



Universitetet
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

MASTEROPPGAVE

Studieprogram/spesialisering: Master i Biologisk Kjemi	Høstsemesteret, 2012 Åpen
Forfatter: Karianne Skogland (signatur forfatter)
Fagansvarlig: Peter Ruoff Intern veileder: Peter Ruoff Ekstern veileder: Oddmund Nordgård	
Tittel på masteroppgaven: "Etablering av metode for anrikning og deteksjon av sirkulerende tumorceller i perifert blod" Engelsk tittel: "Method evaluation for enrichment and detection of circulating tumor cells in peripheral blood"	
Studiepoeng: 60	
Emneord: Bukspyttkjertel Kreft Sirkulerende tumorceller Biomarkør	Sidetall: 72 + vedlegg/annet: 98 Stavanger, dato/år

Høst 2012

Masteroppgave

”Etablering av metode for anrikning og deteksjon av sirkulerende tumorceller i perifert blod”

Karianne Skogland

Master i Biologisk Kjemi
Teknisk-naturvitenskapelig fakultet
Universitetet i Stavanger

Utført ved Laboratorium for Molekylær Biologi ved
Stavanger Universitetssykehus

Sammendrag

Kreftceller som sirkulerer med perifert blod kalles sirkulerende tumorceller (STC). Under de rette forholdene kan disse gi opphav til nye svulster i andre organer (spredning). Kreft i bukspyttkjertelen er den fjerde største kreftrelaterte dødsårsaken i Norge, noe som i hovedsak skyldes at den er vanskelig å oppdage samt ineffektiv kjemoterapibehandling. Forskning tyder på at påvisning av STC kan gi klinisk relevant informasjon ved en rekke kreftformer. Hensikten med denne masteroppgaven var derfor å etablere en metode for anrikning og deteksjon av STC fra perifert blod, da tilknyttet bukspyttkjertelkreft. Oppgaven inngår i et større forskningsprosjekt ved Stavanger Universitetssykehus i regi av forskningsgruppen for kreft og medisinsk fysikk ved Avdeling for blod og kreftsykdommer.

Blodprøven tas på EDTA-rør og anrikningsmetoden er bruk av tetthetsgradientmediet Lymphoprep™. Disse ble kvalitetsvurdert og det ble funnet lite tap av mononukleære celler og celleaggregat. Holdbarheten til EDTA-blod ble fastsatt til maksimalt 48 timers henstand før anrikning av STC bør utføres. Deteksjonsmetoden er RT rt-qPCR hvor epitelspesifikke mRNA benyttes som surrogatbiomarkører for STC. De potensielle biomarkørene som ble etablert og undersøkt var CEACAM5, CEACAM6, CK8, CK19, EPCAM, MMP11 og PRSS1. Basert på undersøkelser av tre cellelinjer fra svulster i bukspyttkjertel og normalt blod, viste biomarkørene CEACAM5, CK8, CK19 og EPCAM beste potensial for STC deteksjon.

Forord

Denne oppgaven ble skrevet under masterstudiet i biologisk kjemi ved Universitetet i Stavanger. Den er utført ved Laboratorium for Molekylærbiologi ved Stavanger Universitetssykehus (SUS).

Jeg vil først takke min hovedveileder, Oddmund Nordgård (PhD), for utmerket veiledning og støtte gjennom arbeidet med oppgaven. Jeg er svært takknemlig for alle teknikkene jeg har fått lære, instrumenter og utstyr som har vært tilgjengelig og for friheten til å kunne utføre selvstendig arbeid innenfor rammene satt. Under oppholdet ved laboratoriet har jeg lært mye, både på det fagmessige og personlige plan. Jeg vil derfor takke alle i forskningsgruppen og ellers ved laboratoriet, hvor jeg ble godt tatt i mot og fikk et større innblikk i forskningshverdagen. En stor takk til medveileder Kjersti Tjensvoll (PhD), for positivt og løsningsorientert engasjement i mitt arbeid. Jeg er takknemlig for all hjelp og opplæring fra Umbreen Yousaf (PhD-student) i forbindelse med Lymphoprep-metoden og fra Satu Oltedal (PhD) i forbindelse med instrumentet Agilent 2100 Bioanalyser. Jeg ønsker også å takke Rune Småland (forskningsleder og seksjonsoverlege FoU) og Bjørnar Gilje (PhD og lege ved KBK) for faglig diskusjon og engasjement i mine resultater og framdrift. Takk, også, til min veileder ved universitetet, Peter Ruoff (Prof.), for tilrettelegging for oppgaveskrivingen ved SUS. Til slutt vil jeg gjerne takke min samboer, Åsbjørn, for urokkelig støtte hele veien. Takk, også, til vår lille datter Tuva, som kom til verden underveis, for hennes tålmodige og snille natur som tillot meg fullføre oppgaven tiltross.

Karianne Skogland, Stavanger 2012

Innholdsliste

FORKORTELSER	8
1 INNLEDNING	9
1.1 MÅLET MED MASTEROPPGAVEN	9
1.2 MASTEROPPGAVENS OPPBYGNING	9
2 TEORI	11
2.1 BUKSPYTTKJERTEL	11
2.1.1 BUKSPYTTKJERTELENS ANATOMI OG FYSIOLOGI	11
2.1.2 KREFT I BUKSPYTTKJERTEL	11
2.2 SIRKULERENDE TUMORCELLER	13
2.2.1 KARAKTERISTIKK	13
2.2.2 BIOLOGI	13
2.2.3 KLINISK RELEVANS	15
2.3 DETEKSJON AV SIRKULERENDE TUMORCELLER	16
2.3.1 ANRIKNINGSMETODER	16
2.3.2 DETEKSJONSMETODER	17
2.4 SIRKULERENDE TUMORCELLER SOM BIOMARKØR FOR BUKSPYTTKJERTELKREFT	18
3 MATERIAL	19
3.1 PRØVEMATERIAL	19
3.1.1 BLODPRØVE	19
3.1.2 CELLEKULTUR	19
3.2 BUFFERE OG LØSNINGER	19
3.3 KJEMIKALIER OG REAGENSER	20
3.3.1 MEDIUM OG REAGENSER FOR DYRKING AV CELLEKULTUR	22
3.4 PRIMERE	23
3.4.1 NYE PRIMERE TIL STUDIEN	23
3.4.2 TIDLIGERE ETABLERT PRIMERE	24
3.5 KIT	24
3.6 INSTRUMENTER	25
4 METODER	26
4.1 ANSKAFFELSE AV PRØVEMATERIAL	26
4.1.1 BLODPRØVE PÅ EDTA-RØR	26
4.1.2 DYRKING AV CELLELINJER	26
4.2 ISOLERING OG KVANTITERING AV CELLEMATERIALE	28
4.2.1 ISOLERING AV MONONUKLEÆRE CELLER VED LYMPHOPREP-METODEN	28
4.2.2 KONSENTRASJONSBEREGNING AV CELLESUSPENSJON VED TELLING I LYSMIKROSKOP	29
4.3 ISOLERING AV RNA OG MIKRO RNA	30
4.4 SPEKTROFOTOMETRI	32
4.5 MIKROFLUIDITET KAPILLÆRELEKTROFORESE	33
4.6 REVERS TRANSKRIPSJON MED DNASE BEHANDLING	34
4.7 QPCR	36
4.7.1 NORMALISERING OG BEREGNING AV RELATIV MRNA KONSENTRASJON	39
4.8 AGAROSE GELELEKTROFORESE	40
4.9 RENSING AV PCR PRODUKT	41

4.10	SEKVENSERING AV PCR-PRODUKT	41
4.11	IDENTIFISERING AV NUKLEOTIDSEKVENNS VED BLAST-SØK	42
4.12	RESTRIKSJONSKUTTING	43
4.13	STATISTISK BEHANDLING AV DATAMATERIALE	44
4.13.1	STANDARDVAVIK	44
4.13.2	VARIASJONSKOEFFISIENT	44
4.13.3	PARET T-TEST	44
4.13.4	KONFIDENSINTERVALL	45
4.13.5	PROSENTAVVIK	46
5	RESULTAT	47
5.1	OVERSIKT OVER METODER OG PRAKTISK ARBEID UTFØRT	47
5.2	ETABLERING AV QPCR-OPPSETT FOR POTENSIELLE BIOMARKØRER	48
5.2.1	OPTIMALISERING AV REAGENSFORHOLD	48
5.2.2	IDENTIFISERING AV PCR-PRODUKT	52
5.2.3	FASTSETTELSE AV AMPLIFISERINGSEFFEKTIVITET	54
5.2.4	NIVÅ AV BIOMARKØRER I CELLELINJER OG NORMAL BLOD	55
5.2.5	SENSITIVITETSBESTEMMELSE	56
5.3	KVALITETSVURDERING AV KIT FOR ISOLERING AV RNA OG MIRNA	58
5.4	HOLDBARHETSTEST AV EDTA-BLOD	59
5.5	EVALUERING AV LYMPHOPREP-METODEN FOR ISOLERING AV MONONUKLEÆRE CELLER FRA PERIFERT BLOD	62
5.5.1	TEST FOR TAP AV MONONUKLEÆRE CELLER VED LYMPHOPREP-METODEN	62
5.5.2	TEST FOR TAP AV CELLEKLUMPER VED LYMPHOPREP-METODEN	63
5.5.3	SAMMENLIGNING AV LYMPHOPREP™ OG RBC LYSIS BUFFER TIL ANRIKING AV SIRKULERENDE TUMORCELLER FRA PERIFERT BLOD	64
6	DISKUSJON	66
6.1	ETABLERING AV QPCR OPPSETT FOR POTENSIELLE BIOMARKØRER	66
6.1.1	OPTIMALISERING AV QPCR-OPPSETT	66
6.1.2	AMPLIFISERINGSEFFEKTIVITET	68
6.1.3	VURDERING AV ENDELIGE BIOMARKØRER TIL STUDIEN	68
6.1.4	SENSITIVITETSBESTEMMELSE	72
6.2	KVALITETSVURDERING AV KIT FOR ISOLERING AV RNA OG MIRNA	72
6.3	HOLDBARHETSTEST AV EDTA-BLOD	74
6.4	EVALUERING AV LYMPHOPREP-METODEN FOR ANRIKING AV MONONUKLEÆRE CELLER FRA PERIFERT BLOD	76
6.4.1	TAP AV MONONUKLEÆRE CELLER VED LYMPHOPREP-METODEN	76
6.4.2	TAP AV CELLEKLUMPER VED LYMPHOPREP-METODEN	77
6.4.3	SAMMENLIGNING AV LYMPHOPREP™ OG RBC LYSIS BUFFER TIL ANRIKING AV SIRKULERENDE TUMORCELLER FRA PERIFERT BLOD	78
6.5	FREMTIDSASPEKTER	80
	REFERANSER	83
	LISTE OVER FIGURER	90
	LISTE OVER TABELLER	93
	VEDLEGG	95

”Etablering av metode for anrikning og deteksjon av sirkulerende tumorceller i
perifert blod”

VEDLEGG 1	95
VEDLEGG 2	97
VEDLEGG 3	98

Forkortelser

blast	Basic local alignment tool
blastn	Basic local alignment tool – nucleotide
bp	Basepar
CCD	Charged coupled device
cDNA	Komplemetært DNA
CEACAM	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
CK	Cytokeratin
C _q	Quatification cycle
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Etylen diamine tetraacetic acid
EPCAM	Epitelialt celleadhesjonsmolekyl
LOC	Lab-on-a-chip
MC	Mononukleær celle
MMP11	Matrix metallopepdidase 11
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumklorid
NCBI	Nasjonalt senter for bioteknologisk informasjon
NTC	No template control
PRSS1	Protease, serine 1
qPCR	Kvantitativ polymerase kjedereaksjon
RBC	Rød blodcelle
RIN	RNA integritets nummer
rRNA	Ribosomalt RNA
RT	Revers transkripsjon
rt	real-time
STC	Sirkulerende tumorceller
TBE	Tris/Borate/EDTA
MUC1	Mucin 1
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
h-TERT	human-telomerase revers transkriptase

1 Innledning

Kreft i bukspyttkjertelen er den fjerde største kreftrelaterte dødsårsaken i Norge [1]. Det oppdages 600-700 nye tilfeller hvert år, oftest sent i kreftutviklingen [1, 2]. Det finnes ingen kjemisk laboratorietest av blod eller andre kroppsvæsker som er tilstrekkelig sensitiv eller spesifikk for å stille diagnosen bukspyttkjertelkreft [2]. Et scenario hvor man v.h.a. en enkel blodprøve kan belyse forholdene rundt kreftutviklingen ville vært svært gunstig. Det kunne bidratt som supplement til dagens diagnostiseringsmetoder, samt være viktige verktøy i overvåkning av sykdomsutvikling og behandlingsrespons [3, 4].

1.1 Målet med masteroppgaven

Denne masteroppgaven er basert på laboratoriearbeid utført i forbindelse med et større forskningsprosjekt i regi av forskningsgruppen for kreft og medisinsk fysikk ved Avdeling for blod og kreftsykdommer ved Stavanger Universitetssykehus (SUS). Hovedmålet med det overordnede forskningsprosjektet er å undersøke den kliniske verdien av å detektere og karakterisere sirkulerende tumorceller (STC) fra kreft i bukspyttkjertelen. Disse vurderes som potensielle biomarkører for overvåkning av sykdomsutvikling, behandlingsrespons og overlevelse. Denne masteroppgaven utgjør et delprosjekt og begrenses til følgende:

- Etablering av qPCR-basert metode for deteksjon og relativ kvantitering av potensielle biomarkører for STC ved bukspyttkjertelkreft
- Etablering og vurdering av metoder for anrikning av STC fra blodprøver og påfølgende isolering av RNA

1.2 Masteroppgavens oppbygning

Den skrevne oppgaven er bygget opp med en innledende teoridel om bukspyttkjertelkreft og STC. Dette etterfølges av kapitler med oversikt over material og metoder som er benyttet i det praktiske arbeidet. Resultatene er deretter fremstilt, inndelt etter vurderinger og eksperimenter utført, med påfølgende diskusjon. Til sist i oppgaven foreligger liste over referanser, figurer

”Etablering av metode for anrikning og deteksjon av sirkulerende tumorceller i
perifert blod”

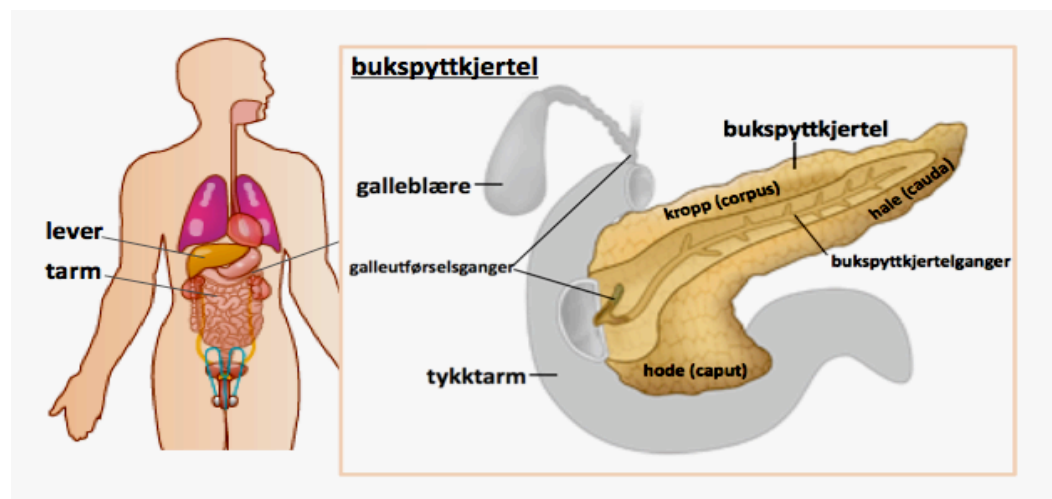
og tabeller, samt vedlegg med supplerende informasjon om deler av resultatene fremstilt.

2 Teori

2.1 Bukspyttkjertel

2.1.1 Bukspyttkjertelens anatomi og fysiologi

Bukspyttkjertelen, også kalt pankreas, er et langstrakt organ som befinner seg i kroppens bukhule [5]. Organet er en kjertel og deles inn i caput (hode), corpus (kropp) og cauda (hale) som er tilknyttet et internt nettverk av gangsystemer [2, 5, 6]. Bukspyttkjertelen består av to typer epitelvev; eksokrint og endokrint kjertelvev [2, 5]. Det eksokrine kjertelvevets funksjon er å produsere fordøyelsesenzymene til tarmen, som føres dit via gangsystemet [2, 5, 7]. Det endokrine kjertelvevet har som oppgave å produsere hormoner, bl.a. det blodsukkerregulerende hormonet insulin. [2, 5, 6].



Figur 1: Illustrasjon av bukspyttkjertelen og dens nærliggende organer. Figuren er laget basert på figurer fra Kreftforeningens nettside og Oncolex [2, 8].

2.1.2 Kreft i bukspyttkjertel

Kreft i bukspyttkjertelen har relativt høy forekomst i Norge, og rammer 7 personer for hver 100 000 [1]. I Europa forårsaker den rundt 40 000 dødsfall årlig, og er den eneste krefttypen (i tillegg til lungekreft hos kvinner) hvor dødstallene ikke forventes å minke i løpet av året 2012 [9]. Prognosen er generelt svært dårlig, da med gjennomsnittlig seks måneders overlevelse fra diagnosetidspunkt [1, 10]. Mindre enn 1% av de norske tilfellene overlever mer enn 5 år, noe som gir denne krefttypen den laveste overlevelsesraten av alle

krefttypene [1]. Årsaken til utvikling av kreft i bukspyttkjertelen er ukjent [2, 10, 11]. Det er i midlertidig funnet indikasjoner på en rekke risikofaktorer bl.a. langvarig kronisk pankreatitt (betennelse i bukspyttkjertelen), sigarett røyking, overvekt, aldring og genetisk predisposisjon [2, 10, 12, 13]. Den dårlige prognosen skyldes at kreften generelt oppdages svært sent i kreftutviklingen ettersom den har lite karakteristiske symptomer [4]. Disse inkluderer symptomer som gulsott, diffuse magesmerter, diaré, nyoppdaget diabetes 2, og en kombinasjon av vekttap, slapphet og generell uvelhetsfølelse [2, 7, 11]. Ved diagnosetidspunkt er det derfor ofte dannet metastaser, som innebærer at nye svulster oppstår også i andre organer pga. spredning av kreftceller fra den primære svulsten [4]. Metastasering er hovedårsaken til kreftrelaterte dødsfall [4, 10]. Primærsvulsten kan i tillegg bli så stor at den direkte ødelegger for bukspyttkjertelens og omliggende organers funksjon, noe som forverrer sykdomsbilde [2].

Eksokrine svulster i bukspyttkjertelen har hovedsakelig oppstått fra en celle i gangsystemet, og mesteparten av de resterende tilfellene er oppstått i caput (hodet) [2]. Endokrine svulster er derimot relativt sjeldne [2]. Ondartete svulster av kjertelepitel har fellesnavnet adenokarsinom, og i bukspyttkjertelen er disse svært aggressive og spres tidlig via blod eller lymfe [2, 5]. Metastaser i lever er vanlig ved diagnosetidspunktet, og sees også i lunger og skjelett i sjeldnere tilfeller [2]. Per dags dato stilles diagnosen basert på undersøkelser som ultralyd, CT (computer tomografi), MR (magnetisk resonans), endoskopi og biopsi [7, 11]. Klassifisering av svulsten gjøres ved TNM systemet, hvor de inndeles på bakgrunn av svulststørrelse (T), involverte regionale lymfeknuter (N) og fjernmetastaser (M) [2, 14]. Svulststørrelsen deles inn i fire kategorier; T1-T4, hvor T1-T3 er mulig å behandle kirurgisk. Ved størrelse T4, har svulsten infiltrert en eller flere av de store arteriene tilknyttet bukspyttkjertelen slik at kirurgisk fjerning ikke kan utføres [2]. Den eneste måten å bli helt kurert på er å fjerne hele svulsten, men dette er kun mulig i 5-15% av tilfellene pga. svulstens natur [2]. Kjemoterapi benyttes som behandling i de øvrige tilfellene og kan gi lindrende og livsforlengende effekt [2, 7, 10]. Gemcitabine er standard medikamentet for kjemoterapeutisk behandling av langtkommet sykdom i

mange land, deriblant Norge [2, 7, 15]. Kliniske studier har funnet lite forbedring av overlevelsesraten ved bruk av Gemcitabine alene, men det kan forbedre almenntilstand, vektøkning og smerte hos rundt 25% av pasientene [2, 7, 15].

Kunnskap om kreftutvikling i bukspyttkjertelen økes stadig ettersom det også gjøres fremskritt rundt de molekylærbiologiske aspektene av den [10, 13]. Fortsatt er det lite man vet om sammenhengen mellom de genetiske endringer som oppstår i cellene og sykdommens aggressivitet [10, 13]. En abnormalitet som er funnet er at mutasjoner i *KRAS* genet forekommer oftere ved bukspyttkjertelkreft enn ved noen annen human krefttype. Det er også funnet at telomere er forkortet, at vekstfaktorer spiller en viktig rolle og at flere tumor suppressor gener er inaktiverte ved denne krefttypen [10, 13, 16, 17].

2.2 Sirkulerende tumorceller

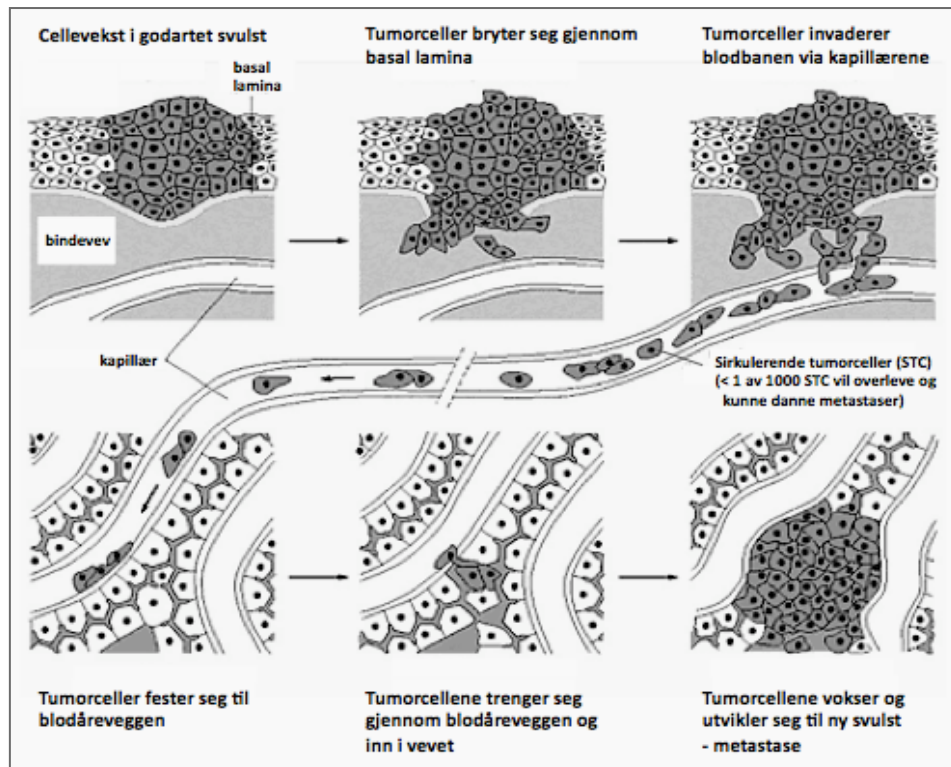
2.2.1 Karakteristikk

En svulst oppstår som resultat av én celledes ukontrollerte celledeling, og disse kreftcellene har dermed ofte karakteristiske kjennetegn som kan være spesifikt for vevet eller for kreftceller generelt [3, 18, 19]. De vevsspesifikke karakteristikkene kan være i form av proteiner på celleoverflaten, koder i DNA og RNA materiale eller ved at de produserer et bestemt enzym eller lignende [3, 19-21]. Mer generelle karakteristikk kan være cellestørrelsen, form, tetthet, størrelsesforholdet mellom cellen og kjernen, mengden kjernemateriale, elektrisk ladning etc. [3, 4, 19, 20]. STC fra samme svulst utgjør en svært heterogen cellepopulasjon [19, 20]. Fellestrekk er at STC er av epitelial opprinnelse og dermed har epitelspesifikk karakteristikk på celleoverflaten og i genmateriale. Fortsatt er store deler rundt celle- og molekylærbiologien av STC ukjent [19].

2.2.2 Biologi

Kreftceller deler seg som nevnt ukontrollert, og nye kreftceller dannes da ofte raskt og i store mengder. De kan etablere evnen til å danne metastaser ved å tilegne seg egenskaper for å bryte gjennom vevsmembranen, kalt basal lamina, og komme seg over i blod. [18, 22] Her følger de blodsirkulasjonssystemet i

kroppen, og kalles da sirkulerende tumorceller (STC). STC som overlever forholdene i blodet, kan potensielt slå seg ned i nye vev dersom de har evner til å etablere seg og kan da utvikles til metastaser. [18, 22]



Figur 2: Illustrasjon over hvordan sirkulerende tumorceller (STC) oppstår fra en primærsvulst og forårsaker metastase i vev et annet sted i kroppen. Figuren er modifisert fra figur i boka "Molecular Biology of the Cell" (Alberts, 2002) [23].

Metastasingen skjer som følge av en komplisert prosess som ofte kalles "metastatiske kaskade" [20]. Mekanismene som er involvert er under utforskning, og det er mye man fortsatt ikke vet [19, 20]. Overgangen av STC til blodbanen er en sentral hendelse, og tilførselen av STC til blodbanen kan skje både aktivt og passivt [4, 20]. I løpet av metastasingen må STC fortløpende tilpasse seg de nye forholdene for å overleve [20]. Mesteparten av STC blir ødelagt i blodbanen eller undergår apoptose (kontrollert celledød), slik at det bare er omtrent én per 1000 STC som overlever. De kan også forbli som inaktive celler i "dvale"-tilstand ved mangel på vekstfaktorer under de nye forholdene, da i opptil flere år [4, 19, 24]. Metastasing er derfor en svært lite effektiv prosess, hvor mesteparten av den ukontinuerlige, lave strømmen av STC som invaderer

blodbanen, aldri vil kunne slå seg ned i andre vev [20]. Til tross for dette klarer metastaser likevel å etablere seg, og da blir også nytilførte STC mer effektive og dødelige [20]. Utvikling av kreftsvulsten avhenger også av eksterne forhold som angiogenese (dannelsen av nye blodkar) og immunrespons [4, 20]. Begge disse kan påvirke dannelsen av STC og de kan variere mellom individuelle kreftpasienter basert på sykdom, alder, genetisk sammensetning og eventuelle andre sykdommer [20]. Tilstedeværelse av STC kan oppstå både ved sent og tidlig stadium av kreftutviklingen. Sent i forløpet er svulsten ofte stor og relativ lett å oppdage, men da er det oftest utviklet svært aggressive fenotyper av STC som øker risikoen for dannelse av fjernmetastaser [19, 20]. Ved et tidlig kreftstadium, hvor det kun er utviklet en liten svulst som er vanskelig å oppdage, kan det også frigis STC til blodbanen. Det betyr at STC kan være i omløp før primærsvulsten oppdages, og innebærer da en risiko for fjernmetastaser allerede før diagnostisering er mulig [19, 20]. Tilfeller av spredning før diagnosen er satt, og tilbakefall av tidligere behandlet svulst, er ansvarlig for omtrent 90% av alle kreftrelaterte dødsfall [20]. Dette forblir dermed en av hovedutfordringene med hensyn til terapi og undersøkelser forbundet med STC og kreft generelt [20].

2.2.3 Klinisk relevans

Utvikling av metoder som kan detektere STC fra blod vil potensielt være viktige verktøy innenfor kreftdiagnostikk, ettersom utvikling av STC er et avgjørende steg i den metastatiske kaskaden [4]. Det er funnet sammenheng mellom tilstedeværelsen av STC og dårlige prognose og behandlingsrespons, sammenlignet med pasienter som ikke har påvist STC i blod [4]. Det trengs likevel flere og større undersøkelser for å fastsette reell klinisk relevans av STC [19]. Potensielt tenkes STC å kunne benyttes i forbindelse med diagnostisering, overvåkning av sykdomsutvikling og behandlingseffekt, risiko for tilbakefall, samt til å estimere overlevelse [4, 19]. Det kreves sensitive metoder for isolasjon og deteksjon av STC ettersom STC er svært sjeldne i blod [3, 4]. De befinner seg i stort mindretall, gjerne bare er én STC per million blodceller [3, 4]. Metodene må

også ha god reproducerbarhet for å kunne være pålitelige laboratorietester til medisinske vurderinger [3, 19].

2.3 Deteksjon av sirkulerende tumorceller

Utgangspunktet for isolering og deteksjon av STC er å benytte de karakteristiske trekkene av STC for å skille dem fra annet materiale [4, 20]. Epitelspesifikke egenskaper benyttes ofte ettersom normale epitelceller sjelden befinner seg i normalt blod [20]. Interessen på dette feltet har i de siste årene vært stor, og det utvikles stadig flere metoder og analyser for isolering og deteksjon av STC. Per dags dato er det rapportert over 200 kliniske studier som er satt i gang for å vurderer klinisk relevans av STC ved for en rekke solide svulsttyper [3, 19].

2.3.1 Anrikningsmetoder

Antall STC i blod er svært lavt i forhold til mengden blodceller [3]. Det er derfor vanlig å benytte anrikningsmetoder av STC for å oppkonsentrere dem i forkant av deteksjon [20]. Dette økt gir økt effektivitet og sensitivitet for deteksjon av STC [4]. Anrikningsmetoder benytter teknologi som skiller STC fra normale blodceller eller grupper av normale blodceller basert på de karakteristiske egenskapene for STC [19]. Hovedsakelig benyttes separasjonsteknikker basert på størrelse og tetthet eller via immunologiske teknikker [20]. Sensitivitet og spesifisitet er problematisk for begge typer metodologi, og de innebærer en risiko for ulik grad av celledød [21]. Teknikkene kan isolere STC med frekvens på 1 per 10^6 - 10^7 kjerneholdige blodcelle [20]. Anrikningsmetoder ved separasjon etter tetthet innebærer tetthetsgradientssentrifugering, mens cellefiltrasjon kan benyttes for separasjon etter på størrelse [20]. Bruk av tetthetsgradientssentrifugering tillater isolasjon av alle typer STC, men metodene er lite spesifikke. Metoder for cellefiltrering er også lite sensitive og spesifikke [4, 21]. Den vanligste immunologiske separasjonsmetoden for anrikning av STC er immunomagnetiske teknikker [4, 21]. Disse innebærer magnetisk perler som er innsatt med antistoff av epiteliale markører (f.eks. CK, EPCAM) eller for tumorspesifikke antigen (f.eks. CEA, HER2). Disse binder dermed selektivt til STC i blodprøven [4, 21]. STC blir på denne måten indirekte bundet til magneten og kan separeres fra resten av prøven ved å applisere et

magnetisk felt [4, 21]. Alternativt kan det benyttes immunomagnetisk teknikk for å fjerne leukocytter fra prøven, da via indirekte binding til magnetperler med spesifikke antigen for leukocytene (f.eks. antiCD-45 og/eller anti-CD61). Her blir store deler av blodcellebakgrunnen fjernet og sensitiviteten for STC deteksjon øker [4, 21]. Immunologiske anrikningsmetoder er forholdsvis lette å utføre og har høy spesifisitet [4, 21].

2.3.2 Deteksjonsmetoder

Det finnes to ulike prinsipper for deteksjonsmetoder av STC: immunologiske- og molekylærbaserte metoder [4, 20]. Immunologiske metoder isolerer og/eller teller STC via binding til monoklonale antistoff for ulike biomarkører. De vanligste biomarkørene er cytokeratiner (CK) og EPCAM [21]. Denne formen for deteksjon er spesifikk og forholdsvis sensitiv [21]. Det eneste standardiserte og godkjente systemet for deteksjon av STC er CellSearch systemet, som benytter immunologiske isolerings- og deteksjonsprinsipper [25]. Det er i dag i bruk ved ulike laboratorier tilknyttet analyser av kreft i bryst, tarm og prostata [19, 25].

Molekylærbaserte metoder innebærer hovedsakelig indirekte analyser av STC v.h.a. PCR-teknikk (polymerase kjedereaksjon) [20]. Her detekteres vevs- og/eller tumorspesifikke biomarkører på genetisk nivå av STC [20]. Slike teknikker benyttes i stort omfang, særlig innenfor forskning [20]. De mest brukte biomarkørene er deteksjon av genmateriale som koder for EPCAM og ulike cytokeratiner (CK), da særlig CK8, CK18 og CK19, for indirekte påvisning av STC [3, 19]. Fordelen med PCR metoder er høy sensitivitet, spesifisitet og effektivitet [21]. Ved å benytte revers transkribert real-time kvantitativ PCR teknikk (RT rt-qPCR) økes sensitiviteten ytterligere [26]. Ved RT rt-qPCR er det i større grad mulig å utelukke deteksjon av annet materiale enn biomarkørene, og samtidig skille mellom nivå av biomarkør fra STC mot bakgrunnsnivå fra normale celler [3, 26].

Både de immunologiske og molekylærbaserte metodene innebærer mulighet for falsk positiv og falsk negativ deteksjon [21, 27]. Et annet utfordrende problem er heterogeniteten til STC populasjonen [27, 28]. Det innebærer at STC utvikler seg til mange nye fenotyper av opphavscellen som potensielt ikke

uttrykker biomarkørene i det hele tatt, eller kun i redusert grad [27, 28]. Dette vanskeliggjør deteksjon av alle hele STC-populasjonen som kan befinne seg i prøven [27, 28]. Deteksjon ved bruk av flere biomarkører samtidig kan bidra til å øke sannsynligheten for dette [29, 30]. Per dags dato har de fleste av deteksjonsmetoder for STC mangler med hensyn til reproducerbarhet, sensitivitet og/eller spesifisitet [20].

2.4 Sirkulerende tumorceller som biomarkør for bukspyttkjertelkreft

Forholdet mellom STC og kreft i bukspyttkjertelen er ikke undersøkt like omgående som for mange andre krefttyper av epitelopprikkelse, som f.eks. brystkreft og tarmkreft [3, 29]. Basert på funn av metastaser i andre organer bestående av kreftceller som har oppstått i bukspyttkjertelen, kan man anta at de har evnen til å opptre som STC [27]. Det er funnet indikasjoner på at STC kan detekteres hos pasienter med bukspyttkjertelkreft, og at dette kan ha prognostisk verdi, både for opererbar og uopererbar svulst [29-35]. Bukspyttkjertelkreft oppstår hovedsakelig fra epitelceller i gangsystemet av kjertelen, og det benyttes derfor epitelspesifikke protein eller mRNA som biomarkører for indirekte deteksjon av STC her [2, 25, 32, 35]. Flere studier antyder at bruk av STC som biomarkører er lovende, men ingen kan foreløpig fastsette sikre kliniske bevis av STC deteksjon hos pasienter med bukspyttkjertelkreft [29-35]. For å kunne oppnå dette må det utføres flere og større studier på området [4].

3 Material

3.1 Prøvematerial

3.1.1 Blodprøve

Normalt blodprøvemateriale fra friske, frivillige personer tas på EDTA-rør.

3.1.2 Cellekultur

Cellelinjene ble brukt i oppgaven ble kjøpt fra ECACC (European Collection of Cell Cultures).

Tabell 1: Oversikt over cellelinjene benyttet til oppgaven.

Cellelinje	Beskrivelse	ECACC katalog nr.
AsPC-1	Humant adenokarsinom fra bukspyttkjertel	96020930
BxPC-3	Humant adenokarsinom fra bukspyttkjertel	93120816
PANC-1	Humant adenokarsinom fra bukspyttkjertel	87092802
LS174T	Humant adenokarsinom fra tarm	87060401

3.2 Buffere og løsninger

- 0,9% NaCl, 1 L
 - 9 g NaCl
 - dH₂O til 1000 ml
- 5xTBE buffer, 1 L
 - 54,0 g Tris base
 - 27,5 g borsyre
 - 20 ml 0,5M EDTA
 - dH₂O til 1000 ml
- 0,5xTBE, 2 L
 - 200 ml 5xTBE buffer
 - dH₂O til 2000 ml

- 0,5 M EDTA, 500 ml
 - 73,1 g EDTA
 - dH₂O til 500 ml
- Krystallfiolett fargevæske, 50 ml
 - 0,025 g krystallfiolett
 - 2,5 g konsentrert eddiksyre
 - dH₂O til 50 ml
- RBC lysis buffer, 1 L
 - 8.26 g NH₄Cl
 - 1,00 g KHCO₃
 - 0,037 g EDTA
 - dH₂O til 1000 ml

3.3 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2: Oversikt over kjemikalier og reagenser benyttet til oppgaven.

Kjemikalie/reagens	Produsent	Artikkelnr.	LOT nr.
Natrium klorid – NaCl: “Natriumchloride, Fluka BioChemika”	Sigma-Aldrich	71376	1223968 24905133
Acetic acid 100%	VWR	20104-298	0505564
Krystallfiolett: “Crystal violet, Microscopy Certistain”	Merck	1.15940.0025	FN1130540 048
Trypan Blue Solution (0.4%)	Sigma-Aldrich	T8154	84K2371
Tris base: “Trizma® base, min. 99.9% titration”	Sigma-Aldrich	T1503	077K5410
Borsyre: “Boric Acid, Molecular Biology Grade”	Calbiochem®	203667	B47460
Agarose NA	GE Healthcare	17-0554-02	311158
10 µg/µl Ethidium Bromide solution	VWR	4439220	HC946162

- Tabellen fortsetter på neste side

”Etablering av metode for anriking og deteksjon av sirkulerende tumorceller i
perifert blod”

- Tabellen fortsetter fra forrige side

Kjemikalie/reagens	Produsent	Artikkelnr.	LOT nr.
Loading buffer - gel: “Blue/Orange 6x Loading Dye”	Promega	G190A	18772202 / 30738811
Størrelsesindikator: “100bp DNA ladder ”	Promega	G2101A	18149204
Størrelsesindikator: “25bp DNA Step Ladder	Promega	G451A	0000003138
Lymphoprep™	Axis Shield	1114545	12CKS15
2-Mercaptoethanol, min. 98% (β-ME)	Sigma	M3148	09729MH
5 x First Strand Buffer (5xFS buffer)	Invitrogen™	P/N Y02321	709042 / 492015
RQ1 DNase Stop Solution	Promega	M199A	25952704
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M610A	25308608
Random Primers (1 µg/µl random nonamer)	Invitrogen™	P/N 58875	428875
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen™	P/N 100000840 - 10777-019	1049411 / 866803
25 mM dNTP: - dATP (2'-Deoxyadenosine 5'-Triphosphate) - dCTP (2'-Deoxycytidine 5'-Triphosphate) - dGTP (2'-Deoxyguanosine 5'-Triphosphate) - dTTP (2'-Deoxythymidine 5'-Triphosphate)	GE Healthcare	- 28406501V - 28406511V - 28406521V - 28406531V	- 375572 - 364653 - 364654 - 364656
0,1 M DTT	Invitrogen™	P/N Y00147	1382315 / 671148
M-MLV	Invitrogen™	28025-021	724966
Enzym: PvuII 10u/µl, 2500u	Fermentas	ER0631	00084038
10x buffer G med BSA, 1ml	Fermentas	B65	00085724
Ammonium klorid - NH ₄ Cl	Merck	1.01145.0500	A766645 716
Kalsium hydrogen karbonat - KHCO ₃	Merck	1.04854.0500	A759654 737
EDTA: “Tritriplex III”	Merck	1.08418.0250	K30666618 238
qPCR Human Reference Total RNA	Agilent Technologies	750500-41	0006107792 / 0006046583

3.3.1 Medium og reagenser for dyrking av cellekultur

Tabell 3: Oversikt over cellekulturmedium og -reagenser benyttet til oppgaven.

Medium/reagens	Produsent	Artikkelnr.	LOT nr.
HyClone - 1640 medium (1x) - L - Glutamine	Termo - HyClone	SH30096.01	AVH74051
Dulbecco's modified eagle's medium	Sigma-Aldrich	D6546	RNBCO 422
HyClone - 1640 medium (1x) - L - Glutamine	Termo - HyClone	SH30096.01	AVH74051
Minimum essential medium eagle	Sigma-Aldrich	M2279	RNBB 4050
Dulbecco's phosphate buffered saline	Sigma	D8537	RNBB5812 / RNBB4652
0.25%trypsin-EDTA solution	Sigma	T4049	10J956
Foetal Bovine Serum	Sigma	F7524	118K3395
L-glutamine	Sigma	G7513	RNBB6653
MEM Non-Essential Amino Acid Solution 100x	Sigma	M7145	RNBB9863
Sodium Pyruvate	Sigma	S8636	RNBB2731

3.4 Primere

3.4.1 Nye primere til studien

Alle primerne er produsert hos Eurofins MWG Operon.

Tabell 4: Oversikt over nye primere til studien.

Primer	Sekvens (5' → 3')	Informasjon om PCR-produkt
CEACAM6 – FA	CACCGTCGGCATCACGA	113 bp
CEACAM6 – RA	GAAGAATTCAGGGTCTGGTCCA	Primerne binder til to forskjellige eksoner.
CEACAM6 – FB	ACAGTCTCTGGAAGTCTCCTGT	59 bp
CEACAM6 – RB	CCAATCGTGATGCCGACGGT	Primerne binder til ekson-ekson overgang.
CK8 – FA	ATGAACGTCAAGCTGGCCTG	144 bp.
CK8 – RA	CGAGCTCAGACCACCTGCATA	Primerne binder til ekson-ekson overgang.
CK8 – FB	AGAGCCGGCTGGAGTCTGGGAT	84 bp.
CK8 – RB	AGGCCGAGCTCAGACCACCT	Primerne binder til overgang fra ekson 6 og 7.
CK8 – FC	TCCTCAGGCAGCTATATGAAGAG	150 bp.
CK8 – RC	GGTTGGCAATATCCTCGTACTGT	Primerne binder til ekson 4 (F) og 5 (R).
CK8 – FD	GGAGACTCTGGGCCAGGAGAAG	195 bp.
CK8 – RD	CCTTCCAGGCGAGACTCCAGC	Primerne binder til ekson 2 (F) og 4 (R)
CK8 – FE	TAGCACTGGGAACAGGAGA	169 bp.
CK8 – RE	TTTGACATTGGCAGAGCTA	Primerne binder delvis til polyA-halen.
CK8 – FF	CATGGGAGGCATCACCGCAG	164 bp.
CK8 – RF	GCTCCAGGAACCGTACCTTGTC	Primer R binder til ekson ½ overgang.
MMP11 – FA	TCCAGGATGCTGATGGCTATGC	142 bp.
MMP11 – RA	AAAGTGTGGCAGGCTCGGC	Primerne binder til ekson-ekson overgang.
MMP11 – FB	CCGCAACCGACAGAAGAGG	145 bp.
MMP11 – RB	ATCGCTCCATACCTTTAGGGC	Primerne binder til ulike eksoner
PRSS1 – FA	GCCACTGGCACGAAGTGCCTC	62 bp.
PRSS1 – RA	TAGTCGGCGCCAGAGCTCGCA	Primerne binder til ekson-ekson overgang.
PRSS1 – FB	CACTCCTGATCCTTACCTTTGTGGC	118 bp.
PRSS1 – RB	TTCAGGGACACCTGGTAGGGGA	Primerne binder til hvert sitt ekson.
PRSS1 – FC	CTGCTACAAGTCCCGCATC	137 bp.
PRSS1 – RC	TGATGTCATTGTTTCAGAGTCTTCC	Primerne binder i overgang fra ekson 2 og 3.
PRSS1 – FD	ATCAGCAGGCCACTGCTACA	150 bp.
PRSS1 – RC	TGATGTCATTGTTTCAGAGTCTTCC	Primerne binder i overgang fra ekson 2 og 3.

3.4.2 Tidligere etablerte primere

Alle primerne er produsert hos Eurofins MWG Operon.

Tabell 5: Oversikt over tidligere etablerte primere benyttet i oppgaven.

Primer	Sekvens (5' → 3')	Informasjon om PCR-produkt
BCR – sg1F_	GCTCTATGGGTTTCTGAATG	99 bp.
BCR – sg1R_	AAATACCCAAAGGAATCCAC	Spanner over intron. Husholdningsgen
CEACAM5 – FC	GGGACCTATGCCTGTTTTGTCTC	151 bp.
CEACAM5 – RC	GAGCAACCCCAACCAGCAC	Spanner over ekson-ekson grense.
CK19 – F	GATGAGCAGGTCCGAGGTTA	96 bp.
CK19 – R	TCTTCCAAGGCAGCTTTCAT	Binder til to forskjellige eksoner.
EPCAM – FB	CGCAGCTCAGGAAGAATGT	88 bp.
EPCAM – RB	TGAAGTACACTGGCATTGACG	Spanner over ekson-ekson grense.

3.5 Kit

Tabell 6: Oversikt over kit benyttet i oppgaven.

Kit	Produsent	Varenummer	LOT nummer
Small RNA Kit	Agilent Technologies	5067-1563	MG20BK01
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies	5067-1511	NB128K03
QIAshredder	Qiagen GmbH	79656	139305586
AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (50)	Qiagen GmbH	80004	139291079 / 139302517
RNeasy MinElute Cleanup Kit (50)	Qiagen GmbH	74204	139284303
RNeasy® Mini Kit (250)	Qiagen GmbH	74106	127150820
qPCR™ Core kit for SYBR® Green I	Eurogentec	RT-SN10-05	Batch# 29
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH	28104	136269400
Big Dye® Terminator v.3.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4336915	1101152M

3.6 Instrumenter

Tabell 7: Oversikt over instrumenter benyttet i oppgaven.

Instrument:	Merke:	Produsent:
Mikrofluiditet kapillær-elektroforese	2100 Bioanalyzer	Agilent
PCR instrument	Mx3000P	Stratagene
Spektrofotometer	NanoDrop 2000C	Thermo Scientific
Gel Imager	SynGene, INgenius	SynGene Bio Imaging
Elektroforese strømforsyningsapparat	EPS301	Amersham pharmacia biotech
Varme sykler	GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems
Vannbad	Sub	Grant
	GD120	Grant
Inkubatorer	Hera cell 150	Heraeus (skap)
	QBD2	Grant
Invertert fasekontrast mikroskop	CKX31	Olympus
Sentrifuger	Microfuge 1.0R	Heraeus
	Heraeus Pic 17 centrifuge	Thermo Scientific
	Centrifuge 5804	Eppendorf
Haemocytometer	Bürker CE	Superior Marienfeld

4 Metoder

4.1 Anskaffelse av prøvematerial

4.1.1 Blodprøve på EDTA-rør

Prøvematerialet som utgjør basismateriale i denne oppgaven er blodprøver fra normale, friske frivillig personer. Blodprøven er venøst fullblod tatt på EDTA-rør. EDTA hindrer at blodet koagulerer [36, 37]. Ved hver prøvetakning kastes det første prøveglasset som fylles for å unngå kontaminasjon av epitelceller fra huden.

4.1.2 Dyrking av cellelinjer

Dyrking av cellelinjer utføres for å oppnå større mengder uniformt prøvemateriale av ulike typer kreftceller. Disse kan holdes i vekst i egnete beholdere over lengre tid dersom vekstforholdene legges til rette. Det innebærer bestemt temperatur, gassblanding og vekstmedium, samt at platetettheten (ant. celler pr. volum vekstmedium) opprettholder et visst nivå [38, 39]. Det dyrkes tre cellelinjer fra svulst i bukspyttkjertelen: AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt cellelinjen LS174T som er fra svulst i tarm. Alle har adherent vekstmåte og epitel morfologi.

Prosedyre:

Celledyrkingen ble utført etter prosedyre fra leverandør: ”ECACC Handbook – Fundamental Techniques and Protocols for ECACC Cell Lines” og ECACC spesifikasjoner oppgitt for hver cellelinje, se tabell 8 [38, 40-43]. Kort gjengitt:

- Aseptisk teknikk benyttes ved all håndtering av cellelinjene
- Benytter ECACC spesifikasjoner oppgitt for hver cellelinje

Oppstart av cellekultur fra frossen tilstand:

- Frossen celleampulle tines raskt i vannbad
- Overfør cellekulturmateriale til cellekulturflaske med forvarmet vekstmedium
- Sett i varmeskap under angitte spesifikasjoner for cellelinjen

Splitting av cellekultur:

- Fjern det brukte vekstmediet
- Vask cellelaget med PBS, volum tilsvarende halve mengden av vekstmedium tilsatt
- Løsriv cellene fra vekstflaten ved tilsatt av 0,25% trypsin-EDTA tilsvarende 1 ml per 25cm² vekstflateareal
- Inkuber i varmeskap til cellene er fritt i løsningen, ca 2-10 minutter
- Tilsett nøytraliserende mengde vekstmedium
- Overfør nødvendig mengde celler for oppstart av ny cellekultur til ny cellekulturflaske med forvarmet vekstmedium
- Sett i varmeskap under angitte spesifikasjoner for cellelinjen

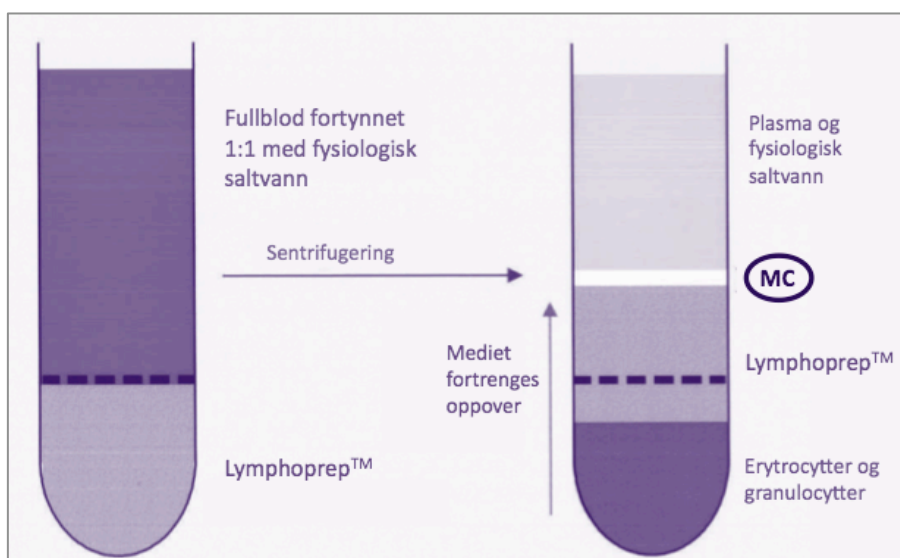
Tabell 8: Oversikt over cellelinjer dyrket, oppgitt med spesifikasjoner for dyrkningsforhold fra ECACC-skjema for cellelinjene [40-43].

Cellelinje	AsPC-1	BxPC-3	PANC-1	LS174T
Celle-materiale	Humant adeno-karsinoma fra bukspyttkjertel	Humant adeno-karsinoma fra bukspyttkjertel	Humant adeno-karsinoma fra bukspyttkjertel	Humant adeno-karsinoma fra tarm
Vekst-medium	RPMI 1640 + 2mM glutamine + 1mM natrium pyruvate (NaP) + 10% føtalt bovint serum (FBS)	RPMI 1640 + 2mM glutamine + 10% føtalt bovint serum (FBS)	DMEM + 2mM glutamine + 10% føtalt bovint serum (FBS)	EMEM (EBSS) + 2mM glutamine + 1mM uessensielle aminosyrer + 10% føtalt bovint serum (FBS)
Rutine for splittelse	Splitt cellekulturen ved 70-80% platetetthet i forholdet 1:3, dvs. 2-4x10,000 celler/cm ² ved bruk av 0,25% trypsin. Dyrk ved 37°C og 5% CO ₂ .	Splitt cellekulturen ved 70-80% platetetthet i forholdet 1:3-1:6, dvs. 2-4x10,000 celler/cm ² ved bruk av 0,25% trypsin. Dyrk ved 37°C og 5% CO ₂ .	Splitt cellekulturen ved 70-80% platetetthet i forholdet 1:3-1:6, dvs. 2-4x10,000 celler/cm ² ved bruk av 0,25% trypsin. Dyrk ved 37°C og 5% CO ₂ .	Splitt cellekulturen ved 70-80% platetetthet i forholdet 1:3-1:5, dvs. 2-5x10,000 celler/cm ² ved bruk av 0,25% trypsin. Dyrk ved 37°C og 5% CO ₂ . Denne cellekulturen vokser sakte og i store klumper.

4.2 Isolering og kvantitering av cellemateriale

4.2.1 Isolering av mononukleære celler ved Lymphoprep-metoden

Mononukleære celler (MC) er en fellesbetegnelse for celler med kun én, rund kjerne, og STC faller inn under denne kategorien [20, 44]. Ettersom STC forekommer i svært lav konsentrasjon i blod, kreves en oppkonsentrering for å øke sensitiviteten for deteksjon [20]. En av de vanligste metodene er bruk av tetthetsgradientmedium kombinert med sentrifugering [44-46]. Lymphoprep™ er et tetthetsgradientmedium med en tettheten 1,007 g/ml. Dette sørger det for effektiv sedimentering av materiale med tetthet høyere enn denne terskelverdien under sentrifugering [44, 45]. Prøvemateriale for isolasjon av MC er EDTA-fullblod, som vil si at det inneholder intakte blodceller og plasma. Monocytter og lymfocytter er blodceller i kategorien MC og disse har tettheter under terskelverdien til Lymphoprep™. Ved Lymphoprep-metoden foreligger dermed MC-materialet i eget sjikt etter sentrifugering, som da består av lymfocytter, monocytter og eventuelle STC. Disse kan pipetteres ut og dermed isoleres fra resten av prøven. Referanseområdet for MC i normalt blod er $1,0 - 4,3 \cdot 10^9$ MC/L [44, 45, 47]. Se figur 3 for illustrasjon av Lymphoprep-metoden.



Figur 3: Modifisert oversiktsfigur over Lymphoprep-metoden for isolering av MC (mononukleært cellemateriale), basert på figur fra Lymphoprep-protokoll utgitt av leverandør (Axis-Shield). [48] Blodprøven fortynnes 1:1 med fysiologisk saltvann som avsettes forsiktig over Lymphoprep™. Etter sentrifugering foreligger MC-materialet adskilt fra resten av blodcellene ovenpå Lymphoprep™ som så kan avpipetteres [48].

Prosedyre:

Lymphoprep-metoden utføres etter modifisert prosedyre for Lymphoprep-mediet utgitt av leverandør (Axis-Shield) [48]. Kort gjengitt:

- EDTA-blod fortynnes 1:1 med 0,9% NaCl som deretter avsettes forsiktig over Lymphoprep-mediet (tilsvarende mengde ufortynnet EDTA-blod)
- Sentrifuger i romtemperatur ved 800xg i 20 minutter uten brems
- Overfør det mononukleære cellelaget til nye rør
- Fortynn med 0,9% NaCl til totalt 50 ml og sentrifuger i 10 minutt ved 250xg med brems. Fjern resulterende supernatant og gjenta samme fortynning og sentrifugering.
- Fjern supernatanten og samle cellemateriale fra like prøver i ett rør, evt. fortynn cellesuspensjonen til ønsket totalvolum med 0,9% NaCl.

4.2.2 Konsentrasjonsberegning av cellesuspensjon ved telling i lysmikroskop

For å bestemme konsentrasjonen av isolert cellemateriale utføres celledelling i Bürker tellekammer. Dette tellekammeret rommer 0,1 µl prøvemateriale over telleflaten slik at konsentrasjonen kan beregnes (se ligning 1). Til tellingen benyttes et fasekontrast mikroskop som sørger for høy kontrast av cellene mot sin omgiende bakgrunn [49]. Det tilsettes fargestoff til cellesuspensjonen i forkant celledelling, for å lettere kunne se hva som skal telles eller ikke. Cellene kan farges på to måter avhengig av cellematerialet:

1. Celler fra blodprøver farges med krystallfiolett fargevæske for å kunne se tydelig hva som er MC basert på kjerneinnhold. Krystallfiolett farger kjernematerialet blått ved å binde til DNA, samtidig som eventuelle erythrocytter tilstede hemolyseres av eddiksyren [50, 51].
2. Tumorceller fra cellelinjene tilsettes fargevæsken 0,4% Trypan blå, som gjør det mulig å skille mellom levende og døde celler. Fargevæsken øker kontrasten av levende celler som sees som lyse prikker mot en blålig bakgrunn. Døde eller skadde celler vil ta fargevæske inn i cellen og sees som tydelige blå prikker [52].

Prosedyre:

- Et rør tilsettes cellesuspensjon og fargevæske:
 - forholdet 1:20 med krystallfiolett fargevæske
 - forholdet 1:1 med 0,4% Trypan blå fargevæske
- Blandingen legges straks opp i Bürkers tellekammer
- Teller 2-9 A-ruter i mikroskop på 10x forstørrelsesobjektiv (se figur 4)
- Beregner cellekonsentrasjon v.h.a. ligningen:

$$C = \frac{N}{A * V * F} \times 1000 = \text{celler/ml} \quad \text{Ligning 1}$$

hvor

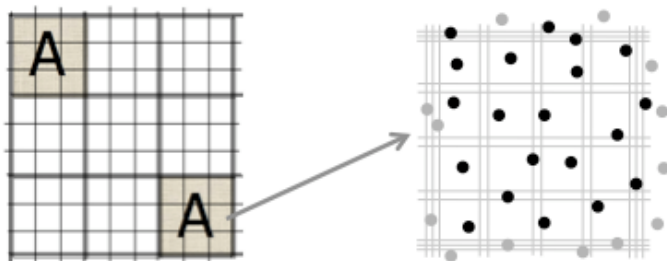
C = Cellekonsentrasjon (celler/ml)

N = Antall talte celler

A = Antall A-celler i tellekammeret benyttet som utgangspunkt for N

V = Volumet av tellekammeret (0,1)

F = Fortynningsfaktor med fargevæske



Figur 4: Illustrasjon av telleflaten i Bürker tellekammer og hva som utgjør en A-celle (t.v), samt hvordan man teller celler innad i én A-celle (t.h). Her teller man kun cellene som er markert sort, mens cellene markert grå ikke skal telles.

4.3 Isolering av RNA og mikro RNA

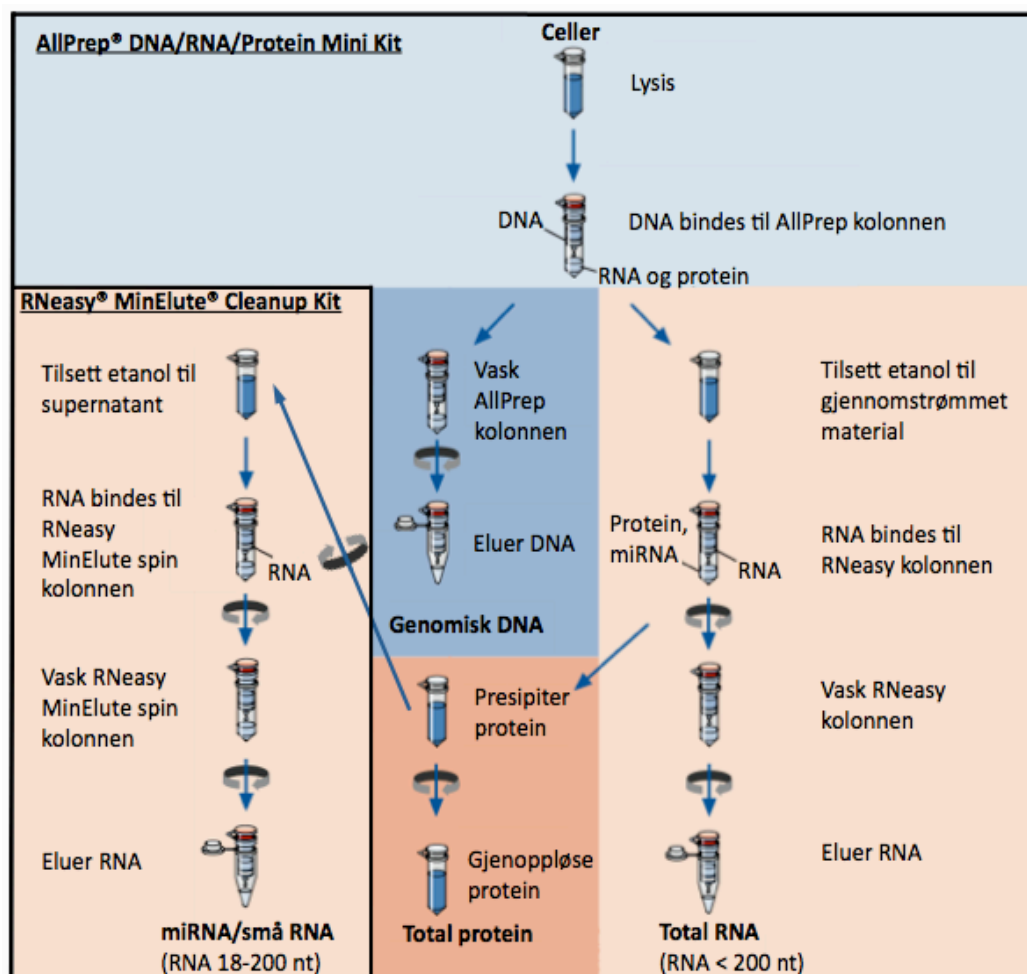
Kittet AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kit isolerer DNA og RNA samt proteiner i én prosedyre. Ved bruk av tilleggs kittet RNeasy[®] MinElute[®] Cleanup Kit kan man også isolere mikro RNA (miRNA) og andre små RNA fra samme prøve.

Separasjonen er basert på kromatografiske seleksjonsmetoder i kolonner (RNA/DNA/miRNA) og bunnfelling (protein), kombinert med høyhastighets

sentrifugering. Først fjernes DNA fra prøvematerialet, før RNA fragmenter som er større enn 200 nukleotider isoleres og elueres i eget prøverør. Deretter felles proteiner ut og resten av prøvematerialet benyttes til isolasjon av RNA fragmenter i størrelsesområdet 18-200 nukleotider [46, 53-55]. Se figur 5 for mer detaljert oversikt over metoden.

Prosedyre:

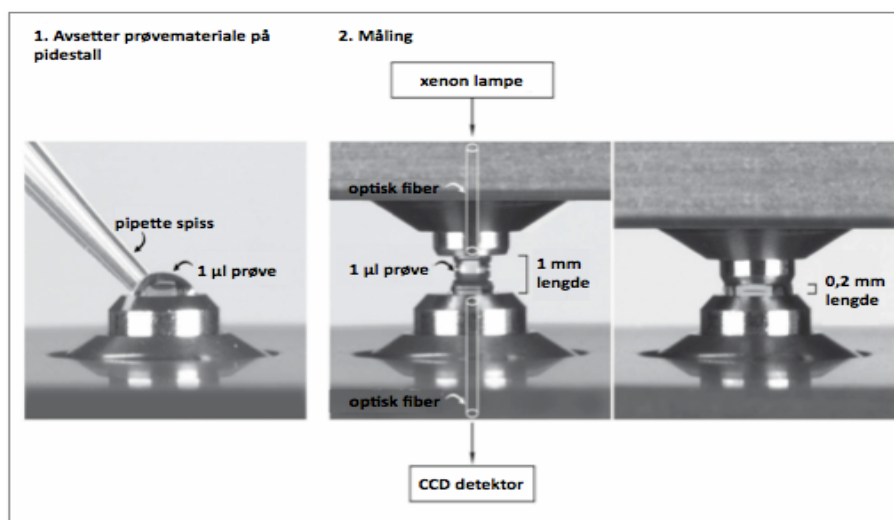
Isolering av RNA og miRNA utføres etter prosedyrer fra kittene: ”AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Handbook” og ”Quiagen Supplementary Protocol - Purification of miRNA from cells and tissues using the AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit and RNeasy® MinElute® Cleanup Kit” fra leverandøren Quiagen [53, 54].



Figur 5 : Oversikt over prosedyren for isolering av RNA, DNA, protein og miRNA/småRNA. Modifisert fra figur oppgitt i prosedyren fra kittet: ”AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Handbook” (Qiagen) [53].

4.4 Spektrofotometri

Spektrofotometeret NanoDrop™ 2000c måler RNA konsentrasjonen i ng/ μ l. Absorbans (A) av RNA måles ved 260 nm, og forholdet til konsentrasjon ved $A=1$ er 44 μ g/ml RNA. Programvaren til instrumentet beregner konsentrasjonen i prøven v.h.a. Beer-Lamberts lov. Denne innebærer at absorbansen til en løsning er direkte proporsjonal til konsentrasjonen av de absorberende molekylene og lengden av prøvematerial som lyset passerer [46, 56]. Se figur 6 for mer detaljert oversikt over metoden. Det måles også absorbans ved bølgelengden 280 nm hvor eventuelt forurensende proteiner detekteres. Man får en indikasjon på renheten av prøvemateriale ved å se på forholdet mellom absorbansverdiene ved de to bølgelengdene, $A_{260}-A_{280}$. [46, 56] Rent RNA har $A_{260}-A_{280}$ -ratio mellom 1,9-2,1 ved pH 7,5 [53].



Figur 6: Oversikt over spektrofotometrisk analyse av RNA ved NanoDrop™ 2000c (modifisert fra figur fra instrumentprotokoll fra Thermo Scientific) [56]. Prøvemateriale avsettes på nedre optiske plattform (1), og absorbansen måles i væskesøylen som dannes mellom de optiske flatene (2). Lyskilden er en xenon lampe som sørger for lysstråle med ulike bølgelengdene, og CCD-detektoren (charged-coupled device) sørger for effektiv avlesning av absorbans [56].

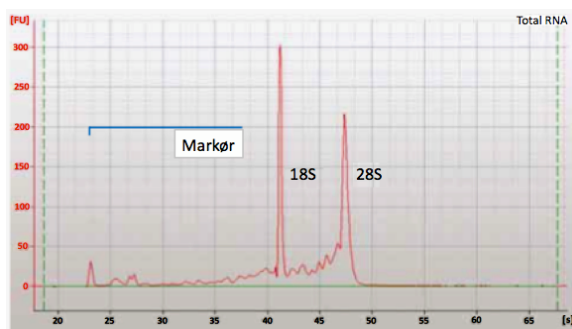
Prosedyre:

- 1-2 μ l prøvematerial avsettes på pidestallen til den nedre optiske flaten i instrumentet . Lukk instrumentet. Mål absorbans ved 260nm og 280nm.
- Først analyseres RNase-fritt vann (mediet RNA er eluert i) for å nullstille instrumentet, deretter RNA prøven.

4.5 Mikrofluiditet kapillærelektroforese

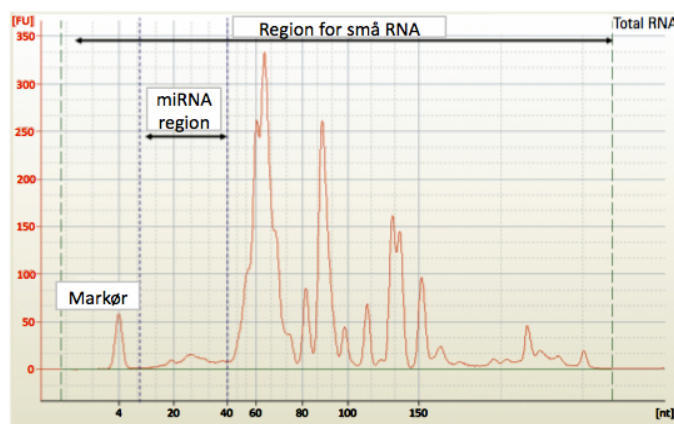
Agilent 2100 bioanalyser benytter mikrofluiditet kapillærelektroforese i såkalt ”lab-on-a-chip”-format (LOC) [57-59]. LOC er små, ferdigfabrikkerte brikker som kan utføre mange kompliserte kjemiske analyser i mikroformat [60].

Mikrofluiditet er et begrep som innebærer mekanismene for væskeflyt i tynne kanaler [61, 62]. Agilent RNA 6000 Nano Kit inneholder brikker og reagenser designet for separasjon av RNA fragmenter. Det er mulig ettersom de oppnår ulik hastighet avhengig av størrelsen og detekteres v.h.a. laserindusert fluoressens ved endt elektroforese. Mengden fluoressens detektert korrelerer til mengden RNA av gitt fragmentstørrelse. Resultatet er en kvalitetsvurdering av RNA-materialet med henhold til integritet, renhet og konsentrasjon. Dette fremstilles i form av elektroferogram, gel-lignende bilder og i tabeller produsert av programvaren til instrumentet. Elektroferogrammet er en grafisk fremstilling av elektroforesen som viser nukleotidfragmentene med nukleotidstørrelse og fluoressensintensitet [57, 58, 63]. Vurdering av RNA integritet oppgis ved bruk av Agilents patenterte RIN algoritme, og utgis som RNA integritets nummer (RIN). I denne sammenhengen innbærer integritet i hvor stor grad RNA materialet er degradert, ettersom RNA er svært utsatt for dette under isoleringsprosessen [58, 59, 63]. Algoritmen innebærer en vurdering av forholdet mellom to ribosomale RNA (rRNA) enheter: 18S og 28S, samt kurvens separasjon med baselinjen og en rekke andre karakteristikker ved elektroferogrammet. RIN oppgis som verdier mellom 1 og 10, hvor verdien 10 viser til optimal kvalitet av RNA materiale. Verdier under 10 viser til ulik grad av svekket RNA integritet [57-59].



Figur 7: Elektroferogrammet viser total RNA fra vellykket analyse ved bruk av Agilent RNA 6000 Nano Kit. Figuren er fra protokollen utgitt av leverandør (Agilent Technologies). [63]

Agilent Small RNA Kit inneholder brikker og reagenser designet for separasjon av RNA fragmenter i størrelsesområde 6 – 150 nukleotider. Resultat innebærer konsentrasjonsforhold av miRNA og andre små RNA, samt fremstilling av disse i et elektroferogram [64].



Figur 8: Elektroferogrammet viser total RNA fra en vellykket analyse ved bruk av Agilent Small RNA Kit. Den viser to inndelte områder, ett for små RNA (0-150 nt) og ett for miRNA (10-40 nt), samt én lav topp for markøren. I miRNA-regionen sees tilstedeværelsen av miRNA som en liten, slak topp. Figuren er fra protokollen utgitt av leverandør (Agilent Technologies). [64]

Prosedyre:

Kvalitetsvurdering av RNA og miRNA ble utført etter prosedyrene fra kittene levert av Agilent Technologies: ”Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide” og ”Agilent Small RNA Kit Guide” [63, 64].

4.6 Revers transkripsjon med DNase behandling

Revers transkripsjon (RT) innebærer tillaging av cDNA (komplementært DNA) fra RNA sekvenser. Reaksjonen katalyseres av enzymet M-MLV, som er en rekombinant DNA polymerase [22, 65]. DNase behandlingen innebærer å fjerne rester av DNA i prøvematerialet som kan forstyrre videre analyser av materiale. Til dette benyttes restriksjonsenzymet RQ1 DNase som degraderer både dobbelt- og enkeltrådet DNA [66]. Inhibitoren RNaseOUT benyttes for å beskytte RNA mot eventuelle RNaser tilstede [67]. Tillaging av kontroll gjøres for hver runde RT som utføres. Denne kontrollen tilsette ikke M-MLV under RT slik at det ikke dannes cDNA av prøvemateriale her. Kontrollen analyser sammen med de andre prøvene under påfølgende rt-qPCR, hvor den fungerer som negativ cDNA

kontroll. Eventuell deteksjon av DNA i kontrollen skyldes da kontaminasjon av prøvematerialet [26].

Prosedyre

- Lag DNase-mastermiks til alle de planlagte reaksjonene ved å blande følgende:
 - 5x FSS buffer: 2 µl x antall reaksjoner
 - RQ1 DNase: 1 µl x antall reaksjoner
 - RNaseOUT RNase inhibitor : 0,25 µl x antall reaksjoner
- Fordel 3 µl DNase-mastermiks i RNase-frie 1,5 ml rør
- Tilsett 500 ng RNA til hvert rør og etterfyll til totalt 20 µl med mQH₂O
- Inkuber 30 minutter i 37°C vannbad.
- Tilsett 1,0 µl RQ1 stoppløsning til hvert rør
- Inkuber 10 minutter ved 65°C for å inaktivere enzymet
- Lag mastermiks 1 (M1) til de planlagte reaksjonene og en negativ kontroll (NoRT), bestående av:
 - 1 µg/µl random nonamer: 0,2 µl x antall reaksjoner
 - 25 mM dNTP: 0,4 µl x antall reaksjoner
 - RNase-fritt vann (mQH₂O): 0,4 µl x antall reaksjoner
- Tilsett 1,0 µl M1 til hvert rør med DNase-behandlet RNA.
- Inkuber 5 minutter ved 65°C. Sett rett på is (min. 2 min).
- Lag mastermiks 2 (M2) til planlagte antall reaksjoner (+1):
 - 5x FSS buffer: 2 µl x antall reaksjoner
 - 0,1 M DTT: 2 µl x antall reaksjoner
 - RNaseOUT RNase inhibitor.: 1,0 µl x antall reaksjoner
 - RNase-fritt vann (mQH₂O): 2,0 µl x antall reaksjoner
- Tilsett 7 µl til hvert rør med RNA.
- Inkuber i 2 minutter i 37°C vannbad.
- Tilsett 1,0 µl M-MLV revers transkriptase til hvert rør (på benken). NB! Skal ikke tilsettes i NoRT prøven.
- Inkuber 10 minutter ved romtemperatur.
- Inkuber 1 time ved 37°C.

- Inkuber 15 minutter ved 65°C for å inaktivere enzymet.
- Tilsett 30 µl mQH₂O i hvert rør for endelig konsentrasjon 10 ng/µl cDNA.

4.7 qPCR

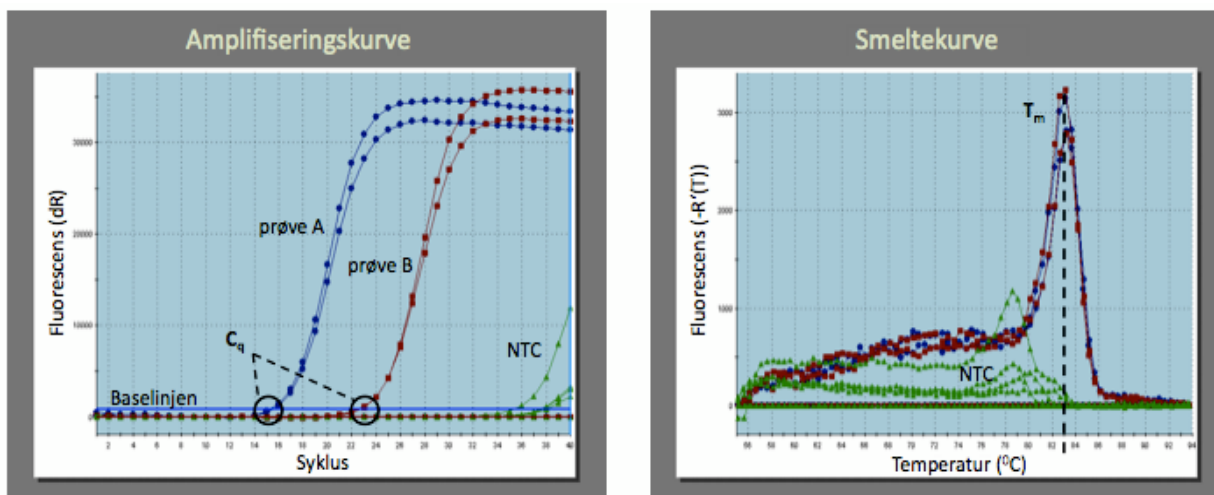
Metoden qPCR er forkortelsen for kvantitativ polymerase kjedereaksjon. Den utføres i såkalt ”real-time” (rt), og er den mest benyttede teknikken for deteksjon av mRNA uttrykksnivå i STC. rt-qPCR er en svært sensitiv metode, hvor én enkelt DNA sekvens kan kopieres opp til detekterbart nivå [20, 22].

Kopieringsprosessen starter med at primere, som er spesialdesignet og kunstig framstilte oligonukleotid, binder spesifikt til ønsket DNA sekvens. Sammen med DNA polymerase, frie nukleotider, PCR buffer og salter, kopieres den ønskede sekvensen eksponentielt. Dette skjer via sykluser av ulike temperatursteg som sikrer optimale arbeidsforhold for DNA polymerasen og primerne [22, 68]. Deteksjonsmetoden av de nye DNA kopiene kan gjøres v.h.a. det fluorescerende fargestoffet SYBR® Green I, som binder uspesifikt til alt dobbeltrådet DNA [69]. Alternativt, kan det benyttes hydrolyseprober (TaqMan®-basert deteksjon) [70]. Disse er oligonukleotid designet for biomarkørens mRNA sekvens, da med et reporter fluorescens fargestoff (kalt ”reporter”) ved 5’ende. Ved 3’ende er det bundet et ”nøytraliserende” fluorescens fargestoff kalt ”quencher”, som hindrer reporterens fluoressens via FRET (fluorescens resonans energy transfer). Under avslutningen av kopiering av PCR-produktet vil quencheren bli kuttet av når Taq DNA polymerasen når proben. Reporterens fluorescens blir dermed detekterbart [70].

Mengden fluorescens som avgis fra prøven måles etter hver syklus ved rt-qPCR, og intensiteten er direkte proporsjonalt til mengden PCR-produkt (DNA kopier av ønsket sekvens) som er dannet. I teorien doubles mengden PCR-produkt for hver syklus [22, 68, 71]. Terskelverdien for deteksjon er syklusen der mengden PCR-produkt blir detekterbart over bakgrunnsfluorescensen. Denne verdien kalles prøvens C_q-verdi (quatification cycle) [26]. C_q-verdien er dermed lavere desto høyere konsentrasjon av cDNA i prøven, og oppgir indirekte hvor mye av biomarkøren (mRNA) som var tilstede i det opprinnelige prøvematerialet [26]. For å oppnå optimale kopieringsforhold kreves bestemte konsentrasjoner

av primer og $MgCl_2$ til hvert primersett. Her tilstrebes det å eliminere eventuell dannelse av primer-dimer, dvs. oppkopiering av selve primerne og ikke ønsket DNA sekvens. Ved å analysere negativ vannkontroll for hver prøve, kalt ”no template control” (NTC), kontrolleres evt. forekomst av uspesifikk kopiering under analysen [26].

Programvaren til varmesykleren Mx3000P generer en amplifiseringskurve for hver reaksjon, som er basert på målt fluorescensintensitet (dR) og antall sykluser. Det kan også fremstilles en smeltekurve basert på avtagende fluorescensintensitet ($-R'(T)$) dersom man benytter SYBR® Green I deteksjon. Idet PCR-produkt smelter under påført temperaturstigning etter siste kopieringssyklus, vil dette kunne detekteres. Hvert PCR-produkt har et karakteristisk smeltepunkt (T_m) [71].



Figur 9: Eksempel på amplifiseringskurve (t.v.) og smeltekurve (t.h.) over en real time qPCR analyse av to prøver analysert i parallell for én biomarkør. Basert på amplifiseringskurven har de to prøvene, A og B, henholdsvis $C_q=15$ og $C_q=23$. Dette tilsier at prøve A inneholder $2^{(23-15)} = 512$ ganger mer av biomarkøren enn prøve B. Smeltekurven viser at begge prøvene har dannet samme PCR-produkt ved at de har samme smeltepunkt ($T_m \approx 83^\circ C$). I både amplifiserings- og smeltekurven sees positive NTC (no template control) som grønne kurver og baselinjen som en klar blå strek (satt til 800 dR).

Prosedyre:

- Skru på instrumentet Mx3000p, lampen trenger 20 min. oppvarming
- Åpne programvaren til instrumentet, velg analyse med SYBR Green, og før hva som avsettes i hvilke brønner på PCR-platen, samt andre forhold rundt prøvemateriale og analysen.
- Lag mastermiks til antall reaksjoner som skal utføres for hver biomarkør, se tabell 9. Benytter reagens fra SYBR Green Core kit fra Eurogentec.
- Pipetter 23 µl mastermiks i brønnene til en 96-brønns PCR-plate.
- Tilsett 2 µl cDNA/NoRT/vann til hver brønn avhengig av analysemateriale.
- Dekk PCR-platen med folie, spinn ned og analyser etter program angitt i tabell 10.

Tabell 9: Oversikt over endelig konsentrasjon ([final] mM) og volum reagens pr. reaksjon (reak.) for biomarkørene; BCR, CEACAM-5, CK-19 og EPCAM, samt startforhold for etablering av nye biomarkører; CEACAM6, CK8, PRSS1 og MMP11. R = revers, F = forover.

Reagens	CEACAM6, CK8, PRSS1, MMP11		BCR		CEACAM5		CK19		EPCAM	
	[final] mM	µl pr. reak.	[final] mM	µl pr. reak.	[final] mM	µl pr. reak.	[final] mM	µl pr. reak.	[final] mM	µl pr. reak.
dH ₂ O		16,130		16,880		17,005		16,130		16,505
10xPCR buffer		2,500		2,500		2,500		2,500		2,500
50 mM MgCl ₂	2,00	1,000	2,00	1,000	1,25	0,625	2,00	1,000	1,25	0,625
5 mM dNTP-U	0,20	1,000	0,20	1,000	0,20	1,000	0,20	1,000	0,20	1,000
10 µM F primer	0,30	0,750	0,15	0,375	0,20	0,500	0,30	0,750	0,30	0,750
10 µM R primer	0,30	0,750	0,15	0,375	0,20	0,500	0,30	0,750	0,30	0,750
1/200 SYBR Green I		0,750		0,750		0,750		0,750		0,750
Hot GoldStar enzym		0,120		0,120		0,120		0,120		0,120

Tabell 10: Analyseprogram for real time qPCR.

	Temperatur	Tid	Antall sykluser	Måling
Aktivering av polymerase	95°C	10 minutt	1	
Amplifisering	95°C	30 sekunder	40	
	60°C	60 sekunder		END
Smeltekurve	95°C	60 sekunder	1	
	55°C	30 sekunder		
	95°C			ALL

4.7.1 Normalisering og beregning av relativ mRNA konsentrasjon

Relativ mRNA konsentrasjon av biomarkøren i det opprinnelige cellematerialet kan beregnes dersom rt-qPCR analysene inkluderer analyse av husholdningsgen og kalibrator i hvert oppsett [26]. Dette kalles normalisering og gjør det samtidig mulig å sammenligne prøver fra ulike PCR analyser. Det gir ingen absolutt konsentrasjonsverdi ettersom normaliseringen baserer seg på ratio mellom ulike gener uttrykt [26, 72]. Det gjøres v.h.a. den såkalte ” $2^{\Delta\Delta Cq}$ -metoden” beskrevet under, se ligning 2 [72]. Konstanten for amplifiseringseffektivitet, E, er satt til 2 i denne ligningen ettersom antall kopier PCR-produkt i teorien doubles for hver syklus. I praksis er E-verdien oftest noe lavere, pga av forholdene rundt primerne og kopieringsprosessen. Riktig E-verdi for PCR-oppsettet kan fastsettes ved å lage standardkurver og beregne E-verdien basert på disse. Ved å sette inn den enkelte biomarkørs E-verdi i formelen, får man et mer nøyaktig estimat av den relative mRNA konsentrasjonen [26, 72, 73]. BCR er et etablert husholdningsgen, d.v.s. at det er likt uttrykt i alle celler og upåvirket av ulike eksperimentelle forhold ved bruk av rt-qPCR metoden beskrevet over [74].

$$R = 2^{\Delta\Delta Cq} \quad \text{Ligning 2}$$

hvor ,

R er relativ mRNA konsentrasjon for biomarkøren,

2 er amplifiseringseffektiviteten (E),

$\Delta\Delta Cq$ beregnes etter ligning 3 under

$$\Delta\Delta C_q = (C_{q_{prøve}} - C_{q_{kalibrator}})_{referanse} - (C_{q_{prøve}} - C_{q_{kalibrator}})_{biomarkør} \quad \text{Ligning 3}$$

hvor ,

$(C_{q_{prøve}} - C_{q_{kalibrator}})_{referanse}$ er differansen mellom C_q -verdi for referansen målt i prøven og referansen målt i kalibrator,

$(C_{q_{prøve}} - C_{q_{kalibrator}})_{biomarkør}$ er differansen mellom C_q -verdi målt for biomarkør i prøven og C_q -verdi for samme biomarkør målt i kalibratoren.

4.8 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er separasjon av partikler etter molekylærvækt. Det gjøres v.h.a. en porøs gel, hvor prøvemateriale avsettes i den ene enden, og et elektriske felt settes over gelen. DNA er negativt ladd og vil bevege seg mot den positive elektroden. Store DNA-produkter møter mer motstand og beveger seg saktere enn mindre produkter. Dette gir en klar separasjon til ulike bånd under elektroforesen. Prøvene settes opp sammen med en kjent størrelsesindikator som benyttes for å fastsette størrelsen av DNA-produktene i prøven. Gelen er tilsatt etidiumbromid, som muliggjør avlesning og bildetakning ved endt elektroforese, da v.h.a. UV-lys som fluoriserer båndene av DNA-produkt [46, 75].

Prosedyre:

Støping av 2% agarose gel

- Tilsett 1,0 g agarose til 50 ml 0,5xTBE buffer i en Erlenmeyer kolbe
- Sett i mikrobølgeovn ved 800 W i 2 min
- La det avkjøle til ca 50°C før tilsats av 2,5 µl 10 µg/µl etidiumbromid
- Hell over i støpeform, sett i brønnkam og la stå i 30 min

Elektroforese

- Fjern brønnkam og plasser gelen i et elektroforesekammer
- Fyll elektroforesekammeret med 0,5xTBE buffer til det dekker gelen
- Bland cDNA prøve og størrelsesindikator med loading buffer i forholdet 1:3, maks total volum 20 µl
- Overfør materiale til hver sin brønn i gelen
- Sett strømkilden på 60 V og 140 mA og la elektroforesen gå i ca. 90 minutt
- Ta bilde av gelen under UV-lys v.h.a.. SynGene INgenius geldoc bildesystem

4.9 Rensing av PCR produkt

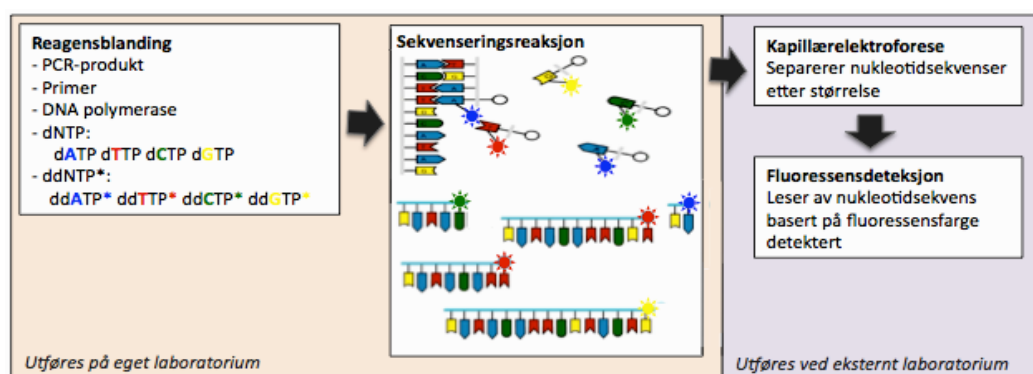
PCR-produkt renses v.h.a. QIAquick® PCR Purification Kit, som isolerer PCR-produkt med størrelser 100-10000 basepar. Metoden benytter kolonner som selektivt binder DNA kombinert med høyhastighetsentrifugering. Rent DNA elueres til egen beholder [76].

Prosedyre:

Rensing av PCR-produkt utføres etter prosedyre fra kit levert av Agilent Technologies: ”QIAquick® Spin Handbook – QIAquick® PCR Purification Kit” [76].

4.10 Sekvensering av PCR-produkt

Sekvenseringsmetoden er såkalt kjedeterminerende Sanger-metode avlest v.h.a. kapillærelektroforese og fluoressensdeteksjon. Reagensblanding lages for hver primer i hvert primersett til PCR-produkt v.h.a. reagenser fra kittet BigDye® Terminator v3.1. Sekvenseringsreaksjonen utføres i varmesykler som generer komplementære DNA kopier av den ene tråden i PCR-produktet. V.h.a. kjedeterminerende fluoressensmerket ddNTP (dideoksynuklosidtrifosfat) dannes alle mulige lengder, hvor ddNTP er siste base i den nye sekvensen. Totalt avviker de resulterende DNA sekvensene med kun én nukleotid seg imellom, og rekkefølgen av sekvensen kan dermed avleses v.h.a. kapillærelektroforese og fluoressensdeteksjon [22, 77, 78].



Figur 10: Oversikt over kjedeterminerende Sanger-metode for sekvensering av PCR-produkt. Sekvenseringsreaksjonen lager komplementære kopier av PCR-produktet, som v.h.a. kjedeterminerende fluoressensmerket ddNTP dannes i alle mulige lengder. Nukleotidsekvensen kan dermed fastsettes v.h.a. kapillærelektroforesen og fluoressensdeteksjon [22, 77, 78]. Illustrasjonen av sekvenseringsreaksjonen er modifisert fra bilde tatt av filmklippet ”DNA Test Methods – DNA Sanger Sequencing” av PHG Foundation [79].

Prosedyre:

- Bland sammen reagenser og prøvematerial etter anvisning i tabell 11 i en 8-brønns PCR strips for hvert PCR-produkt for både forover (F) og revers (R) primer
- Sett lokk på stripsen og spinn ned
- Sett PCR-stripsen i varmesykluseren på sekvenseringsprogrammet angitt i tabell 12
- Tilsett 10 μl dH_2O etter sekvensering, som gir totalvolum sekvensert materiale lik 20 μl .
- Sekvenseringsreaksjonen detekteres vis kapillærelektroforese og fluoressensdeteksjon i eksternt laboratorium.

Tabell 11: Reagensforhold for sekvenseringsreaksjon av PCR-produkt

Reagens:	Mengde:
Big-Dye v. 3.1	1,00 μl
Sekvenseringsbuffer	1,00 μl
Primer (10mM, 10pmol/ μl)	0,32 μl (3,2 pmol)
Templat (PCR-produkt 100-200 basepar)	1-3 ng
dH_2O	til totalvolum 10 μl

Tabell 12: Programinnstilling for sekvenseringsreaksjon

	Antall sykluser	Temperatur	Tid
1	1	96°C	5 min.
2	25	96°C	10 sec.
		50°C	5 sec.
		60°C	4 min
3	1	4°C	

4.11 Identifisering av nukleotidsekvens ved blast-søk

Sekvensen til PCR-produktet oppnådd ved sekvensering benyttes for å verifisere dets identitet via bioinformatikkverktøyet ”blast” (basic local alignment search tool). Dette verktøyet sammenligner søkeseqvensen med sekvenser i en

database for å finne lokalt konserverte eller like områder [46]. Resultatet foreligger raskt og gir et pålitelig mål på sekvensidentitet som er statistisk robust [46]. Søkemotoren for nukleotidsekvenser er blastn, og denne benyttes for identifisering av sekvensene til PCR-produktene. Resultatet angir bl.a. en treffprosentverdi over likhetstrekkene funnet under søket, og viser til søkesekvensens mest sannsynlige identitet dersom like sekvenser identitet i databasen er tidligere kjent [46, 80].

4.12 Restriksjonskutting

Restriksjonsenzym er endonukleaser som kutter DNA ved bestemt sekvens. Type II restriksjonsenzym kutter dobbeltrådet DNA [81]. Restriksjonsenzymet PvuII gjenkjenner og kutter dobbeltrådet DNA ved sekvens som vist i figur 11 [82].



Figur 11: Restriksjonsenzymet PvuII kutter dobbeltrådet DNA som har denne sekvensen.

Prosedyre:

- Tilsett følgende i et 1,5 ml rør for hver prøve:

Reagens/prøve	Volum
PCR-produkt	10 µl (~0.1-0.5 µg DNA)
Vann, nukleasefritt	16-17 µl
10X Buffer G	2 µl
Restriksjonsenzym	1-2 µl
Totalvolum	30 µl

- Inkuber ved 37°C i 2 timer
- Tilsett 0,5 M EDTA til 20 mM total konsentrasjon for å inaktivere enzymet
- Analyser fordøyde produkt v.h.a. agarose gelelektroforese

4.13 Statistisk behandling av datamateriale

4.13.1 Standardavvik

Standardavvik (s) oppgir graden av presisjon mellom målinger av paralleller.

Ved liten spredning mellom målingene er presisjonen god [36, 83]. Formel for beregning av standardavvik er gitt i ligning 4 under.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Ligning 4}$$

hvor,

s er standardavviket

x_i verdi målt for en parallell

\bar{x} er gjennomsnittet av alle de parallelle målingene

n er antall målinger utført

4.13.2 Variasjonskoeffisient

Variasjonskoeffisienten (CV) er et mål for variasjon i analysen og oppgis ofte i prosent. CV beskriver et relativt forhold av usikkerheten i resultatet, og beregnes etter formel oppgitt i ligning 5 [83].

$$CV\% = \frac{s}{\bar{x}} * 100\% \quad \text{Ligning 5}$$

hvor,

CV% er variasjonskoeffisienten i prosent

s er standardavvik

\bar{x} er middelverdien av analyseparalleller

4.13.3 Paret t-test

Paret t-test benyttes ved sammenligninger av normalfordelte prøvesett, ofte hvor det er naturlige grupperinger, som for eksempel "før og etter"-analyser [83]. Den undersøker om det er samsvar mellom prøvesettet over et større måleområde. For å vurdere om en av metodene gir signifikant høyere eller lavere resultat benyttes en ensidig paret t-test med hypotesene:

$$H_0 : \bar{x}_A \leq \bar{x}_B \quad H_1 : \bar{x}_A > \bar{x}_B$$

Ved valgt signifikansnivå konstaterer man hypotesen H_1 dersom $t_{obs} > t_{krit}$.

t_{krit} avhenger av testens signifikansnivå (α -kvantil) og antall frihetsgrader ($n-1$)

slik: $t_{krit} = t_{\alpha, n-1}$. t_{obs} beregnes etter ligning 6 under [83].

$$t_{obs} = \left| \bar{x} - \mu_0 \right| \frac{\sqrt{n}}{s} \quad \text{Ligning 6}$$

hvor

\bar{x} er gjennomsnittet av målingene i ett prøvesett

μ_0 er reelle gjennomsnittsverdi

s er standardavvik

n er antall målinger utført

4.13.4 Konfidensintervall

Konfidensintervall beregnes med t-fordelingen i grunn dersom prøvedata er normalfordelt og kun det empiriske standardavviket (s) er kjent. Det kan være både en- og tosidig konfidensintervall avhengig av t-testen. Konfidensintervall er et uttrykk for å bestemme den ekte middelveidien, som er sannsynlig at ligger innenfor en bestemt avstand fra den målte middelveidien (\bar{x}). Desto flere målinger standardavviket beregnes fra, desto smalere blir konfidensintervallet ved god presisjon. Konfidensintervallet beregnes etter formel vist i ligning 7 under [60].

$$\bar{x} \pm t_{\alpha, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Ligning 7}$$

hvor

\bar{x} er gjennomsnittet målingene i ett prøvesett

$t_{\alpha, n-1}$ er samme verdi som ved t-fordelingen som ligger til grunn for

konfidensintervallet

s er standardavvik

n er antall målinger utført

4.13.5 Prosentavvik

Prosentavvik er en enkelt beregning for avviksmål oppgitt i prosent. Det benyttes i tilfeller hvor det ikke er utført nok parallelle målinger til å utføre andre statistiske beregninger. Det beregnes etter ligning 8 under.

$$\%avvik = \frac{|p1 - p2|}{x} * 100 \quad \text{Ligning 8}$$

hvor,

p1 er parallellmåling 1

p2 er parallellmåling 2

x er gjennomsnittet av p1 og p2 eller fasitverdi

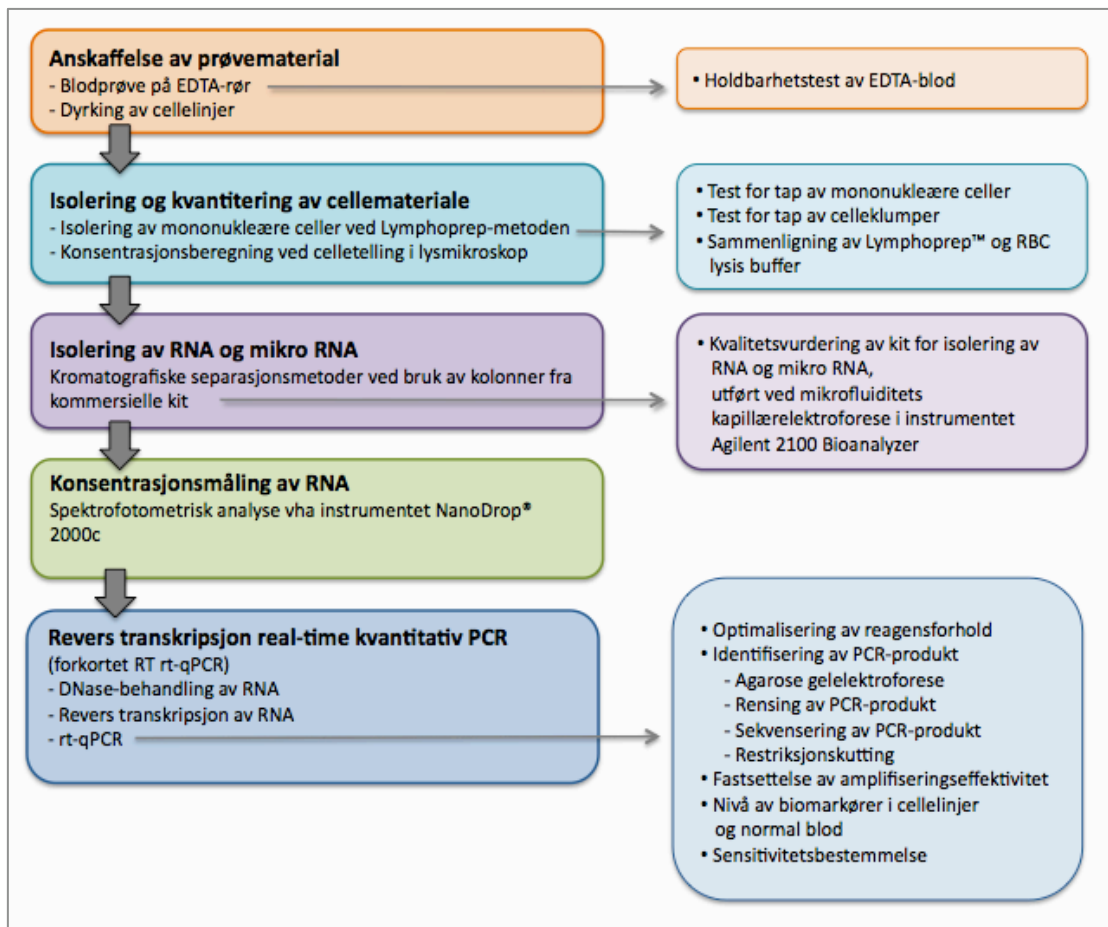
5 Resultat

5.1 Oversikt over metoder og praktisk arbeid utført

Det praktiske arbeidet ble utført for å etablere en metode for anrikning og deteksjon av sirkulerende tumorceller (STC) fra perifert blod, da i forbindelse med kreft i bukspyttkjertelen. STC kan påvises indirekte i prøvematerialet basert på deteksjon av molekylære biomarkører av mRNA. Tre biomarkører som tidligere er etablert av forskningsgruppen ble benyttet som potensielle biomarkører til studien. Disse er CEACAM6, EPCAM og CK19 som alle er epitelspesifikke biomarkører. Valget av disse biomarkørene var basert på gode erfaringer i lignende prosjekter utført av forskningsgruppen, samt indikasjon på klinisk relevans som biomarkører for STC ved bukspyttkjertelkreft av andre forskningsgrupper [31, 74, 84-86]. I tillegg ble det valgt ut fire av nye potensielle biomarkører basert på bioinformatikkanalyser. Disse var CEACAM5, CK8, PRSS1 og MMP11. Det ble gjort av forskningsgruppen v.h.a. databaseverktøyet ”Digital Gene Expression Tool” fra ”Cancer Gene Anatomy Project”. Her undersøkes det for spesifisitet for vev i bukspyttkjertel i kjente cDNA-bibliotek etablert [87].

Veileder i forskningsgruppen designet og bestilt primere basert på denne informasjonen, som videre benyttes til deteksjon av STC ved rt-qPCR (real-time kvantitativ PCR). Oppsettet av rt-qPCR ble optimalisert for hver av de nye potensielle biomarkørene og PCR-produktene dannet under reaksjonen ble identifisert. Amplifiseringseffektiviteten til de potensielle biomarkørene ble fastsatt ved analyse av fortynningsrekker, og relativt nivå av biomarkørene ble vurdert for nivå i cellelinjer fra bukspyttkjertelkreft mot nivå i normalt blod. Til slutt ble det funnet en indikasjon på sensitiviteten for STC-deteksjon til de fire tilsynelatende mest optimale biomarkørene; CEACAM6, CK19, EPCAM og CK8.

Det ble også utført kvalitetstester av Lymphoprep-metoden for å sikre effektiv anrikning av STC fra blodprøver, samt utført holdbarhetstest av EDTA-blod for å finne grensen for tillatt henstand før STC isoleres. I tillegg ble det gjort en kvalitetsvurdering av metodene for isolering av RNA og miRNA, da for å sikre at de gir tilfredsstillende god kvalitet og mengde isolert materiale.



Figur 12: Oversikt over metodene benyttet og det praktiske laboratoriearbeidet utført.

5.2 Etablering av qPCR-oppsett for potensielle biomarkører

5.2.1 Optimalisering av reagensforhold

qPCR-oppsettet optimaliseres for de nye potensielle biomarkørene; CEACAM6, CK8, PRSS1 og MMP11. Dette innebærer å finne best mulig primerdesign og konsentrasjoner av primer og $MgCl_2$ for optimale kopieringsforhold ved PCR. Det ble derfor systematisk analysert for ulike primerdesign og konsentrasjoner for å oppnå mest optimale forhold. Primersettene som ble vurdert er listet opp i tabell 4. Utgangspunktet for reagensforhold er oppgitt i tabell 9 under avsnittet ”4.7 rt-qPCR”. Fremgangsmåten var at ulike konsentrasjonen av $MgCl_2$ først ble vurdert, ved konsentrasjonene 1,25, 1,50, 1,75 og 2,00 mM. Herfra ble det analysert for $MgCl_2$ -konsentrasjoner i området rundt den konsentrasjonen som virket mest

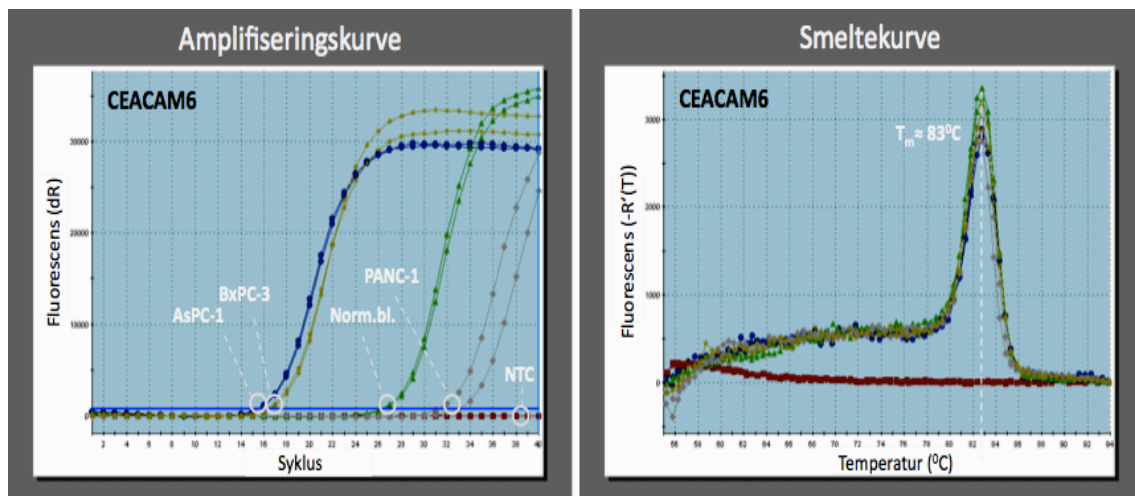
optimal for hver biomarkør, og deretter en eventuell tredje runde med analyse i aktuelle konsentrasjonsområder. Primerkonsentrasjonen ble fastsatt ut i fra samme framgangsmåte som for MgCl₂, men startkonsentrasjonene var 0,075, 0,100, 0,125 og 0,150 µM primer. Primersettene ble luket ut etter hvert som det viste seg at andre primersett for samme biomarkør fungerte bedre, og til sist var det igjen ett primersett for hver potensielle nye biomarkør. Kriteriene for hva som gir mest optimale kopieringsforhold innebærer kompromiss av følgende faktorer:

- lavest mulig C_q-verdi for biomarkøren i cellelinjene fra bukspyttkjertelkreft (høyeste relative mRNA nivå)
- høyest mulig C_q-verdier for biomarkøren i normal blod (laveste relative mRNA nivå)
- minst mulig dannelselse av primer-dimer
- minst mulig positive NTC (no template control)

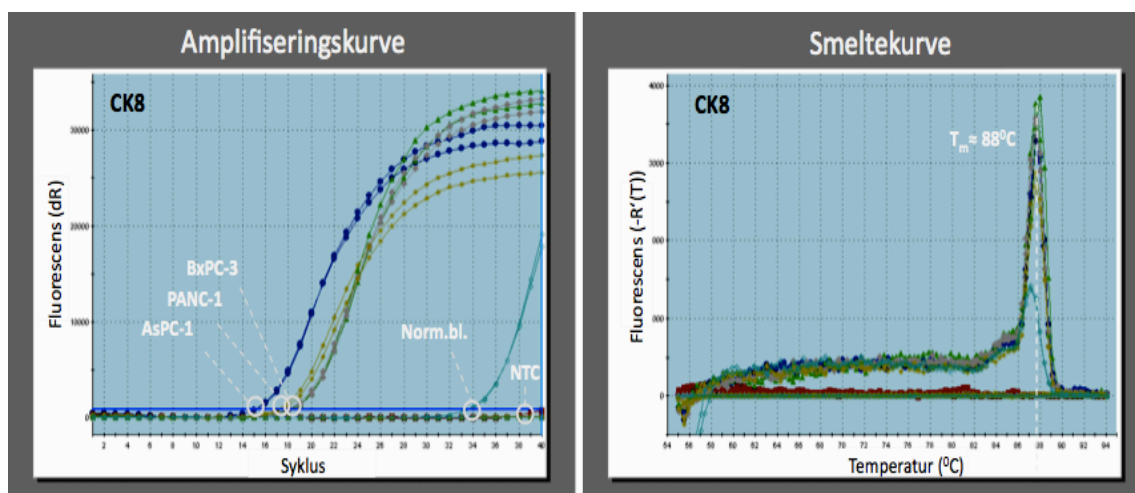
Se tabell 13 for resultatet av hvilke primersett og reagensforhold som ble valgt, og figur 13-16 for eksempler på amplifiserings- og smeltekurver for hver biomarkør under disse forholdene.

Tabell 13: Oversikt over de beste primersettene funnet for hver biomarkør sammen med reagensforholdene som gir mest optimale qPCR-oppsett for disse. Per reaksjon er forkortet pr. r.

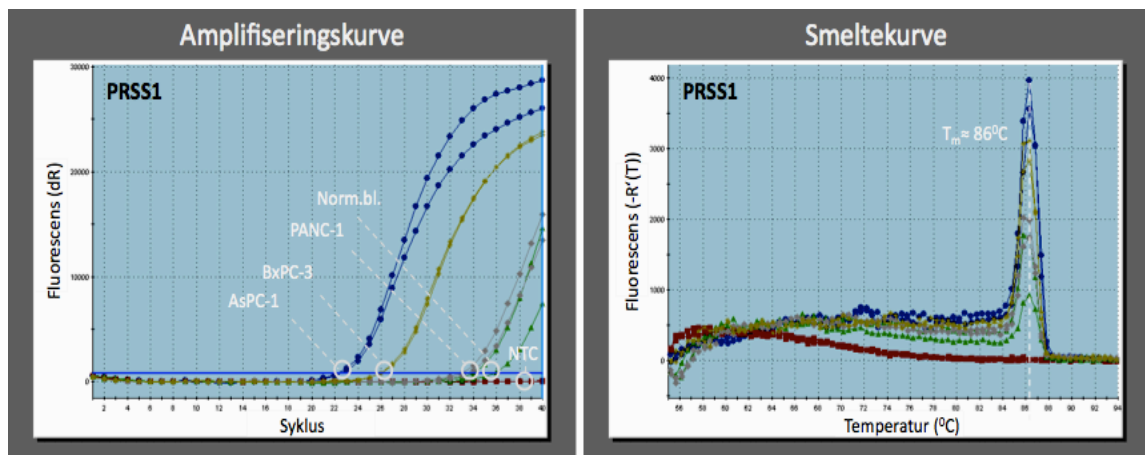
Primersett	CEACAM6-B		CK8-F		MMP11-B		PRSS1-D	
	[final]	µl pr. r	[final]	µl pr. r	[final]	µl pr. r	[final]	µl pr. r
dH ₂ O		17,230		17,380		17,255		16,380
10xPCR buffer	1x	2,500	1x	2,500	1x	2,500	1x	2,500
50 mM MgCl ₂	1.30 mM	0,650	1.50 mM	0,750	1,75 mM	0,875	3,00 mM	1,500
5 mM dNTP-U	0,20 mM	1,000	0,20 mM	1,000	0,20 mM	1,000	0,20 mM	1,000
10 µM F primer	0,15 mM	0,375	0,10 mM	0,250	0,10 mM	0,250	0,15 mM	0,375
10 µM R primer	0,15 mM	0,375	0,10 mM	0,250	0,10 mM	0,250	0,15 mM	0,375
1/200 SYBR Green I	1x	0,750	1x	0,750	1x	0,750	1x	0,750
Hot GoldStar enzym		0,120		0,120		0,120		0,120



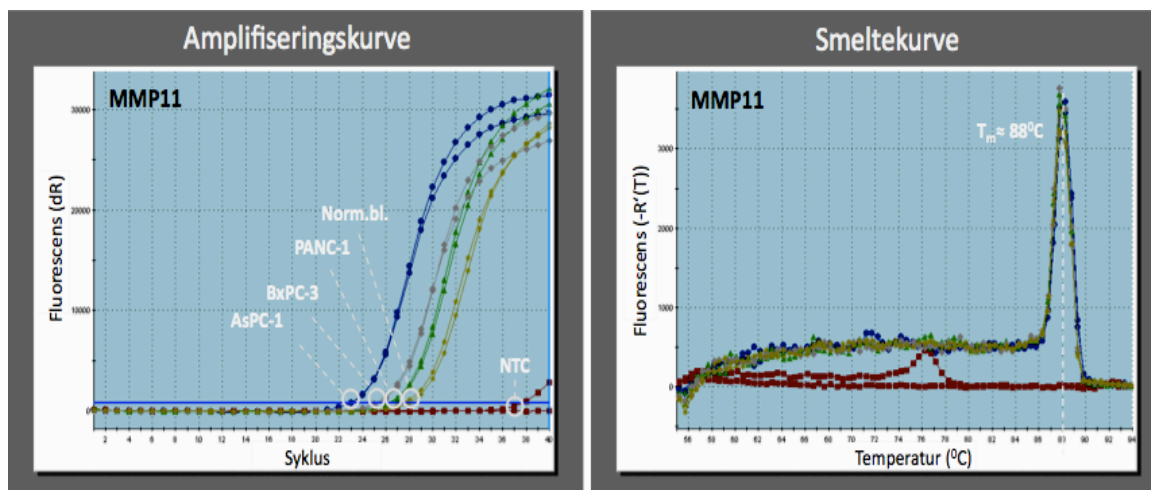
Figur 13: Amplifiserings- og smeltekurve fra qPCR analyse av biomarkøren CEACAM6 for cellelinjene AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt normalt blod (norm.bl.) og NTC (no template control). Smeltekurven angir 83°C som omtrentlig smeltepunkt av PCR-produktet.



Figur 14: Amplifiserings- og smeltekurve fra qPCR analyse av biomarkøren CK8 for cellelinjene AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt normalt blod (norm.bl.) og NTC (no template control). Smeltekurven angir 88°C som omtrentlig smeltepunkt av PCR-produktet.



Figur 15: Amplifiserings- og smeltekurve fra qPCR analyse av biomarkøren PRSS1 for celledinjene AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt normalt blod (norm.bl.) og NTC (no template control). Smeltekurven angir 86°C som omtrentlig smeltepunkt av PCR-produktet.



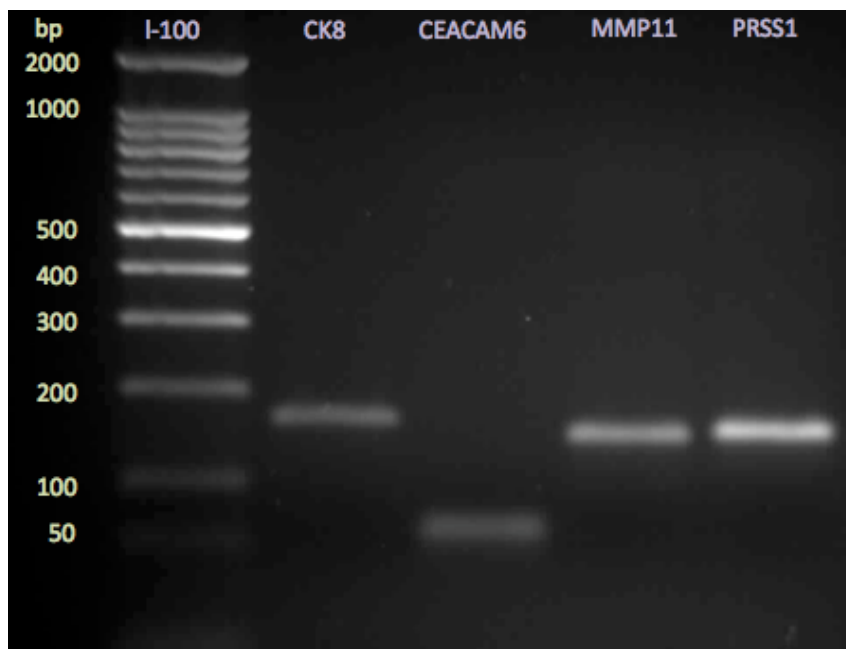
Figur 16: Amplifiserings- og smeltekurve fra qPCR analyse av biomarkøren MMP11 for celledinjene AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt normalt blod (norm.bl.) og NTC (no template control). Smeltekurven angir 88°C som omtrentlig smeltepunkt av PCR-produktet.

5.2.2 Identifisering av PCR-produkt

PCR-produktene som dannes ved det nyetablerte qPCR-oppsettet ble undersøkt for renhet, størrelse og sekvens for å sikre at riktig PCR-produkt dannes under reaksjonen for hver biomarkør. PCR-produktet ble analysert ved 2% agarose gelelektroforese, og resultat av dette er vist i figur 17 under. Basert på dette er det mulig fastsette omtrentlig størrelse og renhet av PCR-produktene. Forventet størrelser er:

- CEACAM6 59 basepar
- PRSS1 150 basepar
- MMP11 145 basepar
- CK8 164 basepar

Videre ble PCR-produktetene sekvensert, og resultatet fra blast-søk av de oppnådde nukleotidsekvensene er fremstilt i tabell 14. Figur 17 viser gelbildet hvor at alle PCR-produktene hadde forventet størrelse.



Figur 17: Gelbilde fra gelelektroforese av PCR-produkt for de nye potensielle biomarkørens qPCR-oppsett. Størrelsesindikatoren ”100 bp DNA ladder” (Promega), kalt I-100, er avsatt helt til venstre på gelen, og antall basepar (bp) som hvert bånd tilsvarer i størrelse er angitt her.

Tabell 14: Oversikt over resultatet fra blast-søk for sekvensering av biomarkørene CK8, PRSS1 og MMP11, samt oppgitte maksimale identitetsprosent for både forover (F) og revers (R) primer til hver biomarkør. Sekvensene som var utgangspunkt for blast-søket er oppgitt i vedlegg 2.

Biomarkør	Identitet fra blast-søk	Maks. identitet - % (F/R)
CK8	Homo sapiens keratin 8 (KRT8), mRNA	100/99
PRSS1	Homo sapiens protease, serine, 1 (trypsin 1) (PRSS1), mRNA	99/99
MMP11	Homo sapiens matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) (MMP11), mRNA	99/98

Av tabell 14 ser man det ikke er utført blast-søk for sekvensen av PCR-produktet til CEACAM6. Dette er på grunn av at mottatt sekvens kun inneholdt 26 og 17 spredt avleste nukleotider for revers og forover primer respektivt. Dette er ikke stort nok grunnlag å basere blast-søk på. PCR-produktet fra CEACAM6 ble i stedet identifisert ved bruk av restriksjonskutting med fordøyelsesenzymer PvuII og agarose gelelektroforese.

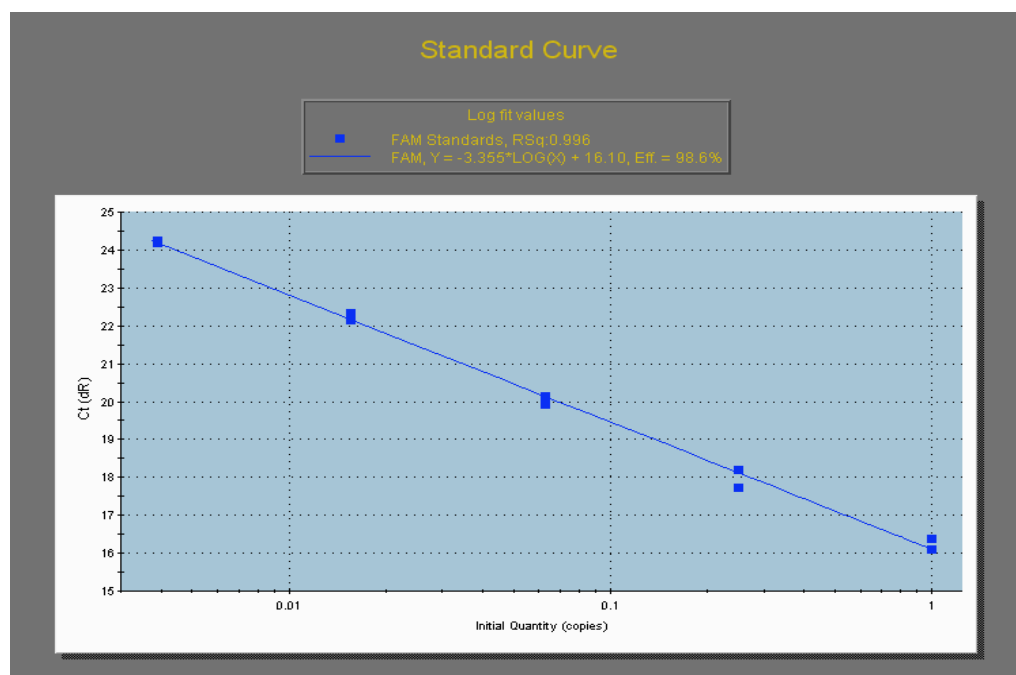
Tabell 15: Oversikt over kjente antall basepar (bp) for ufordøyd og fordøyd PCR-produkt av CEACAM6-B og CK19, samt resultat observert ved agarose gelelektroforese av disse produktene. For modifisert gelbilde av resultatet se vedlegg 3.

Biomarkør	Helt PCR-produkt - ant. bp	Fordøyd PCR-produkt - ant. bp	Identifisert på gel
CEACAM6-B	59	33	Både ufordøyd og fordøyde PCR-produkter ble identifisert for CEACAM6-B og CK19 ved forventede bp-størrelser
		26	
CK19	96	70	
		26	

Oppsummert viser disse undersøkelsene at alle PCR-produktene dannet ved de nyoptimaliserte qPCR-oppsettene har riktig identitet i henhold til forventningene for hver biomarkør.

5.2.3 Fastsettelse av amplifiseringseffektivitet

Amplifiseringseffektiviteten (E) til qPCR-oppsett fastsette ved analyse standardkurver. Den baser seg da på stigning i den log-lineære delen av kurven slik: $E = 10^{-1/\text{stigningstall}} - 1$ [26]. Standardkurvene inneholdt følgende fortyndinger: ufortynnet, 1:4, 1:16, 1:64 og 1:256. Ved oppsett i programvaren til PCR-instrumentet Mx3000P oppgis resultatet som vist i figur 18 sammen med beregnet E- og R-verdi. E-verdier mellom 1,8 og 2,0 ansees å være tilstrekkelig effektive qPCR-oppsett. Avvikene fra en rett regresjonslinje oppgis som R²-verdi. Optimal R²-verdi er 1,0, men R²-verdier mellom 0,99 og 1,0 ansees å være tilstrekkelig gode. Resultatet er fremstilt i tabell 16 og 17. Basert på disse ser man at alle de potensielle biomarkørens qPCR-oppsett gav tilstrekkelig gode amplifiseringseffektiviteter.



Figur 18: Eksempel på kurve over amplifiseringseffektivitet for en av analysene til CEACAM6 fremstilt av programvaren til PCR-instrumentet Mx3000P. Det oppgis effektivitet = 98,6%, som tilsvarer E-verdi = 1,99, og R²-verdi = 0,996.

Tabell 16: Oversikt over gjennomsnittelige E- og R²-verdier, samt antall målinger som inngår i disse (n), standardavviket (s) og variasjonskoeffisienten (CV%) for de nye biomarkørene (CEACAM6, CK8, MMP11 og PRSS1)

Nye biomarkører					
	E-verdi	R ² -verdi	Ant. målinger (n)	Standardavvik (s)	Variasjonskoeffisient (CV%)
CEACAM6	1,94	0,995	6	0,04	2,1
CK8	1,84	0,992	4	0,04	2,0
MMP11	1,85	0,989	5	0,08	4,3
PRSS1	1,84	0,992	5	0,04	2,2

Tabell 17: Oversikt over gjennomsnittelige E- og R²-verdier, samt antall målinger som inngår i disse (n), standardavviket (s) og variasjonskoeffisienten (CV%) for de tidligere etablerte biomarkørene (CEACAM5, CK19 og EPCAM).

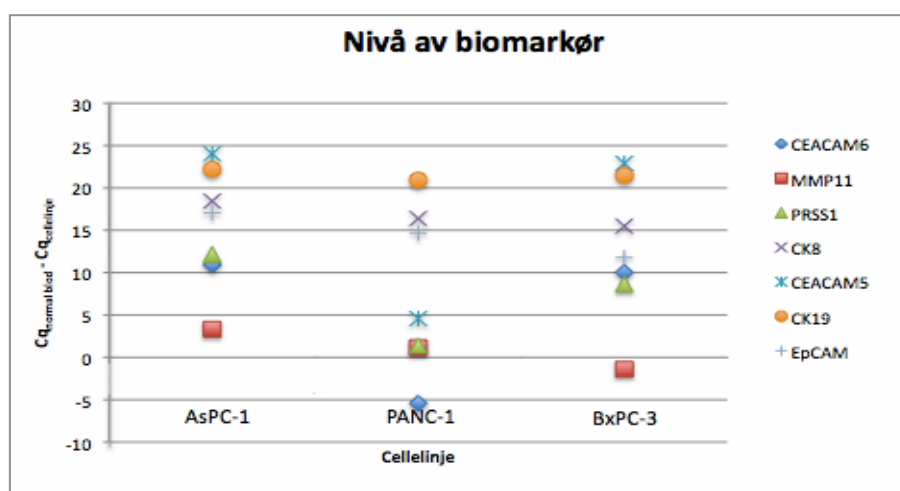
Tidligere etablerte biomarkører				
	E-verdi	R ² -verdi	Ant. målinger (n)	Prosentavvik (%)
CEACAM5	1,90	0,996	2	1,1
CK19	2,07	0,997	2	2,9
EPCAM	1,85	0,990	2	0,5

5.2.4 Nivå av biomarkører i cellelinjer og normal blod

Relativt nivå av biomarkørene i ulike cellelinjer fra bukspyttkjertel; ASPC1, PANC1 og BXPC3 ble sammenlignet mot nivå i normalt blod. Det ønskes lavest mulig nivå for normalt blod med høyest mulig differanse opp mot cellelinjene for at biomarkøren skal kunne fungere som en god biomarkør for STC. Resultatet er vist i tabell 18 og figur 19, hvor man ser at de fire potensielle biomarkørene med beste differanser var CEACAM5, CK19, EPCAM og CK8.

Tabell 18: C_q-verdier fra qPCR av normal blod og cellelinjene fra bukspyttkjertelkreft (AsPC-1, PANC-1 og BxPC-3) for alle de potensielle biomarkørene.

Biomarkør	Normal blod	AsPC-1	PANC-1	BxPC-3
CEACAM6	26,53	15,61	31,94	16,49
MMP11	26,32	23,00	25,16	27,72
PRSS1	34,64	22,49	33,24	26,01
CK8	33,64	15,19	17,25	18,14
CEACAM5	No C _q	15,97	35,42	17,09
CK19	36,10	13,90	15,16	14,63
EPCAM	33,57	16,51	18,88	21,77

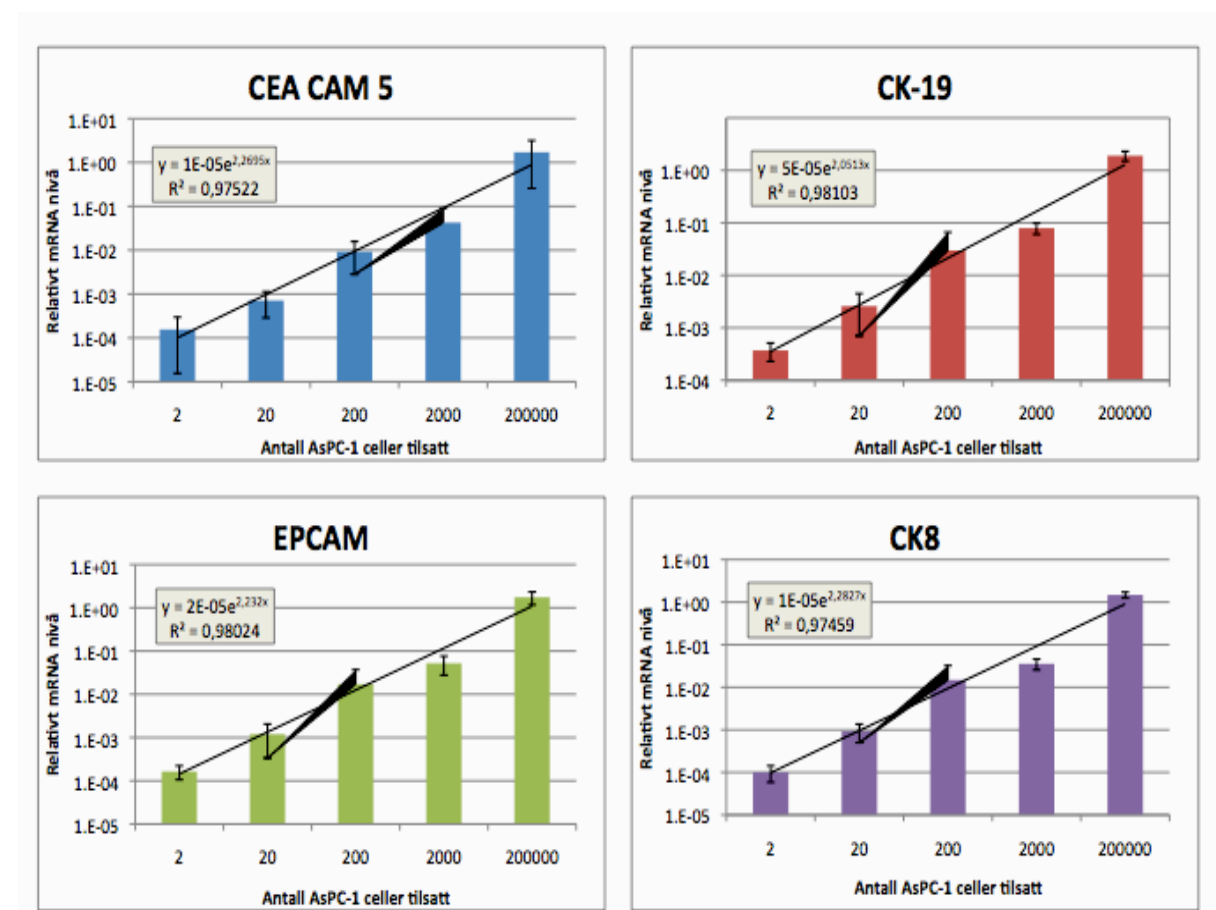


Figur 19: Grafisk presentasjon av datamateriale fra tabell 18, som viser forholdet av differansen mellom C_q i normal blod og C_q i cellelinjen for hver av de tre cellelinjene; AsPC-1, PANC-1 og BxPC-3 for alle potensielle biomarkører. Eventuelle ”No C_q”-verdier er erstattet med verdien 40.

5.2.5 Sensitivitetsbestemmelse

qPCR-oppsettenes sensitivitet vurderes ved å finne laveste antall STC som er detekterbart ved qPCR. To parallelle standardrekker ble laget for å finne en indikasjon på denne sensitiviteten. Hver standardrekke innebar seks standarder med $2 \cdot 10^6$ normale MC, tilsatt henholdsvis 0, 2, 20, 200, 2000 og 200000 AsPC-1 celler. For normalisering og beregning av relativ mRNA nivå ble qPCR reaksjonene satt opp med husholdningsgenet BCR og kalibrator av AsPC-1. To replikater av hver standardrekke ble analysert, og hver standardrekke ble

analysert to ganger ved RT rt-qPCR. Det ble beregnet relativ mRNA nivå for hvert replikat analysert, og da også gjennomsnittlig nivå for hver av standardene. Resultatet fra 0-prøven (standard uten tilsatt AsPC-1 celler), ble trukket fra de øvrige standardene i sine respektive standardrekker. 0-prøven representerer den normale bakgrunnen av blodceller, og skal i teorien være den samme for hver standard. Endring i relativ mRNA konsentrasjon vil dermed skyldes tilstedeværelsen av kreftcellene tilsatt. Figur 20 viser resultatet presentert som barplott, hvor man ser tilnærmet lineær sammenheng mellom antall celler tilsatt og målt nivå av biomarkørene. Statistisk ensidig paret t-test ble utført for alle biomarkørene. Her ble det påviste signifikant høyere nivå i 2-prøven (standard tilsatt 2 AsPC-1 celler) sammenlignet med 0-prøven ($P=0,5$, $n=4$). Dette gir en indikasjon på at qPCR-oppsettenes sensitivitet er 2 STC per $2 \cdot 10^6$ celler.



Figur 20: Barplott over standardrekkenes relative mRNA nivå for biomarkørene CEACAM5, CK19, EPCAM og CK8, fratrukket nivå i 0-prøven. Feilbarer er basert på ensidig konfidensintervall tilknyttet de fire målingene av hver standard. Trendlinjen er eksponentiell og tilhørende likning og R^2 -verdi er oppgitt.

5.3 Kvalitetsvurdering av kit for isolering av RNA og miRNA

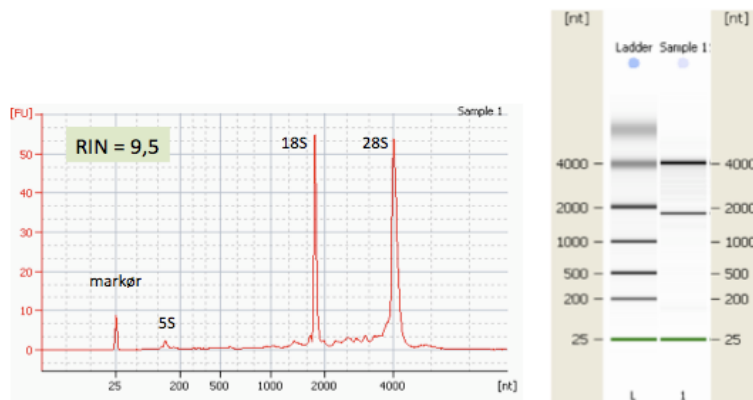
AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit ble benyttet for isolasjon av RNA med størrelser over 200 nukleotider [53]. Ved bruk av dette kittet mister man dermed RNA som er mindre enn 200 nukleotider, noe som innebærer tap av miRNA (20-40 nukleotider). Ved bruk av tilleggskittet RNeasy® MinElute® Cleanup Kit kan man isolere miRNA og andre små RNA (størrelsesområdet 18-200 nukleotider) fra materiale som gjenstår etter den innledende RNA isoleringen. RNeasy® MinElute® Cleanup Kit angis å kunne isolere svært små mengder RNA helt ned til bare noen få picogram. [54] Resulterende RNA og miRNA ble analysert Agilent 2100 bioanalyser for å verifisere kvalitet og tilstedeværelse, respektivt. Resultatet fra denne analysen er vist i tabell 19-20, samt eksempler på elektroferogram og gel-lignende bilder i figur 21 og 22. Her ser man at det var mulig å oppnår svært god RNA kvalitet og at miRNA også isoleres ved bruk av disse isoleringskittene.

Tabell 19: Kvalitetsresultat i form av RIN-verdier for fire parallelt isolerte RNA prøver med AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit. Det er også oppgitt gjennomsnittlig RIN-verdi mellom parallellene, samt standardavvik (s) og variasjonskoeffisienten (CV%) for disse.

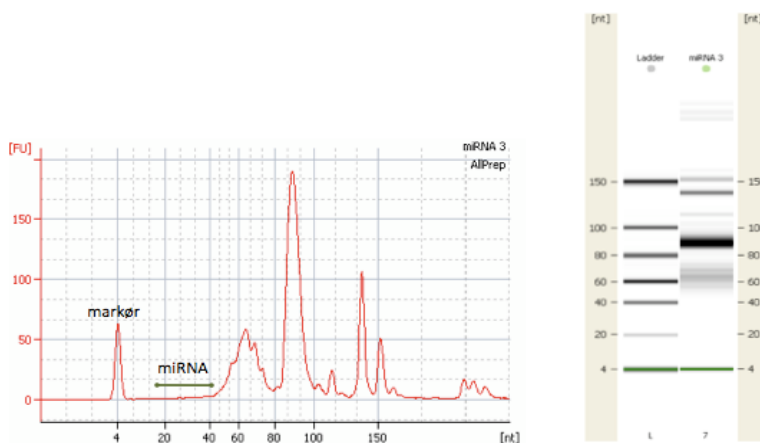
Prøve	RIN	Gjennomsnitt RIN	Standardavvik (s)	Variasjonskoeffisient (CV)
RNA 1	9,5	9,6	0,2	2,6 %
RNA 2	9,3			
RNA 3	9,8			
RNA 4	9,8			

Tabell 20: Resultat av miRNA konsentrasjon i pg/μl for to parallelt isolerte miRNA prøver. Det er også oppgitt gjennomsnittlig konsentrasjon i pg/μl mellom parallellene, samt beregnet prosentavvik mellom disse.

Prøve	miRNA (pg/ul)	Gjennomsnitt miRNA (pg/ul)	Prosentavvik
miRNA 3	273,5	225,5	42,6 %
miRNA 4	177,4		



Figur 21: Resultat for prøven RNA 1 analysert på Agilent 2100 bioanalyser med kittet RNA 6000 Nano. Det presenteres i form av et elektroferogram (t.v.) og gel-liknende bilde (t.h.) produsert av programvaren til instrumentet. I resultatfremstillingen av det gel-liknende bilde er andre prøver analysert samtidig manuelt klippet bort i etterkant av analysen.



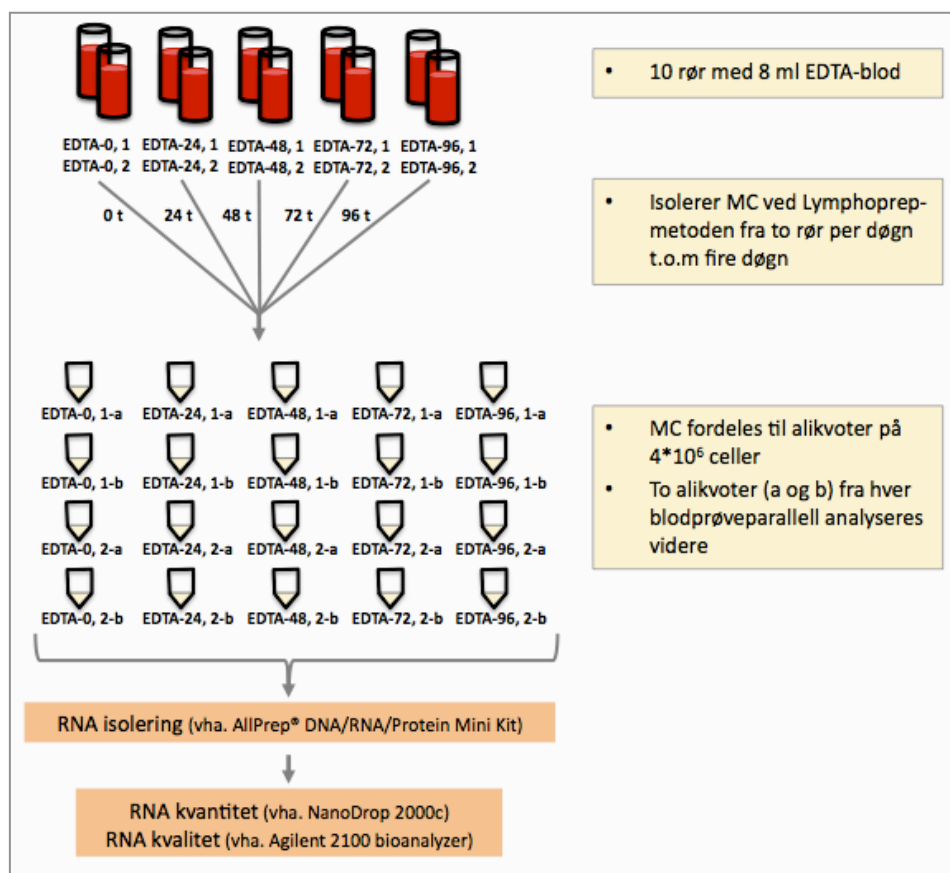
Figur 22: Resultat for prøven miRNA 3 analysert på Agilent 2100 bioanalyser med kittet Small RNA. Det presenteres i form av et elektroferogram (t.v.) og gel-liknende bilde (t.h.) produsert av programvaren til instrumentet. I resultatfremstillingen av det gel-liknende bilde er andre prøver analysert i samme brikke manuelt klippet bort i etterkant av analysen.

5.4 Holdbarhetstest av EDTA-blod

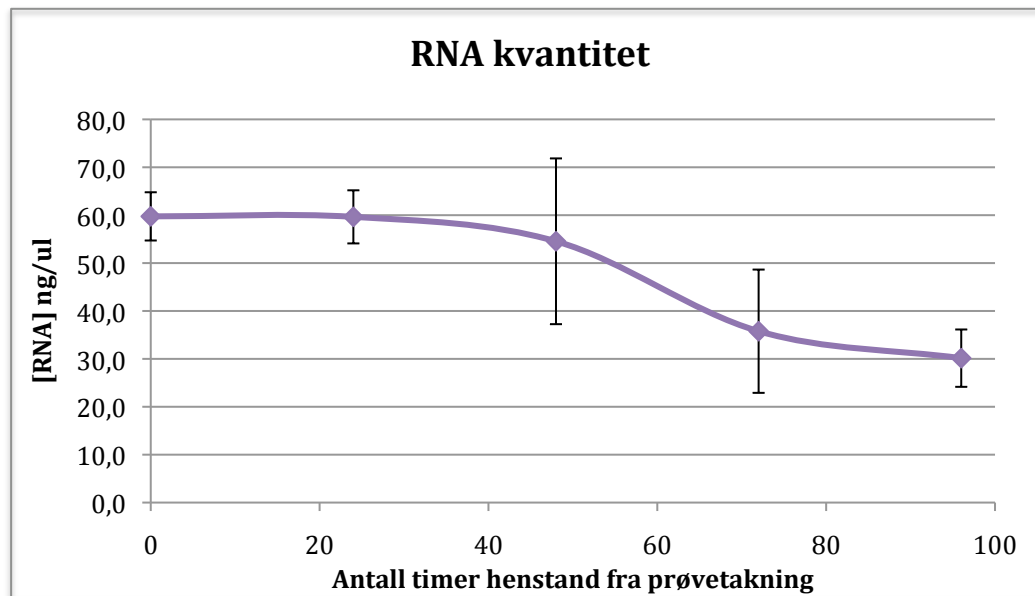
Det ble utført et eksperiment for vurdering av holdbarhet av prøvemateriale over et tidsrom på fire døgn. Bakgrunnen er at prøvemateriale skal mottas fra eksterne laboratorier, men må kunne mottas og prosesseres innenfor et tidsrom som ikke går utover prøve kvaliteten. Vurderingen baseres på mengde og kvalitet av RNA ved ulik henstandstid før analysering. RNA kvantitet ble målt i form av

RNA konsentrasjon i ng/ μ l ved bruk av NanoDrop® 2000c, og kvalitet i form av RIN-verdier ved bruk av Agilent 2100 bioanalyser. Resultatet er fremstilt i figurene 23 -25, hvor rådata er oppgitt i vedlegg 1. Den praktiske utførelse var at like EDTA-blodprøver (totalt 10 rør) ble utsatt for henstand i 0, 24, 48, 72 og 96 timer. Mononukleært cellemateriale ble isolert og fordelt til alikvoter på $4 \cdot 10^6$ celler, før RNA ble isolert, kvantitert og kvalitetsvurdert. Se figur 23 under for mer detaljert oversikt over utførelsen av eksperimentet. Prøvemateriale ble konsekvent behandlet i bestemt rekkefølge f.o.m. RNA isoleringen, slik at ventetid på benk under analysen var den samme for alle prøvedøgn. Dette innebar at alle a-alikvotene fra hver blodprøveparallell ble analysert først, før alle b-alikvotene ble analysert.

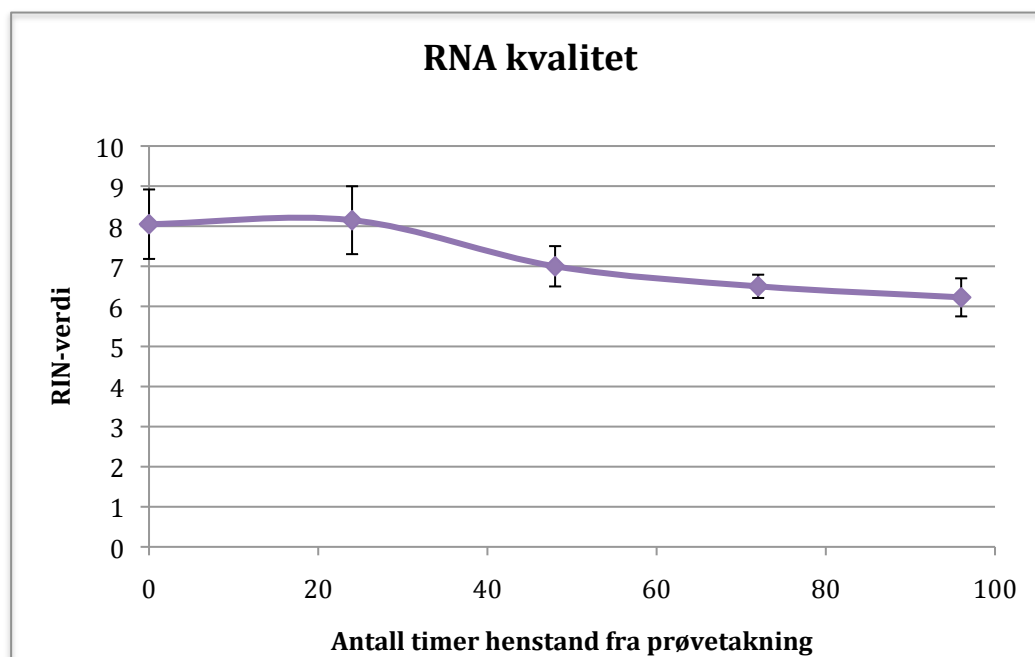
Resultatet er vist i figurene 24-26, og ensidig paret t-test gav signifikant lavere RNA mengde f.o.m. 72 timer henstand og signifikant lavere RNA kvalitet f.o.m. 48 timers henstand ($P=0,5$, $n=4$).



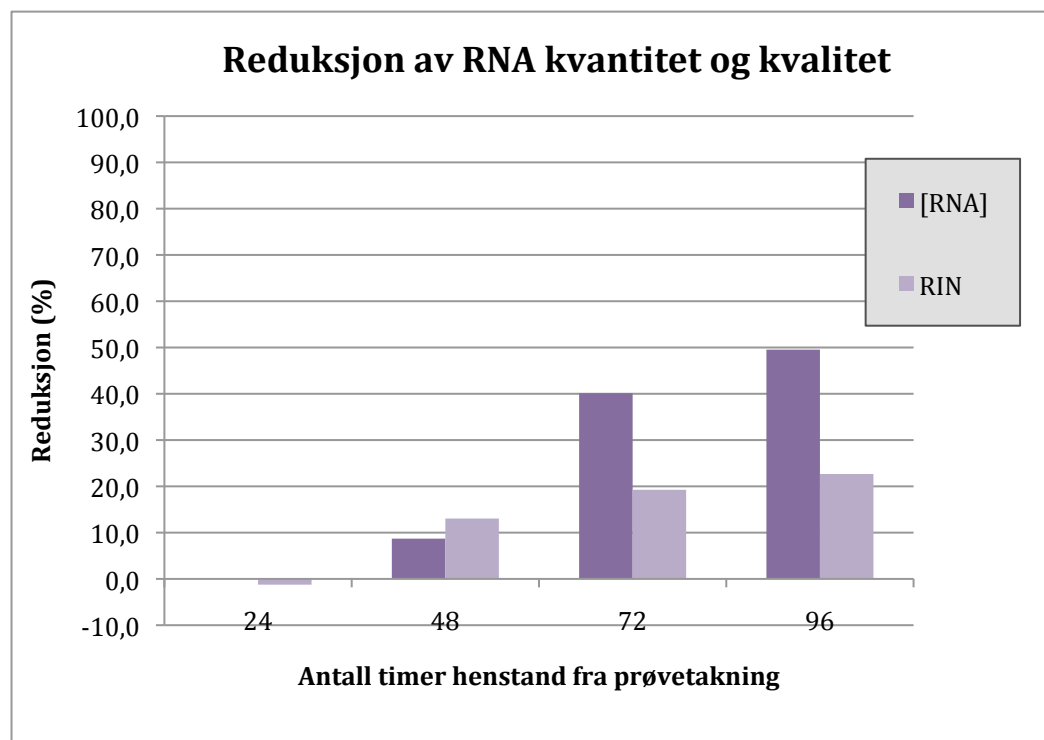
Figur 23: Oversikt over eksperimentet ”Holdbarhetstest av EDTA-blod”. MC = mononukleære celler.



Figur 24: Grafen viser gjennomsnittelig konsentrasjonen av RNA isolert (ng/μl) for hvert prøvedøgn. Feilbarer for hvert punkt viser til konfidensintervallet for de fire parallellene som inngår i gjennomsnittsverdien.



Figur 25: Grafen viser gjennomsnittelig målte RNA kvalitet i RIN-verdi for hvert prøvedøgn. Feilbarer for hvert punkt viser til konfidensintervallet for de fire parallellene som inngår i gjennomsnittsverdien. RIN-skalaen rangerer kvalitet mellom 1-10, hvor 1 indikerer dårligst målbare RNA kvalitet.



Figur 26: Barplott som viser prosentvis reduksjon av RNA konsentrasjon ($\text{ng}/\mu\text{l}$) og RIN-verdi for hvert prøvedøgn sammenlignet med 0 timers henstand.

5.5 Evaluering av Lymphoprep-metoden for isolering av mononukleære celler fra perifert blod

5.5.1 Test for tap av mononukleære celler ved Lymphoprep-metoden

Det ble utført et eksperiment for å vurdere tap av MC ved bruk av Lymphoprep-metoden og påfølgende manuell celletelling. Bruk av Lymphoprep-metoden for oppkonsentrering av MC-materiale innebærer en rekke forhold som kan føre til tap av MC under isoleringsprosessen. Lymphoprep-metoden ble derfor sammenlignet med maskinell celletelling utført v.h.a. helautomatisk Sysmex-instrument ved Laboratorium for Medisinsk Biokjemi ved Stavanger Universitetssykehus (SUS). Denne maskinelle celletellingsmetoden er en veletablert og pålitelig metode og antas dermed å gi den mest korrekte konsentrasjonen av MC i blodprøven. Blodprøver ble tatt fra én frisk person, hvor to blodprøveparalleller ble analysert med Lymphoprep-metoden og én blodprøveparallell ble analysert på Sysmex-instrumentet. Resultatet viste liten forskjell i MC-konsentrasjon mellom metodene (se tabell 21).

Tabell 21: Oversikt over resultatet fra ”test for tap av mononukleære celler” (MC). Manuell metode innebærer Lymphoprep-metoden og påfølgende celledtelling, og maskinell metode innebærer helautomatisk celledtelling v.h.a. Sysmex-instrument.

Analysemetode	Manuell	Maskinell
Ant. MC * 10 ⁹ /L	3,3*	2,72
Differanse mellom metodene (ant. MC*10 ⁹ /L)	0,6	
Prosentavvik mellom metodene	19,3%	

*Basert på to parallelle blodprøver analysert til 3,8 og 2,8 *10⁹ celler/L, prosentavvik = 30,3%.

5.5.2 Test for tap av celleklumper ved Lymphoprep-metoden

Det ble utført et enkelt eksperiment for vurdering om tap av celleklumper ved bruk av Lymphoprep-metoden. Dette var for å undersøke om man taper STC fra blodprøven dersom de befinner seg i klumper og ikke som enkeltceller. Til dette ble det benyttet materiale fra kreftcellelinjen LS174T (opprinnelig fra svulst i tarm) ettersom denne er svært klumpete av natur. LS174T-celler ble derfor tilsatt normalt blodprøvemateriale for å undersøke om Lymphoprep-mediet var i stand til å holde igjen celleklumper i MC-sjiktet etter sentrifugering. To normale blodprøver ble tilsatt 1,5 ml cellesuspensjon av LS174T, som deretter ble analysert etter Lymphoprep-metoden og manuell celledtelling. Både cellesuspensjonen og isolert MC-materiale ble talt manuelt for antall enkeltceller og celleklumper. En celleklump innebærer to eller flere sammenhengende celler. Observasjoner som ble gjort underveis i eksperimentet var at det var flere små celleklumper (2-5 sammenhengende celler) og færre store celleklumper (>10 sammenhengende celler) etter MC-isolering. Likevel ble det observert enkelte svært store celleklumper (> 20 sammenhengende celler) også etter MC-isolering. Resultatet viste totalt lite tap av celleklumper.

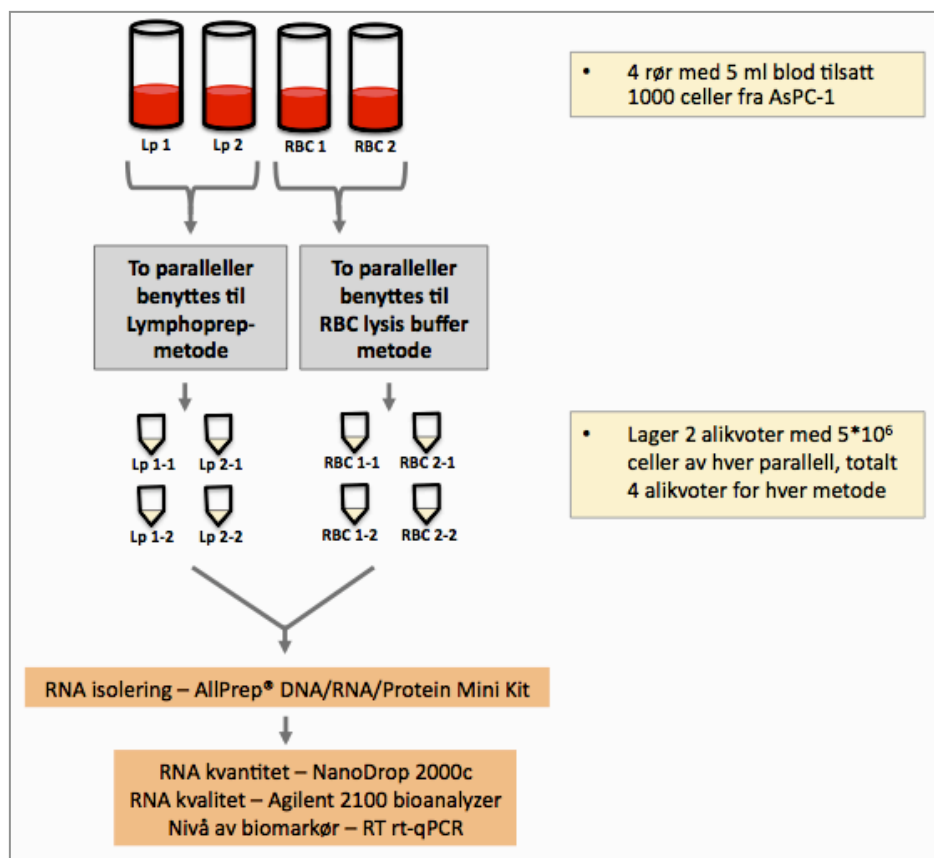
Tabell 22: Oversikt over resultatet fra telling av enkeltceller og celleklumper før og etter isolering med Lymphoprep-metoden med beregnet gjenfinningsprosent.

	Ant. tilsatt før isolering	Ant. talt etter isolering	Gjenfinningsprosent
Enkelceller	2,34*10 ⁷	2,35*10 ⁷	100%
Celleklumper	1,14*10 ⁷	3,25*10 ⁶	71%

5.5.3 Sammenligning av Lymphoprep™ og RBC lysis buffer til anrikning av sirkulerende tumorceller fra perifert blod

Tetthetsgradientmedium som Lymphoprep™ kombinert med sentrifugering er blant de mest benyttede anrikningsmetoden av CTC fra perifert blod.

Bruk av RBC lysis buffer er en anrikningsmetode som innebærer å lysere alle erytrocyttene i blodprøven. Ved påfølgende sentrifugering samles det resterende cellemateriale inkludert eventuelle CTC. Det ble utført et eksperiment for å sammenligne disse metodene. Prøvemateriale var like, normale blodprøver tilsatt 1000 AsPC1-celler per rør. Dette ble analysert i to paralleller for hver av metodene. Sammenligningsgrunnlaget baseres på RNA utelling (konsentrasjon), RNA kvalitet og nivå uttrykt mRNA for biomarkøren CEACAM5. Se figur 27 for detaljert oversikt over eksperimentet. Resultatet er presentert i tabell 23, hvor man tydelige ser at RBC lysis buffer metoden benyttet i dette eksperimentet ikke er i stand til å gi påfølgende isolering av RNA.



Figur 27: Fremgangsmåte for sammenligning av Lymphoprep- og RBC lysis buffer metode.

”Etablering av metode for anrikning og deteksjon av sirkulerende tumorceller i perifert blod”

Tabell 23: Resultat fra RNA konsentrasjonsmålinger i eksperimentet for sammenligning av Lymphoprep- og RBC lysis buffer metode.

Alikvot	Alikvotanalyse		Oppsummert for metode		
	RNA ng/ μ l	A ₂₆₀ -A ₂₈₀	RNA ng/ μ l	Standard-avvik (s)	CV (%)
Lp 1-1	123,4	2,0	122,5	7,5	6,1
Lp 1-2	131,3	2,0			
Lp 2-1	113,0	2,0			
Lp 2-2	122,3	2,0			
RBC 1-1	3,6	1,9	5,0	1,2	24,7
RBC 1-2	4,3	1,6			
RBC 2-1	6,2	1,8			
RBC 2-2	5,8	2,1			

6 Diskusjon

6.1 Etablering av qPCR oppsett for potensielle biomarkører

Det ble etablert qPCR oppsett for potensielle biomarkører til deteksjon av sirkulerende tumorceller (STC) oppstått fra kreftceller i bukspyttkjertelen. Biomarkørene som ble vurdert var CEACAM5, CEACAM6, CK8, CK19, EPCAM, PRSS1 og MMP11. CEACAM, CK og EPCAM er spesifikke for epitelceller generelt [88-90]. PRSS er i større grad spesifikk for epitelceller tilknyttet bukspyttkjertelen, ettersom det koder for et fordøyelsesenzym skilt ut fra epitelcellene her [91]. MMP vurderes som et tumorspesifikt protein, ettersom det bl.a. er involvert i sykdomsprosesser som metastasering [92]. Varianter av disse er tidligere benyttet for STC deteksjon i studier av bukspyttkjertelkreft, da særlig CEACAM, CK og EPCAM [16, 29-31, 33-35, 93, 94].

6.1.1 Optimalisering av qPCR-oppsett

Det ble optimalisert qPCR oppsett for hver av de fire nye potensielle biomarkørene (CEACAM6, CK8, PRSS1 og MMP11). De resulterende amplifiseringskurvene viser generelt lavere C_q for cellelinjene (AsPC-1, PANC-1 og BxPC-3) enn for normalt blod, se figur 13-16. Unntak her er cellelinjen PANC-1 ved CEACAM6 og PRSS1, samt svært jevne nivå av alle de tre cellelinjene og normal blod ved MMP11. Dette antyder at biomarkørene CEACAM6, CK8 og PRSS1 er forholdsvis spesifikke for disse kreftcellene, mens biomarkøren MMP11 ikke er det.

Under optimaliseringsprosessen ble det testet ut mange ulike primersett for hver biomarkør, i søken på det mest spesifikke primersettet. For enkelte av biomarkørene, CK8 og PRSS1, var det vanskelig å finne et slikt primersett ettersom det ofte ble dannet primer-dimer eller i noen tilfeller transkripsjon av annet materiale enn ønsket målsekvens (uspesifikk kopiering). Problemet ble tilslutt løst ved å designe en rekke nye primersett til ønsket spesifisitet ble oppnådd. Et alternativ til denne problemløsningen kunne vært å bruke en annen deteksjonsmetode av PCR-produktene. Ved qPCR-analysene utført her ble det benyttet fluorescensfargestoffet SYBR® Green I for deteksjon av PCR-produktet.

Dette er et uspesifikt fargestoff, som binder seg til alt dobbeltrådet DNA [70]. Ulempen er da at det vil kunne binde seg til annet dobbeltrådet DNA som er tilstede, f.eks. som følge av uspesifikk kopiering, primer-dimer eller genomisk DNA som fortsatt er tilstede. Dette kan potensielt resultere i falske positive signal. Alternativt kunne man i stedet brukt hydrolyseprober som spesifikt binder til PCR-produktet [70]. Her oppnås deteksjon avhengig av den spesifikke hybridisering mellom probe og målsekvens, noe som reduserer bakgrunnsstøyen og potensial for falsk positiv deteksjon [70]. Denne metoden gjør det også mulig å detektere ulike PCR-produkt i én reaksjonsbrønn, dersom man benytter flere prober med ulik fluorescens og instrument designet for dette [70]. Ulempen ved bruk av prober er at man må syntetisere en unik probe for hver målsekvens man ønsker å detektere [70]. I tillegg kan det også her forekomme primer-dimer, som p.g.a. probens intakte quencher er ”usynlige”, og man mister da kontrollen over tilstedeværelsen av dem. Slike primer-dimer vil ikke forstyrre deteksjonen av PCR-produkt direkte, men reduserer mengden prober som er tilgjengelig for deteksjon av målsekvensen og kan redusere amplifiseringseffektiviteten. Ved bruk av SYBR® Green I derimot, kombinert med real-time PCR teknikk, kan man ha oversikt over eventuell primer-dimer dannelse. De kan observeres ved deteksjon i negative vannkontroller som analyseres parallelt. De vil også ha et eget, lavt smeltepunkt som kan skilles fra deteksjon av ønsket PCR-produkt, noe som oftest også er tilfellet for andre produkter som måtte dannes ved uspesifikk kopiering. På den måten har man kontroll over disse fenomenene og kan kvalitetssikre deteksjonen av PCR-produktet deretter. Flere SYBR® Green I-komplekser kan samtidig binde seg til ett PCR-produkt og dermed øke sensitiviteten for deteksjon [70]. Det innebærer også at større PCR-produkt gir mer signal enn mindre PCR-produkt, og dette er fordelaktig ved at primer-dimer oftest er betraktelig mindre enn ønsket PCR-produkt. En annen fordel med bruk av SYBR® Green I er at man kun behøver ett fargestoff for deteksjon av PCR-produkt av alle de ulike biomarkørene, noe som både er kostnads- og arbeidsbesparende [70].

6.1.2 Amplifiseringseffektivitet

Amplifiseringseffektiviteten (E) ble fastsatt for qPCR-oppsettene til alle de potensielle biomarkørene. E-verdiene var mellom 1,84 – 2,07 og ble ansett som tilstrekkelig effektive, se tabell 16-17 . Gjennomsnittlige R-verdier var tilnærmet 1 for hver biomarkør, og indikere at standardkurvene og qPCR-oppsettet er godt utført og optimalisert. Ingen av E-verdiene har derimot den nøyaktig verdien 2. Ved beregninger basert på ” $2^{\Delta\Delta C_q}$ -metoden” bør man derfor benytte de praktisk etablerte E-verdiene. Dette vil gi mer nøyaktige beregninger av relativ mRNA konsentrasjon, og sikre at resultatet ikke er misvisende [26].

6.1.3 Vurdering av endelige biomarkører til studien

Relativt mRNA nivå av biomarkørene ble sammenlignet med nivå i normalt blod, se tabell 18 og figur 19. Her får man bekreftet resultatet indikert ved qPCR optimaliseringen, hvor enkelte biomarkører antyder mindre spesifisitet enn andre. Basert på dette kan det antas at biomarkøren MMP11 ikke vil kunne fungere som en god biomarkør til denne studien. Det samme gjelder for biomarkøren PRSS1. Til tross for at denne har lavt mRNA nivå i normal blod, har den også betraktelig lavere nivå for cellelinjene enn de øvrige biomarkørene. En annen observasjon er at relativt mRNA nivå av biomarkørene CEACAM6 og CEACAM5 var svært lavt ved cellelinjen PANC-1. Dette indikerer at denne cellelinjen har lite uttrykt CEACAM. For cellelinjene AsPC-1 og BxPC-3 viste de derimot høyt nivå, og antas dermed å kunne være potensielt gode biomarkør tiltross. CEACAM5 viste lavere mRNA nivå i normal blod enn CEACAM6, mens resten av prøvematerialet analysert var veldig jevnt. På bakgrunn av dette og at det kun trengs én biomarkør av CEACAM til studien, ble CEACAM5 valgt som den mest potensiell biomarkør til denne studien. Oppsummert ble CEACAM5, CK8, CK19 og EPCAM valgte biomarkører til bruk i den overordnede forskningsstudien.

Tidligere studier av STC tilknyttet bukspyttkjertelkreft har også benyttet disse biomarkørene. Disse studiene er basert på en rekke ulike metoder for anrikning og deteksjon, har ulike grenseverdier for hva som tilsvarer en STC-positiv prøve og inkluderer varierende antall pasienter (6-67 stk). CK19 er rapportert detektert 20-70% av pasientene [29, 31, 33], CEACAM5 hos 2,9% av

pasientene [29], og EPCAM i 23-80% av pasientene [28, 29]. Andre biomarkører som er benyttet i studier av bukspyttkjertelkreft er MUC1, BIRC5, CK7, CK20, CEA, h-TERT og C-MET [29, 30]. MUC1 (Mucin 1) er et protein uttrykt på epitelceller i lunge, bryst, mage og bukspyttkjertel [95]. BIRC5 (baculoviral IAP repeat containing 5) er et tumorspesifikt protein som hindrer cellenes apoptose [96]. h-TERT (human - telomerase revers transkriptase) er også en tumorspesifikk biomarkør som er høyt uttrykt i 85% av alle kreftceller, men sjelden i normale celler [33, 97]. C-MET er proto-onkogen og dermed tumorspesifikk biomarkør som er overuttrykt i en rekke svulsttyper [98].

Den begrensede og varierende spesifisiteten som kunne sees for enkelte av de utprøvde biomarkørene i denne oppgave, og også fra tidligere studier, kan gjenspeile heterogeniteten som finnes blant kreftsvulster og tumorceller. En svulst kan oppstå fra ulike cellefenotyper i vevet, samtidig som kreftcellene utvikler seg og blir mindre differensierte under kreftutviklingen [27, 28]. Det resulterer i at det potensielt finnes en rekke varianter av STC-fenotyper, som uttrykker av biomarkørene i ulik grad. Det er kjent at STC ofte er lavt differensierte kreftceller, da gjerne fra subkloner av primærsvulsten, med lite til ingen uttrykk av slike profilerte biomarkører [20]. Lavdifferensierte STC antas å være de mest aggressive og farlige kreftcellene, og er dermed av stor klinisk signifikans [27]. Deteksjon av disse er derfor en stor utfordring for dagens deteksjonsmetoder av STC. For å overkomme noen av slike spesifisitetsbegrensninger har enkelte studier satt opp multimarkørpanel. Dette innebærer deteksjon av flere biomarkører i samme prøve, for å øke sensitiviteten av STC-deteksjon [29, 30]. Et godt multimarkørpanel etterstreber å dekke over flest mulig fenotyper og differensieringer av STC. Tidligere studier av bukspyttkjertelkreft som har benyttet multimarkørpanel for STC deteksjon, har generelt detektert flere STC ved bruk av multimarkørpanelet enn ved bruk av bare én biomarkør. Disse har benyttet fire til fem biomarkører, hvor det er en blanding av både epitel- og tumorspesifikke biomarkører. Det ble detektert STC hos 47% av pasienter (34 stk.) med bukspyttkjertelkreft ved bruk av multimarkørpanel som inkluderte CK19, MUC1, EPCAM, CEACAM5 og BIRC1 [29]. Antall STC-positive prøver for hver enkelt av disse biomarkørene varierte

fra 2,9% til 23,5% [29]. En annen studie detekterte STC hos 100% av pasientene (25 stk.) ved bruk av multimarkørpanel med h-TERT, CK20, CEA og C-MET [30]. For hver biomarkør ble det detektert mellom 80-100% STC-positive pasienter [30]. Begge studiene hadde ingen STC deteksjon i kontrollgruppen, og begge benyttet immunomagnetisk anrikningsmetode med EPCAM [29, 30]. På bakgrunn av disse funnene ser man potensialet for bruk av slike multimarkørpanel, ved at det øker sensitiviteten og dermed det totale antall STC-positive pasientprøver.

I den overordnede studien for denne oppgaven kunne det vært aktuelt å etablere et multimarkørpanel. Dersom det da bare benyttes de fire valgte biomarkørene CEACAM5, CK8, CK19 og EPCAM, inneholder multimarkørpanelet kun biomarkører som er spesifikke for epitelceller generelt. Dette ville gitt et svært ensidig multimarkørpanel med tanke på heterogeniteten av STC, og sannsynligvis begrense deteksjon av disse. Ved å eventuelt inkludere MMP11 og PRSS1 som biomarkør i den forestående kliniske studien kan det vise seg å gi andre resultater enn det som ble funnet ved nivåvurdering i denne oppgaven. Utgangspunktet for vurderingen er kun basert på relativt mRNA nivå i tre cellelinjer og én normal blodprøve. Det er dermed mye rom for alternative utfall ved en vurdering i klinisk pasient- og kontrollgruppemateriale, og disse bør dermed ikke utelukkes helt på dette tidspunktet.

Generelt har tidligere studier av STC deteksjon ved bukspyttkjertelkreft funnet potensial for bruk av ulike mRNA som biomarkører. Når det gjelder klinisk signifikans i forhold til overlevelse, konkluderer de fleste med at det er sammenheng mellom STC deteksjon og prognose [29-35]. Det ble også funnet sammenheng mellom kreftstadium og antall STC detektert [35, 94]. Flere studier har kommentert at det ble funnet forhøyet antall STC i etterkant av kirurgiske inngrep, som deretter avtar igjen i løpet av de nærmeste dagene [27, 34]. Hvorvidt dette er reelle STC eller normale epitelceller frigitt til blod under operasjonen, er i stor grad ukjent. Det er likevel et fenomen man bør være oppmerksom på under kliniske studier. Grensen for at en pasient kan friskmeldes i forhold til antall STC detektert er under diskusjon [19]. Basert på studier av brystkreft ser det ut til at etablering av STC deteksjonsteknologi kan

ha størst påvirkning for behandling av pasienter uten metastaser [19]. Da kan det fortløpende vurderes sykdomsutvikling og behandlingsrespons, med mulighet for umiddelbar endring i behandling ved behov, uten å måtte vente på de kliniske radiologiske bevisene som er tilfellet i dag [19]. Krav til dagens deteksjonsmetoder av STC er at de må kunne standardiseres, samt forbedre sensitivitet og spesifisitet, før at de skal kunne tas i bruk i klinisk sammenheng.

Deteksjonsmetoden etablert i denne oppgaven er RT real-time qPCR for deteksjon av STC. Forskningsgruppen har tidligere gode erfaringer med RT real-time qPCR tilknyttet deteksjon av kreftceller fra vev, lymfeknuter og benmargsprøver i studier av bryst- og tarmkreft [74, 84, 85, 99]. Deteksjon av STC er et forskningsområde som har eksplodert i nye studier de siste årene. De mest brukte metodene er molekylærbaserte PCR-metoder og immunologiske metoder. [3, 19]. Fordelen med PCR-baserte metoder er relativ høy sensitiv, spesifisitet og effektivitet, og de ansees som mer sensitive enn immunologiske metoder [21]. Det er likevel tilknyttet en rekke mulige tekniske og metodologiske begrensinger ved bruk av PCR-baserte metoder:

- Cellematerialet lyseres i forkant av analyse og kan dermed ikke benyttes til celledelling eller andre analyser i etterkant [20, 21].
- Falske positive resultater kan oppstå som følge av uspesifikk kopiering eller deteksjon p.g.a. uspesifikke biomarkører, pseudogener, fritt DNA som er tilstede i blod, og tilstedeværelse av epitelceller og andre celler i blod som ikke er STC [20, 21].
- Falske negative resultater kan oppstå som følge av nedregulerte målgen, PCR inhibitorer fra i vev og kroppsvæsker som kan senke reaksjonens sensitivitet, at det finnes få vevsspesifikk biomarkør i størsteparten av de solide svulstene, og at STC ikke uttrykker biomarkøren i samme grad pga innbyrdes heterogenitet [20, 21].

Disse tekniske begrensingene kan delvis overkommes ved å bruk av multimarkørpanel, og ved gode primerdesign. Ved å benytte RT rt-qPCR økes sensitiviteten ved at den detekterer mRNA indirekte ved transkripsjon til cDNA. Dette utelukker deteksjon av genomisk DNA og uspesifikk kopiering av pseudogener v.h.a. DNase behandling og godt primerdesign. Samtidig er det også

mulig å skille mellom nivå av biomarkører fra STC mot bakgrunnsnivå fra normale celler [3]. Immunologiske deteksjonsmetoder kan benyttes som et alternativ til PCR, men har også mange fordeler og ulemper. Fordeler er spesifisitet, forholdsvis god sensitivitet og at cellene beholdes intakte til evt. videre bruk i etterkant av analyse. Ulemper er muligheten for falske positive funn dersom andre celler enn STC har disse antigenene på overflaten. Det er også mulighet for falske negative funn ved at enkelte STC ikke kan detekteres som følge av heterogeniteten til STC populasjonen [4, 21].

6.1.4 Sensitivitetsbestemmelse

Sensitivitetsbestemmelsen utført i denne oppgaven innebar å finne en indikasjon på qPCR-oppsettenes sensitivitet hos de valgte biomarkørene (CEACAM6, CK8, CK19 og PRSS1). Analysen av standardrekkene ble normalisert og det ble beregning gjennomsnittlig relativt mRNA nivå for hver standard, se figur 20. Standardkurvene viser tilnærmet lineær sammenheng mellom antall celler tilsatt og målt nivå av biomarkørene. Det var kun benyttet blodprøve fra én frisk person i tillagingen av normalmateriale til standardrekken. Dersom det i stedet var benyttet flere normalprøver som utgangspunkt for standardrekkene kunne man oppnådd et mer representativt nivå av populasjonen. Ensidig paret t-test ble utført, og det ble påvist signifikant høyere nivå i 2-prøven (standard tilsatt 2 AsPC-1 celler) sammenlignet med 0-prøven for alle de fire biomarkørene ($P=0,5$, $n=4$). Dette gir en indikasjon på at qPCR-oppsettenes sensitivitet er 2 STC per $2 \cdot 10^6$ normale celler, altså 1 STC per $1 \cdot 10^6$ normale celler.

6.2 Kvalitetsvurdering av kit for isolering av RNA og miRNA

AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit ble benyttet for isolasjon av RNA med størrelser over 200 nukleotider. Tileggskittet RNeasy® MinElute® Cleanup Kit ble benyttes for videre isolasjon av miRNA og andre små RNA med størrelser i området 18-200 nukleotider. For å kontrollere at metoden gav god RNA kvalitet og at miRNA også kunne isoleres, ble prøvemateriale analysert v.h.a. Agilent 2100 bioanalyser.

Resultatet fra fire RNA prøver gav gjennomsnittlig RIN-verdi 9,6, se tabell 19. Resultatet fra analysen av to prøver for miRNA isolering inneholdt i

gjennomsnittlig 225,5 pg/ μ l, se tabell 20. Dette tilsier at AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kit er i stand til å isolere RNA med svært god kvalitet, og at tilleggskittet RNeasy[®] MinElute[®] Cleanup Kit er i stand til å isolere miRNA ved denne metoden. Det sees stor variasjon i mengden miRNA som isoleres mellom de to parallellene ved at beregnet prosentavvik er på hele 42,5%. Mengden miRNA oppgitt kunne potensielt skyldes biter av degradert RNA, men dette er lite sannsynlig ettersom RNA prøvene var opprinnelig utgangspunkt (RNA 3 og 4) RIN-verdi 9,8, se tabell 20. Dette tilsier at RNA-materiale var svært lite degradert.

Bakgrunnen for vurdering av miRNA-isolering er med tanke på eventuelle fremtidige analyser hvor disse potensielt kan benyttes som biomarkører for kreft i bukspyttkjertelen. I de senere årene er det nemlig utført en rekke studier hvor miRNA benyttes som biomarkører for ulike kreftsykdommer [100]. Det tenkes at miRNA vil kunne bidra med økt spesifisitet og sensitivitet til dagens deteksjonsmetoder, ettersom de er svært spesifikke for sine opphavsceller og vev [20, 100]. miRNA, som er korte, enkeltrådede RNA på ca. 22 nukleotider, koder ikke for noe i seg selv, men har funksjoner i forhold til uttrykksregulering av andre gener. De kan bl.a. både hemme og fremme utviklingen av kreft ved å hemme mRNA fra å bli benyttet som koder til bestemte protein [100, 101]. Det er funnet at miRNA er feilregulert i det fleste human kreftsvulster, og at mønstrene for avvik er forholdsvis unike for hver krefttype [20, 100, 101]. Disse egenskapene, samt at de også er veldig stabile mot degradering, gjør dem til potensielt gode biomarkører [100]. I forbindelse med deteksjon av STC er det foreløpig, basert på teoretiske bioinformatikkstudier, stort potensial for miRNA som biomarkører [20]. Ettersom miRNA kunne isoleres ved bruk av de kombinerte metodene angitt, kan miRNA fra prøvemateriale som hentes inn fryses ned, i påvente av å eventuelt benyttes ved et annet stadium av forskningsstudien.

6.3 Holdbarhetstest av EDTA-blod

Holdbarheten til EDTA-blod er en viktig vurdering med tanke på den praktiske gjennomføringen av prøveinnsamling til forskningsprosjektet. Det vil da motta blodprøvemateriale via postgang fra pasienter ved sykehus andre steder i landet, og det er viktig at prøvematerialet overlever denne transporttiden.

Blodprøvene tas på EDTA-rør, som hindrer blodet i å koagulere og bevarer cellene morfologisk intakte. Forut for eksperimentet ble det antatt at de mest klinisk relevante STC (har evnen til metastasering) vil ha lik eller bedre evne til å overleve i pasientens blod som de øvrige normale cellene i prøven. Kreftceller fra cellekultur tilsatt blodprøven til en vilkårlig frisk person kan derimot tenkes at ikke vil kunne overleve lenge. Dette er på bakgrunn av at kreftcellene da ikke er reelle STC som har tilpasset seg denne personens forhold i vev og blod over tid. Det var derfor ikke hensiktsmessig å tilsette kreftceller i de normale blodprøvene som var utgangspunkt for dette eksperimentet. De fleste av tidligere studier for STC deteksjon ved bukspyttkjertelkreft benytter EDTA-blod, men oppbevaringstiden før videre prosessering varierer [29, 30, 32-34]. Mange oppgir ikke henstandstiden i sine publikasjoner, men de som gjør det har rapportert prosessering av prøvemateriale innen 1, 4 eller 72 timer [29, 30, 32, 33]. Det er også rapportert ulike oppbevaringsforhold, enten ved romtemperatur eller ved 4°C [30, 32].

Vurderingen av holdbarhet i dette eksperimentet baseres på mengde og kvalitet av RNA etter ulik henstandstid i romtemperatur, mellom prøvetakning og videre prøvebehandling. RNA kvantitet ble målt i form av RNA konsentrasjon i ng/ μ l, og kvalitet i form av RIN. Resultatet er fremstilt grafisk i figur 24-25, hvor rådata er oppgitt i vedlegg 1. Her ser man at konfidensintervallene er generelt store, særlig for konsentrasjonsmålingene. Dette kan skyldes biologiske forskjeller mellom blodprøveparallelene og alikvotene. Det kan også være et resultat av prøvehåndteringen under selve RNA isoleringen. Ved kvalitetsanalysen kommer effekten av dette særlig til uttrykk ved at høyeste oppnådde RIN-verdi var 8,7 for en av alikvotene ved 0 timers henstand. Dette tilsier en lavere kvalitet enn forventet ved direkte analyse av prøvemateriale ettersom det da vanligvis oppnås verdier over 9. For å minimere effekten av

feilkilder tilknyttet prøvehåndteringen mellom alikvotene innefor hvert prøvedøgn, ble alle a-alikvotene håndtert før b-alikvotene. Hvert prøvedøgn skal dermed være sammenlignbare. Figur 26 viser resultatet som en prosentvis reduksjon for hvert prøvedøgn sammenlignet med resultatet ved 0 timers henstand. Her ser man at det er liten endring ved 24 timer og knappe 10% reduksjon ved 48 timer, men f.o.m. 72 timer sees større endringer. Herfra er reduksjonen rundt 20% for RNA kvalitet, og over 40% for RNA mengde. Det viser at RNA mengden endrer seg i større grad enn det kvaliteten gjør over tid. Dette kan tolkes som at flere celler i prøven dør over tid, og da minker RNA konsentrasjonen. Videre kan det tolkes at RNA materiale fra de gjenværende cellene likevel innehar relativt bra kvalitet over tid. Statistisk paret t-test ble utført hvor de fire alikvotene innefor hvert prøvedøgn er ansett som paralleller. Det ble påvist signifikant lavere RNA konsentrasjon ved 72 timers henstand sammenlignet med prøvesettet analysert etter 0 timers henstand ($P=0,05$, $n=4$). RNA kvaliteten ble på samme måte påvist å gi signifikant lavere RIN-verdi ved 48 timers henstand ($p=0,05$, $n=4$). Dette viser at grensen for oppbevaringstid av EDTA-blod til dette forskningsprosjektet bør settes til maksimalt 48 timers henstand. I praksis innebærer det at forskningsgruppens laboratorium ved SUS må motta prøven og isolere RNA innen to døgn for å sikre optimal RNA uttelling og kvalitet. Den laveste kvalitetsmålingen funnet i dette eksperimentet var en RIN-verdi på 6,2, da for en av alikvotene ved 96 timers henstand. Basert på forskningsgruppens tidligere erfaringer er dette mest sannsynligvis en akseptabel kvalitet for å oppnå vellykket qPCR-analyse av RNA-materiale. Det kan derfor være aktuelt å undersøke dette videre ved å utføre qPCR analyser på materialet. Dersom det viser seg at alle henstandsdøgnene kan gi vellykket qPCR-analyse, kan grensen for oppbevaringstid settes til 72 timer, som er grensen for signifikant endring i RNA. I den tidligere studien som rapporterte maksimalt 72 timers henstand av EDTA-blod i romtemperatur, ble det detektert STC hos 11 av 26 pasienter [32]. Dette tilsier at opptil 72 timers henstand i den forestående kliniske studien også potensielt kan tillate STC å overleve.

6.4 Evaluering av Lymphoprep-metoden for anriking av mononukleære celler fra perifert blod

Lymphoprep™ er et tetthetsgradienmedium som effektivt sedimenterer erythrocytter og separerer mononukleære celler (MC) til et eget sjikt under sentrifugering [48]. Fordeler ved bruk av Lymphoprep-metoden er at den er uspesifikk og dermed kan isolere alle typer STC [20]. En annen fordel er at kontaminasjon av erythrocytter i MC-materiale kun utgjør 1-5 % [45]. Generelle ulemper ved Lymphoprep-metoden er at den er forholdsvis tidkrevende, kun få prøver kan behandles om gangen og at den er relativt kostbar [44]. Ulemper i forhold til isolering av STC kan være risiko for generelt celledøp og tap celleklumper [102]. En rekke andre feilkilder er også assosiert med Lymphoprep-metoden, hovedsakelig fordi den utføres manuelt. Dette kan gi variasjoner i mengden MC isolert som er uavhengig av prøvemateriale selv. Slike feilkilder inkluderer uheldig miksing av lagene ved tilsats av prøvemateriale, henstand før sentrifugeringen og ineffektiv sentrifugering [20, 21]. Dette kan føre til sedimentasjon av MC-materiale som da ikke lar seg isolere. Videre kan variasjon oppstå som følge av henstand etter sentrifugering (diffusjon av MC til omgiende lag), upresis avpipettering av MC-materialet og risiko for celledød pga. de ”harde” fysiske forholdene de utsettes for [20, 21]. Påfølgende celledøp av det isolerte cellematerialet utføres også manuelt. Lymphoprep-metoden rommer derfor også stor mulighet for individuell variasjon i forhold til hvem som utfører metoden og grad av erfaring. Metoden krever derfor trening før de kan tas i bruk i en reel sammenheng [44]. Det ble derfor utført tre eksperimenter for å evaluere bruk av Lymphoprep-metoden og om hvorvidt den er tilstrekkelig god med tanke på tap av celler og celleklumper, samt sammenlignet med den alternative RBC lysis buffer metoden.

6.4.1 Tap av mononukleære celler ved Lymphoprep-metoden

Lymphoprep-metoden og påfølgende manuell celledøp sammenlignes med maskinell celledøpsmetode. Dette var for å vurdere tap av MC, og resultatet er fremstilt i tabell 21. Prosentavviket mellom parallellene analysert med Lymphoprep-metoden var 30,3%, noe som viser til forholdsvis stor variasjon dem imellom. Avvik av denne størrelsesordenen ikke uventet tatt i betraktning at

det er en manuell metode som innehar rom for flere variasjonsforhold som nevnt innledningsvis. Den maskinelle metoden utført ved SUS er en veletablert, pålitelig og automatisert celletellingsmetode. Den benyttes til daglig bruk i klinisk sammenheng ved sykehuset, og innebærer få muligheter for variasjon i prøvemateriale annet en reelt MC-nivå. En feilkilde som kan nevnes er dannelse av koagler i blodprøveglasset, noe som kan oppstå som følge av dårlig prøvetakning. Dette kan forstyrre det reelle nivå av antall MC som er tilgjengelig for celletelling, men gjelder like mye for manuell Lymphoprep-metode som for maskinell celletellingsmetode. Ved maskinell celletellingsmetode ble det oppgitt at prøven inneholdt $2,72 \cdot 10^9$ MC/L. Dette avviker med gjennomsnittsverdien for manuell metode med $0,6 \cdot 10^9$ MC/L og prosentavvik var 19,3%. Dette avviket er mindre enn mellom parallellene ved manuell metode. Det tilsier dermed at det er liten forskjell i mengden MC funnet mellom disse metodene. Ettersom den maskinelle metoden er svært pålitelig kan resultatet tolkes som at man i liten grad taper MC ved bruk av Lymphoprep-metoden. Denne metoden ansees dermed som tilstrekkelig effektiv i å isolere MC fra EDTA-blod til den overordnede forskningsstudien.

6.4.2 Tap av celleklumper ved Lymphoprep-metoden

Sirkulerende tumorceller (STC) kan finnes seg som celleklumper blod [27, 102]. Dette innebærer at det frigis flere sammenhengende celler til blodbanen som også følger sirkulasjonen i denne tilstanden [27, 102]. Slike celleklumper er antatt å ha potensielle fordeler for overlevelse, proliferasjon og etablering i nye organer [27]. Det påstås også at de ikke trenger å forlate blodbanen igjen for å danne metastaser, men at de kan etablere seg direkte på kapillærveggen og utvikle seg der [27]. Det er generelt akseptert at tilstedeværelsen av celleklumper er en indikasjon på høyt metastatisk potensial [27]. Det er antydnet at bruk av tetthetsgradientmedium og sentrifugering for anrikning av STC ødelegger og mister slike celleklumper [102].

På bakgrunn av dette ble det utført et eksperiment for å vurdere tap av eventuelle celleklumper i blodprøver ved bruk av Lymphoprep-metoden.

Resultatet er fremstilt i tabell 22, og viser antall enkeltceller og celleklumper som er talt før og etter MC-isolering. Her ser man at det ble gjenfunnet 100% av enkeltcellene og 71% av celleklumpene. Visse observasjoner som ble gjort under celletellingen er relevante her. Det ble nemlig observert færre store celleklumper (10-20 celler) etter utført MC-isolering, og at de som da fantes i hovedsak besto av mindre tumorceller per celleklump. Det er da naturlig å anta at celleklumper ble oppløst til mindre enheter, og at de også bidrar til enkeltcellepopulasjonen. Gjenfinningsprosenten oppgitt kan dermed ikke tolkes som de reelle gjenfinningsprosentene av disse. Det ble uansett observert flere store celleklumper, noen bestående av over 20 celler, etter MC-isolering, noe som viser at Lymphoprep™ er i stand til å holde igjen disse i MC-sjiktet.

6.4.3 Sammenligning av Lymphoprep™ og RBC lysis buffer til anriking av sirkulerende tumorceller fra perifert blod

Det ble utført et eksperiment for å vurdere bruk av RBC lysis buffer som alternativ metode for anriking av STC. Bakgrunnen for dette var at RBC lysis buffer metoden tilsynelatende virket som en enklere og mindre tidkrevende metode. Det virket også mindre sannsynlig å miste cellemateriale underveis, til tross for mindre effektiv oppkonsentrering av eventuelle STC. Basert på metodenes prosedyrer ser man flere mulige årsaker til potensielle forskjeller mellom metodene:

- Risikoen for tap av STC underveis. Det antas å være større risiko ved bruk av Lymphoprep-metoden sammenlignet med RBC lysis buffer metoden. Det skyldes at ved Lymphoprep-metoden kan eventuelle STC diffundere til lagene både over og under MC-sjiktet før avpipettering, de kan sedimentere til bunns under sentrifugering og de kan bli igjen ved ufullstendig avpipettering av MC-sjiktet. Ved RBC lysis buffer metoden kan STC kun forsvinne ved å diffundere oppover etter sentrifugering. Resterende risikofaktorer for tap av STC er felles mellom begge metodene, og inkluderer tap som følge av ufullstendig sentrifugering og gjennom vaskestegene for å rense isolert cellemateriale.
- Oppkonsentrering av STC. Lymphoprep-metoden oppkonsentrerer eventuelle STC i større grad enn RBC lysis buffer metoden. Det skyldes at

Lymphoprep-metoden kun isolerer MC, som inkluderer lymfocytter, monocytter og STC, mens RBC lysis buffer metoden i tillegg også isolerer granulocytter. Granulocytter er en tredje undergruppe leukocytter som utgjør 36-80% av blodcellene i normalt blod [47]. Det betyr at alikvoter fra Lymphoprep-metodene som inneholder like mange celler som alikvoter fra RBC lysis buffer metoden, har større sannsynlighet for å inneholde STC.

- Risiko for kontaminasjon. RBC lysis buffer metoden antas å ha større sannsynlighet for kontaminasjon av lysert erytrocytt-materiale i det isolerte cellemateriale. Det er kjent at erytrocytter inneholder mye RNase som vil frigis ved lysis og disse kan potensielt skade RNA som frigis fra MC i forkant av og under RNA isoleringen [103].

En tidligere studie har sammenlignet disse metodene i normalt prøvemateriale tilsatt kjente mengder kreftceller. Sensitiviteten for deteksjon ved påfølgende RT-PCR deteksjon var 60% ved bruk av RBC lysis buffer metode mot 70% ved bruk av Lymphoprep™ [103]. RBC lysis buffer metoden i denne studien var utført med et kommersielt kit [103].

Resultatet av mengden RNA isolert fra alikvotene er presentert i tabell 23. Man ser umiddelbart at det er noe som har gått galt ved isoleringen ved RBC lysis buffer metoden. I gjennomsnitt er det isolert 5,0 ng/ μ l RNA ved denne metoden, mot 122,5 ng/ μ l RNA isolert ved Lymphoprep-metoden. Årsaken til at RBC lysis buffer metoden mislyktes kan være en konsekvens av at den egenlagde bufferen ikke er kompatibel med påfølgende RNA isolasjon ved bruk av AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit. Lysis bufferen for hemolyse av cellemateriale og de selektive kolonnene i dette kittet, krever nøyaktige reagensforhold for å fungere optimalt. Det er mulig at en kommersiell RBC lysis buffer produsert av samme leverandør ville muliggjort RNA isolasjon med dette kittet. Enkelte studier har suksessfullt isolert RNA etter bruk av RBC lysis buffer [28, 31, 93]. Oppskriften på disse er i generelle trekk lik oppskriften som ble benyttet i dette eksperimentet. Påfølgende RNA ekstraksjon ble derimot utført ved bruk av fenol og/eller kloroform [31, 93]. Dette er ikke tilfellet for RNA isolering med kittet AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen) som er fritt for slike kjemikalier

[53]. Det kan dermed se ut til at bruk av en annen RNA isoleringsmetode også kan løse dette problemet dersom man i større grad ønsker å benytte RBC lysis buffer metoden fremfor Lymphoprep-metoden.

Gjennomføringen av dette eksperimentet ble altså ikke slik som forventet. Ettersom det ikke ble isolert RNA med RBC lysis buffer metoden i dette eksperimentet var det ingen hensikt å gå videre med undersøkelsene av RNA kvalitet og nivå av biomarkør uttrykt. Forskjeller mellom metodene ville kanskje kommet til syne ved vurdering av RNA mengde og kvalitet. Dette kunne ha årsak i forhold rundt celleisoleringsprosessen, som stresset cellene utsettes for og graden av kontaminasjon av annet materiale. Dersom mengden og kvalitet av RNA isolert var like mellom metodene, kunne det likevel forventes forskjeller angående nivå av uttrykt mRNA for en biomarkør. Det kan tenkes at Lymphoprep-metoden gir bedre resultater ettersom prøvemateriale inneholder mer oppkonsentrert STC og mindre forstyrrende RNA material fra andre celler enn MC. Den egenlagde RBC lysis bufferen utprøvd ville vært et rimelig og arbeidsbesparende alternativ til Lymphoprep™, dersom metoden hadde fungert og viste tilsvarende eller bedre resultater enn Lymphoprep-metoden. Dersom en kommersiell RBC lysis buffer skulle blitt benyttet isteden, ville det sannsynligvis blitt et mye dyrere alternativ. Det er heller ikke aktuelt å benytte en annen RNA isoleringsmetode enn AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen), ettersom dette isolerer DNA, RNA og protein raskt i én prosedyre med god kvalitet, samt at miRNA kan bevares ved tilleggs kit til denne metoden.

På bakgrunn av dette, sammen med dens brede benyttelse i forskningssammenheng, beholdes Lymphoprep-metoden som standard celleisoleringsmetode til forskningsstudien uten videre undersøkelser. Forskningsgruppen selv har også lang og god erfaringer med Lymphoprep-metoden.

6.5 Fremtidsaspekter

I de fleste publikasjoner tilknyttet deteksjon av STC blir det kommentert at dagens metoder for anrikning og deteksjon av STC må videreutvikles for å innfri krav i forhold til sensitivitet, spesifisitet og standardisering. Når det gjelder

bukspyttkjertelkreft trengs det også flere forskningsstudier med større pasientgrupper for å kunne fastsette klinisk relevans av STC her.

I den overordnede studien vil det bli benyttet de etablerte biomarkørene CEACAM6, CK8, CK19 og EPCAM. Ettersom alle disse er generelt epitelspesifikke biomarkører, vil det være gunstig å ta med biomarkørene MMP11 og PRSS1 i tillegg. Dette er fordi MMP11 er tumorspesifikk og PRSS1 er epitelspesifikk for bukspyttkjertelvev. De tumorspesifikke biomarkørene BIRC5, h-TERT og C-MET som er utprøvd i andre studier [29, 30, 33], kunne også blitt undersøkt som potensielle biomarkører til denne studien. Ved etablering av et slikt multimarkørpanel vil det kunne bidratt til en bredere deteksjon av den heterogene STC populasjonen. Det bør også forsøkes å finne flere potensielle nye biomarkører for STC ved bukspyttkjertelkreft. For å kunne utføre dette trengs det ytterligere molekylær karakterisering av kreftcellene. Dette må undersøkes i celler fra både primærsvulst og lokal- og fjerne metastaser for å inkludere hele bildet av cellenes svulstutvikling. På denne måten kan man øke kunnskapsnivået rundt tumorcellene, og utvikle gode biomarkører deretter.

I denne oppgaven er det hovedsakelig vurdert og omtalt biomarkører av mRNA for indirekte påvisning av STC. Andre typer biomarkører kan også ha potensial som gode biomarkører for STC deteksjon, eks. mikro RNA (miRNA), genetisk DNA, epigenetiske faktorer og molekylære komponenter fritt i serum og andre kroppsvæsker [16]. miRNA er funnet å være involvert i regulering av onkogen og tumor supressor gener, og flere vevsspesifikke miRNA er identifisert i tilknytning til adenokarsinom i bukspyttkjertelen [16, 100]. Genetiske DNA endringer er detektert i flere gener fra celler hos pasienter med bukspyttkjertelkreft, bl.a. i onkogen som *KRAS*, *TP53* og *P16* for å nevne noen [10, 16]. Mutasjoner i *KRAS* har vist særlig stort potensial som biomarkør for tidlig deteksjon av kreftutvikling [16, 17]. Epigenetiske faktorer som endringer i DNA metylering og histon modifikasjoner, kan også vurderes som tumorspesifikke biomarkører [16]. Tumorspesifikke molekylære enheter kan potensielt detekteres og fra serum og andre kroppsvæsker (eks. sekret fra bukspyttkjertelen), og her har særlig CA19-9 vist bra potensial [16, 104]. Basert på dette ser man at det kan være mange innfallsvinkler for STC deteksjon. Det

kan spekuleres i at utvikling av flere spesifikke biomarkører og deteksjonsteknologi, også kan skape mulighet for gode multimarkørpanel som går på tvers av disse grupperingene nevnt over.

Det er forholdsvis allment akseptert at den viktigste faktoren for klinisk relevant STC-deteksjon, er å kunne fange opp de cellene som er mest aggressive og farlige [27, 28]. Slike celler kan forekomme enkeltvis eller som celleklumper [27, 102]. Mesteparten av dagens metoder for STC deteksjon skiller ikke mellom døende og levedyktige STC, eller mellom andre tilstander de befinner seg i, eks. ”dvale”-tilstand [19]. Det er heller ikke mulig å skille mellom STC og normale celler i blod, som kan være tilstede i etterkant av kirurgiske inngrep [27, 34]. Celleklumper av STC er antatt å være spesielt aggressive, ettersom de i denne tilstanden tenkes å være mer motstanddyktige mot de ”harde” forholdene i blodbanen [27, 102]. De mest anvendte av dagens anrikningsmetoder fører potensielt til splittelse av celleklumper og er kombinert med deteksjonsmetoder som heller ikke er i stand til å registrere denne celletilstanden. Mikrobrikken HB-chip (herringbone-chip) er en ny form for mikrobrikke-teknologi som kan detektere STC også i tilstand som celleklumper [102]. Her bindes STC til EPCAM-antigenet i brikken [105, 106], og innebærer dermed begrensinger tilknyttet immunologiske anriknings- og deteksjonsmetoder. Enkeltceller og klumper av STC som binder til antigenet kan videre detekteres ved bruk av fluorescensmikroskopi [102].

Deteksjonsteknologi som er i stand til å kartlegge STC-populasjonen og aggressivitetsgraden av denne kan ha stor klinisk relevans i forbindelse med sykdomsovervåkning og behandlingsrespons. Det vil kunne gi utgangspunkt for individuelt tilpassede behandlingsregimer for pasientene, og potensielt føre til bedre prognoser og overlevelse.

Referanser

1. Cancer Registry of Norway, *Cancer in Norway 2009 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway*. Cancer Registry of Norway. 2011, Oslo: Cancer Registry of Norway.
2. Oncolex. *Oncolex - Oslo Universitetssykehus HF*. 2010. [internett] [sitert 8. mai 2012]; Tilgjengelig fra: www.oncolex.no.
3. Mavroudis, D., *Circulating cancer cells*. *Ann Oncol*, 2010. **21 Suppl 7**: p. vii95-100.
4. Pantel, K., C. Alix-Panabieres, and S. Riethdorf, *Cancer micrometastases*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009. **6(6)**: p. 339-51.
5. Sand, et al., *Menneskekroppen - fysiologi og anatomi*. 2 ed. 2006, Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS.
6. NCBI, *How does the pancreas work?* 2012, [online database] [sitert 30. mai 2012] U.S. National Library of Medicine. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/>
7. NCBI, *Pancreatic carcinoma*. 2012, [online database] [sitert 30. mai 2012] U.S. National Library of Medicine. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/>
8. Kreftforeningen. *Kreftforeningen*. 2011 [internett] [sitert 8. mai 2012]; Tilgjengelig fra: www.kreftforeningen.no
9. Malvezzi, M., et al., *European cancer mortality predictions for the year 2012*. *Ann Oncol*, 2012. **23(4)**: p. 1044-52.
10. Li, D., et al., *Pancreatic cancer*. *Lancet*, 2004. **363(9414)**: p. 1049-57.
11. Hoem, D., O. Villanger, and I. Gladhaug (2007) *Adenocarcinom i pancreas; utredning og behandling*. Retningslinjer fra NGICG.
12. Michaud, D.S., *Epidemiology of pancreatic cancer*. *Minerva Chir*, 2004. **59(2)**: p. 99-111.
13. Vincent, A., et al., *Pancreatic cancer*. *Lancet*, 2011. **378(9791)**: p. 607-20.
14. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. *Ann Surg Oncol*, 2010. **17(6)**: p. 1471-4.
15. Balteskard, L. (2005) *Medikamentell behandling av avansert og metastatisk pancreaskreft*. Retningslinjer fra NGICG.
16. Bhat, K., et al., *Advances in biomarker research for pancreatic cancer*. *Curr Pharm Des*, 2012. **18(17)**: p. 2439-51.
17. Tada, M., et al., *Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma*. *Cancer Res*, 1993. **53(11)**: p. 2472-4.
18. Weinberg, R.A., *The biology of cancer*. 2007, New York: Garland Science - Taylor & Francis Group LLC.
19. Bednarz-Knoll, N., C. Alix-Panabieres, and K. Pantel, *Clinical relevance and biology of circulating tumor cells*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13(6)**: p. 228.
20. Gerges, N., J. Rak, and N. Jabado, *New technologies for the detection of circulating tumour cells*. *Br Med Bull*, 2010. **94**: p. 49-64.
21. Alunni-Fabbroni, M. and M.T. Sandri, *Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization*. *Methods*, 2010. **50(4)**: p. 289-97.

22. Alberts, B., et al., *Essential cell biology*. 2nd ed. 2004, New York: Garland Science.
23. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science.
24. Goss, P.E. and A.F. Chambers, *Does tumour dormancy offer a therapeutic target?* Nat Rev Cancer, 2010. **10**(12): p. 871-7.
25. Allard, W.J., et al., *Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6897-904.
26. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
27. Paterlini-Brechot, P. and N.L. Benali, *Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions*. Cancer Lett, 2007. **253**(2): p. 180-204.
28. Sergeant, G., et al., *Perioperative cancer cell dissemination detected with a real-time RT-PCR assay for EpCAM is not associated with worse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 47.
29. de Albuquerque, A., et al., *Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Metastatic Breast Cancer Patients: A Step Forward in Personalized Medicine*. Breast Care (Basel), 2012. **7**(1): p. 7-12.
30. Zhou, J., et al., *Marker expression in circulating cancer cells of pancreatic cancer patients*. J Surg Res, 2011. **171**(2): p. 631-6.
31. Hoffmann, K., et al., *Detection of disseminated pancreatic cells by amplification of cytokeratin-19 with quantitative RT-PCR in blood, bone marrow and peritoneal lavage of pancreatic carcinoma patients*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(2): p. 257-63.
32. Kurihara, T., et al., *Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a preliminary result*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2008. **15**(2): p. 189-95.
33. Leelawat, K., et al., *Prognostic relevance of circulating CK19 mRNA in advanced malignant biliary tract diseases*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(2): p. 175-81.
34. Mataka, Y., et al., *Carcinoembryonic antigen messenger RNA expression using nested reverse transcription-PCR in the peripheral blood during follow-up period of patients who underwent curative surgery for biliary-pancreatic cancer: longitudinal analyses*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3807-14.
35. Soeth, E., et al., *Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK 20 RT-PCR indicates poor survival*. J Cancer Res Clin Oncol, 2005. **131**(10): p. 669-76.
36. Husøy, A.-M., *Blodprøvetakning i praksis*. 2005, Oslo: Akribe AS.
37. Stokke, O. and T. Hagve, *Klinisk biokjemi og fysiologi*. 3. ed. 2006, Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS.
38. Sigma-Aldrich, *ECACC Handbook - Fundamental Techniques and Protocols for ECACC Cell Lines*. 2 ed. 2012: [brosjyre] Sigma Life Science, ECACC.

39. Alberts B., B.D., Hopkin K. et al., *Essential cell biology*. 2nd ed. 2004, New York: Garland Science.
40. Health Protection Agency UK, *ECACC Cell Line Data Sheet - LS174T*. 2011, [online database] [sitert 11. juni 2012] Health Protection Agency Culture Collections. Tilgjengelig fra:
<http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/>
41. Health Protection Agency UK, *ECACC Cell Line Data Sheet - PANC-1*. 2011, [online database] [sitert 11. juni 2012] Health Protection Agency Culture Collections. Tilgjengelig fra:
<http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/>
42. Health Protection Agency UK, *ECACC Cell Line Data Sheet - BxPC-3*. 2011, [online database] [sitert 11. juni 2012] Health Protection Agency Culture Collections. Tilgjengelig fra:
<http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/>
43. Health Protection Agency UK, *ECACC Cell Line Data Sheet - AsPC-1*. 2012, [online database] [sitert 11. juni 2012] Health Protection Agency Culture Collections. Tilgjengelig fra:
<http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/>
44. Axis-Shield. *Lymphoprep™ - Isolation of human mononuclear cells*. 2003 [internett] [sitert 12. juni 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Leaflet%20Lymphoprep.pdf>.
45. Axis-Shield. *Density gradient media*. 2003 [internett] [sitert 12. juni 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/products.htm>.
46. Sheehan, D., *Physical Biochemistry - Principles and Applications*. 2009, Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
47. Stakkestad, J.A. and A. Åsberg, *Brukerhåndbok i klinisk kjemi*. 3. ed. 2004, Haugesund: Akademisk Forlag AS.
48. Axis-Shield. *Lymphoprep™ - package insert*. 2003 [internett] [sitert 12. juni 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Package%20insert/Lymphoprep.pdf>.
49. Rodak, B.F., *Hematology - Clinical Principles and Applications*. 2. ed. 2002: Saunders.
50. Freshney, I.R., *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 2010, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
51. Butler, M. and M. Spearman, *Cell Counting and Viability Measurements*, in *Animal Cell Biotechnology - Methods and Protocols*, R. Pörtner, Editor. 2007, Human Press Inc.: New Jersey.
52. Sigma-Aldrich. *Trypan Blue solution*. 2011 [internett] [sitert 26. juni 2012]; Tilgjengelig fra:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8154?lang=en®ion=NO>.
53. Qiagen, *AllPrep(R) DNA/RNA/Protein Mini Handbook*. 2007 [brosjyre] Qiagen.
54. Qiagen, *Qiagen supplementary protocol - Purification of miRNA fra cells an tissues using the AllPrep(R) DNA/RNA/Protein Mini Kit and RNeasy(R) MinElute(R) Cleanup Kit*. 2008 [brosjyre] Qiagen.

55. Qiagen, *RNeasy(R) MinElute(R) Cleanup Handbook*. 2010 [brosjyre] Qiagen.
56. Thermo Scientific. *NanoDrop 2000c*. 2009 [internett] [sitert 26.juni 2012]; Tilgjengelig fra:
<http://www.nanodrop.com/Productnd2000coverview.aspx>.
57. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.
58. Imbeaud, S., et al., *Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(6): p. e56.
59. Mueller, O., S. Lightfoot, and A. Schroeder, *RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control*, in www.genomics.agilent.com, A.T. Inc., Editor. 2004, Agilent Technologies Inc.
60. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. 7th ed. 2007, New York: W. H. Freeman and Company.
61. Microfluidizer(R) Processors. *Microfluidics*. 2012 [internett] [sitert 25. juni 2012]; Tilgjengelig fra:
<http://www.microfluidicscorp.com/index.php>.
62. Bercovici, M. *Stanford Microfluidics Laboratory*. 2012 [internett] [sitert 25. juni 2012]; Tilgjengelig fra:
<http://microfluidics.stanford.edu/index.html>.
63. Agilent Technologies, *Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide*, in www.genomics.agilent.com, Agilent Technologies Inc., Editor. 2006, [brosjyre] Agilent Technologies Inc.: Waldbronn.
64. Agilent Technologies, *Agilent Small RNA Kit Guide*, in www.genomics.agilent.com, Agilent Technologies Inc, Editor. 2008, [brosjyre] Agilent Technologies Inc.: Waldbronn.
65. Invitrogen™. *M-MLV Reverse Transcriptase*. 2012 [internett] [sitert 25. juni 2012]; Tilgjengelig fra:
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/28025021?ICID=search-product>.
66. Promega, *RQ1 RNase-Free DNase*, in *Promega Corporation*, Promega Corporation. 2009, [brosjyre] Promega Corporation: Madison.
67. Promega, *RNaseOUT - Recombinant Ribonuclease Inhibitor*, in www.lifetechnologies.com, Life Technologies Corporation, Editor. 2011, [brosjyre] Invitrogen™: Carlsbad.
68. Eurogentec. *qPCR core kit or SYBR(R) Green I No ROX Technical Data Sheet*. 2012 [internett] [sitert 26. juni 2012]; Tilgjengelig fra:
<https://secure.eurogentec.com/EGT/files/RT-SN10-05NR.pdf>.
69. AppliedBiosystems. *TaqMan(R) and SYBR(R) Green Chemistries*. 2011 [internett] [sitert 15. september 2012]; Tilgjengelig fra:
<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>.
70. AppliedBiosystems. *TaqMan(R) and SYBR(R) Green Chemistries*. 2011 [internett] [sitert 28. september 2012]; Tilgjengelig fra:
<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>.

71. Stratagene, *mx3000p_manual*, in *Stratagene*, Stratagene, Editor. 2004, [brosjyre] Stratagene.
72. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
73. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
74. Tjensvoll, K., et al., *A small subgroup of operable breast cancer patients with poor prognosis identified by quantitative real-time RT-PCR detection of mammaglobin A and trefoil factor 1 mRNA expression in bone marrow*. *Breast Cancer Res Treat*, 2009. **116**(2): p. 329-38.
75. Bishop, M.L., E.P. Fody, and L.E. Schoeff, *Clinical Chemistry - Principle, Procedures, Correlations*. 5th ed. 2005, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
76. Qiagen, *QIAquick(R) Spin Handbook*, in *Qiagen(R) Samle and Assay Technologies*, Qiagen(R), Editor. 2008, [brosjyre] Qiagen.
77. Departement of Molecular Biology UiB. *Sequencing Facility*. 2012 [internett] [sitert 26. juni 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.uib.no/seqlab>.
78. Departement of Molecular Biology UiB. *Protocol BigDye v.3.1 UiB*. 2011 [internett] [sitert 26. juni 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.uib.no/seqlab/artikler/2011/09/protocol-bigdye-v.3.1>.
79. PHG-foundation, *DNA Test Methods - DNA Sanger Sequencing*. 2008, YouTube. p. 1:08. [internett] [sitert 22. august 2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.youtube.com/watch?v=oYpllBI0qF8>
80. Madden, T., *The NCBI Handbook : Chapter 16 - The BLAST Sequence Analysis Tool*. 2002, NCBI.
81. Roberts, R.J., *Restriction endonucleases*. *CRC Crit Rev Biochem*, 1976. **4**(2): p. 123-64.
82. Fermentas, *Certificate of analysis - PvuII*, Fermentas Life Sciences, Editor. 2011, [brosjyre] Thermo Fisher Scientific Inc.
83. Helbæk, M., *Statistikk for kjemikere*. 2001, Trondheim: Tapir Akademisk Forlag.
84. Tjensvoll, K., et al., *Disseminated tumor cells in bone marrow assessed by TWIST1, cytokeratin 19, and mammaglobin A mRNA predict clinical outcome in operable breast cancer patients*. *Clin Breast Cancer*, 2010. **10**(5): p. 378-84.
85. Nordgard, O., et al., *Quantitative RT-PCR detection of tumor cells in sentinel lymph nodes isolated fra colon cancer patients with an ex vivo approach*. *Ann Surg*, 2009. **249**(4): p. 602-7.
86. de Albuquerque, A., et al., *Multimarker gene analysis of circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: a feasibility study*. *Oncology*, 2012. **82**(1): p. 3-10.
87. National Cancer Institute, U.S., *Cancer Genome Anatomy Project*. 2012, [online database] U.S. National Institute of Health. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

88. NCBI, *KRT8 keratin 8 [Homo sapiens]*. 2012, [online database] [sitert 15. mai 2012] NCBI - Entrez Gene. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
89. NCBI, *KRT19 keratin 19 [Homo sapiens]*. 2012, [online database] [sitert 15. mai 2012] NCBI - Entrez Gene. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
90. NCBI, *EPCAM epithelial cell adhesion molecule [Homo sapiens]*. 2012, [online database] [sitert 15. mai 2012] NCBI - Entrez Gene. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
91. NCBI, *PRSS1 protease, serine 1 (trypsin 1) [Homo sapiens]*. 2012. [online database] [sitert 15. mai 2012] NCBI - Entrez Gene. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
92. NCBI, *MMP11 matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) [Homo sapiens]*. 2012, [online database] [sitert 15. mai 2012] NCBI - Entrez Gene. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
93. Chausovsky, G., et al., *Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung*. Cancer, 1999. **86**(11): p. 2398-405.
94. Z'Graggen, K., et al., *Biological implications of tumor cells in blood and bone marrow of pancreatic cancer patients*. Surgery, 2001. **129**(5): p. 537-46.
95. NCBI, *MUC1 mucin 1, cell surface associated [Homo sapiens]*. 2012, [online database] NCBI, Entrez Gene. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
96. NCBI, *BIRC5 baculoviral IAP repeat containing 5 [Homo sapiens]*. 2012, [online database] NCBI, Entrez Gene.
97. NCBI, *TERT telomerase reverse transcriptase [Homo sapiens]*. 2012, [online database] NCBI, Entrez Gene. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
98. NCBI, *MET met proto-oncogene (hepatocyte growth factor [Homo sapiens])*. 2012, [online database] NCBI - Entrez Gene. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
99. Nordgard, O., et al., *The potential of cytokeratin 20 and mucin 2 mRNA as metastasis markers in regional lymph nodes of colon cancer patients investigated by quantitative RT-PCR*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(3): p. 261-8.
100. Paranjape, T., F.J. Slack, and J.B. Weidhaas, *MicroRNAs: tools for cancer diagnostics*. Gut, 2009. **58**(11): p. 1546-54.
101. Weiland, M., et al., *Small RNAs have a large impact: Circulating microRNAs as biomarkers for human diseases*. RNA Biol, 2012. **9**(6).
102. Yu, M., et al., *Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization*. J Cell Biol, 2011. **192**(3): p. 373-82.
103. Burchill, S.A., I.J. Lewis, and P. Selby, *Improved methods using the reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect tumour cells*. Br J Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 971-7.
104. Pavai, S. and S.F. Yap, *The clinical significance of elevated levels of serum CA 19-9*. Med J Malaysia, 2003. **58**(5): p. 667-72.

105. Sequist, L.V., et al., *The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(3): p. 281-3.
106. Nagrath, S., et al., *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology*. Nature, 2007. **450**(7173): p. 1235-9.

Bilde på forside:

Kreftcelle fotografert med elektronmikroskop (Balzer, E. 2012 [nettside][sitert 7. september 2012]; tilgjengelig fra:

<http://gpilsinside.umaryland.edu/Lists/Students/DispForm.aspx?ID=442>)

Liste over figurer

- Figur 1: Illustrasjon av bukspyttkjertelen og dens nærliggende organer. Figuren er laget basert på figurer fra Kreftforeningens nettside og Oncolox [2, 8]. .. 11
- Figur 2: Illustrasjon over hvordan sirkulerende tumorceller (STC) oppstår fra en primærsvulst og forårsaker metastase i vev et annet sted i kroppen. Figuren er modifisert fra figur i boka ”Molecular Biology of the Cell” (Alberts, 2002) [23]. 14
- Figur 3: Modifisert oversiktsfigur over Lymphoprep-metoden for isolering av MC (mononukleært cellemateriale), basert på figur fra Lymphoprep-protokoll utgitt av leverandør (Axis-Shield). [48] Blodprøven fortynnes 1:1 med fysiologisk saltvann som avsettes forsiktig over Lymphoprep™. Etter sentrifugering foreligger MC-materialet adskilt fra resten av blodcellene ovenpå Lymphoprep™ som så kan avpipetteres [48]. 28
- Figur 4: Illustrasjon av telleflaten i Bürker tellekammer og hva som utgjør en A-celle (t.v), samt hvordan man teller celler innad i én A-celle (t.h). Her teller man kun cellene som er markert sort, mens cellene markert grå ikke skal telles. 30
- Figur 5 : Oversikt over prosedyren for isolering av RNA, DNA, protein og miRNA/småRNA. Modifisert fra figur oppgitt i prosedyren fra kittet: ”AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Handbook” (Qiagen) [53]. 31
- Figur 6: Oversikt over spektrofotometrisk analyse av RNA ved NanoDrop™ 2000c (modifisert fra figur fra instrumentprotokoll fra Thermo Scientific) [56]. Prøvemateriale avsettes på nedre optiske plattform (1), og absorbanse måles i væskesøylen som dannes mellom de optiske flatene (2). Lyskilden er en xenon lampe som sørger for lysstråle med ulike bølgelengdene, og CCD-detektoren (charged-coupled device) sørger for effektiv avlesning av absorbanse [56]. 32
- Figur 7: Elektroferogrammet viser total RNA fra vellykket analyse ved bruk av Agilent RNA 6000 Nano Kit. Figuren er fra protokollen utgitt av leverandør (Agilent Technologies). [63] 33
- Figur 8: Elektroferogrammet viser total RNA fra en vellykket analyse ved bruk av Agilent Small RNA Kit. Den viser to inndelte områder, ett for små RNA (0-150 nt) og ett for miRNA (10-40 nt), samt én lav topp for markøren. I miRNA-regionen sees tilstedeværelsen av miRNA som en liten, slak topp. Figuren er fra protokollen utgitt av leverandør (Agilent Technologies). [64] 34
- Figur 9: Eksempel på amplifiseringskurve (t.v.) og smeltekurve (t.h.) over en real time qPCR analyse av to prøver analysert i parallell for én biomarkør. Basert på amplifiseringskurven har de to prøvene, A og B, henholdsvis $C_q=15$ og $C_q=23$. Dette tilsier at prøve A inneholder $2^{(23-15)} = 512$ ganger mer av biomarkøren enn prøve B. Smeltekurven viser at begge prøvene har dannet samme PCR-produkt ved at de har samme smeltepunkt ($T_m \approx 83^\circ\text{C}$). I både amplifiserings- og smeltekurven sees positive NTC (no template control) som grønne kurver og baselinjen som en klar blå strek (satt til 800 dR). 37

- Figur 10: Oversikt over kjedeterminerende Sanger-metode for sekvensering av PCR-produkt. Sekvenseringsreaksjonen lager komplementære kopier av PCR-produktet, som v.h.a. kjede-terminerende fluoressensmerket ddNTP dannes i alle mulige lengder. Nukleotidsekvensen kan dermed fastsettes v.h.a. kapillærelektroforesen og fluorescensdeteksjon [22, 77, 78]. Illustrasjonen av sekvenseringsreaksjonen er modifisert fra bilde tatt av filmklippet ”DNA Test Methods – DNA Sanger Sequencing” av PHG Foundation [79]. 41
- Figur 11: Restriksjonsenzymet PvuII kutter dobbeltrådet DNA som har denne sekvensen. 43
- Figur 12: Oversikt over metodene benyttet og det praktiske laboratoriearbeidet utført. 48
- Figur 13: Amplifiserings- og smeltekurve fra qPCR analyse av biomarkøren CEACAM6 for cellelinjene AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt normalt blod (norm.bl.) og NTC (no template control). Smeltekurven angir 83°C som omtrentlig smeltepunkt av PCR-produktet..... 50
- Figur 14: Amplifiserings- og smeltekurve fra qPCR analyse av biomarkøren CK8 for cellelinjene AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt normalt blod (norm.bl.) og NTC (no template control). Smeltekurven angir 88°C som omtrentlig smeltepunkt av PCR-produktet..... 50
- Figur 15: Amplifiserings- og smeltekurve fra qPCR analyse av biomarkøren PRSS1 for cellelinjene AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt normalt blod (norm.bl.) og NTC (no template control). Smeltekurven angir 86°C som omtrentlig smeltepunkt av PCR-produktet..... 51
- Figur 16: Amplifiserings- og smeltekurve fra qPCR analyse av biomarkøren MMP11 for cellelinjene AsPC-1, BxPC-3 og PANC-1, samt normalt blod (norm.bl.) og NTC (no template control). Smeltekurven angir 88°C som omtrentlig smeltepunkt av PCR-produktet..... 51
- Figur 17: Gelbilde fra gelelektroforese av PCR-produkt for de nye potensielle biomarkørens qPCR-oppsett. Størrelsesindikatoren ”100 bp DNA ladder” (Promega), kalt l-100, er avsatt helt til venstre på gelen, og antall basepar (bp) som hvert bånd tilsvarer i størrelse er angitt her..... 52
- Figur 18: Eksempel på kurve over amplifiseringseffektivitet for en av analysene til CEACAM6 fremstilt av programvaren til PCR-instrumentet Mx3000P. Det oppgis effektivitet = 98,6%, som tilsvarer E-verdi = 1,99, og R²-verdi = 0,996. 54
- Figur 19: Grafisk presentasjon av datamateriale fra tabell 18, som viser forholdet av differansen mellom C_q i normal blod og C_q i cellelinjen for hver av de tre cellelinjene; AsPC-1, PANC-1 og BxPC-3 for alle potensielle biomarkører. Eventuelle ”No C_q”-verdier er erstattet med verdien 40..... 56
- Figur 20: Barplott over standardrekkenes relative mRNA nivå for biomarkørene CEACAM5, CK19, EPCAM og CK8, fratrukket nivå i 0-prøven. Feilbarer er basert på ensidig konfidensintervall tilknyttet de fire målingene av hver standard. Trendlinjen er eksponentiell og tilhørende likning og R²-verdi er oppgitt. 57
- Figur 21: Resultat for prøven RNA 1 analysert på Agilent 2100 bioanalyser med kittet RNA 6000 Nano. Det presenteres i form av et elektroferogram (t.v.) og

gel-liknende bilde (t.h.) produsert av programvaren til instrumentet. I resultatfremstillingen av det gel-liknende bilde er andre prøver analysert samtidig manuelt klippet bort i etterkant av analysen.....	59
Figur 22: Resultat for prøven miRNA 3 analysert på Agilent 2100 bioanalyser med kittet Small RNA. Det presenteres i form av et elektroferogram (t.v.) og gel-liknende bilde (t.h.) produsert av programvaren til instrumentet. I resultatfremstillingen av det gel-liknende bilde er andre prøver analysert i samme brikke manuelt klippet bort i etterkant av analysen.	59
Figur 23: Oversikt over eksperimentet ”Holdbarhetstest av EDTA-blod”. MC = mononukleære celler.....	60
Figur 24: Grafen viser gjennomsnittelig konsentrasjonen av RNA isolert (ng/μl) for hvert prøvedøgn. Feilbarer for hvert punkt viser til konfidensintervallet for de fire parallellene som inngår i gjennomsnittsverdien.	61
Figur 25: Grafen viser gjennomsnittelig målte RNA kvalitet i RIN-verdi for hvert prøvedøgn. Feilbarer for hvert punkt viser til konfidensintervallet for de fire parallellene som inngår i gjennomsnittsverdien. RIN-skalaen rangerer kvalitet mellom 1-10, hvor 1 indikerer dårligst målbare RNA kvalitet.	61
Figur 26: Barplott som viser prosentvis reduksjon av RNA konsentrasjon (ng/μl) og RIN-verdi for hvert prøvedøgn sammenlignet med 0 timers henstand...	62
Figur 27: Fremgangsmåte for sammenligning av Lymphoprep- og RBC lysis buffer metode.....	64
Figur 28: Gelbilde av PCR-produktet til biomarkøren CEACAM6 i hel og PvuII-fordøyd tilstand, analysert ved 2% agarose gelelektroforese. Den positive CK19-kontrollen er analysert parallelt, og består av helt og PvuII-fordøyd PCR-produkt fra biomarkøren CK19. På hver side av prøvemateriale er det satt opp en størrelsesindikator, kalt l-25 (”25 bp DNA Step ladder”, Promega) helt til venstre i gelen, og antall basepar (bp) som hvert bånd tilsvarer i størrelse er angitt her. De grønne firkantene i midten av bildet er laget for å vise områdene hvor båndene ble observert under bildetakning av gelen, ettersom de ellers var lite synlige ved bildeformatering for bruk i oppgaven.....	98

Liste over tabeller

Tabell 1: Oversikt over cellelinjene benyttet til oppgaven.	19
Tabell 2: Oversikt over kjemikalier og reagenser benyttet til oppgaven.	20
Tabell 3: Oversikt over cellekulturmedium og –reagenser benyttet til oppgaven.	22
Tabell 4: Oversikt over nye primere til studien.	23
Tabell 5: Oversikt over tidligere etablerte primere benyttet i oppgaven.	24
Tabell 6: Oversikt over kit benyttet i oppgaven.	24
Tabell 7: Oversikt over instrumenter benyttet i oppgaven.	25
Tabell 8: Oversikt over cellelinjer dyrket, oppgitt med spesifikasjoner for dyrkningsforhold fra ECACC-skjema for cellelinjene [40-43].	27
Tabell 9: Oversikt over endelig konsentrasjon ([final] mM) og volum reagens pr. reaksjon (reak.) for biomarkørene; BCR, CEACAM-5, CK-19 og EPCAM, samt startforhold for etablering av nye biomarkører; CEACAM6, CK8, PRSS1 og MMP11. R = revers, F = forover.	38
Tabell 10: Analyseprogram for real time qPCR.	39
Tabell 11: Reagensforhold for sekvenseringsreaksjon av PCR-produkt.	42
Tabell 12: Programinnstilling for sekvenseringsreaksjon.	42
Tabell 13: Oversikt over de beste primersettene funnet for hver biomarkør sammen med reagensforholdene som gir mest optimale qPCR-oppsett for disse. Per reaksjon er forkortet pr. r.	49
Tabell 14: Oversikt over resultatet fra blast-søk for sekvensering av biomarkørene CK8, PRSS1 og MMP11, samt oppgitte maksimale identitetsprosent for både forover (F) og revers (R) primer til hver biomarkør. Sekvensene som var utgangspunkt for blast-søket er oppgitt i vedlegg 2.	53
Tabell 15: Oversikt over kjente antall basepar (bp) for ufordøyd og fordøyd PCR- produkt av CEACAM6-B og CK19, samt resultat observert ved agarose gelelektroforese av disse produktene. For modifisert gelbilde av resultatet se vedlegg 3.	53
Tabell 16: Oversikt over gjennomsnittelige E- og R ² -verdier, samt antall målinger som inngår i disse (n), standardavviket (s) og variasjonskoeffisienten (CV%) for de nye biomarkørene (CEACAM6, CK8, MMP11 og PRSS1)	55
Tabell 17: Oversikt over gjennomsnittelige E- og R ² -verdier, samt antall målinger som inngår i disse (n), standardavviket (s) og variasjonskoeffisienten (CV%) for de tidligere etablerte biomarkørene (CEACAM5, CK19 og EPCAM).	55
Tabell 18: C _q -verdier fra qPCR av normal blod og cellelinjene fra bukspyttkjertelkreft (AsPC-1, PANC-1 og BxPC-3) for alle de potensielle biomarkørene.	56
Tabell 19: Kvalitetsresultat i form av RIN-verdier for fire parallelt isolerte RNA prøver med AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit. Det er også oppgitt gjennomsnittelig RIN-verdi mellom parallellene, samt standardavvik (s) og variasjonskoeffisienten (CV%) for disse.	58

Tabell 20: Resultat av miRNA konsentrasjon i pg/ μ l for to parallelt isolerte miRNA prøver. Det er også oppgitt gjennomsnittelig konsentrasjon i pg/ μ l mellom parallellene, samt beregnet prosentavvik mellom disse.....	58
Tabell 21: Oversikt over resultatet fra "test for tap av mononukleære celler" (MC). Manuell metode innebærer Lymphoprep-metoden og påfølgende celletelling, og maskinell metode innebærer helautomatisk celletelling v.h.a. Sysmex-instrument.	63
Tabell 22: Oversikt over resultatet fra telling av enkeltceller og celleklumper før og etter isolering med Lymphoprep-metoden med beregnet gjenfinningsprosent.	63
Tabell 23: Resultat fra RNA konsentrasjonsmålinger i eksperimentet for sammenligning av Lymphoprep- og RBC lysis buffer metode.....	65
Tabell 24: Oversikt over RNA konsentrasjon analysert for hver prøve med tilhørende A_{260}/A_{280} -ratio tilhørende eksperimentet "Holdbarhetstest av EDTA-blod". Det oppgis også beregnet gjennomsnitt av konsentrasjonen for prøvene innenfor hvert henstandsdøgn (\bar{x}) med konfidensintervall (ensidig, $P=0,05$, $n=4$), standardavvik (s) og variasjonskoeffisienten (CV%).	95
Tabell 25: Oversikt over RNA kvalitet i form av RIN-verdier analysert for hver prøve tilhørende eksperimentet "Holdbarhetstest av EDTA-blod". Det oppgis også beregnet gjennomsnitt av RIN-verdiene for prøvene innenfor hvert henstandsdøgn (\bar{x}), med konfidensintervall (ensidig, $P=0,05$, $n=4$), standardavvik (s) og variasjonskoeffisienten (CV%).	96
Tabell 26: Oversikt over sekvenseringsresultat mottatt av sekvenserte PCR-produkt fra sekvenseringslaboratoriet ved Universitetet i Bergen (UiB). Prøvenavnet innebærer primersett benyttet for dannelsen av PCR-produkt, etterfulgt av F eller R avhengig av forover (F) eller revers (R) primer i reaksjonen. I sekvensen oppgir sekvenseringslaboratoriet bokstaven N der hvor de ikke kunne fastslå nukleotidtype.	97

Vedlegg

Vedlegg 1

Tabell 24: Oversikt over RNA konsentrasjon analysert for hver prøve med tilhørende A_{260}/A_{280} -ratio tilhørende eksperimentet "Holdbarhetstest av EDTA-blod". Det oppgis også beregnet gjennomsnitt av konsentrasjonen for prøvene innenfor hvert henstandsdøgn (\bar{x}) med konfidensintervall (ensidig, $P=0,05$, $n=4$), standardavvik (s) og variasjonskoeffisienten (CV%).

Prøve	Målt RNA konsentrasjon		Gj.snitt prøvedøgn (\bar{x})	Konfidensintervall	Standardavvik (s)	CV
	ng/ul	A_{260}/A_{280}	ng/ul	ng/ul		%
EDTA-0, 1a	58,7	2,04	59,8	$\pm 3,7$	3,17	5,3
EDTA-0, 1b	64,4	2,03				
EDTA-0, 2a	58,6	2,06				
EDTA-0, 2b	57,3	2,02				
EDTA-24, 1a	54,6	2,06	59,7	$\pm 4,1$	3,49	5,8
EDTA-24, 1b	60,6	2,01				
EDTA-24, 2a	62,6	2,05				
EDTA-24, 2b	60,8	2,02				
EDTA-48, 1a	56,1	2,06	54,6	$\pm 12,8$	10,88	19,9
EDTA-48, 1b	69,3	2,03				
EDTA-48, 2a	47,4	2,07				
EDTA-48, 2b	45,4	2,05				
EDTA-72, 1a	25,6	2,06	35,8	$\pm 9,5$	8,10	22,6
EDTA-72, 1b	34,8	2,06				
EDTA-72, 2a	37,5	2,05				
EDTA-72, 2b	45,2	2,05				
EDTA-96, 1a	31,9	2,06	30,1	$\pm 4,4$	3,76	12,5
EDTA-96, 1b	34,6	2,05				
EDTA-96, 2a	27,5	2,05				
EDTA-96, 2b	26,6	2,02				

Tabell 25: Oversikt over RNA kvalitet i form av RIN-verdier analysert for hver prøve tilhørende eksperimentet ”Holdbarhetstest av EDTA-blod”. Det oppgis også beregnet gjennomsnitt av RIN-verdiene for prøvene innenfor hvert henstandsdøgn (\bar{x}), med konfidensintervall (ensidig, $P=0,05$, $n=4$), standardavvik (s) og variasjonskoeffisienten (CV%).

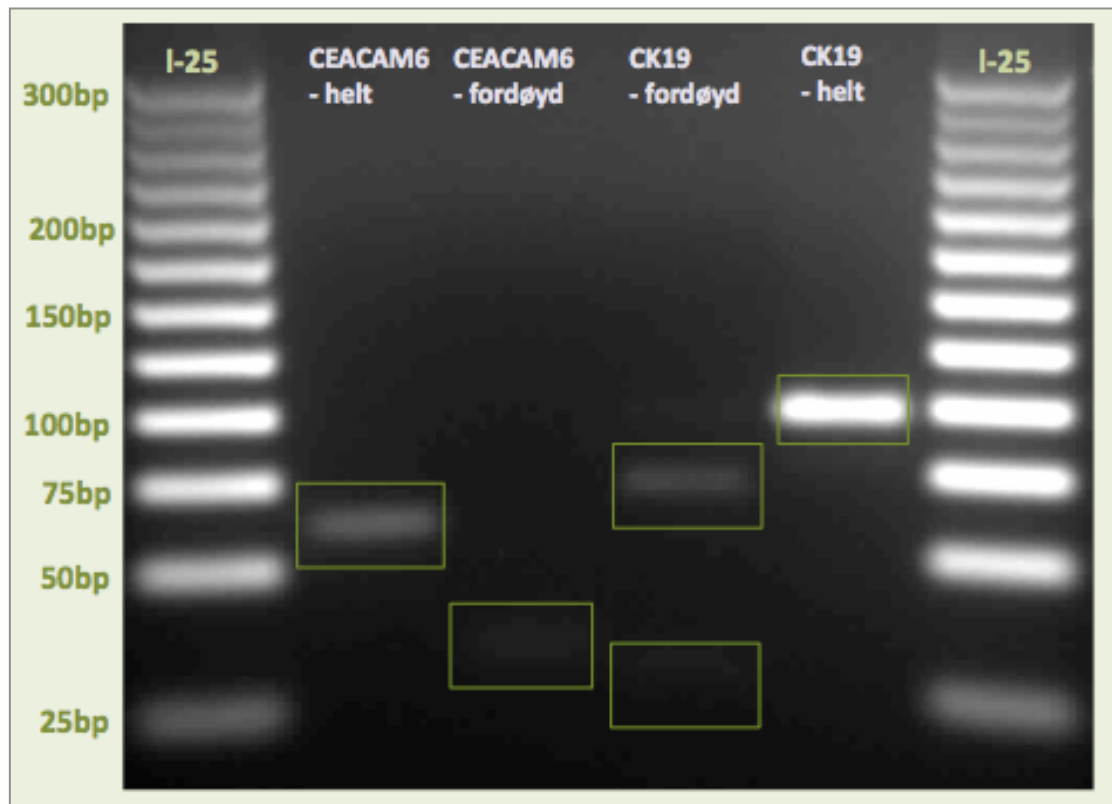
Prøve	Målt RIN-verdi	Gj.snitt RIN pr. prøvedøgn (\bar{x})	Konfidensintervall (RIN)	Standardavvik (s)	CV%
EDTA-0, 1a	8,7	8,1	$\pm 0,6$	0,55	6,8
EDTA-0, 1b	7,6				
EDTA-0, 2a	8,3				
EDTA-0, 2b	7,6				
EDTA-24, 1a	8,5	8,2	$\pm 0,6$	0,53	6,5
EDTA-24, 1b	7,6				
EDTA-24, 2a	8,7				
EDTA-24, 2b	7,8				
EDTA-48, 1a	7,3	7,0	$\pm 0,4$	0,32	4,5
EDTA-48, 1b	6,9				
EDTA-48, 2a	7,2				
EDTA-48, 2b	6,6				
EDTA-72, 1a	6,7	6,5	$\pm 0,2$	0,18	2,8
EDTA-72, 1b	6,4				
EDTA-72, 2a	6,6				
EDTA-72, 2b	6,3				
EDTA-96, 1a	6,3	6,2	$\pm 0,4$	0,30	4,8
EDTA-96, 1b	5,9				
EDTA-96, 2a	6,6				
EDTA-96, 2b	6,1				

Vedlegg 2

Tabell 26: Oversikt over sekvenseringsresultat mottatt av sekvenserte PCR-produkt fra sekvenseringslaboratoriet ved Universitetet i Bergen (UiB). Prøvenavnet innebærer primersett benyttet for dannelse av PCR-produkt, etterfulgt av F eller R avhengig av forover (F) eller revers (R) primer i reaksjonen. I sekvensen oppgir sekvenseringslaboratoriet bokstaven N der hvor de ikke kunne fastslå nukleotidtype.

Prøvenavn	Sekvensresultat mottatt fra eksternt sekvenseringslaboratorium
CEACAM6-B, F	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNANNANTGGANNNTNNNNN ANANNNNNNNNNNNNCCNNCNNNNNNNNCACCNNNN
CEACAM6-B, R	NNNNNNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANACNNNTNNGGGN NGNNGGCGNNGGNCATGACNNNNNNNNCNANNCNGGC
CK8-F, F	NNNNNNNNANTTGTGTGTTGAGGGTCTTGATCTGCTCCTTCTCCTGGGTG CGCACGGCCTGGATGTTGGGGTCCACCTCCAGGACAAGGGGGCTCAGCAG GCTCTGGTTGACCGTAACTGCGGTGATGCCTCCNNTNNNNNNNACAATT AAACAGCATGCATTGAACTGAAAAGATAACTGAGAAAATGAAAGCTCNN NCTGNATTCCAAAA
CK8-F, R	NNNNNNNNNNGCTGNNNCNNTTGNNNGGANGNGGANCCCAACATCCA GGCCGTGCGCACCCAGGAGAAGGAGCAGATCAAGACCTCAACAACAAGT TTGCCTCCTTCATAGACAAGGTACGGTTCCTGGAGCANNNNNNNNNN
PRSS1-D, F	NNNNNNNNNNNNGGNNANCANNNTCGAAGTCCTGGAGGGGAANGAG CAGTTCATCAATGCAGCCAAGATCATCCGCCACCCCAATACGACAGGAA GACTCTGAACAATGACATNNNNNNNTNNN
PRSS1-D, R	NNNNNNNNNNNNNNGGAGNNNTGGCTGCATTGANGAACTGCTCATTC CCCTCCAGGACTTCGATGTTGTGCTCTCCAGTCTCACCTGGATGCGGGA CTTGATAGCAGTGGCCTGCTNNNNNNGGNNGNN
MMP11-B, F	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNANCTCACCTACAGGANCTTCGGTTC CCATGGCAGTTGGTGCAGGAGCAGGTGCGGCAGACGATGGCAGAGGCCCT AAAGGTATGGAGNNNNNNNNNAN
MMP11-B, R	NNNNNNNNNNNCNNNTGNNNNGCACCAACTGCNATGGGAACCGAAGG ANCCTGTAGGTGAGGTCCGTCTTCTCCAGCGCCCGCCAGAAAGCACGAA CCTCTTCTGTCGGTTGCGGANANNANNNNNANN

Vedlegg 3



Figur 28: Gelbilde av PCR-produktet til biomarkøren CEACAM6 i hel og PvuII-fordøyd tilstand, analysert ved 2% agarose gelelektroforese. Den positive CK19-kontrollen er analysert parallelt, og består av helt og PvuII-fordøyd PCR-produkt fra biomarkøren CK19. På hver side av prøvemateriale er det satt opp en størrelsesindikator, kalt I-25 (”25 bp DNA Step ladder”, Promega) helt til venstre i gelen, og antall basepar (bp) som hvert bånd tilsvarer i størrelse er angitt her. De grønne firkantene i midten av bildet er laget for å vise områdene hvor båndene ble observert under bildetakning av gelen, ettersom de ellers var lite synlige ved bildeformatering for bruk i oppgaven.