



Utvärdering av olika RNA-preparationsmetoder samt karakterisering av KLK7-uttryck i prostatacancer-relaterade cellinjer och tumörer

Johan Dalsätt



Institutionen för Klinisk mikrobiologi
Biomedicinsk laboratorievetenskap
Biomedicinska analytikerprogrammet
Examensarbete, 15 hp
Kursansvarige lärare: Ylva Hedberg Fransson ylva.hedberg.fransson@umu.se

Evaluation of Different RNA Preparation Methods and Characterization of KLK7 Expression in Prostate Cancer Related Cell Lines and Tumors

**Handledare: Maria Brattsand, Institutionen för medicinsk biovetenskap, Umeå
universitet**

Läroproponent: Solveig Persson-Sjögren

Examinator: Ylva Hedberg Fransson

Datum för godkännande: 2015 – 06 – 09

Abstrakt

Kallikrein-relaterade peptidaser uttrycks i olika typer av vävnader och tidigare studier tyder på att de har potential att användas som biomarkörer för ett flertal cancertyper. Nyligen har man sett ett samband mellan Kallikrein-relaterat peptidas 7 (KLK7) och prostatacancer. Syftet med studien var att testa uttrycket av KLK7 i olika humana prostatacancer-cellinjer och murin prostatatumörvävnad samt jämföra olika kit för preparation av RNA från detta material. Sex olika kit jämfördes genom att preparera RNA från murin tumörvävnad och PC-3 celler som därefter kvalitetsbestämdes med RNA integritetsnummer (RIN)-metoden. Uttryck av humant och murint KLK7 analyserades i humana prostatacellinjer och murina vävnadsprov genom q-PCR. Qiagen Allprep gav bäst resultat kvalitativt och kvantitativt för vävnadsproverna medan alla sex kit gav likvärdiga resultat kvalitativt för cellpreparationerna. Resultaten från q-PCR analysen på de humana cellinjerna visade att prostatacellinjen, RWPE-1, hade ett *KLK7*-uttryck som var mer än 1000 gånger högre än hos cancer-cellinjerna. Nivåerna av *KLK7* hos de murina proverna var generellt väldigt låga. Konklusionen av studien var att Qiagen Allprep-kit verkar lämpligast att använda vid preparation av vävnadsprover medan NucleoSpin RNA-kittet var mest prisvärt om man ska preparera enbart RNA från cellinjer. *KLK7*-uttrycket var lägre i humana prostatacancer celler jämfört med de normala prostatacellinjerna.

Nyckelord

KLK7, Prostatacancer, mRNA-uttryck, q-PCR, Kit, RNA-preparation

Introduktion

Prostatacancer (Pca) är den vanligaste cancerformen hos män i Sverige och år 2013 rapporterades 9678 maligna tumörer till cancerregistret (1). Idag används mätning av Kallikrein-relaterat peptidas 3 (KLK3), vanligen benämnt prostataspecifikt antigen (PSA), i serum vid diagnostik av Pca, men detta protein är inte cancerspecifikt utan kan detekteras i förhöjd nivå även vid benign prostataförstoring och prostatit. Detta innebär att många prostatabiopsier som tas vid förhöjt PSA är onödiga och själva proceduren medför även en risk för komplikationer som hematuri hos patienten (2). För närvarande saknas en specifik metod för att skilja mellan en aggressiv, snabbväxande cancer och en mer lågrisk-variant. Forskning pågår därför för att hitta nya markörer som kan komplettera PSA vid diagnostik av Pca, samt även användas för att bedöma och övervaka effekten av behandling (3).

En vanlig djurmodell som används vid studier av prostatacancer är TRAMP-möss. Dessa uttrycker ett onkoprotein vilket leder till att spontana tumörer uppstår vars patogenes liknar den humana varianten av sjukdomen (4). TRAMP-C1 är en prostacancercellinje som isolerats från en prostatatumör hos en TRAMP-mus. Denna kan injiceras hos immunkompetenta C57BL/6-möss och ge upphov till prostatatumörer (5). De flesta prostacancertumörer är initialt beroende av androgener för att kunna tillväxa och kan behandlas genom att minska mängden cirkulerande androgener eller blockera bindning till androgenreceptorn (AR) genom hormonbehandling eller kirurgi. Dock blir de flesta tumörer androgenoberoende efter en tid och svarar ej längre på denna behandling. Testosteron och dihydrotestosteron (DHT) är två androgener som påverkar prostatacancerutveckling genom att binda till AR i cytoplasman vilket stimulerar transkription av gener som reglerar celltillväxt och överlevnad (6). Vid studier av androgenoberoende används prostatacancercellinjerna 22Rv1, LNCaP och PC-3 av vilka 22Rv1 och LNCaP är androgenkänsliga och uttrycker AR medan cellinjen PC-3 är androgenoberoende och saknar uttryck av dessa receptorer (7-8).

Kallikrein-relaterade peptidaser (KLKs) är proteiner som hör till serinproteasfamiljen och uttrycks i många olika vävnader i kroppen. Det finns 15 identifierade KLKs hos människor och dessa kodas från ett locus på kromosom 19 (9). Tidigare var det känt att KLK1 kan påverka reglering av bl.a. blodtryck och inflammation (10) samt att KLK3, som tidigare nämnts, kan användas kliniskt vid diagnostik av Pca, men man visste inte mycket om de övriga KLKs och deras betydelse vid sjukdom. Under de senaste åren har det tillkommit mer kunskap om dessa proteiner och djurmodeller med förändrade KLK-gener har konstruerats. Det är nu känt att KLKs har en roll vid en rad olika processer i kroppen som reglering av njurfunktion, hjärnfunktion och produktion av tandemalj (11). Ett samband mellan KLK-uttryck och cancersjukdom har fastställts i ett stort antal studier och många KLKs har visat sig ha potential att användas som biomarkörer för att tidigt upptäcka en etablerad cancer (12). Nyligen har man sett ett samband mellan Kallikrein-relaterat peptidas 7 (KLK7) och Pca. KLK7 uttrycks i flera vävnader i kroppen och identifierades först i mänsklig hud där det tros ha en roll vid reglering av omsättningen av celler i de yttersta hudlagren (13). Data från en nyligen publicerad studie visar att KLK7 har ett lägre uttryck i prostatacancervävnad jämfört med normalvävnad, samt att ett lågt uttryck av proteinet korrelerar med ett högre Gleason Score vilket innebär låg celldifferentiering och därmed

sämre prognos (14). Mekanismerna bakom proteinets roll vid Pca är ännu okända och ytterligare studier av KLK7-uttryck vid denna cancertyp krävs.

Vid studier av genuttryck på transkriptionsnivå görs en kvantifiering av mRNA och en vanlig metod för detta är kvantitativ realtids-PCR (q-PCR). Denna teknik bygger på samma princip som vanlig PCR med skillnaden att vid q-PCR sker amplifiering och detektion samtidigt. Detta möjliggörs genom att använda en fluorescerande markör som binder in till bildat DNA. När antalet genkopior ökar under reaktionen kommer även fluorescensen att öka och denna ökning är proportionell mot mängden DNA som bildas under varje cykel. Vid tolkning av resultatet används Ct-värdet, vilket anger antalet PCR-cykler som behövs för att fluorescens-signalen ska överstiga bakgrundsfluorescensen. Ju mer amplifierat mål-DNA i provet, desto lägre Ct-värde. För att kvantifiera mRNA, måste extraherat RNA först omvandlas till komplementärt DNA (cDNA) med hjälp av ett omvänt transkriptas-enzym. Detta kan göras i samband med PCR-reaktionen (enstegs q-PCR) eller i ett separat rör innan reaktionen (tvåstegs q-PCR) (15). Resultaten av mRNA-kvantifiering med q-PCR, påverkas till stor del av RNA-kvalitén. Därför är det viktigt att det finns metoder för att kontrollera om det extraherade RNA:t är intakt. För detta ändamål utvecklades en RNA-integrity number (RIN)-algoritm av Agilent Technologies, vilken bygger på gel-elektroforesanalys och anger med ett RIN-värde från 1-10 hur degraderat RNA:t är i ett prov (16).

Syftet med studien var att testa uttrycket av KLK7 i humana prostatacancer cellinjer och murin tumörvävnad samt jämföra olika kit för preparation av RNA och protein från detta material.

Material och metoder

Tumörvävnad

Vid denna studie användes tumörvävnad från möss med olika genuppsättningar för mus *KLK7*-genen; Wt 23314 (homozygot för *KLK7*), het 23284 (heterozygot för *KLK7*), ko 23310 (saknar *KLK7*), samt tumörvävnad från två transgena möss; Tg 23289 (uttrycker humant *KLK7*) och wt 23292 (saknar humant *KLK7*). Som positiv kontroll vid q-PCR användes prostata och testisvävnad från mus med normal genuppsättning. Alla möss kom från Sixera Pharma AB, Sverige.

Prostatacellinjer

Cellpelletar; PC-3 och TRAMP-C1, erhöles från Maria Brattsand. Cellpelletar av den humana prostatacellinjen RWPE-1 erhöles från Marika Andersson och färdigpreparerat RNA från LNCaP och 22Rv1-cellinjer erhöles från Erik Bovinder Ylitalo. PC-3 cellinjen är etablerad från en benmetastas, 22Rv1 är etablerad från ett prostatacarcinom. LNCaP-cellinjen är etablerad från en lymfkörteltumör och RWPE-1 är etablerad från normal prostataepitelvävnad. Tre LNCaP prover och tre 22Rv1-prover odlades i steroidfritt medium med olika mängder tillsatt DHT; 0 nM, 1 nM och 10 nM. Ett 22Rv1-prov odlades i vanligt odlingsmedium och ett PC-3 prov och RWPE-1 prov odlades i ordinarie cellmedium kompletterat med 10 nM DHT. Detta gjordes för att undersöka om DHT gav en påverkan på *KLK7*-uttrycket. Alla cellinjer inköptes från American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Prepp av RNA och kvalitetsbestämning

Sex olika kit för RNA-preparation jämfördes; Allprep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Venlo, Nederländerna), RNeasy Mini Kit (Qiagen), Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp, Ontario, Kanada), NucleoSpin TriPrep (Macherey-Nagel, Düren, Tyskland), NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) och NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel). Preparation av RNA utfördes på tumörvävnad het 23284 samt PC3-celler. Före RNA-preparation överfördes vävnadsproverna till homogeniseringsrör, Precellys Lysing kit, CK28-R (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankrike) med tillsatt lyseringsbuffert, från respektive kit, och lyserades i homogenisator Precellys 24 (Bertin Technologies), 6500 rpm 3*30 sek. Två vävnadsprover frystes in direkt efter homogenisering och preparerades nästa dag med Qiagen Allprep-kit och NucleoSpin TriPrep, för att studera om de gav sämre resultat än prover preparerade samma dag. Cellpelletar lyserades genom tillsatts av lyseringsbuffert, från respektive kit, till cellpelleten och därefter blandades och vortexades provet. Efter lysering extraherades RNA från cellprover och vävnadsprover enligt tillverkarens anvisningar för respektive kit. RNA-koncentration mättes med NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Därefter späddes proverna i RNas-fritt H₂O, vid behov till en koncentration av 5-500 ng/μl och kvalitetsbestämdes med Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) tillsammans med RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) enligt tillverkarens anvisningar.

cDNA-syntes och q-PCR

Ett μg RNA omvandlades till cDNA med SuperScript VILO kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) enligt tillverkarens anvisningar, vid 25 °C i 10 min, 42 °C i 60 min och 85 °C i 5 min. Vid q-PCR reaktionen

användes 25 ng cDNA som analyserades med PCR-instrumentet 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) vid 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 95 °C 15 sek, 60 °C 1 min, 40 cykler. Vid reaktionen användes PCR-mixen TaqMan Universal Master Mix II, no UNG 4440040 (Applied Biosystems). Den humana *KLK7*-genen analyserades tillsammans med *KLK7*-primermixen Hs00192503_m1 (Applied Biosystems) samt humant glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenas (*GAPDH*) 4326317E (Applied Biosystems) vilken utgjorde endogen kontroll. Vid analys av mus *Klk7*-genen användes två 18S-primers; 18S1 och 18S2 (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, USA) med följande sekvens: 18S1 – *CGG CGA CGA CCC ATT CGA AC* (20) och 18s2 – *GAA TCG AAC CCT GAT TCC CCG TC* (23), samt en prob, 18SA (SGS DNA, Köping, Sverige) med sekvensen: 5´ (*6-FAM*)*CC TAT CAA C(Dabcyl-dT)T TCG ATG GTA GTC GCC GTG CC(Phosphate)* 3´, som endogen kontroll tillsammans med *Klk7*-primermixen Mm01197332_g1 (Applied Biosystems). Vid första analysen av mus-*KLK7*, omvandlades 250 ng RNA från proverna och 2,5 µg RNA från standardprovet, vilket utgjordes av murin prostatatumörvävnad, till cDNA och 10 ng cDNA användes till q-PCR reaktionen. Under den andra analysen av mus-*KLK7*, användes cDNA från murin testisvävnad till standardkurvan i mängderna 50 ng, 25 ng, 12,5 ng och 6,25 ng. För att jämföra cDNA-mängden hos de humana cellinjerna beräknades en mängdskillnad utifrån erhållna Ct-värden samt en relaterad mängdskillnad utifrån ett utvalt referensprov.

Statistik

Standardfel (SE) beräknades för de dubbla mätningarna för *KLK7*-uttryck hos de humana cellinjerna för att jämföra spridning mellan värdena. Värdena baseras på medelvärde ± SE.

Etiska överväganden

Etiskt tillstånd finns för djurförsök som ligger till grund för produktion av tumörmaterialet, dnr A4-15 utfärdat den 27 februari 2015 av Umeå regionala djurförsöksetiska nämnd. I tillståndet har beaktats att tumörtillväxt och metastasering, samt hur dessa processer påverkas av den genetiska omgivningen, bara kan studeras på levande djur. Antalet djur som ska användas ska begränsas till minsta möjliga för att kunna ge statistiskt säkerställda resultat och tumörerna ska ej tillåtas bli så stora att de påverkar djurens allmäntillstånd. Vad gäller försök med cellinjer in vitro fanns inget behov av etiskt tillstånd.

Resultat

Jämförelse av kit för RNA-prepp

Ett högt RIN-värde innebär ett mer intakt RNA i det analyserade provet. RIN-värdet för vävnadsproverna varierade mellan de olika kiten och NucleoSpin TriPrep och NucleoSpin RNA-kit, gav högst värde, 8,2 respektive 8,7 (Tab. 1). Högst RNA-utbyte för vävnadsproverna gav Qiagen Allprep Kit, Norgen-kitet och NucleoSpin RNA Kit. Qiagen AllPrep, Qiagen RNeasy-kit och Norgen-kitet gav minst kontaminering av större fragment på gelbilden, dock fick provet preparerat med Norgen-kitet ett avvikande utseende med svaga band för ribosomalt RNA (Fig. 1). Analys med Bioanalyser på vävnadsprov preparerat med NucleoSpin RNA Plus gav inga synliga band på gelen och inget RIN-värde erhöles trots att en omkörning gjordes. Proverna som preparerades dagen efter homogenisering med Allprep Mini-kit och NucleoSpin TriPrep, hade bättre RNA-kvalité och även ett högre RNA-utbyte jämfört med proverna som preparerades samma dag med dessa kit. Preparationerna från cellinjen PC-3 gav liknande utseende på gelbild för alla sex kit (Fig. 1), samt RIN-värden mellan 9,4 till 10 (Tab. 2). PC-3 cellerna preparerade med NucleoSpin RNA Plus gav störst RNA-mängd, 50,1 µg (Tab. 2). Prisuppgifter för respektive kit kan ses i Tab. 3.

Uttryck av KLK7

Qiagen AllPrep gav ingen synbar kontaminering av DNA-fragment på gelbild och ett relativt högt RNA-utbyte och därför användes detta kit för att preparera RNA från de olika murina tumörvävnaderna och TRAMP-C1 cellinjen inför cDNA-syntes och q-PCR. När 2,5 µg RNA användes till standarden vid cDNA-syntesen, blev amplifieringen sämre med Ct-värden över 40 för standardproverna och alla de övriga proverna utom prostata, testis, tg 23289 samt het 23284, vilka hade värdena 38, 37, 38 respektive 38. När en ny cDNA-syntes utfördes med 1 µg RNA till både prover och standard och 25 ng cDNA användes vid q-PCR reaktionen, blev resultatet något bättre då proverna; tg 23298, wt 23292, prostata, testis, Std 50, Std 25 och Std 12,5 gav värdena 38, 39, 38, 38, 36, 38 respektive 36, medan de övriga ej var detekterbara.

Vid första q-PCR analysen av de humana cellinjerna med både GAPDH och humant KLK7 i mastermixen, blev alla Ct-värden över 40 för *KLK7* medan de var detekterbara för *GAPDH*. En ny q-PCR, med bara *KLK7* gjordes på dessa prover vilket gav bättre resultat då endast LNCaP 1 nM hade ett Ct-värde över 40 (Tab. 4). Uttrycket för *KLK7* dividerades med *GAPDH*-uttrycket och resultatet visade att cancercellinjerna hade ett *KLK7*-uttryck som var mer än 1000 gånger lägre jämfört med den normala prostatacellinjen RWPE-1, oavsett om den inducerats med DHT eller ej (Fig. 2). 22Rv1-cellinjen odlad i vanligt odlingsmedium hade ett högre uttryck jämfört med de övriga 22Rv1-proverna och 22Rv1-cellinjen odlad i 10 nM DHT gav ett något högre uttryck än cellinjen odlad utan DHT.

Diskussion

Prostatan hos möss består av fyra lobber som var och en utgörs av mukosa med epitelceller och är omgiven av bindväv (17). I en tidigare studie på RNA-kvalité från human prostatavävnad fann man att högre andel epitelceller i vävnaden gav ett högre RIN-värde (18). Cellinjerna som preparerades i denna studie hade bättre RIN-värde än de murina prostatatumörvävnaderna och detta kan förklaras av att i cellkulturer är som regel majoriteten av cellerna i aktiv tillväxtfas, vilket ger en bättre RNA-kvalitet än från vävnadsprover där andelen vilande celler är större. Vävnadsprover kan också bestå av en större del döda celler vilket försämrar kvaliteten. Proverna som preparerades dagen efter homogenisering med Qiagen Allprep-kit och Nucleospin TriPrep-kit, hade bättre RNA-kvalitet och även ett högre RNA-utbyte jämfört med proverna som preparerades samma dag vilket var oväntat, men detta visar att det är möjligt att frysa in ett homogeniserat prov för senare preparation utan att RNA-kvaliteten försämras. Under preparation med Norgen-kitet gick de lyserade vävnadsprovet och cellprovet mycket långsamt genom kolonnen och därför kan man misstänka att dessa ej var tillräckligt lyserade vilket gav dåliga resultat för vävnadsprovet, samt ett relativt lågt RIN-värde för cellinjepreppen. I detta fall borde kanske en ompreparation ha gjorts med större mängd lyseringsbuffert. Alla sex kiten bedömdes som lika enkla att jobba med, men det tog något längre tid att utföra en preparation med NucleoSpin TriPrep och NucleoSpin RNA-kiten från Macherey-Nagel. Dessa kit baseras på att RNA binds upp till en kolonn, DNA centrifugeras bort och därefter tillsätts enzymet DNase, som ska bryta ned kvarvarande DNA i kolonnen (19-20). Eftersom gelbilden för dessa kit visade kontaminering av större fragment, vilket mycket sannolikt var kromosomala DNA-rester, så kan man konstatera att DNA-nedbrytningen inte fungerade vid preparation av denna vävnadstyp. Utifrån resultaten för RNA-kvalitet och RNA-utbyte verkar Qiagen Allprep kit vara mest optimalt vid preparation av murin tumörvävnad. Dock får man ta hänsyn till att detta kit även är det dyraste bland de som jämfördes. Men med tanke på hur viktigt det är att använda rent RNA vid känsligare analyser som q-PCR och micro-array så kan det vara en bra investering att betala den högre kostnaden om man preparerar RNA från vävnadsprover. Vid preparation av PC-3 celler var alla kiten tämligen likvärdiga kvalitetsmässigt, men bäst utbyte gav NucleoSpin RNA-plus kitet vilket dessutom var prisvärt och därför kan vara att föredra framför de övriga kiten.

Många *KLK*-gener är androgenreglerade och ett exempel är att *KLK2* och *KLK3*-mRNA uppregleras i prostata och bröstcancer cellinjer som svar på androgenstimulering (10). Genom att använda prostata-cancer cellinjer odlade i steroidfritt medium med olika tillsatta mängder DHT ville vi undersöka om denna androgen påverkar uttrycket av *KLK7* vid prostatacancer. För RWPE-1 cellerna, var uttrycket större hos cellinjen odlad i DHT men ingen tydlig skillnad kunde ses hos cancer cellinjerna. PC-3-cellinjerna med och utan DHT hade nästan lika högt uttryck vilket kan förklaras av att dessa celler saknar uttryck av AR och därigenom inte har möjlighet att reagera på androgenstimulering. Detta kunde även ses för LNCaP-cellerna men eftersom de har en muterad AR kan DHT ha bundit in sämre (21). Det låga uttrycket av 22Rv1 1 nM kan troligen förklaras av att provets cDNA späddes i mindre grad på grund av låg RNA-koncentration vilket medförde att större mängd av cDNA-mixen medföljde provet och försämrade troligen q-PCR reaktionen. Dock hade vi förväntat oss att tillsatts av DHT skulle ge ett större utslag på *KLK7*-uttrycket jämfört med ordinarie medium utan tillsatt DHT, hos

22Rv1-cellerna och LNCaP-cellerna. Det är oklart om DHT-stimuleringen har fungerat optimalt eller om uttrycket hos dessa celler har försämrats på något sätt. Det var även oväntat att *KLK7*-uttrycket hos 22Rv1 cellinjen odlad i vanligt odlingsmedium skulle ge ett högre uttryck än de övriga cancer-cellinjerna. Troligen har något i odlingsmediet påverkat uttrycket hos detta prov. Det lägre uttrycket av *KLK7* hos cancercellinjerna jämfört med de normala prostatacellinjerna, överensstämmer med resultaten från den tidigare nämnda studien i vilken man detekterade signifikant lägre *KLK7*-uttryck i prostatatumörvävnad jämfört med normal prostatavävnad (14). Ett lägre *KLK7*-uttryck har även påvisats vid lungadenocarcinom och bröstcancer (22-23). Dock har man sett ett ökat uttryck vid colon-cancer och ovarialcancer (24-25). En tidigare studie visar att *KLK7* ökade den invasiva förmågan hos pankreascancerceller genom att klyva celladhesionsproteinet E-cadherin (26). En orsak till skillnaden i uttryck vid olika cancersjukdomar skulle därför kunna vara att uttrycket av *KLK7* uppregleras vid mer invasiva cancertyper, men eftersom även prostatacancer kan vara invasiv så finns det en annan förklaring till detta som ännu är okänd.

Vid analys av mus *Klk7*-genen användes vävnad från olika tumörer från möss med olika genotyp eftersom man tror att omgivningen är viktig för tumörcellernas förmåga att växa och sprida sig. q-PCR analysen av mus *Klk7* på de murina proverna gav inga detekterbara Ct-värden under första omgången då humant GAPDH användes, vilket innebär att sekvensen för denna prob skiljde sig för mycket jämfört med GAPDH-sekvensen hos möss (resultat redovisas ej). Därför användes istället 18S-mixen som kontroll vid omkörningen. Resultaten från q-PCR analysen med GAPDH och humant *KLK7* i samma mastermix, tyder på att GAPDH störde q-PCR-reaktionen eftersom omkörning med endast *KLK7* gav bättre värden. I denna studie kunde *Klk7*-uttrycket i de murina proverna inte fastställas på grund av för höga Ct-värden vid båda q-PCR analyserna. Detta berodde troligen på att nivåerna av mus-*Klk7* var mycket låga i proverna som användes.

Konklusionen av denna studie var att alla kit gav bra resultat för RNA-preparation av PC-3 celler men NucleoSpin RNA Plus gav bäst utbyte till lägst kostnad. När det gäller tumörvävnad visade sig Qiagen Allprep Kit vara mest lämpligt att använda. Resultaten från q-PCR analysen visade att *KLK7*-uttrycket var nedreglerat i prostatacancer-cellinjer jämfört med normala prostata-cellinjer och uttrycket i de murina proverna var generellt väldigt lågt.

Tack tillägnas

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Maria Brattsand för mycket bra handledning och för att tålmodigt ha svarat på alla frågor som dykt upp under arbetets gång. Tack även till Erik Bovinder-Ylitalo för teknisk assistans med Bioanalyser-instrumentet.

Referenser

1. Socialstyrelsen. Cancerincidens I Sverige 2013. <http://www.socialstyrelsen.se/Lists/Artikelkatalog/Attachments/19613/2014-12-10.pdf>. (2015-04-18)
2. Alberts AR, Schoots IG, Roobol MJ. Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: Past and future. *Int J Urol*. 2015 doi: 10.1111/iju.12750.
3. Felgueiras J, Silva JV, Fardilha M. Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014;15(1):16-42.
4. Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, Angelopoulou R, Rosen JM, Greenberg NM. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res*. 1996;56(18):4096-4102.
5. Foster BA, Gingrich JR, Kwon ED, Madias C, Greenberg NM. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res*. 1997;57(16):3325-3330.
6. Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(6):1665-1671.
7. Sramkoski RM, Pretlow TG, Gianconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, Marengo SR, Rhim JS, Zhang D, Jacobberger JW. A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1999;35(7):403-409.
8. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, Huang J. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*. 2011;71(15):1668-1679.
9. Kontos CK, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(11):1877-1891.
10. Borgoño CA, Michael IP, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: physiological roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res*. 2004;2(5):257-280.
11. Prassas I, Eissa A, Poda G, Diamandis EP. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(3):183-202.
12. Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biol Chem*. 2010;391(5):505-511.
13. Lundwall A, Brattsand M. Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(13):2019-2038.
14. Zhang CY, Zhy Y, Rui WB, Dai J, Shen ZJ. Expression of kallikrein-related peptidase 7 is decreased in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2015;17(1):106-110.
15. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75-85.
16. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassman M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;31(7):3.

17. Harmelin A, Danon T, Kela I, Brenner Q. Biopsy of the mouse prostate. *Lab Anim.* 2005;39(2):215- 220.
18. Bertilsson H, Angelsen A, Viset T, Anderssen E, Halgunset J. RNA quality in fresh frozen prostate tissue from patients operated with radical prostatectomy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010;70(1):45-53.
19. RNA isolation User manual. http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNA.pdf (2015-05-10)
20. DNA, RNA , and protein purification User manual. http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalDNARNAProtein.pdf (2010-05-10)
21. Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris-Stalpers C, Kuiper CG, Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;41(3-8):665-669.
22. Planque C, de Monte M, Guyetant S, Rollin J, Desmazes C, Panel V, Lemarié E, Courty Y. KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329(4):1260-1266.
23. Li X, Liu J, Wang Y, Zhang L, Ning L, Feng Y. Parallel underexpression of kallikrein 5 and kallikrein 7 mRNA in breast malignancies. *Cancer Sci.* 2009;100(4):601-607.
24. Walker F, Nicole P, Jallane A, Soosaipillai A, Mosbach V, Okinomopoulou K, Diamandis EP, Magdolen V, Darmoul D. Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a proliferative factor that is aberrantly expressed in human colon cancer. *Biol Chem.* 2014;395(9):1075-1086.
25. Tamir A, Jag U, Sarohini S, Schindewolf C, Tanaka T, Gharbaran R, Patel H, Sood A, Hu W, Patwa R, Blake P, Chirina P, Oh Jeong J, Lim H, Goy A, Pecora A, Suh KS. Kallikrein family proteases KLK6 and KLK7 are potential early detection and diagnostic biomarkers for serous and papillary serous ovarian cancer subtypes. *J Ovarian Res.* 2014;7:109.
26. Johnson SK, Ramani VC, Hennings L, Haun RS. Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shredding E-cadherin. *Cancer.* 2007;109(9):1811-1820.

Tabell 1. Jämförelse mellan kit för preparation av RNA från murin tumörvävnad 23284.

Kit	Mängd vävnad (mg)	Volym (μl)	RNA koncentration (ng/ μl)	Total mängd RNA (μg)	Utbyte ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	RIN ^b
Qiagen Allprep Kit	21,4	50	526,3	26,3	1,2	6,1
Qiagen Allprep Kit ^a	16,3	50	458,8	22,9	1,4	7,0
NucleoSpin TriPrep	16,4	60	45,6	2,7	0,2	7,3
NucleoSpin TriPrep ^a	16,0	60	127,9	7,7	0,5	8,2
Norgen Kit	7,2	50	216,4	10,8	1,5	6,5
Qiagen RNeasy Kit	8,5	50	84,9	4,2	0,5	7,8
NucleoSpin RNA	4,0	60	115,3	6,9	1,7	8,7
NucleoSpin RNA Plus	4,0	60	37,0	2,2	0,6	^c

^a Provet frystes in efter homogenisering och preparerades nästa dag

^b RNA Integrity Number (1-10). Högt RIN-värde motsvarar ett mer intakt RNA.

^c Inget RIN-värde erhöles

Tabell 2. Jämförelse mellan kit för preparation av RNA från PC-3 celler (2*10⁶)

Kit	Volym (µl)	RNA-koncentration (ng/µl)	Total mängd RNA (µg)	RIN ^a
Qiagen Allprep Kit	50	554,5	27,7	9,9
NucleoSpin TriPrep	60	212,9	12,8	9,5
Norgen Kit	50	266,3	13,3	9,4
Qiagen RNeasy Kit	50	519,0	26,0	9,8
NucleoSpin RNA	60	220,8	13,2	10,0
NucleoSpin RNA Plus	60	835,8	50,1	10,0

^aRNA Integrity Number (1-10). Högt RIN-värde motsvarar ett mer intakt RNA.

Tabell 3. Prisjämförelse mellan kit.

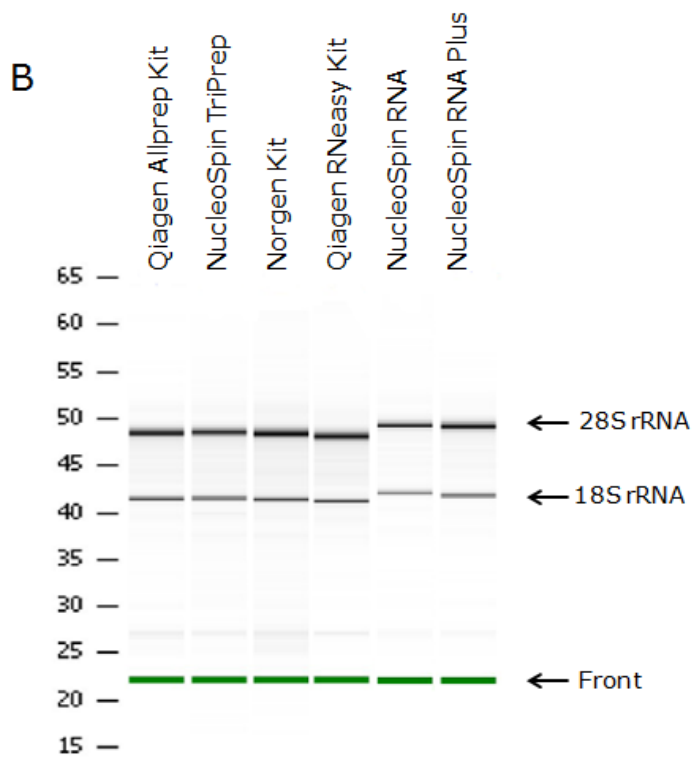
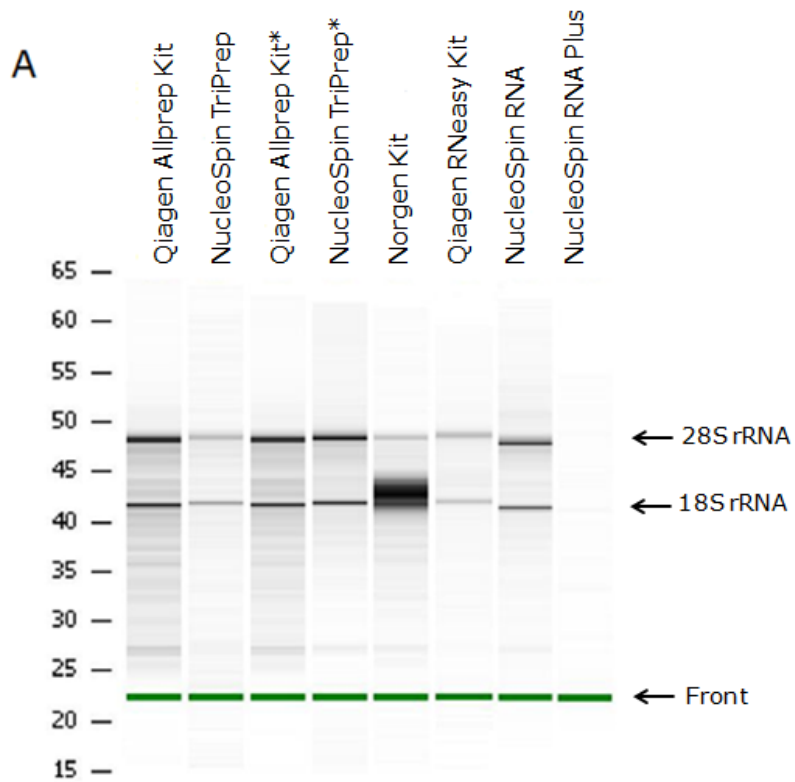
Kit (antal preparationer)	Pris/preparation (kr)
Qiagen Allprep Kit	105
NucleoSpin TriPrep (50)	61
NucleoSpin TriPrep (250)	54
Norgen Kit (50)	33
Norgen Kit (100)	30
Qiagen RNeasy Kit	42
NucleoSpin RNA (50)	43
NucleoSpin RNA (250)	32
NucleoSpin RNA Plus (50)	49
NucleoSpin RNA Plus (250)	31

Tabell 4. Jämförelse mellan Ct-värden för de humana cellinjerna.

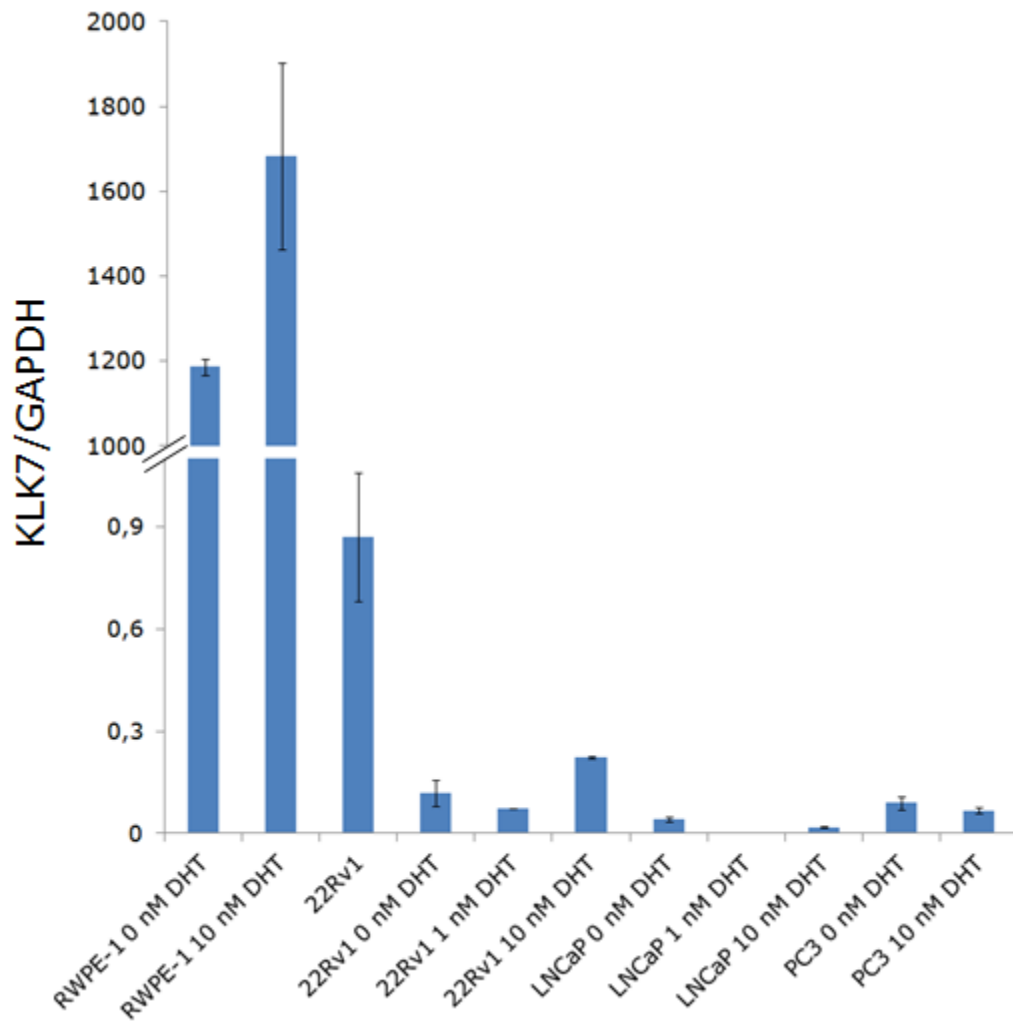
Prov	Ct-värden						ΔCt	Mängdskillnad ($2^{-\Delta Ct}$)	Relativ mängdskillnad ^a
	KLK7		GAPDH		Ct-medelvärde				
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2	KLK7	GAPDH			
LNCaP 0 nM DHT	37	36	24	24	36	24	12	0,00024	0,125
LNCaP 1 nM DHT	>40	>40	23	23	40	23	17	0,00001	0,004
LNCaP 10 nM DHT	36	37	22	22	37	22	15	0,00003	0,016
22Rv1 0 nM DHT	36	37	27	27	36	27	9	0,00195	1,000
22Rv1 1 nM DHT	33	>40 ^b	21	21	33	21	12	0,00024	0,125
22Rv1 10 nM DHT	35	34	26	25	34	25	9	0,00195	1,000
PC3 10 nM DHT	36	35	23	23	35	23	12	0,00024	0,125
PC3 0 nM DHT	35	35	24	21	35	22	13	0,00012	0,063
RWPE-1 10 nM DHT	22	22	26	26	22	26	-4	16,00000	8192
RWPE-1 0 nM DHT	22	22	24	24	22	24	-2	4,00000	2048
22Rv1	32	32	25	24	32	25	7	0,00781	4,000
NegK	>40	>40	>40	>40					

^a Beräknad utifrån 22Rv1 0 nM DHT (Dihydrotestosteron)

^b Värdet struket på grund av att för liten provmängd applicerades



Figur 1. Gelbilder från analys av RNA-proverna med Bioanalyser på A) murin tumörvävnad 23284 och B) PC-3-celler. Prov markerade med * preparerades dagen efter homogenisering.



Figur 2. Genuttryck av *KLK7* hos de humana cellinjerna vilket uppmättes under ett experiment i dubbelprov med q-PCR. Resultaten anges relativt till *GAPDH*-uttryck. Värdena är angivna som medelvärde ± SE.