en 21-25 nt miRNA/miRNA* dupleks, der endene har 5' monophosphate, 3' hydroxyl gruppe og en 3' 2 nt overheng.



Figur 1.6: Oversikt over stedene der miRNA kuttes i prosesseringen fra pri-miRNA til miRNA/miRNA* dupleks. Drosha kutter i pri-miRNA til pre-miRNA inne i cellekjernen. Deretter kuttet pre-miRNA til miRNA/miRNA* dupleks ved hjelp av Dicer i cytoplasma. Figur fra (Haug).

MiRNA/miRNA* duplekseen blir innkorporert i RISC (RNA-Induced Silencing Complex), et multiprotein kompleks som blant annet inneholder Agronaute protein. Det modne miRNA blir beholdt i RISC-komplekset (Kim 2005). RISC bruker miRNA som et templat for å gjenkjenne komplementært mRNA. RISC komplekset integrerer en tråd, denne er kjent som en guidetråd og er valgt av argonaute protein, som er den katalytisk aktive RNasen i RISC komplekset. Den gjenværende tråden blir degradert av en ukjent mekanisme. Modenet miRNA binder seg deretter til komplementære seter på mRNA målet for å negativt regulere gen ekspresjonen i en av to veier som er avhengig av grad av komplementaritet mellom miRNA og målet. Ved fullstendig komplementaritet binder miRNA seg til mRNA i open reading frame (ORF) og fører til at mRNA kløyves og degraderes. Ved ufullstendig komplementaritet hemmer miRNA translasjon ved å binde seg til 3'UTR av mRNA. Et viktig aspekt ved mekanismen for miRNAs regulering av genekspressjonen er at et miRNA kan regulere flere gener og ett gen kan bli regulert av flere miRNA (Esquela-Kerscher and Slack 2006; Slaby, Svoboda et al. 2009).



Figur 1.7: Biogenese av miRNA. Gensekvenser transkriberes til pri-miRNA og prosesserer videre til pre-miRNA og modent miRNA ved hjelp av Polymerase II, Drosha/DGCR8 (her pasha), Exportin5/RanGTP og Dicer. Modent miRNA assosierer med RISC og hemmer genuttrykket (Esquela-Kerscher and Slack 2006).

1.5.2 miRNA, kreft og genekspressjon

miRNA regulerer genekspressjonen og er involvert i cellens viktige funksjoner som differensiering, cellevekst og apoptose. Dette gjør at miRNA kan assosieres med neoplastiske sykdommer. Denne sammenhengen har ført til en stor interesse for miRNA og deres rolle i kreftutvikling. I nyere forskning er miRNAs rolle i utviklingen av kreft, diagnostikk og som mål for behandling sentrale tema (Faber, Kirchner et al. 2009).

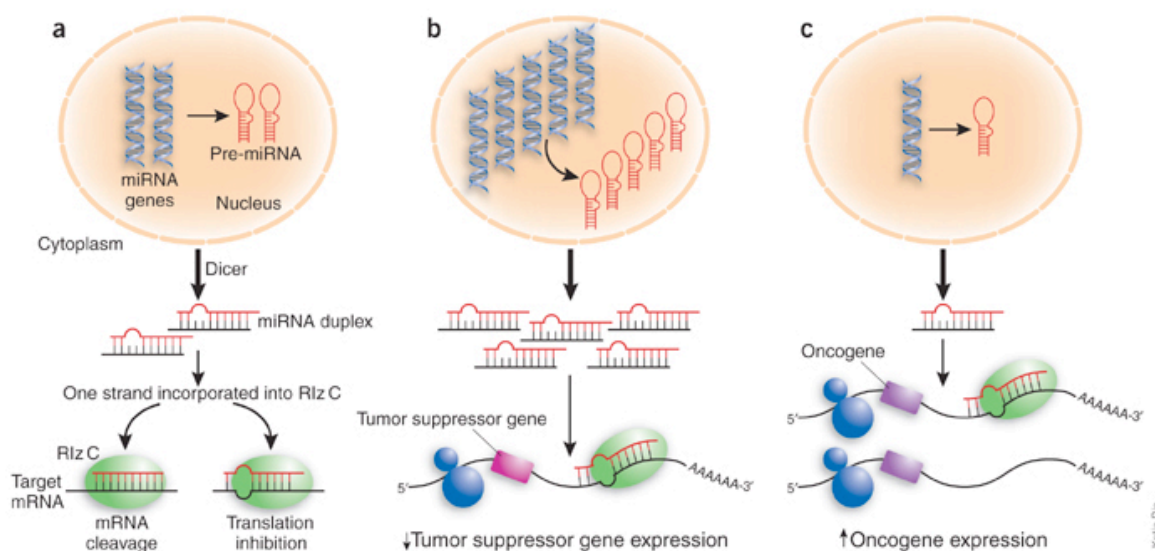
Genekspressjon eller genuttrykk er prosessen som fører til syntese av protein fra et spesifikt gen. DNA transkriberes til RNA, og deretter translasteres fra mRNA fra kodede gener. Genuttrykket har proteiner som sluttprodukt, men også ikke-kodende gener hvor sluttproduktet er RNA molekyler som tRNA og rRNA. De fleste celler uttrykker bare en liten del av genene i genomet på et gitt tidspunkt. Genreguleringen er en komplisert dynamisk og nøye regulert prosess som kan oppstå på alle trinn fra DNA til protein. Både cellens eget behov for endring og ytre miljøforandring kan føre til endret genuttrykk. Mekanismen fungerer både ved å slå av, eller slå på gener samt regulere ved å øke eller minske nivået av ekspresjon av ulike gener.

miRNA er meget viktig i denne reguleringen, og negativt regulerer mål mRNA ved å binde seg komplementær senter innenfor 3'-UTR av mRNA mål. Studier har indikert at miRNA også kan nedregulere ekspresjonen av gener ved å koble seg til kodede region eller 5'UTR av noen mRNA.

Når det gjelder kolorektal cancer og miRNA er det sett og undersøkt flere sammenhenger. miRNA ser ut til å ha innvirkning på regulering av viktige signalveier som RAS/RAF, PI-3-K og Wnt/ β -catenin, samt *p53* som man vet er kjente faktorer i tumorgenese av kolorektal cancer (Faber, Kirchner et al. 2009).

miRNA påvirker cellens prosesser ved å ha en tumorsupressor funksjon eller en onkogen funksjon. miRNA med nedsatt ekspresjon i tumor blir sett på som tumorsupressorgener eller «anti-oncomirs», de vil normalt hindre tumor utvikling ved å hemme onkogen og/eller gener som kontrollerer differensiering og apoptose. miRNA *let-7* er et eksempel på et tumorsupressor miRNA. miRNA med økt ekspresjon i tumor blir ansett som onkogene, og blir ofte kalt «oncomirs». Normalt vil onkogene miRNA forårsake tumorutvikling ved å hemme tumorsupressorgener og/eller gener som kontrollerer celledeling og apoptose (Zhang, Pan et al. 2007). Endringer i cellens genom, for eksempel delesjoner eller duplikasjoner, kan endre miRNAs kodede regioner. Det er gjort hyppige funn av miRNA i kreftassosierte regioner av genomet, og studier viser at mer enn 50 % av miRNA genene er lokalisert innen slike områder (Zhang, Pan et al. 2007).

Det første beviset for at miRNA kunne være involvert i kreft kom i 2002 i en studie av kronisk lymfatisk leukemi (CLL), der man så at miR-15a og mir-16-1 var lokalisert i et område som ofte er deletert, og at transkriptene var fraværende eller lavt uttrykt i det fleste tilfeller av denne kreftformen (Calin, Dumitru et al. 2002). Kolorektal cancer er assosiert med endringer i ekspresjonen av miRNA. Studier viser at det er funnet endringer i miRNA-ekspresjonen for mange ulike miRNA. Det er funnet økt ekspresjonsnivå av *let-7g*, miR-181b og miR-200c i tumorvev kontra normalvev i kolorektal cancer (Nakajima, Hayashi et al. 2006). En annen studie viser funn av 28 ulike miRNA i kolorektal cancer, der ekspresjonen av 2 miRNA; miR-143 og miR-145 var nedregulert i tumorvev kontra normalvev. *Let 7 a/b/c* viste ingen endring i ekspresjonen (Michael, SM et al. 2003; Schepeler, Reinert et al. 2008). Det er også funnet signifikant ekspresjon av miR-15b, miR-181b, miR-191 og miR-200c i tumorvev kontra normalvev (Xi, Formentini et al. 2006). Det er i en annen studie undersøkt ekspresjonsnivået av *let-7a* i kolorektal cancer, dette ble gjort på bakgrunn av undersøkelser som viste lite uttrykk av *let-7a* i lungekreft. To av seks undersøkte humane tumorer samt en av tre celledinjer viste redusert uttrykk av *let-7a* (Akao, Nakagawa et al. 2006).



Figur 1.8: Modell av miRNA og dens påvirkning på tumorsupressorgen og onkogen-uttrykket. a) Normal prosessering av miRNA, miRNA virker enten ved å kløyve mRNA eller hemme translasjon av mRNA, dette ved hjelp av RISC komplekset. b) Overuttrykk av miRNA transkript som hemmer tumor supressorgener, fører til mindre tumor supressorproteiner og økt cellevekst. c) Bortfall eller mindre uttrykk av miRNA transkript kan føre til økt uttrykk hos mål mRNA som kan være et onkogen (Caldas and Brenton 2005)

1.5.3 miRNA *let-7*

let-7 og *lin-4* var de to første miRNA som ble identifisert, de ble oppdaget under en studie av stamcelledeling og differensiering i rundormen *C.elegans*. *let-7* er også den første familien av miRNA som ble funnet hos mennesker, og består av 14 isomere som hver er lokalisert på ulike kromosom. *let-7* har også vist seg å hemme flere komponenter i DNA- replikasjonssystemet og er derfor viktig i cellens utvikling. *let-7* er med på å regulere RAS ved at *let-7* har bindingssteder i 3'UTR-områder i *RAS* genene (*K-*, *N-*, og *HRAS*). Mange av *let-7* isomerene fungerer som tumorsupressorer i en del kreftformer. I forbindelse med lungekreft er det er sett at *let-7* ekspresjonen er lavere i tumorvev enn i normalvev. Mens nivået av RAS proteinet er signifikant høyere i tumorvev enn i normalvev (Johnson, Grosshans et al. 2005).

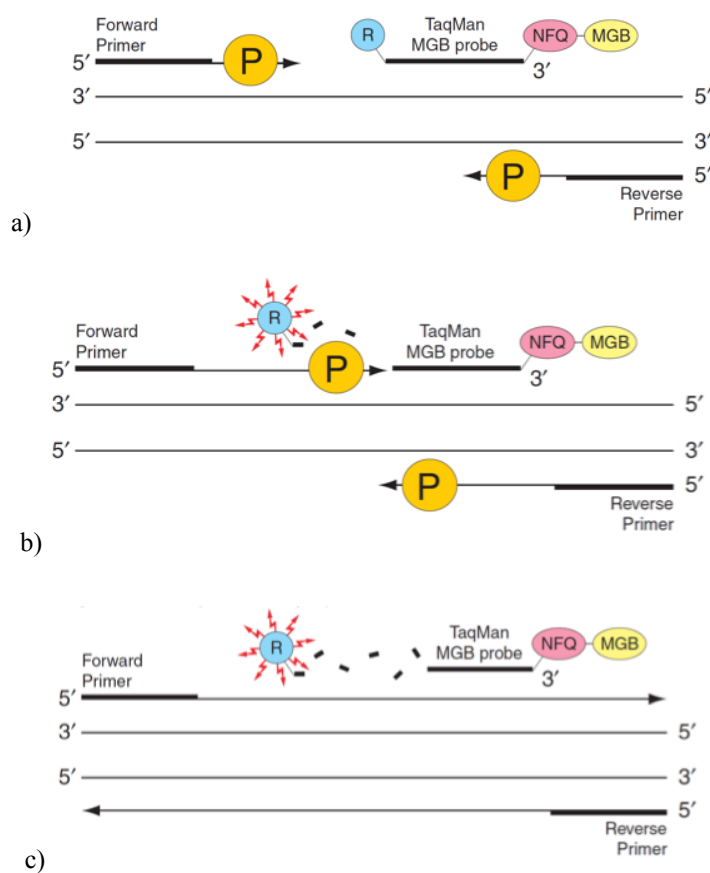
miRNA *lethal-7a* (*let-7a*) er en isoform av *let-7*, og er lokalisert på kromosom 9q22.3. Studier viser at genområdet *let-7a* er lokalisert på ofte er deletert i kolorektalcancer (Akao, Nakagawa et al. 2006).

1.6 Taqman teknologi

Taqman teknologi benytter seg av probe med «reporter dye» og «quencher» og taq polymerase med 5'-3' nukleaseaktivitet for å detektere ønsket målgen. Teknologien er med på å øke spesifiteten til real-time PCR reaksjoner.

Taqman (minor groove binder) MGB probe som benyttes i real-time PCR består av en «reporter dye» (R), for eksempel FAM som er en fluoreserende reporter farge som er festet til 5'enden av proben, og en minor groove binder (MGB) og en ikke fluoreserende quencher (NQF) på 3'enden. MGB er med på å øke smeltetemperaturen uten å øke probelengden, og tillater design av kortere prober. I løpet av real-time PCR reaksjonen vil Taqman MGB proben binde seg spesifikt til komplementære sekvenser mellom bindingsetene til forward og reverse primer. Når proben er intakt vil nærheten mellom reporter dye og quencheren resultere i undertrykkelse av fluoressens fra reporter dye. Dette på grunn av fluorescence resonance energy transfer (FRET). DNA-polymerasen katalyserer DNA-syntese ut i fra de to primerne i 5' => 3' retning. 5' nukleaseaktiviteten til polymerasen vil bare kløyve proben som er hybridisert til målgenet, og skille reporter dye fra quencher. På grunn av dette er ikke spesifikk amplifisering ikke målbart. Kløyving av proben fører

til fluorescenssignal fra reporteren. Intensiteten i fluorescensen er proporsjonal med mengden PCR produkt og dermed også fluorescens intensiteten. Prosessen skjer i hver enkel syklus og interfererer ikke med den eksponentielle amplifikasjonen av produktet i PCR reaksjonen. Polymerisering av tråden fortsetter, men fordi 3` enden på proben er blokkert stopper polymeriseringen (Applied 2010).



Figur 1.9: a) Forward primer, reverse primere og Taqman MGB proben binder seg til templatet. b) DNA-polymerase starter så polymerisering med 5`nukelaseaktivitet som kløyver Taqman MGB proben og skiller «reporter dye» (R) fra NQF c) Polymerisering av templatet fortsetter, siden 3`enden av proben er blokkert, vil ikke proben forlenges. Modifisert figur fra (Applied 2010).

2 Materiale og metoder

Prosedyrer samt oversikt over kommersielle kit og reagenser er beskrevet i Appendiks.

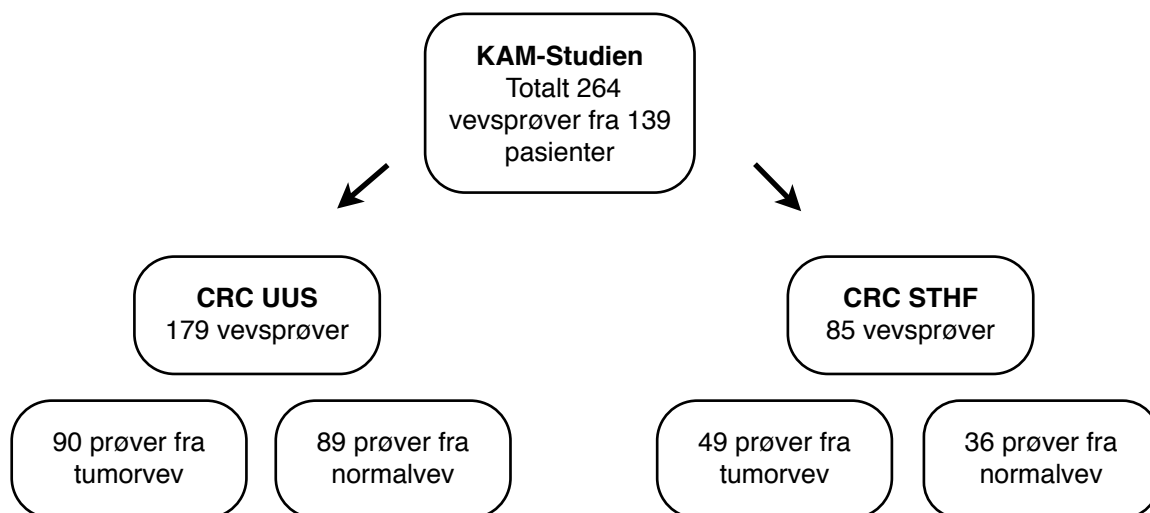
2.1 Studiepopulasjonen

Masteroppgaven er utført på materiale KAM-studien. KAM-studien er en molekylærepidemiologisk studie som består av materiale fra NORCCAP (Norwegian Colorectal Cancer Prevention Trial) screeningundersøkelse, samt fra pasienter med kolorektalcancer (CRC) som er operert ved Sykehuset Telemark (STHF) og Oslo Universitetssykehus HF, Ullevål, her kalt UUS. Registreringsnummer i ClinicalTrials.gov er NCT00119912 (ClinicalTrials.gov 2005).

KAM-biobanken består av blod og vevsprøver fra 234 kolorektalcancer pasienter, hvorav 16 identifisert i NORCCAP screeningundersøkelse og 218 fra STHF og UUS, samt prøver fra 1044 individer med polypper, og 400 kontroller. Individer med polypper og kontroller ble alle hentet fra NORCCAP studien. Alle deltagerne i studien har etnisk norsk opprinnelse (Gondal, Grotmol et al. 2003; Sæbø and Furu Skjelbred 2009).

Materialet som er brukt i denne oppgaven er hentet fra KAM-biobanken og består av 264 vevsprøver (par av normal og tumorvev). 179 av disse vevsprøvene er fra personer operert ved UUS og 85 fra personer operert ved STHF. Det er under operasjon hentet ut to vevsbiter normalvev med størrelse på minst 2 cm³ fra proksimalt område for tumor, samt en tumorvevsbit på minst 1 cm³. Vevsprøvene ble umiddelbart lagt i flytende nitrogen og deretter frosset ned til -80 °C (Kure 2008). Prøvene som er benyttet fra UUS består av 90 tumorvevsprøver og 89 normalvevsprøver. Fra STHF er det brukt 49 prøver fra tumorvev og 36 fra normalvev. Antallet prøver fra normal- og tumorvev varierer fordi det for noen av pasientene ikke fantes både normal- og tumorvev. Grunnen til dette er at vevsmaterialet er brukt opp tidligere i andre prosjekter, eller at det i utgangspunktet ikke er hentet ut vevsmateriale ved operasjon. Totalt er det tatt ut vevsprøver fra 139 personer med CRC fra KAM-biobanken til bruk i denne oppgaven. Normal- og tumorvevsprøver fra samme pasient er tatt fra 125 personer samt kun tumorvevsprøver fra 14 personer.

Informasjon om kjønn, alder og røykedata er hentet fra validert spørreskjema som er besvart av alle deltakerne i KAM-studien. I spørreskjemaet har personene svart på om de røyker daglig, røyker av og til, er tidligere røyker eller har aldri røykt (Tarmkreftundersøkelse 2003). Det er valgt i denne oppgaven å slå sammen alternativene «røyker daglig», «røyker av og til» og «er tidligere røyker».



Figur 2.1: Oversikt over antall vevsprøver som er brukt fra KAM-biobanken i denne oppgaven.

Studiepopulasjonens fordeling med hensyn på alder, kjønn og røykestatus samt mutasjonsstatus vises i tabell 2.1. Det er ekskludert data fra 16 vevsprøver med 0 % tumorceller.

Tabell 2.1 Beskrivende statistikk på fordeling av kjønn, alder og røykestatus i studiepopulasjonen. Ekskludert prøver med 0 % tumorceller

	Menn	Kvinner	Alder	Røyk a)	Ikke røyk	Kvinner røyk	Menn røyk
Antall	63 (51.6%)	58 (47,5 %)	67.9 år ± 12,2	53 (57.6 %)	29 (31.5 %)	20 (37,7 %)	34 (64,3%)

a) 46 stk ubesvart. 92 stk med besvart data, hvorav 46 stk er menn og 46 stk kvinner.

2.2 Snitting av ferskfrosset vev

Frysemikrotom ble brukt for å snitte alle vevsprøvene, for lettere å isolere DNA og RNA. Det ble først skåret ett snitt à 5µm som ble lagt på objektglass, deretter ble det snittet 10 snitt à 10µm som ble samlet, og tilslutt snittet et snitt à 5µm som ble lagt på objektglass. Tynne snitt vil gi en bedre og mer optimal tilgang for bufferene som inngår i isoleringsprosessen for DNA og RNA, enn om det ble brukt en «vevsklump». Alle vevsblokkene ble behandlet likt. Det ble totalt samlet ti rør med 10 snitt av 10µm under snitteprosessen, hvorav det i denne oppgaven er brukt 2 rør. Fra hver enkelt vevsblokk ble det lagt opp to snitt på objektglass, preparatet ble HE-farget og fra tumorvevsprøvene ble det vurdert prosentandel tumorceller. Siden de to snittene som ble vurdert var fra hver ende av det snittede område, vil det vise om alle frysensnittene inneholder tumorceller eller om man har beveget seg utenfor tumorområdet under snittingen.

Frysemikrotom ble brukt kontra vanlig mikrotom for å holde vevet frosset under hele snitteprosessen. Siden det var ferskfrosset vev som var utgangspunktet for videre isolering av DNA/RNA var bruk av frysemikrotom eneste mulighet for å unngå degradering av vevet. Det ferskfrosne vevet ble under hele snitteprosessen holdt så kaldt som mulig. Prøvene ble fraktet og oppbevart på tørris under transport til/fra – 80 °C fryser, samt oppbevart på tørris inne i frysemikrotomen før og etter montering av vevsblokken. For å unngå å forurense vevet ble det under hele snitteprosessen arbeidet så rent som mulig. Alle overflater og redskaper i umiddelbar nærhet til vevsbiten, ble nøye vasket med sprit for å unngå kontaminering av prøvene. Under hele snitteprosessen ble det ført logg, der det ble notert ned prøvenummer, størrelse på vevsbit, antall snitt som ble snittet og eventuelle kommentarer til arbeidet under snittingen som kunne ha betydning for kvaliteten til vevet.

2.3 Hematoxylin/Eosin (HE) farging av vevssnitt

Hematoxylin/Eosin farging er en standard innfargingsmetode for vevssnitt. Denne metoden ble brukt for å farge vevssnittene skåret på frysemikrotom. Hematoxylin er et naturlig fargestoff, der molekylene er negativt ladet og vil via positivt ladede aluminiumioner binde seg til de negativt ladede molekylene i vevsstrukturen. Alle negativt ladede molekyler, som for eksempel DNA heliksen i cellekjernen vil derfor farges blå. Det samme gjelder bruskvev. Eosin er et fluoriserende negativt ladet rødt fargestoff som i surt miljø (pH 4.0) vil binde seg til positivt ladede molekyler i vevsstrukturen og farge den rosa. Cytoplasmaproteiner og bindevev er eksempel på strukturer som vil farges rosa (Kiernan JA 2008).

2.4 Prosentandel tumorvev

Det ble bestemt prosentandel tumorvev i alle vevssnitt fra tumorvev. Prosentandelen tumorvev ble vurdert og bestemt av patolog. Normalvev ble ikke vurdert for eventuell tilstedeværelse av tumorvev, da man vet at dette er normalvev. Alle prøver uavhengig prosentandel tumor ble tatt med til videre analyse. Vevsprøver med 0 % tumorceller ble senere ekskludert fra materialet, før videre statistiske analyser. Dette utgjorde 16 av 139 vevsprøver.

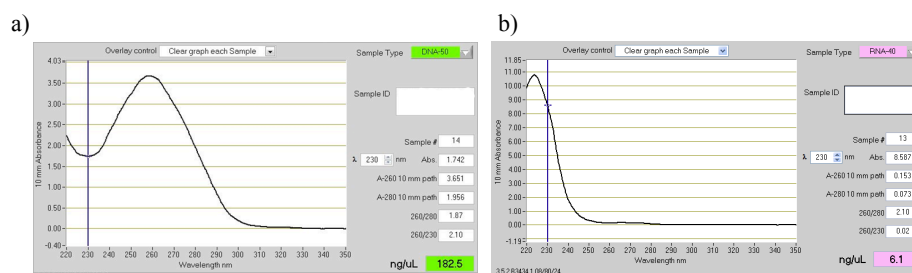
2.5 DNA og RNA kvantifisering

2.5.1 Kvalitet og kvantitets vurdering av DNA og RNA

Konsentrasjonen av ekstraherte DNA/RNA-løsninger ble målt med Nanodrop™ 1000 spektrofotometer. Dette er et fullspektrum (220 nm - 750 nm) spektrofotometer som brukes til å kvantifisere nukleinsyrer, proteiner og andre forbindelser med høy nøyaktighet og reproduserbarhet. Systemet bruker fiberoptisk teknologi, og ved hjelp av overflatespenningen til væsken holdes 1 µl prøvemateriale på plass mellom to optiske plater og danner en væskesøyle mens målingen pågår.

Konsentrasjonsmålingen forgår ved å måle prøvens absorbans ved 230, 260 og 280 nm. Nukleinsyrer absorberer lys ved 260 nm, proteiner ved 280 nm og kontaminanter som fenoler og organiske komponenter ofte ved 230 nm. Ratioen 260/280 og 260/230 sier noe om renheten til DNA og RNA. En 260/280 ratio på ~1.8 aksepters som "rent" DNA, mens for RNA aksepterer man en ~ 2,0 ratio. Ratioer som er lavere kan indikere tilstedeværelse av proteiner, fenoler, salt eller andre kontaminanter som absorberer sterkt på ca 280 nm. 260/230 ratioen er en annen måten å vurdere nukleinsyrens renhet på. Det er her vanlig å godta ratioer mellom 1,8-2,2. Lavere ratioer vil indikere tilstedeværelse av organiske kontaminanter som foreksempel fenol, TRIzol og andre reagenser som brukes i RNA ekstraksjon (NanoDrop 2009).

Konsentrasjonsmåling og vurdering av renhet ble utført på alle prøver etter DNA isolering, RNA isolering og DNase-behandling.



Figur 2.2: Eksempler på kurver fra Nanodrop. a) Graf som viser en bra kurve, prøven har konsentrasjon på 182,5 ng/µL, 260/280 ratio på 1,87 og 260/230 ratio på 2,10. b) Graf som viser en dårlig kurve, prøven har konsentrasjon på 6,1 ng/µL, 260/280 ratio på 2,10 og 260/230 ratio på 0,02.

2.5.2 Bioanalyser

Bioanalyser er en chip-basert kapillærelektroforesemaskin til analyse av RNA, DNA og protein. Resultatene for RNA består av gelbilde, elektroferogram, konsentrasjon, ratio 28S/18S rRNA og et «RNA integrity number» (RIN). RIN verdien ligger mellom 1 og 10, der 10 representerer intakt RNA, mens 1 representerer fullstendig degradert RNA. Det ble analysert et utvalg av fire tilfeldig utplukkede prøver på Bioanalyser for å se på om kvaliteten etter isolering var god. Det ble antatt at resultatene for disse prøvene var representativt for hele materialet. Analysene ble gjort ved et eksternt laboratorium.

2.6 *BRAF* mutasjonsanalyse

2.6.1 DNA isolering

DNA isolering ble foretatt på Biorobot EZ1 med QIAGEN EZ1 DNA Tissue kit. Vevssnittene ble lysert ved hjelp av proteinase K i G2 buffer. Enzymet proteinase K bryter effektivt ned proteiner, og bidrar til å løse opp cellemembranen og ødelegge proteinene i cellen. For å unngå forstyrrelser fra proteinase K i senere PCR-reaksjon varmes prøvene opp til 80 °C for inaktivering av enzymet. Prinsippet for kitet er magnetpartikkel teknologi. Magnetpartikler blir tilsatt lysatet og DNA blir isolert fra lysatet gjennom å binde seg til silica på overflaten av partiklene i tilstedeværelse av chaotropisk salt. Det chaotropiske saltet denaturerer proteiner og andre makromolekyler, for at nukleinsyrene lettere skal skilles ut fra resten av cellekomponentene. Partiklene separeres fra lysatet ved hjelp av en magnet. DNA-et blir vasket mens det er bundet til silicapartiklene, deretter eluert i elueringsbuffer (DNAHandbook 2009).

2.6.2 *BRAF V600E* multipleks real-time PCR

Metoden som ble benyttet for deteksjonen av *BRAF V600E* er en multipleks real-time PCR. I en multipleks PCR kan man få amplifisert flere loci i en og samme PCR reaksjon ved bruk av flere primersett/probesett. Det er den fluoreserende proben som gir spesifisitet og mulighet for multipleksing. Multipleks realtime PCR for deteksjon av *BRAF V600E* som er benyttet i denne oppgaven er utviklet i laboratoriet (Hamfjord, Stangeland et al. 2011). Internkontrollen RNase P og *BRAF V600E* mutasjonen vil detekteres i en og samme reaksjon. Primere og probe for deteksjon av *BRAF V600E* er oppgitt i tabell 2.2. Det ble satt opp duplikater for alle prøver. Cut-off verdien er satt slik at *BRAF*-mutasjon kan detekteres i en prøve med 10 % tumorceller og 90 % normale celler

med en nøyaktighet på ± 2 STD. Denne verdien er satt på bakgrunn av forsøk med DNA fra cellelinjen FFPE (Hamfjord, Stangeland et al. 2011).

Tabell 2.2: Primere og probe benyttet ved *BRAF V600E* real-time PCR.

		Sekvens
Primere	BRAFforward2	5'-TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGA-3'
	BRAFreverse	5'-ACCATCCACAAAATGGATCCA-3'
Probe	MBG-probe	5'-TCGATGGAGTGGGTCC-3'

2.6.3 Internkontroll RNase P

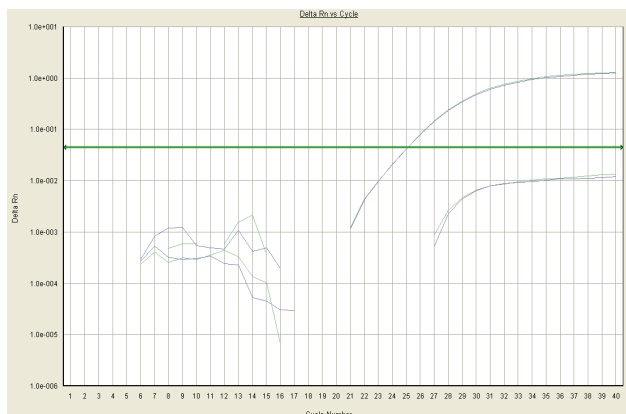
RNase P (Ribonuclease P) brukes som internkontroll i *BRAF V600E* mutasjonsanalysen.

Genet som koder for RNase P er et enkopi-gen som koder for RNA delen av enzymet RNase P, og som finnes naturlig i all humant DNA. TaqMan RNase P Control Reagents Kitet som er brukt i multipleks *BRAF V600E* analysen, inneholder en 20x miks av primere og prober som kan benyttes til å detektere det humane genet for RNase P. Primere og prober er designet i henholdt til Primer Express guidelines for kvantitering, med begrensede primer konsentrasjoner for brukt som endogen referanse/internkontroll i multipleks PCR reaksjoner. Kitet er designet for å benyttes med 5'-nukleaseassay med TaqMan Universal PCR Master mix og genomisk, plasmid eller komplementært DNA (Protocol 2010).

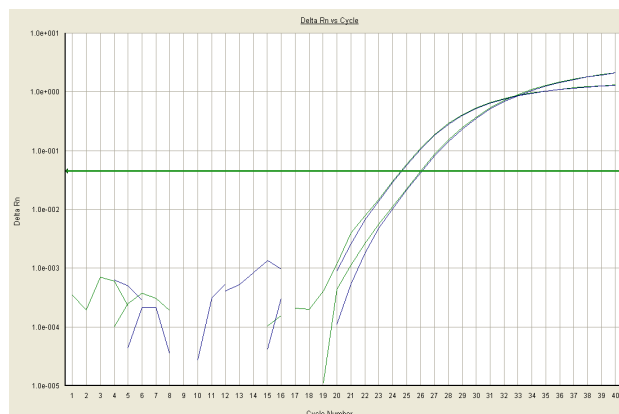
Internkontrollen gir en kontroll på at PCR reaksjonen har forløpt effektivt og som forventet, og gir en indikasjon på at templat samt alle ingredienser er tilsatt mastermiks. Siden RNase P er et enkeltkopi-gen, og det antas at *BRAF* er mutert i et allel, skal begge komme opp samtidig dersom 100% av cellene i prøven er mutert i *BRAF*. *BRAF* skal dermed ikke få en lavere Ct-verdi enn RNase P.

2.6.4 Tolking av amplifiseringskurver

Resultat av realtime PCR for *BRAF V600E* har to mulige utfall, wt eller mutert. Amplifiseringskurven for wt vil kun vise amplifisert produkt av internkontrollen RNase P, amplifisering av prøven vil ikke komme over satt treshold-verdi. Ved mutert *BRAF V600E* vil både internkontrollen RNase P og prøven ha amplifisert produkt over satt treshold-verdi.



Figur 2.3: Amplifiseringskurver for wt *BRAF V600E*.



Figur 2.4: Amplifiseringskurver for mutert *BRAF V600E*.

Cutt-off verdien er satt til 7.17 og break-trought er 13.55. Cutt-off verdien er satt slik at *BRAF*-mutasjon kan detekteres i en prøve med 10 % tumorceller og 90 % normale celler med en nøyaktighet på +/- 3 standardavvik. Denne cut-off verdien er satt på bakgrunn av forsøk med DNA fra wt cellelinje og wt formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) CRC tumorvev (Hamfjord, Stangeland et al. 2011).

2.6.5 Statistisk analyse

For å se om det var noen sammenheng mellom *BRAF* mutasjon, alder, røyking, og kjønn ble det brukt binær logistisk regresjonsanalyse som metode. Statistikk analysene ble først utført eksternt ved Høgskolen i Telemark, ved bruk av Minitab 15. Deretter ble de utført med IBM SPSS statistics software, versjon 19. Utgangspunktet for denne metoden er en utfallsvariabel, altså om en bestemt hendelse forekommer eller ikke. En eller flere kategoriske eller kontinuerlige variabler som for eksempel kjønn, røykestatus og alder kan brukes. Odds ratio (OR) er det sentrale målet som angir sannsynligheten for at en hendelse vil forekomme, dividert med sannsynligheten for at en hendelsen ikke forekommer. Det benyttes 95 % konfidensintervall i studien. Metoden benyttes her for å beskrive sammenhengen mellom *BRAF* mutasjoner og forklaringsvariablene kjønn, alder og røyking.

2.7 Ekspresjonsanalyse miRNA *let-7a*

2.7.1 Isolering av RNA

MirVana™ miRNA Isolation kit ble brukt for å isolere miRNA fra normal og tumorvev. MirVana isoleringsprosedyren kombinerer organiske ekstraksjon fenol i chloroform og solid-kolonne-ekstraksjon. Prøven blir først lysert i en denturerings og lyseringsløsning som stabiliserer RNA og inaktiverer RNaser. Lysatet ekstraheres med en gang med Acid-Phenol:Chloroform som fjerner mesteparten av andre cellulære komponenter, og etterlater RNA som er nesten rent. Prøven blir ytterligere rensert over et glassfiber filter før den blir eluert med 95 °C vann (Isolation-protocol 2009).

2.7.2 Real-time-PCR DPYD IVS14+1G>A

For å undersøke om det var DNA tilstede i isolert RNA, ble det satt opp en real-time PCR reaksjon av SNPen IVS14+1G>A i *DPYD* genet i 4 prøver. Dette vil detektere SNPen som ligger 5' spleisesetet i intron 14. Siden prosessen fra DNA til modent RNA fjerner alle intron ved RNA splicing skal det ikke forekomme deteksjon av *DPYD* IVS14+1G>A i rent RNA. En eventuell tilstedeværelse av DNA vil da detekteres, og DNase-behandling av prøvene vil være nødvendig. Dette ble i hovedsak gjort fordi DNA vil kunne amplifiseres i en qRT-PCR, og gi kunstig høy ekspresjon i analysen. Siden isolert DNA i tillegg skulle benyttes til qRT-PCR for KRAS analyse, der 18s rRNA benyttes som endogen kontroll, var dette viktig. miRNA qRT-PCR trenger i utgangspunktet ikke ta hensyn til dette, fordi miRNA har spesifikke primere som ikke vil amplifisere DNA.

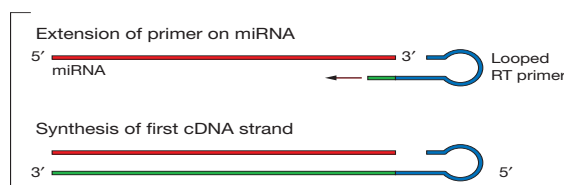
2.7.3 DNase behandling

Alle RNA isolerte prøver ble behandlet med DNA-free™ DNase. DNase kitet er laget for å fjerne kontaminering av DNA i prøvene. Rekombinant DNase I bryter ned DNA ved å kløyve bindingene i DNA-heliksen. DNase inaktiveringsreagens tilsettes for å fjerne DNase enzymet, samt divalente kationer som magnesium og calcium, som kan bindra til å katalysere degraderingen av RNA ved oppvarming (DNA-free 2009).

2.7.4 Revers transkripsjons PCR

Revers transkripsjons PCR (RT-PCR) er en variant av PCR der revers transkriptase (RT) danner et komplementert DNA (cDNA) med RNA som templat. For å kunne starte syntetisering av cDNA er RT avhengig av spesifikke primere, (dette gjelder kun for miRNA, for vanlig RT benyttes polyT komplimentært til poly-A halen på mRNA, og vanligvis random primers i tillegg, som fester seg over alt på RNA (heksomere), nuklotider (dNTP) og buffer som inneholder magnesium. RT-PCR er utført ved syntese av den komplimentære tråden i 30 min ved 42 °C, deretter inaktivering av reversettranskriptase ved 85 °C. Det ble utført RT-PCR med Taqman MicroRNA revers transkripsjons kit og Multiplex RT Human Pool 1 v1.0 som primer pool på alle RNA isolerte prøver. Primer poolen inneholder i alt 48 primere, deriblant primere til microRNA hsa-let-7a (4373169) og SNO RNU 48 (4373383) som benyttes til endogen kontroll.

Taqman MicroRNA revers transkripsjons kitet gir bare revers transkripsjon av modne miRNA og det benyttes spesifikke «hårnål» RT primer (protocol 2010).



Figur 2.5: Binding av «hårnål» RT primer til miRNA og syntese av cDNA.

Ti prøver med konsentrasjon under 20 ng/ μ l ble sentrifugert i en Speedvac vakuumpkonsentratorsentrifuge for å oppnå en høyere konsentrasjon for bruk i RT - kitet. Dette ble utført ved et eksternt laboratorium. Konsentrasjonsmåling ble utført etter vakuump-sentrifugeringen.

2.7.5 Endogen kontroll RNU 48

RNU 48, snoRNA (small nucleolar RNA) ble brukt som endogen kontroll. RNU 48 har vist seg å være en god endogen kontroll, som rikelig mengde detektert og variasjon på tvers av normalt vev og tumorvev. Det ble også gjort et forsøk med RNU 44 som endogen kontroll. For hver enkelt prøve ble det satt opp RNU 48, tilstedeværelse og god kvantifisering av genet viser at PCR reaksjonen har

vært vellykket. Det er viktig at kontrollen har riktig størrelse og den bør være stabilt uttrykt i alle prøver.

2.7.6 Standardkurve miRNA *let-7a*

Kvantitative analyser med ukjente prøver bruker ofte en standardkurve som representerer C_T -verdien, som er funksjonen av log mengde av start materialet.

I en perfekt reaksjon vil antallet amplifiserte kopier doble seg ved hver syklus, og karakteristisk for en standardkurve er en korrelasjons faktor (R^2) 1, og slope - 3,33. Dette vil gi en PCR effektivitet på 100 %. Standardkurven ble laget som en 10 x fortynningsrekke (1000, 100, 10, 1 og 0.1 ng/ul) for normal og tumorsev fra samme pasient. Det ble laget en standardkurve for normalvev, en for tumorsev for miRNA *let-7a* og samme for SNO RNU48 (Appendiks 7.4.1).

2.7.7 Real-time PCR *let-7a*

Realtime PCR med Taqman MicroRNA assays for *hsa-let-7a* (4373169) og RNU 48 (4773383) ble benyttet for deteksjonen av *hsa-let-7a* og RNU 48 i tumor og normalvev. Det ble satt opp duplikater av alle prøver under analyseringen.

2.7.8 Statistisk analyse

Før statistisk analyse av genekspressionsdataene til *let-7a*, ble det beregnet ΔC_T -verdier. Denne beregnes ved $\Delta C_T = C_T (let-7a) - C_T (RNU 48)$. Det ble regnet ut middelværdi, median, standardavvik for ΔC_T - verdiene, samt laget histogram, bokplot og korrelasjonsdiagram. Ikke parametriske analyse med spearman ble også benyttet for å se om det var noen signifikant korrelasjon mellom ΔC_T - verdiene til normal- og tumorsev.

3 Resultat

3.1 *BRAF V600E*

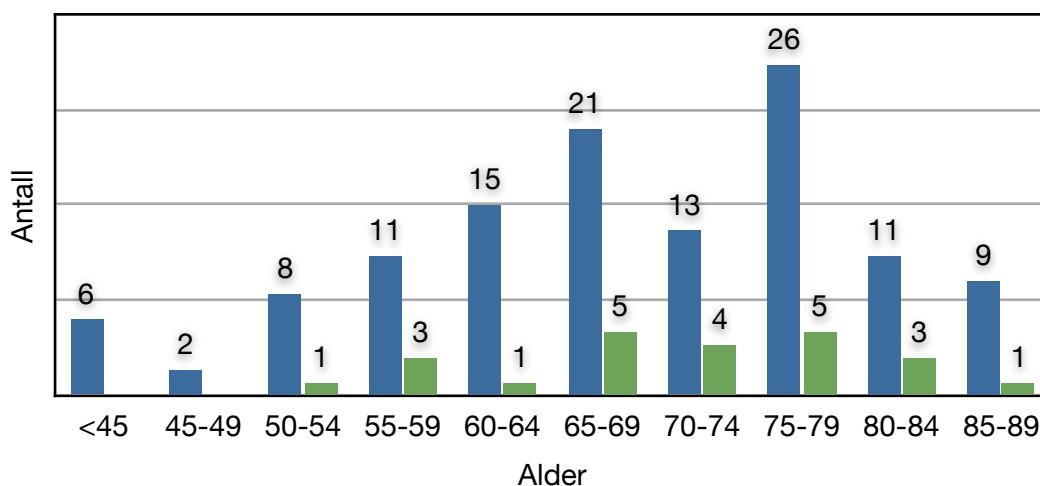
3.1.1 Mutasjonsfrekvens

I mutasjonsanalysen av *BRAF V600E* hadde 18.9 % av studiepopulasjonen en mutert versjon av *BRAF V600E* genet, mens 81.1 % har wt (tabell 3.1). De fleste av studiepopulasjonens mutasjoner forekommer hos kvinner.

Tabell 3.1 Frekvens av *BRAF V600E* mutasjon i studiepopulasjonen.

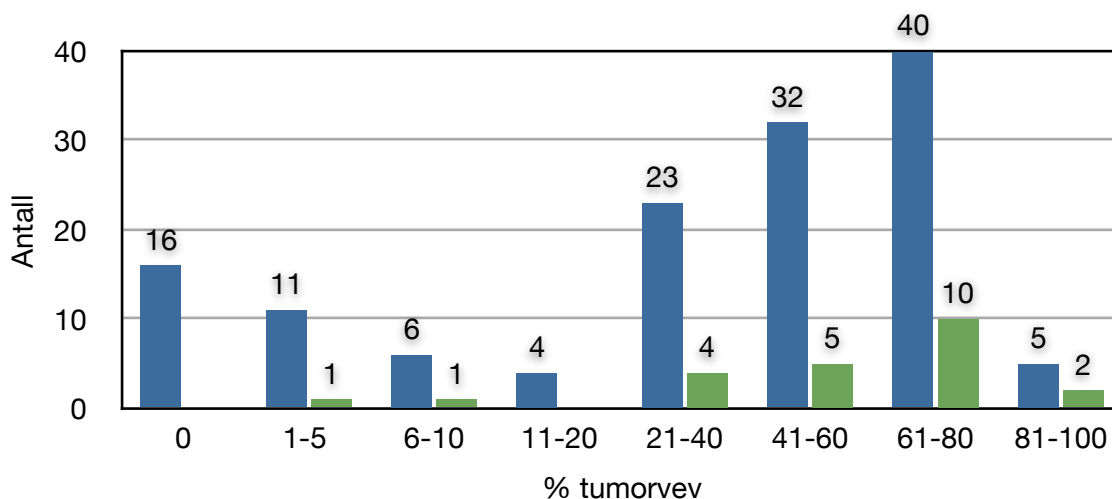
	Totalt		Menn		Kvinner	
	wt	Mutert	wt	Mutert	wt	Mutert
Antall	99	23	6	6	17	17
%	81.1	18.9		26.1		73.9

Aldersfordelingen i studiepopulasjonen, samt alderen på personene med *BRAF V600E* mutasjon blir vist i figur 3.1 som et stolpediagram. En prøve har ikke oppgitt alder og er ekskludert.



Figur 3.1: Blå søyler viser aldersfordelingen i materialet. Grønne søyler viser alderen på personer med *BRAF V600E* mutasjon.

Alle tumorvevsprøver ble vurdert for prosentandel tumorceller, oversikt over studiepopulasjonens fordeling av prosentandelen og andelen mutert *BRAF V600E* i forhold til prosent tumorceller vises i figur 3.2.



Figur 3.2: Fordelingen av prosent tumorvev i studiepopulasjonen. Blå søyler viser totalt antall personer i studiepopulasjonen. Grønne søyler viser antall personer med mutert *BRAF V600E*.

3.1.2 Fordeling av *BRAF V600E* mutasjon i forhold til kjønn og røykestatus

Resultatene fra *BRAF V600E*-analysen viser at 30,4 % av kvinnene og 10,5 % av mennene som røyker har mutasjon i *BRAF V600E*, mens 21,7 % av kvinnene og 0 % av mennene som ikke røyker har *BRAF V600E* (tabell 3.2) 46 av 138 personer besvarte ikke spørsmålet om røykestatus. Antallet personer i hver gruppe er liten, dette påvirker styrken til resultatet.

Tabell 3.2: Andelen kvinner/menn med mutert *BRAF V600E* som røyker/ikke røyker i studiepopulasjonen.

	Kvinner - røyk - mutert <i>BRAF</i>	Menn - røyk - mutert <i>BRAF</i>	Kvinner - ikke røyk - mutert <i>BRAF</i>	Menn - ikke røyk - mutert <i>BRAF</i>
Antall	7	4	5	0
%	30.4	10.5	21.7	0

Resultatene fra regresjonsanalysen viser at det er signifikant flere mutasjoner hos kvinner enn hos menn. Sannsynligheten for at man har en *BRAF* mutasjon når man har kolorektal cancer og er kvinne har en $OD = 3.85$. Røykere har ikke flere *BRAF* mutasjoner enn ikke røykere, $OD = 1.26$ (tabell 3.3) Alderen ved intervensjon viser ingen signifikant sammenheng med *BRAF* mutasjon. Antallet i analysen er liten, dette påvirker styrken til regresjonsanalysen.

Tabell 3.3: Tabellen viser sammenhengen mellom *BRAF V600E*, kjønn, alder og røykestatus. OR og P-verdier fra regresjonsanalysedataene ved 95% konfidensintervall. a) *BRAF* splittet mot kjønn, kjønn og alder. b) *BRAF* splittet mot røyk, røyk og alder.

a)	Kjønn	Kjønn	Alder
OR	3.85	3.99	0.99
P	0.009	0.008	0.6

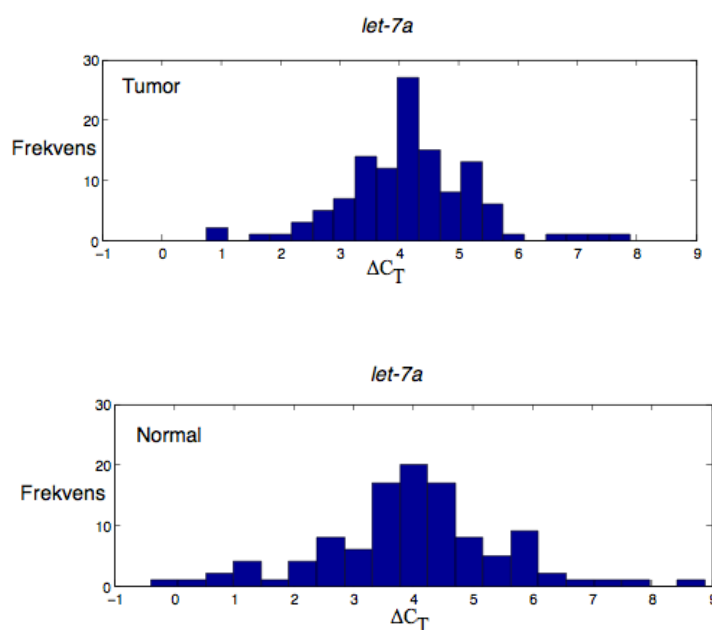
b)	Røyk	Røyk	Alder
OR	1.26	1.32	0.99
P	0.701	0.645	0.622

3.2 miRNA let-7a

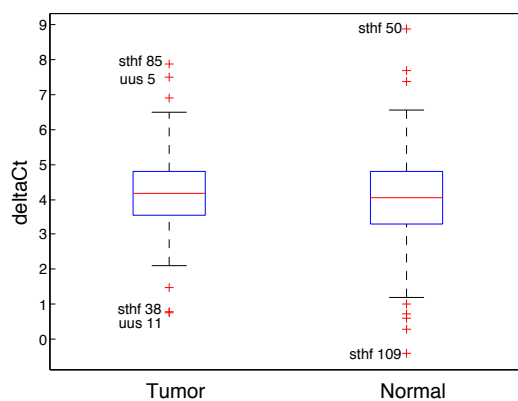
Analyse av genekspressjonsdataene ved utregning av ΔC_T viser ett tilnærmet lik gjennomsnittsverdi for tumorvev og normalvev, med standardavik på henholdvis 4.4 og 3.4. Både normalvev og tumorvevet viser en tilnærmet normalfordeling av materialet (figur 3.3). Det vises ingen tydelig korrelasjon $\text{korr} = 0.1433$, $\text{pval} = 0.1371$ mellom normalvev og tumorvev (figur 3.5). Grafisk sammenligning av median og minste og største observasjon i materialet er vist i boksplot (figur 3.4). «Utelligere» er markert med kryss i boksplotet og merket med prøvenummer. Det er en vevsprøve fra samme pasient der både normal- og tumorvevet er «utelligere».

Tabell 3.4: Oversikt over mean, std, median og mode for ΔC_T -verdier til *let-7a* i normal- og tumorvev.

	Tumorvev	Normalvev
Mean	4.1714	3.9929
Std	4.3950	3.4950
Median	4.1800	4.0600
Mode	4.3950	3.4950



Figur 3.3: Fordelingen av ΔC_T -verdier for *let-7a* i normal- og tumorvev.



Figur 3.4: Boksplot som viser median, med øvre og nedre kvartil for normal- og tumorvev.

Tabell 3.5: Oversikt over hvilke prøver som er «uteliggerne» i boksplotet.

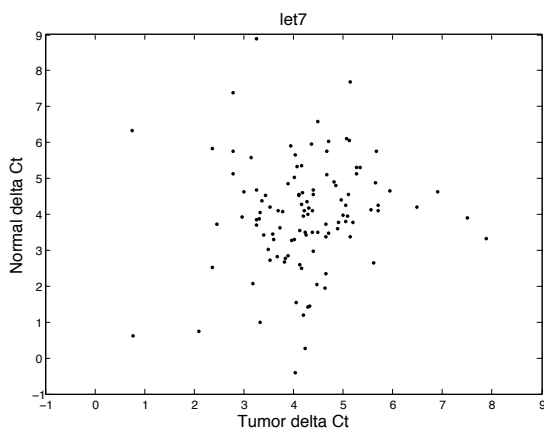
Tumorvev		Normalvev	
< 2.095 ΔC_T -verdi	> 6.49 ΔC_T -verdi	< 1.205 ΔC_T -verdi	> 6.57 ΔC_T -verdi
UUS 11	UUS 5	UUS 3	UUS 25
Sthf 38	UUS 31	UUS 8	UUS 30
Sthf 122	Sthf 85	UUS 11	UUS 50
		UUS 29	
		Sthf 109	

Kommentarer hentet ut fra loggen utført under snitteprosessen til uteliggerne. Prøvene vist under var de eneste med kommentarer, resterende hadde ingen kommentar og innholdt over over 5 % tumorceller.

Sthf 85, UUS 3, UUS 50, UUS 109, UUS 8; snittet liten vevsbit.

Sthf 38: Inneholder 1 % tumorceller.

Sthf 122: Inneholder 5 % tumorceller.



Figur 3.5: Korrelasjonsdiagram for ΔC_T -verdier for *let-7a* i tumorvev og normalvev. Spearman corr: 0.1433, p: 0,137.

4 Diskusjon

4.1 *BRAF V600E*

Hensikten med første del av masterstudien var å undersøke frekvensen av *BRAF V600E* mutasjoner i tumorvev fra kolorektal cancer pasienter, og se på sammenhengen mellom frekvensen av mutasjonen og faktorene alder, kjønn og røykestatus.

Studien viste en forekomst av mutert *BRAF V600E* på 18,9 % i studiepopulasjonen. Blant mennene hadde 26,1 % mutert *BRAF V600E*, mens hos kvinnene var andelen 73,9 %. Studiepopulasjonen bestod av 51,6 % menn og 47,5 % kvinner med en gjennomsnittsalder på 67,9 år. Alderen ved intervensjon viser ingen signifikant sammenheng med mutert *BRAF V600E*, men viser at det er signifikant flere mutasjoner hos kvinner enn hos menn. Sannsynligheten for at man har en *BRAF V600E* mutasjon når man har kolorektal cancer og er kvinne har en OD 3,85.

Resultatet av denne masterstudien viser en høyere mutasjonsfrekvens av *BRAF V600E* sammenlignet med andre studier (tabell 1.1). Studiene som det er sammenlignet med har mutasjonsfrekvenser mellom 3 % og 27 %, hvor hovedandelen ligger på rundt 10 % (tabell 1.1).

En av grunnene til denne masterstudiens høye mutasjonsfrekvens i forhold til andre studier kan skyldes metoden. *BRAF V600E* multipleks real-time PCR reaksjon er en sensitiv metode og kan detektere mutasjoner i prøver med lav andel tumorceller (Hamfjord, Stangeland et al. 2011). Hovedandelen mutasjoner forekommer i prøver med 40-80 % tumorvev (figur 3.2). Ser man på fordelingen av hele studiepopulasjonen i forhold til andel tumorvev, ligger også flesteparten av prøvene i området 40-80 % tumorvev. I tumorvev er andelen celler med somatisk mutasjon ofte lav, og det er ikke sikkert at alle tumorcellene har mutasjonen selv om de er tumorceller. En sensitiv metode vil kunne detektere mutasjoner i vevsprøver med lav andel tumorceller. Allelisk diskriminering (AD) er en av metodene andre studier har brukt (Laurent-Puig, Cayre et al. 2009; De Roock, Claes et al. 2010). Her detekteres forekomsten av to alleler, man er enten homozygot for et av allelene eller heterozygot. Denne metoden er ikke like godt egnet til deteksjon av somatiske mutasjoner i vevsprøver som en multipleks real-time PCR. I denne masterstudien er det detektert mutert *BRAF V600E* i prøver med henholdsvis 5 % og 10 % tumorceller. Metoden er sensitiv og klarer å detektere prøver i området med 5-10 % tumorceller. Hver enkelt prøve ble undersøkt for

andelen tumorceller. 16 tumorprøver inneholdt ikke tumorceller, disse ble ekskludert fra studien. Undersøkelse av andelen tumorceller i vevsprøvene er viktig, da dette kan være en feilkilde som kan påvirke mutasjonsfrekvensen.

Kvaliteten på vevsprøvene er viktig. Dersom vevsprøvene har blitt oppbevart for varmt før nedfrysning, eller at de har blitt tint opp i forbindelse med vevssnitteprosessen kan dette føre til dårlig kvalitet på vevet. Både DNA, RNA og miRNA kan degraderes. RNA er mest ustabil, mens DNA og miRNA er nokså stabilt (Jung, Schaefer et al. 2010). Dårlig kvalitet på DNA kan påvirke real-time PCR analysene. Kontaminering fra andre vevprøver under snitteprosessen er mulig, og kan påvirke kvaliteten til vevssnittene. Det er lite sannsynlig at kontaminering har skjedd i denne studien, da det har vært et sterkt fokus på kontamineringsfare og renhold av fyrsemikrotomen.

I denne masterstudien består studiepopulasjonen av vevsmateriale fra 139 pasienter. Dette er et lavere antall enn hovedandelen av studiene det er sammenlignet med i tabell 1.1. Tre studier har lavere studiepopulasjon. Dersom man ser på Samowitz, Albertsen *et al* sin studie har den en studiepopulasjon på 1271 pasienter, mens Di Nicolantonio, Martini *et al* har 113 pasienter i sin studiepopulasjon.

Problemet med å ikke ha en relativ stor studiepopulasjon oppstår ved bruk av statistiske analyser. Mange statistiske analyser krever en viss mengde data for at resultatet av analysen skal bli signifikant. I studier med liten studiepopulasjon, oppstår det problemer om man ønsker å dele inn populasjonen ytterligere i mindre grupper. Disse gruppene blir da ofte bestående av et lite antall som svekker signifikansen av resultatet. Et eksempel er denne masterstudien, der det er sett på andelen kvinner/menn med mutert *BRAF V600E* som røyker/ikke røyker. Her er antallet kvinner med mutert *BRAF V600E* som røyker 7, og i gruppen for menn 4. Dette er relativt lave antall i hver gruppe, noe som svekker resultatet. Ideelt sett burde studiepopulasjonen vært betraktelig større for å styrke resultatene ytterligere.

Det er studier som viser lav frekvens av *BRAF V600E* helt ned i 3 % (Laurent-Puig, Cayre et al. 2009). En av grunnene til dette kan skyldes studiepopulasjonen. I denne studien består studiepopulasjonen av 173 pasienter som har gjennomgått kjemoterapi før behandling med cetuximab. Laurent-Puig, Cayre *et al* sier at en årsak til lav mutasjonsfrekvens kan være at pasienter med *BRAF V600E* mutasjoner ikke har levd lenge nok til at de har blitt med i studien

(Laurent-Puig, Cayre et al. 2009). Det er i denne studien brukt allelic discrimination (AD) som metode. Både metoden og studiepopulasjonens utvalget kan være årsaker til at denne studien har en lavere mutasjonsfrekvens sammenlignet med andre studier. En større undersøkelse med 773 pasienter med kolorektal cancer behandlet med cetuximab fra 7 land i europa viser en mutasjonsfrekvens for *BRAF V600E* på 4,7 % (De Roock, Claes et al. 2010). Det er brukt i denne studien brukt AD som metode. En annen studie viser også en *BRAF V600E* mutasjonsfrekvens på 4,7 %. Studiepopulasjonen består av 319 pasienter fra Japan, og det er brukt real-time PCR som metode (Yokota, Ura et al. 2011).

En europeisk studie har undersøkt *BRAF V600E* mutasjonsstatusen til 113 pasienter med metastatisk kolorektal cancer behandlet enten med cetuximab eller panitumumab. Sekvensering ble brukt som metode, og resultatene viser at 10 % av studiepopulasjonen har mutert *BRAF V600E*. (Di Nicolantonio, Martini et al. 2008). En studie med større studiepopulasjon på 1271 pasienter har 9,7 % mutert *BRAF V600E*, metoden som ble brukt var sekvensering (Samowitz, Albertsen et al. 2006). Andre studier der det er brukt sekvensering som metode viser en mutasjonsfrekvens på henholdsvis 15 % og 7% (Loupakis, Ruzzo et al. 2009; Baldus, Schaefer et al. 2010). Sammenligner man metode mot mutasjonsfrekvens i disse studiene, viser det ikke noen tydelig sammenheng mellom sekvensering som metode og mutasjonsfrekvensen som er funnet. Mutasjonsfrekvensen varierer fra 7 % til 15 %, mens metoden er den samme.

Det er en kjent sammenheng mellom kolorektal cancer og kjønn, kvinner har en høyere insidens enn menn (Bray, Wibe et al. 2007). Personer over 50 år har en hyppigere forekomst av kolorektal cancer enn yngre (Souglakos 2007). I en populasjonsbasert cohort studie i USA der studiepopulasjonen bestod av 555 kvinner mellom 55-69 år viser en *BRAF V600E* mutasjonsfrekvens på 27 % (Limsui, Vierkant et al. 2009). Resultatene til Limsui, Vierkant et al, viser en høy mutasjonsfrekvens, en forklaring på dette kan være at studiepopulasjonen består kun av kvinner mellom 55-69 år. Resultatene fra denne masterstudien viser en sammenheng mellom *BRAF V600E* mutasjon og kjønn. Sannsynligheten er høyere for å ha mutasjonen om man er kvinne.

Det er en assosiasjon mellom røykestatus og *BRAF V600E* mutasjon (Samowitz, Albertsen et al. 2006; Limsui, Vierkant et al. 2009). En populasjonsbasert studie med 1271 pasienter fra Utah og Minnesota, har en *BRAF V600E* mutasjonsfrekvens på 9,7 %. Studien viser at det er en assosiasjon mellom røyking og økt risiko for kolorektal cancer som er har utbredt metylering av CpG-øyer (CIMP) og/eller har *BRAF V600E* mutasjon uavhengig om tumoren er mikrosatelittstabil eller mikrosatelittinstabil (MSI) (Samowitz, Albertsen et al. 2006). MSI oppstår ofte når feil antall baser bygges inn i de repeterende sekvensene som mikrosatelittene består av. MSI er også assosiert med sigarettøyk i sporadiske kolorektal cancer (Limsui, Vierkant et al. 2009) De fleste tilfeller av MSI har også CIMP, og av disse tumorene har ofte *BRAF V600E* mutasjon. Det er også vist at røykere har statistisk større risiko for kolorektal cancer med både MSI, CIMP og mutert *BRAF V600E* enn ikke røykere (Limsui, Vierkant et al. 2009).

Resultatene i denne masteroppgaven viser at røykere ikke har høyere frekvens av mutert *BRAF V600E* enn ikke røykere (OD 1,26). Studiepopulasjonens antall svekker styrken til den statiske analysen, da det er få personer i hver enkelt gruppe, som forklart tidligere i diskusjonen.

I følge spørreundersøkelsen gjennomført av alle som deltok i studien, var det 92 personer som besvarte spørsmålet om røykestatus. Av disse var over halvparten (66,3 %) røykere. Ser man på *BRAF V600E* mutasjonsstatus hos røykerne viser det seg at 30,4 % av kvinnene og 10,5 % av mennene har mutasjonen. Mens det er 21,7 % av kvinnene og ingen av mennene som ikke røyker som har mutasjonen. Det er altså en relativt høy prosent av kvinner som røyker med mutert *BRAF V600E*, sett i forhold til at det er færre kvinner (37,7 %) enn menn (62,3 %) som i utgangspunktet var røykere. Studien til Limsui, Vierkant *et al* der studiepopulasjonen kun består av kvinner viser en assosiasjon mellom *BRAF V600E* mutasjon og røykestatus. Denne studiens resultat samsvarer noe med resultatet i masterstudien. Men man kan ikke på grunn av lav studiepopulasjon, trekke noen sikker konklusjon.

En studie med 106 pasienter med grad II kolorektal cancer og 258 pasienter med grad III kolorektal cancer, viser en *BRAF V600E* mutasjonsfrekvens på 22 % for grad II og 19 % for grad III (Farin˜ a-Sarasqueta, van Lijnschoten et al. 2010). Grad II pasientene ble bare behandlet med kirurgi, mens grad III pasientene ble behandlet med kirurgi og kjemoterapi. Det er et interessant funn at frekvensen av mutasjonen varierer med hvilken grad tumoren har, da dette kan være med å påvirke

mutasjonsfrekvensen i mange studier. Loupakis, Ruzzo et al sin studie som har KRAS wt som studiepopulasjon viser en mutasjonsfrekvens på 15,2 % (Loupakis, Ruzzo et al. 2009). Begge studier har brukt real-time PCR som metode. Tallene fra disse studiene viser en mutasjonsfrekvens som er noe lik mutasjonsfrekvensen på 18,9 % som er funnet i denne masterstudien.

4.2 miRNA *let-7a*

miRNA er den største klassen av genregulatorer (Slaby, Svoboda et al. 2009). I kolorektal cancer er det funnet endringer i miRNA-ekspressjonen for ulike miRNA i normalvev og tumorvev. *let-7a* er et av de, og det viser seg at genområdet *let-7a* er lokalisert på ofte er deletert i kolorektal cancer (Akao, Nakagawa et al. 2006). Hensikten med den andre delen av studien var å se om det fantes noen forskjell i genekspressjonen for miRNA *let-7a* mellom normal- og tumorvev i kolorektal cancer.

Genekspressjons analysen viste at det ikke var noen signifikant forskjell for uttrykket av *let-7a* i normalvev og tumorvev. ΔC_T -verdiene viste gjennomsnitt på 4.17 for normalvevet og 3.99 for tumorvevet, dette er tilnærmet likt. Både normalvevet og tumorvevet hadde normalfordelte data. Ikke parametrisk analyse med Spearmans variasjonskoeffisient viste heller ingen signifikant korrelasjon mellom de to variablene, normalvev og tumorvev. Boks-plottet (figur 3.4) viser at det er noe variasjon innad i tumorvev og normalvev. Det er markert 6 «uteliggere» for tumorvev og 8 for normalvev (tabell 3.5) Disse «uteliggerne» med avvikende resultat fra resten av datamengden, ble undersøkt videre. Kunne disse forklares med en eventuell metodisk feil som kunne spores tilbake til for eksempel snitteprosessen, isoleringsprosessen eller real-time PCR analysen? Det kunne også være interessant å se om det er tumorvev og normalvev fra samme pasient som var «uteliggere»?

Det viste seg at det var en prøve fra samme pasient som var uteligger både på tumorvev og normalvev, denne prøven hadde en lavere ΔC_T -verdi både for normalvevet og tumorvevet. Og kan muligens forklares med at denne pasienten har naturlig lav ekspressjon av miRNA *let-7a* i både normal- og tumorvev.

Dersom man ser på spredningen av «uteliggerne» i normalvevet i forhold til tumorvevet (figur 3.4), kan det se ut som at normalvevet har en litt større spredning. Det er mulig at normalvevet har en naturlig større variasjon enn tumorvevet. Dette kan muligens skyldes biologisk variasjon i vevet. To av «uteliggerne» var vevsprøver som inneholdt henholdsvis 1 % og 5 % tumorceller i tumorvevet, disse fikk en lav ekspresjon av miRNA *let-7a*. Disse prøvene inneholder få tumorceller, og man kan da anta at de inneholder endel normale celler. Det er interessant å se at disse prøvene med lav andel tumorceller og lav ekspresjon av *let-7a* muligens kan ha noe med at de inneholder normalceller. Og siden spredningsmøsteret til normalvevet er noe større enn tumorvevet, kan man muligens se en tendens til at disse to prøvene kan passe inn blant normalvev prøvene.

Under snitteprosessen ble det ført loggbok og angitt hvor store vevsbiter som ble snittet. Fem av «uteliggerne» viste seg å ha kommentaren små vevsbiter, dette er altså vevsbiter som er under gjennomsnittet små. Det er usikkert å si noe om dette har en betydning for at de har havnet som «uteliggere», da flestparten av prøvene som er snittet fra små vevsbiter ikke er «uteliggere».

Det er vanskelig å trekke noen sikker konklusjon rundt «uteliggerne». Det var her ikke noen klar sammenheng mellom «uteliggere» som kunne spores tilbake til en eventuell metodisk feil. En forklaring kan være at det er en biologisk variasjon mellom uttrykket av *let-7a* mellom normalvev og tumorvev. Men man kan ikke på grunnlag av disse observasjonene trekke noen tydelig konklusjon rundt denne observasjonen.

let-7 er med på regulere RAS. I tumorvev fra lunge er det sett at nivået av RAS er signifikant høyere enn i normalvev fra lunge (Johnson, Grosshans et al. 2005). Og man vil dermed anta at *let-7* nivået i tumorvev også er endret. En studie viser redusert uttrykk av *let-7a* i kolorektal cancer, to av seks undersøkte humane tumorer og en av tre cellelinjer viser redusert uttrykk av *let-7a* (Akao, Nakagawa et al. 2006). Andre studier som har undersøkt *let-7 a/b/c* finner ingen endring i ekspresjonen mellom normalvev og tumorvev i kolorektal cancer. Men de viser til at ekspresjonen til miRNAene; miR-143, mi-145 miR-126, miR-133b er nedregulert i tumorvev. Samt at flere miRNA er oppregulert som for eksempel; miR-31, miR-96, mir-135 og miR-185 (Michael, SM et al. 2003; Schepeler, Reinert et al. 2008; Bartels and Tsongalis 2009). For videre studie kunne vært interessant å undersøkt genekspresjonsprofilen til alle miRNA i normal- og tumorvev fra kolorektal cancer for en større studiepopulasjon.

5 Konklusjon

Studien viser høyere frekvens av *BRAF V600E* mutasjonen i studiepopulasjonen fra KAM -studien, sammenlignet med andre studier. Sannsynligheten er større for å ha mutasjonen om du er kvinne. Det sees ingen signifikant sammenheng mellom alder, røykestatus og mutasjon i *BRAF V600E*. Lavt prøveantall er med på å svekke den statistiske analysen i studien.

Det vises ingen signifikant forskjell i ekspresjonsnivået til miRNA *let-7a* i normal- og tumorvev fra kolorektal cancer pasienter i KAM-studien.

6 Referanser

- Akao, Y., Y. Nakagawa, et al. (2006). "let-7 MicroRNA Functions as a Potential Growth Suppressor in Human Colon Cancer Cells." Biol. Pharm. Bull **903-906**
- Applied, B. (2010). "Taqman Gene Expression Assay Protocol."
- Baldus, S. E., K.-L. Schaefer, et al. (2010). "Prevalence and Heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations in Primary Colorectal Adenocarcinomas and Their Corresponding Metastases." Clin Cancer Res February **February 1, 2010 16; 790** (10.1158/1078-0432.CCR-09-2446).
- Bartels, C. L. and G. J. Tsongalis (2009). "MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer." Clin Chem **55(4): 623-31.**
- Benvenuti, S., A. Sartore-Bianchi, et al. (2007). "Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies." Cancer Res **67(6): 2643-8.**
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, et al. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." RNA **10(2): 185-91.**
- Borchert, G. M., W. Lanier, et al. (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." Nat Struct Mol Biol **13(12): 1097-101.**
- Bray, F., A. Wibe, et al. (2007). "[Epidemiology of colorectal cancer in Norway]." Tidsskr Nor Laegeforen **127(20): 2682-7.**
- Cai, X., C. H. Hagedorn, et al. (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA **10(12): 1957-66.**
- Caldas, C. and J. D. Brenton (2005). "Sizing up miRNAs as cancer genes." Nat Med **11(7): 712-4.**
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **99(24): 15524-9.**
- Calvert, P. M. and H. Frucht (2002). ""The genetics of colorectal cancer."." Ann Intern Med **137(7): 603-12.**
- Calvert, P. M. and H. Frucht (2010). "Molecular genetics of colorectal cancer."
- Chial, H. (2008). "Genetic Regulation of Cancer." Nature.
- ClinicalTrials.gov. (2005). "ClicalTrials.gov." from <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00119912>.

- De Roock, W., B. Claes, et al. (2010). "Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis." Lancet Oncol **11**(8): 753-62.
- Di Nicolantonio, F., M. Martini, et al. (2008). "Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer." Journal of Clinical Oncology **Vol 26, No 35 (December 10), 2008**: pp. 5705-5712.
- Dibb, N. J., S. M. Dilworth, et al. (2004). "Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family." Nat Rev Cancer **4**(9): 718-27.
- DNA-free, p. (2009). "DNA-free™ Kit protocol."
- DNAHandbook, E. (2009). "EZ1® DNA Tissue Handbook."
- Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." Nat Rev Cancer **6**(4): 259-69.
- Faber, C., T. Kirchner, et al. (2009). "The impact of microRNAs on colorectal cancer." Virchows Arch **454**(4): 359-67.
- Farin˜ a-Sarasqueta, A., G. van Lijnschoten, et al. (2010). "The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients." Oxford University Press, Annals of Oncology **original article doi:10.1093/annonc/mdq258**.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Giovannucci, E. (2001). "An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(7): 725 - 731.
- Goel, A. and C. R. Boland (2010). "Recent Insights into the Pathogenesis of Colorectal Cancer." Curr Opin Gastroenterol. ;**26**(1):47-52.
- Gondal, G., T. Grotmol, et al. (2003). "The Norwegian Colorectal Cancer Prevention (NORCCAP) screening study: baseline findings and implementations for clinical work-up in age groups 50-64 years." Scand J Gastroenterol **38**(6): 635-42.
- Hamfjord, J., A. M. Stangeland, et al. (2011). "Wobble-enhanced ARMS Method for Detection of KRAS and BRAF Mutations." Diagn Mol Pathol **20**(3): 158-65.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
- Haug, K. B. F. "microRNA (miRNA)- nye veier innen regulering av genekspressjon." Power point presentasjon.

- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-31.
- <http://globocan.iarc.fr>. (2010). "<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#BOTH>."
- Isolation-protocol (2009). "mirVanaTM miRNA Isolation Kit Protocol."
- Johnson, S., H. Grosshans, et al. (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." Cell **2005 Mar 11**;120(5):635-47.
- Jung, M., A. Schaefer, et al. (2010). "Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples." Clin Chem **56**(6): 998-1006.
- Kiernan JA (2008). Histological and histochemical methods: theory and practice.
- Kim, V. N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 376-85.
- Kreftregisteret. (2009). "Cancer in Norway 2009, Cancer Registry of Norway, Institute of population based cancer research."
- Kreftregisteret. (2009). "Cancer in Norway 2009, Cancer Registry of Norway, Institute of population based cancer research."
- Kure, E. (2008). "Protokoll for praktisk gjennomføring av tarmkreftprosjekt på Ullevål Universitetssykehus. Pasienter med kolorektal cancer som opereres på UUS."
- Laurent-Puig, P., A. Cayre, et al. (2009). "Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer." J Clin Oncol **27**(35): 5924-30.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-54.
- Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-60.
- Limsui, D., R. A. Vierkant, et al. (2009). "Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes." J Natl Cancer Inst **102**(14): 1012-22.
- Lodish, H. (2003). Molecular cell biology. New York, Freeman.
- Loupakis, F., A. Ruzzo, et al. (2009). "KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer." Br J Cancer **101**(4): 715-21.
- Lu, J., G. Getz, et al. (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." Nature **435** (7043): 834-8.
- Michael, M. Z., O. C. SM, et al. (2003). "Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia." Mol Cancer Res **1**(12): 882-91.

- Nakajima, G., K. Hayashi, et al. (2006). "Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer." Cancer Genomics Proteomics **3** (5): 317-324.
- NanoDrop (2009). "NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual."
- Pierce, B. A. (2003). Genetics : a conceptual approach. New York, Freeman.
- protocol, m. (2010). "Taqman MicroRNA Assays protocol."
- Protocol, R. (2010). "TaqMan® RNase P Control Reagents (VIC)."
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, et al. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res **14**(10A): 1902-10.
- Roush, S. and F. J. Slack (2008). "The let-7 family of microRNAs." Trends Cell Biol **18**(10): 505-16.
- Rozek, L. S., C. M. Herron, et al. (2010). "Smoking, gender, and ethnicity predict somatic BRAF mutations in colorectal cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(3): 838-43.
- Samowitz, W. S., H. Albertsen, et al. (2006). "Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer." J Natl Cancer Inst **98**(23): 1731-8.
- Schepeler, T., J. T. Reinert, et al. (2008). "Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer." Cancer Res **68**(15): 6416-24.
- Schwarz, D. S. (2006). "Unraveling the Mysteries of Small RNAs." sciencemag.
- Sharma, S. G. and M. L. Gulley (2010). "BRAF mutation testing in colorectal cancer." Arch Pathol Lab Med **134**(8): 1225-8.
- Slaby, O., M. Svoboda, et al. (2009). "MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application." Mol Cancer **8**: 102.
- Solberg Lavik, L. A. and W. Sjørusen (2009). "Molekylærgenetiske analyser ved utredning av arvelig kolorektal cancer." Bioingeniøren **6/7 2009**: 6-13.
- Souglakos, J. (2007). "Genetic Alterations in Sporadic and Hereditary Colorectal Cancer: Implementations for Screening and Follow-Up." Digestive Diseases Dig Dis **2007;25:9-19**
- Suehiro, Y., C. W. Wong, et al. (2008). "Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma." Clin Cancer Res **14**(9): 2560-9.
- Sæbø, M. and C. Furu Skjelbred (2009). "Ph.D Thesis. Colorectal Carcinogenesis: Genetic Susceptibility and Enviromental Impact."
- Sæbø, M., C. Skjelbred, et al. (2006). "Association between cigarette smoking, APC mutations and the risk of developing sporadic colorectal adenomas and carcinomas." BMC Cancer **6**(1): 71.

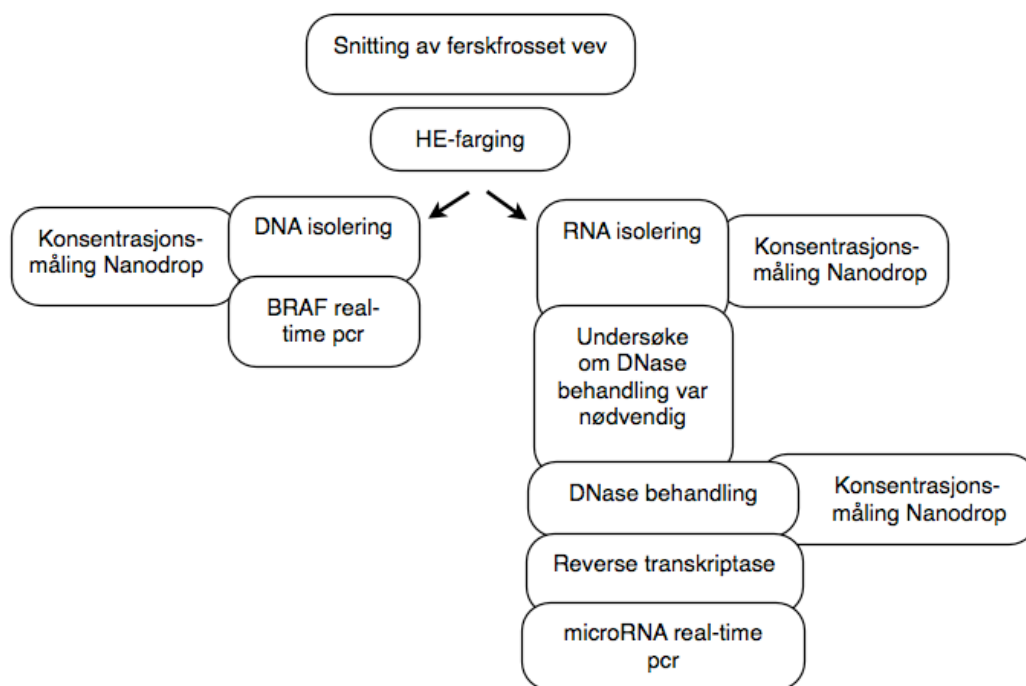
- Søreide, K. (2007). "Genetikk og molekylær klassifisering ved kolorektal kreft." Tidsskrift for Den norske legeforening **2007**; **127**:2818-23.
- Tarmkreftundersøkelse, S. (2003). "Spørreskjema; Tarmkreftundersøkelse: Kolorektal kreft, arv og miljø."
- Vandrovcova, J., K. Lagerstedt-Robinson, et al. (2006). "Somatic BRAF-V600E mutations in familial colorectal cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(11): 2270-3.
- Vaughn, C. P., S. D. Zobel, et al. (2011). "Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer." Genes Chromosomes Cancer **50**(5): 307-12.
- Xi, Y., A. Formentini, et al. (2006). "Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer." Biomark Insights **2**: 113-121.
- Y Kim, R., H. Xu, et al. (2011). "The Future of Personalized Care in Colorectal Cancer: Current Colorectal Cancer Genetic Biomarkers." Medscape news.
- Yokota, T., T. Ura, et al. (2011). "BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer." British Journal of Cancer **104**, 856-862 (1 March 2011) | doi:10.1038/bjc.2011.19 **104**, **856-862** (1 March 2011)(| doi:10.1038/bjc.2011.19).
- Zeng, Y. (2006). "Principles of micro-RNA production and maturation." Oncogene **25**(46): 6156-62.
- Zhang, B., X. Pan, et al. (2007). "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." Elsevier.

Internettside:

www.mirbase.org

7 Appendiks

7.1 Flowskjema arbeid



7.2 Prosedyrer

7.2.1 Snitting av ferskfrosset vev på frysemikrotom

VIKTIG! Vevet og snittene må holdes frosset hele tiden, det er derfor også viktig at alt utstyr som kommer i kontakt med vevet og mikrotomet holdes så kaldt som mulig!

Fremgangsmåte

1. Merk 10 stk. 1,5ml mikrorør per prøve til oppbevaring av vevssnittene. Benytt merkelapper som tåler -80 °C (Brady TLS 2200). Gjør klar til det antall prøver det skal jobbes med denne økten. Eksempel på merking av rør: CRC-UUS 1, B0317783, Tumor, rør 1. Lokket på rørene merkes UUS 1.
2. Sett de merkede rørene i «Sarstedtesker» og plasser dem i -80 °C fryser, slik at de blir tilstrekkelig avkjølt til de skal brukes.
3. Finn fram en isoporboks med rikelig tørris. Overfør aluminiumsboksene med vevsbitene som skal snittes, stativet og «Sarstedtesken» med mikrorørene til isoporboksen.

4. Gjør klar frysemikrotom: Tørk bort alt løst vev inni mikrotomet, vask nøye alle overflater med sprit for å hindre forurensning av prøven. Kalde overflater kan kun vaskes med sprit da vann fryser, ellers vaskes utstyr først med vann og så med sprit. Pass på å hold lokket mest mulig lukket for å holde temperaturen så lav som mulig.
5. Legg cellostoffer i beholderen som samler opp "vevsavfall" og under utstyret som brukes til å berøre snittene.
6. Legg inn tørris for plassering av stativet med mikrorørene, slik at vevssnittene kan oppbevares på $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ etter at de er skåret.
7. Vask på nytt med sprit på "snittsamleplaten", "soppen" og "soppholderen".
8. Fyll ut loggskjemaet for registrering av prøvene som skal snittes.
9. Merk objektglass til HE-snitt, Eksempel: CRC UUS 1, HE, dato, Tumor A/B og signatur
10. Bytt hansker for å unngå kontaminering.
11. Ta esken og stativet inn i frysemikrotomen, flytt raskt mikrorør 1-10 for den vevsbiten som skal snittes fra esken til stativet.
12. Ta ut aluminiumsboksen med vevsbiten fra isoporboksen med tørris og sett den umiddelbart inn på tørrisen i frysemikrotomen.
13. Monter vevsbiten på «soppen» med Tissue-Tek spesiallim, velg hensiktsmessig snittflate på bakgrunn av hvor man kan få representative snitt der minst mulig av vevet trimmes bort.
14. Monter engangs mikrotomkniv, vær sikker på at mikrotomen står i låst posisjon. Viktig å bytte kniv mellom hver prøve.
15. Fininnstill blokken slik at du treffer hele snittflaten. Vær forsiktig under denne prosessen slik at ikke unødvendig vev skjæres bort.
16. Lag ett snitt på $5\text{ }\mu\text{m}$ som strekkes mest mulig ut på "snittsamleplaten", legg objektglasset merket til HE-farging raskt ned på snittet slik at dette festes til objektglasset. Dette snittet skal være mest mulig fritt for bretter og rifter (slik at type vev og tumorandel kan bedømmes).
17. Lag 10 snitt à $10\text{ }\mu\text{m}$, samle disse forsiktig sammen med syl og overfør raskt til et mikrorør. Hold kun i rørets lokk ved overføring av snittene. Berør rørene så lite som mulig, slik at temperaturen ikke stiger og snittene ikke blir degradert. Gjenta denne prosessen for alle de 10 rørene som er merket for den aktuelle prøven.
18. Lag et nytt snitt på $5\text{ }\mu\text{m}$ til HE-farging og plasser det på samme objektglass som det første, slik at type vev og tumorandel kan bedømmes både før det ble samlet til rør 1 og etter at det ble samlet til rør 10.
19. Det frosne limet med vevsbiten demonteres fra soppen, og vevsbiten løsnes meget forsiktig fra limet ved hjelp av engangsskalpell. Legg vevsbiten tilbake i aluminiumsboksen. Pass på å ikke skade vevet og sørg for å holde vevet frosset hele tiden!
20. Legg aluminiumsboksen med vevsbiten og mikrorørene med snitt raskt tilbake i isoporboksen med tørris.
21. Før neste prøve: vask alle overflater med sprit og skift cellostoffer i "vevsavfall"- beholderen. Vask pinsett og syl med vann og sprit.
22. Rengjøre alle flater ved dagens slutt og rydd utstyret. Mikrotomet skal være i slik stand at den raskt skal kunne brukes til frysensnitt, så mikrotomkniven skal stå montert.
23. Overfør alle mikrorørene og vevsbitene fra isoporboksen til $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fryseren så raskt som mulig. Vevsbitene settes tilbake på plass i sine respektive bokser, og mikrorørene fordeles etter rønummer (1-10) i ti esker merket med settnummer.

24. Farging av snitt: Se egen prosedyre. Snittene til farging kan settes kjølig, 4-8 °C opptil 2 netter før farging. Snittene bør stå i romtemperatur så kort tid som mulig.

OBS: Dersom det kommer frysensnitt (øyeblikkelig hjelp) må mikrotomet klargjøres for dette så raskt som mulig. Skjer dette mens man holder på med en prøve kan «soppen» med vevsbiten settes ”opp ned” i aluminiumsboksen slik at prøven ikke kontamineres, da dette går raskere enn demontering. Tørris og stativ med rør kan eventuelt settes i isoporesken. Still «soppholderen» i nøytral posisjon og la mikrotomkniven stå montert.

Viktig: Ha alltid bare en prøve med tilhørende rør inne i mikrotomen.

7.2.2 Hematoxylin-Eosin (HE) farging av vevssnitt

1. Snittene settes 1 time ved 37 °C varmeskap eller på kjølerommet 4 °C over natt for tørking.
2. Fikser i 1:1 eter:etanol i 5 minutter.
3. Skyll i vann.
4. Farg 1- 2 min i Hematoxylin (avhenger av hvor nylaget Hematoxylinen er).
5. La stå i rennede lunket vann for «blåning» i 10 min.
6. Skyll kort i 70 % etanol, og dypp ca. 15 ganger i Eosin (avhenger av hvor sterk eosinen er).
7. Skyll raskt i vann.
8. Før snittene gjennom dehydreringsrekka (H₂O, 70 % etanol, 96 % etanol, abs.etanol, abs.etanol) til xylen.
9. Legg opp snittene med Eukitt manuelt, eller ved hjelp av oppleggsmaskin.

7.2.3 DNA isolering på Qiagen Biorobot EZ

1. Finn fram vevsrørene fra -80 °C fryseren.
2. Tilsett 190 µl G2 buffer og 10 µl Proteinase K direkte i vevsrøret .
3. Lysér vevet på termoblokka i 60 minutter ved 56 °C og 450 rpm, eventuelt lenger dersom vevet ikke er fullstendig lysert. Vevet kan stå på termoblokka over natt uten at det påvirker DNA-kvaliteten.
4. Øk temperaturen til 80 °C, la prøvene stå i 10 min. for å inaktivere rester av Proteinase K som kan forstyrre PCR-reaksjonen senere.
5. Spinn ned innholdet i loBind røret (hurtigspinn).
6. Overfør væsken til sampletube (hører til Qiagen-kit). Fettslinter og annet ulysert vev tas ikke med. Væsken må ikke være så viskøs at den ikke enkelt kan pipetteres. Tilsett eventuelt mer G2-buffer og isoler flere rør per prøve.
7. Sett inn ”DNA Tissue card EZ 1” i BioRobot. Vær oppmerksom på at isolering av ferskt vev og parafininnstøpt vev ikke kan kjøres samtidig på maskinen, da det kreves to forskjellige program (cards).
8. Slå på maskinen.
9. Trykk ”START” for å få frem ”Protocols”-menyen.
10. Trykk ”1” for å starte ”worktable setup for the Tissue protocol”. Trykk så hvilken som helst tast for å følge teksten som kommer opp i displayet.
11. Sett elueringsvolumet til 200 µl, eventuelt til 100µl eller 50µl om det er lite materiale. Minimum trenger markørene, uten mulighet for omkjøring; IgH 3µl, IgK 3µl, IgL 3µl, TCRA 3µl, TCRB 3µl, T(11/14) 7,5µl, T(14/18) 7,5µl.

12. Åpne døra til arbeidsstasjonen ved å skyve den rett opp, bruk begge hender.
13. Sett inn 1-6 reagensstrips tilsvarende antall prøver som skal isoleres med et klikk. Husk å vende dem noen par ganger for å blande magnetpartiklene.
14. Sett inn 1-6 åpne elueringsrør i 1. rad. Husk å merke dem med biopsinummer.
15. Sett inn 1-6 tip holdere med filtertips i 2. rad.
16. Sett inn 1-6 åpne sampletube med ferdig lysert vev i 4. rad (rad 3 skal være tom).
17. Lukk døra.
18. Trykk "START". Isoleringen tar omtrent 20 minutter.

Etter isolering

1. Når protokollen er ferdig, står det "Protocol finished" i displayet. Åpne døra.
2. Ta ut elueringsrørene med isolert DNA. Kork dem umiddelbart.
3. Sett prøvene på termoblokka, 10 min. ved 60°C, 350 rpm.
4. Kast tipholdere og filterspisser, samt prøverør og strips i risikoavfall.
5. For å kjøre en annen protokoll, trykk "ESC".
6. Skal man ikke kjøre mer, trykk "STOP" to ganger for å komme tilbake til første bildet.
7. Lukk døra og skru av roboten.

7.2.4 Måling av DNA konsentrasjon og OD på Nanodrop 1000 spectrophotometer

1. Slå på PC'en, velg NanoDrop ikonet.
2. Velg user default, og trykk på knappen «Nucleic Acid».
3. Skjerm bilde med beskjed om å rengjøre «measure pedestals» kommer opp. Tørk av med linsepapir og appliser 1,5 µl nukleasefritt H₂O. Klikk OK for å initialisere instrumentet.
4. Tørk av «measure pedestals» og legg på 1,5 µl nukleasefritt H₂O. Trykk på knappen «blank» og se til at resultatene som kommer opp viser 0 ng/µl. Tørk av «measure pedestals» med linsepapir.
5. Nanodropen er nå klar til måling av konsentrasjon og OD.
6. Skriv inn prøvenummer/navn i feltet «sample id», og legg på 1,5 µl prøve. NB! benytt pipette som kun brukes til DNA evt RNA.
7. Trykk på knappen «measure». Resultatet kommer opp på skjermen og lagres automatisk.
8. Gjenta punkt 5-8 for neste prøve.
9. Når alle prøvene er målt, gå til «print report» og skriv ut resultatene, for så å lagre resultatene.

7.2.5 RNA isolering med MirVana™ miRNA Isolation kit

Sett RNase-fritt vann i 95°C

100 % etanol i romtemperatur

1. Tilsett ca 10 x vevets volum med lysisbuffer (500 µl til 10 snitt á 10 µm).
2. Pippeter opp og ned til vevet har løst seg opp.
3. Tilsett 1/10 volum (av lysisbuffer brukt) av miRNA Homogenat Additiv til lysatet.
4. Bland godt på vortex.
5. La det stå på is i 10 minutter.
6. Tilsett 1 x volum (av lysisbuffer brukt) Acid-Phenol:chloroform (ta fra under vannfasen).
7. Vortex 60 sek (1600 rpm).

8. Sentrifuger 5 min 10.000 rpm (romtemperatur).
9. Interfasen skal være kompakt, hvis ikke sentrifugeres det en gang til.
10. Overfør forsiktig den øvre fasen i et nytt rør. Merk volumet.
11. Tilsett 1.25 x volumet (av vannfasen) med absolutt ethanol. Bland godt.
12. Tilsett til en kolonne (maks 700µl) .
13. Sentrifuger 15 sek 10.000 rpm (romtemperatur).
14. Kast flowtrough.
15. Ved mer volum enn 700µl gjentas trinn 12-14.
16. Tilsett 700µl miRNA wash solution 1.
17. Sentrifuger 10-15 sek 10.000 rpm (romtemperatur).
18. Tilsett 500µl Wash Solution 2/3.
19. Sentrifuger 10 sek 10.000 rpm (romtemperatur).
20. Kast flowtrough.
21. Tilsett 500µl Wash Solution 2/3.
22. Sentrifuger 10 sek 10.000 rpm (romtemperatur).
23. Kast flowtrough.
24. Tørk membranen ved å sentrifugere 1 min 10.000rpm (romtemperatur).
25. Eluer med 100µl vann 95 °C.
26. Sentrifuger 30 sek 10.000 rpm (romtemperatur).
27. Sett røret med eluert RNA på is.
28. Ta ut 3µl av eluatet i et nytt rør til konsentrasjonsmåling på NanoDrop.
29. Frys ned RNA-løsningen så fort som mulig ved - 80 °C.

7.2.6 Real-time-PCR *DPYD* IVS14+1G>A

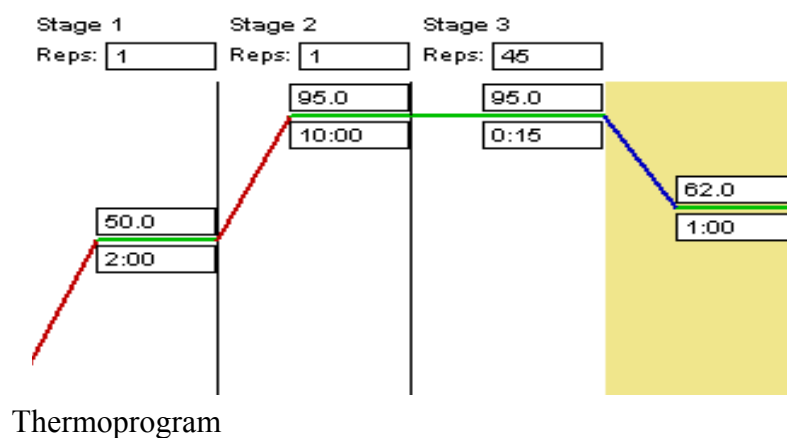
Primere og prober benyttet ved real-time PCR av polymorfismen *DPYD* IVS14+1G>A.

		Sekvens
Primere	IVS14-Fow	5'-CAT-ATT-GGT-GTC-AAA-GTG-TCA-CTG-AA-3'
	IVS14-Rev	5'-CAA-CTT-ATG-CCA-ATT-CTC-TTG-TTT-TAG-A-3'
Prober	IVS14-wt	6FAM-AGA-CAA-CGT-AAG-TGT-GAT-TTA-MGB-3'
	IVS14-mut	VIC-AGA-CAA-CAT-AAG-TGT-GAT-TTA-MGB-3'

Standard reagensmengder til PCR oppsett av *DPYD* IVS14+1G>A

Navn reagenser	Konsentrasjon bruksløsning	Antall µl/prøve	Konsentrasjon i PCR-reaksjon
dH ₂ O		5.3	
Mastermix	2 x	2.5	0.5 x
Probe A	5.0 µM	0.2	0.1 µM
Probe B	5.0 µM	0.2	0.1 µM
Forward primer	20.0 µM	0.4	0.9 µM
Reverse primer	20.0 µM	0.4	0.9 µM
Totalt med reaksjonsmik		9.0	
DNA-templat	100 ng/µl	0.4	
Totalt volum i PCR-reaksjon		9.4	

Kommentar: Oppsettet er optimalisert for real-time PCR med instrumentet ABI7500. Oppsettet benytter mastermix fra Applied Biosystems med Uracil-N-Glykosylase (UNG).



7.2.7 DNase - behandling

DNase - behandling med DNA-free kit:

1. Tilsett en mengde (10 µl) 10x DNase I buffer som tilsvarer 0,1 x totalvolum av RNA-løsningen (10 µl ved 100 µl elueringsvolum) .
2. Tilsett 3 µl rDNaseI. Bland forsiktig.
3. Inkuber ved 37°C i 30 min.
4. Tilsett 0,1 x reaksjonsvolumet med resuspendert DNase Inactivation Reagent (13,5 µl). Bland godt. Bruk alltid minst 2 µl DNase Inactivation Reagent, selv om det er mer enn 0,1 x reaksjonsvolumet.

5. Inkuber 2 min. ved romtemperatur, bland av og til for å resuspendere DNase Inactivation Reagent.
6. Sentrifuger ved 10 000 x g, 1,5 min. og overfør RNA-løsningen (supernatanten) til et nytt rør. Det er viktig å ikke få med noe av pelleten.

DNase Inactivation Reagent kan bli vanskelig å pipettere etter flere gangers bruk på grunn av fordamping av væske fra de interstitielle områdene. Dersom dette oppstår tilsettes 20-25 % av det gjenværende volumet med nukleasefritt H₂O. Vortex kraftig, slik at det blir en slush som kan pipetteres.

Bestem konsentrasjonen ved å måle OD på Nanodrop. RNAet lagres ved – 80 °C.

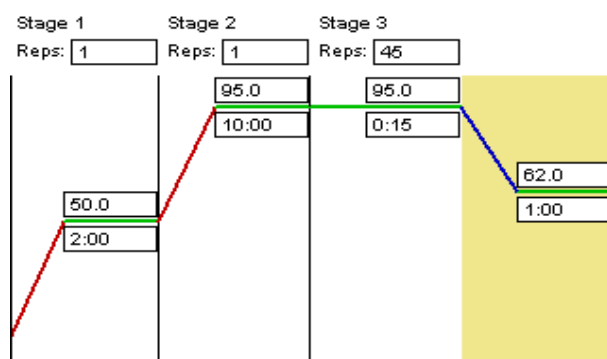
Jobb på is!

7.2.8 BRAF V600E/RNase P real-time PCR

Standard reagensmengder til PCR oppsett av BRAF V600E/RNaseP real-time PCR.

Navn reagenser	Konsentrasjon bruksløsning	Antall µl/prøve	Konsentrasjon i PCR-reaksjon
dH ₂ O		8.938	
Universal PCR Master mix	2 x	12.50	1.0 x
BRAFforward2	20.0 µM	0.375	0.300 µM
BRAFreverse	20.0 µM	1.125	0.900 µM
VIC-RNase P Assay	20.0 x	1.250	1.0 x
BRAF TaqMan MGB probe	20.0 µM	0.313	0.250 µM
Totalt med reaksjonsmiks		24.50	
DNA-templat	20 ng/µl	0.50	
Totalt volum i PCR-reaksjon		25.00	

Thermosyklus protokol



BRAF mutasjonsanalyse - metode (Hamfjord, Stangeland et al. 2011).

7.2.9 Revers transkripsjons PCR

MultiplexRT Human pool 1 v1 for taqman[®]miRNA ble brukt som primer.

Standard reagensmengder til Taqman microRNA revers transkripsjons PCR

Navn reagenser	Konsentrasjon bruksløsning	Antall µl/prøve	Konsentrasjon i PCR-reaksjon
Nuclease-free H ₂ O		6.35	
10 x RT buffer	10 x	2.00	1.0 x
10 x dNTP mix	100 mM	0.40	2.0 mM
RT primers (MultiplexRT Human pool 1 v1 for taqman [®] miRNA)	10.0 x	2.00	1.0 x
RNase Inhibitor (20 U/µl)	20.0 U/µl	0.25	0.25 U/µl
MultiScribe RT enzyme	50.0 U/µl	4.00	10.0 U/µl
Totalt med reaksjonsmiks		15.0	
Totalt RNA	20 ng/µl	0.50	
Totalt volum i RT-reaksjonen		20.0	

Thermosyklus program revers transkripsjons PCR

Temperatur (°C)	Tid
16	30 min
42	30 min
85	5 min
4	Hold

Fortynn cDNA 1:10 før tilsetning til real-time reaksjonen!

Alle komponenter holdes på is. Inkuber reaksjonen i minst 5 min på is etter tilsetning av RNA.

7.2.10 Taqman microRNA let-7a real-time PCR

Assay:

hsa-let-7a (4373169)

RNU 48 (4373383)

 Standard reagensmengder til Taqman microRNA real-time PCR

Fortynn cDNA 1:10 før tilsetning til realtime reaksjonen

Navn reagenser	Konsentrasjon bruksløsning	Antall µl/prøve	Konsentrasjon i PCR-reaksjon
Nuclease-free H ₂ O		925	
Taqman MicroRNA Assay	20 x	1.25	1.0 x
Taqman Universal PCR Master Mix	2 x	12.5	2.0 mM
Totalt med reaksjonsmiks		23	
cDNA templat		2.0	
Total volum i PCR-reaksjonen		25.0	

 Thermosyklus program for Taqman microRNA PCR

Temperatur (°C)	Tid	
50	2 min	
95	10 min	
95	15 sek	40 sykluser
60	1 min	

7.3 Materialer

7.3.1 Kommersielle kit

Kit	Produsent
QIAGEN EZ1 DNA Tissue kit (48)	QIAGEN
mirVana™ miRNA Isolation kit	Ambion inc.
Taqman®MicroRNA Reverse Transkriptase kit	Applied Biosystems
MultiplexRT Human pool 1, V1 for taqman®miRNA	Applied Biosystems
DNA-free™ DNase treatment & removal	Ambion inc.
Taqman universal PCR mastermix	Applied Biosystems
Taqman MicroRNA assays	Applied Biosystems
Taqman® RNase P Control Reagens Kit	Applied Biosystems

7.3.2 Teknisk utstyr

Teknisk utstyr	Produsent
QIAGEN Biorobot EZ1	QIAGEN
Eppendorf thermomixer komfort (varmeblokk)	Eppendorf
Eppendorf centrifuge 5415R	Eppendorf
7500 Realtime PCR system	Applied Biosystems
VWR thermocycler	VWR
Leica CM3050S frysemikrotom	Leica microsystems
Nanodrop 1000 spectrophotometer	ThermoFisher
2100 Bioanalyzer (eksternt laboratorium)	Agilent Technologies
Speed Vac plus SC210A (eksternt laboratorium)	Savant instruments

7.3.3 Kjemikalier

Kjemikalier
Hematoxylin
Eosin
Absolutt etanol, 96 % etanol og 70 % etanol

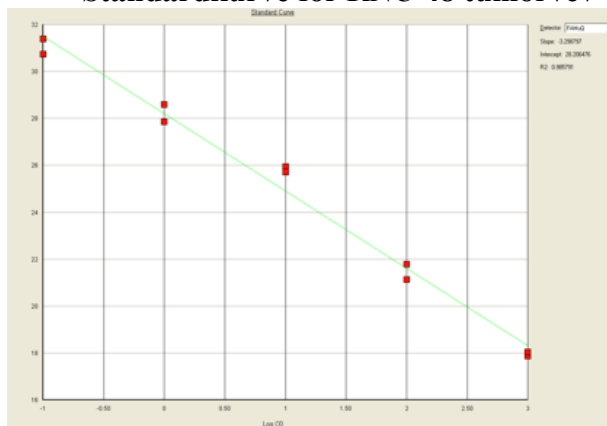
7.4 Tillegg til resultat

7.4.1 Standardkurver *let-7a* og RNU 48

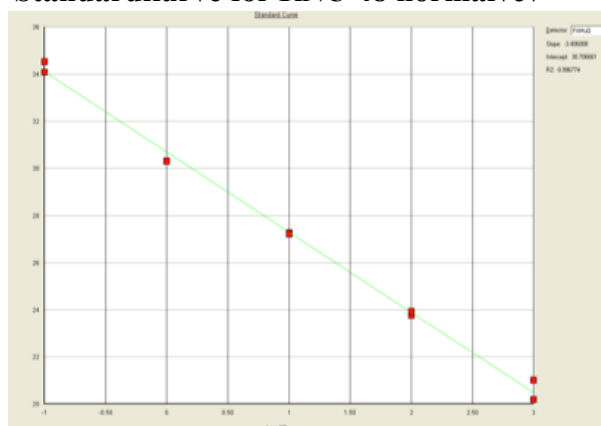
Tabell over slope og korrelasjonsfaktor (R2) verdier for standardkurver til *let-7a* og RNU 48. Prøve nr 30 CRC UUS (normalvev og tumorvev) er brukt til standardkurvene. 10 x fortynningsrekke (1000, 100, 10, 1, 0,1 µl) a) Slope og R2-verdi for alle konsentrasjoner i fortynningsrekken. b) Ny slope og R2-verdier der konsentrasjon 0.1ng/µl er utelatt.

	Normalvev	Tumorvev
RNU 48	-3,406,008 (slope)/R2 0,996774	- 3,298797 (slope)/R2 0.985791
<i>let-7a</i>	-3.079396 (slope)/R2 0.956024	-2.442011(slope)/R2 0.959200 a) -2,903929 (slope)/R2 0,994138 b)

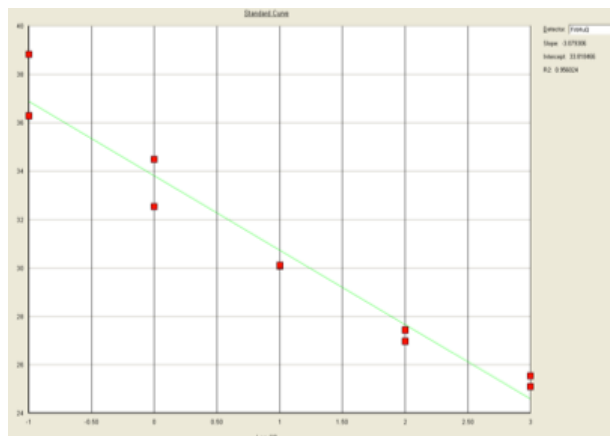
Standardkurve for RNU 48 tumorvev



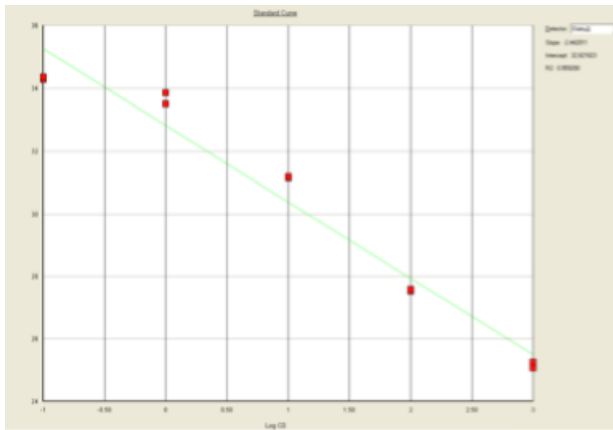
Standardkurve for RNU 48 normalvev



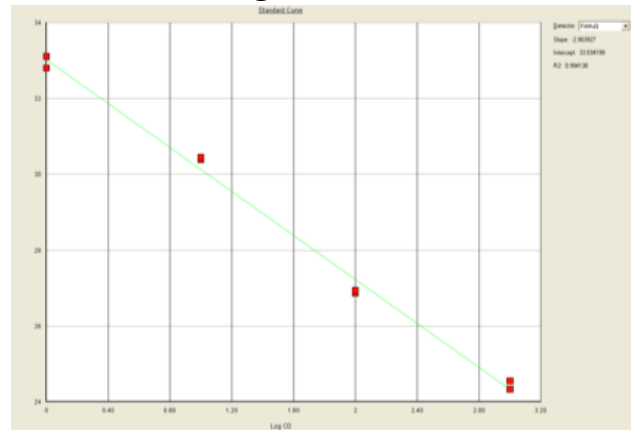
Standardkurve for *let-7a* normalvev



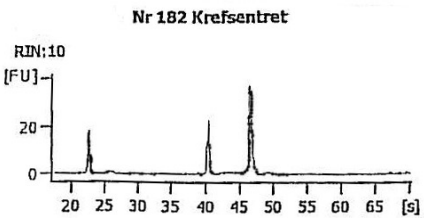
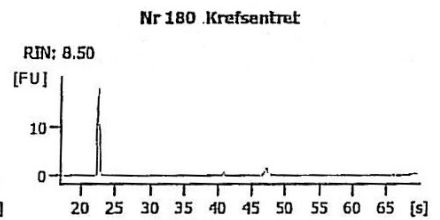
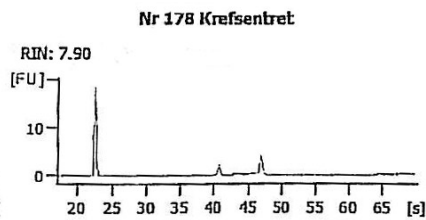
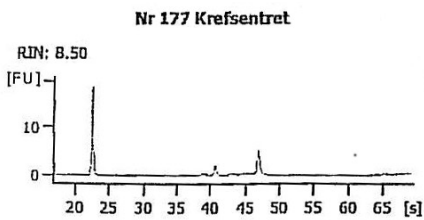
Standardkurve for Let7a tumorvev



**Standardkurve for Let-7a tumorvev
Utelatt kons. 0.1ng/ul**



7.4.2 Bioanalyser



Diagrammene viser resultatet av de fire prøvene som ble analysert på Bioanalyser, med følgende RIN verdier: 8.5, 7.9, 8.5 og 10.