



Universitetet
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

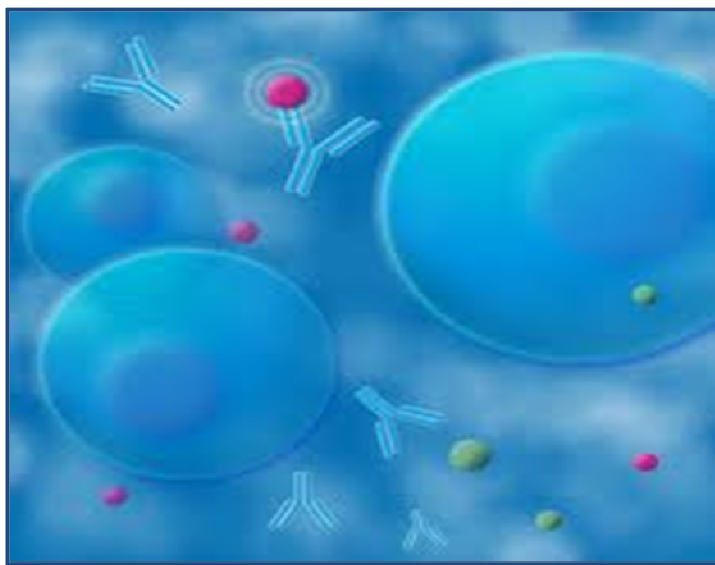
MASTEROPPGAVE

Studieprogram/spesialisering: Biologisk Kjemi	Vår.semesteret, 2012..... Åpen / Konfidensiell
Forfatter: Anne Elin Varhaugvik (signatur forfatter)
Fagansvarlig: Peter Ruoff Veileder(e): Emiel Janssen og Jan P.A. Baak	
Tittel på masteroppgaven: Prognostiske biomarkører i endometrioid endometrial karsinogenese Engelsk tittel:	
Studiepoeng:	
Emneord: Endometriekreft PAX2 COX2 PTEN Immunhistokjemi Real-Time PCR	Sidetall: 52 + vedlegg/annet: 2..... Stavanger 15.06.12

Prognostiske biomarkører i endometrioid endometrial karsinogenese

Anne Elin Varhaugvik

Masteravhandling: Biologisk Kjemi



Institutt for matematikk og naturvitenskap

Våren 2012

Forord

Denne masteroppgaven er en del av min mastergradsstudie ved Universitetet i Stavanger. Studiet bygger på en bachelorgrad i molekylærbiologi, biokjemi eller tilsvarende emner. Oppgaven tilsvarer en arbeidsmengde på 60 studiepoeng og er utarbeidet ved Avd. for Patologi, Stavanger Universitetssykehus, i perioden august 2011 - mai 2012.

Jeg vil takke prof. dr. med. Jan P.A. Baak ved Avd. for Patologi, Seksjon for kvantitativ og molekylær patologi, som har vært min veileder. Han har sammen med overlege Kjell H. Kjellevold tilrettelagt for at det er mulig å drive med forskning på Avd. for Patologi. Min faglige veileder i arbeidet med denne oppgaven har vært Emiel A..M. Janssen. Jeg er svært takknemlig for all hjelpen jeg har fått gjennom hele prosessen med å finne en interessant problemstilling og for god veiledning underveis. Og ikke minst de mange motiverende og gode samtalene.

Jeg vil også takke Ivar Skaland ved Seksjon for Immunhistokjemi for hans hjelp med å utføre de immunhistokjemiske analysene. Hans gode innsikt i denne type analyser og hans kompetanse er uvurderlig for vårt laboratorium. Jeg vil også rette en takk til ledelsen ved Avd. for Patologi, Kjell Kjellevold og Siri Robberstad, som har innvilget de permisjonene som har vært nødvendige for å gjennomføre dette studiet. En takk til Bianca van Diermen og Melinda Lillesand som har tatt over mine arbeidsoppgaver under arbeidet med oppgaven, samt Kjetil Knudsen som har hjulpet meg med de praktiske oppgavene i den molekylære delen.

Til slutt vil jeg takke min kjære samboer Thommy Holmvåg for den gode støtten. Jeg er utrolig takknemlig for at du hele tiden har vært så motiverende og positiv til mine studier. Også en stor takk til mine foreldre, Anne Irene og Harald Johan Varhaugvik, som alltid har trodd på meg og motivert meg til å stå på.

Stavanger, juni 2012

Anne Elin Varhaugvik

Sammendrag

I den vestlige verden er endometriekreft den vanligste gynekologiske kreftformen og forekomsten er økende. Det er også den fjerde hyppigste kreftformen hos kvinner i Norge. De fleste kvinner som rammes av endometriekreft er over 60 år, og risikoen øker med alderen. I dag oppdages sykdommen tidligere enn før hos mange kvinner og det gir gode muligheter for helbredelse, men også økt risiko for overbehandling av kvinner uten risiko for utvikling av kreft. Utviklingen av endometrial karsinogenese er en komplisert og innviklet prosess der mange ulike faktorer, regulatorer og mekanismer spiller en rolle. Gjennom forskning har forståelsen for denne utviklingen blitt bedre, men enda er det mange ting vi ikke forstår eller vet.

Målet med studien er å finne hvilken rolle PAX2, COX2 og PTEN, og flere microRNAs (mir-183, 200C, 10B, 223, 205, 505, 29a, let7a, 101, 152) har i utviklingen av endometrial karsinogenese. Om disse kan brukes som biomarkør for å forutsi prognose og om proteinnivået av COX2, PAX2 og PTEN kan bli forklart ut fra en korrelasjon mellom mRNA, microRNA og protein nivået. Derfor ble det gjort immunhistokjemiske analyser og mRNA analyser ved rtPCR for disse PAX2/COX2/PTEN. Det ble brukt RNA fra formalinfiksert parafininnstøpt vev fra pasienter med endometrie hyperplasi. Immunhistokjemiske snitt fra pasient prøver med proliferativt endometrie og endometrie hyperplasi ble scoret på to ulike måter for å bestemme protein nivået, samt at det ble gjort immunhistokjemi på TMA snitt fra 183 pasienter med endometriekreft.

Det ble funnet at PAX2 inaktivering er en tidlig hendelse, og at PAX2 H-score kan brukes som biomarkør for å forutsi prognose av pasienter med endometrie hyperplasi, men at disse resultatene trenger å bli validert før denne metoden kan brukes til rutinediagnostikk. Scoringsmetoden for PAX2 trenger å bli forbedret, dette siden reproduserbarhet ennå ikke er optimal.

Ordforklaringer/forkortelser

BMI	Body Mass Index
BRH	Benign Reaktiv Hyperplasias
COX2	Cytochrome c oxidase subunit II
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
EIN	Endometrial intraepitelial neoplasi
FIGO	The International Federation of Gynaecologists
GLP	Good Laboratory Practice
IHC	Immunhistokjemi
PAX2	Paired box gene 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTEN	Fosfatase and Tensin homolog
RASSF1A	Ras association domain family 1 isoform A
RNA	RiboNucleic Acid
TMA	Tissue micro arrays
VPS	Volume Percentage Stroma
WHO	Verdens Helse Organisasjon

Innhold

Forord	iii
Sammendrag	iv
Ordforklaringer/forkortelser	v
1. Innledning	1
2. Problemstilling og hensikt med oppgaven	3
3. Bakgrunn	4
3.1. Endometriekreft	4
3.2. Endometrial kreftutvikling	6
3.3. Epidemiologi og klassifikasjoner	7
3.4. WHO klassifisering	7
3.5. EIN klassifisering og D score	8
3.6. Biomarkører	12
3.6.1. DNA-markører	12
3.6.2. Protein biomarkører	13
3.7. PTEN - Fosfatase and tensin homolog	13
3.8. PAX2	15
3.9. COX2 - cytochrome c oxidase subunit II	16
3.10. RNA	17
3.11. Vevsmikromatriser	19
3.12. Immunhistokjemi (IHC)	20
3.13. Primere	21
3.14. Real-time PCR	22
4. Materiale og metoder	24
4.1. Studiepopulasjon	24
4.2. Immunhistokjemi for PTEN, COX2 og PAX2	24
4.3. Kvantitative analyser av immunhistokjemi	25
4.4. Optimalisering av Primere	26
4.5. Isolering av RNA og kvantitativ Real-Time PCR (qPCR) for formalin fiksert vev.	27
4.6. cDNA-syntese	28
4.7. microRNA analyser	28
4.8. Statistisk analyse	29
5. Resultater	30
6. Diskusjon	33
Referanser	36

Vedleggsliste:

Vedlegg 1

Protokoll for isolering av total RNA ;

High Pure FFPE RNA Micro Kit

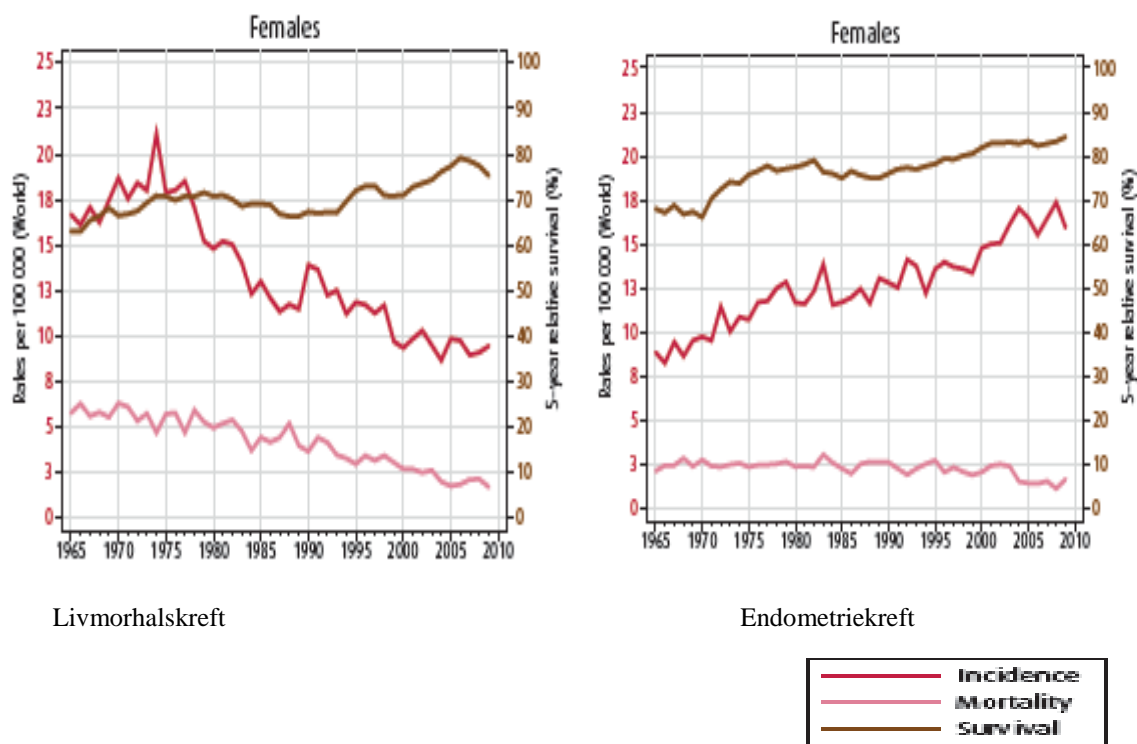
Vedlegg 2

Protokoll for tillaging av cDNA;

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol

1. Innledning

I den vestlige verden er endometriekreft den vanligste gynekologiske kreftformen og forekomsten er økende. I Norge har den aldersjusterte forekomsten av endometriekreft mer enn doblet seg i løpet av de siste femti årene (fra 6.8 per 100 000 i 1958 til 16.4 i 2009). Det er også den fjerde hyppigste kreftformen hos kvinner i Norge. Det totale antallet av krefttilfeller av endometriekreft i Norge i 2009 var på 696, og fem års relativ overlevelse var 83,5 % [1]. Vi ser en økning i forekomsten av endometriekreft i de senere år, mens forekomsten av livmorhalskreft har gått ned (figur 1).



Figur 1: Oversikt over innsidens, mortalitet og overlevelse fra 1965 – 2010 for livmorhalskreft og endometriekreft i Norge.

De fleste kvinner som rammes av endometriekreft er over 60 år, og risikoen øker med alderen. I dag oppdages sykdommen tidligere enn før hos mange kvinner og det gir gode muligheter for helbredelse men også økt risiko for overbehandling av kvinner uten risiko for utvikling av kreft. En langvarig påvirkning av det kvinnelige kjønnshormonet østrogen kan øke risikoen for endometriekreft. På tross av denne påvirkningen får mange kvinner i dag moderne østrogenbehandling mot plager i overgangsalderen. Denne behandlingen gis i kombinasjon

med hormonet progesteron. Progesteron motvirker østrogen og beskytter slimhinnen i endometrie mot kreftutvikling. Faktorer som høyt blodtrykk, diabetes, sen overgangsalder og få eller ingen barnefødsler, kan gi økt risiko for endometriekreft. Livsstil som for eksempel dårlig kosthold, fedme, vektøkning og mangel på fysisk aktivitet er også knyttet til endometriekreft [2-5].

Det er i flere studier rapportert en økt risiko for å utvikle endometriekreft med økende kroppsvekt eller body mass index (BMI) [4, 6]. Omtrent 60 % av forekomsten av endometriekreft skyldes fedme, og overvektige kvinner som er diagnostisert med endometriekreft har seks ganger så stor risiko for å dø av sykdommen enn ikke-overvektige kvinner [7, 8]. Leptin, er en sentral aktør i regulering av energibalanse og av kontroll av kroppsvekten, men kan også fungere som en vekstfaktor i visse organer ved både normal og ved sykdomstilstander. Hyperleptinemia (et forhøyet leptin nivå i serum) er et felles trekk ved overvektige kvinner.

Leptin induisert funksjonell aktivering av COX-2 er JAK2/STAT3-, MAPK/ERK-, og PI3K/AKT avhengig, og induserer celleproliferasjon i endometriekreft celler. Noe som indikerer at COX-2 kan være en kritisk faktor i kreftutvikling i endometrie [9].

PAX2 tilhører en familie av sammenkoblede boks gener som er involvert i transkripsjonsregulering under embryogenese. Genet kan aktiveres ved hjelp av østrogen og tamoxifen i endometriale kreftceller, mens det ikke blir aktivert i normalt endometriet, noe som impliserer at PAX2 er en nøkkel regulator i kreftutvikling av endometriet.

PTEN tumorsuppressor genet er det hyppigst inaktiverte genet i premaligne og maligne lesjoner i endometrioid endometriekreft. Ved bruk av immunhistokjemi er PTEN protein ofte vist som inaktivert i norske endometrioid endometriekreft prøver, men mutasjoner har nesten aldri blir funnet (upublisert data fra vårt laboratorium). Dette kan tyde på at PTEN proteinaktivering er forårsaket av epigenetiske mekanismer. Hypermetylering er en plausibel og mulig mekanisme, en annen mulig mekanismen er nedtrykk av PTEN mRNA på grunn av microRNA binding. For eksempel har det blitt vist at miR183 og miR200c kan regulere direkte.

2. Problemstilling og hensikt med oppgaven

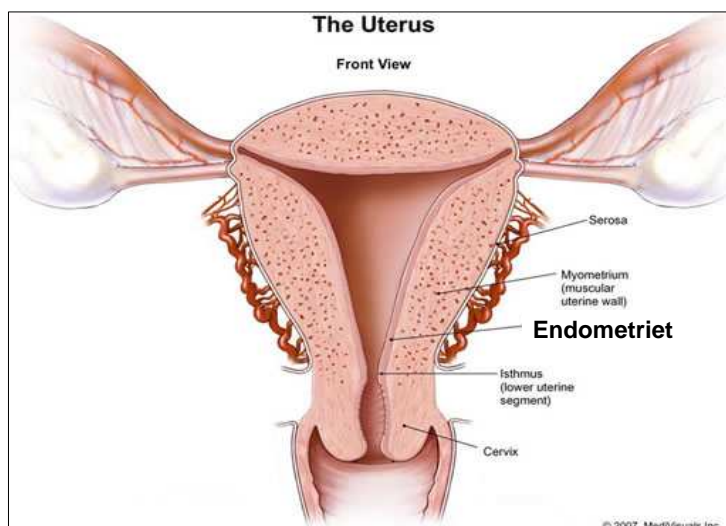
I denne studien ønsket vi å undersøke:

1. Hvilken rolle PAX-2, COX-2 og PTEN, og flere microRNAs (mir-183, 200C, 10B, 223, 205, 505, 29a, let7a, 101, 152) har i utviklingen av endometrial karsinogenese?
2. Kan PAX2, COX2 og PTEN protein- eller mRNA ekspresjons brukes som biomarkør for å forutsi prognose av en pasient med endometrie hyperplasi eller endometriekreft?
3. Kan proteinnivået av COX2/PAX2 og PTEN bli forklart ut fra en korrelasjon mellom mRNA, microRNA og protein nivå?

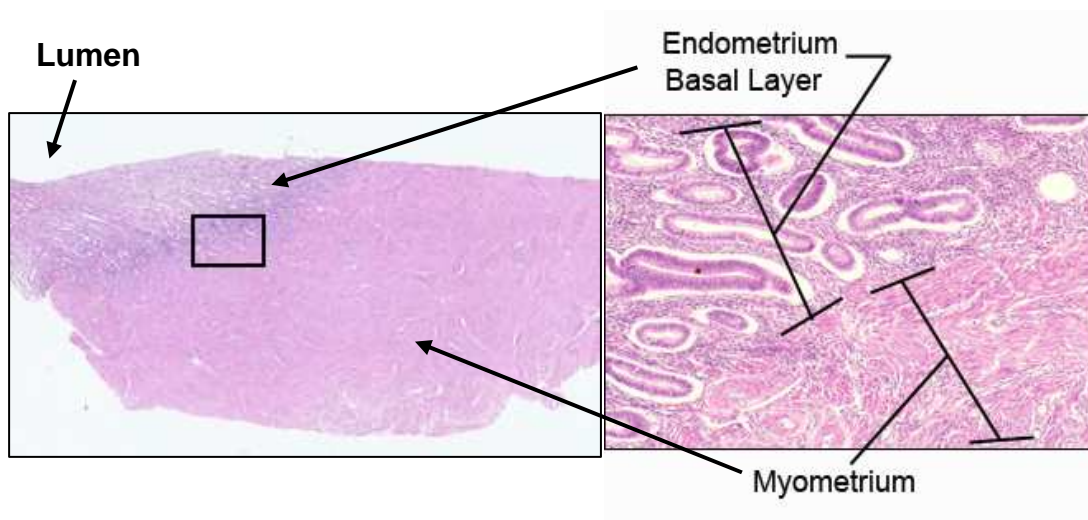
3. Bakgrunn

3.1. Endometriekreft

Kreftformen endometriekreft dannes i slimhinnen i livmorhulen, endometrie. Det store flertallet av endometriekreft er av typen adenokarsinom. Denne kreftformen oppstår i celler som produserer og utsondrer slim og andre væsker. I 1982 presenterte Bokhman en dualistisk modell av endometrie tumorgenese som var basert på klinisk observasjon og klinisk-patologisk korrelasjon [10]. I denne dualistiske modellen følger kreftformene ulike biologiske mekanismer, der de er delt inn i type 1, endometrioid kreft, og type 2, ikke - endometrioid kreft.



Figur 2: Oversikt over uterus. Endometrie er innerste lag med epiteliale celler.



Bilde 1: Histologisk oversikt av uterusveggen.

Type 1 endometriekreft utvikles fra normal til proliferativt endometrium via endometrie hyperplasi til invasiv karsinom. Denne kreftformen omfatter ca 80 % av alle nydiagnostisert endometriekreft. Type 2 kreft oppstår ofte fra atrofisk endometrie i eldre kvinner og oppfører seg mye mer aggressivt. Utvikling fra normalt til malignitet kan ta rundt 30-40 år og prosessen følger en trinnvis oppbygning av endringer i cellulære regulatoriske veier som fører til uhensiktsmessig cellevekst [11]. Endometrioid endometrial kreft er vanligvis diagnostisert på et tidlig stadium, FIGO (The International Federation of Gynaecologists) stadium 1 og 2, der kreften fortsatt er begrenset til corpus uteri og dermed er muligheten for helbredelse høy. Likevel ser vi at en av tre kvinner dør av sykdommen selv om kreften er diagnostisert på et tidlig stadium [12].

Siste revisjon av graderingssystemet er FIGO2009;

FIGO 2009 Kirurgisk Graderings System for Karsinom i endometriet	
IA	Tumor begrenset til endometrie, ingen eller $< \frac{1}{2}$ myometriets spredning
IB	Tumor begrenset til endometrie, $> \frac{1}{2}$ myometriets spredning
II	Cervikal stromal spredning, men ikke utover endometrie
IIIA	Tumor invaderer den serøse hinnen eller adnexa omgivelser
IIIB	Vaginal og / eller parametrial spredning
IIIC1	Spredning til bekken lymfeknuter
IIIC2	Spredning til para-aorta
IVA	Tumorspredning til blære og / eller tarmslimhinner
IVB	Fjernmetastaser inkludert abdominal metastaser og / eller i lyske lymfeknuter

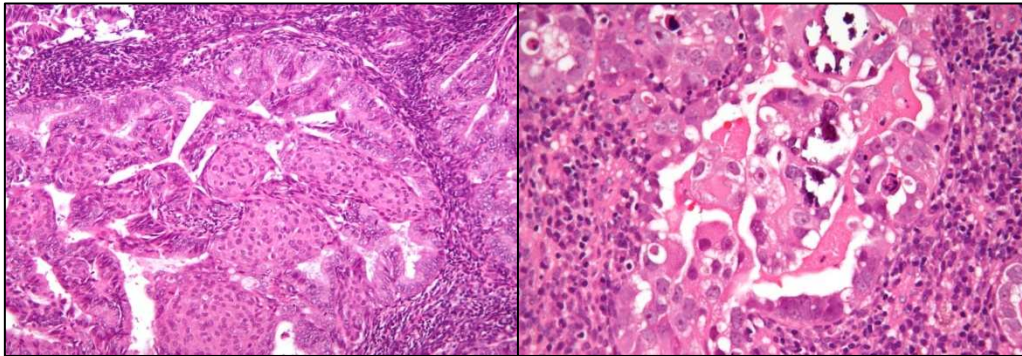
Tabell 1: FIGO 2009 Kirurgisk Graderings System for karsinom i endometrie.

Dødsfallsraten for endometriekreft i FIGO stadium 2-4 er høy (20-80 % og høyere). Selv om sykdommen nå blir oppdaget mye hyppigere ved et "gunstig" tidlig stadium (FIGO stadium 1-2) er dødeligheten fremdeles 5-15 % [13, 14] og i flere tiår har dette vært stabilt [15, 16]. I tillegg til FIGO graderingssystemet brukes i dag histologisk grad for å bestemme individuell terapi. Dette har gjentatte ganger vist seg å være av prognostisk betydning [17, 18], men disse vurderingene av grad er subjektive og den prognostiske nøyaktigheten og reproduserbarheten er ikke alltid optimal [14, 15, 19]. Likevel reflekterer histologisk grad ikke nødvendigvis den biologisk atferden til kreft [20].

3.2. Endometrial kreftutvikling

Vogelstein og medarbeidere introduserte en molekylær modell for utvikling av ondartede svulster som baserte seg på utviklingen av kolorektal adenom til karsinom [21]. I følge denne teorien, utvikler ondartede svulster seg gjennom en rekke forløperlesjoner med cellulær atypi og arkitektoniske forandringer, der man støter på uttrykkene dysplasi, karsinom in situ, intraepitelial neoplasi og atypisk hyperplasi, avhengig av det aktuelle organ. Utviklingsprosessen av svulsten blir etterfulgt av en trinnvis ervervelse av ulike epigenetiske endringer.

Til tross for den høye frekvensen av endometrioid (= type 1) endometriekreft, er ikke de molekylære endringene som bidrar til utvikling og progresjon fullt ut forstått. De fleste studier på endometrie karsinogenese konsentrerer seg om de genetiske endringer og forskjeller mellom type 1 og 2 kreft. Det er få studier vedrørende onkogenesen fra proliferativ endometrium hos unge kvinner, til fullverdig type 1 endometriekreft. Ofte er de basert på et lite antall pasienter. Som ved de fleste epitheliale maligniteter, er endometriekreft resultatet av en opphoping av ulike genetiske og epigenetiske endringer i gener som regulerer blant annet vekst av celler.



Bilde 2: Histologiske bilder av endometriekreft. Type 1, endometrioid adenocarcinoma (til venstre) og type 2 papillær serøs adenokarsinom (til høyre).

Et normalt premenopausalt endometrium er preget av et syklisk mønster av proliferative og sekretoriske faser, som blant annet blir kontrollert av steroidhormoner i ovariet, der det øvre cellelaget blir avstøtt ved hver menstruasjon. Dette systemet blir forstyrret under endometrie hyperplasi og kreft hvor endometriet blir ufullstendig avstøtt og genetiske endringer forblir i cellene i basallagen [22]

3.3. Epidemiologi og klassifikasjoner

Endometrie hyperplasi er en histologisk diagnose som er preget av spredning av endometrie kjertler som gir en større kjertel-til-stroma ratio enn det som er observert i normalt endometrium[23]. Det er en utbredt sykdom med 5-10 % sjanse for kreft progresjon. Det er anslått til å være minst 200.000 nye tilfeller per år i den vestlige verden, og rundt 3000-5000 tilfeller i Norge [24].

3.4. WHO klassifisering

Det har blitt foreslått mange forskjellige klassifikasjonssystemer for endometrie hyperplasi, men først i 1994 aksepterte Verdens Helse Organisasjon et klassifiseringssystem for endometrie hyperplasier med 4 kategorier (WHO94). Dette systemet var basert på en studie (!) med bare 170 tilfeller [25] som hadde sammenfallende tilstedeværelse av to kriterier; kjerne atypi og kjertel kompleksitet.

De fire kategorier i klassifikasjonssystemet for endometrie hyperplasi er enkel hyperplasi (SH), kompleks hyperplasi (CH), enkel atypisk hyperplasi (SAH), og kompleks atypisk hyperplasi (CAH). Disse varierer i sin progresjonsrisiko med henholdsvis 1%, 3%, 8% og 29% [25]. Tabellen nedenfor viser antall tilfeller som er involvert for hver kategori. Selv om progresjonsrisikoen ser imponerende ut, er den kun basert på 13 krefttilfeller, og i tre av fire underkategorier er det bare ett tilfelle.

	Cancer progression	Number of patients	Number of Progression cases
Simple hyperplasia	1%	93	1
Complex hyperplasia	3%	29	1
Simple atypical hyperplasia	8%	13	1
Complex atypical hyperplasia	29%	35	10

Tabell 2: Den statistiske grunnlaget for den WHO94 klassifiseringssystem (Kurman et al 1985).

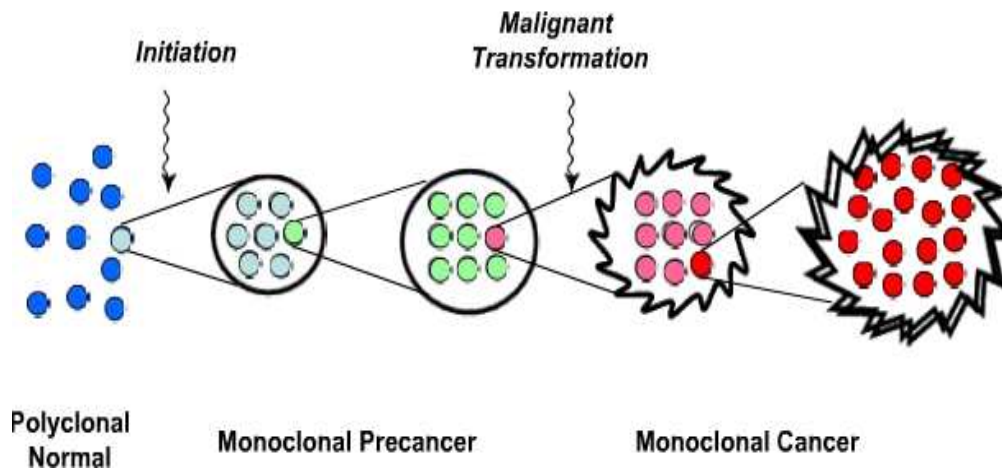
WHO94 klassifiseringssystemet var en forbedring fra de tidligere nomenklaturene, siden dette systemet korrelerte til kliniske utfall, men det statistiske grunnlaget er ytterst svakt. En annen svakhet med WHO94 klassifiseringssystemet for endometrie hyperplasi er at det er subjektivt og at det fokuserer på cytologisk atypi. Dette histologisk trekket har i flere nyere studier vist seg å være dårlig reproducerbart [26-30]. I tillegg korrelerer WHO94 dårlig med molekylær biologiske funksjoner [31].

I praksis betydde innføringen av WHO94 at alle kvinner med en kompleks hyperplasi eller mer alvorlig stadium ble behandlet med en hysterektomi. Ut fra tabell 2 kan man lese at bruk av WHO94 har ført til en enorm overbehandling, siden bare 16% (12/77) av pasienter med en kompleks hyperplasi eller mer utvikler kreft.

3.5. EIN klassifisering og D score

Morfometriske tilnærminger til endometrie hyperplasi ble utforsket på slutten av 1970 og i begynnelsen av 1980-tallet [32-35]. Morfometriske funksjoner er godt reproducerbare, noe som står i kontrast til de subjektive mikroskopiske kriterier. I senere tid har morfometrisk prognostisk D-score blitt utviklet ved hjelp av endometriekreft som endepunkt [36]. Helt fra starten av har D-score blitt utviklet som en prognostisk test for å forutsi fremtiden og eventuell progresjon til kreft. Denne prognostiske testen hadde ikke til hensikt å etterligne de subjektive diagnostiske klassene i WHO94 klassifikasjonssystemet. Funksjonene til D-score bygger på en arkitektonisk (volum prosent stroma, og ytre overflate tetthet av kjertler) og cytologisk (standardavvik av korteste kjerne aksel) natur [36].

Uavhengige valideringsstudier av GLP fase 3 og 4 i USA [37], Nederland [38] og Norge [39], bekrefter at D-score har prognostisk verdi. D-score har blitt implementert som en rutinemessig diagnostisk og terapeutisk patologitest i en rekke laboratorier i Nederland, Norge og USA [40]. Omtrent på samme tid som D-score ble publisert, ble molekylære tester anvendt på endometrie hyperplasier av Mutter et al. i Boston. Ved å bruke genetiske klonalitetstester, viste han at de fleste hyperplasier er polyklonale, men at noen ble monoklonale. Endometrie hyperplasier viser karakteristiske genetiske endringer som er bevart i påfølgende kreft [31, 41-43]. Disse funnene stemmer overens med de erfaringer som er gjort i flere epiteliale systemer, og at godartede monoklonale premaligne lesjoner er utsatt for malign transformasjon.



Figur 3: Klonal ekspansjon og multistep kreftutvikling. (G.L.Mutter; www.endometrium.org)

Verdensledende gynekologiske patologer vurderte en sammenligning av molekylærgenetisk klonalitet og D-score. Denne sammenligningen viste at D-score korrelerte mye sterkere til klonalitet enn WHO94 diagnoser, og at D-score var mye bedre reproducerbart enn WHO94 [37, 44]. Nesten alle tilfeller med D-score > 1 (eller VPS > 55%) er polyklonale, mens mange (men ikke alle) tilfeller med D-score < 1 (eller VPS < 55%) er monoklonale. Innen 2000 var det klart at de genetiske og morfometriske tilnærmingene har identifisert en overlappende gruppe endometriale lesjoner som kan utvikle seg til kreft.

Den nyeste versjonen av WHO- klassifikasjonen (WHO2003) [45] bekrefter bruken av WHO94, men erkjenner sine mangler. Den nye klassifikasjonen introduserer alternative molekylær genetiske og morfometrisk-baserte Endometrie Intraepetelial Neoplasi (EIN) klassifiseringen [46]. Det er ingen tvil om at det for tiden er D-score som er den sterkeste prognostiske faktoren for endometrie hyperplasi, men det er ikke alle patologiske laboratorier som har morfometrisk utstyr tilgjengelig. Derfor forsøkte Mutter et al. å "etterligne" D-score ved å ta flere av de grunnleggende elementene fra D-score som har resultert i EIN klassifiseringen.

Denne klassifiseringen kan en nå utføre ved hjelp av et vanlig standard lysmikroskop. Opprinnelig er EIN klassifiseringen foreslått av det International Endometrial Collaborative Group [26], og den beskriver tre sykdomskategorier:

1. Benign Reaktiv Hyperplasi (BRH).

Dette er en hormonavhengig, diffus lesjon som er polyklonale.

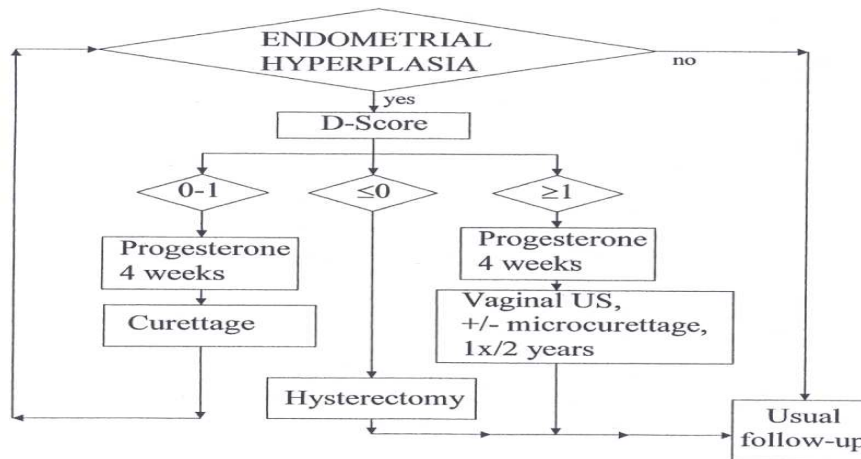
2. Endometrial intraepitelial neoplasi (EIN).

EIN er ved oppstart en lokalisert "klonal" spredning. Det er monoklonalt og neoplastisk. Med avanserte stadium, kan det bli mer diffuse lesjoner.

3. Kreft.

EIN er en klinisk relevant diagnose som er ment å føre til direkte behandling. Den prognostiske verdien av EIN ligger i kombinasjonen av at det er lett å måle morfometriske funksjoner som kan brukes til å beregne D-score. Dette gjøres i et vanlig Haematoxylin & Eosin snitt. EIN kan identifiseres ved subjektiv vurdering av standard H&E fargede histologiske snitt [44].

Denne type subjektive vurderinger er rimelig godt reproducerbare [47], men vurderingen av D-score er imidlertid mye bedre reproducerbar [44]. På grunn av dette har hyperplasi med en D-score <1 blitt re-definert som morfometrisk EIN [24]. Dette er virkelige neoplastiske monoklonale lesjoner, og det er bare et tidsspørsmål før mange vil utvikle seg til kreft, dersom de forblir ubehandlet. "Hyperplasi" lesjoner med en D-score > 1 som ikke er neoplastiske, polyklonale ikke-regressive og som er østrogen-induserte. Disse lesjonene bør anses som ufarlige og behandles deretter med for eksempel progesteron/progestin. Den prognostiske verdien av D-score overgår WHO2003 sin prognostiske verdi kraftig. Dette ble bekreftet i en fersk meta-analyse av 674 endometrie hyperplasier med 10-15 års oppfølging (hasardratio: D-score=45, WHO2003=7) [24].



Figur 4: Behandlingskjemaet for pasienter med endometriet hyperplasi.

Type 1 endometrial kreft følger den østrogen-relaterte veien. Det virker som de oppstår i bakgrunnen av uhindret østrogenstimulering, siden de er forbundet med endometriale hyperplasier, har østrogen (ER) og progesteron (PR) ekspresjon, samt de er forbundet med forhøyede nivåer av østradiol i serum. Den viktigste årsaken til hyperestrogenisme er endogen overproduksjon av østrogener på grunn av fedme, og ved anovulerende sykluser under perimenopause og overgangsalder. I tillegg er østrogenet uhindret grunnet mangelen på progestin ved redusert ovarial produksjon.

Type 2 endometrial kreft følger den ikke-relaterte østrogen veien, og det virker som de oppstår i bakgrunnen av atrofisk endometrie. Denne krefttypen forekommer vanligvis ved en høyere alder, ca 5-10 år senere enn ved type 1 endometriekreft. ER og PR ekspresjonen for type 2 endometrial kreft er som oftest negativt eller svakt positivt, og nivået av østradiol i serum er ikke forhøyet.

Den hyppigste genetiske endringer ved endometriekreft er PTEN inaktivering grunnet mutasjoner, etterfulgt av microsatelitt instabilitet og mutasjoner av K-ras og β -catenin. PTEN, K-ras mutasjoner og microsatelitt instabilitet er ansett som tidlige hendelser som oppstår i en undergruppe av atypisk endometrie hyperplasi og føre til type 1 endometriekreft. Mens p53 mutasjoner er ansett som en sen hendelse som skjer under progresjon av omtrent 10-20% av endometriekreft, de fleste av disse type 2. Den molekylære patogenesen av endometriekreft er fortsatt relativt dårlig forstått, men det er i dag vel etablert at type 1 og type 2 endometrial kreft følger distinkte genetiske veier.

De prognostiske studiene som er gjort på biomarkører i endometrial karsinogenese er ofte preget av en blanding av de forskjellige sub-typene (type 1 og 2 sammen, plus alle FIGO stadier til sammen) av endometrial kreft, men også av lave pasienttall

3.6. Biomarkører

Kunnskapen om kreft på det molekylære nivået har det siste tiåret økt sterk etter en betydelig forbedring av måten menneskelige svulster er karakterisert på.

Biomarkører ble først definert på denne måten;

"Cellulær biokjemiske eller molekylære endringer som er målbare i biologisk media som humant vev, celler eller væsker".

I dag inkluderer denne definisjonen også biologiske egenskaper og prosesser. Disse kan bli objektivt målt og vurdert som en indikator på normale biologiske prosesser, eller som en farmakologisk respons på den terapeutiske intervensjonen. Kort forklart er biomarkører praktiske verktøy og teknologier som kan gi oss målbar informasjon om prediksjon, årsak, diagnose og regresjon, men også utfallet av behandling av sykdom. På grunn av dette kan man undersøke om de sier noe om prognose for overlevelse, sjansene for å danne metastaser og valg av behandlingsform ved å koble informasjonen om biomarkører opp mot klinisk data. En **prognostisk** biomarkør spår utfallet av pasienten ved tidspunktet av diagnose uansett terapien, mens en **prediktiv** markør vil gi informasjon om hvor mye resultat man kan forvente av en terapi.

3.6.1. DNA-markører

Biomarkører kan også kategoriseres etter en målt analytt, for eksempel DNA, RNA, proteiner eller metabolitter. DNA-baserte markører kan representere blant annet mutasjoner, aneuploidy, tap av heterozygositet eller mikrosatellitt ustabilitet, DNA metylering, viral DNA eller genamplifisering.

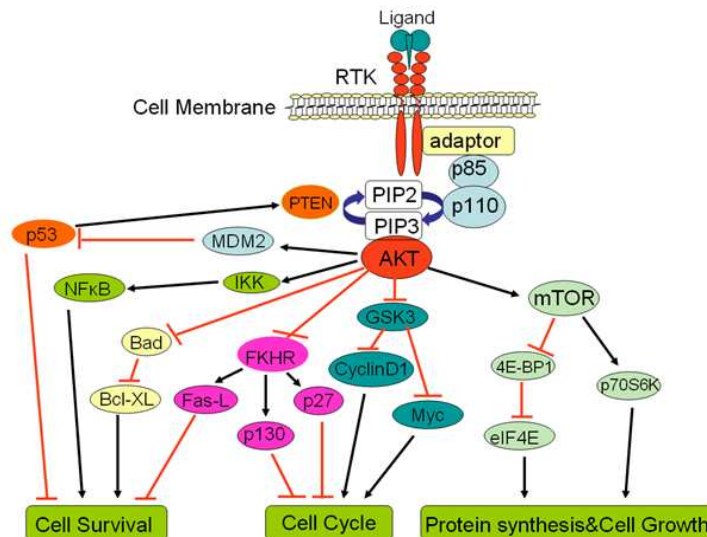
3.6.2. Protein biomarkører

De to store klassene av muterte gener som bidrar til kreftutvikling er onkogener og tumorsuppressor gener. Disse genene er ikke bare muterte, men har også store forandringer på grunn av metylering eller microRNA nivået. Disse muterte genene kan påvirke den normale syklusen i cellene ved å forstyrre de fire fasene i cellyklusen; G1, S, G2 og M. For at celleveksten kan øke kreves det en forbedring av de positive faktorene og en utarming av de negative faktorene. Når et onkogen er mutert, blir proteinproduktene til onkogenet produsert i store kvanta eller de har en økt aktivitet. Proteiner som spiller en rolle i både det å hemme vekst og i tumordannelse blir kodet av tumorsuppressor gener. Protein biomarkører kan påvises både i serum og i vevsprøver.

I kreft i andre typer organer, er molekylære biomarkører sterke prediktorer for klinisk progresjon av kreftsykdommen, og stadig nye molekylære biomarkører er innført som prognostiske faktorer. For endometriekreft er mange molekylære faktorer som DNA Ploidy, Microsatellitt instabilitet (MSI) og morfometriske funksjoner lovende, men resultatene er sprikende og ikke-konkluderende for de fleste biomarkørene.

3.7. PTEN - Fosfatase and tensin homolog

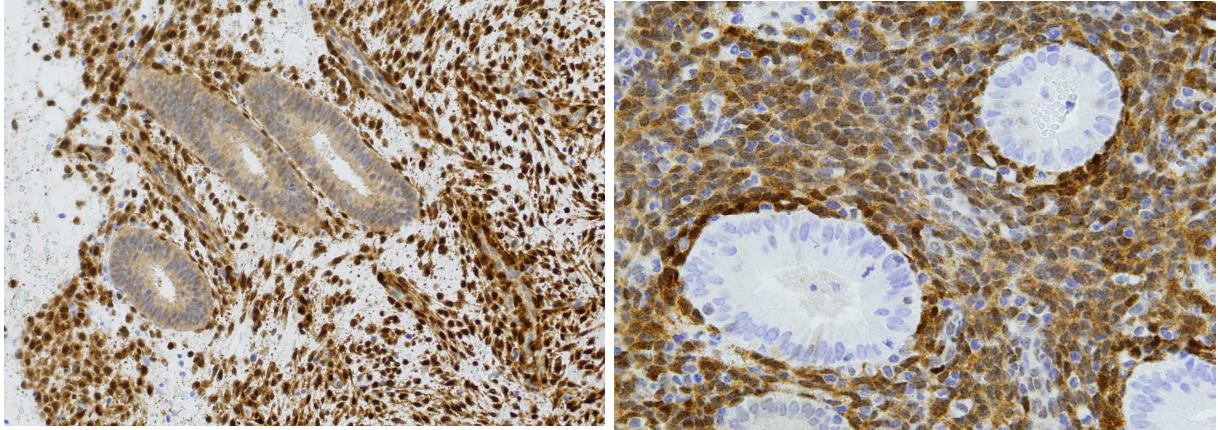
PTEN tumorsuppressor genet er det hyppigst inaktiverte genet i premaligne og maligne lesjoner i endometrioid (type1) endometriekreft [43, 48]. Funksjonell inaktivering av PTEN resulterer i økt spredning og er forenlig med endometrie hyperplasi og kreft som har blitt bekreftet i knockout mus [49]. Ved at PTEN undertrykker phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-AKT-mTOR signalvei, styrer PTEN veldig mange cellulære prosesser. Dette inkluderer overlevelse, spredning/proliferasjon, energi metabolisme og cellulær arkitektur. I kreft er derfor mange av mekanismer som styrer PTEN uttrykket og funksjoner endret. Disse mekanismene inkluderer transkripsjonsregulering, post-transkripsjonsregulering av **ikke** kodende RNA, post-translasjonelle modifikasjoner og protein-protein interaksjonen [50].



Figur 5: AKT er sentral i flere viktig prosesser; nedtrykk av PTEN vil fører til en forhøyet aktivitet av AKT og dermed av proliferasjon, cellevekst og overlevelse.

Nylig har det monoklonale antistoffet 6h2.1 blitt brukt til rutine immunhistokjemisk evaluering av PTEN aktiviteten. Dette bekrefter at opp til 83% av endometrioid type er endometrial kreft og 63% av alle EIN lesjoner, er PTEN negative [48]. Et problem med PTEN er at det er normalt uttrykt i proliferative endometriale kjertler og stroma, men uttrykk avtar i normalsekretorisk syklus, noe som resulterer i variabelt proteinuttrykk [51].

Mikrosatellitt instabilitet spiller også en beskjeden, ekstra prognostisk rolle for P21 og Survivin i FIGO - 1 endometriekreft [52, 53]. Videre har amerikanske studier vist at PTEN ofte er mutert [54]. Ved bruk av immunhistokjemi er PTEN protein ofte vist som inaktivert i norske endometrioid endometriekreft prøver, men mutasjoner har nesten aldri blir funnet (upublisert data fra vårt laboratorium). Dette kan tyde på at PTEN proteinaktivering er forårsaket av epigenetiske mekanismer. Hypermetylering er en plausibel og mulig mekanisme, og det er interessant og viktig hvis dette også kan forklare inaktivering av P21, P27 og andre proteiner. Videre er det viktig å få vite om det er en relasjon mellom slike eventuelle suppressor gen, hypermetyleringer og leptin reseptorer. I så fall kan det gi en molekylær cellebiologisk forklaring på endringer i kosthold og livsstil i Norge, og den økte forekomsten av endometriekreft.

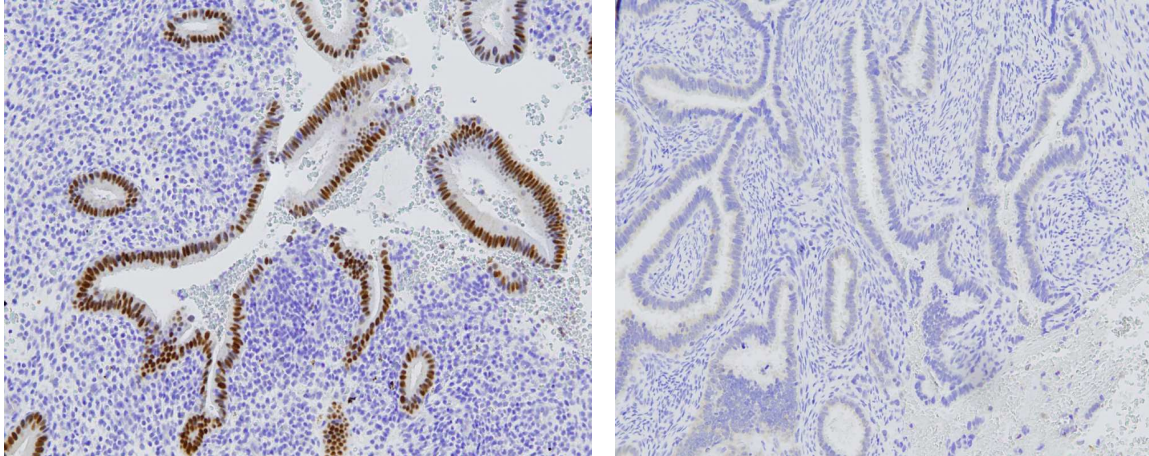


Bilde 3: Eksempler på kjertler positive for PTEN til venstre og kjertler negativ for PTEN til høyre.

3.8. PAX2

Det er vist at både normalt proliferativt og normalt sekretorisk endometrie generelt har et sterkt proteinuttrykk av PAX2 (ved hjelp av IHC), mens hyperplasi har et varierende uttrykk. Komplekse og atypiske hyperplasier, og karsinomer har større sannsynlighet for å ha et fullstendig tap av PAX2 uttrykk ved bruk av immunhistokjemi. Tap av PAX2 synes å forekomme tidlig i utviklingen av endometriale forstadier. Dette kan vise seg nyttig i enkelte tilfeller der en diagnostisk markør kan brukes for å skille normalt endometriet fra komplekse og atypiske hyperplasier, og karsinomer av lav-grad. Komplet tap av PAX2 proteinuttrykk er økende med økende alvorlighetsgrad av hyperplasia. Et delvis tap av PAX2 uttrykk oppstår i normalt endometrium, men i mindre grad av vevet og noe sjeldnere enn i enkel hyperplasi.

En av fordelene med PAX2 er at proteinuttrykket sjeldent er borte i både normal proliferativt og sekretorisk endometrium, slik som proteinuttrykk til PTEN kan være. PTEN er uttrykt både cytoplasmisk, nukleær og i stromale celler. Sammenligner man proteinuttrykket til PTEN og PAX2, er det lettere å vurdere proteinuttrykket til PAX2 på grunn av den tydelige kjernefarging.



Bilde 4: Eksempler på kjertler positive for PAX2 til venstre og kjertler negativ for PAX2 til høyre.

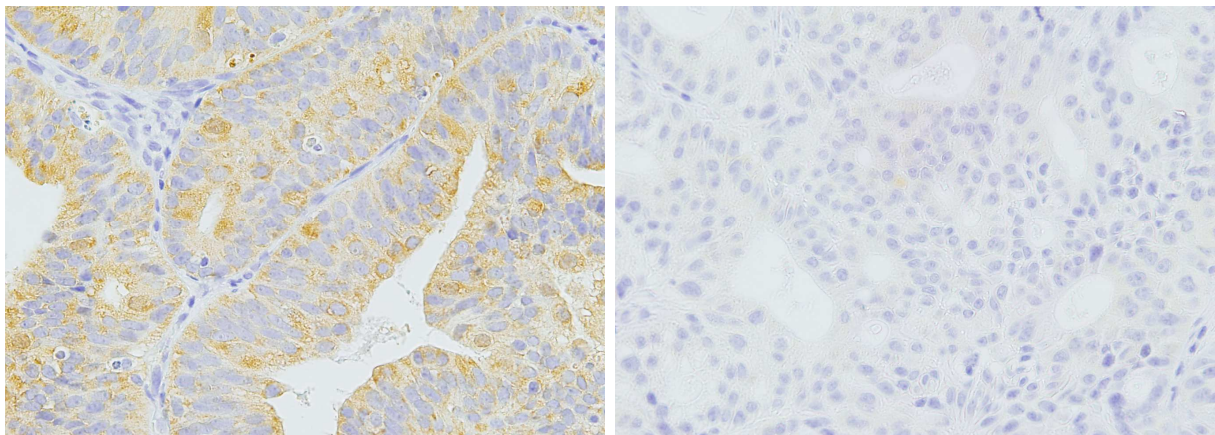
3.9. COX2 - cytochrome c oxidase subunit II

Steinbakk et. al gjorde en av de mest omfattende studie der det immunhistokjemiske proteinuttrykket av flere biomarkører ble analysert i endometrie hyperplasier. Disse ble korrelert med klinisk utfall (progresjon til kreft i løpet av oppfølgingsperioden). Resultatet av denne studien viser at den morfometrisk prognostiske D-score og COX2 har selvstendig ekstra prognostisk verdi som overskygger andre funksjoner som blant annet 2003 WHO og EIN klassifikasjonene. COX2 negativitet er assosiert med høy kreft progresjon risiko. Disse resultatene kan synes å være kontroversielle i forhold til teorien om at den biologiske rollen til COX2 som en sen faktor i endometrie karinogenesisen. COX2 har flere roller, og de mekanismene og samspillet mellom disse mekanismene er stort sett ukjent.

Det som er interessant er at Lu og Broaddus [55] har i en stor serie av endometrioid endometriekreft funnet COX2 metylering i den ene halvdel. Dette innebærer vanligvis et redusert genuttrykk og som antyder at COX2 overuttrykk ikke er en viktig mekanisme i de endometroide svulster. De fleste studier på endometriekreft har funnet tilsvarende høyt ekspresjonsmønster av COX2 (60-92% positivitet).

Leptin-indusert funksjonell aktivering av COX-2 er JAK2/STAT3-, MAPK/ERK-, og PI3K/AKT avhengig, og induserer celleproliferasjon i endometriekreft celler, noe som indikerer at COX-2 kan være en kritisk faktor i kreftutvikling i endometrie [9]. Hyppig inntak av høy glykemisk mat kan også være viktig, siden det er forbundet med regelmessig høyt insulin og insulinvekstfaktor topper (som kan bli forverret ved insulinresistens). Siden mange

av kroppens celler inneholder insulin reseptorer som kan stimulere spredning, kan det tenkes at et vestlig kosthold gir opphav til kontinuerlig hyperstimulering av for eksempel endometrialeceller. Det er nylig blitt rapportert at nye bærere av en polymorfisme i insulin reseptoren substrat-2 (IRS-2)-genet (assosiert med insulinresistens, fedme og type 2 diabetes) har en 4.87 ganger høyere risiko for å utvikle endometriekreft [56]. Disse dataene samlet antyder at dietter som rike på høy glykemiske karbohydrater og en livsstil med lite fysisk trening er relatert til endometriekreft og at dette forhold kan effektueres av leptin, insulin og insulinvekstfaktorer.



Bilde 5: Eksempler på kjertler positiv for COX2 til venstre og kjertler negativ for COX2 til høyre

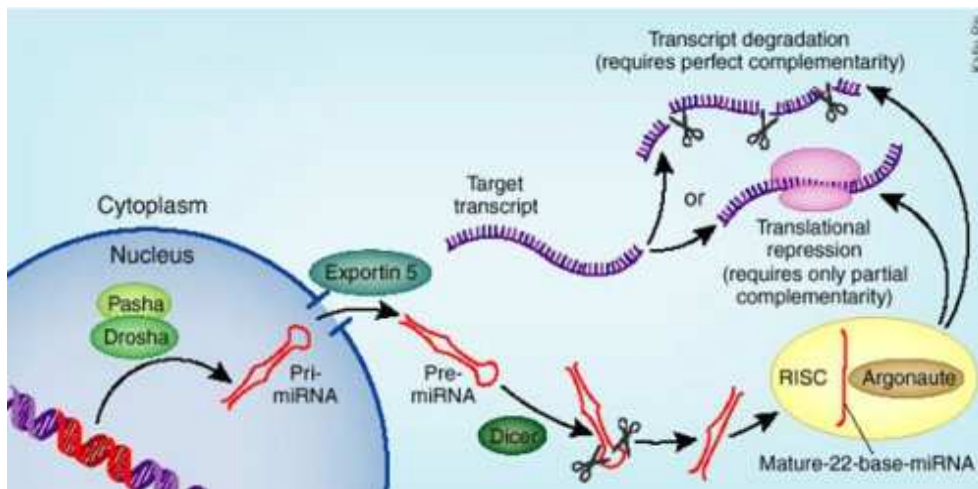
3.10. RNA

RNA (ribonukleinsyre) er molekyler som er satt sammen av fire ribonukleinsyrer [adenin](#) (A), [cytosin](#) (C), [guanin](#) (G) og [uracil](#) (U). RNAet er en kopi av [DNAet](#) som brukes til å lage proteiner av aminosyrer etter DNAets oppskrift. Når et gen uttrykkes lager enzymet RNA polymerase en kopi av informasjonen i genet i form av messengerRNA (mRNA). I mRNA er alle introner fjernet fra DNAet. Translasjonen av mRNA foregår på ribosomene og er selve syntesen av proteiner.

Et av de siste og mest overraskende fremskritt i vår forståelse av de grunnleggende mekanismene i genreguleringen, har vært oppdagelsen av microRNA (miRNAs). Siden de ble oppdaget i 1993 [57], har det vært en økning og nylig en flom av studier som beskriver deres betydning i den cellulære fysiologien og patologien. MicroRNAs er **ikke** kodende, korte enkelt trådet (18-22 nukleotider) RNA molekyler, som har en rolle i å regulere mengden av

protein fra kodene RNA ved å påvirke deres stabilitet og translasjons effektiviteten av mål mRNA. De har blitt tatt med i en økende rekke biologiske prosesser, herunder neoplasi. Nyere studier viser at disse regulatoriske molekylene er involvert i utviklingen av endometriekreft.

De er post-transkripsjonale regulatorer som binder seg til komplementære sekvenser på mål messenger RNA molekyler (mRNA), som vanligvis resulterer i translasjons undertrykkelse eller molekyldegradering og stans på protein ekspresjon av målgenet. Til nå har man klart å identifisere over 1000 forskjellige microRNA molekyler og teoretisk kan disse binde seg til 60% av alle mulige mRNA molekyler. Forholdene mellom mRNA og microRNA er komplekse, siden et microRNA kan påvirke ekspresjon av forskjellige mRNA molekyler mens forskjellige microRNA molekyler kan påvirke det samme mRNAet. MicroRNA molekyler er veldig stabile og det er rikelig av disse molekylene i mange menneskelige celletyper. MicroRNA er derimot veldig vevsspesifikke og er trolig involvert i de fleste biologiske prosesser ved at de påvirker genreguleringen.



Figur 6: Forenklet bilde av hvordan microRNA blir laget og eksportert til cytoplasma hvor den kan binde seg til et mål mRNA molekyl [58].

Nylig beskrev Cohn et al. en mikroRNA profileringsstudie hvor de konkluderte med at forskning på miRNA, i et tidlig stadiet av endometriekreft, virker veldig lovende [59]. De demonstrert miRNAs evne til å identifisere en kreft fenotype, forutsi overlevelse, og evne til identifisere kjente endret gene i endometriekreft. Videre beskriver de to microRNA molekyler (mir-183 og mir-200C) som regulerer PTEN direkte [60]

3.11. Vevsmikromatriser

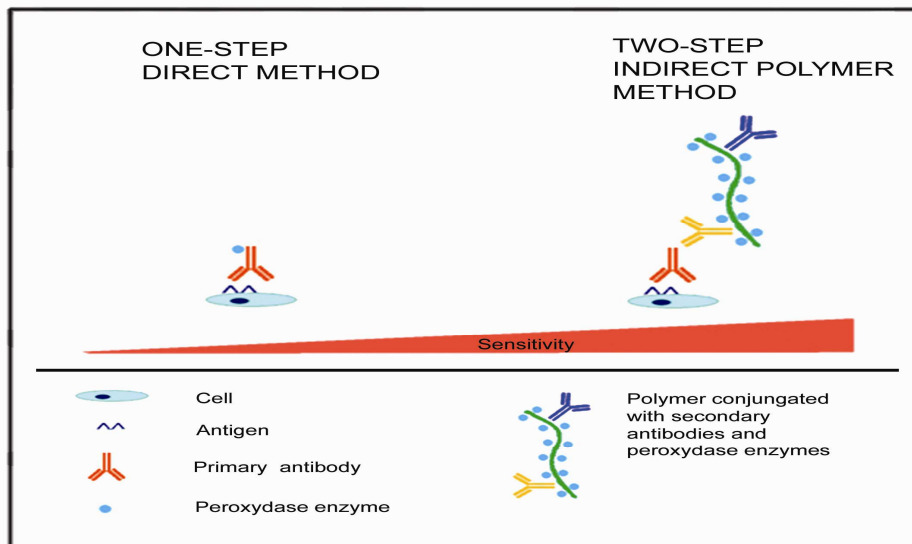
Tissue micro array eller vevsmikromatriser er parafinblokker som inneholder vevsylinderer fra mange forskjellige pasientprøver. Instrumentet som brukes er et enkelt laboratorieinstrument. En bruker to tynnveggede, skarpe, hule nåler til å stanse ut en parafinsylinder fra en tom parafinblokk (mottakerblokk), og en vevsylinder fra en pasientprøve med parafininnstøpt vev (donorblokk). Diameteren på nålene bestemmer hvor stor vevsylinderen som stanes ut skal være. Den kan variere fra 0.6mm - 2.0mm. Nålen som brukes for å stanse ut vevsylinderen har litt større diameter enn nålen som stanser ut parafinsylinderen. På denne måten vil en sikre at vevsylinderer vil være tett omsluttet av parafin når den plasseres i hullet i mottakerblokken. Ved hjelp av to mikrometerskruer på nåleholderen, kan nålene beveges i X-Y retning med eksakt presisjon. På denne måten blir vevsylinderen plassert på sirlige, rette linjer, og de ferdige TMA-snittene kan screenes hurtig og systematisk.

Denne teknikken gir mulighet for å analysere opptil hundre vevsprøver i ett enkelt snitt. Analyser på TMA-snitt kan utføres på både DNA, RNA og protein nivå. Dette kan være både *in situ* hybridisering og immunohistokjemi. Det arkiverte, formalinfikserte parafininnstøpte vevet som er brukt til å stille diagnostiske konklusjoner er et svært verdigfullt og finnes i begrenset mengde. Uttak av en vevsylinder fra en parafinblokk er en skånsom måte å ta ut materiale på, og det gir minimalt med ødeleggelse på det resterende vevet rundt [61].

På et enkelt snitt er det derfor mulig å utføre immunhistokjemi på et stort antall prøver fra tumorvevet. På denne måten kan en teste ut og optimalisere nye antistoffer, prober og protokoller. Det oppnås en hurtig evaluering av analysen fordi den utføres på flere vevsprøver på ett snitt. Man sparer også kostnader til reagenser og antistoffer. Siden alle vevsprøvene behandles og farges under samme betingelser vil det være små variasjoner i resultatene [62-64]. Flere studier konkluderer med at det er en god korrelasjon mellom bruken av TMA og hele snitt. TMA er godt egnet som screening metode ved analysing av et stort antall tumorer [61, 65, 66].

3.12. Immunhistokjemi (IHC)

Immunhistokjemi har fått navnet sitt fra ordet "immun" som refererer til de antistoffer som brukes og "HISTO" som betyr vev. De refererer til den prosessen der proteiner oppdages i cellene i vevs snitt ved å utnytte prinsippet om at antistoffer binder seg spesifikt til antigener i biologisk vev. Ved å vise nøyaktig hvor et gitt protein ligger innenfor det vevet en undersøker, har denne metoden en enorm fordel. Helt siden 1980-tallet har det blitt utviklet immunhistokjemiske algoritmer som gir en mer nøyaktig tumor diagnose i tillegg til den morfologiske analysen. Man kan oppnå en visualisering av en antistoff-antigen interaksjon ved å benytte flere ulike direkte og indirekte metoder. Den mest anvendte metoden nå er en høy sensitiv, to trinns peroxidase markert polymer metode, der ett høyt antall peroxidase enzymer katalyserer nedslag av DAB substrat på steder der antigenet befinner seg.



Figur 7: Direkte (til venstre) og indirekte (til høyre) metoden for immunhistokjemi

Immunhistokjemi kan være en teknisk komplisert analyse. Alle trinn i den prosessen en vevsprøve går gjennom er viktige for utfallet av undersøkelsen. Fikseringstiden i formalin bør være minst 24 timer for små preparater og 48 timer for store preparater. En ufullstendig fiksering fører til at cellene krymper. Dette gjør det vanskelig for parafinene å trenge inn i cellene og erstatte vann, alkohol og xylen under framføringsprosessen. Forsinket fiksering medfører autolyse av vevet som gjør det vanskelig å trekke konklusjoner ved bedømming av fargereaksjonen på de immunhistokjemiske snittene.

For å unngå at snittene løsner helt eller delvis ved oppvarming under antigen retrieval prosessen er det en fordel å benytte objektglass dekket med silan. Det er viktig at snittene som er snittet ikke lagres ved romtemperatur i mer enn noen få uker. De vil etter hvert miste en del antigener, og det gjelder spesielt kjerne antigener som for eksempel østrogen reseptor. Snittene bør fryses ned dersom de skal lagre over lengre tid. Parafininnstøpt vev kan oppbevares ved romtemperatur uten å tape antigenisitet. Det er også viktig å ikke bruke for tykke snitt til immunhistokjemi analyser. Det kan føre til uspesifikk farging og en risiko for at vevsbiter løsner fra objektglasset under immunhistokjemi prosessen.

Ved å bruke monoklonale antistoff kan en oppnå høy sensitivitet, og spesifisiteten kan forbedres med en god rensemetode. Polyklonale antistoff gir høy sensitivitet men ikke alltid like god spesifisitet.

3.13. Primere

En primer er en kort sekvens på 20-30 nukleotider, og de er konstruert spesielt for å gjenkjenne en sekvens i eller rundt et ønsket målgen/målområde. Et primer-par kan være designet for et spesifikt DNA/RNA område i en spesifikk art eller den kan være spesifikk for en gruppe proteiner/gener. De kan også være spesifikke for arter med et DNA område hvor felles egenskaper er lokalisert.

Et primer-par består av to nukleotidsekvenser spesifikt mot DNA/cDNA/mRNA/mikroRNA tråd i 5`-3` retning ("Forward-Primer"), og det andre er designet for den motsatte, komplementære DNA tråden i 3`-5` retning ("Reverse-Primer"). Når disse er konstruert riktig, vil de danne et "amplikon" i PCR prosessen. Størrelse på amplikonet er avhengig av hvor stor avstand det er mellom bindingsstedene til den "forward" og den "reverse" primeren. Det er viktig at amplikon størrelsen ikke blir for lang, for da kreves lengre tid og høyere temperatur i hver syklus under PCR prosessen. Dette er spesielt viktig i real-Time PCR og det er anbefalt at amplikon størrelsen er mindre enn 100-300 bp.

Utvalget av primere er svært viktig og man bør ta hensyn til spesifisiteten av sekvensene, smeltetemperaturen, prosent andel Guanin og Cytosin nukleotider og selvhybridiserings muligheten.

3.14. Real-time PCR

Tidlig på 1980 tallet ble PCR teknikken utviklet og har hatt stor betydning for forskning og bioteknologi i de senere år [67]. Uten PCR-teknikken hadde ikke kartleggingen av det humane genom og andre organismer vært mulig. Teknikken har revolusjonert diagnostikken innenfor blant annen rettsmedisin, kreftmedisin, farmasøytisk industri og fylogeni. Målet med PCR er å kopiere en bit av en gen sekvens i tilstrekkelig mange kopier, slik at deteksjon er mulig. Teknikken er svært sensitiv, og har den fordelen at den ikke er avhengig av et fenotypisk uttrykk som ofte kan variere innen samme individ og art.

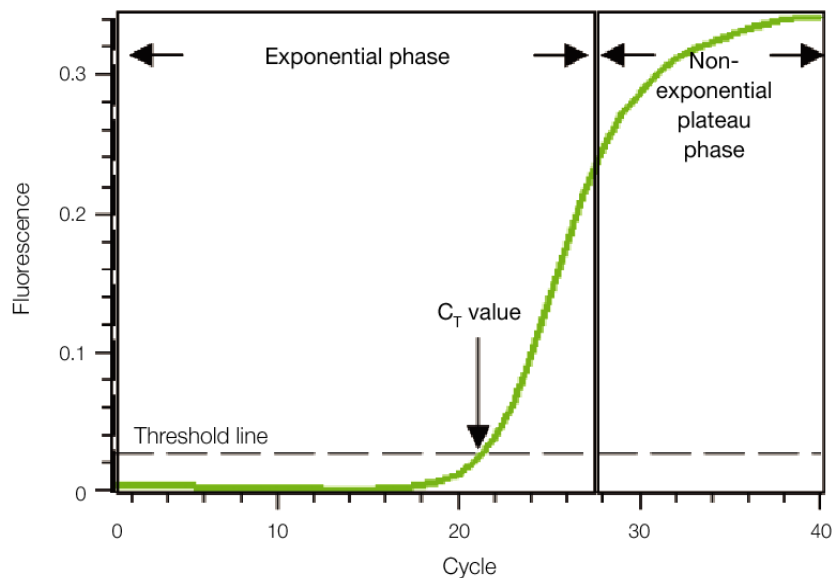
Kort forklart er prinsippet for en tre-trinns konvensjonell PCR:

- Trinn 1. Oppvarming til 93-98 °C (denaturering). Dobbeltrådet DNA splittes til to enkeltråder.
- Trinn 2. Avkjøling til vanligvis 45–65 °C (hybridisering). To egendesignede enkeltrådet oligonukleotider, primere (ca. 20 basepar), hybridiserer til hver sin DNA tråd (templat) i hver ende av målgenet. Oligonukleotidene er komplementære til sekvensen de hybridiserer til.
- Trinn 3. Oppvarming til 72 °C (polymerisering), som er DNA polymerases optimale temperatur. DNA polymerase forlenger primerens 3` ende ved å koble sammen de fire basenukleotidene (Adenin, Tymin, Cystin og Guanin) i riktig rekkefølge slik at kopien blir komplementær til templatet. Adenin er komplementær til Tymin, og Cystin komplementær til Guanin. I RNA blir Tymin erstattet med Uracil.

Hver syklus (trinn 1-3) gjentas ca. 20- 40 ganger og flere hundre millioner kopier vil tilslutt være i løsningen. Kopieringen av DNA ved PCR skjer eksponentielt, og fra hvert templat blir det dannet to kopier, som i sin tur er opphavet til to nye, og så videre [68]. Amplifiseringen (kopieringen) foregår i såkalte mikro-rør eller brønner i spesielle maskiner (termosyklere) der temperaturen justeres automatisk etter det programmet som er valgt av brukeren.

Real-time PCR er en modifisert metode av konvensjonell PCR som gir flere anvendelsesområder. Den viktigste forskjellen mellom konvensjonell og modifisert metode er at Real-time PCR muliggjør kvantifisering av DNA kopier i utgangsmateriale. Ved Real-time PCR kan man direkte følge med på amplifiseringen av mål DNA/cDNA/RNA (amplikon).

Figur 8 viser en amplifikasjonskurve fra en klassisk real-time PCR kjøring. Kurven viser antall PCR-sykler på x-aksen og fluorescensintensitet fra amplifikasjonen på y-aksen. Fluorescensintensiteten er proporsjonal med antall ny amplifiserte amplikonkopier i prøverøret. Amplifikasjonsplottet viser to faser, en eksponentiell fase og en ikke eksponentiell fase, ofte kalt platå fase. I løpet av den eksponentielle fasen doubles mengden amplikon for hver syklus. Etter hvert som reaksjonen pågår, forbrukes komponentene (for eksempel DNA polymerase eller primere) og dermed blir en eller flere av dem en begrensende faktor. Reaksjonshastigheten vil falle når dette skjer og gå over i en platåfase (syklus 28-40 i Figur 8). Fluorescenssignalet, ved de første syklusene (syklus 1-18 i Figur 8), vil være på nivå med bakgrunnsignalet (negativ kontroll), selv om det også her skjer en eksponentiell økning av amplikon. Mengden amplikon må overstige en terskel, Threshold Line, for at fluorescens kan detekteres. Brytningspunktet for amplifikasjonskurven og Threshold Line kalles Threshold Cycle (CT), og blir angitt i syklusnummer [64].



Figur 8: Amplifikasjonsplott for en positiv prøve med Real-time PCR.

Syklusnummerene til reaksjonen er vist på x-aksen, og fluorescensintensiteten på y-aksen (grønn kurve). Figuren er hentet fra BioRad [69].

4. Materiale og metoder

4.1. Studiepopulasjon

Testpersonene i studien er hentet fra en database med **5494** pasienter som har en eller to histologiske prøve(r) fra endometrie. Studien er et retrospektivt og populasjonsbasert arbeid som inkluderer proliferativt endometrie, endometrie hyperplasi og endometriekreft prøver. Disse prøvene er fra pasienter som alle har vært pasienter ved Stavanger Universitetssykehus mellom 1977-2004. Alt pasientmateriale ved avdeling for patologi er kategorisert i en database (Sympathy), og alle prøver som er tatt siden 1975 er inkludert i dette kodesystemet. Fram til 1987 ble SNOP systemet brukt (Systematized NOmenclature of Pathology), mens alle prøvene som er arkivert etter dette har blitt kodet i henhold til SNOMED systemet (Systematized NOmenclature of MEDicine).

Materialet er formalinfiksert og parafininnstøpt, og parafinblokkene er lagret ved 10-15°C. Fra arkivet ble det hentet frem parafinblokker ved å bruke pasientdatabasen for Avd. for Patologi, SUS (Sympathy). Disse ble brukt til utvinning av total RNA og til å lage snitt til immunhistokjemi. Etisk Komité, Helse Vest, Datatilsynet og Helsedirektoratet hadde på forhånd godkjent bruk av pasientmaterialet til studien (REK nummer 2010/2664). Totalt har vi brukt fullsnitt av kvinner med 75 proliferativt endometrie, 36 pasienter med endometrie hyperplasi. TMA blokker som ble laget inneholder 237 endometriekreft tilfelle. For RNA-isolering brukte vi fullsnitt fra 65 tilfelle med endometrie hyperplasi.

4.2. Immunhistokjemi for PTEN, COX2 og PAX2

Parafinsnitt med en tykkelse på 4 µm ble festet til ett glass dekket med Silan (S3002, Dako, Glostrup, Danmark) og tørket over natt ved 37°C og deretter en time ved 60°C. Snittene ble avparafinisert i xylene og rehydrert i en gradert serie med alkoholløsninger. Gjenvinning av antigener ble utført ved 120°C og et trykk av 1.9 bar i 10 mmol/L TRIS/1 mmol/L EDTA (pH 9.0) i 2 minutter under fullt trykk, før det ble avkjølt i 15 minutter for PTEN og PAX2. For COX2 ble Dako Target Retrieval Solution S1699 brukt med samme temperatur og trykk. Alle antistoffer ble uttestet i forkant av studien og alle snittene ble farget sammen for samme antistoffet.

Immunhistokjemi ble utført ved bruk av en automatisert fargemaskin (Dako). Tris-bufferet saltvann (S1968) 0,05% Tween 20 (pH 7.6) ble brukt som skyllebuffer. Endogent peroksidase aktivitet ble blokkert med peroksidase blokkerings reagens S2001 (Dako) i 10 minutter og inkubert for 30 minutter med de aktuelle antistoffene; PTEN monoklonalt antistoff, 1:300 (clone 6h2.1, Cascade Biosciences, Winchester, Mass), PAX2 antistoff, 1:200 (clone kanin polyklonal, cat. No 71-6000 fra Invitrogen, Camarillo, California), COX2 antistoff, 1:400 (clone 4h12, Novocastra Laboratories, Ltd). Alle antistoffer ble fortynnet i DAKO fortynningsmiddel. Immunkompleksene ble visualisert ved hjelp av Peroxidase/DAB ChemMate Envision Kit, Dako) og inkubert Envision/HRP rabbit anti-mus sekundær antistoffet i 30 minutter og deretter med DAB-chromogen i 10 minutter. Snittene ble så farget med hematoxylin som kontrast farging, dehydrerte og monterte.

Hel snitt ble brukt for analysering av PAX2/COX2 og PTEN i både proliferativt endometrie og endometrie hyperplasier. TMA ble brukt for å analysere PAX2 og PTEN i alle krefttilfelle.

4.3. Kvantitative analyser av immunhistokjemi

Kvantitativ analyse av det immunhistokjemiske uttrykket ble gjort i et avmerket område på hvert enkelt snitt. Området er markert av en kvalifisert patolog som valgte området med den mest høygradige delen av lesjonen. Alle snitt tilhørende en pasient ble analysert i samme avmerkede område for alle immunfargingene. Det ble gjort en semikvantitative vurdering av de immunhistokjemiske snittene. Det ble utført av to personer uavhengig av hverandre. Resultatene ble sammenlignet og der hvor det ikke var samsvar ble det gjort en ny vurdering ved bruk av stereomikroskop og diskusjon i fellesskap.

PTEN og COX2 ble evaluerte som enten positive eller negative. Ved å bruke stromalt PTEN farging som positiv kontroll, ble PTEN uttrykket i kjertler klassifisert som positivt der PTEN ble uttrykt og negativt der PTEN ikke ga uttrykk av farge i kjertlene (helt blå kjertler, se bilde 4). Snitt som inneholdt en eller flere PTEN-null kjertler ble scoret som negative selv om det lå flere kjertler med PTEN uttrykk i samme område.

Videre ble fargingsintensitet ble gradert som 0 (negativ), 1 (svakt positiv), 2 (positivt), eller 3 (sterkt positiv) for PAX2, for hver fargingsintensitet ble det i tillegg vurdert prosentandel av den intensiteten i det markerte område. Fra disse vurderingene, ble en H-score beregnet som

prosentandel av en fargingsintensitet ganger fargeintensiteten. Derfor varierer H-score poengsummen fra 0-300 (fargingsintensitet 3 i 100% av alle celler i det markerte område)

4.4. Optimalisering av Primere

Primere ble valgt ved å undersøke egenskapene til et sekvensområdet ved å først sette opp et alignment i ClustalX. Dette gjorde vi for å se hvilke områder som kan være aktuelle. Det er viktig at primerne er spesifikke slik at de ikke gir opphav til uspesifikke bindinger.

Et BLAST søk i NCBI ble gjort for å undersøke at det utvalgte område ikke representerte intron-områder. Dette er områder som ikke vil bli uttrykt av mRNA. Dersom primerparet ligger på hver sitt exon (med intron imellom), kan det dannes to produkter. Amplicon fra mRNA blir da kortere enn ampliconen fra DNA strengen.

Siden primere kan binde flere steder er det viktig å unngå repeterende sekvenser siden dette kan gi opphav til flere produkter. Det ble også undersøkt om primerne i primer-paret ikke overlappet hverandre. Dette for å unngå komplementære sekvenser mellom primerne og/eller sekvensen ("loop-back"). Base rekken i sekvensene ble sjekket for å unngå like baser i rekke, og da spesielt med tanke på Guanin basene. Det valgte området bør ha en jevn sammensetning av de fire basene for å øke spesifisiteten, og unngå at den ene primeren binder bedre enn den andre. Dette for å unngå at primerne for eksempel har ulikt smeltepunkt. Da vil effektiviteten av den ene være bedre enn den andre avhengig av hvilken annealing temperatur som er satt for prosessen. Til slutt ble de siste 5 nukleotidene sjekket for antall av G-er eller C-er, fordi det er viktig at 3`enden ikke inneholder mer enn to G-er eller C-er.

Primerne ble konstruert i [Primer3](#) ved at den utvalgte sekvensen ble lagt inn, samt eventuelle spesifikasjoner (inkluderende, ekskluderende). Flere gode alternativer ble gitt, hvor de gitte kriterier var best mulig ivarettatt, og de som passet best ble valgt.

Primere	Sekvens (5' -> 3')	Lengde	Produkt størrelse
PAX2 forward	TATGTTTCGCCTGGGAGATTC	20	118
PAX2 reverse	GAAAGGCTGCTGAACTTTGG	20	
PTEN forward	CCCACACGACGGGAAGACAA	20	63
PTEN reverse	ACCACACACAGGTAACGGCTG	21	
COX2 forward	CGAGTACACCGACTACGGCGGA	22	83
COX2 reverse	GGAGTCGCAGGTCGCCTGGT	20	

Tabell 3: Primersekvensene og lengde for de tre utvalgte gener

Primere	Konsentrasjon	Produsentens temp. °C	Optimalisert temp. °C	GC innhold i %
PAX2 forward	10µM	57.3	54/56?	50
PAX2 reverse	10µM	57.3	54/56?	50
PTEN forward	10µM	61.4	61.5	60
PTEN reverse	10µM	61.8	61.5	57.1
COX2 forward	10µM	65.8	65.6	63.6
COX2 reverse	10µM	65.5	65.6	70

Tabell 4: Primerkonsentrasjon og primerhybridiseringstemperatur for de tre utvalgte gener. Alle PCR reaksjoner ble på forhånd optimalisert med hensyn til hybridiseringstemperatur for primerene, og med hensyn til primerkonsentrasjonen. Alle PCR produkter ble analysert på agarosegelen.

4.5. Isolering av RNA og kvantitativ Real-Time PCR (qPCR) for formalin fiksert vev.

Alle snittene ble evaluert av en erfaren patolog for å få vurdert andelen av tumorceller i hvert vev. Alle vev inneholdt minst 50% tumorceller i området valgt for RNA-isolering. Fem snitt på 10 µm av hver prøve ble snittet for RNA isolering. De 5 snittene ble lagt på hver sitt objektglass for å skrape av det valgte området i snittet. Materialet ble overført til et mikrorør og parafinn ble fjernet ved hjelp av xylen. Deretter ble cellene lysert ved hjelp av proteinase K

slik at celleinnholdet ble frigjort.. Total RNA ble isolert ved hjelp High Pure FFPE RNA Micro Purification Kit (Cat.NO. 04 823 125 001, Roche, Basel, Sveits) i henhold til protokollen fra produsenten (Se vedlegg 1). For kvalitetskontroll ble konsentrasjonen for alle prøvene analysert ved hjelp av et Nanodrop instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

4.6. cDNA-syntese

cDNA prøver ble laget av 40 ng total RNA ved hjelp av høy kapasitet cDNA RT Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, California), etter produsentens protokoll (Se vedlegg 2). To μL fortynnet cDNA (1:1,64) ble brukt sammen med QuantiTect Sybergreen PCR Kit (Qiagen,), til et endelig reaksjon volum på 20 μL . Real-time PCR kvantifisering ble utført med en Light Cycler 480 (Roche, Zürich, Sveits), der 10 mM av spesifikke primere for PAX2 (Forward primer; TATGTTTCGCCTGGGAGATTC, Reverse Primer; GAAAGGCTGCTGAACTTTGG), COX2 (Forward primer; CGAGTACACCGACTACGGCGGA, Reverse Primer; GGAGTCGCAGGTTCGCCTGGT) og PTEN (Forward primer; CCCACACGACGGGAAGACAA, Reverse Primer; ACCACACACAGGTAACGGCTG) ble brukt og fem mM av GAPDH spesifikke primere (forward primer: TCTTTTGCCTGCCAGCCGA, revers primer: CGACCAAATCCGTTGACTCCGACC) (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Tyskland).

Å bestemme det relative uttrykksnivået for hvert mål gen, ble den komparative Ct metoden brukt. Ct verdien av målgenet ble normalisert ved en endogen referanse ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{COX2/PAX2/PTEN}) - \text{Ct} (\text{GAPDH})$). Den relative uttrykk for hvert mål genet ble beregnet gjennom likningen $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

4.7. microRNA analyser

Følgende microRNAs skulle bli undersøkt på total RNA fra 32 pasienter med endometrie hyperplasi: miR-10b, miR-29c, miR-101, miR-183, miR-200c, miR-205, miR-223 og tre kontroll microRNAs U6 snRNA, miR-24, miR-26b. For cDNA syntese skulle vi bruke miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylering og cDNA syntese kit, ekspresjon av de utvalgte mikroRNA molekyler skulle måles med hjelp av semikvantitativ-rtPCR. Amplifisering skulle skje i en lightcycler480 med miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, SYBR Green master miks i en fast plate oppsett fra Exiqon.

	hsa-miR-10b	hsa-miR-29c	hsa-miR-101	hsa-miR-183	hsa-miR-200c	hsa-miR-205	hsa-miR-223	U6 snRNA	hsa-miR-24	hsa-miR-26b	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
	hsa-miR-10b	hsa-miR-29c	hsa-miR-101	hsa-miR-183	hsa-miR-200c	hsa-miR-205	hsa-miR-223	U6 snRNA	hsa-miR-24	hsa-miR-26b	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
	hsa-miR-10b	hsa-miR-29c	hsa-miR-101	hsa-miR-183	hsa-miR-200c	hsa-miR-205	hsa-miR-223	U6 snRNA	hsa-miR-24	hsa-miR-26b	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
	hsa-miR-10b	hsa-miR-29c	hsa-miR-101	hsa-miR-183	hsa-miR-200c	hsa-miR-205	hsa-miR-223	U6 snRNA	hsa-miR-24	hsa-miR-26b	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
	hsa-miR-10b	hsa-miR-29c	hsa-miR-101	hsa-miR-183	hsa-miR-200c	hsa-miR-205	hsa-miR-223	U6 snRNA	hsa-miR-24	hsa-miR-26b	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
	hsa-miR-10b	hsa-miR-29c	hsa-miR-101	hsa-miR-183	hsa-miR-200c	hsa-miR-205	hsa-miR-223	U6 snRNA	hsa-miR-24	hsa-miR-26b	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
	hsa-miR-10b	hsa-miR-29c	hsa-miR-101	hsa-miR-183	hsa-miR-200c	hsa-miR-205	hsa-miR-223	U6 snRNA	hsa-miR-24	hsa-miR-26b	UniSp6 CP	UniSp3 IPC
	hsa-miR-10b	hsa-miR-29c	hsa-miR-101	hsa-miR-183	hsa-miR-200c	hsa-miR-205	hsa-miR-223	U6 snRNA	hsa-miR-24	hsa-miR-26b	UniSp6 CP	UniSp3 IPC

Tabell 5: Eksempel på plate oppsett for micorRNA analyse av 32 RNA prøver fra pasienter med endometrie hyperplasi.

4.8. Statistisk analyse

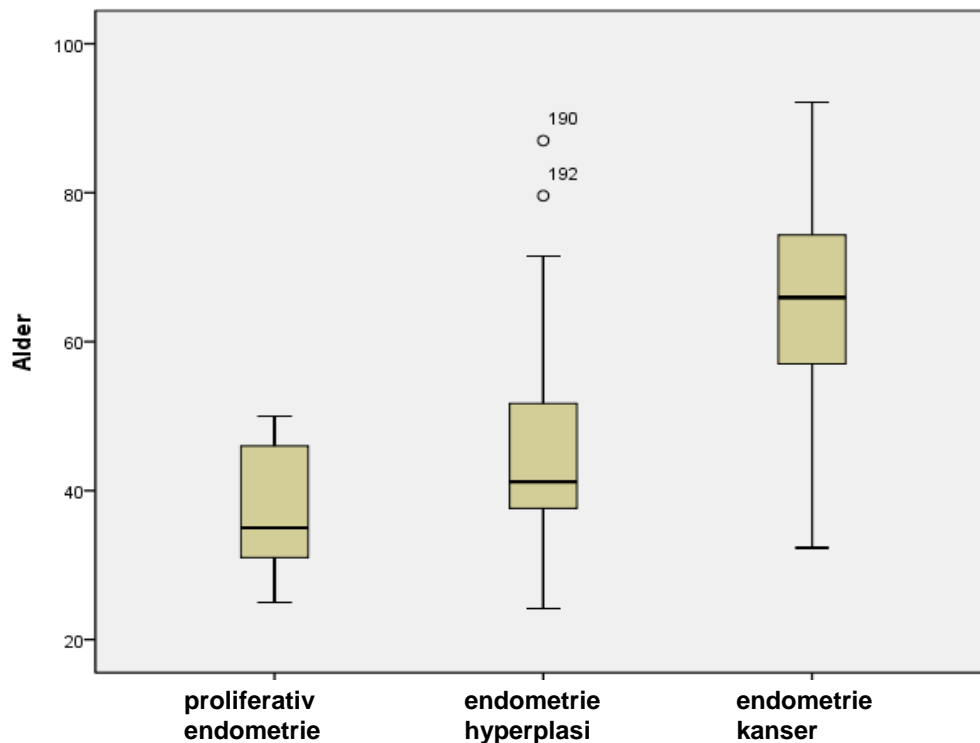
SPSS 18.0 for Windows (SPSS, Chicago, USA) ble brukt til statistisk analyser. Data er presentert som median med rekkevidde med mindre annet er oppgitt. Den Kolmogorov-Smirnov test og visuelt figurene ble brukt til å teste for normal fordeling. Kontinuerlige data ble analysert ved to-sidig t-test eller Mann-Whitney U-test. Ekspresjon av de forskjellige markører ble sammenlignet med hverandre i proliferativt endometrie/hyperplasi og kanser. Videre ble markørene også vurdert i forhold til risiko for kanser progresjon eller stabil sykdom eller regresjon i alle hyperplasi tilfeller, og i forhold til risiko for tilbakefall/død av sykdommen i alle kreft tilfellene.

5. Resultater

Totalt har vi undersøkt 349 endometrieprøver med immunhistokjemi for PAX2/COX2 og PTEN. Videre har vi isolert og analysert 65 RNA prøver fra pasienter med endometrie hyperplasi. Av de 349 pasientene er 75 av proliferativt endometrium, 36 hyperplasier og 237 krefttilfeller. I de 75 proliferative endometrieprøvene ble alle fargingene vellykket. For de 36 endometrie hyperplasi tilfellene var lesjonen snittet bort i 6 tilfeller for PTEN, og i 8 tilfeller for COX2. Av de 238 kanser tilfellene som det ble laget TMA-blokker av, fikk vi PAX2 farging i 183 tilfeller.

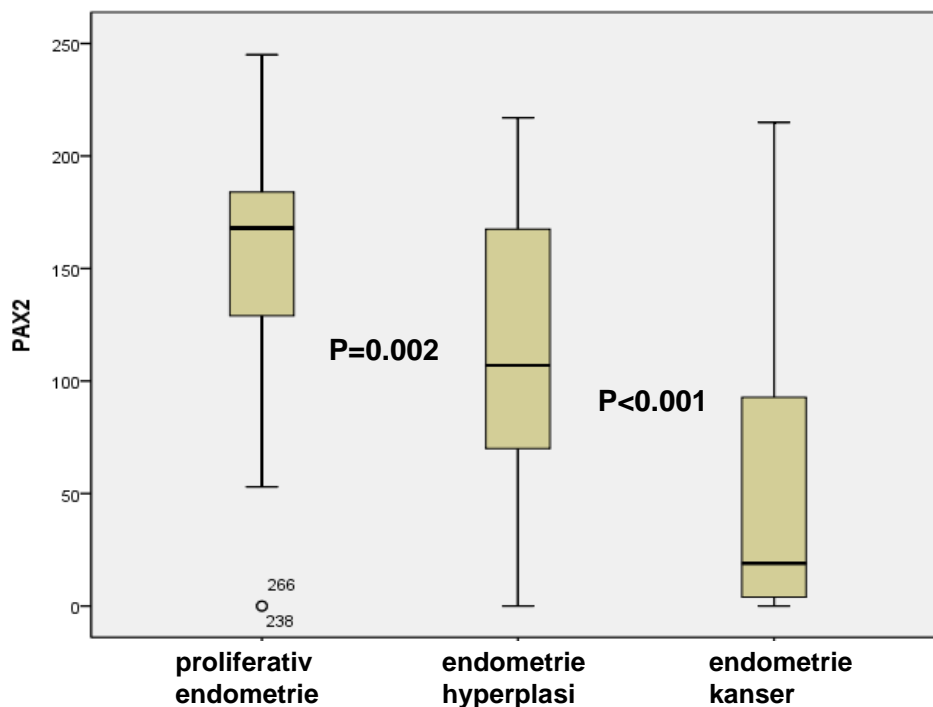
Totalt ble det isolert RNA fra 65 pasientprøver, men grunnet for lite materiale eller for lav RNA konsentrasjon etter isoleringen ble det endelige antallet 55 prøver. Av disse prøvene ble det laget cDNA.

Aldersfordeling for de forskjellige grupper var følgende: for proliferativt endometrie var gjennomsnittet 37,7 (rekkevidde 25-50); for endometrie hyperplasi var gjennomsnittet 46 (rekkevidde 24-88); for endometriekreft var gjennomsnittet 66,2 (rekkevidde 32-92) (se figur 9).



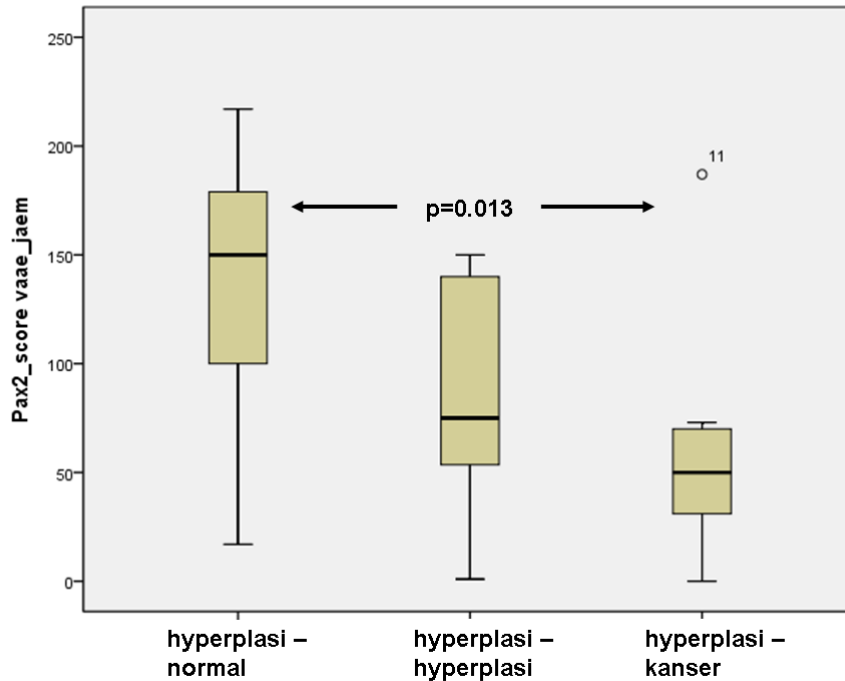
Figur 9: Boksplott som viser aldersfordeling i de forskjellige pasientgrupper.

Analysering av PAX2 i alle tilfeller var godt reproducerbar. For å komme til en endelig score måtte en konsensus møte til i 41/183 tilfeller. Gjennomsnitt score for proliferativt endometrie, hyperplasi og kreft var signifikant forskjellig fra hverandre. Figur 10 viser boksplott med fordeling av PAX2 H-score i de tre forskjellige gruppene; gjennomsnitt for PAX2 score i proliferativt endometrie var på 157 (rekkevidde 0-245); for endometrie hyperplasi var gjennomsnittet 114 (rekkevidde 0-235) og for endometrie kreft var gjennomsnittet 55 (rekkevidde 0-215).



Figur.10: Boksplott som viser PAX2 protein uttrykk i pasienter med proliferativt endometrie, endometrie hyperplasi og endometriekreft.

Selv om det er mye overlapping mellom de forskjellige gruppene viser boksplottet en tydelig trend for en lavere H-score for PAX2 med en mer malign diagnose. I pasienter med proliferativt endometrie hadde 27 pasienter en oppfølgende prøve, 8 av disse pasientene fikk diagnosen leiomyom. Den gjennomsnittlige PAX2 verdien for disse pasientene var også betydelig lavere (131 vs 179) enn de 14 pasientene som hadde blitt diagnostisert som normal i oppfølgingsprøven. For pasienter med hyperplasi har vi også analysert PAX2 H-score i forhold til oppfølgingen, og trenden er den samme; for pasienter som hadde regresjon av sin sykdom, var PAX2 H-score mye høyere enn for de pasienter som viste progresjon av sin sykdom (136 vs. 63, $p=0.013$).



Figur.11: Boksplott som viser PAX2 H-score for pasienter med hyperplasi med oppfølging.

PAX2 H-score viste ingen signifikant forskjell i pasienter med forskjellige FIGO stadier. Det var det heller ingen signifikant forskjell i PAX2 H-score for pasienter med eller uten tilbakefall av sin sykdom. COX2 og PTEN var positiv i nesten alle pasienter med proliferativt endometrie og det var ingen korrelasjon mellom proteinekspresjon for COX2, PTEN og PAX2.

I 50 tilfeller med endometrie hyperplasi hadde vi både PAX2 H-score og resultater fra rtPCR. Disse resultater viste ingen korrelasjon. PAX2 rtPCR var heller ikke korrelert med oppfølging av disse pasienter, og det var heller ingen korrelasjon mellom mRNA ekspresjon av PAX2 med COX2 eller PTEN. rtPCR for PTEN og COX2 var heller ikke korrelert med oppfølging (regresjon eller progresjon). Av de 183 kreftilfellene fikk 18/183 tilbakefall eller døde av sin sykdom. For alle tilfeller hadde vi data for både PTEN/p27/p21/p16/survivin/p63/p53 protein uttrykket og data for hypermetylering for hMLH1/RASSF1a/p16/p21/survivin. PAX2 proteinekspresjon viste ingen korrelasjon med disse faktorene.

Dessverre fikk vi ikke muligheten til å analysere microRNA molekylerne, da leverandøren til microRNA-platene har hatt problemer med levere disse.

6. Diskusjon

Målet med denne studien var å undersøke 1). Hvilken rolle PAX-2, COX-2 og PTEN, og flere microRNAs (miR-10b, miR-29c, miR-101, miR-183, miR-200c, miR-205, miR-223) har i utviklingen av endometrial karsinogenese; 2). Kan PAX2, COX2 og PTEN protein- eller mRNA ekspresjons brukes som biomarkør for å forutsi prognose av en pasient med endometrie hyperplasi eller endometriekreft; 3). Kan proteinnivået av COX2, PAX2 og PTEN bli forklart ut fra en korrelasjon mellom mRNA, microRNA og protein nivå?

For å oppnå dette målet, ble tilgjengelig litteratur gjennomgått og eksperimenter har vært utført i laboratoriet basert på innsamlet informasjon. Den følgende diskusjonen fokuserer på observasjoner og data innhentet under den eksperimentelle delen av dette arbeidet.

Utviklingen av endometrial karsinogenese er en komplisert og innviklet prosess der mange ulike faktorer, regulatorer og mekanismer spiller en rolle i denne utviklingen. Gjennom forskning har forståelsen for denne utviklingen blitt bedre, men enda er det mange ting vi ikke forstår eller vet. Utvikling fra normalt til malignitet kan ta rundt 30-40 år. Og vi ser i denne studien at dette stemmer godt overens med utviklingen fra normal proliferativt endometrie til endometrie hyperplasi tar omtrentlig 10 år, og at utviklingen fra endometrie hyperplasi til invasivt karsinom tar omtrent 10-20 år. At det er så pass langt mellom de ulike stadier av den endometriale karsinogenese gir oss gode muligheter for å oppdage og behandle pasienter på en adekvat måte. Dessverre mangler man fortsatt gode biomarkører for å tydelig identifisere de lesjoner med høy risiko for kreftutvikling. Derfor blir per dags dato mange pasienter med endometrie hyperplasi overbehandlet med et kirurgisk inngrep.

Gjennom ulike studier har en funnet ut at COX2 er avhengig av JAK2/STAT3-, MAPK/ERK-, og PI3K/AKT, og induserer celleproliferasjon i endometriekreft celler. Noe som indikerer at COX-2 kan være en kritisk faktor i kreftutvikling i endometrie [9]. Andre studier impliserer at PAX2 er en nøkkel regulator, og at PTEN tumorsuppressor genen er det hyppigst innaktiverede genen i premaligne og maligne lesjoner i endometrioid endometriekreft. Noe som kan tyde på at PTEN proteinaktivering er forårsaket av epigenetiske mekanismer.

I denne studien ser vi en tydelig trend der H-score for PAX2 blir lavere med en mer malign diagnose. Den samme trenden ser vi hos pasienter med regresjon av sin sykdom der PAX2 H-score er mye høyere enn for de pasienter som viste progresjon av sin sykdom. Dette kan tyde på at en høy H-score for PAX2 gir bedre prognose for pasienten og at PAX2 fungerer som en regulator som bremser kreftutviklingen i endometrie, samt at PAX2 ekspresjons kan brukes som biomarkør for å forutsi prognosen til en pasient. Pax2-inhibering kan dermed anses som en tidlig hendelse i den endometriale karsinogenese. Noe som passer med tidligere funn fra Allison et al, (51) som beskrev at PAX2 partiell tap forekommer i 18% normale endometrie og at prosent andel med PAX2 økte med økt grad av malignitet. Monte et al [70] fant respektiv 36%, 71%, og 77% tap av PAX2 i normalt, prekanser (=hyperplasi) og kreft, som er mye mer enn vi fant. Forskjellen ligger nok mest i scorings metode mellom Monte et al og oss, Bildene de viser i artikkelen av PAX2 negative hadde vi aldri scoret som negativ men som en H-score av 280 (dvs 90% med en fargingsintensitet av 3 pluss 10% med en fargingsintensitet av 1). De beskriver også at pasienter med både tap av PTEN og PAX2 øker med økende malignitet noe som tyder på en klonal ekspansjon av disse kjertler. PAX2 ser ut til å fungere som en tumorsuppressor gen i endometrium. PAX2 er en transkripsjonsfaktor som regulerer andre gener som for eksempel ERB-2, et gen som har vist å være av prognostiske verdi i endometriekreft [71].

Ved å sammenligne PAX2 H-score med de forskjellige FIGO stadiene fant vi ingen signifikant forskjell. Det var eller ingen forskjell i PAX2 H-score for pasienter med eller uten tilbakefall av sin sykdom. PAX2 kan derfor brukes som prognostisk faktor i hyperplasier, og eventuelt i proliferativt endometrium, men den kan ikke benyttes som prognostisk faktor i krefttilfeller. COX2 og PTEN var positiv i nesten alle pasienter med proliferativt endometrie og det var ingen korrelasjon mellom protein ekspresjon for COX2, PTEN og PAX2. Det var ingen korrelasjon mellom PAX2 H-score og resultatene fra rtPCR fra de 50 endometrie hyperplasi prøvene som ble analysert. Det var heller ingen korrelasjon mellom resultatene fra PAX2 rtPCR og oppfølging av disse pasientene. Ingen korrelasjon ble funnet mellom mRNA ekspresjon av PAX2 med COX2 eller PTEN. Dette kan tyde på at PAX2 mRNA er stabile og har en sen "turnover", eller at microRNA har betydning i denne prosessen og fungerer som en brems i kreftutviklingen.

Sammenligning av rtPCR for PTEN og COX2 viste heller ingen korrelasjon med oppfølging (regresjon eller progresjon).

For alle de 183 krefttilfellene sammenlignet vi de data vi hadde for PTEN/p27/p21/p16/survivin/p63/p53 protein uttrykket og data for hypermetylering av hMLH1/RASSF1a/p16/p21/survivin. Denne sammenligningen viste at PAX2 protein ekspresjon ikke korrelerte med noen av disse faktorene.

Det er viktig å være klar over forskjellen mellom de ulike analysemetodene som er brukt i denne studien for scoring av PAX2, PTEN og COX2. I analysemetode 1 (Scoring_Baak) har vi sett på ett begrenset antall kjertler, mens med analysemetode 2 (Scoring_vaae_jaem) er det antall kjertler i et avmerket område som er tatt med. Dette kan da tilsvare ca 40 kjertler. Dette kan gi utslag på om scoren blir høy eller lav og om den blir positiv eller negativ. Dette kan da føre til at disse analysemetodene ikke korrelere med hverandre. I analyse metode 3 (RNA isolering) blir ett enda større område av vevet tatt med (50-60 kjertler), ved makrodissekering blir det omliggende vevet rundt kjertlene (stroma) også tatt med.

Ved for eksempel analysing av PTEN, som også har proteinuttrykk i stroma, kan en få et høyere ekspresjonsnivået av mRNA enn ved scoring av PTEN på immunsnitt hvor man bare se på endometrie kjertler. Siden de tre analyse metodene er så forskjellige kan det være en forklaringen på hvorfor nivåene mellom mRNA og protein ikke stemmer overens med hverandre.

Vi kan konkludere med at PAX2 inaktivering er en tidlig hendelse. En kan også konkludere med at PAX2 H-score kan brukes som biomarkør for å forutsi prognose av pasienter med endometrie hyperplasi, men at disse resultatene trenger å bli validert før denne metoden kan brukes til rutinediagnostikk. Scoringsmetoden trenger å bli forbedret siden reproduserbarhet ennå ikke er optimal. Eventuelt kan kanskje digital billedanalyse hjelpe til med å forbedre reproduserbarheten for PAX2.

I det videre arbeidet er det nødvendig å finne en mulig funksjon av PAX2 i endometrium. Dersom en biologisk funksjon av PAX2 er kjent kan dette eventuelt føre til et nytt target for endometrie hyperplasi behandlingen.

Referanser

1. *Cancer i Norway 2009 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway*, 2009: Cancer Registry of Norway.
2. Hjartaker, A., H. Langseth, and E. Weiderpass, *Obesity and diabetes epidemics: cancer repercussions*. *Adv Exp Med Biol*, 2008. **630**: p. 72-93.
3. Rieck, G. and A. Fiander, *The effect of lifestyle factors on gynaecological cancer*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006. **20**(2): p. 227-51.
4. Fader, A.N., et al., *Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship*. *Gynecol Oncol*, 2009. **114**(1): p. 121-7.
5. Thomas, C.C., et al., *Endometrial cancer risk among younger, overweight women*. *Obstet Gynecol*, 2009. **114**(1): p. 22-7.
6. Kaaks, R., A. Lukanova, and M.S. Kurzer, *Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. **11**(12): p. 1531-43.
7. Calle, E.E. and R. Kaaks, *Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(8): p. 579-91.
8. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
9. Gao, J., et al., *Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(3): p. 389-95.
10. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 1983. **15**(1): p. 10-7.
11. Abeler, V.M., K.E. Kjorstad, and E. Berle, *Carcinoma of the endometrium in Norway: a histopathological and prognostic survey of a total population*. *Int J Gynecol Cancer*, 1992. **2**(1): p. 9-22.
12. Mikuta, J.J., *International Federation of Gynecology and Obstetrics staging of endometrial cancer 1988*. *Cancer*, 1993. **71**(4 Suppl): p. 1460-3.
13. Creasman, W., *Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009. **105**(2): p. 109.
14. Baak, J.P., et al., *Prospective multicenter validation confirms the prognostic superiority of the endometrial carcinoma prognostic index in international Federation of gynecology and obstetrics stage 1 and 2 endometrial carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(22): p. 4214-21.
15. van der Putten, H.W., et al., *Prognostic value of quantitative pathologic features and DNA content in individual patients with stage I endometrial adenocarcinoma*. *Cancer*, 1989. **63**(7): p. 1378-87.
16. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. *CA Cancer J Clin*, 2008. **58**(2): p. 71-96.
17. Carriaga, M.T. and D.E. Henson, *The histologic grading of cancer*. *Cancer*, 1995. **75**(1 Suppl): p. 406-21.
18. Mittal, K.R., P.E. Schwartz, and K.W. Barwick, *Architectural (FIGO) grading, nuclear grading, and other prognostic indicators in stage I endometrial adenocarcinoma with identification of high-risk and low-risk groups*. *Cancer*, 1988. **61**(3): p. 538-45.
19. Zaino, R.J., et al., *The prognostic value of nuclear versus architectural grading in endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study*. *Int J Gynecol Pathol*, 1994. **13**(1): p. 29-36.

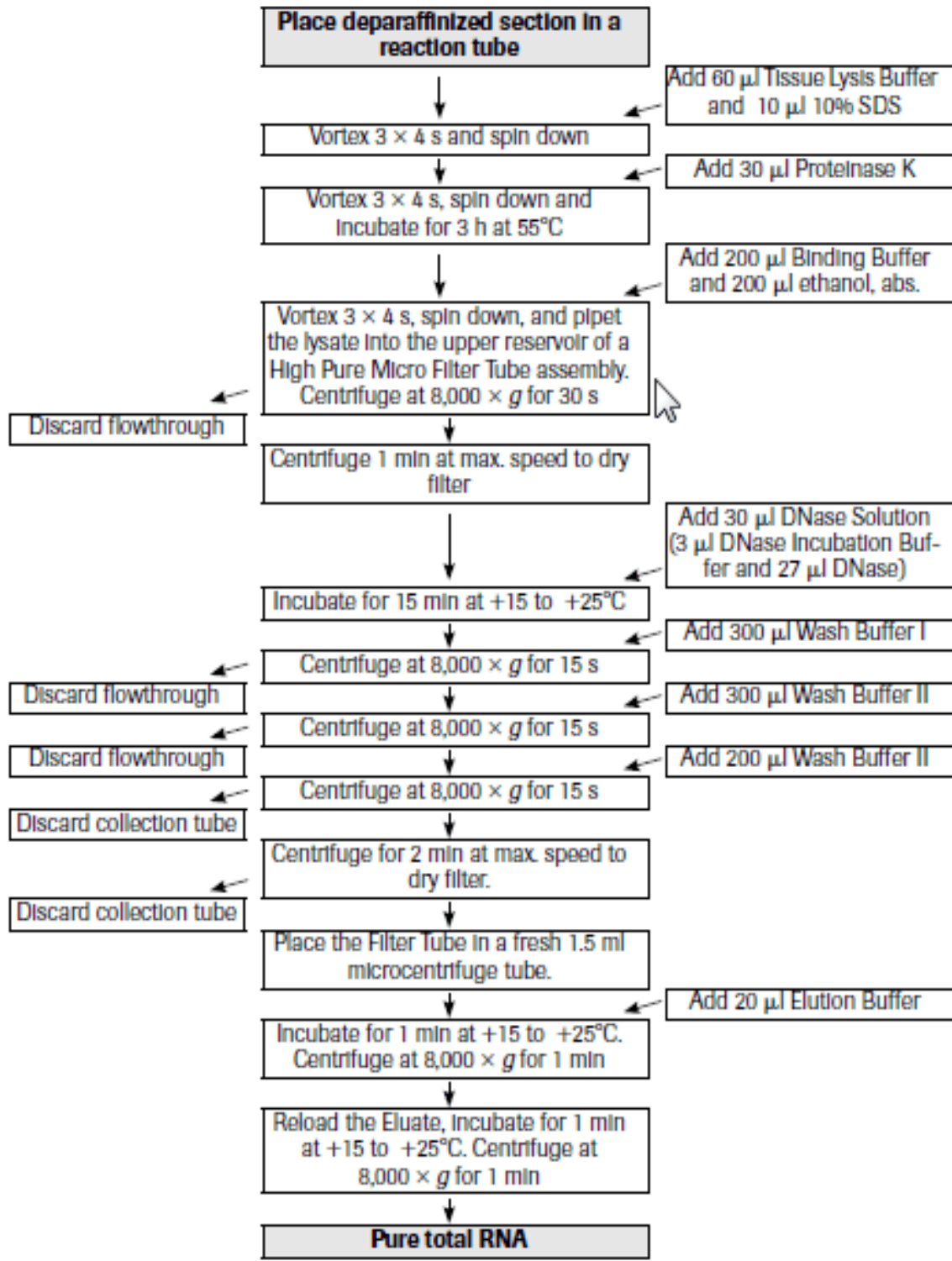
20. Alkushi, A., et al., *Description of a novel system for grading of endometrial carcinoma and comparison with existing grading systems*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(3): p. 295-304.
21. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
22. Mutter, G.L., *Molecular Patogenesis of Endometrial Cancer*. In: Fuller A SM, Young R, editor. *Utrine Cancer: American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology*: Hamilton, Ontario, Canada: B.C. Decker, 2003.
23. Kurman, R., Norris, HJ, *Endometrial hyperplasia and related cellular changes*. In: Kurman RJ, editor. *Blaustein's Patology of the Female Genital Tract, 4th ed*. New York: Springer-Verlag, 1994.
24. Baak, J.P., et al., *The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 World Health Organization classification system*. Cancer, 2005. **103**(11): p. 2304-12.
25. Kurman, R.J., P.F. Kaminski, and H.J. Norris, *The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients*. Cancer, 1985. **56**(2): p. 403-12.
26. Allison, K.H., et al., *Diagnosing endometrial hyperplasia: why is it so difficult to agree?* Am J Surg Pathol, 2008. **32**(5): p. 691-8.
27. Bergeron, C., et al., *A multicentric European study testing the reproducibility of the WHO classification of endometrial hyperplasia with a proposal of a simplified working classification for biopsy and curettage specimens*. Am J Surg Pathol, 1999. **23**(9): p. 1102-8.
28. Kendall, B.S., et al., *Reproducibility of the diagnosis of endometrial hyperplasia, atypical hyperplasia, and well-differentiated carcinoma*. Am J Surg Pathol, 1998. **22**(8): p. 1012-9.
29. Skov, B.G., et al., *Comparison of the reproducibility of the WHO classifications of 1975 and 1994 of endometrial hyperplasia*. Int J Gynecol Pathol, 1997. **16**(1): p. 33-7.
30. Zaino, R.J., *Endometrial hyperplasia: is it time for a quantum leap to a new classification?* Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**(4): p. 314-21.
31. Mutter, G.L., *Histopathology of genetically defined endometrial precancers*. Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**(4): p. 301-9.
32. Diegenbach, P.C. and J.P. Baak, *Quantitative nuclear image analysis: differentiation between normal, hyperplastic, and malignant appearing uterine glands in a paraffin section. III. The use of texture features for differentiation*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1978. **8**(2): p. 109-16.
33. Diegenbach, P.C. and J.P. Baak, *Quantitative nuclear image analysis: differentiation between normal, hyperplastic, and malignant appearing uterine glands in a paraffin section. IV. The use of Markov chain texture features in discriminant analysis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1978. **8**(3): p. 157-62.
34. Baak, J.P., et al., *Quantitative, microscopical, computer-aided diagnosis of endometrial hyperplasia or carcinoma in individual patients*. Histopathology, 1981. **5**(6): p. 689-95.
35. Baak, J.P., et al., *Discrimination of hyperplasia and carcinoma of the endometrium by quantitative microscopy--a feasibility study*. Histopathology, 1981. **5**(1): p. 61-8.
36. Baak, J.P., et al., *Architectural and nuclear morphometrical features together are more important prognosticators in endometrial hyperplasias than nuclear morphometrical features alone*. J Pathol, 1988. **154**(4): p. 335-41.

37. Dunton, C.J., et al., *Use of computerized morphometric analyses of endometrial hyperplasias in the prediction of coexistent cancer*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(5): p. 1518-21.
38. Baak, J.P., et al., *Assessment of the risk on endometrial cancer in hyperplasia, by means of morphological and morphometrical features*. Pathol Res Pract, 1992. **188**(7): p. 856-9.
39. Orbo, A., et al., *Computerised morphometrical analysis in endometrial hyperplasia for the prediction of cancer development. A long-term retrospective study from northern Norway*. J Clin Pathol, 2000. **53**(9): p. 697-703.
40. Baak, J.P., et al., *Prospective multicenter evaluation of the morphometric D-score for prediction of the outcome of endometrial hyperplasias*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(7): p. 930-5.
41. Mutter, G.L., M.L. Chaponot, and J.A. Fletcher, *A polymerase chain reaction assay for non-random X chromosome inactivation identifies monoclonal endometrial cancers and precancers*. Am J Pathol, 1995. **146**(2): p. 501-8.
42. Mutter, G.L., et al., *Allelotype mapping of unstable microsatellites establishes direct lineage continuity between endometrial precancers and cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(19): p. 4483-6.
43. Mutter, G.L., et al., *Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium*. Cancer Res, 2001. **61**(11): p. 4311-4.
44. Mutter, G.L., et al., *Endometrial precancer diagnosis by histopathology, clonal analysis, and computerized morphometry*. J Pathol, 2000. **190**(4): p. 462-9.
45. Tavassoli, F., Devilee, P., *Pathology and genetics of tumours of the breast and femal genital organs: IARC Press: Lyon*. 2003.
46. Mutter, G.L., *Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group*. Gynecol Oncol, 2000. **76**(3): p. 287-90.
47. Hecht, J.L., et al., *Prediction of endometrial carcinoma by subjective endometrial intraepithelial neoplasia diagnosis*. Mod Pathol, 2005. **18**(3): p. 324-30.
48. Mutter, G.L., et al., *Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(11): p. 924-30.
49. Stambolic, V., et al., *High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten+/- mice*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3605-11.
50. Song, M.S., L. Salmena, and P.P. Pandolfi, *The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(5): p. 283-96.
51. Allison, K.H., et al., *PAX2 loss by immunohistochemistry occurs early and often in endometrial hyperplasia*. Int J Gynecol Pathol, 2012. **31**(2): p. 151-159.
52. Steinbakk, A., *Prognostic value of Microsatellite Instability, Molecular and Quantitative Biomarkers in FIGO Stage I Endometrioid Endometrial Adenocarcinoma*. 2009.
53. Steinbakk, A., et al., *Molecular biomarkers in endometrial hyperplasias predict cancer progression*. Am J Obstet Gynecol, 2011. **204**(4): p. 357 e1-12.
54. www.endometrium.org.
55. Lu, K., Broaddus, RR, *Future challenges in clinical and translational research for endometrial cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2005: p. 398-411.
56. Cayan, F., et al., *Insulin receptor substrate-2 gene polymorphism: is it associated with endometrial cancer? Gynecol Endocrinol, 2010. 26(5): p. 378-82.*
57. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.

58. Zhang, L., et al., *Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA*. Cell Res, 2012. **22**(1): p. 107-26.
59. Cohn, D.E., et al., *Comprehensive miRNA profiling of surgically staged endometrial cancer*. Am J Obstet Gynecol, 2010. **202**(6): p. 656 e1-8.
60. Si, M.L., et al., *miR-21-mediated tumor growth*. Oncogene, 2007. **26**(19): p. 2799-803.
61. Simon, R., M. Mirlacher, and G. Sauter et al, *Tissue microarrays for early target evaluation*. Drug Discovery Today: Technologies. 2004.
62. Mousses, S., et al., *Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays*. Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(1): p. 97-101.
63. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
64. Milanes-Yearsley, M., et al., *Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups*. Mod Pathol, 2002. **15**(12): p. 1366-73.
65. von Wasielewski, R., et al., *Tissue array technology for testing interlaboratory and interobserver reproducibility of immunohistochemical estrogen receptor analysis in a large multicenter trial*. Am J Clin Pathol, 2002. **118**(5): p. 675-82.
66. Hendriks, Y., et al., *Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors*. Am J Pathol, 2003. **162**(2): p. 469-77.
67. Bartlett, J.M. and D. Stirling, *A short history of the polymerase chain reaction*. Methods Mol Biol, 2003. **226**: p. 3-6.
68. Pierce, K.E. and L.J. Wangh, *Effectiveness and limitations of uracil-DNA glycosylases in sensitive real-time PCR assays*. Biotechniques, 2004. **36**(1): p. 44-6, 48.
69. BioRad. *real-time PCR guide_bio-rad*. Available from: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>.
70. Monte, N.M., et al., *Joint loss of PAX2 and PTEN expression in endometrial precancers and cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6225-32.
71. Mariani, A., et al., *HER-2/neu overexpression and hormone dependency in endometrial cancer: analysis of cohort and review of literature*. Anticancer Res, 2005. **25**(4): p. 2921-7.



High Pure FFPE RNA Micro Kit

Experimental Overview




Protocol for the Isolation of RNA from Formalin-fixed, Paraffin- Embedded Tissue

Deparaffinization The following table describes the deparaffinization procedure for one 1-10 μm section of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in a 1.5 ml reaction tube.

- | | |
|---|---|
| 1 | To one 1 - 10 μm section in a 1.5 ml reaction tube add 800 μl Hemo-De (or Xylene), at least vortex for 4 s three times, incubate for 2 min, vortex at least for 4 s three times again and incubate for 5 min. Centrifuge for 2 min at maximum speed (12,000 - 14,000 $\times g$) and discard supernatant by aspiration.
 After this step directly cap the tubes to avoid tissue sections from drying.
 If the tissue appears to be floating in the Xylene, spin for a further 2 min. |
| 2 | Repeat Step 1. |
| 3 | Add 800 μl ethanol and flick the tube to dislodge the pellet and vortex for 4 s three times.
Centrifuge for 2 min at maximum speed (12,000 - 14,000 $\times g$) and discard supernatant by aspiration. |
| 4 | Add 800 μl 70% ethanol flick the tube to dislodge the pellet and vortex for 4 s three times.
Centrifuge for 2 min at maximum speed and discard supernatant by aspiration. |
| 5 | After removal of 70% ethanol, respin the tube for 10 - 20 s and carefully remove the residual fluid with a fine bore pipet.
Incubate the open tubes in a heating block for 5 - 15 min at 55°C to air dry the tissue pellet.
Proceed with step 1 of the RNA Isolation protocol. |

Alternative Procedure

The following table describes the deparaffinization procedure for one 1 - 10 μm section of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue on a microscope slide.

- | | |
|---|--|
| 1 | Place the slide in a Hemo-De (or Xylene) bath and incubate for 10 min. |
| 2 | Tap off excess liquid and place the slide into ethanol abs. for 10 min. |
| 3 | Change bath and incubate the slide for a further 10 min in ethanol abs. |
| 4 | Scratch the deparaffinized section from the slide by using a sterile single-use scalpel and place it in a 1.5 ml reaction tube.
 To avoid scattering of the tissue, scratch the section from the microscope slide before it has dried. |
| 5 | <ul style="list-style-type: none">• Dry the tissue for 10 min at 55°C.• Proceed with step 1 of the RNA Isolation protocol. |

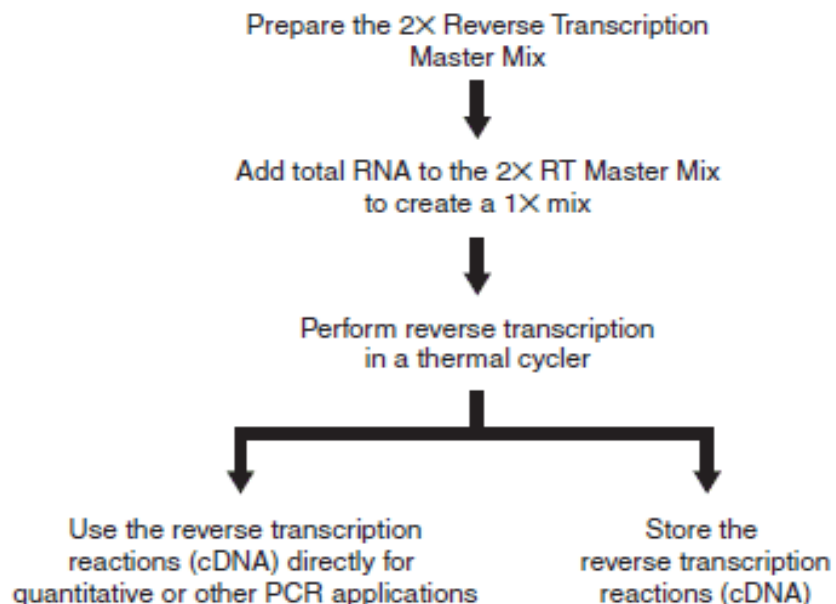
RNA Isolation Protocol

The following protocol describes the RNA isolation from a 1-10 μm section of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.

- ④ If necessary, multiple preparations can be pooled after step 4.
-
- ① • To one tissue pellet (deparaffinized as described above) add 60 μl Tissue Lysis Buffer (bottle 1, white cap) and 10 μl 10% SDS
 • Vortex 3 \times 4 s, spin down and add 30 μl Proteinase K working solution.
 • Vortex 3 \times 4 s, spin down and incubate for 3 h at 55°C.
-
- ② • Add 200 μl Binding Buffer (bottle 3, green cap) and 200 μl ethanol abs.
 • Vortex 3 \times 4 s and spin down
-
- ③ Combine the High Pure filter tube with a collection tube and pipet the lysate into the upper reservoir.
-
- ④ Centrifuge for 30 s at 8,000 $\times g$ in a microcentrifuge and discard the flowthrough.
 ④ Steps 3-4 can be repeated in order to load the column with additional sample material (do not overload the column).
-
- ⑤ Centrifuge for 1 min at max. speed to dry filter.
-
- ⑥ • Add 30 μl DNase Solution (3 μl DNase Incubation Buffer and 27 μl DNase), incubate for 15 min at +15 to +25°C.
-
- ⑦ • Add 300 μl Wash Buffer I working solution (bottle 4, black cap) to the upper reservoir.
 • Centrifuge for 15 s at 8,000 $\times g$, discard the flowthrough.
-
- ⑧ • Add 300 μl Wash Buffer II working solution (bottle 5, blue cap).
 • Centrifuge for 15 s at 8,000 $\times g$, discard the flowthrough.
-
- ⑨ Add 200 μl Wash Buffer II working solution (bottle 5, blue cap), centrifuge for 15 s at 8,000 $\times g$, discard the collection tube.
-
- ⑩ Place the High Pure Micro filter tube in a fresh collection tube and centrifuge for 2 min at maximum speed.
-
- ⑪ • Place the High Pure Micro filter tube in a fresh 1.5 ml reaction tube, add 20 μl Elution Buffer (bottle 8, colorless cap), and incubate for 1 min at +15 to +25°C.
 • Centrifuge for 1 min at 8,000 $\times g$.
-
- ⑫ • Reload the Eluate; incubate for 1 min at +15 to +25°C. Centrifuge at 8,000 $\times g$ for 1 min
-
- ⑬ The microcentrifuge tube now contains the eluted RNA. Either use 0.5 – 5 μl of the eluted RNA directly in RT-PCR or store the eluted RNA at –80°C for later analysis.
 ⚠ Before photometric determination of the RNA concentration, centrifuge the eluate for 2 min at maximum speed and transfer supernatant to a fresh 1.5 ml reaction tube without disturbing glass fibers at the bottom of the original tube.

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol

Overview To synthesize single-stranded cDNA from total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits:



RNA Template Guidelines

For optimal performance of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems recommends using RNA that is:

- Free of inhibitors of reverse transcription and PCR
- Dissolved in PCR-compatible buffer or water
- Free of RNase activity

Note: If you suspect that the RNA contains RNase activity, add RNase Inhibitor to the reverse transcription reaction at a final concentration of 1.0 U/ μ L.

Input Amount of Total RNA

Use up to 2 μ g of total RNA per 20- μ L reaction.

Preparing the cDNA Reverse Transcription Reactions

To prepare the cDNA RT reactions:

1.	Pipette 10 μ L of 2X RT master mix into each well of a 96-well reaction plate or individual tube.
2.	Pipette 10 μ L of RNA sample into each well, pipetting up and down two times to mix.
3.	Seal the plates or tubes.
4.	Briefly centrifuge the plate or tubes to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.
5.	Place the plate or tubes on ice until you are ready to load the thermal cycler.

Performing Reverse Transcription

To perform reverse transcription:

1.	<p>Program the thermal cycler conditions using one of the thermal cyclers listed in Table 3 on page 4.</p> <p>IMPORTANT! These conditions are optimized for use with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits.</p> <table border="1" data-bbox="576 1435 1299 1666"> <thead> <tr> <th></th> <th>Step 1</th> <th>Step 2</th> <th>Step 3</th> <th>Step 4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Temperature ($^{\circ}$C)</td> <td>25</td> <td>37</td> <td>85</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Time</td> <td>10 min</td> <td>120 min</td> <td>5 min</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table>		Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Temperature ($^{\circ}$ C)	25	37	85	4	Time	10 min	120 min	5 min	∞
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4												
Temperature ($^{\circ}$ C)	25	37	85	4												
Time	10 min	120 min	5 min	∞												
2.	Set the reaction volume to 20 μ L.															
3.	Load the reactions into the thermal cycler.															
4.	Start the reverse transcription run.															

N

**Storing cDNA
Reverse
Transcription
Reactions**

You can store cDNA RT plates or tubes prepared using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for short-term or long-term storage.

Storage Duration	Storage Temperature (°C)
Short-term (up to 24 hours before use) [‡]	2 to 6
Long-term	-15 to -25

[‡] For prolonged storage at 2 to 6 °C, add EDTA to a final concentration of 1 mM to chelate cations and to prevent nucleic acid degradation.

IMPORTANT! If required, briefly centrifuge the archive plates or tubes before storing to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.