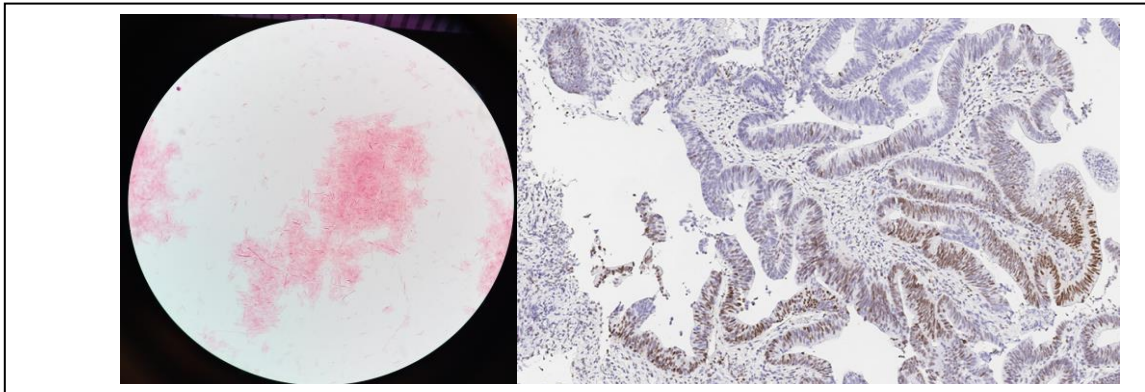


Masteroppgave

Master i biomedisin

Mai 2021



Cytokinprofil i kolorektale tumorer

Med og uten *Fusobacterium nucleatum*

Kandidatnavn: Annette Knapskog Alte Kandidatnummer: 513

Emnekode: MABIO 5900 Antall studiepoeng: 60 sp

Fakultet for helsevitenskap

OSLO METROPOLITAN UNIVERSITY
STORBYUNIVERSITETET



Cytokinprofil i kolorektale tumorer

Med og uten *Fusobacterium nucleatum*

Annette Knapskog Alte

Masterstudium i biomedisin

Masteroppgave, 60 sp

Fakultet for Helsevitenskap, Institutt for naturvitenskapelige helsefag

Utført ved: Molekylær genteknologisk diagnostisk seksjon, TLMB, Akershus
universitetssykehus.

Veiledere: Per Christian Sæther, Vahid Bemanian og Hege Smith Tunsjø.

Mai 2021



Forord

Først vil jeg uttrykke en stor takk til mine dyktige veiledere Vahid Bemanian, Per Christian Sæther og Hege Smith Tunsjø for all hjelp og støtte under arbeidet med masteroppgaven og for gode råd under utarbeidelse og skriving av oppgaven. En spesiell takk til Per Christian for at du alltid har stilt opp ved behov og har øst av din store kompetanse i tillegg til at du har vært en uvurdelig støtte under alt arbeidet, også under det histopatologiske arbeidet. Du kaster deg ut i nytt og ukjent territorium som førstegangs veileder, men har vært en eksemplarisk veileder fra første stund og tilegner deg ny kunnskap som en svamp. Hege, du er et orakel som kan alt til det fulle om både mikrobiologi og oppgaveskriving. Oppgaven har løftet seg adskillige hakk med dine kyndige tilbakemeldinger. Vahid, du er trygg, stødig og dyktig og din lange erfaring innenfor genteknologi og patologi gjør deg trygg i alle metoder og problemer underveis. Jeg vil også få takke Kariann Vangen Frøystein og Trude Haga Flatås for midler og veiledere tilgjengelige ved vårt felles arbeidssted, TLMB, til å kunne gjennomføre dette masterprosjektet. Min gode kollega Gro Gundersen takkes også for god hjelp, oppmuntrende ord underveis, opplæring av ekstraksjonsmetoden benyttet og verdifulle råd fra sitt mastergradsarbeid med samme biobankmateriale. Morten Moe, takk for hjelp med SPSS boxplott mal, så jeg kom i gang videre med statistikk og data vurderingen.

Jeg vil rette en takk til Kirsten Margrethe Østbye ved OsloMet for hjelp og innføring i mikrotom-bruk, Yan Liu ved Epigen for uvurderlig hjelp til optimalisering av antistoff og farging av biopsisnitt og avlesning av immunfluorescens resultatet. Tusen takk til Jose Luis Subirats Camacho for dine tips til det histopatologiske arbeidet og avlesning av immunfluorescens.

Jeg vil også få rette en takk til mannen min, Steffan Alte, for all støtte og som har stilt opp når det har røynt på i slutfasen, du er god som gull. Barna mine som har skjont at det har vært tøft til tider, hvor min tenåringsønn til og med stilte opp med middag på slutten. Takk til gode venner og foreldrene mine for oppmuntrende ord.

Til alle: Veien har vært lengre enn anntatt på grunn av Covid-19 og andre årsaker, men endelig er målstreken der. Takker og bukker for samarbeidet, og Hege, Vahid og Per Christian- dette hadde ikke vært mulig uten dere;)

Lillestrøm, 16. mai 2021

Annette Knapskog Alte

Sammendrag

Bakgrunn og formål: Den vanlige oppfatningen er at inflammasjon i kolorektal kreft (CRC) er et resultat av den neoplastiske celleveksten. Det er vist at epitelbarrieren mot tarmlumen kan være svekket i kolorektale tumorer, dette kan føre til infeksjoner av opportunistiske bakterier. Det kan tenkes at bakterier som finnes i tumorens mikromiljø kan forme immunresponsen i CRC. I denne oppgaven er det studert uttrykk av cytokiner som representerer forskjellige typer immunrespons i tumorvev og ikke-neoplastisk vev fra pasienter med CRC. Hypotesen er at *Fusobacterium nucleatum* påvirker og promoterer tumorigenese ved å opprettholde en lokal kronisk inflammasjon. Et innblikk ønskes i om ikke-neoplastisk vev viser tegn på inflammasjon, og om noen av cytokinene er så høyt i tumor at de kan vurderes som ikke-invasive markører. Det er også ønskelig å finne ut om immunresponsen har utviklet seg ulikt i ulike tumorer.

Materiale og metoder: Biopsier fra 25 adenokarsinomer er sammenlignet med biopsier fra marginalsone fra de samme 25 pasientene. Biopsiene er fra en REK-godkjent forskningsbiobank fra Akershus Universitetssykehus. Marginalsone utgjør et område utenfor tumor, hvor det ikke er funnet neoplastisk vekst. Referansegener og primere ble evaluert og analyser optimalisert før RT-qPCR med SYBR Green ble utført på 50 prøver i duplikat for cytokinene IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, TGF- β , TNF- α og IFN- γ . Relativt genuttrykk av mRNA ble beregnet med $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -metode. Uttrykk av IL-6 og pSTAT3 ble undersøkt på 25 formalinfiksert parafininnstøpte tumorbiopsier fra de samme pasientene ved bruk av immunhistokjemi (IHC).

Resultater: Pro-inflammatoriske IL-6, IL-23, og IL-17 var signifikant høyere uttrykt i tumorprøvene sammenliknet med marginalsone. Dette gjaldt også IFN- γ . IL-12 var ikke signifikant forhøyet i tumor, og hadde mindre uttrykk i tumor enn marginalsone i 8 prøver. TGF- β var høyt uttrykt i marginalsone, og noe forhøyet i tumor. IHC viste at IL-6 og pSTAT3 var høyt uttrykt i tumorceller. Det ble funnet høyere uttrykk av både IL-6 og IL-23 i prøver med *Fusobacterium nucleatum* funn i kolon, men disse forskjellene var ikke statistisk signifikante.

Konklusjon: Tumorvevet domineres av et pro-inflammatorisk miljø med mye genuttrykk av IL-6, IL-23 og IL-17. Etersom genuttrykket av IL-6 var høyt i tumor og IHC viste at det var mest uttrykt i selve tumorcellene, kan IL-6 vurderes som mulig ikke-invasiv markører for kolorektal kreft. Det er også vist en tendens til at både IL-6 og IL-23 er høyere uttrykt i prøver som har funn av *Fusobacterium nucleatum* i kolon, men det krever videre forskning. TGF- β er et pleiotropisk cytokin med flere effekter innen immun-regulering og tumorutvikling og da cytokinet var høyt uttrykt i marginalsone, var det vanskelig å vurdere effekten innenfor hver prøve og lokalisasjon. Det kreves mer forskning på både signalvei og celletyper som kan påvirkes av cytokinet. Det var tegn på at immunresponsen utvikler seg ulikt i ulike tumorer med prøver med høye og lave nivåer av IFN- γ , i tillegg til funn av høye nivåer av cytokiner som kan øke tumorigenese hos andre prøver.

Abstract

Background and aim: It is commonly thought that inflammation is a response to the neoplastic cell-growth in colorectal cancer. Former studies have shown that the epithelial barrier may be weakened in CRC creating an opportunity for pathogenic bacteria to invade and create infection within the microenvironment. The presence of bacteria in the tumor microenvironment may possibly trigger and shape the immune response. The current work has studied the expression of cytokines that represent different responses by the immune system in both tumor tissue and non-neoplastic tissue from a selection of patients diagnosed with CRC. One hypothesis is that *Fusobacterium nucleatum* influence and promotes tumorigenesis by creating and maintaining a local chronic inflammation. One aim of this study is to see if the non-tumor tissue has signs of inflammation, and to identify possible candidates for non-invasive biomarkers of CRC. Another aim is to study the diversity of the immune response by analyzing the expression of different cytokines.

Materials and methods: The material of this study consisted of 25 adenocarcinoma biopsies, which were compared to 25 biopsies from non-neoplastic zones collected within the same patients. The project is approved by The Regional Ethics Community and the samples are part of a biobank established at the Akershus University Hospital, Norway. A selection study was conducted on suited reference genes and primer design for IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, TGF- β , TNF- α and IFN- γ was performed. RT followed by SYBR Green qPCR was conducted on 50 duplicated samples, specificity and efficiency was measured and corrected using T_m analysis and LinReg software before quantification by using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. IHC analysis of anti-IL-6 and anti-pSTAT3 was performed on FFPE sections from CRC tumours.

Results and conclusion: Expression of IL-6, IL-23 and IL-17 was significantly ($p < 0,005$) increased in tumours. IHC also showed that both IL-6 and pSTAT3 was highly expressed by neoplastic cells within the tumor tissue, pointing to IL-6 as a potential candidate for a non-invasive biomarker. IFN- γ and TGF- β were also significantly higher expressed in tumours, but TGF- β was also highly expressed in the non-neoplastic zone. These findings require more research regarding cellular location and biological effects of TGF- β . IL-12 was not significantly increased in tumours ($p = 0,065$) and 8 samples showed more expression in the non-neoplastic zone. There was a tendency towards higher expression of both IL-6 and IL-23 in samples with *F. nucleatum*, but the differences were not significant. More research is required to establish a potential link between cytokine expression and *F. nucleatum*. The biobank consists of CRC samples from different cancer stages and several of the samples showed diversities in their immune profile, showing samples with low and high expression of immune regulating cytokines. Several of these cytokines have previously been shown to promote tumor growth and survival.

Forkortelser

ANK = analyse negativ kontroll

APC = adenomatøs polyposis coli

APC = antigen presenterende celle

APRIL = proliferasjons induserende ligand

BRAF = Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, serin threonin-protein kinase B-Raf

CDC4 = celle divisjon kontroll protein 4

Cfu = kolonidannende enheter. Mål på antall bakterier i suspensjon f.eks. cfu/ml

CIMP = CpG øy metylator fenotype

CIN = kromosomal ustabilitet

COX2 = syklooksigenase 2

CRC = kolorektal kreft

CTL = cytotoksisk T-lymfocytt

CTLA-4 = cytotoksisk T-lymfocytt assosiert antigen 4.

DAB/Chrom = 3,3'-diaminobenzidine kromogen substrat (substratfarge immunhistokjemi)

DC = dendrittisk celle

EGFR = epidermal vekstfaktor reseptor

EMT = epitelial mesenchymal transisjon

ENK = ekstraksjonsnegativ kontroll.

GAPDH = Glyceraldehyd 3-phosphate

GAP-junction = Intercellulær forbindelses kanal

HDAC = histon deacetylase

HRP = horse raddish peroksidase

IFN γ = interferon gamma

IHC = immunhistokjemi

IL = interleukin

KRAS = Kirsten rotte sarkoma viral onkogen homolog

LOH = Tap av heterozygositet

MAMP = mikrobeassosiert molekylært mønster

MAPK = Mitogen aktivert protein kinase

MDSC = myeloid derivert suppressor celle

MHC = store histokompatibilitetskompleks

MMR = Mismatch reparaşjonsgener

MSC = mesenchymal stromal celle

MSI = mikrosatellitt ustabilitet

M ϕ = makrofag

NF- κ B = nukleær faktor kappa B (transkripsjonsfaktor)
NFW = nukleasefritt vann
PD-1 = Programmert celledød protein 1
PD-L1 = Ligand for programmert celledød protein 1
PGE2 = Prostaglandin E2
PI3K = fosfoinositid 3-kinase/Protein kinase B
POLR2A = Polymerase (RNA) II (DNA rettet polypeptid A)
PRR = mønster gjenkjennelses reseptor
RT-qPCR = reverse transkriptase kvantitativ polymerase kjede reaksjon
SCFA = kortkjedede fettsyre (Dannes av den anaerobe nedbrytningen av ufordøyde karbohydrater som polysakkarider og oligosakkarider i fiber og stivelse.)
SMAD 4 = mother against decapentaplegic homolog 4
STAT3 = Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SYBR Green = $C_{32}H_{37}N_4S^+$ (asymmetrisk cyanisk farge som farger dobbeltrådet DNA)
TAM = tumor assosierte makrofager
TBP = TATA boks bindende protein
TCR = T-celle reseptor
TGF- β = transformerende vekst faktor beta
TH = T-hjelpecelle
TIGIT = T-celle immunoreseptor med immunoglobulin og ITIM domene
TLR = toll-lignende reseptor
TNF-a = tumor nekrose faktor alfa
TP53 = Tumor suppressor protein 53
UBC = Ubiquitin C
VEGF = vaskulær endotelial vekstfaktor
Wnt = wingless

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	IV
1. Innledning	1
1.1. Kolorektal kreft.....	1
1.1.1. Adenom-karsinomsekvensen	1
1.1.2. Wnt/ β -catenin signalveien.....	2
1.2. Tarmens mikrobiota.....	3
1.2.1. Mikrobiotaenes rolle i utvikling av kolorektal kreft	4
1.3. Slimhinnen utgjør en barriere mot tarmlumen det er vanskelig for bakterier å penetrere.....	6
1.3.1. Slimceller og mucin-2 produksjon.	8
1.4. PAMP/MAMP og PRR	10
1.5. Immunsystemet.....	11
1.5.1. Dendritiske celler, Nøytrofile granulocytter og Makrofager	11
1.5.2. T-celler	12
1.5.3. Antigenpresentasjon	13
1.5.4. Cytotoksiske T-lymfocytter og kreft	14
1.6. Cytokiner	16
1.6.1. Tumor Nekrosis Faktor α	16
1.6.2. Interleukin-12 og Interferon- γ	17
1.6.3. Transforming Growth Factor β	18
1.6.4. IL-10.....	19
1.6.5. Interleukin-6.....	20
1.6.5.1. JAK/STAT3 aktivering:.....	20
1.6.6. Interleukin-23 og Interleukin-17	21

1.7.	TLR roller	21
1.7.1.	TLR signalering ved skade i epitelcellelaget	21
1.7.2.	TLR signalering som induserer inflammasjon	22
1.8.	Inflammasjon og tumorutvikling, immunforsvaret i kreft	22
1.8.1.	Tumor stroma	22
1.8.2.	Immunologisk og molekylær subtype klassifisering av CRC	24
1.9.	<i>Fusobacterium</i> , inflammasjon og utvikling av kolorektal kreft	26
2.	Formål med oppgaven	30
3.	Metodisk teori	31
3.1.	Revers Transkripsjon kvantitativ PCR (RT qPCR)	31
3.2.	PCR spesifisitet	32
3.3.	Genekspresjon med relativ kvantifisering qPCR	34
3.4.	Referansegener	35
3.5.	PCR- effektivitet	35
4.	Metoder	36
4.1.	Materialer	36
4.1.1.	Studiepopulasjon og biobank	36
4.1.2.	Etiske og juridiske forhold knyttet til studien	38
4.2.	Studiedesign	39
4.3.	Eksperimentell design del 1: Genekspresjon av utvalgte inflammasjonsmarkører med RT-qPCR	40
4.3.1.	Ekstraksjon av nukleinsyrer	40
4.3.2.	Kvantitets- og kvalitets-måling av RNA	40
4.3.3.	cDNA-syntese	40
4.3.4.	Primere for målgener og referansegener	41
4.3.5.	Kvantitativ real-time PCR	42
4.3.6.	Optimalisering av protokoller og kvalitetssikring av analyser	44

4.3.6.1.	Kontroller	44
4.3.6.2.	Optimalisering av RNA- og cDNA-mengder	45
4.3.6.3.	Vurdering av amplifikasjonskurver og PCR-spesifisitet	46
4.3.6.4.	Evaluering av referansegeners stabilitet	46
4.3.6.5.	Korrigeringsfaktor for ulik PCR-effektivitet	46
4.3.7.	Data-analyse	47
4.4.	Eksperimentell design del 2: Immunhistokjemisk påvisning av utvalgte inflammasjonsmarkører	48
4.4.1.	Snitting av formalinfikserte parafininnstøpte (FFPE) tumorbiopsier.....	48
4.4.2.	Valg og vurdering av antistoffer	49
4.4.2.1.	Valg av antistoffer	49
4.4.2.2.	Test av antistoffer.....	49
4.4.3.	Automatisert farging med AutostainerLink 48	50
5.	Resultater	51
5.1.	Vurdering av PCR-analyser for referansegener.....	51
5.1.1.	Amplifikasjons- og smeltepunktsskurver	51
5.1.2.	Intern kontroll PCR (IC)	52
5.1.3.	PCR-spesifisitet.....	53
5.1.4.	Referanse-genenes stabilitet.....	54
5.2.	Vurdering av PCR-analyser for målgener	55
5.2.1.	Amplifikasjons- og smeltepunktsskurver og PCR-spesifisitet.....	55
5.2.2.	PCR-effektivitet	57
5.3.	Kontroll av antistoff til IHC.	58
5.4.	Uttrykk av cytokiner.....	60
5.4.1.	Uttrykk av cytokiner i margin og tumor.....	60
5.4.1.1.	TGF- β er høyt uttrykt i margin.....	61
5.4.1.2.	Samtlige cytokiner er oppregulert i tumor.....	62
5.4.2.	Uttrykket av cytokiner varierer fra pasient til pasient.....	64
5.4.2.1.	IL-6 er kraftig oppregulert i tumor, men viser store individuelle forskjeller.....	64
5.4.2.2.	Både tumorceller og celler i tumor stroma uttrykker IL-6 og pSTAT3.....	65

5.4.2.3.	Mengde IL-23 og IL-17 varierer fra tumor til tumor.....	66
5.4.2.4.	Det vises tydelig ikke lineær korrelasjon mellom IL-6 og IL-23	67
5.4.2.5.	Uttrykk av IFN- γ og IL-12 varierer fra tumor til tumor og viser betydelig ikke lineær korrelasjon.	68
5.4.2.6.	Ingen korrelasjon mellom uttrykk av IFN- γ og IL-6.....	69
5.4.2.7.	TGF- β har betydelig monotonisk korrelasjon med uttrykk av IL-6.....	70
5.5.	Mulig korrelasjon mellom <i>F. nucleatum</i> og uttrykk av IL-6 og IL-23.....	72
6.	Diskusjon.....	74
6.1.	Ikke-neoplastisk vev har høye nivåer av TGF- β –mulig anti-inflammatorisk	75
6.1.1.	TGF- β kan ha forskjellige roller i tumor og margin.....	76
6.2.	Neoplastisk vev viser hovedsakelig ett pro-inflammatorisk miljø	77
6.2.1.	IL-6 er generelt kraftig uttrykt i tumorvev og kan være en mulig kandidat som ikke-invasiv biomarkør.	77
6.2.2.	IL-23 og IL-17 er også samlet sett forhøyet i tumorprøvene, med en signifikant korrelasjon mellom IL-23 og IL-6.	78
6.3.	IL-12 og IFN- γ	79
6.4.	Ulikt uttrykk av cytokiner i tumorer med og uten funn av <i>F. nucleatum</i>	80
6.5.	Metodiske begrensninger.....	81
6.5.1.	Evaluering og valg av referansegener.	81
6.5.2.	IHC farging av pSTAT3 og delvis IL-6 ga ikke forventede resultat.....	81
6.5.3.	Utelukkelse av IL-10 RT-qPCR og valg av IL-12 primere.....	82
7.	Konklusjon.....	83
	Litteraturliste.....	85
	Vedlegg	90

1. Innledning

1.1. Kolorektal kreft

Kolorektal kreft (Colorectal cancer, CRC) er den tredje største kreftformen på verdensbasis med økende antall tilfeller hvert år (1). Den er mest utbredt i Vesten, men de siste årene har det vært redusert forekomst i Europa, bortsett fra i Norge hvor antall tilfeller øker hvert år. I Norge er CRC en av de mest hyppigste kreftformene og i 2019 ble det oppdaget 4295 nye krefttilfeller av CRC med høyere insidens hos kvinner (2). Det må derimot tas forbehold for at Covid-19 pandemien har forårsaket betydelig underrapportering av antall krefttilfeller, i tillegg til at dødsårsak kartleggingen er på etterskudd, med kun ca.73% av tilfeller kartlagt for 2019 og det er store forsinkelser for 2020 rapporteringen av krefttilfeller (2).

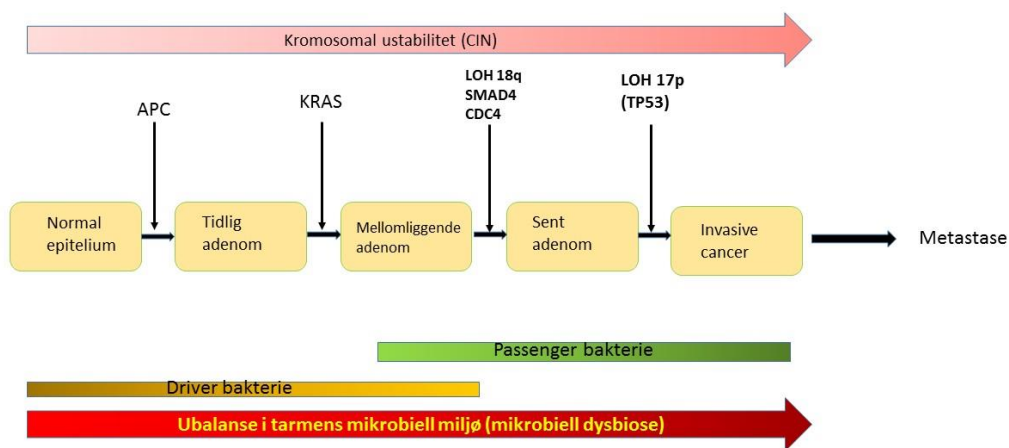
Kolorektal kreft er ensbetydende med kreft i tykktarm og/eller endetarm. Kreftformen er oftest adenocarcinom fra kjertelvev i tarmslimhinnen (mucosa). Risikofaktorer for å utvikle kolorektal kreft er alder (med en økende tendens etter fylte 50 år), overvekt og kosthold med rødt og foredlet kjøttinntak som kan øke risikoen for kreftutvikling med 70%, røyking med en risiko på 10,8%, langvarige kroniske inflammasjonssykdommer som Crohn 's med risiko på 2,5% og ulcerøs kolitt med risiko på 3,7% (1). Sannsynligheten er også større for å utvikle kolorektal kreft i yngre alder dersom det foreligger mange tilfeller av CRC i familien. Genomisk ustabilitet, akkumulering av genetiske mutasjoner som fører til deaktivering av tumorsuppressorgener og aktivering av onkogene signalveier fører til en gradvis utvikling av kreft, tumorigenese (3).

1.1.1. Adenom-karsinomsekvensen

Kolorektal kreft er en heterogen sykdom der forskjellige undertyper kan kjennetegnes av spesifikke kliniske og/eller molekylære egenskaper. Tre forskjellige patogenetiske veier har vært implisert i utviklingen av CRC svulstene: (1) kromosomal ustabilitet (CIN); (2) mikrosatellitt ustabilitet (MSI); (3) CpG øy-metylator fenotype, (CIMP) (4). Flertallet av sporadiske CRC-tilfeller (ca. 85%) viser kromosomal ustabilitet (CIN), med endringer i kromosomantall og struktur. Disse endringene inkluderer insersjon eller delesjon av kromosomale segmenter, kromosomale omorganiseringer og tap av heterozygositet (Loss Of Heterozygosity, LOH), og genkopinummervariasjoner (CNV) (5) .

I 1990 foreslo Fearon og Vogelstein en modell for kolorektal karsinogenese som ble allment akseptert og som brukes som et paradigme for progresjon av solide tumorer (6). Modellen er kjent som adenom-karsinomsekvensen og viser et sekvensielt mønster for akkumulering av genetiske endringer som

driver malign progresjon av tarmens slimhinne (figur 1). Ifølge denne modellen forekommer inaktivering av genet adenomatøs polypose coli (APC) i et tidlig stadium av sekvensen. APC er et tumorsuppressorgen som koder for et multifunksjonelt protein som har en viktig rolle i Wnt/ β -catenin signalveien. Somatiske mutasjoner i begge allelene til APC-genet er en av de første innledende trinnene mot utviklingen av tumorer i kolon og står for 85% av den sporadiske utviklingen fra neoplastiske celler til adenokarsinomer (7). Mutasjoner i APC gir en selektiv vekstfordel og forsterker derved veksten av den muterte cellen. Dette blir etterfulgt av mutasjoner i onkogenet KRAS i det adenomatøse stadiet, og til slutt oppstår delesjon av kromosom 18q og inaktivering av tumorsuppressorgenet TP53 på kromosom 17p ved overgangen til malignitet (figur 1) (8).



Figur 1: Kolorektal adenom-karsinom sekvens

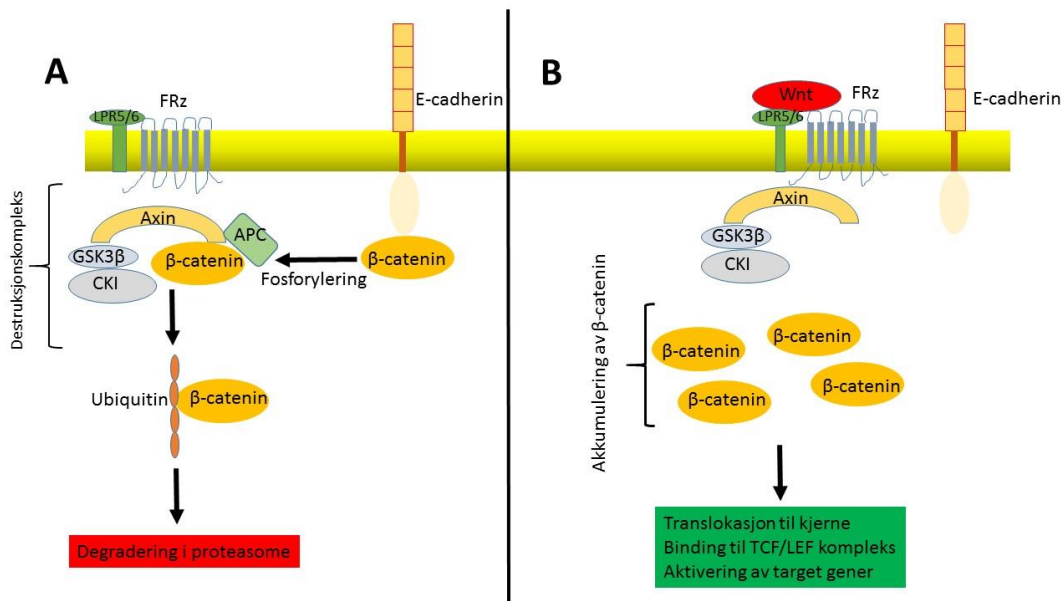
Figuren viser rekkefølge av genetiske mutasjoner som medfører transformasjon av normale epitelceller til tumorceller. Figuren viser også den bakterielle «driver-passenger»-hypotesen for utvikling av kolorektal kreft (se avsnitt 1.2.1). Ifølge hypotesen medfører patogenetiske forandring i epitelium en gradvis forandring i tarmens mikrobielle miljø, slik at «driver» bakterier blir erstattet med opportunistiske «passenger»-bakterier som trives i mikromiljøet rundt tumor. Figur er laget av Vahid Bemanian, adaptert av (6) og (9)

APC: adenomatøse polyposis coli, KRAS: KRAS proto onkogen GTPase, LOH: Loss of heterozygosity, SMAD4: Mother Against Decapentaplegic homolog 4, CDC4: Cell Division Control protein 4, TP53: Tumor Protein 53.

1.1.2. Wnt/ β -catenin signalveien

Wnt/ β -catenin signalveien er essensiell for å opprettholde kontrollerbar fornyelse av epiteliale stamceller som ligger i bunnen av Lieberkuhnske krypter i kolon (10). Wnt er et glykoprotein som finnes i alle dyrearter. Navnet, Wnt, refererer til to evolusjonært relaterte gener, Wingless (fra bananflue, *Drosophila melanogaster*) og det mammalske protoonkogenet Int-1. β -catenin er et avgjørende protein i Wnt/ β -catenin signalveien. Ved fravær av Wnt foreligger β -catenin i inaktiv

tilstand enten bundet til transmembranproteinet E-cadherin eller så destrueres det ved hjelp av et destrueringskompleks bestående av APC, Axin, GSK-3 β og CKI. β -catenin merkes med ubiquitin og degraderes i proteasomer (figur 2A). Ved binding av Wnt til transmembranproteinet Frizzled (Fz) innledes en kaskade-reaksjon som frigjør Axin og APC fra β -catenin, slik at β -catenin kan akkumulere i cytoplasma og translokere til cellekjernen. I cellekjernen interagerer β -catenin med T-cellefaktor (TCF) og aktiverer transkripsjon av en rekke tumorassosierte gener blant annet onkogenet C-myc (figur 2B).



Figur 2: Skjematisert fremstilling av Wnt/ β -catenin signalveien.

A: I fravær av Wnt fosforyleres β -catenin av et proteinkompleks bestående av Axin, CK1 α , GSK3 β og APC. β -catenin gjennomgår deretter ubiquitin-proteasomal nedbrytning. **B:** Ved binding av Wnt til Frizzled og LRP5/6 frigjøres β -catenin fra destruksjonskompleket og stabiliserer seg i cytoplasmaet. Deretter translokere β -catenin til kjerne og binder seg til TCF / LEF-transkripsjonsfaktorer for å initiere transkripsjon av sine målgener.

CK1 α : casein kinase 1 α , GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β , APC: adenomatøspolypose coli, LRP5: LDL receptor related protein 5/6, TCF: T-cell factor, LEF: lymphoid enhancer factor

Figuren er laget av Vahid Bermanian, adaptert fra Zhan et al., 2017

1.2. Tarmens mikrobiota

Begrepet mikrobiota omfatter alle mikrober i et habitat og deres mikromiljø. Kroppen inneholder mange ulike habitater med hver sitt mikrobiota som er vel adaptert til det aktuelle miljøet (11). I tarmen vil det eksistere en naturlig symbiose mellom tarmens mikrobiota og tarmepitelets barriere, det vil foreligge en homeostase. De bakteriene som utgjør tarmfloraen i en sunn mikrobiota kalles kommensale bakterier. Kolon, som består av blindtarm, tykktarm og endetarm, er den delen av

fordøyelsessystemet, og for øvrig resten av kroppen, som har høyest tetthet av bakterier med anslagsvis 10^{11} - 10^{12} bakterieceller per milliliter fordøyelsesinnhold, cfu/ml (12). Til sammenlikning har magesekken 10^1 - 10^3 cfu/ml og ileum 10^4 - 10^7 cfu/ml.

En stor diversitet, eller et høyt mangfold av ulike arter og stammer, er beskrevet å gjenspeile et sunt kolorektalt miljø. Denne hypotesen har imidlertid blitt utfordret av flere som hevder at det ikke er bakteriell diversitet i seg selv som er viktig, men et høyt nok antall av karbohydratfermenterende gener (13).

Mikrobiotaen i tarmen regulerer homeostasen, og er med på å beskytte mot kolonisering av patogene mikrober. Mikrobiotaen regulerer også immunsystemet i tarmens slimhinne gjennom aktivering av ulike reseptormolekyler på epitel- og immuncellene, (14). I tillegg er den viktig for å bryte ned næringsstoffer som humane celler ikke kan spalte på egen hånd som for eksempel kostfiber (15).

Den vanligste celletypen i kolon er enterocytter, kalt kolonocytter. Den primære energikilden for kolonocytter i den øvre delen av krypten er butyrat, en kortkjedet fettsyre (SCFA) fra anaerobe bakteriers metabolisme av fiber. En kost med mye fiber vil derfor føre til en favorisering av obligate anaerobe butyratproduserende bakteriearter som blant annet *Bacteroides*, *Firmicutes* og *Actinobacteria* (16). Metabolismen av butyrat foregår ved β -oksidasjon og forbruk av oksygen.

Denne oksygenbruken gir tilbake et gunstig miljø for obligate anaerobe bakterier. I tillegg til å være en energikilde for kolonocytter hemmer butyrat og propionat den intracellulære aktiviteten til histon deacetylasen (HDAC) i kolonocytter og immunceller (14). Histon deacetylasen er enzymer som fjerner acetylgrupper fra histoner slik at histoner kan pakke DNA tettere, noe som fører til forhindring av transkripsjon (17). I makrofager vil dette ha en anti-inflammatorisk effekt ved å nedregulere uttrykket av pro-inflammatoriske cytokiner (18), mens naive T-celler kan differensiere til å bli regulatoriske immunceller (14). En hemming av HDAC kan også inducere uttrykk av aktiverte AP-1 på epitelceller. Ved aktivering kan AP-1 lede til apoptose (19).

1.2.1. Mikrobiotaenes rolle i utvikling av kolorektal kreft

Nyere forskning viser at forandringer i tarmens mikrobielle miljø kan ha vesentlig effekt på prosessen som leder til utvikling av kolorektal kreft (20). I 2012 ble det foreslått en bakteriell «driver-passenger» modell for bakterienes betydning for kolorektal kreft (9). Modellen beskriver en kronologisk rekkefølge av hvordan forskjellige bakterier er assosiert med CRC. Ifølge denne modellen forårsaker "driver-bakterier" først DNA-skade og fremmer den ondartede transformasjonen av epitelstamceller. Denne prosessen fremmer nisjeendringer som favoriserer vekst av "passasjer-bakterier" som kan bidra ytterligere til sykdomsutviklingen og er generelt funnet å være beriket i mikrobiomet til CRC-pasienter (figur 1). Driver-passenger modellen var en modifisert versjon av «alpha-bugs» hypotesen (21) som foreslo et treparts-forhold i utvikling av CRC: Forandringer i epitelceller, mikrobiotaen og

tarmens immunsystem. Denne modellen danner det teoretiske grunnlaget for CRC mikrobiom-prosjektet som denne studien er en del av (9, 20).

Nylig har disse modellene blitt utfordret av en biofilm-teori (22). Teorien er ikke ulik de to andre modellene, men skiller seg fra disse ved at en moden biofilm initierer tumorigenese, og at sammensetningen i prokarsinogene biofilmer kan være ulik. Biofilmer er strukturelle overflateansamlinger av mikroorganismer som er innkapslet i en ekstracellulær beskyttende matriks (polymer). Biofilmer i tarmen kan invadere slimhinnen og komme i direkte kontakt med epitelcellene. Li et al har i sin biofilm-teori foreslått at det utvikles en progressiv mikrobiell dysbiose ved overgangen fra friskt vev til biofilm-dekket vev og deretter til kreft (22). Dejea et al viste at sammensetningen av bakterier i tumorvev korrelerte med sammensetningen av bakterier i biofilmdekket friskt vev langt unna tumor, men ikke med friskt vev uten biofilm (23). Forfatterne viste også at multibakterielle biofilmer korrelerte med proonkogene biologiske forandringer i tarmvev (eksempelvis tap av E-cadherin og økte mengder av proinflammatoriske cytokiner), uansett om det var i kreftpasienter eller friske kontroller (23).

Det er beskrevet en rekke ulike mekanismer for hvordan bakterier bidrar til utvikling av CRC (24) :

Tap av tarmepitelets barriere, for eksempel gjennom en skade, kan føre til translokasjon av kommensale bakterier til lamina propria (figur 3). Bakteriene og bakterielle produkter, som lipopolysakkarider (LPS) hos gram-negative bakterier, kan aktivere immunsystemet.

Patogene bakterier kan invadere/treng gjennom epitelcellelaget eller aktivere signalveier i tarmens epitelcellelag via ulike virulensmekanismer. Immunceller i stroma kan stimuleres til å øke produksjonen av toksiske metabolitter og pro-inflammatoriske cytokiner. Eksempler på (opportunistisk) patogene bakterier er enterotoksinproduserende *Bacteroides fragilis* og *Fusobacterium nucleatum*.

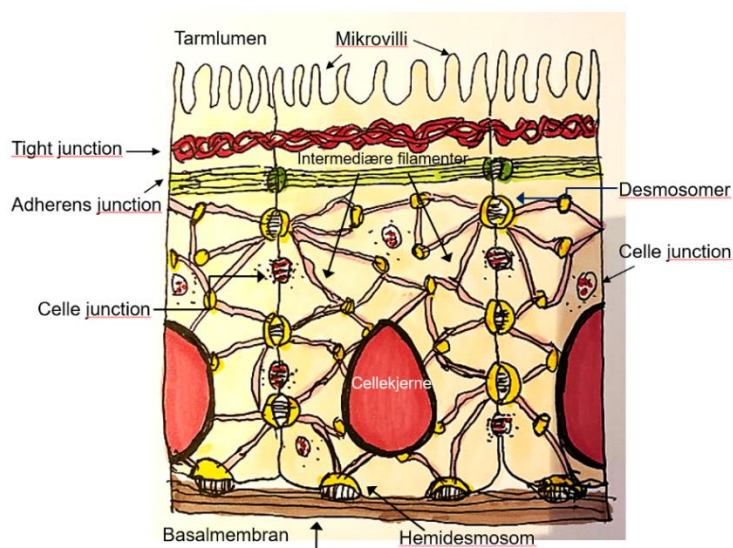
Genotoksiske bakterier kan initiere utvikling av CRC via produksjon av genotoksiner eller toksiske metabolitter (gallesyremetabolitter, polyaminer og hydrogensulfider) som ødelegger cellemembraner og danner frie oksygen radikaler som kan gi DNA-skade, interferere med cellyklus og indusere oksidativt stress (25). Eksempler på genotoksiske bakterier er *Enterococcus faecalis*, *Clostridium scindens*, *Campylobacter jejuni* og genotoksiske *Escherichia coli*.

Mikrobiell dysbiose (ubalanse) i tarmfloraen kan være forårsaket av antibiotikabruk, invasjon av patogene bakterier eller kronisk inflammasjon i tarmen. Når sammensetningen av de kommensale bakteriene i mikrobiotaen endres, vil det føre til at metabolismen skifter til anaerob glycolyse som gir mye frie nitrater, laktat og oksygen i tarmlumen (14). Dette vil i sin tur danne et gunstig miljø for flere fakultativt anaerobe bakterier, eksempelvis *Enterobacteriaceae* (26). Deres metabolitter bidrar til et pro-inflammatorisk miljø og på sikt et mer karsinogent miljø i tykktarmen.

1.3. Slimhinnen utgjør en barriere mot tarmlumen det er vanskelig for bakterier å penetrere.

Fordøyelseskanaalen varierer mye når det gjelder struktur, differensierte celletyper, oksygentilgang, pH, interaksjon med immunforsvaret og koloniseringen av mikrober. I motsetning til tynntarmen har ikke tykktarmen villi. Den består av en overflate med slim i to lag som beskytter en epiteloverflate av mange invaginerte krypter kalt Lieberkühnske krypter (14). Epitelcellene i kryptene består av mange ulike celletyper med ulike funksjoner, hvor colonocytter er mest fremtredende (figur 4).

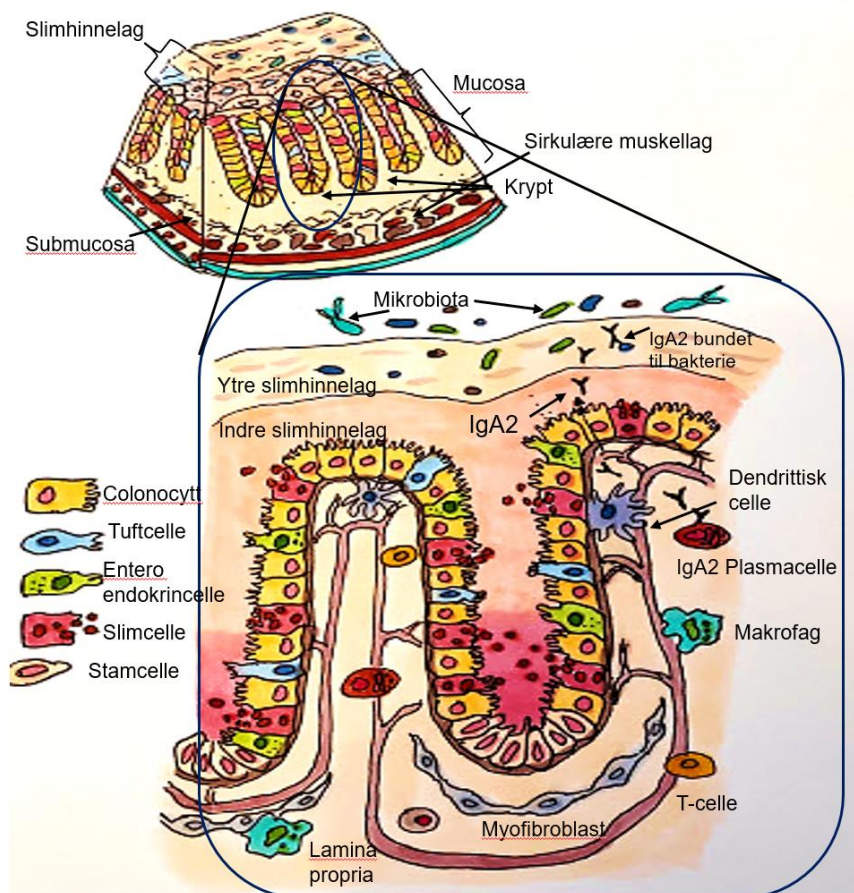
Samlet utgjør cellene i epitellaget en fysisk barriere som forhindrer at bakterier og større molekyler fra tarmlumen trenger inn i kroppen (27). For at dette cellelaget kan danne en effektiv barriere er hver epitelcelletype bundet til en basalmembran med hemidesmosomer og naboepitelceller med desmosomer. Innenfor cellene er intermediære filamenter med på å lage ankringspunkt mellom flere desmosomer. Epitelcellene er forankret i hverandre gjennom et sammenhengende tight junction kompleks på tvers av øvre del av epitelcellene (figur 3).



Figur 3: Epitelcellene sine forankringspunkter

Hver epitelcelle er forankret til nabo-epitelceller gjennom desmosomer mellom plasmamembranene og intermediære filamenter av keratin som strekker seg utover i cellen, adherens junction i øvre del av cellen med lange belter med aktin på tvers av cellen og cadherin mellom cellene. Hver epitelcelle er forankret til basallaget med hemidesmosomer. Øverst i cellen finnes tight junction komplekset med sirkulære tråder av transmembrane proteiner, som består av ulike proteiner, tredd mellom hver celle. Celle junction mellom hver plasmamembran sørger for transport mellom cellene gjennom kanaler av connexin i celle- mellomrom forbindelser (28, 29). Figur er laget av forfatter, inspirert av (27).

Epitelcellene har ulike funksjoner i tynntarm og tykktarm. I tynntarm regulerer enterocytene væskeabsorpsjonen og nærings metabolismen fra maten som konsumeres, derfor er også overflaten preget av tarmtotter og mikrovilli som øker absorpsjonsevnen (14). Tykktarmens colonocytter har evnen til å stadig fornye seg. De produseres av stamceller i basen av kryptene (30). Kolonocytter og slimceller har også evnen til å kunne produsere anti-mikrobielle peptider som bidrar til å beskytte cellelaget mot invasjon av kommensale bakterier som finnes i det øvre beskyttende slimhinne laget. Kolonocytter kan produsere β -defensiner og RegIII γ , mens Paneth celler som kun finnes i tynntarm produserer α -defensiner og lysozymer (14, 31).



Figur 4: Tverrsnitt av colon og dens oppbygning

Slimhinnen i colon består av både epitellaget med dets doble slimhinne lag, bindevev og muskulatur. Epitelcellelaget skiller tarm lumen med dens mikrobiota fra lamina propria med stromaceller (myofibroblaster), blodårer og infiltrater av immunceller. Epitelcellelaget er ordnet i innbuktninger, krypter som er beskyttet mot fæces og mikrobiota gjennom et dobbelt slimhinne lag produsert av slimceller. Epitelcelletypene har ulike funksjoner som beskrives i hovedteksten. Det foregår et samspill mellom mikrobiota og immunforvaret. For eksempel kan plasmaceller produsere IgA som transporteres gjennom epitellaget ut i slimet og binder seg til epitoper på bakteriene. Figur er laget av forfatter, inspirert av (14).

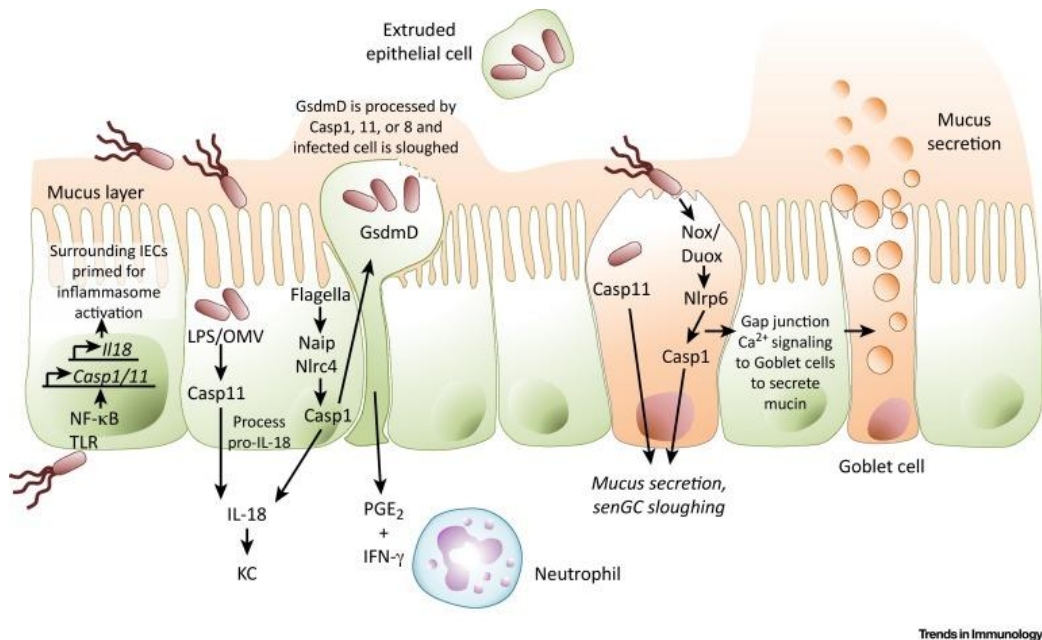
Innenfor epitelcellelaget, i lamina propria, finnes det flere ulike immunceller. Eksempler er makrofager, dendrittiske celler, T-celler og B-celler i form av plasmaceller (figur 4). Ved for eksempel en skade eller apoptose av kolonocytter i epitelcellelaget kan bakterier og bakterielle produkter trenge inn og aktivere reseptorer som bare er uttrykt på den basolaterale siden av kolonocytene. Dette induserer produksjon av cytokiner som proliferasjon-induserende ligand (APRIL). APRIL vil igjen induserer plasmaceller til å produsere IgA2, en T-celle uavhengig isotype av IgA som ikke brytes ned av proteaser. IgA2 vil transporteres gjennom epitelcellelaget og binde seg til bakterier i lumen og hindre deres evne til å invadere slimhinnen. Dette sørger for en beskyttelse av epitelcellelaget mot invasjon av både kommensale og patogene bakterier. (32) (figur 4).

Stamcellene finnes i basen av hver krypt (figur 4). Metabolismen vil nede i kryptene skifte fra anaerob β -oksidasjon av butyrate til glycolyse med laktat som endeprodukt. Oksygenet vil ikke bli forbrukt og det vil dannes et gunstig aerobt miljø for celledeling og differensiering av stamcellene. Stamceller omdanner laktat til pyruvat som videre gjennom oksidativ fosforylering aktiverer p38 som er viktig for stamcelle fornyelsen (14). I tynntarmen samarbeider Paneth celler med stamcellene ved å produsere laktat. Stamcellene sørger for celledeling av epitelcellelaget. Noen av stamcellene vil etter celledeling differensieres til modne epitelceller mens de transporteres til toppen av krypten. Når epitelcellene når toppen av en krypt går de i apoptose, løsner fra epitellaget og skilles ut i tarmlumen ved en prosess som kalles «shedding». Hele prosessen fra stamcelle til shedding sørger for at epitellaget i krypten fornyes hver 4-5 dag (30). Stamcellene blir stimulert til fornyelse og dannelse av tidlige forløper celler i krypten ved aktivering av transkriberte Wnt targetgener som C-myc (10).

1.3.1. Slimceller og mucin-2 produksjon.

Kontinuerlig slimproduksjon sørger også for at det blir vanskelig for bakterier å feste seg til epitellaget. Slimet som ligger over epitelcellene deles ofte inn i to lag. Det øverst inneholder bakterier fra lumen mens det nederste som er nærmest epitelcellene inneholder få bakterier da det er vanskelig for bakteriene å penetrere ned til dette laget (figur 3). Slimcellene produserer både det ytre og indre slimlaget ved sekresjon av glycoproteinet Muc2 og andre mucin proteiner. Det finnes flere subtyper av disse slimcellene som blant annet sentinel-slimcellen lokalisert i øvre del av kryptene (figur 3). Muc2 er hovedbestanddelen av slimlaget og både beskytter epitelcellelaget mot skader fra proteaser, gallesyre, toksiner og kommensale bakterier, men slimhinnelaget er også viktig i forhold til aktivering av det medfødte immunforsvaret og videre det adaptive immunforsvaret (33). En studie av Birchenough et.al i 2016 viste at sentinel-slimceller kan detektere mikrober som har penetrert det indre slimhinnelaget. Dette utløser en hurtig utskillelse av Muc2 over hele øvre del av kryptområdet som «skyller ut» potensielt patogene mikrober av tarmsystemet (34). Denne responsen foregår ved dannelse av et inflammasom. TLR aktiveres av patogene bakterier som *Salmonella* ved invasjon i epitelcellene (figur 5). Inflammasomet fører til en koordinert utskillelse av mucin som fører til diare ved aktivering av IL-18 og prostaglandin E2 (PGE2). En celledød mekanisme kalt pyroptose induseres

(figur 5). Pyroptose innebærer avstøting/shedding av infisert colonocyt med patogene bakterier ved aktivering av caspaser. De intracellulære patogene bakteriene i epitelcellene vil så følge med den koordinerte økte væske- og slimutskillelsen fra slimcellene ut av rektum (14, 35). Hu et.al viste i 2010 at inflammasom av typen NLRC4 kan føre til Colitt-indusert kolorektal cancer (CAC) i caspase-1^{-/-} mus (36).



Figur 5: Aktivering av intrinsisk epitel inflammasom utløser en koordinert immun beskyttelsesrespons av tarmslimhinne.

Når en patogen mikrobe entrer cytoplasma hos tarmepitelceller (IEC) trigges en celle spesifikk inflammasom respons via aktivering av ulike kaspaser som kaspase-1 og kaspase-11. Hos enterocytter fører dette til produksjon og sekresjon av IL-18 som vil vandre til naboceller og forberede miljøet på ytterligere patogen invasjon gjennom NFκB aktivering, eller direkte TLR aktivering av mikrobe. Pyroptose induseres, hvor den infiserte IEC avsnøres ut i lumen. Proteinet Gsdmd vil ved aktivering av kaspaser i inflammasomet danne mikroporer som fører til celledvelling og fanger bakteriene i den øvre delen, slik at de bakteriene ikke kan unnslipe når cellemembran sprekker. Ved celle shedding frigis PGE₂ som rekrutterer immunceller som nøytrofile granulocytter til blant annet produksjon av cytokinet IFN-γ. Sentinel slimceller vil samtidig gjennom TLR aktivering av patogene mikrober føre til en Nox-mediert aktivering av inflammasomet via kaspaser. Videre gir dette en økt Muc2 utskillelse fra slimcellen i tillegg til frigjøring av Ca²⁺ som signaliserer til nabo slimceller gjennom intracellulære GAP-kanaler. Nabocellene aktiveres også til Muc2 utskillelse. Dette gir en masse eksocytose av mucin over hele den apikale delen av tarmlumen som hurtig fjerner de avsnørte pyroptotiske colonocytene med patogene mikrober.

Figur er reprint fra Allaire J. et. al (14). Gjengitt med tillatelse fra Elsevier.

TLR=Toll lignende reseptor, OMV= ytre membran vessikkel, LPS= lipopolysakkarid, PGE₂= Prostaglandin E 2, IFNγ= Interferon gamma, Gsdmd= Gasdermin D

Slimcellene er også involvert i antigen eksponering til dendritiske celler (DC) for å sørge for immun toleranse av mikrobiomet i tarmlumen (37). Dette foregår ved at kommensale antigener eller translokerte kommensale bakterier fanges av DC som presenterer kommensale antigener gjennom slimhinne assosierte antigen passasjer (GAP) og aktiverer T-celler til regulatoriske (T_{reg}) effektorceller (14). Kommensal spesifikke T_{reg} celler kan produsere både immundempende interleukin-10 (IL-10) og transformering vekst faktor beta (TGF- β). DC-cellene vil i tillegg kunne aktivere B-celler til å bli IgA2 produserende plasmaceller, og aktivere T_H17 celler som produserer IL-17 og IL-22 som regulerer homeostasen. Interleukin-12 (IL-12) vil være gunstig for slimhinne immunsystemet ved at cytokinet øker både produksjonen av anti-mikrobielle peptider, mucin produksjon, regenerering av epitelet og reparering ved en eventuell skade (33).

1.4. PAMP/MAMP og PRR

Mikroorganismer har molekylære strukturer som ikke finnes på humane celler. Dette kan for eksempel være dobbeltrådet RNA fra virus, peptidoglykan fra celleveggen til bakterier, eller lipopolysakkarid (LPS) fra den ytre membranen til gram-negative bakterier. Felles for disse strukturene er at de ofte er fundamentale komponenter i mikroorganismenes oppbygning og dermed vanskelig å endre med en eller et fåtall mutasjoner. Isteden vil det kreve mutasjoner i flere enzymer involvert i de samme kjemiske prosessene. En fellesbetegnelse som ofte brukes for disse strukturene er patogen assosierte molekylære mønstre (PAMP) men siden disse strukturene er felles for patogener og kommensale mikroorganismer har det blitt mer og mer vanlig å bruke frasen mikrobe assosierte molekylære mønstre (MAMP) (32).

Kroppens celler har reseptorer for PAMP/MAMP kalt mønster gjenkjennende reseptorer (PRR). Aktivering gjennom PRR fører ofte til betennelse, rekruttering av immunceller og bekjempelse av den invaderende mikroorganismen. De mest studerte PRRene tilhører en familie av transmembrane reseptorer som heter Toll-lignende reseptorer (TLR) (38). Eksempler på disse reseptorene er vist i tabell 1.

Tabell 1: Toll lignende reseptorer (TLR) og deres MAMP ligand.

TLR	PAMP/MAMP ligand
TLR3	Doppeltrådet RNA
TLR5	Flagellin
TLR4	Lipopolysakkarid (LPS) fra gram-negative bakterier
TLR2	Peptidoglykan fra gram-positive bakterier

Det er vist at epitelceller i tarm uttrykker TLR. Vanligvis er reseptorene lavt uttrykt, men pasienter med inflammatorisk tarmsykdom har ofte høyere uttrykk, spesielt av TLR4. Dette passer godt med studier som viser at inflammatoriske cytokiner kan oppregulere TLR uttrykk på epitelceller (39). Man tenker seg at TLR er med på å opprettholde homeostase i slimhinnen, men mekanismene for dette er ofte ufullstendig kartlagt. En hypotese går ut på at TLR uttrykt på apikal side er med på å indusere immuntoleranse mens aktivering av TLR på basolateral side av epitelcellene kan indusere inflammasjon (32). Somatiske mutasjoner i TLR reseptorer kan være assosiert med kreftutvikling i mage-tarm og utvikling av inflammatoriske tarm sykdommer som IDB, Crohn`s og ulcerøs colitt (40).

1.5. Immunsystemet

Tumorbiopsier viser ofte, hvis ikke alltid, infiltrater av immunceller, og mange forskningsprosjekter er dedikert til å forstå immunsystemets rolle i utviklingen av kreft. Som vist i de neste avsnittene kan type immunceller og hvilke cytokiner de produserer ha stor betydning for kreftutviklingen. Immunceller produseres fra selv-fornyende pluripotente stamceller i benmarg. Modne immunceller forlater så benmarg for å patruljere kroppen etter invaderende mikroorganismer og neoplastiske celler. Men for å kunne bekjempe infeksjoner og tumorceller på en effektiv måte er det derimot helt avgjørende at immunsystemets celler er i stand til skille mellom det patologiske og kroppens egne, friske celler. Overordnet bruker immunsystemet to typer strategier for dette. Den ene strategien er gjenkjennelse av PAMP/MAMP med PPR, som for eksempel TLR, og brukes av immunceller fra den myeloide cellerekken. Denne delen av immunsystemet kalles for det medfødte immunforsvaret. Den andre brukes av B- og T-celler i den lymfoide celle rekken og gir immunitet - som i noen tilfeller kan vare livet ut (41).

1.5.1. Dendritiske celler, Nøytrofile granulocytter og Makrofager

Immunceller fra den myeloide cellerekken inkluderer granulære celler som nøytrofile granulocytter og makrofager, samt naturlige dreper (NK) celler og dendritiske celler (DC) (41). Disse cellene har forskjellige, men overlappende funksjoner. Makrofager og dendritiske celler ligger ofte latent i perifert vev og venter på eventuelle invaderende bakterier. Makrofager kan fagocyttere mikrober og produsere cytokiner som igjen vil rekruttere immunceller og stimulere til et mer pro-inflammatorisk miljø. Makrofager kan også produsere PGE2 som er viktig for regenerering av epitelet.

Makrofager (M ϕ) har ikke evnen til å vandre som DC cellene, men virker lokalt i vevet med mange ulike funksjoner. Makrofager og DC kan spise, eller fagocyttere invaderte bakterier (ekstra- og intracellulære) og virus gjennom aktivering av TLR reseptorer, men også celleavfall og intracellulær matriks, og bryte disse ned i intracellulære, spesialiserte organeller.

Makrofager kan i tillegg aktiveres av ulike cytokiner som for eksempel IFN- γ og IL-17. Ved aktivering av visse cytokiner kan de også få evnen til å skille ut oksygen radikaler som gjør stor skade på omkringliggende vev, uavhengig om det er bakterier eller normalvev (42).

Makrofager kan produsere egne cytokiner som bidrar under sårheling, men også pro-inflammatoriske, anti-inflammatoriske cytokiner og kjemokiner. De kan inndeles i ulike fenotyper som M1: anti-inflammatorisk, immunstimulerende og antigenpresenterende fenotype eller M2: pro-inflammatorisk type, immundempende, vekstfremmende type og kan også være assosiert til tumor, da som TAM (43, 44).

Nøytrofile granulocytter er den mest tallrike hvite blodcellen i blodet. De har meget kort levetid, ca. en til to dager, men kan raskt rekrutteres til betent vev for å bekjempe eventuelle infeksjoner (41). Disse cellene er derfor ofte den først cellulære responsen på invaderende bakterier. Både nøytrofile granulocytter og makrofager har til enhver tid korn eller granula i sitt cytoplasma. Disse frigjøres ved aktivering i det omkringliggende miljøet og inneholder substanser som er i stand til å drepe bakterier (41).

Dendritiske celler har ikke granula og frigir dermed ikke bakteriedrepende substanser. I likhet med makrofager har de evnen til å ta opp bakterier og makromolekyler fra sitt nærmiljø for å bryte disse ned intracellulært. DC celler har evnen til å sirkulere til lymfeknute og milt for å stimulere og rekruttere naive T-celler til effektor T-celler i stor grad (42). Siden de er i stand til å presentere antigen fra ekstracellulære bakterier i form av peptider til T hjelpe cellene utgjør disse også APC. I likhet med makrofager kan DC celler også produsere cytokiner, men da hovedsakelig med en immunrespons mot intracellulære infeksjoner og kreftutvikling, som IL-12 produksjon (42). Umodne DC celler kan derimot produsere cytokiner som stimulerer Treg til T-celle toleranse ved produksjon av IL-10 og TGF- β . Dermed hemmes anti-tumor immun responsen og kreftutviklingen øker (42). Disse benevnes ofte som myeloid deriverte suppressorceller (MDSC) og vil omtales senere.

1.5.2. T-celler

T-celler utgjør sammen med B-cellene den cellulære delen av det adaptive immunforsvaret og har en helt annen mekanisme for å gjenkjenne antigen. Under modningsprosessen gjennomgår T-cellene en somatisk rekombinasjon av sin antigen-reseptor; T-celle reseptor (TCR). Resultatet er at hver enkelt T-celle uttrykker en antigen-reseptor på overflaten som er litt forskjellig fra antigen-reseptorer uttrykt på andre T-celler (41). Med andre ord gjenkjenner forskjellige T-celler forskjellige antigen-peptider. Når hver enkelt T-celle har affinitet for forskjellige antigener vil det samlede repertoaret for antigen-gjenkjenning være enormt. I teorien kan T-celle populasjonen i enhver organisme kunne gjenkjenne alle mulige peptidsekvenser som kan presenteres av MHC, og derfor være godt tilpasset til å møte nye, muterte varianter av mikroorganismer (41).

Naive T_H -celler som aktiveres av APC vil utvikle seg til forskjellige undergrupper av T_H -celler avhengig av hvilke cytokiner som APC produserer (45). Se tabell 2 og figur 6 for T_H1 celle.

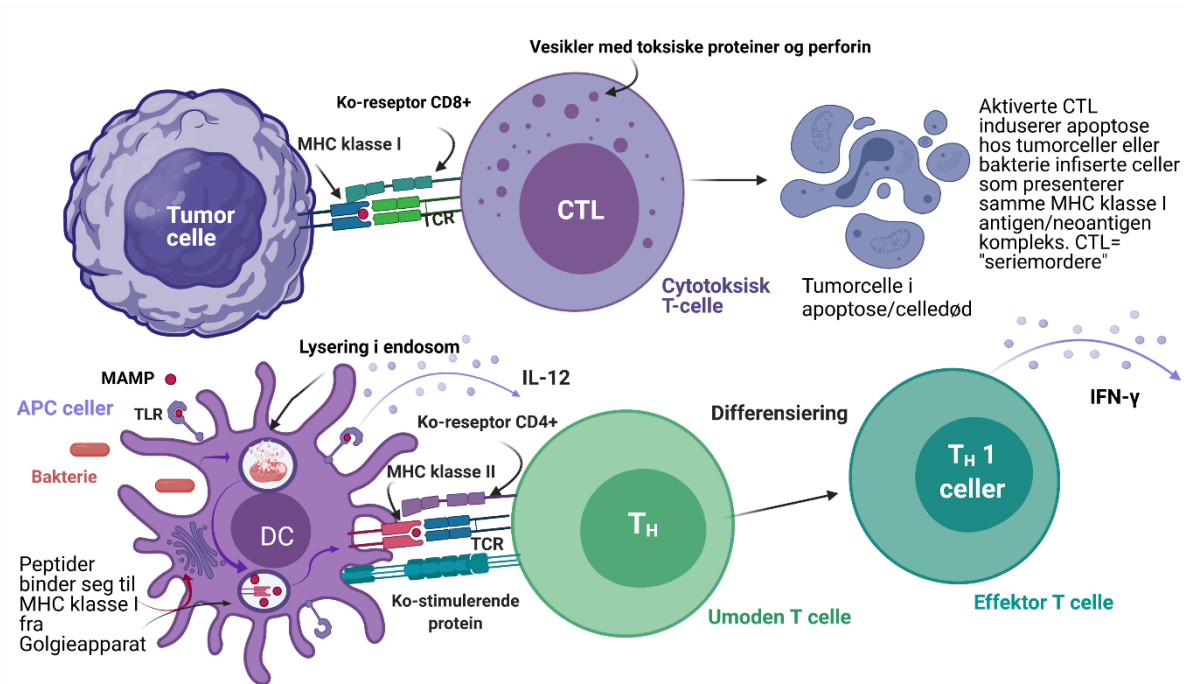
Tabell 2: Oversikt over hvilke T_H celler som differensieres av MHC klasse II/antigen T_H -kompleks:

Nativ T_H celle aktivering i miljø med cytokin	Type effektor T-celle	Hoved cytokin produksjon
IL-12	T_H1	IFN- γ (anti-inflammatorisk, makrofagaktivering, tumordrepende)
IL-4	T_H2	IL-4, IL-5, IL-13 (parasitt beskyttelse, B-celle antistoff skifte til IgE produksjon)
TGF-β og IL-6 / IL-23	T_H17	IL-17 (pro-inflammatorisk, autoimmunitet, pro-tumor)
TGF-β	Regulatorisk (T_{REG})	IL-10, TGF- β (immun dempende, immuntoleranse, redusere autoimmunitet. TGF- β også onkogen og tumor-suppressor)
IL-6 og IL-21	Follikulære (T_{FH})	IL-4, IL-21 (B-celle antistoff klasse skifte)

T_{REG} = regulatoriske T-celler, T_H = hjelper T-celler, IFN γ = Interferon gamma, TGF β = transforming growth factor beta.

1.5.3. Antigenpresentasjon

Makrofager og DC celler har som nevnt evnen til å kunne fagocyttere mikrober og bryte de ned i endosomer. Proteolyserte proteiner blir så tatt opp av MHC klasse II molekyler og presentert på overflaten til T hjelpe (T_H)-celler som peptider på 13 – 25 aminosyrer (se figur 6) (41). Denne evnen fører til at de kan presentere antigener fra fagocytterte mikrober eller neoantigener fra kreftceller til T_H -celler. Immunceller som presenterer antigen til T_H -celler kalles profesjonelle antigenpresenterende celler (APC). APC utgjør dermed linken mellom det medfødte og adaptive immunforsvaret. Aktiverte APC vandrer til lymfeknute for å presentere antigen til naive T-celler (T-celler som ikke er aktivert av antigen). CD4 uttrykt på T_H -celler virker som en koreseptor som bare binder til MHC klasse II og ikke til MHC klasse I. Dermed kan T_H -celler bare aktiveres av antigen presentert på MHC klasse II. Likeledes uttrykker cytotoxiciske T-lymfocytter (CTL) CD8 som gjør at disse cellene bare kan aktiveres gjennom MHC klasse I (figur 6). Binding til MHC/antigen er ikke nok for å aktivere naive T-celler. De trenger i tillegg et kostimulerende signal fra CD28 som binder seg til CD80 uttrykt på APC (signal 2), og aktivering gjennom cytokinreseptorer (signal 3). Får ikke den naive T-cellen signal 2 og 3 blir cellen anerg og vil ikke kunne aktiveres av antigen på et senere tidspunkt. Denne er en viktig mekanisme for å hindre autoimmunitet og er en form for perifer toleranse (41, 42).



Figur 6: Fagocytose av mikrober hos antigenpresenterende celler eller endringer hos tumorceller vil presenteres av neo-/peptider på ulike MHC klasser og aktivere ulike T-celler.

APC som DC og makrofager kan presentere antigener til naive T-celler gjennom fagocytose, dannelse av endosom som fusjonerer med vesikler fra Golgieapparatet med glykoprotein MHC klasse II fra ER, slik at MHC klasse II kompleks dannes med antigenet og presenteres i cellemembranen. TCR og ko-reseptor CD4 fra naiv hjelper T-celle (T_H) vil binde seg til det antigenpresenterende MHC komplekset og aktivere T-cellen. Figur viser eksempel på differensiering til T_H1 celle ved samtidig produksjon av IL-12 fra DC cellen gjennom TLR aktivering. Påvirkning av andre cytokiner fører til differensiering til andre typer T_H -celler. Transformerte tumorceller kan presentere neoantigen bundet til MHC klasse I. Blir neoantigenene gjenkjent av CTL vil tumorcellen bli drept via apoptose. CTL induserer apoptose ved å danne en immunologiske synapse med tumorcellen og frigir proteiner som danner porer i cellemembranen til tumorcellen og proteiner som entrer cytosol og aktiverer kaspaser som til slutt vil gi apoptose i målcellen. Figur laget av forfatter i biorender.com.

APC= antigenpresenterende celle, DC= dendrittisk celle, TLR= Toll lignende reseptor, MAMP= mikrobe assosiert molekyllær mønster, TCR= T-celle reseptor, IL-12= interleukin 12, IFN- γ = interferon gamma, MHC= store histokompatibilitets kompleks, T_H = naiv hjelper T-celle.

1.5.4. Cytotoksiske T-lymfocytter og kreft

Cytotoksiske T-lymfocytter (CTL) er en undergruppe av T-celler. I motsetning til T hjelpe-cellene gjenkjenner ikke disse cellene peptid-antigener presentert av MHC klasse II molekyler uttrykt på APC. Isteden gjenkjenner de peptider presentert av MHC klasse I (41). MHC klasse I molekyler er uttrykt på overflaten til alle nukleære celler og presenterer peptider som kommer fra proteolyserte intracellulære proteiner. Dette er derfor et system hvor immunsystemet kan undersøke hva som foregår inne i hver

enkelt celle og er særst viktig i bekjempelse av virus og kreft (41). Blir en CTL aktivert av et peptid-antigen er den i stand til å drepe cellen som presenterer antigenet via apoptose (figur 6 og 7). Aktiverte effektor CTL dreper direkte kreftcellene eller patogen infisert celle ved å danne synapse med target cellen og indusere apoptose ved eksocytose av cytotoksiske granula. Cytotoksiske granula inneholder to hovedgrupper av proteiner. Perforin polymeriserer til en ringstruktur som lager hull i cellemembranen til målcellen. Granzymmer kan deretter entre målcellens cytoplasma hvor de binder til caspase 8 og induserer apoptose. Dette er en prosess som bare tar noen minutter (Figur 6) (45).

Gjennom kreftutviklingen akkumuler kreftceller mutasjoner, noe som resulterer i forandringer i aminosyreskvensen til endogene proteiner. Disse forandringene kan presenteres på MHC klasse I uttrykt på kreftcellen og vil være annerledes enn peptider presentert av normale, friske celler. En samlebetegnelse på modifiserte peptider som oppstår i kreftceller på denne måten er neoantigener. Man tenker seg at det hele tiden foregår en kamp mellom tumorcellene og cytotoksiske immunceller i en prosess som kalles immunoediting (46). En populasjon av tumorceller er som kjent heterogen i forhold til akkumulerte mutasjoner. Tumorceller som av en eller annen grunn presenterer mange neoantigener kan fort bli eliminert av CTL. Tumorcellene som gjenstår er vanskeligere å oppdage for CTL og har mulighet til å utvikle seg videre. En strategi tumorcellene bruker for å unngå å bli oppdaget av CTL er å mutere β 2-mikroglobulin eller Transporter Associated with Antigen Presentation (TAP1/2) (47). MHC klasse I molekyler er avhengig av disse proteinene for å binde til seg antigen-peptider og transporteres til celleoverflaten. Tumorceller som har mutert disse proteinene har ikke overflateuttrykk MHC klasse I molekyler og blir vanskelig å oppdage for CTL. En annen strategi tumorcellene kan bruke er å uttrykke ligand for CTLA-4 (cytotoksisk T-lymfocyt assosiert antigen 4) eller PD-1 (programmert celledød 1) (48, 49). CTLA-4 og PD-1 er inhibitoriske reseptorer uttrykt på noen CTL som er i stand til å stoppe det aktiverende signalet som kommer fra TCR. Tumorcellen unngår da å bli drept til tross for at den presenterer neoantigener på MHC klasse I (se figur 8). Antistoff som binder PD-1 brukes nå som behandling i visse kreftformer. Legemiddelet blokkerer interaksjonen mellom PD-1 uttrykt på aktiverte T-celler og PD-L1 (ligand for programmert celledød 1) uttrykt på tumorcellen og stopper det inhibitoriske signalet fra PD-1 slik at T-cellen igjen kan drepe tumorcellene.

Med økende kunnskap om hvordan immunsystemet påvirker kreftutviklinger, er det også økende interesse for å implementere immunologiske markører i diagnostikken. Galon et al. foreslår en klassifisering av tumorer kalt Immunoscore (50). Klassifiseringen går ut på å telle antall CTL (CD8+) og hukommelses T-celler (CD45RO+) i sentrum og margin av tumor med immunhistokjemiske metoder, og grupper antall celler i fem nivåer; fra 0 – 4. Metoden er ment å supplere den klassiske AJCC/UICC TMN klassifiseringen og kan si noe om prognosen til pasienten, da det er vist at høye nivåer av CD8/CD45RO positive celler i tumor er assosiert med færre tilbakefall og økt overlevelse (51).

1.6. Cytokiner

Cytokiner er en fellesbetegnelse for en stor gruppe signalmolekyler med forskjellige egenskaper. I motsetning til hormoner som går i blodbanen og påvirker celler i andre organer enn der de ble produsert, virker cytokinene stort sett parakrint eller autokrint i mikromiljøet til cellene som har produsert de. Noen unntak finnes. TNF- α , IL-6 og IL-1 produsert i betent vev kan gå i blodbanen og inducere produksjon av akutt fase proteiner i lever (42). Likeledes kan TNF- α inducere feber ved å påvirke hypotalamus. Ved høye nok konsentrasjoner kan andre cytokiner allikevel gå i blodbanen fra vevet de er produsert, men de har ingen kjente endokrine funksjoner.

Cytokiner ble før omtalt som signalmolekyler som virket innenfor immunsystemets celler og funksjon. Senere er det blitt klart at mange ikke-hematopoietiske celler, som epitelceller, endotelceller og fibroblaster, også er i stand til å produsere og lar seg stimulere av cytokiner. Kjemokiner (cytokiner som er kjemotaktiske som f.eks. IL-8), som regulerer hvite blodcelle trafikken, og vekstfaktorer inngår også i definisjonen av cytokiner (42). Felles for alle cytokiner er at de produseres og virker over et begrenset tidsrom. I motsetning til f.eks. proteiner i cytotoxiske granula som frigis få minutter etter stimulus, blir cytokiner syntetisert *de novo* etter aktivering av cellen. Til sammenligning tar det derfor litt lengere tid fra aktivering av cellen til den responderer ved å skille ut cytokiner. Alle cytokiner syntetiseres som respons på aktivering av reseptorer i cellemembranen, og alle cytokiner aktiverer celler gjennom cytokin-spesifikke transmembrane reseptorer. Forekomst og graden av uttrykket til hvert enkelt cytokin i solide tumorer avhenger av type immunceller og tumorens mikromiljø generelt (42). Cytokinene har mange biologiske funksjoner som kan variere i organismens utviklingsstadium, homeostase (likevekt) tilstander og under patologiske tilstander i kroppen. De kan være både pro-inflammatoriske, anti-inflammatoriske, veksthemmende eller vekstfremmende (24).

1.6.1. Tumor Nekrosis Faktor α

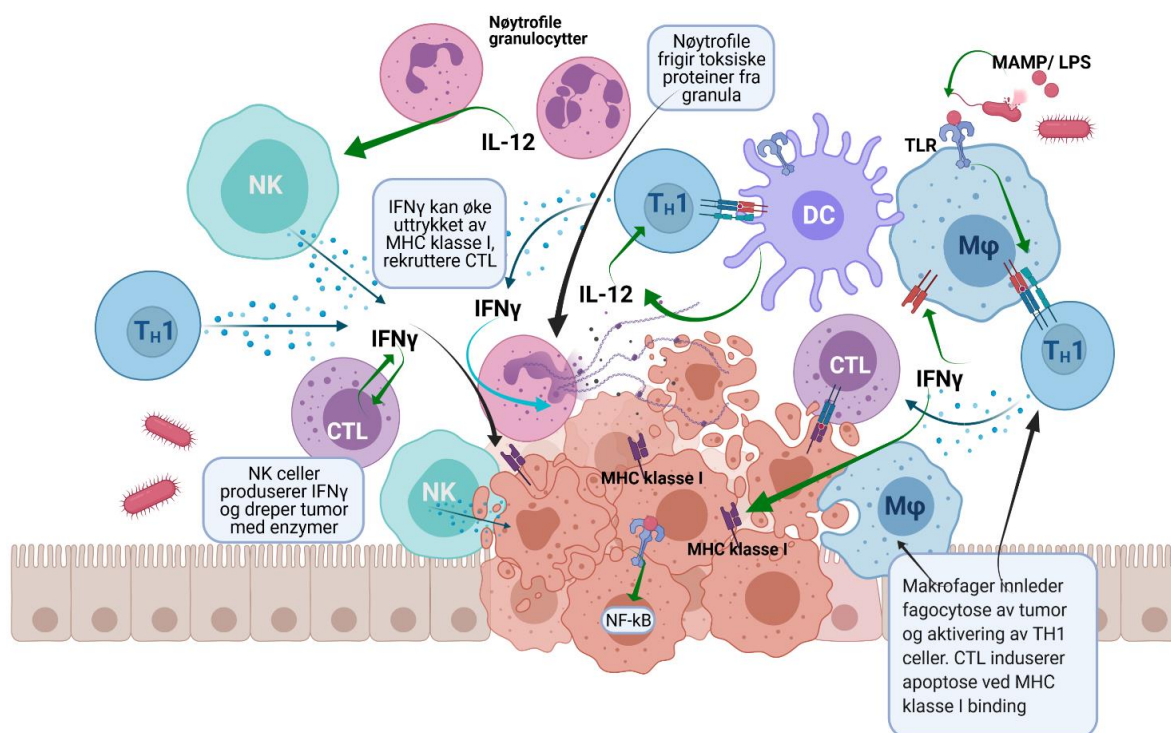
Tumor Nekrosis Faktor α (TNF- α) produseres av makrofager i respons på LPS og har en rekke pro-inflammatoriske funksjoner. Ved aktivering av TNF- α blir blodårene mer permeable og endotelceller oppregulerer uttrykk av adhesjons molekyler. Både endotelceller og makrofager begynner å produsere kjemokiner. Alle disse faktorene gjør at nøytrofile granulocytter og monocytter fra blod rekrutteres til betent vev for å bistå i bekjempelsen av eventuelle bakterielle infeksjoner. Cytokinet har fått navnet tumor nekrose faktor, da det i enkelte tumorer viste seg å inducere nekrose. Navnet er noe paradoksalt da det i ettertid har vist seg å ikke representere cytokinets hovedfunksjon som gjelder celle overlevelse. TNF- α kan nedregulere uttrykket av TLR4 på monocytter, mens IL-6 reseptorer øker (42).

1.6.2. Interleukin-12 og Interferon- γ

I likhet med TNF- α er interleukin-12 (IL-12) en tidlig mediator for inflammasjon, men former en immunrespons som er mer rettet mot intracellulære infeksjoner og kreft (52). Hovedkilden til IL-12 er profesjonelle antigen-presenterende celler som makrofager og DC. IL-12 aktiverer naturlige dreperceller (NK-celler) som kan responderer med å drepe virus infiserte celler og kreft celler samt produsere IFN- γ (figur 7). NK-cellene er gjerne på banen tidligere i forløpet av en inflammasjon enn T-cellen og kan utgjøre en viktig forskjell i bekjempelse av sykdom frem til det dannes antigen-spesifikke T-celler. IL-12 produksjon er nødvendig for at naive T-celler skal aktiveres til T_H1 celler som igjen kan aktivere CTL celler (53).

IFN- γ vil på sin side kunne stimulere makrofager til å øke sin anti-mikrobielle aktivitet, oppregulere overflateuttrykk av MHC klasse II og dermed evnen til å presentere antigener til T-celler. I likhet med IL-12 fremmer IFN- γ differensiering av T hjelper-celler mot type 1 (T_H1) og initierer aktivering av antigen-spesifikke CTL (figur 7). Av celler tilhørende det adaptive immunsystemet er T_H1-celler og CTL potente kilder til IFN- γ (52).

IFN- γ kan stimulere alle nukleære celler til å produsere proteiner som er involvert i antigenpresentasjon, inklusive proteiner som inngår i proteasomer og MHC klasse I (54). På den måten påvirker IFN- γ cellen til å presentere flere intracellulære proteiner til T-cellene (figur 7), og det er større sannsynlighet for at virus deriverte proteiner og neoantigener blir oppdaget av immunsystemet.



Figur 7: Cytotoksisk og høy immunogen tumor med immuncelle infiltrater og deres cytokiner i stroma.

Tumorvekst og stroma med mye infiltrater av immunceller med cytotoksisk effekt. Mye apoptose og destruksjon av neoplastiske celler foregår, også med rekruttering av NK-celler og nøytrofile granulocytter som frigir sine toksiske proteiner. DC og Mφ aktiverer det adaptive immunforsvaret med presentasjon av antigen på MHC klasse II for aktivering og rekruttering av TH1 celler, utskillelse av IL-12 som aktiverer IFN γ produksjon. IFN γ fører til ytterligere uttrykk av MHC klasse I på tumorcellene, rekrutterer CTL, slik at de kan binde seg til TCR på CTL og indusere apoptose i kreftcellen. Mikrober som invaderer i stroma vil også kunne aktivere Mφ og kreftceller gjennom deres LPS/ TLR interaksjon.

Figur er laget av forfatter.

MAMP= mikrobiologisk molekylær assosiert mønster, TLR= Toll lignende reseptorer, Mφ= makrofager, DC= dendrittiske celler, CTL= cytotoksiske T-lymfocytter, TH1= hjelper T-celle 1, IFN γ = Interferon gamma, IL-12= Interleukin 12, MHC klasse I/II= store histokompatibilitets protein klasse I/II.

1.6.3. Transforming Growth Factor β

Transforming Growth Factor β (TGF- β) utgjør en familie av cytokiner med mange medlemmer. TGF- β reseptor er alltid en transmembran dimer men kan bestå av forskjellige enheter. Den intracellulære signaleringen kan være gjennom blant annet PI3K/Akt, MAPK/Erk, men de viktigste effektene av TGF- β er alltid mediert gjennom den kanoniske signalveien TGF- β reseptor/SMAD. Ved aktivering av TGF- β reseptor vil de intracellulære proteinene SMAD 2-4 fosforylere og fusjonere, og sammen

fungere som transkripsjonsfaktor for ulike gener involvert i apoptose, cellevekst, celledifferensiering, inflammasjon, immunregulering, adhesjon, tumorinvasjon og metastase avhengig av kontekst (55, 56).

TGF- β blir produsert hos både, T_{reg} celler, tumor epitelceller og MSC. Når det gjelder regulering av immunsystemet, er TGF- β 1, -2, og -3 de viktigste, og disse er stort sett vist å ha en immundempende effekt. For å hindre unødvendig skade i omkringliggende vev og auto-immunitet, er det viktig at immunresponsen stopper opp etter at patogener har blitt uskadeliggjort. TGF- β er med på denne prosessen ved å begrense celledeling og produksjon av cytokiner hos T_H-celler. Effekten på CTL er tilsvarende med redusert ekspresjon av IFN- γ og proteiner som inngår i cytotoksiske granula. I tillegg stimulerer TGF- β til differensiering av T_H-celler til Treg (56). Treg er definert som T-celler som uttrykker transkripsjonsfaktoren FOXP3 i tillegg til CD4 og CD25. Treg celler produserer hovedsakelig TGF- β og IL-10. Disse faktorene vil bidra til å gjøre tumoren mer immuntolerant og unndra seg immunforsvaret. Effektene av TGF- β er på den måten selvforsterkende og virker som en motpol til pro-inflammatoriske cytokiner (56).

TGF- β har en rekke funksjoner utover regulering av immunsystemet og har vist seg å være viktig for biologiske mekanismer som celledifferensiering og homeostase. Mange studier er dedikert til å undersøke hvilken rolle TGF- β har i utviklingen av tumorceller. TGF- β har en dobbeltrolle i forhold til tumorigenese ved at det virker både som tumor-suppressor gjennom å hemme proliferering og indusere apoptose hos transformerte epitelceller i en tidlig kreftfase, og som onkogen ved at det fremmer progresjon og metastase gjennom å øke såkalt epitelial-to-mesenchymal transition (EMT) (57). Tumorer viser ofte inaktiverende mutasjoner i TGF- β reseptor og SMAD proteinene, noe som kan resultere i ukontrollert neoplastisk cellevekst, kronisk inflammasjon og immun suppresjon (57). Dette utgjør en sterk indikasjon på at TGF- β utøver et seleksjonspress på transformerte celler, i hvert fall i en tidlig fase av kreftutviklingen. Dette stemmer godt overens med kunnskap om at TGF- β er i stand til å hemme celledeling gjennom for eksempel å oppregulere uttrykk av inhibitorer for cyklin-avhengige kinaser. På en annen side er TGF- β i stand til å indusere EMT. EMT går ut på at epitelceller mister polaritet og kontakt med nabocellene, og er en naturlig prosess i embryogenese og regenerering av vev etter sårtilheling. Når dette skjer i transformerte epitelceller, er det derimot en patologisk mekanisme som fremmer metastase og spredning av tumorceller.

1.6.4. IL-10

IL-10 er ett cytokin som reduserer T_H1 cytokin produksjon, modning av DC og MHC klasse II presentasjon på makrofager, slik at det demper det adaptive immunforsvaret. Det kan også hemme IFN- γ eller LPS induert sekresjon av pro-inflammatoriske cytokiner som IL-6 og TNF- α (42).

Cytokinet blir produsert av T_H2 celler, makrofager og T_{REG}, men kan også utskilles hos B lymfocytter og keratinocytter.

1.6.5. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) produseres av mange forskjellige cellyper inklusive immunceller, endotelceller, MDSC, MSC, TAM og fibroblaster i stroma som respons på PAMP/MAMP og cytokinene IL-1 og TNF- α . IL-6 kan også produseres av tumorcellene selv (58). Som nevnt tidligere er IL-6 en av få cytokiner med kjent endokrin funksjon. Hepatocytter stimuleres av IL-6 til å produsere akutt fase proteiner som CRP, serum amyloid A og fibrinogen. I benmarg kan IL-6 mediere modning av megakaryocytter som resultere i økt antall blodplater i blod. Mer lokalt er IL-6 også med på å forme T-celle responsen i infeksjoner. Naive T-celler kan i respons på IL-6 ikke utvikle seg til Treg. Isteden er IL-6, sammen med andre cytokiner som TGF- β , med på å stimulere naive T-celler til å bli pro-inflammatoriske T_H17 celler (59). Samtidig er det vist at TGF- β i tillegg har evnen til å regulere og dempe IL-6 nivået hos tidlig transformerte epitelceller (60).

IL-6 er ett cytokin med mange funksjoner og påvirker direkte eller indirekte både inflammasjon, immunregulering og tumorigenese ved blant annet å fungere som vekstfaktor for tumorceller og øke ekspresjonen av VEGF som igjen induserer blodårevest/angiogenese, en av «hallmarks of cancer» (43). IL-6 har også en nøkkelrolle mellom kronisk inflammasjon og tumor progresjon, da IL-6 stimulerer flere immunceller i mikromiljøet til ytterligere pro-inflammatorisk cytokin produksjon (58). IL-6 sine roller i tumorvevet er gjengitt i figur 8.

1.6.5.1. JAK/STAT3 aktivering:

Tumorceller som uttrykker IL-6 reseptor stimuleres til vekst og celledeling under påvirkning av IL-6. IL-6 reseptor signalerer via JAK/STAT3 (58). IL-6 reseptor består av en α -enhet og en β -enhet hvor β -enhet alltid er transmembran og er ansvarlig for signaltransduksjon. Ved aktivering vil β -enheten forflyttere tyrosin 705 på Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) som forflytter seg til cellekjernen og virker som en transkripsjonsfaktor for en rekke gener, inklusive gener for celledeling (c-Myc, cyclin D1), anti-apoptotiske proteiner (Bcl2 og Bcl-xL), og vekstfaktoren VEGF (24, 58). STAT3 kan også aktiveres av IL-11, IL-21, IL-22 og IL-23 (24). STAT 3 kan binde seg til IL-6 promoter og gi en positiv feedback loop som vil øke IL-6 uttrykket ytterligere (58).

STAT3 kan aktiveres av både GPCR reseptorer og TLR4 gjennom aktivering av LPS fra bakterier (58). STAT3 kan også aktivere β -catenin vist ved CAC (61) og kan interagere med NF κ B og dens transkripsjonsproteiner i både immunceller, tumor og stroma celler (62) og dermed også hemme T_H1 celler sin cytokin produksjon som IFN- γ . Både STAT3 og STAT5 kan aktivere og differensiere T_{REG} celler og STAT3 aktiverer cellenes TGF- β og IL-10 produksjon. STAT3 kan også virke som en antagonist på STAT1 og hemme STAT1 rolle i DC celler som er å øke IL-12 produksjon, men også STAT1 rolle for å aktivere T_H1 celler til IFN- γ produksjon (53, 62).

1.6.6. Interleukin-23 og Interleukin-17

IL-23 er et pro-inflammatorisk cytokin som i hovedsak produseres av makrofager, men kan også produseres av tumor assosierte myeloide celler (MDSC). IL-23 virker gjennom aktivering av NF κ B og STAT3 (63). Cytokinet er en heterodimer og består av en unik p19 enhet og en p40 enhet som er felles for IL-23 og IL-12. Ved hudkreft studier er det vist at IL-23 har evnen til å redusere infiltrasjon av cytotoxiske T-celler (24).

Det finnes 5 forskjellige isotyper av IL-17, T_H17 celler produserer i hovedsak A og F, Andre lymfocytter som tilhører det medfødte immunforsvaret mer enn det adaptive kan også produsere IL-17. (24).

En musemodell for CRC, hvor CPC-APC mus spontant utvikler adenokarsinomer har gitt ny innsikt i hvordan IL-23 og IL-17 påvirker tumorutvikling. Ved å fjerne genene for IL-23 p19 enheten eller IL-23 reseptor utviklet disse musene tumorer som var 2 - 3 ganger mindre enn kontrollmusene. Selv om IL-23 kan fremme cellevekst ved aktivering av STAT3, uttrykker tumorcellene i CPC-APC mus derimot ikke IL-23 reseptor (63). Videre ble det vist at uttrykk av IL-17 i tumorer fra disse musen var avhengig av IL-23. Reseptor for IL-17 var høyt uttrykt på tumorcellene og stimulerte til celledeling og tumorvekst gjennom aktivering av ERK og NF κ B (63, 64). Det ble foreslått en modell hvor LPS fra invaderende bakterier er i stand til å aktivere makrofager til å produsere IL-23. IL-23 igjen fremmer differensiering av T hjelpe-celler og produksjon av IL-17 som igjen stimulerer tumorceller til vekst av tumor via IL-17 reseptor uttrykt på tumorcellene (57). Et studium av Tosolini et. al, 2011, har vist at ved en immunprofil med mye T_H17 celler under tidlige stadium av kreft (stadium 1 og 2), indikerer dette en raskere utvikling mot uhelbredelig metastase og en dårligere prognose (65).

En form for direkte suppresjon av immunforsvaret oppnås også ved at IL-17 stimulerer til økt uttrykk av PD-L1 i tumorceller som hemmer cytotoxiske T-celler (66). IL-17C fremmer også tumorutvikling ved TLR aktivering i neoplastiske epitelceller induert av en endret mikrobiota, hvor IL-17C virker autokrint på samme neoplastiske celle til oppregulering av anti-apoptotiske gener som Bcl-2 og Bcl-xL (67).

1.7. TLR roller

1.7.1. TLR signalering ved skade i epitelcellelaget

Ved en skade i epitelbarrieren i colon kan kommensale bakterier med deres metabolitter invadere inn i lamina propria og bakterie liposakkarider fra gramnegative bakterier (LPS) kan binde seg til blant annet TLR4 i plasmamembranen til blant annet makrofager (43).

TLR aktivering i epitelceller fører blant annet til en økt proliferasjon, regenerering av epitelcellelaget ved aktivering av EGFR (epidermal vekstfaktor reseptor) (40). Epitelcellene utsettes for LPS fra

bakterier som har invadert inn i lamina propria og dette kan også indukere IgA2 produksjon som nevnt (32). TLR4 vil også indukere produksjon av EGFR ligander gjennom aktivering av NFκB og MAPK signalveiene (32).

1.7.2. TLR signalering som induserer inflammasjon

Aktivering av TLR i immunceller, epitelceller eller mesenchymale celler stimulerer produksjon av multiple cytokiner eller prostaglandiner (PGE2) gjennom aktivering av intracellulære signalveier som NFκB, MAPK og JAK/STAT (32).

Nukleær faktor kappa B (NFκB) er en latent transkripsjons regulator og er sentral i det primære immunforsvaret i tillegg til å være sentral i tumorigenese i forhold til celledeling, angiogenese, metastase og hemme celledød (68). Hos immunceller kan aktivering av NFκB gi målgener som pro-inflammatoriske cytokiner som IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-17 og IL-23, mens det kan hos epitelceller som har utviklet seg til kreftceller, neoplastiske celler, oppreguleres uttrykk av anti-apoptotiske gener og vekst fremmede gener som c-Myc, cyclin D1 og microRNA-21 (24, 69, 70).

1.8. Inflammasjon og tumorutvikling, immunforsvaret i kreft

1.8.1. Tumor stroma

En tumor kan fra et patologisk ståsted defineres som en ansamling av unormale celler som har fått evnen til å vokse uhindret uten kontroll innenfor et område bestående av minimum 3 ulike vevsområder: primærområde, invadering i vevet (mesenchymet) i tumorens nærhet og evne til å metastasere i avsidesliggende mesenchym (71). Kompakte tumorer består videre av 2 avhengige vevs populasjoner: tumorcellene (neoplastiske) kalt parenchymet og dets stroma. Stroma har sitt opphav i omkringliggende bindevev og plasma proteiner og består av blant annet bindevevsproteiner, blodårer, fibroblaster og andre celletyper som mesenchymale stamceller (MCS) og myeloid deriverte suppressor celler (MDSC) i tillegg til infiltrater av immunceller rekruttert til vevet (71). De raskt voksende tumorcellene er helt avhengig av denne omkringliggende strukturen for å tilrøve seg næring til vekst og bli kvitt avfallsstoffer. Uten denne utvekslingen av metabolitter ville ikke tumoren kunne vokse seg større enn et par mm uten at cellene i sentrum begynner å dø. I tillegg kan cellene i stroma hjelpe med tumorvekst ved f.eks. å produsere vekstfaktorer, stimulere til dannelse av blodårer (angiogenesen), dempe immunforsvaret mot tumor og tilrettelegge for metastase (72, 73).

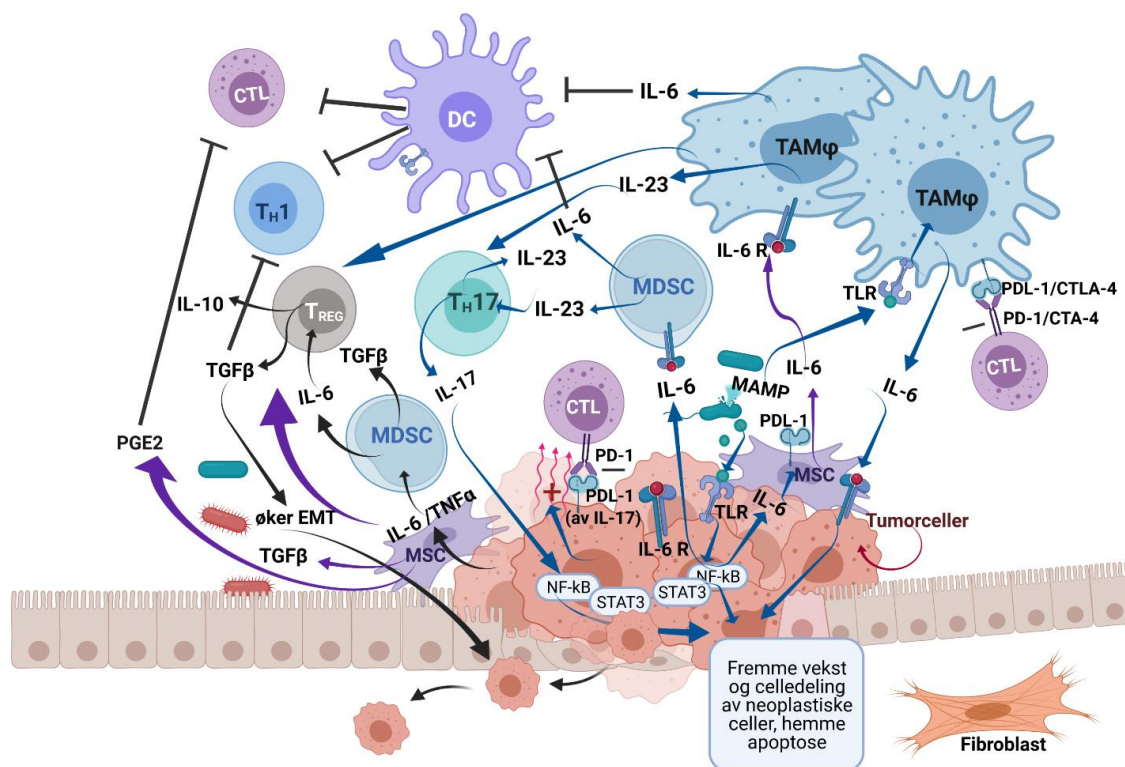
Mesenchymale stromalceller (MSC) er ikke-hematopoetiske fibroblast lignende celler som kan utvikle seg til kreft assosierte fibroblaster (CAF). Ved høye nivåer av TGFβ i stroma har *Calon et. al* vist at det differensieres mot mer CAF som igjen øker tumorvekst og gir dårlig metastase prognose (73). MSC kan påvirke tumormiljøet gjennom mange mulige veier, som i hovedsak leder til en demping av immunforsvaret (74). Ved pro-inflammatorisk stimuli gjennom cytokiner som IL-6 og

TNF α vil MSC produsere IL-6. MSC kan også skille ut PGE₂ som blant annet fører til reduksjon av NK-celler og DC-celler for å unngå fagocytose. MSC kan utskille immundempende cytokiner som TGF β eller interagere direkte med CTL sine PD-1 gjennom uttrykk av cellemarkører som PD-L1 og kan på den måten unngå drap fra CTL(74).

Myeloid deriverte supressorceller (MDSC) er også å finne i stroma og har evnen til å remodelere tumorens mikromiljø og skape et vekstfremmende miljø. MDSC er umodne immunceller fra den myeloide rekken, og aktiviseres i tumorens mikromiljø av IL-6, TNF, IL-1 β og mikrobielle peptider (43). MDSC har evnen til å dempe immunresponsen i tumor ved å uttrykke IL-10, COX2 og TGF β og kan indusere T_{reg} celler, men kan også produsere IL-6, TNF α og VEGF (72). Tumorer infisert med *F. nucleatum* har et høyere antall MDSC, TAM og andre myeloide celler enn kontrollgruppen uten *F. nucleatum* (75).

I stroma og tumor invasive front finnes det også ofte økt forekomst av **tumor assosierte makrofager (TAM)**. TAM ligner pro-inflammatoriske fenotype M2 makrofager (44). Slike TAM produserer IL-23 som videre kan aktiverer T_H17 celler til IL-17 produksjon, produserer IL-6 som stimulerer kreftcellene til høye uttrykk av vekstfaktorer som EGF, VEGF, proteaser som degraderer ekstracellulære matriks proteiner (43). TAM er ved et senere stadium av kreft vist å kunne dempe immunforsvaret ved å kunne rekruttere T_{REG} celler i tillegg til at TAM kan uttrykke ligand for PD-1 og CTLA-4 (figur 8) (76).

Umodne myeloide celler i stroma som MDSC kan også rekruttere flere M2-lignende TAM og bidra ytterligere til et inflammatorisk miljø (43). Miljøet i stroma og påvirkningseffektene til neoplastiske celler er gjengitt i figur 8.



Figur 8: Oversikt over ulike celler sin rolle i mikromiljøet hos langt fremskreden tumor, deres cytokin produksjon og påvirkning på neoplastisk vekst.

I et miljø med mye neoplastisk vekst foreligger det både infiltrater av TAM, umodne myeloide celler (MDSC) og fibroblast lignende stromaceller (MSC) som produserer cytokiner. Disse øker tumorigenesesen, fremmer tumorvekst og sikrer overlevelse ved transkripsjon av anti-apoptotiske gener gjennom STAT3 og NFκB aktivering i neoplastiske colonocytt. I tillegg dempes immunforsvaret mot tumor gjennom aktivering av T_{REG} celler med IL-10 og TGFβ produksjon, mindre rekruttering av CTL til vevet, men også oppregulering av uttrykk av PD-L1 og CTLA-4 hos både tumorcellene, MSC og TAM. Disse ligandene hemmer CTL sin evne til å indusere apoptose. IL-6 produksjon kan innledes ved TLR aktivering av MAMP og forsterkes i flere ledd, som øker ytterligere cytokinets mange effekter. TGFβ kan også øke EMT til tumorcellene, slik at metastase evnen øker. Figur er laget av forfatter.

PGE= prostaglandin 2, MAMP= mikrobeassosiert molekylære mønstre, TLR= Toll lignende reseptorer, TAM= tumor assosierte makrofager, DC= dendrittiske celler, CTL= cytotoxiske T-lymfocytter, T_H1/17= hjelper T-celle 1-/17. IL-6/10/17/23= interleukiner 6/10/17/23, TNFα= tumornekrose factor alfa, TGFβ= transformerings vekstfaktor beta. IL-6R= IL-6 reseptor, EMT= epitelial mesenchymal transisjon.

1.8.2. Immunologisk og molekylær subtype klassifisering av CRC

I røffe hovedtrekk kan immunresponsen i kolorektale tumorer deles inn i to typer med forskjellig klinisk utfall. Det er vist at infiltrasjon av cytotoxiske T- og NK-celler øker overlevelsen hos

pasienter med tykktarmskreft (77). Dette kan forklares med disse cellenes evne til å gjenkjenne og drepe transformerte celler. Disse cellene preger også en immunrespons mot virus, og akkompagneres gjerne med produksjon av interferoner som IFN γ som hemmer vekst og celledeling (78), se figur 7. Til forskjell kan en immunrespons som domineres av TAM og T-celler som T_{reg} og T_H17 celler fremme vekst av neoplastiske celler (figur 8). Denne type immunreaksjon preges av proinflammatoriske cytokiner som TNF- α , IL-1 og IL-6 som produseres av makrofager. Andre cytokiner, som IL-23, IL-17, IL21, og IL-22, produsert av henholdsvis makrofager, MDSC og T_H17 celler, er også vist å kunne promotere tumorvekst gjennom aktivering av NF- κ B og STAT3 (63).

Guinney et. al foreslo i 2015 en klassifisering av CRC i 4 ulike molekylære subtyper (79), men basert på funnene til Galon et. al og Tosolini et. al (51, 65), når det gjelder immunsignaturen og prognose ved tidlige kreftstadier har det blitt adaptert endringer til denne subtype klassifiseringen av Dienstmann et.al i 2017 (78). Klassifiseringene er gjengitt i påfølgende tabell 3.

Tabell 3: Klassifisering av konsensus molekylære subtyper av CRC i forhold til prognose

Consensus molekylær subtype (CMS)	Forekomst i tidlige tumorfaser	Genomisk signatur	Signalveier aktive	Immun-og stromaceller	Tumor lokalitet colon
CMS1-immunogen	14%	MSI high, hyper mutasjon og hyper metylering, Mutasjoner: BRAF, TGF β 2	JAK/STAT Pro-apoptose: kaspaser Cytotoksisk immunaktivering av adaptive forsvar	CTL, T _H 1 celler, DC, NK celler	proksimale høyre del
CMS2-kanonisk epitelial	37%	CIN, MSS mutasjoner: APC, KRAS, TP53, SMAD4 PIK3CA	Cellesyklus gener: Wnt, c-Myc, vekstfaktorer: EGFR, VEGFR	Mangler immuncelle infiltrater i stroma (PDL1 negative)	Distale venstre del/ rektum
CMS3 -metabolsk	13%	Lite CIN, 30% har MSI high, hypermetylering, KRAS	MMR, metabolsk repogrammering: lipidogense, glutaminolyse	Mangler immuncelle infiltrater i stroma (PDL1 negative)	Nærmere proksimalt
CMS4-mesenchymal	23%	Høy CIN, MSS immuntolerant, APC, KRAS, TP53, SMAD4 PI3KCA	TGF β , kjemokiner EMT, komplement aktivering, høy inflammasjon, immunsuppresjon	CAF, MDSC, MSC, T _H 17 celler	Distale venstre del/ rektum

CMS=consensus molekylær subtype, MSI=mikrosatelitt ustabilitet, CIN= kromosomal ustabilitet, APC= adenomatøs poliptosis protein, KRAS= Kirsten rotte sarkoma viral onkogen homolog, TP53= tumorsuppressor protein 53, BRAF= Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, CTL= cytotoksiske T lymfocytter, T_H1= hjelper-1 T-celler, DC= dendritiske celler, NK-celler= natural killer celler, PDL-1= Ligand for programmert celledød 1, PI3KCA = fosfoinositid kinase-3 signalvei, SMAD 4 = mother against decapentaplegic homolog 4, TGF β 2 = transformerings vekst faktor beta reseptor 2, EMT= epitelial mesenchymal transisjon, MDSC= myeloid derivert suppressor celle, MSC= mesenchymal stromacelle, CAF= cancer assosiert fibroblast, EGFR= epidermal vekstfaktor reseptor, MMR=mismatch reparasjons gener.

Mutasjonene i de ulike subtypene følger hovedsakelig Vogelstein sin modell fra 1990 (se pkt 1.1). Figur 8 representerer de generelle forholdene i stroma ved CMS4 CRC som indikerer en dårligere prognose, mens figur 7 viser hvordan forholdene er hos CRC av typen CMS1 med bedre prognose.

Hos tumorer med defekter i DNA mismatch repareringssystemet, som blant annet epigenetiske endringer i promoter området til reparasjonsgenene (CIMP= CpG øy metylator fenotype), mutasjoner i MMR (selve reparasjonsgenene) med en høy mikrosatelitt instabilitet (MSI high) og mye hypermutasjoner, preges stroma av mye immuncelle infiltrater av typen T_H1 celler og CTL (80). Dette gir et høyt neopeptid presenterende miljø med anti-inflammatoriske cytokiner som IFN γ og IL-12, men oppregulering av hemmer av CTL uttrykt i tumorvevet (PD-L1 og CTLA-4).

Et høyt TGF β uttrykk er assosiert med dårligere prognose, da dette indikerer en switch fra infiltrat rikt stroma med høy inflammasjons status til epitelial mesenchymal transisjon (EMT) med stor risiko for metastasering hos pasient (78). Immunkarakteriseringen av molekylære subtyper viser en assosiasjon av en mesenchymal signatur med en immunsuppressiv subtype (80). Et høyt TGF β uttrykk viser også stor grad av immuntolerant tumor som vist i punkt 6.3 og figur 8. Tumorer med CMS2 og CMS4 fenotype preges også av mutasjoner som gir mye kromosomal ustabilitet (CIN) (78).

1.9. *Fusobacterium*, inflammasjon og utvikling av kolorektal kreft

Fusobacterium nucleatum er en gram-negativ strikt anaerob stavbakterie som normalt finnes i munnhulen og andre slimhinner hos både mennesker og dyr (81). Bakteriens interaksjon med humant vev strekker seg fra nøytral til patogen. Tilstedeværelse i friskt vev indikerer at bakterien er en naturlig del av mikrobiotaen. Samtidig er *F. nucleatum* isolert fra kliniske prøver ved en rekke sykdommer som periodontitt, appendicitt, hjerneabscesser, osteomyelitt, perikarditt og patologiske svangerskapsutfall (eks. chorioamnionitt), og bakterien kan derfor anses som en opportunistisk patogen. Hvilken rolle *F. nucleatum* har i de ulike infeksjonene er noe uklart, og det er lite bevis for at Koch's postulater er oppfylt, med unntak av patologiske svangerskapsutfall (24, 82). Bakterien produserer ingen av de klassiske virulensfaktorene som alene kan forårsake skade på vertsorganismen (toksiner), men den har andre virulensfaktorer, blant annet overflateproteiner, som har viktige adhesjons-funksjoner (82).

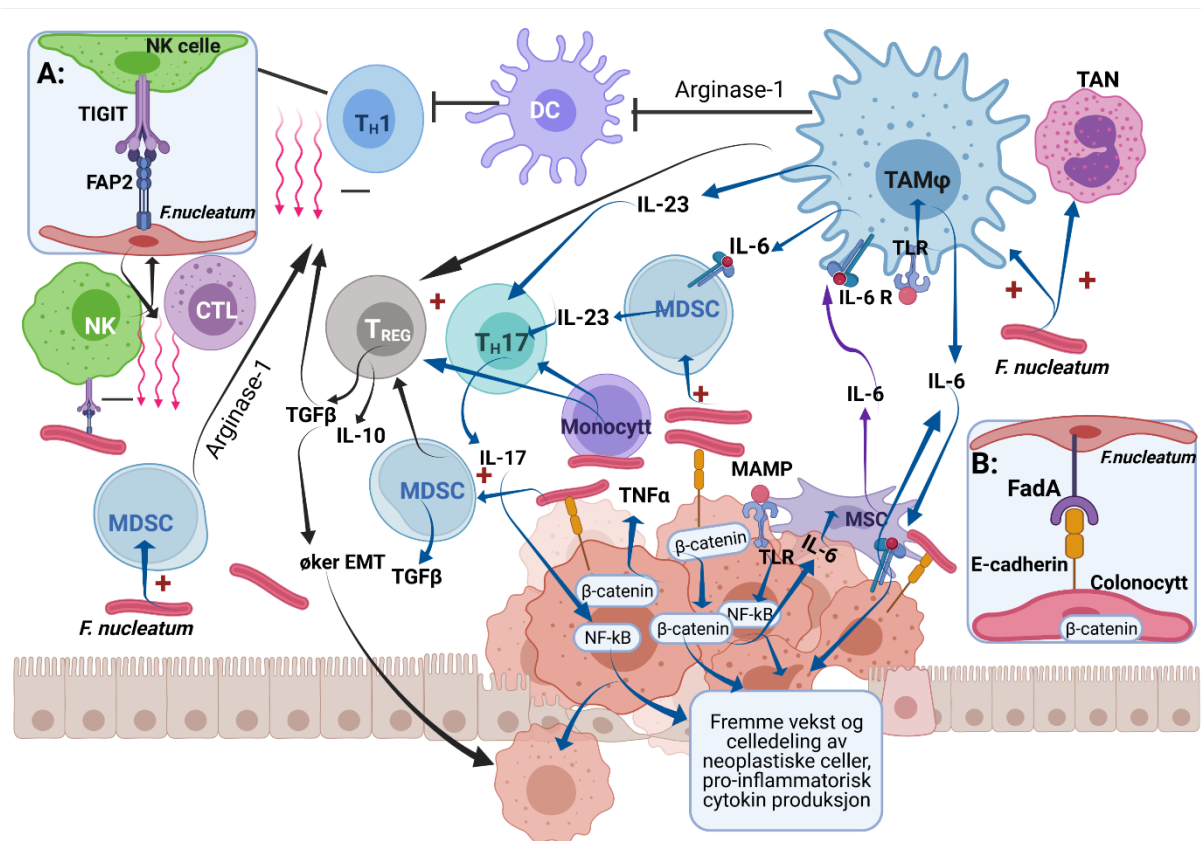
F. nucleatum er mest studert i forbindelse med periodontitt, der den er kjent som en brobygger mellom ulike bakterier i biofilm i munnhulen. Bakteriene har en avlang form og cellene er relativt store sett i forhold til andre bakterier, noe som gjør at de kan binde mange andre bakterier samtidig. *F. nucleatum* kan fremprovosere en pro-inflammatorisk respons i munnhuleepitel ved periodontitt, som blant annet er karakterisert ved økt ekspresjon av det antimikrobielle peptidet β -defensin 2, samt IL6 og IL8 (83).

Det siste tiåret har det vært økt fokus på *F. nucleatum* som en onkobakterie. De første molekulære studiene som assosierte *F. nucleatum* med CRC kom i 2012 (75, 84). Forfatterne viste at *F. nucleatum* var spesielt beriket i tumor versus normalt vev. Dette har siden blitt reproduisert i en rekke molekulære og mikroskopiske studier. Tunsjø *et.al* viste i 2019 økte mengder av *F. nucleatum* i feces hos ca. 30% av norske pasienter med kolorektale tumorer (85). Reproduksjon av liknende funn i studier utført på ulike populasjoner og materialer, viser at assosiasjonen mellom CRC og *F. nucleatum* ikke er tilfeldig, og at *F. nucleatum* har en rolle i CRC. Mikroskopi med fluorescence in situ hybridization (FISH) har illustrert at *F. nucleatum* er tett assosiert til tarmens krypter (86).

Flere eksperimentelle studier har vist hvordan *F. nucleatum* kan benytte seg av ulike virulensmekanismer for å fremme tumorigenese.

Flere studier har vist at *F. nucleatum* kan feste seg via adhesinet FadA til E-cadherin, noe som fører til aktivering av β -catenin signalveien (69). FadA binder spesifikt til det ekstracellulære domenet av E-cadherin, noe som forårsaker redusert fosforylering av β -catenin og akkumulering av proteinet i cytosol, etterfulgt av β -catenin translokasjon til kjernen der transkripsjon av målgener aktiveres (blant annet onkogenet C-Myc) (87). Rubinstein *et.al.* viste at bindingen mellom E-cadherin og FadA førte til økt aktivering av NF- κ B, som dermed øker transkripsjonen av onkogenene c-Myc og cyclin D, som er sentrale i celledelingen for økt ukontrollert celledeling hos kreftcellene (69). Denne dysregulerte aktiveringen av Wnt/ β -Catenin-signalveien øker tumorvekst og inflammasjon (69) og kan også føre til tap av barrierefunksjonen slik at ulike epitelceller som for eksempel slimhinnecellene ikke vil differensieres (10). Et tap av barrieren mellom epitelcellene vil øke forflytning av bakterier i tumorens mikromiljø innenfor lamina propria. Tap av E-cadheriner kan også utgjøre en rolle i utvikling av EMT (epitel mesenchymal transisjon) og mulighet for metastase (88). TLR4 aktivering av *F. nucleatum* på colonocyttene og immunceller i stroma kan danne et pro-inflammatorisk nærmiljø ved økt uttrykk av cytokiner som TNF α og IL-6 (81). *F. nucleatum* vil også stimulere til ytterligere filtrering av tumorassosierte myeloide celler (MDSC) som derved indirekte vil øke stroma sitt uttrykk av inflammatoriske cytokiner som blant annet IL-6, IL-23 og IL-17 (89) (figur 9).

F. nucleatum produserer også en annen virulensfaktor, membranproteinet Fap2. Fap2 er vist å binde den inhibitoriske reseptoren TIGIT uttrykt på NK-celler og CTL. Selv om det er uklart hvilken rolle dette har for utviklingen av CRC kan interaksjonen potensielt inhibere effektorfunksjonen til disse cellene. (90) (81). Fap2 kan også bidra til at *F. nucleatum* bindes til tumorceller via interaksjon med polysakkaridet D-galactose- β -(1-3)-N-acetyl-D-galactosamin (Gal-GalNAc), som blir uttrykt i økende grad på membranen til tumorceller (91).



Figur 9: Mulig *F. nucleatum* rolle hos immun- og stromaceller ved neoplastisk vekst i colon

Fusobacterium nucleatum påvirker stroma på mange områder. A: Direkte ved binding av Fap2 til TIGIT domene på NK celler og T-celler, noe som hindrer deres cytotoxiske evne i tumorvevet. Dette fører også til mindre rekruttering av T_H1 celler. B: Binding av FadA til E-cadherin på tumorcellene vil translokere β -catenin til cellekjernen for transkripsjon av gener til cellevekst og pro-inflammatoriske cytokiner som IL-6 og $TNF\alpha$. MAMP fra bakterien kan også aktivere TLR og indusere NF κ B signalering og transkripsjon av flere neoplastiske gener. *F. nucleatum* påvirker også indirekte til å rekruttere mer umodne MDSC til stroma gjennom metabolitter de utskiller som SCF, men også det økte IL-6 nivået. Bakterien kan også virke direkte på monocytter og øke utskillelse av kjemokiner som vil rekruttere og aktivere T_{REG} og T_H17 celler til produksjon av IL-23, IL-17 og immundepende IL-10 og TGF β . TGF β kan i store nivåer øke EMT, og dermed øke metastaserings evnen. *F. nucleatum* rekrutterer også TAM og TAN som øker tumorigenesen og cytokin produksjonen ytterligere.

Figuren er laget av forfatter.

NK= Natural killer celler, TIGIT= T cell immunoglobulin og ITIM domene, TAN= Tumroassosiert nøyetrofil. MAMP= mikrobiologisk molekylær assosiert mønster, TLR= Toll lignende reseptorer, TAM= tumor assosierte makrofager, DC= dendritiske celler, SCF= short chain fatty acids, FadA = fadhesin A.

F. nucleatum oppregulerer uttrykk av onkogenisk mikroRNA mir-21 via binding til TLR4. (70). MicroRNA er en klasse av enkelttrådig RNA-molekyler med en lengde på 15–27 nukleotider som regulerer genuttrykk på posttranslasjonsnivå. Økt uttrykk av miR-21 fører til økt tumorcelledeling, redusert apoptose og metastase ved å inhibere uttrykk av en rekke tumor-supressor gener (92). Økt mikroRNA mir-21 nivå kan også øke IL-10 og PGE2 nivået (93).

Hos *APC^{MIN/+}* mus foret med *F. nucleatum* viste Kostic et.al at *F. nucleatum* induerte rekruttering av TAM, myeloide celler, MDSC og at disse hemmer T-celler gjennom arginase-1 (figur 9) (75). TAM stimulerer tumorprogresjonen, cellevekst, angiogenesen og øker metastasen (94). I tillegg var det økt tumor assosierte granulocytter som nøytrofile granulocytter, men lite CD8⁺ CTL og CD4⁺ hjelper T-celler i stroma (75). *F. nucleatum* har også evnen til å direkte interagere med kreftceller og monocytter og aktivere deres produksjon av kjemokin CCL20 som binder seg til reseptor CCR6 hos CCR6⁺ immunceller (figur 9). Dette kan føre til en rekruttering av TAM celler, T_H17 celler med følgelig IL-17 og IL-23 produksjon, men også rekruttering av immundependende T_{REG} celler som produserer IL10 og TGFβ (95, 96). Figur 9 viser en oppsummering av hva tidligere forskning ovenfor viser.

Mima K. et. al viste i 2016 at *F. nucleatum* var involvert i immunresponsen i flere av de ulike konsensus molekylære subtypene utarbeidet av Guinney et.al (se pkt 1.8.2), men kunne ikke klassifiseres i en bestemt type, selv om høyere forekomst av *F. nucleatum* hos CRC korrelerte med mer alvorlige stadier av CRC (97). Denne og tidligere forskning av Mima K. viste også at *F. nucleatum* var relatert til MSI high, hypermetylering og premaligne lesjoner med høy grad av CIMP i tillegg til assosiasjon med lav forekomst av CD3⁺ T-celler (men ikke assosiert med CTL (CD8⁺), hukommelses celler (CD45RO⁺) eller T_{REG} (FOXP3⁺ celler)) (98).

Det er mye som tyder på at infeksjon av *F. nucleatum* i kolorektale tumorer er med å diktere immunresponsen i tumorens mikromiljø, men dette er ufullstendig karakterisert i menneske.

2. Formål med oppgaven

Inflammasjon er en medvirkende årsak til kolitt-assosiert kreft. I tykktarmskreft er den vanlige oppfatningen at inflammasjon heller er et resultat av den neoplastiske celleveksten, men man kan ikke utelukke at subklinisk inflammasjon kan være en medvirkende årsak. Det er godt etablert at inflammasjon kan være med på å forme tumorutviklingen i tykktarmskreft. Likeledes tenker man seg at tumorens mikromiljø er med på å forme immunresponsen. Det er derimot ikke klart hvilke faktorer som avgjør hvilken retning immunresponsen tar. I tillegg er det vist at epitelbarrieren mot tarmlumen kan være svekket i kolorektale tumorer, noe som kan føre til infeksjoner av opportunistiske bakterier. Det kan derfor tenkes at bakterier og bakterieprodukter som finnes i tumorens mikromiljø er med på å forme immunresponsen i denne kreftformen.

I denne oppgaven er det studert uttrykk av cytokiner som representerer forskjellige typer immunrespons i tumorvev og ikke-neoplastisk vev fra norske pasienter med kolorektal kreft. Hypotesen er at *Fusobacterium nucleatum* påvirker og promoterer tumorigenese ved å opprettholde en lokal kronisk inflammasjon og at immunsystemet kan virke som et ledd mellom bakterien og tumorutviklingen. Det var også ønskelig å få et innblikk i om ikke-neoplastisk vev viser tegn på inflammasjon, og om uttrykk av noen av cytokinene er såpass høyt i tumormaterialet at de kan vurderes som kandidater for ikke-invasive markører. Problemstillinger:

1. Er ikke-neoplastisk vev dominert av pro-inflammatoriske eller anti-inflammatoriske cytokiner?
2. Hvilke typer inflammasjon dominerer i tumorvev, og er det tegn på at immunresponsen har utviklet seg forskjellig i forskjellige tumorer?
3. Er cytokiner uttrykt ulikt i tumorer med og uten *Fusobacterium nucleatum*?

3. Metodisk teori

3.1. Revers Transkripsjon kvantitativ PCR (RT qPCR)

Revers Transkripsjon kvantitativ PCR (RT qPCR) omfatter to ulike prosesser. MessengerRNA (mRNA) må først transkriberes til komplementært DNA (cDNA) i en revers transkripsjons-reaksjon før qPCR for bestemte målgener kan utføres. RT qPCR kan utføres i en ett-trinns eller to-trinns-operasjon, der både mRNA og total-RNA kan benyttes som templat.

Revers transkripsjon

mRNA som templat gir fordeler i form av høy sensitivitet, men mRNA er ustabil og kan lett degraderes i nødvendige rense- og anrikningsprosesser. Ujevnt tap av ulike mRNA i renseprosessene kan dermed gi skjevfordeling i etterfølgende analyser. Ved ekstraksjon av total RNA kan andelen mRNA variere mellom prøver, men forholdet mellom de ulike mRNA i en prøve vil være representativt. Ekstraksjon av total-RNA krever færre rense- og anrikningstrinn og dermed mindre tap av mRNA i disse prosessene (99). I en to-trinns RT- qPCR vil RT-reaksjonen og qPCR-reaksjonen foregå i to separate rør. Dette gjør at betingelsene for begge reaksjoner kan optimaliseres, noe som gir høy sensitivitet. I tillegg gir det muligheter for å benytte flere primertyper, både random primere, oligo(dT)-primere og sekvensspesifikke primere. Random primerne vil binde til alt RNA (både tRNA, rRNA og mRNA), mens oligo(dT)-primere binder spesifikt til mRNA med polyA-hale. Dette vil gi et total-cDNA som er representativt for alle gener som er uttrykt i prøven, og som kan benyttes til gjentatte eller flere ulike qPCR-reaksjoner. To-trinns RT qPCR er derimot sårbar for eksperimentelle variasjoner ettersom reaksjonene foregår i flere steg i ulike rør.

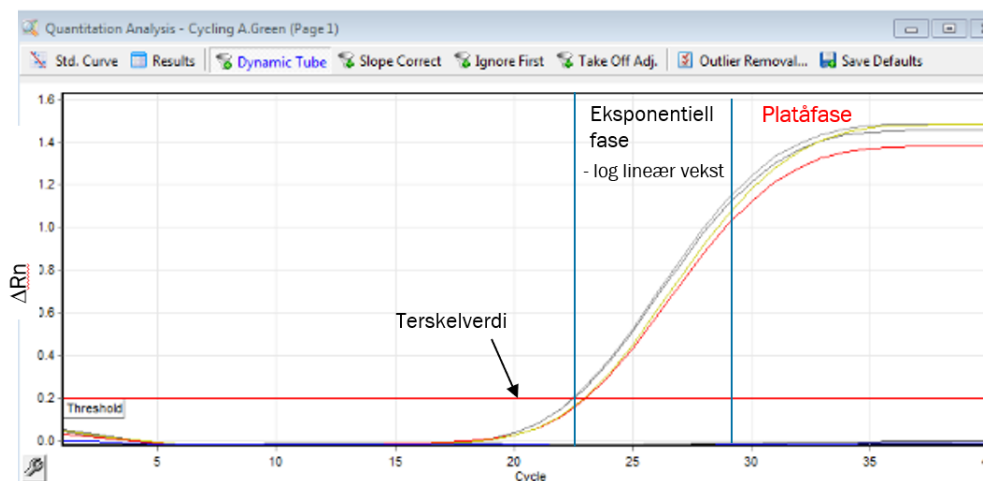
I en ett-trinns RT qPCR vil RT-reaksjonen og qPCR-reaksjonen foregå i samme rør. I denne type reaksjoner kan det kun benyttes sekvensspesifikke primere. Dette gir færre muligheter for optimalisering av de ulike reaksjonene. Ett-trinns RT qPCR er imidlertid mindre sårbar for eksperimentelle variasjoner (99).

Kvantitativ PCR (qPCR)

Kvantitativ PCR (qPCR) baserer seg på måling av PCR-produkt i sanntid. Målingene registreres etter hver PCR-syklus i form av fluorescerende lys som emitteres fra fluorokromer bundet til PCR-produkt. Dette kan oppnås både med fluorokromer festet til DNA-prober eller med fluorokromer som bindes direkte til PCR-produkt, eksempelvis SYBR Green, som emitterer fluorescerende lys når den er bundet til dobbeltrådet DNA. Mengden emittert lys vil øke proporsjonalt med mengden PCR-produkt (100). Når signalet blir signifikant sterkere enn bakgrunns-fluorescensen, settes en terskellinje, og antall PCR-sykler nødvendig for å oppnå denne signalstyrken registreres i form av en Ct-verdi (Cycle threshold

value) (101). Ct-verdien er omvendt proporsjonal med logaritmen av utgangskonsentrasjonen av DNA/RNA i prøven. For å få et nøyaktivt mål av utgangskonsentrasjonen av RNA/DNA kan man benytte både absolutt kvantifisering med en standardkurve av kjente konsentrasjonsstandarder, eller relativ kvantifisering ved bruk av referansegener (se utdypende beskrivelse i kapittel 3.3).

En optimal PCR-kurve bør ha en sigmoid form, og den eksponentielle vekstfasen, hvor mengde PCR-produkt fordobles, bør være lang og ha en bratt stigning (figur 10). Platåfasen, hvor det er mangel på primere og PCR-komponenter som gjør at veksten stagnerer, bør ikke komme for tidlig og heller ikke inntreffe ved for lav bakgrunnsnormalisert fluorescens (ΔRn) (102).



Figur 10: Optimal PCR vekstkurve med ulike vekst faser

Kvantifiseringsplott som viser en optimal amflifikasjonskurve med sen platåfase og tydelig sigmoid form i den eksponentielle fasen. Terskelverdi er satt over bakgrunns fluorescens i starten av den log-linære fasen.

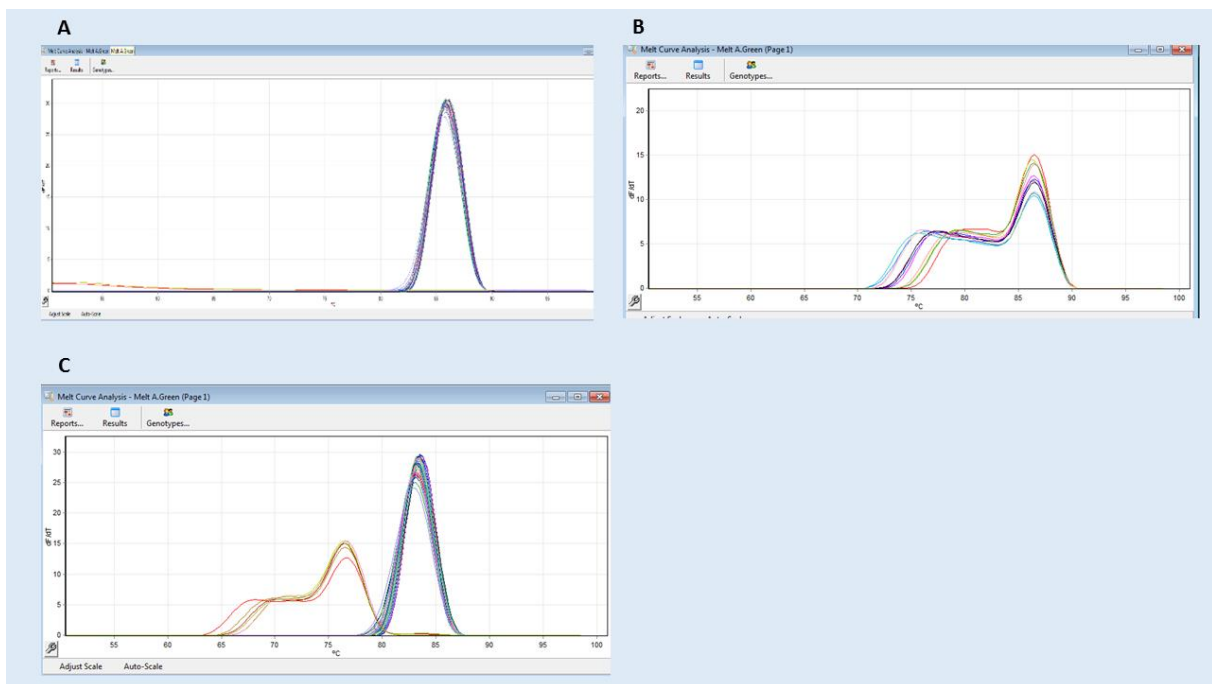
3.2. PCR spesifisitet

DNA-interkalerende farger som SYBR Green vil binde til alt dobbeltrådet DNA som er amplifisert under PCR, og kan også binde uspesifikt til primer-dimere eller annet uspesifikt PCR-produkt (101). Det er derfor viktig å undersøke PCR-spesifisiteten til hver enkelt PCR-analyse.

En smeltepunktsanalyse eller en dissosiasjonskurve kan benyttes til dette. Ved en smeltepunktsanalyse vil PCR-instrumentet gradvis øke temperaturen fra 50°C til 99°C ved slutten av hver PCR-reaksjon, mens fluorescensen avleses jevnlig. Det dobbeltrådet PCR-produktet vil gradvis denaturere til enkeltrådet DNA, og SYBR Green vil frigjøres fra DNA. Når PCR- produktet er 50% dissosiert vil dette gi en kraftig reduksjon i fluorescens. Denne temperaturen avleses som produktets

smeltepunkttemperatur T_m . T_m vil avhenge av lengden av ampliconet, men også av basesammensetningen (101).

En ideell smeltepunktanalyse vil vise en enkelt derivert smeltepunktstopp i et forventet temperaturområde (figur 11A). Dersom et PCR-produkt inneholder mange GC-rike områder i midten av produktet kan det danne seg en hale/skulder med liten topp inntil den forventede og høyere smeltepunktstoppen (figur 11B) (103). Dette inntreffer fordi det krever høyere varmeenergi for å bryte tre hydrogenbindinger mellom GC i motsetning til to hydrogenbindinger mellom AT, og betyr ikke at det foreligger to PCR-produkter. Slike ulike smeltepunktstyper kan også oppstå hos amplicons som danner sekundærstruktur eller hos amplicons med lnjeforskyvninger i AT rike områder (103). Dersom smeltepunktanalysen viser to distinkte smeltepunktstopper er dette ofte tegn på et uspesifikt PCR-produkt eller primer/dimer i tillegg til ønsket PCR-produkt (figur 11C).



Figur 11: Eksempler på gode og dårlige smeltepunktstyper

Figuren viser smeltepunktstyper med log-transformerte (dF/ dT)-verdier. En optimal smeltepunktstyper fremstår med en enkelt topp (A). En topp med lang skulder er tegn på flere GC-rike områder i PCR-produktet (B). En smeltepunktstyper med flere toppe i annet temperaturområde er tegn på uspesifikk amplifisering (C).

PCR-spesifisitet kan også evalueres med gel-elektroforese. Spesifikke produkter migrerer som et bånd med forventet lengde. Primerdimere sees gjerne som diffuse bånd under 100 bp. Hvis forward og revers primer er lagt i hvert sitt ekson, kan DNA kontaminering også oppdages med gelelektroforese. Dette fremstår da som et bånd med lengde tilsvarende et produkt der mellomliggende intron ikke er spleiset ut.

3.3. Genekspresjon med relativ kvantifisering qPCR

Relativ kvantifisering betyr den relative forskjellen i mRNA-uttrykk mellom gruppen man ønsker å studere i forhold til en frisk kontrollgruppe, eksempelvis tumorvev mot ikke neoplastisk vev i marginalsoner. En etablert metode for å beregne dette er $2^{-\Delta\Delta CT}$ (104). Det er viktig å korrigere for variasjoner mellom prøvene før man vurderer eventuelle ulikheter mellom de to gruppene. Dette kan gjøres ved å normalisere ekspresjon av mål-gener mot ekspresjon av stabilt uttrykte referansegener.

Trinn 1. For normalisering av Ct-verdien benyttes følgende formel:

$$(1) \Delta Ct \text{ (normalisert Ct)} = Ct_{\text{målgen av interesse}} - Ct_{\text{referansegen}}$$

Dersom det benyttes flere referansegener, foregår normaliseringer med gjennomsnittet av Ct-verdiene fra alle referansegenene.

Trinn 2. For å beregne endring i genuttrykk mellom to grupper/posisjoner benyttes formelen:

$$(2) \Delta\Delta CT \text{ verdi} = \Delta CT_{\text{testgruppe}} - \Delta CT_{\text{kontrollgruppe}}$$

Testgruppen er i dette arbeidet prøver fra tumorvev og kontrollgruppen er prøver fra tumorfri reseksjonsrand, kalt marginalsoner, fra samme pasient.

Trinn 3. For å beregne fold endring mellom gruppene benyttes formelen:

$$(3) 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Fold endring beskriver den relative endringen i testgruppen i forhold til kontrollgruppen og om denne er positiv eller negativ.

Ved $2^{-\Delta\Delta CT} > 1$ viser det at genuttrykk i testgruppen (tumorvev) er oppregulert i forhold til kontrollgruppen (marginalsonen).

Ved $2^{-\Delta\Delta CT} = 1$ viser det ingen forskjell i genuttrykk i testgruppen (tumorvev) i forhold til kontrollgruppen (marginalsonen).

Ved $0 < 2^{-\Delta\Delta CT} < 1$ viser det at genuttrykk i testgruppen (tumorvev) er nedregulert i forhold til kontrollgruppen (marginalsonen).

3.4. Referansegener

I genekspressionsanalyser med relativ kvantifisering er første trinn å normalisere ekspresjonen av målgenet mot et eller flere stabilt uttrykte referansegener. Hensikten med normalisering mot referansegener er å korrigere for variasjoner mellom prøver i form av ulik RNA-kvalitet, ujevn mRNA-andel av total-RNA og ulik effektivitet i RT-reaksjonene (105). Det finnes en rekke kandidatgener som ofte benyttes som referansegener, men det er allikevel viktig å gjøre egne undersøkelser. Referansegenene som benyttes skal være stabilt uttrykt i materialene som undersøkes og under de forholdene som undersøkes (105). Det er anbefalt å benytte flere referansegener til normalisering ettersom bruk av kun ett referansegen kan føre til relativt store feil (106).

Det finnes flere analyse-verktøy for å undersøke stabilitet av referansegener, eksempelvis Normfinder (utarbeidet ved Universitet i Århus, Danmark (107) og Bestkeeper (108). BestKeeper er et Excel-basert verktøy som utfører parvise korrelasjoner mellom alle par av referansegener og kalkulerer en geometrisk middelverdi /indeks av de referansegenene som er mest stabile. Indeksen kan så sammenliknes med målgener i studien for å avgjøre om de er ulikt uttrykt under ulike forhold. Databehandlingen er basert på Ct-verdier (108).

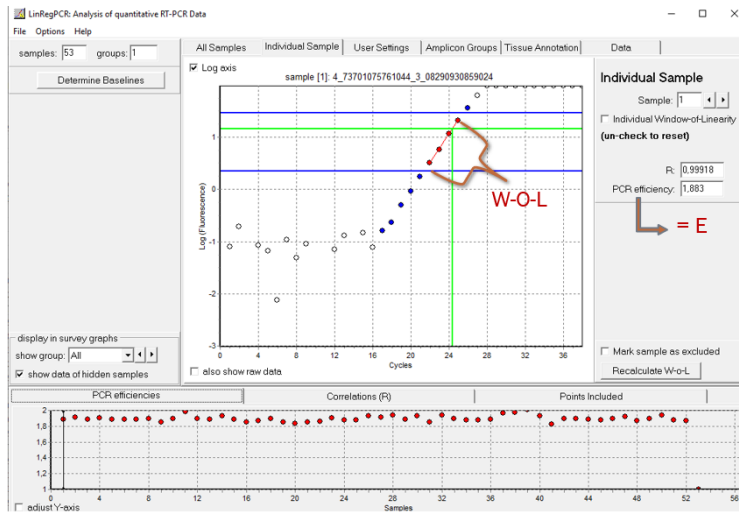
Normfinder gir en stabilitetsverdi som utgjør et mål for ekspresjonsvariasjonen mellom de ulike kandidatgenene til normalisering. Programmet kan gi et mål på referansegenenes systematiske feil ved å inkludere både intergruppe og intragruppe variasjon. Denne metoden kan oppdage samregulering av referansegener og angir den beste kombinasjonen for å unngå dette (107). Normfinder benytter lineære verdier i sine utregninger og data må derfor først konverteres til lineære verdier (107).

3.5. PCR- effektivitet

For at relativ kvantifisering skal kunne benyttes til å beregne mengden av et PCR-produkt, må visse kriterier oppfylles. Det er viktig at PCR-effektiviteten til referansegenene som skal benyttes er den samme som PCR-effektiviteten til målgenene (102). En PCR-analyse med en effektivitet på 100% betyr at det skjer en fordobling av PCR-produkter ved hver PCR-syklus. Dersom PCR-effektiviteten ikke er 100%, kan Ct-verdier korrigeres ut fra målt PCR-effektivitet for aktuell analyse.

Til å undersøke de ulike PCR-analysenes effektivitet, finnes det ulike programmer. Programmet LinRegPCR benytter bakgrunnskorrigerte rådata fra alle prøver for å beregne en gjennomsnittlig PCR-effektivitet for hver enkelt PCR-analyse. Effektiviteten (E) til hver prøve kalkuleres ved at programmet utfører en baseline-korreksjon for hver prøve for deretter å finne et område med linearitet basert på fire punkter i eksponentiell fase (figur 12). PCR-effektiviteten beregnes ved bruk av lineær

regresjonsanalyse som gir en rett linje, der stigningstallet til denne linjen viser effektiviteten. En $E = 2$ betyr en PCR-effektivitet på 100% (109).



Figur 12: LinReg linearitetsvindu

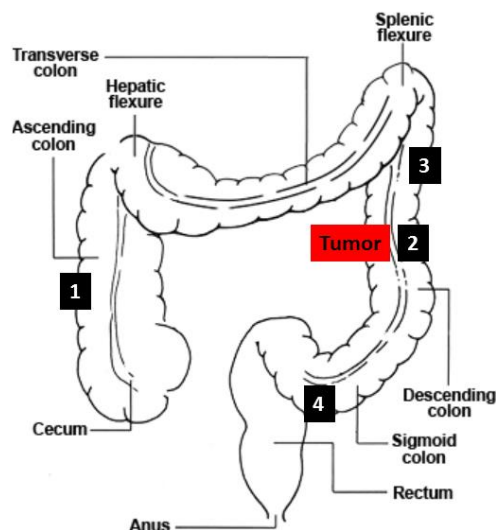
Programvaren LinReg finner området for eksponentiell vekst i hver individuelle PCR-reaksjon som er utført. I dette området vil LinReg angi fire punkter som et linearitetsvindu (W-O-L, markert med rødt) som benyttes til å beregne PCR-effektiviteten (E) for hver prøve.

4. Metoder

4.1. Materialer

4.1.1. Studiepopulasjon og biobank

Materialet som er benyttet i oppgaven er hentet fra forskningsbiobanken «CRC - tidlig deteksjon» og er samlet inn ved Akershus Universitetssykehus mellom 2014 og 2017. Biobanken består av materiale fra 25 pasienter med kolorektal kreft, 25 pasienter med polypper og 25 pasienter i en frisk kontrollgruppe. Alle deltakerne har gjennomgått koloskopi der det er hentet ut biopsier (2x2 mm) fra fire ulike posisjoner i tarmen (Figur 13): proximale del av colon - colon ascendens (merket «-1»), tumorzone (merket «-2»), marginalzone – nærliggende ikke neoplastisk vev 8 cm fra tumor, (merket «-3») og distale colon - colon sigmoideum (merket «-4»). Biopsiene er oppbevart i Allprotect tissue reagent (Qiagen).



Figur 13: Illustrasjon av kolon og biopsiområder

Illustrasjon og beskrivelse av ulike deler av kolon. Angitte nummererte posisjoner viser hvor biopsimateriale er hentet fra under koloskopi. Posisjon 2 er biopsi fra tumor (lokalisasjon kan variere mellom pasienter), mens posisjon 3 er marginalsone som representerer ikke-neoplastisk vev ca. 8 cm fra tumor. Figur er laget av Vahid Bemanian.

I dette arbeidet er det inkludert biopsier fra tumor (merket «-2») og marginalsone (merket «-3») fra 25 kreftpasienter, til sammen 50 prøver. Materiale fra polyppgruppen og kontrollgruppen er ikke inkludert. Marginalsone representerer et område utenfor tumor, hvor det ikke er funnet neoplastisk vekst, såkalt fri reseksjonsrand.

Alle 25 tumorbiopsier er fra adenokarsinomer, bortsett fra C2. Biopsiene er undersøkt og klassifisert i et UICC (The union for international cancer control) TNM klassifiseringssystem av patologisk avdeling ved Akershus universitetssykehus. TNM er et internasjonalt anatomisk klassifiseringssystem utarbeidet av WHO (110).

T angir tumorens størrelse og infiltrasjon i vevet (0-4, hvor tumorvekst er i 1 = submucosa, 2 = muskellaget, 3 = gjennom muskellag og videre i perirektalt fettvev, 4 = invasjon til naboorganer). N angir infiltrasjon i regionale lymfeknuter (skala 0-2, hvor 1 = metastase til 1-3 lymfeknuter og 2 = metastase > 4 lymfeknuter). M beskriver om det er metastatisk spredning eller ikke (skala 0-1) (se tabell 1). TNM-klassifiseringen benyttes igjen for å inndele kreftutviklingen i 4 stadier basert på UICC 0- IV klassifiseringsmodell (union for international cancer control), hvor 0 angir tumor in situ og IV angir langt fremskridende kreft med fjernspredning (110).

Tabell 4: Oversikt over pasienter fra kreftgruppen, inkludert pTNM-klassifisering av tumor. Funn av *F. nucleatum* i tarmbiopsier er også angitt.

PrøveID		Tumor				TNM klassifisering			<i>F. nucleatum</i> i tarmbiopsi
Pasient	Alder	Kjønn	Lokalisasjon	Størrelse (mm)	Morfologi	T	N	M	Lokalisasjon 1-4
C01	69	M	Sigmoid colon	20	Adenocarcinoma	2	0	0	T
C02	74	M	Sigmoid colon	15 × 10 × 5	Haggitt: level 2				-
C03	57	F	Cecum	45	Adenocarcinoma	2	0	0	T, M, CS
C04	53	F	Cecum	60	Adenocarcinoma	3	2	0	CA, T, M, CS
C05	70	M	Rectosigmoid junction	130	Adenocarcinoma	3	2	0	CA, T, M, CS
C06	80	F	Transverse colon	50	Adenocarcinoma	3	1	0	CA, T, M, CS
C07	69	M	Rectum	20	Adenocarcinoma	2	0	0	M
C08	71	M	Sigmoid colon	35	Adenocarcinoma	2	0	0	CA, M, CS
C09	67	M	Ascending colon	60	Adenocarcinoma	3	1	0	T, M
C10	72	M	Sigmoid colon	28	Adenocarcinoma	2	0	0	-
C11	80	F	Ascending colon	35	Adenocarcinoma	3	0	0	CA, T, M, CS
C12	75	M	Transverse colon	28	Adenocarcinoma	1	0	0	T, CS
C13	68	M	Sigmoid colon	60	Adenocarcinoma	3	0	1	T
C14	68	M	Cecum	18	Adenocarcinoma	2	0	0	-
C15	63	M	Rectosigmoid junction	35	Adenocarcinoma	3	0	0	T
C16	84	M	Cecum	70	Adenocarcinoma	4	2	1	-
C17	76	M	Ascending colon	23	Adenocarcinoma	3	2	0	-
C18	65	M	Sigmoideum	20	Adenocarcinoma	1	0	0	-
C19	70	F	Cecum	38	Adenocarcinoma	2	0	0	CA, T, M, CS
C20	55	F	Cecum	70	Adenocarcinoma	4	1	1	T
C21	45	M	Sigmoid colon	55	Adenocarcinoma	4	1	1	-
C22	66	M	Sigmoid colon	40	Adenocarcinoma	3	0	0	CS
C23	82	M	Rectum	40	Adenocarcinoma	2	0	0	-
C24	81	M	Rectum	25	Adenocarcinoma	2	0	0	T
C25	73	F	Sigmoid colon	42 × 46 × 56	Adenocarcinoma	4b	1b	0	-

T: tumor. M: marginalsone. CS: colon sigmoideum. CA: colon ascendens. Tabell modifisert med tillatelse fra Tunsjø *et. al.* 2019 (85).

4.1.2. Etske og juridiske forhold knyttet til studien

Prosjektet er en del av et overordnet prosjekt «Kolorektal kreft – tidlig deteksjon og ikke-invasive biomarkører» og er godkjent av Regional Etisk Komité (2012/1994) og av internt personvernombud ved Ahus. Forskningsbanken «CRC – tidlig deteksjon» er godkjent av de samme instanser (vedlegg).

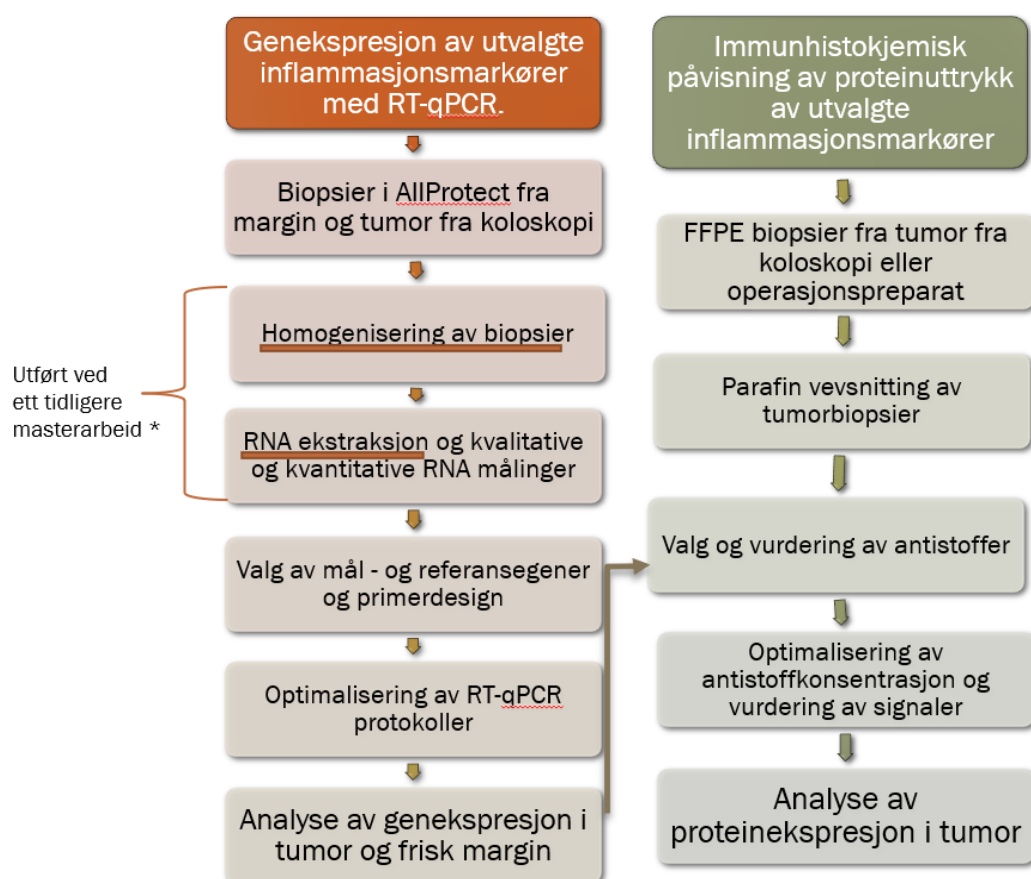
Alle pasienter som er inkludert i studien har fått skriftlig og muntlig informasjon om studien og har signert samtykkeskjema før inklusjon. Alle pasienter har mulighet til å trekke seg når som helst fra studien. Alle data er aidentifiserte og lagret i en sikker forskningsdatabase ved Ahus.

4.2. Studiedesign

Dette arbeidet undersøker ekspresjon av inflammatoriske cytokiner i kolorektale tumorer og om cytokinekspressjonen korrelerer med funn av *Fusobacterium nuclaetum* i tumor. Det benyttes to ulike tilnærminger:

- Genuttrykk i biopsier fra tumor og frisk margin måles gjennom Revers Transkripsjon kvantitativ PCR (RT-qPCR).
- Immunhistokjemi (IHC) ble brukt som en supplerende metode for å følge opp funn fra RT-qPCR.

Hver metode har egne optimaliseringer og delmål som skissert i figur 14.



Figur 14: Flytskjema av studiedesign

Skjemaet viser arbeidsflyten inndelt i hovedprosesser under dette prosjektet. Linjen til venstre beskriver genekspressjonen av utvalgte målgener (inflammatoriske cytokiner) utført med RT-qPCR. Resultater fra denne delen la igjen føringer for hvilke markører og antistoffer som ble valgt til immunhistokjemisk påvisning av proteinuttrykk. * = Gundersen Gro, 2019 (111).

4.3. Eksperimentell design del 1: Genekspresjon av utvalgte inflammasjonsmarkører med RT-qPCR.

4.3.1. Ekstraksjon av nukleinsyrer

Ekstraksjon av nukleinsyrer (både DNA og RNA) er tidligere utført etter protokoll beskrevet av Moen et al., 2016 (112). Protokollen er modifisert fra AllPrep DNA/RNA minikit (Qiagen, Hilden, Tyskland), der endringene i hovedsak går ut på en mer effektiv lysering/homogenisering, både mekanisk (silisiumkuler), kjemisk (lysisbuffer) og enzymatisk. Nukleinsyrene har vært oppbevart i -80°C. I dette arbeidet ble det utført nukleinsyreekstraksjon av den siste prøven C25, både fra tumor og marginalsone. Protokollen som ble benyttet var den samme (112).

4.3.2. Kvantitets- og kvalitets-måling av RNA

Kvantitet av ekstrahert total-RNA ble målt på Qubit 3.0 spektrofotometer (Invitrogen) ved hjelp av Qubit RNA HS assay kit (Life technologies). Dette kitet har et måleområde fra 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ til 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$. RNA-kvalitet og renhet ble målt på Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Renheten angis ved $A_{260/280}$ og $A_{260/230}$, der RNA absorberer lys ved A_{260} , proteiner ved A_{280} og karbohydrater og ulike organiske kjemikalier ved A_{230} . For resultater og mengde inn i cDNA syntese, se vedlegg 3.

4.3.3. cDNA-syntese

I dette arbeidet ble det benyttet to trinns RT-qPCR med total-RNA som templat. Det ble benyttet en blanding av randomprimere og oligo-dT som var inkludert i det kommersielle RT-kitet.

cDNA fra alle prøver (n=50) fra tumor og marginalsone ble syntetisert med QuantiNova Reverse Transcription kit (Qiagen). Protokollen er validert for prøver med RNA-konsentrasjoner fra 10 μg – 5 μg .

En totalmengde RNA på 400 ng ble benyttet som templat i syntesen (for optimalisering, se kapittel 4.3.6.2). Protokollen for c-DNA syntese startet med et steg med fjerning av genomisk DNA og tilsetning av en internkontroll (IC)-oligo. Mengde av disse er angitt i tabell 5.

Tabell 5: Komponenter og templatmengde ved gDNA elimineringsstrinn i cDNA syntesen

Komponenter	Kit/Produsent	Produktnr	Volum
gDNA removal mix (m/RNase inhibitor)	QuantiNova RT kit/ Qiagen	205411	2 µl
intern kontroll (IC) oligo	QuantiNova RT kit/ Qiagen	205411	1µl
RNA			12 µl (400 ng) *
Totalt			15 µl

* volumet av hver prøve var avhengig av RNA-konsentrasjonen. Vann ble tilsatt til et totalvolum på 12µl, slik at mengden RNA i cDNA-syntesen var 400 ng.

Blandingen ble inkubert ved 45°C i 2 min før tilsetning av komponenter til revers transkripsjon.

Komponenter og mengde av disse er angitt i tabell 6.

Tabell 6: RT-reagenser og mengde til cDNA syntese

Komponenter	Kit/produsent	Produktnr	Volum
Reverse transkriptase mix	QuantiNova RT kit/ Qiagen	205411	4 µl
Reverse transkriptase enzym	QuantiNova RT kit/ Qiagen	205411	1µl
Templat fra gDNA removal trinn			15 µl
Totalt			20 µl

Revers transkripsjon ble utført på Uno 96 PCR cykler (VWR) med temperaturprofil som angitt i tabell 7. Alt arbeidet under syntesen foregikk med prøver og reagenser på is og vask av pipetter og utstyr med nukleasefjernere før bruk for å unngå degradering av RNA. RT-kitet fra Qiagen inneholdt også RNase inhibitorer innblandet i RT-mixen. Til slutt ble c-DNA fortynnet 1:10 og oppbevart i fryser ved -20°C før opptining til videre qPCR av alle cytokinene og referansegenene (for optimalisering, se pkt 3.3.6).

Tabell 7: Temperaturprofil for revers transkripsjon

gDNA eliminerings	45°C	2 min (maks 10 min!)
Pause	25°C	Prøvene overføres til is, RT-reagenser tilsettes.
Annealing	25°C	3 min
Revers transkripsjon	45°C	10 min (opptil 20 min ved >200bp produkt)
Inaktivering av RT-enzym	85°C	5 min (prøver overføres deretter til is)

4.3.4. Primere for målgener og referansegener

Interleukinene IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 og IL-23, Interferon gamma (IFN- γ), Transforming growth factor beta (TGF- β) og Tumor nekrose faktor alfa (TNF- α) ble benyttet som målgener i studien. Fire

ulike kandidater til referansegener ble vurdert basert på litteratursøk (113). Disse var Glyceraldehyd 3-phosphate (GAPDH), Ubiquitin C (UBC), Polymerase (RNA) II A (POLR2A) og TATA box-bindende protein (TBP) (se tabell 8).

Det var ønskelig med lik annealing-temperatur på alle primerpar, og det ble derfor besluttet å benytte tidligere publiserte primerpar med tilnærmet lik T_m på 60°C. Noen primerpar ble designet på nytt ved hjelp av programvaren Primer3 (114) eller modifisert for å sikre lik annealing-temperatur. Alle primerne ble kontrollert i Primer3 med anerkjente anbefalinger for primerdesign (mer stabil 5'-ende enn 3'-ende, stabilitet, GC-innhold, lengde på primer). De ble kontrollert og sjekket for spesifisitet og at forward og revers primer lå i hvert sitt ekson ved å benytte søkeverktøyet Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) i GenBank (115). Alle primere ble testet og PCR-betingelser optimalisert (kapittel 3.3.6). Kommersielle primersett ble bestilt der egendesignede primere ikke ga optimale resultater. Primere for alle målgener og kandidater til referansegener er oppgitt i tabell 8.

4.3.5. Kvantitativ real-time PCR

cDNA fra alle prøver (n=50) ble analysert med qPCR i duplikater for alle målgener og referansegener. QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen) med hotstart DNA polymerase ble benyttet med protokoll som anbefalt fra leverandøren. Egendesignede primere ble benyttet for IL-12, TGFβ og TNFα, hvor reverse primer for IL-6 var hentet fra (116). Referansegenene var hentet fra tidligere publikasjoner (113). Etter innledende forsøk (se kapittel xx) ble det bestilt kommersielle QuantiTect SYBR Green PCR-primere (Qiagen) for cytokinene IFNγ, IL-10, IL-17 og IL-23. Tabell 9 og 10 viser mengde av PCR-reagenser, primere og templat for begge PCR-oppsett.

Tabell 9: QuantiNova reagenser, primer og templat mengder til SYBR Green PCR

Komponenter	Kit/produsent	Produktnummer	Volum	Slutt-konsentrasjon
F primer (7μM)	Eurogentec	Egenprodusert	2 μl	0,7μM
R primer (7 μM)	Eurogentec	Egenprodusert	2 μl	0,7μM
2x QuantiNova SYBR Green master mix	QuantiNova SYBR Green PCR kit/Qiagen	208054	10 μl	1x
30x fortynnet cDNA i Yellow template buffer	QuantiNova Yellow templat dilution buffer 100x	208054	6 μl	≤100 ng/rx
Totalt			20 μl	

F: Forward primer. R: Revers primer

Tabell 8: Primere til alle mål- og referansegener

Cytokinn primere	Gen	GenBank Accession nr	Referanse/ produsent	Sekvens	Lokalisasjon	PCR-produkt kt	T _m primer e (°C)	T _m PCR-produkt (°C)
IL-6	Homo sapiens Interleukin 6, transkript variant 1	NM_000600.5	Safety et al 2004 (113)	F: 5'TACCCCCAGGAGAAGATTCC-3' R: 5'AGTGCCTCTTTGGCTGCTTTC-3'	7p15.3	166 bp	60,3	82,5
IL-12A	Homo sapiens Interleukin 12A	NM_000882	Egen design	F: 5'CACTCCAGACCCAGGAATGT-3' R: 5'CAATGGTAACAGGCCCTCCA-3'	3q25.33	181 bp	60,0	82
TGF-β	Homo sapiens transforming growth factor beta 1	NM_000660.7	Egen design	F: 5'GCAACAATTCCTGGCGATAC-3' R: 5'AAACCCGTTGATGTCCCACTTG-3'	19q13.2	193 bp	60,5	86
TNF-α	Homo sapiens tumor necrosis factor	NM_000594.4	Egen design	F: 5'CCCCAGGGACCCTCTCTATAA-3' R: 5'GCTGGTTATCTCTCAGCTCCA-3'	6p21.33	182 bp	60,6	87
IFN-γ	Interferon gamma		Qiagen	catno QT00000525	12q15			79
IL-10	Homo sapiens Interleukin 10		Qiagen	catno QT00041685	1q32.1			80
IL-17A	Homo sapiens Interleukin 17A		Qiagen	catno QT00009233	6p12.2			82
IL-23A	Homo sapiens Interleukin 23A		Qiagen	catno QT00204078	23A:12q13.13			85,5
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046.3	Zhang C. et al 2017 (116)	F: 5'TCTCCTCTGACTTCAACAGCGAC-3' R: 5'CCCTGTTGCTGTAGCCCAAATTCC-3'	12p13.31	126 bp		83
UBC	Ubiquitin C	NM_021009.6	Zhang C. et al 2017 (116)	F: 5'GATTGGGTCGCAGTTCTT-3' R: 5'TGCCCTTGACATTCCTCGAATGGT-3'	12q24.3	134 bp		82
POLR2A	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A)	NM_000937.4	Zhang C. et al 2017 (116)	F: 5'GCACCACGTCACAATGACAT-3' R: 5'GTGCGGCTGCTCCATATAA-3'	17p13.1	267 bp		86,5
TBP	TATA box-binding protein	NM_003194.4	Zhang C. et al 2017 (116)	F: 5'TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA-3' R: 5'TGGACTGTTCTTCACCTCTTGGC-3'	6q27	227 bp		83

Tm: Smeltepunkt. Pb: basepar. F: Forward primer. R: Revers primer

Tabell 10: Reagenser til SYBR Green PCR med kommersielle primere

Komponenter	Kit/produzent	Produktnummer	Volum	Slutt-konsentrasjon
10x QuantiTect primer	QuantiTect primer assay/ Qiagen	IL-10: QT00041685 IL-17: QT00009233 IL-23: QT00204078 IFN- γ : QT00000525 QNIC: QT02589307	2 μ l	1x
NFW			2 μ l	
2x QuantiNova SYBR Green master mix	QuantiNova SYBR Green PCR kit/Qiagen	208054	10 μ l	1x
30x fortynnet cDNA i Yellow template buffer	QuantiNova Yellow templat dilution buffer 100x	208054	6 μ l	\leq 100 ng/rx
Totalt			20 μ l	

NFW: Nukleasefritt vann, QNIC= Intern kontroll primere til Intern kontroll PCR

Automatisk pipettering med Qiaguly pipetteringsrobot ble benyttet for standardisering av betingelser. PCR-mix og cDNA ble blandet 5 ganger i 72 brønners O-ringer før qPCR ble initiert på RotorGene Q (Qiagen) med temperaturprofil angitt i tabell 11.

Tabell 11: Temperaturprofil qPCR

Aktivering av DNA polymerase	95°C	2 min
40 sykler av:		
Denaturering	95°C	5 sek
Annealing, ekstensjon og data innsamling	60°C	10 sek

Etter qPCR ble det utført en smeltepunktsanalyse med en gradvis økning av temperaturen fra 50°C til 99°C mens fluorescens ble avlest.

Amplifiseringskurvene ble vurdert for eksponentiell vekst med en sigmoid kurve og om de nådde platåfase. Smeltepunktsanalyse ble vurdert for 1 eller flere smeltepunktstopper. I de tilfellene der det ble observert avvikende form på smeltepunktskurven, uventet høy eller manglende Ct-verdi eller flere smeltepunktstopper, ble PCR-analysen repetert.

4.3.6. Optimalisering av protokoller og kvalitetssikring av analyser

4.3.6.1. Kontroller

Internkontroll : Hver prøve ble analysert og vurdert med en internkontroll RNA-oligo på 200 bp (QuantiTect primer assay, Qiagen) som ble tilsatt i RT-reaksjonen. Formålet med internkontrollen var å påvise eventuell hemming av RT-PCR-reaksjoner. Dette kan være forårsaket av inhibitorer som for

eksempel etanol, SDS eller EDTA som ikke har blitt fjernet under RNA ekstraksjonen.

Internkontrollen i hver prøve ble sammenliknet med internkontrollen i en templatfri kontrollprøve.

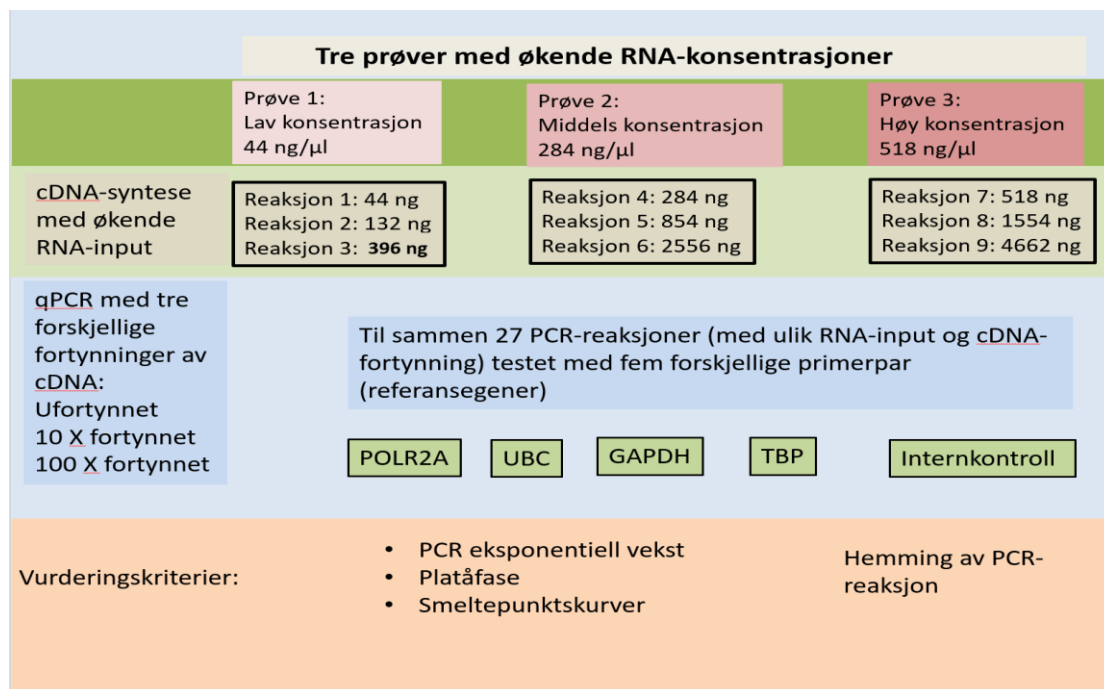
Ved en forskjell mellom kontrollprøve og pasientprøve på mer enn $2\Delta Ct$, ble det ansett som signifikant hemming i aktuelle prøve.

Negative prosesskontroller : Det ble også inkludert tre negative prosesskontroller fra ekstraksjoner utført i 2017-2018, i tillegg til en negativ prosesskontroll under ekstraksjonen av prøve C25 i dette arbeidet. Disse ble inkludert for å sjekke at det ikke var noen forurensing i ekstraksjons- eller cDNA-reagenser i form av celler eller vev. De negative ekstraksjonskontrollene ble inkludert i alle PCR-analyser/oppsett.

4.3.6.2. Optimalisering av RNA- og cDNA-mengder

For å optimalisere RNA-mengde og cDNA-fortynning før qPCR ble det benyttet tre utvalgte prøver med ulike RNA-konsentrasjoner (fra 44 ng/ μ l – 518 ng/ μ l). Fra hver av prøvene ble det benyttet ulike mengde templat i cDNA syntesen (1 μ l, 3 μ l og 9 μ l) for å dekke et RNA-område fra 44 til 4462 ng RNA. Alle de ni rørene med cDNA ble analysert ufortynnet, fortynnet 1:10 og fortynnet 1:100 i ulike qPCR-reaksjoner (figur 15).

PCR-analyser for referansegenene ble benyttet i evalueringen. Amplifiseringskurvene ble vurdert for eksponentiell vekst med en sigmoid kurve og om de nådde platåfase. Smeltepunktanalyse ble vurdert for 1 eller flere smeltepunktstopper. Internkontrollen ble vurdert for å se om mengde total-RNA eller cDNA-fortynning hadde innvirkning på PCR-hemming.



Figur 15: Flytskjema for optimalisering av RNA-mengde og cDNA-fortynning

Figur laget av Vahid Bemanian.

Etter optimalisering av PCR-analyser for referansegenene, ble et mindre oppsett utført med PCR-analyser for målgenene. I tillegg ble ulike volum med samme total mengde cDNA (2 µl 10X fortynnet cDNA og 6 µl 20X fortynnet cDNA) analysert for å evaluere pipetteringsunøyaktigheter med små volum og som en kontroll på automatisk pipettering ved bruk av Qiagility pipetteringsrobot (Qiagen). Eksperimentell variasjon grunnet variasjon i pipettering er i dette prosjektet redusert ved bruk av automatisk pipettering av alle qPCR-reaksjoner. Fortynningen av cDNA ble gjort i en gul fargeløsning som medfulgte SYBR Green PCR kitet (QuantiNovaYellow template dilution buffer, Qiagen) som også har den funksjonen at den skaper en visuell fargeendring ved tilsetning av templat.

4.3.6.3. Vurdering av amplifikasjonskurver og PCR-spesifisitet

Alle amplifiseringskurver ble vurdert for eksponentiell vekst med en sigmoid kurve og om de nådde platåfase. Smeltepunktanalyse ble vurdert for en eller flere smeltepunktstopper. Alle negative kontroller ble vurdert for uspesifikke reaksjoner.

Det ble i tillegg utført agarosegel-elektroforese for vurdering av uspesifikke bånd med totalt tre separate oppsett. En agarosegel på 2% ble laget ved bruk av 50 ml 1 X TEA buffer og agarose. Det ble benyttet 15µl av en størrelsesstandard (low mass DNA ladder) og 20µl PCR-produkt blandet med 4µl fargeløsning (gel loading dye orange). Etter elektroforesen ble agarosegelen farget i en løsning med 15µl av en DNA-interkalerende farge (SYBR Safe) løst i 100ml dH₂O i 2 timer med risteinkubator, før avfarging i dH₂O i 30 min.

4.3.6.4. Evaluering av referansegeners stabilitet

For å undersøke hvilke referansegener som var stabilt uttrykt i våre prøver, ble det benyttet to ulike bioinformatisk verktøy, Normfinder (utarbeidet ved Universitet i Århus, Danmark (107) og Bestkeeper (108). Ct-verdiene for alle prøver analysert med PCR for de ulike referansegenene ble eksportert fra PCR-instrumentet i tekst-format, og importert til de to programmene. Databehandlingen i Bestkeeper er basert på Ct-verdier og utregner parvise korrelasjoner som geometrisk middelværdier (108), mens Normfinder benytter lineære verdier i sine utregninger og data (Ct-verdiene) måtte derfor først konverteres til lineære verdier (107). Middelværdien av Ct-verdiene til de to beste referansegenene ble brukt til å normalisere Ct-verdier for alle de åtte målgenene (cytokinene) som ble undersøkt i studien.

4.3.6.5. Korrigering for ulik PCR-effektivitet

PCR-effektiviteten til alle PCR-analyser ble beregnet og vurdert ved bruk av programmet LinRegPCR (117). Rådata med alle fluorescensmålinger ble eksportert fra PCR-instrumentet RotorGene Q og importert til Excel, der de ble redigert til riktig format. Deretter ble data importert i LinRegPCR, som beregnet effektiviteten til hver individuelle PCR-reaksjon. Til slutt beregnet programmet en samlet effektivitetsverdi for hver PCR-analyse, basert på alle individuelle målinger.

Alle Ct-verdier ble deretter justert for ulik PCR-effektivitet med følgende formel:

$$(4) C_{t_{\text{justert}}} = C_{t_{\text{målt}}} * (\log(1+E) / \log(2)) , (100)$$

hvor E = gjennomsnittlig effektivitet for hver PCR-analyse, basert på alle analyserte prøver. Når E = 2 er PCR-effektiviteten 100 %.

Justeringen ble utført før videre normalisering og utregninger av relativ kvantifisering av mRNA-uttrykk, som beskrevet under pkt 3.3 metodisk teori. For eksempel på justering og $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utregning, se vedlegg 4 og 5.

4.3.7. Data-analyse

Relativ kvantifisering av genuttrykk i tumor i forhold til frisk reseksjonsrand i marginalsone hos samme pasient ble beregnet med $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoden (104). En korreksjon for variasjoner mellom prøvene ble utført ved normalisering med egnede referansegener som beskrevet i punkt 1.4.

Rekkefølgen av data analysene utført etter at alle optimaliseringer var gjort og referansegener var bestemt:

1. Gjennomsnitt av tekniske replikater for alle PCR-reaksjoner
2. Korrigering for PCR-effektivitet (formel 4)
3. Gjennomsnitt av referansegener
4. Normalisering av genuttrykk med referansegener (ΔC_t : formel 1)
5. Beregning av relativt genuttrykk ($\Delta\Delta C_t$: formel 2)
6. Beregning av fold endring ($2^{-\Delta\Delta C_t}$: formel 3)
7. Statistiske utregninger

Det ble utført deskriptiv statistikk av qPCR-resultater med utregning av gjennomsnitt og standardavvik for beskrivelse av variasjon, men disse kunne ikke benyttes for de fleste målgenene, da det ikke forelå normalfordeling av data. Normaliserte Ct-verdier for marginalsone og relativ genekspressjon ($2^{-\Delta C_t}$) for alle målgenene, i denne sammenhengen cytokiner, ble gruppert visuelt i boksplokk for sammenlikning.

Differansen mellom margin og tumor gruppene ble undersøkt for normalfordeling med Shapiro Wilk test ($p > 0,05$) og for statistiske utliggere ved bruk av et box-plot.

Wilcoxon signed rank test ble benyttet for å sammenlikne medianen av normaliserte $2^{-\Delta C_t}$ verdier i de to gruppene tumor og marginalsone, bortsett fra IL-12 som oppfylte kravene for bruk av parret t-test til sammenlikning av gjennomsnittsverdier i tumor og marginalsone. Dette ble utført på alle 25 prøvepar for ethvert mål-gen. Nullhypotesen var at det ikke var noen signifikant forskjell i genuttrykk ($2^{-\Delta C_t}$) mellom tumor og marginalsone ved $p > 0,05$.

Forskjell i genekspresjon mellom tumor og marginalsone ble presentert som fold endring ($2^{-\Delta \Delta C_t}$) og visuelt vurdert i et stolpediagram. Alle cytokiner og alle pasienter ($n = 25$) ble presentert individuelt.

Ikke-parametrisk Spearman $\rho < 0,05$ ble benyttet for å vurdere assosiasjon og eventuell styrke mellom uttrykk av ulike cytokiner i form av fold endring ($2^{-\Delta \Delta C_t}$). Linearitet ble også vurdert visuelt i spredningsplott. Pearson R kunne ikke benyttes til korrelasjon da ingen av fold endringene viste Gauss fordeling ved bruk av Shapiro Wilk test og fold endringene for de undersøkte cytokinene hadde flere statistiske utliggere som ikke kunne utelukkes.

Basert på resultater fra qPCR ble det valgt å sammenlikne genuttrykk av IL-6 og IL-23 i to ulike grupper basert på tilstedeværelse av *F. nucleatum* i kolon eller ikke (resultater fra tidligere forskning på samme biopsimateriale). Uavhengig t-test var foretrukket metode for den kontinuerlige variabel, ved $\Delta \Delta C_t$ verdier for IL-6 og IL-23. Dataene ble vurdert for normalitet med Shapiro-Wilk test innenfor hver kategorisk gruppe. Variansen ble undersøkt for homogenitet ved bruk av Levenes test. I tillegg ble distribusjonen vurdert i et box-plott. Ikke-parametrisk Mann Whitney U ble også benyttet for $2^{-\Delta \Delta C_t}$ for IL-6 og IL-23 i forhold til de to *Fucobacterium* gruppene.

4.4. Eksperimentell design del 2: Immunhistokjemisk påvisning av utvalgte inflammasjonsmarkører

4.4.1. Snitting av formalinfikserte parafininnstøpte (FFPE) tumorbiopsier.

Formalinfikserte parafininnstøpte (FFPE) tumorbiopsier fra de 25 tumorprøvene ble snittet til 3-4 μm tykkelse på en rotasjonsmikrotom. For å sikre nok snitt fra hver pasient ble det i utgangspunktet brukt reseksjons-biopsier, men for fire av pasientene (C2, C5, C20 og C25) manglet disse og det ble isteden brukt mindre biopsier fra koloskopi. Hard parafin er helt avgjørende for å få gode snitt.

Parafinblokkene ble derfor plassert i 10 minutter ved -20°C og oppbevart på is før de ble montert på mikrotomen for snitting. Snitt ble inkubert i 1 minutt i et vannbad som sto på is. Deretter ble de inkubert i vannbad, 45°C i 2-3 minutter for at snittene skulle strekke seg ut. Etter strekking ble snittene så fisket opp og montert på merkede elektrostatiske ladede objektglass. Objektglassene ble tørket i ca.

30 min på varmeblokk på 45°C knyttet til vannbadet før ytterligere tørking i 30 minutter -1 time i varmeskap på 60°C. Ferdig tørkede snitt ble til slutt plassert i en preparat-boks og oppbevart ved i fryser (med holdbarhet over flere måneder) til fargingene kunne gjennomføres.

4.4.2. Valg og vurdering av antistoffer

4.4.2.1. Valg av antistoffer

Basert på resultater fra RT-qPCR ble det besluttet å se på proteinekspressjon av følgende antigener i tumorvev:

1. IL-6: Uttesting av to forskjellige kloner/produsenter av antistoff mot IL-6.
2. pSTAT3: Uttesting av et antistoff spesifikt for STAT3 fosforylert på tyrosin 705.

Tabell 12: Oversikt over antistoffkloner

Antigen	Klon	Isotype	Produkt-nummer	Produsent	Anbefalt Fortynning IHC
IL-6	E-4	Monoklonalt mus IgG2a	Sc-28343	Santa Cruz	1:50-1:500
IL-6	1A3B4	Monoklonalt mus IgG2b	66146-1-Ig	ProteinTech	1:50-1:500
Phospho-STAT3 (Tyr705)	D3A7	Monoklonalt kanin IgG	#9145	Cell signaling technology	1:100-1:400

IHC= immunhistokjemi

Antistoff-kloner og leverandører (tabell 12) ble valgt ut ifra tidligere publikasjoner (IL-6: (118) og pSTAT3: (119)) og kvaliteten på fargingene vist i produktarkene..

4.4.2.2. Test av antistoffer

Antistoffene ble vurdert i forhold til optimal buffer-pH og hvilken bruksfortynning som ga optimal differensiering og minst bakgrunnsfarging i vevet.

Før FFPE vev kan farges må epitopene i vevet gjøres tilgjengelig for antistoffene. Det ble brukt PT Link til rehydrering og deparafinisering i tillegg til å teste hvilken pH (pH=7 eller pH=9) som ga best demaskering av epitoper for hvert antistoff. Det var mest praktisk å teste forskjellige konsentrasjoner av antistoff med manuelle fargeprosedyrer.

IL-6: Anti-IL-6 antistoff fra SantaCruz ble testet med fortynningene 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 og 1:400. Som positive kontroller ble det valgt snitt fra lymfeknute og tumorprøve C9. Tumorprøve C9 ble valgt fordi det ble funnet høyt uttrykk av IL-6 med RT-qPCR i denne prøven.

Antistoffet fra ProteinTech ble testet ut i fortynningene 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 og 1:600 i høy pH-buffer.

pSTAT3: For å finne optimal fortynning av anti-pSTAT3 antistoffet ble først fortynningene 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 og 1:600 testet på snitt fra lymfeknute som positiv kontroll. Deretter i fortynningene 1:400 og 1:600 i tonsille, brystkreftvev og CRC prøve C24 og C12. Det ble også kjøpt kontroller. Positiv kontroll var HeLa celler stimulert med IFN α . Negativ kontroll var ustimulerte HeLa celler.

4.4.3. Automatisert farging med AutostainerLink 48

Anti-IL-6 antistoffet fra SantCruz virket ikke i de første manuelle utprøvingen og derfor ble det besluttet å ikke gå videre med dette antistoffet når fargeprosessen skulle automatiseres (se pkt 4.3). Både anti-IL-6 antistoff fra ProteinTech og anti-pSTAT3 ble brukt i fortynning 1:400.

Maskinen PT link (Agilent, USA) ble benyttet til automatisert hydrering, avparafinisering og demaskering av epitoper. Disse prosessene innebar et innledende trinn på 65°C til avparafinisering og videre demaskering ved 97°C i 20 min av vevsnittene i høy pH (pH=9) buffer med Envision Flex target retrieval solution, fortynnet til bruksløsning 1:50.

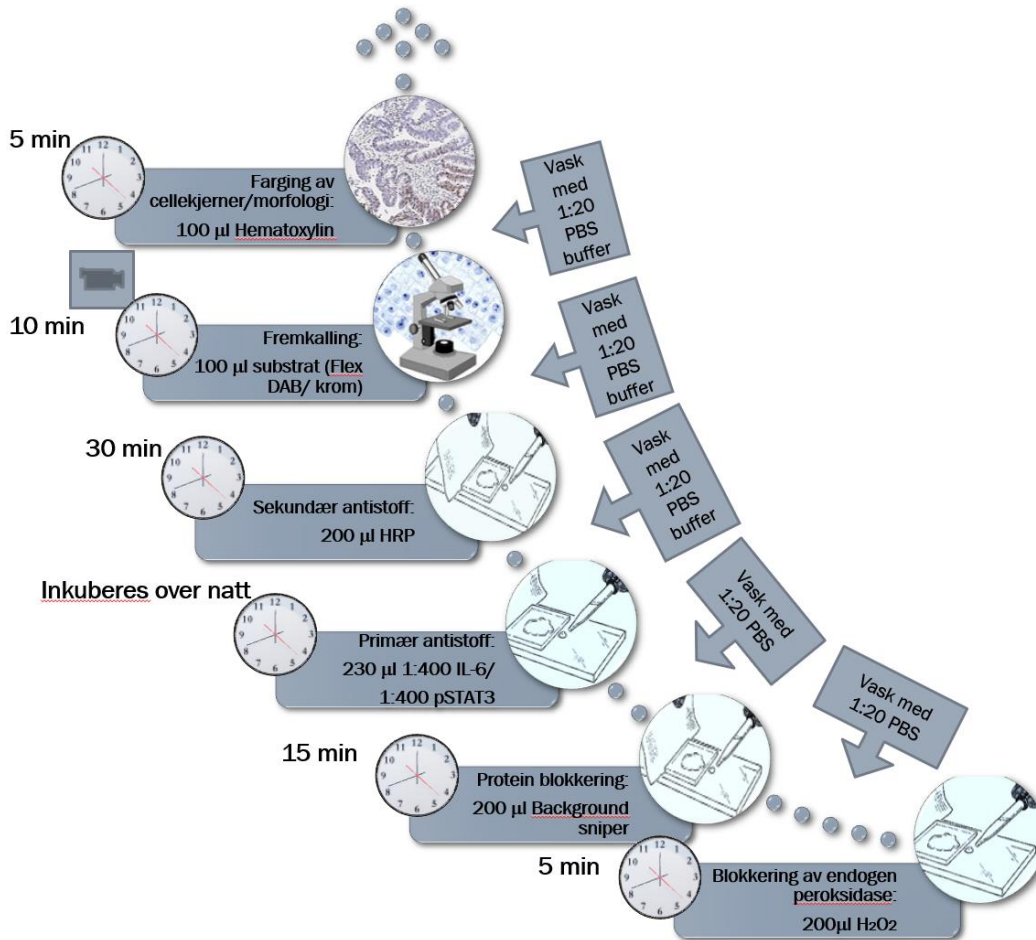
Farging av vevsnittene ble utført videre automatisk ved bruk av AutostainerLink 48 fra Dako (figur 16). Reagenser med produktnummer benyttet under farging var som angitt i tabell 13.

Dehydreringen ble utført manuelt i stigende alkoholløsninger i kar (75%, 95% og 2x i 100% etanol) hver i 2-5 min, med en siste 2x skylling i xylen. Snittene ble så umiddelbart montert maskinelt i ClearVue Mountant XYL for å kunne sikre stabilitet og langtidslagring ved romtemperatur.

Tabell 13: Reagenser til immunhistokjemisk analyse.

Komponenter	Kit/Produsent	Produktnummer	Volum
Proteinblock serum free	Dako	X0909	200 μ l
Background sniper	Brocare medical	BS966 L	200 μ l
Flex HRP	Dako	SM807	200 μ l
Flex DAB/krom substrat	Dako	SM803	100 μ l
Flex Hematoxylin	Dako	SM806	100 μ l

HRP= horse raddish peroksidase



Figur 16: Flytskjema over manuell og maskinell fargeprosess

Flytskjema over hele fargeprosessen fra blokkering av endogent peroksidase til farging med Hematoxylin. Figur laget av forfatter.

5. Resultater

5.1. Vurdering av PCR-analyser for referansegener

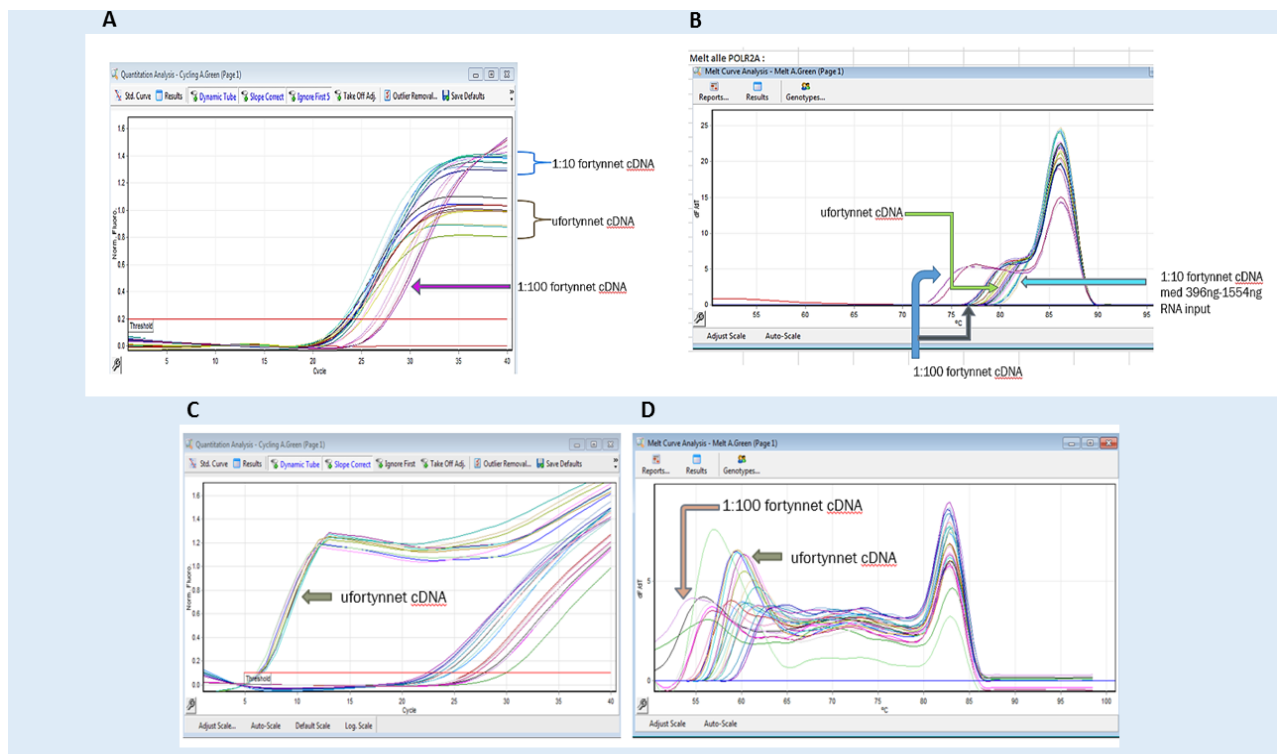
5.1.1. Amplifikasjons- og smeltepunktskurver

PCR amplifikasjonskurver og smeltepunktskurver ble vurdert for alle referansegenene med ulike RNA-mengder i cDNA-syntesen (RNA-input) og ulike cDNA-fortynninger før PCR (som beskrevet under optimalisering av protokoller pkt.6.2). PCR-analysene for POLR2A, UBC og GAPDH ga sigmoide amplifikasjonskurver som oppnådde platåfase og enkle smeltepunktstopper med RNA-input mellom 396 og 1554 ng og 1:10 fortynnet cDNA. Høyere RNA-input og ufortynnet cDNA ga amplifikasjonskurver med tidlig platåfase, og smeltepunktcurver med lenger skulder og flere topper, noe som kan tyde på hemming eller over-belastning av PCR reaksjonen. Lavere RNA-input og cDNA

1:100 resulterte i amplifikasjonskurver uten platåfase og smeltepunktkurver med flere topper (figur 17A og B, tabell 14).

PCR-analysen for TATA bindende protein (TBP) ga suboptimale amplifikasjonskurver og uspesifikke smeltepunktstopper under alle undersøkte forhold. Den eksponentielle veksten nådde ikke platåfase med 100-fold fortynnet cDNA, mens ingen eksponentiell vekst ble observert med ufortynnet cDNA. Smeltepunktskurvene viste flere smeltepunktstopper og lange skuldre for alle prøveforhold (figur 17C og D, tabell 14).

Basert på disse resultatene ble TPB ekskludert som referansegene. RNA-mengder på 400 ng og cDNA fortynnet 1:10 ble vurdert som optimale for andre referansegener i PCR-analysene og derfor benyttet som standard forhold i denne studien. Dette stemmer godt med anbefalingene i brukeranvisningen for QuantiNova Reverse Transkriptase kit (Qiagen).



Figur 17: Smeltepunktskurver for POLR2A og TBP under ulike prøveforhold

A: amplifikasjons- og B: smeltepunktkurver for referansegene POLR2A med ulike RNA-mengder og cDNA-fortynninger. Grafene er representative for referansegenene POLR2A, UPB og GAPDH. C, D: amplifikasjonskurver og smeltepunktkurver for referansegene TBP med ulike RNA-input og cDNA-fortynninger.

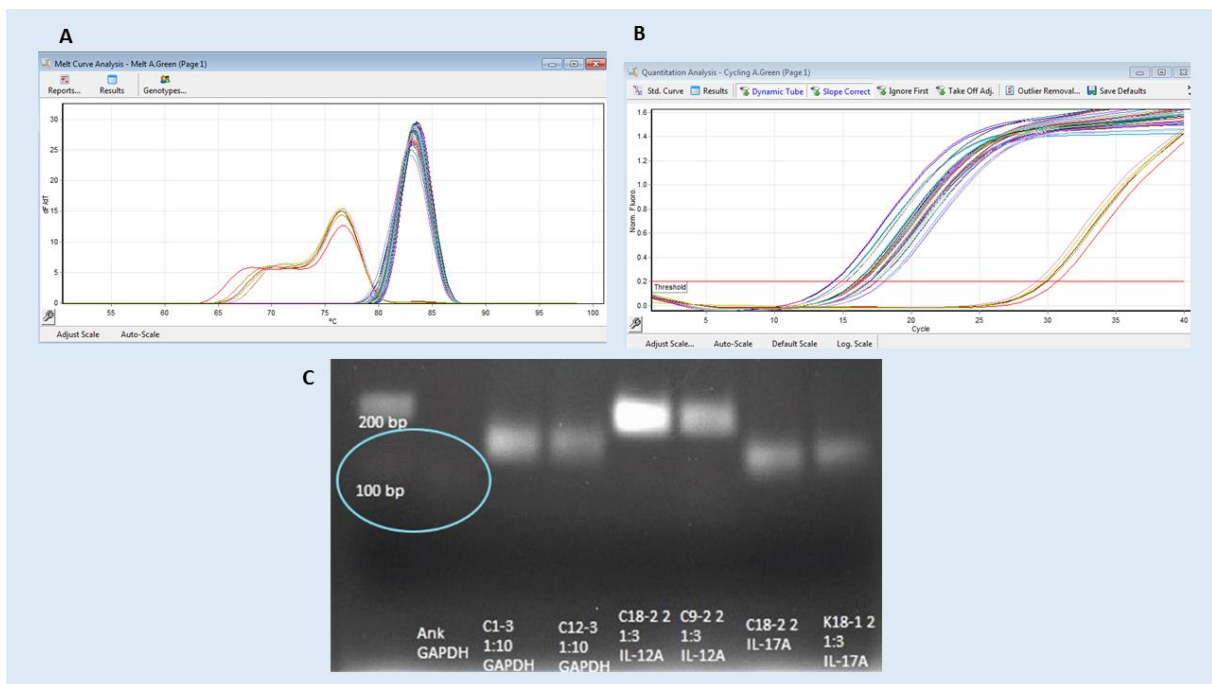
5.1.2. Intern kontroll PCR (IC)

PCR med bruk av QuantiTect primere for IC viste ingen forskjeller mellom kontrollprøve og pasientprøve lik eller mer enn $2\Delta Ct$ i noen av de 50 prøvene. Det ble derfor ikke funnet noe signifikant hemming hos noen av prøvene i hverken tumor eller marginalsone.

5.1.3. PCR-spesifisitet

PCR-spesifisitet for POLR2A, GAPDH og UBC ble vurdert med smeltepunktanalyser for alle 50 prøver (tumorprøver fra 25 pasienter og fra tilsvarende marginalsoner) i duplikat. I tillegg ble det analysert fire negative prosess-kontroller og flere negative analysekontroller.

Resultatene fra smeltepunktanalyser for POLR2A og UBC viste enkle smeltetopper uten amplifisering i de negative kontrollene. PCR-analysen for GAPDH ga imidlertid uspesifikk amplifisering i både negative analysekontroller og negative prosesskontroller (figur 18A og B). Det ble derfor utført en gel elektroforese for å undersøke båndstørrelse av PCR-produktet i negativ kontroll for GAPDH. Resultatet viste tilstedeværelse av et svakt bånd av omtrent 100 bp størrelse (figur 18C). Dette kan tyde på uspesifikt PCR produkt eller primer dimer egenskaper hos primerparet.



Figur 18: Uspesifikk amplifisering av GAPDH i negative kontroller A: Summert smeltepunktsploTT over GAPDH PCR for alle prøvene som viser uspesifikk amplifisering i lavere smeltepunktsoner (ca 77°C) for tre negative kontroller (grønne og røde kurver). B: Amplifiseringssplott av GAPDH for alle prøver og tre negative kontroller (grønne og røde kurver). C: Gel elektroforese bilde av primerpar til målgener og PCR produktet til GAPDH og uspesifikk amplifisering i negativ kontroll (ank) til GAPDH (markert med blå ring)

Tabell 14. Vurdering av PCR-analyser for referansegener

Referansegen	Sigmoid kurve og platåfase i RT-PCR	Smeltee kurve kun én topp	Ingen skulder smeltekurve	Negative kontroller	Agarose gel-elektroforese
POLR2A	Ok	Ok*	Ok	Ok	Ikke utført
UBC	Ok	Ok	Ok**	Ok	Ikke utført
GAPDH	Ok	Ok	Ok**	Uspesifikk reaksjon	Uspesifikt bånd i neg ktr
TBP	Nei	Nei	Lang skulder	Ok	Ikke utført

*cDNA fortykning 1:100 ga to sammenhengende topper. **cDNA fortykning 1:100 ga en len skulder.

Tabell viser forenklet sammenfatning av resultatene av RT-PCR-analysene for de fire undersøkte referansegenene. Kvalitetsmål er angitt i øverste kolonne.

5.1.4. Referanse-genes stabilitet

For å evaluere hvilke referansegener som var stabilt uttrykt under de aktuelle forholdene og som derfor kan brukes til å normalisere genuttrykk med Δ Ct-metoden, ble PCR-resultater fra alle prøver for referansegenene POLR2A, UPC og GAPDH vurdert med programvarene Normfinder og Bestkeeper.

POLR2A hadde den laveste stabilitetsverdien beregnet med Normfinder og utgjorde det mest stabilt uttrykte referansegenet (tabell 15). Intergruppe variasjonen viste motsatt trend for POLR2A og GAPDH, og programmet viste at en kombinasjon av POLR2A og GAPDH ville vært det beste valget. Kombinasjonen av disse ga en lavere samlet stabilitetsverdi enn POLR2A alene (tabell 15).

Resultatene fra BestKeeper viste også lavest standardavvik og lavest CV% for POLR2A. GAPDH og UBC viste noe høyere standardavvik enn POLR2A, men fortsatt akseptabelt lave verdier (tabell 15). GAPDH hadde lavere geometrisk gjennomsnitt basert på Ct-verdier i forhold til POLR2A og UBC (tabell 15).

Tabell 15. Stabilitetsvurdering av referansegener beregnet med Normfinder og Bestkeeper. Referansegenene er sortert etter synkende stabilitet.

Referansegen	Normfinder		Bestkeeper	
	Stabilitetsverdi	Intragruppe-variasjon	Intergruppe-variasjon	Variasjonskoeffisient CV%
POLR2A	0,150	0,331 (T) 0,125 (M)	-0,059 (T) 0,059 (M)	3,16
UBC	0,188	0,536 (T) 0,441 (M)	-0,066 (T) 0,066 (M)	5,21
GAPDH	0,185	0,145 (T) 0,246 (M)	0,125 (T) -0,125 (M)	5,37

T: tumor. M: Marginalsoner. Genet med lavest stabilitetsverdi fra Normfinder og lavest variasjonskoeffisient fra Bestkeeper angir det mest stabilt uttrykte referansegenet.

Etter en totalvurdering av resultatene ble referansegenene POLR2A og UBC valgt som referansegener i denne studien. GAPDH kom bedre ut enn UBC i stabilitetsanalysene, men grunnet uspesifikk amplifisering i alle negative kontroller ble dette referansegenet ekskludert (figur 18). Gjennomsnittet av Ct-verdiene for de to referansegenene POLR2A og UBC ble benyttet til normalisering av hver prøve i prosjektet.

5.2. Vurdering av PCR-analyser for målgener

5.2.1. Amplifikasjon- og smeltepunktkurver og PCR-spesifisitet

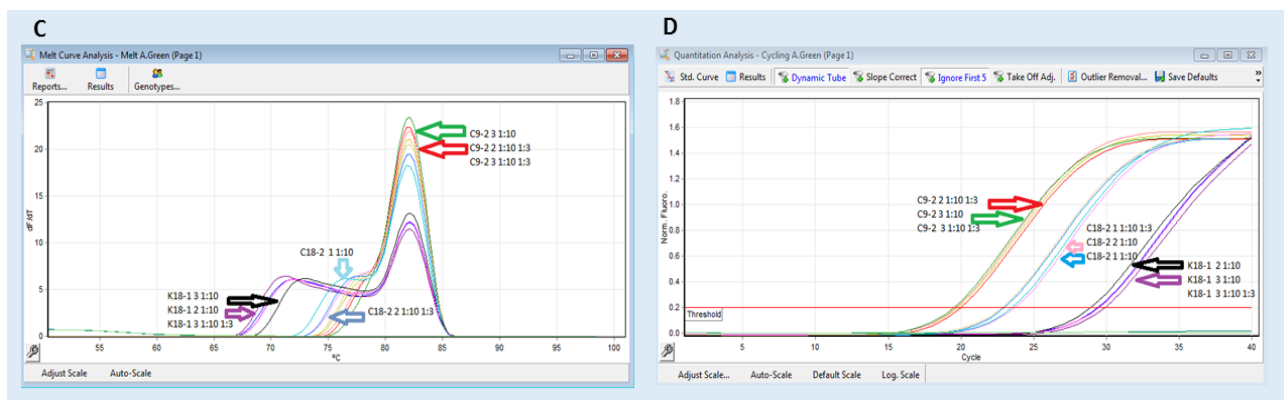
PCR for målgenene IL6, TNF- α og TGF- β ga sigmoide amplifikasjonskurver som oppnådde platåfase og optimale smeltepunktskurver med én enkelt topp. Gel elektroforese av PCR-produkter fra IL-6 viste sterke singulære bånd i forventet område, noe som stemte overens med optimale smeltepunktskurver og lave Ct-verdier (tabell 16, bilde 1).

PCR for IL-12 fikk en uønsket uspesifikk amplifikasjon i analyse negativ kontroll med smeltepunkt i annet T_m -område enn forventet for primerne. Nytt kommersielt primersett ble derfor bestilt for IL-12. Dette ga imidlertid også uspesifikk amplifisering i en av de negative kontrollene, i tillegg til mer uttalt skulder i smeltepunktsanalysen. Det ble derfor besluttet å gå tilbake til egendesignede primersett for dette cytokinet. De egendesignede primerne viste seg ved nytt PCR-oppsett å gi fine amplifiseringskurver og optimale enkle smeltepunktstopper for alle prøvene. Det var heller ingen amplifisering i noen av de negative kontrollene.

PCR for målgenene IFN- γ , IL-10, IL-17 og IL-23 viste amplifikasjonskurver som ikke nådde platåfasen, i tillegg smeltepunktkurver med flere topper og lange skuldre (tabell 16). Gel elektroforese av PCR-produkter fra IL-10 viste et uspesifikt bånd under 100 bp som kan tyde på primer/dimer eller overskudd av primere (figur 20). Nye kommersielle primersett ble bestilt for IFN- γ , IL-10, IL-17 og IL-23 (Quantitect, Qiagen) og kontrollert på samme måte. Resultatene viste forbedrede smeltepunktskurver og kvantifiseringsplot med platåfase for alle disse cytokinene (tabell 17). Disse primersettene ble derfor benyttet til analyse av pasientprøvene.

Kartlegging av ulike cDNA-volum for å undersøke unøyaktigheter ved pipettering av små volumer viste ingen forskjeller mellom små volum (manuell pipettering med 2 μ l av 10X fortynnet cDNA) og større volum til automatisert pipettering (6 μ l av 30X fortynnet cDNA) (tabell 16).

Tabell 16 og 17 viser resultatene oppsummert for alle primere for målgener testet i dette arbeidet.



Figur 19: Amplifiserings- og smeltepunktkurver for IL-6.

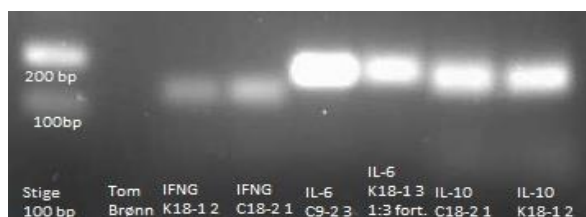
C: IL-6 smeltepunkts kurver og D: amplifiseringsplott i prøvene benyttet til validering av primere (både 10x og 30x fortynnet (1:10 1:3) cDNA). Cycle terskelverdi (Ct) varierer og gjenspeiler ulike styrker og uttrykk i prøvene, Smeltepunktskurvene varierer med lang skulder med antydning til lav topp ved høyere Ct.

Figur 19C og D viser at prøver med lavere terskelverdi (Ct) ga finere smeltepunktskurver med optimale enkle toppler i forventet smelteområde (rød, gul og grønn kurve). En lav Ct verdi indikerer et sterkere uttrykk av målgenet. Prøver med noe høyere Ct ga smeltepunktskurver med mer skulder (de blå kurvene). Det var antydning til en liten lav topp i skulder hos prøver med svakest uttrykk og dermed høyest Ct verdier (svart og lilla kurver). Disse variasjonene representerer mest sannsynlig naturlige variasjoner i uttrykk av cytokinet hos de ulike prøvene benyttet til validering og vurderes som akseptabel variasjon ved vurderingen av primerne.

Tabell 16: Vurdering av PCR-analyser med egendesignede primere

Målgen	Platåfase oppnås i PCR	Enkelt smelte-topp	Ingen skulder i smeltekurve	Variasjon ved ulike cDNA-volum	Variasjon ved ulike mengder RNA	Negative kontroller	Agarosegel-elektroforese	Godkjent
IL-6	Ok	Varierer*	Ok	Nei	Ja - ok	Ok	Ok	Ja
TNF α	Ok	Ok	Liten skulder	Nei	Ja	Ok	Ok	Ja
TGF β	Ok	Ok	Ok	Nei	Lite	Ok	Ok	Ja
IL-12	Ok	Varierer*	Ok	Nei	Ja	Ikke ok**	Ok	Inkonklusiv
IL-10	Nei	Flere toppler	Ok	Nei	Nei	Ok	Uspesifikt produkt	Nei
IL-17	Nei	Varierer	Lang skulder	Nei	Lite	Ok	Ok	Nei
IL23	Nei	Varierer	Lang skulder	Nei	Ja	Ok	Ok	Nei
IFN γ	Nei	Ok	Lang skulder	Nei	Lite	Ok	Noe svake bånd	Nei

* IL-6 og IL-12 viser optimale enkle toppler, men sammenhengende lav topp sammen med optimal ved høye Ct verdier. **En av to negative kontroller ga amplifisering med uspesifikt smeltepunkt i annet temperaturområde enn forventet smeltepunkt for primerparet.



Figur 20: Gel for sjekk av PCR produkt til IFN- γ , IL-6 og IL-10

Annenhver prøve på gelbildet representerer god og dårlig smeltepunktsskurve for hver cytokin. Stigen vises til venstre med markører fra 100bp-200bp. Produktene viser spesifikke bånd i estimert forventet område for primerparene. For IFN- γ er det forventet på 118 bp, IL-6 forventet produkt i område 166 bp og IL-10 i område 148 bp. IL-10 viser en antydning til et bredt uspesifikt bånd under 100 bp hos begge prøvene.

Tabell 17: Vurdering av PCR-analyser med kommersielle QuantiTect primere

Mål-gen	Platåfase oppnås i PCR	Enkelt smeltetopp	Ingen skulder i smeltekurve	Negative kontroller	Godkjent
IL-12	Ok	Varierer **	Lange skuldre	Ikke ok***	Nei
IL-10	Ok	Ok	Liten skulder*	Ok	Ja
IL-17	Ok	Ok	Liten skulder*	Ok	Ja
IL23	Ok	Ok	Ok	Ok	Ja
IFN γ	Ok	Ok	Ok	Ok	Ja
IL-6	Ok	Ok	Ok	Ok	Ja

egendesign

* Liten skulder i IL-10 og IL-17 gjenspeiler høy Ct-verdi.

** Større grad av doble sammenhengende topper

***En av to negative kontroller ga uspesifikk amplifisering

5.2.2. PCR-effektivitet

Ved bruk av Δ Ct-metoden for relativ kvantifisering av genuttrykk bør referansegener og målgener ha tilnærmet samme PCR-effektivitet. Dersom dette ikke er tilfelle, må det gjøres justeringer for PCR-effektivitet før Δ Ct-beregninger.

Beregning av PCR-effektivitet ble utført med LinReg v20 på alle 50 pasientprøver i studien.

Resultatene viste akseptable PCR-effektivitetsverdier mellom 1,865 og 2,010 for begge primerpar for de utvalgte referansegene og for syv av åtte av primerparene for målgene (tabell 18). En E-verdi på 2 viser til 100% effektivitet.

Resultater fra PCR-analysen for IL-10 hadde generelt lave Ct verdier med sen eller ingen platåfase og ikke optimale smeltepunktsskurver (se vedlegg 6). Dette medførte til at LinReg ikke fant platåfase på tilstrekkelig antall prøver for å kunne utregne en gjennomsnittlig effektivitet for denne PCR-analysen. IL-10-analysen ble derfor ekskludert.

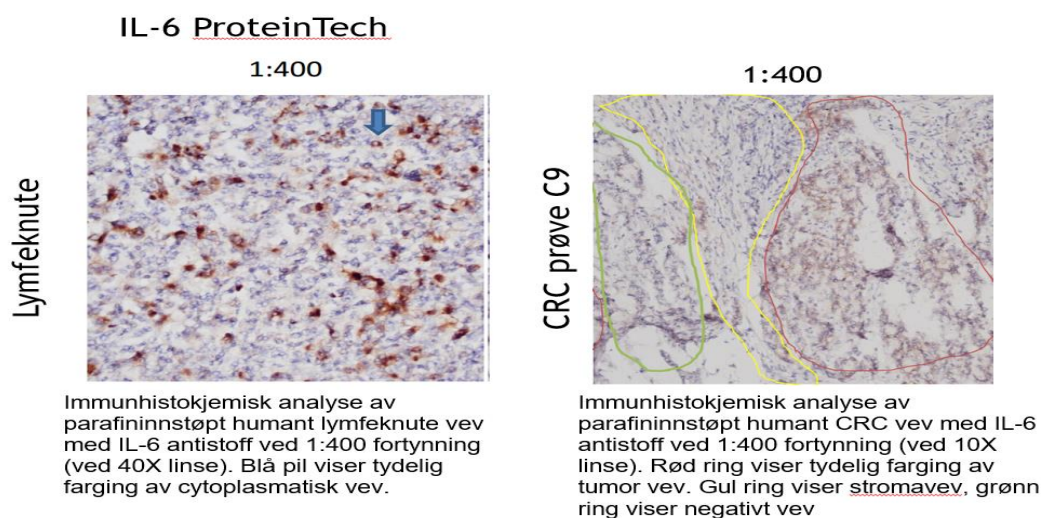
Tabell 18: Gjennomsnittlig PCR effektivitet (E) for godkjente PCR-analyser, beregnet med LinReg

	Kit/produsent	PCR-effektivitet	SD
IFN γ	Quantitect	2,010	0,029
IL-6	Egedesign	1,901	0,024
IL-23	QuantiTect	1,910	0,024
TGF β	Egedesign	1,919	0,024
IL-12	Egedesign	1,918	0,024
TNF α	Egedesign	2,0005	0,028
IL-10	QuantiTect	*platåfase ikke nådd	
IL-17	QuantiTect	1,865	0,024
POLR2A	Egedesign	1,907	0,026
UBC	Egedesign	1,846	0,023

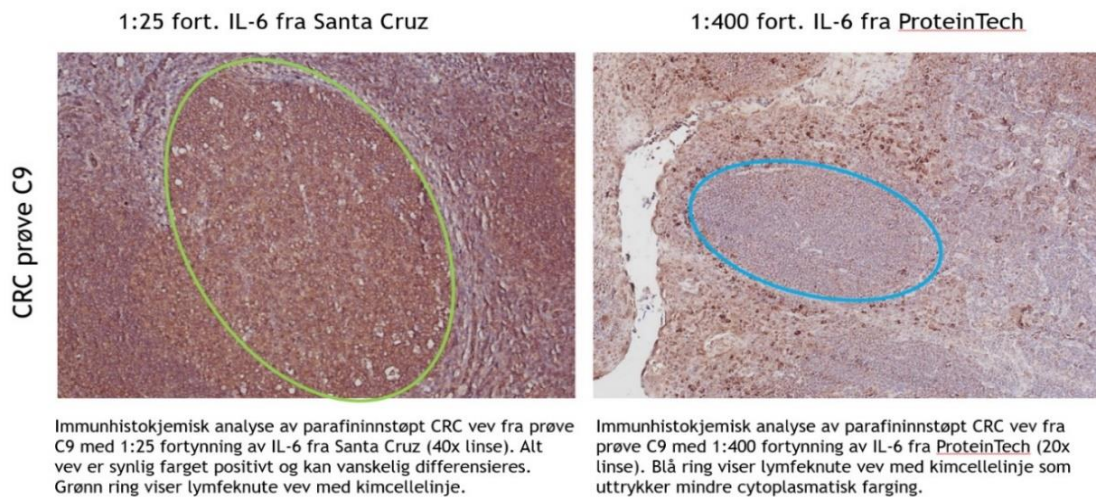
*IL-10 hadde generelt høye Ct verdier med sen eller ingen platåfase og ikke optimale smeltepunkts-kurver. Dette medførte til at LinReg ikke fant platåfase på tilstrekkelig antall prøver for å kunne utregne en gjennomsnittlig E for denne PCR-analysen.

5.3. Kontroll av antistoff til IHC.

IL-6 antistoff fra 2 produsenter ble vurdert i ulike vev i ulike fortynninger (pkt 3.4.2) for å finne optimal antistoffkonsentrasjon og hvor mye bakgrunnsfarge det var i vevet. Det var også viktig å evaluere om antistoffet tydelig ble uttrykt i forventet lokalisasjon innenfor cellene, cytoplasmatisk for IL-6 og både cytoplasmatisk eller nukleært for STAT-3.



Figur 21: Resultat av optimalisering av IL-6 antistoff fra ProteinTech ved 1:400 fortynning.

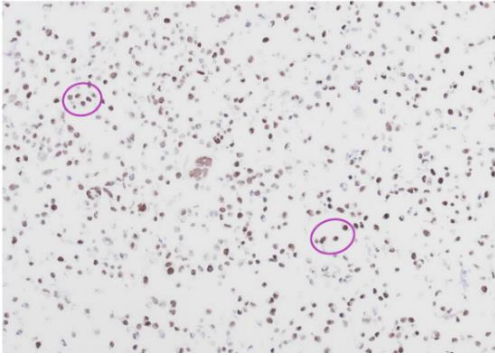


Figur 22: Sammenlikning av immunfluorescens for IL-6 Santa Cruz og IL-6 ProteinTech

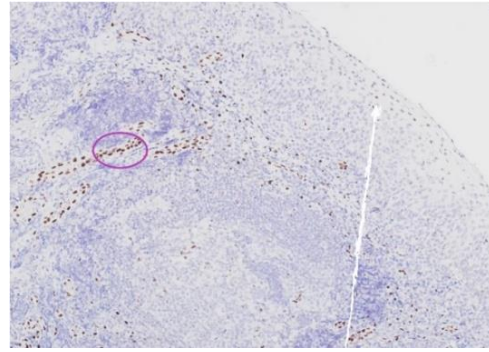
Optimalt resultat ble oppnådd ved 1:400 fortyningning av IL-6 antistoffet fra ProteinTech. Uttestinger i både tonsillevev, lymfeknute og CRC prøve- C9, med forventet sterk positiv immunfluorescens, viste at antistoffet fungerte optimalt med tydelig cytoplasmatisk farging og differensiert skille mellom ulike celletyper i vevet (figur 21). For å kontrollere at sekundærantistoffet HRP ikke ga bakgrunnsfarging ble dette også kontrollert med vevssnitt inkubert uten primærantistoff. Resultatet viste seg som forventet negativ bakgrunn med kun sekundærantistoff. Det viste seg at antistoffet fra SantaCruz ikke virket da det uspesifikt farget alt vev med alle konsentrasjoner. Figur 22 viser generell sterk farging av alt vev og celler med antistoff fra Santa Cruz med lite forskjeller ved kimsellelinjen i lymfeknute (grønn ring). Kimsenteret i lymfeknute (blå ring) viste mye mindre farging med IL-6 antistoff fra ProteinTech. Celler utenfor kimsenteret viste tydelig farging av enkeltceller.

pSTAT3 antistoff ble testet ut påsnitt med HeLa celler stimulert med TNF α (positiv kontroll) eller ustimulerte celler (negativ kontroll). Figur 23 viser resultat av denne kontrollfarging.

A:



B:



Figur 23: Kontroll av pSTAT3 med positive HeLa celler og lymfeknutesnitt

A: Immunohistokjemisk analyse av HeLa positive celler pSTAT3 20X kontroll snitt. Lilla ring=farging av kjerne. Bilde B: Immunohistokjemisk analyse av lymfeknute 10X farget med pSTAT3. Lilla ring= kjernefarging i endotelceller.

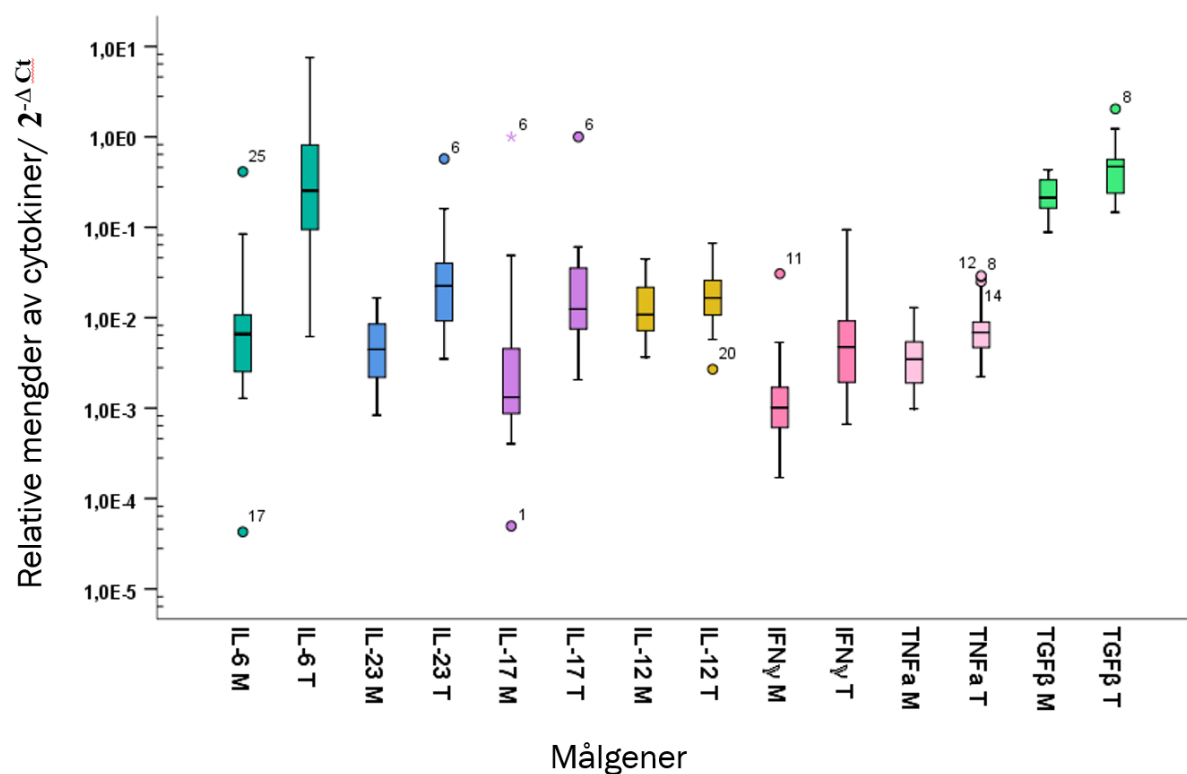
Etter vurdering i lysmikroskop av to patologer ble hver prøve gruppert etter negativ, svak og sterk positivt IL-6 uttrykk og vurdert etter hvor i vevet uttrykket var lokalisert.

Farging med pSTAT3 antistoff viste tydelig nukleær farging og lite bakgrunn i alle positive snitt. Kun fire av prøvene var positive; to viste sterk farging og to prøver var svakt positiv. Det viste seg at de positive prøvene var fra små tangbiopsier fra kolonskopi, mens alle de negative var reseksjonssnitt. Fosforylering er en ustabil og temporær interaksjon. Det mistenktes at måten reseksjonsbiopsiene fikses ikke tok vare på fosforylering av STAT3, og at det må utføres en ny farging på tangbiopsier for å se på pSTAT3 i disse prøvene (se diskusjon pkt 6.5.2).

5.4. Uttrykk av cytokiner

5.4.1. Uttrykk av cytokiner i margin og tumor

Det er godt etablert at kolorektale tumorer uttrykker cytokiner. Hvilke cytokiner som er studert varierer derimot fra studium til studium og er ofte begrenset til en type problemstilling eller en type immunrespons. Det ble valgt å se på uttrykket av et utvalg cytokiner som representerer forskjellige typer immunrespons for å få et innblikk i hvordan immunresponsen varierer i kolorektale tumorer fra norske pasienter. I tillegg er det kun vanlig å rapportere relativ forskjell mellom tumor og margin ($\Delta\Delta Ct$) når man ser på uttrykk med RT-qPCR, men det er lite beskrevet hvordan uttrykket er i frisk margin. En vurdering av hvordan cytokiner er uttrykt i frisk margin kan gi ny viktig innsikt når man skal sammenligne med uttrykket i tumor. Det ble derfor beregnet ΔCt -verdier for alle cytokinene fra marginprøver og tumorprøver hver for seg. Verdiene ble så omgjort til $2^{-\Delta Ct}$ og resultatene ble illustrert med box-plot for å vise det relative genuttrykket i begge posisjoner (figur 24).



Figur 24: Relativt uttrykk av cytokiner gruppert for margin og tumorsoner.

Boxplot med median og interkvartil range som viser uttrykk av cytokiner i frisk marginalsoner (M) og tumor (T) (n=25). Genuttrykket er normalisert mot referansegenene POLR2A og UBC. Nedre kvartil viser 25% percentil, mens øvre kvartil viser 75% kvartil område. Mulige statistiske utliggere er markert med hvilken prøve ID og ° i området 1,5 x range, mens utliggere utenfor 3x range er markert med *.

Marginbiopsiene viser høyt uttrykk av TGF-β (figur 24) sammenlignet med de andre cytokinene, noe som er forenelig med at margin ikke skal være preget av inflammasjon at TGF-β er et immunregulerende cytokin. INFγ er minst uttrykt i margin, og til sammenligning er IL-12, IL-6 og IL-23 betydelig mer uttrykt. Det er vanskelig å s noe mer om den biologiske betydningen av dette uten å vite hvilke celler som er ansvarlig for uttrykket.

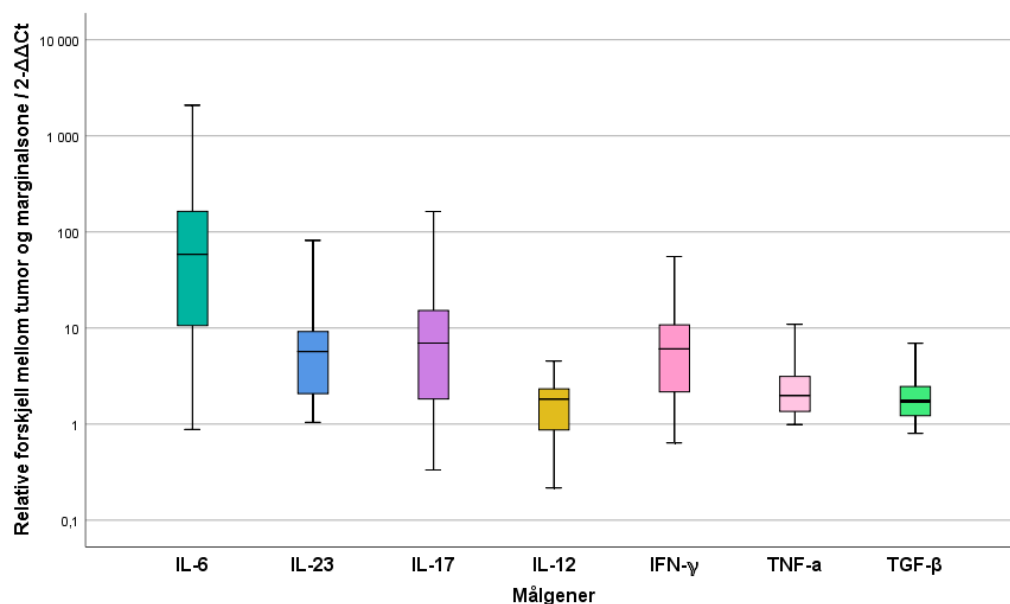
5.4.1.1. TGF-β er høyt uttrykt i margin

Figur 24 viser at det er en høy grad av anti-inflammatorisk TGF-β i frisk margin. Tabell 10 viser at TGF-β har en like høy median i margin som IL-6 i tumor ($2,5 \times 10^{-1}$), men en liten oppregulering i tumor ($5,1 \times 10^{-1}$). TGF-β har pluripotente roller og kan ha forskjellig funksjon i de to lokalisasjonene.

Wilcoxon signed-rank test viser også en signifikant forskjell ($p < 0,005$) mellom uttrykk av TGF-β i marginalsoner og det nest høyest uttrykte cytokinet i marginalsoner (IL-12). Det vises et 16,7X sterkere uttrykk i marginalsoner for TGF-β enn uttrykket for IL-12.

5.4.1.2. Samtlige cytokiner er oppregulert i tumor

Figur 24 viser at alle cytokiner har høyere uttrykk i tumor enn marginalsone, men i ulik grad. For å se nærmere på dette har det blitt sammenlignet uttrykket mellom tumor og margin med $\Delta\Delta C_t$ metoden og regnet om til fold endring ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Figur 25).



Figur 25: Uttrykk av cytokiner i tumor relativt til marginalsone.

Samlet boxplot med median og interkvartil område over fold endring for forskjell mellom tumor og marginalsone ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Nedre kvartil viser 25% percentil, mens øvre kvartil viser 75% kvartil område. Genuttrykket i marginalsone og tumor er normalisert mot referansegenene POLR2A og UBC.

IL-6 er kraftig uttrykt i tumor med en median som er 38 ganger høyere enn for marginalsonen. IFN- γ og IL-23 er tilnærmet 5 ganger høyere uttrykt i tumor, mens det er tilnærmet 9 ganger mer IL-17 mRNA i tumor enn det er i marginalsonen (figur 24 og tabell 19). Av cytokinene som viser moderat høyere uttrykk i tumor er IL-12 1.5 ganger høyere uttrykt, mens TNF α og TGF β er 2 ganger mer uttrykt (figur 24 og tabell 19). TGF β er også høyt uttrykt i marginalsonen, så selv om forskjell i uttrykk mellom margin og tumor er beskjeden er det trolig betydelige mengder TGF β mRNA i tumorprøvene. Figur 25 viser at forskjellen mellom tumor og marginalsone har en stor spredning hos både IL-6, IL-23, IL-17 og IFN- γ , og at de fleste prøvene har en oppregulering av genuttrykk i tumor i forhold til marginalsone ($2^{-\Delta\Delta C_t} > 1$). For IL-17 og IFN- γ vises det også for enkelte prøver av nedregulering av genuttrykk i tumor i forhold til marginalsone ($2^{-\Delta\Delta C_t} < 1$). IL-12 har en større spredning i området som viser nedregulering i tumor $2^{-\Delta\Delta C_t} < 1$, og antakelig flere prøver som viser dette forholdet. TNF- α og TGF- β har mye mindre spredning av genuttrykkene.

Tabell 19: Median, range og statistiske forskjeller mellom $2^{-\Delta Ct}$ for marginal og tumorsone for n =25.

Målgen	Median $2^{-\Delta Ct}$	Forskjell median marg- tumor			Range	Sig p-verdi (2 tailed)
IL-6 Marg	0,0066	37,9 X > T			0,412	p < 0,0005
IL-6 Tumor	0,25				7,529	
IL-23 Marg	0,0045	4,9 X > T			0,016	p < 0,0005
IL-23 Tumor	0,022				0,568	
IL-17 Marg	0,0013	9,2 X > T			0,049 *	p < 0,0005
IL-17 Tumor	0,012				0,060 *	
IL-12 Marg	0,011	1,5 X > T	Gjennomsnitt Marg 0,015	Standardfeil 0,0032	0,041	0,065**
IL-12 Tumor	0,016		Tumor 0,022			
IFNγ Marg	0,001	4,7 X > T			0,031	p < 0,0005
IFNγ Tumor	0,0047				0,093	
TNFα Marg	0,0035	2,0 X > T			0,012	p < 0,0005
TNFα Tumor	0,0069				0,027	
TGFβ Marg	0,25	2,0 X > T			0,344	p < 0,0005
TGFβ Tumor	0,51				1,893	

Tabell over forskjeller mellom de uparametriske $2^{-\Delta Ct}$ (parametriske data for IL-12) relative mengder av cytokiner i margin og tumorsone for alle målgener. ΔCt representerer normaliserte Ct verdier for hvert målgen mot referansegener POLR2A og UBC Alle cytokiner bortsett fra IL-12 hadde statistisk signifikant forskjell mellom margin og tumor sone ($p < 0,0005$), vurdert ved bruk av Wilcoxon signed ranks test. ** = vurdert med parret t-test på parametriske data, $p = 0,065$ viser til ikke signifikant forskjell mellom tumor og margin for IL-12. * = range for IL-17 ekskludert prøve C6 (uten uttrykk av målgenet i noen av biopsi posisjonene).

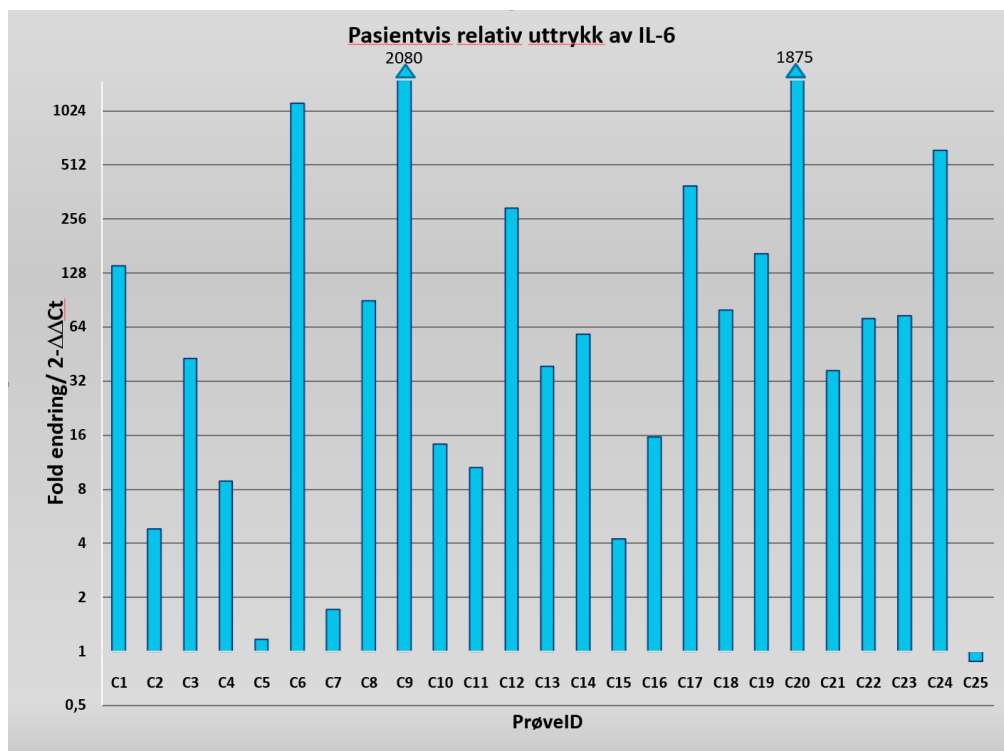
Normalfordeling av $2^{-\Delta Ct}$ verdier ble undersøkt med Shapiro Wilk test. Det forelå ikke normalfordeling av noen av cytokinene ($p < 0,0005$), med unntak av IL-12 som hadde $p = 0,54$. Det forelå også statistiske uteliggere, slik at betingelsene for bruk av parret t-test ikke var oppfylt, bortsett fra for IL-12. Wilcoxon signed-rank test med bruk av medianverdier ble derfor benyttet til statistisk analyse for alle cytokiner, bortsett fra IL-12. Resultatene viste at en statistisk signifikant forskjell i relativ genekspresjon mellom tumor og marginalsone for alle cytokiner, som vist med $p < 0,0005$ (tabell 19).

For IL-12 viste parret t-test $p = 0,065$ (tabell 19), ingen signifikant forskjell mellom det relative uttrykket av IL-12 i tumor og marginalsone for $n = 25$. $2^{-\Delta Ct}$ for IL-12 i tumor er kun $0,0063 \pm 0,003$ høyere enn uttrykket av IL-12 i margin.

5.4.2. Uttrykket av cytokiner varierer fra pasient til pasient.

5.4.2.1. IL-6 er kraftig oppregulert i tumor, men viser samtidig store individuelle forskjeller.

IL-6 er generelt sett kraftig uttrykt i tumorprøvene, men viser stor variasjon i uttrykk mellom pasienter (figur 24 og 25). Figur 25 viser også at IL-6 har den største spredningen i dataene fra nesten likt uttrykk i tumor og marginalsoner ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$) til > 1000 X høyere uttrykk i tumor. For å få et innblikk i hvordan spredningen er fordelt har det blitt sett på IL-6 uttrykket målt som fold endring for hver enkelt pasient (figur 26).



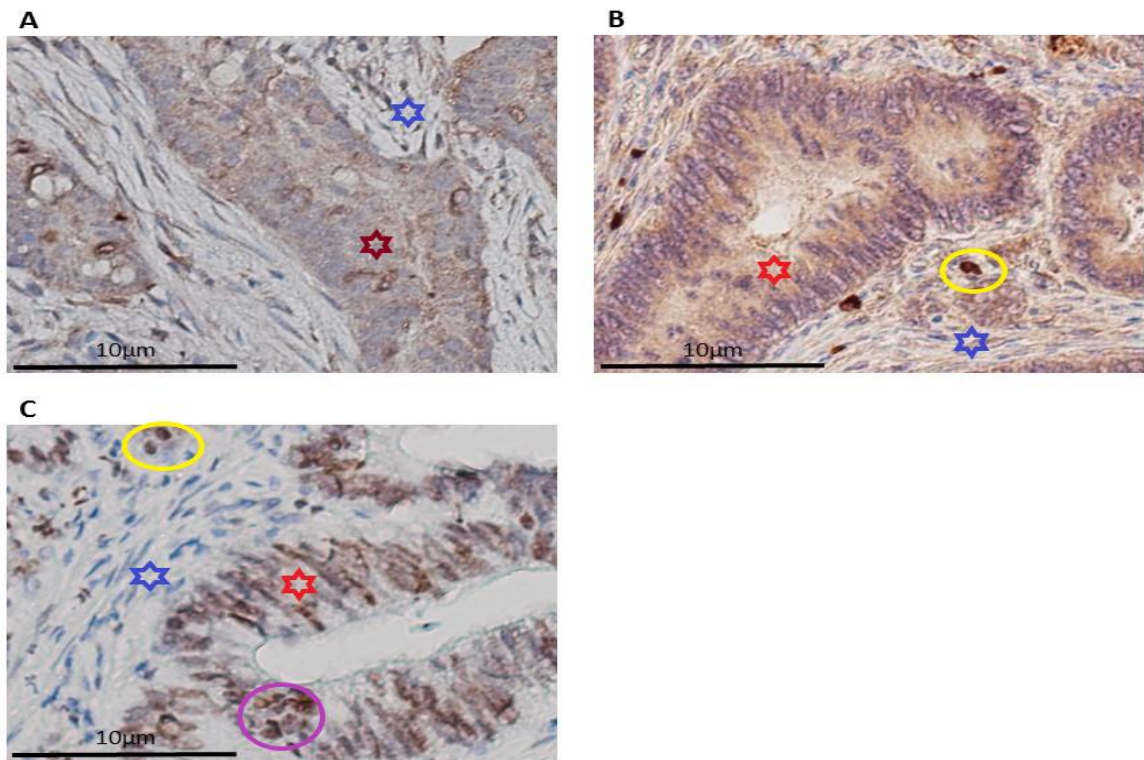
Figur 26: Individuelt uttrykk av IL-6

Stolpediagrammet viser forskjell i uttrykk av IL-6 mellom margin og tumor. Forskjellen er vist som fold endringer ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), hvor verdier over 1 representerer høyere uttrykk i tumor enn i margin og verdier under 1 representerer et høyere uttrykk i margin. Prøvene vises som (ID nr.C- x) på x-aksen. Genuttrykket av IL-6 er normalisert mot referansegenene POLR2A og UBC.

Alle prøver med unntak av en viste høyere IL-6 uttrykk i tumor enn i marginalsonen. Noe som forklarer utliggeren i bokplottet over $2^{-\Delta Ct M}$ (figur 24). Den ene prøven som hadde høyere uttrykk i margin (C25) viste i tillegg en beskjeden forskjell. IL-6 var som oftest mye høyere uttrykt i tumor enn i marginalsonen (figur 26). Tre av prøvene viste over 1000 ganger høyere uttrykk av IL-6 i tumor enn i marginalsonen (C6, C9 og C20), mens bare to prøver hadde under 2 ganger endring (C5 og C7). Prøve C17 hadde ikke noe genuttrykk i marginalsoner og Ct ble satt til øvre syklus =40.

5.4.2.2. Både tumorceller og celler i tumor stroma uttrykker IL-6 og pSTAT3.

Den store variasjonen i IL-6 uttrykk kan antyde at forskjellige celletyper i disse tumorene produserer IL-6. Derfor var det ønskelig å se nærmere på hvilke celletyper som produserer IL-6 med immunhistokjemi.



Bilde 27: Immunhistokjemisk analyse av CRC med IL-6 og pSTAT3 antistoff.

Immunhistokjemisk analyse (IHC) av prøver med svakt og sterkt IL-6 (ProteinTech, 1:400) uttrykk, og phosphoSTAT3 (Tyr 705, 1:400). A: IL-6 C5 20X med lavt IL-6 cytoplasmatisk uttrykk i tumorceller og stroma vev. B: IHC av C24 20X med høyt IL-6 cytoplasmatisk uttrykk i tumorceller og stroma. C: Immunhistokjemisk analyse av C25 20X med høyt pSTAT3 (1:400) uttrykk. Uttrykket er mest fremtredende i kjerne/nukleus hos tumorceller. Alle slides har morfologi farget av henatoxylin. Rød stjerne = tumorvev, blå stjerne = stromavev, gul ring = mulig infiltrerte immunceller i stroma., lilla ring = representativ farging av cellekjerne/nukleus.

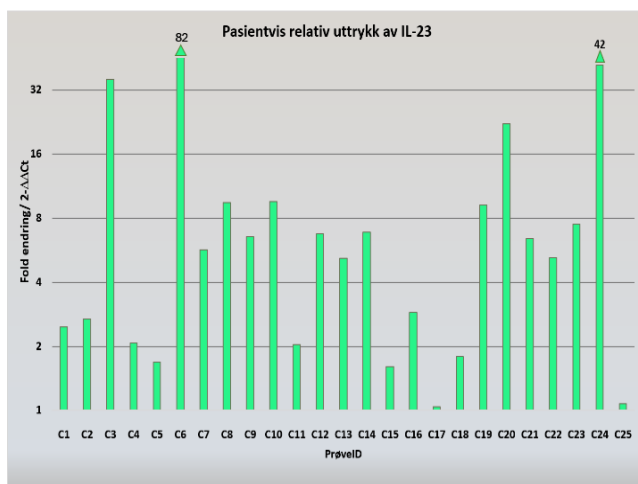
Som representative eksempler ble det valgt en prøve vist å ha lite uttrykk (prøve C5) og en prøve vist å ha mye uttrykk (prøve C24) med RT-qPCR. Figur 27A og B viser snitt farget med IL-6 antistoff for de to prøvene. Tumorceller (rød stjerne) er generelt mindre enn cellene i stroma (blå stjerne), som inneholder mange fibroblaster, og sees vanligvis som øyer av tumorceller omkranset av stroma. Figurene viser at det er hovedsakelig tumorceller som produserer IL-6 hos pasienter med CRC tumor, hvor tumorcellene i prøve C5 har et svakt uttrykk mens tumorcellene i prøve C24 er kraftig farget. Det er også infiltrater av immunceller eller celler i stroma som produserer IL-6, og styrken på uttrykket i stroma og grad av mulige immunceller til stede så ut til å øke i prøver med sterkere uttrykk av IL-6 i tumor (ikke vist). Fosforylering av STAT3 på tyrosin 705 (pSTAT3) er en signaleringshendelse som

skjer nedstrøms for aktivering av blant annet IL-6 reseptor. Det er tidligere vist i en musemodell for colitt-indusert kreft at IL-6 og STAT3 induserer cellevekst hos tumor celler (120). Det var derfor av interesse å se om det kunne påvises pSTAT3 i tumorceller fra vårt prøvemateriale. Som vist i figur 27C ble det observert at pSTAT3 hovedsakelig var aktivert og til stede i kjernen i tumorceller, men enkelte celler i stroma viste også farging.

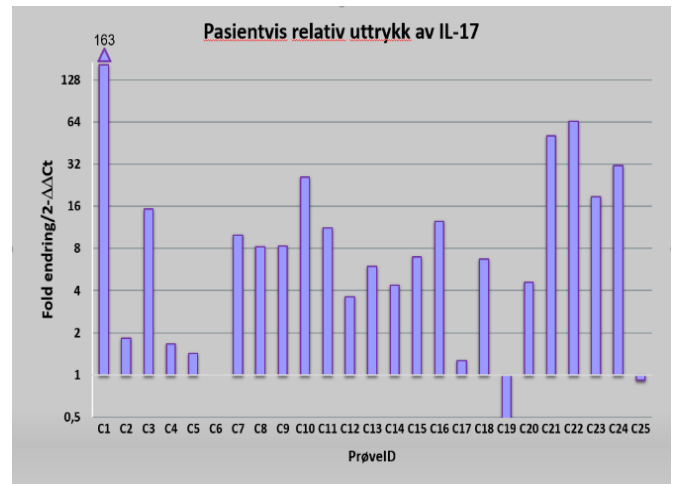
5.4.2.3. Mengde IL-23 og IL-17 varierer fra tumor til tumor.

Figur 24 og 25 viser at i likhet med IL-6 er det stor variasjon i uttrykket av IL-23 og IL-17 fra prøve til prøve. Figur 25 viser også at IL-17 har enkelte prøver som viser nedregulering i tumor kontra marginalsone ($2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$). For å få et større innblikk i dette så ble det sett på det individuelle uttrykket av de to cytokinene (figur 28).

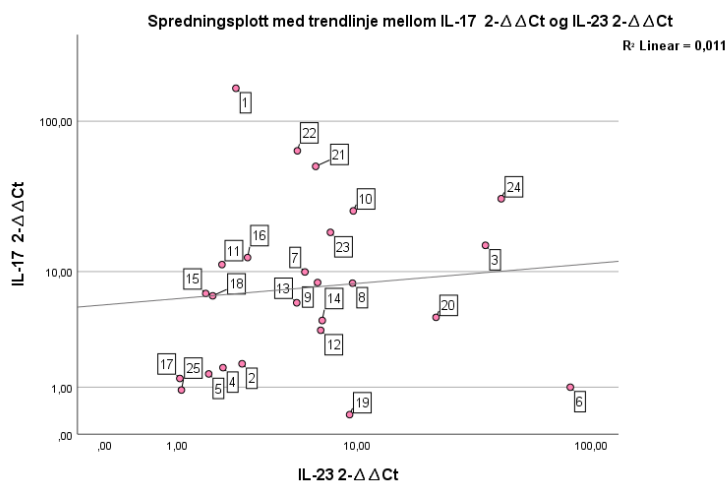
A:



B:



C:



Figur 28: Individuelt uttrykk av IL-23 og IL-17

Stolpediagrammene viser individuelle uttrykk av fold endringer ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) for IL-23 (A) og IL-17 (B). Prøvene vises som (ID nr.C- x) på x-aksen, mens fold endring vises mellom normalisert genuttrykk i tumor og marginalsone på Y-aksen. Figur C: Spredningsplot med IL-23 på x-aksen og IL-17 på y-aksen.. Prøvenummer er oppgitt.

Alle prøver hadde et høyere uttrykk av IL-23 i tumor sammenlignet med marginalsonene, med C6 som den mest ekstreme (figur 28A). Kun fem prøver (C5, C15, C17, C18 og C25) hadde et uttrykk som var mindre enn 2 ganger endring. For prøve C17 og C25 var uttrykket mellom marginalsone og margin tilnærmet likt.

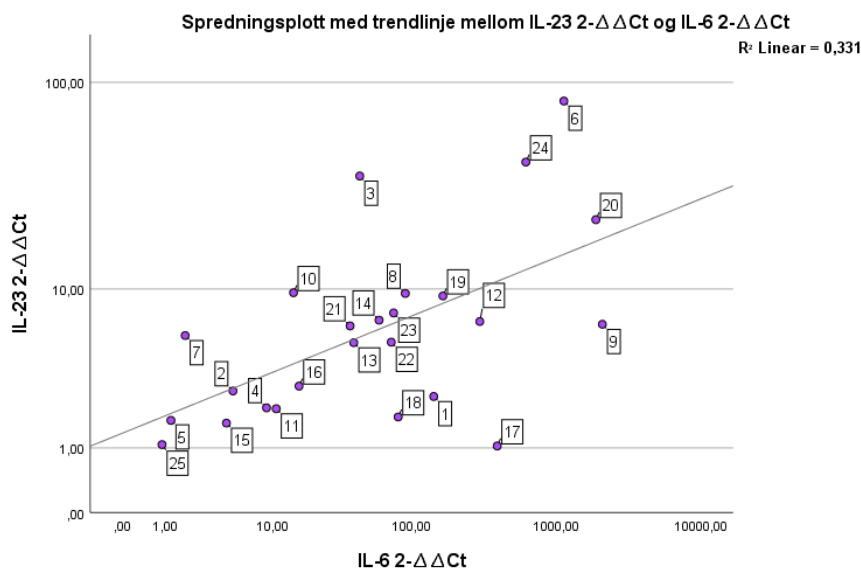
IL-17 var også oppregulert i tumor for alle prøver med unntak av C19 og C25 som viste høyere uttrykk i marginalsonen (figur 28B). Prøve C1 hadde høyest uttrykk med 163X høyere uttrykk i tumor enn marginalsone, men denne prøven manglet signal i PCR og Ct ble satt til øvre syklus =40. Prøve C6 er også vist med ikke noe uttrykk i hverken marginalsone eller tumor.

C6 er ekskludert fra videre vurderinger, da det ikke var noe Ct verdi i hverken marginalsone eller tumor. Prøven ble derfor vurdert som en ikke signifikant utligger (figur 28B).

Det hentydes til svak korrelasjon mellom genuttrykkene av IL-17 og IL-23 (figur 28C). Spearman rho $\rho = 0,23$, men det foreligger ikke monotonisk korrelasjon mellom fold endringer hos variablene, vist ved $p = 0,28$ ($p > 0,05$). Dette viser dermed til ingen signifikant monotonisk eller lineær korrelasjon mellom IL-23 og IL-17.

5.4.2.4. Det vises tydelig ikke lineær korrelasjon mellom IL-6 og IL-23

Flere prøver i figur 26 og 28A ser ut til å følge hverandre. Et spredningsplott avdekker om dette foreligger.



Figur 29: Spredningsplott for IL-23 og IL-6.

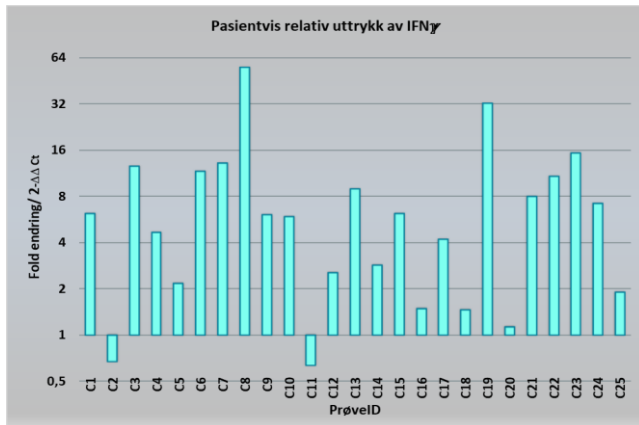
Y-aksen viser logaritmisk skala for $2^{-\Delta\Delta Ct}$ til IL-23, x-aksen viser logaritmisk skala for $2^{-\Delta\Delta Ct}$ til IL-6. Plottet antyder til betydelig lineære forhold mellom genuttrykkene med $r = 0,57$ ($R^2 = 0,331$). Prøvenummer er oppgitt.

Plottet for IL-23 mot IL-6 viser en mulig betydelig korrelasjon mellom variablene med $r = 0,58$ ($R^2 = 0,331$) (figur 29). Det foreligger ikke normalfordeling av genuttrykkene til IL-6 og IL-23 og det foreligger derfor ikke lineær korrelasjon, slik at Pearson R ikke kan benyttes. Spearman $\rho = 0,53$, viser et betydelig korrelasjonsforhold mellom genuttrykkene til IL-23 og IL-6 med en signifikant ikke lineær, men monotonisk assosiasjon ($p < 0,05$) (spredning som følger hverandre, men ikke linearisk), på 99% signifikans nivå.

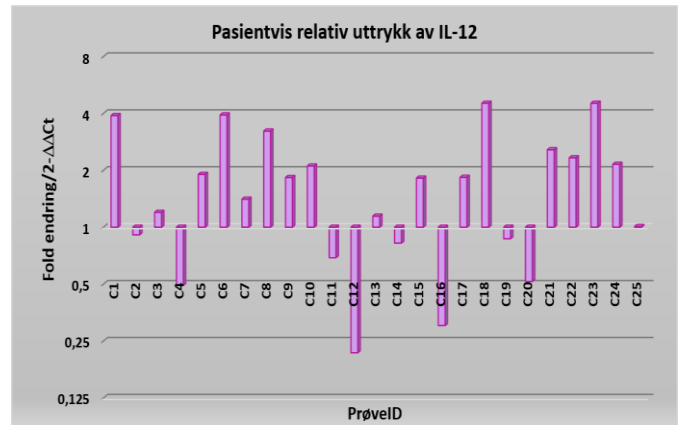
5.4.2.5. Uttrykk av IFN- γ og IL-12 varierer fra tumor til tumor og viser betydelig ikke lineær korrelasjon.

Figur 25 viser stor spredning av IFN- γ , mens et større område av spredningen for IL-12 viser lavere uttrykk i tumor kontra marginalsoner ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ mindre enn 1). For å se hvor mange pasienter dette inkluderer var det ønskelig å se nærmere på det individuelle uttrykket av IL-12 og IFN- γ .

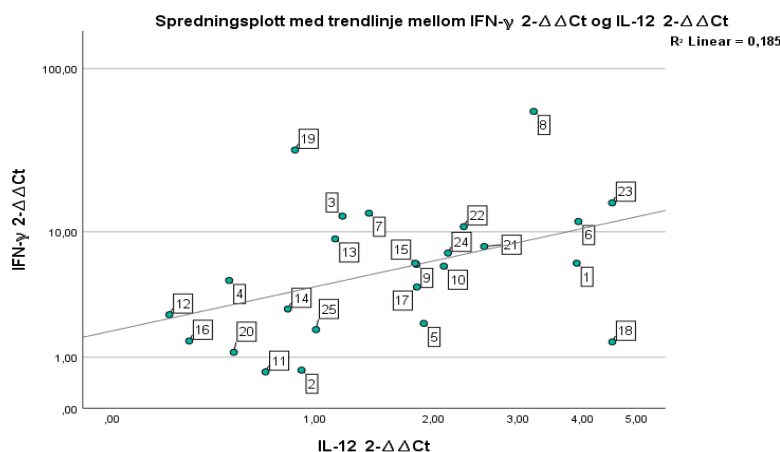
A:



B:



C:



Figur 30: Individuelt uttrykk av IFN- γ og IL-12

Stolpediagrammene viser fold endringer ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) for IFN- γ (A) og IL-12 (B) innenfor samme prøve. Prøvene vises som (ID nr.C- x) på x-aksen, mens fold endring vises mellom normalisert genuttrykk i tumor og marginalsoner på Y-aksen. C: Spredningsplott mellom fold endring for IFN- γ og IL-12 for $n=25$. Prøvenummer er oppgitt.

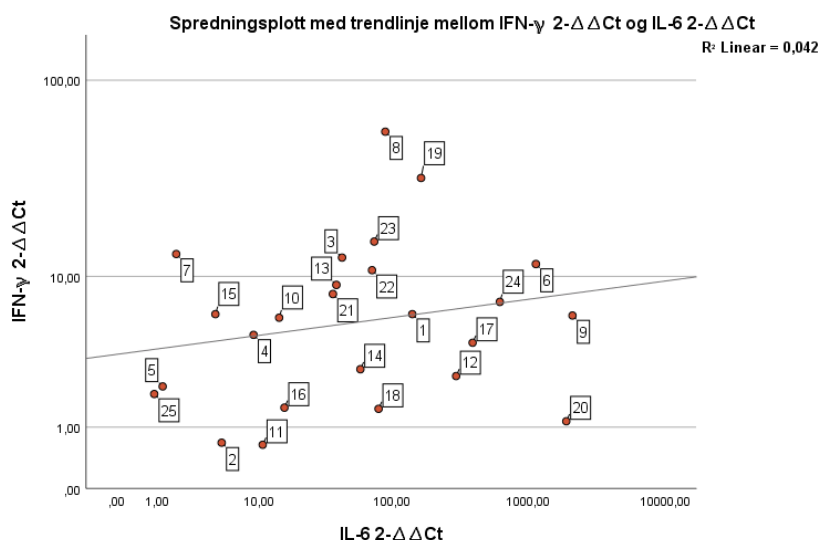
Uttrykket av IFN- γ er høyere i tumor enn i marginalsonen for alle prøvene med unntak av C2 og C11 (figur 30A). Prøve C8, C19 og C23 hadde det høyeste uttrykket med mer enn 16X høyere uttrykk i tumor enn margin (figur 30A). 7 prøver er også oppregulert med $\geq 8X$ høyere uttrykk i tumor enn marginalsone. C20 nærmer seg likt uttrykk i tumor og margin.

Sammenlignet med andre cytokiner var uttrykket av IL-12 beskjedent oppregulert i tumor. For 8 av prøvene var det også mer IL-12 i marginalsonen enn i tumor ($2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$) (figur 30B). De fleste prøvene er ikke signifikant oppregulert i tumor kontra marginalsone, (tabell 19; $p=0,051$). C18 og C23 hadde det høyeste uttrykket med 4,5 i fold endring og 3 prøver viser tilnærmet likt uttrykk i tumor og marginalsone (fold endring =1).

IFN- γ og IL-12 er begge assosiert med en cytotoxisk immunrespons. Det ble brukt spredningsplott for å se på forhold mellom de to cytokinene (figur 30C). Plottet mellom fold endringene til IFN- γ og IL-12 viser $r=0,43$ ($R^2= 0,185$), noe som antyder til moderat lineære forhold mellom dataene, men det foreligger ikke normalfordelte data annet enn hos IL-12. Spearman $\rho = 0,46$, viser betydelig korrelasjons forhold mellom genuttrykkene til IL-12 og IFN- γ med en signifikant ikke lineær monotonisk korrelasjon, $p=0,02$ ($p<0,05$) på 95% signifikans nivå.

5.4.2.6. Ingen korrelasjon mellom uttrykk av IFN- γ og IL-6

A:



Figur 31: Spredningsplott mellom foldendring ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) for IFN- γ mot fold endring for IL-6.

Spredningsplott over foldendring ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) for IFN- γ mot fold endring for IL-6 for $n=25$. Y-aksen viser logaritmisk skala for foldendring til IFN- γ , x-aksen viser logaritmisk skala for fold endring til IL-6.

For å se om IL-6 kan føre til nedgang i cytotoxisk immunrespons representert av IFN- γ , så ble mulig lineær korrelasjon vurdert i et spredningsplott før eventuelt mulig lineær regresjonsanalyse (figur 31).

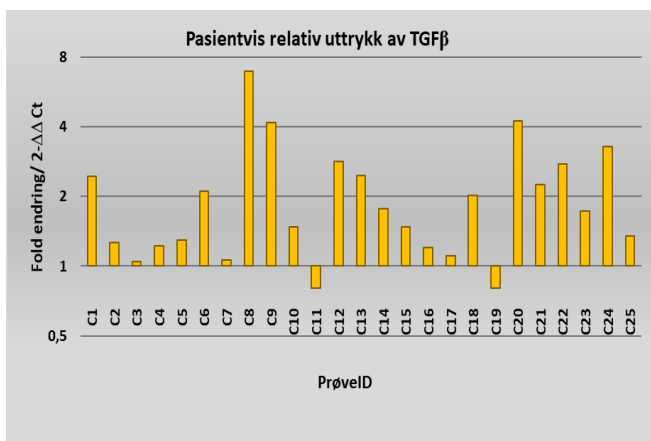
Plottet for IFN- γ mot IL-6 viser en svak korrelasjon mellom variablene med $r=0,20$ (figur 31). Det foreligger ikke normalfordeling av genuttrykkene til IL-6 og IFN γ med $p<0,0005$ og det foreligger derfor ikke lineær korrelasjon, slik at Pearsson R ikke kan benyttes for mulig korrelasjonsvurdering.

Det hentydes til svak korrelasjon mellom genuttrykkene av IL-6 og IFN- γ med Spearman rho $\rho = 0,22$, men det foreligger ikke monotonisk korrelasjon mellom fold endringer hos variablene, vist ved $p = 0,30$ ($p>0,05$). Dette viser dermed til ingen signifikant monotonisk eller lineær korrelasjon mellom IL-6 og IFN- γ .

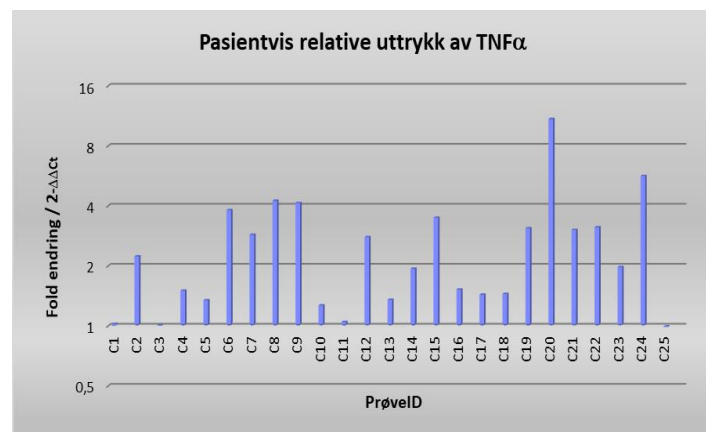
For enkelte prøver som C8 og C19 vises det moderate IL-6 verdier, men høye IFN- γ verdier, mens prøve C20 viser høye verdier av IL-6 og lavere verdier av IFN- γ (figur 31).

5.4.2.7. TGF- β har betydelig monotonisk korrelasjon med uttrykk av IL-6

A:



B:



Figur 32: Individuelt uttrykk av TGF- β og TNF- α

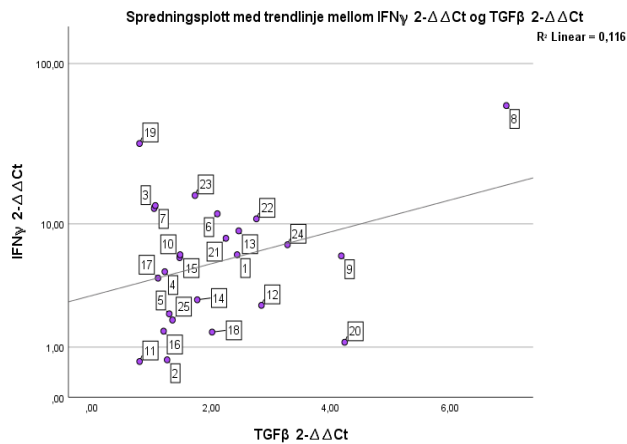
Stolpediagrammet som viser fold endringer $2^{-\Delta\Delta Ct}$ for TGF- β (A) og TNF- α (B) innenfor samme prøve. Prøvene vises som (ID nr.C- x) på x-aksen, mens fold endring vises mellom normalisert genuttrykk i tumorvev og marginalsone på Y-aksen.

Siden TGF β er et pleiotropisk cytokin med effekter innen immunregulering og tumorutvikling, var det ønskelig å se på det individuelle uttrykket av TGF β . Cytokinet var høyere uttrykt i alle tumorprøver med unntak av C11 og C19. Prøve C8, C9 og C20 hadde høyest uttrykk med over fire ganger mer mRNA i tumor enn i marginalsonen, mens 3 prøver viste tilnærmet samme uttrykk i marginalsone og tumor (figur 32A).

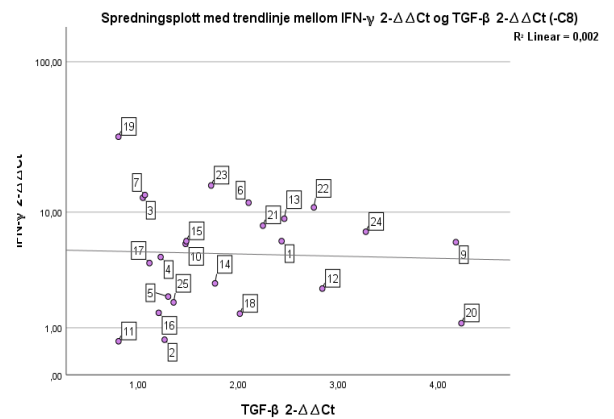
Ingen prøver er nedregulert for TNF- α i tumor, men variasjonen i genuttrykket er lavt og lite (foldendring <4) innenfor $n=25$, bortsett fra hos prøve C20 og C24 som hadde høyest uttrykk av TNF- α med 10,9 og 5 ganger mer mRNA i tumor (figur 32B).

For å se på mulige sammenhenger mellom TGF- β og andre cytokiner ble det sett på spredningsplott av TGF β mot INF γ og IL-6 (figur 33A og C).

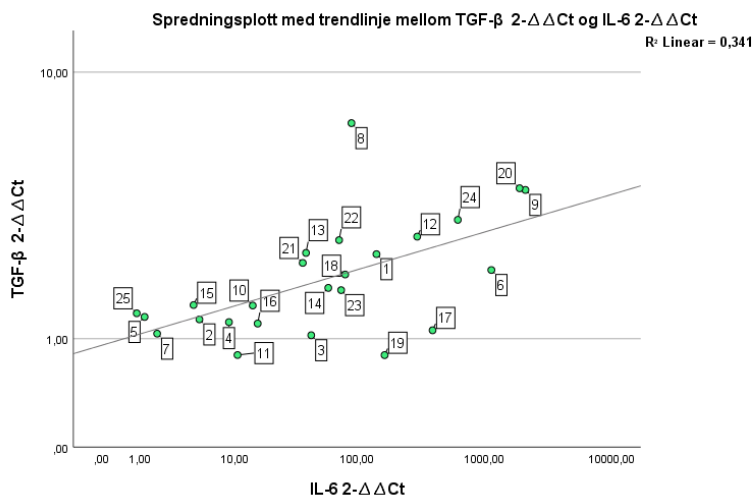
A:



B:



C:



Figur 33: Spredningsplott over foldendring ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) for IFN- γ og TGF- β mot fold endring for TGF- β og IL-6.

Figur A Spredningsplott over foldendring ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) for IFN- γ mot fold endring for TGF- β . B: Plott for foldendring for IFN- γ og TGF- β uten prøve C8. C: Spredningsplott over foldendring ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) for TGF- β mot fold endring for IL-6. Alle X- og Y-akser viser logaritmisk skala for foldendringene.

Plottet for IFN- γ mot TGF- β viser en svak korrelasjon mellom variablene med $r = 0,34$ ($R^2 = 0,116$) (figur 33A). Det foreligger ikke normalfordeling av genuttrykkene til IFN γ og TGF- β med $p < 0,0005$ og det foreligger derfor ikke lineær korrelasjon, slik at Pearsson R kan ikke benyttes for korrelasjonsvurdering.

Det hentydes til veldig svak korrelasjon mellom genuttrykkene av IL-6 og IFN- γ med Spearman rho $\rho = 0,12$, men det foreligger ikke monotonisk korrelasjon mellom fold endringer hos variablene, vist ved $p = 0,58$ ($p > 0,05$). Dette viser dermed til ingen signifikant monotonisk eller lineær korrelasjon mellom IFN- γ og TGF- β . Det ble også vurdert mulig negativ korrelasjon mellom disse genuttrykkene uten prøve C8 (figur 33B), men dette viste ingen korrelasjon $\rho = 0$ og $p > 0,05$.

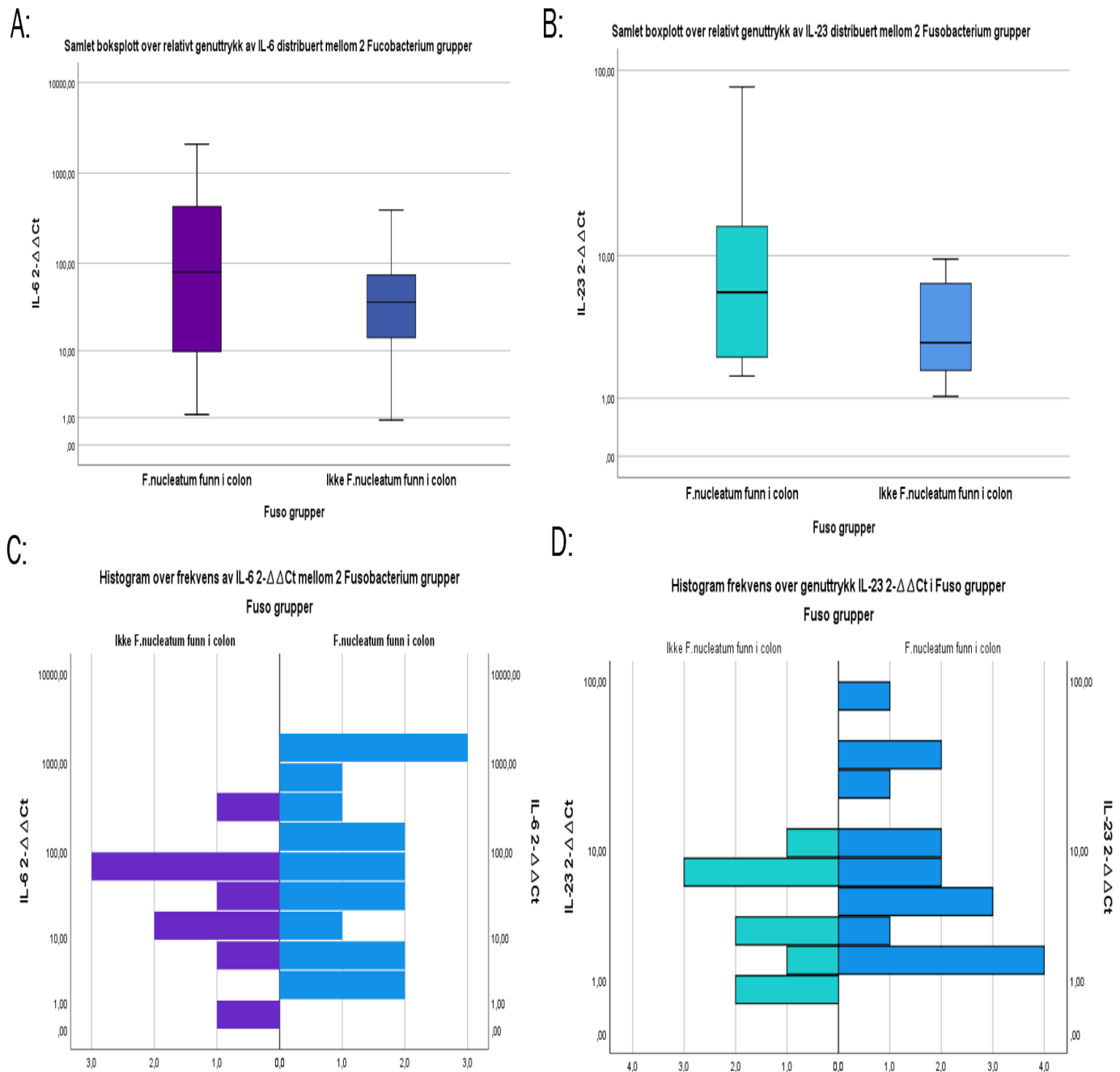
Av spredningsplottet observeres det at prøve C8 utskiller seg fra datamengden med både høyt TGF- β og IFN- γ uttrykk. Prøve C19 har lavt TGF- β , og fortsatt høyt IFN- γ uttrykk. Prøve C20 har derimot lavt IFN- γ , men moderat TGF- β uttrykk. Plottet for TGF- β mot IL-6 viser en korrelasjon mellom variablene med $r = 0,58$ ($R^2 = 0,341$) (figur 33C). Det foreligger ikke normalfordeling av genuttrykkene til TGF- β og IL-6 med $p < 0,0005$ og Pearsson R kan ikke benyttes for lineær korrelasjonsvurdering. Spearman $\rho = 0,55$, viser betydelig korrelasjons forhold mellom genuttrykkene til TGF- β og IL-6 med en signifikant ikke lineær monotonisk korrelasjon, $p = 0,005$ ($p < 0,05$) på 99% signifikans nivå.

5.5. Mulig korrelasjon mellom *F. nucleatum* og uttrykk av IL-6 og IL-23

Det er tidligere beskrevet av *F. nucleatum* kan interagere direkte med epitelceller og tumorceller ved å binde til E-cadherin. Studier som stort sett kommer fra forsøk med musmodeller for CRC indikerer at *F. nucleatum* også kan promotere tumorutviklingen ved å infisere tumorer og aktivere immunceller som er til stede i tumor stroma. Vår hovedhypotese er at dette er tilfellet i menneske og det var derfor ønskelig å se om det foreligger en korrelasjon mellom funn av *F. nucleatum* og to av de proinflammatoriske cytokinene som er vist å kunne promotere CRC i mus; IL-6 og IL-23. Det ble derfor utført en sammenlikning ved bruk uavhengig prøve t-test av $\Delta\Delta Ct$ verdier for IL-6 og IL-23 mot 2 nominale grupperinger av *Fusobacterium nucleatum* (85). Gruppe 1 utgjør ($n = 16$) prøver med funn av *F. nucleatum* i tykktarm, gruppe 2 utgjør prøver ($n = 9$) uten funn av *F. nucleatum*. Funn av *F. nucleatum* er definert som positivt uavhengig av hvilken posisjon bakterien er påvist (biopsi 1-4, forklaring se pkt 4.1.1, tabell 4).

Normalitet i de kontinuerlige variablene $\Delta\Delta Ct$ IL-6 og $\Delta\Delta Ct$ IL-23 i hver gruppe foreligger vist ved Shapiro Wilk test for IL-6 $p = 0,63$ og $p = 0,85$, for IL-23 $p = 0,19$ og $p = 0,24$ ($p > 0,05$). Ingen statistiske utligger er observert i box-plot av $\Delta\Delta Ct$ IL-6 og IL-23. Levenes test viser at variansen i hver *Fusobacterium*-gruppe har homogenitet med $p = 0,29$ og $p = 0,42$ ($p > 0,05$). Gruppen med funn av *F. nucleatum* i kolon viste 66,8 ganger høyere uttrykk av IL-6 i tumor sammenliknet med margin, mens gruppen uten *F. nucleatum* i kolon viste 25,5 ganger høyere uttrykk av IL-6 i tumor sammenliknet med margin. For IL-23 viste gruppen med funn av *F. nucleatum* i kolon 7,1 ganger høyere uttrykk i tumor sammenliknet med margin, mens gruppen uten *F. nucleatum* i kolon viste 3,3 ganger høyere uttrykk av IL-23 i tumor sammenliknet med margin. Resultatene er illustrert som boksplo i figur 33A og B. Selv om resultatene viser en tendens til høyere uttrykk av IL-6 i gruppen med *F. nucleatum* (figur 34A), foreligger det ingen statistisk signifikant forskjell mellom $\Delta\Delta Ct$ uttrykket til IL-6 og funn eller ikke funn av *F. nucleatum* i tykktarm, $p = 0,30$ ($p > 0,05$), utregnet med

en prøveuavhengig t-test. Med $p = 0,11$ var det heller ingen statistisk signifikant forskjell mellom $\Delta\Delta Ct$ uttrykket til IL-23 og funn eller ikke-funn av *F. nucleatum*.



Figur 34: Distribusjonsplott og histogram over fold endring av IL-6 og IL-23 i tumor sammenliknet med margin. Resultatene er presentert for prøver med og uten funn av *F. nucleatum* i kolon.

A, B: Boksplokk med median og interkvartile områder for fold endring av genuttrykk (A: IL-6 og B: IL-23) mellom tumor sammenliknet med marginalsonen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Gruppe 1 utgjør ($n = 16$) prøver med funn av *F. nucleatum* i kolon, gruppe 2 utgjør ($n = 9$) prøver uten funn av *F. nucleatum* i kolon. C, D: Histogram over fordeling av fold endring av genuttrykk (C: IL-6 og D: IL-23) for alle prøver, gruppert etter funn av *F. nucleatum* i kolon eller ikke.

Spredningen ser ut til å være større i prøver med funn av *F. nucleatum* i kolon, hvor medianen for IL-6 i gruppen med *F. nucleatum* i kolon (median =80,3) er noe høyere enn gruppen uten *F. nucleatum* i kolon (median =36,5) (figur 34A). Distribusjonen er ulik, men ikke signifikant forskjellig mellom de to *F. nucleatum*-gruppene i forhold til genuttrykket av IL-6 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), med $p = 0,28$ ($p > 0,05$) med Mann-Whitney U test og visuelt (figur 34C).

Spredningen av IL-23 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ser i tillegg ut til å være betydelig større i det øvre område av Tukey Fences (utenfor 75% percentilen) i prøver med *F. nucleatum* i kolon (figur 33B), mens medianen på 6,1 for IL-23 i gruppen med *F. nucleatum* i kolon er noe høyere enn gruppen uten *F. nucleatum* i kolon (median = 2,9) (figur 34B). Distribusjonen er også for IL-23 ulik, men ikke signifikant forskjellig mellom de to gruppene i forhold til genuttrykket av IL-23 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), med $p = 0,26$ ($p > 0,05$) med Mann-Whitney U test og visuelt (figur 34D).

6. Diskusjon

Dette prosjektet er utført som en del av prosjektet «Kolorektal kreft: Tidlig deteksjon ved hjelp av ikke-invasive biomarkører og overvåkning av intestinal bakterieflora». Materialet som er brukt i denne studien ble samlet inn mellom 2014-2017, og har tidligere blitt karakterisert for ulike mikrobiotiske og molekylære funn i både fæces, biopsier og blod. Dette gjelder funn av *F. nucleatum*, ulike onkogene mutasjoner som KRAS, BRAF, PIK3CA i tillegg til mikrosatelitt instabilitet (MSI) og hypermetylering av promoter til MLH1 og MGMT.

I motsetning til kolitt-assosiert kreft er ikke inflammasjon en medvirkende årsak til tykktarmskreft. Man tenker seg heller at inflammasjonen er et resultat av den neoplastiske celleveksten i denne kreftformen. Pasienter tidligere diagnostisert med inflammatorisk tarmsykdom som ulcerøs Colitt, MB Crohn`s eller IDB er ikke inkludert i biobanken undersøkt i dette prosjektet, og biobanken egner seg derfor godt til å studere inflammasjon i tumorer hvor kronisk inflammasjon ikke er årsaken til kreft. Det er godt etablert at inflammasjon kan være med på å forme tumorutviklingen i tykktarmskreft. For eksempel ser det ut til at tumorer med et høyt antall T-celler i tumorens mikromiljø er gunstig for pasienten da det er assosiert med økt overlevelse. På en annen side er det rapportert at mengde IL-6 både i tumor og blod øker etter hvert som tumoren utvikler seg. Ved å bruke musemodeller for CRC har man kunnet peke ut flere immunologiske aktører som kan spille en rolle for kreftutviklingen – også i menneske. Det er brukt denne kunnskapen som utgangspunkt da oppgaven sitt hovedmål med å se på uttrykk av cytokiner i vårt biobank-materiale ble besluttet. I dette prosjektet har det blitt studert forskjeller mellom tumorvev og marginalsone uten tumorvekst, både innenfor hver enkelt CRC pasient, men også i og mellom kohort.

Å kartlegge cytokinprofiler i CRC kan ha klinisk relevans både i forhold til persontilpasset behandling og for å etablere nye diagnostiske og prognostiske markører. Etablering av ikke-invasive markører vil være særst ettertraktet. I så måte er cytokiner gode kandidater da de kan diffundere fra tumor og ut i blodbanen. Uttrykk av cytokiner er på en annen side felles for mange patologiske tilstander, ikke minst infeksjoner. Sirkulerende cytokiner kan derfor ikke være markør for CRC alene men kan potensielt brukes sammen med andre biomarkører. Det er derfor nødvendig å studere cytokinprofiler i CRC og sammenligne disse med molekylære funn, kreftstadium og ikke minst forandringer i tarmens mikrobiota. For å få en forståelse av interaksjonen mellom immunsystemet og tumorceller er det også viktig å kunne knytte uttrykk av cytokiner opp mot hvilke celletyper som er representert i tumorstroma og tilhørende signalveier. I dette arbeidet har man fått innblikk i det siste ved å bruke antistoff for IL-6 og pSTAT3 i immunhistokjemi.

Det var funn av flere cytokiner som var høyere uttrykt i tumor enn i marginalsoner. For IL-6 var det meget store forskjeller. Det kunne vært interessant å måle uttrykk av de samme cytokinene i polyppgruppen som tilhører biobanken for å få et innblikk i om denne gruppen også viser tegn til inflammasjon. Det er også ønskelig å følge opp dette arbeidet ved å studere enkelte av cytokinene i blod.

6.1. Ikke-neoplastisk vev har høye nivåer av TGF- β – tegn på et anti-inflammatorisk miljø?

Det er sammenlignet relativt uttrykk av cytokiner i prøver fra marginalsonen (figur 24). TGF- β er sterkere uttrykt i denne lokalisasjonen enn de andre cytokinene, med hele 16,7 ganger høyere uttrykk av TGF- β enn IL-12 – cytokinet med nest høyest uttrykt cytokinet i marginalsonen. Til sammenligning har TGF- β en median i marginalsoner som er like høy som medianen til IL-6 i tumorvev ($2,5 \times 10^{-1}$) (tabell 19). TGF- β er et pluripotent cytokin som kan ha ulike effekter avhengig av hvilke celletyper som påvirkes. Som nevnt under pkt 1.2, vil det i normalvev i kolon foreligge et anaerobt mikrobielt miljø, hvor butyrat er primærnæringskilden til kolonocytter. Butyrat kan også hemme histon deacetylase (HDAC) aktivitet, som i sin tur hemmer gentranskripsjon i kolonocytter, men HDAC kan også føre til en oppregulering av anti-inflammatoriske cytokiner som TGF- β produsert av T_{REG} immunceller (14). Det er også tidligere beskrevet at TGF- β kan indusere klasse skift til IgA hos LPS aktiverte plasmaceller. Translokasjon av IgA over til tarmlumen er igjen med på å opprettholde homeostase i tarmslimhinnen (121). Det kan ikke konkluderes noe om det cellulære opphavet til TGF β i margin fra våre data. For å gjøre det må man se på lokalisasjon av TGF β sammen med andre markører ved å bruke fluorescerende antistoff i immunhistokjemi eller flowcytometri.

IL-12 er høyere uttrykt i marginalsoner enn de andre cytokinene med en median på $1,1 \times 10^{-2}$ og ligger på nesten samme nivå som IL-17 i tumor (figur 24). IL-12 har i tillegg ikke signifikant forskjell i

cytokin uttrykk mellom marginalsonen og tumor (tabell 19). IL-12 er et cytokin som er viktig i immunrespons mot intracellulære infeksjoner. IL-12 produseres i hovedsak av makrofager og dendritiske celler (DC) etter aktivering gjennom PRR, og er på den måten til stede i miljøet tidlig i en immunrespons. IL-12 produksjon er nødvendig for at CD4⁺ T celler skal aktiveres til T_H1 celler som videre vil aktivere CTL celler (53). Våre data viste også noe høyere uttrykk av for eksempel IL-6 og IL-23 enn IFN- γ i marginalsonen. I og med at det ble funnet noe uttrykk av enkelte proinflammatoriske cytokiner i marginalsonen kan det være en indikasjon på inflammasjon i dette vevet hos noen av pasientene. Man vet ikke når i tumorutviklingen inflammasjon begynner å spille en rolle hos pasienter med sporadisk CRC, men en hypotese vil være at inflammasjon kan være en initiell driver, slik det er for CAC. Igjen vil bruk av antistoff mot cellulære markører i immunhistokjemi eller flowcytometri kunne si noe om opphavet til disse cytokinene. I tillegg ville det vært interessant å kartlegge uttrykket av disse cytokinene i polyppgruppen og hos pasienter uten tumor.

6.1.1. TGF- β kan ha forskjellige roller i tumor og margin.

Det observeres en beskjeden økning av TGF- β i tumor i forhold til margin (figur 32A). Det er altså funnet høye nivåer av TGF- β både i tumor og margin. Det vil være interessant å se hvilke celler som produserer TGF- β i de forskjellige lokalisasjonene. I den grad margin representerer frisk slimhinne vil det være nærliggende å tro at celler som Treg er hovedkilden til TGF- β . I tumorer kan det være annerledes. Det er f.eks. kjent at tumorceller og andre tumor assosierte celler som MDSC og MSC kan produsere TGF- β . En vanlig teori er at TGF- β i tumorens mikromiljø hemmer inflammasjon og dermed tumorspesifikke og tumor-promoterende immunresponser (55). Det er uklart om TGF- β har en immunhemmende effekt i vårt prøvemateriale, da det samtidig sees høye nivåer av proinflammatoriske cytokiner. Eksempelvis ble det funnet ingen klar negativ korrelasjon mellom TGF- β og IFN- γ . Et spredningsplott for cytokinene hvor prøve C8 var fjernet viste antydning til nedadgående trendlinje, men statistisk vurdering viste ingen korrelasjon mellom variablene $\rho=0$ (pkt 5.4.4) (figur 33B). Slike sammenligninger kan derimot være noe misvisende i TGF- β sitt tilfelle da TGF- β er høyt uttrykt i prøver fra margin og muligvis har andre roller i dette vevet. Antall prøver kan også være for lavt for reelt sammenligningsgrunnlag og disse representerer tumorer i ulike kreftstadier med følgelig ulik cytokinprofil. Det var også mindre variasjon i uttrykket av TGF- β i begge lokalisasjoner sammenlignet med f.eks. IFN- γ og IL-6.

TGF- β har også effekter utover cellene i immunsystemet. Det er beskrevet at TGF- β hemmer celledeling og kan indusere apoptose i celler som har reseptor for cytokinet. Dette er en biologisk mekanisme som potensielt hemmer progresjon av tumorceller og støttes av observasjoner hvor tumorceller ofte viser mutasjoner TGF- β reseptor eller nedstrøms signalmolekyler som SMAD4 (57). Vår biobank er ikke karakterisert i forhold til slike mutasjoner og det kan derfor ikke anslås om hvor utbredt de er i vårt prøvemateriale og hvordan de forholder seg til uttrykk av TGF- β .

TGF- β er en potent mediator for epitelial til mesenchymal transisjon (EMT), en prosess som er viktig i embryogenese og for sårtilheling. Når dette skjer i tumorceller er det en patologisk prosess som er forbundet med et forverret utfall og metastase (78). Gitt de vidt forskjellige effektene til TGF- β er det fristende å tenke at cytokinet er en viktig årsak til EMT hos tumor celler. Hos prøve C20 som hadde kjent metastase ved prøveinnsamlings tidspunktet, viste cytokinprofilen seg som høyt TGF- β (nest høyest), nedregulering av IL-12 og tilnærmet likt uttrykk i tumor og marginalsone av IFN- γ , høyt uttrykk av IL-6, IL-23, TNF- α og noe forhøyet IL-17 uttrykk. Immunkarakteriseringen av molekylære subtyper viser en assosiasjon av en mesenchymal signatur med en immunsuppressiv subtype, noe som prøve C20 kan hentyde på (80). For disse prøvene og de andre prøvene er det derimot vanskelig å si noe mer spesifikt om forholdene uten å karakterisere hvilke celler som uttrykker cytokinet og hvilke celler som har reseptor for cytokinet i de to lokalisasjonene. Det er beskrevet at tumorceller i tykktarm kan unngå apoptose og bevege seg mot EMT ved å regulere ekspresjon av signalmolekyler som er nedstrøms for TGF β reseptor. Spesielt er oppregulering av c-Jun N-terminal kinase (JNK) og alternativ fosforylering av SMAD3 er tatt frem som en potent molekylær mekanisme for dette (122). Det ville vært interessant å studere denne signaleringsveien i mer detalj i våre tumorprøver. Likeledes ville det vært interessant å studere uttrykk av TGF β i polyppgruppen.

6.2. Neoplastisk vev viser hovedsakelig ett pro-inflammatorisk miljø

6.2.1. IL-6 er generelt kraftig uttrykt i tumorvev og kan være en mulig kandidat som ikke-invasiv biomarkør.

Denne studien identifiserte et høyt nivå av IL-6 mRNA i 22 av 25 tumor prøver (figur 26). Dette stemmer godt med tidligere publikasjoner. Esfandi et al viste i 2006 at IL-6 nivå i både tumor og i serum var økt i forbindelse med CRC (123). For å finne det cellulære opphavet til IL-6 ble det utført immunhistokjemi og funnene viste at både tumorceller og celler i tumor stroma produserer IL-6 (figur 27 A og B). Dette stemmer også godt med hva som er vist tidligere. Det ble også funnet uttrykk av pSTAT3 i tumorceller (figur 27C), men da kun hos 4 av 25 prøver grunnet metodiske begrensninger (se pkt 6.5). Antall prøver med pSTAT3 i tumorceller er trolig høyere enn det som ble avdekket her. Grivennikov et al beskrev at IL-6 er i stand til å drive utviklingen av tumorer gjennom IL-6 reseptor og STAT3 i en musemodell for kolitt-assosiert tykktarmskreft (120). Andre cytokiner som IL-23 kan også signalere gjennom STAT3, og det kan ikke trekkes noen slutninger om at uttrykket av pSTAT3 i tumor skyldes kun IL-6. Våre funn av både IL-6 og pSTAT3 i humane tumorer er derimot med på å støtte hypotesen om at IL-6 og pSTAT3 kan være med på å drive tumorutviklingen i menneske i tillegg til hva som er funnet i mus. Siden det er flere cytokiner som kan føre til fosforylering av STAT3 i tumorceller er det nødvendig å gjøre en bredere karakterisering av hvordan disse cytokinene og deres reseptorer er uttrykt i kolorektale tumorer. I den forbindelse er det interessant å se at Putoczki

et al har funnet et høyere uttrykk av IL-11 enn av IL-6 i kolorektale tumorer (124). Det vil også være nyttig å se i hvilken grad disse cytokinene er uttrykt i polypper, og om de eventuelt kan egne seg som spesifikke markører som skiller polyppgruppen fra kreftgruppen.

IL-6 var i tillegg å finne i ikke lineær korrelasjon med TGF- β (figur 33C). Det er vist at STAT3 aktivering i tumorceller, MDSC og T_{REG} celler kan føre til produksjon av både TGF- β og IL-10 (62). Både IL-6 og TGF- β er forhøyet i serum hos pasienter med prostatakraft, hvor dette også korrelerte med graden av metastase (125). I tillegg er det beskrevet at STAT3 kan hemme utvikling av T_H1 gjennom blant annet å være en antagonist til STAT1 (62). Det var derimot ingen signifikant negativ korrelasjon mellom IL-6 og IFN- γ (figur 31).

IL-6 og IL-11 er potensielle kandidater for ikke-invasive markører i CRC. At Esfandi et al finner en korrelasjon mellom IL-6 i blod og TNM stadium styrker denne påstanden. IL-6 kan derimot også detekteres i blod etter infeksjoner, og er dermed lite egnet som en markør for tykktarmskreft alene. Skal man kunne bruke IL-6 i blod som markør og unngå falske positive svar må IL-6 eventuelt kombineres med andre markører. IL-11 er mindre studert enn IL-6. Det gjenstår å se om cytokinet kan detekteres i blod og om det er mer spesifikt for CRC enn IL-6.

6.2.2. IL-23 og IL-17 er også samlet sett forhøyet i tumorprøvene, med en signifikant korrelasjon mellom IL-23 og IL-6.

Både IL-23 og IL-17 var oppregulert i tumorvev kontra marginalsone med en større variasjon for IL-17 enn for IL-23 (figur 24 og 25). Tidligere forskning har vist at IL-23 og IL-17A er oppregulert i CRC tumorer, både i humant og mus tumorceller (63). Disse cytokinene er beskrevet å kunne promotere inflammasjon ved å aktivere immunceller eller andre celler i tumor stroma. I tillegg kan de promotere celledeling og cellevekst av tumorceller (24, 43).

Resultater i denne masteroppgaven viste at nivået av IL-23 var oppregulert i flere av de samme tumorprøvene som hadde høye nivåer av IL-6 (figur 28A, 26), og det fantes en ikke lineær korrelasjon mellom de to cytokinene (figur 29). I de senere år har det blitt kjent at IL-6 kan indusere rekruttering av umodne myeloide celler som MSC og MDSC til tumor stroma. Autokrin signalering i MSC kan øke nivået av IL-6 og MDSC kan produsere IL-23. IL-6 kan indusere et fenotypiskskifte hos makrofager mot M2 TAM og kan sammen med cytokiner som TGF- β og IL-23 indusere T_H17 celler (72, 74, 76). Med andre ord ser det ut til at disse cytokinene påvirker hverandres uttrykk, noe som kan forklare korrelasjonen funnet mellom IL-6 og IL23 og muligens at IL-6 nivået kan bli så kraftig i enkelte prøver.

Figur 23A og B viser at nivåene av IL-23 og IL-17 varierer mellom hver pasient og kan trolig skyldes i hvilken fase av CRC det er tatt biopsi fra. Noen tumorer kan ikke ha kommet til det stadiumet hvor IL-17 eller T_H17 cellene er aktivert ennå, noe som mulig er tilfelle hos prøvene C6 og C19 (C6 hadde

ikke noe IL-17 uttrykk i hverken marginalsone eller tumor), mens andre trolig ikke har aktivert hverken IL-23 og IL-17 produksjon som muligvis prøve C17 hentyder på. Det faktum at prøvene i biobanken representerer så ulike kreftstadier med ulike celletyper til stede og aktivert i vevet kan også muligens forklare at det ikke forelå noen signifikant korrelasjon mellom IL-23 og IL-17 i våre prøver (figur 28C). Men det kreves betydelig mer forskning på dette og klassifisering av stadium i forhold til cytokinuttrykk i kombinasjon med andre molekylære og kliniske funn, kan som sagt ikke utføres uten å finne ut av hvilke celletyper som befinner seg i tumorvevet og hvilke reseptorer som er uttrykt hos både neoplastisk vev, immunceller og andre celler i stroma.

6.3. IL-12 og IFN- γ .

Det relative genuttrykket til IFN- γ er forhøyet samlet sett i tumor med stor spredning, mens IL-12 ikke har noen statistisk signifikant forskjell mellom genuttrykkene i marginalsone og tumor (figur 24, tabell 19). Som vist i figur 30B var genuttrykket av IL-12 lavere i tumor enn i marginalsone i flere prøver. Kitamura. et.al. har vist at IL-6 kan nedregulere overflateuttrykk av MHC klasse II og produksjon av IL-12 hos DC (53) Det kan igjen føre til en redusert T_H1 mediert immunitet. Basert på dette studiet er det mulig at det høye IL-6 nivået som ble funnet i våre tumorprøver er med på å indusere de lave nivåene av IL-12.

Det er også funnet en viss korrelasjon mellom uttrykket av IL-12 og IFN γ i våre tumorprøver (figur 30C). CTL og andre immunceller kan produsere IFN γ som respons på IL-12 stimulering. Selv om det ikke har blitt kvantitert CTL og andre immunceller som NK-celler og T_H1 celler i våre tumorprøver er dette en indikasjon på at en andel av prøvene kan ha en viss grad av anti-tumor respons. Spesielt prøve C8 og C19 skilte seg ut med markant høyere nivåer av IFN- γ . IL-6 og IFN- γ hadde derimot ingen signifikant korrelasjon.

Prøve C8 hadde høyest TGF- β uttrykk i tumor og samtidig høyest IFN- γ uttrykk, høyt pro-inflammatorisk bilde med høye IL-6, IL-23 og IL-17 uttrykk i tillegg til svakt forhøyet TNF- α og IL-12. Det hadde vært interessant å kartlegge hva slags rolle TGF- β har hatt i tumor hos denne pasienten. Prøve C19 viste høyt mRNA uttrykk av IL-6 og IFN- γ , moderat IL-23 uttrykk, men derimot lavere IL-17, IL-12 og TGF- β uttrykk i tumor enn marginalsone. Dette kan hentyde på at prøve C19 kan muligens ikke ha kommet til det stadiumet, hvor det kan foreligge ytterligere TGF- β produksjon og T_H17 cellene er aktivert til IL-17 produksjon. Dette kan også muligens indikere bedre prognose ved behandling med anti-PD-L1 eller anti-CTLA-4 for denne pasienten, men det krever adskillig videre forskning for å avdekke betydningen av disse funnene hos disse pasientene og hos resten av kohorten.

6.4. Ulikt uttrykk av cytokiner i tumorer med og uten funn av *Fusobacterium nucleatum*.

Tidligere forskning har vist at *F. nucleatum* kan føre til en inflammasjonstilstand som kan øke tumorigenesen i vevet, og mengden av *F. nucleatum* i tumorvevet ser ut til å øke ved senere kreftstadier (75, 97). Tunsjø et. al. har avdekket funn av *F. nucleatum* i 16 av 25 prøver gjennom RT-qPCR, Denne studien viser ingen signifikant korrelasjon mellom det høye genuttrykket av IL-6 eller IL-23 og funn av *F. nucleatum* i kolon. Det ble funnet en samlet forskjell mellom uttrykket av disse cytokinene med tendens til noe høyere genuttrykk i tumor av både IL-6 og IL-23 i gruppen med *F. nucleatum*, men denne forskjellen var ikke statistisk signifikant ($p > 0,05$) (figur 34).

Variasjon av genuttrykkene til IL-6 og IL-23 var også større i gruppen med *F. nucleatum*. Resultatene kan antakelig påvirkes av den lave datamengden med $n=25$ prøver, og en større biobank ville muligens kunne vise resultater med mer statistisk signifikans. Tendensen som ble funnet mellom IL-6 og *F. nucleatum* stemmer med tidligere publisert forskning. Kostic et al. har vist at IL-6 var signifikant forhøyet i kolon hos *F. nucleatum* foret *Apc*^{MIN/+} mus versus TSB foret mus (75). Datagruppene var derimot små med $n=6-9$, slik at signifikansnivået kan være regnet ut på for få prøver. I tillegg er forsøket utført på mus nødvendigvis ikke direkte overførbare til menneske. McCoy et. al har sett på sammenhengen mellom *Fusobacterium* og cytokiner i kolorektale adenomer hos menneske (86). Forfatterne fant signifikant høyere uttrykk av IL-10 og TNF- α i tumorer med mye *Fusobacterium*. IL-6 var også oppregulert men i mindre grad enn IL-10 og TNF- α . Dette står i kontrast til våre funn med mye IL-6 og lite TNF- α , men kan gjenspeile at McCoy et al har sett på ikke-maligne adenomer mens vår biobank stort sett består av prøver fra senere kreftstadier (tabell 4). TNF- α kan oppregulere uttrykket av IL-6 reseptor på immunceller (42). Av våre 25 prøver var det kun 2 som viste noe forhøyet TNF- α uttrykk i tumor (figur 32B). Disse prøvene hadde også høyt uttrykk av IL-6 (figur 26).

Grivennikov et al har tidligere vist i en musemodell for CRC at makrofager i tumor kan produsere IL-23 som respons på LPS. Uttrykk av IL-6 og IL-17 var også avhengig av LPS mediert aktivering av TLR (63). Videre viste de at epitelbarrieren i disse tumorene er mer permeabel mot tarmlumen og at slimproteinet Muc2 er nedregulert. Immunhistokjemi av humane kolorektale tumorer viser også fravær av Muc2 mens det er normalt uttrykk av slimproteinet i prøver fra margin. Grivennikov et al konkluderer med at bakterier eller bakterielle komponenter fra tarm kan aktivere makrofager som er til stede i tumor stroma til å produsere IL-23. Dette er igjen med på å drive en proinflammatorisk immunrespons som forhindrer en immunrespons preget av CTL. Det er i denne oppgaven jobbet med en hypotese om at infeksjon av bakterier i tumor også kan forme immunresponsen i tumorer hos menneske. Selv om forskjellene ikke var statistisk signifikante sees en tendens til høyere uttrykk av IL-23 i tumorer hvor det er påvist *F. nucleatum*. Det sees også en tendens til høyere uttrykk av IL-6 i tumorer med *F. nucleatum*, men i og med at det er så mange forskjellige celletyper i tumor som produserer IL-6 er det vanskeligere å predikere et spesifikt årsaksforhold. Det har blitt vist at

tumorcellene produserer IL-6 i vårt prøvemateriale. Det er også kjent at epitelceller uttrykker TLR reseptorer. Det kan derfor tenkes at tumorcellene stimuleres til å produsere IL-6 direkte av bakterielle komponenter gjennom reseptorer for PAMP/MAMP. En annen hypotese er at tumorcellene stimuleres til å produsere IL-6 som respons til cytokiner som IL-6 og IL-17 produsert av immunceller i tumorens mikromiljø. Det er vist i musemodeller at IL-6 og IL-17 kan stimulere tumorceller til cellevekst (120). Denne prosessen kan være selvforsterkende gjennom en autokrin IL-6 stimulering av tumorcellene. Ideen om at *F. nucleatum* kan infisere kolorektale tumorer og induserer en immunrespons preget av IL-6 og IL-23 er meget interessant. Den kan forklare et direkte årsaksforhold mellom *F. nucleatum* og tumorprogresjon som kan foregå parallelt med *F. nucleatum* sin evne til å binde E-cadherin på epitelceller. Videre åpner det for muligheten å se på IL-6 og IL-23 som ikke-invasive markører for CRC i blod i kombinasjon med funn av *F. nucleatum* i fæces.

På grunn av begrenset tid ble det ikke vurdert korrelasjon mellom funn av *F. nucleatum* og andre cytokiner enn IL-6 og IL-23.

6.5. Metodiske begrensninger

6.5.1. Evaluering og valg av referansegener.

Den beste kombinasjonen ifølge Normfinder og BestKeeper var POLR2A og GAPDH, men det ble besluttet å ekskludere GAPDH som referansegen. GAPDH ga uspesifikk amplifisering i de amplifikasjonsnegative kontrollene (ank og enk) med en smeltepunktstopp i et annet temperaturområde enn forventet. Amplifiseringen forelå som et uønsket PCR-produkt indikert ved et svakt bånd på rundt 100bp i gelelektroforese (figur 18). De amplifikasjonsnegative kontrollene er forventet å være negative, og en slik uspesifikk amplifisering kan tyde på at primere har egenskaper som fremmer dannelse av primer dimer eller at primerne binder cDNA uspesifikt. Primerpar med slike egenskaper vil gi usikkerhet i RT-qPCR resultatene, og det vil da være tvil om prøver med svak amplifisering vil representere spesifikke PCR produkt. Det kunne vært inkludert flere referansegener under optimaliseringen eller utført optimalisering med nye referansegener, men det ville øke arbeidsmengden betraktelig og gå utover det som er rimelig for dette arbeidet.

6.5.2. IHC farging av pSTAT3 og delvis IL-6 ga ikke forventede resultat

IHC farging med pSTAT3 antistoff resulterte i påfallende mange prøver som var negative (21 av 25 prøver) Fargingen var distinkt og lokalisert til cellekjernen i de 4 resterende prøvene, og viste varierende uttrykk (figur 27C). Alle de fire prøvene som ga pSTAT3 merking var gjort på snitt fra tangbiopsier fra kolonskopi, mens farging av pSTAT3 negative prøver var gjort på snitt fra reseksjonsbiopsier. Det ble derfor mistenkt at pSTAT3 antistoffet ikke virket på reseksjonsbiopsier. Det kan være flere mulige forklaringer på den manglende fargingen: Fikseringsløsningen brukt på reseksjonene kan blokkere epitopen på en irreversibel måte slik at epitopen var tapt i påfølgende

farginger. Fikseringsløsningen til reseksjonssnittene besto av vann (1,7 L), konsentrert formalin (0,8 L) og eddiksyre (0,5 L). Det var derimot ikke beskrevet i produktinformasjonen fra antistoffleverandør at disse kjemikaliene kunne interferere med bindingen til antistoffet. En annen forklaring kan være relatert til størrelsen på biopsiene. Reseksjonsbiopsier er mye større enn tangbiopsier og det tar lengre tid før fikseringsløsningen trenger inn i vevet. Dette kan føre til at en så flyktig prosess som forforyling av et protein i en signalkaskade kan gå tapt. Grunnet tidsbegrensinger ble det besluttet å ikke snitte alle prøvene på nytt fra tangbiopsi FFPE preparat og videre farge disse på nytt med pSTAT3. Dette arbeidet skal utføres, men da inkludert i ett nyopprettet doktorgrads stipendiat.

Snitt fra tumor ble farget med IL-6 antistoff for alle 25 tumorprøver. Fargingen ble vurdert av en patolog og klassifisert etter en skala på svak, middels og sterk (figur 27A og B). Grad av farging stemte derimot ikke med uttrykket av IL-6 indentifisert med RT-qPCR. IHC og RT-qPCR er derimot to vidt forskjellige metoder som begge har sine styrker og begrensinger. Tolkning av fargeintensitet i IHC utføres visuelt på kun ett lite snittområde av en biopsi og representerer nødvendigvis ikke total mengde i hele biopsien. Til sammenligning er RT-qPCR en mye mer sensitiv metode som gir et kvantitativt mål på cytokin uttrykket. Vurderinger av cytokin uttrykk blir mer trolig representativt med RT-qPCR enn bruk av IHC. I tillegg ble RT-qPCR utført på ekstrahert RNA materiale i 2 små biopsier, slik at uttrykket ble samlet for alle vev og celler i dette materialet. Den makrobeskjærte tumor biopsien er i tillegg fiksert, noe som kan maskere antigener/epitoper under farging, og dersom fikseringsløsningen bruker for lang tid på å trenge inn i vevet er det fare for at proteiner blir degradert og evne til å bli gjenkjent av antistoff. Det kan føre til manglende eller lave signaler. IHC har derimot fordelen av å kunne demonstrere visuelt hvor i vevet eller hos hvilke celler cytokinet er til stede.

6.5.3. Utelukkelse av IL-10 RT-qPCR og valg av IL-12 primere

IL-12 primere ble valgt fra egendesignede primerpar, selvom optimaliseringen viste en uspesifikk amplifisering under PCR i en av de amplifikasjonsnegative kontrollene. QuantiTect primersettet for IL-12 viste en enda dårligere smeltepunkts profil, i tillegg til uspesifikk amplifisering i negativ kontroll. Dette kunne bydd på problemer under qPCR. Før qPCR av alle prøver ble det derimot mye feilsøking, da det viste seg at flere primere ga dårlige smeltepunktskurver under det automatiserte prøveoppsettet, selvom de viste fine resultater under den manuelle optimaliseringen. Det viste seg at primerne og qPCR miksen var veldig følsom for lite tilblending av templat og qPCR miks utført maskinelt. Smeltepunktskurve problemene ble løst og ga faktisk mye bedre optimale signaler for de fleste cytokiner ved 5ganger miks og templat blanding. IL-12 viste grunnet dette enkle optimale smeltepunktstopper i de fleste prøvene og det forekom ingen flere problemer med uspesifikk amplifisering i amplifikasjonsnegative kontroller. Forsøk med IL-10 primere viste generelt veldig lavt uttrykk og ga dårlige smeltepunktskurver med flere topper, hvor de uspesifikke toppene ofte lå høyere

enn de spesifikke. LinReg klarte ikke å finne platåfase. Det ble valgt å ekskludere IL-10 fra dette arbeidet.

7. Konklusjon

Ved å sammenligne uttrykk av IL-6 og IL-23 med funn av *F. nucleatum* ble det i denne oppgaven sett at cytokinene var noe høyere uttrykt i gruppen med *F. nucleatum*. Det forelå derimot ikke noen statistisk signifikante forskjeller og det er heller ikke mulig å fastslå et årsaksforhold. Det ble også funnet at tumorcellene var kilde til IL-6 i tillegg til celler i tumor stroma. Man bør være åpen for at *F. nucleatum* kan påvirke tumorceller direkte til å produsere cytokiner, og at immunceller nødvendigvis ikke trenger å være et mellomledd mellom *F. nucleatum* og tumorvekst. For å få et større innblikk i hvilken grad *F. nucleatum* kan påvirke immunsystemet i CRC vil det være særlig nyttig å kunne påvise *F. nucleatum* i tumorvevet med FISH og identifiser hvilke celler bakterien er i kontakt med. Videre undersøkelser med flere typer teknikker og et større prøvemateriale er derfor nødvendig.

Det ble funnet høye nivåer av de proinflammatoriske cytokinene IL-6, IL-23 og IL-17 i tumorvev sammenlignet med vev uten neoplastisk vekst. Sett i sammenheng med hva som er vist tidligere kan det tyde på at en type immunrespons som er med på å fremme tumorvekst dominerer i vårt prøvemateriale. Genuttrykket av IL-6 korrelerte derimot med TGF- β . I og med at TGF- β i hovedsak er beskrevet som et anti-inflammatorisk cytokin går denne observasjonen tilsynelatende imot tanken om at en proinflammatorisk immunrespons som er med på å drive kreftutviklingen, ser ut til å dominere i våre prøver. TGF- β er derimot vist å inducere flere forskjellige biologiske effekter inklusive EMT og immundepende effekt hos tumorceller. Hvilke effekter TGF- β har i våre tumorprøver vites ikke. For å få et innblikk i det må det identifiseres det cellulære opphavet til TGF- β hos tumorprøvene og hvilke celler som uttrykker reseptor for cytokinet. Å studere mulige mekanismer for EMT ville også være nyttig.

To av prøvene skilte seg ut med høye nivåer av IFN- γ , mens andre prøver hadde mindre uttrykk av både IFN- γ og IL-12 i tumor enn i marginalsone. Det forelå også en viss korrelasjon av IFN- γ og IL-12. Dette kan tyde på at det er mange cytotoxiske immunceller til stede i enkelte av prøvene, mens andre prøver kan ha en viss grad av immundepende respons. Det er derimot ikke mulig å være sikker før man har analysert hvilke typer immunceller som har infiltrert tumorene.

Prøver fra margin viste høye nivåer av anti-inflammatorisk TGF- β og stemmer godt med ideen om at frisk margin er uten inflammasjon. Det ble i tillegg funnet noe uttrykk av proinflammatoriske cytokiner som IL-6. For å få et større innblikk i dette ville det være nyttig å karakterisere prøvene med tanke på infiltrat av T_{REG} og aktiveringsstatus av andre immunceller.

Mengde IL-6 funnet i tumorprøvene var overaskende høyt. Andre cytokiner som IL-23 og IL-17 var også høyt uttrykt i tumor sammenlignet med marginalsone. Disse observasjonene danner et grunnlag for å identifisere cytokiner i blod som mulige ikke-invasive markører for CRC.

Det lar seg ikke gjøre å konkludere noe entydig bilde i forhold til cytokinprofil og immunuttrykk kun med funn avdekket i dette prosjektet, men funnene herfra kan i kombinasjon med videre forskning på celletyper, reseptorer og mutasjoner avdekke mer av cytokin effekten, slik at de til slutt eventuelt kan brukes til å kunne subtype klassifisere tumorprøvene i kombinasjon med molekulære og andre kliniske funn.

Litteraturliste

1. Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
2. Kreftregisteret. Cancer in Norway, Kreft insidens, dødelighet, overlevelse og prevalens i Norge. Institutt for populasjonsbasert kreft forskning; 2019.
3. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(25):2449-60.
4. Pancione M, Remo A, Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int.* 2012;2012:509348.
5. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1177-90.e3.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
7. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1653(1):1-24.
8. Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett.* 2018;16(1):9-18.
9. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(8):575-82.
10. Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res.* 2005;306(2):357-63.
11. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016;8(1):51.
12. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7(7):688-93.
13. Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science.* 2018;359(6380):1151-6.
14. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 2018;39(9):677-96.
15. Myhrstad MCW, Tunsjø H, Charnock C, Telle-Hansen VH. Dietary Fiber, Gut Microbiota, and Metabolic Regulation-Current Status in Human Randomized Trials. *Nutrients.* 2020;12(3).
16. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005;308(5728):1635-8.
17. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(10):661-72.
18. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(6):2247-52.
19. Nepelska M, Cultrone A, Béguet-Crespel F, Le Roux K, Doré J, Arulampalam V, et al. Butyrate produced by commensal bacteria potentiates phorbol esters induced AP-1 response in human intestinal epithelial cells. *PLoS One.* 2012;7(12):e52869.
20. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(11):800-12.
21. Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis.* 2011;203(3):306-11.
22. Li S, Konstantinov SR, Smits R, Peppelenbosch MP. Bacterial Biofilms in Colorectal Cancer Initiation and Progression. *Trends Mol Med.* 2017;23(1):18-30.
23. Dejea CM, Wick EC, Hechenbleikner EM, White JR, Mark Welch JL, Rossetti BJ, et al. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(51):18321-6.
24. Chen J, Pitmon E, Wang K. Microbiome, inflammation and colorectal cancer. *Semin Immunol.* 2017;32:43-53.
25. Candela M, Turrone S, Biagi E, Carbonero F, Rampelli S, Fiorentini C, et al. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol.* 2014;20(4):908-22.
26. Rivera-Chávez F, Lopez CA, Bäumlér AJ. Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radic Biol Med.* 2017;105:93-101.
27. Williams JM, Duckworth CA, Burkitt MD, Watson AJ, Campbell BJ, Pritchard DM. Epithelial cell shedding and barrier function: a matter of life and death at the small intestinal villus tip. *Vet Pathol.* 2015;52(3):445-55.
28. et.al. Intestinal epithelium [Digital Encyclopedia]. Wikipedia; 2020 [updated 22.06.2020; cited 2020 07.09.2020]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Intestinal_epithelium.

29. Totland MZ, Rasmussen NL, Knudsen LM, Leithe E. Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(4):573-91.
30. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241-60.
31. Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun*. 2007;75(5):2399-407.
32. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):131-44.
33. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-41.
34. Birchenough GM, Nyström EE, Johansson ME, Hansson GC. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science*. 2016;352(6293):1535-42.
35. Rauch I, Deets KA, Ji DX, von Moltke J, Tenthorey JL, Lee AY, et al. NAIP-NLRC4 Inflammasomes Coordinate Intestinal Epithelial Cell Expulsion with Eicosanoid and IL-18 Release via Activation of Caspase-1 and -8. *Immunity*. 2017;46(4):649-59.
36. Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21635-40.
37. McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*. 2012;483(7389):345-9.
38. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(2):135-45.
39. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun*. 2003;71(6):3503-11.
40. Fukata M, Abreu MT. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):680-7.
41. Janeway Charles A. Jr. TP, Walport M., Shlomchik M. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5. edition ed. New York: Garland Publishing; 2001.
42. Dembic Z. *The Cytokines of the Immune system*: Elsevier Inc.; 2015.
43. Korneev KV, Atretkhany KN, Drutskaya MS, Grivennikov SI, Kuprash DV, Nedospasov SA. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine*. 2017;89:127-35.
44. Zhang S-Y, Song X-Y, Li Y, Ye L-L, Zhou Q, Yang W-B. Tumor-associated macrophages: A promising target for a cancer immunotherapeutic strategy. *Pharmacological Research*. 2020;161:105111.
45. Alberts Bruce JA, Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. *The innate and adaptive immune system*. *Molecular biology of the cell*. 6.edition ed: Garland science; 2015. p. 1297-336.
46. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
47. Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: β 2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens*. 2003;61(3):211-9.
48. Yaghoubi N, Soltani A, Ghazvini K, Hassanian SM, Hashemy SI. PD-1/ PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:312-8.
49. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol*. 2016;21(3):462-73.
50. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med*. 2012;10:205.
51. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
52. Abbas A. LA, Pillai S. *Differentiation and Functions of CD8+ effector T-cells*. *Cellular and molecular immunology*. 9.utgave ed: Elsevier; 2017.
53. Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, Ohtake J, Homma S, Kawamura H, et al. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci*. 2017;108(10):1947-52.
54. Kursunel MA, Esendagli G. The untold story of IFN- γ in cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;31:73-81.

55. Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2017;152(1):36-52.
56. David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(7):419-35.
57. Wang K, Karin M. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Adv Cancer Res*. 2015;128:173-96.
58. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(4):234-48.
59. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295.
60. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*. 2004;21(4):491-501.
61. Bollrath J, Pesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2009;15(2):91-102.
62. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):798-809.
63. Grivnenkov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254-8.
64. Wang K, Kim MK, Di Caro G, Wong J, Shalapour S, Wan J, et al. Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity*. 2014;41(6):1052-63.
65. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011;71(4):1263-71.
66. Wang X, Yang L, Huang F, Zhang Q, Liu S, Ma L, et al. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- α up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells. *Immunol Lett*. 2017;184:7-14.
67. Song X, Gao H, Lin Y, Yao Y, Zhu S, Wang J, et al. Alterations in the microbiota drive interleukin-17C production from intestinal epithelial cells to promote tumorigenesis. *Immunity*. 2014;40(1):140-52.
68. Terzić J, Grivnenkov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-14.e5.
69. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):195-206.
70. Yang Y, Weng W, Peng J, Hong L, Yang L, Toiyama Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- κ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology*. 2017;152(4):851-66.e24.
71. Connolly JL SS, Wang HH, et al. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors., editor. *Tumor Structure and Tumor Stroma Generation*. In: *Holland-Frei Cancer Medicine*. . 6. edition ed: BC Decker, Hamilton; 2003.
72. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3356-64.
73. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Céspedes MV, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*. 2012;22(5):571-84.
74. O'Malley G, Heijltjes M, Houston AM, Rani S, Ritter T, Egan LJ, et al. Mesenchymal stromal cells (MSCs) and colorectal cancer: a troublesome twosome for the anti-tumour immune response? *Oncotarget*. 2016;7(37):60752-74.
75. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 2013;14(2):207-15.
76. Pixley FJ. Tumor-Associated Macrophages. In: Boffetta P, Hainaut P, editors. *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)*. Oxford: Academic Press; 2019. p. 496-503.
77. Atreya I, Neurath MF. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2008;8(4):561-72.
78. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(2):79-92.

79. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-6.
80. Angelova M, Charoentong P, Hackl H, Fischer ML, Snajder R, Krogsdam AM, et al. Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome Biol.* 2015;16(1):64.
81. Lee SA, Liu F, Riordan SM, Lee CS, Zhang L. Global Investigations of *Fusobacterium nucleatum* in Human Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology.* 2019;9:566.
82. Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(3):156-66.
83. Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun.* 2000;68(5):2907-15.
84. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012;22(2):299-306.
85. Tunsjo HS, Gundersen G, Rangnes F, Noone JC, Endres A, Bemanian V. Detection of *Fusobacterium nucleatum* in stool and colonic tissues from Norwegian colorectal cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(7):1367-76.
86. McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One.* 2013;8(1):e53653.
87. Bashir A, Miskeen AY, Bhat A, Fazili KM, Ganai BA. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging bug in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev.* 2015;24(5):373-85.
88. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-99.
89. Wu J, Li Q, Fu X. *Fusobacterium nucleatum* Contributes to the Carcinogenesis of Colorectal Cancer by Inducing Inflammation and Suppressing Host Immunity. *Translational oncology.* 2019;12(6):846-51.
90. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity.* 2015;42(2):344-55.
91. Abed J, Emgård JE, Zamir G, Faroja M, Almogy G, Grenov A, et al. Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe.* 2016;20(2):215-25.
92. Schetter AJ, Okayama H, Harris CC. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer J.* 2012;18(3):244-52.
93. Noshok K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):557-66.
94. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(2):231-7.
95. Ye X, Wang R, Bhattacharya R, Boulbes DR, Fan F, Xia L, et al. *Fusobacterium Nucleatum* Subspecies *Animalis* Influences Proinflammatory Cytokine Expression and Monocyte Activation in Human Colorectal Tumors. *Cancer Prev Res (Phila).* 2017;10(7):398-409.
96. Cook KW, Letley DP, Ingram RJ, Staples E, Skjoldmose H, Atherton JC, et al. CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut.* 2014;63(10):1550-9.
97. Mima K, Nishihara R, Qian ZR, Cao Y, Sukawa Y, Nowak JA, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut.* 2016;65(12):1973-80.
98. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, Qian ZR, Yamauchi M, Inamura K, et al. *Fusobacterium nucleatum* and T Cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2015;1(5):653-61.
99. scientific T. Basic principles of RT-qPCR [Molecular biology learning center]. Thermofisher; 2020 [cited 2021 10. mai]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>.
100. Kubista M. SR, Tichopad A, Bergkvist A, Lindh D. The prime technique: Real-time PCR data analysis: Kubista M. TATAA Biocenter; 2007 [cited 2021 10.05]. Available from: <https://www.gene-quantification.de/kubista-bioinf-2007.pdf>.
101. Strachan T. RA. Analyzing the structure and expression of genes and genomes. Human molecular genetics. 5th ed. Taylor and Francis group: CRC Press, Garland science book; 2019. p. 170-222.

102. Qiagen. Critical Factors for successful real-time PCR. Real-time PCR Brochure. 7/2010 ed: Qiagen International
103. Downey N. Explaining multiple peaks in qPCR meltcurve analysis: Integrated DNA technologies; 2014 [updated 1. februar, 2017. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>.
104. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
105. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*. 2013;54(4):391-406.
106. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):Research0034.
107. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004;64(15):5245-50.
108. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26(6):509-15.
109. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*. 2003;339(1):62-6.
110. Bosman F. CF, Hruban R., Theise N. WHO classification of tumours of the digestive system. 4 th ed: IARC, International agency for research on cancer; 2010.
111. Gundersen G. Genetiske og epigenetiske endringer i Fusobacterium nucleatum positive tumorer hos pasienter med kolorektal kreft [Mastergradsavhandling]: OsloMet- storby universitet; 2019.
112. Moen AE, Tannaes TM, Vatn S, Ricanek P, Vatn MH, Jahnsen J, et al. Simultaneous purification of DNA and RNA from microbiota in a single colonic mucosal biopsy. *BMC research notes*. 2016;9:328.
113. Zhang C, Wang YQ, Jin G, Wu S, Cui J, Wang RF. Selection of reference genes for gene expression studies in human bladder cancer using SYBR-Green quantitative polymerase chain reaction. *Oncol Lett*. 2017;14(5):6001-11.
114. Primer3.org. Primer3 Plus design tool: GitHub; 2019 [updated 17.august 2019; cited 2021 10. mai]. Available from: <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>.
115. BLAST: Basic local alignment search tool [Internet]. National center for biotechnology information. 2021 [cited 19. september 2019]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
116. Safley SA, Villinger F, Jackson EH, Tucker-Burden C, Cohen C, Weber CJ. Interleukin-6 production and secretion by human parathyroids. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(1):145-56.
117. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6):e45.
118. Zeng J, Tang ZH, Liu S, Guo SS. Clinicopathological significance of overexpression of interleukin-6 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2017;23(10):1780-6.
119. Yuza K, Nagahashi M, Shimada Y, Nakano M, Tajima Y, Kameyama H, et al. Upregulation of phosphorylated sphingosine kinase 1 expression in colitis-associated cancer. *J Surg Res*. 2018;231:323-30.
120. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009;15(2):103-13.
121. Stavnezer J, Kang J. The surprising discovery that TGF beta specifically induces the IgA class switch. *J Immunol*. 2009;182(1):5-7.
122. Matsuzaki K, Seki T, Okazaki K. TGF-beta during human colorectal carcinogenesis: the shift from epithelial to mesenchymal signaling. *Inflammopharmacology*. 2006;14(5-6):198-203.
123. Esfandi F, Mohammadzadeh Ghobadloo S, Basati G. Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2006;244(1):76-8.
124. Putoczki TL, Thiem S, Loving A, Busuttill RA, Wilson NJ, Ziegler PK, et al. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell*. 2013;24(2):257-71.
125. Adler HL, McCurdy MA, Kattan MW, Timme TL, Scardino PT, Thompson TC. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J Urol*. 1999;161(1):182-7.

Vedlegg:

Vedlegg 1 : Oppdatert REK godkjenning 25.09.18

Vedlegg 2 : Endringsvedlegg REK godkjenning 22.11.19

Vedlegg 3: RNA konsentrasjonsmåling og RNA mengde inn i cDNA syntese

Vedlegg 4: Rådata for optimale referansegener til normalisering, effektivitetsjustering

Vedlegg 5: Eksempel på utregning av relativt genuttrykk med normalisering og effektivitetsjustering

Vedlegg 6: PCR oppsett med dårlig IL-10 primere som ble ekskludert fra cytokinpanelet

Region:	Saksbehandler:	Telefon:	Vår dato:	Vår referanse:
REK sør-øst	Tor Even Marthinsen	22845521	25.09.2018	2012/1944/REK sør-øst C
			Deres dato:	Deres referanse:
			24.08.2018	

Vår referanse må oppgis ved alle henvendelser

Vahid Bemanian

Akershus universitetssykehus

Sykehusveien 25

1478 Lørenskog

2012/1944 Kolorektal kreft: tidlig deteksjon ved hjelp av ikke-invasive biomarkører og overvåking av intestinal bakterieflora

Forskningsansvarlig: Akershus universitetssykehus HF

Prosjektleder: Vahid Bemanian

Vi viser til søknad om prosjektendring datert 24.08.2018 for ovennevnte forskningsprosjekt. Søknaden er behandlet av leder for REK sør-øst C på fullmakt, med hjemmel i helseforskningsloven § 11.

Endringsøknadens innhold

Endringen består i at antallet deltakere økes, fra 125 til 175. De nye deltakerne vil inngå i hhv. armen med kolorektal kreft og armen med adenomatøs polypp, mens antallet i kontrollgruppen forblir det samme.

Samtidig søkes det om en forlengelse av prosjektperiode, ut 2022.

Det skal gjøres nye analyser i prosjektet, og søker angir i den sammenheng:

Hoveddelene ved prosjektet kan oppsummeres slik:

1. *Vi vil kartlegge forandringer i mikrobiell flora hos pasienter ved å bruke molekylære metoder blant annet PCR (Polymerase Chain Reaction) og neste-generasjon sekvensering (NGS). Våre bakterielle analyser blir utført på avføring eller biopsier samlet fra pasienter som har gitt skriftlig samtykke til deltakelse i studien. Fra disse prøvene vil det bli ekstrahert bakteriell genomisk DNA og RNA som vil bli analysert med overnevnte metoder. Data vil bli lagret aidentifisert i Ahus' forskningsdatabase. Forskningsdatabase er adgangsbegrenset, og sekvensdata fra bakterier anses som ikke-sensitiv informasjon. Lagring av data i denne databasen vurderes derfor som trygt.*

2. *I tillegg ønsker vi å se på de molekylære egenskapene til tumorer som er assosiert med overvekst av *Fusobacterium nucleatum* eller andre aktuelle bakterier hos utvalgte kolorektalkreft-pasienter. Til det skal genetiske og epigenetiske forandringer i tumorceller fra tarmbiopsier undersøkes. Vårt hovedmål er å undersøke mutasjoner i kreft-relaterte gener som onkogener (KRAS, BRAF og PIK3CA), mikrosatellit ustabilitet og DNA hypermetylering. I forbindelse med publisering av manuskripter kreves det en del metadata som inkluderer informasjon om kjønn, bruk av antibiotika, og patologiske tilstander av tumor biopsi. Slike data vil ikke være personidentifiserende.*

3. *Vi vil undersøke uttrykk av en rekke regulatoriske mikroRNA i blodprøver fra kolorektal kreft pasienter sammenliknet med uttrykkningsnivå og mønster av mikroRNA hos kontroll gruppen.*

4. *Det kan være aktuelt for oss å lagre bakterielle data i Europiske sikker servere for eksempel EGA (the European Genome-Phenome Archive; <https://ega-archive.org/>). Noen av vitenskaplige tidsskrifter krever det*

eller krever de tilgang til råsekvensdata for å bekrefte nye funn.

Komiteens vurdering

Komiteen har ingen innvendinger til de metodologiske endringene i prosjektet, men Komiteen setter som vilkår for godkjenning at informasjonsskrivet knyttet til studien revideres i tråd med ny mal på REKs nettsider, slik at informasjonen som gis til deltakerne er forenlig med ny personopplysningslov.

Vedtak

Komiteen har gjort en forskningsetisk vurdering av endringene i prosjektet, og godkjenner prosjektet slik det nå foreligger, jf. helseforskningsloven § 11, under forutsetning av at ovennevnte vilkår er oppfylt.

Vi gjør samtidig oppmerksom på at etter ny personopplysningslov må det også foreligge et behandlingsgrunnlag etter personvernforordningen. Det må forankres i egen institusjon.

Tillatelsen gjelder til 31.12.2022. Av dokumentasjonshensyn skal prosjektopplysningene likevel bevares inntil 31.12.2027. Opplysningene skal deretter slettes eller anonymiseres, senest innen et halvt år fra denne dato.

Komiteens vedtak kan påklages til Den nasjonale forskningsetiske komité for medisin og helsefag, jf. Forvaltningslovens § 28 flg. Eventuell klage sendes til REK Sør-Øst. Klagefristen er tre uker fra mottak av dette brevet.

Med vennlig hilsen

Britt-Ingjerd Nesheim
professor dr. med.
leder REK sør-øst C

Tor Even Marthinsen
seniorrådgiver

Kopi til: *hlur@ahus.no; personvern@ahus.no*

Region:	Saksbehandler:	Telefon:	Vår dato:	Vår referanse:
REK sør-øst C	Claus Henning Thorsen	22845515	22.11.2019	26284
			Deres referanse:	

Vahid Bemanian

26284 Kolorektal kreft: tidlig deteksjon ved hjelp av ikke-invasive biomarkører og overvåking av intestinal bakterieflora

Forskningsansvarlig: Akershus universitetssykehus HF

Søker: Vahid Bemanian

REKs vurdering

REK-prosjekt 2012/1944.

Vi viser til søknad om prosjektendring, mottatt 24.09.2019. Søknaden er behandlet av leder for REK sør-øst C på fullmakt.

Prosjektendringen består av følgende:

1. Ny prosjektslutt er 01.09.2025.
2. Forsker Per Christian Sæther og bioingeniør/MSC student Annette Knapskog Alte blir nye prosjektmedarbeidere.
3. Annen endring
-man ønsker å studere inflammatoriske biomarkører i tumorbiopsier.
-man ønsker å studere egenskaper med mikrober assosiert med kolorektal cancer.

Komiteen har vurdert søknaden og har ingen forskningsetiske innvendinger til endringen av prosjektet.

Vedtak

Alle skriftlige henvendelser om saken må sendes via REK-portalene
Du finner informasjon om REK på våre hjemmesider rekportalen.no

Godkjent

REK har gjort en forskningsetisk vurdering av endringene i prosjektet, og godkjenner prosjektet slik det nå foreligger, jf. helseforskningsloven § 11.

Vi gjør samtidig oppmerksom på at etter ny personopplysningslov må det også foreligge et behandlingsgrunnlag etter personvernforordningen. Det må forankres i egen institusjon.

Tillatelsen er gitt under forutsetning av at prosjektendringen gjennomføres slik det er beskrevet i prosjektendringsmeldingen og endringsprotokoll, og de bestemmelser som følger av helseforskningsloven med forskrifter.

Med vennlig hilsen

Britt Ingjerd Nesheim
Prof. dr.med.
Leder REK sør-øst C

Claus H. Thorsen
seniorrådgiver
Kopi til Akershus universitetssykehus HF ved øverste administrative ledelse:
Fellesmail.Postmottak@ahus.no

Klageadgang

Du kan klage på komiteens vedtak, jf. forvaltningsloven § 28 flg. Klagen sendes til REK sør-øst C. Klagefristen er tre uker fra du mottar dette brevet. Dersom vedtaket opprettholdes av REK sør-øst C, sendes klagen videre til Den nasjonale forskningsetiske komité for medisin og helsefag (NEM) for endelig vurdering.

Vedlegg 3 - 6

Vedlegg 3: Eksempler på RNA konsentrasjonsmålinger utført med Qubit og Nanodrop(renhet og kontrollmåling før fortynning til Qubit range). Mengde total RNA inn i RT-PCR var 400ng. Tabell viser også utregninger for templat volum inn i RT-PCR (totalt 12µl) med evt. fortynning.

PrøveID	Gruppe	Nanodrop RNA kons ng/µl ved 1:2 fort.	Renhet 260/280	Fortynning før Qubit måling	Qubit RNA kons ng/µl	Fortynning fra originalrør	RNA kons. Originalrør ng/µl	Mengde templat inn i RT-PCR, justert til 400ng total RNA + mengde vann (tot 12µl reaksjon)	Konsentrasjon total RNA inn i c-DNA syntese etter utregning
C1-2	Tumor	42,4	1,99	1:2	19,5	1:4	78	5,2 µl + 6,8 µl vann	405,6 ng
C1-3	Marginalsone	37,8	2,08	1:2	13,8	1:4	55,2	7,3 µl + 4,7 µl vann	403 ng
C2-2	Tumor	108,7	2,07	1:2	46,6	1:4	186,4	2,15 µl + 9,85 µl vann (2,2 µl + 9,8 µl vann)	400 ng 410 ng
C2-3	Marginalsone	67,1	2,03	1:2	29,2	1:4	116,8	3,5 µl + 8,5 µl vann	408,8 ng
C3-2	Tumor	121,7	2,08	1:2	51	1:4	204	2 µl + 10 µl vann	408 ng
C3-3	Marginalsone	97,8	2,07	1:2	39,6	1:4	158,4	2,5 µl + 9,5 µl vann	396 ng
C4-2	Tumor	78,8	2,03	1:2	31,4	1:4	125,6	3,2 µl + 8,8 µl vann	401,9 ng
C4-3	Marginalsone	37	2,04	1:2	17	1:4	68	5,9 µl + 6,1 µl vann	401,2 ng
C5-2	Tumor	59,2	2,03	1:2	26,8	1:4	107,2	3,8 µl + 8,2 µl vann	407,4 ng
C5-3	Marginalsone	93,2	2,08	1:2	40,5	1:4	162	2,5 µl + 9,5 µl vann	405 ng
C6-2	Tumor	23,8	2,09	1:2	8,07	1:4	32,28	12 µl templat	387,4 ng
C6-3	Marginalsone	171,9	2,08	1:2	66	1:4	264	1,5 µl + 10,5µl vann	396 ng
C7-2	Tumor	61,5	2,04	1:2	24,6	1:4	98,4	4,1µl + 7,9 µl vann	403,4 ng
C7-3	Marginalsone	134,9	2,1	1:2	55	1:4	220	1,8 µl + 10,2µl vann	396 ng

C8-2	Tumor	151,3	2,1	1:2	60	1:4	240	1,7 µl + 10,3µl vann	408 ng
C8-3	Marginalsone	66,7	2,05	1:2	27,1	1:4	108,4	3,7 µl + 8,3 µl vann	401,1 ng
C9-2	Tumor	40,6	2,01	1:10	2,2	1:20	44	9,1 µl + 2,9 µl vann	400,4 ng
C9-3	Marginalsone	128,1	2,07	1:10	9,04	1:20	180,8	2,2 µl + 9,8 µl vann	397,8 ng
C10-2	Tumor	514,8	2,07	1:10	49,5	1:20	990	Fortynn 1:10 først. Deretter: 4,1 µl + 7,9 µl vann	405,9 ng
C10-3	Marginalsone	282,4	2,09	1:10	26,2	1:20	524	Fortynn 1:10 først. Deretter: 7,7 µl + 4,3 µl vann	403,5 ng
C11-2	Tumor	237,2	2,11	1:10	21,3	1:20	426	Fortynn 1:3 først. Deretter: 2,8 µl + 9,2 µl vann	397,6 ng
C11-3	Marginalsone	153,8	2,07	1:10	12,8	1:20	256	1,6 µl + 10,4µl vann	409,6 ng
C12-2	Tumor	83,8	2,06	1:10	6,68	1:20	133,6	3 µl + 9 µl vann	400,8 ng
C12-3	Marginalsone	237,2	2,1	1:10	22,2	1:20	444	Fortynn 1:3 først. Deretter: 2,7 µl + 9,3 µl vann	399,6 ng
C13-2	Tumor	262,4	2,1	1:10	26,2	1:20	524	7,7 µl + 4,6 µl vann	403,5 ng
C13-3	Marginalsone	220,5	2,09	1:10	19,5	1:20	390	Fortynn 1:3 først. Deretter: 3,1 µl + 8,9 µl vann	403 ng
C14-2	Tumor	246,5	2,1	1:10	23,5	1:20	470	Fortynn 1:3 først. Deretter: 2,6 µl + 9,4 µl vann	407,3 ng

C14-3	Marginalsone	159,6	2,09	1:10	13,9	1:20	278	Fortynn 1:3 først.	407,8 ng
-------	--------------	-------	------	------	------	------	-----	--------------------	----------

								Deretter: 4,4 µl + 7,6 µl vann	
C15-2	Tumor	352,8	2,07	1:10	33,4	1:20	668	Fortynn 1:10 først. Deretter: 6 µl + 6 µl vann	400,8 ng
C15-3	Marginalsone	191,2	2,09	1:10	17	1:20	340	Fortynn 1:3 først. Deretter: 3,6 µl + 8,4 µl vann	407,9 ng
C16-2	Tumor	837,1	2,1	1:10	77	1:20	1540	Fortynn 1:10 først. Deretter: 2,6 µl + 9,4 µl vann	400,4 ng
C16-3	Marginalsone	148,4	2,09	1:10	12,9	1:20	258	1,6 µl + 10,4µl vann	412,8 ng
C17-2	Tumor	204,7	2,11	1:10	19,1	1:20	382	Fortynn 1:3 først. Deretter: 3,2 µl + 8,8 µl vann	407,4 ng
C17-3	Marginalsone	442,7	2,1	1:10	46,4	1:20	928	Fortynn 1:10 først. Deretter: 4,3 µl + 7,7 µl vann	399 ng
C18-2	Tumor	286,5	2,11	1:10	25,9	1:20	518	Fortynn 1:3 først. Deretter: 2,3 µl + 9,7 µl vann	397,1 ng
C18-3	Marginalsone	322,8	2,1	1:10	32,9	1:20	658	Fortynn 1:10 først. Deretter: 6,1 µl + 5,9 µl vann	401,4 ng
C19-2	Tumor	631,8	2,07	1:10	57	1:20	1140	Fortynn 1:10 først. Deretter: 3,5 µl + 8,5 µl vann	399 ng
C19-3	Marginalsone	218,2	2,09	1:10	19,9	1:20	398	Fortynn 1:3 først. Deretter: 3 µl + 9 µl vann	398 ng

C20-2	Tumor	73,1	2,05	1:10	4,61	1:20	92,2	4,4 µl + 7,6 µl vann	405,7 ng
C20-3	Marginalsone	216	2,08	1:10	20,7	1:20	414	Fortynn 1:3 først. Deretter: 2,9 µl + 9,1 µl vann	400,2 ng
C21-2	Tumor	121,1	2,08	1:10	11,3	1:20	226	1,8 µl + 10,2µl vann	406,8 ng
C21-3	Marginalsone	145,4	2,07	1:10	13,4	1:20	268	1,5 µl + 10,5µl vann	402 ng
C22-2	Tumor	644,6	2,12	1:10	56	1:20	1120	Fortynn 1:10 først. Deretter: 3,6 µl + 8,4 µl vann	403,2 ng
C22-3	Marginalsone	212,8	2,09	1:10	18,4	1:20	368	Fortynn 1:3 først. Deretter: 3,3 µl + 8,7 µl vann	404,8 ng
C23-2	Tumor	349,4	2,1	1:10	30,8	1:20	616	Fortynn 1:10 først. Deretter: 6,5 µl + 5,5 µl vann	400,4 ng
C23-3	Marginalsone	370,8	2,1	1:10	32,1	1:20	642	Fortynn 1:10 først. Deretter: 6,3 µl + 5,7 µl vann	404,5 ng
C24-2	Tumor	341	2,11	1:10	33,2	1:20	664	Fortynn 1:10 først. Deretter: 6,1 µl + 5,9 µl vann	405 ng
C24-3	Marginalsone	242,9	2,1	1:10	20,1	1:20	402	Fortynn 1:3 først. Deretter: 3 µl + 9 µl vann	402 ng
C25-2	Tumor	305,5	2,13	1:10	26,9	1:20	538	Fortynn 1:10 først. Deretter: 7,5µl + 4,5 µl vann	403,5 ng
C25-3	Marginalsone	328,6	2,13	1:10	27,0	1:20	540	Fortynn 1:10 først. Deretter:	399,6 ng

								7,4 μ l + 4,6 μ l vann	
Enk 191028	Fra ekstraksjon C25 191028aka	1,0	1,12		Out of range (<5)	1:2			

Vedlegg 4: Rådata for referansegenene,

Effektivitetskorrigerede Ct verdier og gj.snitt (POLR2A og UBC)

Prøve ID/ lokalisasjon	Gj.snitt POLR2A	E POLR2A	E-korrigert gjsn POLR2A	Gjsn UBC	E UBC	E-korrigert gjsn UBC	Gjsn 2 refgener (POL2A /UBC)
C1-2	22,33	1,91	20,84667701	22,53	1,85	19,99594435	20,42131068
C1-3	23,925	1,91	22,33572537	23,315	1,85	20,69265169	21,51418853
C2-2	22,29	1,91	20,80933411	22,875	1,85	20,30214057	20,55573734
C2-3	23,005	1,91	21,47683854	22,5	1,85	19,96931859	20,72307857
C3-2	21,98	1,91	20,51992659	19,64	1,85	17,43099632	18,97546145
C3-3	22,73	1,91	21,22010607	20,405	1,85	18,10995315	19,66502961
C4-2	22,725	1,91	21,2154382	23,175	1,85	20,56839815	20,89191818
C4-3	24,2	1,91	22,59245785	23,47	1,85	20,8302181	21,71133798
C5-2	24,06	1,91	22,46175768	23,615	1,85	20,95890927	21,71033347
C5-3	23,865	1,91	22,27971101	23,49	1,85	20,84796861	21,56383981
C6-2	24,035	1,91	22,43841836	22,82	1,85	20,25332668	21,34587252
C6-3	23,115	1,91	21,57953153	22,77	1,85	20,20895041	20,89424097
C7-2	23,785	1,91	22,2050252	23,07	1,85	20,475208	21,3401166
C7-3	23,4	1,91	21,84559974	22,95	1,85	20,36870496	21,10715235
C8-2	22,99	1,91	21,46283495	23,105	1,85	20,50627138	20,98455317

C8-3	23,815	1,91	22,23303238	22,895	1,85	20,31989107	21,27646173
C9-2	24,145	1,91	22,54111135	20,415	1,85	18,1188284	20,32996988
C9-3	23,195	1,91	21,65421734	20,625	1,85	18,30520871	19,97971303
C10-2	23,52	1,91	21,95762845	22,355	1,85	19,84062743	20,89912794
C10-3	22,955	1,91	21,43015991	22,275	1,85	19,76962541	20,59989266
C11-2	22,76	1,91	21,24811325	22,97	1,85	20,38645547	20,81728436
C11-3	23,145	1,91	21,60753871	22,69	1,85	20,13794839	20,87274355
C12-2	24,075	1,91	22,47576127	23,505	1,85	20,86128149	21,66852138
C12-3	23,595	1,91	22,0276464	23,52	1,85	20,87459437	21,45112038
C13-2	24,64	1,91	23,00322981	23,53	1,85	20,88346962	21,94334971
C13-3	23,99	1,91	22,39640759	23,735	1,85	21,0654123	21,73090995
C14-2	23,43	1,91	21,87360691	23,025	1,85	20,43526936	21,15443814
C14-3	23,85	1,91	22,26570742	23,595	1,85	20,94115876	21,60343309
C15-2	23,1	1,91	21,56552794	22,605	1,85	20,06250875	20,81401834
C15-3	23,75	1,91	22,17235016	23,35	1,85	20,72371507	21,44803262
C16-2	23,15	1,91	21,61220658	23,765	1,85	21,09203806	21,35212232
C16-3	23,99	1,91	22,39640759	23,965	1,85	21,26954311	21,83297535
C17-2	24,725	1,91	23,08258348	24,305	1,85	21,57130171	22,32694259
C17-3	24,895	1,91	23,24129083	24,58	1,85	21,81537115	22,52833099

C18-2	23,815	1,91	22,23303238	22,485	1,85	19,95600571	21,09451905
C18-3	23,85	1,91	22,26570742	22,905	1,85	20,32876633	21,29723687
C19-2	21,7	1,91	20,25852625	20,1	1,85	17,83925794	19,0488921
C19-3	23,585	1,91	22,01831067	20,62	1,85	18,30077108	20,15954088
C20-2	25,095	1,91	23,42800536	22,155	1,85	19,66312237	21,54556387
C20-3	23,125	1,91	21,58886726	20,405	1,85	18,10995315	19,8494102
C21-2	24,145	1,91	22,54111135	20,44	1,85	18,14101653	20,34106394
C21-3	23,45	1,91	21,89227837	20,48	1,85	18,17651754	20,03439796
C22-2	23,11	1,91	21,57486367	22,395	1,85	19,87612844	20,72549605
C22-3	23,11	1,91	21,57486367	22,65	1,85	20,10244738	20,83865553
C23-2	22,985	1,91	21,45816709	19,13	1,85	16,97835843	19,21826276
C23-3	23,18	1,91	21,64021375	20,04	1,85	17,78600643	19,71311009
C24-2	23,445	1,91	21,8876105	21,19	1,85	18,80666049	20,3471355
C24-3	23,085	1,91	21,55152435	20,35	1,85	18,06113926	19,80633181
C25-2	25,145	1,91	23,47468399	23,695	1,85	21,02991129	22,25229764
C25-3	24,41	1,91	22,7885081	22,85	1,85	20,27995244	21,53423027

Prøve ID: C (nr.X-2)= prøvenr. Tumor

Prøve ID: C(nr.X-3) = prøvenr.Marginalsone

Alle prøver og referansegener er analysert i duplikat (gjennomsnitt er vist i tabell)

Effektivitetskorrigeringsformel: $(4) Ct_{\text{justert}} = Ct_{\text{målt}} * (\log(1+E) / \log(2)) , (100)$

hvor E = gjennomsnittlig effektivitet for hver PCR-analyse, basert på alle analyserte prøver. Når E = 2 er PCR-effektiviteten 100 %.

Vedlegg 5: Eksempel på utregning av relativ genuttrykk for IL-6							
(Ct-verdier (duplikat) for IL-6/ effektivitetskorr./ normalisert ΔCt (IL-6 - 2ref)/ $\Delta\Delta Ct$ (tumor-marg)/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$							
Prøve ID/ lokalisasjon	Gj.snitt IL-6	Effektivitet IL6	E-korrigert gj.sn IL6	Gjsn 2 refgener (POL2A/UBC)	DeltaCt Target-Ref	ddCt (-2T)-(-3M)	Fold Change
C1-2	20,48	1,9	18,96446809	20,42131068	-1,456842589	-7,139256983	140,9712331
C1-3	29,37	1,9	27,19660292	21,51418853	5,682414394		
C2-2	30,125	1,9	27,89573248	20,55573734	7,339995146	-2,268037241	4,816673858
C2-3	32,755	1,9	30,33111095	20,72307857	9,608032387		
C3-2	21,705	1,9	20,09881738	18,97546145	1,123355927	-5,41739801	42,73653421
C3-3	28,3	1,9	26,20578355	19,66502961	6,540753937		
C4-2	25,99	1,9	24,06672489	20,89191818	3,174806711	-3,157747705	8,92435377
C4-3	30,285	1,9	28,04389239	21,71133798	6,332554416		
C5-2	29,605	1,9	27,41421279	21,71033347	5,703879314	-0,220573615	1,165196776
C5-3	29,685	1,9	27,48829274	21,56383981	5,924452929		
C6-2	21,61	1,9	20,01084744	21,34587252	-1,335025084	-10,13758546	1126,463977
C6-3	32,07	1,9	29,69680135	20,89424097	8,802560379		
C7-2	30,71	1,9	28,43744214	21,3401166	7,097325545	-0,779303906	1,716302565

C7-3	31,3	1,9	28,9837818	21,10715235	7,876629451		
C8-2	19,515	1,9	18,07087865	20,98455317	-2,913674514	-6,481777187	89,37362195
C8-3	26,83	1,9	24,8445644	21,27646173	3,568102673		
C9-2	19,255	1,9	17,8301188	20,32996988	-2,499851072	-11,02240015	2080,04662
C9-3	30,78	1,9	28,5022621	19,97971303	8,522549076		
C10-2	25,79	1,9	23,881525	20,89912794	2,982397065	-3,831923063	14,24045229
C10-3	29,605	1,9	27,41421279	20,59989266	6,814320128		
C11-2	26,615	1,9	24,64547452	20,81728436	3,828190167	-3,403148633	10,5791267
C11-3	30,35	1,9	28,10408235	20,87274355	7,2313388		
C12-2	20,49	1,9	18,97372809	21,66852138	-2,694793291	-8,204145979	294,9130756
C12-3	29,115	1,9	26,96047307	21,45112038	5,509352687		
C13-2	25,825	1,9	23,91393498	21,94334971	1,970585271	-5,277656587	38,79117542
C13-3	31,295	1,9	28,9791518	21,73090995	7,248241857		
C14-2	25,015	1,9	23,16387546	21,15443814	2,009437319	-5,870951075	58,52378104
C14-3	31,84	1,9	29,48382149	21,60343309	7,880388394		
C15-2	27,86	1,9	25,7983438	20,81401834	4,984325457	-2,083794023	4,239205848
C15-3	30,795	1,9	28,51615209	21,44803262	7,068119479		
C16-2	25,91	1,9	23,99264493	21,35212232	2,640522617	-3,968574171	15,65524489
C16-3	30,715	1,9	28,44207214	21,83297535	6,609096788		

C17-2	30,49	1,9	28,23372227	22,32694259	5,906779679	-8,604866071	389,3344164
C17-3	40	1,9	37,03997674	22,52833099	14,51164575		
C18-2	23,32	1,9	21,59430644	21,09451905	0,499787394	-6,316318079	79,6895187
C18-3	30,36	1,9	28,11334235	21,29723687	6,816105473		
C19-2	22,385	1,9	20,72849698	19,0488921	1,679604888	-7,352985904	163,4817638
C19-3	31,525	1,9	29,19213167	20,15954088	9,032590792		
C20-2	20,84	1,9	19,29782788	21,54556387	-2,247735983	-10,8728079	1875,172885
C20-3	30,75	1,9	28,47448212	19,8494102	8,625071916		
C21-2	25,645	1,9	23,74725509	20,34106394	3,406191146	-5,191312919	36,53767476
C21-3	30,92	1,9	28,63190202	20,03439796	8,597504066		
C22-2	24,52	1,9	22,70550574	20,72549605	1,980009689	-6,155856592	71,30130573
C22-3	31,29	1,9	28,97452181	20,83865553	8,13586628		
C23-2	23,73	1,9	21,9739662	19,21826276	2,755703442	-6,20938846	73,99667087
C23-3	30,97	1,9	28,67820199	19,71311009	8,965091902		
C24-2	22,295	1,9	20,64515704	20,3471355	0,298021541	-9,263718211	614,691281
C24-3	31,715	1,9	29,36807156	19,80633181	9,561739753		
C25-2	25,61	1,9	23,71484511	22,25229764	1,46254747	0,184782062	0,879781969
C25-3	24,635	1,9	22,81199568	21,53423027	1,277765408		

Vedlegg 6: Eksempel på PCR oppsett av prøver med dårlige ikke godkjente smeltepunktskurver for IL-10 og lave signaler.

