

**Ekspresjon av DNA-reparasjonsprotein  
PARP1 i ulcerøs kolitt og kolorektalkreft; en  
immunhistokjemisk studie**

Sean Pham  
November 2018

**OSLOMET**

# **Ekspresjon av DNA-reparasjonsprotein PARP1 i ulcerøs kolitt og kolorektalkreft; en immunhistokjemisk studie**

Av

**Sean Pham**

Masteroppgave (60 sp)

November 2018

Masterstudium i Biomedisin,  
Fakultet for Helsevitenskap,  
Institutt for Naturvitenskapelige Helsefag,  
OsloMet - Storbyuniversitetet

Utført ved Avdeling For Patologi,  
Oslo Universitetssykehus

Veileder: Paula De Angelis

**OSLOMET**





# Forord

Gjennomføringen av denne masteroppgaven har vært en lærerik prosess, som har gitt meg innblikk hvordan forskning utføres i praksis. Det har vært mange lange dager på laboratoriet, foran PC og lesesalen som til slutt resulterte i en ferdig oppgave. Denne masteroppgaven ble gjennomført ved avdeling for patologi ved Rikshospitalet og Radiumhospitalet i løpet av 2017-2018. Jeg setter pris på at arbeidsgiver var villig til å la meg gjennomføre denne oppgaven hos dem. Jeg setter også stor pris på all praktisk og faglig tilrettelegging de ansatte ved biomedisinutdanningen ved OsloMet har bidratt med.

En stor takk går til min veileder Paula De Angelis for å konstruere en interessant oppgave, og for all tid hun satt av til meg for oppfølging. Alle dine faglige og praktiske råd har vært veldig verdifulle for meg under oppgaveprosessen. Jeg må også takke Lisa Yuen for hennes praktiske bidrag i forbindelse med western blot analyse.

En stor takk går også til alle gode kollegaer ved FISH-laboratoriet ved Radiumhospitalet som har vært samarbeidsvillige og gitt meg både tid og rom for å gjennomføre denne oppgaven. Det hadde ikke vært mulig å la seg gjøre uten dette samarbeidet.

Takk til Ingrid og Vidar Eldøy for tiden dere satt av til å korrekturlesning. Dette var et verdifullt bidrag.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til familie og nære venner for støtten jeg har fått gjennom denne studieperioden.

## Sammendrag

Cellens genomiske integritet er helt essensielt for alt liv, og utsettes konstant for både endogene og eksogene påvirkninger. For å ivareta denne integriteten, har cellen gjennom evolusjonen utviklet en rekke biomekanismer som samlet utgjør cellens DNA-skaderespons. En av disse mekanismene er DNA-reparasjon; bestående av et omfattende nettverk med reparasjonsproteiner som deltar i elimineringen av DNA-skader. I hver enkeltcelle induseres det så mye som  $10^5$  ulike former for DNA-skader daglig. Akkumulasjon av DNA-skader over tid fremmer genomisk instabilitet, som er en sentral driver av karsinogenesen. En av de mest potente kildene til DNA-skader er reaktive oksygen- og nitrogenarter (RONS).

Ulcerøs kolitt er en tarmsykdom som skyldes kronisk idiopatisk inflammasjon. Sykdommen rammer kolon i ulik grad og omfang. Oksidativ- og nitrativ stress i kronisk inflammet vev fremmer et tumorinitierende mikromiljø, og tilrettelegger for økt RONS-syntese. Som resultat av dette, forekommer det ofte høye konsentrasjoner av DNA-skader i kolon hos denne pasientgruppen. Man tror dette er en viktig bidragende årsak til at denne pasientgruppen har en økt predisposisjon for å utvikle kolittassosiert kolorektalkreft (CAC). I motsetning til sporadisk kolorektalkreft (CRC), rammer CAC ofte yngre pasienter ettersom progresjonen fra de dysplastiske UC-lesjonene til CAC skjer raskere i forhold til utviklingen av sporadisk CRC.

Vår forskningsgruppe har tidligere med immunhistokjemi, digitalt patologisk verktøy, og semikvantitativ celledetelling studert ekspresjonsmønsteret til DNA reparasjonsproteinet NUCKS1 i kolonbiopsier fra pasienter med UC og sporadisk CRC. Her ble det påvist en invers korrelasjon mellom NUCKS1-ekspresjon og sykdomsprogresjon. I denne studien ser vi videre på ekspresjonsmønsteret av PARP1 i de samme pasientgruppene. PARP1 er et enzym, som katalyserer overføringen av polymerkjeder med ADP-riboseenheter til en rekke målproteiner involvert i DNA-reparasjon. Denne transferaseaktiviteten er en viktig post-translasjonell modifisering som initierer DNA-reparasjon når PARP1 detekterer DNA skader. Selv om PARP1 har vist seg å være biologisk multifunksjonell, er den mest kjent for sin rolle som DNA-skadesensor i base-eksisjonsreparasjon mekanismen. Resultatet vi har fått i denne studien viser at det forekommer en høy PARP1-ekspresjon i både UC og CRC. Når vi i tillegg sammenligner ekspresjonsnivået mellom sykdommene, ser vi at UC-lesjonene har et kraftigere PARP1-ekspresjonsnivå i forhold til CRC ( $p < 0.05$ ), noe som kan bety at PARP1 og DNA-reparasjon har en betydningsfull rolle i UC patogenese.

## **Abstract**

The cell's genomic integrity is essential for all life forms, and is constantly being exposed to both endogenous and exogenous threats. In order to preserve this integrity, through evolution, the cells have developed a toolbox of biomechanisms which collectively make up the cells' DNA damage response. One of these mechanisms is DNA repair; consisting of an extensive network of repair proteins, specialized in repairing DNA damage. The daily amount of DNA damage induced in each cell can be as much as  $10^5$  lesions. Accumulation of DNA damage over time trigger genomic instability, which is a hallmark of cancer. Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) are among the most common sources of DNA damage.

Ulcerative colitis is an intestinal disease caused by chronic idiopathic inflammation, affecting the colon to a varying extent and degree. Oxidative and nitrative stress in chronic inflamed tissue promotes a tumor microenvironment that accelerates the increased production of RONS. As a result, the concentration of DNA damage is high in the colon epithelia of UC patients. It is believed that high concentrations of DNA damage are an important predisposing factor for the progression to colitis-associated colorectal cancer (CAC) in UC-patients. Unlike sporadic colorectal cancer (CRC), CAC is more frequent in younger individuals as progression from dysplastic UC to CAC may advance faster compared to the more prolonged progression of sporadic CRC.

In a previous study, our research group has used immunohistochemistry, digital pathology, and semi-quantitative cell counting to study the expression pattern of the NUCKS1 DNA double-strand break repair protein in colon biopsies from patients with UC and sporadic CRC. An inverse correlation between NUCKS1 expression and disease progression was demonstrated. In this study we looked at the expression pattern of PARP1 in the same groups of patients. PARP1 is an enzyme which catalyzes the transfer of polymer chains with ADP-ribose units to target proteins involved in DNA repair. This transferase activity is an important post-transnational modification that initiates DNA repair when PARP1 senses DNA damage. Although PARP1 is biologically multifunctional, it is best known for its function as DNA nick-sensor in the base-excision repair pathway. Our results from this study show that the PARP1 expression is generally increased in both UC and CRC. However, when we compared the levels of PARP1 expression in both diseases, we observed that UC lesions displayed a stronger level of PARP1 expression than CRC ( $p < 0.05$ ), which could indicate that PARP1 and DNA repair may be critically involved in the UC pathogenesis.

## Forkortelser

8-OHdG – 8-Oxo-2'-deoxyguanosine

ADP – Automatic digital photosystems (NO: Automatisk digitalt bildesystem)

APE1 – Apurinic/aprimidinic endonuclease 1

ATM - Ataxia-telangiectasia mutated protein

ATR – Ataxia telangiectasia-mutated and RAD3-like protein

BER – Base excision repair (NO: Base-eksisjonsreparasjon)

BRCA1/2 – Breast cancer protein/gene 1 or 2

CAC – Colitis-associated colorectal cancer (NO: Kolitt-assosiert kolorektalkreft)

CDKN2A - Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A,

CIMP – CpG-island methylator phenotype (NO: CpG-øy metylator fenotype)

CIN – Chromosomal instability (NO: Kromosomal instabilitet)

CRC – Colorectal cancer (NO: Kolorektalkreft)

DBS-R – Doublestrand break repair (NO: Dobbelttrådbrudd reparasjon)

DDR – DNA-damage response (NO: DNA-skaderespons)

DSB – Doublestrand break (NO: Dobbelttrådbrudd)

DSS – Dextran sulfatnatrium

AOM – Azoksymetan

FFPE – Formalin-fixed and paraffin-embedded (NO: Formalinfiksert og parafininnstøpt)

ERCC6 - Excision repair Cross-Complementing, group 6

GG-NER – Global genomisk nukleotid-eksisjonsreparasjon

HIER – Heat induced epitope retrieval (NO: Antigendemaksering/antigengjenoppretting)

hMLH1 – Human MutL homolog 1

hMSH2 – Human MutS homolog 2

hMSH6 – Human MutS homolog 6

hPMS2 – Human postmeiotic segregation 2

HR-R – Homologous recombination repair (NO: Homolog rekombinasjonsreparasjon)

I-κB – Inhibitor av κB

IBD – Inflammatory bowel disease (Inflammatorisk tarmsykdom)

IHC – Immunohistochemistry (NO: Immunhistokjemi)

IKK –Inhibitor av κB kinase

MGMT - O-6-methylguanine-DNA methyltransferase

MMR – Mismatch repair (NO: Misparingsreparasjon)

MSI – Mikrosatellitt instabilitet

NAD<sup>+</sup> – Nikotinamid adenin dinukleotid (oksidert form)

NER – Nucleotide excision repair (NO: Nukleotid-eksisjonsreparasjon)

NF-κB – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NHEJ-R – Non-homologous end joining repair (NO: Ikke-homolog endebindingsreparasjon)

NSAID – Non-steroidal anti-inflammatory drugs

NUCKS1 – Nuclear casein kinase and cyclin dependent kinase substrate 1

OGG1 – 8-Oxoguanine glycolase

PALB2 – Partner and localizer of BRCA 2 protein

PAR – Poly-ADP ribose

PARP1 – Poly-ADP ribose polymerase 1

PARPi – PARP inhibitor (NO: PARP-hemmer)

PI3K-kinase – Phosphatidyl- inositol 3-kinase

PIAS $\gamma$  – Protein inhibitor of activated STAT protein  $\gamma$

PSC – Primary sclerosing cholangitis (NO: Primær skleroserende kolangitt)

PTM – Post-translasjonell modifisering

QIF – Quantitative fluorescence (NO: Kvantitativ fluorescens)

RNS – Reactive nitrogen species (NO: Reaktive nitrogenarter)

RONS – Reactive oxygen and nitrogen species (Reaktive oksygen – og nitrogenarter)

ROS – Reactive oxygen species (NO: Reaktive oksygenarter)

SL – Syntetisk letalitet

SNP – Single nucleotid polymorphism (NO: Enkeltnukleotid polyorfisme)

SSB – Singlestrand break (NO: Enkeltrådebrudd)

SSB-R – Singlestrand break repair (NO: Enkeltrådbrudd reparasjon)

STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3

TC-NER – Transcription-coupled nucleotid excision repair (NO: Transkripsjonskoblet nukleotid-eksisjonsreparasjon)

TMA – Tissue microarray (NO: Vevsmikromatrise)

UC – Ulcerative colitis (NO: Ulcerøs kolitt)

WB – Western blotting

XPC - Xeroderma pigmentosum, complementation group C

XRCC1 – X-ray repair cross-complementing protein 1

$\gamma$ H2AX –  $\gamma$ H2A histon familiemedlem X

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b>	<b>1</b>
<b>SAMMENDRAG</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>FORKORTELSER</b>	<b>4</b>
<b>1 INNLEDNING</b>	<b>8</b>
<b>1.1 ANATOMI OG HISTOLOGI AV KOLON</b>	<b>8</b>
<b>1.2 ULCERØS KOLITT</b>	<b>10</b>
1.2.1 KOLITTASSOSIERT KOLONREKTALKREFT	12
1.2.2 MAKRO - OG MIKROSKOPISK KARAKTERISERING AV UC	12
<b>1.3 KRONISK INFLAMMASJON OG DYSPLASI</b>	<b>13</b>
<b>1.4 SPORADISK KOLONREKTALKREFT</b>	<b>14</b>
1.4.1 MAKRO - OG MIKROSKOPISK KARAKTERISERING AV CRC	16
<b>1.5 MOLEKYLÆR PATOGENESE - GENOMISK INSTABILITET I CRC OG CAC</b>	<b>17</b>
1.5.1 CIN	18
1.5.2 MIKROSATELLITTINSTABILITET (MSI)	19
1.5.3 CIMP	20
<b>1.6 DNA-SKADERESPONS (DDR) OG DNA-SKADER</b>	<b>20</b>
<b>1.7 DNA-REPARASJON</b>	<b>23</b>
<b>1.8 POLY ADP-RIBOSE POLYMERASE 1 (PARP1)</b>	<b>25</b>
1.8.1 PARP1 I DNA-REPARASJON	26
1.8.2 PARP1 OG KREFT	27
1.7.3 PARP-HEMMERE (PARPi)	28
<b>2. MÅL MED OPPGAVEN</b>	<b>30</b>
<b>3 FORSØKSMATERIALE OG METODER</b>	<b>30</b>
<b>3.1 PASIENTMATERIALE</b>	<b>30</b>
3.1.1 ETISKE VURDERINGER	31
<b>3.2 VEVSMIKROMATRISJE (TMA) - OPPSETT</b>	<b>31</b>
<b>3.3 IMMUNHISTOKJEMI (IHC)</b>	<b>32</b>
3.3.1 OPTIMALISERING AV ANTISTOFF FORTYNNING	32
3.3.2 OPTIMALISERING AV ANTIGENDEMASKERING - VALG AV BUFFER OG pH-NIVÅ	33
3.3.3 FREMGANGSMÅTE	33
<b>3.3 DIGITAL BILDESKANNING</b>	<b>34</b>
<b>3.4 IMMUNHISTOKJEMISK CELLETELLING AV PARP1-KJERNEPROTEIN</b>	<b>34</b>
<b>3.5 WESTERN BLOTTING</b>	<b>35</b>
<b>3.6 STATISTISK ANALYSE</b>	<b>37</b>
<b>4 RESULTAT</b>	<b>38</b>

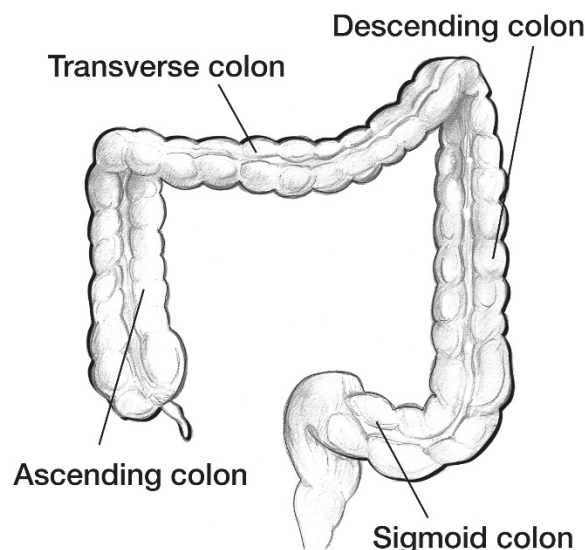
<b>4.1 IHC-FARGERESULTATER AV PARP1</b>	<b>38</b>
<b>4.2 PARP1-EKSPRESJON I UC, CRC, OG NORMAL MUCOSA</b>	<b>41</b>
<b>4.3 SAMMENLIGNING AV PARP1-UTRYKK MELLOM UC, CRC, OG NORMAL MUCOSA</b>	<b>45</b>
<b>4.4 PARP1-UTRYKK I FORHOLD TIL DYSPLASIGRADERING AV UC PASIENTER</b>	<b>48</b>
<b>5 DISKUSJON</b>	<b>51</b>
<hr/>	
<b>5.1 PARP1-EKSPRESJON I UC OG SPORADISK CRC</b>	<b>51</b>
<b>5.2 PARP1 OG TP53 I UC OG CRC</b>	<b>56</b>
<b>5.3 PARP1 SIN POTENSIELLE ROLLE I UC-PATOGENESE OG CAC</b>	<b>58</b>
<b>5.4 METODEEVALUERING</b>	<b>60</b>
5.4.1 IHC	60
5.4.2 IMMUNHISTOKJEMISKE TELLINGS - OG SCORINGSSYSTEMER	61
5.4.3 TMA	66
5.4.4 DIGITAL PATOLOGI	67
<b>6 KONKLUSJON</b>	<b>68</b>
<hr/>	
<b>REFERANSELISTE</b>	<b>69</b>
<hr/>	

# 1 Innledning

## 1.1 Anatomi og histologi av kolon

Tykkntarmen består av coecum (blindtarm), kolon, rektum, og anus, som til sammen utgjør den terminale kanalen av gastrointestinaltraktus med en lengde på ca. 1,5 m.<sup>1</sup> Kolon er den største delen av tykkntarmen. Den er anatomisk inndelt i 4 ulike hovedsegmenter som består av; (1) kolon ascendes (oppadstigende del); (2) kolon transversum (tverrgående del); (3) kolon descendes (nedadgående del); og (4) kolon sigmoideum (terminale del) (figur 1).<sup>2</sup>

Hovedfunksjonen til kolon er absorpsjon av vann, elektrolytter og midlertidig lagring og transport av ufordøyd mat (feces) som tilføres fra tynntarmen.<sup>3</sup>



(Figur 1. Illustrasjon av kolon som viser lokalisasjon av kolon ascendes, kolon transversum, kolon descendes, og kolon sigmoideum. Figuren er gjengitt med tillatelse fra National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK).)

Histologisk, er tarmveggen bygget opp av fire forskjellige vevslag.<sup>1(s.690-92)</sup> Fra tarmlumen og utover består disse lagene av (figur 2):

1. *Mucosa* består av mykt vev uten folder og vilier, som kler kanalens indre lumenale del. Her finnes multiple tettliggende tubulære kjertler, Lieberkühnske krypter. Disse strekker seg gjennom mucosa til muscularis mucosa (figur 3).<sup>1(s.694)</sup> Fornyelsen av mucosaepitelet foregår i bunnen av disse kryptene hvor et fåtall multipotente stamceller er lokalisert.<sup>4</sup> Disse stamcellene gir opphav til de ulike epiteliale



celletypene som konstruerer kolons Lieberkühnske krypter. De omfatter absorptive celler, mucinproduserende begerceller, endokrine celler og tuft celler.<sup>1(s.695-96)</sup> Under differensieringen migrerer de absorptive cellene, begercellene, og tuftcellene sakte oppover mot lumen hvor de modnes og erstattes hver 3. til 4. dag.<sup>1(s.694)</sup>

Det mellomliggende vevet i mucosa som skiller hver enkelt krypt fra hverandre, kalles Lamina propria. Det består hovedsakelig av løst bindevev med kapillærer, lymfeknuter og et høyt antall leukocytter som utgjør tarmkanalens immunbarriere.<sup>1(s.697-98)</sup>

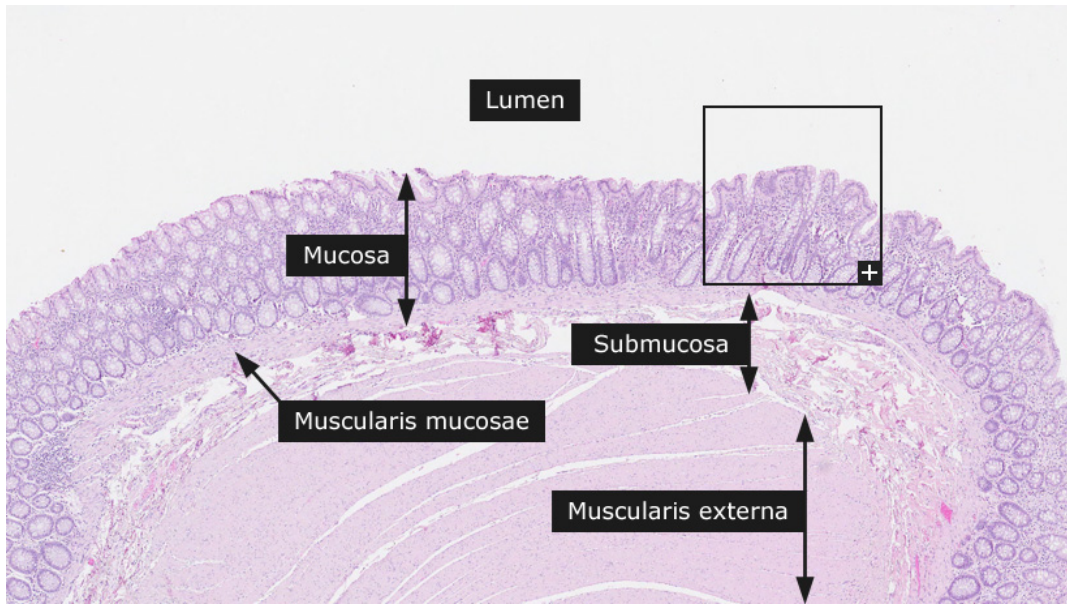
Ut mot enden av mucosa finnes et tynt lag muskelvev, mucosa muscularis, som skiller mucosa fra submucosa. Mucosa muscularis utgjør en spesielt viktig grense i den kolorektale kreftdiagnostikken, da den histologisk avgjør om tumor er av lokal opprinnelse eller metastaserendem, avhengig av om dette vevslaget har blitt penetrert eller ikke.<sup>5</sup>

2. *Submucosa* kjennetegnes av cellefattig vev med høyt kollageninnhold, samt noe fett.<sup>1(s.699)</sup> Store blodårer som forsyner kolon samt nerver og ganglier finnes også her.

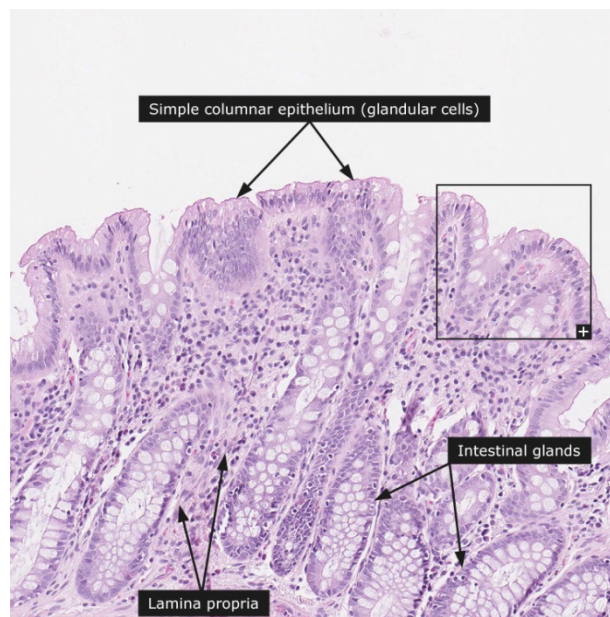
3. *Muscularis propria (externa)* består av to lag med glatt muskulatur adskilt av bindevev.<sup>1(s.699)</sup> Det ene laget består av langsgående fibre, mens det andre av sirkulære. Både nerver, vener og arterier penetrerer dette muskellaget.

4. *Serosa* utgjør kolonkanalens ytterste lag, og består av et tynt lag bindevev med blod- og lymfeårer.<sup>1(s.699)</sup> På flere områder er dette bindevevet i tillegg kledd med peritoneum (bukhinne).

Ved normal kolonhistologi, er den luminale overflaten regelmessig og rett.<sup>6</sup> De tubulære kryptene er tettpakket, uten avgreininger, og parallelt posisjonert i forhold til hverandre (figur 3). Begerceller finnes i høyt antall.<sup>6</sup> Lamina propria inneholder moderat mengde med varierende typer leukocytter (figur 3).<sup>6</sup>



(Figur 2. Kolons ulike vevslag farget med hematoksylin-eosin. Serosa er ikke vist på figuren. Bildet er gjengitt med tillatelse fra Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org).)



(Figur 3. Vertikal forstørrelse av Lieberkhünske krypter (intestinale kjertler) i kolon med Lamina propria, farget med hematoksylin-esoin. Bildet er gjengitt med tillatelse fra Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org).)

## 1.2 Ulcerøs kolitt

Ulcerøs kolitt (UC) er en kronisk inflammatorisk tarmsykdom (IBD) som rammer tykktarmen og endetarmen i ulik grad og omfang.<sup>7</sup> Sykdomsetiologien er fortsatt ukjent, men man tror at det kan skyldes en genetisk predisposisjon som får immunforsvaret til å respondere irregulært på den normale tarmfloraen.<sup>7</sup> Resultatet av denne vedvarende inflammasjonstilstanden er

oksidative og nitrative stresskader i kolon.<sup>8</sup> Familiehistorie med tidligere IBD-sykdommer anses som et av de viktigste risikofaktorene, men miljøfaktorer og episoder med tidligere gastrointestinale infeksjoner har også blitt pekt ut som sannsynlige risikofaktorer.<sup>7</sup>

Forekomsten av UC på verdensbasis er høyest i Nord Amerika, Storbritannia, og Nord Europa, der insidensen i Europa er på 1,2- 20,3 tilfeller per 100 000 personer årlig, mens prevalensen er på 7,6 – 246 tilfeller per 100 000 personer årlig.<sup>9</sup> Lavest forekomst finner man i Asia, men er økende i denne verdensdelen på grunn av gradvis tilpasning til vestlig kosthold og livsstil. Det er også en tett assosiasjon mellom primær skleroserende kolangitt (PSC) og UC, ettersom prevalensen av UC blant PSC-pasienter er på 70-80 %.<sup>10</sup> Forekomsten av UC har også en bimodal aldersfordeling som er høyest i aldersgruppen fra 15-30 år og 50-70 år.<sup>7</sup>

De vanligste symptomene er blodig diaré, blødning fra endetarmen, og abdominal smerte, men symptomer som feber, endrede avføringsvaner og leddsmerter, forekommer også.<sup>11</sup> Den histologiske klassifiseringen av sykdommens utviklingsstadier er utarbeidet av Riddell et. al, og baserer seg på dysplasi-gradering.<sup>12</sup> Den dysplastiske graderingen inndeles i; ikke dysplasi (regenarsjon), uklassifiserbar dysplasi, og dysplasi (lavgradig eller høygradig). Dysplasi er en premalign epitelial lesjon, og er en av de viktigste markørene for inflammasjons-relatert kreft i tarmen.<sup>12</sup> De morfologiske kriteriene som brukes i graderingen av dysplasier er basert på cytologiske og vevsstrukturelle forandringer som oppstår i tarmkryptene.<sup>13</sup> Den fenotypiske klassifiseringen er basert på Montrealklassifiseringen.<sup>14</sup> Kriteriene som vurderes her, er sykdommens aktivitet og omfang. Aktiviteten graderes i mild, moderat, eller alvorlig, mens omfanget inndeles i prokitt (rektum), venstre kolitt, eller pankolitt (hele kolon).

Sykdommen er sjelden livstruende, men på grunn av dens kroniske tilstand går behandlingen ut på å indusere klinisk remisjon og forhindre tilbakefall med bruk av inflammasjonsdempende - og immunsupprimerende medisiner, som for eksempel glukortoider og mesalazine (5-ASA aminosalicylat).<sup>15</sup> For pasienter som ikke responderer på en intensiv medikamentell behandling, kan kolektomi være eneste behandlingsmulighet.<sup>15</sup> I tilfeller hvor det ses høygradig dysplasi, eller ved mistanke om kolorektalkreft (CRC), blir profylaktisk kolektomi anbefalt.<sup>15</sup>

### 1.2.1 Kolittassosiert kolonrektalkreft

En av de mest alvorlige komplikasjonene hos UC-pasienter er utviklingen av kolittassosiert kolorektalkreft (CAC), som er en undertype av sporadisk kolonrektalkreft (CRC).<sup>7</sup> CAC utgjør omtrent 1 % av alle tilfeller med kolorektale kreftformer.<sup>16</sup> Og rundt 10-15 % av dødsfallene blant IBD-pasienter skyldes CAC.<sup>17</sup> De to største risikofaktorene for utvikling av CAC hos UC-pasienter er sykdomsvarigheten, som øker med 2 %, 8 % og 18 % etter 10 år, 20 år og 30 år, respektivt etter diagnose.<sup>18</sup>

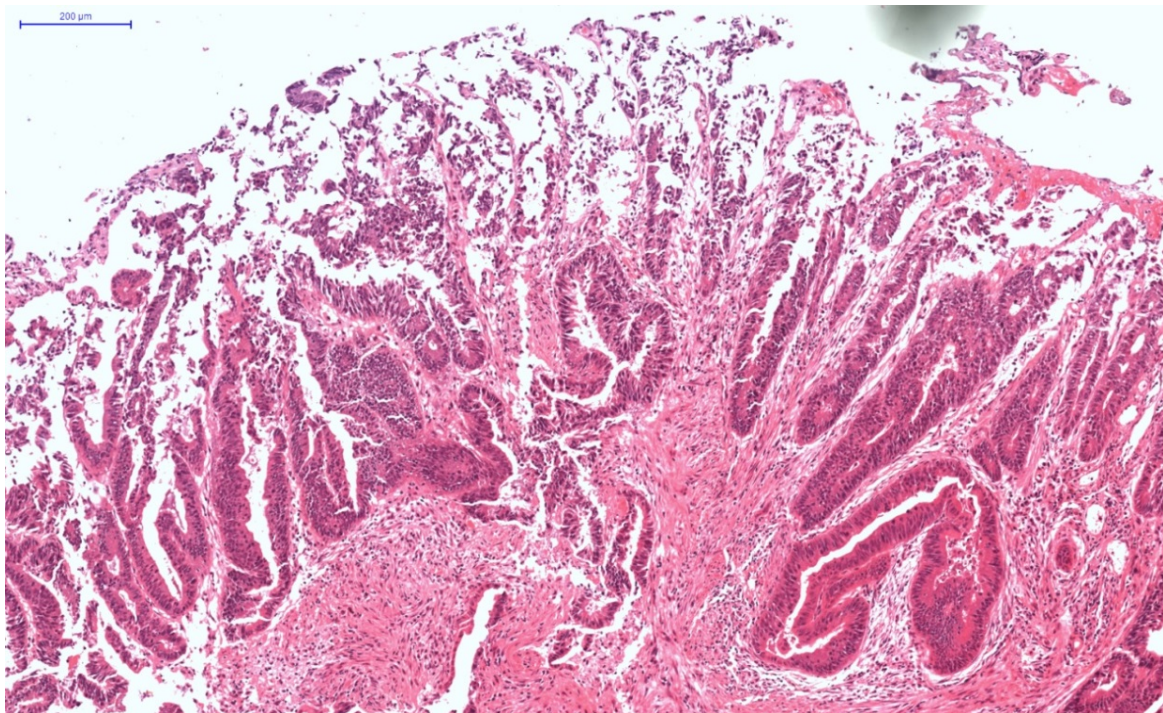
Den andre risikofaktoren er sykdomsomsfanget, der utstrakt kolitt (pankolitis) gir høyest kreftrisiko.<sup>19</sup> Siden IBD-sykdommer ofte debuterer i tidlig levealder, rammer CAC, i motsetning til sporadisk CRC, oftere yngre individer i alderen mellom 15 og 30 år.<sup>19</sup> I motsetning til sporadisk CRC, som har utgangspunkt bare i premaligne adenomer eller polypper, er den neoplastiske utviklingen i CAC multifokal, med utgangspunkt i flate dysplastiske lesjoner som kan oppstå simultant over hele kolon.<sup>7</sup> I forhold til de polypoide lesjonene i sporadisk CRC, kjennetegnes de flate lesjonene i CAC som mer infiltrative. En av grunnene til dette er fordi de flate lesjonene er vanskeligere å oppdage med endoskopi og radiologi.<sup>6(s.1476)</sup>

### 1.2.2 Makro - og mikroskopisk karakterisering av UC

Det makroskopiske bildet av UC varierer avhengig av sykdomsaktiviteten, der kolon kan være fra normal til å være uttalt forandret. Ved kronisk sykdom er mucosa granulert, uten hemoragi og inflammatoriske polypper.<sup>20</sup> Ved aktiv sykdom er den mucosomale overflaten i kolon atrofisk, forvrent og forkortet på grunn av muskelkontraksjon.<sup>2(s.249)</sup> Slimhinneepitelet er granulert, rødaktig og hemoragisk.<sup>2(s.249)</sup> Overflatiske ulcerasjoner med slim og puss kan forekomme i tillegg.<sup>2(s.249)</sup>

Det typiske mikroskopiske sykdomsbildet i UC kjennetegnes av inflammatoriske forandringer, som utelukkende ses i kolons mucosa og i øverste del av submucosa (figur 4).<sup>2(s.250-51)</sup> Vevsbeskrivelsen innebærer uregelmessig mucosa-arkitektur med blant annet ulcerasjoner.<sup>2(s.250-51)</sup> Antallet Lieberkhünke krypter er redusert. I tillegg er de gjenværende kryptene forkortet, har mistet sine parallelle ordninger i forhold til hverandre og danner

istedet forgreininger.<sup>6(s.1459)</sup> Antallet begerceller er betydelig reduserte, noe som medfører fortynnet mucinlag.<sup>2(s.250-51)</sup> I Lamina propria ses det betydelig forhøyet infiltrasjon av plasmaceller, lymfocytter, og granulocytter.<sup>2(s.250-51)</sup> De epiteliale cellene som konstruerer tarmkryptene er høyt reaktive. Og om det foreligger dysplasi eller regenerasjon (ikke dysplasi), baseres på hvor uttalte de cytomorfologiske parameterene som f.eks. kjerne/cytoplasma ratio, cellepolaritet, mitotisk aktivitet, kjernehyperkromasi, kjernestørrelse/kontur og pleomorfi er.<sup>6(s.1477-78), 13</sup> Generelt viser «ikke-dysplasi» lett til moderat cytomorfologisk atypi med en vel bevart kryptstruktur. Ved lavgradig dysplasi er cellekjernene mer hyperkromatiske, frostørrede, og avlange. De atypiske trekkene som ses ved lavgradig dysplasi er mer uttalte ved høygradig dysplasi, hvor det i tillegg ses kjernepleomorfi.<sup>13</sup>



(Figur 4. Mikroskopisk bilde av kolon med UC som viser uregelmessig mucosa struktur. Bildet er tatt fra snittpreparat med prøvekode C03-43)

### 1.3 Kronisk inflammasjon og dysplasi

Akutt inflammasjon er en vanlig immunrespons for å bekjempe infeksjoner. Denne formen for inflammasjon er alltid kortvarig og selvregulert gjennom leukocyttenes balanserte syntese av anti- og proinflammatoriske cytokiner. Den opphører opphører igjen straks etter at vevstilhelingen er overstått.<sup>21</sup> Ved kronisk inflammasjon er denne responsen langvarig. Over



tid kan denne tilstanden indusere genomisk instabilitet, som er en sentral driver av karsinogenesen.

Det har lenge vært kjent at vedvarende inflammasjon predisponerer for utvikling av kreft og andre inflammasjonsrelaterte sykdommer.<sup>22</sup> Den vedvarende effekten av pro-inflammatoriske cytokiner i kombinasjon med makrofagenes økte syntese av reaktive oksygen (ROS) - og nitrogenarter (RNS), er med på å generere et tumorfremmende mikromiljø i kolon hos UC-pasienter.<sup>21</sup> Siden det i tillegg pågår en vedvarende vevsregenerasjon med hyppige celledelings - og proliferasjonssykluser, kan dette øke forekomsten av genetiske og epigenetiske forandringer som danner utgangspunkt for dysplasiutvikling.

Et av de viktigste kliniske og epidemiologiske funnene som bekrefter sammenhengen mellom kronisk inflammasjon og kreft, er den beskyttende effekten NSAID medikamenter (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) har mot utviklingen av CRC.<sup>23</sup>

#### **1.4 Sporadisk kolonrektalkreft**

CRC er den tredje vanligste kreftformen på verdensbasis med over 1,8 millioner nye tilfeller årlig.<sup>24</sup> Høyeste sykdomsinsidens i 2018 er i Europa, Nord-Amerika, Oceania, og Øst-Asia, mens den er lavest i Sør-Sentral Asia og Vest-Afrika.<sup>24</sup> Når det gjelder kjønn, er sykdomsinsidensen 30-40 % høyere hos menn enn hos kvinner.<sup>25</sup> Omtrent 75 % av krefttilfellene (inkludert CAC) er sporadiske, mens de resterende skyldes en kjent arvelig predisposisjon.<sup>26</sup>

Utviklingen av CRC er en langsom prosess som ofte inntreffer i sen levealder, der median diagnosealder er 68 år hos menn og 72 år hos kvinner.<sup>27</sup> Under 1 % av individene som får CRC er under 20 år.<sup>25(s.889)</sup> CRC er også blitt diagnostisert hos spedbarn, der den yngste pasienten ved diagnostetidspunkt var 9 mnd. gammel.<sup>25(s.889)</sup> Når yngre pasienter utvikler CRC er det ofte arvelige predisposisjoner, eller IBD-sykdommer som UC involvert.<sup>25(s.899)</sup> I tillegg får yngre pasienter ofte en forsinket diagnose på grunn av sin unge alder. Dette medfører at de ofte diagnostiseres med en høygradig kreftform.<sup>25(s.889)</sup> Livstidsrisikoen for å utvikle CRC uten familiehistorie er på 5-6 % i en alder over 50 år. Denne risikoen øker med 20 % ved 1.grads eller 2.grads familiehistorie, og videre opptil 80-100 % livstidsrisiko ved hereditære

kolonrektale kreftsyndromer som Lynch syndrom eller familiær adenomatøs polypose.<sup>28</sup> Det er ikke pekt ut noen enkel risikofaktor for CRC, men epidemiologiske studier har blant annet identifisert tidligere familiehistorie med CRC,<sup>29</sup> IBD-sykdommer,<sup>19</sup> høyt alkoholforbruk,<sup>30</sup> og høyt inntak av rødt og prosessert kjøtt som mulige risikofaktorer.<sup>31</sup> Ett av de viktigste forebyggende tiltakene er å identifisere og fjerne premaligne polypper eller lesjoner med koloskopi og kirurgi.<sup>32</sup>

De vanligste symptomene for CRC er blant annet blodig avføring, abdominal smerte, endrede avføringsvaner, og uforklarlig vekttap.<sup>33</sup> Rundt 30 % av alle diagnostiserte tilfeller er asymptomatiske.<sup>25(s.886)</sup> Den kliniske betydningen avhenger av om tumor har utviklet seg i høyre eller venstre kolon, og om sykdommen er ved tidlig eller avansert stadium. Ved tidlig oppdagelse er 5 års overlevelsestid på 90 %. Ved avansert sykdom som innebærer spredning til fjerntliggende organer, er 5 års overlevelsestid på 12 %.<sup>25(s.886)</sup> Unge pasienter har verst prognose med 5 års overlevelsestid på 10 % eller mindre.<sup>25(s.886)</sup> I forhold til CAC, har polypoide CRC-lesjoner vist seg å ha bedre prognose ettersom de er lettere å oppdage i tidlig stadium.<sup>34</sup>

Biopsier tas for å bekrefte kolorektalt karsinom, histologisk type, og neoplastisk gradering. TNM-klassifiseringen har i dag gradvis tatt over for Dukes klassifiseringen i den histopatologiske klassifiseringen av CRC. Ved TNM-klassifiseringen beskrives tumorens størrelse (T), om det foreligger metastase til lokale eller regionale lymfeknuter (N), og om det foreligger fjernmetastaser (M).<sup>35</sup>

I den tidligere Dukes klassifiseringen<sup>36</sup> ble stadiene inndelt slik:

- A - Tumor uten gjennomvekst av muscularis propria, uten lymfeknutemetastaser.
- B - Tumor med gjennomvekst av muscularis propria, uten lymfeknutemetastaser.
- C - Tumor med lymfeknutemetastaser.
- D - Fjernmetastaser til andre organer.

Behandlingen som tilbys avhenger av sykdomsstadium. Dersom det ikke foreligger metastase på diagnosetidspunktet, behandles de fleste pasienter med å fjerne av primærsvulsten kirurgisk.<sup>37</sup> Ved lokalavansert CRC (dvs. kun spredning til lokale lymfeknuter) gis det adjuvant behandling med sikte på helbredelse.<sup>38</sup> En slik behandling innebærer pre - eller

postoperativ stråleterapi, etterfulgt med kirurgi. Ved metastatisk sykdom hvor kurativ behandling ikke er oppnåelig, benyttes palliativ behandling med enten kjemoterapi eller stråleterapi.<sup>39</sup> De vanligste metastaselokalisasjonene er lever, lunge, og lymfeknuter.<sup>39</sup>

#### 1.4.1 Makro - og mikroskopisk karakterisering av CRC

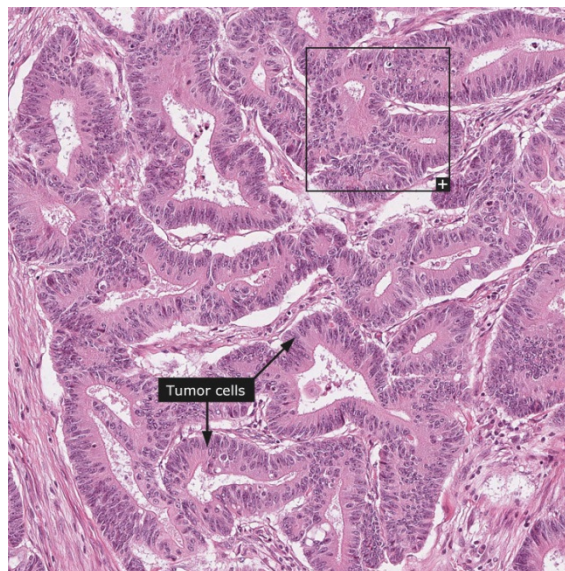
Den histologiske utviklingssekvensen av både sporadisk CRC og CAC, følger ofte en definert multistegssekvens. Sporadisk CRC følger en adenom-karsinom sekvens, mens CAC følger en inflammasjon-dysplasi-karsinom sekvens.<sup>40</sup> I begge disse neoplastiske sekvensene oppstår det mutasjoner i, eller tap av spesifikke tumorsuppressorgener som er med på å drive den neoplastiske utviklingen i tykktarmen. Mens utviklingen av sporadisk CRC initieres gjennom akkumulering av somatiske genmutasjoner over tid, er det følgene av det inflammasjonsinduserte mikromiljøet i UC som er utgangspunktet for CAC.<sup>41</sup>

Den hyppigste tumorvarianten ved sporadisk CRC er adenokarsinomer.<sup>42</sup> Denne typen karsinomer har sitt utgangspunkt i premaligne adenomer, som er dysplastiske lesjoner i tykktarmsepitelet og antas å oppstå fra stamcellene i en enkelt tarmkrypt.<sup>25(s.893)</sup> Mer sjeldne varianter er nevroendokrine-, skvamøs celledede-, adenoskvamøse-, spolcellede- og udifferensierte karsinomer.<sup>5</sup> Makroskopisk, ses det i premalignt sykdomsstadium ofte et adenom i form av en polyp eller en uregelmessig flat hevelse (non-polypoid) i slimhinneoverflaten. Dette adenomet fremstår som mer rødere eller mørkere enn det omkringliggende vevet.<sup>25(s.865-66)</sup> Når adenomet har utviklet seg til karsinom kan det blant annet få ulcerasjoner med irregulær avgrensning, samtidig som det er fastere og blekere i forhold.<sup>25(s.889-90)</sup>

Mikroskopisk danner kolorektale adenokarsinomer kjertellignende strukturer, som er utgangspunkt for den histologiske graderingen av CRC (figur 5).<sup>5</sup> Hvor godt histologisk differensierte disse kjertlene er, avgjør om tumor er lavgradig (veldifferensiert), moderatgradig (middels differensiert) eller høygradig (lavdifferensiert). Av disse graderingene har den høygradige typen dårligst prognose.<sup>34</sup> Generelt viser kolorektale adenokarsinomceller en cytomorfologisk atypi. Denne atypien beskrives ofte med forstørrede - og langstrakte kjerner med høy kerne/cytoplasma ratio og hyperkromasi.<sup>43</sup> I tillegg ses det ofte desmoplastisk reaksjon og spindel celleformasjon rundt kjertelstrukturene.<sup>5</sup> Prolifererende stromale fibroblaster som syntetiserer kollagen og annet bindevevsprotein, er



kilden til denne desmoplasien.<sup>25(s.893)</sup> Mucosa er mer uregelmessig og atypisk i arkitekturen i forhold til normalt. Antallet begerceller er også økt, noe som sannsynligvis skyldes en reaktiv respons på den mucosomale atypien.<sup>25(s.892)</sup> Adenokarsinomer som til slutt vokser gjennom muscularis mucosa og inn i submucosa, blir invasive og sprer seg videre til nærliggende lymfeknuter. I dette tumorstadiet klassifiseres tilstanden som carcinoma *in situ*.<sup>5</sup>



(Figur 5. Mikroskopisk bilde av moderat differensiert adenokarsinom med typiske kjertelignende strukturer. Vevssnittet er farget med hematoksylin-eosin. Bildet er gjengitt med tillatelse av Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org).)

## 1.5 Molekylær patogenese - Genomisk instabilitet i CRC og CAC

De fleste kreftformer har en eller annen underliggende form for instabilitet i det humane genom.<sup>44</sup> Selve uttrykket genomisk instabilitet er et samlebegrep som omfatter ulike molekylære mekanismer som forårsaker alt fra grove kromosomale avvik til mindre genetiske forandringer, og som er godt definert i den kolorektale karsinogenesen.<sup>45</sup> Fenotyper av CRC inndeles etter hvilken mekanisme for genomisk instabilitet som er drivende for kreftutviklingen.<sup>46</sup> CRC-fenotyper omfatter kromosomal instabilitet (CIN), mikrosatellittinstabilitet (MSI), og CpG-øy metylatorfenotype (CIMP).

Selv om genomisk instabilitet er mest assosiert med sporadisk CRC, anses den også å være en sentral driver av CAC progresjonen hos UC-pasienter med dysplastiske lesjoner. De molekylære avvikene som ofte ses i CAC og CRC har mange likhetstrekk, men det som skiller dem er tidspunktet for når den genomiske instabiliteten inntreffer i forhold til den

neoplastiske transformasjonen.<sup>47</sup> Det at det har blitt observert molekylære forandringer i normalt tarmepitel hos UC-pasienter med dysplasi eller kreft, er en indikasjon på at genomisk instabilitet er en tidlig predisponibel hendelse i sykdomsutviklingen.<sup>48, 49</sup> I normalt epitel hos både UC-pasienter uten dysplasi eller kreft og sporadisk CRC-pasienter, er det derimot ikke blitt observert noen form for genomisk instabilitet.<sup>40</sup>

### 1.5.1 CIN

CIN er den vanligste fenotypen i CRC-tumorer, og ses i 80 - 85 % av sykdomstilfellene av sporadisk CRC.<sup>45</sup> Tilfeller av CAC predomineres også av CIN-fenotypen.<sup>49</sup> CIN kjennetegnes av vedvarende tap og tilføyelser av hele eller deler av kromosomsegmenter, som resulterer i et heterogent kromosomalt strukturavvik.<sup>44</sup> En direkte konsekvens av CIN er derfor aneuploiditet og kromosomal rearrangering. Tap av heterozyogistet (LOH), delesjoner, translokasjoner og amplifikasjoner er ofte en følge av kromosomale rearrangeringer. Dette kan videre resultere i funksjonelle endringer i kritiske tumorsuppressorgener og/eller onkogener.<sup>45</sup> I den typiske «CIN-pathway» i sporadisk CRC og CAC, oppstår det mutasjoner i eller LOH av både APC (Adenomatøs polypose coli) (APC) og Tp53 (Tumorprotein 53).<sup>40</sup>

Selv om disse mutasjonene er ganske like i begge disse kolonrektale kreftformene, er mutasjonsrekkefølgen noe forskjellig. APC-mutasjon er ofte en tidlig hendelse i sporadisk CRC, mens den er senere i CAC. Tp53-mutasjon er derimot en senere hendelse i sporadisk CRC, og en tidlig i CAC.<sup>40</sup> Videre forekommer ofte mutasjon i proto-onkogenet KRAS i tidlig stadium av sporadisk CRC,<sup>40</sup> mens det forekommer sjeldnere og trolig senere i CAC.<sup>40, 50</sup> Wnt/ $\beta$ -catenin signalveien er viktig for å regulere tarmepitelcellenes vekst og proliferasjon.<sup>51</sup> Regulatoriske defekter i denne signalveien er også noe som er vanlig i kolorektale kreftformer.<sup>52</sup>

Det er viktig å presisere at det typiske mutasjonsmønsteret i CRC ikke er en absolutt hendelse, men fungerer bare som et verktøy som beskriver de typiske genetiske forandringene som ofte ses ved denne kreftformen. I følge Fearon og Vogelstein (1990) var denne beskrivelsen den typiske mutasjonssekvensen.<sup>53</sup> Smith et. al derimot, var skeptisk til en slik modell, ettersom hans forskningsdata viste at APC, KRAS, og Tp53- mutasjon kun forekom i 7 av 106 tumorer.<sup>54</sup>

Det er trolig flerfoldige underliggende årsaker til at CIN indusere, men feil i mekanismene som styrer kromosomsegregeringen under mitosen er fremmet som en plausibel årsak.<sup>55</sup> Tumorsuppressorgenet APC er blant annet involvert i de mitotiske mekanismene, og mutasjon i dette genet vil følgelig påvirke mitosen og presisjonen i kromosomsegregeringen.<sup>55</sup> CIN-fenotypiske tumorceller er generelt vanskelige å behandle ettersom de lett utvikler behandlingsresistens.<sup>56</sup> Dette kommer av at de gjennomgår en CIN-mediert seleksjonsprosess, og får kromosomvarianter som gir dem bedre tilpasningsevne i forhold til forandringer i mikromiljøet.<sup>56</sup>

### **1.5.2 Mikrosatellittinstabilitet (MSI)**

Mikrosatellitter er tandemrepeterte nukleotidbasesekvenser av varierende lengde (1-6 bp), spredt utover hele genomet.<sup>57</sup> Dets repeterende profil håndteres spesielt dårlig av DNA-polymeraser, slik at det under replikasjonen har en tendens til oppstå nukleotidmisparinger og baseparforskyvninger i mikrosatellitrike områder.<sup>58</sup> Normalt vil cellens mismatch-reparasjon (MMR) tre inn og rette på disse feilene før cellyklusen kan fortsette.<sup>59</sup> Ved MSI er MMR dysfunksjonell, noe som resulterer i høy mutasjonsfrekvens.<sup>59</sup> Den direkte årsaken til denne defekten skyldes enten somatiske mutasjoner, eller epigenetiske forandringer i MMR-gener som blant annet kan være forårsaket av ROS.<sup>60</sup> De vanligste reparasjonsgenene som affiseres i sporadisk CRC er hMLH1 (human MutL homolog 1) og hPMS2 (human postmeiotic segregation 2).<sup>58</sup> MSI-fenotypen forekommer i 15 % av alle pasienter med sporadisk CRC,<sup>58</sup> mens noe sjeldnere i forbindelse med CAC progresjonen.<sup>61</sup> Ervervede mutasjoner i MMR-gener forekommer også. Dette ses ofte hos individer med Lynch syndrom som er predisponert for den arvelige formen for CRC. I tillegg til MMR-genene hMLH1 og hPMS2, affiseres også hMSH2 (human MutS homolog 2) og hMSH6 (human MutS homolog 6) i Lynch syndrom.<sup>58</sup>

MSI-tumorer klassifiseres etter hvor mange mikrosatellittsekvenser fra et panel som er affisert. Ved MSI-lav er bare en av fem spesifikke mikrosatellitter mutert, ved MSI-høy er to eller flere mutert, og ved MSS (mikrosatellittstabil) er ingen muterte.<sup>62</sup> MSI-statusen er spesielt viktig for valg av behandlingsmetode. Prognosen viser seg å være bedre for pasienter med MSI-fenotypen enn for de med CIN-fenotypen.<sup>63</sup> En forklaring på dette er at MSI-fenotypen histologisk kjennetegnes av en høy tilstrømning med tumor-infiltrerende lymfocytter til Lamina propria, som trolig skyldes en naturlig immunrespons på MSI-

genererende tumor antigen.<sup>64</sup> Denne ervervede formen for immunrespons antas å bidra til en forbedret prognose hos MSI-fenotypiske CRC-pasienter.

### 1.5.3 CIMP

CIMP-fenotypen ses isolert hos en undergruppe CRC-pasienter, og er karakterisert av en vedvarende høy forekomst av hypermetylerede CpG-øyer. Innenfor epigenetikken er CpG-øyer DNA-sekvenser med et rikelig innhold av cytosin og guanin basepar som ofte ses i promotorområdene til en rekke sentrale gener.<sup>65</sup>

Normalt reguleres genuttrykket gjennom metyleringsnivået av CpG-øyer, ved at DNA-metyltransferaser binder metylgrupper på cytosin nukleobasen. Denne metyleringen danner en fysisk blokkade og forhindrer transkripsjonsfaktor i å binde seg på promotorområdet.<sup>65</sup> I CRC-tumorer med CIMP-fenotypen er ofte en rekke tumorsuppressorgener som CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A), og reparasjonsgener som hMLH1 og MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) inaktiverte, på grunn av hypermetylerede promotorområder.<sup>66</sup> Funn tyder på at dette inntreffer i tidlig utviklingsfase av CRC.<sup>67</sup> I følge Juo et. als metaanalyse er CIMP forbundet med dårlig overlevelsesprognose blant CRC-pasienter.<sup>68</sup> CIMP er forholdsvis lite studert i CAC, men i følge Sanchez et. als studie er CIMP vanligere i den sporadiske formen enn i CAC.<sup>69</sup>

## 1.6 DNA-skaderespons (DDR) og DNA-skader

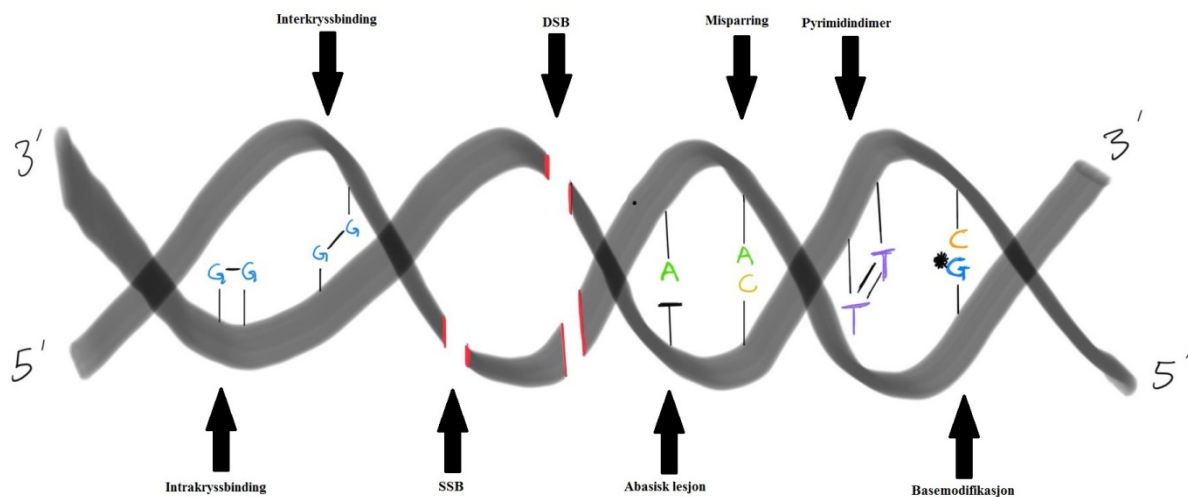
Et individ blir i løpet av levetiden hyppig eksponert for eksogene og endogene påvirkninger som kan forårsake ulike former for DNA-skader. Disse utgjør en stor trussel mot den genomiske integriteten. Det er estimert at det induseres så mye som  $10^5$  DNA-skader daglig i hver celle.<sup>70</sup> Eksempler på potente kilder av DNA-skader er ROS, RNS, ioniserende stråling, UV-stråling og en rekke kjemiske stoffer med mutagene egenskaper.<sup>70</sup> Naturlige biomekanismer som transkripsjon og replikasjon kan også være kilder til DNA-skader.<sup>71</sup>

Når en DNA-skade oppstår, skyldes dette at enten nukleotidbasene eller DNA-molekylets strukturelle formasjon har blitt påført fysiokjemiske forandringer som endrer dets funksjonelle karakter. Disse forandringene er mangfoldige (figur 6). Vanlige former for DNA-skader er:

- *Base - og nukleotidmodifikasjoner*, som er de hyppigst forekommende og opphav til mange punktmutasjoner.<sup>72</sup>
- *Abasiske lesjoner*, som oppstår når en base i DNA-sekvensen går tapt grunnet brudd i den kjemiske bindingen mellom purin-/pyrimidinbasene og DNA-molekylets sukkerfosfat ryggrad.<sup>73</sup>
- *Pyrimidindimere*, som oppstår når UV-stråling induserer lokale strukturendringer og oppsvulminger på DNA-tråden.<sup>74</sup>
- *Inter - og intrakryssbindinger*, som oppstår når det dannes kovalente bindinger innad i DNA-tråden eller mellom to komplementære DNA-tråder.<sup>74</sup>
- *Trådbruddskader*, som oppstår når fosfodiesterbindingene i DNA-ryggraden brytes.<sup>71</sup>

Oppstår bruddet i den ene tråden dannes det et enkeltrådig brudd (SSB), mens et simultant brudd i hver av trådene generer et dobbeltrådig brudd (DSB). DSB utgjør den aller største trusselen mot cellens genomiske integritet, og anses som den mest cytotoksiske formen for DNA-skader som forekommer.<sup>71</sup> Det er nettopp trådbruddskadenes cytotoksiske karakter, den konvensjonelle kreftterapien (cytostatika og strålebehandling) har som mål å indusere i kreftceller; dette for å indirekte aktivere Tp53-mediert apoptose.<sup>75</sup>

Behandlingsresistente kreftceller har vist seg å ha en unormal høy DNA-reparasjonsaktivitet, og eliminerer derfor effektivt cytotoksiske DNA-skader som DSBs.<sup>76</sup> Samtidig er høye nivåer av DNA-skademarkører noe man ser i dysplastiske og neoplastiske stadier i kreft, og en rekke inflammasjonsrelaterte sykdommer. For eksempel har Westbrook et. al påvist høye nivåer av den potent mutagene oksidative basemodifikasjonen 8-oksoguanin i musemodeller med kronisk inflammet tarmvev.<sup>77</sup> De Angelis et. al observerte nylig en økende forekomst av DSB-markøren  $\gamma$ H2Ax ( $\gamma$ H2A histon familiemedlem X) med en parallell synkende forekomst av reparasjonsmarkøren NUCKS1 (Nuclear Casein Kinase And Cyclin Dependent Kinase Substrate 1) i både i sporadiske CRC-tumorer og dysplastiske UC-lesjoner.<sup>78</sup> Disse funnene er blant eksempler som sammenfaller med premisset om at systemisk akkumulasjon av DNA-skader i kombinasjon med redusert DNA-reparasjonsevne, er med på å fremme genomisk instabilitet som er et viktig utgangspunkt for kreftutvikling.<sup>75</sup>



(Figur 6. Eksempler på noen varianter av DNA-skader: Inter- og intrakryssbindinger, SSB, DSB, abasisk lesjon, misparring, pyrimidindimere, og basemodifikasjoner)

For å nøytralisere de skadelige effektene som DNA-skader utgjør, har cellen gjennom evolusjonen utviklet en DNA-skaderespons (DDR). Dette skaderesponssystemet består av et komplekst signalnettverk som overvåker skadestatus på DNA. Sentralt i dette nettverket er et system av ulike DNA-reparasjonsmekanismer, som har som hovedfunksjon å reversere fysiokjemiske skadene som daglig påføres DNA-molekylet.<sup>75</sup> Omtrent 450 reparasjonsproteiner er både direkte og indirekte involvert i dette vedlikeholdsapparatet.<sup>75</sup> Mange av disse reparasjonsproteinene har blitt genetisk bevart gjennom evolusjonen, og demonstrerer hvor essensielt DDR er for å opprettholde liv.<sup>79</sup> Den essensielle betydningen av DDR gjenspeiler seg også i en rekke sjeldne arvelige kreftsyndromer, der cellens DNA-reparasjonsevne er betydelig svekket.<sup>71</sup> Eksempler på slike syndromer er Nijmegen breakage syndrom, Xeroderma Pigmentosum, Lynch syndrom, og familiær adenomatøs polypose syndrom. Felles for pasienter med disse syndromene er at de har en betydelig økt predisposisjon for å utvikle en eller flere kreftformer, inkludert dystrofier og andre ikke-kreftrelaterte sykdommer gjennom hele livsløpet.

En annen viktig del av DDR er sjekkpunktene i cellesyklusens ulike faser, som sikrer feilfri inngang til mitosen (eller meiosen). Her foregår blant annet koordinering og valg av de ulike formene for DNA-reparasjon som skal igangsettes. De viktigste sjekkpunktene ved DNA-reparasjon skjer i overgangen mellom G1 og S-fasen før DNA-transkripsjon finner sted, men også i mindre grad i S-fasen og i G2/M-fasen.<sup>80</sup> Oppdages det en kritisk feil som for eksempel DNA-skade her, blir denne utbedret ved at cellen settes i midlertidig sykularrest. Er feilen for

omfattende, iverksettes i stedet apoptose eller cellulær senescence for å forhindre en potensiell neoplasiutvikling.

På molekylært nivå, er det PI3K-kinasene (phosphatidyl-inositol 3-kinase) ATM (Ataxia Telangiectasia Mutert) og ATR (Ataxia Telangiectasia Rad3-relatert protein) som har den overordnede styringen av syklusarrest og DDR.<sup>81</sup> ATM initierer elimineringen av DSBs via ATM-Chk2 signalveien, mens ATR initierer hovedsakelig elimineringen av SSBs via ATR-Chk1 signalveien.<sup>81</sup> Tp53 er et av de mest kjente tumorsuppressorproteinene som fosforyleres nedstrøms av ATM og ATR, og er et viktig ledd i DDR. I aktivert form kan Tp53 indusere syklusarrest gjennom å øke uttrykket av p21 og p27, som er direkte hemmere av syklin-avhengige kinaser.<sup>81</sup> Tp53 er også sentral i induseringen av apoptose og senescence.<sup>82</sup> De hyppigste genmutasjonene som ses ved kreftsykdommer, forekommer derfor ikke overraskende i nettopp Tp53-genet.<sup>83</sup>

## 1.7 DNA-reparasjon

Cellen har spesialiserte mekanismer som eliminerer spesifikke former for DNA-skader. Noen av disse mekanismene omfatter base-eksisjonsreparasjon (BER), nukleotid-eksisjonsreparasjon (NER), mismatch-reparasjon (MMR), ikke-homolog endebindingsreparasjon (NHEJ-R), og homolog rekombinasjonsreparasjon (HR-R). En detaljert beskrivelse av de ulike DNA-reparasjonsmekanismene er omfattende temaer som overgår denne oppgavens rammeverk. En generell beskrivelse av dem vektlegges nedenfor:

- *BER* eliminerer hovedsakelig SSBs, abasiske seter, og basemodifikasjoner.<sup>73, 81(s.6)</sup> Siden basemodifikasjoner er en av de vanligste DNA-skadene som forekommer,<sup>72</sup> betyr dette at *BER* aktiviteten er høy.
- *NER* eliminerer hovedsakelig større strukturelle lesjoner på DNA-molekylet som omfatter flere basepar, ofte induert av UV-strålinger.<sup>84</sup> Eksempler på slike skader er syklobutan-pyrimidindimere og 6-4 fotoprodukter. Det finnes to varianter av *NER*; global-genomisk *NER* (GG-*NER*) og transkripsjonskoblet *NER* (TC-*NER*). Det som skiller dem er at GG-*NER* er selektiv for DNA-skader som oppstår i hele genomet, mens TC-*NER* er selektiv for DNA-skader som kun oppstår i utrykte gener.<sup>84</sup>

- *MMR* utfører post-replikativ reparasjon av misparrede enkeltbaser, samt misjusterte basepar (insersjons - og delesjonssløyfer) som hyppigst forekommer i områder med mikrosatellitter.<sup>85</sup>
- *NHEJ-R* og *HR-R* konkurrerer om elimineringen av DSBs.<sup>86</sup> Mens *NHEJ-R* er tilgjengelig for cellen under alle fasene i cellyklus unntatt i M-fasen, er *HR-R* kun tilgjengelig i S/G<sub>2</sub> fasen etter replikasjon.<sup>87</sup> *HR-R* er med andre ord forbeholdt replikasjonsaktive celler, mens *NHEJ-R* er for ikke-replikative celler.

*HR-R* er unik i at den reparerer DSBs feilfritt, noe som er helt nødvendig med hensyn til denne skadetypens cytotoxiske karakter. Dette er mulig å oppnå fordi den bruker den homologe DNA-tråden fra søsterkromatiden som templat under reparasjonsprosessen.<sup>86</sup> Denne søsterkromatiden er kun tilgjengelig i S/G<sub>2</sub> fasen under cellyklus.<sup>88</sup> *NHEJ-R* er i motsetning til *HR-R* ikke avhengig av templat, og binder isteden bruddendene i DSBs direkte sammen. Fordi et mindre område av DNA-sekvensen går tapt under prosessen med endebinding, resulterer dette ofte i en mer eller mindre upresis reparasjon som kan generere delesjoner og/eller endringer på den opprinnelige basesekvensen.<sup>86</sup> *NHEJ-R* kan derfor på paradoksal vis, også bidra til genomisk instabilitet.

*BER*, *NER*, og *MMR* omtales ofte samlet for enkeltrådbrudd-reparasjon (*SSB-R*), mens *NHEJ-R* og *HR-R* omtales for dobbeltrådbrudd-reparasjon (*DSB-R*). I forbindelse med skadeprosessering, anvender *SSB-R* en eksisjonsbasert reparasjon, mens en mer kompleks skadeprosessering inngår i *DSB-R*. Annet enn at de involverer ulike reparasjonsproteiner og har mer eller mindre ulike fremgangsmåter for skadeprosessering, deler de forskjellige reparasjonsmekanismene stort sett samme reparasjonsprinsipp<sup>81(s.4-5)</sup> som innebærer:

1. *Skadegjenkjenning*, som medieres via skadespesifikke sensorproteiner.
2. *Oppbygging av reparasjonskompleks*, hvor ytterligere reparasjonsfaktorer rekrutteres til skadestedet.
3. *Skadeprosessering*, som innebærer at glykolaser eller nukleaser resekterer DNA på skadeområdet.
4. *Nukleotidsyntese*, der DNA-polymeraser resyntetiserer opprinnelig DNA.
5. *Ligering av brudd*, utført av DNA-ligaser.



Mange av reparasjonsproteinene er ofte spesifikke for ett av reparasjonsmekanisme, men noen kan også være aktive i flere enn en mekanisme.

## 1.8 Poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP1)

PARP-1 er et multifunksjonelt kjerneenzym i PARP-superfamilien. Denne proteinfamilien består av en gruppe poly-ADP-ribose polymeraser med en bred rolle i en rekke celleprosesser som for eksempel DNA-reparasjon, DNA-transkripsjon, celledifferensiering, kromatinstrukturendring og inflammasjon.<sup>89</sup>

Enzymer i PARP-proteinfamilien ble først identifisert av Chambon et. al for over 50 år siden.<sup>90</sup> De er i dag mest kjent for sin transferaseaktivitet som innebærer at de katalyserer overføringen av en eller flere ADP-ribose enheter fra kofaktoren NAD<sup>+</sup> (nikotinamid adenin dinukleotid) til et spesifikt målprotein.<sup>91</sup> Denne enzymatiske aktiviteten blir også kalt (poly)ADP-ribosylering eller PARylering. PARylering av målproteiner in vivo er en viktig post-translasjonell modifisering (PTM) for å regulere en viktig celleprosess.<sup>92</sup> Det er hittil blitt identifisert 17 enzymvarianter i PARP-proteinfamilien, hvor bare seks av dem; PARP1, PARP2, PARP3, PARP4, og tankyrase 1 og 2 (PARP5a - og 5b), er definert som ekte **poly**-ADP ribose polymeraser. De andre medlemmene i PARP-familien har ikke en slik aktivitet, men har isteden **mono**-ADP ribosyl transferaseaktivitet og kan kun bære og overføre en ADP-ribose enhet om gangen.<sup>93</sup> Av medlemmene i PARP-proteinfamilien har PARP1 blitt mest studert, på grunn av dens sentrale rolle som skadesensorprotein i BER. Andre funksjoner av PARP1 som har fått økende oppmerksomhet, er dets mulige delaktige rolle i utviklingen av en rekke kreftformer, inflammasjonsrelaterte, - og autoimmune sykdommer.<sup>94</sup>

PARP1 aktiveres gjennom å bli bundet til sitt substrat som for eksempel er DNA-skader og andre reparasjonsproteiner. Når substratbinding har oppstått, induseres autosyntese av polymerkjeder bestående av flere ADP-riboseenheter (PAR) på PARP1 enzymet selv, en såkalt PAR-syntese (figur 7). Disse polymerkjedene består tilsammen av ca. 200 repeterende ADP-riboseenheter. Disse kan igjen være fordelt i mindre polymerkjedeforgreininger på 20-50 ADP-riboseenheter. Enhetene er forbundet til hverandre via 2', 1'-O-glykosid ribose bindinger.<sup>91</sup> Proteiner som kan være mål for PARylering, har alltid PAR-bindende domener.<sup>92</sup> Mange av disse proteinene er ofte involvert i DNA-vedlikehold.

PARP1-aktiviteten reguleres av poly-ADP-ribose glykohydrolase (PARG), som bryter ned polymerkjeden av PAR.<sup>89</sup> Vedvarende PARP1-aktivitet konsumerer NAD<sup>+</sup> og kan tappe cellens NAD<sup>+</sup> lager. Et slikt underskudd påvirker energimetabolismen i negativ retning, ettersom NAD<sup>+</sup> er en essensiell kofaktor i ATP-syntesen.<sup>91</sup>

### 1.8.1 PARP1 i DNA-reparasjon

PARP1 sin funksjon er mest studert i forbindelse med DNA-reparasjon, ettersom dets enzymatiske aktivitet øker i forbindelse med gentoksisk cellostress. Når PARP1 binder seg til DNA øker den sin katalytiske aktivitet med omtrent 500x.<sup>89</sup> Dette resulterer i en selvforsterkende PAR-syntese, som i sin tur setter i gang en reparasjonskaskade på skadeområdet hvor en rekke reparasjonsfaktorer blir involvert (figur 7).<sup>91</sup>

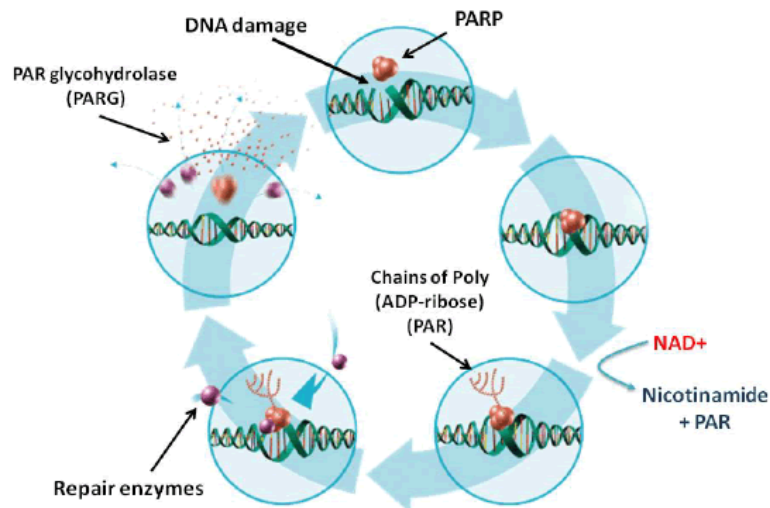
Av reparasjonsmekanismene som er identifisert, er PARP1 mest kjent som skadesensor i BER.<sup>89</sup> Det var Durkacz et. al som først identifiserte denne sammenhengen, etter å ha observert at elimineringsfrekvensen av SSBs var betydelig redusert i celler eksponert for den selektive PARP-hemmeren (PARPi) 3-aminobenzamide.<sup>95</sup> Videre har Dantzer et.al påvist ved å inaktivere PARP1 i cellelinjer, reduseres BER aktiviteten samtidig.<sup>96</sup>

Måten PARP1 initierer BER er fortsatt noe uklar, men to etablerte forklaringer er fremmet. En av dem går ut på at PARP1 gjennom PARylering av histoner, tilrettelegger for kromatinremodellering, slik at BER-spesifikke reparasjonsfaktorer lettere får tilgang til DNA-skaden.<sup>89</sup> En annen forklaring er at når PARP1 binder seg til DNA-brudd, oppstår det en autosyntese av PAR-polymerkjeder på PARP1 selv, noe som i sin tur tiltrekker reparasjonsfaktorer med PAR-bindende domener til skadestedet.<sup>89</sup> Når reparasjonskomplekset er ferdig oppbygget, dissosieres bindingen mellom PARP1 og DNA slik at selve reparasjonsprosessen kan initieres.<sup>97</sup> At disse to nevnte hendelsene er tett relaterte er et plausibelt scenario. I tillegg til sin sentrale funksjon i BER, har det vist seg at PARP1 også i mer eller mindre grad kan være involvert i NER,<sup>98</sup> MMR,<sup>99</sup> NHEJ-R<sup>100</sup> og HR-R.<sup>101</sup>

PARP1 sin viktige rolle i DNA-reparasjon er i ytterligere belyst i «knockout» studier med forsøksmus, som fikk inaktivert begge genkopiene av PARP1. Disse transgene musene var blant annet mer sensitive for DNA-skadende stoffer.<sup>102</sup> I PARP1<sup>-/-</sup> mus der spesifikke DNA-

reparasjonsproteiner i tillegg har blitt delvis inaktivert, ses også økt forekomst av tumor i lever,<sup>103</sup> hjerne<sup>103</sup> og bryst.<sup>104</sup> Embryonal dødelighet er også noe som spesielt forekommer hos PARP1<sup>-/-</sup> mus med dobbel «knock-out» av gener som koder for reparasjonsfaktorer som ATM,<sup>105</sup> BRCA1/2 (Breast cancer gene/protein 1 or 2),<sup>106</sup> og DNA-polymerase  $\beta$ .<sup>107</sup>

Disse funnene indikerer sammen et tett synergisk samspill mellom de ulike signalveiene som til sammen utgjør cellens DDR.



(Figur 7. PARP1 og PARylering i DNA-reparasjon: Når PARP1 detekterer DNA-skade, initierer det en auosyntese av PAR-enheter med NAD<sup>+</sup> som kofaktor. Det dannes videre forgreininger med PAR-polymerkjeder, som gjennom PARylering aktiverer og tiltrekker andre reparasjonsproteiner til skadestedet. Etter at DNA-reparasjonen er igangsatt, opphører PARP1 sin aktivitet når PARG nedbryter PAR-polymerkjeden. Figuren er opprinnelig publisert i originalartikkel av Toss et.al (2013), og gjengitt med tillatelse fra artikkelforfatter.)

### 1.8.2 PARP1 og kreft

Enkeltstudier har vist at PARP1 på protein - og mRNA nivå er høyt uttrykt i en rekke kreftformer som er forbundet med en dysregulert DDR. Eksempler på dette er kolorektale karsinomer,<sup>108</sup> brystkreft<sup>109</sup> og ovariekreft.<sup>110</sup> Ossovs kaya et.al utførte en studie, hvor ekspresjonsprofilen av PARP1-mRNA i normalvev ble sammenlignet med ekspresjonsprofilen i mer enn 8000 ulike kreftvevstyper. De observerte blant annet at normalvev hadde en lav og uniform PARP1-ekspresjon i motsetning til kreftvev fra en rekke organer som hadde en betydelig høyere ekspresjonsnivå.<sup>109</sup> I korrelasjonsstudier med pasienter som diagnostisert for kreft, var høy PARP1-ekspresjon forbundet med dårlig

prognose og tilbakefall.<sup>111, 112</sup> Til sammen er disse funnene noe som har gjort PARP1 til et ypperlig mål for den målrettede molekylære kreftterapien.

Den underliggende årsaken som forklarer disse oppregulerte nivåene i kreft er fortsatt uklar, men det er vel etablert at kreftceller evner å utvikle et mer effektivt DDR i forhold til normale celler. Man tror et effektivt DDR i kreftceller er noe som gjør dem spesielt motstandsdyktige mot en rekke DNA-skadeinduserende kreftbehandling.<sup>113, 114</sup>

Polymorfismer av promotorområdet til PARP1-genet, er også noe som kan forklare høy PARP1-ekspresjon i kreft. For eksempel gir enkeltnukleotid polymorfien (SNP) - T2444C, en aminosyresubstitusjon (V762A) i PARP1s katalytiske domene.<sup>115</sup> Denne spesifikke SNP er blant annet med blant annet kreft i prostata og spiserør.<sup>116, 117</sup> Høy PARP1-ekspresjon kan også forklares av genamplifikasjon, som er påvist i brystkreft.<sup>111</sup> Amplifikasjon av PARP1-genet i CAC eller CRC er så vidt vi vet enda ikke beskrevet. I det humane genom, er genet som koder for PARP1 lokalisert i q-armen på kromosom 1 (mer spesifikt 1q42.12).<sup>118</sup>

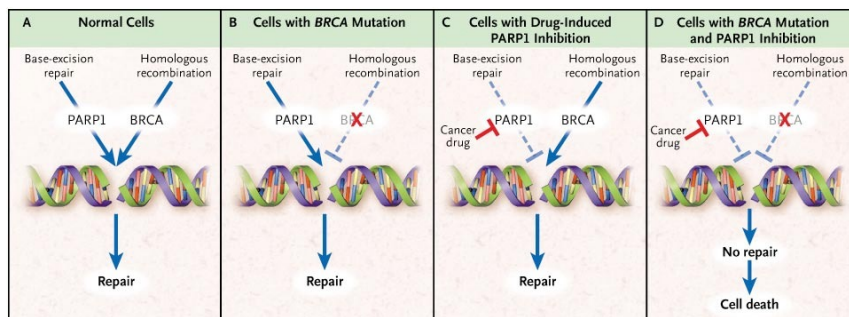
### **1.7.3 PARP-hemmere (PARPi)**

PARP1s mangfoldige funksjon i DDR har vært grunnlag for en type målrettet molekylær kreftterapi. Dette behandlingsprinsippet innebærer at man kan ramme DNA-reparasjonen i kreftceller gjennom selektivt å hemme involverende reparasjonsfaktorer med farmakologiske signalhemmere. Formålet med denne behandlingsstrategien er å indusere en massiv opphopning av cytotoxiske DNA-skader som kreftcellen ikke er i stand til å eliminere, og som til slutt vil resultere i kreftcelledød. En annen mulighet når det gjelder kombinasjonsterapi, er at man også kan bedre effekten av konvensjonell kreftterapi når man svekker DNA-reparasjonskapasitet til kreftcellen.<sup>119</sup> Utviklingen av PARPi var nettopp basert på en slik grunntanke.

Enkelte kreftformer kan ha defekter eller mangler i bestemte DNA-reparasjonsmekanismer.<sup>28, 120</sup> For å kompensere for dette, har det i en del tilfeller vist seg at noen kreftceller aktiverer en alternativ intakt reparasjonsmekanisme for å forbli levedyktige.<sup>120</sup> Konseptet syntetisk letalitet (SL), også kalt onkogen-uavhengig karsinogenese, er et fenomen som innebærer at tap av ett av to relaterte gener gir fortsatt levedyktighet, mens tap av begge gener medfører celledød.<sup>121</sup>

Bruken av PARPi til behandlingen av bryst - og eggstokkreft med BRCA1/2 negativ fenotype, er det beste eksempelet på en vellykket tilnærming av SL i den molekylære kreftterapien.<sup>122, 123</sup> BRCA1/2 tumorsuppressorgen er en viktig regulator av HR-R, og defekt i dette genet gjør at cellen blir mer eksponert for cytotoksiske nivåer av DSBs. Kreftceller med mutasjoner i BRCA1/2-genet har derfor ikke et funksjonelt HR-R, og er isteden avhengig av en PARP1-mediert reparasjon (BER) for å forhindre at det akkumuleres cytotoksiske nivåer av SSBs og DSBs.<sup>124</sup> Man tror dette er en forklaring på at tumorer med BRCA1/2 negativ fenotype er sensitive for PARPi, siden det forekommer en SL-interaksjon mellom BRCA1/2 og PARP1 (figur 8).

Olaparib, niraparib, og rucaparib er eksempler på nyere generasjon PARPi, med høy nok spesifisitet til å hemme >90% av PARP1s enzymatiske aktivitet.<sup>125</sup> Virkningsmekanismen til disse farmakologiske signalhemmerne, er å imitere PARP1 enzymets naturlige kofaktor - NAD<sup>+</sup>, og konkurrere om dets katalytiske domene for å forhindre PAR-syntesen.<sup>126</sup> PARPi er i dag godkjent for behandling av BRCA1/2 negativ eggstokk-, bryst- og bukhinnekreft.<sup>127</sup> Ulike studier har også sett positiv effekt av PARPi mot bestemte genotyper av CRC<sup>128, 129</sup> og prostatakreft,<sup>130</sup> og det pågår kliniske studier med bruk av PARPi i behandlingen av en rekke andre kreftformer som er assosiert med dysregulert DNA-reparasjon.<sup>131</sup>



(Figur 8. Virkningsmekanismen for hvordan PARPi kan indusere celledød i BRCA negative kreftceller gjennom syntetisk letalitet. Figuren er gjengitt med tillatelse fra Massachusetts Medical Society, og opprinnelig publisert i originalartikkel av Dirk Iglehart J og Silver D.P (2009).)

## 2. Mål med oppgaven

Målsettingen med oppgaven er å undersøke ekspresjonsmønsteret av PARP1 i UC og CRC, for deretter å sammenligne ekspresjonsnivået mellom disse to sykdommene. I en tidligere relatert studie har vi observert at UC hadde en høyere ekspresjon av DNA-reparasjonsproteinet NUCKS1, samtidig som frekvens av DSBs var lav. I tillegg observert vi at NUCKS1 ekspresjonen var avtagende under progresjonen fra UC til CAC. Vi lurer på om det også kan være et liknende ekspresjonsmønster av PARP1 i den samme sykdomsprogresjonen.

## 3 Forsøksmateriale og metoder

All produktrelatert informasjon på utstyr og reagenser som har blitt anvendt i denne studien, er vedlagt i Appendiks

### 3.1 Pasientmateriale

**UC:** Fra pasientutvalget diagnostisert med UC, har vi 57 biopsier fra ni kolektomerte pasienter til disposisjon. Medianalderen til pasientutvalget var 23 år (alder 14-58 år). Prøvetakingen ble utført mellom årsperioden 1985 -1994 ved Oslo Universitetssykehus - Rikshospitalet. Biopsimaterialet ble formalinfiksert og parafininnstøpt (FFPE). De har siden vært lagret og arkivert i forskningsbiobanken ved avdeling for patologi ved Oslo universitetssykehus HF. Patologer på Rikshospitalet har diagnostisert og dysplastisk karakterisert FFPE-materialet. Fra dette materialet har det blitt skåret helsnittspreparater på 4 µm tykkelse for videre bruk til immunhistokjemisk analyse av PARP1 kjerneprotein.

**CRC:** Fra pasientutvalget med CRC ble det innhentet 39 biopsier fra kolon med representativ tumor. Denne pasientgruppen hadde en gjennomsnittsalder på 74,5 år ( $\pm 10,7$  år). Biopsiene ble tatt i perioden 2000-2003 ved Tønsberg sykehus, og har siden vært lagret i forskningsbiobanken ved avdeling for patologi ved Oslo universitetssykehus HF i form av FFPE-vevsblokk. Fra dette materialet har det blitt konstruert parafininnstøpte vevsmikromatrise (TMA) blokker, som videre har blitt skåret på 4 µm tykkelse for bruk til immunhistokjemisk analysing av PARP1 kjerneprotein. Biopsimaterialet fra CRC-

pasientutvalget har tidligere blitt diagnostisert og histologisk karakterisert av patologer ved Tønsberg sykehus.

Som kontrollutvalg har vi disponert 28 normal kolonmucosa prøver (22 peritumorale og 6 non-peritumorale), som er tatt fra CRC-biopsier ved Rikshospitalet i perioden 1993-1999. Disse var også inkludert i TMA-preparatene som ble brukt til PARP1 immunhistokjemi.

### **3.1.1 Etiske vurderinger**

Studiens bruk av pasientmateriale til immunhistokjemiske forskningsstudier er godkjent av Det Regionale Komiteer for Medisinsk og Helsefaglig Forskningsetikk (REK) fra og med 2015 til 2025; REK# 2015/628. Alle pasientbiopsier ble under forsøksperioden anonymiserte med vilkårlige prøvekode for vern av pasientidentitet.

### **3.2 Vevsmikromatrise (TMA) - oppsett**

FFPE-biopsimaterialet fra pasientutvalget med CRC ble preparert som paraffinstøpt TMA. En automatisk matrisemaskin (3DHitech TMA Master II) (3DHitech, Budapest, Ungarn) med tilhørende programvare (3DHitech TMA control software) (3DHitech) ble brukt for å lage TMA-preparatene. Matrisene ble konstruert med en skalering på 11 x 12, og inndelt i serier på 2-3 vevskjerner med representativ tumor fra hver pasient. CRC-pasientutvalget, ble fordelt på tre ulike TMA-snitt: CRC III TMA, CRC IV TMA, og CRC V TMA. De sirkulære vevskjernene ble lagd med en diameter på 1 mm. Jeg deltok ikke selv i tillagingen av TMA-preparatene som ble brukt i denne studien. Disse preparatene hadde allerede blitt laget på forhånd i forbindelse med tidligere immunhistokjemiske studier. Snittpreparatene var derfor ferdig tilrettelagt for denne immunhistokjemiske studien. Som kontrollvev ble det anvendt non-peritumralt og peritumoralt normalt mucosavev. Disse ble inkludert i TMA-preparat CRC III TMA. Koordinator/oppsett for CRC-TMA preparatene er vedlagt i Appendiks.

Til informasjon fantes det også TMA-preparater for UC, men både disse preparatene og tilhørende donorblokker var betydelig nedskårede og derfor ikke representative for bruk i denne studien. Av den grunn brukte vi bare tilgjengelige helsnittspreparater fra pasientutvalget med UC.

### 3.3 Immunhistokjemi (IHC)

Til den immunhistokjemiske påvisningen av PARP1, ble det brukt FFPE-vevssnitt fra tykktarmsbiopsier som ble tatt fra pasientutvalgene beskrevet i avsnitt 4.1. Disse snittene hadde en vevstykkelse på 4 µm, og lagret ved 4 °C før bruk. Vi brukte helsnitt for pasientutvalget med UC, og TMA-snitt for pasientutvalget med CRC. FFPE-biopsimateriale fra tonsiller ble brukt som negativ og positiv kontroll, og ble farget parallelt med forsøkssnittene. En optimalisert protokoll for IHC-farging ble fulgt. Prosedyren som ble fulgt er vedlagt i Appendiks.

#### 3.3.1 Optimalisering av antistoff fortynning

Generelt består immunhistokjemiske fargeprotokoller av flere kritiske ledd som har tidligere blitt godt beskrevet av Kim et.al.<sup>132</sup> Et av disse er primær antistoffets optimale bruksfortynning. For lav fortynning gir unødvendig forbruk av kostbart antistoff, samtidig som det generer mer bakgrunn. For høy fortynning gir svak deteksjonsevne. For å oppnå best mulig fargerresultat med et nytt antistoff, gjorde vi en empirisk test for å finne den optimale antistofffortynningen som var best egnet til immunhistokjemisk farging av PARP1. For dette optimaliseringsformålet brukte vi FFPE-vevssnitt fra tonsiller med 4 µm tykkelse som kontrollmateriale. Dette valget kontrollmaterialet ble valgt på bakgrunn av søk i «Human Protein Atlas» ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)), hvor det blant annet opplyses at tonsiller har et naturlig høyt uttrykk av PARP1.<sup>(133)</sup> Fremgangsmåten for å utføre av IHC, er beskrevet i avsnitt 4.3.3.

Primær antistoffet som ble brukt til immunhistokjemisk påvisning av PARP1, var monoklonalt anti-PARP1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Kvaliteten på dette spesifikke anti-PARP1 antistoffet er verifisert av «Human Protein Atlas»,<sup>134</sup> som er et pålitelig nettbasert litteraturhjelpemiddel med liste over kvalitetssikrede antistoffer til forskningsformål.

Antistoffet ble lagret ved -20 °C, og tint i romtemperatur før bruk. Vi brukte produsentens anbefalte bruksfortynning på 1:5000 som utgangspunkt for fortynningsrekken - 1:5000,



1:7500 og 1:10000. EnVision FLEX™ Antibody diluent (DAKO, Santa Clara, CA, USA) ble brukt som fortynningsbuffer. En progressiv IHC-farging av hele fortynningsrekken ble videre utført på kontrollmaterialet. Vi tolket kontrollresultatet ved å vurdere fargens lokalisasjon, intensitet og signal/bakgrunn ratio. Basert på vurderingen til en erfaren patolog i samarbeid med veileder, ble anti-PARP1 med fortykning på 1:7500 vurdert som den optimale fortykningstørrelsen. Denne fortynningsstørrelsen ble videre brukt for immunhistokjemisk påvisning av PARP1 protein på pasientmaterialet vi disponerte.

### **3.3.2 Optimalisering av antigendemaskering - valg av buffer og pH-nivå**

Et annet kritisk ledd i immunhistokjemiske metoder, er buffer pH til antigendemaskering. Hvilken buffer og pH-nivå som egner seg er best til dette formål, avhenger av antistoffet man bruker og eventuelt hvilket vevsantigen man ønsker å påvise.<sup>135</sup> Som ved optimalisering av primært antistoff, er empirisk uttesting også en praktisk måte å velge buffer og optimal pH til bruk med antigendemaskeringsteknikken HIER (Heat Induced Epitope Retrieval). For uttesting ble 10 mM citratbuffer med lav pH 6 (Sigma-Aldrich) sammenlignet med en kommersiell Tris-EDTA buffer med høy pH 9 (EnVision Flex™ Target Retrieval Solution 50x, High pH) (DAKO). Fremgangsmåten for å utføre HIER, er den samme som er beskrevet i avsnitt 4.3.3. Etter nærmere vurdering med veileder, ga citratbuffer med pH 6 det mest optimale fargerresultet.

### **3.3.3 Fremgangsmåte**

Vevsnittene ble deparafinisert i varmeskap ved 60 °C i en 1 time. Deretter ble de ført gjennom en gradert rehydreringsrekke bestående av romtemperert xylen og etanol (Xylen - Absolutt EtOH - 96 % EtOH – 70 % EtOH - vann). Etter vask i ddH<sub>2</sub>O (5 min x 3), ble vevsnittene inkubert med romtemperert blokkeringsreagens EnVision FLEX™ Peroxidase blocking reagent) (DAKO) i 5 minuttter. Målet med dette blokkeringstrinnet var å blokkere endogen peroksidaseaktivitet. Videre ble vevsnittene grundig vasket i vaskebuffer (EnVision FLEX™ Wash buffer) (DAKO) før antigendemaskering med HIER-teknikk ble gjennomført. Vevsnittene ble i dette trinnet varmebehandlet med mikrobølgeovn i citratbuffer (10 mM, pH 6) i 30 minuttter ved 100 °C.

Etter gjennomført HIER ble snittene avkjølt i romtemperatur før vi skylte dem i rennende kaldt vann, vasket dem grundig i vaskebuffer og inkuberte dem med romtemperert blokkeringsbuffer (1 % føtalt kalveserumalbumin i tris-buffersaline) (Sigma-Aldrich) i 1 time. Dette blokkeringsstrinnet var viktig med hensyn på fargebakgrunn som skyldtes uspesifikk binding mellom primært antistoff og uspesifikk vevsantigen.<sup>136</sup> Etter raskt skylle i vaskebuffer, appliserte vi anti-PARP1 primærantistoff (1:7500) på vevssnittene og inkuberte dem over natt i fuktekammer ved 4° C. Negativt kontrollsnitt ble kun inkubert med blokkeringsbuffer uten primærantistoff.

Påfølgende dag vasket vi først vevssnittene grundig i vaskebuffer for å fjerne overskudd av primærantistoff, og deretter inkuberte vi dem med sekundært antistoff (EnVision™ FLEX/HRP) (DAKO) i 30 minutter ved romtemperatur. DAB kromogen (EnVision™ FLEX DAB+) (DAKO) ble anvendt til visuell påvisning av immunkompleksene bestående av PARP1 kjerneprotein og anti-PARP1 antistoff. Vi fortynnet DAB kromogenløsning i substrat buffer (EnVision FLEX™ Substrate buffer), og inkuberte dette vevssnittene i kromogeløsningen i 5-8 minutter ved romtemperatur. Kontrastfarging ble gjort ved å dyppe vevssnittene raskt i hematoksylin og skylle i rennende vann. Snittene ble videre ført gjennom en dehydreringsrekke med romtemperert etanol og xylen (70 % EtOH - 96 % EtOH – Abs. EtOH – Xylen), før montering med xylenbasert lim (Pertex® monteringsmedium) (HistoLab, Göteborg, Sverige) og dekkglass.

### **3.3 Digital bildeskanning**

Vi tok digitale bilder av de PARP1 fargede vevssnittene med en helsnittskanner med integrert 20X kameraobjektiv - 3DHitech Panoramic MIDI bright-field scanner (3DHitech). Bildene fra skanneren ble videre prosessert og behandlet med 3DHitechs bilderedigeringsprogram Panoramic Viewer versjon 1.15.4 (3DHitech).

### **3.4 Immunhistokjemisk celledelling av PARP1-kjerneprotein**

Vi gjorde en manuell semikvantitativ celledelling av PARP1-kjernepositivitet på representative områder i de IHC-fargede kolonsnittene. Kun tarmepitelceller i de Lieberkhünke kryptene ble definert som representative. Totalt ble det talt 1000 celler på

tilfeldig valgte områder i hvert helsnittspreparat med UC-lesjon. På TMA-snittene med CRC-lesjon telte vi forsøksvis totalt 1000 celler (men minst 500 celler), fordelt på en serie med 2-3 representative vevskjerner per kasus.

En kvalitativ vurdering av IHC farging er ofte basert på subjektive tolkninger av fargeintensitet - og nyanser. Dette er variabler som ikke lar seg fullstendig elimineres. Det ble derfor i konsensus lagd standard evalueringskriterier for å mest mulig redusere subjektiv bias, og for å oppnå mest mulige repeterbare/reproduserbare telleresultater fra den immunhistokjemiske celletellingen av PARP1. Vi fulgte følgende evalueringskriterier for celletelling:

- Ekskludere apoptotiske eller fragmenterte celler.
- Kun telle i representative områder; tarmepitelceller konsentrert i Lieberkühnske krypter.
- Sterk positive celler har  $\geq 50 - 100$  % brun kjernefarge; intens eller moderat farge.
- Svak positive celler har  $\leq 1 - 49$  % brun kjernefarge; ofte svak brun farge men kan være sterkere noen ganger.
- Negative celler har blå kjerner uten noe brun farge.
- Celletelling utføres manuelt på digitale bilder med 50x forstørrelse på PC-skjerm med programvaren Panoramic Viewer versjon 1.15.4 (3DHistech).

PARP1 ekspresjonsnivå ble presentert som prosentandel av antall positiv fargede cellekjerner ut av totalt 1000 talte cellekjerner. Resultatdata fra celletellingene er vedlagt i Appendiks.

### 3.5 Western blotting

Som supplerende kvalitetssikring av antistoffets spesifisitet, utførte vi en western blot analyse. Formålet med denne analysen var å bekrefte at våre PARP1-farginger var tilstrekkelig reelle uten høy andel uspesifikk antistoffbinding.

Pankreaskreft cellelinjene *Capan2* og *10.05*, CRC-cellelinjene *HT29* og *CaCo2*, lungekreft cellelinjen H69, og leukemi cellelinjen THP-1 ble brukt for å evaluere PARP1-antistoffets spesifisitet. Vi hentet disse cellelinjene fra ATCC ([www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org)), som er en

global kommersiell ressursbiobank for cellelinjer og annet biologisk materiale. Pankreas celler ble spesielt valgt til dette kvalitetssikringsformålet, ettersom denne celletypen har et naturlig lavt til moderat uttrykk av PAPR1.<sup>133</sup> 7,5 µg protein av det totale proteinlysatet fra cellelinjene ble tilsatt β-mercaptoethanol og fortynnet i lyseringsbuffer. Proteinlysat ble deretter denaturert i 5 minutter ved 95 C° før vi appliserte det til 12 % SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyakrylamide Gel Electrophoresis). Elektroforesen (Mini-PROTEAN TetraCell elektroforesemodul) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ble gjort i 1 time med 120V (PowerPac™ HC strømkilde) (Bio-Rad). En polyakrylamid gel (ExpressPlus™ PAGE Gel) (Genscript, Piscataway, NJ, USA) og running buffer (Tris-MOPS-SDS Running Buffer) (Genscript) ble brukt til elektroforesen.

Etter elektroforesen ble det utført en elektroblotting hvor proteinene i polyakrylamid gelen ble overført til membran. Overføringen ble utført i 1,5 time med 120V i transfer buffer (10x Tris/Glycine Transfer Buffer) (Bio-Rad) under avkjøling i is. Blokkering av membran (for uspesifikk immunreaksjon) ble gjort med 5 % tørrmelk i TBS-T buffer (Tris Buffer Saline - Tween 20) i 1 time. Immunblotting (Mini Trans-BlotCell blottingsmodul) (Bio-Rad) ble videre utført. I dette trinnet ble membran inkubert i primært anti-PARP1 antistoff (Sigma Aldrich) med en anbefalt fortynningsstørrelse på 1:500 (1 µg/mL) over natten i kjølerom. Anti-mus IgG-HRP koblet antistoff (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) med fortynningsstørrelse på 1:10000, ble brukt som sekundært antistoff med inkuberingsstid på 30 minutter i romtemperatur. For deteksjon brukte vi kjemiluminescens med SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate kit anvendt (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Inkuberingsstiden for kjemiluminescens var 5 minutter i romtemperatur. Vi brukte LAS-400 mini kamera (FujiFilm, Tokyo, Japan) med tilhørende programvare for å avlese immunblotting av PARP1.

Humant PARP1 protein har en molekylærvekt på 113 kDa.<sup>91</sup> I avlesningen ble det sett et distinkt og tydelig proteinbånd i hver av kreftcellelinjene som tilsvarte PARP1s molekylærvekt. Det sees i tillegg svake bånd med lavere molekylærvekt i Caco2, H69, og THP-1 cellelinjene. Disse båndene skyldtes trolig uspesifikk binding og/eller reagensbruk. Det ses ellers ingen andre distinkte bånd enn de vi forvente. Basert på WB-evalueringen er anti-PARP1 primærantistoffet som vi anvendte i denne IHC-studien, tilstrekkelig spesifikk for

PARP1 kjerneprotein. Vi kan derfor konkludere at våre PARP1-farginger representerer reelle fargeutslag. Resultatbilde av western blot analysen er vedlagt i Appendiks.

### **3.6 Statistisk analyse**

Til å bearbeide resultatene fra celletellingen av PARP1-positivitet, brukte vi programvaren SPSS versjon 24 (Statistical Package for Social Sciences) (IBM, Armonk, NY, USA). Den videre bruken av parametriske eller ikke-parametriske metoder ble avgjort ved å studere om telleresultatene tilhørte normalfordelte populasjoner eller ikke. Til dette formålet studerte vi deskriptiv statistikk gjennom frekvensfordeling (histogram), sentraltendens (median og aritmetisk gjennomsnitt), og spredning (standardavvik og prosentiler).

Vi brukte supplerende normalitetstest med Shapiro-Wilk statistikk ytterligere for å bekrefte eller avkrefte normalfordeling av data. Fordelingen av telleresultatenes sentraltendens tilfredsstilte ikke nullhypotesens antagelse om normalfordeling med denne testen ( $p < 0,001$ ). For å sammenligne PARP1-telleresultatenes sentraltendens (median) i UC, CRC, og normal mucosa, brukte vi Kruskal-Wallis variansanalyse (ikke-parametrisk ANOVA) med et statistisk signifikansnivå på  $p < 0.05$ . Samme test og signifikansnivå ble også brukt for å teste forskjeller i PARP1-telleresultatenes sentraltendens (median) mellom de ulike UC-dysplasiene. Ved statistisk signifikans variansanalyse, ble post-hoc test med Bonferroni korreksjon for parvis gruppesammenligning videre utført.

## 4 Resultat

### 4.1 IHC-fargeresultater av PARP1

Telling av negativ, svak, og sterk PARP1-ekspressjon i tarmepitelceller fra kolon, ble i dette forsøket gjennomført etter forhåndsdefinerte evalueringskriterier for IHC-celletelling. Denne måten å kategorisere ekspressionsnivåene av PARP1 ble anbefalt av en erfaren patolog.

IHC-fargingene for PARP1 ble utført på FFPE-vevssnitt fra ulike kolonlokalisasjoner. Telleresultatene var basert på til sammen 57 UC-lesjoner (fordelt på 9 pasienter), 39 CRC-lesjoner (en biopsi per pasienter), og 28 normal mucosa (kontroll, per pasient); hvorav 6 var non-peritumorale og 22 var peritumorale.

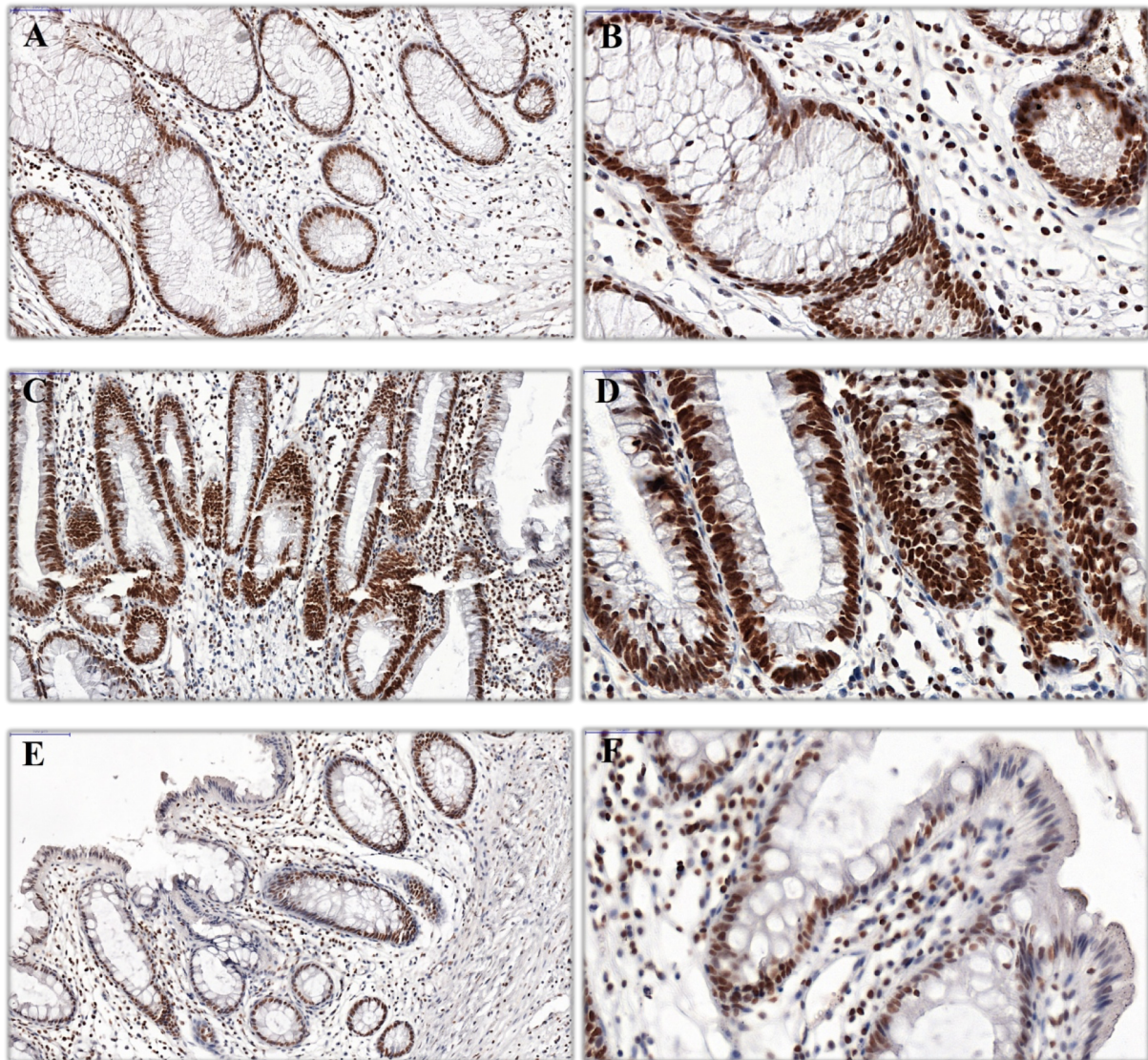
Den histologiske representativiteten defineres ved at multiple tarmkrypter (intestinale kjertler) er tilstede. Et brunlig immunhistokjemisk kromogent fargenedslag som var kjernelokalisert ble definert som PARP1-positivitet. Lymfocytter i Lamina propria har et naturlig høyt PARP1-ekspressjon og ble brukt som positiv internkontroll,<sup>137</sup> men ble ikke inkludert i celletellingen.

Basert på vurderingen av IHC-fargingene, viste UC-lesjonene en overveiende tydelig og intens PARP1-positivitet (figur 9 A-F). CRC-lesjonene viste også en tydelig og intens PARP1-positivitet, men hadde derimot en mer heterogen farging med høyere andel svak PARP1-positivitet (figur 10 A-F). I normal mucosa (non-peritumoralt og peritumoralt) var det overveiende homogen negativitet for PARP1, men få normale enkeltprøver viste svak PARP1-farging; noe som er å forvente i normale celler (se figur 11 A-F).

Fargingene var i de fleste tilfellene kjernelokalisert, men ved enkelte tilfeller var avgrensingen mellom cytoplasma og cellekjerne vanskelig å se. Cytomorfologisk sett, har reaktive celler i UC og kreftceller i CRC flere atypiske cellulære likhetstrekk som for eksempel høy kjerne/cytoplasma ratio og høy mitotisk aktivitet/hyperkromasi. Disse likhetstrekkene kan bidra til at kjernens cytoplasmatiske avgrensingen blir utydelig og dermed vanskelig å tolke.<sup>12</sup>

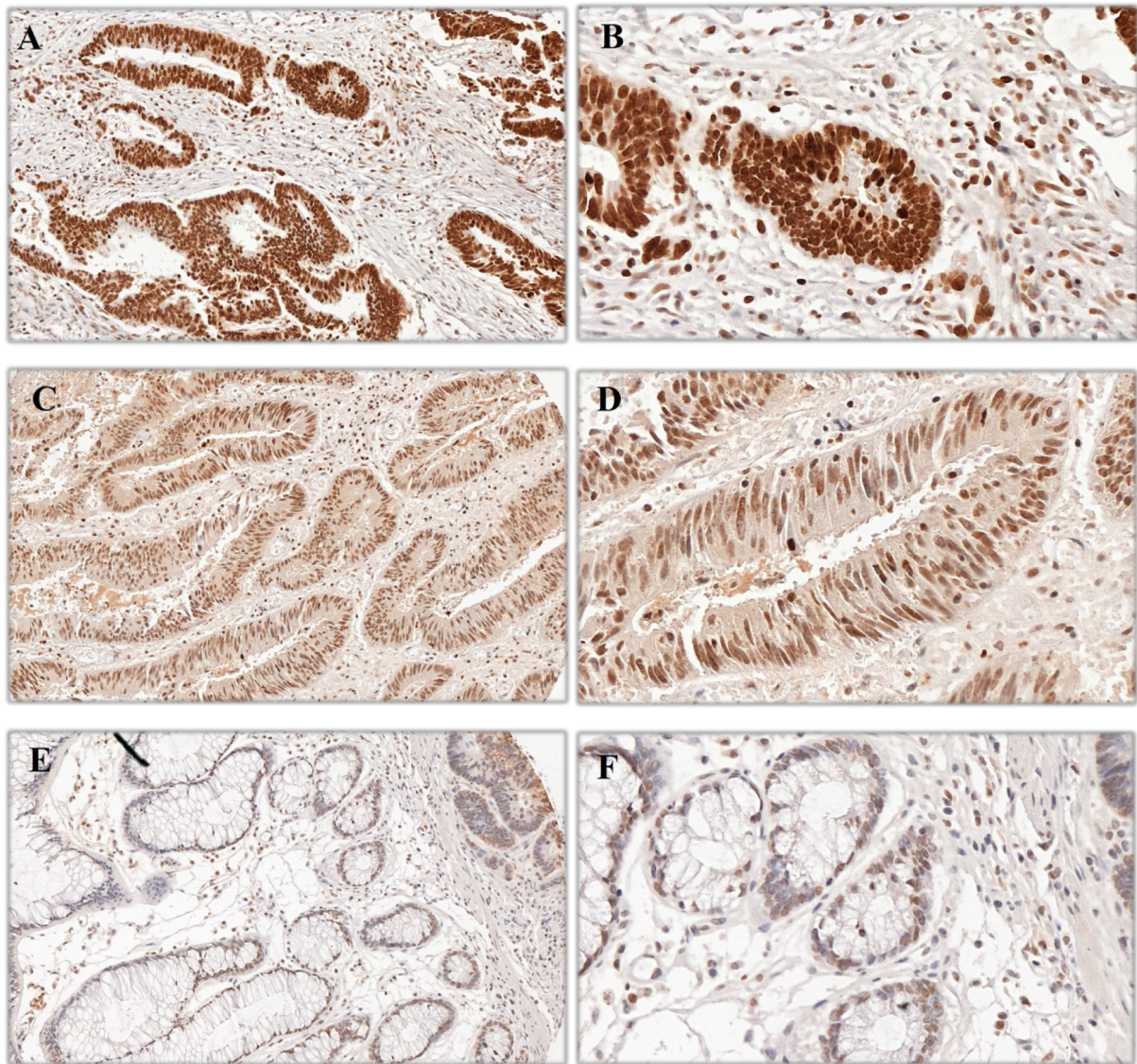


For bearbeiding av telleresultatene, gjorde vi vi til slutt en statistisk sammenligning mellom medianene av andel svak -, sterk -, og samlet PARP1-positivitet innad i hver sykdomsgruppe, og mellom sykdomsgruppene. For UC har vi i tillegg sammenlignet PARP1-ekspressjonen i forhold til dysplasi-gradering. Dessverre hadde vi ikke mulighet til å utføre en tilsvarende sammenligning for Dukes-klassifiseringene i CRC-pasientutvalget, på grunn av mangel på pasientopplysninger.



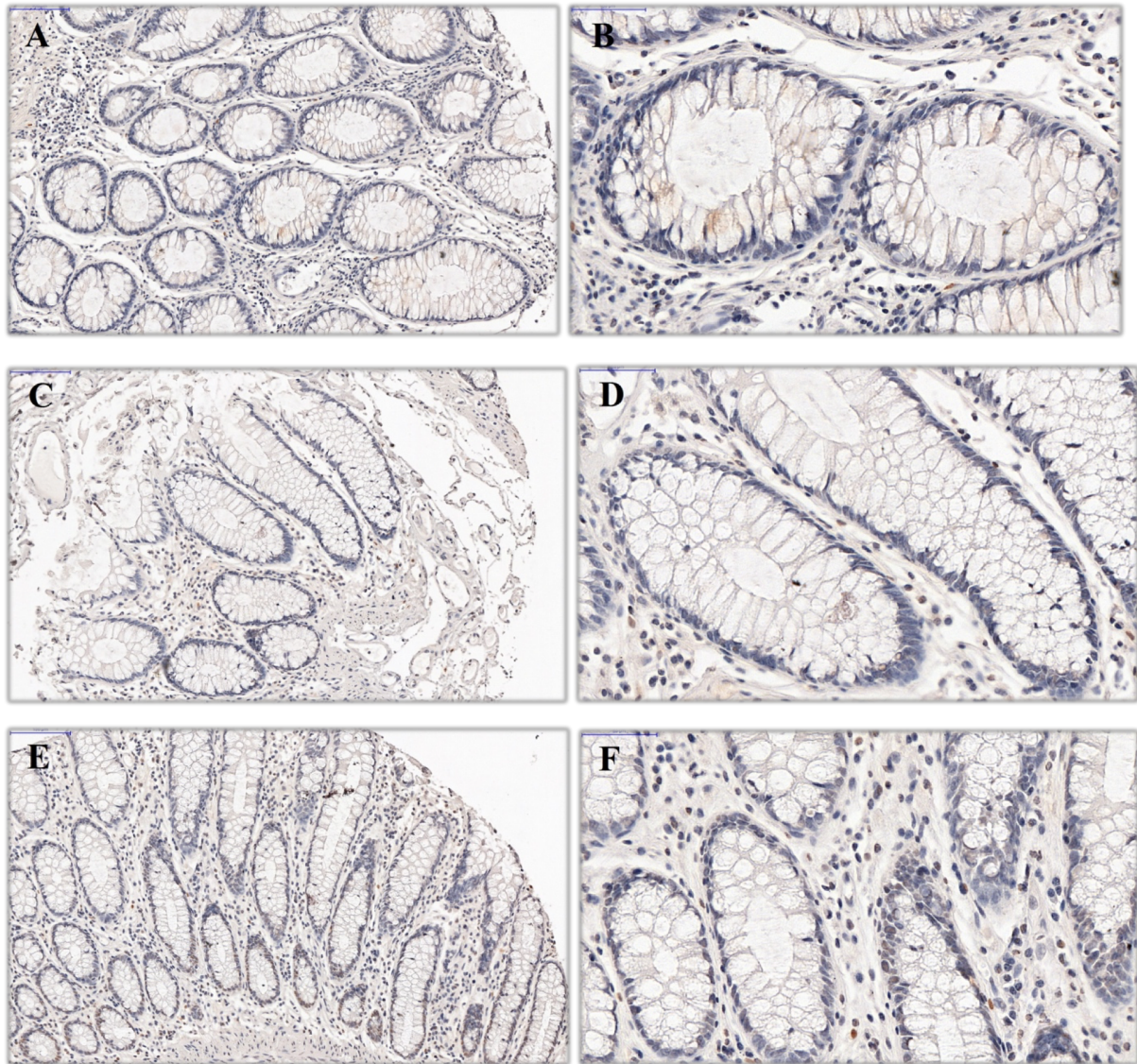
(Figur 9. Representative immunohistokjemiske fargerresultater for PARP1 i FFPE-kolonvevssnitt med UC: A og B viser sterk PARP1-kjernepositivitet i vevssnitt tilhørende prøvekode S164-I, med respektivt 20x og 50x forstørrelse; C og D viser sterk PARP1-kjernepositivitet i vevssnitt tilhørende prøvekode S169-I, med respektivt 20x og 50x forstørrelse; mens E og F viser heterogen farging med innslag av både negativ, svak, - og sterk PARP1-kjernepositivitet i vevssnitt tilhørende prøvekode S191-V, med respektivt 20x og 50x forstørrelse.)





(Figur 10. Representative immunohistokjemiske fargeresultater for PARP1 i FFPE-kolonvevssnitt med CRC: A og B viser sterk PARP1-kjernepositivitet i vevssnitt tilhørende prøvekode C05-10, med respektivt 20x og 50x forstørrelse; C og D viser heterogen farging med innslag av både svak og sterk PARP1-kjernepositivitet i vevssnitt tilhørende prøvekode C03-43, med respektivt 20x og 50x forstørrelse; mens E og F viser svak PARP1-kjernepositivitet i vevssnitt tilhørende prøvekode C05-24, med respektivt 20x og 50x forstørrelse).



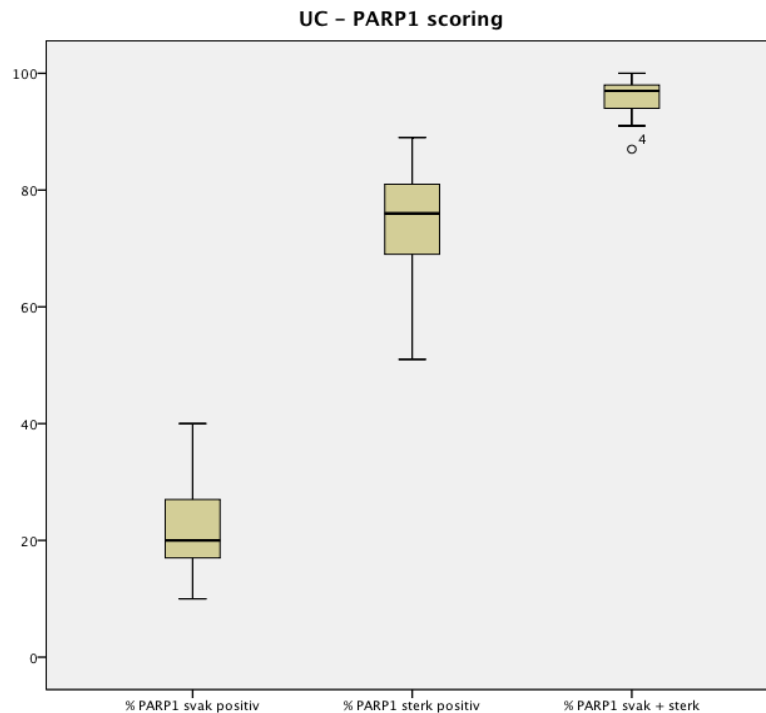


(Figur 11. Representative immunohistokjemiske fargeresultater for PARP1 i FFPE-kolonvevssnitt med normal mucosa: A og B viser negativ PARP1-kjernepositivitet i peritumoralt vevssnitt tilhørende prøvekode 93-9P, med respektivt 20x og 50x forstørrelse; C og D viser negativ PARP1-kjernepositivitet i non-peritumoralt vevssnitt tilhørende prøvekode C03-42, med respektivt 20x og 50x forstørrelse; mens E og F viser negativ PARP1-kjernepositivitet i non-peritumoralt vevssnitt tilhørende prøvekode C03-45, med respektivt 20x og 50x forstørrelse).

## 4.2 PARP1-ekspresjon i UC, CRC, og normal mucosa

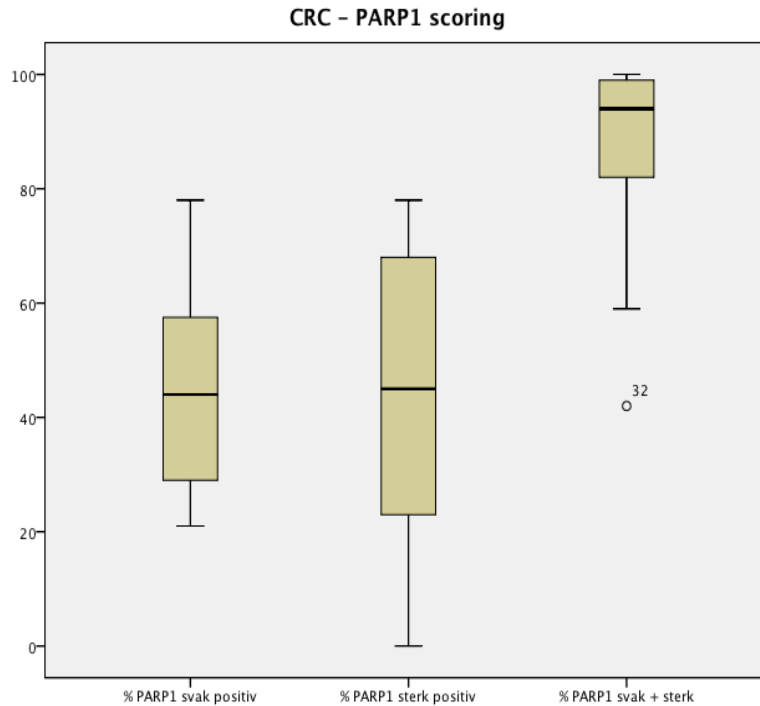
**UC (figur 12):** Vi påviste PARP1-positivitet i alle 57 UC-vevssnittene, med en variasjonsbredde på 10 % - 89 %. Denne pasientgruppen hadde en svak PARP1-positivitet med median på 20% (IQR = 20% - 27,5%, variasjonsbredde = 10% - 40%), og en sterk PARP1-positivitet med median på 76% (IQR = 68,5% - 81%, variasjonsbredde = 51% - 89%). PARP1-ekspresjonen i UC var derfor overveiende sterkt. Den samlede PARP1-ekspresjonen

(svak og sterk PARP1-positivitet) hadde en median på 97 % (IQR = 94% - 98%, variasjonsbredde = 87% - 100%). Liten spredning i fargeintensitetene tyder på at PARP1-ekspressjonen er ganske homogen i UC lesjoner.



(Figur 12. Box-whisker diagram for UC-utvalget som viser median celleandel med svak-, sterk, og samlet PARP1-scoring. Både interkvartilavstanden og variasjonsbredden vises også diagrammet.)

**CRC (figur 13):** Det ble påvist PARP1-positivitet i alle 39 CRC-vevssnittene, med en variasjonsbredde på 10 % - 89 %. Her hadde svakt PARP1-positivitet en median på 44 % (IQR = 29 % - 59 %, variasjonsbredde 21 % - 78 %), mens sterk PARP1-positivitet hadde en median på 45 % (IQR = 22 % - 69 %, variasjonsbredde = 0 % - 78 %). Fordelingen mellom svak og sterk PARP1-positivitet i CRC var derfor nærmest lik. Den samlede PARP1-ekspressjonen hadde en median på 94 % (IQR = 82 % - 99 %, variasjonsbredde 42 % - 100 %). Stor spredning i fargeintensitetene tyder på at PARP1-ekspressjonen er mer heterogen i CRC-lesjoner.

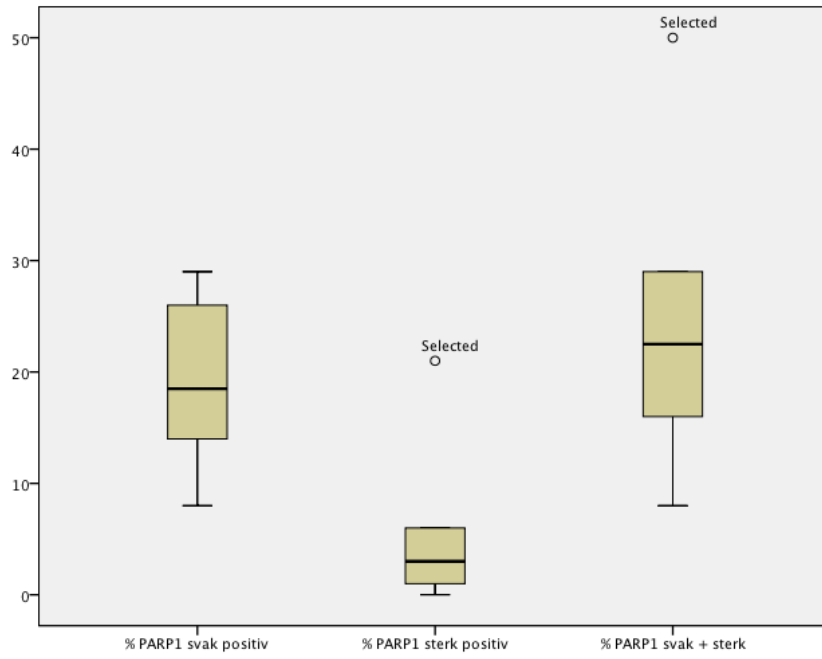
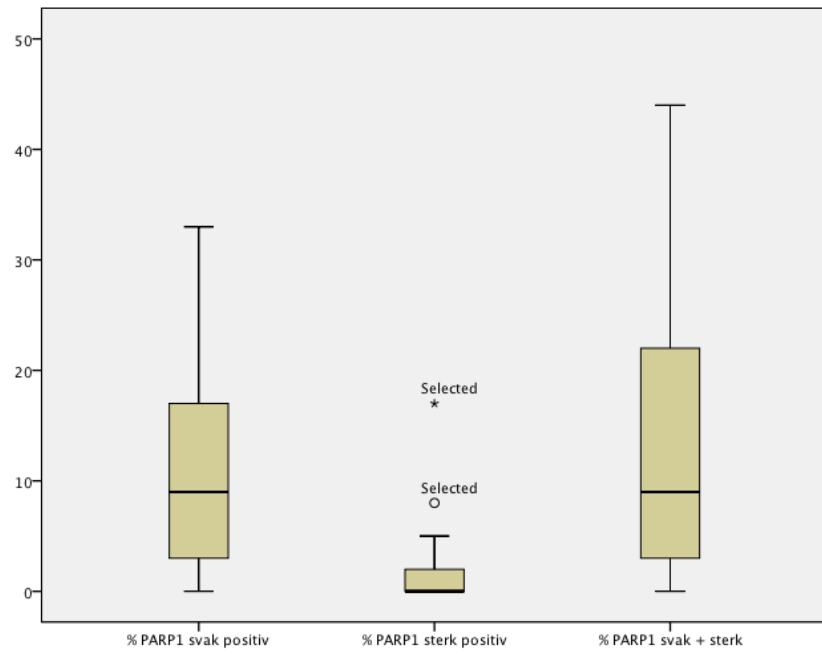


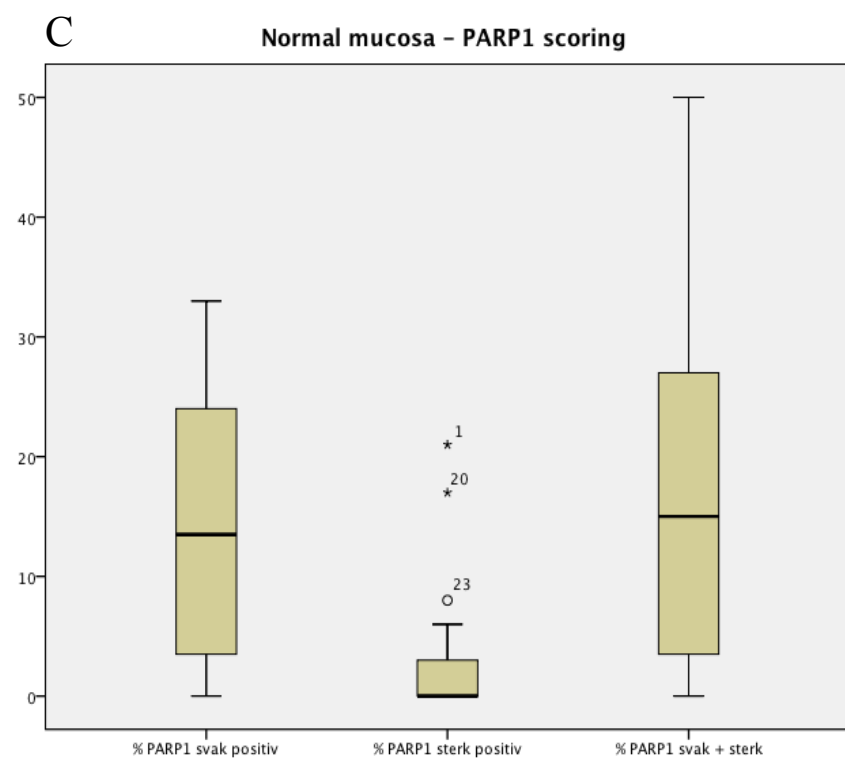
(Figur 13. Box-whisker diagram for CRC-utvalget som viser median celleandel med svak-, sterk, og samlet PARP1-scoring. Både interkvartilavstanden og variasjonsbredden vises også diagrammet.)

**Normal mucosa (figur 14 A-C):** For normal mucosa påviste vi PARP1-positivitet i alle non-peritumorale vevssnittene, med en variasjonsbredde på 1 % - 29 %. Svak PARP1-ekspresjon hadde en median på 18 % (IQR = 12,5 % - 26,75 %, variasjonsbredde = 8 % - 29 %), mens sterkt PARP1-ekspresjon hadde en median på 3 % (IQR = 0,75 % - 9,75 %, variasjonsbredde = 0 % - 21 %). En samlet PARP1-ekspresjon hadde en median på 22,5 % (IQR = 14 % - 34,25 %, variasjonsbredde 0 % - 50 %).

I peritumoralt vev påviste vi PARP1-positivitet i 21 av 22 vevssnitt (95,5 %), med en variasjonsbredde på 2 % - 33 %. Her var medianen for svak PARP1-positivitet på 9 % (IQR = 3 % - 19,5 %, variasjonsbredde = 0 % - 33 %), og for sterk PARP1-positivitet på 0 % (IQR = 0 % - 2,25 %, variasjonsbredde = 0 % - 17 %). En samlet PARP1-ekspresjon hadde en median på 9 % (IQR = 3 % - 24,25 %, variasjonsbredde = 0 % - 44 %).

Oppsummert, var PARP1-uttrykket i normalt mucosa vev overveiende svakt.

**A****Non-peritumoral - PARP1 scoring****B****Peritumoral - PARP1 scoring**

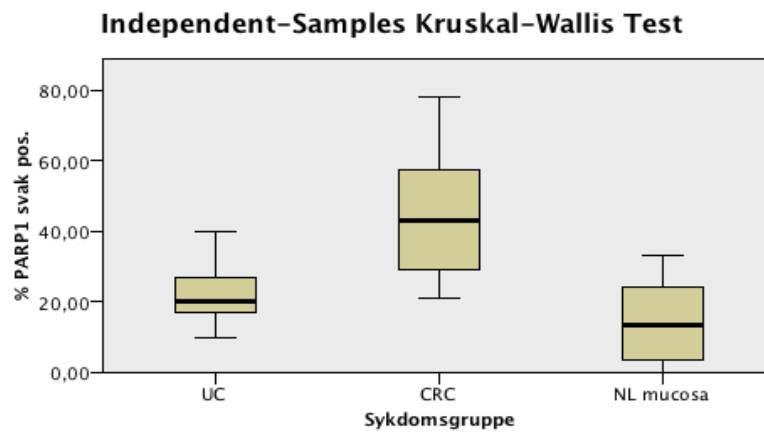


(Figur 14. Box-whisker diagram for kontrollutvalgene med normal mucosa som viser median celleandel med svak-, sterk-, og samlet PARP1-scoring. Både interkvartilavstanden og variasjonsbredden vises også diagrammet: A viser diagram for Non-peritumoralt vev; B viser digram for peritumoralt vev, mens C viser et diagram hvor non-peritumoralt og peritumoralt vev er samlet i ett utvalg (normal mucosa).)

### 4.3 Sammenligning av PARP1-uttrykk mellom UC, CRC, og normal mucosa

I forbindelse med sammenligningen av medianene til UC, CRC, og normal mucosa (non-peritumoral og peritumoral), ble undergruppene av normal mucosa (non-peritumoralt og peritumoralt) behandlet som en samlet, uavhengig gruppe - normal mucosa. Dette gjorde vi på bakgrunn av at utvalgsstørrelsen (n=6) til den non-peritumorale subgruppen var for liten med hensyn til den statistiske styrken i hypotesetester.

En svak PARP1-ekspresjon var påvist å være signifikant forskjellig mellom UC, CRC, og normal mucosa ( $p < 0.001$ ) (figur 15). En parvis gruppesammenligning (Post-hoc test med Bonferroni korreksjon) påviste ytterligere at andelen svak PARP-ekspresjon i CRC var signifikant høyere enn både UC ( $p < 0.001$ ) og normal mucosa ( $p < 0.001$ ). Det var derimot ingen signifikant forskjell i svak uttrykk mellom UC og normal mucosa.

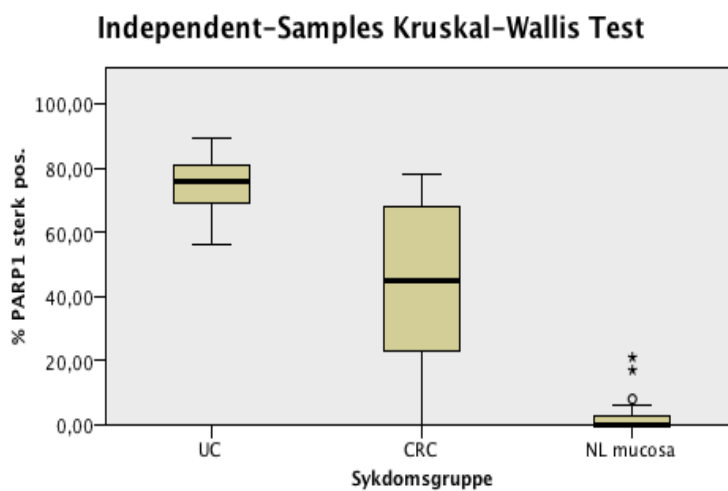


<b>Total N</b>	124
<b>Test Statistic</b>	62,583
<b>Degrees of Freedom</b>	2
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,000

1. The test statistic is adjusted for ties.

(Figur 15. Box-plot diagram fra Kruskal-Wallis test, der median celleandel med svak PARP1-scoring i UC -, CRC -, og Normal kontrollutvalg sammenlignes. Tilhørende post-hoc test med bonferroni korreksjon test er ikke vist i figuren)

For sterk PARP1-positiv scoring, ble det påvist signifikant høyere uttrykk både i UC og CRC i forhold til normal mucosa (UC:  $p < 0.001$ , CRC:  $p < 0.001$ ) (figur 16). Den sterke PARP1-ekspressjonen var også signifikant høyere i UC i forhold til CRC ( $p < 0.001$ ).



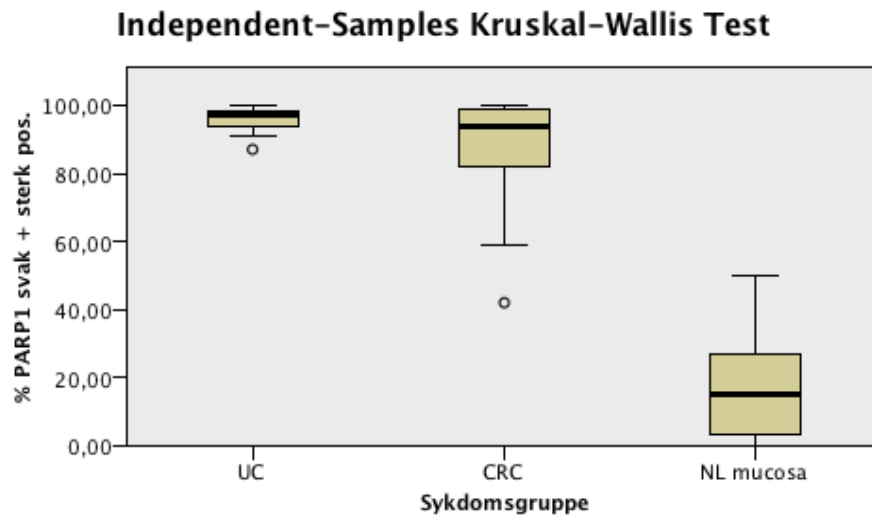
<b>Total N</b>	124
<b>Test Statistic</b>	85,313
<b>Degrees of Freedom</b>	2
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,000

1. The test statistic is adjusted for ties.

(Figur 16. Box-plot diagram fra Kruskal-Wallis test, der median celleandel med sterk PARP1-scoring i UC -, CRC -, og Normal kontrollutvalg sammenlignes. Tilhørende post-hoc test med bonferroni korreksjon test er ikke vist i figuren)



Den totale PARP1-positiviteten var som forventet signifikant høyere både i UC og CRC i forhold til normal mucosa (UC:  $p < 0.001$ ), CRC  $p < 0.001$ ) (figur 17). Derimot var det ingen signifikant forskjell i det totale PARP1-uttrykket mellom UC og CRC, dvs. at antall PARP1-positive celler i UC og CRC var forholdsvis like.



<b>Total N</b>	124
<b>Test Statistic</b>	66,029
<b>Degrees of Freedom</b>	2
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,000

1. The test statistic is adjusted for ties.

(Figur 17. Box-plot diagram fra Kruskal-Wallis test, der median celleandel med svak PARP1-scoring i UC -, CRC -, og normalt kontrollvalg sammenlignes. Tilhørende post-hoc test med bonferroni korreksjon test er ikke vist i figuren)

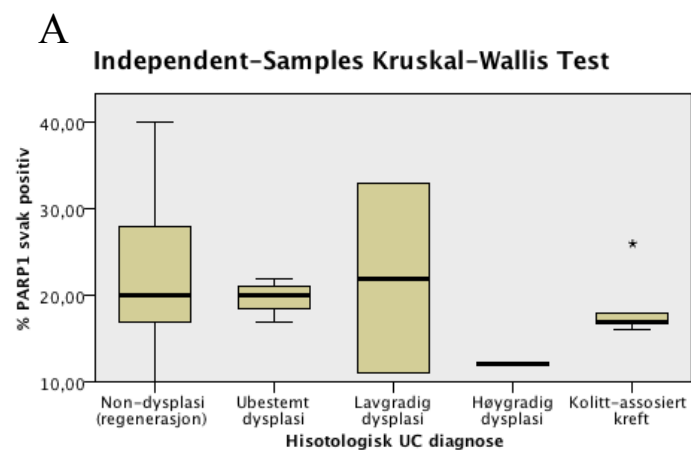
Oppsummert viser denne gruppesammenligningen at det foreligger en sterkere PARP1-ekspressjon i UC enn i CRC, mens en svak PARP1-ekspressjon forekommer hyppigere i CRC.

#### 4.4 PARP1-uttrykk i forhold til dysplasi-gradering av UC pasienter

En sammenligning av PARP1-positivitet i UC basert på den dysplastiske graderingen, viste at det var høyest andel av svak PARP1-ekspressjon i lavgradig dysplasi (22 %) og lavest andel i



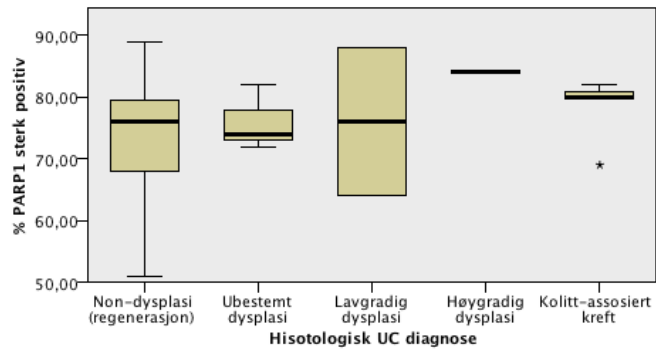
høygradig dysplasi (12 %), men denne forskjellen var ikke signifikant forskjellig (figur 18 A-C). Andelen av sterk PARP1-ekspressjon var høyest uttrykt ved høygradig dysplasi (84 %) og lavest i ubestemt dysplasi (median 74 %), men denne forskjellen var heller ikke signifikant forskjellig. I forhold til den samlede PARP1-ekspressjonen, var denne generelt høy ved alle de ulike dysplastiske graderingene, men høyest i lavgradig dysplasi (median 98 %) og lavest ved ubestemt dysplasi (median 94 %). Tellingene fra 2 (av 57) UC-vevssnitt ble ekskludert i denne sammenligningen, fordi opplysningene om dysplasigrad manglet.



<b>Total N</b>	55
<b>Test Statistic</b>	3,540
<b>Degrees of Freedom</b>	4
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,472

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

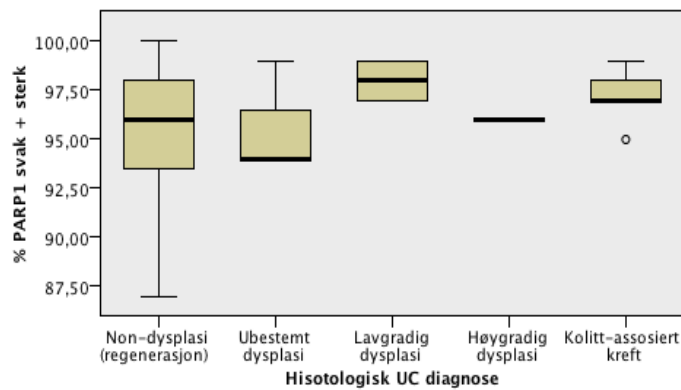
## B Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



<b>Total N</b>	55
<b>Test Statistic</b>	3,735
<b>Degrees of Freedom</b>	4
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,443

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

## C Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



<b>Total N</b>	55
<b>Test Statistic</b>	2,294
<b>Degrees of Freedom</b>	4
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,682

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

(Figur 18. Box-plot diagram fra Kruskal-Wallis test, der median celleandel med samlet PARP1-positivitet i de ulike dysplasi-gradene i UC-utvalget sammenlignes: A viser diagram for svak PARP1-scoring; B viser diagram for sterk PARP1-scoring; og C viser diagram for samlet PARP1-positivitet.)

## 5 Diskusjon

### 5.1 PARP1-ekspresjon i UC og sporadisk CRC

I dette forsøket har vi sett på det immunhistokjemiske nivået av PARP1-kjerneprotein på FFPE-materiale med kolonvev fra 9 UC-pasienter (fordelt på 57 biopsier fra kolon) og 33 sporadisk CRC-pasienter (fordelt på totalt 39 biopsier fra kolon). Selv om PARP1 har en bred biologisk funksjon, er vår interesse av å studere PARP1-ekspresjonen i disse sykdommene hovedsakelig knyttet til proteinets rolle som reparasjonsfaktor i cellens DDR. Denne rollen kan relateres til PARP1s evne til å utføre post-translasjonelle modifiseringer av andre reparasjonsproteiner som er involvert i BER. Dette skjer gjennom en enzymatisk prosess kalt PARylering (poly-ADP ribosylering) når det oppdages spesifikke former for DNA-skader.

Endringer i ekspresjonsnivå av DNA-reparasjonsfaktorer observeres ofte i ulike stadier av kreft men ikke i normalvev.<sup>138, 139</sup> Selv om PARP1 antas å bidra til å forhindre neoplastisk transformasjon av normale celler, er det også en av reparasjonsfaktorene som ofte er observert å være høyt uttrykt i kreftceller.<sup>109</sup> I tillegg kan det tyde på at PARP1 også er involvert i UC-patogenesisen<sup>140</sup> samt en rekke andre sykdommer som ikke er kreftrelaterte.<sup>141-143</sup>

I likhet med sporadiske kreftformer er det også påvist en oppregulert PARP1-aktivitet i den inflammasjonsmedierte kreftformen pankreaskreft, med pankreatitt som utgangspunkt.<sup>93</sup> Pasienter med kronisk pankreatitt har økt risiko for å utvikle pankreaskreft, som er en kreftform med særdeles dårlig prognose. UC er i likhet med pankreatitt, også en tilstand som kjennetegnes av kronisk idiopatisk inflammasjon med økt risiko for å utvikle kolonrektale kreftformer.

Gjennom å telle celler basert på å gradere den kromogene fargeintensiteten, har vi kartlagt ekspresjonsmønsteret av PARP1 både i UC og sporadisk CRC. Resultatene vi har fått fra denne studien viser at den totale celleandelen som uttrykker PARP1 er like for begge disse

sykdommene. I UC-utvalget var denne andelen 97 % mens andelen for sporadisk CRC var 94 %. Når det gjelder andelen celler i UC-utvalget som viste svake og sterke IHC-farginger, ble det observert en høyere celleandel med sterk PARP1-ekspresjon (76 %) i forhold til celleandelen med svak PARP1-ekspresjon (20 %). I CRC-utvalget ser vi en noe mer jevn fordeling mellom celleandel med svak (44 %) - og sterk proteinekspresjon (45 %). Selv om en høy andel CRC-tumorer uttrykker en forholdsvis sterkere PARP1-positivitet enn normalvev (svak -13,5 %, sterk - 0 %, samlet - 15 %), er dette uttrykket (statistisk signifikant) noe lavere i forhold til hva som ble sett i UC-lesjonene. Derimot uttrykker sporadiske CRC-tumorer en noe høyere andel svak PARP1 positivitet enn UC-lesjonene.

Sulzyc-Bielicka et.al har i en tidligere studie også brukt IHC for å studere PARP1-ekspresjonen i 151 Polske CRC-pasienter.<sup>144</sup> I denne studien ble det i likhet med våre resultater observert høy andel PARP1-positivitet. Men til forskjell fra våre resultater, observerte Sulzyc-Bielicka et.al en høyere andel CRC-tumorer med sterk PARP1-positivitet i forhold til svak PARP1-positivitet (32 %). Den resterende andelen på 6 % hadde ingen proteinekspresjon. Vi har i motsetning til Sulzyc-Bielicka et.al, ikke observert negativ PARP1-ekspresjon i vårt CRC-pasientutvalg. Alle CRC-pasientene i vår studie uttrykte enten mer eller mindre PARP1. En mulig forklaring på dette er at CRC er å anse som en heterogen kreftform, hvor den molekylære karsinogenesen kan variere fra pasient til pasient.<sup>145</sup>

Sulzyc-Bielicka et. al har i motsetning til våre to kategorier for fargeintensitet (svak og sterk), brukt 6 ulike kategorier for å gruppere fargeintensiteten av PARP1-ekspresjon. Hver kategori har blitt gitt en scoring som samsvarer med enten svak eller sterk positivitet. Fordelen med dette kvantifiseringssystemet er at det har en høyere sensitivitet samtidig som det generer mer informative resultatdata. Derimot kan et slikt system gi mindre reproducerbare telleresultater da man har flere kategorier av fargeintensitet å forholde seg til.<sup>146</sup> Vi har i motsetning til Sulzyc-Bielicka et. al sitt immunhistokjemiske scoringssystem ikke konvertert våre celledtellingene i scoringspoeng, men har direkte gruppert celledtellingene i enten svak eller sterk positivitet, siden vi kun har forholdt oss til to ulike kategorier av fargeintensitet.

Videre observerte den samme studien en positiv korrelasjon mellom høy PARP1-ekspresjon og sykdomsprogresjonen. Denne korrelasjonen hadde vi ikke mulighet til å bekrefte i vår studie, på grunn av at pasientdata om CRC-utvalgets Dukes stadium ikke var tilgjengelig for

oss under forsøksperioden. Andre studier har assosiert høy PARP1-ekspresjon i brystkreft, med forverret sykdomsprognose.<sup>147</sup> Dette kan være basert på premisset om at kreftceller evner å oppregulere aktiviteten til PARP1 eller andre DNA-reparasjonsfaktorer gjennom en CIN-mediert prosess.<sup>76, 148</sup> Oppregulert DNA-reparasjon i behandlingsresistente kreftceller, er noe som kan bidra til at de får en økt toleranse for cytotoksiske nivåer av DNA-skader i forhold til normale celler.

Dörsam et. al studerte også PARP1-ekspresjon i kolonvev fra musemodeller med IHC-metode.<sup>140</sup> Selv om IHC i denne studien bare ble brukt som supplerende metode for å understøtte studiens mer omfattende PARP1 knockout-forsøk, ble det i likhet med våre resultater, observert en generelt høy PARP1-ekspresjon i sporadisk CRC. I denne studien ble dette observert i sporadisk CRC-indusert kolon hos transgene musemodeller, mens i vår studie ble dette observert i humant vev. Det rapporteres videre at denne høye PARP1-ekspresjonen er korrelert med progresjonen av CRC i disse musemodellene. Derimot presiseres det ikke hvordan fargerresultatene for PARP1 har blitt evaluert i denne studien, slik at vi ikke fikk mulighet til å sammenligne nivåforskjeller i proteinekspresjon fra vår studie i forhold til denne studien. I følge forfatterne av studien, kan høye PARP1 nivåer ha en preventiv effekt i utviklingen av CRC i tidlig stadium, mens de i motsatt fall er med på å fremme CAC-progresjon hos UC-pasienter med dysplasi. Denne studien er spesielt interessant siden den er med på å belyse PARP1 som et multifunksjonelt protein med en potensiell tvetydig funksjon både i å opprettholde genomisk instabilitet og samtidig bidra til å fremme inflammasjonsmediert patogenese. Denne studien omtaler jeg ytterligere i avsnitt 5.3, som omhandler PARP1 sin potensielle rolle i UC-patogenese og CAC.

Vi har ingen sammenligningsgrunnlag for våre immunhistokjemiske funn i forhold til tidligere IHC-studier av PARP1 i UC. Det er derfor ytterlige behov for tilsvarende studier som kan bekrefte eller avkrefte våre funn

Basert på den immunhistokjemiske fargeintensiteten, kan man si noe om ekspresjonsnivået av PARP1. Om dette videre sier noe om DNA-reparasjonsaktiviteten i UC eller sporadisk CRC er vanskelig å si med sikkerhet, men kan blant annet være knyttet opp til hvilke typer DNA-reparasjonsmekanismer som er aktive, og eventuelt i hvilken grad de aktiveres i begge disse to sykdomstilstandene. Det er godt etablert viten at PARP1 har en sentral funksjon som initiator av BER, som er en reparasjonsmekanisme som hovedsakelig reparerer oksidative

basemodifikasjoner og SSBs. Disse formene for DNA-skader er blant de hyppigst induserte i kronisk inflammert tarmvev, forårsaket av høy ROS og RNS-syntese.<sup>149</sup> Trolig gjenspeiler de høye PARP1-nivåene i UC at det er spesielt BER-mekanismen som er oppregulert for å respondere på de høye DNA-skadenivåene i denne sykdomstilstanden. Dette påviste vi indirekte gjennom den høye forekomsten av PARP1 i UC-pasientutvalget vårt. Etersom PARP1 ikke nødvendigvis er direkte ensbetydende med oppregulert BER-aktivitet, kunne man eventuelt i fremtiden gjøre en bekreftende IHC-studie med et utvidende markørpanel. I dette panelet kunne man for eksempel inkludert mer BER-spesifikke proteiner som for eksempel XRCC1,<sup>150</sup> APE1,<sup>151</sup> OGG1,<sup>152</sup> og DNA-polymerase  $\beta$ ,<sup>153</sup> som alle har vist seg å være mer eller mindre mål for regulering via PARP1.

Tidligere forskning på DNA-reparasjon i UC er begrenset, og omfanget av BERs rolle i UC er også lite kartlagt. Derimot har MMR i UC blitt beskrevet tidligere.<sup>154</sup> Derimot har den foreløpige kartleggingen av DNA-reparasjonsstatusen i CRC vært bredere i forhold til UC. Farrington et.al har sett på sammenhengen mellom mutasjoner i BER-gener og CRC-utvikling i skotske CRC-pasienter. Her ble det observert at en bi-allelisk defekt i mutY DNA-glykosylase var sterkt assosiert med CRC i tidlig alder (< 55 år), mens en mono-allelisk defekt var assosiert med kreftutvikling i sen levealder.<sup>155</sup> Defekt i reparasjonsproteinene OGG1 og XRCC1 resulterer også i redusert BER-kapasitet, og kan gi økt predisposisjon for utvikling av CRC.<sup>156</sup> Redusert NER-aktivitet har blitt karakterisert i CRC, men da mest i forbindelse med SNPs av genene som koder for reparasjonsproteinene ERCC6 (Excision Repair Cross-Complementing, group 6) og XPC (Xeroderma Pigmentosum, complementation group C).<sup>157</sup> En dysfunksjonell MMR har lenge vært godt etablert i MSI-fenotypisk CRC.<sup>158</sup> Arvelige mutasjoner i reparasjonsproteinene ATM og PALB2 (Partner and localizer of BRCA 2 protein) som er involvert i HR-R i forbindelse med reparasjon av DSBs, er også forbundet med økt risiko for CRC.<sup>159</sup>

I denne studien sammenlignet vi også PARP1-ekspresjon i de ulike UC-dysplasigradene, som ikke viste noen statistisk forskjell. Dette gir en indikasjon på at DNA-skadenivået generelt forblir likt gjennom hele den dysplastiske UC-progresjonen. En forklaring på dette er at det kan forekomme andre former for DNA-skader enn de som er nevnt i UC (og CRC), da PARP1 også har vist seg å være involvert i en rekke andre reparasjonsmekanismer enn kun BER.

I en nylig publisert studie av De Angelis et.al studerte man forekomsten av DSBs i både UC og CRC-pasienter, gjennom måling av DSB-markøren  $\gamma$ H2AX.<sup>78</sup> Her påviste de et økende  $\gamma$ H2AX nivå som korrelerte med økende dysplasi i UC. Den høyeste forekomsten av  $\gamma$ H2AX ble sett i CAC og sporadiske CRC-lesjoner. Samtidig påviste de en invers korrelasjon mellom NUCKS1 og  $\gamma$ H2AX. Dette tilsa en økt induseringsfrekvens av DSBs parallelt med en redusert DSB-R aktivitet under CAC-progresjonen og i sporadisk CRC. NUCKS1 er i likhet med PARP1 et multifunksjonelt kjerneprotein, og er mest kjent for sin rolle som reparasjonsfaktor i DSB-R mekanismen HR-R.<sup>78, 160</sup>

I denne immunhistokjemiske studien kan vi ikke med sikkerhet si om PARP1 har en spesifikk rolle i reparasjonen av DSBs. Men siden PARP1 uttrykkes likt (og høyt) gjennom progresjonsstadiene i UC, kan man spekulere på om den har en delaktig rolle i reparasjon av DNA-skader generelt. DSBs induseres sjelden direkte og er mer et resultat av en akkumulasjon av mindre omfattende DNA-skader over tid.<sup>71</sup> Det at DSBs øker parallelt med de dysplastiske graderingene i UC, kan også komme av en videreutvikling av mindre omfattende DNA-skader som for eksempel basemodifikasjoner og SSBs. For eksempel er den oksidative basemodifikasjonen 8-OHdG av en av de hyppigste formene for DNA-skader som forekommer i UC, der dens lokale skadekonsentrasjon har vist seg å øke progressivt med sykdomsprogresjonen til UC. Konsentrasjonen 8-OHdG når til slutt et toppunkt i vevsregioner som har utviklet dysplasi eller CAC.<sup>149</sup> 8-OHdG er et potent mutagen som oppstår når nukleosiden deoxyguanosin (deoxyribose + guanin) i DNA-molekylet kjemisk oksideres av ROS.<sup>161</sup>

Basert på telleresultatene vi har fått med immunhistokjemisk metode, er det begrenset hva man kan forklare om underliggende molekylære mekanismer og hvilke kliniske effekter en høy PARP1-ekspresjon har i UC (og sporadisk CRC). I den videre drøftingen vil jeg kommentere interaksjonen mellom NF- $\kappa$ B og PARP1. I tillegg vil jeg trekke inn noen interessante proteomiske - og knockout studier for å forklare mulige årsaks mekanismer som kan medføre høy PARP1-ekspresjon i UC.

## 5.2 PARP1 og Tp53 i UC og CRC

Kronisk inflammert vev som stadig regenerer har vist seg å ha høyere forekomst av mutasjoner.<sup>162</sup> Under stadig repeterende vevskade - og tilhelingscykluser i UC, oppstår det hyppige celleproliferasjoner og differensieringer som er tett kontrollert for å sikre at det forekommer tilstrekkelig antall celledelinger som er nødvendig for å rekonstruere opprinnelig vev. Det er spesielt i regenerasjonsstadiet at cellen er høyst mottagelig for endringer i DNA som potenserer for utviklingen av dysplasi og neoplasi.<sup>163</sup>

Med tanke på at stamcellene i tykktarmens krypter er høyt proliferative i en bakgrunn av pro-inflammatorisk mikromiljø, er det ikke overraskende at risikoen for tumorutvikling er høyere i tykktarmsepitel som hyppig regenerer. En av de viktigste tumorsuppressorproteinene i DDR er Tp53. Det at det har blitt observert hyppige nivåfluktuasjoner av Tp53 under regenerasjonsprosessen, tilsier at Tp53 har en sentral koordinerende rolle i vevsrekonstruksjonen i UC.<sup>164</sup> For eksempel i initierende regenerasjonsfase ble Tp53-nivået observert å være nedjustert for trolig å tillate hyppig celledeling. I senere fase ble Tp53-nivået observert å være kraftig oppjustert igjen. Med tanke på at Tp53 kan være mutert hos både UC-pasienter med og uten dysplasi,<sup>165</sup> gir det ytterligere indikasjon for at villtype Tp53 er kritisk for koordineringen av den kontrollerte vevstilhelningen.

Både Tp53 og PARP1 har sentrale nøkkelfunksjoner i cellens DDR. Den potensielle interaksjonen mellom PARP1 og p53 er derfor et interessant tema i forhold til DNA-reparasjon i UC. Det er et tett samspill mellom ulike reparasjonsfaktorer når Tp53 fungerer som tumorsuppressor, og det kan tyde på at PARP1 er en av disse reparasjonsfaktorene.

Selv om den eksakte betydningen av et slikt samspill er noe uklart, har man i proteomiske studier sett en klar interaksjon som kan tyde på et funksjonelt samspill. Funnene til Malanga et.al antyder at det finnes tre mulige PAR-bindende motiver i Tp53 gensekvensen.<sup>166</sup> Fischbach et.al har påvist at det multifunksjonelle C-terminale domenet i Tp53, som blant annet er involvert i DNA-binding, transkripsjon og interaksjon med kofaktorer, muligens blir regulert gjennom PARylering av PARP1.<sup>167</sup> Kjemisk inaktivering av PARP1 i humane fibroblast - og brystkreftcellerlinjer, fører til at disse cellene får redusert evne til å aktivere Tp53-indusert celledarrest ved eksponering for  $\gamma$ -stråling.<sup>168</sup> Om den kjemiske inaktiveringen



av PARP1 førte til indirekte undertrykkelse av Tp53 i disse cellelinjene er plausibelt. Det har også blitt antydnet at PARP1-interaksjonen er viktig for kjernelokaliseringen av Tp53 hvor det gjør sin hovedfunksjon.<sup>169</sup>

Når det gjelder UC, har Friis-Ottesen et. al fra vår forskningsgruppe tidligere sett på Tp53 ekspresjon i kolonbiopsier. I denne studien ble det påvist en høy Tp53 akkumulasjon i dysplastisk vev med UC, i motsetning til inflammert tarmepitel uten dysplasi.<sup>165</sup> I diagnostisk sammenheng kan dette brukes som markør for å identifisere UC- pasienter med økt predisposisjon for CAC. For å studere hvordan Tp53 og PARP1 uttrykkes i forhold til hverandre i UC, kunne man ved en eventuell fremtidig publikasjon utført en korrelasjonsanalyse mellom Tp53 resultatene fra Friis-Ottessens sin studie og PARP1 resultatene fra denne studien.

Interaksjonen mellom PARP1 og Tp53 kan påvirke PARP1-ekspressjonen i sykdommene vi har sett på i denne studien. Siden mutasjoner som resulterer i funksjonstap av Tp53 er vanligere i sporadisk CRC enn i UC/CAC, kan dette påvirke PARP1-ekspressjonen i negativ retning. I CRC har det vist seg at andelen Tp53 mutasjoner ligger på 85 - 90 %, mens det i UC/CAC forekommer en større intravariasjon som kan være så lav som 33 % mutasjoner.<sup>170</sup> Dette kan være en forklaring på at CRC-tumorer i denne studien uttrykte en lavere andel med sterk PARP1-positivitet i forhold til UC-lesjoner.

I sporadisk CRC kan det også tenkes seg at de hyppige Tp53 mutasjonene er med å påvirke DNA-reparasjonsevnen til denne pasientgruppen, mens de i mindre grad påvirker DNA-reparasjon i UC da mutasjonsfrekvensen i denne sykdommen kan være lavere. Det er godt etablert at DNA-reparasjonsmekanismene i CRC tumorer ofte er dysfunksjonelle. Tp53s rolle i BER og NER har blitt beskrevet tidligere.<sup>171</sup> Mange gener som koder for reparasjonsproteiner i BER og NER reguleres av Tp53, og mutasjoner i Tp53-genet vil derfor ha en supprimerende effekt på BER og NER i sporadisk CRC. I UC derimot kan man spekulere om disse reparasjonsmekanismene er mer funksjonelle siden den neoplastiske transformasjonen ikke skjer i «non-progressors» individer.

### 5.3 PARP1 sin potensielle rolle i UC-patogenese og CAC

At økte nivåer av PARP1 kan fremme kronisk inflammasjon, er en interessant hypotese i forhold til UC-patogenesen. Denne hypotesen baserer seg på funn gjort i en rekke studier hvor man ser et potensielt synergisk samspill mellom PARP1 og transkripsjonsfaktorkomplekset NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B er et sentralt transkripsjonsfaktorkompleks som overstyrer reguleringen av immun - og inflammasjonsrelaterte gener. In vivo er NF- $\kappa$ B inaktivert når det er bundet til I- $\kappa$ B (Inhibitor of  $\kappa$ B). Ved stimuli blir I- $\kappa$ B fosforylert av IKK-kompleks (Inhibitor of  $\kappa$ B kinase) som i sin tur frigjør aktivert NF- $\kappa$ B. Gentoksisk stress og DNA-skader er blant stimuli som kan aktivere NF- $\kappa$ B.<sup>172</sup> Aktivert NF- $\kappa$ B motvirker Tp53-mediert apoptose og følgene av DNA-skader i cellen, og stimulerer istedenfor cellevekst og proliferering.<sup>173</sup> I UC og andre IBD-sykdommer påvises det høy NF- $\kappa$ B aktivitet,<sup>173</sup> som blant annet resulterer i høy tilstrømming av aktive leukocytter til Lamina propria. En konsekvens av denne inflammasjonsresponsen er økt utskillelse av ROS og RNS, som påfører tarmepitelet vevsskader.

Som multifunksjonelt protein, er det påvist at høye PARP1-nivåer kan bidra til å fremme UC-patogenese via en koaktiverende interaksjon med NF- $\kappa$ B. Funn som støtter en slik hypotese, er basert på en rekke proteomiske studier som har sett et sannsynlig interagerende samspill mellom PARP1 og NF- $\kappa$ B.

I Kameoka et. al sin studie ble PARP1 identifisert som koaktivator for NF- $\kappa$ B.<sup>174</sup> Dette bygget på at de observerte en høy bindingsaffinitet til p50 og p65-subenhetene av NF- $\kappa$ B transkripsjonsfaktorkomplekset. Disse to subenhetene muliggjør binding til målgener som NF- $\kappa$ B komplekset regulerer.<sup>175</sup> I følge Hassa et. al er ikke PARP1 sin koaktiverende effekt på NF- $\kappa$ B avhengig av enzymatisk PARylering.<sup>176</sup> Chang et. al rapporterer det motsatte.<sup>177</sup> For å bekrefte at dette er reelt kunne man gjøre en IHC-studie på PARP1 sitt enzymatiske produkt - PAR, for å se om dette var nedregulert eller oppregulert i UC. En lav PAR forekomst vil trolig indikere at det ikke foreligger en PARP1-indusert PARylering.

Stilmann et.al rapporterer at PARP1s aktiverende samspill med NF- $\kappa$ B er en respons på DNA-skader.<sup>82</sup> Dette skjer gjennom PARP1-mediert oppbygging av signalosom bestående av

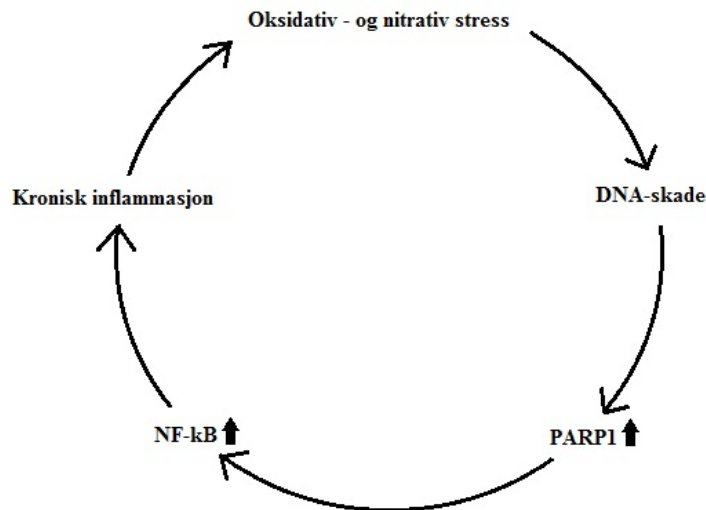
IKK $\gamma$ , PIASy (Protein Inhibitor of Activated STAT protein  $\gamma$ ) og ATM. Dette signalosomet har videre som formål å katalysere aktivering av IKK og NF- $\kappa$ B, med celleoverlevelse som endepunkt.

Altmeyer *et. al* påviste i sin gen-knockout studie at PARP1<sup>-/-</sup> mus med salmonella-induserte tarminfeksjon, hadde en forsinket utvikling av tarminfeksjon grunnet nedjustert NF- $\kappa$ B aktivitet.<sup>178</sup> I andre studier har man også observert at PARPi kan ha en inflammasjondempende effekt i kolon hos kolitt-induserte musemodeller.<sup>179</sup> Disse funnene kan ha en terapeutisk verdi dersom man kan bruke PARPi for å modulere inflammasjonsaktiviteten i IBD-sykdommer. I humane fibroblastcellelinjer celler som ble utsatt for oksidativ stress og kronisk inflammasjon, har man gjennom inaktivering av PARP1 greid å reversere utviklingen av forkortede telomerer og akselert aldring.<sup>180</sup> Basert på funnene fra studiene som er nevnt, tyder det på at NF- $\kappa$ B aktiveringen opphører når PARP1 blokkeres.

En nylig studie som er verdt å trekke frem er utført av Dörsam *et. al*. De har sammenlignet PARP1-ekspresjonen i PARP1 villtypemus og PARP1<sup>-/-</sup> mus etter enten eksponering for dextran sulfatnatrium (DSS) eller azoksymetan (AOM).<sup>140</sup> DSS er kjemisk potent kollittogen for induisering av CAC, mens AOM er et kjemisk mutagen som brukes til å fremkalle sporadisk CRC i dyremodeller. Ved både makro - og mikroskopisk evaluering ble det observert at tykktarmen til DSS eksponert villtypemus hadde et kraftigere inflammasjonsbilde, mens det var nærmest upreget hos DSS eksponert mus med PARP1<sup>-/-</sup> genotypen.

At det var et potensielt samspill mellom PARP1 og NF- $\kappa$ B som var relatert til disse observasjonene, ble indirekte bekreftet gjennom høye IHC-nivåer av NF- $\kappa$ B markørene STAT3 og syklin D i villtype musen. I tilfellet med AOM-eksponert villtype og PARP1<sup>-/-</sup> mus, ble det med massespektrometrisk kvantifisering observert høy enzymatisk PARP1-aktivitet i villtypen som var nærmest fraværende hos PARP1<sup>-/-</sup> genotypen. De høye nivåene av AOM-induserte DNA-skader førte ikke til noen tydelig tumordannelse i villtypens tykktarm, mens det forekom tumorer i PARP1<sup>-/-</sup> genotypens. Dette gir indikasjon på at DNA-reparasjonsaktivitet i villtype mus er oppregulert og forhindrer tumorutvikling i tidlig sykdomsfase. Med andre ord påpekes det her at PARP1 kan ha en tvetydig rolle i utvikling av kolorektale karsinomer, som avhenger av om utgangspunktet er kronisk inflammasjon eller ikke.

Funnene som er gjort i de nevnte studier er interessante siden de gir indikasjon på at PARP1 også kan bidra til å fremme UC gjennom å fungere som koaktivator for NF- $\kappa$ B. Ettersom oksidativt og nitrativt stress i UC resulterer i høy PARP1-ekspresjon, kan man spekulere på om dette indirekte fremmer en positiv sykluseffekt som forsterker UC-patogenese; forårsaket av en mulig aktiverende interaksjon mellom PARP1 og NF- $\kappa$ B (figur 19).



(Figur 19. Modellen illustrerer hvordan interaksjonen mellom PARP1 og NF- $\kappa$ B er involvert i UC-patogenesen.)

## 5.4 Metodeevaluering

### 5.4.1 IHC

Fordelene med å bruke IHC til å studere PARP1-uttrykket i denne studien, er at metoden er godt etablert for å studere og visualisere forekomsten av proteiner in situ. Selv om IHC-metoder mangler standardisering, er prosedyrene ofte enkle og krever minimalt med avansert og kostbart utstyr når de utføres manuelt. I tillegg er kommersielle reagenser og antistoffer godt tilgjengelig, og nye forbedrede teknikker utvikles stadig. Det at metodene ikke er standardiserte gir også rom for tilpasning gjennom empiriske forsøk. For eksempel er det ofte helt nødvendig å optimalisere metoden ved forskning på nye proteinmarkører. En annen unik egenskap som skiller IHC fra andre teknikker for proteindeteksjon, er at den morfologiske sammensetningen bevares i sin helhet. Dette er spesielt viktig når man studerer sammenhengen mellom vevsstruktur og mikromiljø i patologiske prosesser. Det at flere tusen

studier og rutinediagnostikk er basert på IHC-teknikker, gjenspeiler de nevnte fordelene med bruken av IHC.

Ankepunktene med IHC-metoder er blant annet mangel på standardisering, at det forekommer høy variabilitet i antistoffkvalitet samt etiske utfordringer i forhold til bruken av vertsdyr for antistoffproduksjon.<sup>181</sup> Variasjoner for prosedyrer og teknikker er i dag store. Hva som foretrekkes baseres ofte på preferanse gjennom empiri, erfaringer eller tradisjoner. Dette er faktorer som kan påvirke reproduserbarheten av IHC-farginger.

Jeg skal ikke gå detaljert inn på fordeler og ulemper med hver enkelt teknikk og kritiske ledd i IHC-prosedyrer, siden dette temaet er omfattende, og metodeutvikling ikke er oppgavens hovedfokus. Forenklet forklart er det flere pre-analytiske og analytiske forhold som avgjør fargerresultatets utfall som for eksempel vevsfixering, lagring, antigendemaskering, valg av primærantistoff, antistofffortynning og deteksjonssystem.<sup>132</sup> Å kontrollere alle disse variablene kan være utfordrende. I rutinelaboratorier går fremføring av biopsier gjennom mange ledd med flere involverte, og ved suboptimalt fargerresultat vil arbeidet med å finne årsaken være en tidskrevende prosess. Det store utvalget av firmaer som tilbyr antistoffer (og reagenser) byr også på nye utfordringer. En ulempe med dette er betydelig kvalitetsvariasjon på primærantistoff. Av egen erfaring kan dette medføre frustrasjon, forsinkelser og i noen tilfeller økte kostnader dersom nytt innkjøp må gjøres.

Å bruke IHC til å kvantifisere proteinkonsentrasjon, er ikke den best egnede metoden, siden forholdet mellom kromogent fargesubstrat og proteinkonsentrasjon ikke er lineært.<sup>182</sup> Til dette finnes det mer presise kvantifiseringsmetoder, som for eksempel ELISA og massespektrometriske teknikker. Disse metodene måleri suspensjoner eller oppløsninger, og ikke in situ.

#### **5.4.2 Immunhistokjemiske tellings - og scoringssystemer**

Ett av de viktigste post-analytiske trinnene i IHC-metoder er presentasjon og tolkning av fargerresultater. Dette trinnet er i dag lite standardisert, og resultatet beror ofte på hvilke kriterier og systemer for telling eller scoring som er valgt. De vanligste systemene som i dag brukes for evaluering og presentasjon av IHC-resultater, er basert på manuelle semikvantitative metoder. Disse metodene innebærer at man gjør en visuell vurdering av det

kromogene fargenedslaget, for så å omforme dette til ordinal - eller nominaldata for videre statistisk bearbeiding.<sup>146</sup>

En svakhet med semikvantitative tellemetoder er at de generer IHC-resultater som i mer eller mindre grad er preget av subjektive tolkninger og/eller systematisk bias, og er derfor lite reproducerbare.<sup>183</sup> Evalueringskriteriene som ligger til grunn for hvordan fargevariablene skal vurderes, kan variere fra studie til studie og bidrar til å komplisere resultatsammenligninger på tvers av uavhengige studier. I tillegg er evalueringskriteriene og systemene for celletelling eller scoring ofte individuelt tilpasset for hvert enkelt forsøk og markør, med målsetning å kunne besvare problemstillingen på best mulig måte. En ulempe med dette er at standardisering utelukkes. I følge Gibson-Corley et.al burde et stabilt og godt system ha; (1) tiltak som minimaliserer bias eller subjektiv telling; (2) gi telleresultater som er representativt for hele snittserien; (3) ha lesjonsparameterne som er spesifikke for vevet eller organet man studerer; (4) ha godt definerte evalueringskriterier, som tydeliggjør skillet mellom de ulike kategoriene for fargeintensitet; (5) være tolkningskonsistent, dvs. ikke være påvirket av «diagnostisk drift». Dette oppstår når evnen til å utføre telle eller score konsistent svekkes, og kan for eksempel skyldes for høyt antall vevssnitt, lang tid mellom avlesningssekvenser eller uklare evalueringskriterier for celletelling.<sup>184</sup>

Vanlige semikvantitative metoder for immunhistokjemisk celletelling eller scoring er insidensmetoden og ordinalmetoden.<sup>146</sup> Insidensmetoden er en enkel måte for celletelling, og innebærer at man kvalitativt grupperer fargeutfallet som negativt eller positivt, uten videre gradering av fargeintensitet. I ordinalmetoden graderes fargeintensiteten hierarkisk i flere kategorier, som skal reflektere ekspresjonsnivået av en bestemt markør. Kategorier for fargeintensitet på 3-5 grupper er vanligst, men det finnes systemer med flere grupper. Få grupper gir et mindre sensitivt system, mens for mange grupperinger går utover reproducerbarheten/repeterbarheten.

Systemet for celletelling vi har brukt i dette forsøket var spesifikt tilpasset vårt forsøk for å kartlegge ekspresjonsmønsteret av PARP1 på en best mulig måte. Våre telleresultater for PARP1-ekspresjon var basert på vurdering av kromogen fargeintensitet, som videre ble gruppert i negativ, svak positiv, og sterk positiv farging. Evalueringskriteriene for negativ ekspresjon var 0 % fargenedslag, 1 - 49 % for svak positiv, og 50 - 100 % for sterk positiv. I tillegg har vi også utført statistiske slutninger uten fargegradering, hvor vi kun har sett på

samlet positiv farging i forhold til negativ farging. Vi har derfor både brukt ordinal - og insidensmetode i vårt system for celletelling av PARP1-positivitet.

Selve celletellingen med dette systemet, bød tidvis på utfordringer ved tolkningen av fargeintensiteten. Spesielt var det utfordrende å gruppere og klassifisere moderate farginger som enten svak positiv eller sterk positiv farging. Dette skyldtes at overgangen mellom den øvre delen av fargeintensitetsskalaen for svak positiv farging og nedre delen av fargeintensitetsskalaen for sterk positiv farging, var visuelt vanskelig å skille. Hvilken kategori for fargeintensitet (svak eller sterk) de moderat positive fargingene fikk, var derfor i stor grad basert på en subjektiv oppfatning av fargenyanser (figur 20 A-F). Kjernefarginger som hadde et marginalt fargenedslag bød også på lignende utfordring, siden veldig svake farginger både kan representere reell farging eller bakgrunn. Disse nevnte utfordringene kan ha bidratt til både underestimering og overestimering av telleresultatene våre; en feilkilde som ubevisst kan ha bidratt til mer eller mindre skjeve telleresultater.

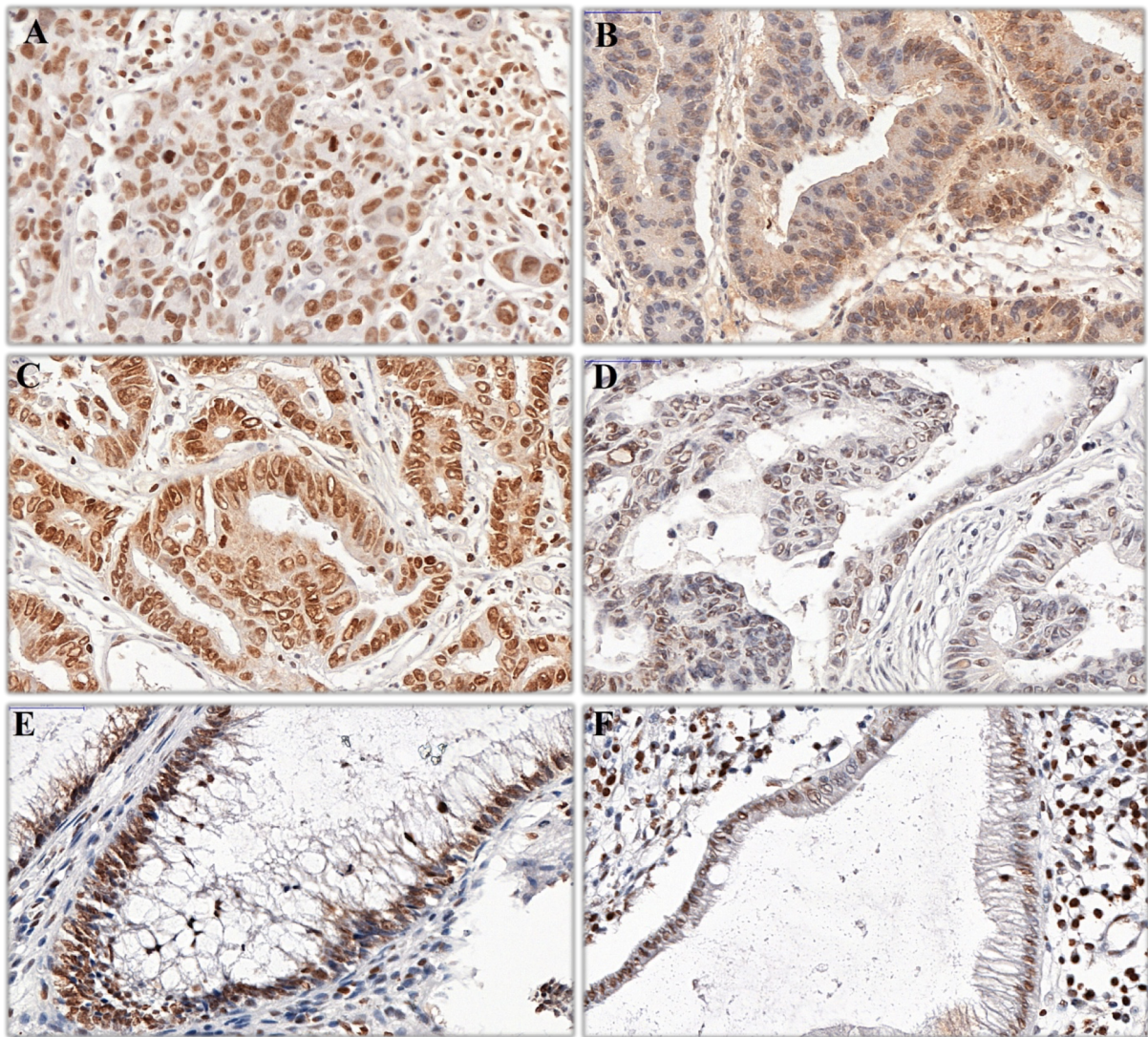
Det menneskelige synet har en naturlig begrenset evne til å skille små forskjeller i kontrastskalaen. Dette kan bidra til å gjøre det utfordrende å skille cellekjerner med små forskjeller i fargeintensitet.<sup>185</sup> Studier har belyst dette som en reell utfordring i forhold til reproduserbarhet ved manuell immunhistokjemisk kvantifisering.<sup>186</sup> For eksempel rapporterer Rimm et.al at patologer har en tendens til å overestimere negative farginger som i utgangspunktet er svakt positive.<sup>187</sup> Årsaken til dette i følge Rimm, kan være at det menneskelige synet er svakest på nyanser i lave fargeintensitetsskalaer.

En annen utfordring jeg opplevde var kjernefarginger som var heterogent kjernekonsentrerte, dvs. at fargeintensiteten varierte mye innad i kjernen (figur 20 A-F). Om disse fargingene skulle vurderes som svak eller sterk positive var også sterkt subjektivt preget. Hva som skyldtes dette fargefenomenet er vanskelig å si med sikkerhet, men en mulig årsak kan være inadekvat vevsfiksering eller langtidslagring, siden dette er faktorer som har vist seg å påvirke vevsmorfologien og vevsantignisiteten.<sup>188, 189</sup> Siden vårt forsøksmateriale med stor sannsynlighet ble preparert i tidsperioden mellom 1985 – 2003, er det vanskelig å identifisere om årsaken skyldtes inadekvat pre-analyse eller en naturlig vevsforandring.

En annen svakhet som er knyttet til kvantifiseringssystemet og/eller evalueringskriteriene vi brukte, var at grove grupperinger i bare svak og sterk positiv kan fremstå som noe



misvisende. Moderat positive prøver som vurderes enten som svakt eller sterk positiv, kan oppfattes som distinkt forskjellige i fargeintensitet, selv om forskjellene som i utgangspunktet skilte dem var små (figur 20 A-F). Sett i ettertid burde man kanskje vurdert å utvide ytterligere med tellekategorien – moderat positiv. Dette ville gitt et mer informativt telleresultat.



(Figur 20. Eksempler på vevssnitt (50x forstørrelse) som var utfordrende å telle, og som kan ha påvirket telleresultatenes presisjon: A viser ett vevssnitt fra pasientkode C05-16 med moderat positivitet, som er vanskelig å kategorisere som enten svakt eller sterk PARP1-positiv. Hvordan man scorer i dette eksempelet er sterkt subjektivt preget; B viser vevssnitt fra pasientkode C00-33, som i likhet med A var vanskelig å kategorisere som enten negativ eller svakt PARP1-positiv grunnet mye bakgrunn som maskerer reell farging; C og D viser vevssnitt fra de respektive prøvekodene C03-24 og C00-29 som viser en intracellulær heterogen PARP1-positivitet og som gjør det vanskelig å score presist. I tillegg har noen av cellene en kraftig positivitet i kjernemembranen og samtidig negativ eller svakt positivitet i sentrum av kjernen, noe som ytterligere kompliserer scoring; både E og F viser vevssnitt fra prøvekode S174 III som har et kraftig inflammatorisk bilde



*med utydelig avgrensning som kan gjøre celledelingen vanskelig. Denne problemstilling var spesielt gjeldene for UC-preparater.)*

En måte å omgå utfordringene som de manuelle kvantifiseringsystemene byr på, er å bruke automatisk digital bildeanalyse (ADB) som baserer seg på kvantifiseringsalgoritmer. Disse digitale patologisystemene kan utføre objektive kalkuleringer av immunhistokjemiske fargevariabler som for eksempel optisk tetthet, og generer derfor måledata på en kontinuerlig skala. En fordel med bruk av kontinuerlige måledata i forskning er at de først og fremst er lettere å reprodusere. I tillegg gir de bedre en statistisk styrke til å oppdage små forandringer av betydning i forhold til kvalitative og semikvantitative data.<sup>146</sup> Studier som sammenligner reproduserbarheten og sensitiviteten i ADB og manuell immunhistokjemisk scoring, har vist at ADB gir mer presise måledata som korrelerer bedre med det immunhistokjemiske markørtrykket.<sup>190</sup> ADB kan derfor bidra til å effektivisere diagnostikken, mens det kan bidra til standardisering, bedre reproduserbarhet og repeterbarhet i forskningssammenheng og følgelig mer pålitelige forskningsresultater som lettere kan sammenlignes på tvers av ulike studier.

Selv med de fordelene som følger med bruken av ADB, er disse systemene fortsatt lite utbredt. Det finnes et fåtall systemer som er kommersielt tilgjengelige, selv om dette tallet er økende. En mulig årsak er at implementeringen er tidkrevende. Systemenes kvantifiseringsalgoritmer har vist seg å være spesielt svake til å morfologisk karakterisere ulike celletyper og egenskaper (som for eksempel å skille mellom normale celler og kreftceller), og krever ofte en manuell overstyring for å kunne fungere optimalt.

Det er også begrensninger ved bruken av kromogenbasert IHC som vi har brukt i vår studie. Selv om begrensningene er mest relatert til ADB, er de også verdt å nevne. Det som kjennetegner bruken av kromogene substrater, er at de har en tendens til å gi et fargenedslag med høy tetthet. Dette kromogene fargenedslaget er lett å oppdage, men vanskelig å kvantifisere presist. Kromogent fargenedslag er heller ikke lineært i forhold til biomarkørkonsentrasjon i vevet.<sup>182</sup> For eksempel absorberer det hyppig anvendte kromogene substratet DAB (3,3'-diaminobenzidine) opptil 99 % av lyset, og etterlater kun 1 % av de totale lyssignalene tilgjengelig for analyse eller kvantifisering.<sup>146</sup>

En bedre løsning kan være fluoresenscebasert IHC, hvor fluorokrome substrater benyttes istedenfor. Fordelen med kvantitativ immunfluorescens (QIF) er at fluorokromer generer signaler med en bredere dynamisk signalrekkevidde i forhold til kromogener.<sup>191</sup> Dette gjør at QIF er spesielt godt egnet til å måle små forskjeller i biomarkøruttrykk. Fordelen med QIFs høye sensitivitet har blitt belyst av Welsh et.al, som brukte QIF til å måle konsentrasjonen av østrogenrespetor (ER) i brystkreftceller.<sup>192</sup> Ved å sammenligne med måleresultatene fra konvensjonell kromogenbasert IHC, viste det seg at 10-20 % av kasusene som var ER-negative med kromogenbasert IHC, var ER-positive med QIF. Den lave dynamiske signalrekkevidden til kromogene substrater var mulig årsak til at de lave ER-konsentrasjonene ikke var påvisbare. Den digitale helsnittskanneren vi brukte i vår studie for å fremskaffe digitale helsnittbilder, hadde ingen fluorescenslampe, bare lysfeltkilde, slik at det ikke var mulig å helsnittkanne snitt farget med fluorokromer.

### 5.4.3 TMA

Vevsmikromatrise (TMA) er en type FFPE-vevsblokk som kan inneholde et stort antall med små sylindriske vevskjerner, hentet fra FFPE-donorbiopsier. I motsetning til helsnitt som tradisjonelt blir brukt i IHC, er det både tids -og ressursbesparende å bruke TMA fordi det gjør det mulig å analysere representative vevsregioner fra flere helsnitt samlet, på ett og samme TMA-preparat.

I følge Vudoc et. al kan scoring av store biomarkørpaneler på helsnitt ta flere måneder å gjennomføre, mens det på TMA kan fullføres på få uker.<sup>193</sup> Siden en matrise også er skalerbar, kan man også analysere flere pasienter samtidig under identiske analyseforhold. Man reduserer også muligheten for resultatforskjeller som er knyttet til metode og/eller subjektiv tolkning.

Blant ulempene med TMA er at bare små utvalgte vevsregioner fra helsnitt er representert. Scoring av biomarkører på TMA gir derfor ikke alltid et helhetlig bilde og kan bidra til falske resultater. Spesielt i maligne epiteliale tumorer hvor det forekommer høy intra-tumoral heterogenitet, kan dette være problematisk.<sup>194</sup> En annen problemstilling som jeg selv erfarte, er tap av vevskjerner i TMA. Dette kan enten oppstå under konstruksjonen av TMA-preparatet eller i forbindelse med farging. Tekniske årsaker har vist seg å forårsake så mye som 10-30 % av vevskjernetapene i TMA.<sup>193</sup> Konsekvensen av dette er at man må ekskludere

disse fra TMA-studien, noe som bidrar til å redusere analysens statistiske styrke. Denne problemstillingen kan løses ved å inkludere flere vevskjerner fra donorblokken, hvor minst fire vevskjerner har vist seg å være tilstrekkelig.<sup>195</sup>

I dette forsøket brukte vi både TMA og helsnitt for å studere PARP1-uttrykk. TMA-snitt ble brukt på CRC-lesjoner, mens helsnitt med UC-lesjoner (på grunn av at TMA-preparatene med UC som vi hadde, var nedskårede). Basert på egne erfaringer var både farging og scoring på TMA-preparater en tids- og ressursbesparende prosess i forhold til helsnitt. Analysetiden på helsnitt var betydelig lengre. Reagens- og antistoffforbruket var også mye høyere på helsnitt. Å telle på helsnitt var også en utmattende øvelse, fordi man har et betydelig større område å avlese. Dette kan påvirke tellepresisjonen siden konsentrasjonsevnen kan svekkes. Et viktig aspekt med å telle på helsnitt, var at jeg måtte spre celletellingen jevnt over et større område for å fange opp tilfeller hvor det forekom PARP1 intra-heterogenitet. Denne utfordringen gjelder også for TMA-snitt, men i mye mindre grad. Teller man for konsentrert i helsnitt med heterogen PARP1-farging, kan man få telleresultater med systematisk bias og skjevhet.

Siden deler av oppgaven gikk ut på å sammenligne PARP1-ekspresjon i UC og CRC, kunne man eventuelt standardisert opplegget ved enten bare å bruke TMA-snitt eller bare helsnitt, istedenfor å bruke begge parallelt. Siden man i TMA-snitt bare teller på et mindre avgrenset område, er telleresultatene også lettere å reprodusere, i motsetning til helsnitt. Som tidligere nevnt gjorde jeg celletellingen på helsnitt på et betydelig større område, og der jeg tilfeldig valgte å telle PARP1 kan ha påvirket sluttresultatet, siden det kromogene fargenedslaget ikke nødvendigvis var jevnt fordelt over hele snittet. Det kan derfor hjelpe å markere koordinatene ved telling på helsnitt, slik at det telles på like områder ved kontrolltelling av en annen person. Alternativt kan man også ta flere representative bilder som flere kan telle. På bakgrunn av dette er det mulig at telleresultatene fra CRC-TMA var noe lettere å reprodusere i forhold til UC-helsnitt.

#### **5.4.4 Digital patologi**

Formålet med digital patologi, er å forenkle og effektivisere måten patologifaglige virksomheter utfører diagnostisering, opplæring, og prøvehåndtering. I tillegg generer denne teknologien billedata som gir plassbesparende arkivering, som er lettere å hente frem til eventuelt å dele via telepatologi eller publisering. I forhold til kvantitativ-IHC, kan digital

patologi med ADB generere mer pålitelige resultater uten bias. I Norge har blant annet Nasjonal-IKT et mål om gradvis å implementere digital patologi i patologiavdelinger rundt om i de regionale helseforetakene.<sup>196</sup> De potensielle utfordringene den digitale overgangen kan ha er blant annet personvern, datasikkerhet, systembrudd og implementeringskostnader.

## 6 Konklusjon

PARP1-ekspresjon i UC-CAC progresjonen og i sporadisk CRC viser seg å være overveiende høyt. Ekspresjonsmønsteret som er påvist er homogent kraftig i UC generelt og mer heterogent i sporadisk CRC med både svak og kraftig ekspresjon. Ettersom oksidativt og nitrativt stress er sterkt assosiert med disse sykdommene, induseres det høye nivåer av DNA-skader i tarmepitelceller hos disse pasientgruppene. Ettersom PARP1 er sentral i initieringen av BER, resulterer dette i en høy PARP1-ekspresjon for å respondere på den høye DNA-skadefrekvensen som forekommer i UC og CRC. Ytterligere IHC-studier med en utvidet BER-spesifikt markørpanel hvor man forslagsvis inkluderte XRCC1, OGG1, APE1, og DNA-polymerase  $\beta$ , trengs for å bekrefte at det foreligger en oppregulert PARP1-mediert BER aktivitet i UC og CRC. I tillegg er det behov for ytterligere ekspresjonsstudier på PARP1 i UC, som kan bekrefte eller avkrefte våre funn hos denne pasientgruppen.

## Referanseliste

1. Turner K. Noneoplastic Diseases of the Colon. In: A N, editor. Gastrointestinal Pathology. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2017. p. 689.
2. Fenger C. Fordøjelseskanal og peritoneum. In: C F, U B, P PC, G KJ, N G, editors. Klinisk patologi. 1st ed. Copenhagen: FADL's Forlag AS; 2002. p. 245.
3. National Cancer Institute. Colon [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov): National Cancer Institute; [Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/colon?redirect=true>.
4. Clevers H. The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell*. 2013;154(2):274-84.
5. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2012;3(3):153-73.
6. Petras R E. Nonneoplastic Intestinal Diseases. In: E MS, editor. Diagnostic Surgical Pathology. II. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015. p. 1458.
7. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2012;380(9853):1606-19.
8. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;287(1):G7-17.
9. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
10. Loftus EV, Jr., Sandborn WJ, Lindor KD, Larusso NF. Interactions between chronic liver disease and inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 1997;3(4):288-302.

11. Helsebiblioteket. Ulcerøs kolitt 2018 [Available from: <http://www.helsebiblioteket.no/pasientinformasjon/alle-brosjyrer/ulceros-kolitt>].
12. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications. *Human Pathology*. 1983;14(11):931-68.
13. Bressenot A, Cahn V, Danese S, Peyrin-Biroulet L. Microscopic features of colorectal neoplasia in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(12):3164-72.
14. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55(6):749-53.
15. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *The American journal of gastroenterology*. 2004;99(7):1371-85.
16. Burstein E, Fearon ER. Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(2):464-7.
17. Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, Charabaty A. Current Management of Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR*. 2011;4(2):53-61.
18. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526-35.
19. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2012;10(6):639-45.

20. Gordon I O. Inflammatory Bowel Disease. In: A N, editor. *Gastrointestinal Pathology*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2007. p. 588.
21. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
22. Kuek A, Hazleman BL, Östör AJK. Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. *Postgraduate Medical Journal*. 2007;83(978):251-60.
23. Drew DA, Cao Y, Chan AT. Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16:173.
24. WHO - International Agency for Research on Cancer. Colorectal Cancer 2018 [Available from: [http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10\\_8\\_9-Colorectum-fact-sheet.pdf](http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf)].
25. Rish K, Hernandez Gonzalo D, Schaeffer D F. Epithelial Neoplasms of the Colon. In: A N, editor. *Gastrointestinal Pathology*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2017. p. 855.
26. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. COLORECTAL CANCER. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15065-.
27. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2012;62(4):220-41.
28. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*. 2007;21(20):2525-38.
29. Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA. Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *Gastroenterology*. 2010;138(3):877-85.
30. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2011;22(9):1958-72.

31. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS one*. 2011;6(6):e20456.
32. Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Rickert A, Hoffmeister M. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study. *Annals of internal medicine*. 2011;154(1):22-30.
33. Mayo Clinic. Colon cancer 2018 [Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/symptoms-causes/syc-20353669>].
34. Cooper H S. Intestinal Neoplasms. In: E MS, editor. *Diagnostic Surgical Pathology*. II. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015. p. 1534-5.
35. Oncolex. Stadier ved kreft i tykk- og endetarm 2016 [Available from: <http://oncolex.no/Tykkertarm/Bakgrunn/Stadier>].
36. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1932;35(3):323-32.
37. Mayo Clinic. Treatment: Mayo Clinic; 2018 [updated 3.7.2018. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/diagnosis-treatment/drc-20353674>].
38. Oncolex. Kirurgi ved lokalavansert tykktarmskreft: Oncolex; 2014 [updated 6.4.2014. Available from: <http://oncolex.no/Tykkertarm/Prosedyre katalog/BEHANDLING/Kirurgi/Tykkertarm-Lokalavansert-lokalt-residiv?lg=procedure>].
39. H. S, M. B, L. B. Palliativ kjemoterapi og strålebehandling ved metastatisk kolorektal cancer *Tidsskriftet: Den Norske Legeforening*; 2008 [Available from: <https://tidsskriftet.no/2008/01/tema-kolorektal-kreft/palliativ-kjemoterapi-og-stralebehandling-ved-metastatisk-kolorektal>].



40. Scarpa M, Castagliuolo I, Castoro C, Pozza A, Scarpa M, Kotsafti A, et al. Inflammatory colonic carcinogenesis: a review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):6774-85.
41. Subramaniam R, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Mechanistic roles of epithelial and immune cell signaling during the development of colitis-associated cancer. *Cancer research frontiers*. 2016;2(1):1-21.
42. Thrumurthy SG, Thrumurthy SSD, Gilbert CE, Ross P, Haji A. Colorectal adenocarcinoma: risks, prevention and diagnosis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2016;354.
43. Koizumi JH, Schron DS. Cytologic features of colonic adenocarcinoma. Differences between primary and metastatic neoplasms. *Acta cytologica*. 1997;41(2):419-26.
44. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396:643.
45. Geigl JB, Obenauf AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. Defining 'chromosomal instability'. *Trends in genetics : TIG*. 2008;24(2):64-9.
46. Bathe OF, Farshidfar F. From Genotype to Functional Phenotype: Unraveling the Metabolomic Features of Colorectal Cancer. *Genes*. 2014;5(3):536-60.
47. Chen R, Lai LA, Brentnall TA, Pan S. Biomarkers for colitis-associated colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(35):7882-91.
48. Chen R, Bronner MP, Crispin DA, Rabinovitch PS, Brentnall TA. Characterization of genomic instability in ulcerative colitis neoplasia leads to discovery of putative tumor suppressor regions. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2005;162(2):99-106.
49. Willenbacher RF, Aust DE, Chang CG, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH, 2nd, et al. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *The American journal of pathology*. 1999;154(6):1825-30.

50. Sebastian S, Hernández HV, Myrelid P, Kariv R, Tsianos E, Toruner M, et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). *Journal of Crohn's and Colitis*. 2014;8(1):5-18.
51. Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*. 2006;127(3):469-80.
52. Yoshida N, Kinugasa T, Ohshima K, Yuge K, Ohchi T, Fujino S, et al. Analysis of Wnt and beta-catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer research*. 2015;35(8):4403-10.
53. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
54. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJV, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9433-8.
55. Thompson SL, Bakhom SF, Compton DA. Mechanisms of chromosomal instability. *Current biology : CB*. 2010;20(6):R285-95.
56. Sansregret L, Vanhaesebroeck B, Swanton C. Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2018;15(3):139-50.
57. Bull LN, Pabón-Peña CR, Freimer NB. Compound Microsatellite Repeats: Practical and Theoretical Features. *Genome Research*. 1999;9(9):830-8.
58. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-87.e3.
59. Li G-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*. 2007;18:85.
60. Jackson AL, Chen R, Loeb LA. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(21):12468-73.

61. Lovig T, Andersen SN, Clausen OP, Rognum TO. Microsatellite instability in long-standing ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2007;42(5):586-91.
62. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. MSI testing and its role in the management of colorectal cancer. *Current treatment options in oncology*. 2015;16(7):30-.
63. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9:489.
64. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology*. 2008;134(4):988-97.
65. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*. 2011;25(10):1010-22.
66. Mojarad EN, Kuppen PJK, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*. 2013;6(3):120-8.
67. Derks S, Postma C, Moerkerk PT, van den Bosch SM, Carvalho B, Hermsen MA, et al. Promoter methylation precedes chromosomal alterations in colorectal cancer development. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology*. 2006;28(5-6):247-57.
68. Juo YY, Johnston FM, Zhang DY, Juo HH, Wang H, Pappou EP, et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*. 2014;25(12):2314-27.
69. Sanchez JA, DeJulius KL, Bronner M, Church JM, Kalady MF. Relative role of methylator and tumor suppressor pathways in ulcerative colitis-associated colon cancer. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(9):1966-70.

70. Hoeijmakers JHJ. DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(15):1475-85.
71. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.
72. Bauer NC, Corbett AH, Doetsch PW. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic acids research*. 2015;43(21):10083-101.
73. Strachan T, Read A P. Instability of the human genome, mutation and DNA repair. In: Kingston F, editor. *Human Molecular Genetics 3*. 3rd ed. New York: Garland Science; 2004. p. 344-5.
74. Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(9):585-98.
75. O'Connor Mark J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*. 2015;60(4):547-60.
76. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11:239.
77. Westbrook AM, Wei B, Braun J, Schiestl RH. Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer research*. 2009;69(11):4827-34.
78. De Angelis PM, Schjolberg AR, Hughes JB, Huitfeldt HS, Norheim Andersen S, Ostvold AC. Nondysplastic Ulcerative Colitis Has High Levels of the Homologous Recombination Repair Protein NUCKS1 and Low Levels of the DNA Damage Marker Gamma-H2AX. *Inflammatory bowel diseases*. 2018;24(3):593-600.
79. Aravind L, Walker DR, Koonin EV. Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Research*. 1999;27(5):1223-42.

80. Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1170:29-40.
81. Kelley M, Fishel M. Overview of DNA repair pathways, current targets, and clinical trials bench to clinic. In: Kelley M, Fishel M, editors. *DNA Repair in Cancer Therapy*. 2nd ed: Academic Press; 2016. p. 22-4.
82. Stilmann M, Hinz M, Arslan SC, Zimmer A, Schreiber V, Scheidereit C. A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced IκB kinase activation. *Mol Cell*. 2009;36(3):365-78.
83. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502:333.
84. Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JH. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(7):465-81.
85. Jiricny J. Postreplicative Mismatch Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a012633.
86. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*. 2008;18(1):134-47.
87. Shibata A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutation research*. 2017;803-805:51-5.
88. Jeggo PA, Löbrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene*. 2007;26:7717.
89. Schreiber V, Dantzer F, Ame J-C, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7:517.

90. Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochemical and biophysical research communications*. 1963;11:39-43.
91. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal*. 1999;342 ( Pt 2):249-68.
92. Barkauskaite E, Jankevicius G, Ladurner AG, Ahel I, Timinszky G. The recognition and removal of cellular poly(ADP-ribose) signals. *The FEBS journal*. 2013;280(15):3491-507.
93. Martinez-Bosch N, Fernandez-Zapico ME, Navarro P, Yelamos J. Poly(ADP-Ribose) Polymerases: New Players in the Pathogenesis of Exocrine Pancreatic Diseases. *The American journal of pathology*. 2016;186(2):234-41.
94. Bai P, Virág L. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS Letters*. 2012;586(21):3771-7.
95. Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. (ADP-ribose)<sub>n</sub> participates in DNA excision repair. *Nature*. 1980;283:593.
96. Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*. 2000;39(25):7559-69.
97. Liu C, Vyas A, Kassab MA, Singh AK, Yu X. The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(14):8129-41.
98. King BS, Cooper KL, Liu KJ, Hudson LG. Poly(ADP-ribose) Contributes to an Association between Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A in Nucleotide Excision Repair. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(47):39824-33.
99. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) Binds to Specific Domains in DNA Damage Checkpoint Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(52):40974-80.

100. Dong F, Soubeyrand S, Hache RJ. Activation of PARP-1 in response to bleomycin depends on the Ku antigen and protein phosphatase 5. *Oncogene*. 2010;29(14):2093-103.
101. Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ, et al. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(2):1197-208.
102. Shibata A, Kamada N, Masumura K, Nohmi T, Kobayashi S, Teraoka H, et al. Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*. 2005;24(8):1328-37.
103. Shibata A, Maeda D, Ogino H, Tsutsumi M, Nohmi T, Nakagama H, et al. Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age. *Mutation research*. 2009;664(1-2):20-7.
104. Tong WM, Yang YG, Cao WH, Galendo D, Frappart L, Shen Y, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 plays a role in suppressing mammary tumorigenesis in mice. *Oncogene*. 2007;26(26):3857-67.
105. Huber A, Bai P, de Murcia JM, de Murcia G. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(8-9):1103-8.
106. Wang X, Liu L, Montagna C, Ried T, Deng CX. Haploinsufficiency of Parp1 accelerates Brca1-associated centrosome amplification, telomere shortening, genetic instability, apoptosis, and embryonic lethality. *Cell death and differentiation*. 2007;14(5):924-31.
107. Sugo N, Niimi N, Aratani Y, Masutani M, Suzuki H, Koyama H. Decreased PARP-1 levels accelerate embryonic lethality but attenuate neuronal apoptosis in DNA polymerase beta-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;354(3):656-61.

108. Nosho K, Yamamoto H, Mikami M, Taniguchi H, Takahashi T, Adachi Y, et al. Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the early stage of colorectal carcinogenesis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2006;42(14):2374-81.
109. Ossovskaya V, Koo IC, Kaldjian EP, Alvares C, Sherman BM. Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes & Cancer*. 2010;1(8):812-21.
110. Singh N. Enhanced poly ADP-ribosylation in human leukemia lymphocytes and ovarian cancers. *Cancer letters*. 1991;58(1-2):131-5.
111. Gonçalves A, Finetti P, Sabatier R, Gilabert M, Adelaide J, Borg J-P, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mRNA expression in human breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2011;127(1):273-81.
112. Csete B, Lengyel Z, Kadar Z, Battyani Z. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase-1 expression in cutaneous malignant melanomas as a new molecular marker of aggressive tumor. *Pathology oncology research : POR*. 2009;15(1):47-53.
113. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*. 2014;6(3):1769-92.
114. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2016;8(1):57-84.
115. Cottet F, Blanche H, Verasdonck P, Le Gall I, Schachter F, Burkle A, et al. New polymorphisms in the human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coding sequence: lack of association with longevity or with increased cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2000;78(8):431-40.
116. Hao B, Wang H, Zhou K, Li Y, Chen X, Zhou G, et al. Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2004;64(12):4378-84.



117. Lockett KL, Hall MC, Xu J, Zheng SL, Berwick M, Chuang S-C, et al. The ADPRT V762A Genetic Variant Contributes to Prostate Cancer Susceptibility and Deficient Enzyme Function. *Cancer Research*. 2004;64(17):6344.
118. NCBI - The National Center for Biotechnology Information. PARP1 poly(ADP-ribose) polymerase 1 [ Homo sapiens (human) ] NCBI: NCBI; 2018 [updated 14.10.2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/142#gene-expression>.
119. Lee Jm, Ledermann JA, Kohn EC. PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Annals of Oncology*. 2014;25(1):32-40.
120. Guo Gs, Zhang Fm, Gao Rj, Delsite R, Feng Zh, Powell SN. DNA repair and synthetic lethality. *International Journal Of Oral Science*. 2011;3:176.
121. O'Neil NJ, Bailey ML, Hieter P. Synthetic lethality and cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2017;18:613.
122. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *The New England journal of medicine*. 2009;361(2):123-34.
123. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9737):235-44.
124. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(4):293-301.
125. Carney B, Kossatz S, Lok BH, Schneeberger V, Gangangari KK, Pillarsetty NVK, et al. Target engagement imaging of PARP inhibitors in small-cell lung cancer. *Nature Communications*. 2018;9(1):176.

126. Kummar S, Chen A, Parchment RE, Kinders RJ, Ji J, Tomaszewski JE, et al. Advances in using PARP inhibitors to treat cancer. *BMC Medicine*. 2012;10:25-.
127. U.S Food and Drug Administration. FDA approves rucaparib for maintenance treatment of recurrent ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer [www.fda.gov](http://www.fda.gov): US Food and Drug Administration; 2018 [Available from: <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm603997.htm>].
128. Wang C, Jette N, Moussienko D, Bebb DG, Lees-Miller SP. ATM-Deficient Colorectal Cancer Cells Are Sensitive to the PARP Inhibitor Olaparib. *Translational Oncology*. 2017;10(2):190-6.
129. Ghiringhelli F, Richard C, Chevrier S, Vegran F, Boidot R. Efficiency of olaparib in colorectal cancer patients with an alteration of the homologous repair protein. *World J Gastroenterol*. 2016;22(48):10680-6.
130. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(18):1697-708.
131. Kamel D, Gray C, Walia JS, Kumar V. PARP Inhibitor Drugs in the Treatment of Breast, Ovarian, Prostate and Pancreatic Cancers: An Update of Clinical Trials. *Current drug targets*. 2018;19(1):21-37.
132. Kim S-W, Roh J, Park C-S. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2016;50(6):411-8.
133. Human Protein Atlas. RNA and protein expression overview [Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143799-PARP1/tissue>].
134. Human Protein Atlas. Immunohistochemistry [Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143799-PARP1/antibody#immunohistochemistry>].

135. Kalyuzhny A E. Ancillary Reagents for IHC. In: E KA, editor. Immunohistochemistry - Essential Elements and Beyond. Minneapolis: Springer; 2016. p. 34.
136. E KA. Ancillary Reagents for IHC. In: E KA, editor. Immunohistochemistry - Essential Elements and Beyond. Minneapolis: Springer; 2016. p. 30-1.
137. Human Protein Atlas. Lymph node - Expression summary [Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143799-PARP1/tissue/lymph+node>].
138. Abdel-Fatah T, Arora A, Gorguc I, Abbotts R, Beebejaun S, Storr S, et al. Are DNA repair factors promising biomarkers for personalized therapy in gastric cancer? Antioxidants & redox signaling. 2013;18(18):2392-8.
139. Jewell R, Conway C, Mitra A, Randerson-Moor J, Lobo S, Nsengimana J, et al. Patterns of Expression of DNA Repair Genes and Relapse From Melanoma. Clinical Cancer Research. 2010;16(21):5211-21.
140. Dorsam B, Seiwert N, Foersch S, Stroh S, Nagel G, Begaliew D, et al. PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018;115(17):E4061-e70.
141. Pacher P, Szabo C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. Cardiovascular drug reviews. 2007;25(3):235-60.
142. Obrosova IG, Li F, Abatan OI, Forsell MA, Komjáti K, Pacher P, et al. Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activation in Diabetic Neuropathy. Diabetes. 2004;53(3):711-20.
143. Strosznajder RP, Czubowicz K, Jesko H, Strosznajder JB. Poly(ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. Molecular neurobiology. 2010;41(2-3):187-96.

144. Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Hybiak J, Majewicz-Broda A, Safranow K, Domagala W. Colorectal cancers differ in respect of PARP-1 protein expression. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*. 2012;63(2):87-92.
145. Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2018;85(1-2):72-84.
146. Meyerholz DK, Beck AP. Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. *Laboratory Investigation*. 2018;98(7):844-55.
147. Rojo F, García-Parra J, Zazo S, Tusquets I, Ferrer-Lozano J, Menendez S, et al. Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer. *Annals of Oncology*. 2012;23(5):1156-64.
148. Lee AJX, Endesfelder D, Rowan AJ, Walther A, Birkbak NJ, Futreal PA, et al. Chromosomal Instability Confers Intrinsic Multi-Drug Resistance. *Cancer research*. 2011;71(5):1858-70.
149. D'Inca R, Cardin R, Benazzato L, Angriman I, Martines D, Sturniolo GC. Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and dysplasia. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(1):23-7.
150. El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(19):5526-33.
151. Prasad R, Dyrkheeva N, Williams J, Wilson SH. Mammalian Base Excision Repair: Functional Partnership between PARP-1 and APE1 in AP-Site Repair. *PloS one*. 2015;10(5):e0124269.
152. Noren Hooten N, Kompaniez K, Barnes J, Lohani A, Evans MK. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(52):44679-90.

153. Sukhanova M, Khodyreva S, Lavrik O. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair. *Mutation research*. 2010;685(1-2):80-9.
154. Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, et al. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res*. 2000;60(17):4864-8.
155. Farrington Susan M, Tenesa A, Barnetson R, Wiltshire A, Prendergast J, Porteous M, et al. Germline Susceptibility to Colorectal Cancer Due to Base-Excision Repair Gene Defects. *American Journal of Human Genetics*. 2005;77(1):112-9.
156. Przybylowska K, Kabzinski J, Sygut A, Dziki L, Dziki A, Majsterek I. An association selected polymorphisms of XRCC1, OGG1 and MUTYH gene and the level of efficiency oxidative DNA damage repair with a risk of colorectal cancer. *Mutation research*. 2013;745-746:6-15.
157. Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, Thuita LW, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Genetic Variation in the Nucleotide Excision Repair Pathway and Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006;15(11):2263-9.
158. Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie*. 2002;84(1):27-47.
159. AlDubayan SH, Giannakis M, Moore ND, Han GC, Reardon B, Hamada T, et al. Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. *American Journal of Human Genetics*. 2018;102(3):401-14.
160. Parplys AC, Zhao W, Sharma N, Groesser T, Liang F, Maranon DG, et al. NUCKS1 is a novel RAD51AP1 paralog important for homologous recombination and genome stability. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(20):9817-34.

161. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. 2009;27(2):120-39.
162. Kiraly O, Gong G, Olipitz W, Muthupalani S, Engelward BP. Inflammation-Induced Cell Proliferation Potentiates DNA Damage-Induced Mutations In Vivo. *PLoS Genetics*. 2015;11(2):e1004901.
163. Lagasse E. Cancer stem cells with genetic instability: the best vehicle with the best engine for cancer. *Gene Therapy*. 2007;15:136.
164. Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Kiritsy CP, Lynch SE. p53 expression during normal tissue regeneration in response to acute cutaneous injury in swine. *J Clin Invest*. 1994;93(5):2206-14.
165. Friis-Ottessen M, Burum-Auensen E, Schjolberg AR, Ekstrom PO, Andersen SN, Clausen OP, et al. TP53/p53 alterations and Aurora A expression in progressor and non-progressor colectomies from patients with longstanding ulcerative colitis. *International journal of molecular medicine*. 2015;35(1):24-30.
166. Malanga M, Pleschke JM, Kleczkowska HE, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) Binds to Specific Domains of p53 and Alters Its DNA Binding Functions. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(19):11839-43.
167. Fischbach A, Krüger A, Hampp S, Assmann G, Rank L, Hufnagel M, et al. The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by PARP1. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(2):804-22.
168. Wieler S, Gagné J-P, Vaziri H, Poirier GG, Benchimol S. Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Is a Positive Regulator of the p53-mediated G1 Arrest Response following Ionizing Radiation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(21):18914-21.

169. Kanai M, Hanashiro K, Kim SH, Hanai S, Boulares AH, Miwa M, et al. Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribose)ylation. *Nature cell biology*. 2007;9(10):1175-83.
170. Itzkowitz SH. Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35(3):553-71.
171. Smith ML, Seo YR. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis*. 2002;17(2):149-56.
172. Park MH, Hong JT. Roles of NF- $\kappa$ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 2016;5(2):15.
173. Viennois E, Chen F, Merlin D. NF- $\kappa$ B pathway in colitis-associated cancers. *Translational gastrointestinal cancer*. 2013;2(1):21-9.
174. Kameoka M, Ota K, Tetsuka T, Tanaka Y, Itaya A, Okamoto T, et al. Evidence for regulation of NF-kappaB by poly(ADP-ribose) polymerase. *The Biochemical journal*. 2000;346 Pt 3:641-9.
175. Urban MB, Schreck R, Baeuerle PA. NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *The EMBO Journal*. 1991;10(7):1817-25.
176. Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(49):45588-97.
177. Chang WJ, Alvarez-Gonzalez R. The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(50):47664-70.
178. Altmeyer M, Barthel M, Eberhard M, Rehrauer H, Hardt WD, Hottiger MO. Absence of poly(ADP-ribose) polymerase 1 delays the onset of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced gut inflammation. *Infection and immunity*. 2010;78(8):3420-31.

179. Larmonier CB, Shehab KW, Laubitz D, Jamwal DR, Ghishan FK, Kiela PR. Transcriptional Reprogramming and Resistance to Colonic Mucosal Injury in Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP1)-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(17):8918-30.
180. Boesten DMPHJ, de Vos-Houben JMJ, Timmermans L, den Hartog GJM, Bast A, Hageman GJ. Accelerated aging during chronic oxidative stress: a role for PARP-1. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:680414-.
181. Thousands of goats and rabbits disappear from troubled antibody provider's facility [press release]. *Springer Nature*2016.
182. Ciftlik AT, Lehr HA, Gijs MA. Microfluidic processor allows rapid HER2 immunohistochemistry of breast carcinomas and significantly reduces ambiguous (2+) read-outs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(14):5363-8.
183. Aeffner F, Wilson K, Martin NT, Black JC, Hendriks CLL, Bolon B, et al. The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis: Manual Versus Automated Scoring as Ground Truth. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(9):1267-75.
184. Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for valid histopathologic scoring in research. *Veterinary pathology*. 2013;50(6):10.1177/0300985813485099.
185. Peck AR, Gironde MA, Liu C, Kovatich AJ, Hooke JA, Shriver CD, et al. Validation of tumor protein marker quantification by two independent automated immunofluorescence image analysis platforms. *Modern Pathology*. 2016;29:1143.
186. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Barnes DM, Anderson E, Bobrow LG, et al. Study of Interlaboratory Reliability and Reproducibility of Estrogen and Progesterone Receptor Assays in Europe Documentation of Poor Reliability and Identification of Insufficient Microwave Antigen Retrieval Time as a Major Contributory Element of Unreliable Assays. *American Journal of Clinical Pathology*. 2001;115(1):44-58.



187. Rimm DL, Giltane JM, Moeder C, Harigopal M, Chung GG, Camp RL, et al. Bimodal population or pathologist artifact? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(17):2487-8.
188. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American journal of surgical pathology*. 2000;24(7):1016-9.
189. Xie R, Chung J-Y, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2011;59(4):356-65.
190. Matos LL, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MA. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2006;61(5):417-24.
191. Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, Neumeister VM, Rimm DL. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2015;95(4):385-96.
192. Welsh AW, Moeder CB, Kumar S, Gershkovich P, Alarid ET, Harigopal M, et al. Standardization of estrogen receptor measurement in breast cancer suggests false-negative results are a function of threshold intensity rather than percentage of positive cells. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(22):2978-84.
193. Voduc D, Kenney C, Nielsen TO. Tissue Microarrays in Clinical Oncology. *Seminars in radiation oncology*. 2008;18(2):89-97.
194. Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *International journal of cancer*. 2001;93(3):346-52.

195. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *The American journal of pathology*. 2001;159(6):2249-56.

196. Nasjonal IKT HF. Prosjektet Digital patologi er godt i gang med gjennomføringsfasen: Nasjonal IKT HF,; 2018 [updated 12.10.2018. Available from: <https://nasjonalikt.no/prosjekter/digital-patologi/digital-patologi-gjennomforingsfase/prosjektet-digital-patologi-er-godt-i-gang-med-gjennomforingsfasen>.

# Appendiks

## IHC-prosedyre for PARP1 (til FFPE-vevsmateriale)

1. Deparafiniser snittene i 30 min ved 60°C i varmeskap.
2. Sett snittene i xylen i 2 x 10 min
3. Rehydrer i 100% etanol i 2 x 5 min, 95% etanol i 5 min, 70% etanol i 5 min, 50% ethanol i 5 min, og ddH<sub>2</sub>O i 2 x 5 min
4. Blokker for endogen peroksidaseaktivitet ved å inkubere snittene i DAKO EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM841)
5. Skyll i 1x DAKO vaskebuffer i 3 x 5 min (bruk Dako EnVision FLEX wash buffer 20x konsentratløsning, DM851)
6. Antigendemaskering: bruk citratebuffer pH 6. Sett vevssnittene I mikrobølgeovn og velg program P100 (maks styrke). Trykk på + for å legge til tid (omtrent 2-3 min for nå kokepunkt). Når kokepunkt er nådd, reduserer styrken ved å velge program P25 for å opprettholde en temperatur på under 85°C. Trykk på + for å velge varmebehandlingstid på 30 min. Etterfyll karene med buffer dersom buffer har fordampet underveis.
7. La snittene avkjøle i romtemperatur i 20 min.
8. Skyll snittene i rennende kaldt vann i 5 min, før vask i 1 x DAKO vaskebuffer 3 x 5 min.
9. Inkuber snittene I blokkeringsløsning TBS + 1 % BSA I 1t ved romtemperatur.
10. Appliser anti-PARP1 mus monklonalt antistoff fra Sigma-Aldrich (AMAb90960, konsentrasjon = 1000µg/ml) med en bruksfortynning på 1:7500, fortynnet i DAKO EnVision FLEX antibody diluent (DM830), dekk over med plastikk dekkfilm og inkuber over natt ved 4°C i fuktekammer.
11. Vask snittene i 1X DAKO vaskebuffer 3 x 5 min.
12. Inkuber i bruksklart DAKO EnVision FLEX/HRP (DM842) i 30 min ved romtemperatur (dette er en blanding av anti-kanin-HRP og anti-mus-HRP)
13. Vask i 1X DAKO vaskebuffer i 3-5 min
14. For å visualisere immunkompleksene, inkuberes snittene med en løsning av 25 µl DAKO EnVision FLEX DAB+Chromogen (DM847) og 1 ml EnVision FLEX Substrate Buffer (DM843). Inkubasjonstiden er på 10-15 min ved romtemperatur
15. Skyll snittene i ddH<sub>2</sub>O i 5 min
16. Kontrastfarg ved å dyppe snittene et par sekunder i hematoksylin.
17. Skyll snittene med rennende vann i 5 min.

## Kordinater/oppsett for CRC-TMA preparater

**CRC III TMA (11x12 matrix, 1 mm core)**

Nyre	C03-45	C03-45	C03-45	93-3P	93-3P		C00-12P	C00-12P		Cancere
						C00-11P	C00-11P			Peritumor.
	C03-42	C03-42	C03-42	93-9P	93-9P		C00-16P	C00-16P	milt	Non-perit.
						C00-09N	C00-09N			
	C03-29	C03-29	C03-29	95-1P	95-1P		C00-19P	C00-19P	C00-36P	C00-36P
						C00-06P	C00-06P			
	C03-28	C03-28	C03-28	95-5P	95-5P		C00-21P	C00-21P	C03-37P	C03-37P
						C00-03P	C00-03P			
	C03-27	C03-27	C03-27	98-19P	98-19P		C00-24P	C00-24P	C03-39P	C03-39P
						C00-02P	C00-02P			
				99-06P	99-06P				Pankr.	
	C00-33	C00-33	C00-33			C99-21	C99-21	C00-26P	C00-26P	
				99-13P	99-13P					
	C00-29	C00-29	C00-29			C99-20P	C99-20P	C00-29P	C00-29P	
				99-15P	99-15P					C03-40P
Lever	C00-27	C00-27	C00-27			C99-19P	C99-19P			C03-40P

**CRC IV TMA (11x12 matrix, 1 mm core)**

C03-01	C03-01	C03-01		C03-04	C03-04	C03-04		C03-05	C03-05	C03-05
C03-07	C03-07	C03-07		C03-08	C03-08	C03-08		C03-08a	C03-08a	C03-08a
C03-09	C03-09	C03-09		C03-10	C03-10	C03-10		C03-11	C03-11	C03-11
C03-12	C03-12	C03-12		C03-15	C03-15	C03-15		C03-16	C03-16	C03-16
C03-17	C03-17	C03-17		C03-18	C03-18	C03-18		C03-19	C03-19	C03-19
C03-20	C03-20	C03-20		C03-21	C03-21	C03-21		C03-22	C03-22	C03-22
C03-23	C03-23	C03-23		C03-24	C03-24	C03-24		C03-24a	C03-24a	C03-24a
C03-25	C03-25	C03-25		C03-30	C03-30	C03-30		C03-31a	C03-31a	C03-31a
C03-32	C03-32	C03-32		C03-33	C03-33	C03-33		C03-34	C03-34	C03-34
Pankreas		Appendix		Hjerte		Tynntarm		C03-34a	C03-34a	C03-34a

**CRC V TMA (11x12 matrix, 1 mm core)**

C03-35	C03-35	C03-35		C03-35a	C03-35a	C03-35a		C03-36	C03-36	C03-36
C03-36a	C03-36a	C03-36a		C03-38a	C03-38a	C03-38a		C03-41	C03-41	C03-41
C03-42	C03-42	C03-42		C03-43	C03-43	C03-43		C03-44	C03-44	C03-44
C03-44a	C03-44a	C03-44a		C03-45	C03-45	C03-45		C03-45a	C03-45a	C03-45a
C05-01	C05-01	C05-01		C05-02	C05-02	C05-02		C05-03	C05-03	
C05-04	C05-04	C05-04		C05-05	C05-05	C05-05		C05-08	C05-08	C05-08
C05-09	C05-09	C05-09		C05-10	C05-10	C05-10		C05-12	C05-12	C05-12
C05-15	C05-15	C05-15		C05-16a	C05-16a	C05-16a		C05-18	C05-18	C05-18
C05-20	C05-20	C05-20		C05-22	C05-22	C05-22		C05-23	C05-23	C05-23
Pankreas	Appendix			Hjerte	Tynntarm			C05-24	C05-24	C05-24

**Tabell S1 - Utstyr og reagenser**

Produktnavn	Produktnr.	Produsent	By, Land	Analyse
Pannoramic MIDI bright-field scanner	NA	3DHistech	Budapest, Ungarn	Digital patologi
Pannoramic Viewer versjon 1.15.4	NA	3DHistech	Budapest, Ungarn	Digital patologi
EnVision FLEX™ Peroxidase blocking reagent	DM841	Dako	Santa Clara, CA, USA	IHC
EnVision FLEX™ Wash buffer	DM851	Dako	Santa Clara, CA, USA	IHC
EnVision FLEX™ Substrate buffer	DM843	Dako	Santa Clara, CA, USA	IHC
EnVision FLEX™ DAB+	DM847	Dako	Santa Clara, CA, USA	IHC
EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution 50x, High pH	DM848	Dako	Santa Clara, CA, USA	IHC
EnVision FLEX™ Antibody diluent	DM830	Dako	Santa Clara, CA, USA	IHC
Bovine Serum Albumin (BSA)	A9647	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	IHC
Citric acid monohydrate (konsentrat til citratbuffer pH 6)	C71239	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	IHC
Mayer's Hematoksylin	26043-05	E.M.S	Hatfield, PA, USA	IHC
Pertex® mounting medium	00840	HistoLab	Göteborg, Sverige	IHC
SPSS versjon 24	NA	IBM	Armonk, NY, USA	Statistikk
3DHistech TMA Master II	NA	3DHistech	Budapest, Ungarn	TMA
TMA control software	NA	3DHistech	Budapest, Ungarn	TMA
Tris-MOPS-SDS Running Buffer	M00139	Genscript	Piscataway, NJ, USA	WB
Mini-PROTEAN TetraCell elektroforesemodul	NA	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	WB
PowerPac™ HC strømkilde	NA	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	WB
ExpressPlus™ PAGE Gels	M41212S	Genscript	Piscataway, NJ, USA	WB
10x Tris/Glycine Transfer Buffer	161-0771	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	WB
LAS-4000 mini kamera	NA	FujiFilm	Tokyo, Japan	WB
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	34076	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA	WB
Mini Trans-BlotCell blottingmodul	NA	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	WB

**Tabell S2 - Antistoff**

Navn (primær/Sekundær)	Vertsdyr	Produktnr.	Lot	Fortynning	Produsent	Analyse
Monoklonalt anti-PARP1 (Primær)	Mus	AMAb90960	2846 (klon CL2209)	1:7500	Sigma-Aldrich	IHC, WB
EnVision™ FLEX/HRP, anti-mus/kanin IgG (Sekundær)	Geit	DM842	NA	Bruksklar	DAKO	IHC
Anti-mus IgG-HRP koblet (Sekundær)	Hest	7076s	NA	1:10000	Cell Signaling Tech.	WB

### Tabell S3 - Resultatdata fra celletelling

PARP1- UC helsnitt (1000 celler (minst 500) telles forsøksvis per prøve):

Prøve ID	Neg	Svak +	Sterk +
S12 I	12	173	815
S12 III	27	180	793
S12 IV	22	174	804
S12 V	127	163	710
S12 VI	54	186	760
S62 I	19	213	768
S62 II	12	298	690
S62 III	13	185	802
S62 IV	1	107	892
S62 V	22	131	847
S62 VII	17	184	799
S62 VIII	23	98	879
S70 I	17	194	789
S70 II	52	110	838
S70 III	35	198	767
S70 IV	2	156	842
S70 V	0	220	780
S70 VI	12	104	884
S70 VII	7	108	885
S164 I F	61	202	737
S169 I F	41	124	835
S169 II F	62	212	726
S169 V2 F a	32	214	754
S169 V2 F b	32	137	831
S174 0 F2	86	331	583
S174 I F2	40	174	786
S174 III F1	7	169	824
S174 III F2	30	165	805
S174 III F3	23	179	798
S174 III F4	33	165	802
S174 III F7	51	255	694
S174 IV F	45	183	772
S174 IX F	11	229	760
S174 VIII F1	38	131	831
S174 VIII F2	91	199	710
S174 VIII F3	41	195	764
S191 F V	90	277	633
S191 F W	60	255	685
S191 F X	55	285	660
S191 F Y	37	173	790
S191 F Z	21	204	775
S191 F Å	18	314	668
S191 F Æ	22	301	677
S191 F Ø	29	335	636
S192 II F	65	220	715
S192 III F	33	210	757
S192 V F	86	185	729
S192 VI F	46	221	733
S192 VII F	13	166	821
S192 VIII F	57	222	721
S216 I F	85	402	513
S216 II F	32	310	658

S216 III F	65	370	565
S216 IV F	79	346	575
S216 V F	92	337	571
S216 VI F	45	271	684
S216 VII F	29	279	692
S216 VIII F	85	333	582

PARP1- CRC TMA (1000 celler (minst 500) telles forsøksvis per prøve):

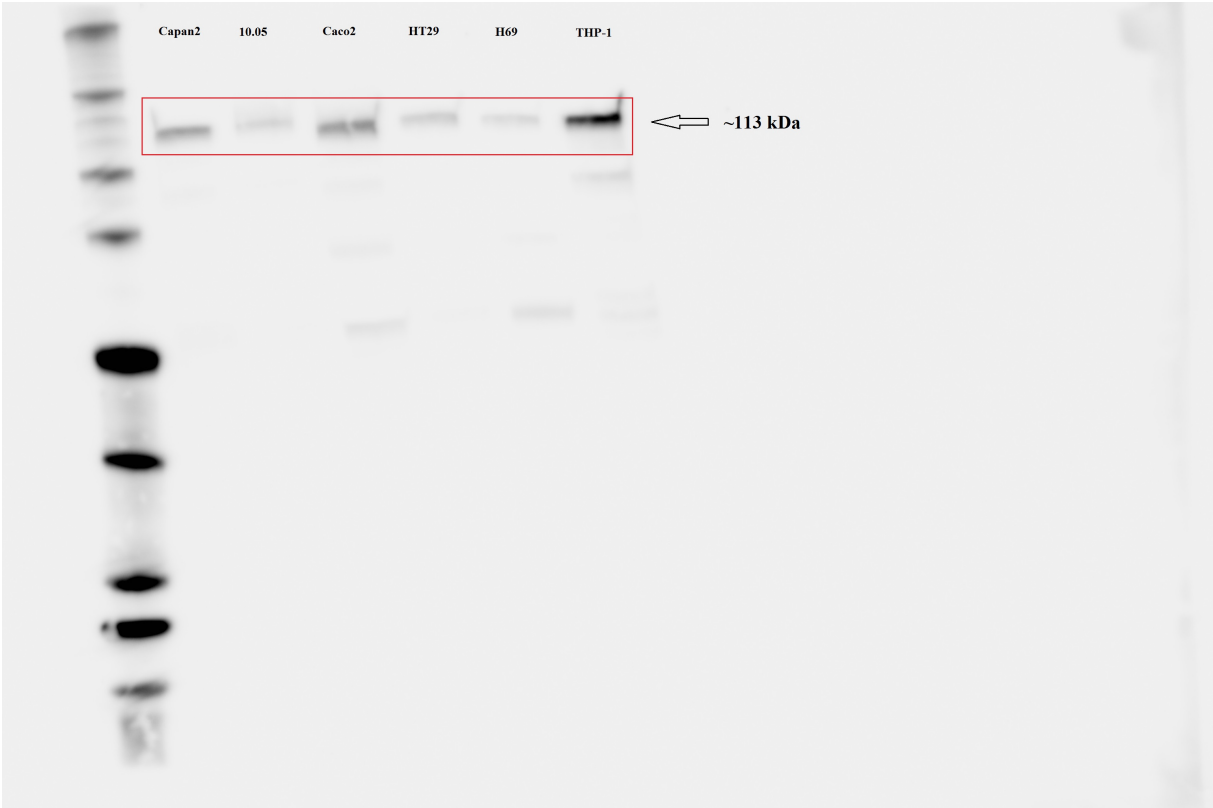
<b>Cancere</b>	<b>Normal mucosa - kontrol</b>	<b>Proksimal mucosa</b>
----------------	--------------------------------	-------------------------

Prøve ID	Neg	Svak +	Sterk +
<b>CRC TMA III</b>			
C00-27	386	512	102
C00-29	109	753	109
C00-33	209	631	160
C03-27	715	258	27
C03-28	794	144	62
C03-29	842	151	7
C03-42	924	76	0
C03-45	753	220	27
93-3P	825	169	6
93-9P	938	59	3
95-1P	983	16	1
95-5P	857	141	2
98-19P	957	43	0
99-06P	671	326	3
99-13P	831	130	39
99-15P	780	171	49
C99-19P	807	163	30
C99-20P	974	26	0
C99-21	-	-	-
C00-02P	973	27	0
C00-03P	925	73	2
C00-06P	996	4	0
C00-09N	504	285	211
C00-11P	557	267	176
C00-12P	886	110	4
C00-16P	946	49	5
C00-19P	596	324	80
C00-21P	991	9	0
C00-24P	985	15	0
C00-26P	693	303	4
C00-29P	970	30	0
C03-36P	658	316	26
C03-37P	-	-	-
C03-39P	-	-	-
C03-40P	-	-	-
<b>CRC TMA IV</b>			
C03-01	-	-	-
C03-04	-	-	-
C03-05	200	452	348



C03-07	286	537	177
C03-08	34	221	745
C03-08a	11	211	778
C03-09	364	598	38
C03-10	73	405	522
C03-11	43	292	665
C03-12	142	479	379
C03-15	9	336	655
C03-16	130	630	240
C03-17	329	642	29
C03-18	42	512	446
C03-19	20	294	686
C03-20	184	599	217
C03-21	163	518	319
C03-22	123	442	435
C03-23	7	247	745
C03-24	0	424	576
C03-24a	0	550	450
C03-25	30	364	606
C03-30	15	329	656
C03-31a	31	354	615
C03-32	0	236	764
C03-33	4	604	392
C03-34	4	277	719
C03-34a	0	270	730
<b>CRC TMA V</b>			
C03-35	130	563	307
C03-35a	127	591	282
C03-36	577	422	1
C03-36a	-	-	-
C03-38a	6	273	721
C03-41	410	352	238
C03-42	-	-	-
C03-43	11	426	563
C03-44	56	252	692
C03-44a	1	243	756
C03-45	186	694	120
C03-45a	99	402	56
C05-01	3	293	707
C05-02	0	280	720
C05-03	6	374	620
C05-04	15	349	422
C05-05	-	-	-
C05-08	-	-	-
C05-09	142	232	626
C05-10	0	85	915
C05-12	233	267	0
C05-15	128	560	312
C05-16a	20	511	259
C05-18	8	163	829
C05-20	7	207	786
C05-22	-	-	-
C05-23	74	2	701
C05-24	166	570	264

**Resultat fra western blot analyse**

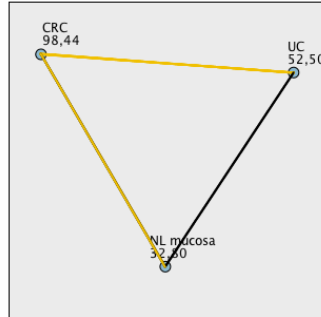


## Statistiske beregninger - Kruskal Wallis (parvis sammenglining)

Mellom sykdomsgruppene:

### Svak PARP1-positivitet

Pairwise Comparisons of Sykdomsgruppe



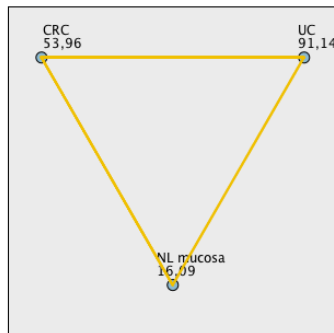
Each node shows the sample average rank of Sykdomsgruppe.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
NL mucosa-UC	19,696	8,290	2,376	,018	,053
NL mucosa-CRC	65,632	8,898	7,376	,000	,000
UC-CRC	-45,936	7,465	-6,154	,000	,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

### Sterk PARP1-positivitet

Pairwise Comparisons of Sykdomsgruppe



Each node shows the sample average rank of Sykdomsgruppe.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
NL mucosa-CRC	37,872	8,891	4,260	,000	,000
NL mucosa-UC	75,051	8,283	9,061	,000	,000
CRC-UC	37,179	7,459	4,984	,000	,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

## Samlet PARP1-positivitet



Each node shows the sample average rank of Sykdomsgruppe.

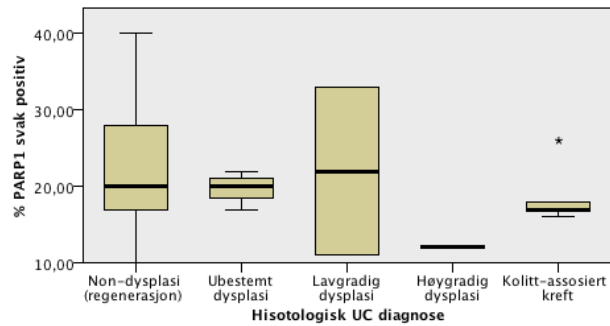
Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
NL mucosa-CRC	56,595	8,884	6,371	,000	,000
NL mucosa-UC	65,543	8,277	7,919	,000	,000
CRC-UC	8,947	7,453	1,200	,230	,690

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

## Mellom dysplasiene:

### Svak PARP1-positivitet

#### Independent-Samples Kruskal-Wallis Test

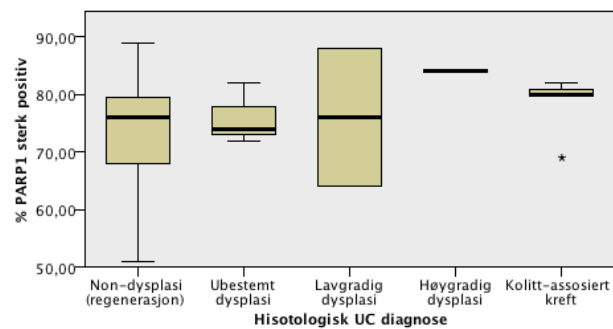


Total N	55
Test Statistic	3,540
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,472

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

### Sterk PARP1-positivitet

#### Independent-Samples Kruskal-Wallis Test

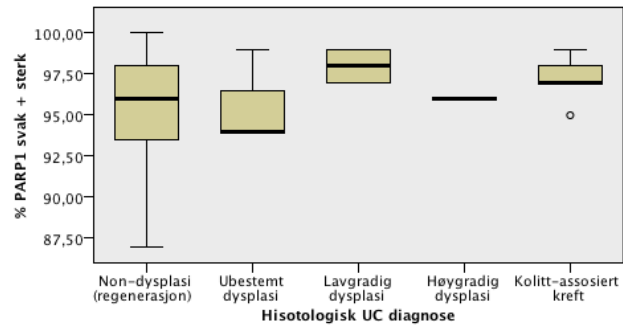


Total N	55
Test Statistic	3,735
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,443

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

## Samlet PARP1-positivitet

### Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



<b>Total N</b>	55
<b>Test Statistic</b>	2,294
<b>Degrees of Freedom</b>	4
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,682

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.