

Effekt av legemidler på metyleringsmønsteret til Karboksylesterase- genen

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Tuyet Xuan Thi Tran

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk- naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Avdeling for farmakologi og medisinsk biokjemi

Oslo universitetssykehus, Ullevål

Mai 2015

Effekt av legemidler på metyleringsmønsteret til Karboksylesterase-genet

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Tuyet Xuan Thi Tran



Mai 2015

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk- naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITET I OSLO

Avdeling for farmakologi og medisinsk biokjemi

Ullevål sykehus

Veiledere

Marianne K. Kringen

Kari Bente Foss Haug

Hege Thoresen

© Tuyet Xuan Thi Tran

2015

Effekt av legemidler på metyleringsmønsteret til Karboksylesterase- genen

Tuyet Xuan Thi Tran

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Representeren, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmakologi og Avdeling for Medisinsk Biokjemi ved Ullevål sykehus, i perioden august 2014 til mai 2015. Jeg vil gjerne rekke en stor takk til mine eksterne veiledere Marianne K. Kringen og Kari Bente Foss Haug for god oppfølging og rådgivning gjennom hele masteroppgaven. Jeg vil også rekke en stor takk til Hege Gilbø Bakke som har vært en super veileder på laben og hjulpet meg mye med det tekniske, samt veiledet meg gjennom flere av metodene som ble utført på laben. Til tross for alle problemene og frustrasjonene underveis i oppgaven har dette vært en veldig lærerik periode hvor jeg har fått tilegnet meg mye spennende kunnskap og mye nyttige erfaringer. Jeg vil takke for all tålmodighet og tid dere har ofret for tilretteleggelse av masteroppgaven min, og ikke minst for alt omsorg og oppmuntring jeg har fått av alle fra resten av avdelingen. En stor takk rekkes også til min interne veileder Hege Thoresen for god oppfølging, og som har sørget for at masterperioden har blitt utført på en oppriktig måte.

Jeg vil takke kull 2015 for fem råde og uforglemmelige år sammen. Det blir trist å forlate den koselige tiden sammen, men gode minner kommer og forblir. En spesiell takk til mine farmasi-jenter for et godt vennskap med mye latter, minner og spennende og morsomme opplevelser under den lange studietiden. Farmasistudien hadde ikke vært den samme uten dere.

Sist men ikke minst vil jeg takke familien og mine nærmeste for all den støtten de har gitt og at de bestandig har stilt opp for meg. Det har betydd utrolig mye.

Ullevål, mai 2015

Tuyet Xuan Thi Tran

Abstract

Introduction: Carboxylesterases are a multigene family of enzymes which are found widespread in a large part of the human body, where they catalyze the hydrolysis of a number of endogenous and exogenous substances, including a great number of important drugs. It has been shown that genetic variation in *CES1* and *CES2* genes may be associated with different drug responses in individuals, which can contribute to either loss of efficacy of the drug or side effects to the patient. Irinotecan is an antineoplastic prodrug used in the treatment against colorectal cancer. It is converted to its active metabolite SN-38 by *CES1* and *CES2*. Earlier studies have shown that the use of drugs can affect the methylation pattern of different genes. In this assignment, a HepG2 cell line was used as an *in-vitro* model to investigate the changes in promoter- methylation and mRNA expression of *CES1*, *CES2* and *UGT1A1*. The question we wanted answered was if Irinotecan itself can lead to loss of efficacy in some patients, through the change in methylation pattern and altered gene expression.

Methods: A HepG2- cell line was grown in medium and stimulated with four concentrations of Irinotecan (0 μM , 0.3 μM , 3 μM and 30 μM). Forty- eight hours after stimulation, the cells were investigated in the microscope for changes in cell morphology and cell mortality. Moreover DNA and RNA were isolated separately. DNA was used in the pyrosequencing for the investigation of gene promoter- methylation. Before pyrosequencing, the DNA samples were bisulphite treated and PCR amplified with *CES/UGT*- specific primers. Reverse transcription quantitative PCR (RT -qPCR) was used to investigate the gene expression of the various genes. The ddCq values were calculated and normalized to selected reference genes, and the significant changes in the gene expression between the samples were determined.

Results: Pyrosequencing showed no significant changes in the methylation pattern in either of the various genes. *CES1* and *CES2* showed a low degree of methylation, while *UGT1A1* proved to be almost entirely methylated in HepG2 cells. RT- qPCR revealed significant changes in gene expression in *CES2* for all the three concentrations of Irinotecan compared to the zero sample. For the *CES1* and the *UGT1A1* the significant changes observed was minor. All the significant changes showed an upregulation in gene- expression.

Discussion and conclusion: Drug stimulation with Irinotecan in HepG2- cells resulted in a significant change in the level of gene transcription in *CES1*, *CES2* and *UGT1A1*. The change was showed to be greatest in *CES2*, and less extensive in *CES1* and *UGT1A1*. No change was found for the methylation pattern in either of the genes after stimulation with Irinotecan, and there were also no association between the change in the methylation pattern and the level of gene transcription. Irinotecan have a negative effect on the HepG2- cells, where stimulation with this drug gave a change in cellmorphology and an increase celldeath. Several studies are needed for a better understanding of the methylation pattern of the *CES*- and *UGT1A1*- genes.

Sammendrag

Innledning: Karboksylesterase er en type mammalske enzymer som finnes utbredt i store deler av kroppen, hvor de er med på å hydrolysere en rekke endogene og eksogene substanser, inkludert en rekke viktige legemidler. Det er vist at genetisk variasjon i CES1 og CES2- genene kan være assosiert med ulik legemiddelrespons og bidra til enten dårligere legemiddeleffekt eller bivirkninger hos pasienter. Irinotecan er et cytostatikum som blir brukt til behandlingen av blant annet avansert kolorektalkreft, hvor det gjennom CES1 og CES2 blir omdannet til dens aktive metabolitt SN-38. Det er tidligere vist at bruk av legemidler kan påvirke metyleringsmønsteret hos ulike gener. I denne oppgaven ønsket vi derfor å undersøke Irinotecans effekt på promotor- metyleringen og mRNA transkripsjonen til CES1, CES2 og UGT1A1 ved hjelp av *in vitro*- studier av levercellekulturer (HepG2). Vi ønsket å finne ut om Irinotecan i seg selv kan føre til redusert legemiddelrespons (resistens) ved å forandre metyleringsmønsteret og ekspresjonen til disse genene.

Metode: HepG2- cellelinjer ble sådd ut i medie og stimulert med Irinotecan, hvor det ble brukt fire ulike konsentrasjoner (0 μM , 0.3 μM , 3 μM og 30 μM). Førti-åtte timer etter celle-stimulering ble cellene studert i mikroskop hvor cellemorfologi og celledødelighet ble studert og tolket. Videre ble DNA og RNA isolert ut hver for seg. DNA ble brukt til pyrosekvensering for å studere promotor- metyleringen til de ulike genene. Før selve pyrosekvenseringen ble prøvene bisulfitt behandlet, og PCR- amplifisert med CES/UGT- spesifikke primere. Metoden revers transkripsjon kvantitativ PCR (RT- qPCR) ble brukt på RNA for å studere genekspresjonen til de ulike genene. ddCq- verdiene ble utregnet (normalisert med ulike referansegener) og signifikante forandringer i genekspresjon mellom prøvene ble bestemt.

Resultater: Pyrosekvensering viste ingen signifikante endringer i metyleringsmønsteret hos noen av de studerte genene. CES1 og CES2 viste lav grad av metylering, mens UGT1A1 viste seg å være nesten fullstendig metylert i HepG2- celler. RT- qPCR viste signifikant økt genekspresjonen hos CES2 ved alle de tre ulike konsentrasjonene i forhold til nullprøven. Hos CES1 og UGT1A1 ble det observert mindre signifikante endringer, kun en moderat økning.

Diskusjon og konklusjon: Legemiddelstimulering med Irinotecan hos HepG2- celler gav en økt gentranskripsjon av CES1, CES2 og UGT1A1. Endringen var størst hos CES2 og litt mindre omfattende hos CES1 og UGT1A1. Ingen forandring ble funnet i metyleringsmønsteret hos de ulike genene etter legemiddelstimulering, og det var heller ingen assosiasjon mellom endring i metyleringsmønster og gentranskripsjonsnivå i disse genene. Irinotecan har en negativ effekt på HepG2- celler hvor stimulering med dette legemidlet gav en endring i cellemorfologi og økt celledødelighet. Flere studier er nødvendig for å få en bedre forståelse på metyleringsmønsteret hos CES- og UGT1A1- genene.

Forkortelser

18S	18s ribosomal RNA
5- FU	5-Fluorouracil
A	Adenine
APC	7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
C	Cytosine
cDNA	Complementary DNA
CES1	Carboxylesterase 1
CES2	Carboxylesterase 2
CpG	Cytosine-phospho-guanine
CPT-11	Camptothecin-11, (Irinotecan)
Cq	Quantification cycle
Ct	Threshold cycle
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
dATPαs	Deoxyadenosine triphosphate α fas
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
ddCq	delta delta Cq
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNMT	DNA methyltransferase
DNA	Deoxyribonucleic acid
E- mix	Enzyme-mix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol

FBS	Fetal bovine serum (kalveserum)
G	Guanine
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GUSB	Glucuronidase beta
IL-6	Interleukine- 6
MgCl₂	Magnesium chloride
miRNA	MikroRNA
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPIB	Peptidylprolyl isomerase B
PSG	Penicillinstreptomycinglutamine
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rounds per minute
RT- qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
RT- steget	Reverse transkripsjon- steget
S- mix	Substrate- mix
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin
SN-38G	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin glucuronide
T	Thymine
TBP	TATA-box binding protein
U	Uracil
UGT1A1	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 1A1
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar

Innholdsfortegnelse

Forord	V
Abstract	VI
Sammendrag	VIII
Forkortelser	X
1 Innledning	1
1.1 Farmakokinetikk.....	1
1.2 Farmakodynamikk.....	2
1.3 Farmakogenetikk.....	3
1.4 DNA og dets oppbygning.....	3
1.4.1 Cellesyklus og celledeling.....	4
1.5 Epigenetikk.....	5
1.5.1 DNA- metylering.....	6
1.5.2 Histonmodifisering.....	6
1.5.3 MikroRNA.....	6
1.6 Karboksylesterase (CES).....	7
1.7 Irinotecan.....	9
1.8 PCR.....	11
1.9 Mål for masteroppgaven.....	13
2 Materialer og metoder	14
2.1 Materialer.....	14
2.1.1 Kjemikaler og reagenser.....	14
2.1.2 Utstyr.....	16

2.2	Metoder.....	17
2.2.1	HepG2- celler som et modellsystem.....	17
2.2.2	Celledyrkning.....	16
2.2.3	Splitting av celler.....	18
2.2.4	Celletelling.....	19
2.2.5	Cellestimulering.....	19
2.2.6	Observasjon i mikroskop.....	21
2.2.7	Isolering av DNA og RNA.....	21
2.2.8	Kvantifisering av DNA og RNA.....	22
2.2.9	RT- qPCR.....	22
2.2.9.1	Testing av referansegener til bruk ved qPCR.....	24
2.2.9.2	cDNA syntese.....	26
2.2.9.3	Kvantitativ real time PCR, Real time qPCR.....	29
2.2.9.4	Kalkulering av ekspresjonsdata.....	32
2.2.9.5	PCR- Effektivitetstesting.....	32
2.2.10	Pyrosekvensering.....	34
2.2.10.1	Primer og primerdesign.....	35
2.2.10.2	Testing av primere.....	36
2.2.10.3	Bisulfitt-behandling av DNA.....	37
2.2.10.4	PCR- amplifisering.....	39
2.2.10.5	Pyrosekvensering.....	40
2.2.11	Agarose- gelelektroforese.....	43
3	Resultater.....	44
3.1	Observering av cellene i mikroskopet.....	44
3.2	Kvantifisering av DNA og RNA.....	45
3.3	Real time- qPCR.....	46

3.3.1	PCR- effektivitetstesting.....	50
3.4	Pyrosekvensering.....	51
4	Diskusjon.....	55
4.1	Prøveopparbeidelsen.....	55
4.2	Valg av metoder.....	56
4.2.1	RT-qPCR og Pyrosekvensering.....	56
4.2.2	Valg av Irinotecans konsentrasjoner til cellestimulering..	57
4.2.3	HepG2- celler som in- vitro modellsystem.....	57
4.3	Valg av target- og referansegener.....	58
4.3.1	Targetgenene.....	58
4.3.2	Referansegenene.....	58
4.4	Forandring i morfologi og celledødelighet.....	59
4.5	mRNA transkripsjonsforandringer ved RT- qPCR.....	60
4.6	Promotor- metyleringsforandringer ved pyrosekvensering...	61
4.7	Sammenheng mellom metyleringsmønster og gentranskripsjon.....	62
4.8	Metodologiske utfordringer.....	63
4.9	Veien videre.....	63
5	Konklusjon.....	64
6	Litteraturliste.....	65
7	Vedlegg.....	70

1 Innledning

1.1 Farmakokinetikk

Fra legemidlet kommer inn i kroppen og utøver sin virkning, gjennomgår det flere ulike prosesser før det igjen går ut av kroppen. En fellesbetegnelse på disse prosessene er *farmakokinetikk* og består av absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon.

Opptaket av et legemiddel kan skje enten fra tarmen (peroralt) eller utenfor tarmen (parenteralt). Absorpsjonen av et legemiddel er blant annet avhengig av legemidlets størrelse, lipidløselighet og av absorpsjonsstedets egenskaper. Absorpsjonen øker med økende lipidløselighet, noe som vil si at jo mer fettløselig et legemiddel er, jo lettere blir det absorbert i kroppen. Flere legemidler er dårlig løselig i kroppen, og det blir derfor laget et prodrug av legemidlet som er i en mer fettløselig form. Prodrugget blir deretter omdannet til dets aktive form i kroppen, hvor enzymer spiller inn som en viktig rolle.

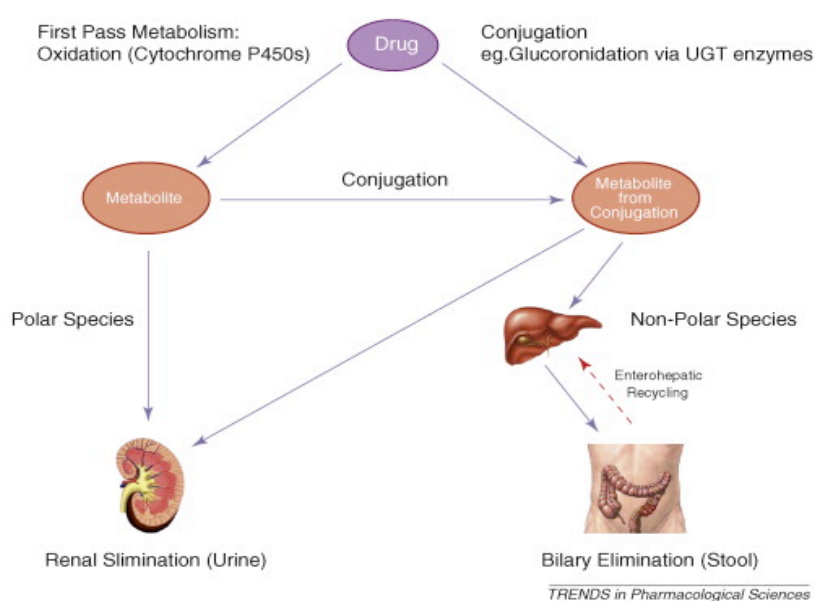
Distribusjon er fordeling av legemidlet mellom de ulike vevene i kroppen hvor legemidlet får utøvet sin effekt. Dette skjer hovedsakelig ved passiv diffusjon, og hastigheten bestemmes av legemiddelmolekylets størrelse, lipidløselighet, ioniseringsgrad, konsentrasjonen i blodet og blodgjennomstrømmingen i vevet. Distribusjonsvolumet beskriver forholdet mellom mengde legemiddel som er i kroppen versus plasmakonsentrasjonen. (1)

Det er bare fritt (ubundet) legemiddel som kan krysse biologiske membraner og utøve sin farmakologiske effekt. Legemidler som er bundet til proteinmolekyler i blodet vil her ikke kunne gi noe effekt. (2) Lipidløselige legemidler må først bli omdannet til vannløselige substanser før de kan bli skilt ut av kroppen. Dette skjer hovedsakelig i leveren hvor legemidlene blir metabolisert og inaktivert. Metaboliseringen kan deles inn i to hovedtyper: fase 1- metabolisme og fase 2- metabolisme. Ved fase 1- metabolisme skjer det en kjemisk omdannelse ved hjelp av hydroksylering og demetylering, mens ved fase 2- metabolisme forekommer det en konjugering med et annet molekyl slik at metabolitten blir mer vannløselig. *Cytokrom P-450*-enzymene (*CYP*-enzymene) og *uridindifosfat-glukuronosyltransferase* enzymene (*UGT*-

enzymene) er viktige grupper enzymer som er involvert i metabolismen. Når det gjelder vannløselige legemidler skilles de vanligvis ut umetabolisert i nyrene. Dette kalles for renal ekskresjon og skjer hovedsakelig gjennom tre hovedprosesser: glomerulær filtrasjon, aktiv tubulær sekresjon og passiv tubulær transport. Enkelte legemidler kan også bli skilt ut gjennom gallen, en prosess som kalles biliær ekskresjon. Dette forekommer hovedsakelig bare hos legemidler med så høy molekylvekt at de ikke kan bli skilt ut i nyrene. (1) Genetisk polymorfisme av gener som koder for enzymer ansvarlige for absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon kan bidra til å forklare de individuelle forskjellene i farmakokinetikken for et spesifikt legemiddel hos enkeltindivider. (3)

1.2 Farmakodynamikk

Farmakodynamikk er læren om legemidlets effekt og hvordan de virker i kroppen, og har en betydning for hvordan individer responderer på ulike legemidler. Mens farmakokinetikk som nevnt tidligere beskriver hva kroppen gjør med legemidlet, beskriver farmakodynamikk hva legemidlet gjør med kroppen. Farmakodynamikk handler om hvordan legemidler og ligander bindes til f.eks. reseptorer og virker på sine målorganer i kroppen og utøver ønskede eller eventuelt uønskede effekter. Bindingsaffiniteten til reseptorer kan variere mye fra person til person hvor genetisk variasjon også kan være med å påvirke dette. (4)



Figur 1. Oversikt over de ulike prosessene i legemiddelmetabolismen.

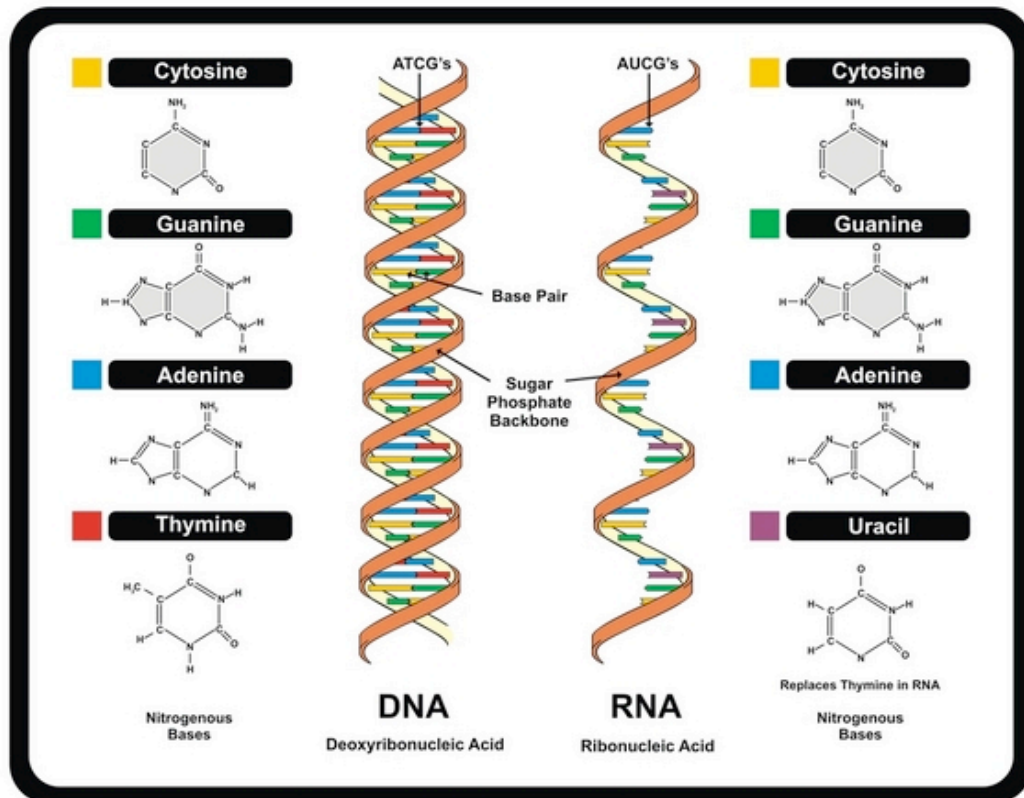
1.3 Farmakogenetikk

Arv og miljø er to essensielle faktorer som spiller inn når det kommer til legemiddelrespons. Faktorer som kjønn, alder, etnisk bakgrunn, matinntak og samspillet mellom ulike legemidler har mye å si for hvordan den enkelte responderer på et bestemt legemiddel. Genetisk variasjon kan bidra til å gi ulik legemiddelrespons, og det har vist seg at enkeltindivider har respondert forskjellig på den samme dosen av ett og samme legemiddel. Variasjonen kan slå ut på flere måter ved at enkelte responderer bare delvis eller mangler effekt av et legemiddel, mens andre kan utvikle store bivirkninger. (5)

Farmakogenetikk tar utgangspunkt i hvordan arveegenskaper kan forutsi legemidlers effekt og bivirkninger. Dette fagområdet sier noe om hvordan genetiske variasjoner hos enkeltindivider kan påvirke virkningen av et legemiddel. De genetiske variasjonene kan være alt fra enkeltnukleotid-variasjoner (SNP) og kopitalls-variasjoner (CNV) til insersjoner og delesjoner av gener som koder for en rekke metaboliserende enzymer, reseptorer og legemiddeltransportører. (6)

1.4 DNA og dets oppbygning

DNA regnes som kroppens byggestein og inneholder all informasjon som kroppen trenger for å fungere. DNA er bygd opp av forskjellige nukleotider og består av tre hoveddeler: en fosfatgruppe, en karbohydratgruppe og 4 ulike nitrogenholdige baser (A, T, G og C). Strukturen er formet som en dobbelheliks av to DNA enkelttråder, hvor fosfat- og karbohydrat- gruppene utgjør ryggraden, og basene som koder for DNA ligger i sentrum av disse, bundet til karbohydratdelen. Basene binder seg ved hjelp av hydrogenbindinger til hverandre på helt bestemte måter. Mens A bare kan binde seg til T, kan C bare binde seg til G. Begge DNA- enkelttrådene kan fungere som templattråder og kan brukes til å transkribere DNA. De fire basene i DNA former et kodon på tre bokstaver, hvor hver kodon igjen koder for ulike aminosyrer. Hver kodon kan kode for bare én aminosyre, men én aminosyre kan være kodet av flere enn bare ett kodon. (7)

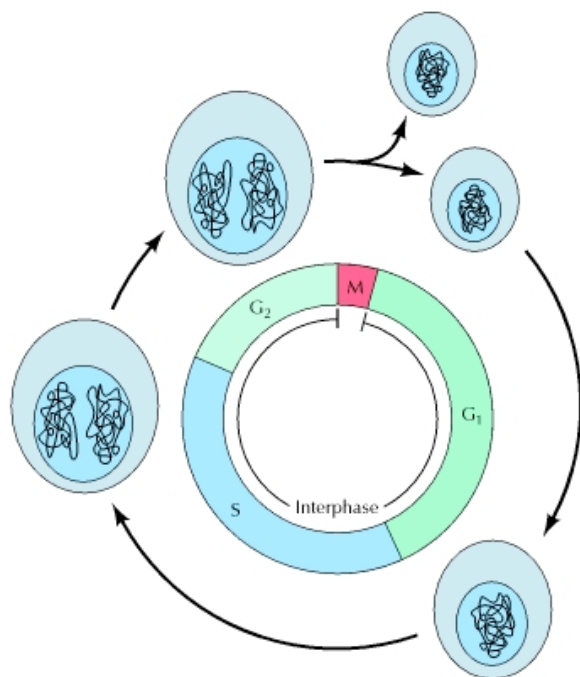


Figur 2. Strukturen av DNA og RNA og deres ulike nitrogenholdige baser. I RNA er thymine (T) byttet ut med uracil (U).

Hentet fra: <http://www.livescience.com/37247-dna.html>

1.4.1 Cellesyklus og celledeling

Cellessyklusen består av fire ulike faser: cellevekst, DNA replikasjon, duplisering av DNA til datterceller og celledeling. For eukaryote celler er de fire fasene bedre kjent som som M-, G₁- , S- og G₂- fasene. I M- fasen forekommer mitosen hvor kjernedelingen skjer, bestående av de fire fasene: profase, metafase, anafase og telofase, etterfulgt av cytokinesen (celledeling). G₁- fasen er perioden før DNA syntesen, og her vokser cellen og klargjør seg til celledeling. Under S- fasen skjer selve DNA replikasjonen, hvor DNA blir kopiert. G₂- fasen er perioden etter DNA-syntesen, og her blir cellen klargjort til mitosen og cytokinesen. G₁- fasen, S- fasen og G₂- fasen utgjør til sammen noe man kaller for interfasen som utgjør nærmere 90-95% av cellessyklusen. En cellessyklus utgjør totalt ca. 24 timer (dette kan variere mellom ulike celler), hvor lengden for de ulike fasene er forskjellige. G₁- fasen har en varighet på ca. 11 timer, S- fasen en varighet på ca. 8 timer, G₂- fasen på ca. 4 timer og M- fasen på ca. 1 time. (8)



Figur 3. Cellesyklusen er delt inn i fire faser: M-fasen, G₁-fasen, S-fasen og G₂-fasen. Hentet fra: The Eukaryotic cell cycle, The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.

1.5 Epigenetikk

Fagfeltet epigenetikk tar for seg arvelige endringer i DNA og regulering av genekspressjon, men hvor den primære DNA-sekvensen ikke blir endret. Det foregår altså en endring i fenotype, men ikke i genotype og rekkefølgen på basene endres ikke. Disse epigenetiske endringene hos et individ kan vedvare livet ut og er i den senere tid også vist å kunne bli nedarvet til neste generasjon. Epigenetiske forandringer kan påvirke legemiddelbehandling ved å endre ekspresjonen av gener som er involvert i metabolisme og distribusjon av legemidler. Dette reguleringsprinsippet kan dermed være med å bidra til å introdusere variasjoner i legemiddelresponsen hos enkeltindivider. (3)

Tre mekanismer inkludert DNA-metylering, histon-modifisering og RNA-assosiert genregulering er alle kjente mekanismer som er mye brukt innenfor epigenetikken. (9)

1.5.1 DNA- metylering

Ved DNA- metylering binder en metyl- gruppe seg kovalent til karbon 5 i cytosin og medfører at genet blir slått av, noe som hindrer transkripsjon av DNA. I mammalske celler forekommer DNA- metylering nesten helt utelukkende på CpG- seter, som er sekvens-områder med en C etterfulgt av en G. Områder med et høyt innhold av CpG- seter (CpG- øyer) forekommer normalt i områder nær promotorer og er vanligvis umetylerte. CpG- setene i resten av genomet har vist seg å være vesentlig metylerte. Det er vist at ikke- metylerte CpG- seter også er funnet i embryonale stamceller.

I forbindelse med kreft og andre sykdommer kan disse områdene bli hypo-/ hypermetylerte og føre til at gener blir slått på eller av. DNA- metylering skjer ved hjelp av DNA metyltransferaser, og i mammalske celler skjer dette via tre ulike metyltransferaser: DNMT1, DNMT3a og DNMT3b. (10)

Mens DNMT3a og DNMT3b primært er assosiert med selve de novo- metyleringen og dannelsen av metyleringsmønsteret, bidrar DNMT1 med vedlikeholdelse av metyleringsmønsteret ved at det binder DNA under replikasjonen og ved at det kopierer metyleringsmønsteret inn til nydannede datterceller.

Metyleringsforandringer skjer under celledelingen. (11)

Studier har vist at gener med promotorområder med et høyt innhold av metylerte cytosiner som oftest er avslåtte. (12)

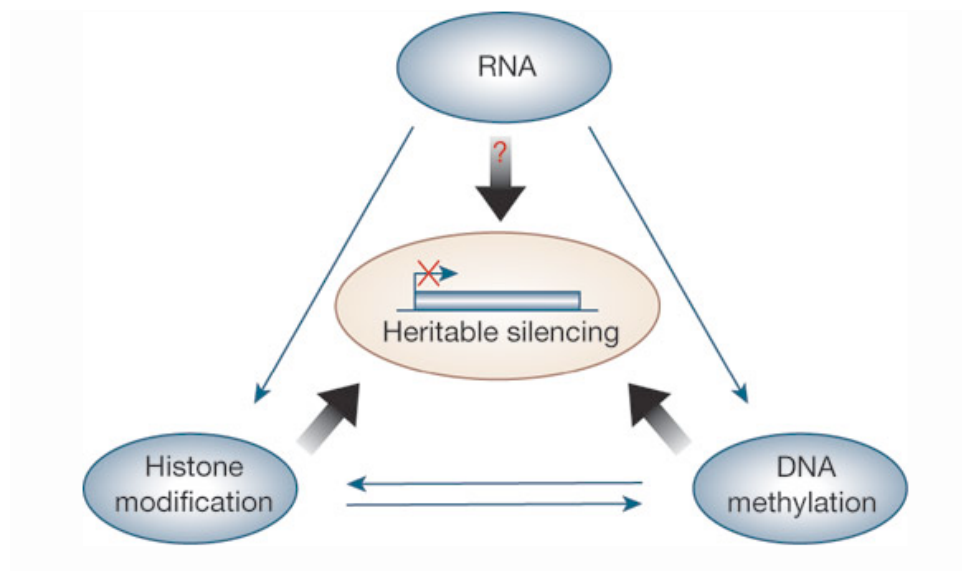
1.5.2 Histonmodifisering

Histonmodifisering påvirker hvor tett DNA pakkes til kromatin og bestemmer om et gen blir utilgjengelige eller tilgjengelige for aktivering og dermed om et gen blir slått av eller på. Gener vil være avslått i DNA-områder hvor DNA er tettpakket, mens gener i DNA-områder som har en løsere pakket struktur vil være påskrudd siden de er mer tilgjengelig for aktivering. (13)

1.5.3 MicroRNA

Den tredje mekanismen involverer ncRNA som er RNA molekyler som ikke har blitt oversatt til proteiner. Disse RNA molekylene kan deles inn i flere mindre grupper, hvor miRNA antas å være den viktigste når det kommer til regulering av genuttrykk og epigenetikk. miRNA består av 18-22 nukleotider og regulerer en rekke intracellulære funksjoner slik som reproduksjon, apoptose og celledifferensiering. (13)

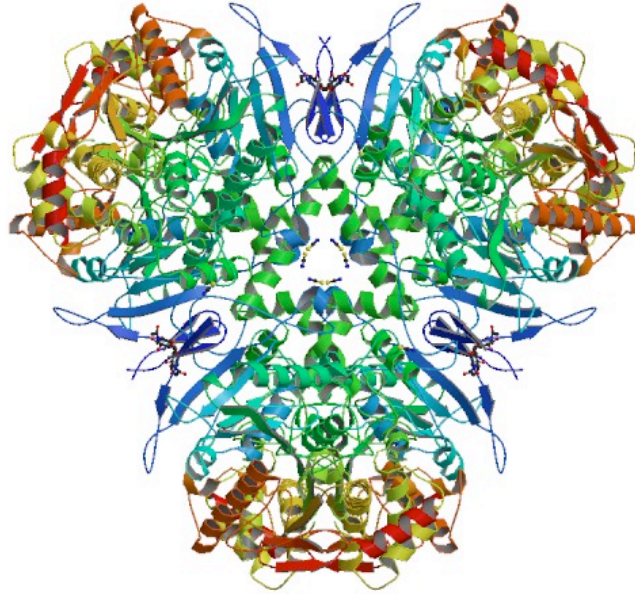
Selv om disse tre metodene er ulike, har det vist seg at de kan påvirke hverandre og fremme virkningen av hverandre. Forskning viser at disse RNA- molekylene er involvert i å styre DNA- metylering og histonmodisering til deler av genomet som inneholder transposoner, og at dette kan bidra til å skru av nabogener. (14)



Figur 4. Sammenhengen mellom de tre epigenetiske metodene; DNA- metylering, histonmodifisering og miRNA- regulering, hvor alle tre kan føre til at et gen blir skrudd av og ikke kommer til uttrykk. Figuren er hentet fra: Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. (9)

1.6 Karboksylesterase – CES

Karboksylesterase (CES) er en type mammalske enzymer som finnes utbredt i store deler av kroppen; blant annet i det endoplasmiske retikulum, leveren, tarmen, morkaken og hjernen. Som en del av multigen familien α,β -hydrolase foldede proteiner, hydrolyserer de en rekke endogene og eksogene substanser, inkludert en rekke viktige legemidler. *CES* hydrolyserer substrater som inneholder ester-, amid- og thioester- bindinger, og spiller en viktig rolle i metabolismen av legemidler hvor de omdanner produget av et legemiddel om til den aktive metabolitten. De kan også virke på motsatt måte ved å inaktivere legemidler.



Figur 5. Tredimensjonal proteinstruktur av humant rekombinant *CES1* isolert fra larven *Cabbage looper*.

Hentet fra: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4AB1>

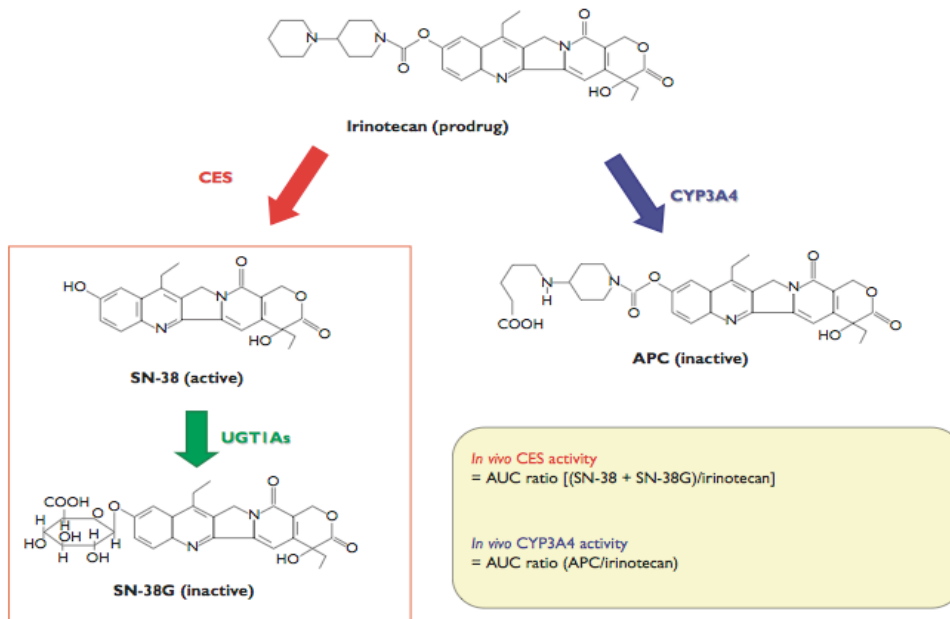
Det er minst 5 isoenzymer av *CES* (*CES1-CES5*) som hittil har vært kjent, nylig ble enda et nytt isoenzym (*CES6*) identifisert. Blant disse er det *CES1* og *CES2* som blir regnet som de viktigste isoenzymer når det kommer til legemiddel metabolisme. Begge disse isoenzymene uttrykkes i leveren. *CES1* uttrykkes mest i leveren, mens det i tarmen kun er *CES2* som blir uttrykt. *CES1* hydrolyserer i hovedsakelig substrater med små alkohol- grupper og med store akyl- grupper, i motsetning til *CES2* som hydrolyserer substrater med store alkohol- grupper og med små akyl- grupper. Eksempler på legemidler som blir metabolisert av *CES1* er: dabigatran etexilate, oseltamivir, imidapril, methylphenidate og clopidogrel. Mens de førstnevnte blir aktivert fra prodrug til den aktive metabolitten, blir de to sistnevnte inaktivert av *CES1*. Aspirin og irinotecan er eksempler på legemidler som blir metabolisert av *CES2*. (15, 16)

Alle *CES*- isoenzymene har lik peptidstruktur med en N-terminal signalpeptid av 17-22 aminosyre residuer, inkludert en hydrofob aminosyre. *CES* har fire Cys residuer som er involvert i spesifikke disulfid bindinger. (17)

Metylering regulerer ekspresjonen av mange enzymer ansvarlige for metabolismen av kjemoterapeutiske legemidler, der i blant enzymene *CES1*, *CES2* og *UGT1A1*. Genuttrykk som blir skrudd av gjennom metylering kan videre føre til legemiddelresistens. (18)

1.7 Irinotecan

Irinotecan er et cytostatikum som sammen med 5-fluorouracil og oxaliplatin, blir brukt til behandlingen av avansert kolorektalkreft og andre kreftsykdommer som blant annet lungekreft og ventrikkelkreft. Det forekommer som et prodrug, som gjennom *CES1* (mindre grad) og *CES2* (større grad) hydrolyseres til SN-38 (7-ethyl-10hydroxycamptothecin) (aktiv metabolitt) og carbonyloxycamptothecin (7-ethyl-10[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]) (inaktiv metabolitt). SN-38, som er mer potent enn Irinotecan, er en DNA-topoisomerase I inhibitor som hemmer DNA replikasjonen og på denne måten dreper kreftcellene. (15) Den cytotoksiske effekten er tidsavhengig og spesifikk for S-fasen. Doseregimen for behandling av kolorektalkreft er ved monoterapi 350mg/m² hver 3. uke gitt som intravenøs infusjon over 30-90 minutter. Ved kombinasjonsterapi blir det administrert 180 mg/m² hver 2.uke etterfulgt av en infusjon med folinsyre og 5-FU. (19) Både *CES1* og *CES2* kan hydrolysere irinotecan til dets aktive form SN-38, men *CES2* har vist seg å være mer effektiv enn *CES1*. Siden irinotecan blir gitt intravenøst, er tilgjengeligheten i tarmen begrenset. Selv om *CES2* regnes for å være mest effektiv, har *CES1* likevel en viktig rolle i legemiddel aktiveringen. (16) Utenom *CES*-enzymene, er det to andre enzymer som også er med på påvirke metabolismen til irinotecan; *UGT1A1*, som danner den inaktive metabolitten SN-38G og *CYP3A4*, som danner den inaktive metabolitten APC. (20)



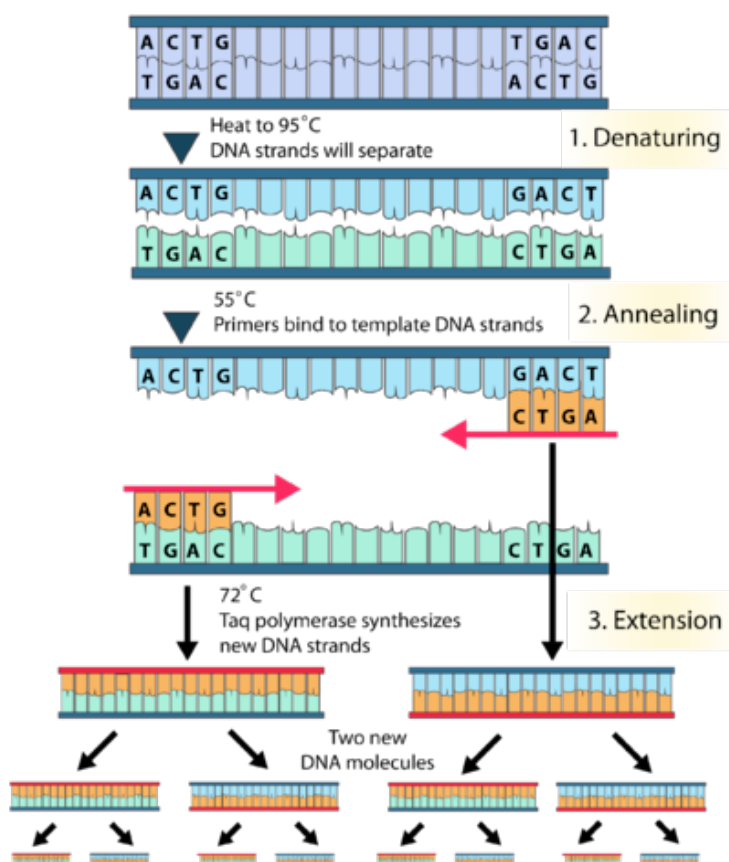
Figur 6. Metabolisme-mekanismer til Irinotecan. Prodrugget Irinotecan blir aktivert gjennom *CES* til SN-38, og deretter detoksifisert av *UGT1A* til den inaktive metabolitten SN-38G. Irinotecan blir også metabolisert gjennom *CYP3A4* til den inaktive metabolitten APC. (20)

Irinotecan har blitt mye brukt for å behandle kreftpasienter, hvor det gir god tumor regresjon og progresjonsfri overlevelse. Når det er sagt er effektiviteten til Irinotecan påvirket av mengden SN-38 (aktiv metabolitt), som igjen er modulert av forskjellen i ekspresjon og aktivitet til *CES2* og *UGT1A1*. (21)

Studier har vist at pasienter har varierende respons av Irinotecan, hvor legemiddelresistens er en overordnet faktor for den begrensede legemiddelresponsen hos pasientene. Det er vist at SN-38 resistens også kan føre til en kryssresistens for 5-fluorouracil, et annet legemiddel som ofte brukes sammen med Irinotecan ved kolorektalkreft. (22)

Studier har også vist at kreftlegemidler kan påvirke metyleringsmønsteret til ulike gener, hvor det både kan indusere hypo- og hypermetylering, hvor genet kan bli skrudd på eller av. I disse studiene ble kreftlegemidler som blant annet 5-fluorouracil og metotreksat brukt i både lungekreftceller og rhabdomyosarcoma celler. (23)

1.8 PCR



Figur 7. De ulike stegene i PCR prosessen. Stegene blir nærmere beskrevet i teksten under.

Polymerase chain reaction (PCR) er basert på enzymet DNA polymerasens evne til å syntetisere nye DNA tråder som er komplementære til templat tråden. Et templat er et enkelttrådet DNA/RNA brukt til å lage en ny kopi av DNA. Templatet virker som en mal og er utgangsmaterialet for polymerasekjedereaksjonen og celledobling. For at DNA polymerase skal kunne binde seg til DNA og amplifisere, er det nødvendig med bruk av primere komplementære til utvalgte områder på templatet. Med spesifikke primere kan amplifiseringen skje i akkurat det området av DNA som er ønskelig. Flere DNA- analysemetoder krever PCR- amplifisering, siden det ofte kreves en høy nok mengde DNA for å kunne gi signaldeteksjon. Selve metoden er basert på temperaturendringer som kontrollerer aktiviteten til DNA polymerase og bindingen av primere. (24)

DNA som ønskes amplifisert blandes sammen med nukleotider, *Taq polymerase* (et varmostabilt DNA polymerase enzym), en nøye tilpasset buffer og DNA primere. Ved start økes temperaturen til 95 °C for å bryte hydrogenbindingene i DNA slik at enkelttrådet DNA kan dannes. Videre senkes temperaturen til ca. 60 °C, noe som tillater binding av primere på DNA- tråden. Ved bruk av primere som sitt startpunkt, begynner *Taq polymerase* å syntetisere den komplementære tråden til DNA. Dette forekommer ved den optimale temperaturen for *Taq polymerase* som er ved 72 °C. Etter endt syklus sitter man igjen med dobbelt så mye DNA som man i utgangspunktet hadde. Veksten er derfor eksponentielt voksende. Syklusen gjentas helt til nok DNA har blitt dannet, som regel 30-40 ganger. (25)

1.9 Mål for masteroppgaven

Karboksylesterase 1 (CES1) er et av mange leverenzymmer som bidrar til omdannelsen av flere viktige legemidler. Det er vist at genetisk variasjon i *CES1* og *CES2*- genene kan være assosiert med ulik legemiddelrespons og bidra til enten dårligere legemiddeleffekt eller bivirkninger hos pasienten. *CES*- genene har et CpG- rikt område i promotor regionen, og metylering av slike CpG- seter er en kjent mekanisme for å skru av gener på. Det er tidligere vist at bruk av legemidler kan påvirke metyleringsmønsteret hos ulike gener, og vi ønsker i denne oppgaven å undersøke legemidlers effekt på promotor- metylering og mRNA transkripsjon av *CES1* og *CES2* ved hjelp av *in vitro*- studier av levercellekulturer (HepG2). Videre ønsker vi å studere *UGT1A1*, som også viser seg å ha en viktig rolle for effekten av Irinotecan. Studier har vist at metyleringsforandringer også har forekommet hos dette genet. Dersom det viser seg at legemidlet faktisk endrer metyleringsmønsteret og/eller transkripsjonen til *CES*- genene/*UGT1A1*, kan dette ha betydning for omsetningen av *CES/UGT1A1*- spesifikke legemidler. Videre ønsker man også å finne ut om metyleringsforandringer i Irinotecan- metaboliserende gener under behandling med Irinotecan kan forklare hvorfor noen pasienter får dårligere effekt av Irinotecan (ikke en del av denne studien). Et spørsmål vi stiller oss er om Irinotecan i seg selv kan føre til dårligere effekt ved å påvirke metyleringsmønsteret i kreftcellene.

Kort oversikt over metodene som skal tas i bruk:

- Utsåing og splitting av celler
- *In vitro*- stimulering av levercellekulturer (HepG2- cellelinjer) med et legemiddel (Irinotecan) som omsettes av *CES*.
- DNA og mRNA isolering fra stimulerte HepG2- cellelinjer
- *CES*- metylering:
 - Bisulfittbehandling av DNA
 - PCR- amplifisering med *CES/UGT1A1*- spesifikke primere
- - Sekvensering ved pyrosekvensering
- mRNA- transkripsjon:
 - syntese av cDNA fra mRNA ved hjelp av revers transkriptase
 - kvantitativ PCR av *CES/UGT1A1* ved hjelp av Real time- qPCR

De nevnte metodene har tidligere ikke blitt utført i denne sammenhengen, så store deler av denne oppgaven vil også gå ut på å teste ut disse metodene.

2 Materiale og metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikaler og reagenser

Produsent	Kjemikaler/Reagenser	
Qiagen®, Tyskland	Kit Allprep DNA/RNA mini kit Cat.no. 80204	Kjemikalium/Reagens Buffer AW1
		Buffer AW2
		Buffer EB
		Buffer RLT plus
		Buffer RPE
		Buffer RW1
	EpiTect Bisulfite kit Cat.no. 59104	Bisulfite Mix
		Buffer BD
		Buffer BL
		Buffer BW
		Buffer EB
		Carrier RNA
	EpiTect PCR control DNA set Cat.no. 59695	DNA protect buffer
		Methylated human control DNA, converted
		Unmethylated human control DNA, converted
	PyroMark Gold Q24 Reagents Cat.no. 970802	Unmethylated human control DNA, unconverted
		Enzyme Mixture
		Substrate Mixture
		dATP α S (nukleotid A)
		dGTP (nukleotid G)
	PyroMark PCR kit Cat.no. 978703	dCTP (nukleotid C)
		dTTP (nukleotid T)
		CoralLoad concentrate
PyroMark PCR Mastermix		
Kjemikalium/Reagens		
PyroMark Denaturation Solution, Cat.no. 979007		
PyroMark Annealing buffer, Cat.no. 979009		
PyroMark Binding buffer, Cat.no. 979006		
Metabion International®, Tyskland	CES1_met forward primer #211	
	CES1_met reverse primer #212	
	CES1_met sequencing primer #213	
	CES2prom1 forward primer #299	
	CES2prom1 reverse primer #300	

Produsent	Kjemikalium/Reagens
Metabion International®, Tyskland	CES2prom1 sequencing primer #301
	CES2prom2 forward primer #302
	CES2prom2 reverse primer #303
	CES2prom2 sequencing primer #304
	CES2exon1 forward primer #305
	CES2exon1 reverse primer #306
	CES2exon1 sequencing primer #307
	UGT1A1prom forward primer #308
	UGT1A1prom reverse primer #309
	UGT1A1prom sequencing primer #310
Life Technologies®, USA	Hso3946171_cn, CES1 probe
	Hso1077945_m1, CES2 probe
	Hs02511055_s1, UGT1A1 probe
	Hs99999905_m1, GAPDH probe
	4333767-1006020, GUSB probe
	Hs00168719_m1, PPIB probe
	Hs03928990_g1, S18 probe
	Hs00427620_m1, TBP probe
	Tryptan Blue Stain 0,4%
Universal Taqman PCR Mastermix	
ATCC®, USA	Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)
	HepG2 celler
Sigma- Aldrich®, USA	B- mercatoethanol
	Irinotecan hydrochloride
Sigma- Aldrich®, UK	DMSO
	Tryptan- EDTA 0,25%
	L- Glutamine- Penicillin- Streptomycin solution, produkt# G6784
Kemetyl®, Norge	100% etanol
Lonza® USA	Fetal Bovine Serum, FBS produkt# DE14-801F
	Seakem Le Agarose
Quanta Biosciences® USA	q- script cDNA supermix
GE Healthcare Bio- Sciences® Sverige	Streptavidin Sepharose
Cambrex Bio Science Rockland® USA	Gelstar Nucleid Acid Gel Stain
Ullevål Apotek Norge	Tryptanblått- oppløsning 2%

2.1.2 Utstyr

Leverandør	Utstyr
Qiagen®, Tyskland	1,5 mL collection tube
	2 mL collection tube
	Plateholder
	PyroMark Q24
	PyroMark Q24 Cartridge (kassett)
	PyroMark Q24 Plate
	PyroMark Vacuum prep workstation
	Rotor Adapter
	QIAcube
	QIAshredder spin column
	RNeasy Mini spin column
	Allprep DNA mini spin column
	EpiTect spin column
Life technologies®, Singapore	PCR1 maskin
	viiA7
Life technologies®, USA	Countess II FL
Invitrogen®, USA	
VWR®, USA	0,2 mL PCR rør
Becton Dickinson Labware®, UK	12- brønners brett
	Biocoat Collagen cellekulturflasker
Thermo Scientific® UK	96- brønners brett
Thermo Election Corporation®	CO ₂ -inkubator
Integra Biosciences®, Sveits	gassbrenner
	vacusafe
Inter Instrument, Norge	Nicon Elipse Ti fluorescens mikroskop
Zeiss® Tyskland	Mikroskop T-10
BD Falcon®, USA	Målesylinder-rør
Fisher Scientific®, Norge	Nanodrop- 1000
Eppendorf®, USA	Ep T.I.P.S dualfilter, pipetter
Eppendorf®, Tyskland	Mixmate PCR 96, ristemaskin
Costar®, Mexico	Rubber policeman cell scraper
Costar®, USA	Serologiske pipetter
Grant Instrument®, England	Vannbad Type T100
Grant Boekel®, England	Varmeblokk
MQ- vann maskin	Purelab Ultra®
VWR	Sterile Pasteurpipetter, produkt# 612-1701
	Eppendorf Centrifuge, produkt# 5415R

2.2 Metoder

2.2.1 HepG2- celler som et modellsystem

På grunn av artsforskjeller og for å redusere bruken av dyr i toksiske analyser, er det nødvendig med pålitelige, humane testsystemer. Hydrolyse aktiviteten gjennom *CES* er forskjellig mellom mennesker og dyr, og det er dermed vanskelig å forutsi effektiviteten i mennesker ved bruk av kliniske studier i dyr. I disse tilfeller er det bedre å bruke humane cellekulturmodeller. (26, 27)

HepG2 er en rensset cellelinje fra humane leverkreftceller, opprinnelig isolert fra en 15 år gammel gutt av hvit amerikansk opprinnelse med godt differensiert leverkreft.

Morfologisk er HepG2 epitelceller med et kromosom antall på 55. De er godt karakteriserte celler. (28) Bruk av *in-vitro* modeller for å etterligne *in-vivo* modeller kan være gode, sensitive verktøy for å kunne studere mulige forandringer i en celle.

Humane cellelinjer er lette å jobbe med i kulturer og er tilgjengelige i store kvantitative mengder. Dette gjør dem til gode valg som *in-vitro* modeller. Imidlertid er det en del cellelinjetyper som mister sin evne til å utføre vevs- og celle-spesifikke funksjoner, som gjør at de er mindre egnet til å etterligne *in-vivo* responser. HepG2-cellelinjer har vist seg å beholde flere av sine funksjoner *in-vitro*, blant annet uttrykking av flere leverspesifikke gener. (29) Denne typen cellelinje inneholder f.eks. mange av de spesialiserte funksjonene, som blant annet sekresjon av store plasmaproteiner, noe som normalt går tapt under kultivering av primære hepatocytter. (30) HepG2 celler har blitt brukt til flere forskningsområder innenfor toksikologi og farmakologi, slik som i forbindelse med lever metabolisme, onkogenese, levertoksisitet, samt genekspressjon og transkripsjon. (31)

2.2.2 Celledyrkning

HepG2- celler (cat.no. HB- 8065) ble hentet fra fryser (-150 °C) og sådd ut i medie for oppvekst. Det ble brukt EMEM medie (cat. No. 30-2003) tilsatt 10% varmeinaktivert kalveserum (FBS) og 1% L-Glutamine- Penicillin- Streptomycin løsning (PSG). Disse komponentene er tilsatt for å gi cellene næring til å vokse og for å unngå

bakterievekst i mediet. Alt ble satt i vannbad på 37 °C før bruk, noe som er optimal temperatur for HEPG2-celler.

Når man jobber med celler er det viktig å jobbe så sterilt som mulig, derfor ble alt arbeid utført på steril-laben med sterile utstyr og aseptisk arbeidsteknikk. Arbeidsbenken og utstyr ble vasket med 70% sprit. Cellene ble løst i 10 ml EMEM medie tilsatt FBS og PSG. Løsningen ble satt til sentrifugering i 10 minutter på program 13 (200 runder på 10 minutter) på sentrifugemaskinen. Etter sentrifugeringen ble supernatanten fjernet forsiktig med et sterilt glasspipette. Nye 10 ml EMEM medie med FBS og PSG ble tilsatt, og blandingen ble overført til en biotin celleflaske. Celleflasken ble satt i et CO₂- inkubatorskap over noen dager for oppvekst, hvor de ble observert daglig for å se vekstfremgangen. Hvor mange dager de sto i CO₂-inkubatorskapet før splitting var avhengig av hvor mye celler som ble tilsatt i celleflasken, hvor fort de vokste og hvor gode betingelsene var for at dette kunne skje. Mye av den første perioden ble derfor brukt til å bli bedre kjent med cellene, og lære å lese hvordan deres vekstmønster var.

2.2.3 Splitting av celler

Cellene ble observert i mikroskopet daglig for å se vekstfremgangen. Da de hadde vokst seg tette (konfluente, når cellene er i kontakt med hverandre og man nesten ikke kan se noe mellomrom mellom dem) ble cellene splittet for å holde dem i live og for å ha mer celler å jobbe med. Det var likevel viktig å passe på at de ikke vokste seg altfor tette, noe som igjen kan føre til celledød. Gammelt medie ble sugd av med en lang pasteurpipette u/filter. 3 ml trypsin/ EDTA ble tilsatt celleflasken og sugd av umiddelbart. Dette gjøres for å fjerne siste rest av medie. Nye 3 ml med trypsin/EDTA ble tilsatt og celleflasken ble plassert i varmeskap i ca. 4 minutter. Da alle cellene var løsnet ble det tilsatt 3 ml medie for å inaktivere trypsin. En lang pasteurpipette m/filter og smokk ble så brukt for å lage enkeltcellesuspensjoner av cellene. 5 ml medie ble videre tilsatt og løsningen ble blandet godt sammen. Det ble tatt ut en liten mengde i et eppendorfrør for celledelling. Videre ble cellene sådd ut i nye biotin celleflasker og/eller på 12- brønners bretter.

2.2.4 Celletelling

Celletellingene under denne oppgaven ble foretatt både manuelt med mikroskop og med et mer avansert celleteller instrument Countess II FL fra Life Technologies.

Ved manuell celletelling ble 10 μL celler og 10 μL tryptanblått blandet sammen i et eppendorfrør. 10 μL av blandingen ble så applisert på et glassbrett til telling i mikroskop. Cellene i en rute ble talt, og tallet ble multiplisert med 10^4 og med fortynningsfaktoren 2. Ved celletelling med Countess II FL ble 10 μL celsuspensjon blandet med 10 μL Tryptanblått 0,4%- løsning i forholdet 1:1.

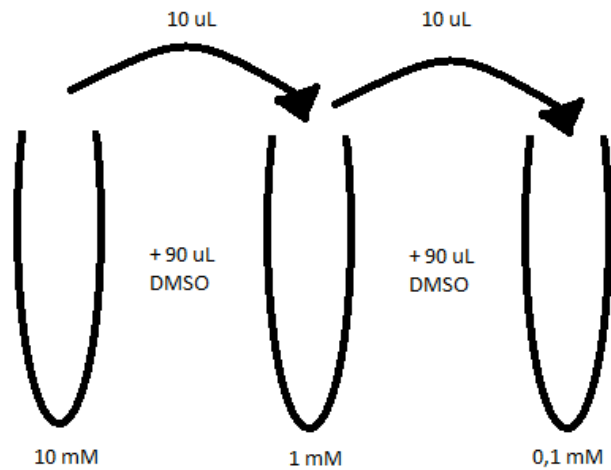
Blandingene ble tilsatt et tellekammer og satt inn i Countess II FL maskinen, hvor den kunne estimere antall levende celler. Ved hjelp av tryptanblått ble levende og døde celler skilt fra hverandre ved at de døde cellene ble farget blå.

Tryptanblått som er et stort, vannløselig molekyl kan ikke trenge seg gjennom den intakte cellemembranen til levende celler, og disse forblir dermed ufarget.

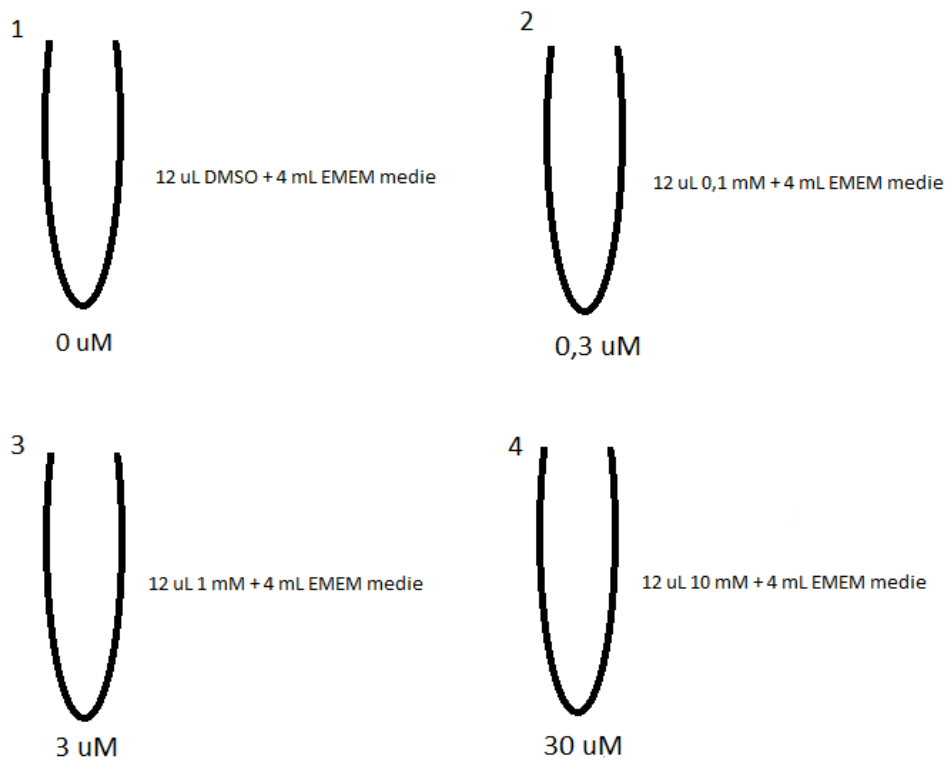
2.2.5 Cellestimulering

Omkring 200.000 celler og 1 ml medie ble tilsatt i hver brønn i et 12- brønners brett. 12- brønners brettet ble plassert i et CO_2 inkubator- skap i 24 timer, før de ble stimulert med Irinotecan. Det ble brukt fire ulike konsentrasjoner av Irinotecan: 0 μM , 0.3 μM , 3 μM og 30 μM , hvor det ble gjort 3 parallelle forsøk av hver enkelt konsentrasjon. Tilsammen utgjorde dette 12 prøver per brett. På det første oppsettet ble cellene på det ene 12- brønners brettet inkubert i 24 timer før det ble høstet og isolert, mens det andre 12- brønners brettet ble inkubert i 48 timer før det ble høstet og isolert. På oppsett 2 og 3 ble cellene inkubert i 48 timer før de ble høstet og isolert.

Irinotecan ble fryst ned i aliquoter på 50 μL og 100 μL med en konsentrasjon på 10 mM. En aliquote med konsentrasjonen 10 mM ble brukt for å lage fortynnete løsninger på 1 mM og 0,1 mM. For hver fortynning ble det brukt 10 μL Irinotecan- løsning og 90 μL DMSO. Disse ble fortynnet i 1,5 mL eppendorfrør.



Figur 8. Skjematisk oversikt over hvordan Irinotecan ble fortynnet til de ulike konsentrasjonene.



Figur 9. Det ble laget 4 forskjellige løsninger, brukt til å stimulere cellene med slik som anvist i figuren over.

Tabell 1: Oversikt over konsentrasjonene i 12- brønners brettet

0 μ M	0,3 μ M	3 μ M	30 μ M
0 μ M	0,3 μ M	3 μ M	30 μ M
0 μ M	0,3 μ M	3 μ M	30 μ M

1 ml løsning ble tilsatt i brønnene i 12-brønners brettet, slik som anvist i tabell 1.

2.2.6 Observasjon i mikroskop

Etter 24- og 48- timers stimulering ble cellene observert i mikroskopet for å se hvordan celleveksten hadde utviklet seg (om de hadde vokst seg tettere eller ikke, om de hadde endret seg på formen, osv.). Det ble også brukt et mer avansert mikroskop, Nikon Elipse Ti fluorescens mikroskop, til å ta bilde av de forskjellige prøvene i de ulike tidspunktene (rett før stimulering, 24- og 48- timer etter stimulering).

2.2.7 Isolering av DNA og RNA

For å isolere DNA og RNA fra levercellene ble Allprep DNA/RNA mini kit (Cat.no. #80204) fra Qiagen benyttet. Minikitet inneholdt 2 typer minikolonner (en for DNA og en for RNA), RNasefritt vann og en rekke buffere og vaskeløsninger.

Cellene ble først tilsatt 350 μ L buffer RLT plus og lysert direkte i 12- brønners brettet. En rubber policeman ble brukt for å skrape ut cellene etter lyseringen, og dette ble overført til en QIAshredder spin column plassert i en 2 ml samlerør. Videre ble prøveløsningene sentrifugert i 2 minutter på maks hastighet ved 20 °C med sentrifugemaskinen Eppendorf Centrifuge (VWR). Prøvene ble deretter kjørt på Qiacube roboten hvor DNA og RNA ble eluert i to forskjellige steg, DNA- og RNA-prøvene ble senere brukt til ulike formål. Se vedlegg for et mer utbredt prosedyre.

2.2.8 Kvantifisering av DNA og RNA

Nanodrop ble brukt til å sjekke konsentrasjonen og renheten av DNA- og RNA-prøvene. Programmet Nanodrop-1000 versjon 3.3 ble tatt i bruk. Før prøvene ble analysert, måtte systemet først nullstilles med MQ-vann og deretter med elueringsløsningene for prøvene. DNA ble målt med spesifikasjonene: DNA-40, bølgelengde 230 nm og analysevolum 1,5 µL. EB- buffer ble brukt som nullprøve for DNA-prøvene. Før det ble foretatt noen målinger på RNA ble systemet blanket med MQ- vann, som her fungerer som en nullprøve for RNA. Det ble målt med spesifikasjonene: RNA-40, bølgelengde 230 nm og analysevolum 1,5 µL.

2.2.9 RT- qPCR

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real time RT- qPCR) har evnen til å monitorere PCR mens det kjører, altså i sanntid. Data blir derfor samlet inn fortløpende under PCR kjøringen istedenfor helt på slutten av prosessen. Real time RT- qPCR er relativ enkel å utføre og i kombinasjon med dens effektivitet, sensitivitet og spesifisitet er den en av de mest brukte metodene i kvantitativ analyse, der i blant analyse av DNA og RNA. (32)

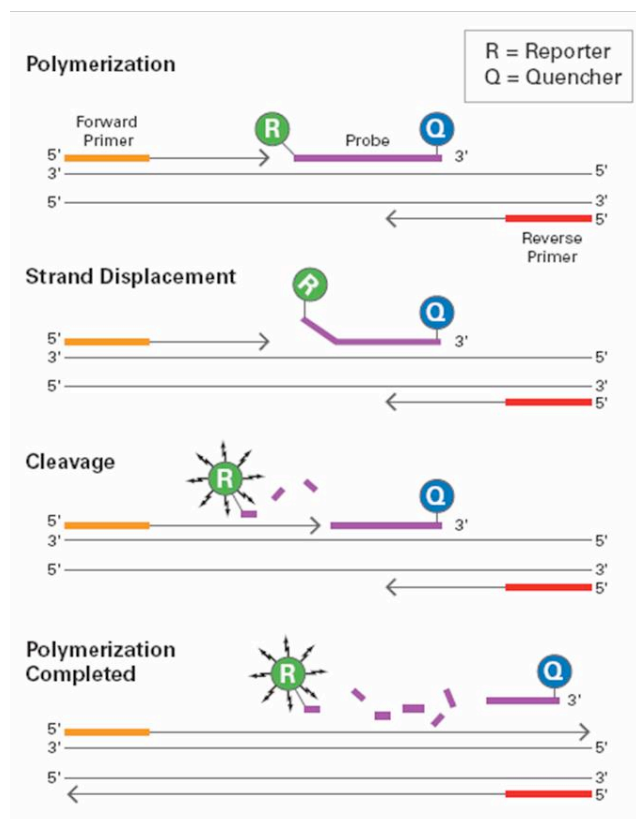
Metoden deles inn i flere trinn;

- i. Revers transkripsjon (RT- steget) hvor RNA blir omdannet til cDNA.
- ii. amplifisering av cDNA ved hjelp av PCR
- iii. deteksjon og kvantifisering av amplifiseringen i real time.

Metoden baserer seg på måling av økt fluorescent signal som er proporsjonal med mengde DNA som blir dannet under hver PCR sykel. Denne korrelasjonen av fluorescens og mengde amplifisert produkt, tillater oss å gjøre en presis kvantifisering av mål-molekyler over et bredt område. Ved bruk av prober med ulike ”reporter dyes” er det mulig å kvantifisere flere målgener i en og samme reaksjon. Individuelle reaksjoner er karakterisert av PCR sykelen ved at fluorescensen først overskrider en definert bakgrunns fluorescens, kjent som threshold cycle (Ct).

Jo mer utgangsmateriale vi hadde i startpunktet, jo lavere blir Ct- verdien. (33)

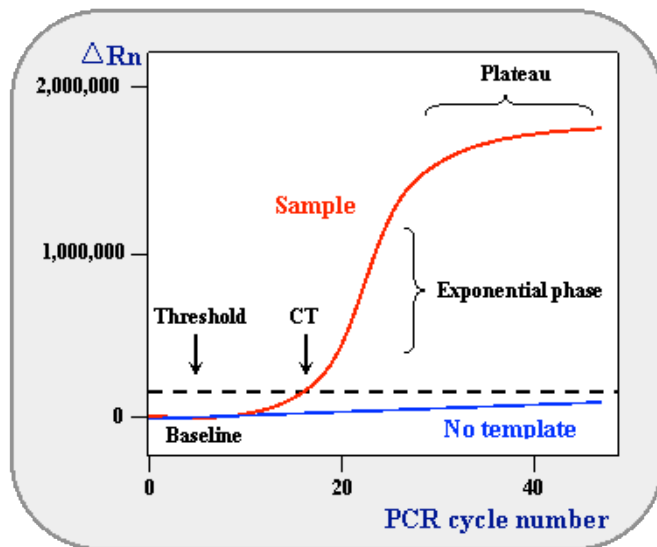
I litteraturen blir threshold cycle (Ct) mye brukt, men MIQE guidelines foretrekker å bruke begrepet quantification cycle (Cq)(32). I denne oppgaven har vi derfor valgt å bruke begrepet Cq.



Figur 10. Oversikt over prinsippet for TaqMan- prober. R(reporter)- substansen og Q (quencher)- substansen under en sykel i qPCR kjøringen.

I tillegg til en forward- og en revers- primer som binder seg på hver sin ende av det DNA- området man vil amplifisere, kan man bruke prober som binder seg spesifikt til PCR produktet. Taqman proben, også kjent som "double dye" oligonukleotider, var en av de første probene som ble tatt i bruk innenfor real time qPCR, og er i dag fortsatt en av de mest brukte probene innenfor dette feltet. To ulike substanser er bundet på hver sin ende av proben. Den fluorescerende reporter substansen er bundet til 5'enden av proben, mens den non-fluorescerende quencher substansen er bundet på 3'enden. Quencheren vil redusere reporterens evne til å fluorescere. Når *Taqman polymerase* binder seg til primeren i 5'enden av DNA og begynner å polymerisere, beveger den seg framover mot reporteren og kløyver den fra quencheren. Reporteren vil nå ikke lenger være hemmet av quencheren og kan fluorescere og sende ut lyssignal som så kan detekteres. (34)

Model of real time quantitative PCR plot



Figur 11. Real time qPCR plot. Baselinjen anses å være bakgrunnsstøy i de tidlige syklene, hvor fluorescensen ikke er detekterbar. Threshold er området over baselinjen hvor deteksjonen anses å ikke være bakgrunnsstøy. Alle signaler over dette området er derfor brukbare målinger. Verdier over Ct- verdien regnes å være signifikante verdier og kan brukes som deteksjon for en prøve.

Vi valgte å gjøre en to-steps PCR-kvantifisering hvor RNA- prøvene først ble transkribert til cDNA ved hjelp av revers transkriptase på PCR- maskinen. Deretter ble cDNA brukt videre til å gjøre en kvantitativt real- time PCR (qPCR). Både target gener (*CES1*, *CES2* og *UGT1A1*) og referansegener (*GAPDH*, *TBP* og *SI8*) ble brukt. Vi kjørte flere oppsett med denne metoden, hvor det ble brukt både 24-timers prøver og 48- timers prøver i det første oppsettet. I de to neste oppsettene ble det kun brukt 48- timers prøver.

2.2.9.1 Testing av referansegener til bruk ved qPCR

Referansegener blir som regel brukt til normalisering av prøver for eventuelle variasjoner under oppsettet og prøveopparbeidelsen. For best mulig validering av resultatene er det derfor viktig med et godt valg av referansegener. Ut i fra review-artikler og erfaringer fra tidligere doktorgradsstudenter ble det valgt ut relevante referansegener som ble testet ut til bruk som normalisering ved qPCR.

Følgende referansegener ble valgt ut til testing: *18s*, *GAPDH*, *TBP*, *GUSB* og *PPIB*. I tillegg hadde man også targetgenene: *CES1*, *CES2* og *UGT1A1*. Uttesting av referanse-genene foregikk ved hjelp av qPCR. For hvert target-/referansegen ble det laget en mastermix med følgende innhold: DNasefritt H₂O, universal PCR mastermix og FAM- proben. I oppsettet ble det brukt to cDNA prøver, en med lav konsentrasjon og en med høy konsentrasjon, samt negative kontroller (-RT) av disse. Kontrollprøvene inneholdt kun cDNA og DNasefritt vann, hvor universal PCR mastermixen ble utelatt.

Tabell 2: Volum av reagenser for mastermix til bruk i qPCR for uttesting av referansegener

Mastermix	1 prøve	10 prøver
DNasefritt H ₂ O	7 µL	70 µL
Universal PCR mastermix	10 µL	100 µL
FAM gene specific assay	1 µL	10 µL
Totalt	18 µL	180 µL

Det ble laget seks ulike mastermix med et totalvolum på 180 µL for de 6 ulike probene. Volumet av reagensene kan du se i tabell 2 ovenfor. Hver mastermix skal være nok til 8 prøver (prøve A, prøve B, kontroll A, kontroll B, hvor man kjørte et parallell av disse). Det ble satt av et overskudd på 2 prøver med tanke på eventuelle overførings- og pipeteringsfeil. Mastermixen ble blandet sammen i 1,5 mL effendorfrør. 18 µL av mastermixen og 2 µL av cDNA ble tilsatt i brønnene i et 96- brønners brett som vist i oppsettet i tabell (vedlegg 7.1). Prøvene ble så kjørt på viiA 7 PCR maskinen.

Tabell 3: Temperatur- og tidsprogram for kjøring av qPCR

Stage	Temperature	Time
Hold	95 °C	10 min.
40 cycles	95 °C	15 sec.
	60 °C	60 sec.

2.2.9.2 cDNA syntese

cDNA syntese, også kjent som revers transkripsjonssteget (RT- steget), benyttes ved omdannelsen av enkelttrådet RNA om til komplementær DNA (cDNA). Dette skjer ved hjelp av et revers transkriptase enzym, primere, nukleotider (dNTPs) og en RNase- inhibitor. Ulike typer primere kan tas i bruk, blant annet såkalte ”random” primere, oligo (dT) primere og genspesifikke primere, alle med sine positive og negative sider. Ved cDNA syntese fester primeren seg først på enkelttrådet RNA, som fungerer som et templat. Videre binder revers transkriptase enzymet seg på 3’enden på primeren hvor det begynner å syntetisere DNA. cDNA som blir dannet i slutten av denne prosessen kan så videre brukes som templat i qPCR. (35) qScript cDNA Supermix (Quanta) ble tatt i bruk for oppsettene med følgende innhold: buffer, MgCl₂, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), rekombinant RNase inhibitor protein, qScript revers transkriptase, ”random” primere, oligo (dT) primere og stabilisatorer.

Oppsett 1

24- timers prøvene:

I en tidligere oppgave utført av en doktorgradsstudent ble det brukt 200 ng RNA til cDNA syntese. Sluttløsningen som brukes i PCR- maskinen ved cDNA syntese bør likevel ikke overskride 20 µL. På grunn av lave konsentrasjoner av RNA ble det derfor bare brukt 50 ng RNA. Vi hadde i utgangspunktet totalt 12 RNA prøver, men enkelte prøver hadde så lave konsentrasjoner at de ble utelatt fra oppsettet. Følgende prøver ble med i oppsettet: 0B, 0C, 0,3C, 3A, 3C, 30B og 30C. Det ble laget en mastermix for hver prøve med volumene oppgitt i tabell 4. Mastermixene ble blandet i 0,2 mL eppendorfrør og kjørt på PCR1- maskinen med spesifikasjonene oppgitt i tabell 8.

Tabell 4: Volum (µL) av reagenser for mastermix brukt til syntese av cDNA for 24-timers prøvene i oppsett 1

Mastermix	0B	0C	0,3C	3A	3C	30B	30C
DNasefritt H ₂ O	11,2	12,62	13,75	5,36	5,58	4,64	13,71
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	4	4	4	4
RNA (50ng)	4,8	3,38	2,25	10,64	10,42	11,36	2,29
Totalt	20	20	20	20	20	20	20

48- timers prøvene:

I dette oppsettet ble alle de 12 RNA prøvene tatt med. Det ble brukt 50 ng RNA av hver prøve, hvor det ble laget en mastermix for hver prøve med volumene oppgitt i tabell 5. Mastermixene ble blandet i 0,2 mL eppendorfrør og kjørt på PCR1-maskinen med spesifikasjonene oppgitt i tabell 8.

Tabell 5: Volum (μL) av reagenser for mastermix brukt til syntese av cDNA for 48-timers prøvene i oppsett 1

Mastermix	0A	0,3A	3A	30A
DNasefritt H ₂ O	15,14	13,76	13,92	12,12
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	4
RNA (50ng)	0,86	2,24	2,08	3,88
Totalt	20	20	20	20
Mastermix	0B	0,3B	3B	30B
DNasefritt H ₂ O	15,26	13,76	10,9	12,54
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	4
RNA (50ng)	0,74	2,24	5,10	3,46
Totalt	20	20	20	20
Mastermix	0C	0,3C	3C	30C
DNasefritt H ₂ O	14,81	13,79	14,39	3,62
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	4
RNA (50ng)	1,19	2,21	1,61	12,38
Totalt	20	20	20	20

Oppsett 2:

I dette oppsettet ble følgende prøver tatt med: 0A, 0,3A, 3A, 30A, 0B, 0,3B, 3B og 30B. Det ble brukt 50 ng RNA av hver prøve, hvor det ble laget en mastermix for hver prøve (tabell 6). Mastermixene ble blandet i 0,2 mL eppendorfrør og kjørt på PCR1- maskinen med spesifikasjonene oppgitt i tabell 8.

Tabell 6: Volum (μL) av reagenser for mastermix brukt til syntese av cDNA i oppsett 2

Mastermix	0A	0,3A	3A	30A
DNasefritt H ₂ O	15,39	14,61	13,9	11,52
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	4
RNA (50ng)	0,61	1,39	2,10	4,48
Totalt	20	20	20	20
Mastermix	0B	0,3B	3B	30B
DNasefritt H ₂ O	15,07	14,61	13,17	11,52
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	4
RNA (50ng)	0,93	1,39	2,83	4,48
Totalt	20	20	20	20

Oppsett 3:

Følgende prøver ble tatt med i dette oppsettet: 0A, 0,3A, 3A, 30A, 0B, 0,3B, 3B, 30B, 0C, 0,3C og 30C. Det ble brukt 50 ng RNA av hver prøve, hvor det ble laget en mastermix for hver prøve (tabell 7). Mastermixene ble blandet i 0,2 mL eppendorfrør og kjørt på PCR1- maskinen med spesifikasjonene oppgitt i tabell 8.

Tabell 7: Volum (μL) av reagenser for mastermix brukt til syntese av cDNA i oppsett 3

Mastermix	0A	0,3A	3A	30A
DNasefritt H ₂ O	15,48	14,63	14,19	12,19
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	4
RNA (50ng)	0,52	1,37	1,81	3,81
Totalt	20	20	20	20
Mastermix	0B	0,3B	3B	30B
DNasefritt H ₂ O	14,91	14,45	12,73	11,12
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	4
RNA (50ng)	1,09	1,55	3,27	4,88
Totalt	20	20	20	20
Mastermix	0C	0,3C	30C	
DNasefritt H ₂ O	14,77	14,07	10,34	
qScript cDNA Supermix (Quanta)	4	4	4	
RNA (50ng)	1,23	1,93	5,66	
Totalt	20	20	20	

Tabell 8: Temperatur- og tidsprogram for syntese av cDNA. Denne ble brukt til alle oppsettene.

Temperatur	Tid
25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	hold

2.2.9.3 Kvantitativ real time PCR, Real time qPCR

Etter endt cDNA syntese ble prøvene fortynnet i forholdet 1:5, før de videre ble brukt til qPCR. Mastermix ble laget til hver probe hvor volumet av de ulike reagensene er oppgitt i tabellene under. 18 μL av mastermix og 2 μL av cDNA ble tilsatt

brønnene i et 96- brønners brett (se vedlegg 7.2). Prøvene ble kjørt på Vii7 PCR-maskinen, hvor innstillinger for temperatur og tid ble lagt inn manuelt (tabell 13). Etter endt kjøring analyserte vi resultatene og beregnet delta delta C_q.

Oppsett 1

24- timers prøvene

Tabell 9: Volum (μL) av reagenser for mastermix brukt til qPCR for oppsett 1, 24- timers prøvene

Mastermix	1 prøve	16 prøver
DNase fritt H ₂ O	7	112
Universal PCR MasterMix	10	160
FAM gene specific assay	1	16
Totalt	18	288

48- timers prøvene

Tabell 10: Volum (μL) av reagenser for mastermix brukt til qPCR for oppsett 1, 48- timers prøvene

Mastermix	1 prøve	26 prøver
DNase fritt H ₂ O	7	182
Universal PCR MasterMix	10	260
FAM gene specific assay	1	26
Totalt	18	468

I dette oppsettet kjørte vi totalt 120 prøver; 2 paralleller på 12 prøver med 5 ulike gener. 2 targetgener: *CES1* og *CES2* + 3 referansegener: *GAPDH*, *TBP* og *SI8*. Vi måtte derfor kjøre qPCR på 2 forskjellige brett. Oppsettet for 24- timers prøvene var en prøveoppsett for alle targetgenene. I starten ble det bestemt å fokusere mest på *CES1* og *CES2*. *UGT1A1* ble derfor ikke tatt med i dette oppsettet. I de to siste oppsettene ble det likevel valgt å ta med alle tre targetgenene.

Oppsett 2

Tabell 11: Volum (μL) av reagenser for mastermix brukt til qPCR for oppsett 2

Mastermix	1 prøve	18 prøver
DNase fritt H ₂ O	7	126
Universal PCR MasterMix	10	180
FAM gene specific assay	1	18
Totalt	18	324

Oppsett 3

Tabell 12: Volum (μL) av reagenser for mastermix brukt til qPCR for oppsett 3

Mastermix	1 prøve	24 prøver
DNase fritt H ₂ O	7	168
Universal PCR MasterMix	10	240
FAM gene specific assay	1	24
Totalt	18	432

I dette oppsettet kjørte vi totalt 132 prøver; 2 paralleller på 11 prøver med 6 ulike

gener. 3 targetgener: *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* + 3 referansegener: *GAPDH*, *TBP* og *S18*. Vi kjørte derfor qPCR på to ulike 96- brønner brett.

Tabell 13: Temperatur- og tidsprogram for qPCR

Stage	Temp	Time
Hold	95°C	10 min
40 cycles	95°C	15 sec
	60°C	60 sec

2.2.9.4 Kalkulering av ekspresjonsdata

Etter endt kjøring analyserte vi resultatene, hvor delta delta Cq ble brukt for å kalkulere den relative endringen i genekspresjonen. Formel og Cq -verdiene ble lagt inn i Microsoft Excel og beregningen ble foretatt gjennom denne programvaren. Referansegenene *GAPDH*, *S18* og *TBP* ble brukt til normalisering.

Formelen for delta delta Cq: $2^{\Delta\Delta Cq}$

delta delta Cq($\Delta\Delta Cq$) =

$(Cq_{\text{målgen}} - Cq_{\text{referansegen}})_{\text{prøve}} - (Cq_{\text{målgen}} - Cq_{\text{referanseprøve}})_{\text{nullprøve}}$

(36)

2.2.9.5 PCR- effektivitetstesting

Primerene som ble brukt i denne oppgaven er allerede blitt validert hos produsenten (Life Technology), men vi ønsket likevel å utføre en effektivitetstest på dem.

Det ble laget en fortynningsrekke på fem fortynninger med fortynningen 1:5, hvor 1:5 cDNA fortynningsprøven fra en av RT-qPCR kjøringene ble brukt som originalprøve. Vi valgte den prøven med lavest Cq- verdi fra RT- qPCR kjøringene.

For hver fortynning tok vi ut 10 μ L cDNA og blandet det med 50 μ L DNasefritt vann.

1:5 fortynningsrekken:

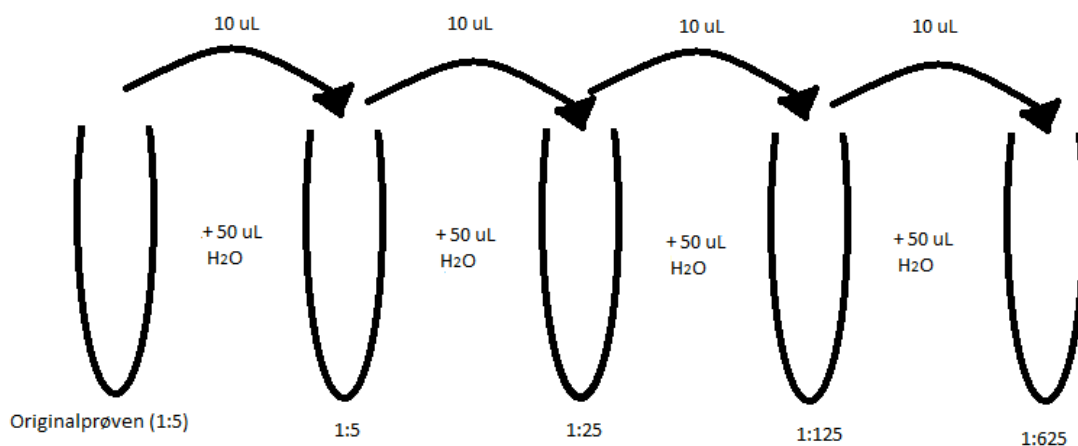
1. Originalprøven (1:5 fortynningen)

2. 1:5 ($1:5^1$)

3. 1:25 ($1:5^2$)

4. 1:125 ($1:5^3$)

5. 625 ($1:5^4$)



Figur 12. Skjematisk oversikt over 1:5 fortynningsrekken med blandingsforholdene.

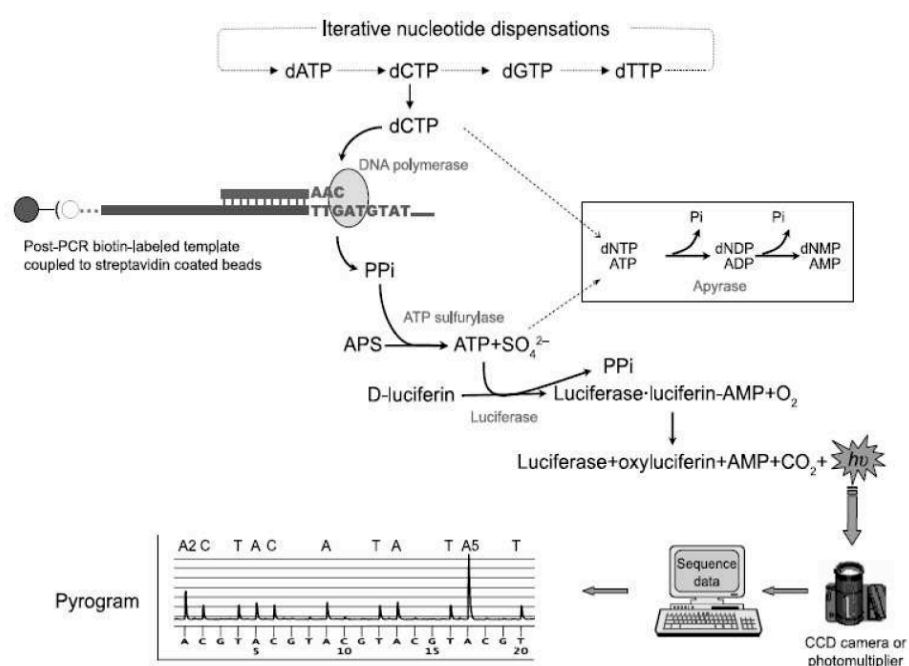
Fortynningsløsningene ble benyttet i et oppsett til kjøring på RT- qPCR med 3 targetgener (*CES1*, *CES2* og *UGT1A1*) og 3 referansegener (*S18*, *GAPDH* og *TBP*). Det ble kjørt to paralleller per prøve, noe som utgjorde til sammen 60 prøver. Man forventet her 2,3 Cq- verdier mellom hver fortykning for å ha perfekt effektivitet. Mastermix ble laget til hvert targetgen hvor volumet av de ulike reagensene er oppgitt i tabell 14. 18 μL av mastermix og 2 μL av cDNA ble tilsatt brønnene i et 96-brønners Brett (se vedlegg 7.3). Prøvene ble kjørt på Vii7 PCR- maskinen, hvor innstillinger for temperatur og tid ble lagt inn manuelt (tabell 13).

Tabell 14: Volum (μL) av reagenser for mastermix brukt til qPCR for effektivitetstesting av primere

Mastermix	1 prøve	12 prøver
Dnase fritt H ₂ O	7	84
Universal PCR MasterMix	10	120
FAM gene specific assay	1	12
Totalt	18	216

2.2.10 Pyrosekvensering

Pyrosekvensering er en DNA- sekvenseringsmetode basert på <<sekvensering via syntese>> prinsippet. Metoden er kvantitativt og baserer seg på deteksjon av lyssignaler som genereres gjennom inkorporering av nukleotider og frigjøring av pyrofosfat.



Figur 13. Skjematiske oversikt over stegene i pyrosekvensering

Reaksjonsløsningen består av enkeltrådede DNA- templat som er biotinmerket, *DNA- polymerase*, *ATP sulfurylase*, *luciferase*, *apyrase*, *adenosine 5'fosforsulfat* (*APS*) og *luciferin*. I starten av pyrosekvenseringen fester sekvenseringsprimeren seg til 3'enden på det biotinmerkede, enkeltrådede DNA- templatet. Fire ulike deoksynukleotid trifosfater (dATP α S, dTTP, dGTP og dCTP) blir separat tilsatt i en bestemt rekkefølge. Hvis tilsatt nukleotid er komplementær til basen i DNA-templatet, vil det skje en inkorporering av nukleotidet til DNA- templatet ved hjelp av DNA- polymerase. For hver gang et nukleotid blir inkorporert vil det frigis en bestemt mengde med pyrofosfat (PPi) som er ekvivalent med mengde inkorporert nukleotid. Ved hjelp av tilstedeværelse av *APS* og *ATP sulfurylase*, blir PPi omdannet til ATP, som videre omdanner luciferin til oxyluciferin ved hjelp av *luciferase*. Dette genererer så utsendelse av et lyssignal, hvor mengde lyssignal som blir sendt ut er proporsjonalt med mengde ATP som blir dannet. Lyssignalet kan så detekteres ved hjelp av et

kamera, hvor resultatene vises som topper i et pyrogram. Topphøyden i pyrogrammet kan si oss noe om mengde nukleotider som er inkorporert i prøven og rekkefølgen av disse. (37)

2.2.10.1 Primer og primerdesign

Primere er korte, syntetiske fragmenter av DNA som brukes for å syntetisere DNA. For at primerne skal kunne binde seg til spesifikke deler av DNA som ønskes amplifisert, må de være designet til å være komplementære med DNA i ønsket område. Siden DNA består av to enkelttråder, er det nødvendig med to ulike primere; en forward primer og en revers primer. Disse binder seg på hver sin side av DNA-trådene og beveger seg mot hverandre. Ved pyrosekvensering er en av primerene biotinmerket, slik at de skal kunne feste seg på sepharose kulene under prøveopparbeidelsen. Valg av riktig primer er en kritisk faktor for metoden og for tolkning av resultatene. Visse betingelser bør derfor følges når man designer primere. Ved bisulfitt pyrosekvensering må primerene være spesifikke for bisulfittbehandlet DNA. (38, 39)

Primerlengden bør være på omkring 18-24 baser. Om primeren er for kort blir den ikke spesifikk nok og det vil være fare for at den kan binde seg til andre steder enn ønsket område av DNA. En for lang primer igjen vil føre til en for høy smeltepunkt (T_m), noe som også er et viktig moment ved primerdesign. Primere som brukes sammen bør heller ikke være komplementære med hverandre og palindromer bør unngås. (40)

Dataprogrammet Genome browser ble brukt for å finne DNA sekvensen til *CES1*, *CES2* og *UGT1A1*. Vi valgte ut bestemte områder av DNA- sekvensen hvor CpG-øyer var lokalisert. DNA- sekvensen ble videre lagt inn i Pyromark Assay Design 2.0 for å designe primere.

2.2.10.2 Testing av primere

For å være sikker på at primerene som ble bestilt fungerte som de skulle, ble det utført en kvalitetstest på dem. Det ble først satt opp PCR med de respektive primerparene. Deretter ble PCR produktet testet for renhet og korrekt fragmentstørrelse ved agarosegelelektroforese.

Følgende primere ble testet ut:

CES2prom1 forward primer (#299), CES2prom1 reverse primer (#300)

CES2prom2 forward primer (#302), CES2prom2 reverse primer (#303)

CES2exon forward primer (#305), CES2exon reverse primer (#306)

UGT1A1 forward primer (#308), UGT1A1 reverse primer (#309)

Tabell 15: Reagenser for PCR metylering

Mix 1	Bruksløs	Final kons	uL
H ₂ O			24
PyroMark PCR Master Mix (gir 1.5mM MgCl ₂)	2x	1x	50
CoralLoad Concentrate	10x	1x	10
Forward primer	10 µM	0,2 µM	2
Reverse primer	10 µM	0,2 µM	2
MgCl ₂	25mM		
Bisulphite conv DNA (10-20 ng)			
Total			88
Mastermix per brønn			24

Tabell 16: Temperatur- og tidsinnstillinger for PCR metylering

Temp	Tid	Cycler	Instr.
95°C	15 min	1	
94°C	30 sek		
56°C	30 sek	45	Thermo
72°C	30 sek		
72°C	10 min	1	
4°C	Hold	1	

Det ble laget 4 forskjellige mastermixer (ett for hvert primer-par), hvor hver mastermix skulle holde til 3 prøver (umetylert, metylert, vannkontroll). Det ble satt av

et overskudd på 1 prøve (totalt nok til 4 prøver). 24 µL av mastermixen ble tilsatt i 0,2 mL PCR- rør, hvor det etterpå ble tilsatt 1 µL av umetylert DNA/ metylert DNA/ RNasefritt vann i de ulike PCR- rørene (Vedlegg 7.4). Etter endt PCR- kjøring ble PCR- produktene kjørt ut på agarose- gelelektroforese.

2.2.10.3 Bisulfitt behandling av DNA

Bisulfitt pyrosekvensering er en metode som brukes for å bestemme metyleringsmønsteret til DNA. DNA ble først behandlet med bisulfitt før det ble PCR amplifisert og sekvensert. Under bisulfitt- behandling blir alle umetylerte cytosiner (C-nukleotider) omdannet til uracil (U- nukleotider), mens de metylerte cytosinene forblir uforandret (fortsatt C-nukleotider). EpiTect Bisulfite Kit (Cat.no. 59104) fra Qiagen ble benyttet, og prosedyren fra produsenten ble fulgt.

Reagensene ble klargjort før oppstart:

- 30 ml etanol (96-100%) ble tilsatt buffer BW, hvor flasken ble vendt på noen ganger før bruk.

- 27 ml etanol (96-100%) ble tilsatt buffer BD. Siden bufferen er sensitiv til CO₂, ble flasken lukket umiddelbart etter tilsetning.

- 310 µL RNasefritt vann ble tilsatt 310 µg carrier RNA (nok til 48 prøver).

Løsningen ble løst og blandet godt gjennom vortexing. (Overskudd av carrier RNA- løsning kan fryses ned i aliquoter (eks. 50 µL) ved 20 °C). Carrier RNA- løsningen ble videre blandet i buffer BL, hvor mengden som ble utblandet var avhengig av hvor mange prøver man hadde (Tabell 17).

Tabell 17. Volum av carrier RNA og buffer BL

Antall prøver	1	4	8	16	24	48
Volum buffer BL	620 µL	2.5 mL	5 mL	10 mL	15 mL	31 mL
Volum carrier RNA- løsning	6.2 µL	25 µL	50 µL	100 µL	150 µL	310 µL

DNA- prøver ble hentet fra fryser og satt til tining. 800 µL RNasefritt vann ble tilsatt pulveret i Bisulfite Mix flasken (1 flaske er nok til 8 prøver). Blandingen ble vortexet

helt til den var fullstendig oppløst. Bisulfitt- reagensene i tabell 18 ble tilsatt i ett 0,2 mL PCR- rør i den rekkefølgen de er listet opp.

Tabell 18: Volum av bisulfitt reagenser

Reagent	Volum per reaksjon (µL)
DNA løsning (1 ng – 2 µg)	20 µL
RNasefritt vann	Variable*
Bisulfit Mix løsning	85
DNA protect buffer	35
Total volum	140

*Totalvolum av DNA-løsning og RNasefritt vann tilsammen må ikke overskride 20µL.

Løsningen i PCR- rørene ble blandet godt sammen. DNA protect buffer skiftet farge fra grønn til blå etter tilsetning av DNA- bisulfitt mix. DNA- bisulfitt konverteringen ble kjørt på PCR maskin 1, hvor temperatur og tidsintervallet ble stilt inn som oppført i tabell 19 nedenfor.

Tabell 19: Temperatur og tid for DNA- bisulfitt konvertering

Steg	Temperatur	Tid
Denaturering	95 °C	5 min
Inkubasjon	60 °C	25 min
Denaturering	95 °C	5 min
Inkubasjon	60 °C	85 min (1h 25min)
Denaturering	95 °C	5 min
Inkubasjon	60 °C	175 min (2h 55min)
Hold	20 °C	-

Opprensning av DNA ble utført etter DNA- bisulfitt behandlingen. PCR- rørene ble sentrifugert lett og innholdet ble overført til 1,5 mL effendorfrør. 560 µL buffer BL ble tilsatt i hver prøve. Løsningen ble vortexet og blandet godt sammen.

Prøveløsningen ble så overført til Epiect spin kolonner.

Kolonnene ble sentrifugert på maks hastighet i 1 minutt, ”flow- through” løsningen ble kastet og kolonnen ble plassert i røret igjen. 500 µL buffer BW ble tilsatt i hver kolonne og sentrifugert på maks hastighet i 1 minutt, ”flow- through” løsningen ble

kastet og kolonnen ble plassert i røret igjen. 500 µL buffer BD ble tilsatt i hver kolonne og inkubert i 15 minutter i romtemperatur (15-25 °C). Kolonnene ble sentrifugert på maks hastighet i 1 minutt, ”flow- through” løsningen ble kastet og kolonnen ble plassert i røret igjen. 500 µL buffer BW ble tilsatt i hver kolonne og sentrifugert på maks hastighet i

1 minutt, ”flow- through” løsningen ble kastet og kolonnen ble plassert i røret igjen. Ytterligere 500 µL buffer BW ble tilsatt i hver kolonne og sentrifugert på maks hastighet i 1 minutt, ”flow- through” løsningen ble kastet og kolonnen ble plassert i røret igjen. Spin- kolonnene ble plassert i nye 2 mL effendorfrør og sentrifugert på maks hastighet i 1 minutt for å fjerne eventuelle væskerester. Spin- kolonnene ble så plassert i nye 1,5 mL effendorfrør, og ble inkubert med åpen lokk i 56 °C på varmeblokk i 5 minutter. 20 µL buffer EB ble tilsatt rett på membranen på spin- kolonnen og sentrifugert på 12.000 rpm i 1 minutt. Effendorfrørene med prøveløsningene ble så fryst ned (-20 °C) for senere bruk i PCR- metylering.

2.2.10.4 PCR- amplifisering

Prøvene fra bisulfitt- behandlingen ble tatt opp fra fryser til tining. Arbeidsark (pyroPCRmetylering.xls) i excel ble fylt inn med riktig antall og prøvenummer for beregning av mengde reagenser som ble tatt i bruk (Tabell 20).

Tabell 20: Mastermix for PCR- amplifisering av bisulfitt behandlet DNA

Mix 1	Bruksløs	Final kons	µL
H ₂ O			8
PyroMark PCR Master Mix (gir 1.5mM MgCl ₂)	2x	1x	12,5
CoralLoad Concentrate	10x	1x	2,5
Forward primer	10 µM	0,2 µM	0,5
Reverse primer	10 µM	0,2 µM	0,5
MgCl ₂	25mM		
Bisulphite conv DNA (10-20 ng)			
Total			24

Mengden som er oppgitt i Tabell 20 er nok for 1 prøve. Mengde for hvert reagens ble derfor ganget med antall prøver, hvor det ble satt av et overskudd på 2 prøver.

Tillagingen av reagenser til PCR- amplifiseringen foregikk i pre-PCR sone (rom

0606023) med kalibrerte pipetter og filterspisser. Mastermixene ble fordelt i 0,2 mL PCR- rør. PCR- rørene ble så tatt med til ”rent rom” (rom 0606022) hvor bisulfitt-behandlet DNA ble tilsatt. Prøvene ble spunnet ned i noen sekunder, før de ble kjørt på PCR maskin 1. Se tabell 21 for temperatur- og tidsinnstillinger.

Tabell 21: Temperatur- og tidsinnstillinger for PCR metylering

Temp	Tid	Cycler	Instr.
95°C	15 min	1	
94°C	30 sek		
56°C	30 sek	45	Thermo
72°C	30 sek		
72°C	10 min	1	
4°C	Hold	1	

Etter PCR- amplifiseringen ble uracil (U) omdannet til thymine (T).

2.2.10.5 Pyrosekvensering

Til pyrosekvenseringen ble instrumentet Pyromark Q24 benyttet. Programmet PyroMark Q24 ble åpnet på datamaskinen inne på PCR- rommet (rom 0606021). En ny kjøring ble dannet ved å trykke på New run (grønn pil). Under punktet Instrument Method ble PyroMark Q24 method 012 valgt. Prøvenavnene slik det ble satt opp i PCR brettet ble skrevet inn i Plate Setup. Brønnene som skulle sekvenseres med et bestemt assay ble markert. På venstremenyen ble riktig assay valgt (dette er avhengig av hvilken primer og hvilket targetgen som benyttes), og med musen ble dette trukket over det markerte området i Plate Setup. Det ble kontrollert at riktig assay og prøvenummer var plassert i riktige brønner. Filen ble lagret på en USB minnepenn, som senere i prosedyren ble satt inn i PyroMark Q24 instrumentet.

Arbeidsarket med volumet av E-mix, S-mix og nukleotidene ble skrevet ut. (Tools-> Pre Run Information-> skriv ut).

Tillaging av reagenser til pyrosekvenseringen foregikk i post- PCR sone (rom 0606054).

Varmebllokken ble slått på og satt på 80 °C, og en plateholder ble lagt på varmebllokken. PCR/kulemix ble blandet i forhold til antall prøver (Tabell 22). Flasken med sepharosekuler ble ristet godt før pipettering og reagensene ble blandet i et 2 mL eppendorfrør. Løsningen ble blandet godt ved å vende litt på det. 70 µL PCR/kulemix ble tilsatt i hver brønn i et 24 brønners brett. 10 µL av PCR- produktene ble deretter tilsatt i brønnene, og sealing ble satt på. PCR- brettet ble satt til risting ved 14 000 rpm i minimum 5 minutter.

Tabell 22: Reagenser for PCR/kulemix (oppgitt i µL)

	Reactions
	1
Sepharose beads	1
Binding Buffer	40
H2O	29
PCR product	10
Total	80

*Mengden som er oppgitt i tabellen er nok til 1 prøve. Mengde for hvert reagens ble derfor ganget med antall prøver, hvor det ble satt av et overskudd på 2 prøver.

Tabell 23: Reagenser for sekvenseringsmix (oppgitt i µL)

Reactions:	1
Stock solution (µM)	10
Working solution (µM)	0,3
Total volume	500
µl sequencing primer	0,75
µl Annealing Buffer	24,25

*Mengden som er oppgitt i tabellen er nok til 1 prøve. Mengde for hvert reagens ble derfor ganget med antall prøver, hvor det ble satt av et overskudd på 2 prøver.

Mens PCR- brettet sto til risting, ble sekvenseringsmixen blandet i et 1,5 mL eppendorfrør (Tabell 23). 25 µL sekvenseringsmix ble tilsatt i brønnene i et PyroMark sekvenseringsbrett, og brettet ble satt i riktig posisjon i PyroMark Vaccum prep workstation. Karene til PyroMark vaccum prep workstation ble fylt med riktige løsninger. Før oppstart av opprensingsprosessen ble filterprobene skylt med vann; vakuumpumpen og vakuomet på filterproben ble slått på. Filterproben ble deretter satt i karet med vann hvor vakuomet ikke ble slått av før alt vannet var blitt sugd opp. Vann ble etterfylt i karet. Da PCR- brettet var ferdig ristet ble det satt i riktig

posisjon i PyroMark vaccum prep workstation, og sealing ble fjernet.

Vakuumpumpen ble slått på igjen og filterproben plassert i PCR- brettet i ca. 10 sekunder. Filterproben ble deretter flyttet til EtOH karet i 5 sekunder. Videre ble det flyttet til denaturation solution i 5 sekunder og videre flyttet til karet med vaskebuffer i 10 sekunder. Filterproben ble løftet opp og holdt vertikalt helt til all væsken var sugd ut. Vakuum på filterproben ble slått av, og filterproben plassert i sekvenseringsbrettet og ristet godt i 10 sekunder. Til slutt ble filterproben flyttet til vannkaret og ristet i 10 sekunder før det ble plassert i parkeringskaret og vakuumpumpen ble slått av. Brettet med sekvenseringsprimere og PCR- fragmenter (sekvenseringsbrettet) ble satt på oppvarmet plateholder på varmeblokk ved 80 °C i 2 minutter. Sekvenseringsbrettet ble deretter avkjølt ved romtemperatur i 5 minutter. Kassetten til pyrosekvenseringskjøringen ble klargjort og renses. Kamrene og undersiden av kassetten ble skylt 2 ganger med destillert vann. Kamrene ble igjen fylt med destillert vann og det ble dannet et trykk ved å holde en finger over hvert kammer, slik at en tynn, loddrett vannstråle ble observert. Kassetten ble fylt med riktig volum av E-mix, S-mix og nukleotider i følge Pre Run Information skjemaet. Kassetten og sekvenseringsbrettet ble satt inn i PyroMark Q24 instrumentet. USB- minnepennen ble satt inn i maskinen, riktig fil ble valgt og Run- knappen trykket. Etter endt kjøring ble resultatet lagret på USB- minnepennen, hvor den senere ble åpnet i PyroMark Q24 programmet på dataen inne på PCR- rommet (rom 0606021).

Etter kjøring ble karene i PyroMark vaccum prep workstation tømt og skylt med vann. Kassetten ble også skylt godt med destillert vann.

For oversikt over basesekvensene til primerene og tilsetningsrekkefølge; se vedlegg 7.7 og 7.8.

Resultatene ble tolket og validert, Prøver hvor tallene kom dårlig ut pga. for lav topp forårsaket av for lav DNA- konsentrasjon eller der andre eventuelle feil oppsto under prosedyren, ble utelukket. Tallene som var gode nok ble brukt til å beregne metyleringsgraden (i %), hvor metyleringsgraden for de ulike konsentrasjonene ble sammenlignet med hverandre for å se om det hadde skjedd en forandring i metyleringen eller ikke.

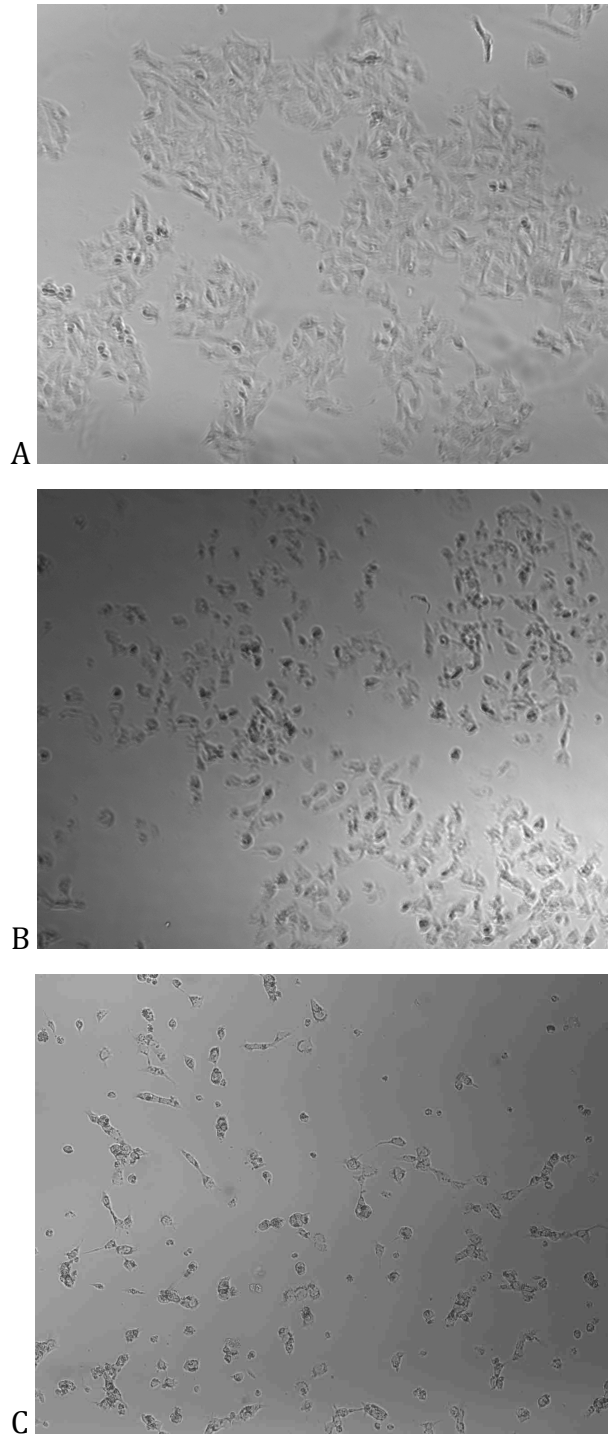
Gjennomsnittet av parallellene på hver konsentrasjon ble utregnet ved de ulike CpG-setene. Kontroller på 100% metylert DNA og umetylert DNA ble brukt til å vurdere kvaliteten av pyrosekvenseringen.

2.2.11 Agarose- gelelektroforese

Metoden agarose- gelelektroforese ble i denne oppgaven brukt for å påvise DNA/PCR produkter i prøvene. Til dette ble det laget en 1% agarosegel: 1 g agarosepulver ble veid opp i veieskip og overført til en glasskolbe (rom 0606045). Kolben ble så tatt med til rom 0606054 hvor 100 ml TBP- buffer ble tilsatt. Løsningen ble varmet opp i mikrobølgeovn helt til alt pulveret hadde løst seg opp. Litt papir ble satt i kolbeåpningen slik at væsken ikke fordampet under oppvarmingen. Etter noe nedkjøling ble løsningen tilsatt 10 μ L Gelstar Nucleid Acid Gel Stain og blandet godt sammen. Løsningen ble helt i et ”agarosekar”, hvor kammeret ble satt i og små luftbobler ble fjernet. Vi lot agarosegelen stå og stivne i ca. 30 minutter før PCR-prøvene ble tilsatt. 10 μ L av hver PCR- prøve ble tilsatt og som kontrollprøve ble plus ladder DNA brukt. Elektroforesen foregikk i ca. 45 minutter ved 120 volt. For observering og deteksjon av DNA/PCR produkt ble gelen belyst med UV-lys.

3 Resultater

3.1 Observering av cellene i mikroskop



Figur 14. HepG2- celler ble sådd ut i et 12- brønners Brett med et celleantall på ca. 200.000 celler per brønn. Etter inkubasjon i 24 timer, ble cellene stimulert med Irinotecan i opptil 48 timer. Mikroskopbildene i figur 15 er tatt av cellene før og etter stimulering med Irinotecan 30 μ M. Figur A: cellene før stimulering, figur B: cellene 24 timer etter stimulering, figur C: cellene 48 timer etter stimulering. Forstørrelsesglass 4x ble brukt for alle tre bildene.

Det ble observert en forskjell på cellenes utseende etter stimulering med irinotecan ved de ulike konsentrasjonene (Figur 14). Ved de laveste konsentrasjonene (0 uM og 0.3 uM) var cellene avlange i formen, mens cellene med de høye konsentrasjonene (3 uM og spesielt 30 uM) hadde blitt noe rundere i formen og fått en mørkere svart farge. Det ble også observert et mindre celleantall ved de høye konsentrasjonene, noe som indikerer at stimulering med irinotecan kan ha stoppet opp celleveksten og/eller har ført til celledød. Forskjellen var mest tydelig hos 48-timersprøvene.

For flere bilder av cellene 24 timer og 48 timer etter stimulering; se vedlegg 7.9.

3.2 Kvantifisering av DNA og RNA

Absorbansen ved 260 nm og 280 nm ble brukt til å bestemme renheten til DNA og RNA. Forholdet 260/280 skal være på ~1.8 for DNA og nærmere ~2.0 for RNA. I tilfeller hvor begge ratioene er lave, kan dette indikere på tilstedeværelse av proteiner, fenoler eller annen kontaminasjon i prøven.

260/230 ratioen er en annen parameter som måler renheten av nukleinsyrer. Denne verdien er som regel høyere enn 260/280 ratioen, og ligger som regel mellom 2.0-2.2 for både DNA og RNA. Prøver som gir lavere verdier enn dette indikerer tilstedeværelse av kontaminerende stoffer som absorberer ved 230 nm. Ett eksempel på dette er guanidine HCl som blir brukt ved DNA isolasjon. (41)

Oppsett 1

260/280 ratioen for RNA i 24-timersprøvene var dårlige. Verdiene varierte mye med både lave og høye verdier. 48-timersprøvene viste bedre resultater hvor nesten alle prøvene hadde verdier på ~2.0. Når det gjaldt DNA varierte verdiene mye mer; fra verdier helt nede i 1.5 til verdier helt opp til 4.5.

260/230 ratioen var dårlige for både DNA og RNA, spesielt for DNA hvor alle tallene var under 0.4. Det ser ut som om renheten til DNA ikke var tilfredstillende, og konsentrasjonene var også her nokså lav.

Oppsett 2

260/280 ratioen for både DNA og RNA var gode hvor nesten alle prøvene hadde verdier ~ 2.0 . DNA- prøven med dårligste 260/280 ratio var på 1.73, mens 260/280 ratioen for dårligste RNA- prøve hadde en verdi på 1.81.

Når det kom til 260/230 ratioen hadde RNA- prøvene varierende verdier. Flere av verdiene hadde en ratio på over 1.0 hvor et par av dem hadde en ratio ~ 2.0 . Enkelte av prøvene hadde likevel en ratio på langt under 1.0.

Alle 260/230 ratioene for DNA- prøvene kom dårlig ut, hvor alle verdiene lå på under 0.68. DNA- prøven med dårligste verdi hadde en så lav verdi som 0.10.

Oppsett 3

I oppsett 3 var 260/280 ratioen for både DNA og RNA veldig gode. Hos RNA- prøvene var nærmest alle verdiene ~ 2.0 . Flere av DNA- prøvene hadde også verdier på $\sim 1.8-2.0$. Kun en DNA- prøve hadde litt lavere verdi med ratioen 1.55.

260/230 ratioen var lik som i oppsett 2 med litt varierende verdier for RNA og lave verdier for DNA.

Selv om 260/230 ratioen for prøvene ikke var så gode, ser man likevel først og fremst på 260/280 ratioen og konsentrasjonen på prøvene når de blir tatt i bruk i RT-qPCR og pyrosekvensering. Kvaliteten på DNA- og RNA prøvene så ut til å være greie, men flere av prøvene hadde litt for lave konsentrasjoner.

3.3 Real-time RT- qPCR

HepG2 celler ble sådd ut på et 12 brønners- brett med et celleantall på ca. 200.000 celler per brønn. Etter inkubasjon i 24 timer, ble cellene stimulert med Irinotecan i 24 timer (første oppsett) og 48 timer (resten av oppsettene) før DNA og RNA ble isolert. Videre ble RNA analysert ved RT qPCR for å studere genekspressjonen til cellene. Tre referansegener ble brukt til normalisering, og ddCq ble beregnet for prøvene med følgende formel:

Formelen for delta delta Cq: $2^{-\Delta\Delta Cq}$

Delta delta Cq ($\Delta\Delta Cq$) =

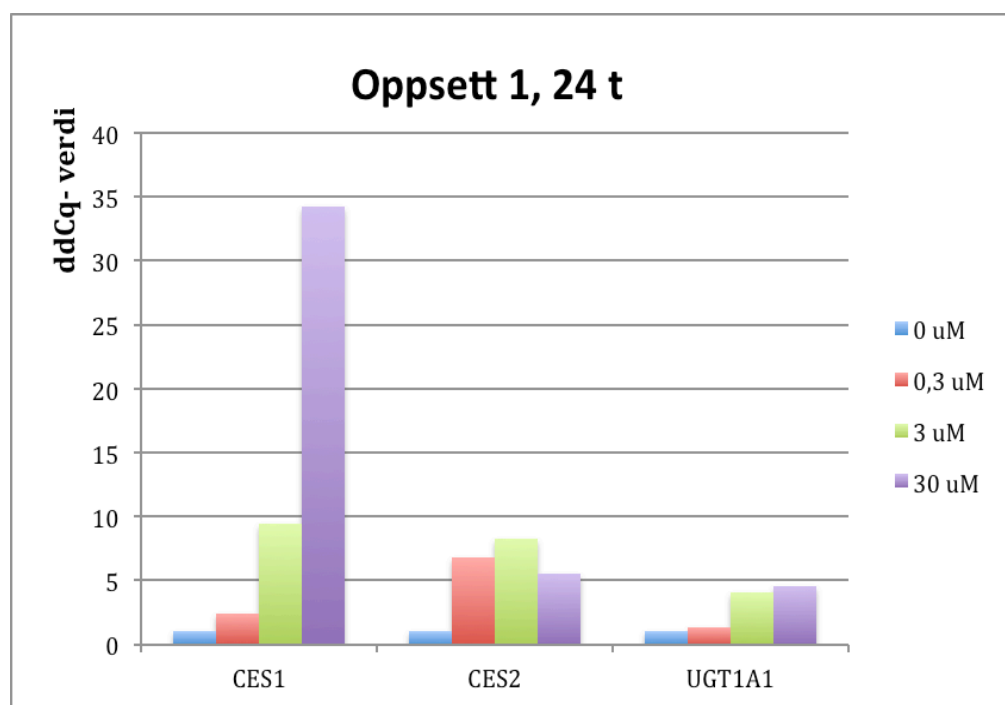
$(Cq_{\text{målgen}} - Cq_{\text{referansegen}})_{\text{prøve}} - (Cq_{\text{målgen}} - Cq_{\text{referanseprøve}})_{\text{nullprøve}}$

Detaljerte tabeller med en oversikt over Cq- verdiene normalisert med hvert enkelt referansegene er lagt ved som vedlegg 7.11. Under kommer tabeller og diagrammer av ddCq- verdiene hvor Cq av gjennomsnittet av alle tre referansegene har blitt brukt til normalisering.

Oppsett 1, 24 timers prøvene

Tabell 24: ddCq – verdiene for oppsett 1, 24 timers prøvene

Kons.	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	Ref.	CES1	CES2	UGT1A1
0 μM	30,377	30,74	34,709	27,608			
0,3 μM	30,931	29,771	36,103	29,41	2,3751	6,8258	1,3268
3 μM	28,645	29,198	34,182	29,107	9,3891	8,2306	4,0727
30 μM	28,035	31,04	35,276	30,364	34,249	5,4869	4,5598

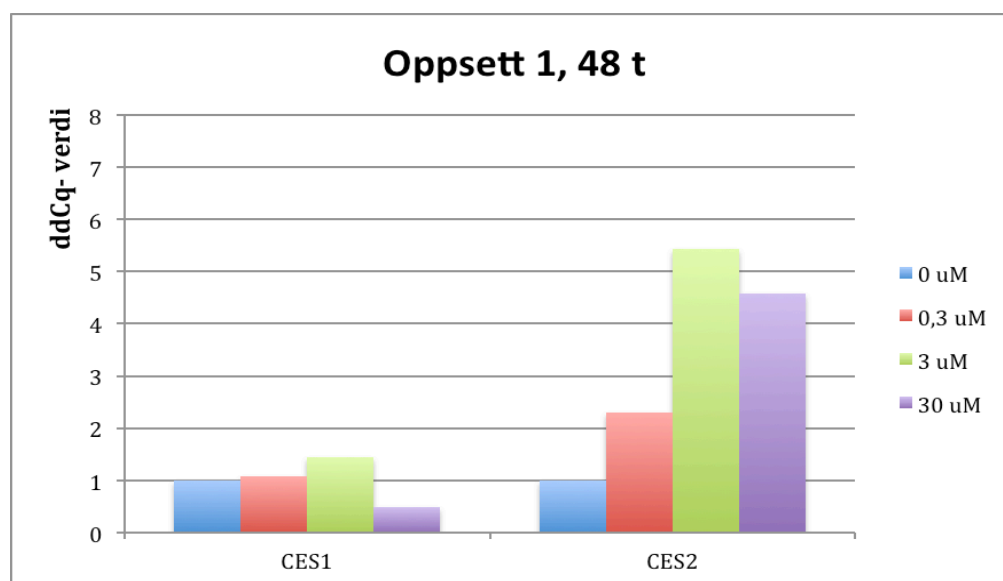


Figur 15. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* i HepG2- celler, stimulert med Irinotecan i konsentrasjoner opp til 30 μM i oppsett 1 (24 timers- prøver) normalisert med gjennomsnittet av alle tre referansegene.

Oppsett 1, 48 timers prøvene

Tabell 25. ddCq – verdiene for oppsett 1, 48 timers prøvene

Konsentrasjon	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	Ref.	CES1	CES2
0 μM	26.738	29.123	21,995		
0.3 μM	26.9615	28.249	22,319	1,072144	2,29421
3 μM	27.3257	27.801	23,1158	1,44703	5,43695
30 μM	28.7183	27.866	22,933	0,48555	4,57889

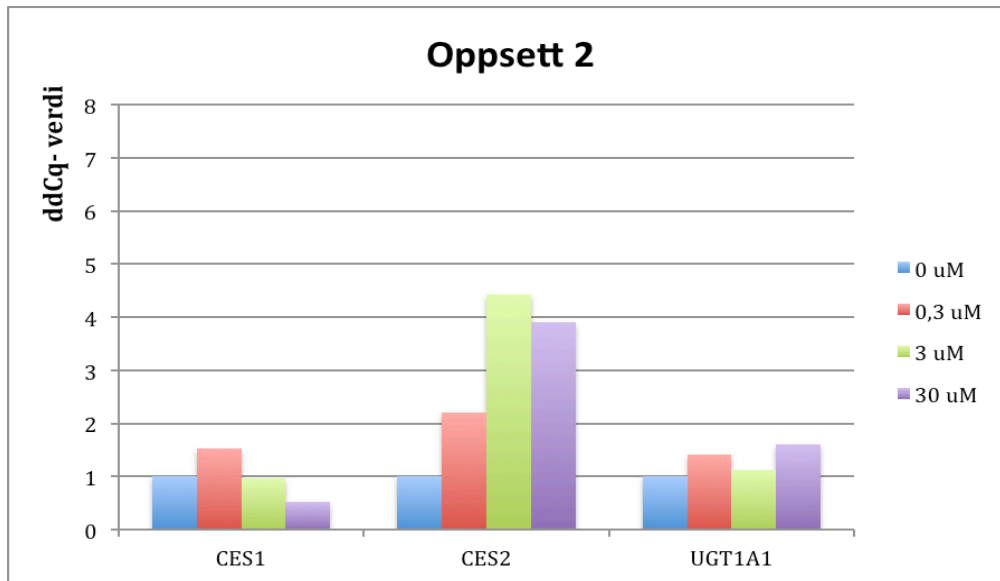


Figur 16. ddCq – verdiene for *CES1* og *CES2* i HepG2- celler, stimulert med Irinotecan i konsentrasjoner opp til 30 μM i oppsett 1 (48 timers- prøver) normalisert med gjennomsnittet av alle tre referansegene. UGT1A1 ble ikke analysert i dette oppsettet.

Oppsett 2

Tabell 26: ddCq – verdiene for oppsett 2

Konsen- trasjon	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	Ref.	CES1	CES2	UGT1A1
0 μM	25,6445	28,3645	35,0685	21,874			
0.3 μM	25,525	27,7245	35,0685	22,3718	1,5340	2,2004	1,4121
3 μM	26,1175	26,6525	35,327	22,307	0,9726	4,4229	1,1285
30 μM	26,977	26,8065	34,79	22,279	0,5257	3,8987	1,6060

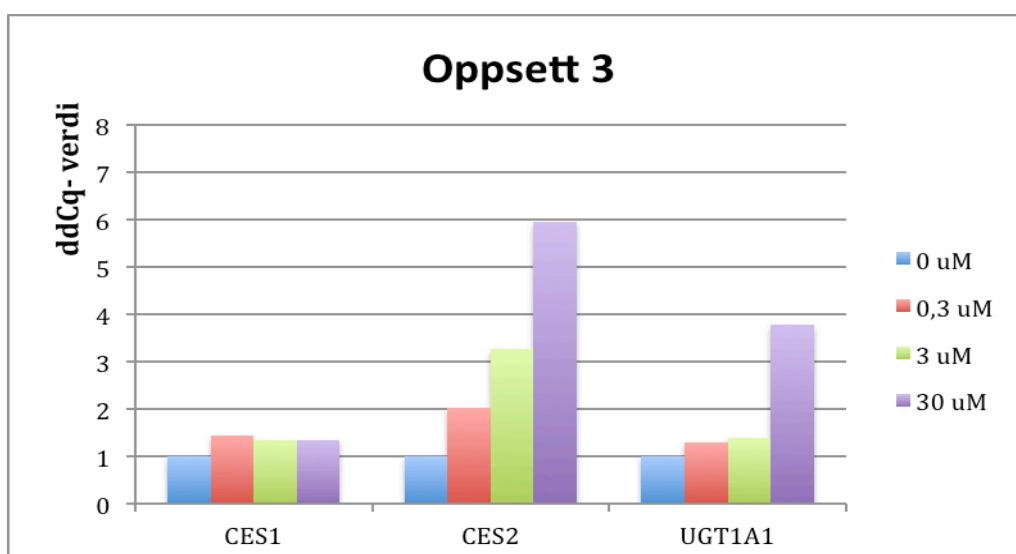


Figur 17. ddCq – verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* i HepG2- celler, stimulert med Irinotecan i konsentrasjoner opp til 30 uM i oppsett 2, normalisert med gjennomsnittet av alle tre referansegene.

Oppsett 3

Tabell 27: ddCq – verdiene for oppsett 3

Konsen- trasjon	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	Ref.	CES1	CES2	UGT1A1
0 μ M	27,507	28,402	35,491	21,919			
0,3 μ M	27,281	27,694	35,425	22,235	1,4559	2,0335	1,3031
3 μ M	27,395	27,007	35,335	22,234	1,3444	3,2716	1,3860
30 μ M	28,03	26,794	34,538	22,882	1,3566	5,9422	3,7737



Figur 18. ddCq– verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* i HepG2- celler, stimulert med Irinotecan i konsentrasjoner opp til 30 uM i oppsett 3, normalisert med gjennomsnittet av alle tre referansegene.

Førti-åtte timers prøvene i oppsett 1, 2 og 3 ble sammenlignet med hverandre og standardavviket, feilmarginen og konfidensintervallene (se vedlegg 7.13) ble regnet ut ved hjelp av Microsoft Excel. Vi unnlot å ta med resultatene for 24 timers prøvene fra det første oppsettet i denne sammenligningen, siden disse skilte seg godt fra de tre andre oppsettene. En annen årsak til hvorfor vi valgte å gå videre med 48- timers prøvene var for å sikre flere celledelinger, noe som gir økt sjans for å detektere en eventuell metyleringseffekt. For *CESI* var det kun 0,3 μM prøven som gav en signifikant endring i genekspressjon i forhold til nullprøven. Denne prøven hadde en konfidensintervall på [1,074 - 1,633], noe som ligger utenfor konfidensintervallet [1,0 - 1,0] for nullprøven. For *CES2* så man en signifikant endring i genekspressjon for alle konsentrasjonene, hvor disse endringene med konfidensintervallene [2,026-2,325], [3,151-5,603] og [3,629-5,984] var mye tydeligere enn hos *CESI*. Den største endringen ble observert hos de to høyeste konsentrasjonene 3 μM og 30 μM . Hos *UGT1A1* viste 0,3 μM - og 3 μM - prøvene signifikante endringer i genekspressjon med konfidensintervallene [1,079 - 2,457] og [1,349 - 4,745]. Genregulerings- mønsteret mellom de ulike referansegene for det samme targetgenet var nokså godt samsvarte. Hos *CESI* var det f.eks. en oppregulering i ddCq- verdi hos alle tre referansegene da genet ble stimulert med 0,3 μM , og videre en nedregulering ved stimulering med 30 μM .

3.3.1 PCR- effektivitetstesting

En PCR- effektivitetstest sier noe om hvor godt et gitt PCR- oppsett amplifiserer templatet gjennom en enkel sykel, og er også et mål på hvor godt primere detekterer cDNA. Den gjennomsnittlige Cq- verdien for hvert triplikat ble utregnet, og ved hjelp av Microsoft Excel ble det laget en standardkurve for hver primer (se vedlegg 7.14 og 7.15). Microsoft Excel ble også benyttet for beregning av regresjonsverdien (R_2) og stigningstallet (Y).

Ved hjelp av disse faktorene ble effektiviteten utregnet ved formelen:

$$E = -1/\text{stigningstallet}$$

Tabell 28: Effektiviteten til primerene

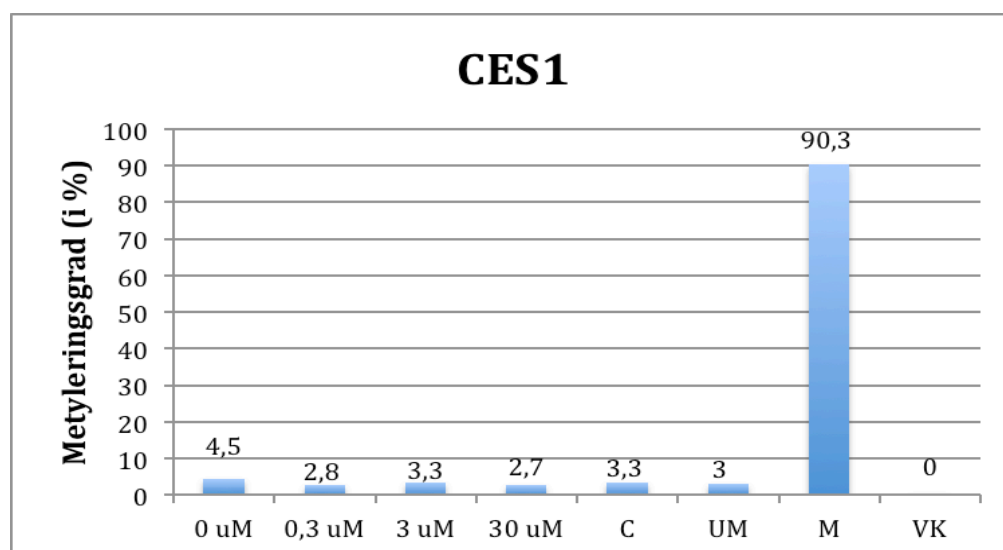
Target-/Referanseggen	Effektivitet	Effektivitet (i %)
CES1	1,78	89
CES2	1,91	96
GAPDH	1,80	90
S18	1,74	87
TBP	2,10	105

Tabellen viser effektiviteten både i tall og i prosent for de ulike primerene som ble testet ut.

Optimalt er det ønskelig med en effektivitet på 2,0 eller 100%. Ut ifra resultatene gav ingen av primerene optimalt effektivitet, hvor verdier på både lavere og høyere enn 2,0 ble observert. Laveste effektivitet var på 1,74 med en tilsvarende effektivitet i prosent på 87%. For TBP ble det observert en effektivitet på 2,10 med en tilsvarende effektivitet i prosent på 105%. Det ble likevel valgt å stole på produsenten (Life Technology), som har validert og konkludert med at primerene hadde en god nok kvalitet og effektivitet.

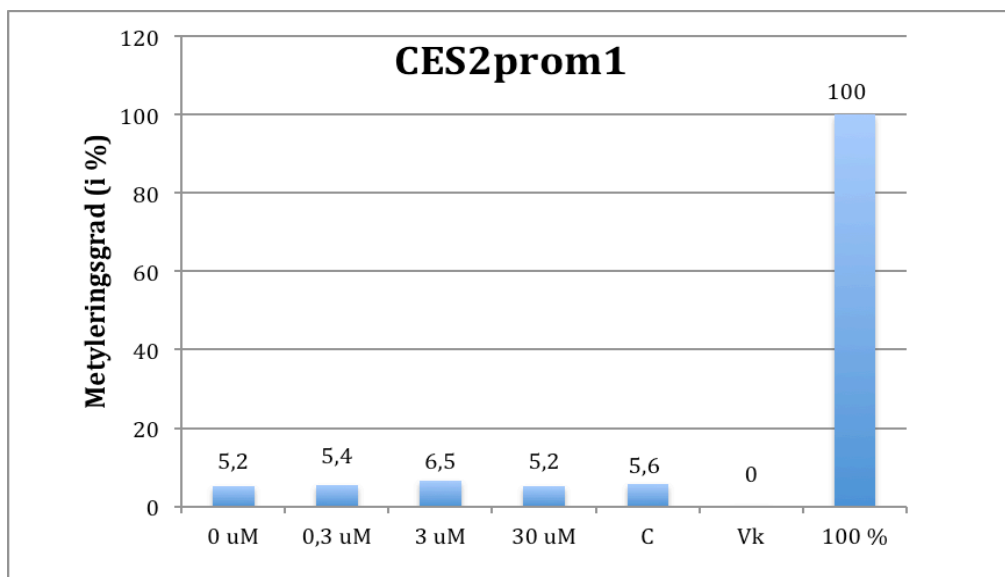
3.4 Pyrosekvensering

HepG2- celler ble sådd ut på 12 brønners- brett med et celleantall på ca. 200.000 celler per brønn. Etter inkubasjon i 24 timer, ble cellene stimulert med Irinotecan i 48 timer før DNA og RNA ble isolert. Videre ble DNA kjørt gjennom pyrosekvensering for å studere promotor-metyleringsmønsteret til cellene. Resultatene ble tolket og validert, hvor metyleringsgraden for de ulike konsentrasjonene ble sammenlignet med hverandre for å se om det har skjedd en forandring i metyleringen eller ikke.

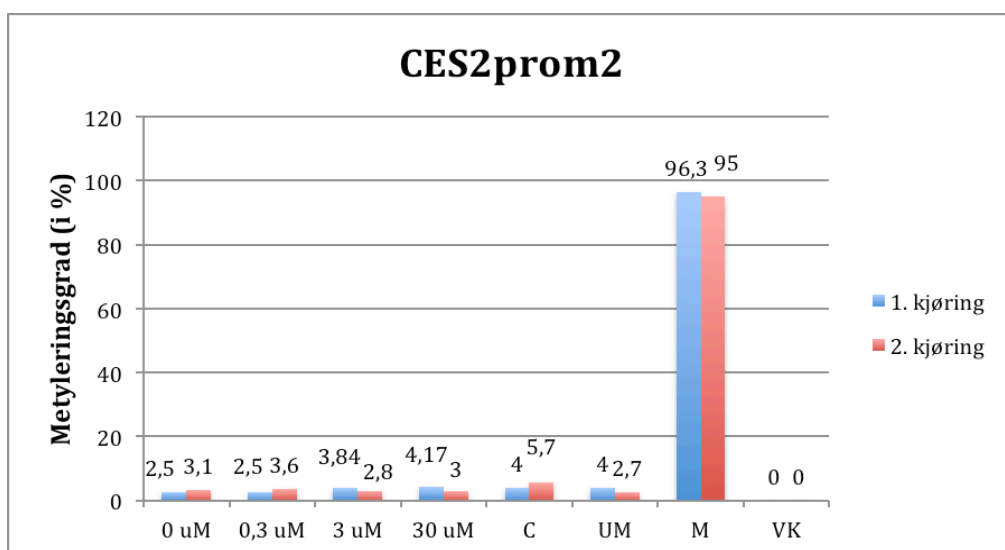


Figur 19. Metyleringsgrad av *CES1* etter stimulering av HepG2- celler med Irinotecan konsentrasjoner opp til 30 μ M i 48 timer. Det ble utført 2 kjøringene med *CES1*, men resultatene fra den første kjøringen var så dårlige at vi valgte å utelukke disse fra resultatene. Figuren viser resultater fra den andre kjøringen. C= kontroll, UM= umetylert kontroll, M= metylert kontroll, Vk= vannprøve

Irinotecan gav ikke noe signifikant endring i metyleringsnivå for *CES1*, forskjellen som ble observert mellom de ulike konsentrasjonene var bare et par %- verdier fra hverandre. Metyleringsgraden hos alle prøver analysert er veldig lave, langt under 10%. Både den umetylerte- og den metylerte kontrollen viste fine verdier. Vannprøven viste heller ikke noe form for metylering, noe som indikerer at både den positive og den negative prøven har fungert bra.

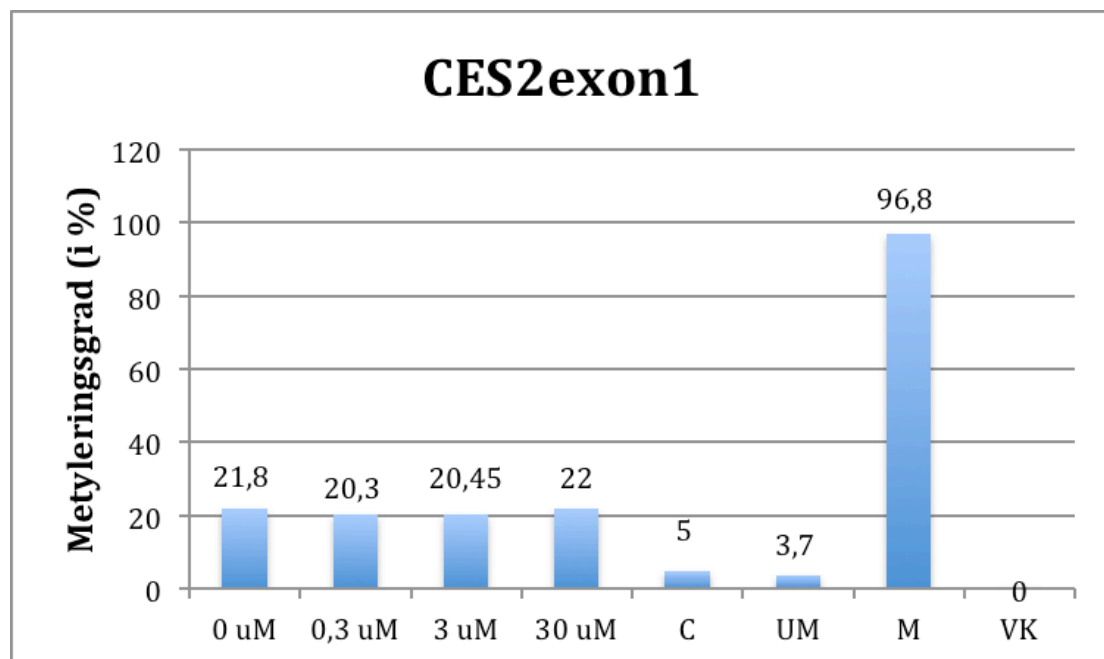


Figur 20. Metyleringsgrad av *CES2prom1* etter stimulering av HepG2- celler med Irinotecan konsentrasjoner opp til 30 μ M i 48 timer. Stolpediagrammet som viser 100% helt til høyre er bare lagt inn som en illustrasjon (prøvene i forhold til 100%) og er ikke en del av selve oppsettet. C= kontroll, Vk= vannkontroll



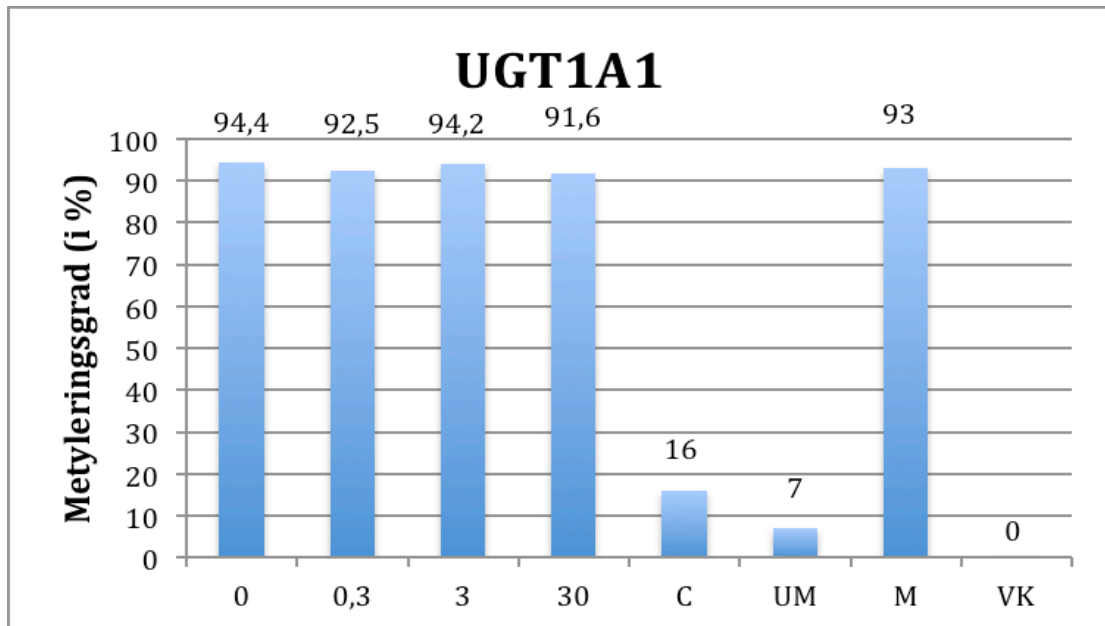
Figur 21. Metyleringsgrad av *CES2prom2* etter stimulering av HepG2- celler med Irinotecan konsentrasjoner opp til 30 μ M i 48 timer. Begge kjøringene er angitt. C= kontroll, UM= umetylert kontroll, M= metylert kontroll, Vk= vannkontroll

Metyleringsresultatene for *CES2*promotor- prøvene (*CES1*prom1 og *CES2*prom2) viste heller ingen endring i metyleringsnivå etter Irinotecan behandling av cellene. Her ligger metyleringsgradene også veldig lavt, nesten fullstendig umetylert. På grunn av metodologiske problemer ble det ikke tatt med positive prøver for *CES2*prom1, men den negative kontrollen var godkjent. For *CES2*prom2 var alle tre kontrollene i orden.



Figur 22. Metyleringsgrad av *CES2*exon1 etter stimulering av HepG2- celler med Irinotecan konsentrasjoner opp til 30 μ M i 48 timer. C= kontroll, UM= umetylert kontroll, M= metylert kontroll, Vk= vannkontroll

Metyleringsgraden for *CES2*exon1 var litt høyere enn kjøringene for *CES1* og *CES2*prom. Det ble likevel ikke observert noen endring i metyleringsgrad mellom de ulike konsentrasjonene i dette genet. Siden nullprøven også hadde en høyere metyleringsgrad er det lite sannsynlig at den forhøyede metyleringsgraden her skyldes stimulering med Irinotecan. Alle tre kontrollene var fine.



Figur 23. Metyleringsgrad av *UGT1A1* etter stimulering av HepG2- celler med Irinotecan konsentrasjoner opp til 30 μ M i 48 timer. C= kontroll, UM= umetylert kontroll, M= metylert kontroll, Vk= vannkontroll

Metyleringsgraden for ustimulert *UGT1A1* viste høy verdi (nærmere 100%), noe som tilsier at store deler av *UGT1A1* allerede er metylert i HepG2- cellene. Det ble ikke observert noen endring i metyleringsgrad mellom de ulike konsentrasjonene er observert. Kontrollene hadde fine verdier.

4 Diskusjon

DNA- metylering er et av de mest studerte mekanismene innenfor epigenetikk. Flere studier i forskjellige kreftceller har vist at DNA- metylering har ført til en undertrykkelse av genuttrykket, og at genet dermed blir skrudd av. Dette forekommer når det skjer en hypermetylering på CpG- setene på promotor- områdene i genet. (42) Det har lenge vært kjent at det er en assosiasjon mellom DNA- metylering og flere typer kreft, der i blant kolorektalkreft, som er blant de hyppigste kreftformene i verden i dag. (43, 44) *CES1* og *CES2* har en sentral rolle i aktiveringen av Irinotecan, et legemiddel som blir ansett som viktig og sentralt i behandlingen av blant annet kolorektalkreft. Variabiliteten i enzymenes aktivitet og ekspresjon har en stor innvirkning på effekten og toksisiteten for CPT-11. (45, 46)

I denne oppgaven har vi brukt RT-qPCR og pyrosekvensering til å studere legemidlers effekt på promotor-metyleringen og mRNA transkripsjonen av Irinotecans metaboliserende enzymer; *CES1*, *CES2* og *UGT1A1*. RT- qPCR viste en liten forandring i mRNA transkripsjonen, mens pyrosekvensering ikke viste noe signifikant endring i promotor- metyleringsmønsteret hos disse enzymene.

4.1 Prøveopparbeidelsen

Prøveopparbeidelsen var en stor del av prosessen for å kunne få vellykkede analyseringer av både RT- qPCR og pyrosekvenseringen. Aseptisk arbeidsteknikk og krav om sterilitet var faktorer som ble opprettholdt gjennom hele forsøket. For å redusere faren for degradering av nukleinsyrer ble det tatt i bruk sterile hansker og nukleasefritt utstyr. Ulike rom ble benyttet for de ulike prosessene for å minimere faren for kontaminasjon. Dette er spesielt viktig for pre- PCR og post- PCR prosessene, hvor bruk av samme rom kan medføre høy grad av kontaminasjon fra tidligere PCR- produkter. For å få best mulig sammenlignbare resultater ble de samme metodene og prosedyrene, med de samme betingelsene brukt for alle de ulike prøveoppsettene.

4.2 Valg av metoder

4.2.1 RT- qPCR og Pyrosekvensering

RT- qPCR er en effektiv amplifiseringsmetode som i flere tilfeller blir brukt til å kvantifisere mRNA. Dens nøyaktighet og sensitivitet er en av grunnene til at den har blitt valgt framfor andre mRNA- kvantifiseringsmetoder som f.eks. in situ- hybridisering og Northern blotting. I forhold til RT-qPCR har disse metodene ikke like god nøyaktighet og er ofte mer tungvinte og mer tidskrevende å utføre. (47) RT-qPCR kan utføres både som et enkelt ett-trinns steg hvor hele prosessen skjer under ett og samme steg, eller som et to- trinnssteg hvor revers transkripsjon av mRNA til cDNA, og selve qPCR kjøringen skjer i to ulike steg. I denne oppgaven ble to- trinnssteget valgt siden det gir muligheten til optimalisering av de to ulike stegene hver for seg og ofte fører til et bedre resultat. I tillegg gir dette også muligheten til å studere/kvantifisere flere gener fra samme cDNA- pool.

Det er flere metoder som kan benyttes til å studere DNA- metyleringsmønsteret i mammalske celler, der i blant Sanger sekvensering, pyrosekvensering og masse spektroskopi. I denne oppgaven ble pyrosekvensering valgt pga. dens mange fordeler; i tillegg til å være enkel i bruk, tidssparende, stor grad av fleksibilitet, er metoden i seg selv kvantitativt. De to andre metodene har vist seg å være mindre fleksible, mer tidskrevende og dyrere i drift. (40) Foruten de nevnte fordelene for de ulike metodene, ble valget av metodene også basert på relevante review artikler og tidligere oppgaver utført av andre studenter innenfor det samme forsknings-området. (21, 48-50)

For at metodene skulle være så spesifikke og effektive som mulig ble det stilt ulike krav til flere av faktorene. Faktorer som temperatur, mengde reagenser brukt (f.eks. $MgCl_2$) og ikke minst valg av primere er i stor grad med på å påvirke hvor godt reaksjonene går. Temperaturen bestemmer hvor spesifikke primerene binder seg til DNA- templatet. For lav temperatur vil kunne gi opphav til uspesifikke produkter ettersom primere her vil ha muligheten til å binde seg til mer uspesifikke områder. Det er derfor ønskelig å ha en høy nok temperatur til at amplifikasjonen er spesifikk til det området man ønsker, uten at temperaturen blir så høy at effektiviteten faller pga. at primeren ikke klarer å binde seg til DNA- templatet.

Ettersom DNA- polymerasen trenger $MgCl_2$ for å aktiveres, påvirker $MgCl_2$ også spesifisiteten og effektiviteten til amplifiseringsreaksjonen. En for lav konsentrasjon vil føre til dårlig effektivitet, mens en for høy konsentrasjon kan føre til amplifisering av både spesifikke og uspesifikke produkter.

Kjøringsprogram, temperaturinnstillinger og mengde reagenser brukt i denne oppgaven ble også bestemt ut i fra produsentenes spesifikasjoner.

4.2.2 Valg av Irinotecans konsentrasjoner til cellestimulering

De tre konsentrasjonene brukt til å stimulere cellene med ble bestemt ut ifra en tidligere review artikkel som benyttet de samme konsentrasjonene under et annet forsøk, der IL-6 ble brukt til å teste ut genekspressjonen til *CES1* og *CES2*. (51)

Vi sammenlignet også dosen sammen med en annen artikkel som hadde brukt et konsentrasjonsintervall for Irinotecan på 5-1000ng/mL. Sammenlignet med denne artikkelen, lå en av konsentrasjonene (0,3 uM) brukt i denne oppgaven innenfor dette intervallet, mens de to andre lå på et litt høyere nivå. (52)

4.2.3 HepG2- celler som *in-vitro* modellsystem

I denne oppgaven ble HepG2- celler brukt som et modellsystem for å teste ut legemiddelstimulering av leverceller *in-vitro*, og for å studere hvordan diverse gener i disse levercellene påvirkes av dette. Siden Irinotecan er et kreftlegemiddel som utfører sin effekt i tarmen, stiller man spørsmålet om HepG2- celler, som er leverceller er pålitelig å bruke i denne sammenhengen. Vi har valgt å bruke HepG2- celler som et modellsystem i denne oppgaven siden selve omdannelsen av Irinotecan til aktiv metabolitt skjer i leveren. I tillegg er HepG2- celler et godt og mye brukt modellsystem med sine mange leverspesifikke funksjoner. (53)

Det tyder også på at *CES1* og *CES2* er høyt uttrykt i denne typen cellelinje, mens *UGT1A1* er lavt uttrykt. Dette gir oss muligheten til å kunne studere både eventuelle hypo- og hypermetyleringer samtidig. (16, 44, 48)

In-vitro modellsystemer har blitt opprettet for blant annet å minske bruken av *in-vivo* studier hos dyr. Ved bruk av *in-vitro* modeller er det likevel viktig å vurdere hvor

godt dette modellsystemet samsvarer med det som skjer *in vivo* i kroppen. Det er ønskelig med et modellsystem med de samme egenskaper og betingelser som det modellsystemet skal etterligne i kroppen. Selv om HepG2 cellelinjer er et godt modellsystem for leverceller er det viktig å kunne være kritisk til om effekten som sees i HepG2 celler faktisk også kan skje *in vivo* i humane leverceller. Man kan ikke med sikkerhet si at tilsvarende effekt vil kunne skje *in vivo*, men *in-vitro* modellsystemer er et viktig utgangspunkt når det er ønskelig å teste ut genregulering i humane celler, testing ved toksisitet eller ved andre tilsvarende tilfeller. (26)

4.3 Valg av target- og referansegener

4.3.1 Valg av Targetgener

Targetgenene som skulle testes ut i denne oppgaven var *CES1* og *CES2*, som begge er sentrale i metabolismeringen av Irinotecan. I tillegg har vi valgt å ta med *UGT1A1*, som er ansvarlig for omdannelsen av den aktive metabolitten SN-38 til den inaktive metabolitten SN-38G. Et annet enzym, *CYP3A4*, er også involvert i metabolismeringen av Irinotecan, og bidrar til omdannelsen av metabolittene APC og NPC. Vi har likevel valgt å se bort i fra *CYP3A4* i denne oppgaven, siden den biologiske aktiviteten til APC har vist seg å være svakere enn for SN-38. (54)

Det hadde likevel vært spennende å se på *CYP3A4* i andre sammenhenger, f.eks. ved bruk av Irinotecan sammen med andre legemidler som er avhengig av *CYP3A4*.

Bruker man f.eks. legemidler som metaboliseres via *CYP3A4* og/eller *UGT1A1* kan disse være med på å inhibere oksidasjonen og/eller konjugasjonen til CPT-11. (55)

4.3.2 Valg av Referansegener

Referansegener eller bedre kjent som husholdningsgener i litteraturen, ble brukt i denne oppgaven for å korrigere for eventuelle variasjoner i forsøket. Et krav til referansegener er at de i stor grad ikke skal påvirkes av forsøksprosedyren. De er blant annet med på å korrigere for variasjoner i RNA-kvalitet, RNA-kvantitet, forskjeller i utbytte i RT-steget, og andre eventuelle variasjoner i prøveoppbeidelsen (f.eks. ved pipettering). (47, 56)

Ut fra tidligere oppgaver fra andre studenter og fra relevante review artikler ble tre referansegener valgt ut til normalisering i RT-qPCR oppsettene. To av referansegenene (*TBP* og *GAPDH*) hadde et uttrykk på lik nivå som for begge målgenene (*CES*- genene), mens *SI8* hadde en litt lavere Cq- verdi område. Likevel er denne verdien ikke så lav at den gikk utenfor det relevante området. Alle tre referansegenene, spesielt *GAPDH*, har blitt mye brukt i andre forsøk. (44, 47, 57)

Alle tre referanse-genene viste seg til å være stabile. Selv om referansegenene gav litt variasjoner under kjøringene, hadde de nokså lik variasjonsmønster. Cq- verdiene for de ulike referansegenene var også godt samsvarte mellom de ulike oppsettene, hvor verdiene lå i det samme området.

4.4 Forandring i morfologi og celledødelighet

HepG2- celler ble sådd ut i medie og inkubert i 24 timer før de ble stimulert med Irinotecan i 48 timer. Det ble brukt tre ulike konsentrasjoner av Irinotecan (0 uM, 0.3 uM, 3 uM og 30 uM). Bilder ble tatt før og etter stimulering. Bildene viste en forandring i cellemorfologi, hvor cellene hadde endret seg både i form og størrelse ved de ulike konsentrasjonene av Irinotecan. Bildene tatt før stimulering viste et godt samsvar mellom cellene hvor alle så nokså like ut, noe som tilsier at de hadde et likt utgangspunkt. Cellene som ble stimulert med de høyeste konsentrasjonene av Irinotecan (3 uM og 30 uM) hadde blitt mer runde og innskumpet i formen. Fargen på disse cellene hadde også blitt en del mørkere, nærmere svarte. Cellene som ikke ble behandlet med Irinotecan (0 uM prøven), hadde en mer avlang form hvor cellene ikke viste tegn på innskumpning. Det så også ut som om celledødeligheten også var høyere hos de høyeste konsentrasjonene, hvor det ble observert et færre celleantall i brønnene. I det første oppsettet ble det også tatt bilder 24 timer etter stimulering. Bildene viste en tydeligere forskjell mellom cellene ved de ulike konsentrasjonene hos 48 timers- prøvene sammenlignet med 24- timers prøvene.

Yang et al. (ref.43) viste også en forandring i cellemorfologi da HepG2 celler ble stimulert med Irinotecan. Forskjellen i disse forsøkene i forhold til våre, var at halvparten av disse cellene i tillegg ble tilsatt IL-6, et substrat som har vist å kunne hemme aktiviteten til både *CES1* og *CES2*. Cellene stimulert med Irinotecan uten tilsetning av IL-6 viste en rund og innskumpet form, mens cellene ved tilsetning av IL-6 hadde en større og litt mer avlang form. Cellene uten IL-6 tilsetning hadde

også blitt mer svarte i fargen, noe som indikerer på celledskade og dødelighet. (51) Økt celledødeligheten og forandring i morfologi viser at Irinotecan gir ønsket effekt.

4.5 mRNA transkripsjonsforandringer ved RT- qPCR

RT- qPCR ble i denne oppgaven brukt til å studere mRNA transkripsjonen til *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* ved stimulering av kreftlegemidlet Irinotecan, for å se om mRNA-uttrykket endret seg etter legemiddelstimuleringen. Dette ble utført også for å se om det var noen sammenheng mellom metyleringsmønsteret og gen- transkripsjonen. Studier har vist at endringer i gen- transkripsjon kan være assosiert med endringer i DNA- metylering, altså at hypo-/hypermetylering kan gi høyere/lavere transkripsjon. (48, 58)

Med formelen: $2^{-\Delta\Delta Cq}$

delta delta Cq($\Delta\Delta Cq$) =

$(Cq_{\text{målgen}} - Cq_{\text{referansegen}})_{\text{prøve}} - (Cq_{\text{målgen}} - Cq_{\text{referanseprøve}})_{\text{nullprøve}}$

ble Microsoft Excel brukt til å beregne ddCq – verdier for de ulike targetgenene, hvor verdiene ble normalisert med ulike referansegener. Gjennomsnittet av Cq- verdiene av tre paralleller ble brukt for hver konsentrasjon. ddCq- verdiene og grafene fra Excel viser en forandring i genekspressjon ved de ulike konsentrasjonene, hvor genuttrykkene både ble oppregulert og nedregulert. Konfidensintervaller ble så brukt for å se om stimulering med Irinotecan gav signifikant endring i genekspressjon hos de ulike genene. *CES2* viste en signifikant endring i genekspressjon ved alle konsentrasjonene av Irinotecan, og ekspressjonen så ut til å være forhøyet.

En forhøyet ekspressjon hos *CES2* vil kunne føre til økt omdannelse av Irinotecan til SN-38 (aktive metabolitt). Dette vil kunne føre bedre effekt hos pasienter, men også en fare for økt toksisitet. Det kunne være interessant å studere hvor stabil denne økningen er og når den eventuelle økningen kommer etter et doseinntak.

Hos *CES1* og *UGT1A1* var den signifikante endringen ikke like omfattende. *CES1* viste kun signifikant endring ved stimulering med 0,3 uM Irinotecan, der forskjellen bare var på grensen til å være signifikant. Denne endringen gav en økt genekspressjon. En studie viser at de ulike *CES*- enzymene blir uttrykt i ulike nivåer i humane leverceller. (59)

Dette stemmer godt med våre resultater da det så ut som om *CES1* og *CES2* ble uttrykt i ulik grad. Hos *UGT1A1* fant vi signifikant økt ekspresjon for både 0,3 uM og 3 uM prøvene, hvor endringene viste seg å være oppregulering av genekspresjon. Dette vil kunne føre til en høyere aktivitet for *UGT1A1* som igjen vil gi økt metabolisering av SN-38 om til inaktiv metabolitt. Dette kan være ugunstig ved at det kan føre til en dårligere legemiddeleffekt hos pasienter. På den andre siden kan dette også være gunstig for enkelte når det kommer til bivirkninger som f.eks. neutropeni (mangel på neutrofile granulocytter) og diaré, som en del pasienter uheldigvis får.

(60)

Siden genreguleringsmønsteret hos *CES1* og *UGT1A1* var så varierende under de ulike oppsettene er det vanskelig å vite om endringen i ekspresjonen her skyldes at de faktisk er uttrykt i ulike nivåer eller om det rett og slett bare var et tilfældighet.

4.6 Promotor- metyleringsforandringer ved Pyrosekvensering

Promotor- metyleringsmønsteret hos *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* ble undersøkt ved pyrosekvensering etter stimulering med Irinotecan hos HepG2- celler. Irinotecan er et legemiddel som skal virke cytotoxisk på kreftceller. Studier har vist at selv legemidler kan føre til metyleringsforandringer i et gen. Vi ønsket derfor å finne ut om Irinotecan i seg selv kan føre til metyleringsforandringer hos *CES1*, *CES2* og *UGT1A1*.

I Imai et al. (ref.27) og Hori et al. (ref.48) sine review artikler kom det fram at DNA-metylering er involvert i *CES1* sin genekspresjon i human lever- og nyreceller.

Behandling av HEK293- celler (nyreceller) med 5-aza-dC, et demetylerende agent, førte til en økt ekspresjon av *CES1* i disse cellene. *CES1* er vanligvis nesten fullstendig metylert (lav genekspresjon) hos HEK293 celler, mens det i HepG2 er nesten fullstendig umetylert. (27, 48)

UGT1A1 har høy grad av metylering i flere typer leverceller. En idé var å finne ut om Irinotecan kunne virke demetylerende på *UGT1A1* (gi nedsatt metyleringsnivå i dette genet), og om dette kunne føre til en økt ekspresjon hos *UGT1A1*.

Det har blitt antydnet at genekspresjonsnivået hos *UGT1A1* i kreftceller kan være med på å bestemme kjemosensitiviteten til Irinotecan. (43) Genetisk polymorfisme har lenge vært en kjent årsak til ulik genekspresjon hos *UGT1A1* og andre gener.

Nylige observasjoner viser at andre mekanismer også kan være med på å endre ekspresjonen i et gen. Epigenetiske mekanismer som DNA- metylering har blitt ansett å være blant de viktigste mekanismene som har en kritisk rolle i progresjonen av kolorektalkreft. (16, 44)

Gagnon et al. (ref.44) utførte et forsøk hvor UGT1A1 ble behandlet med en DNA metyltransferase inhibitor med demetylerende effekt. Dette resulterte i et økt ekspresjon hos *UGT1A1*, og støtter dermed teorien om at ekspresjon av dette genet er regulert ved metylering. En annen studie har også vist at demetylering av *UGT1A1* var assosiert med nedsatt kjemosensitivitet i kolorektalkreftcellene. (61)

Pyrosekvensering viste ingen forandring i metyleringsmønster hos noen av disse tre genene etter stimulering med legemiddel. Ut i fra resultatene fant vi at *CES1* og *CES2* nesten var fullstendig umetylerte i HepG2 celler, mens *UGT1A1* viste seg å være nesten fullstendig metylert. Metyleringsmønsteret viste seg også å være annerledes for de ulike områdene i genet, hvor eksonområdet hos *CES2* så ut til å ha en høyere grad av metylering enn promotorområdet. Dette kan være med på støtte teorien om at forskjellige områder i et gen kan være metylert i ulik grad.

4.7 Sammenheng mellom metyleringsmønster og gentranskripsjon

Det har tidligere blitt påvist en sammenheng mellom metyleringsmønsteret og gentranskripsjonen i ulike gener. (44, 62) I denne oppgaven ble ingen klare sammenhenger mellom metyleringsmønsteret og gentranskripsjonen hos de ulike genene funnet. En økning i gentranskripsjon ble ikke assosiert med noen endring i metyleringsmønsteret i disse genene. Det ser ut som at det her kan være andre mekanismer enn DNA- metylering som kan ha ført til denne endringen i gentranskripsjon. Det som likevel var spennende å se var samsvaret mellom metyleringsgraden og gentranskripsjonen hos de ulike genene. *CES1* og *CES2* som begge hadde lav grad av metylering (langt under <10%), hadde en nokså høy gentranskripsjonsnivå (Cq verdier på 25-28). *UGT1A1* som derimot viste seg å være nesten fullstendig metylert (nærmere 100%) hadde en mye lavere gentranskripsjonsnivå (Cq verdier på 34-35).

4.8 Metodologiske utfordringer

Eksperimenter går sjelden nøyaktig som planlagt og underveis i oppgaven dukket det opp en del utfordringer som måtte løses. I starten hadde vi problemer med konsentrasjonen og kvaliteten på DNA, hvor DNA- konsentrasjonen var for lav og renheten for dårlig. Det ble prøvd ut flere ulike opprensingsprosesser for å se om DNA- renheten ble noe forbedret. Vi utførte DNA- isoleringen av prøvene våre blant annet med metoder som var basert på sentrifugefilterkolonne og DNA- felling, hvor hensikten var å fjerne avfallstoffer som kunne forstyrre DNA. Resultatene viste dessverre ikke noe forbedring av DNA- renheten. For å sjekke om det faktisk var DNA tilstede i prøvene våre og for å utelukke eventuelle feil ved DNA isoleringen, ble DNA- prøvene kjørt ut på agarose- gel. Agarose-gelen viste fine bånd og indikerte tilstedeværelse av DNA i prøvene. Likevel prøvde vi også et annet DNA- isoleringskit, hvor DNA og RNA ble isolert separat og ikke i samme prosedyre slik som tidligere benyttet metode.. DNA- renheten ble litt forbedret, men ikke mye så vi valgte å gå tilbake til den gamle prosedyren. Etter et par runder med isolering, ble konsentrasjonen og renheten til DNA litt forbedret. På grunn av dårlig DNA kvalitet fikk vi en del mislykkede pyrosekvenseringskjøringer, hvor noen av kjøringene måtte forkastes pga. lave/umålbare pyrogrammer. Vi fikk også flere ganger problemer hvor hele analyser viste blank, der det ikke kom noen topp for verken E-mix, S- mix og de tilsatte nukleotidene. En av tilfellene skyldes en feil ved kassetten brukt i tilsetningen, hvor det viste seg til at den var tett. Ellers har vi også hatt tekniske problemer med enkelte maskiner og utstyr under oppgaven og kjøringene.

4.9 Veien videre

Videre studier er nødvendig for å kjenne bedre til metyleringsmønsteret og genreguleringen til *CES* ved legemiddelstimulering. Det er kjent at metyleringsendringer skjer i selve celledelingen, og at det kanskje må flere celledelinger til for at man skal kunne se noe forandring i genreguleringen. Med tanke på dette kan det være en idé å se om det kunne ha skjedd en større forandring ved stimulering av Irinotecan (med lav konsentrasjon) over et lengre tidsintervall. Det som også kunne være spennende å se på er om det kunne ha skjedd en forandring i metyleringsmønsteret til *CES*- genene ved stimulering av et annet legemiddel enn Irinotecan. Eksempler på legemidler kan være blant annet clopidogrel og dabigatran, som også blir metabolisert av *CES*.

5 Konklusjon

Legemiddelstimulering med Irinotecan hos HepG2- celler endret gentranskripsjonsnivået i *CES1*, *CES2* og *UGT1A1*. Endringen var størst hos *CES2* og litt mindre omfattende hos *CES1* og *UGT1A1*. Ingen forandringer ble funnet i metyleringsmønsteret hos de ulike genene etter stimulering med Irinotecan. Det ble heller ikke funnet noen sammenheng mellom endring i metyleringsmønster og gentranskripsjonsnivå i disse genene. Det viste seg likevel å være en korrelasjon mellom metyleringsgrad og gentranskripsjonsnivå, hvor høy metyleringsgrad gav lav gentranskripsjons-nivå og motsatt. Stimulering av HepG2- celler med Irinotecan gav en endring i cellemorfologi og celledødelighet, der det viste seg at cellene ble mindre og celleantallet redusert. Dette viser at Irinotecan har en negativ effekt på disse cellene. Det er per i dag blitt gjort lite metyleringsstudier på *CES*- gener. Flere studier er derfor nødvendig for en bedre forståelse av metylerings- mønsteret hos disse genene og for å eventuelt avklare om legemidler kan ha en effekt på metyleringsmønsteret eller ikke.

6 Litteraturliste

1. Norsk, Legemiddelhåndbok. G2 Farmakokinetikk og doseringsprinsipper [updated 27.03.2013].
Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/88526>.
2. Slørdal L, Spigset O. Grunnleggende farmakokinetikk- Distribusjon. Tidsskr Nor Lægeforen 2005;125:1007 – 8.
3. Ivanov M, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Epigenomics and interindividual differences in drug response. Clinical pharmacology and therapeutics. 2012;92(6):727-36.
4. Bernard JP, Opdal MS, Khiabani H. Generelle farmakodynamiske prinsipper. Tidsskr Nor Lægeforen 2006;126:2107 – 9.
5. Lindpaintner K. Pharmacogenetics and the future of medical practice. British Journal of Clinical Pharmacology. 2002;54(2):221-30.
6. Ma Q, Lu AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. Pharmacological reviews. 2011;63(2):437-59.
7. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. DNA and Chromosomes. Essential Cell Biology. 3. ed: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2010. p. 171-8.
8. Cooper GM. The Eukaryotic Cell Cycle. 2000. In: The Cell: A Molecular Approach [Internet]. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>.
9. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature. 2004;429(6990):457-63.
10. Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nature reviews Genetics. 2010;11(3):204-20.
11. Huang K, Fan G. DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: an emerging systematic view. Regenerative medicine. 2010;5(4):531-44.
12. Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature. 2009;462(7271):315-22.
13. Ghavifekr Fakhr M, Farshdousti Hagh M, Shanehbandi D, Baradaran B. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. Genetics Research International. 2013;2013:9.
14. Thorstensen T. Epigenetikk – alt ligger ikke i genene. GENialt. 2010;nr.2/2010.
15. Merali Z, Ross S, Pare G. The pharmacogenetics of carboxylesterases: CES1 and CES2 genetic variants and their clinical effect. Drug metabolism and drug interactions. 2014;29(3):143-51.

16. Laizure SC, Herring V, Hu Z, Witbrodt K, Parker RB. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy*. 2013;33(2):210-22.
17. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2008;13(2):412-31.
18. Xie FW, Peng YH, Chen X, Chen X, Li J, Yu ZY, et al. Regulation and expression of aberrant methylation on irinotecan metabolic genes CES2, UGT1A1 and GUSB in the in-vitro cultured colorectal cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2014;68(1):31-7.
19. Felleskatalogen. Irinotecan Hospira [updated 19.11.2013]. Available from: <http://www.felleskatalogen.no/medisin/irinotecan-hospira-hospira-560278>.
20. Sai K, Saito Y, Tatewaki N, Hosokawa M, Kaniwa N, Nishimaki-Mogami T, et al. Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2010;70(2):222-33.
21. Okumura M, Iwakiri T, Takagi A, Hirabara Y, Kawano Y, Arimori K. Hepatocyte growth factor suppresses the anticancer effect of irinotecan by decreasing the level of active metabolite in HepG2 cells. *Biochemical pharmacology*. 2011;82(11):1720-30.
22. Petitprez A, Poindessous V, Ouaret D, Regairaz M, Bastian G, Guerin E, et al. Acquired irinotecan resistance is accompanied by stable modifications of cell cycle dynamics independent of MSI status. *International journal of oncology*. 2013;42(5):1644-53.
23. Nyce J. Drug-induced DNA hypermethylation and drug resistance in human tumors. *Cancer research*. 1989;49(21):5829-36.
24. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990;262(4):56-61, 4-5.
25. PrimerDesign, Ltd. Beginner's guide to Real- Time PCR 2008. Available from: http://www.primerdesign.co.uk/assets/files/beginners_guide_to_real_time_pcr.pdf.
26. Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2003;31(8):1035-42.
27. Imai T, Hosokawa M. Prodrug approach using carboxylesterases activity: catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue. *Journal of Pesticide Science*. 2010;35(3):229-39.
28. Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*. 2013;518(2):335-45.

29. Dehn PF, White CM, Conners DE, Shipkey G, Cumbo TA. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2004;40(5-6):172-82.
30. Mersch-Sundermann V, Knasmuller S, Wu XJ, Darroudi F, Kassie F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. 2004;198(1-3):329-40.
31. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology*. 2009;40(10):1512-5.
32. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):611-22.
33. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*. 2006;1(3):1559-82.
34. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*. 2005;29(3):151-9.
35. Life, Technologies. Basic Principles of RT-qPCR, Introduction to RT-qPCR. Available from:
<https://http://www.lifetechnologies.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/basic-principles-rt-qpcr.html>.
36. SABiosciences. Introduction To Real - Time Quantitative PCR (qPCR). Available from: [http://www.sabiosciences.com/manuals/seminars/qPCR Introduction April 2012.pdf](http://www.sabiosciences.com/manuals/seminars/qPCR%20Introduction%20April%202012.pdf).
37. Lundeberg J. PYROSEQUENCING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. 2004. 2004;19(2).
38. Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC research notes*. 2008;1:54.
39. Biotage. Guidelines for PCR set-up and primer design SNP 2014. Available from:
<http://www.danyel.co.il/FileServer/b7ce78db01ea1dca35494a2c09d93cb8.pdf>.
40. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature protocols*. 2007;2(9):2265-75.
41. Scientific, Thermo. 260/280 and 260/230 Ratios. Available from:
[http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop 1000-&NanoDrop 8000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf](http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf).
42. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*. 2010;70:27-56.
43. Coppede F. Epigenetic biomarkers of colorectal cancer: Focus on DNA methylation. *Cancer letters*. 2014;342(2):238-47.

44. Gagnon J-F, Bernard O, Villeneuve L, Têtu B, Guillemette C. Irinotecan Inactivation Is Modulated by Epigenetic Silencing of UGT1A1 in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(6):1850-8.
45. Tanimoto K, Kaneyasu M, Shimokuni T, Hiyama K, Nishiyama M. Human carboxylesterase 1A2 expressed from carboxylesterase 1A1 and 1A2 genes is a potent predictor of CPT-11 cytotoxicity in vitro. *Pharmacogenetics and genomics*. 2007;17(1):1-10.
46. Vanhoefer U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Rustum YM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(5):1501-18.
47. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(4):856-62.
48. Hori T, Hosokawa M. DNA methylation and its involvement in carboxylesterase 1A1 (CES1A1) gene expression. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2010;40(2):119-28.
49. Stormo C, Kringen MK, Lyle R, Olstad OK, Sachse D, Berg JP, et al. RNA-sequencing analysis of HepG2 cells treated with atorvastatin. *PloS one*. 2014;9(8):e105836.
50. Stormo C, Kringen MK, Grimholt RM, Berg JP, Piehler AP. A novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) splice variant with an alternative exon 1 potentially encoding an extended N-terminus. *BMC molecular biology*. 2012;13:29.
51. Yang J, Shi D, Yang D, Song X, Yan B. Interleukin-6 alters the cellular responsiveness to clopidogrel, irinotecan, and oseltamivir by suppressing the expression of carboxylesterases HCE1 and HCE2. *Molecular pharmacology*. 2007;72(3):686-94.
52. Chen X, Peer CJ, Alfaro R, Tian T, Spencer SD, Figg WD. Quantification of irinotecan, SN38, and SN38G in human and porcine plasma by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to hepatic chemoembolization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2012;62:140-8.
53. Castell JV, Jover R, Martinez-Jimenez CP, Gomez-Lechon MJ. Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2006;2(2):183-212.
54. Santos A, Zanetta S, Cresteil T, Deroussent A, Pein F, Raymond E, et al. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(5):2012-20.
55. Haaz MC, Rivory L, Riche C, Vernillet L, Robert J. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A and drug interactions. *Cancer research*. 1998;58(3):468-72.

56. Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;345(2):646-51.
57. Crea F, Giovannetti E, Cortesi F, Mey V, Nannizzi S, Gallegos Ruiz MI, et al. Epigenetic mechanisms of irinotecan sensitivity in colorectal cancer cell lines. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(7):1964-73.
58. Tekpli X, Zienolddiny S, Skaug V, Stangeland L, Haugen A, Mollerup S. DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;131(7):1509-16.
59. Sanghani SP, Quinney SK, Fredenburg TB, Sun Z, Davis WI, Murry DJ, et al. Carboxylesterases expressed in human colon tumor tissue and their role in CPT-11 hydrolysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(13):4983-91.
60. Marsh S, Hoskins JM. Irinotecan pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2010;11(7):1003-10.
61. Xie FW, Peng YH, Wang WW, Chen X, Chen X, Li J, et al. Influence of UGT1A1 gene methylation level in colorectal cancer cells on the sensitivity of the chemotherapy drug CPT-11. *Biomedicine & pharmacotherapy =Biomedecine & pharmacotherapie*. 2014;68(7):825-31.
62. Tekpli X, Landvik NE, Anmarkud KH, Skaug V, Haugen A, Zienolddiny S. DNA methylation at promoter regions of interleukin 1B, interleukin 6, and interleukin 8 in non-small cell lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2013;62(2):337-45.

7 Vedlegg

7.1 Uttesting av referansegener

Prøveoppsett i 96- brønners brettet for uttesting av referansegener

	1	2	3	4	5	6
A	CES1 prøveA	18s prøveA	GAPDH prøveA	TBP prøveA	GUSB prøveA	PPIB prøveA
B	CES1 prøveA	18s prøveA	GAPDH prøveA	TBP prøveA	GUSB prøveA	PPIB prøveA
C	CES1 kontrollA	18s kontrollA	GAPDH kontrollA	TBP kontrollA	GUSB kontrollA	PPIB kontrollA
D	CES1 kontrollA	18s kontrollA	GAPDH kontrollA	TBP kontrollA	GUSB kontrollA	PPIB kontrollA
E	CES1 prøveB	18s prøveB	GAPDH prøveB	TBP prøveB	GUSB prøveB	PPIB prøveB
F	CES1 prøveB	18s prøveB	GAPDH prøveB	TBP prøveB	GUSB prøveB	PPIB prøveB
G	CES1 kontrollB	18s kontrollB	GAPDH kontrollB	TBP kontrollB	GUSB kontrollB	PPIB kontrollB
H	CES1 kontrollB	18s kontrollB	GAPDH kontrollB	TBP kontrollB	GUSB kontrollB	PPIB kontrollB

7.2 qPCR

7.2.1 96- brønners oppsett for qPCR for 24- timers prøvene.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1 0B	C1 0B	C2 0B	C2 0B	U 0B	U 0B	U-C 0B	U-C 0B	G 0B	G 0B	TBP 0B	TBP 0B
B	C1 0C	C1 0C	C2 0C	C2 0C	U 0C	U 0C	U-C 0C	U-C 0C	G 0C	G 0C	TBP 0C	TBP 0C
C	C1 0,3C	C1 0,3C	C2 0,3C	C2 0,3C	U 0,3C	U 0,3C	U-C 0,3C	U-C 0,3C	G 0,3C	G 0,3C	TBP 0,3C	TBP 0,3C
D	C1 3A	C1 3A	C2 3A	C2 3A	U 3A	U 3A	U-C 3A	U-C 3A	G 3A	G 3A	TBP 3A	TBP 3A
E	C1 3C	C1 3C	C2 3C	C2 3C	U 3C	U 3C	U-C 3C	U-C 3C	G 3C	G 3C	TBP 3C	TBP 3C
F	C1 30B	C1 30B	C2 30B	C2 30B	U 30B	U 30B	U-C 30B	U-C 30B	G 30B	G 30B	TBP 30B	TBP 30B
G	C1 30C	C1 30C	C2 30C	C2 30C	U 30C	U 30C	U-C 30C	U-C 30C	G 30C	G 30C	TBP 30C	TBP 30C

C1= CES1, C2= CES2, U= UGT1A1, U-C= UGT1A1 kontroll, G= GAPDH

7.2.2 96- brønners oppsett for qPCR for 48- timers prøvene. Brett nummer 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C
B	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C
C	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C
D	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C
E	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C
F	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C
G	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C
H	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C

C1= CES1, C2= CES2, G= GAPDH

7.2.3 96- brønners oppsett for qPCR for 48- timers prøvene. Brett nummer 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	3C	30A	30B	30C
B	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s	18s
	0A	0B	0C	0,3A	0,3B	0,3C	3A	3B	30A	3C	30B	30C

7.2.4 96- brønners oppsett for qPCR for oppsett 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C2	C2	U	U	S18	S18	TBP	TBP	G	G
	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A	0A
B	C1	C1	C2	C2	U	U	S18	S18	S18	TBP	G	G
	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A	0,3A
C	C1	C1	C2	C2	U	U	S18	S18	TBP	TBP	G	G
	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A	3A
D	C1	C1	C2	C2	U	U	S18	S18	TBP	TBP	G	G
	30A	30A	30A	30A	30A	30A	30A	30A	30A	30A	30A	30A
E	C1	C1	C2	C2	U	U	S18	S18	TBP	TBP	G	G
	0B	0B	0B	0B	0B	0B	0B	0B	0B	0B	0B	0B
F	C1	C1	C2	C2	U	U	S18	S18	TBP	TBP	G	G
	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B	0,3B
G	C1	C1	C2	C2	U	U	S18	S18	TBP	TBP	G	G
	3B	3B	3B	3B	3B	3B	3B	3B	3B	3B	3B	3B
H	C1	C1	C2	C2	U	U	S18	S18	TBP	TBP	G	G
	30B	30B	30B	30B	30B	30B	30B	30B	30B	3B	30B	30B

C1= CES1, C2= CES2, U= UGT1A1, G= GAPDH

7.2.5 96- brønners oppsett for qPCR for oppsett 3. Brett nummer 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	C1 0A	C1 0,3A	C1 3A	C1 30A	C1 0B	C1 0,3B	C1 3B	C1 30B	C1 0C	C1 0,3C	C1 30C
B	C1 0A	C1 0,3	C1 3A	C1 30A	C1 0B	C1 0,3B	C1 3B	C1 30B	C1 0C	C1 0,3C	C1 30C
C	C2 0A	C2 0,3A	C2 3A	C2 30A	C2 0B	C2 0,3B	C2 3B	C2 30B	C2 0C	C2 0,3C	C2 30C
D	C2 0A	C2 0,3A	C2 3A	C2 30A	C2 0B	C2 0,3B	C2 3B	C2 30B	C2 0C	C2 0,3C	C2 30C
E	UGT. 0A	UGT. 0,3A	UGT. 3A	UGT. 30A	UGT. 0B	UGT. 0,3B	UGT. 3B	UGT. 30B	UGT. 0C	UGT. 0,3C	UGT. 30C
F	UGT. 0A	UGT. 0,3A	UGT. 3A	UGT. 30A	UGT. 0B	UGT. 0,3B	UGT. 3B	UGT. 30B	UGT. 0C	UGT. 0,3C	UGT. 30C

C1= CES1, C2= CES2, UGT= UGT1A1

7.2.6 96- brønners oppsett for qPCR for oppsett 3. Brett nummer 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	S18 0A	S18 0,3A	S18 3A	S18 30A	S18 0B	S18 0,3B	S18 3B	S18 30B	S18 0C	S18 0,3C	S18 30C
B	S18 0A	S18 0,3A	S18 3A	S18 30A	S18 0B	S18 0,3B	S18 3B	S18 30B	S18 0C	S18 0,3C	S18 30C
C	TBP 0A	TBP 0,3A	TBP 3A	TBP 30A	TBP 0B	TBP 0,3B	TBP 3B	TBP 30B	TBP 0C	TBP 0,3C	TBP 30C
D	TBP 0A	TBP 0,3A	TBP 3A	TBP 30A	TBP 0B	TBP 0,3B	TBP 3B	TBP 30B	TBP 0C	TBP 0,3C	TBP 30C
E	GAP 0A	GAP 0,3A	GAP 3A	GAP 30A	GAP 0B	GAP 0,3B	GAP 3B	GAP 30B	GAP 0C	GAP 0,3C	GAP 30C
F	GAP 0A	GAP 0,3A	GAP 3A	GAP 30A	GAP 0B	GAP 0,3B	GAP 3B	GAP 30B	GAP 0C	GAP 0,3C	GAP 30C

GAP= GAPDH

7.3 PCR- effektivitetstesting

96- brønners oppsett for qPCR for effektivitetstesting av primere

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1 1	C1 1	C2 1	C2 1	UGT 1	UGT 1	S18 1	S18 1	TBP 1	TBP 1	GAP 1	GAP 1
B	C1 2	C1 2	C2 2	C2 2	UGT 2	UGT 2	S18 2	S18 2	TBP 2	TBP 2	GAP 2	GAP 2
C	C1 3	C1 3	C2 3	C2 3	UGT 3	UGT 3	S18 3	S18 3	TBP 3	TBP 3	GAP 3	GAP 3
D	C1 4	C1 4	C2 4	C2 4	UGT 4	UGT 4	S18 4	S18 4	TBP 4	TBP 4	GAP 4	GAP 4
E	C1 5	C1 5	C2 5	C2 5	UGT 5	UGT 5	S18 5	S18 5	TBP 5	TBP 5	GAP 5	GAP 5

C1= CES1, C2= CES2, UGT= UGT1A1, GAP= GAPDH

7.4 Uttesting av primere til pyrosekvensering

Oppsett for PCR- metylering for uttesting av primere

	1	2	3	4
A	#299 + #300 umetylert	#302 + #303 umetylert	#305 + #306 umetylert	#308 + #309 umetylert
B	#299 + #300 metylert	#302 + #303 metylert	#305 + #306 metylert	#308 + #309 metylert
C	#299 + #300 vannkontroll	#302 + #303 vannkontroll	#305 + #306 vannkontroll	#308 + #309 vannkontroll

7.5 QIAcube prosedyre

DNA og RNA isoleres i to forskjellige steg. Roboten starter først med å isolere DNA. Etterpå fortsetter den og isolerer ut RNA.

7.5.1 DNA isolering

Sørg for at alle buffer og løsninger er klart og sett de i riktig posisjon. Buffer-løsningene overføres til flasker før de settes i det blå brettet.

Posisjon 1: 70 % etanol

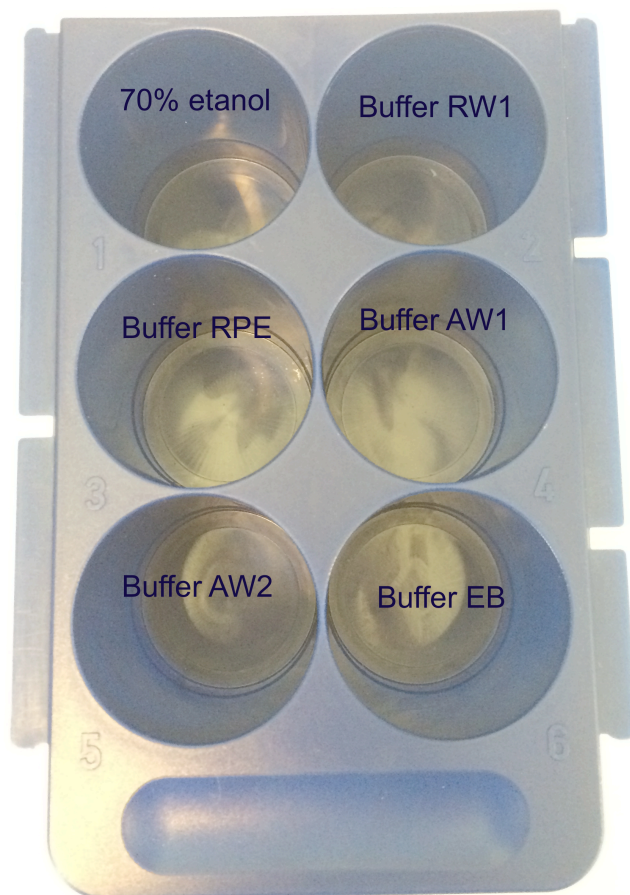
Posisjon 2: Buffer RW1

Posisjon 3: Buffer RPE

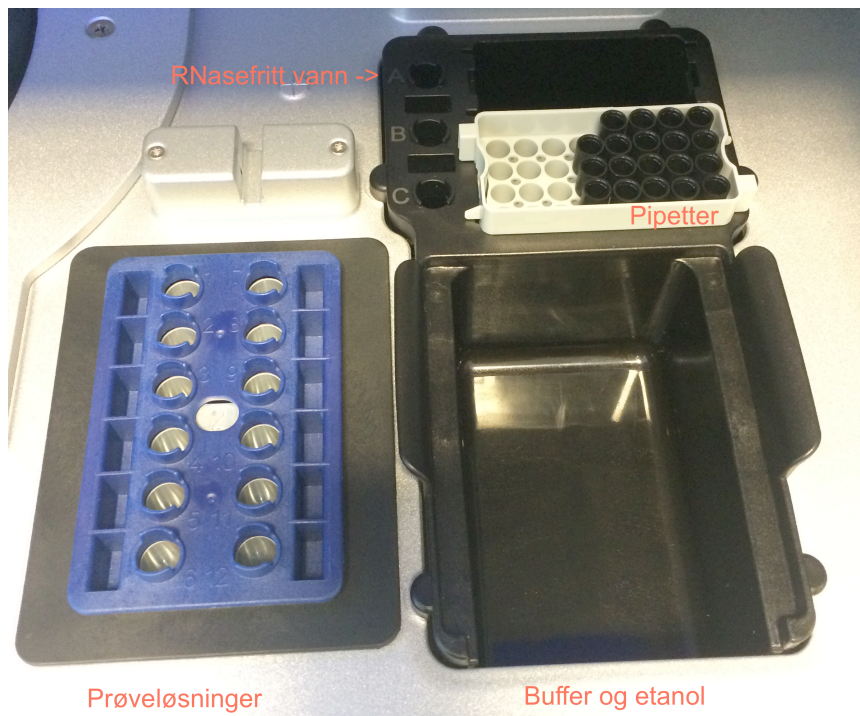
Posisjon 4: Buffer AW1

Posisjon 5: Buffer AW2

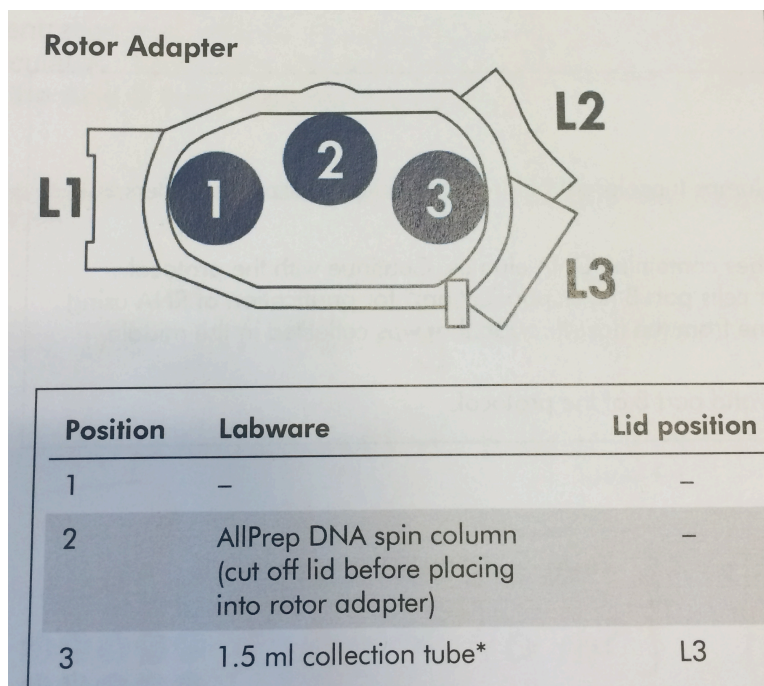
Posisjon 6: Buffer EB



Figur 1. Oppsett for bufferene og hvordan de skal stå i QIAcube maskinen.



Figur 2. Effendorfrør med RNasefritt vann tilsettes i posisjon A som vist på bildet. Prøveløsningene plasseres i det blå brettet. Husk å plassere lokk i hullet.



Figur 3. En oversikt over hva som skal plasseres i rotoradapteren ved DNA- eluering.

Plasser en DNA spin column i posisjon 2 (klipp av lokket)

Plasser en 1,5 ml collection tube i posisjon 3. Legg lokket i hull L3.

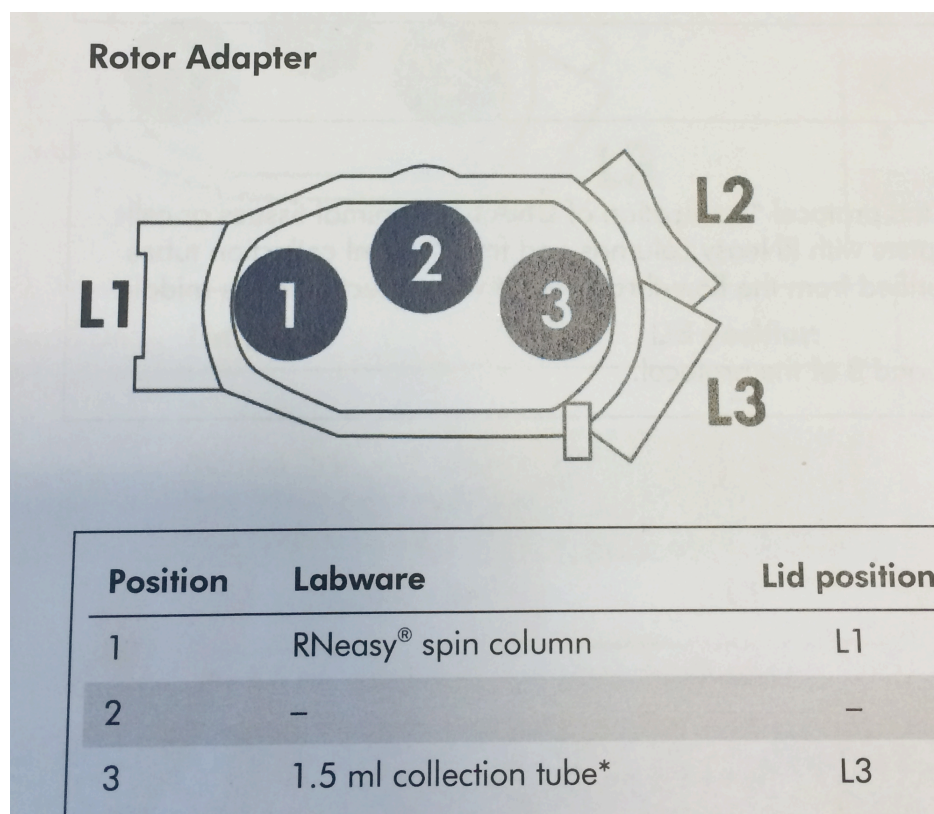
Sett rotoradapterer i roboten.

Sjekk at alle innstillinger er riktig stilt inn før start.

7.5.2 RNA eluering

Etter at roboten er ferdig med å kjøre DNA elueringen, startes RNA- elueringen.

Men først må rørene byttes om. Vi lar bufferløsningene og RNasefritt vann stå igjen. Rotoradapteren tas ut av QIAcuben. Løsningen som er i posisjon 3 er det isolerte DNA-et vårt. Dette taes ut og oppbevares i kjøleskap, mens prøveløsningene med RNA kjøres. Løsningen i posisjon 2 skal brukes videre til RNA-isoleringen, som vi lar stå igjen.



Figur 4. En oversikt over hva som skal plasseres i rotoradapteren ved RNA- isolering.

Plassér en RNeasy spin column i posisjon 1. Plasser lokket i hullet.

Plasser en ny 1,5 ml collection tube i posisjon 3. Plasser lokket i posisjon L3.

Velg riktig innstillinger og kjør RNA-elueringen.

7.6 QIAcube protocol sheets

7.6.1 DNA

General Information (June 2008)

Application	RNA
Kit	AllPrep® DNA/RNA Mini Kit
Sample material	Animal tissues and cells
Short protocol name	Standard part A
Version	2
Full protocol name	Purification of DNA and RNA from animal tissues or cells part A (DNA purification)
Editable parameters	–
Required QIAcube® software versions	Firmware version FIW-50-001-L_FW_MB.hex and PLC program version FIW-50-002-J_PLG_MB.prs or higher; available from the QIAcube Web Portal

Shaker

Material	Up to 20 mg frozen or 10 mg stabilized animal tissue or up to 5×10^6 animal cells disrupted in 350 μ l Buffer RLT Plus
Vessel	2 ml safe-lock microcentrifuge tube*
Adapter	Shaker adapter for 2 ml microcentrifuge tubes (marked with "2")

* Sample Tubes RB, 2 ml (cat. no. 990381); see www.qiagen.com/MyQIAcube.

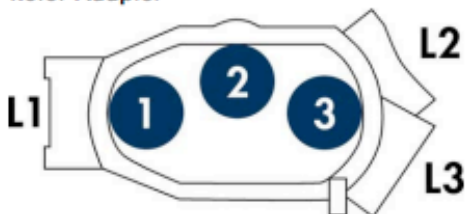
Disposable Tips

Disposable Filter-Tips, 1000 μ l

Reagent Bottle Rack

Rack labeling strip	AllPrep Mini
----------------------------	--------------

Rotor Adapter



Position	Reagent
1	70% ethanol
2	Buffer RW1
3	Buffer RPE
4	Buffer AW1
5	Buffer AW2
6	Buffer EB

Position	Labware	Lid position
1	–	–
2	AllPrep DNA spin column (cut off lid before placing into rotor adapter)	–
3	1.5 ml collection tube*	L3

* Sarstedt, Micro tube 1.5 ml, Safety Cap (see www.sarstedt.com).



Microcentrifuge Tube Slots

	Position		
	A	B	C
Content	RNase-free water		
Vessel	2 ml safe-lock microcentrifuge tube*		

* Sample Tubes RB, 2 ml (cat. no. 990381); see www.qiagen.com/MyQIAcube.

Number of samples	Volume of reagent required for the indicated number of samples (μ l)		
	A	B	C
2	256		
3	364		
4	472		
5	580		
6	688		
7	796		
8	904		
9	1012		
10	1120		
12	1336		

Comments

DNA is eluted in 100 μ l Buffer EB.

Things to do before starting

Be sure to cut off the lids of the AllPrep DNA spin columns (uncolored) before placing into the rotor adapters.

Things to do at the end of the protocol

Remove AllPrep DNA spin columns and collection tubes containing DNA eluates. Continue with the protocol "Purification of DNA and RNA from animal tissues or cells part B (RNA purification)" for purification of RNA using the same rotor adapters. RNA purification will be done from the flow-through that was collected in the middle position of the rotor adapters.

Make sure not to mix up the samples between part A and part B of the protocol.

Trademarks: QIAGEN®, QIAcube®, AllPrep® (QIAGEN Group).
© 2008 QIAGEN, all rights reserved.



7.6.2 RNA

General Information (June 2008)

Application	RNA
Kit	AllPrep® DNA/RNA Mini Kit
Sample material	Animal tissues and cells
Short protocol name	Standard part B
Version	2
Full protocol name	Purification of DNA and RNA from animal tissues or cells part B (RNA purification)
Editable parameters	Elution volume: 30–100 µl in increments of 10 µl; default 50 µl
Required QIAcube® software versions	Firmware version FIW-50-001-L_FW_MB.hex and PLC program version FIW-50-002-J_PLG_MB.prs or higher; available from the QIAcube Web Portal

Shaker

Material	–
Vessel	–
Adapter	Shaker adapter for 2 ml microcentrifuge tubes (marked with "2")

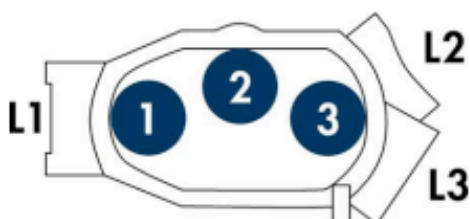
Disposable Tips

Disposable Filter-Tips, 1000 µl

Reagent Bottle Rack

Rack labeling strip	AllPrep Mini
----------------------------	--------------

Rotor Adapter



Position	Reagent
1	70% ethanol
2	Buffer RW1
3	Buffer RPE
4	Buffer AW1
5	Buffer AW2
6	Buffer EB

Position	Labware	Lid position
1	RNeasy® spin column	L1
2	–	–
3	1.5 ml collection tube*	L3

* Sarstedt, Micro tube 1.5 ml, Safety Cap (see www.sarstedt.com).



7.7 Oversikt over primere brukt i pyrosekvenseringen

Primer-nr.	Primer	Sekvens (retning 5' til 3')
#211	CES1met forward	GGTTGGGTTTTAGGGTTGGATA
#212	CES1met reverse	B*-TCAACTACTCCAAATCCAAATCC TAA TAT
#213	CES1met sequencing	AGTTTTTTTGAATTGTATAGAGAT
#299	CES2prom1 forward	AGGGGTTAGTGAAATGTTTGTTAAGTG
#300	CES2prom1 reverse	B*-ATCCCTCCCTACTCAATCA
#301	CES2prom1 sequencing	GTTTGTTAAGTGGATAAATGAT
#302	CES2prom2 forward	GTTAGAATTAGGTTTTAGGGGGTAT
#303	CES2prom2 reverse	B*-CCCCCTTTTCTCCATAACTTTCAAT TTC
#304	CES2prom2 sequencing	GGTTTTAGGGGGTATTAA
#305	CES2exon1 forward	GGTAGGAGTTGGTGGAGATG
#306	CES2exon1 reverse	B*-CCCCTATACTCCCCTAATTCCTTACC
#307	CES2exon1 sequencing	GTTGGTGGAGATGATAG
#308	UGT1A1prom forward	GGGGTTTTTGAAGGGTTTGT
#309	UGT1A1prom reverse	B*-CTCTTAAACAATCCAACATAATAA ACTACT
#310	UGT1A1prom sequencing	AGGTTTTAGTTATTTGTTTGAAT

B*= Biotinmerket

7.8 Tilsetningsrekkefølgen i pyrosekvenseringen

CES1

GTCGCTATGTTTCGAGATAGTCGTTGATCGATGTAGTTCGTGTTATTGTATT
AGTTCAGTCGTGGTGAGTTGATAATAGTCGGTA

CES2prom1

GCTATAGTCGTAGTTCAGTCGAGTGAGATGAGTATCGAGAAGGTCGTTA
GAGTAGTCAGTCGTGATCGTGTGATCGTTAAGATAGTCGTG

CES2prom2

GATGTCAGTCGAGCTATTATGATCGTTGAGTAGTAGTCGATGTTTCGTATAG
TATCGTAGTCGTTG

CES2exon1

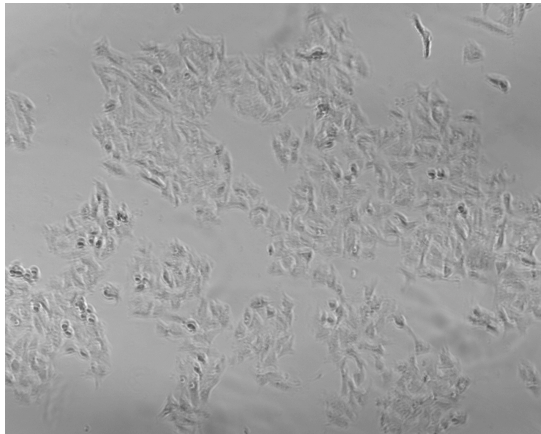
GTCGTGTATCGTGAGCTTGATCGTGATCAGTTCAGTCGTAGTGTTAGAGTA
TAGATGTCGTGG

UGT1A1

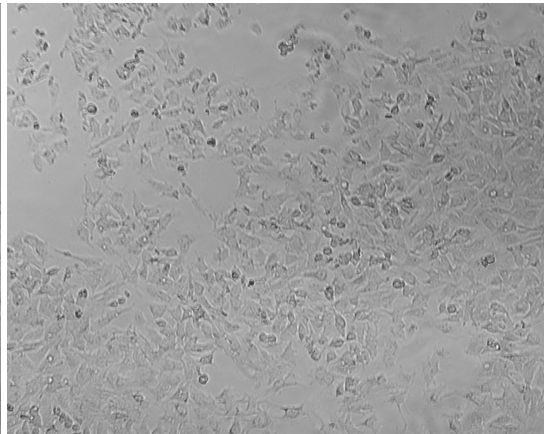
ACTTGATCGTTAGTTCGGTTAGTCGGTGTATGATGTCGTAGTAGTCGTGAT
CGTTGATGATTCGTATCGAGTGATCGGTA

7.9 Bilder tatt i mikroskop

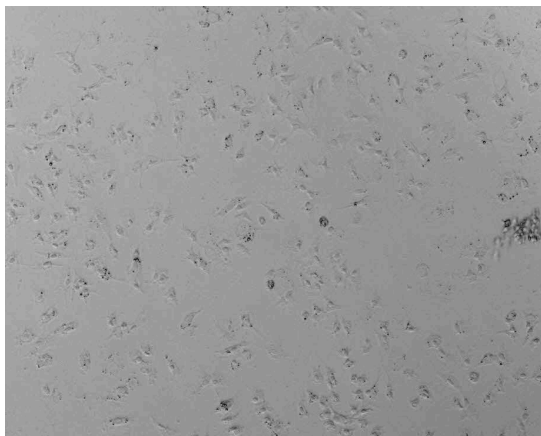
7.9.1 24 timer etter stimulering



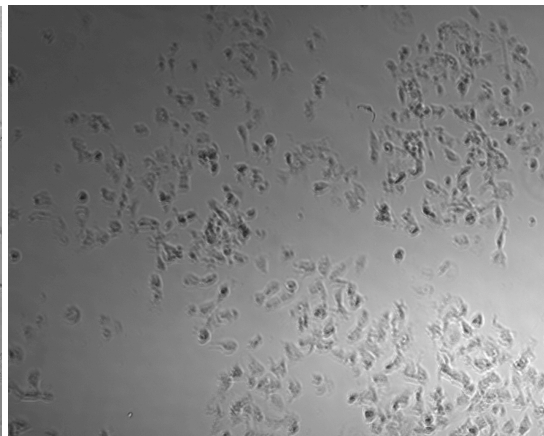
0 uM



0,3 uM

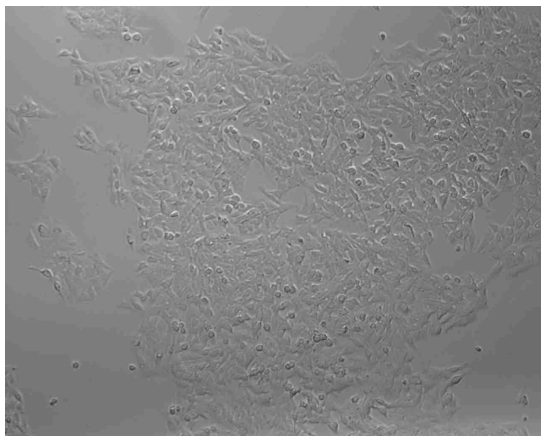


3 uM

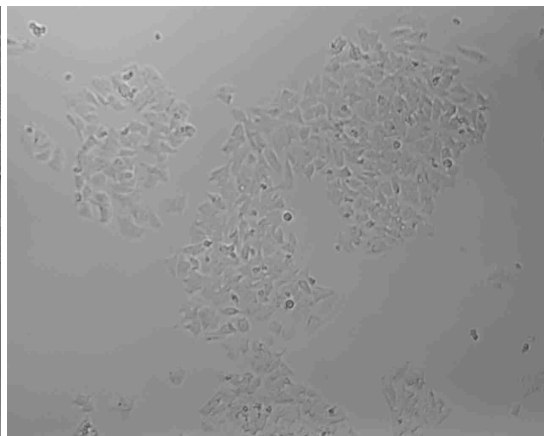


30 uM

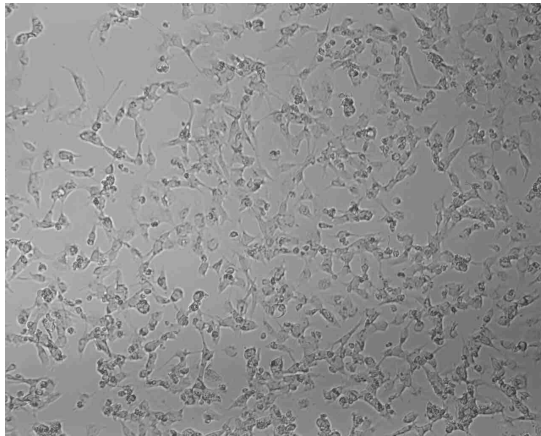
7.9.2 48 timer etter stimulering



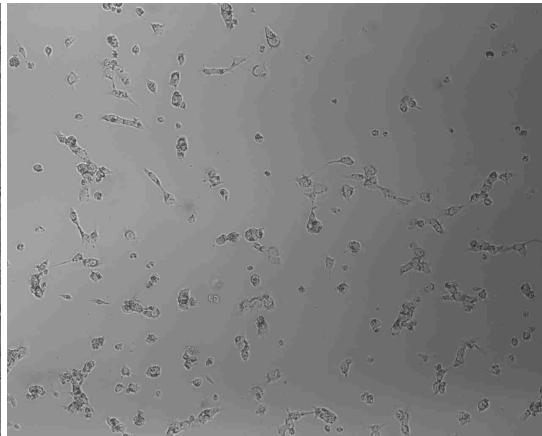
0 uM



0,3 uM



3 uM



30 uM

7.10 Kvantifisering av DNA og RNA

7.10.1 Oppsett 1

24 timers prøvene

DNA

Prøve	Konsentrasjon ng/uL	260/280	260/230
0A	4.81	1.63	0.20
0B	4.44	2.03	0.21
0C	5.43	1.71	0.30
0.3A	4.84	2.16	0.25
0.3B	5.27	2.09	0.21
0.3C	7.10	1.72	0.21
3A	4.04	1.63	0.16
3B	5.49	1.77	0.15
3C	3.98	1.54	0.14
30A	2.60	2.39	0.04
30B	3.77	1.52	0.04
30C	3.28	1.71	0.04

RNA

Prøve	Konsentrasjon ng/uL	260/280	260/230
0A	11.57	2.18	0.45
0B	15.02	2.02	1.65
0C	0.01	0.51	0.00
0.3A	0.23	-0.34	-0.76

0.3B	10.42	1.46	0.33
0.3C	24.14	2.03	1.70
3A	0.00	-0.00	0.00
3B	4.21	3.27	0.60
3C	4.57	1.74	0.48
30A	2.85	2.01	1.83
30B	5.10	1.78	0.18
30C	0.86	0.54	0.08

48 timers prøvene

DNA

Prøve	Konsentrasjon ng/uL	260/280	260/230
0A	6.33	1.89	0.23
0B	9.08	1.78	0.33
0C	7.81	2.24	0.10
0.3A	8.63	2.17	0.31
0.3B	7.90	2.17	0.24
0.3C	9.23	1.64	0.36
3A	5.38	1.57	0.28
3B	5.71	2.12	0.13
3C	5.02	4.54	0.09
30A	5.11	2.03	0.06
30B	4.13	2.95	0.03
30C	7.30	2.02	0.06

RNA

Prøve	Konsentrasjon ng/uL	260/280	260/230
0A	58.20	2.08	0.75
0B	67.38	2.08	1.24
0C	42.12	1.95	1.30
0.3A	111.53	2.05	1.99
0.3B	111.44	2.08	1.97
0.3C	113.07	2.09	1.30
3A	24.09	2.11	0.79
3B	9.80	2.02	1.00
3C	31.03	2.19	1.25
30A	12.90	1.77	0.67
30B	14.46	1.82	1.26
30C	4.04	2.07	0.26

7.10.2 Oppsett 2

DNA

Prøve	Konsentrasjon ng/uL	260/280	260/230
0A	16,33	2,07	0,58
0.3A	14,44	1,89	0,66
3A	13,55	1,76	0,68
30A	9,64	2,15	0,45
0B	12,71	1,93	0,42
0.3B	13,70	1,76	0,31
3B	12,88	1,90	0,26
30B	11,69	1,73	0,10

RNA

Prøve	Konsentrasjon ng/uL	260/280	260/230
0A	81,48	2,07	1,97
0.3A	36,10	1,99	1,52
3A	23,82	2,11	1,29
30A	11,16	1,81	0,44
0B	54,01	2,01	1,36
0.3B	35,97	1,93	1,06
3B	17,67	1,86	0,48
30B	11,15	1,84	0,23

7.10.3 Oppsett 3

DNA

Prøve	Konsentrasjon ng/uL	260/280	260/230
0A	13,50	1,87	0,53
0.3A	10,02	2,17	0,50
3A	8,65	2,12	0,41
30A	8,78	1,88	0,37
0B	10,75	2,08	0,44
0.3B	9,68	1,55	0,37
3B	7,32	2,67	0,31
30B	5,69	2,17	0,27
0C	9,42	1,92	0,37
0.3C	10,25	1,96	0,26
30C	7,08	2,21	0,17

RNA

Prøve	Konsentrasjon ng/uL	260/280	260/230
0A	95,39	2,02	2,01
0.3A	36,41	1,99	1,33
3A	27,70	1,99	0,70
30A	13,13	2,05	1,13
0B	46,06	2,06	1,69
0.3B	32,24	2,06	1,75
3B	15,29	2,03	0,95
30B	10,25	2,10	0,77
0C	40,80	1,89	1,31
0.3C	25,95	2,05	1,28
30C	8,83	1,74	0,15

7.11 Tabellene for Cq- verdiene ved RT- qPCR

7.11.1 Oppsett 1

delta delta Cq 24- timersprøvene

GAPDH

Kons.	Cq		Cq		ddCq		ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	GAPDH	CES1	CES2	UGT1A1
0 μ M	30,377	30,74	34,709	25,091			
0,3 μ M	30,931	29,771	36,103	27,941	4,9109	14,113	2,7434
3 μ M	28,645	29,198	34,182	26,683	10,014	8,7787	4,3439
30 μ M	28,035	31,04	35,276	27,019	19,293	3,0908	2,5686

TBP

Kons.	Cq		Cq		ddCq		ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	TBP	CES1	CES2	UGT1A1
0 μ M	30,377	30,74	34,709	30,125			
0,3 μ M	30,931	29,771	36,103	30,879	1,1487	3,3012	0,6417
3 μ M	28,645	29,198	34,182	31,531	8,8030	7,7168	3,8185
30 μ M	28,035	31,04	35,276	33,709	60,800	9,7405	8,0949

delta delta Cq 48- timersprøvene

GAPDH

Konsentrasjon	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	GAPDH	CES1	CES2
0 μM	26.738	29.123	22.921		
0.3 μM	26.9615	28.249	23.156	1.008003047	2.156960863
3 μM	27.3257	27.801	24.143	1.552184443	5.832037515
30 μM	28.7183	27.866	24.1797	0.606424523	5.718750641

TBP

Konsentrasjon	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	TBP	CES1	CES2
0 μM	26.738	29.123	30.3113		
0.3 μM	26.9615	28.249	30.6005	1.046592627	2.239536221
3 μM	27.3157	27.801	31.2667	1.290294153	4.848034616
30 μM	28.7183	27.866	30.8313	0.363417551	3.427127819

S18

Konsentrasjon	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	S18	CES1	CES2
0 μM	26.738	29.123	12.755		
0.3 μM	26.9615	28.249	13.202	1.167562678	2.498392251
3 μM	27.3257	27.801	13.9377	1.510472686	5.675313154
30 μM	28.7183	27.866	13.788	0.518602117	4.890561111

7.11.2 Oppsett 2

delta delta Cq for oppsett 2

GAPDH

Konsen- trasjon	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	GAPDH	CES1	CES2	UGT1A1
0 μM	25,6445	28,3645	35,0685	22,595			
0.3 μM	25,525	27,7245	35,0685	23,37	1,8589	2,6665	1,6205
3 μM	26,1175	26,6525	35,327	23,3675	1,2307	5,5964	1,4280
30 μM	26,977	26,8065	34,79	23,5855	0,7889	5,8502	2,4099

TBP

Konsen- trasjon	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	TBP	CES1	CES2	UGT1A1
0 μM	25,6445	28,3645	35,0685	30,6745			
0.3 μM	25,525	27,7245	35,0685	31,1115	1,4706	2,1096	1,2820
3 μM	26,1175	26,6525	35,327	31,026	0,9192	4,1799	1,0665
30 μM	26,977	26,8065	34,79	30,964	0,4853	3,5987	1,4824

S18

Konsentrasjon	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	S18	CES1	CES2	UGT1A1
0 μ M	25,6445	28,3645	35,0685	12,3525			
0.3 μ M	25,525	27,7245	35,0685	12,634	1,3204	1,8940	1,1510
3 μ M	26,1175	26,6525	35,327	12,5275	0,8133	3,6986	0,9437
30 μ M	26,977	26,8065	34,79	12,2895	0,3801	2,8186	1,1611

7.11.3 Oppsett 3

Delta delta Cq for oppsett 3

GAPDH

Konsentrasjon	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	GAPDH	CES1	CES2	UGT1A1
0 μ M	27,507	28,402	35,491	23,102			
0,3 μ M	27,281	27,694	35,425	23,416	1,4539	2,0307	1,3013
3 μ M	27,395	27,007	35,335	23,474	1,3986	3,4034	1,4419
30 μ M	28,03	26,794	34,538	24,138	1,4270	6,2506	3,9697

TBP

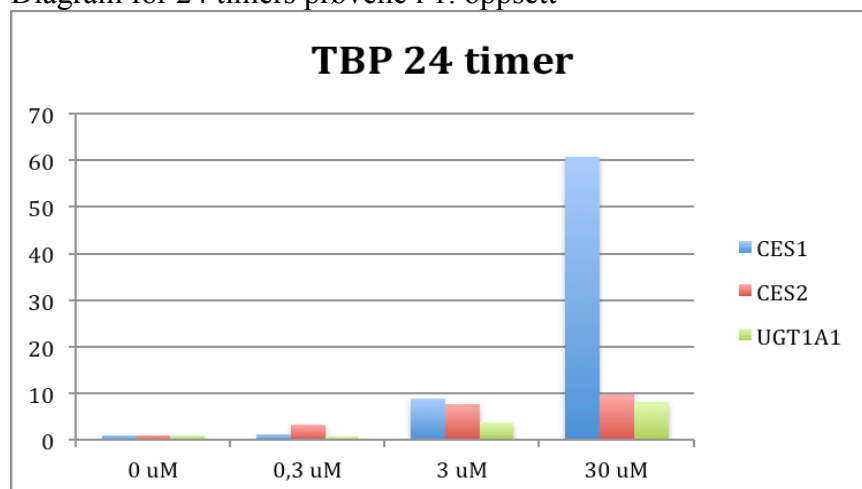
Konsentrasjon	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	TBP	CES1	CES2	UGT1A1
0 μ M	27,507	28,402	35,491	29,979			
0,3 μ M	27,281	27,694	35,425	30,141	1,3086	1,8277	1,1712
3 μ M	27,395	27,007	35,335	30,65	1,7207	4,1872	1,7739
30 μ M	28,03	26,794	34,538	31,252	1,6818	7,3667	4,6784

S18

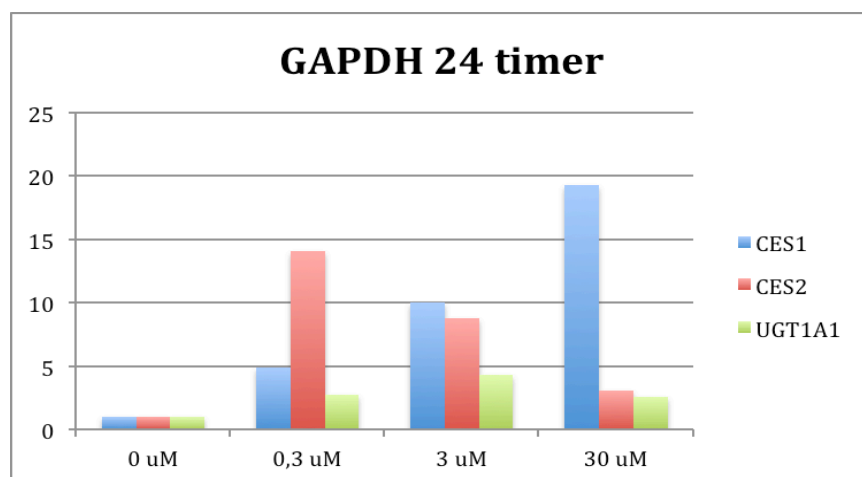
Konsentrasjon	Cq	Cq	Cq	Cq	ddCq	ddCq	ddCq
	CES1	CES2	UGT1A1	S18	CES1	CES2	UGT1A1
0 μ M	27,507	28,402	35,491	12,677			
0,3 μ M	27,281	27,694	35,425	13,149	1,6223	2,2658	1,4519
3 μ M	27,395	27,007	35,335	12,669	1,0747	2,6153	1,1080
30 μ M	28,03	26,794	34,538	13,255	1,0389	4,5504	2,8899

7.12 Stolpediagram for Cq- verdiene ved qPCR

Diagram for 24 timers prøvene i 1. oppsett

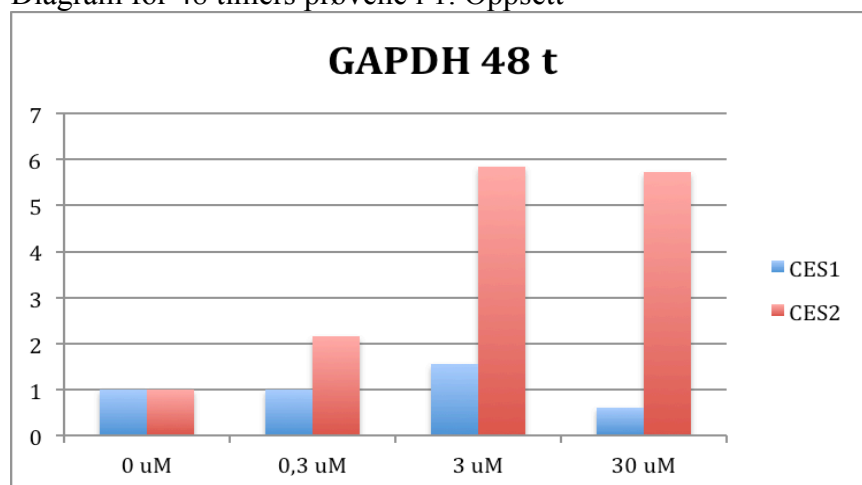


Figur 1. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for 24 timers prøvene i 1. oppsett hvor *TBP* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

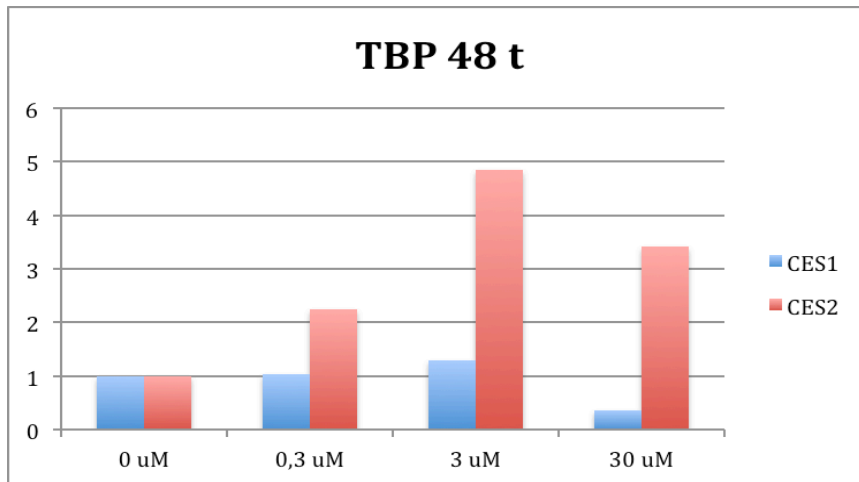


Figur 2. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for 24 timers prøvene i 1. oppsett hvor *GAPDH* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

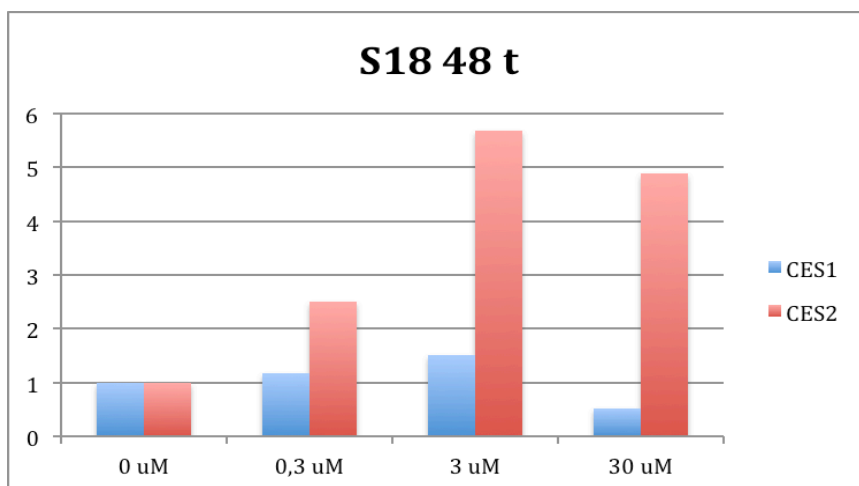
Diagram for 48 timers prøvene i 1. Oppsett



Figur 3. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for 48 timers prøvene i 1. oppsett hvor *GAPDH* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

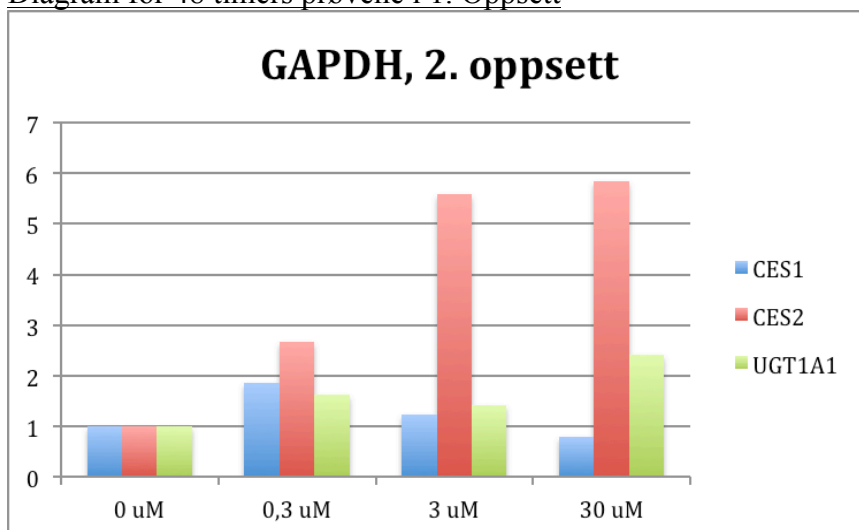


Figur 4. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for 48 timers prøvene i 1. oppsett hvor *TBP* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

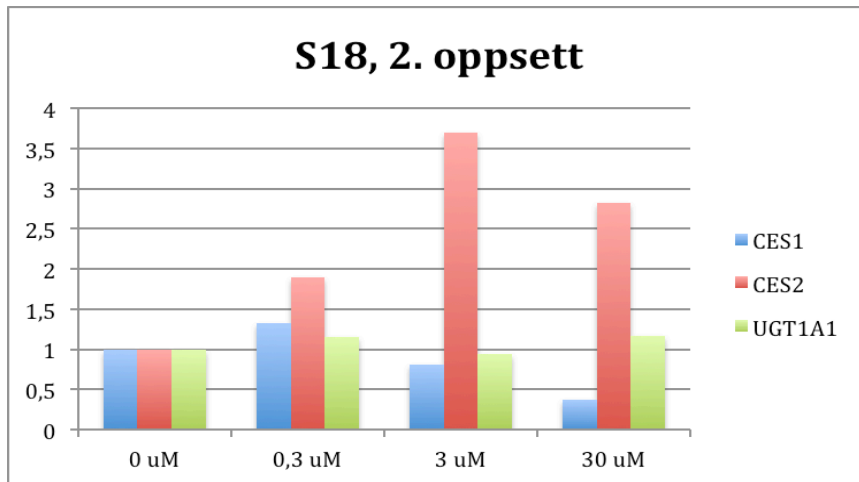


Figur 5. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for 48 timers prøvene i 1. oppsett hvor *S18* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

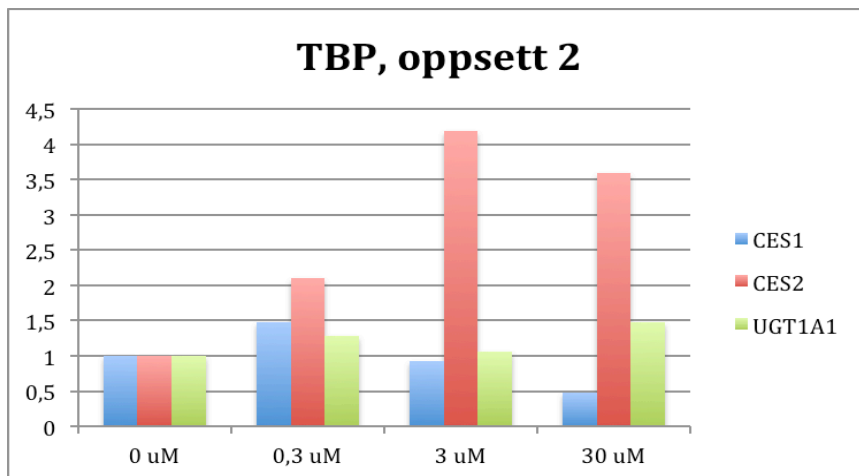
Diagram for 48 timers prøvene i 1. Oppsett



Figur 6. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for prøvene i 2. oppsett hvor *GAPDH* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

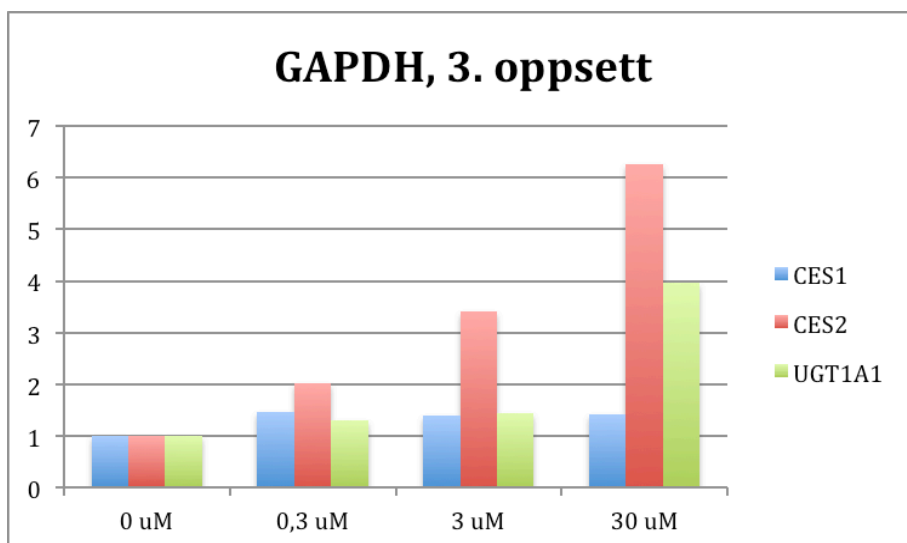


Figur 7. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for prøvene i 2. oppsett hvor *S18* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

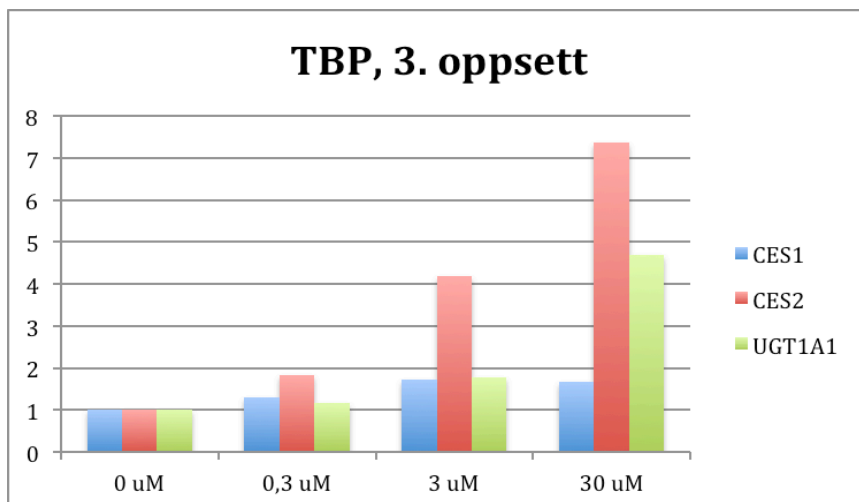


Figur 8. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for prøvene i 2. oppsett hvor *GAPDH* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

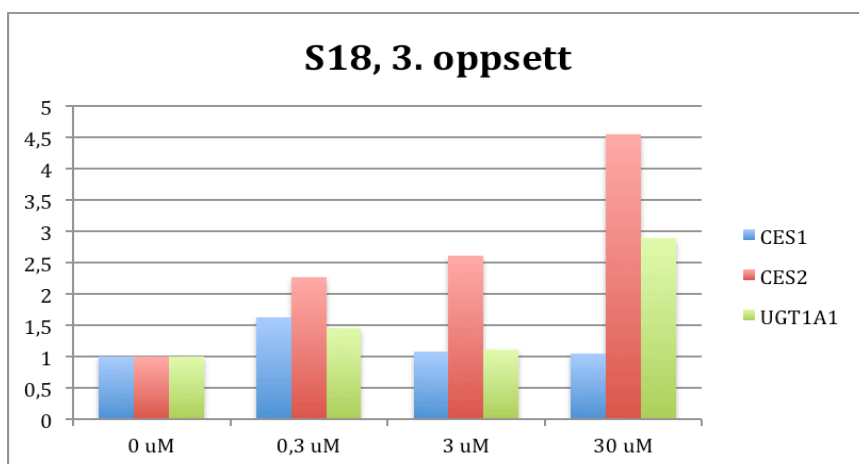
Diagram for prøvene i 3. oppsett



Figur 9. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for prøvene i 3. oppsett hvor *GAPDH* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.



Figur 10. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for prøvene i 3. oppsett hvor *TBP* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.



Figur 11. ddCq- verdiene for *CES1*, *CES2* og *UGT1A1* for prøvene i 3. oppsett hvor *S18* ble brukt som normalisering. Y-aksen viser ddCq- verdien.

7.13 Statistiske beregninger for de tre ulike oppsettene

7.13.1 *CES1*

Kons.	1. oppsett	2. oppsett	3. oppsett	Mean	Stdev	Margin of error	Upper bound	Lower bound
0 μ M	1	1	1	1	0	0	1	1
0,3 μ M	1,072	1,534	1,4559	1,354	0,247	0,279	1,633	1,074
3 μ M	1,447	0,972	1,3444	1,254	0,249	0,282	1,537	0,972
30 μ M	0,485	0,525	1,3566	0,789	0,491	0,556	1,345	0,232

Tabell 1. ddCq- verdiene for de tre ulike oppsettene hos *CES1*, samt de beregnede statistiske verdiene.

Konfidensintervallet for *CES1*:

0 μM : 1 - 1

0,3 μM : 1,074 - 1,633

3 μM : 0,972 - 1,537

30 μM : 0,232 - 1,345

7.13.2 *CES2*

Kons.	1. oppsett	2. oppsett	3. oppsett	Mean	Stdev	Margin of error	Upper bound	Lower bound
0 μM	1	1	1	1	0	0	1	1
0,3 μM	1,072	2,200	2,035	1,768	0,608	0,689	2,457	
3 μM	1,44	3,271	3,271	3,047	1,500	1,698	4,745	1,349
30 μM	0,485	5,942	5,942	3,442	2,756	3,119	6,561	0,322

Tabell 2. ddCq- verdiene for de tre ulike oppsettene hos *CES2*, samt de beregnede statistiske verdiene.

Konfidensintervallet for *CES2*:

0 μM : 1 - 1

0,3 μM : 2,026-2,325

3 μM : 3,151-5,603

30 μM : 3,629-5,984

7.13.3 *UGT1A1*

Kons.	1. oppsett	2. oppsett	3. oppsett	Mean	Stdev	Margin of error	Upper bound	Lower bound
0 μM	1	1	1	1	0	0	1	1
0,3 μM	-	1,412	1,303	1,357	0,077	0,106	1,464	1,250
3 μM	-	1,128	1,386	1,257	0,182	0,252	1,509	1,004
30 μM	-	1,606	3,773	2,689	1,532	2,124	4,814	0,565

Tabell 3. ddCq- verdiene for de tre ulike oppsettene hos *UGT1A1*, samt de beregnede statistiske verdiene.

Konfidensintervallet for *UGT1A1*:

0 μM : 1 - 1

0,3 μM : 1,250 – 1,464

3 μM : 1,004 – 1,509

30 μM : 0,565 – 4,814

7.14 Tabellene for Cq- verdiene for effektivitetsberegning av primere

GAPDH

Fortynning	Cq- verdi
1:5 ⁰	22,70
1:5 ¹	25,44
1:5 ²	28,17
1:5 ³	31,09
1:5 ⁴	33,65

S18

Fortynning	Cq- verdi
1:5 ⁰	13,107
1:5 ¹	16
1:5 ²	18,96
1:5 ³	21,784
1:5 ⁴	24,782

CES2

Fortynning	Cq- verdi
1:5 ⁰	29,175
1:5 ¹	31,832
1:5 ²	34,338
1:5 ³	37,248
1:5 ⁴	38,899

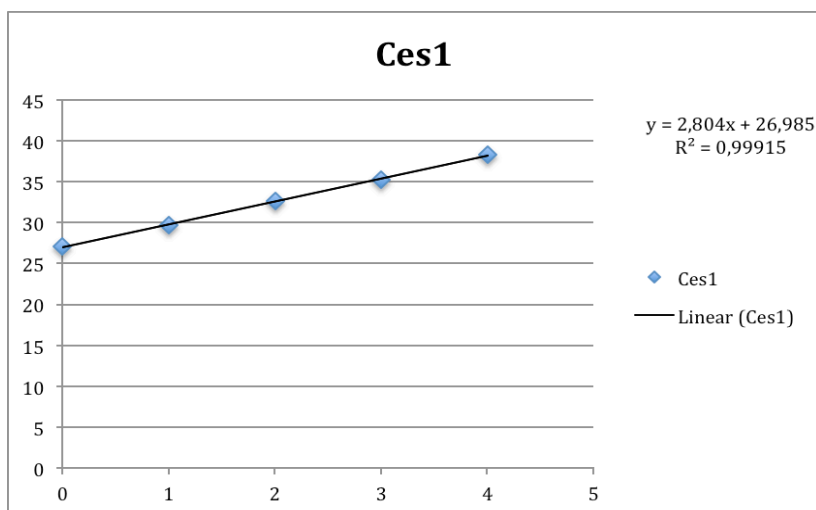
TBP

Fortynning	Cq- verdi
1:5 ⁰	29,857
1:5 ¹	32,627
1:5 ²	34,925
1:5 ³	36,909
1:5 ⁴	38,605

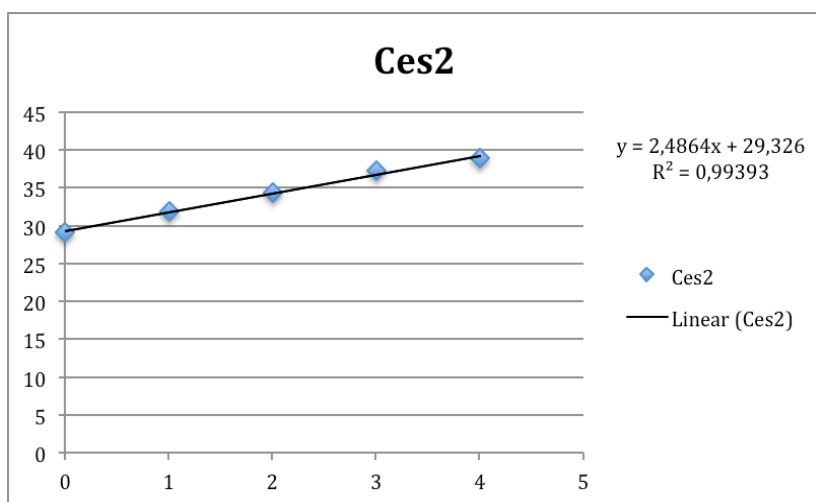
CES1

Fortynning	Cq- verdi
1:5 ⁰	27,092
1:5 ¹	29,692
1:5 ²	32,604
1:5 ³	35,234
1:5 ⁴	38,341

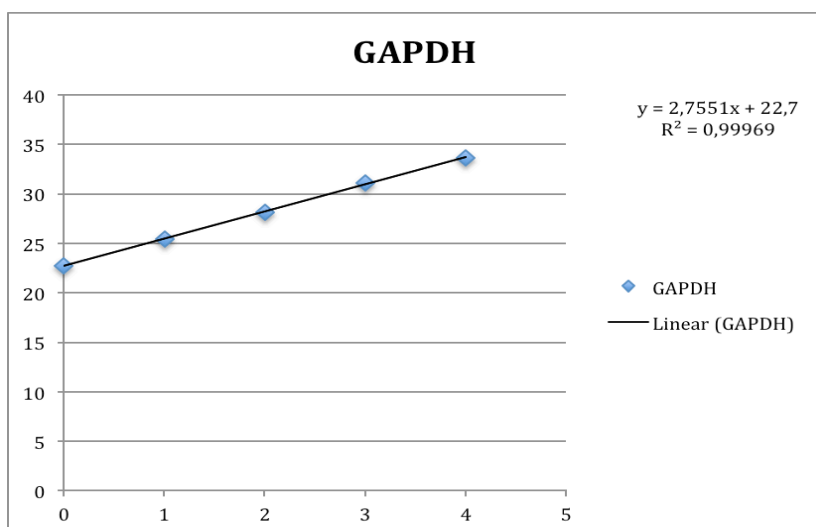
7.15 Graf for Cq- verdiene ved effektivitetsberegning av primere



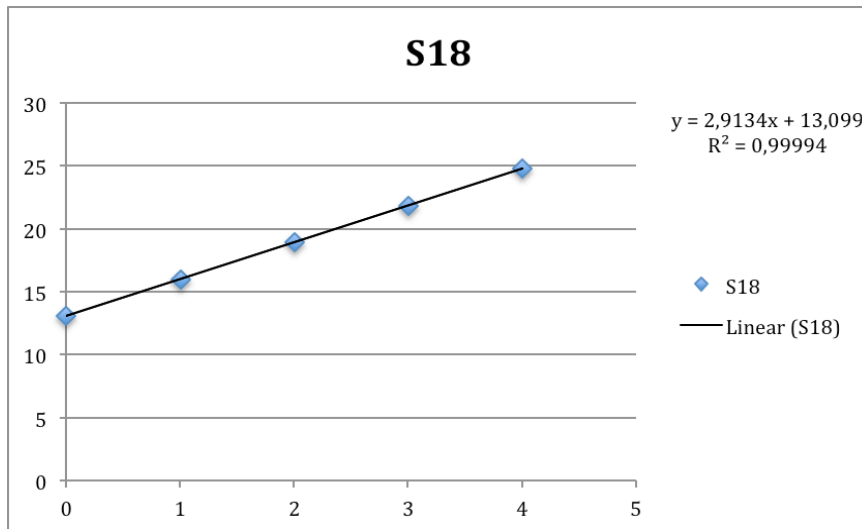
E= 1,78 %= 89 Y-aksen viser Cq- verdien.



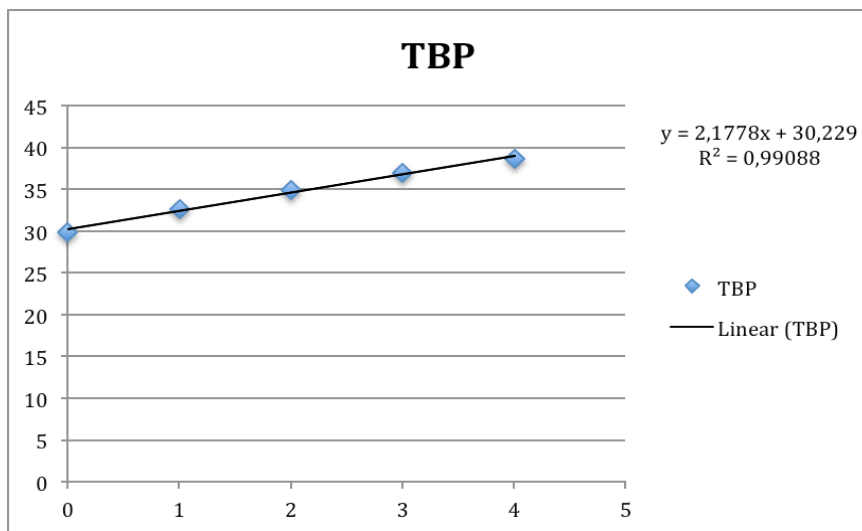
E= 1,91 %= 96 Y-aksen viser Cq- verdien.



E= 1,80 %= 90 Y-aksen viser Cq- verdien.



E= 1,74 %= 87 Y-aksen viser Cq- verdien.



E= 2,10 %= 105 Y-aksen viser Cq- verdien.

7.16 Metyleringsgradene ved pyrosekvensering

7.16.1 Metyleringsgraden til CES1

Prøve (i μM)	Metyleringsgrad (i %)
0	4,5
0,3	2,8
3	3,3
30	2,7
Kontroll	3,3
Umetylert	3
Metylert	90,3
Vannkontroll	Negativ

7.16.2 Metyleringsgraden til CES2prom1

Prøve (i µM)	Metyleringsgrad (i %)
0	5,2
0,3	5,4
3	6,5
30	5,2
Kontroll	5,6
Vannkontroll	Negativ

7.16.3a Metyleringsgraden til CES2prom2 i den første kjøringen

Prøve (i µM)	Metyleringsgrad (i %)
0	2,5
0,3	2,5
3	3,84
30	4,17
Kontroll	4
Umetylert	4
Metylert	96,3
Vannkontroll	Negativ

7.16.3b Metyleringsgraden til CES2prom2 i den andre kjøringen

Prøve (i µM)	Metyleringsgrad (i %)
0	3,1
0,3	3,6
3	2,8
30	3
Kontroll	5,7
Umetylert	2,7
Metylert	95
Vannkontroll	Negativ

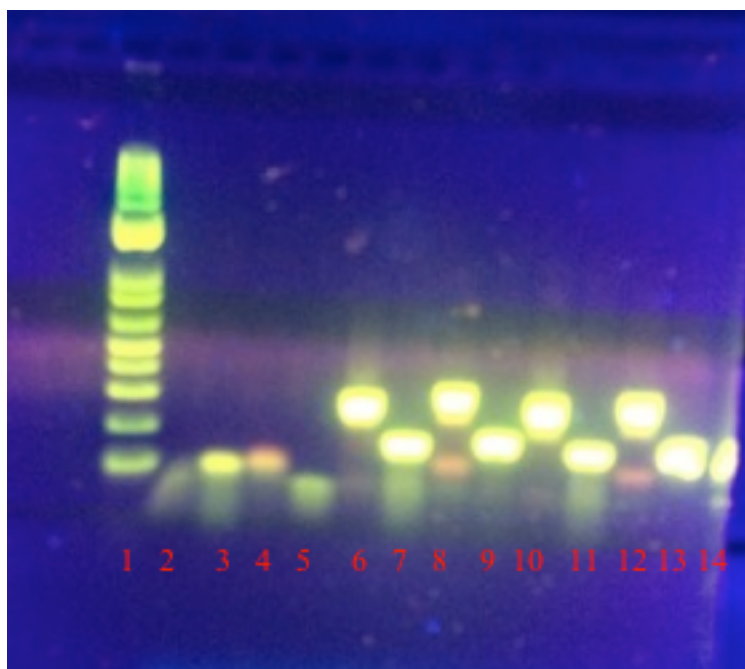
7.16.4 Metyleringsgraden til CES2exon1

Prøve (i µM)	Metyleringsgrad (i %)
0	21,8
0,3	20,3
3	20,45
30	22
Kontroll	5
Umetylert	3,7
Metylert	96,8
Vannkontroll	Negativ

7.16.5 Metyleringsgraden til UGT1A1

Prøve (i μM)	Metyleringsgrad
0	94,4
0,3	92,5
3	94,2
30	91,6
Kontroll	16
Umetylert	7
Metylert	93
Vannkontroll	Negativ

7.17 Agarosegelen ved uttesting av primere



Figur 25. Agarosegelen ved uttesting av primere.

Følgende primere ble testet ut: Ces2prom1, Ces2prom2, ces2exon, UGT1A1.

Tilsatt rekkefølge er følgende (fra venstre til høyre):

1. plus ladder DNA,
2. UGT1A1
3. vannkontroll,
4. CES2exon vannkontroll,
5. CES2prom2 vannkontroll,
6. CES2prom1 vannkontroll,
7. UGT1A1 metylert,
8. UGT1A1 umetylert,
9. CES2exon metylert,
10. CES2exon umetylert,
11. CES2prom2 metylert,
12. CES2prom2 umetylert,
13. CES2prom1 metylert,
14. CES2prom1 umetylert

Agarosegel- elektroforese ble brukt i flere sammenhenger under arbeidet med denne oppgaven, også ved uttesting av primere til bruk PCR før pyrosekvenseringen. Agarosegelen gav fargebånd i alle brønner hvor det var tilsatt primere i, mens vannprøvene som i utgangspunktet ikke skal inneholde noe PCR produkt var klare. Brønn 7-14 er primere tilsatt metylerte- og umetylerte kontroller. Her fikk vi fine fargebånd på alle prøvene. Prøve nr. 1 helt til venstre er en DNA- ladder som fungerer som en molekylvekt- kontroll som man bruker for å sammenligne størrelsene på prøvene med.