



En søken etter stabile sirkulerende biomarkører ved bruk av stor-skala miRNA profilering av humane brystkreftcellerlinjer

Cathrine Sivertsen

Master i farmasi – Far-3901

Våren-2012



Forord

Mastergradsoppgaven har blitt utført ved Institutt for farmasi ved Universitetet i Tromsø. I denne anledning vil jeg takke dere som har inspirert, støttet og hjulpet meg med denne oppgaven.

Først og fremst vil jeg gi en stor takk til Tonje Fiskaa, for å gi meg muligheten til å gjennomføre denne spennende oppgaven. Takk for god veiledning og mange gode råd, jeg vil spesielt takke deg for de gode og konstruktive tilbakemeldingene under skriveprosessen!

En stor takk går også til Erik Knutsen for god veiledning på laboratoriet! Jeg vil også takke for all hjelp med resultatbearbeidelsen, og da spesielt som problemløser i Excel! Takk for gode tilbakemeldinger under skriveprosessen!

Jeg vil også få takke Bjørn Helge Haug ved Forskningsgruppen for pediatri (Institutt for klinisk medisin) ved Universitetet i Tromsø, for råd og veiledning med exosom-isoleringen, proteinfiltrering og for god hjelp med TEM!

En stor takk går også til alle på laboratoriet for gode råd!

Jeg vil takke venner og familie for god støtte i disse 5 årene! En stor takk til mamma, pappa og Nina for at dere alltid støtter meg! Spesielt takk for god korrekturlesing!

Sist, men ikke minst en stor takk til min kjære Steffen, for at du alltid støtter og oppmuntrer meg!

Cathrine Sivertsen

Tromsø, mai 2012

Sammendrag

En av de store utfordringene innenfor kreftforskning, er å finne og identifisere stabile biomarkører som kan brukes til diagnostisering. I 2008 ble miRNA for første gang detektert i blod, siden har det også blitt detektert i andre kroppsvæsker. Ekstracellulære miRNA er godt egnet som potensielle biomarkører, siden de har vist seg å være svært stabile i kroppsvæsker uten å bli degradert av ribonukleaser. miRNA er omkring 19-23 nukleotider lange enkeltrådede RNA-molekyler, som deltar i reguleringen av genaktivitet og proteinsyntese i celler. Funksjonelt inngår miRNA i et kompleks med proteiner, og forårsaker kløyving, deadenylering og degradering av mRNA, samt hemming av translasjonen. miRNA i exosomer, ble for første gang beskrevet i 1983, og siden den gang har det blitt gjennomført flere studier for å kartlegge sammenhengen mellom exosomer og miRNA.

Den første koblingen mellom miRNA og kreft ble oppdaget i 2002, og det har i senere tid blitt vist at miRNA har en viktig rolle innenfor utvikling og progresjon av nesten alle krefttyper, deriblant brystkreft. I denne oppgaven har det blitt sekvensert miRNA fra brystkreftceller med SOLiD-4 sekvensering, og analysert miRNA i exosomer med RT-qPCR-analyse. Det har blitt vist at miRNA-uttrykket i de seks brystkreftcellerlinjer ikke følger cellelinjenes genetiske subtyper, men har i stedet kun en delvis sammenfallende uttrykksprofil. miRNA med et kjent overuttrykk og kjente roller som regulatorer i brystkreft er også høyt uttrykt i cellelinjene i denne oppgaven. Det exosomale miRNA-uttrykket sammenfaller i stor grad med det intracellulære miRNA-uttrykket. Likevel er det funnet miRNA som kun er detektert i cellelinjene eller exosomene, noe som kan tyde på at utskillelsen av miRNA i exosomer kan være en aktiv og selektiv prosess. Det er liten tvil om at miRNA har et stort potensial som fremtidige biomarkører både med diagnostisk og prognostisk verdi, samtidig som de kan bidra til å utvikle nye profiler for en mer skreddersydd behandling av brystkreft.

Forkortelser

mRNA- Messenger-RNA

PR- Progesteronreseptor

ncRNA- Ikke-proteinkodende RNA

HER2- Human epidermal growth factor receptor-like 2

rRNA- Ribosomale RNA

GRB7- Growth factor receptor-bound protein 7

tRNA- Transfer RNA

HDL- High-density lipoprotein

snRNA- Små nukleære RNA

NPM1- Nucleophosmin1

snoRNA- Små nukleolære RNA

MVBs- Multivesicular bodies

miRNA- MikroRNA

ESCRTs- Endosomal-sorting complexes required for transport

piRNA- Piwi-interacting RNA

RT-qPCR- Reverse transcription quantitative real time polymerase chain reaction

siRNA- Små-interfererende RNA

Lu- Luminal

PASR- Promoter-assosierte short RNA

BaA- Basal-A

TASR- Termini-assosierte short RNA

BaB- Basal-B

eRNA- Enhancer RNA

ATCC- American Type Culture Collection

nt- Nukleotider

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle medium

RISC- RNA- induced- silencing complex

RPMI- Roswell Park Memorial Institute medium

pri- miRNA- Primary microRNA

PBS- Phosphatebuffered saline

pre-miRNA- Precursor microRNA

total-RNA- TotRNA

RNase- Ribonuklease

mg/ml- Milligram/milliliter

miRISC- MicroRNA-assosiert-RNA-induced-silencing complex

ml- Milliliter

Ran-GTP- Ran-guanosintrifosfat-avhengig transporter

rpm- Rotasjoner per minutt

Ago2- Argonaut2

µl- Mikroliter

UTR- Untranslated region

RIN- RNA integrity number

P-bodies- Processing-bodies

M- Molar

kb- Kilobase

cDNA- Komplementært DNA

ER- Østrogenreseptor

RT- Revers transkripsjon

TEM- Transmisjon elektronmikroskopering

EM- Elektronmikroskopi

Innholdsfortegnelse

Forord	ii
Sammendrag	iv
Forkortelser	vi
1. Introduksjon	1
1.1 Ikke-proteinkodende RNA molekyler	1
1.1.1 Små-regulatoriske RNA	1
1.1.2 miRNA-gener	2
1.2 Biogenesen av miRNA	3
1.3 miRNA som genregulatorer	5
1.4 Brystkreft	8
1.4.1 Klassifisering av brystkreft	8
1.4.2 Brystkreftcellerlinjer	9
1.5 Brystkreft og miRNA	10
1.6 Ekstracellulært miRNA	12
1.6.1 Exosomer	13
2. Materiale og metode	15
2.1 Cellelinjer	15
2.2 Isolering av total-RNA fra cellelinjer	17
2.3 Qubit® Fluorometer	18
2.4 Agilent 2100 Bioanalyser	18
2.5 Sekvensering	19
2.5.1 Sequencing by Oligo Ligation and Detection (SOLiD):	20
SOLiD™ 4-sekvensering	20
2.5.2 Bibliotek for SOLiD™ 4-sekvensering	21
2.5.3 Templated beads for SOLiD™ 4-sekvensering	22
2.5.4 Work-flow analyse (WFA) og SOLiD 4-sekvensering	23
2.5.5 Bioinformatikk, CLC Genomics Workbench	23

2.6 miRNA fra exosomer	24
2.6.1 Isolering av miRNA fra exosomer	24
2.6.2 Reverse transcription quantitative real time polymerase chain reaction (RT-qPCR)	25
2.7 Transmisjons-elektronmikroskopi (TEM) av exosomer	26
3. Resultater	27
3.1 SOLiD™ 4-sekvensering	27
3.1.1 miRNA-uttrykket følger ikke klassifiseringen av brystkreftcellerlinjer	28
3.1.2 Sammenligning av miRNA-uttrykket i ulike subtyper av cellerlinjer	31
3.2 Transmisjons-elektronmikroskopi av exosomer	33
3.3 Ekstracellulære miRNA som er detektert i exosomer	34
3.3.1 God korrelasjon mellom parallellene av miRNA detektert i exosomer	34
3.3.2 Uttrykk av miRNA i exosomer følger ikke cellerlinjenes genetiske subtype	36
3.4 Selektiv utskillelse av miRNA i exosomer fra brystkreftcellerlinjer	41
4. Diskusjon	43
5. Konklusjon og videre aspekter	49
6. Referanser	51
7. Appendiks	61
7.1. SOLiD™ bead concentration chart	61
7.2. Kvalitetskontroll av totRNA	62
7.3. Kontroll av miRNA isolert fra exosomer	65

1. Introduksjon

1.1 Ikke-proteinkodende RNA molekyler

I mer enn 50 år har et “gen” vært synonymt med en del av genomet som koder for et messenger RNA (mRNA), som igjen translateres til et protein. Selv om de proteinkodende genene bare utgjør omkring 1-2 % av genomet, har transkriptomanalyser vist at opptil 90 % av genomet blir transkribert [1]. Den delen av genomet som blir transkribert, men ikke translaterert, kalles ikke-proteinkodende RNA (non-coding RNA, ncRNA). Antallet proteinkodende gener har vært relativt konstant gjennom evolusjonen, mens mengden av ikke-proteinkodende sekvenser har økt proporsjonalt med kompleksiteten til organismene [2]. Disse ncRNA molekylene har viktige regulatoriske roller i utvikling [3-5], stressrespons og respons på andre stimuli [6-8], samt i sykdomsutvikling [9, 10]. ncRNA deles inn i infrastrukturelle ncRNA og regulatoriske ncRNA. Ribosomale RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA), små nukleære RNA (snRNA) og små nukleolære RNA (snoRNA) er eksempler på infrastrukturelle konstitutivt uttrykte RNA. Regulatoriske ncRNAs har derimot en mer direkte rolle i regulering av genekspresjonen og deles inn i mikroRNA (miRNA), piwi-interacting RNA (piRNA), små interfererende RNA (siRNA) og lange ikke-kodende RNA (long non-coding (lncRNA)) [11]. I tillegg er det nylig beskrevet, men ikke fullstendig karakterisert ulike klasser regulatoriske ncRNA som: promoter-assosierte short RNA (PASR) terminus-associated short RNA (TASR) og enhancer RNA (eRNA) [7, 8, 12, 13].

1.1.1 Små-regulatoriske RNA

Små-regulatoriske RNA, er i størrelse, den minste klassen av regulatoriske RNA. De er mindre enn 40 nukleotider (nt), og deles inn i tre ulike klasser basert på funksjon: siRNA, piRNA og miRNA [14]. siRNA er med på å regulere genuttrykket ved sekvensspesifikk binding av mRNA, med påfølgende kløyving av mRNA'et via RNA-induced-silencing complex (RISC). piRNA er også involvert i nedregulering av genuttrykk, særlig i form av hemming av uttrykket av transposoner under embryogenesen [15, 16].

miRNA er omkring 19-23 nt lange enkeltrådede RNA-molekyler (det korteste og lengste miRNA'et som har blitt oppdaget er på henholdsvis 15-og 27 nt) som deltar i reguleringen av

genaktivitet og proteinsyntese i celler. Funksjonelt inngår miRNA i et kompleks med proteiner, og kan forårsake kløyving, deadenylering og degradering av mRNA, samt hemming av translasjonen [17-22]. Det første medlemmet av miRNA familien, *lin-4*, ble oppdaget i 1993 i nematoden *Caenorhabditiselegans*. *Lin-4* viste seg å regulere *lin-14* proteintranslasjon, som førte til et lavere nivå av *lin-14*-proteinet i tidlig larvestadium [23]. miRNA ble imidlertid ikke anerkjent som en egen klasse regulatoriske molekyler før tidlig på 2000-tallet [24, 25]. Siden 1993 har det blitt oppdaget og identifisert flere tusen miRNA i ulike arter, som alle blir lagret i en offentlig database kalt miRBase [17]. Siden et miRNA kan binde en rekke mRNA og et mRNA kan reguleres av flere miRNA, har det blitt estimert at uttrykket til mer enn tredjedel av de humane genene blir regulert av miRNA [26].

1.1.2 miRNA-gener

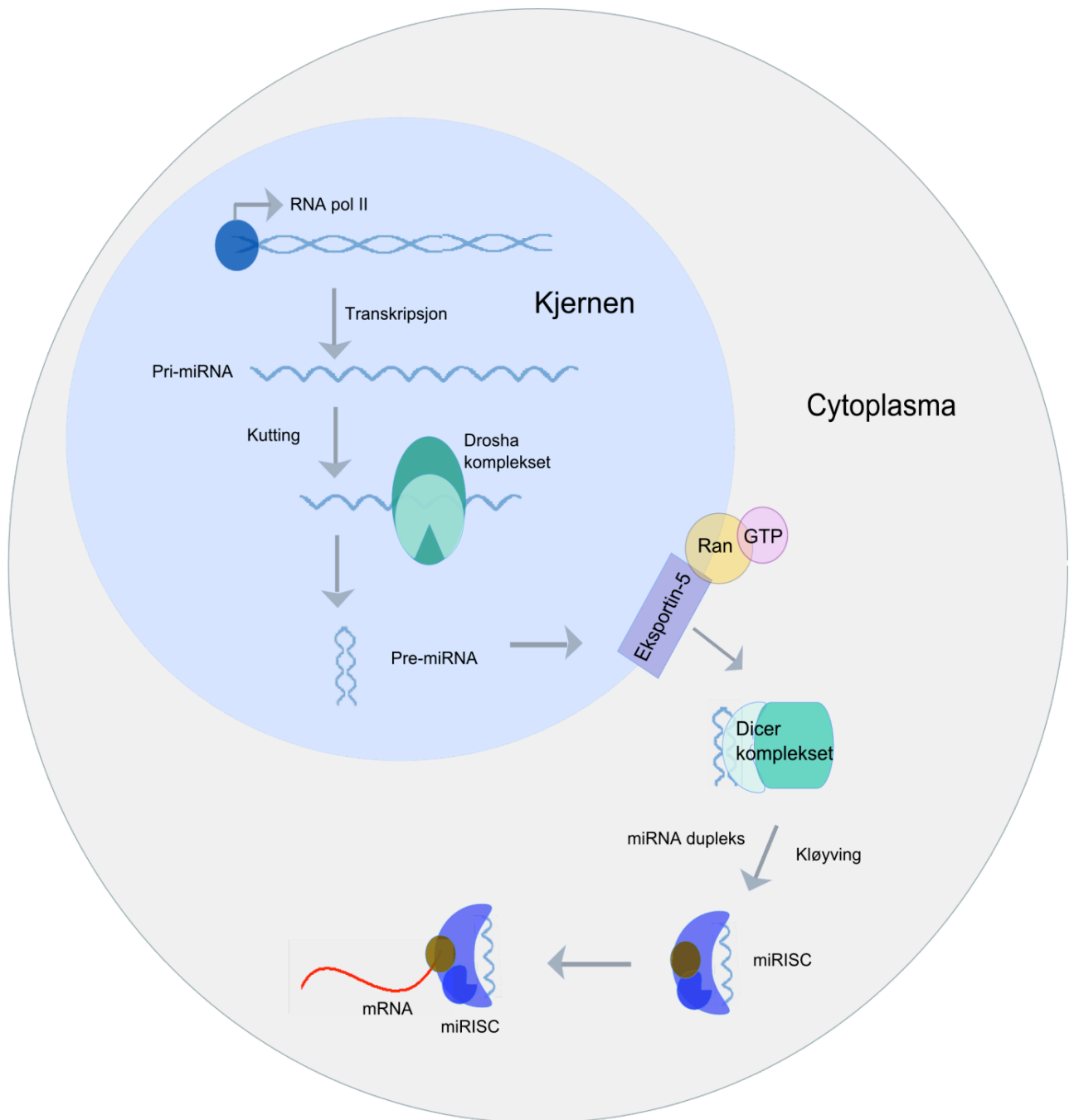
Omkring 70 % av miRNA-genene er lokalisert i introner og/eller eksoner. De resterende 30 % finnes i områdene mellom andre gener (intergenic regions/intergeniske regioner) [27]. Vanligvis er miRNA som er lokalisert inne i introner og eksoner orientert i samme retning som vertsgenet, slik at de transkriberes sammen med vertsgenet som et stort transkript. I motsetning vil miRNA som er lokalisert i intergeniske regioner transkriberes derimot som uavhengige transkripter [28]. Det finnes også miRNA i introner og eksoner som er orientert i motsatt retning av vertsgenet, og disse transkriberes i likhet med intergeniske miRNA som uavhengige transkripsjonsenheter. Ofte opptrer miRNA i såkalte genomiske cluster (grupper av miRNA som er nært hverandre i genomet) og ofte, men ikke alltid er miRNA i slike cluster i familie (har sekvenslikhet i seed regionen, se kapittel 1.3). miRNA med genomisk nærhet transkriberes ofte sammen som såkalte polycistroniske RNA, men miRNA lokalisert lenger fra hverandre enn 50 kilobaser (kb) transkriberes vanligvis uavhengig av hverandre [29].

1.2 Biogenesen av miRNA

Biogenesen av miRNA starter i cellekjernen og består i hovedsak av tre trinn, transkripsjon av primary miRNA (pri-miRNA) i kjernen, prosessering av pri-miRNA til precursor miRNA (pre-miRNA) i kjernen og dannelsen av modent miRNA i cytoplasma (figur 1.1) [30].

pri-miRNA- transkriptet transkriberes vanligvis av RNA polymerase II fra pri-miRNA genene, men det finnes også enkelte pri-miRNA som blir transkribert av polymerase III [31-33]. pri-miRNA kan være et relativt langt transkript på flere tusen basepar [30, 34, 35]. Etter transkripsjonen av pri-miRNA, blir transkriptet prosessert i kjernen av et kompleks som består av et ribonuklease III enzym (RNase III) kalt Drosha, og det dobbelttrådig-RNA bindingsproteinet DGCR8 [32, 36]. Drosha er den katalytiske delen av komplekset, mens DGCR8 gjenkjenner pri-miRNA og stabiliserer interaksjonen med Drosha [15]. Denne prosesseringen resulterer i et 60-70 nt langt pre-miRNA som er organisert i en hårnålstruktur. I basen på denne hårnålstrukturen er det en 5`fosfatgruppe og et 3` overheng, noe som er karakteristisk for produkter av en RNase III reaksjon. pre-miRNA`et blir transportert ut av kjernen av en Ran-guanosintrifosfat-avhengig transporter (Ran-GTP), Exportin-5 [15, 30, 37], hvor Exportin-5 gjenkjenner hårnålsstrukturen og 3` overhenget på pre-miRNA`et [32].

I cytoplasma blir pre-miRNA`et videre prosessert. Denne prosesseringen skjer ved hjelp av et annet RNA polymerase III enzym, Dicer, sammen med en dobbelttrådet RNA bindingspartner, TRBP [32]. TRBP er med på å stabilisere Dicer slik som DGCR8 gjør med Drosha [38]. Dicer/TRBP kutter begge trådene i hårnålsstrukturen 19-23 nt fra basen, og genererer dermed et miRNA-dupleks. Duplekset inkorporeres så i et kompleks, kalt RNA-induced- silencing complex (RISC), som består av Dicer, TRBP og en endonuklease med navn Argonaute 2 (Ago2). Ago2 er den katalytiske komponenten i komplekset [3, 14]. Den ene tråden av miRNA-duplekset degraderes som oftest, mens den andre blir værende i RISC, nå kalt miRNA-assosiert-RNA-induced- silencing complex (miRISC) [39]. Tråden som blir inkorporert i komplekset bestemmes ut i fra hvilket RNA-molekyl som har den minst termodynamisk stabile 5`enden, og betegnes som det modne miRNA`et. miRNA`et kan nå negativt regulere genuttrykket ved direkte baseparring med mRNA [14].



Figur 1.1. Biogenesen av miRNA

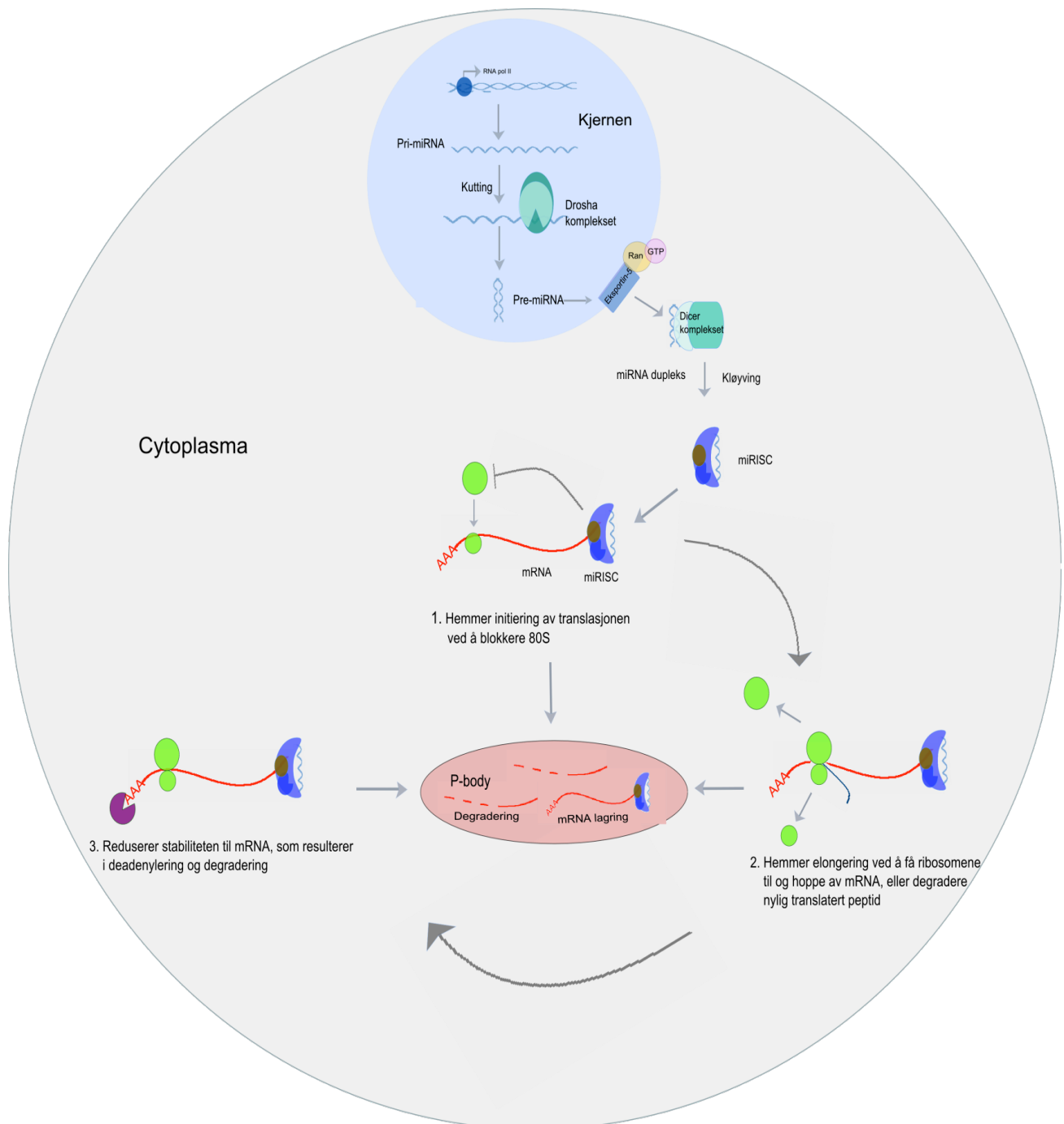
pri-miRNA blir transkribert av RNA polymerase II i kjernen. Transkriptet blir videre prosessert av Drosha-komplekset til pre-miRNA (60-70 nt). pre-miRNA transporteres ut av kjernen av Exportin-5. I cytoplasma prosesseres pre-miRNA`et videre til et modent og funksjonelt miRNA (19-23 nt) ved hjelp av endonukleasen Dicer. Det modne miRNA`et inkorporeres så i miRISC, og forårsaker sekvensspesifikk nedregulering av genuttrykk [19, 20, 31-33, 36, 39-41].

1.3 miRNA som genregulatorer

Den eksakte mekanismen for hvordan miRNA nedregulerer sine målgener er et omdiskutert tema, men det foreligger hovedsakelig to modeller som forklarer hvordan miRNA regulerer genuttrykket [14, 21, 22, 40]. Den ene modellen bygger på at miRNA forårsaker degradering av mRNA'et, og uten mRNA kan det heller ikke lages noe protein. Den andre modellen foreslår hemming av translasjonsinitiering med påfølgende degradering av mRNA'et som den primære virkemåten. I cellen er disse prosessene så tett koblet at en hemming av translasjonen uansett vil føre til degradering av mRNA, dersom ikke mRNA'et aktivt beskyttes mot degradering [42]. Det er vist at mange av de faktorene som forårsaker degradering av mRNA, også er involvert i regulering av translasjonen [20]. Når miRNA'et er en del av RISC komplekset, kan bindingssetet på mål-mRNA'et gjenkjennes. Dette bindingssetet finnes oftest i 3' untranslated region (UTR) på mRNA'et, og binder med standard Watson and Crick baseparing [21]. I hvor stor grad bindingen mellom miRNA-mRNA er komplementær, ser ut til å ha en betydning for reguleringsmekanismen [14]. miRNA i pattedyr binder som regel ikke fullstendig komplementært til mRNA, bortsett fra i den såkalte seed-sekvensen. Seed-sekvensen består av nukleotid 2-7 på 5' enden av miRNA'et som binder fullstendig komplementært til mRNA [43]. Likevel finnes det eksempler på at miRNA også kan være funksjonelle selv med en lav grad av komplementaritet i seed sekvensen [22]. En fullstendig komplementær binding i den sentrale regionen (nukleotid 9-12) mellom miRNA og mRNA stimulerer en Argonaut-mediert kløyving av mRNA, men dette er vanligere i planter enn hos pattedyr [22].

Det finnes flere modeller for hvordan miRNA regulerer genuttrykket hos pattedyr: bindingen av miRISC til 3' UTR sekvensen fører til et mer tilgjengelig mRNA, noe som fremmer deadenylering og eksonukleaseaktivitet. Proteinet GW182 binder Ago2 i miRISC, og rekrutterer dermed det poly (A)-bindings proteinet (PABP), deadenylasekomplekset CCR4:NOT1 og decapping proteinkomplekset DCP1:DCP2 [18, 21, 22, 44-46]. Dette kan tyde på at degradering av mRNA utgjør en viktig del av miRNA-mediert nedregulering av genuttrykket. Det har også blitt foreslått at miRNA kan inhibere translasjonen ved hemming av elongering eller tidlig terminering, samt å bidra til degradering av et translatert protein [14, 21, 47, 48]. Figur 1.2 viser hvordan miRNA kan regulere genuttrykket via tre forskjellige modeller: 1) Hemme initiering av translasjonen ved å hindre gjenkjennelse av EIF4E-cap og med det hemme dannelsen av eller blokkere ribosomale enheter som 80S på mRNA. 2)

Hemme elongeringen ved at ribosomet dissosierer fra mRNA`et, samt degradere nytranslatert peptid. 3) Destabilisere mRNA ved å binde til deadenylerende komplekser, blant annet GW182, som fører til en deadenylering av mRNA med påfølgende degradering. miRISC bundet til mRNA kan også bli lagret eller degradert i såkalte processing-bodies (P-bodies) [40].



Figur 1.2. Genregulering av miRNA, modifisert fra [40].

miRISC binder til bindingssetet på mRNA og regulerer genuttrykket via: 1) Hemme initiering av translasjonen ved å blokkere 80 S. 2) Hemme elongeringen ved å få ribosomene til å dissosiere fra mRNA eller degradere nylig translert peptid. 3) Redusere stabiliteten til mRNA som fører til en deadenylering med påfølgende degrading av mRNA [40].

1.4 Brystkreft

I 2009 ble 2745 kvinner og 15 menn rammet av brystkreft i Norge. Risikoen for å få brystkreft stiger med økende alder, og ca 80 % av de som blir rammet er over 50 år.

Brystkreft hos menn forekommer, men ut i fra statistikken er sannsynligheten for å utvikle denne formen for kreft svært liten [49]. Brystkreft er ikke en enkelt sykdom, men en samling av brysttumorer som har forskjellig genetikk, patologi, genomisk variasjon og klinisk utfall [50].

1.4.1 Klassifisering av brystkreft

Brystkreft klassifiseres i fem ulike subtyper basert på genuttrykk [51-53]. Disse fem subtypene deles inn i østrogenreseptor (ER)-positive eller ER-negative. De ER-positive tumorene uttrykker ER, ER-responsive gener, samt andre gener som er karakteristiske for luminal epitelceller, og de kalles derfor for luminal-subtype [54]. Genuttrykket til den luminal subtypen av brystkreft korrelerer med genuttrykket til de normale luminal epitelcellene i brystet. Dette inkluderer transkripsjonsfaktorene GATA3 og FOXA1 som er viktige for luminal differensiering [55]. Den luminal subtypen uttrykker ofte (HER)2, og basert på uttrykket av blant annet ER, PR og HER2 kan den luminal subtypen deles i to undergrupper, kalt luminal-A og luminal-B. Luminal-subtype tumorer har generelt en bedre prognose enn basal-lignende tumorer, og er oftere stadium I (klinisk T1N0M0, tumor \leq 2 cm i største diameter) ved diagnostidspunkt enn den basale subtypen [56-60].

De ER-negative tumorene deles inn i tre undergrupper: HER2-positive (alternativt kalles denne ERBB2 siden ERBB2 er navnet på genet som koder for HER2), basal-lignende- og såkalte normale brystvevlignende-tumorer. HER2-positive tumorer har et høyt uttrykk av gener lokalisert i HER2 ampliconet (i 17q21), inkludert HER2 og growthfactor receptor-bound protein 7 (GRB7), aktivering av (NF)- κ B og transkripsjonsfaktoren GATA4, samtidig som uttrykket av ER og GATA3 mangler [61, 62].

De basal-lignende tumorene mangler ER og HER-2, og har et genuttrykk som ligner basale epitelceller og myoepitelceller i fra bryst. De har ofte mutasjoner i tumor-suppressorgenene (gener som er assosiert med negativ regulering av cellyklus, apoptose og differensiering), *TP53* og *PTEN*, og er assosiert med en "aggressiv" type med en dårlig prognose.

Trippel negativ-fenotype tumor er tumorer som verken uttrykker ER, PR eller HER2. Disse er nesten alltid klassifisert som basal-lignende type [63]. Trippel negativ type brystkreft har en markant høyere risiko for tilbakefall de første 3-5 årene etter diagnose tidspunkt sammenlignet med de to ER-positive undergruppene. Samtidig er risikoen for tilbakefall etter 3-5 år markant lavere for denne gruppen enn for de ER-positive undergruppene [64, 65].

Den normale brystvevlignende undergruppen har fått sitt navn fordi den ligner normalt brystvev med et relativt høyt uttrykk av mange gener karakteristisk for fettceller og andre ikke-epiteliale celletyper, og lavt uttrykk av lumbale og epiteliale gener. Denne undergruppen er assosiert med svært ulike prognoser som strekker seg fra luminal-A med den aller beste prognosen, til HER-2 og basal-lignende tumorer [51, 52, 66-68].

1.4.2 Brystkreftcellelinjer

Det er en stor utfordring å forstå biologien til brystkreft. Siden sykdommen er så kompleks og består av så mange forskjellige undergrupper, er det vanskelig å bruke en enkelt eksperimentell modell innenfor forskningen [69]. Den mest brukte modellen innenfor forskning på brystkreft er brystkreftcellelinjer. Mye av den informasjonen man har om de ulike brystkrefttypene har man funnet ut ved studier utført med cellelinjer [69].

Brystkreftcellelinjer har blitt brukt til å undersøke hvordan proliferasjon, apoptose og migrering er deregulert i brystkreft, samt for å forstå brystkreftpatologien og finne nye terapimål [50, 69]. Basert på genuttrykk deles brystkreftcellelinjer inn i gruppene luminal, basal-A og basal-B [70]. Sammenligning av subtyper i brysttumorer og cellelinjer viser at de fleste lumbale cellelinjene ligner på luminal-A eller luminal-B-tumorer, de fleste basal-A cellelinjene ligner på basal-lignende og de fleste av basal-B ligner enten på basal-lignende eller HER2 tumorgruppen. Sammenligning av brystkrefttumorer opp mot de ulike gruppene av cellelinjer, viser at de fleste basal-lignende tumorer svarer til basal-A cellelinjer. Luminal-A-og B tumorer ligner mest på lumbale cellelinjer, mens HER2 ligner enten på lumbale eller basal-A cellelinjer [70]. Grunnen til dette avviket mellom brystkrefttumorer og brystkreftcellelinjer kan være at cellelinjene ikke inneholder celler fra normalt epitel eller stroma som påvirker den genetiske profilen. Det kan også skyldes et fravær av interaksjon og/eller signalering mellom tumor og det omkringliggende vevet i cellekulturene. Den mest sannsynlige forklaringen er kanskje at cellelinjene stammer fra subpopulasjoner av kreftceller

som er selektert frem på grunn av vekstfordeler, og dermed viser noe mindre variasjon i genuttrykket enn brysttumorer [71].

1.5 Brystkreft og miRNA

En av de store utfordringene innenfor kreftforskning, er å finne og identifisere stabile biomarkører som kan brukes i diagnostisering. Eksisterende diagnostiske metoder for å detektere brystkreft har mange begrensninger. På nåværende tidspunkt er mammografi antatt som den mest pålitelige metoden for å oppdage brystkreft som fremdeles er så lite utviklet at kvinnen ikke merker den selv. I Norge blir alle kvinner i alderen 50-69 år invitert til mammografiprogrammet hvert annet år [72]. Denne metoden er forbundet med varierte tolkninger av resultater, og kan dermed gi falske positive eller negative resultater [73, 74]. Det hevdes også at antall døde av brystkreft i Norge og andre europeiske land ikke har blitt redusert etter innføringen av mammografi [75]. Dersom det finnes biomarkører for brystkreft i blod, spytt eller urin hos dem som er rammet, vil dette kunne forbedre diagnostikken og den kliniske behandlingen av brystkreft [73]. Analyse av kroppsvæsker er mye brukt i diagnostikk, fordi det er reproducerbart, enkelt, ikke-invasivt og koster lite. Mange ulike komponenter kan potensielt være biomarkører for brystkreft: dette inkluderer både frie, sirkulerende kreftceller (Circulating tumor cells–CTC) og makromolekyler som lipider, proteiner, DNA, RNA og miRNA som stammer fra kreftcellene eller omkringliggende celler assosiert med kreften [76].

Den første koblingen mellom miRNA og kreft ble oppdaget i 2002, da det ble vist at microRNA-15 (miR-15) og miR-16 var nedregulert i B-celle kronisk lymfatisk leukemi [77]. Senere har det også blitt vist at miRNA har en viktig rolle innenfor utvikling og progresjon av nesten alle krefttyper, deriblant brystkreft [73]. I 2005 viste Iorio *et al.* at en sammenligning av 76 primære brystkreft- og 10 normale vevsprøver, ga et resultat på 29 miRNA med signifikant forskjellig uttrykk. Noen miRNA var nedregulerte, som miR-10b, miR-125b og miR-145, mens miR-21 og miR-155 var oppregulerte, noe som viste at miRNA kan ha både krefthemmende og kreftfremmende egenskaper [78].

Et onkogent miRNA (onkomiR) fremmer tumorutvikling ved å hemme uttrykket av tumor-suppressorgener. miR-21 er et eksempel på et miRNA som er et onkomiR i brystkreft. Dette miRNA'et er ofte overuttrykt i brystkreft [78], og det er assosiert med en langtkommen

sykdom og en dårlig prognose [79]. miR-21 har en viktig rolle i reguleringen av tumorvekst [79], invasjon [80], metastasering [81], og det er vist at miR-21 er involvert i resistens mot kjemoterapi [82].

miR-155 er et annet onkomiR som også har vist seg å være involvert i resistens mot kjemoterapibehandling [83]. Dette miRNA`et fremmer metastase [84], celleoverlevelse og cellemigrering i brystkreft [85]. Overuttrykk av miR-155 i brystkreftceller har også vist seg å fremme celleproliferasjon, tumorvekst og dannelse av metastaser [86]. I 2011 ble det vist at en nedregulering av miR-155-uttrykket i brystkreftceller kunne hemme vekst av brystkreftceller ved å indusere celledød i G0/G1 fasen av celledødsprosessen. Disse resultatene antyder at ved å nedregulere onkomiR`er, kan dette brukes som en del av strategien i brystkreftbehandling [84].

miRNA som har et lavere uttrykk i kreftceller sammenlignet med normale celler kan ha såkalte krefthemmende egenskaper. Disse miRNA`ene hemmer uttrykket av onkogener, og virker dermed som tumorsuppressorer [87]. miR-34a er en kjent tumorsuppressor, og uttrykket av dette miRNA`et har vist seg å redusere risikoen for metastase i brystkreft, samt å være assosiert med en lavere risiko for tilbakefall eller død som følge av brystkreft [88]. miR-34a har også vist seg å være involvert i celledød *in vivo*, da både ved apoptotisk og ikke-apoptotisk celledød [89]. miR-31 er, i likhet med miR-34a, også assosiert med evnen til å hindre dannelsen av metastaser i brystkreft. Uttrykket av dette miRNA`et er negativt korrelert med både tilstedeværelsen av metastaser og sannsynligheten for tilbakefall, uavhengig av andre molekylære markører. miR-31 hemmer alene minst fire ulike trinn i invasjons- og metastase-prosessen: lokal invasiv vekst, intraluminal overlevelse, effektiv dissosiasjon av kreftceller fra primærsvulst inn i blod- og lymfesystemet og evnen til å danne metastaser [90].

1.6 Ekstracellulært miRNA

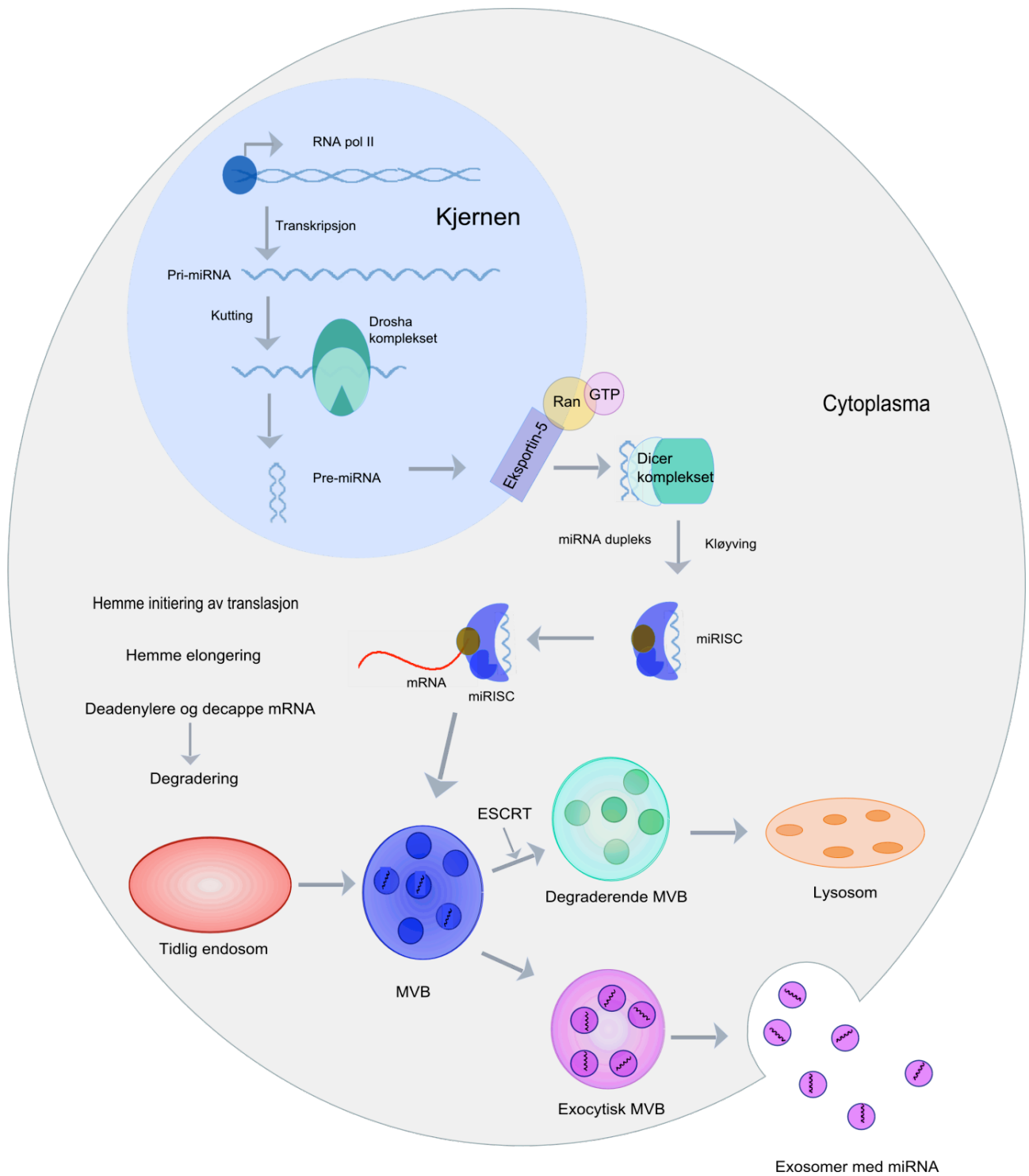
Siden det første miRNA`et ble oppdaget, har det vært mye forskning innen dette feltet [91-97]. I 2008 ble miRNA for første gang detektert i blod [98], og det har også blitt detektert i andre kroppsvæsker som urin, spytt og melk [73]. Ekstracellulære miRNA er godt egnet som potensielle biomarkører, fordi de har vist seg å være svært stabile i kroppsvæsker uten å bli degradert av ribonukleaser. En studie utført i 2008 der stabiliteten til miRNA i sirkulasjonen ble undersøkt, viste at miRNA`et forble intakt selv etter gjentatte temperaturendringer og flere fryse-tine sykluser. Ved tilførsel av syntetisk miRNA i forsøkene, så man derimot en umiddelbar degradering av det syntetiske miRNA`et, noe som har støttet opp om teorien at miRNA som finnes i blodet, må være beskyttet for ikke å bli degradert av ribonukleaser [98].

Opphavet til stabilt ekstracellulært miRNA er ennå ikke fullstendig kartlagt, men det har blitt foreslått tre ulike opphav: i) En passiv lekkasje fra ødelagte celler forårsaket av vevsskader, apoptose, inflammasjon eller celler som har kort levetid. ii) Aktiv sekresjon av miRNA bundet til RNA-bindende proteiner. Slike RNA-bindende proteiner kan være high-density lipoprotein (HDL), Ago2 eller nucleophosmin1 (NPM1). iii) Et tredje opphav til sirkulerende miRNA kan være aktiv sekresjon av miRNA via mikrovesikler som exosomer, mikropartikler eller apoptotiske vesikler [99]. Det faktum at ekstracellulært miRNA er stabilt i blod, tyder på at miRNA kan være assosiert med proteinkomplekser eller lokalisert inne i mikropartikler noe som beskytter mot degradering [99]. En studie gjennomført av Turchinovich *et al.* i 2011 antydte at mesteparten av ekstracellulært miRNA er assosiert med Ago2, og at dette kan indikere at sirkulerende miRNA er biprodukter fra døde celler på grunn av stabiliteten til dette komplekset [100]. Studier har også vist at sirkulerende miRNA kan være bundet til NPM1 som kan være med på å gi et stabilt miRNA i sirkulasjonen [100, 101]. En studie utført i 2008 viste at mikrovesikler som exosomer i cellekulturer inneholder miRNA, og at disse mikrovesiklene fungerte som effektive bærere for miRNA [102]. Studier som har blitt utført etter denne viser også at mikrovesikler i blod kan være en blanding av flere forskjellige mikrovesikler som mikropartikler, exosomer og andre partikler med vesikulær struktur [103, 104].

1.6.1 Exosomer

Exosomer ble for første gang beskrevet i 1983 [105], og siden den gang har det blitt gjennomført flere studier for å kartlegge sammenhengen mellom exosomer og miRNA [101, 106-108]. Exosomene blir dannet ved invers budding av endosomale membraner, og gir med det opphav til multivesicularbodies (MVBs). MVBs har blitt vist til å være et trinn i modningen av lysosomer, samt at de kan være forløpere til exosomer [109]. MVBs blir til exosomer ved å fusjonere sammen med plasmamembranen, og frigjøre innholdet ekstracellulært (figur 1.3). Disse membranvesiklene, med størrelse 30-100 nanometer (nm), blir frigjort fra flere celletyper både ved normale forhold og ved sykdom [99, 110]. Det er tenkelig at det er biokjemiske egenskaper som styrer hvorvidt MVBs utvikler seg til lysosomer eller exosomer [111]. Hvilke mekanismer som styrer utviklingen av MBV's til lysosomer eller exosomer er noe uklart, men multikomplekset "endosomal-sorting complexes required for transport" (ESCRTs) er foreslått å ha en rolle i dannelsen av lysosomer [112], mens utviklingen av exosomer muligens kan være ubiquitin-avhengig [111].

Det har blitt foreslått at exosomer ikke inneholder miRNA ved en tilfeldighet, men at det tvert imot er en aktiv prosess som kontrolleres av spesifikke proteiner i RISC-komplekset. Ago2 har blitt observert i exosomer fra THP-1-celler [113]. GW182 som er en del av miRISC-komplekset, er også funnet i exosomer [114]. Dette kan tyde på at exosomer ikke bare leverer miRNA, men også proteiner som er assosiert med RISC-komplekset, noe som kan bidra til en økt funksjon av miRNA [99]. Tidligere har det vært tenkelig at det kun er hormoner, neurotransmitterer og cytokiner som har vært involvert i intercellulær kommunikasjon, men økende mengder data viser at membranvesikler som exosomer også finnes intercellulært, og kan spille en viktig rolle i den intercellulære kommunikasjonen [99, 111, 115, 116]. Flere studier har vist at exosomer som inneholder miRNA kan skilles ut av en type celler for deretter å tas opp av mottakerceller hvor miRNA'et virker på samme måte som endogent miRNA [99, 117-119]. Hvordan ekstracellulært miRNA blir tatt opp av mottakerceller er fortsatt uklart, men det foreligger noen teorier. Chen *et al.* 2011, fremmet en teori om at miRNA som er funnet i vesikler kan bli tatt opp av mottakerceller når vesiklene gjennomgår fagocytose, endocytose eller direkte fusjon med membranen til mottakercellene. miRNA som er bundet til proteinkomplekser kan muligens tas opp av andre celler via spesifikke reseptorer på celleoverflaten. Dersom slike reseptorer foreligger, vil dette kunne gi et spesifikt opptak av ekstracellulært miRNA i cellene [99].



Figur 1.3. Dannelse og frigjøring av exosomer, modifisert fra [99].

MVBs er vist til å være et trinn i dannelsen av lysosomer og exosomer. Exosomer blir dannet i MVBs ved inners budding av endosomale membraner. Exosomer blir frigjort ekstracellulært ved at MVBs fusjonerer sammen med plasmamembranen, for deretter å frigjøre exosomene [99, 109, 111, 112].

2. Materiale og metode

2.1 Cellelinjer

Cellelinjer som ble brukt i denne oppgaven var Hs 578 T, MDA-MB 231, HCC 1569, MCF 7, AU 565 og HCC 1187 (oppsummert i tabell 2.1). Hs 578 T-cellelinjen har sitt opphav fra en basal-lignende brystkreft fra en 74 år gammel kvinne, og ER og PR negativ. Denne cellelinjen klassifiseres som en basal-B subtype cellelinje [70, 71, 120]. MDA-MB 231 har sitt opphav fra en 51 år gammel kvinne, og er fra en basal-lignende tumor med en trippel negativ fenotype. Som cellelinje er MDA-MB 231 klassifisert som en basal-B subtype, og er karakterisert som en svært invasiv (in vitro), aggressiv og metastaserende (in vivo) cellelinje [70, 71, 121]. HCC 1569 er fra en 70 år gammel kvinne, og klassifisert som basal-A cellelinje med uttrykk av HER2 [70, 71]. MCF 7 er den mest brukte brystkreftcellelinjen i verden, og er fra en 69 år gammel kvinne med en ER- og PR-positiv luminal-A brystkrefttumor. MCF 7 er klassifisert som en luminal cellelinje [70, 71, 121, 122]. AU 565 er fra en 43 år gammel kvinne med HER2- positiv tumor, og er en luminal cellelinje [71, 123]. HCC 1187 er klassifisert som en basal A cellelinje fra en 41 år gammel kvinne, og er fra en trippel negativ fenotype tumor [70, 71].

Cellelinjene ble dyrket som anbefalt fra American Type Culture Collection (ATCC). Vekstmedium som ble brukt var enten Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, fra Sigma Aldrich) eller Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI fra Sigma Aldrich) med 10 % føtalt kalveserum (FBS). Cellene ble inkubert ved 37 °C under 5 % CO₂ og subkultivert 1-3 ganger per uke, for å ha optimale vekstvilkår.

Ved subkultivering ble mediet pipettert av, og cellene ble vasket med 5-10 milliliter (ml) phosphate buffered saline (PBS fra Sigma Aldrich). Deretter ble 1-2 ml trypsin (Sigma Aldrich) tilsatt, og cellene ble inkubert på 37 °C til de løsnet fra dyrkningsflaskene. For å aspirere cellene ble vekstmedium brukt (DMEM eller RPMI med 10 % FBS), og 1×10^6 (T-25) - 4×10^6 (T-75) celler ble overført til en ny dyrkningsflaske med etterfylling av passende mengde vekstmedium (totalt 10 ml i T-25 og 20 ml i T-75).

Tabell 2.1. Oversikt over cellelinjer, klassifisering, uttrykk av reseptorer, alder på pasient og dyrkningsbetingelser som er brukt i denne oppgaven [71].

Cellelinje	Klasse	ER	PR	Trippel negativ	Her2	Alder	Medium	Andre betingelser
Hs 578 T	Basal B	-	-			74 år	DMEM + 10 % FBS	0,01 (mg/ml) insulin
MDA-MB 231	Basal B	-	-	+		51 år	DMEM+ 10 % FBS	
HCC 1569	Basal A	-	-		+	70 år	RPMI+ 10 % FBS	
HCC 1187	Basal A	-	-	+		41 år	RPMI+ 10 % FBS	
MCF 7	Luminal	+	+			69 år	DMEM + 10 % FBS	
AU 565	Luminal	-	-		+	43 år	RPMI+ 10 % FBS	

- DMEM- Dulbecco`s Modified Eagle medium, RPMI- Roswell Park Memorial Institute medium, FBS- Føtalt kalveserum

2.2 Isolering av total-RNA fra cellelinjer

Total-RNA (totRNA) isolering ble utført etter protokoll fra Forskningsgruppe for RNA og transkriptomikk, Universitetet i Tromsø. Isoleringen bestod i alt av seks trinn:

1) Cellelysering: Dette trinnet startet med å sentrifugere celler-vekstmedium på 1000 g i 3 minutter. Supernatanten ble pipettert av, og cellene ble vasket med PBS etterfulgt av en ny sentrifugering på 1000 g i 3 minutter. Supernatanten ble deretter pipettert av, cellene ble lysert ved tilsetning av 1 ml Trizol-reagent med påfølgende pipettering opp og ned til pelleten var løst. Trizol-reagenten er en en-fase løsning bestående av fenol og guanidine isothiocyanate som deaktiverer RNaser, lyserer cellene og stabiliserer RNA. Celler med Trizol-reagent ble satt på romtemperatur (RT) i 5 minutter for fullstendig lysing av cellene. Dette ble så overført til et 1,5 ml Lobind Eppendorfrør.

2) Faseseparering: I dette trinnet ble 0,2 x volum kloroform tilsatt, og prøven ble satt på is i 20 minutter med vending av røret hvert 2. minutt. Deretter ble dette sentrifugert ved 9000 rotations pr minute (rpm) i 30 minutter. Ved tilsetning av kloroform vil RNA`et separeres ut i den vannløselige fasen etter sentrifugering.

3) RNA-felling: Den nederste organiske fasen ble fjernet, etterfulgt av en ny sentrifugering på 9000 rpm i 5 minutter. Den øverste vannfasen ble så pipettert over i et nytt 1,5 ml Lobind reagensrør før 1 x volum av isopropanol ble tilsatt og blandet godt, før det ble satt i kjøleskap i 2 timer. Prøven ble så sentrifugert på 15000 g i 30 minutter, før supernatanten ble fjernet.

4) RNA vasking: 1 ml iskald 80 % etanol ble tilsatt, etterfulgt av en ny sentrifugering på 15000 g i 5 minutter. Supernatanten ble pipettert av, og pelleten ble tørket i avtrekkskap i 15 minutter.

5) Resuspending: Pelleten ble resuspendert i 10 mikroliter (μ l) nukleasefritt vann.

6) Kvalitativ og kvantitativ kontroll: Kontroll av prøven ble gjennomført ved bruk av Qubit Fluorometer (se kapittel 2.3) og Agilent 2100 Bioanalyser (se kapittel 2.4) (se appendiks 7.2).

2.3 Qubit® Fluorometer

Qubit® Fluorometer bruker fluorescens som er spesifikk for proteiner, RNA, DNA. Denne fluoriserende markøren fluoriserer kun når den er bundet til RNA, DNA eller proteiner. Kvantifisering med Qubit fluorometer detekterer kun molekyler som er av interesse, i motsetning til andre metoder slik som UV-absorbans som også kan detektere degraderte nukleinsyrer og frie nukleotider [124]. I denne oppgaven ble Qubit® Fluorometer brukt til kvantitativ analyse etter isolering av totRNA og miRNA fra exosomer (se kapittel 2.2 og 2.6.1). Qubit® Fluorometer ble utført etter protokoll fra Invitrogen.

2.4 Agilent 2100 Bioanalyser

Agilent 2100 Bioanalyser er et system som kan brukes for å kvantifisere og analysere kvalitet og størrelse av RNA, DNA, celler og proteiner. Dette systemet skiller prøvene etter størrelse ved bruk av en gel-elektroforese. Det brukes en chip som inneholder små brønner og mikrokanaler som tilføres gel, fluoriserende markør og prøvene. Prøvene blir separert med elektroforese, og blir detektert med fluorescens. Resultatene fra elektroforesen visualiseres som gel-liknende bånd og et diagram. Ved totRNA-analyse vil også et RNA integrity number (RIN) si noe om hvor intakt eller degradert RNA`et er. RIN har verdier fra 1 til 10, hvor 10 er fullstendig inntakt RNA. Det finnes ulike chip`er til ulike prøver. I denne oppgaven ble det brukt chip`er til total-RNA, småRNA og DNA. For totRNA analyse ved isolering av totRNA (se kapittel 2.2) ble det brukt TOTAL RNA 6000 Nano Chip. Til miRNA analyse ved bibliotekspreparering for SOLiD-sekvensering og exosomer, ble det brukt Small RNA Chip (se kapittel 2.5.2 og 2.6.1). For å undersøke kvantitet og størrelse av DNA ved bibliotekspreparering til SOLiD-sekvensering, ble det brukt en High Sensitivity DNA chip. Alle analysene ble utført etter protokoll fra Agilent Technologies [125].

2.5 Sekvensering

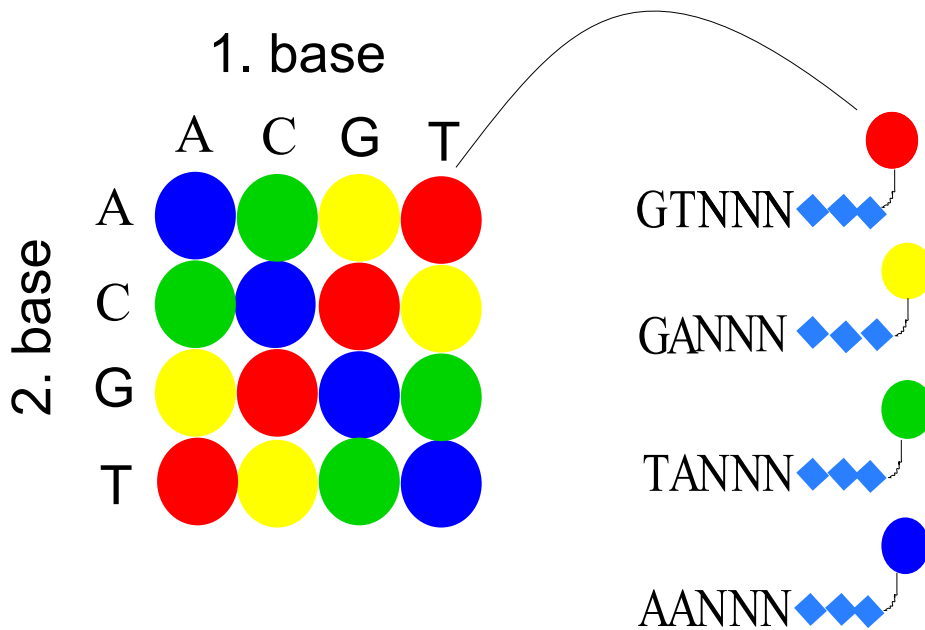
Sanger sekvensering har vært den mest brukte metoden til sekvensering av DNA siden den ble beskrevet for første gang i 1977 [126]. Sanger sekvensering bygger på deteksjon av nukleotid spesifikke endemerkede DNA-fragmenter i ulike størrelser, som separeres ved hjelp av gelelektroforese. Ved å sette fragmentene sammen, vil de representere hele DNA-tråden. I de siste årene har bruken av automatisert Sanger sekvensering (også kalt første generasjons teknologi) for genomanalyser blitt redusert, siden metoden både er tidkrevende og dyr. Behovet for nyere og forbedrede metoder for å sekvensere store mengder DNA (genom) og RNA (transkriptom), har ført til utviklingen av såkalt neste generasjon sekvenserings (NGS)-teknologi [127]. NGS som sekvenseringsteknikk ble valgt ut av *Nature Methods* som "the method of the year 2007"/ metoden av året 2007 [128]. Fordelene med NGS-teknologien er muligheten til å produsere store mengder data, samt muligheten til å identifisere og kvantifisere uoppdagede transkripter. NGS leser DNA-templatene randomisert gjennom hele genomet. Templatene kan leses ved å dele opp genomet i mindre fraksjoner, for deretter å ligere fraksjonene av DNA`et med adaptorer for randomisert lesning under DNA syntesen [129]. NGS-teknologien har resultert i omfattende studier for å sammenligne hele genomet i forskjellige organismer (dybde-sekvensering), samt å undersøke hvordan genetiske forskjeller i det humane genomet kan påvirke helse og sykdom [75]. NGS har også vist seg å være en teknologi som kan brukes i andre karakteriseringer og profileringer, som for eksempel av mRNA og miRNA [128].

2.5.1 Sequencing by Oligo Ligation and Detection (SOLiD):

SOLiD™ 4-sekvensering

SOLiD™ 4 systemet er en av de tre mest kjente NGS-teknologiene. Dette systemet ble tilgjengelig i 2007, og skiller seg fra de andre teknologiene ved å være en ligase-mediert sekvensering, noe som vil si at det brukes en ligase i stedet for polymerase ved elongering av templatet [128]. I dette systemet blir adaptorer bundet til DNA-fragmenter, som videre blir bundet til magnetiske kuler (eller såkalte "beads"). For opp-amplifisering av DNA'et på disse magnetiske kulene blir det gjennomført en såkalt emulsjons-PCR (polymerase chain reaction). Vanndråpene i oljeemulsjonen inneholder amplifikasjonsreagenser, de magnetiske kulene og et enkelt DNA templat med adaptorer. Festet til kulene er det adaptorer (P1 adaptor) som er komplementære til adaptorene som er festet til DNA- templatet, og de kan derfor brukes som primere ved emulsjons-PCR'en. Kuler med opp-amplifisert templat blir isolert ved hjelp av anrikningskuler som kun binder magnetiske kuler med templat. For sekvensering blir anrikede kuler deponert og kovalent bundet til en liten glassplate laget spesielt for dette formålet.

Selve sekvenseringen starter med en hybridisering av en primer til P1 adaptoren. Deretter blir prober som består av et bestemt fluoriserende merket 8-mer oligonukleotid ligert til primeren. Fire fluoriserende fargekoder er festet til probene (figur 2.1). Hvilken fluoriserende fargekode proben får, bestemmes ut i fra de to første basene på proben. Hvert liggeringsstrinn blir etterfulgt av en deteksjon av de fluoriserende fargekodene. Etter deteksjon er det en kløyving av proben etter 5'basen og fargekoden frigjøres, før en ny hybridisering- og liggeringssyklus gjennomføres. Etter flere sykluser med hybridisering og liggering, denatureres og fjernes det ny-syntetiserte liggeringsproduktet, og en primer som binder ett nukleotid oppstrøms i forhold til primer 1 starter en ny prosedyre med hybridisering og liggering. Dette primer-skiftet vil utføres totalt fem ganger med en ny redusering av ett nukleotid, og hver base vil da være sekvensert to ganger [128-130]. SOLiD™ 4 systemet fra Applied Biosystem ble brukt ved sekvensering av småRNA fra brystkreftcellerlinjene beskrevet i kapittel 2.1.



Figur 2.1, modifisert fra [131]. Fire fluoriserende fargekoder blir tilknyttet proben under SOLiD™ 4-sekvensering.

2.5.2 Bibliotek for SOLiD™ 4-sekvensering

I denne oppgaven ble småRNA bibliotek utarbeidet etter protokoll, Small RNA Library Preparation, SOLiD™ Total RNA-Seq Kit fra Applied Biosystems. SmåRNA bibliotekspreparering startet ved å utarbeide startmateriale: Total-RNA ble isolert fra cellelinjene Hs 578 T, AU 565, HCC 1569, HCC 1187, MCF 7 og MDA-MB 231 (se kapittel 2.2). Mengde og kvalitet av totRNA ble undersøkt ved bruk av Agilent 2100 Bioanalyzer (se kapittel 2.4). Den totale andelen av småRNA i cellelinjene varierte fra 0,2 % til 0,5 %. For å fjerne store RNA-molekyler og øke andelen småRNA i prøvene, ble prøven anrikt for småRNA. Invitrogen PureLink® miRNA Isolation Kit ble brukt til dette formålet. Metoden baseres på kolonner med silikamembraner som separerer småRNA fra større RNA. Større RNA binder til silikamembranen, mens småRNA elueres ut, og overføres til en ny kolonne for vasking med vaskebuffer. SmåRNA elueres ut til slutt med RNase-fritt vann. Andelen miRNA etter anrikning av småRNA bør ha en konsentrasjon mellom 1 -100 nanogram for å kunne lage komplementært-DNA (cDNA)- bibliotek til sekvensering med SOLiD™ 4.

Anrikt småRNA ble undersøkt ved bruk av Agilent 2100 Bioanalyser (se kapittel 2.4), og ut i fra disse resultatene ble mengden av prøven som ble brukt til biblioteket bestemt. Anrikt RNA ble hybridisert og ligert med adaptorsekvenser etter protokoll. Det ble utført en revers transkripsjon for å få dannet cDNA. cDNA ble renset ved å bruke MinElute®PCR Purification Kit fra Qiagen. Deretter ble cDNA størrelsesselektert ved bruk av gel, amplifisert med en PCR reaksjon og renset med kolonnerensning, alle trinnene utført etter protokoll. Ved å bruke barcoded SOLiD™ 3' PCR Primers i PCR reaksjonen var det mulig å sekvensere flere prøver på en gang. Etter rensingen ble størrelsen av det amplifiserte cDNA undersøkt ved Agilent 2100 Bioanalyser (se kapittel 2.4). Viste resultatene fra Agilent over 50 % av ønsket lengde av miRNA-ligeringsproduktet, var neste trinn system templated bead preparation etter protokoll. I denne oppgaven viste resultatene over 50 % av ønsket miRNA-ligeringsprodukt, så preparering av templated beads ble startet.

2.5.3 Templated beads for SOLiD™ 4-sekvensering

"Templated beads" ble utarbeidet ved å bruke det automatiserte SOLiD®EZ Bead™ systemet. Systemet består av tre trinn, hvorav det første er å bruke SOLiD™ EZ Bead™ Emulsifier for å preparere emulsjonen som består av det preparerte biblioteket og P1-kuler. Det andre trinnet er å bruke SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier for å utføre emulsjons-PCR. For å vaske og anrike de magnetiske kulene med biblioteket ble SOLiD™ EZ Bead™ Enricher brukt. Etter anrikning ble kulene modifisert på 3`enden, for å kunne binde kovalent til glassplatene som ble brukt til sekvensering. Alle trinnene ble utført etter protokollene Applied Biosystems SOLiD™ EZ Bead™ Emulsifier Getting Started Guide, Applied Biosystems SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier Getting Started Guide og Applied Biosystems SOLiD™ EZ Bead™ Enricher Getting Started Guide.

2.5.4 Work-flow analyse (WFA) og SOLiD 4-sekvensering

For å kunne kalkulere korrekt mengde løsning med kuler som skulle deponeres på glassplatene, ble en work-flow analyse utført. SOLiD™ bead concentration chart (se appendiks 7.1) fra Applied Biosystems ble brukt for å estimere konsentrasjonen av løsningen med kuler før de ble deponert på glassplaten for WFA, optimalt område for sekvenseringen er mellom 750 000 til 1,25 millioner kuler/ µl. En slik analyse gir konsentrasjonen av kuler i løsningen, som kan brukes for å få riktig mengde kuler deponert på glassplaten til selve sekvenseringen. En full glassplate kan i følge protokollen Applied Biosystems SOLiD™ 4 System Instrument Operation Guide inneholde 708 millioner positive P2 kuler.

Plater med kuler, reagenser og oppsett av SOLiD 4 Analyser ble utført etter protokollen Applied Biosystems SOLiD™ 4 System Instrument Operation Guide med mindre modifikasjoner. For vasking av kuler (Kp2.1) ble «Covalent Declump 3» brukt i steg 1, en ekstra sonikering (Covalent Declump 1) ble utført etter steg 8, samt at kuler med templat ble fordelt i 2 Lobind rør i steg 5 og kombinert i steg 11. For preparering av glassplaten (Kp2.2) ble ikke vasking med SOLiD™ XD Slide Prep Reagent og SOLiD™ XD Slide Deposition Buffer v2 gjennomført (steg 3 til og med steg 8), og for "bead deposition" (Kp2.3) ble steg 2 samt 10-11 repetert og inkuberingen i steg 11 ble utført ved 37 °C.

2.5.5 Bioinformatikk, CLC Genomics Workbench

Bioinformatikk brukes for å lagre, analysere og tolke biologiske resultater. Det finnes flere bioinformatikk-platformer, men i dette forsøket ble resultater fra sekvenseringen analysert med CLC Genomics Workbench av CLC bio. CLC Genomic Workbench brukes til å analysere og visualisere resultater fra NGS. Dette ble utført ved å bruke CLC Genomic Workbench for å trimme adaptorer, og deretter ble sekvensene telt og annotert opp mot en versjon av miRBase 17. Etter analysering på CLC Genomic workbench ble resultatene importert i Microsoft Excel for normalisering og oppsummering.

2.6 miRNA fra exosomer

2.6.1 Isolering av miRNA fra exosomer

Exosom-isoleringen startet med å la cellene stå på samme mediet i minimum 72 timer. Mediet som ble brukt var enten DMEM eller RPMI med 10 % føtalt kalveserum (FBS). Kalveserumet ble sentrifugert på 120 000 g i 70 minutter, før supernatanten ble tilsatt til mediet. Etter 72 timer ble mediet samlet opp, og sentrifugert ved 4000 g i 5 minutter for å fjerne celler fra mediet. Supernatanten ble deretter sentrifugert ved 37600 g (Beckman Optima™ LE-80K) i 70 minutter for pelletering av exosomene, før den ble pipettert av. Pelleten ble vasket ved å tilsette PBS etterfulgt av en ny ultrasentrifugering på 37600 g i 70 minutter. Etter sentrifugeringen ble PBS pipettert av, og pelleten ble løst i 200 µL PBS, og overført til 1,5 ml Lobind Eppendorfrør.

800 µl Trizol ble tilsatt, og prøven ble satt på is i 5 minutter. Deretter ble 0,2 x volum kloroform tilsatt, etterfulgt av ny inkubering på is i 20 minutter med vending av røret hvert 2. minutt. Dette ble så sentrifugert ved 9000 rpm i 30 minutter, og Trizol-fasen (den nederste fasen) ble pipettert av, etterfulgt av en ny sentrifugering på 9000 rpm i 8 minutter hvor den øverste fasen (vannfasen) ble overført til et nytt 1,5 ml Lobind Eppendorfrør. Deretter ble 20 µl glykogen, 10 % 5 Molar (M) ammoniumacetat (NH₄OAc) og 1 x volum av isopropanol tilsatt før prøven ble satt i kjøleskap i 2 timer. I nærvær av ammoniumacetat og isopropanol, bidrar glykogen som en bærer av miRNA, som vil gi et større utbytte av rensingen.

Røret ble så sentrifugert på 15000 g i 30 minutter, og supernatanten ble pipettert av. 1 ml iskald 80 % etanol ble tilsatt, etterfulgt av en sentrifugering på 15000 g i 5 minutter. Supernatanten ble pipettert av, og pelleten ble tørket i avtrekkskap i 15 minutter. Pelleten ble resuspendert i 15 µl nukleasefritt vann.

Kvalitativ og kvantitativ kontroll ble utført ved bruk av Qubit Fluorometer og Agilent 2100 Bioanalyser etter protokoll henholdsvis fra Invitrogen og Agilent Technologies (se kapittel 2.3 og 2.4) (se appendiks 7.3).

2.6.2 Reverse transcription quantitative real time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RT-qPCR er en hurtig og reproducerbar metode når man skal vurdere RNA uttrykk, og er derfor en metode som blir mye brukt og sett på som en gullstandard [132, 133]. I denne oppgaven er MiRCURY LNA™ UNIVERSAL RT microRNA PCR fra Exiqon brukt. LNA står for locked nucleic acid, som vil si at det brukes en klasse av nukleinsyre-analoger som har en ribose-ring som er låst i en bestemt konformasjon. Disse LNA nukleosidene består av baser som også er å finne i DNA og RNA, og de kan derfor danne Watson and Crick basepar. Ved å låse en konformasjon som er perfekt for en Watson and Crick baseparring, blir det sterke bindinger til den komplementære tråden, og den nydannede duplekset forblir mer stabil (har et høyere smeltepunkt). For å bedre sensitiviteten i analysen, som ofte kan være et problem i slike analyser på grunn av miRNA med nesten identisk sekvens (isomiR'er), er det her en forbedret primer-affinitet. En poly-A hale blir først lagt til RNA-transkriptene, etterfulgt av en cDNA-syntese med en primer som binder spesifikt til de ulike miRNA'ene. SYBR Green er et fargestoff som fluoriserer ved binding til dobbelt-trådig DNA. Etterfulgt av primer-mediert replikasjon av mål-sekvensen binder flere molekyler av SYBR Green til produktet og avgir et sterk fluoriserende signal som enkelt kan detekteres. Fluorescens-basert real-time qPCR-teknologi gir en rask og høysensitiv deteksjon av PCR-produktene [134, 135].

I denne oppgaven ble RT-qPCR satt opp etter protokoll miRCURY LNA™ UNIVERSAL RT microRNA PCR fra Exiqon. Protokollen bestod av 2 deler: cDNA-syntese og qPCR.

Universal cDNA synthesis kit ble brukt for å lage en mastermix, som sammen med templat-RNA (exosom-RNA med konsentrasjon på 5ng/ µl) ble inkubert først i 60 minutter på 42 °C, 5 minutter på 95 °C for varme-inaktivere revers transkriptasen, og deretter rask nedkjøling til 4 °C. cDNA ble tilsatt til en blanding av SYBR Green mastermix og nukleasefritt vann før det ble overført til et PCR-panel fra Exiqon. Det ble pipettert 10 µl til hver brønn som inneholdt en probe som var spesifikk for et miRNA. Real-Time PCR ble satt opp etter protokoll (Exiqon).

Resultatene fra Real-Time PCR'en ble gjennomgått ved bruk av SDS 2.3 programvare. Alle prøveresultatene ble kontrollert for å ha en logaritmisk fase. Hvis ikke logaritmisk fase var tilstede, ble disse resultatene fjernet manuelt. Resultatene ble deretter satt inn i Microsoft Excel for sammenligning og korrigerings av tekniske variasjoner.

2.7 Transmisjons-elektronmikroskopi (TEM) av exosomer

Transmisjons-elektronmikroskop bruker elektroner (istedenfor lys som brukes i et vanlig lysmikroskop) for å visualisere prøven, som er exosomer i denne oppgaven. Ved å bruke elektroner som har kortere bølgelengde enn lys, vil man kunne få en tusen ganger bedre oppløsning [136]. I denne oppgaven ble TEM utført etter protokoll fra Rani et. al med modifiseringer [137]. Mediet som ble brukt hadde stått på cellene i 72 timer. Mediet ble sentrifugert på ultrasentrifuge ved 37600 g i 1 time og 10 minutter. Supernatanten ble pipettert av og pelleten ble løst opp i 37,5 µl PBS, og tilsatt 12,5 µl 8 % paraformaldehyd.

1 dråpe, tilsvarende 10 µl, av denne blandingen ble tilsatt på en parafilm og en elektronmikroskopi(EM)-grid ble påført dråpen i 20 minutter. Grid`en med exosomene ble vasket ved å tilsette 1 dråpe (tilsvarende 50 µl) PBS, med påfølgende inkubering i 1 minutt. Dette ble gjentatt 2 ganger med tilsammen 3 dråper PBS.

Grid`en ble fiksert ved å legge den i 50 µl 1 % glutaraldehyd i 5 minutter. Deretter ble den vasket i dråper på 100 µl destillert vann og inkubert i 2 minutter. Dette trinnet ble gjentatt 4 ganger.

Grid`en ble så overført til 50 µl 2 % metylcellulose/ 4 % uranylacetat, i forholdet 9:1, og satt på is i 10 minutter. Overskuddet av denne væsken på grid`en ble tørket av med filterpapir. Deretter ble den lufttørket i 10 minutter, og overført til en gridboks før mikroskopering ble utført.

3. Resultater

miRNA har vist seg å ha en viktig rolle innenfor utvikling og progresjon i de fleste typer av kreft, ved å ha en kreftfremmende eller krefthemmende funksjon. I denne oppgaven har det blitt sekvensert miRNA fra forskjellige subtyper av brystkreftceller, for å undersøke om det finnes forskjeller i miRNA-uttrykket mellom subtypene, og om det er noen spesifikke miRNA som skiller seg ut ved enten å ha et høyt uttrykk eller er uttrykt konsekvent i alle celler. miRNA eller profiler av miRNA som er spesifikke for alle celler, og som ikke uttrykkes i normalt brystvev, kan ha et potensial som mulige biomarkører.

3.1 SOLiD™ 4-sekvensering

For å undersøke miRNA-uttrykket mellom forskjellige subtyper av celler har det blitt isolert totRNA fra celler Hs 578 T, MDA-MB 231, HCC 1569, MCF 7, AU 565 og HCC 1187. Fra denne isoleringen har småRNA blitt sekvensert med SOLiD™ 4-sekvensering (se kapittel 2.2-2.5.5) og miRNA-uttrykket har blitt analysert.

Resultatene fra sekvensering av disse celler viste et totalt antall av sekvenser på 194.281.961. Dette utgjorde i prosent: 12 % fra AU 565, 14 % fra Hs 578 T, 9 % fra MCF 7, 13 % fra MDA-MB 231, 43 % fra HCC 1569 og 9 % HCC 1187. Adaptorer ble gjenkjent og eliminert, og 52 % av de totale sekvensene var igjen etter trimming av adaptorer. Disse sekvensene ble annotert opp mot en versjon av miRBase 17, hvor 21.053.460 sekvenser ble gjenkjent som modne miRNA, noe som tilsvarte 11 % av totalt antall sekvenser ved sekvensering.

Sekvenseringsdata ble importert inn i Microsoft Excel hvor miRNA-sekvensene ble normalisert med lineær-skala normalisering, og uttrykt som sekvenser per million.

3.1.1 miRNA-uttrykket følger ikke klassifiseringen av brystkreftcellerlinjer

Uttrykket av miRNA fra sekvenseringen har blitt satt opp med Pearsons korrelasjon, for å undersøke korrelasjonen mellom de ulike subtypene av cellelinjene, samt av cellelinjer innenfor samme subtype. Pearsons korrelasjon kan brukes til å se en lineær sammenheng mellom to variabler. Korrelasjonen kan strekke seg fra -1 til +1. Når korrelasjonen er +1 er det en fullstendig positiv korrelasjon, mens -1 er en fullstendig negativ korrelasjon. Er korrelasjonen 0, er det ingen korrelasjon.

Pearsons korrelasjon med lineære resultater har lett for å bli påvirket av enkelte miRNA som er sterkt uttrykt, derfor er det satt opp Pearsons korrelasjon på logaritmiske tall, som vist i tabell 3.1.1. De cellelinjene som har best korrelasjon basert på miRNA-uttrykket er AU 565 (luminal(Lu)) og HCC 1569 (basal-A(BaA)) med en verdi på 0.766. MCF 7 som også er klassifisert som en luminal cellelinje, har en god korrelasjon med begge disse cellelinjene, verdier på henholdsvis 0.756 med AU 565 (Lu) og 0.765 med HCC 1569 (BaA). Dette kan tyde på at disse tre cellelinjene har et ganske likt uttrykk av miRNA. Ved å gå inn i resultatene (ikke vist her) vises det for eksempel at miR-103a er et miRNA som er høyt uttrykt i alle tre cellelinjene. I HCC 1569 (BaA) og AU 565 (Lu) er miR-29b også høyt uttrykt, men det er ikke tilfelle i MCF 7 (Lu). miR-29a er høyt uttrykt i HCC 1569 (BaA), men dette er mye lavere uttrykt i AU 565 (Lu) og MCF 7 (Lu).

MDA-MB 231 (basal-B(BaB)) korrelerer best med en basal-A cellelinje, HCC 1569 med en verdi på 0.708, men korrelerer også i stor grad med Hs 578 T (BaB) og MCF 7 (Lu) (0.702 og 0.703). HCC 1187 (BaA) har, i likhet med HCC 1569 (BaA), best korrelasjon med en cellelinje klassifisert som luminal, AU 565 (Lu).

Disse resultatene viser at cellelinjer som er klassifisert likt, ikke nødvendigvis korrelerer best når miRNA-uttrykket blir sammenlignet.

Tabell 3.1.1. Pearsons korrelasjon av miRNA-uttrykket fra cellelinjer sekvensert med SOLiD™ 4-sekvensering. (Lu): Luminal-subtype, (BaA): Basal A-subtype, (BaB): Basal B-subtype. Korrelasjon=1 viser fullstendig korrelasjon, verdier lik 0 viser ingen korrelasjon.

	AU 565 (Lu)	MCF 7 (Lu)	MDA-MB 231 (BaB)	HCC 1569 (BaA)	Hs 578 T (BaB)	HCC 1187 (BaA)
AU 565 (Lu)	1.000	*	*	*	*	*
MCF 7 (Lu)	0.756	1.000	*	*	*	*
MDA-MB 231 (BaB)	0.643	0.703	1.000	*	*	*
HCC 1569 (BaA)	0.766	0.765	0.708	1.000	*	*
Hs 578 T (BaB)	0.585	0.561	0.702	0.644	1.000	*
HCC 1187 (BaA)	0.651	0.521	0.483	0.603	0.475	1

For å bekrefte resultatene i fra Pearsons korrelasjon ble en annen statistisk metode for å beregne korrelasjon, Spearmans Rho, brukt. Spearmans Rho undersøker korrelasjonen mellom data som er rangert etter størrelse, der det høyest uttrykte miRNA`et er rangert som 1, det nest høyest uttrykte miRNA er rangert som 2 osv. Spearmans Rho kan variere i likhet med Pearsons fra -1 til +1. Er verdien +/-1 viser det en god korrelasjon mellom to variabler. Er Spearmans Rho nærmere verdien 0, er det liten eller ingen korrelasjon. Tabell 3.1.2 viser Spearmans Rho av resultatene fra sekvenseringen.

Spearmans Rho viser samme trenden som Pearsons korrelasjon: at det ikke er fullstendig korrelasjon av miRNA-uttrykket mellom de ulike subtypene av de brystkreftcellelinjene som er undersøkt i denne oppgaven. Den beste korrelasjonen med Spearmans Rho er mellom AU 565 (Lu) og MCF 7 (Lu) som har en verdi på 0.704. Som vist i Pearsons korrelasjon korrelerer også HCC 1569 (BaA) best med MCF 7 (Lu) og AU 565 (Lu) med Spermans Rho. Ved også å gå inn i resultatene her (ikke vist her) vises det at miR-103a er det miRNA`et som er høyest uttrykt i AU 565 (Lu) og MCF 7 (Lu), og uttrykt som det tredje høyest uttrykte miRNA`et i HCC 1569 (BaA). Det som er mest uttrykt i HCC 1569 er miR-29b som også er høyt uttrykt i AU 565 (Lu) rangert som 2, mens det i MCF 7 (Lu) er rangert som 21. miR-29a er det nest høyest uttrykte miRNA`et i HCC 1569 (BaA), men dette er mye lavere uttrykt i AU 565 (Lu) og MCF 7 (Lu), rangert som 16 og 55.

MDA-MB 231 (BaB) har med Spearmans Rho den beste korrelasjonen med MCF 7 (Lu), etterfulgt av Hs 578 T (BaB) og HCC 1569 (BaA). Forskjellen fra Pearsons korrelasjon er at MDA-MB 231 nå korrelerer best med MCF 7 (Lu) (HCC 1569 (BaA) i Pearsons korrelasjon). HCC 1569 (BaA) korrelerer også best i følge Spearmans Rho med en luminal cellelinje, AU 565 (Lu). HCC 1187 (BaA) korrelerer også best med en luminal cellelinje, men med Spearmans Rho er dette MCF 7 (Lu) (HCC 1569 (BaA) i Pearsons korrelasjon).

Spearmans Rho viser mye av de samme tendensene som Pearsons korrelasjon. Selv om Spearmans Rho viser litt forskjell i korrelasjonen, er trenden fortsatt den samme. Trenden viser at uttrykket av miRNA ikke følger klassifikasjonen av cellelinje-subtypene. Dette viser at uttrykket av miRNA innenfor samme subtype kan variere mye, og at miRNA uttrykket ikke følger den genetiske klassifiseringen for disse cellelinjene.

Tabell 3.1.2. Spearmans Rho av miRNA-uttrykket fra cellelinjer sekvensert med SOLiD™ 4-sekvensering. (Lu): Luminal-subtype, (BaA): Basal A- subtype, (BaB): Basal B-subtype. Spearman Rho kan variere fra -1 til + 1. Er verdien +/- 1 viser det en god korrelasjon mellom to variabler. Er Spearmans Rho nærmere verdien 0, er det liten eller ingen korrelasjon.

	AU 565 (Lu)	MCF 7 (Lu)	MDA-MB 231 (BaB)	HCC 1569 (BaA)	Hs 578 T (BaB)	HCC 1187 (BaA)
AU 565 (Lu)	1	*	*	*	*	*
MCF 7 (Lu)	0.704	1	*	*	*	*
MDA-MB 231 (BaB)	0.575	0.668	1	*	*	*
HCC 1569 (BaA)	0.696	0.748	0.648	1	*	*
Hs 578 T (BaB)	0.502	0.523	0.650	0.559	1	*
HCC 1187 (BaA)	0.586	0.500	0.425	0.573	0.461	1

3.1.2 Sammenligning av miRNA-uttrykket i ulike subtyper av cellelinjer

Resultatene fra sekvenseringen ble rangert etter uttrykket av miRNA, og de 15 mest uttrykte miRNA`ene i cellelinjene er vist i figur 3.1. De 15 mest uttrykte i hver cellelinje utgjorde totalt 42 forskjellige miRNA som vist i linjediagrammet (figur 3.1). I diagrammet er det rangerte verdier, dette vil tilsi at det miRNA`et som er mest uttrykt er det som har verdi 1.0, og ikke-detektert miRNA har verdien 250. Cellelinjer som er samme subtype, er i samme fargesjanger. miR-103a er rangert som det mest uttrykte miRNA`et i 3 av cellelinjene, AU 565 (Lu), MCF 7 (Lu) og HCC 1187 (BaA), og det er også høyt rangert hos de resterende tre cellelinjene. miR-23a og miR-24 viser seg også å være høyt uttrykt i alle cellelinjene. Det høyeste rangerte miRNA`et i MDA-MB 231 (BaB), HCC 1569 (BaA) og Hs 578 T (BaB) er miR-29b. Trendene som ble vist med Pearsons korrelasjon og Spearmans Rho går igjen i dette diagrammet. MDA-MB 231 og Hs 578 T er klassifisert som basal-B cellelinjer, men har ganske forskjellige uttrykk av miRNA. miR-31 er lavt uttrykt i MDA-MB 231, mens det i Hs 578 T er rangert som høyt uttrykt. Med uttrykket av miR-489 er det omvendt, her er det høyt uttrykt i MDA-MB 231, mens det i Hs 578 T er lavt uttrykt. Det finnes også miRNA som er rangert helt likt i disse cellelinjene, eksempler på dette er miR-29a, miR-29b, miR-98 og miR-125b.

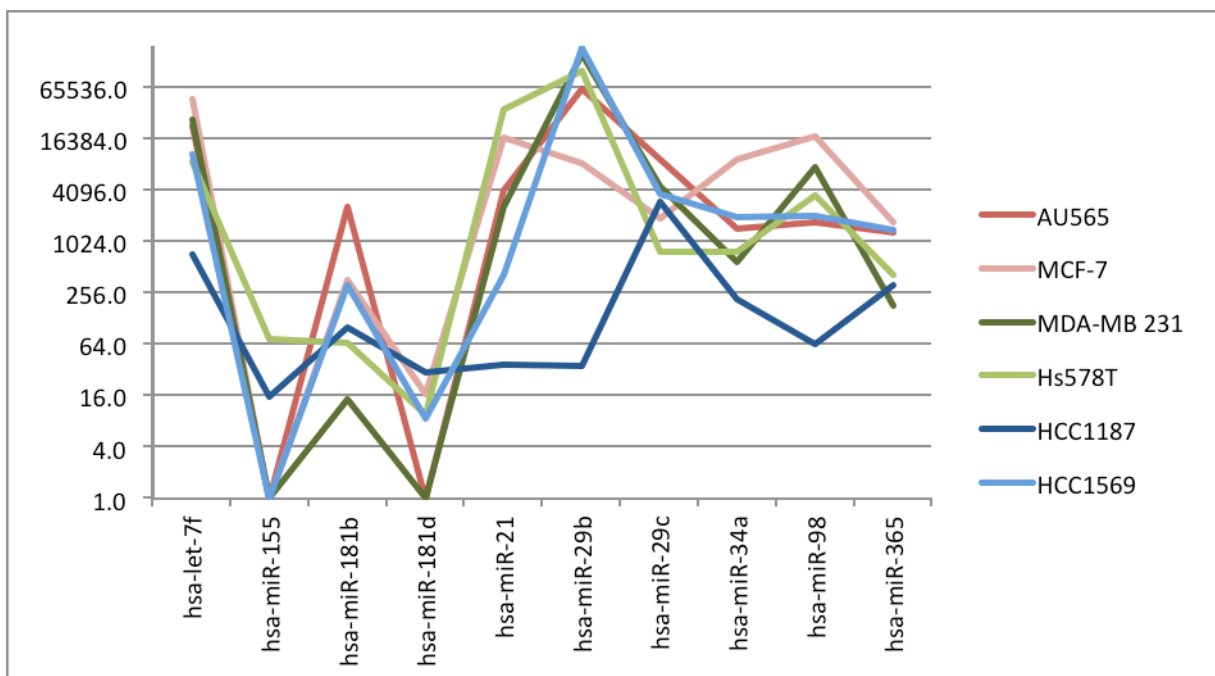
AU 565 og MCF 7 er klassifisert som lumbinale cellelinjer. I disse cellelinjene er miR-31, let-7b og miR-130a eksempler på miRNA som er detektert med ganske forskjellig rangert miRNA-uttrykk. Uttrykk som derimot er ganske like i disse to cellelinjene er let-7f og miR-15b.

HCC 1187 og HCC 1569 er klassifisert som basal-A cellelinjer, disse er muligens de som ligner minst på hverandre av cellelinjer av samme subtype. Dette vises når miR-29b er det høyest uttrykte miRNA`et i HCC 1569, mens det i HCC 1187 er lavt uttrykt. Andre eksempler på dette er miR-15b og miR-484, som er henholdsvis høyt og lavt uttrykt i HCC 1569 og HCC 1187. Disse to cellelinjene har også miRNA som er ganske likt uttrykt slik som miR-7 og miR-19b.

Dette diagrammet viser at de miRNA`ene som er rangert lavt (høyt uttrykt) er å finne igjen i alle cellelinjene som høyt uttrykte, men som vist i figuren finnes det også store variasjoner i uttrykket blant de 15 mest uttrykte miRNA`ene i disse cellelinjene.

For å se nærmere på resultatene fra sekvenseringen har det blitt valgt ut 10 miRNA, som har vist seg å være regulatorer i brystkreft [79, 88]. Det absolutte uttrykket av disse miRNA`ene har blitt satt opp i et linjediagram med en logaritmisk skala, hvor verdien 1,0 tilsvarer ikke-detekterte miRNA (figur 3.2). Som det også ble vist i figur 3.1, peker miR-29b seg ut fra de andre miRNA`ene som det mest uttrykte, etterfulgt av miR-21 og let-7f. miR-29b var det høyeste uttrykte miRNA`et i MDA-MB 231 (BaB), Hs 578 T (BaB) og HCC 1569 (BaA). MDA-MB 231 (BaB) er kjent for å være en svært aggressiv cellelinje, og viser med disse resultatene at miRNA som er kjent for å være oppregulerte i brystkreft, også er høyt uttrykt i denne cellelinjen. To miRNA som ikke ble detektert i alle cellelinjene var miR-155 og miR-181d. miR-155 var kun detektert i Hs 578 T (BaB) og HCC 1187 (BaA), og miR-181d ble detektert i alle cellelinjene unntatt AU 565 (Lu) og MDA-MB 231 (BaB). HCC 1187 (BaA) skiller seg fra de andre cellelinjene ved å ha et lavere uttrykk av disse 10 miRNA`ene. De andre cellelinjene har samme trend, det vil si at de fleste miRNA`ene er de samme miRNA`ene som er høyt og lavt uttrykt i alle cellelinjene.

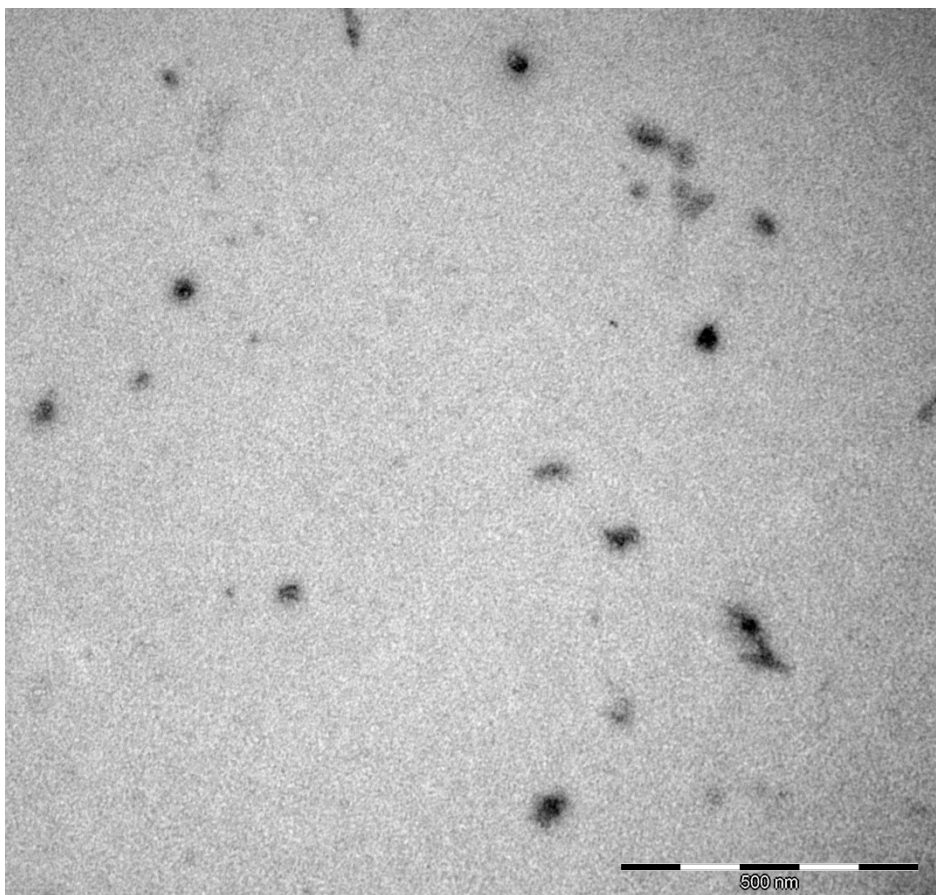
Disse resultatene viser at uttrykket av miRNA som fra før er vist å være regulatorer i brystkreft, også er representert blant de miRNA`ene som er høyest uttrykt i alle subtype av cellelinjene.



Figur 3.2. Linjediagram som viser uttrykket av 10 utvalgte miRNA fra cellelinjene AU 565, MCF 7, MDA-MB 231, HCC 1569, Hs 578 T og HCC 1187 sekvensert med SOLiD™ 4.

3.2 Transmisjons-elektronmikroskopi av exosomer

For å verifisere isolering av exosomer (2.6.1), ble transmisjons-elektronmikroskopi utført på exosomer fra cellelinjen MDA-MB 231. Figur 3.3 viser et representativt bilde tatt under mikroskoperingen. En skala på 500 nm har blitt lagt til bildene, for å kunne sammenligne størrelsen på vesiklene som er detektert. Bildet (figur 3.3) viser tilstedeværelse av vesikler som befinner seg innenfor riktig størrelsesområde som exosomer, 30-100 nm, for cellelinjen MDA-MB 231. Det konkluderes med at exosomer er isolert i fra cellelinjene.



Figur 3.3. Transmisjons-elektronmikroskopibilde av exosomer isolert fra cellelinjen MDA-MB 231.

3. 3 Ekstracellulære miRNA som er detektert i exosomer

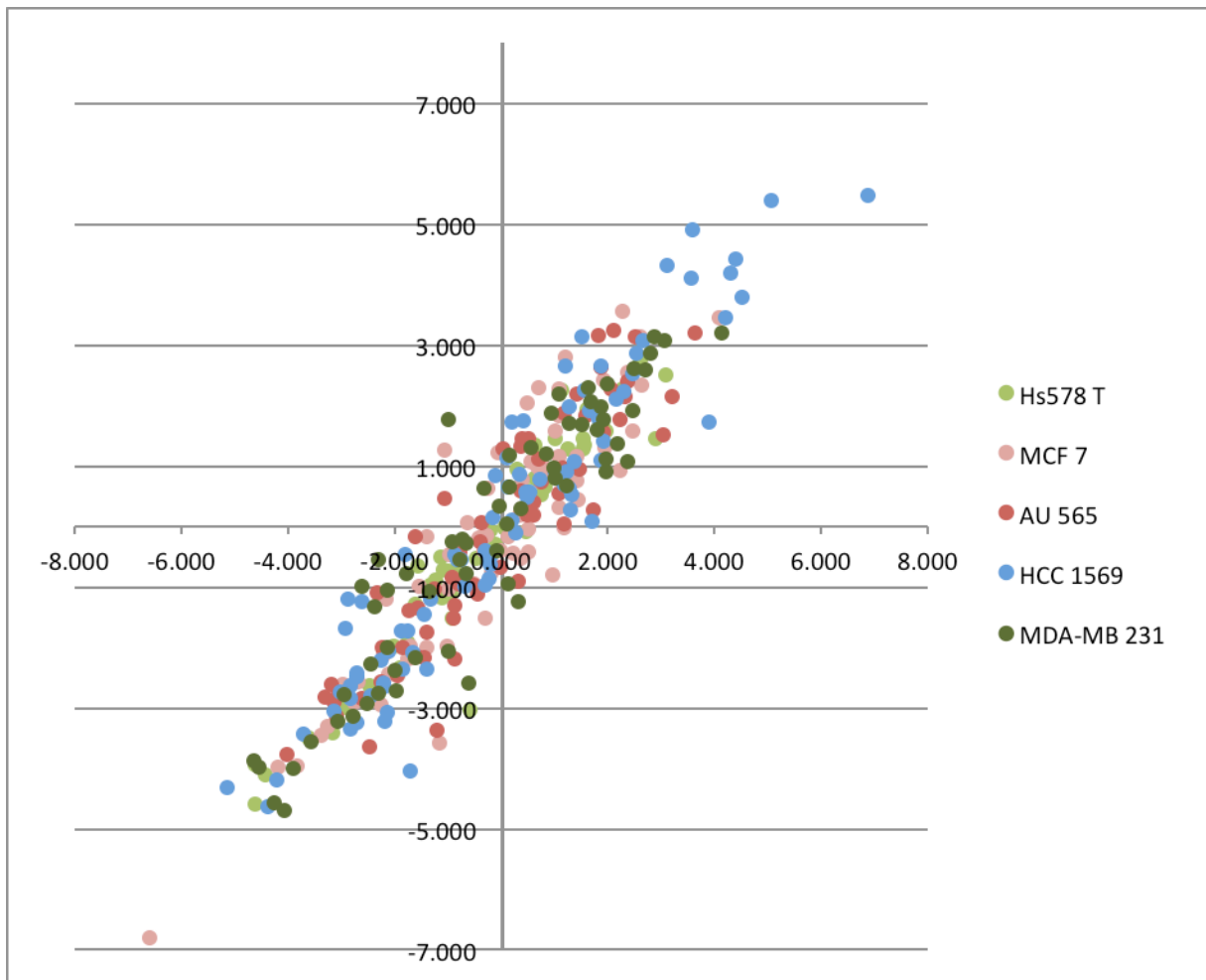
For å undersøke om exosomer skilles ut spesifikt fra cellene, og om det er noe forskjell i miRNA-uttrykket i exosomene fra forskjellige subtyper av cellelinjer, ble det i denne oppgaven isolert exosomer fra cellelinjene AU 565, MCF 7, MDA-MB 231, HCC 1569 og Hs 578 T som vist i 2.6.1. Det samme ble utført på DMEM med 10 % kalveserum, for å bruke den som en kontroll. RT-qPCR ble satt opp etter protokoll miRCURY LNA™ UNIVERSAL RT microRNA PCR fra Exiqon, for å undersøke miRNA-uttrykket i exosomene. Det ble først satt opp et panel med 384 brønner som inneholdt prøber for spesifikke miRNA. Ut i fra resultatene fra 384-brønnerspanelet, ble miRNA som var høyest uttrykt i disse cellelinjene valgt ut, samt et utvalg av detekterte miRNA som er kjente regulatorer i brystkreft. Det ble satt opp en ny parallell for de utvalgte miRNA med et 96-brønnerspanel som inneholdt prøber for de spesifikke miRNA`ene. Resultatene ble normalisert med en global-mean normalisering.

3.3.1 God korrelasjon mellom parallellene av miRNA detektert i exosomer

Parallellene av miRNA fra exosomene er satt opp i et scatterplot for å undersøke den tekniske korrelasjonen. Et scatterplot kan brukes til å undersøke om det er en assosiasjon mellom to variabler. Scatterplottet viste at den tekniske korrelasjonen for 2 paralleller var god med R-verdier fra 0.8317 til 0.9221 (tabell 3.1.3), og at resultatene var reproducerbare (figur 3.4). Med en god teknisk korrelasjon og reproducerbare resultater, har gjennomsnittet av disse parallellene blitt brukt i videre analyser.

Tabell 3.1.3. R-verdier som viser den tekniske korrelasjonen mellom parallellene fra miRNA isolert fra exosomer satt opp i et scatterplott i figur 3.4.

	R-verdi
Hs 578 T	0.9221
MCF 7	0.8317
AU 565	0.8415
HCC 1569	0.9009
MDA-MB 231	0.8682



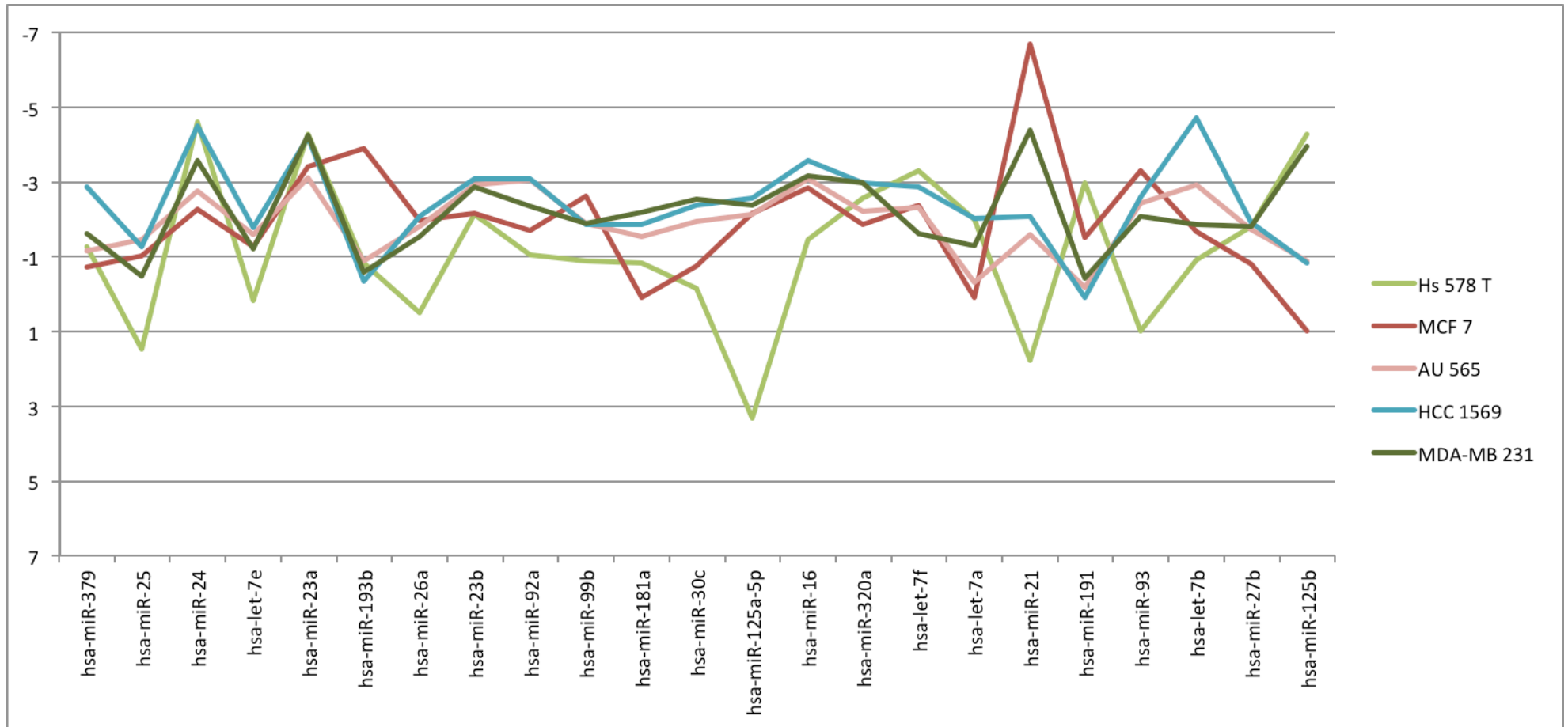
Figur 3.4. Scatterplot av den tekniske korrelasjonen mellom parallellene av miRNA fra exosomer analysert med RT-qPCR. Scatterplottet viser en god teknisk korrelasjon, som tyder på at resultatene er reproducerbare.

3.3.2 Uttrykk av miRNA i exosomer følger ikke cellelinjenes genetiske subtype

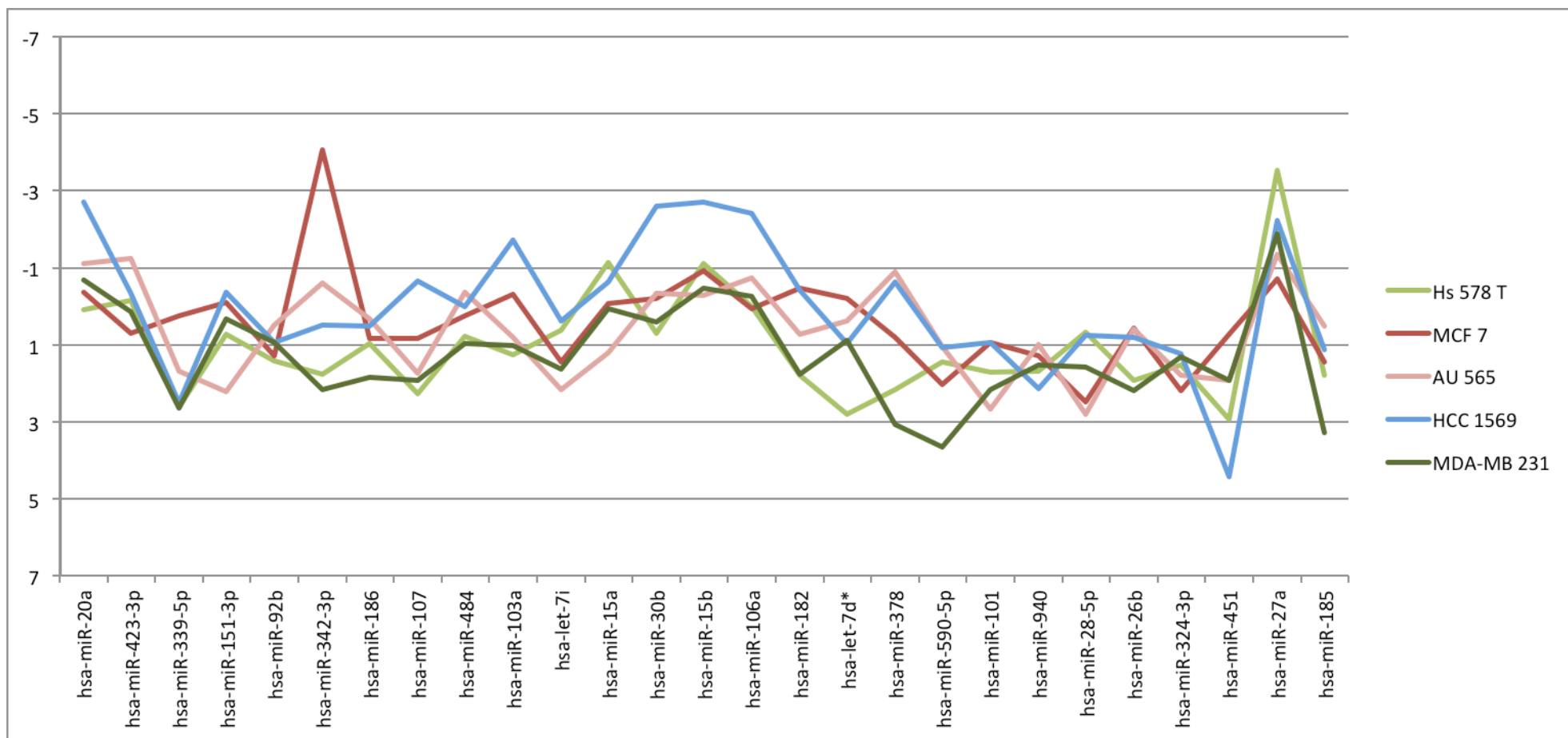
For å sammenligne uttrykket av miRNA mellom exosomene isolert fra de ulike cellelinjene, har gjennomsnittsverdien fra parallellene til exosom-miRNA blitt satt opp i to linjediagram (figur 3.5 med fortsettelse). DMEM/10 % FBS ble brukt som negativ kontroll. De første resultatene av DMEM/10 % FBS viste seg å inneholde betydelige mengder miRNA (fra det føtale kalveserumet), noe som ville påvirket analysene av exosomene fra cellelinjene dersom disse miRNA'ene ikke ble eliminert. Serum ble derfor sentrifugert og exosomene fjernet fra serum, før det ble tilsatt DMEM og inkubert på cellene (2.6.1). Nye analyser av DMEM med sentrifugert serum viste kun to detekterte miRNA, miR-197 og miR-720. DMEM med exosomfritt FBS ble brukt som negativ kontroll i denne oppgaven, og miR-197 og miR-720 ble derfor eliminert fra resultatene. Det lavest uttrykte miRNA'et i resultatene hadde en ΔCq på 6.16 etter normaliseringen, derfor fikk de miRNA'ene som ikke ble detektert ΔCq på 7.

Linjediagrammene (figur 3.5 -med fortsettelse) viser miRNA fra exosomer som ble detektert i alle fem cellelinjene. Figurene viser resultatene i global-mean normaliseringstall, det vil si en invers relasjon til miRNA'et (jo mer negative tallene er, desto høyere uttrykt er miRNA'et). Som vist i figurene er mengde og type miRNA i exosomene forholdsvis likt i alle cellelinjene. Noen miRNA er likevel differensielt uttrykt, blant annet er miR-21 er et miRNA som er høyt uttrykt. miR-21 er funnet overuttrykt i flere krefttyper, og blir assosiert med celleproliferasjon og metastasering [138]. miR-21 er det miRNA'et som er høyest uttrykt av alle i MCF 7 og MDA-MB 231, men ikke fullt så høyt uttrykt i de andre exosomene. Exosomer fra MCF 7 har også miR-342-3p som er høyt uttrykt. Nedregulert miR-342-3p har blitt assosiert med kjemoterapieresistens som tamoxifen, og kan med det ha en potensiell rolle som en markør for tamoxifenrespons [139].

I AU-565 er miR-23a og miR-24 høyt uttrykt i exosomene. miR-24 er også detektert som høyt uttrykt i exosomer fra HCC 1569 og Hs 578 T. I tillegg er let-7b funnet høyt uttrykt i HCC 1569-exosomene, men ikke like høyt uttrykt i de andre exosomene. Videre er miR-125b (fig. 3.5) høyt uttrykt i exosomer fra Hs 578 T og MDA-MB 231 som begge er fra subtypen basal-B, og lavere uttrykt i de andre exosomene. Figur 3.5 viser de samme tendensene som analysen av det intracellulære miRNA-uttrykket fra cellelinjene: uttrykket av miRNA følger ikke cellelinjenes genetiske subtyper, men har en fellesuttrykksprofil med noen få unntak.



Figur 3.5. RT-qPCR av exosom-miRNA som er detektert i alle celledinene. Jo mer negativ verdi, desto høyere uttrykk av miRNA. miRNA'ene som er uttrykt følger omtrent samme trenden mellom celledinene, med noen unntak.

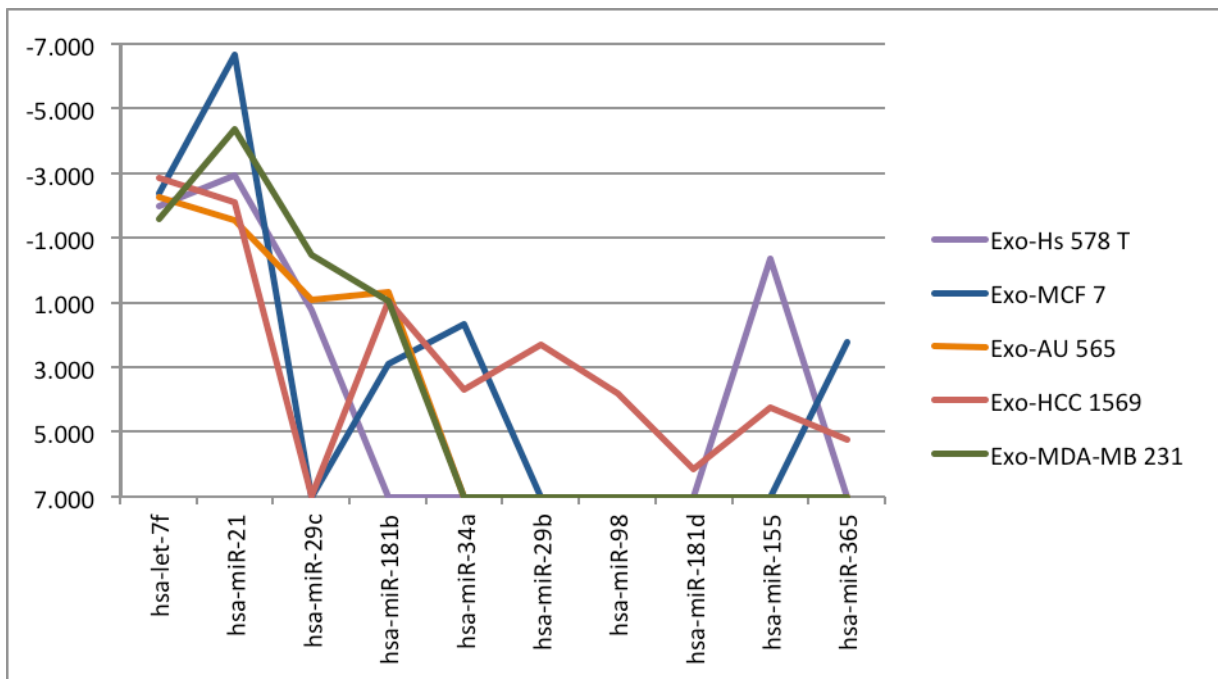


Figur 3.5 fortsettelse.

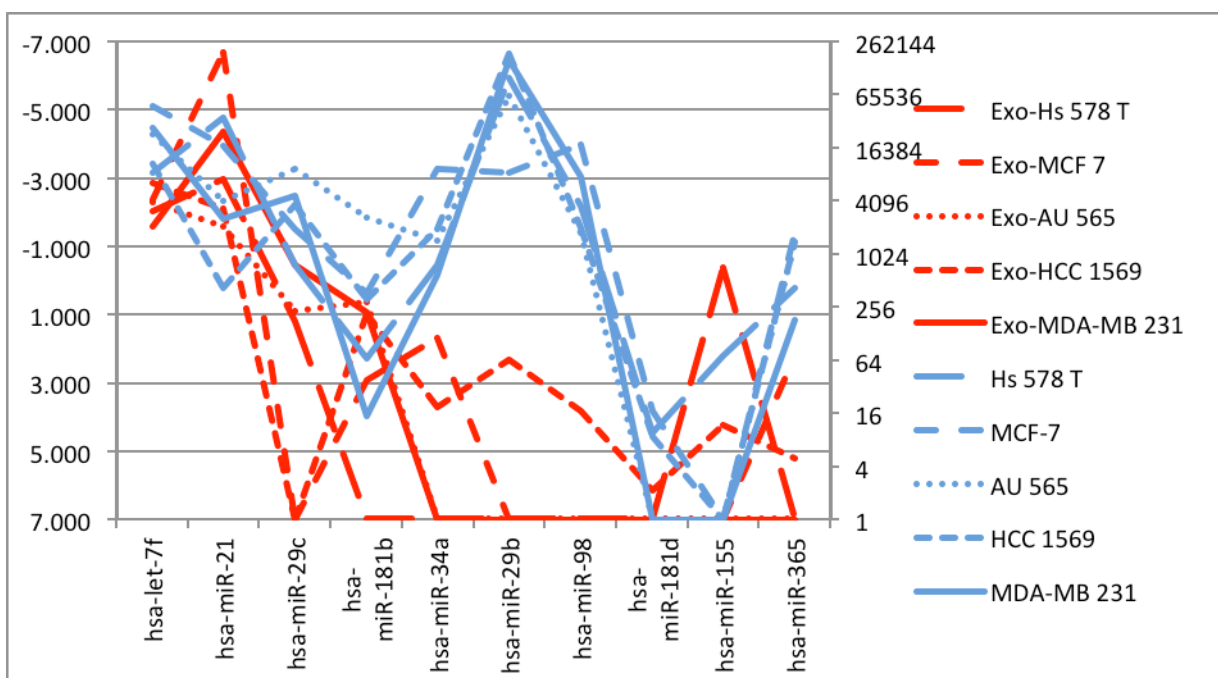
I kapittel 3.1.2 ble det valgt ut 10 miRNA, som har vist seg å være regulatorer i brystkreft [79, 88]. De samme 10 miRNA`ene er vist i figur 3.6, hvor miRNA i exosomene er sammenlignet. Figur 3.7 viser en sammenligning av disse 10 miRNA`ene fra cellelinjene og exosomene. Vist i disse diagrammene er let-7f og miR-21 høyest uttrykt i alle exosomene. Disse var også høyt uttrykt i cellelinjene. miR-29b derimot, som jevnt over var høyt uttrykt i alle cellelinjene, er kun detektert i exosomene fra HCC 1569.

Videre er hele 9 av disse 10 miRNA`ene detektert i HCC 1569. miR-29b, miR-98, miR-181d er kun detektert i HCC 1569. Det er også verdt å merke seg at verken AU 565 eller MDA-MB 231 har miR-34a, miR-29b, miR-98, miR-181d, miR-155 eller miR-365 tilstede i exosomene sine. Hs 578 T har heller ikke uttrykk av miR-34a, miR-29b, miR-98, miR-181d, men har derimot et ganske høyt uttrykk av miR-155. MCF 7 har heller ikke detektert, miR-29b, miR-98, miR-181d eller miR-155, men har det høyeste uttrykket av miR-21 og er den eneste cellelinjen i tillegg til HCC 1569 der både miR-34a og miR-365 er detektert.

Diagrammene viser store ulikheter i tilstedeværelsen av disse 10 brystkreftrelaterte miRNA`ene i exosomene. Videre er det også store forskjeller på det intracellulære miRNA-uttrykket og tilstedeværelsen av de samme 10 miRNA`ene i exosomene. Dette viser at miRNA innholdet i exosomene ikke fullstendig reflekterer det intracellulære miRNA uttrykket, noe som kan tyde på at utskillelse av miRNA i exosomer er en spesifikk og aktiv prosess.



Figur 3.6. Uttrykket av 10 miRNA som har vist seg å være med i reguleringen av brystkreft, i exosomer isolert fra ulike subtyper av celledinjer, og analysert med RT-qPCR. miRNA som ikke ble detektert fikk verdien 7,000.



Figur 3.7. Sammenligning av uttrykket av 10 miRNA som har vist seg å være med i reguleringen av brystkreft, i exosomer og tilsvarende celledinjer. miRNA som ikke ble detektert fikk verdien 7,000 i exosomene og 1 i celledinjene.

3.4 Selektiv utskillelse av miRNA i exosomer fra brystkreftceller

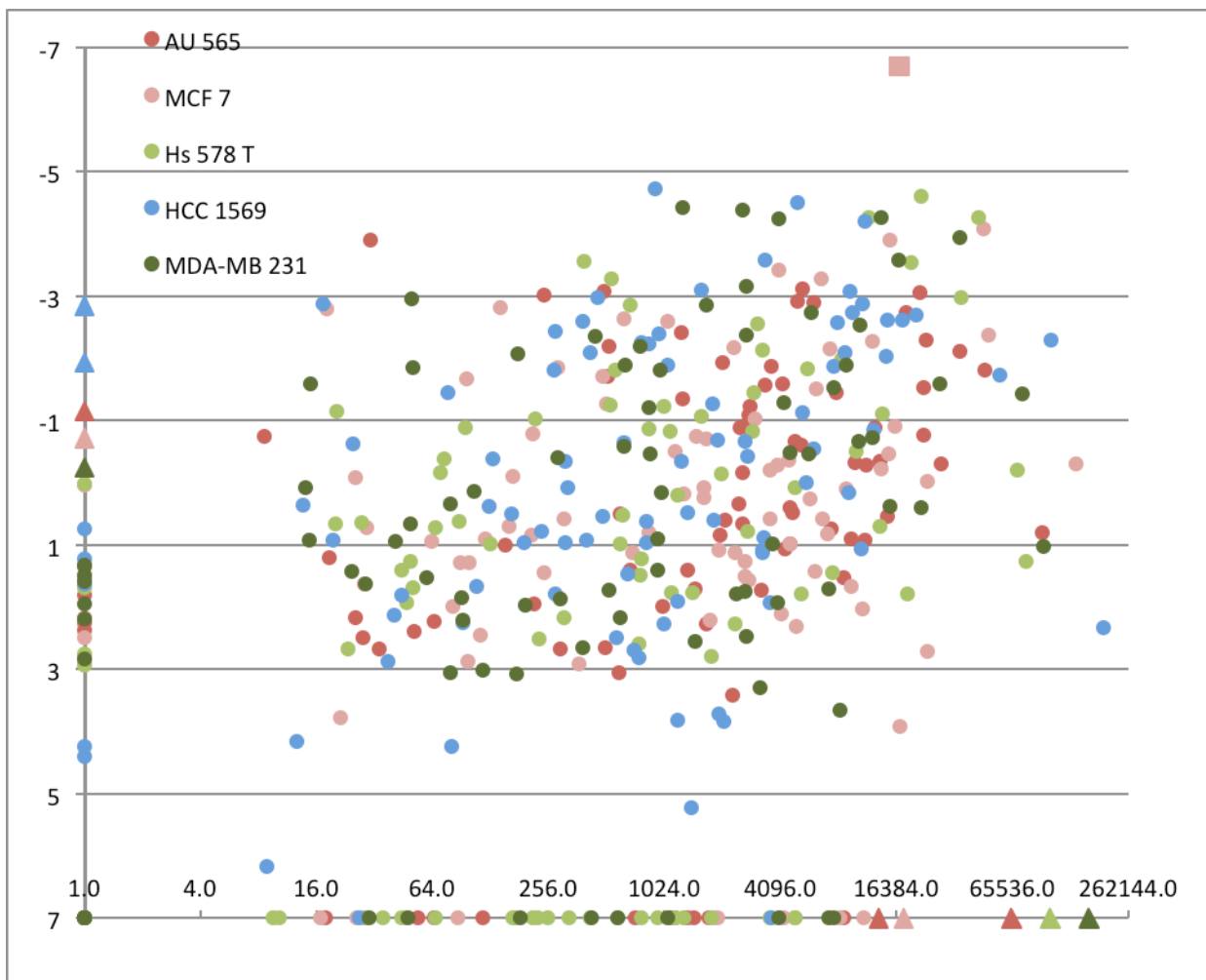
Siden sammenligning av brystkreftrelaterte miRNA fra celler og exosomer viser at miRNA ikke fullstendig reflekterer det intracellulære miRNA-uttrykket, ble det gjort en større sammenligning av miRNA detektert i celler og exosomer fra de samme celler. Resultatene fra begge analysene har blitt satt opp i et scatterplot (figur 3.8). Scatterplottet viser at det ikke er så store forskjeller mellom uttrykte miRNA i exosomene og uttrykte miRNA i cellene. Det finnes imidlertid miRNA som er høyt uttrykt i cellene og ikke i exosomene, og omvendt. Disse miRNA`ene vil ligge nederst i høyre hjørnet på plottet hvis de er høyt uttrykt i cellene og lavt uttrykt i exosomene. Er de derimot høyt uttrykt i exosomene, men lavt uttrykt i cellene, vil punktene ligge øverst mot venstre hjørnet av plottet. Det er også miRNA som kun er detektert i exosomene eller kun i cellene. Er de bare detektert i exosomene, vil de befinne seg på y-aksen med verdi 1,0 i cellene. Jo høyere opp på y-aksen, desto sterkere uttrykt er miRNA`ene i exosomene. Det har blitt valgt ut fem miRNA som eksempler på miRNA som kun er detektert i exosomene, merket med trekant-indikator. Disse fem er uttrykt i exosomene, men ikke detektert i cellene. De fem øverste trekantene representerer henholdsvis, fra øverst ned mot origo: miRNA detektert i exosomer fra HCC 1569 miR-200c og miR-27b, miR-379 er detektert i exosomer fra AU 565 og MDA-MB 231, og miR-106a er detektert i exosomer fra MDA-MB 231, men ikke i cellene. miR-200c har vist seg å kunne hemme celleinvasjon og migrering i brystkreft [140], mens miR-27b har vist seg å fremme cellevekst i brystkreft [141].

Nederst mot høyre hjørnet av plottet på x-aksen med verdi 7, vises fem eksempler på miRNA som kun er detektert i cellene og ikke i exosomene, merket med trekant-indikator. Fra høyre mot origo er disse fem miRNA`ene, miR-29b i MDA-MB 231, Hs 578 T og AU 565, miR-98 i MCF 7 og miR-19b i AU565. miR-29b og miR-98 har vist seg å være oppregulerte i brystkreft [79].

Et miRNA som skiller seg ut som høyt uttrykt både i cellene og exosomene er miR-21, merket som rosa firkant i scatterplottet. Dette er sterkt detektert både i celler og exosomer fra celler MCF 7. Det har blitt vist i en studie at ved å hemme miR-21 i MCF 7-celler og MDA-MB 231-celler, så ble også cellevekst og migrering hemmet [142].

Dette scatterplottet viser at de fleste miRNA i exosomer ikke skiller seg ut selektivt fra celler. Hadde det vært en fullstendig selektiv utskillelse ville det vært større variasjon i plottet, og punktene ville vært enda mer spredt. Samtidig er det et betydelig antall miRNA

som er svært høyt uttrykt i cellelinjene, men som ikke er detektert i exosomene. Dersom inkorporeringen av miRNA utelukkende er en passiv prosess, vil miRNA som er høyt uttrykt i cellelinjene, også være tilstede i exosomene: det exosomale miRNA-innholdet ville gjenspeilet det intracellulære miRNA-uttrykket. Dette er ikke tilfellet med de miRNA'ene som er markert med trekant på x-aksen. I plottet vises også en rekke eksempler på miRNA som finnes i exosomene, men som ikke er uttrykt i stor grad i cellelinjene, noe som tyder på at utskillelse av miRNA i exosomer fra brystkreftcellelinjer er en selektiv prosess.



Figur 3.8. Scatterplot av detekterte miRNA i celler og exosomer fra cellelinjene AU 565, MCF 7, Hs 578 T, HCC 1569 og MDA-MB 231. miRNA som ikke er detekterte i cellene har fått verdien 1,0, og ikke-detekterte miRNA i exosomene har fått verdien 7. Eksempler på miRNA som kun er detektert enten i cellene eller i exosomene har fått indikator-markør som trekant.

4. Diskusjon

Brystkreft er den hyppigste diagnostiserte krefttypen, og den ledende årsaken til dødsfall grunnet kreft blant kvinner i verden. I 2008 tilsvarte brystkreft 23 % av totalt nye krefttilfeller som ble diagnostisert blant kvinner, og 14 % av dødsfallene var forårsaket av brystkreft [143]. Behovet for en bedre diagnostisering av brystkreft er stort, og et område det forskes mye på. Behovet og målet er å finne stabile biomarkører som kan bidra til å oppdage brystkreft i en tidlig fase. Per dags dato er det 2 markører som kan brukes for å evaluere brystkrefttumorer og deres terapeutiske respons, ER og HER2, men dette er histologiske prøver, og vil ikke kunne brukes som biomarkører. Andre markører som blir brukt er karbohydrat-antigener og karsinoembryonisk-antigen, men disse egner seg ikke som diagnostiseringsmarkører på grunn av deres lave sensitivitet, og brukes kun til å undersøke progresjonen av tumoren [144].

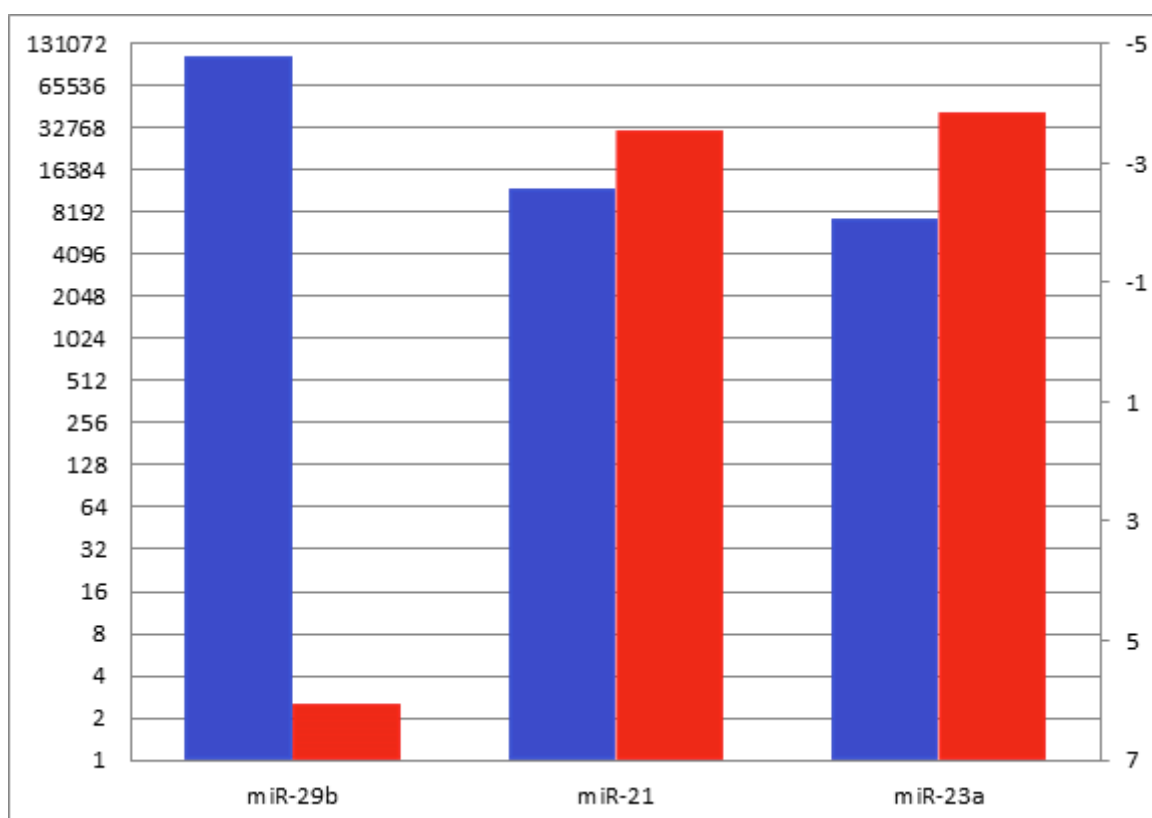
En ideell biomarkør må være sensitiv for å oppdage tumorer i en tidlig fase, samt være kostnadseffektiv [144]. Det har blitt funnet ut at miRNA i sirkulasjonen har et potensial som mulige biomarkører. I en studie der miRNA-profilene fra fullblod fra 48 brystkreftpasienter og 57 kontrollpasienter ble sammenlignet, ble det funnet 59 miRNA som hadde et signifikant differensielt uttrykk mellom brystkreftpasientene og kontrollgruppen [145]. En annen studie viser til høyt uttrykk av miR-21 og miR-29a i serum fra brystkreftpasienter sammenlignet med friske individer [138]. Som nevnt tidligere er brystkreft en svært heterogen sykdom som består av mange ulike undergrupper. miRNA som eventuelt kan brukes som biomarkører, må derfor bli funnet igjen i alle disse undergruppene av brystkreft. De må også skille seg spesifikt ut fra andre miRNA, og fra miRNA som blir funnet normalt hos friske kontroller.

I denne oppgaven ble det undersøkt miRNA i 6 forskjellige brystkreftcellelinjer med 2 cellelinjer av hver subtype: luminal, basal-A og basal-B. Det har også blitt sammenlignet miRNA i exosomer fra 5 av de samme cellelinjene. Som vist i resultatene ble sekvensene fra SOLiD 4-sekvenseringen annotert opp mot miRBase 17, det vil si at det i denne oppgaven kun har blitt sett på miRNA som allerede er kjente. I disse sekvensene som ikke har blitt annotert, er det store muligheter for at det også finnes miRNA som ennå ikke har blitt oppdaget, og som muligens kan ha en viktig rolle i brystkreftutviklingen.

For å kunne finne miRNA som kan brukes som biomarkører har det i denne oppgaven blitt undersøkt om det finnes enkelte miRNA av de som har blitt detektert og annotert, som skiller seg ut i alle cellelinjene. Korrelasjonen av uttrykte miRNA i disse cellelinjene ble undersøkt

med Pearsons korrelasjon og Spearmans Rho, som viste seg at den beste korrelasjonen ikke nødvendigvis var mellom cellelinjer av samme subtype. Dette viser at det er stor variasjon i uttrykket av miRNA mellom cellelinjene av samme subtype og på tvers av subtypene. På grunn av stor forskjell i miRNA-uttrykket for cellelinjer av samme subtype, kan derfor ikke miRNA-profiler brukes til å klassifisere disse cellelinje-subtypene når sammenligningsgrunnlaget er begrenset til seks cellelinjer. I disse resultatene er det også vist at det kan finnes uttrykk av miRNA som er like på tvers av subtypene, siden cellelinjer av en subtype kan korrelere bedre med cellelinjer av en annen subtype. En sammenligning av miRNA-uttrykket fra sekvenseringen, viste at miR-103a, miR-29b og miR-21 var miRNA som var høyt uttrykt blant alle cellelinjene (figur 3.1 og 4.1).

miR-29b er en viktig regulator av metastasering, og kan fungere som en markør for brystkreft og progresjonen av brystkreft. I en studie der uttrykket av miR-29b i basal-B cellelinjen MDA-MB 231 og den luminal cellelinjen MCF 7 ble sammenlignet, ble det vist at uttrykket av miR-29b var høyere i MDA-MB 231 som er en mer aggressiv, invasiv og metastaserende cellelinje, enn i MCF 7. Studien viste også at ved å hemme miR-29b i cellekulturer, økte uttrykket av tumorsuppressor PTEN, som fremmer apoptose, hemmer invasjon og metastasering [146]. Dette er i samsvar med resultatene i denne oppgaven der miR-29b var høyt uttrykt (rangert som høyest uttrykt) i MDA-MB 231, og litt lavere i MCF 7. Dette kan tyde på at miR-29b har en viktig rolle i den aggressive cellelinjen MDA-MB 231. miR-29b er også det høyest uttrykte miRNA'et i Hs 578 T og HCC 1569 og har også et høyt uttrykk i AU 565, men noe lavere i HCC 1187. Siden miR-29b har en klar rolle i brystkreftutvikling og har et relativt høyt uttrykk i alle cellelinjene, kan dette åpne for at dette miRNA'et potensielt kan være en biomarkør for brystkreft. Samtidig viste resultatene i denne oppgaven at miR-29b var lite uttrykt i exosomene, noe som kan være et argument mot tilstedeværelsen av dette miRNA'et i blodet til individer som er rammet av brystkreft (figur 4.1). Videre må også uttrykket av miR-29b i blod og brystvev fra friske individer kartlegges før noen konklusjon vedrørende mulig bruk av miR-29b som biomarkør kan trekkes. Det at miR-29b er generelt høyt uttrykt intracellulært, men ikke i exosomene i alle cellelinjene, skyldes ikke ulike analysemetoder (SOLID4 sekvensering og RT-qPCR-analyse). miR-29b var også høyt uttrykt i Hs 578 T-cellelinjen analysert med samme metode som ved exosom-profileringene (MiRCURY LNATM UNIVERSAL RT microRNA PCR, Exiqon) tidligere utført av Forskningsgruppe for RNA og transkriptomikk (upubliserede resultater).



Figur 4.1. Viser gjennomsnittsuttrykket av miR-29b, miR-21 og miR-23a i cellelinjer (blå søyle, venstre y-akse) og exosomer (rød søyle, høyre y-akse).

De fleste dødsfall forårsaket av brystkreft skyldes som regel utvikling av metastaser. Denne prosessen innebærer flere trinn: cellene løsner fra primærtumor og sprer seg via blodsirkulasjonen og/eller lymfesystemet, og migrerer gjennom basalmembranen i blod- eller lymfeårene før de etablerer en ny svulst i det sekundære vevet [147]. miR-21 er overuttrykt i flere krefttyper, deriblant brystkreft, og er assosiert med økt celleproliferasjon, metastasering og redusert overlevelse [79, 138]. I brystkreft reguleres tumorsuppressor-genene programmed cell death 4 gene (PDCD4) og Tropomyosin 1 (TM1) direkte av miR-21 [148-150]. miR-21 har også vist seg å kunne ha en rolle i resistens mot legemiddelterapi. En studie der effekten av trastuzumab i HER2 positive brystkreftcellelinjer og brystkreftceller ble undersøkt, viste at et overuttrykk av miR-21 bidro til å fremme resistens mot trastuzumab både i brystkreftcellelinjer og i brystkrefttumorer [82]. Dette viser at miR-21 kan ha mange ulike funksjoner i brystkreft. I samsvar med dette var miR-21 også høyt uttrykt i alle cellelinjene i

denne oppgaven, noe som videre bekrefter at dette miRNA`et har en viktig rolle i utviklingen av brystkreft (figur 4.1).

Et annet miRNA som er høyt uttrykt er let-7f som er en del av let-7 familien. Let-7 familien har 13 medlemmer (*let-7a-1*, *7a-2*, *7a-3*, *7b*, *7c*, *7d*, *7e*, *7f-1*, *7f-2*, *7g*, *7i*, *mir-98*, og *mir-202*) lokalisert på 9 ulike kromosomer, og er definert som en familie fordi seed-sekvensen er lik. miRNA`ene i let-7 familien er tumorsuppressorer, og er derfor ofte nedregulert i mange krefttyper [152]. I noen krefttyper som lungekreft og eggstokkreft er medlemmene av let-7 familien ofte fullstendig nedregulert [153, 154]. Det har også blitt funnet at medlemmer av let-7 familien også kan være oppregulert i kreft, og ikke bare fungere som en tumorsuppressor [152]. En studie av det globale miRNA-uttrykket i primære brystkreftsvulster (113 vevsprøver av brystkreftsvulster og 40 prøver av normalt brystvev) viste at let-7f var 1 av 9 miRNA (**miR-21**, **miR-365**, **miR-181b**, **let-7f**, miR-155, **miR-29b**, miR-181d, miR-98, og miR-29c, uthevet miRNA er også funnet oppregulert i cellelinjene brukt i denne oppgaven, se figur 3.1 og figur 3.2) som var oppregulert mer enn to-fold når man sammenlignet med normalt brystvev [79]. let-7f er et av de høyest uttrykte miRNA`ene i brystkreftcellelinjene som er brukt i denne oppgaven. I likhet med de andre miRNA`ene som er høyt uttrykt, er det imidlertid ikke blitt gjort en sammenligning med normale celler fra brystvev slik at man ikke kan konkludere med en oppregulering av let-7. Likevel er let-7f et av de miRNA`ene som er høyest uttrykt i alle disse cellelinjene, noe som kan tyde på at dette miRNA`et kan ha en viktig rolle i de ulike subtypene av brystkreft.

Resultatene i oppgaven har vist at det finnes flere miRNA med et kjent overuttrykk i kreft som også er høyt uttrykt i brystkreftcellelinjene, og blant disse miRNA`ene kan det finnes potensielle biomarkører. Potensialet som biomarkører er relatert til ekstracellulær tilstedeværelse i kroppsvæsker, for eksempel i form av exosomer. En nylig publisert studie undersøkte om miRNA i hovedsak var å finne innkapslet i exosomer, eller om de var å finne som fritt sirkulerende. Dette ble undersøkt i serum og spytt, og det viste seg at konsentrasjonen av miRNA var konsekvent høyere inne i exosomene enn som fritt sirkulerende [155]. I denne oppgaven ble det bekreftet at det finnes et stort antall miRNA i exosomer som er skilt ut i fra brystkreftcellelinjer. Metoden som er brukt for profilering detekterer kun kjente miRNA, noe som muliggjør en exosomal tilstedeværelse av miRNA som ikke er kjent, men som også kan ha et potensial som biomarkører

Det har blitt foreslått at ekstracellulært miRNA i hovedsak er bundet til Ago2, og at det er et fåtall av miRNA som er innkapslet i vesikler som exosomer [156]. På bakgrunn av dette, ble det også gjort et forsøk på å detektere miRNA fra proteinkomplekser, deriblant Ago2, i denne oppgaven. Det ble valgt ut tre forskjellige cellelinjer: en luminal cellelinje, MCF 7, en basal-A, HCC 1569 og en basal-B, MDA-MB 231. Dette forsøket ble utført ved å eliminere exosomer fra mediet med ultrasentrifugering, og filtrere mediet gjennom et 50 kilodalton (kDa)-filter for å fjerne mindre proteiner (Ago2 ~95 kDa). Denne fraksjonen ble deretter analysert på samme panelet som ble brukt til profilering av miRNA fra exosomene (MiRCURY LNATM UNIVERSAL RT microRNA PCR, Exiqon), og en RT-qPCR-analyse ble utført. I denne analysen ble det ikke detektert noen miRNA. Det kan både skyldes lite protein-miRNA komplekser og/eller for lite startmateriale. Basert på disse forsøkene kan man ikke trekke noen konklusjon om hvorvidt miRNA i hovedsak er bundet til proteinkomplekser eller innkapslet i vesikler i disse brystkreftcellelinjene. Denne mangelen på detektert miRNA i proteinfraksjonen, peker i retning av at det ekstracellulære miRNA'et primært finnes i exosomer.

I exosomene ble det detektert mange miRNA, deriblant flere miRNA som skilte seg ut som høyere uttrykt enn de resterende. Det miRNA'et som var høyest uttrykt ved sammenligning av miRNA i exosomene, var miR-23a. Siden dette miRNA'et er høyt uttrykt i exosomer fra alle brystkreftcellelinjene, kan det tyde på at det kan ha en viktig funksjon i disse cellene og kanskje også i brystkreft (figur 4.1). En studie der miRNA uttrykket fra brystkreftsvulster (21 prøver) ble sammenlignet med normalt brystvev (20 prøver) ved bruk av SOLiD-sekvensering, viste at dette miRNA'et er fem-fold oppregulert i brystkreft sammenlignet med normalt brystvev [138]. Dette kan tyde på at miR-23a er generelt oppregulert i brystkreft, og kan være en lovende kandidat som en biomarkør, siden det også er høyt uttrykt i exosomene fra alle brystkreftcellelinjene i denne oppgaven.

Det har blitt foreslått at miRNA i exosomer skilles ut selektivt fra cellene [117, 157]. Resultatene som er presentert i denne oppgaven støtter en viss selektiv utskillelse. For eksempel er oncomiR'et miR-155 detektert i exosomer fra HCC 1569, men ikke i selve cellelinjen. Dette åpner for at tumorceller aktivt kan skille ut spesifikke miRNA som kan bidra til å fremme kreftutvikling og metastasering. Det finnes også en rekke miRNA som er høyt uttrykt i cellelinjene, men som ikke blir detektert i exosomene. miR-29b er høyt uttrykt i alle cellelinjene, men finnes kun i exosomer fra HCC 1569. miR-125b er høyt uttrykt i alle cellelinjene, men det høye uttrykket reflekteres kun i exosomene fra Hs 578 T og MDA-MB

231. miR-125b er tidligere funnet i serum hos brystkreftpasienter, der et høyt uttrykk av miR-125b korrelerte med et lavere antall apoptotiske celler og økt resistens mot kjemoterapi [158]. Det at uttrykket av miR-125b også blir funnet høyt uttrykt i exosomene fra basal-B subtype cellelinjene i denne oppgaven, viser at dette miRNA`et kan ha en viktig rolle i denne subtypen spesielt.

Dersom det ikke hadde vært en selektiv utskillelse av miRNA til exosomene, kunne man forventet at miRNA-innholdet i exosomene reflekterte det intracellulære uttrykket. For et stort antall miRNA viser resultatene nettopp dette (figur 3.8). Alle cellelinjene har for eksempel et høyt uttrykk av miR-21, miR-23a og miR-24 både intracellulært og i exosomene. Resultatene som er presentert i denne oppgaven viser at miRNA-innholdet i exosomene i stor grad reflekterer det intracellulære miRNA-uttrykket, samtidig som en rekke miRNA skilles ut selektivt.

Hvis det er slik at uttrykket av miRNA i exosomene i stor grad reflekterer uttrykket i kreftceller, kan exosomale miRNA-profiler fra blod potensielt brukes som ikke-invasive indikatorer på hvor aggressiv tumoren er før behandling. Tilstedeværelsen av miRNA som er assosiert med økt celleproliferasjon, metastasering, resistens mot kjemoterapeutika eller prognose, kan kanskje påvirke fremtidige valg av behandling mot brystkreft.

5. Konklusjon og videre aspekter

I denne oppgaven har det blitt vist at miRNA-uttrykket i seks brystkreftcellelinjer ikke følger cellelinjenes genetiske subtyper, men har i stedet kun en delvis sammenfallende uttryksprofil. miRNA med et kjent overuttrykk og definerte roller som regulatorer i brystkreft, er også høyt uttrykt i cellelinjene i denne oppgaven. Enkelte miRNA, som miR-29b, miR-23a og miR-21, er høyt uttrykt i alle cellelinjene. Exosomer fra disse cellelinjene inneholder en rekke ulike miRNA, og det exosomale miRNA-uttrykket sammenfaller i stor grad med det intracellulære miRNA-uttrykket. Likevel er det funnet miRNA som kun er detektert i cellelinjene eller exosomene, noe som kan tyde på at utskillelsen av miRNA i exosomer kan være en aktiv og selektiv prosess.

En tidlig diagnose av brystkreft er avgjørende for et best mulig utfall. miRNA har vist seg å kunne ha et potensial som biomarkører for tidlig deteksjon av brystkreft, noe som resultatene i denne oppgaven også støtter. Det har blitt detektert miRNA som er høyt uttrykt i alle subtypene av brystkreftcellelinjer, og som kan detekteres ekstracellulært (i denne oppgaven i form av exosomer). Et viktig og interessant eksperiment ville være å utføre et nytt forsøk for å detektere miRNA i proteinfraksjonen, for deretter å undersøke om miRNA som er bundet til proteiner har en annen uttryksprofil enn miRNA i exosomene. Det ville også vært ønskelig å inkludere flere cellelinjer for å få et større datagrunnlag, også "normale celler", for eksempel cellelinjen Hs 578 bst, som er derivert fra samme pasient som Hs 578 T. Dette er viktig for å kunne si noe om forskjellen på miRNA-uttrykket i brystkreft og normale celler, og er grunnleggende i søken etter mulige biomarkører.

Før miRNA kan brukes som biomarkører i brystkreft må det utføres flere studier i store populasjoner, der uttrykket av miRNA sammenlignes hos brystkreftrammede og friske individer. Ved Institutt for samfunnsmedisin ved Universitetet i Tromsø ble det i 1991 startet en landsdekkende undersøkelse kalt 'Kvinner, livsstil og helse', senere endret undersøkelsen navn til 'Kvinner og kreft'. Formålet med studien er å lete etter årsaker til kreft hos kvinner, spesielt brystkreft. Fra 2006 er det blitt samlet inn blod i det som kalles postgenom-studien. Denne delen av undersøkelsen gir en mulighet til å studere sammenhengen mellom gener som er aktive ved blodprøvetakingen, og senere risiko for kreft. 50 000 blodprøver er nå samlet

inn, og deler av dette materialet brukes nå til å sammenligne miRNA-profilene i blod og serum fra kvinner som er blitt rammet av brystkreft med friske individer.

For at enkelte miRNA eller miRNA-profiler skal kunne brukes som biomarkører for brystkreft, må også spesifisiteten kartlegges. En optimal biomarkør må være spesifikk for brystkreft og gi lav andel av falske negative- og positive prøvesvar. Det er liten tvil om at miRNA har et stort potensial som fremtidige biomarkører både med diagnostisk og prognostisk verdi, samtidig som de kan bidra til å utvikle nye profiler for skreddersydd behandling av brystkreft.

6. Referanser

1. Feingold, E., P. Good, M. Guyer, S. Kamholz, L. Liefer, K. Wetterstrand, F. Collins, T. Gingeras, D. Kampa, og E. Sekinger, *The ENCODE(Encyclopedia of DNA elements) Project*. Science, 2004. **306**: s. 636-640.
2. Amaral, P.P. og J.S. Mattick, *Noncoding RNA in development*. Mammalian genome, 2008. **19**: s. 454-492.
3. Blackshaw, S., S. Harpavat, J. Trimarchi, L. Cai, H. Huang, W.P. Kuo, G. Weber, K. Lee, R.E. Fraioli, og S.H. Cho, *Genomic analysis of mouse retinal development*. PLoS biology, 2004. **2**.
4. Rinn, J.L., M. Kertesz, J.K. Wang, S.L. Squazzo, X. Xu, S.A. Brugmann, L.H. Goodnough, J.A. Helms, P.J. Farnham, og E. Segal, *Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**: s. 1311-1323.
5. Dinger, M.E., P.P. Amaral, T.R. Mercer, K.C. Pang, S.J. Bruce, B.B. Gardiner, M.E. Askarian-Amiri, K. Ru, G. Solda , og C. Simons, *Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation*. Genome research, 2008. **18**: s. 1433-1445.
6. Li, T.H., J. Spearow, C.M. Rubin, og C.W. Schmid, *Physiological stresses increase mouse short interspersed element (SINE) RNA expression in vivo*. Gene, 1999. **239**: s. 367-372.
7. Kim, T.K., M. Hemberg, J.M. Gray, A.M. Costa, D.M. Bear, J. Wu, D.A. Harmin, M. Laptewicz, K. Barbara-Haley, og S. Kuersten, *Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers*. Nature, 2010. **465**: s. 182-187.
8. De Santa, F., I. Barozzi, F. Mietton, S. Ghisletti, S. Polletti, B.K. Tusi, H. Muller, J. Ragoussis, C.L. Wei, og G. Natoli, *A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers*. PLoS biology, 2010. **8**.
9. Taft, R.J., K.C. Pang, T.R. Mercer, M. Dinger, og J.S. Mattick, *Non-coding RNAs: regulators of disease*. The Journal of pathology, 2010. **220**: s. 126-139.
10. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. Nature Reviews Genetics, 2011. **12**: s. 861-874.
11. Ponting, C.P., P.L. Oliver, og W. Reik, *Evolution and functions of long noncoding RNAs*. Cell, 2009. **136**: s. 629-641.
12. Seila, A.C., J.M. Calabrese, S.S. Levine, G.W. Yeo, P.B. Rahl, R.A. Flynn, R.A. Young, og P.A. Sharp, *Divergent transcription from active promoters*. Science, 2008. **322**: s. 1849-1851.
13. Kapranov, P., F. Ozsolak, S.W. Kim, S. Foissac, D. Lipson, C. Hart, S. Roels, C. Borel, S.E. Antonarakis, og A.P. Monaghan, *New class of gene-termini-associated human RNAs suggests a novel RNA copying mechanism*. Nature, 2010. **466**: s. 642-646.
14. Carthew, R.W. og E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**: s. 642-655.
15. Yang, W., D.Y. Lee, og Y. Ben-David, *The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis*. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2011. **3**: s. 140-155.
16. Kutter, C. og P. Svoboda, *MiRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown*. RNA Biol, 2008. **5**: s. 181-188.
17. Kozomara, A. og S. Griffiths-Jones, *MiRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic acids research, 2011. **39**.

18. Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, og E. Izaurralde, ***MRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes.*** Genes & development, 2006. **20**: s. 1885-1898.
19. Winter, J., S. Jung, S. Keller, R.I. Gregory, og S. Diederichs, ***Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.*** Nature cell biology, 2009. **11**: s. 228-234.
20. Collier, J. og R. Parker, ***General translational repression by activators of mRNA decapping.*** Cell, 2005. **122**: s. 875-886.
21. Huntzinger, E. og E. Izaurralde, ***Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay.*** Nature Reviews Genetics, 2011. **12**: s. 99-110.
22. Pasquinelli, A.E., ***MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship.*** Nature Reviews Genetics, 2012. **13**: s. 271-282.
23. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, og V. Ambros, ***The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.*** Cell, 1993. **75**: s. 843-854.
24. Lee, R.C. og V. Ambros, ***An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans.*** Science, 2001. **294**.
25. Lau, N.C., L.P. Lim, E.G. Weinstein, og D.P. Bartel, ***An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans.*** Science, 2001. **294**: s. 858-862.
26. Li, M.F., J. Li, X.F. Ding, M.A. He, og S.Y. Cheng, ***MicroRNA and Cancer.*** Aaps Journal, 2010. **12**: s. 309-317.
27. Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J.L. Ashurst, og A. Bradley, ***Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.*** Genome research, 2004. **14**: s. 1902-1910.
28. Lee, Y., K. Jeon, J.T. Lee, S. Kim, og V.N. Kim, ***MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.*** EMBO J, 2002. **21**: s. 4663-4670.
29. Baskerville, S. og D.P. Bartel, ***Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes.*** Rna, 2005. **11**: s. 241-247.
30. Yang, Z. og L. Wang, ***Regulation of microRNA expression and function by nuclear receptor signaling.*** Cell Biosci, 2011. **1**.
31. Beezhold, K.J., V. Castranova, og F. Chen, ***Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention.*** Mol Cancer, 2010. **9**: s. 134.
32. Ma, C., Y. Liu, og L. He, ***MicroRNAs - powerful repression comes from small RNAs.*** Sci China C Life Sci, 2009. **52**: s. 323-330.
33. Borchert, G.M., W. Lanier, og B.L. Davidson, ***RNA polymerase III transcribes human microRNAs.*** Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**: s. 1097-1101.
34. Tomari, Y. og P.D. Zamore, ***MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner.*** Current Biology, 2005. **15**.
35. Ladomery, M.R., D.G. Maddocks, og I.D. Wilson, ***MicroRNAs: their discovery, biogenesis, function and potential use as biomarkers in non-invasive prenatal diagnostics.*** Int J Mol Epidemiol Genet, 2011. **2**: s. 253-260.
36. Denli, A.M., B.B. Tops, R.H. Plasterk, R.F. Ketting, og G.J. Hannon, ***Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex.*** Nature, 2004. **432**.
37. Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara, og B.R. Cullen, ***Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.*** Genes Dev, 2003. **17**.
38. Haase, A.D., L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Laine, R. Sack, A. Gatignol, og W. Filipowicz, ***TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression,***

- interacts with Dicer and functions in RNA silencing*. EMBO Rep, 2005. **6**: s. 961-967.
39. Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D.P. Bartel, og P.D. Zamore, *Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes*. Cell, 2005. **123**: s. 607-620.
 40. Li, Z. og T.M. Rana, *Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries*. Accounts of Chemical Research, 2012.
 41. Carey, L.A., E.C. Dees, L. Sawyer, L. Gatti, D.T. Moore, F. Collichio, D.W. Ollila, C.I. Sartor, M.L. Graham, og C.M. Perou, *The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**: s. 2329-2334.
 42. Schwartz, D.C. og R. Parker, *Mutations in Translation Initiation Factors Lead to Increased Rates of Deadenylation and Decapping of mRNAs in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology, 1999. **19**: s. 5247-5256.
 43. Fabian, M.R., N. Sonenberg, og W. Filipowicz, *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs*. Annual review of biochemistry, 2010. **79**: s. 351-379.
 44. Fabian, M.R., G. Mathonnet, T. Sundermeier, H. Mathys, J.T. Zipprich, Y.V. Svitkin, F. Rivas, M. Jinek, J. Wohlschlegel, og J.A. Doudna, *Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation*. Molecular cell, 2009. **35**: s. 868-880.
 45. Zekri, L., E. Huntzinger, S. Heimstadt, og E. Izaurralde, *The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release*. Molecular and cellular biology, 2009. **29**: s. 6220-6231.
 46. Chekulaeva, M., H. Mathys, J.T. Zipprich, J. Attig, M. Colic, R. Parker, og W. Filipowicz, *MiRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs*. Nature structural & molecular biology, 2011. **18**: s. 1218-1226.
 47. Wu, L. og J.G. Belasco, *Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs*. Molecular cell, 2008. **29**: s. 1-7.
 48. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, og N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nature Reviews Genetics, 2008. **9**: s. 102-114.
 49. Kreftforeningen. *Brystkreft*. 2011 04.07.2011; Tilgjengelig fra: http://www.kreftforeningen.no/portal/page?_pageid=37,83296&_dad=portal&_schema=PORTAL&navigation1_parentItemId=2448&navigation2_parentItemId=2448&navigation2_selectedItemId=2017&_piref37_88109_37_83296_83296.sectionId=284&gclid=ClaBzfua-qwCFcZzmAod60CgSA.
 50. Vargo-Gogola, T. og J.M. Rosen, *Modelling breast cancer: one size does not fit all*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**: s. 659-672.
 51. Perou, C.M., T. Sørlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, og L.A. Akslen, *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**: s. 747-752.
 52. Sørlie, T., C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. Van De Rijn, og S.S. Jeffrey, *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**.
 53. Sørlie, T., *Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities*. European journal of cancer, 2004. **40**: s. 2667-2675.

54. Rakha, E.A., J.S. Reis-Filho, og I.O. Ellis, ***Basal-like breast cancer: a critical review***. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**: s. 2568-2581.
55. Bernardo, G.M., K.L. Lozada, J.D. Miedler, G. Harburg, S.C. Hewitt, J.D. Mosley, A.K. Godwin, K.S. Korach, J.E. Visvader, og K.H. Kaestner, ***FOXA1 is an essential determinant of ER alpha expression and mammary ductal morphogenesis***. Development, 2010. **137**: s. 2045-2054.
56. Abd El Rehim, D.M., S.E. Pinder, C.E. Paish, J. Bell, R. Blamey, J.F.R. Robertson, R.I. Nicholson, og I.O. Ellis, ***Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma***. The Journal of pathology, 2004. **203**: s. 661-671.
57. Korsching, E., S.S. Jeffrey, W. Meinerz, T. Decker, W. Boecker, og H. Buerger, ***Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations***. Journal of clinical pathology, 2008. **61**: s. 553-560.
58. Oncolex. ***Brystkreft, stadier, TNM-klassifikasjon***. 2011 30.03.2012 [cited 2012 07.04.2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.oncolex.no/en/Bryst/Bakgrunn/Stadier.aspx>.
59. Calza, S., P. Hall, G. Auer, J. Bjohle, S. Klaar, U. Kronenwett, E.T. Liu, L. Miller, A. Ploner, og J. Smeds, ***Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients***. Breast Cancer Research, 2006. **8**.
60. Hu, Z., C. Fan, D. Oh, J. Marron, X. He, B. Qaqish, C. Livasy, L. Carey, E. Reynolds, og L. Dressler, ***The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms***. BMC genomics, 2006. **7**.
61. Bertucci, F., N. Borie, C. Ginestier, A. Groulet, E. Charafe-Jauffret, J. Adelaide, J. Geneix, L. Bachelart, P. Finetti, og A. Koki, ***Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers***. Oncogene, 2004. **23**: s. 2564-2575.
62. Biswas, D.K. og J.D. Iglehart, ***Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB signaling in breast cancer***. Journal of cellular physiology, 2006. **209**: s. 645-652.
63. Kreike, B., M. Van Kouwenhove, H. Horlings, B. Weigelt, H. Peterse, H. Bartelink, og M.J. Van De Vijver, ***Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas***. Breast Cancer Research, 2007. **9**.
64. Hudis, C.A. og L. Gianni, ***Triple-negative breast cancer: an unmet medical need***. The oncologist, 2011. **16**: s. 1-11.
65. Cheang, M.C.U., D. Voduc, C. Bajdik, S. Leung, S. McKinney, S.K. Chia, C.M. Perou, og T.O. Nielsen, ***Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype***. Clinical Cancer Research, 2008. **14**: s. 1368-1376.
66. Sotiriou, C., S.Y. Neo, L.M. McShane, E.L. Korn, P.M. Long, A. Jazaeri, P. Martiat, S.B. Fox, A.L. Harris, og E.T. Liu, ***Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study***. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**.
67. Sotiriou, C., P. Wirapati, S. Loi, A. Harris, S. Fox, J. Smeds, H. Nordgren, P. Farmer, V. Praz, og B. Haibe-Kains, ***Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis***. Journal of the National Cancer Institute, 2006. **98**: s. 262-272.
68. Sørlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, og S. Geisler, ***Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets***. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**.

69. Lacroix, M. og G. Leclercq, ***Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.*** Breast cancer research and treatment, 2004. **83**: s. 249-289.
70. Kao, J., K. Salari, M. Bocanegra, Y.L. Choi, L. Girard, J. Gandhi, K.A. Kwei, T. Hernandez-Boussard, P. Wang, og A.F. Gazdar, ***Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery.*** PloS one, 2009. **4**.
71. Neve, R.M., K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F.L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J.P. Coppe, og F. Tong, ***A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes.*** Cancer cell, 2006. **10**: s. 515-527.
72. Krefregisteret. ***Mammografiprogrammet.*** 2012 17.03.2012; Tilgjengelig fra: <http://www.krefregisteret.no/no/Forebyggende/Mammografiprogrammet/>.
73. Corcoran, C., A.M. Friel, M.J. Duffy, J. Crown, og L. O'Driscoll, ***Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer.*** Clinical chemistry, 2010. **57**: s. 18-32.
74. Per-Henrik Zahl, J.M., ***Overdiagnostikk av brystkreft etter 14 år med mammografiscreening.*** Tidsskriftet for Den norske legeforening, 2012.
75. Metzker, M.L., ***Sequencing technologies - the next generation.*** Nat Rev Genet, 2010. **11**: s. 31-46.
76. Martin, K.J., M.V. Fournier, G.P.V. Reddy, og A.B. Pardee, ***A need for basic research on fluid-based early detection biomarkers.*** Cancer research, 2010. **70**: s. 5203-5206.
77. Calin, G.A., C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, og K. Rai, ***Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.*** Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**.
78. Iorio, M.V., M. Ferracin, C.G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, og M. Campiglio, ***MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer.*** Cancer research, 2005. **65**.
79. Yan, L.X., X.F. Huang, Q. Shao, M.A.Y. Huang, L. Deng, Q.L. Wu, Y.X. Zeng, og J.Y. Shao, ***MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis.*** Rna, 2008. **14**: s. 2348-2360.
80. Song, B., C. Wang, J. Liu, X. Wang, L. Lv, L. Wei, L. Xie, Y. Zheng, og X. Song, ***MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression.*** J Exp Clin Cancer Res, 2010. **29**.
81. Zhu, S., H. Wu, F. Wu, D. Nie, S. Sheng, og Y.Y. Mo, ***MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis.*** Cell research, 2008. **18**: s. 350-359.
82. Gong, C., Y. Yao, Y. Wang, B. Liu, W. Wu, J. Chen, F. Su, H. Yao, og E. Song, ***Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer.*** Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**.
83. Kong, W., L. He, M. Coppola, J. Guo, N.N. Esposito, D. Coppola, og J.Q. Cheng, ***MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer.*** J Biol Chem, 2010. **285**.
84. Chen, J., B.C. Wang, og J.H. Tang, ***Clinical significance of MicoRNA-155 expression in human breast cancer.*** J Surg Oncol, 2011.
85. Kong, W., H. Yang, L. He, J. Zhao, D. Coppola, W.S. Dalton, og J.Q. Cheng, ***MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor Beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA.*** Molecular and cellular biology, 2008. **28**: s. 6773-6784.

86. Jiang, S., H.W. Zhang, M.H. Lu, X.H. He, Y. Li, H. Gu, M.F. Liu, og E.D. Wang, ***MicroRNA-155 functions as an oncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene.*** Cancer Res, 2010. **70**: s. 3119-3127.
87. Zhang, B., X. Pan, G.P. Cobb, og T.A. Anderson, ***MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors.*** Developmental biology, 2007. **302**: s. 1-12.
88. Peurala, H., D. Greco, T. Heikkinen, S. Kaur, J. Bartkova, M. Jamshidi, K. Aittomaki, P. Heikkila, J. Bartek, og C. Blomqvist, ***MiR-34a Expression Has an Effect for Lower Risk of Metastasis and Associates with Expression Patterns Predicting Clinical Outcome in Breast Cancer.*** PloS one, 2011. **6**.
89. Kato, M., T. Paranjape, R. Ullrich, S. Nallur, E. Gillespie, K. Keane, A. Esquela-Kerscher, J. Weidhaas, og F. Slack, ***The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in C. elegans and in vitro in human breast cancer cells.*** Oncogene, 2009. **28**: s. 2419-2424.
90. Valastyan, S., F. Reinhardt, N. Benaich, D. Calogrias, A.M. Szasz, Z.C. Wang, J.E. Brock, A.L. Richardson, og R.A. Weinberg, ***A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis.*** Cell, 2009. **137**: s. 1032-1046.
91. Lim, L.P., N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley, og J.M. Johnson, ***Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.*** Nature, 2005. **433**: s. 769-773.
92. Cuellar, T.L. og M.T. McManus, ***MicroRNAs and endocrine biology.*** Journal of endocrinology, 2005. **187**: s. 327-332.
93. Poy, M.N., L. Eliasson, J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, X. Ma, P.E. MacDonald, S. Pfeffer, T. Tuschl, N. Rajewsky, og P. Rorsman, ***A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion.*** Nature, 2004. **432**: s. 226-230.
94. Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish, og D.P. Bartel, ***MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.*** Science, 2004. **303**: s. 83-86.
95. Wilfred, B.R., W.X. Wang, og P.T. Nelson, ***Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways.*** Molecular genetics and metabolism, 2007. **91**: s. 209-217.
96. Harfe, B.D., M.T. McManus, J.H. Mansfield, E. Hornstein, og C.J. Tabin, ***The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb.*** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**.
97. Brennecke, J., D.R. Hipfner, A. Stark, R.B. Russell, og S.M. Cohen, ***Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in Drosophila.*** Cell, 2003. **113**: s. 25-36.
98. Mitchell, P.S., R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K.C. O'Briant, og A. Allen, ***Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.*** Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**.
99. Chen, X., H. Liang, J. Zhang, K. Zen, og C.Y. Zhang, ***Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication.*** Trends in Cell Biology, 2012.
100. Turchinovich, A., L. Weiz, A. Langheinz, og B. Burwinkel, ***Characterization of extracellular circulating microRNA.*** Nucleic acids research, 2011. **39**: s. 7223-7233.
101. Wang, K., S. Zhang, J. Weber, D. Baxter, og D.J. Galas, ***Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells.*** Nucleic acids research, 2010. **38**: s. 7248-7259.

102. Skog, J., T. Wurdinger, S. Van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, W.T. Curry, B.S. Carter, A.M. Krichevsky, og X.O. Breakefield, ***Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers.*** Nature cell biology, 2008. **10**: s. 1470-1476.
103. Kosaka, N., H. Iguchi, og T. Ochiya, ***Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis.*** Cancer science, 2010. **101**: s. 2087-2092.
104. Etheridge, A., I. Lee, L. Hood, D. Galas, og K. Wang, ***Extracellular microRNA: A new source of biomarkers.*** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2011.
105. Pan, B.T. og R.M. Johnstone, ***Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor.*** Cell, 1983. **33**: s. 967-978.
106. Stoorvogel, W., ***Functional transfer of microRNA by exosomes.*** Blood, 2012. **119**: s. 646-648.
107. Michael, A., S.D. Bajracharya, P.S.T. Yuen, H. Zhou, R.A. Star, G.G. Illei, og I. Alevizos, ***Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers.*** Oral diseases, 2010. **16**: s. 34-38.
108. Brase, J.C., D. Wuttig, R. Kuner, og H. Sultmann, ***Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer.*** Molecular Cancer, 2010. **9**.
109. Stoorvogel, W., M.J. Kleijmeer, H.J. Geuze, og G. Raposo, ***The biogenesis and functions of exosomes.*** Traffic, 2002. **3**: s. 321-330.
110. Zomer, A., T. Vendrig, E.S. Hopmans, M. Van Eijndhoven, J.M. Middeldorp, og D.M. Pegtel, ***Exosomes: fit to deliver small RNA.*** Communicative & integrative biology, 2010. **3**.
111. Simpson, R.J., J.W.E. Lim, R.L. Moritz, og S. Mathivanan, ***Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential.*** Expert review of proteomics, 2009. **6**: s. 267-283.
112. Babst, M., ***A close-up of the ESCRTs.*** Developmental cell, 2006. **10**: s. 547-548.
113. Zhang, Y., D. Liu, X. Chen, J. Li, L. Li, Z. Bian, F. Sun, J. Lu, Y. Yin, og X. Cai, ***Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration.*** Molecular cell, 2010. **39**: s. 133-144.
114. Gibbins, D.J., C. Ciaudo, M. Erhardt, og O. Voinnet, ***Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity.*** Nature cell biology, 2009. **11**: s. 1143-1149.
115. Yang, C. og P.D. Robbins, ***The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis.*** Clinical and Developmental Immunology, 2011.
116. Ludwig, A.K. og B. Giebel, ***Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication.*** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2011.
117. Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, og J.O. Lotvall, ***Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.*** Nature cell biology, 2007. **9**: s. 654-659.
118. Montecalvo, A., A.T. Larregina, W.J. Shufesky, D.B. Stolz, M.L.G. Sullivan, J.M. Karlsson, C.J. Baty, G.A. Gibson, G. Erdos, og Z. Wang, ***Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes.*** Blood, 2011. **119**: s. 756-766.
119. Kosaka, N., H. Iguchi, Y. Yoshioka, K. Hagiwara, F. Takeshita, og T. Ochiya, ***Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs.*** J Biol Chem, 2011.
120. Hackett, A., H. Smith, E. Springer, R. Owens, W. Nelson-Rees, J. Riggs, og M. Gardner, ***Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid***

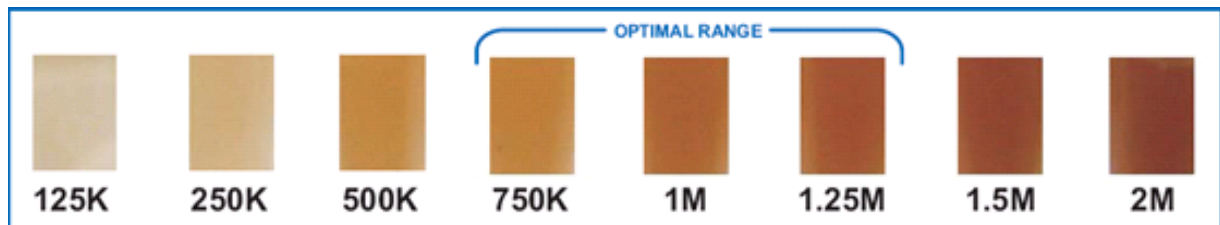
- mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines.* Journal of the National Cancer Institute, 1977. **58**.
121. Subik, K., J.F. Lee, L. Baxter, T. Strzepak, D. Costello, P. Crowley, L. Xing, M.C. Hung, T. Bonfiglio, og D.G. Hicks, *The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines.* Breast cancer: basic and clinical research, 2010. **4**.
 122. Burdall, S.E., A.M. Hanby, M. Lansdown, og V. Speirs, *Breast cancer cell lines: friend or foe?* Breast Cancer Research, 2003. **5**: s. 89-89.
 123. Blick, T., E. Widodo, H. Hugo, M. Waltham, M. Lenburg, R. Neve, og E. Thompson, *Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines.* Clinical and Experimental Metastasis, 2008. **25**: s. 629-642.
 124. technologies, L. *Quant-iT™ Technology.* 2011; Tilgjengelig fra: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/Quant-iT.html>.
 125. Agilent Technologies, A.b., *One platform--endless possibilities, for DNA, RNA, protein and cell analysis.* 2008.
 126. Sanger, F., S. Nicklen, og A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* 1977. Biotechnology, 1992. **24**: s. 104-8.
 127. Slatko, B.E., L.M. Albright, S. Tabor, og J. Ju, *DNA sequencing by the dideoxy method.* Curr Protoc Mol Biol, 2001.
 128. Ansorge, W.J., *Next-generation DNA sequencing techniques.* New biotechnology, 2009. **25**: s. 195-203.
 129. Zhang, J., R. Chiodini, A. Badr, og G. Zhang, *The impact of next-generation sequencing on genomics.* J Genet Genomics, 2011. **38**: s. 95-109.
 130. Kircher, M. og J. Kelso, *High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations.* Bioessays, 2010. **32**: s. 524-536.
 131. Voelkerding, K.V., S.A. Dames, og J.D. Durtschi, *Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics.* Clinical chemistry, 2009. **55**: s. 641-658.
 132. Abruzzo, L.V., K.Y. Lee, A. Fuller, A. Silverman, M.J. Keating, L.J. Medeiros, og K.R. Coombes, *Validation of oligonucleotide microarray data using microfluidic low-density arrays: a new statistical method to normalize real-time RT-PCR data.* Biotechniques, 2005. **38**: s. 785-792.
 133. Schmittgen, T.D., E.J. Lee, J. Jiang, A. Sarkar, L. Yang, T.S. Elton, og C. Chen, *Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA.* Methods, 2008. **44**: s. 31-38.
 134. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, og W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis.* Biotechniques, 2008. **44**: s. 619-626.
 135. J.Wengel, *Locked Nucleic Acid Technology™: A brief overview.* Exiqon.
 136. Nobelprize.org. *Microscopes.* 2012 27.04.2012]; Tilgjengelig fra: <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/index.html>.
 137. Rani, S., K. O'Brien, F.C. Kelleher, C. Corcoran, S. Germano, M.W. Radomski, J. Crown, og L. O'Driscoll, *Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling.* Methods Mol Biol, 2011. **784**: s. 181-195.
 138. Wu, Q., Z. Lu, H. Li, J. Lu, L. Guo, og Q. Ge, *Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection.* Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011. **2011**.
 139. Cittelly, D.M., P.M. Das, N.S. Spoelstra, S.M. Edgerton, J.K. Richer, A.D. Thor, og F.E. Jones, *Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors.* Mol Cancer, 2010. **9**.
 140. Jurmeister, S., M. Baumann, A. Balwierz, I. Keklikoglou, A. Ward, S. Uhlmann, J.D. Zhang, S. Wiemann, og O. Sahin, *MicroRNA-200c represses migration and invasion*

- of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F.* Mol Cell Biol, 2012. **32**: s. 633-651.
141. Wang, Y., R. Rathinam, A. Walch, og S.K. Alahari, ***ST14 (suppression of tumorigenicity 14) gene is a target for miR-27b, and the inhibitory effect of ST14 on cell growth is independent of miR-27b regulation.*** J Biol Chem, 2009. **284**: s. 23094-23106.
142. Yan, L.X., Q.N. Wu, Y. Zhang, Y.Y. Li, D.Z. Liao, J.H. Hou, J. Fu, M.S. Zeng, J.P. Yun, Q.L. Wu, Y.X. Zeng, og J.Y. Shao, ***Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth.*** Breast Cancer Res, 2011. **13**.
143. Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, og D. Forman, ***Global cancer statistics.*** CA: a cancer journal for clinicians, 2011. **61**: s. 69-90.
144. Heneghan, H.M., N. Miller, A.J. Lowery, K.J. Sweeney, J. Newell, og M.J. Kerin, ***Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer.*** Annals of surgery, 2010. **251**.
145. Schrauder, M.G., R. Strick, R. Schulz-Wendtland, P.L. Strissel, L. Kahmann, C.R. Loehberg, M.P. Lux, S.M. Jud, A. Hartmann, og A. Hein, ***Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection.*** PLoS One, 2012. **7**.
146. Wang, C., Z. Bian, D. Wei, og J.G. Zhang, ***MiR-29b regulates migration of human breast cancer cells.*** Mol Cell Biochem, 2011. **352**: s. 197-207.
147. Hedley, B.D. og A.F. Chambers, ***Tumor dormancy and metastasis.*** Adv Cancer Res, 2009. **102**: s. 67-101.
148. Lu, Z., M. Liu, V. Stribinskis, C. Klinge, K. Ramos, N. Colburn, og Y. Li, ***MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene.*** Oncogene, 2008. **27**: s. 4373-4379.
149. Frankel, L.B., N.R. Christoffersen, A. Jacobsen, M. Lindow, A. Krogh, og A.H. Lund, ***Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells.*** Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**: s. 1026-1033.
150. Zhu, S., M.L. Si, H. Wu, og Y.Y. Mo, ***MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1).*** J Biol Chem, 2007. **282**: s. 14328-14336.
151. Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C.C. Harris, og C.M. Croce, ***A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.*** Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**: s. 2257-2261.
152. Boyerinas, B., S.M. Park, A. Hau, A.E. Murmann, og M.E. Peter, ***The role of let-7 in cell differentiation and cancer.*** Endocr Relat Cancer, 2010. **17**: s. 19-36.
153. Takamizawa, J., H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi, og T. Takahashi, ***Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival.*** Cancer Res, 2004. **64**.
154. Dahiya, N., C.A. Sherman-Baust, T.L. Wang, B. Davidson, M. Shih Ie, Y. Zhang, W. Wood, 3rd, K.G. Becker, og P.J. Morin, ***MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer.*** PLoS One, 2008. **3**.
155. Gallo, A., M. Tandon, I. Alevizos, og G.G. Illei, ***The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes.*** PLoS One, 2012. **7**.
156. Creemers, E.E., A.J. Tijssen, og Y.M. Pinto, ***Circulating microRNAs.*** Circulation Research, 2012. **110**: s. 483-495.

157. Pigati, L., S.C. Yaddanapudi, R. Iyengar, D.J. Kim, S.A. Hearn, D. Danforth, M.L. Hastings, og D.M. Duelli, ***Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells***. PLoS One, 2010. **5**.
158. Wang, H., G. Tan, L. Dong, L. Cheng, K. Li, Z. Wang, og H. Luo, ***Circulating MiR-125b as a Marker Predicting Chemoresistance in Breast Cancer***. PLoS One, 2012. **7**.

7. Appendiks

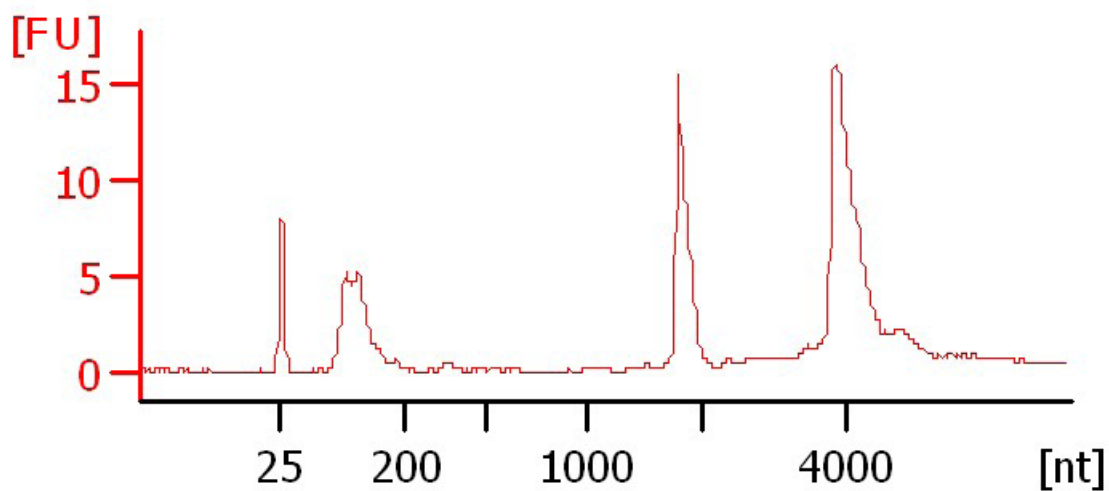
7.1. SOLiD™ bead concentration chart



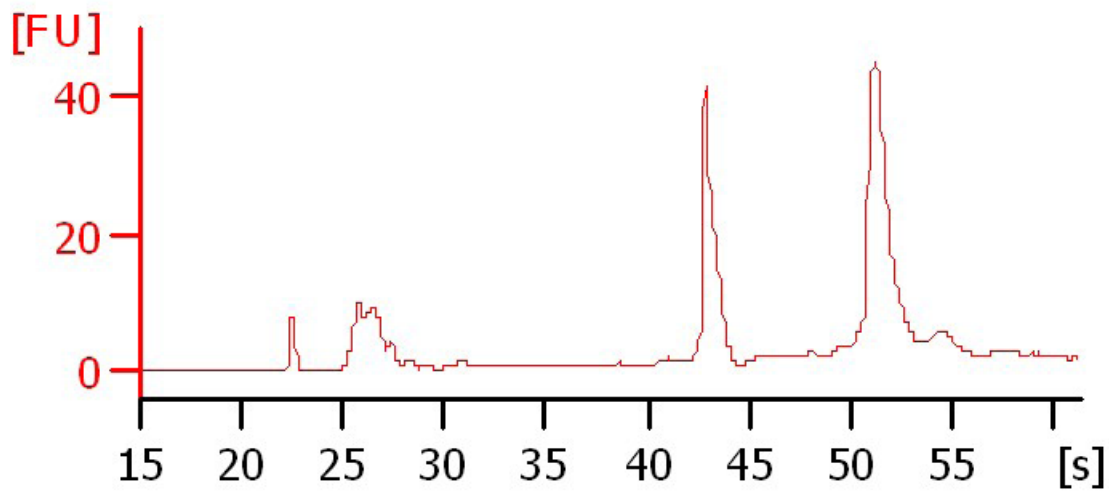
Figur 7.1. SOLiD™ bead concentration chart fra Applied Biosystems, ble brukt for å estimere konsentrasjonen av løsning med kuler før de ble deponert på glassplaten for en work-flow analyse, optimalt område for sekvenseringen er mellom 750 000 til 1,25 millioner kuler/ μl .

7.2. Kvalitetskontroll av totRNA

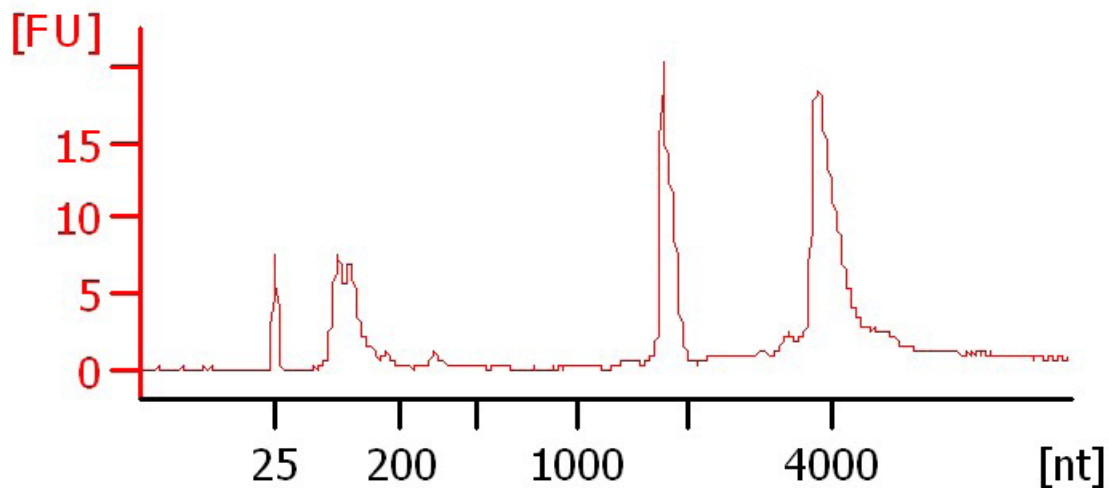
I noen tilfeller vises størrelsen på RNA'et i sekunder på x-aksen (figur 7.3 og figur 7.5-7.11). Dette skyldes lav konsentrasjon 5S RNA som brukes som et av referanse-RNA'ene, og vil ikke påvirke kvaliteten på analysen.



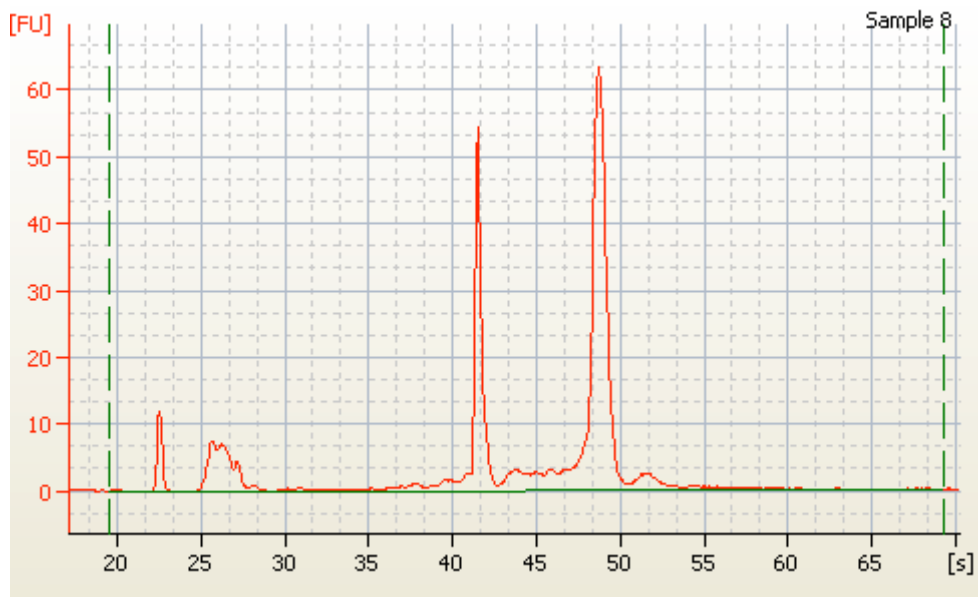
Figur 7.2. Elektroforese-diagram av totRNA isolert fra cellelinjen MDA-MB 231, som har blitt analysert med en TOTAL RNA 6000 Nano Chip på Agilent 2100 Bioanalyser. RIN -verdien var på 10, som viser at det var fullstendig inntakt RNA.



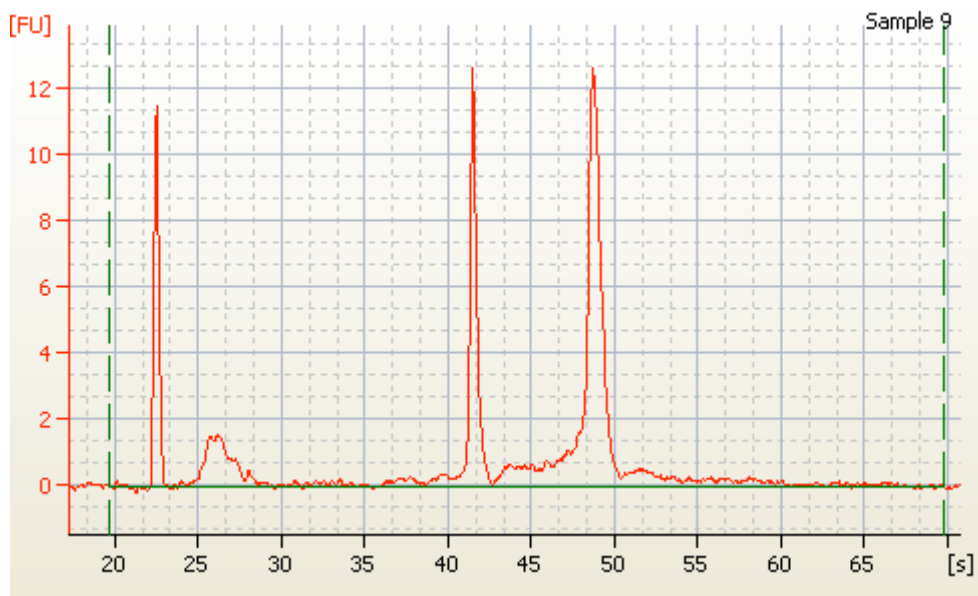
Figur 7.3. Elektroforese-diagram av totRNA isolert fra cellelinjen Hs 578 T, som har blitt analysert med en TOTAL RNA 6000 Nano Chip på Agilent 2100 Bioanalyser. RIN verdien var på 10, som viser at det var fullstendig inntakt RNA.



Figur 7.4. Elektroforese-diagram av totRNA isolert fra cellelinjen MCF 7, som har blitt analysert med en TOTAL RNA 6000 Nano Chip på Agilent 2100 Bioanalyser. RIN-verdien var på 9,9 som viser at det var nesten fullstendig inntakt RNA.

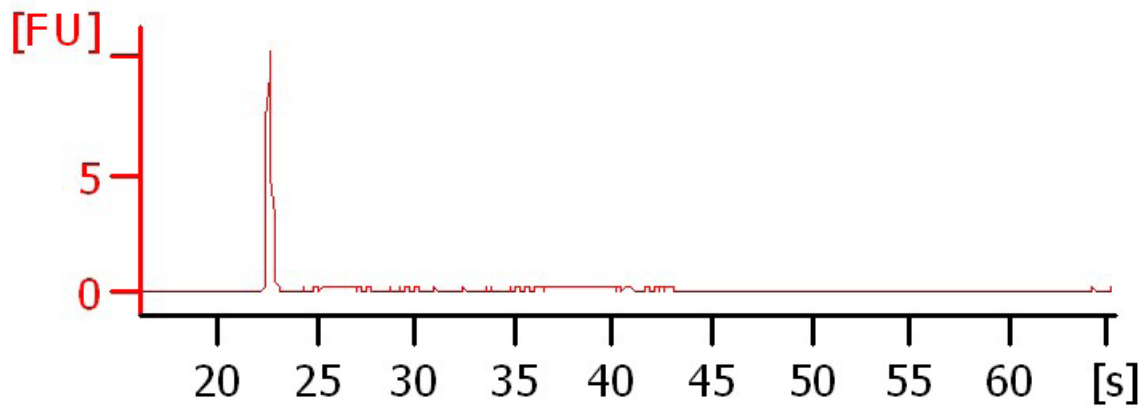


Figur 7.5. Elektroforese-diagram av totRNA isolert fra cellelinjen HCC 1569, som har blitt analysert med en TOTAL RNA 6000 Nano Chip på Agilent 2100 Bioanalyser. RIN-verdien var på 10 som viser at det var fullstendig inntakt RNA.

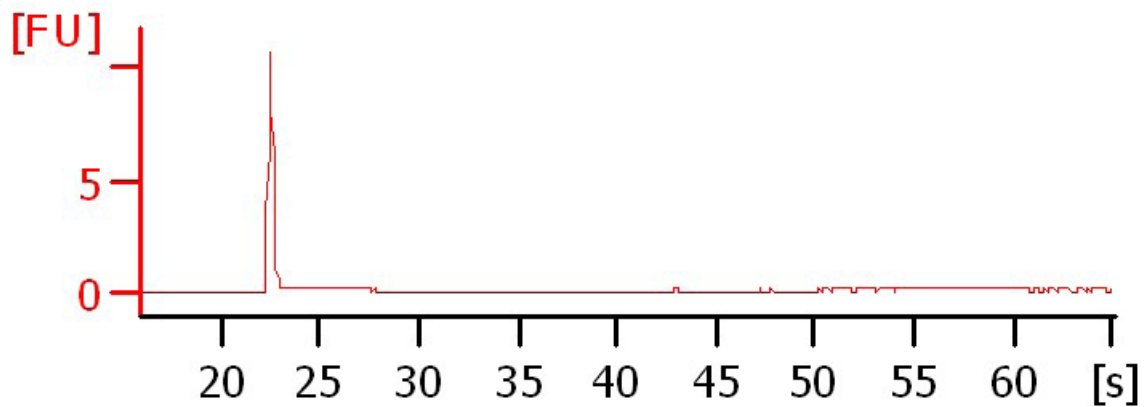


Figur 7.6. Elektroforese-diagram av totRNA isolert fra cellelinjen HCC 1187, som har blitt analysert med en TOTAL RNA 6000 Nano Chip på Agilent 2100 Bioanalyser. RIN-verdien var på 9,7 som viser at det var fullstendig inntakt RNA.

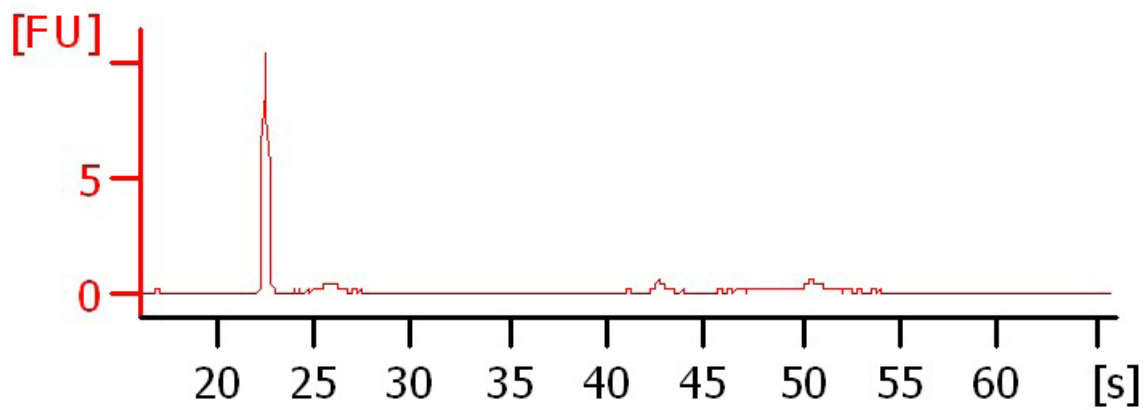
7.3. Kontroll av miRNA isolert fra exosomer



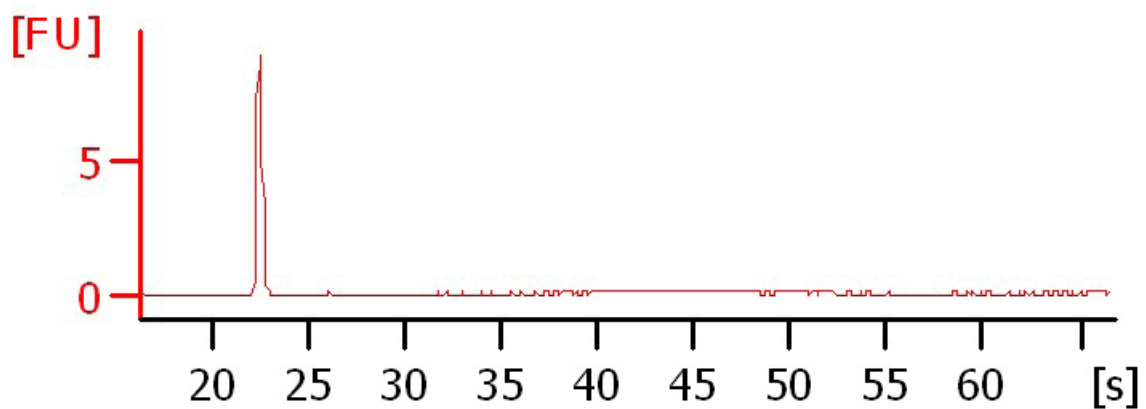
Figur 7.7. Elektroforese-diagram av miRNA isolert fra MCF 7-exosomer, som har blitt analysert med en Small RNA Chip på Agilent 2100 Bioanalyser.



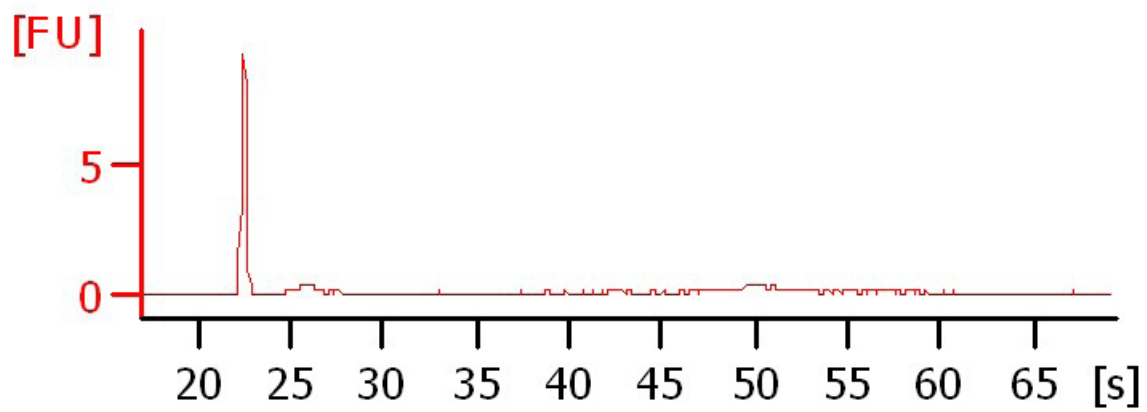
Figur 7.8. Elektroforese-diagram av miRNA isolert fra AU 565-exosomer, som har blitt analysert med en Small RNA Chip på Agilent 2100 Bioanalyser



Figur 7.9. Elektroforese-diagram av miRNA isolert fra HCC 1569-exosomer, som har blitt analysert med en Small RNA Chip på Agilent 2100 Bioanalyser.



Figur 7.10. Elektroforese-diagram av miRNA isolert fra Hs 578 T-exosomer, som har blitt analysert med en Small RNA Chip på Agilent 2100 Bioanalyser.



Figur 7.11. Elektroforese-diagram av miRNA isolert fra MDA-MB 231-exosomer, som har blitt analysert med en Small RNA Chip på Agilent 2100 Bioanalyser.