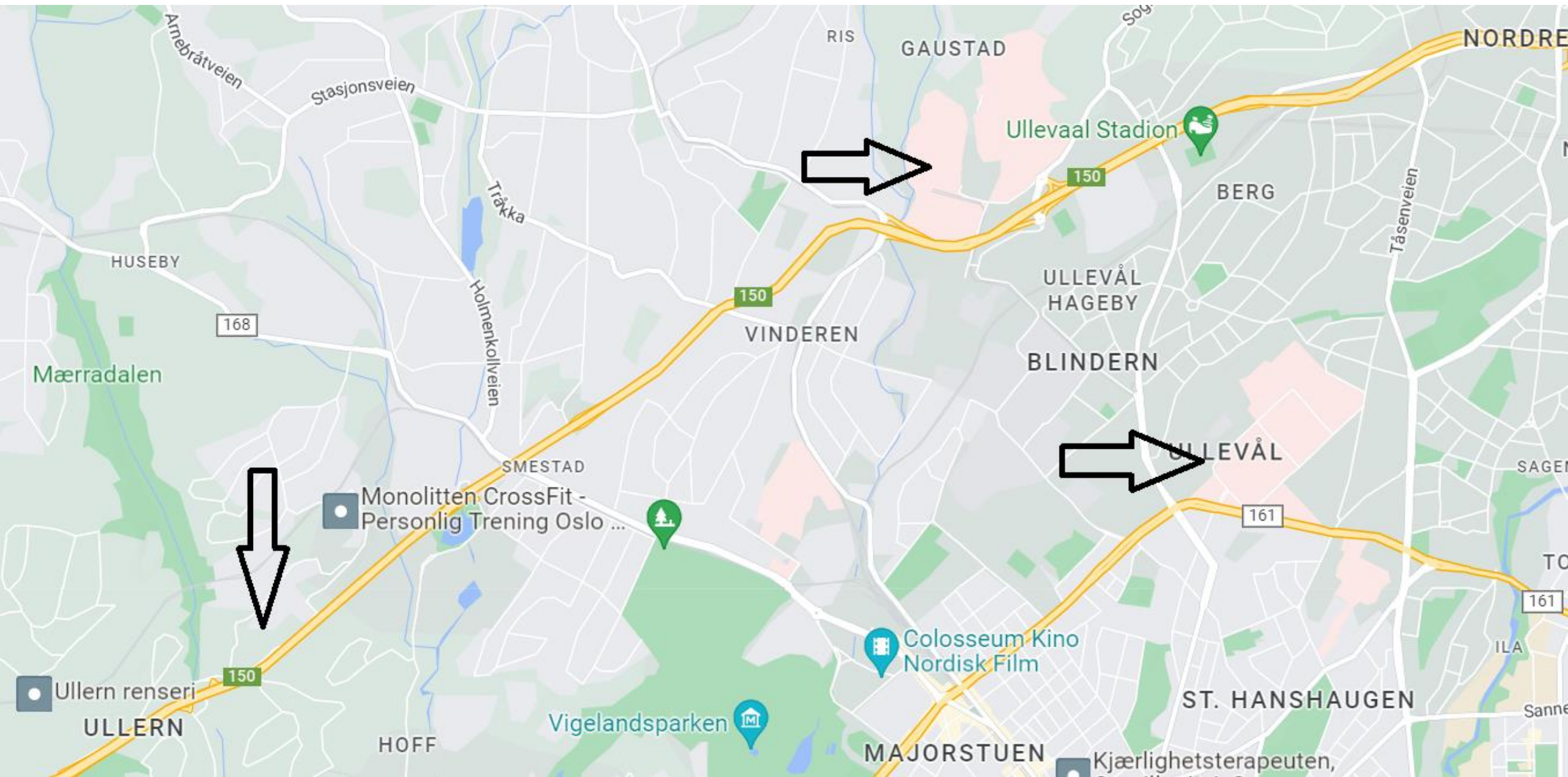
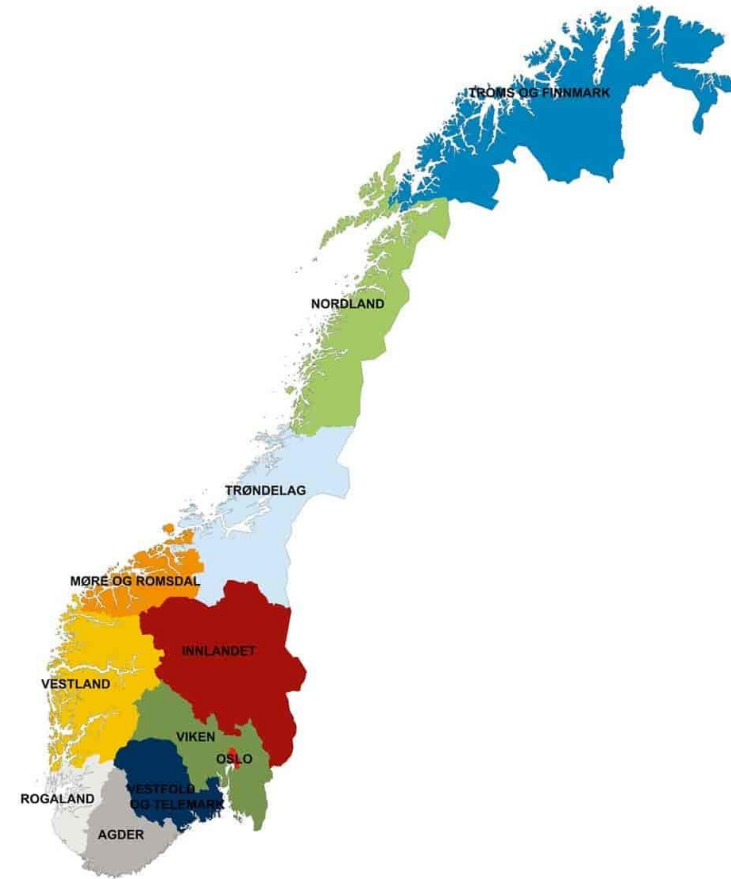


Fra perfekt prosessering til
endelig diagnose.
Hva skjer med vevet videre?

Marius Lund-Iversen
Avdeling for patologi, OUS



- Ca 100000 prøver
 - Histologi
 - Immunhistokjemi
 - Spesialfarger
 - Molekylær
 - FISH
 - Cytologi
 - Flowcytometri
 - Elektronmikroskopi



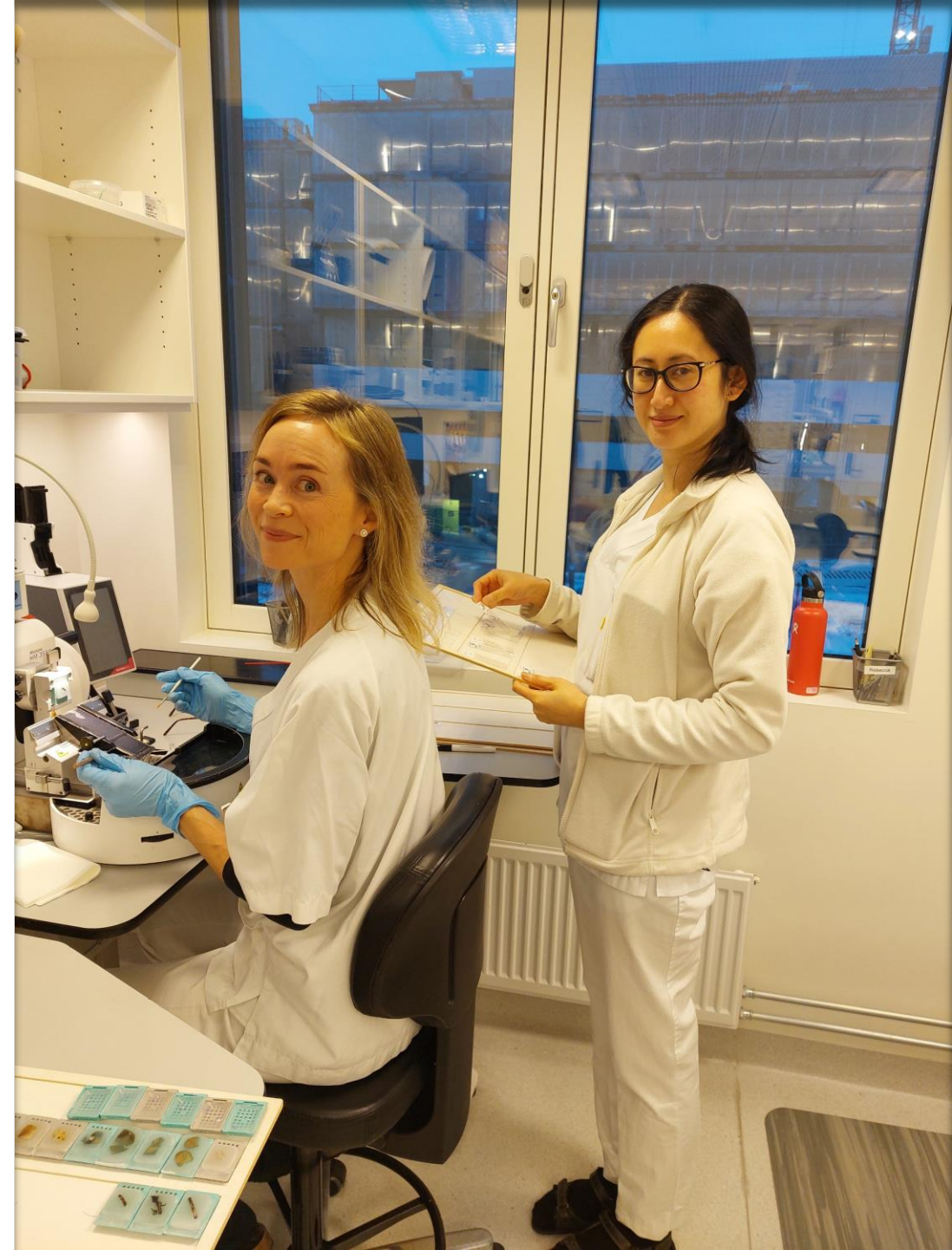
Histologi

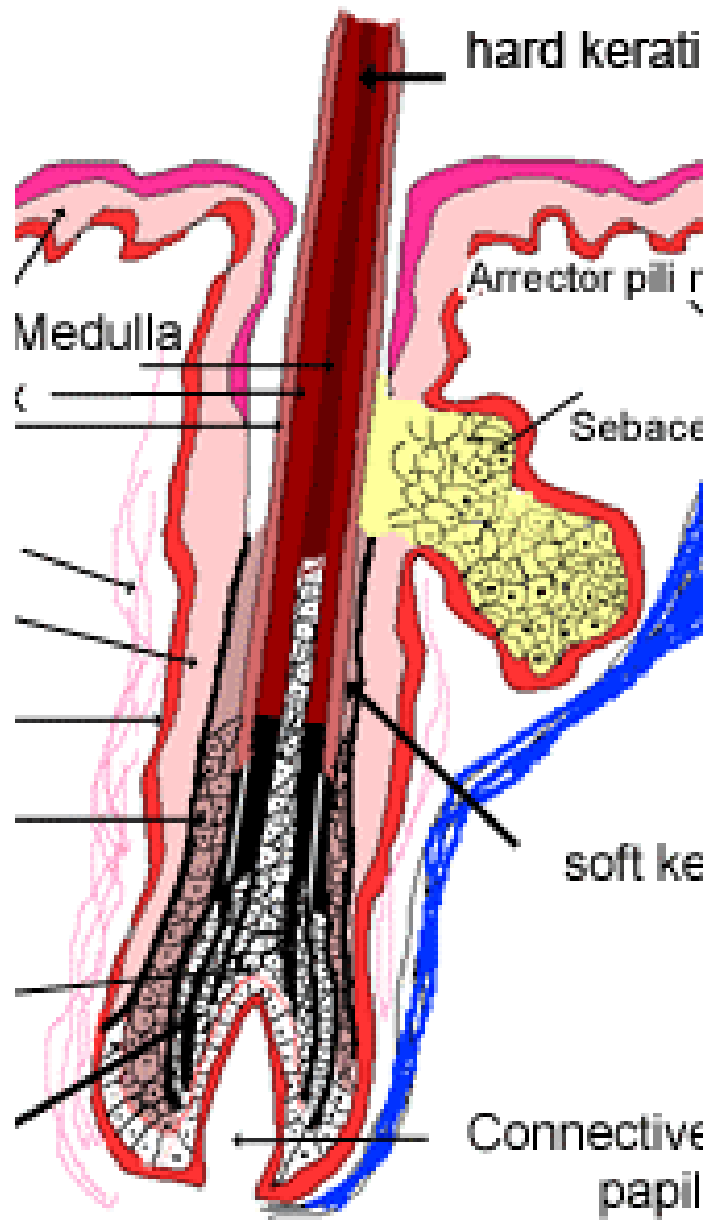
2022

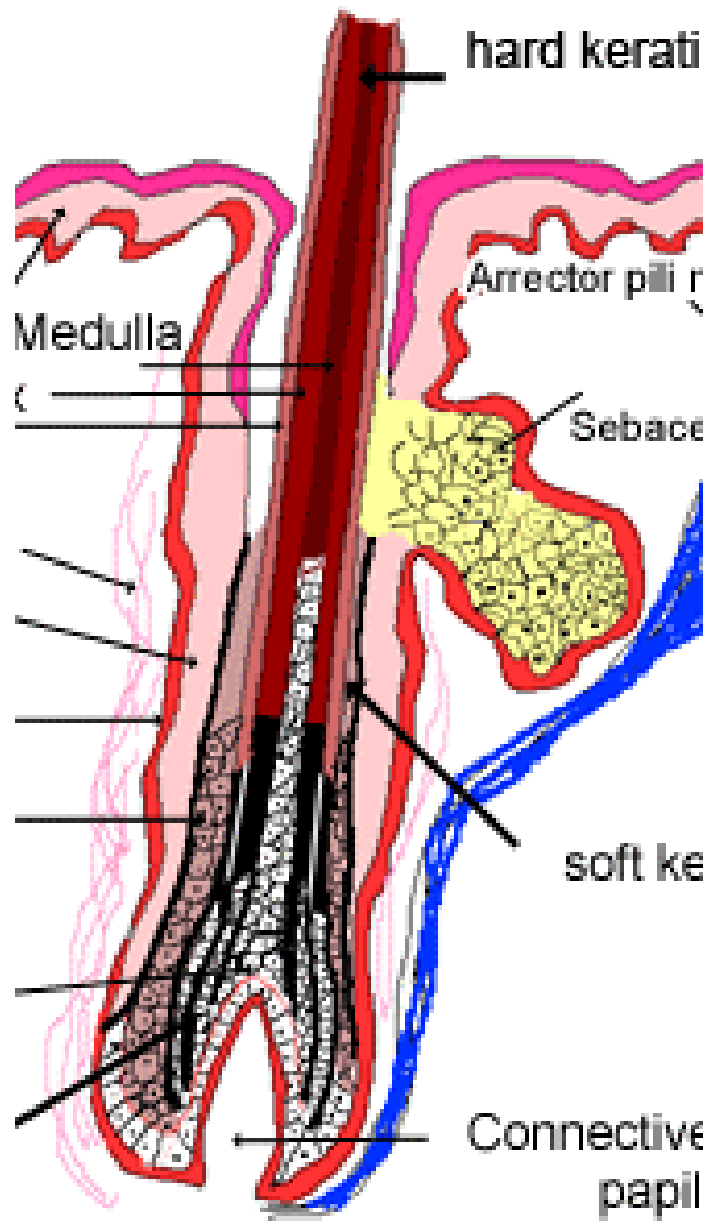
- >60000 prøver
- 518000 objektglass

2016

- Ca 60000 prøver
- 435000 objektglass

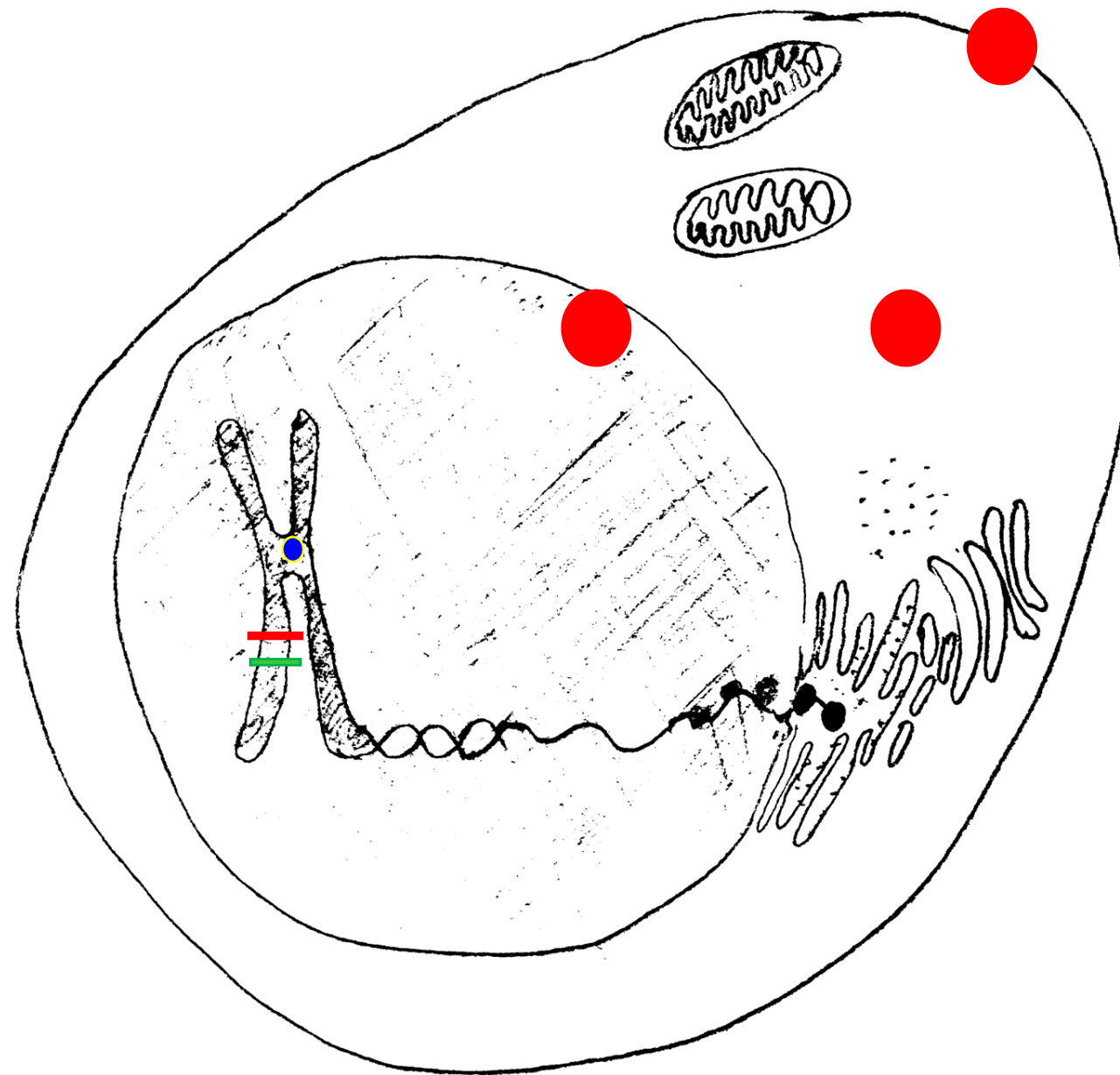


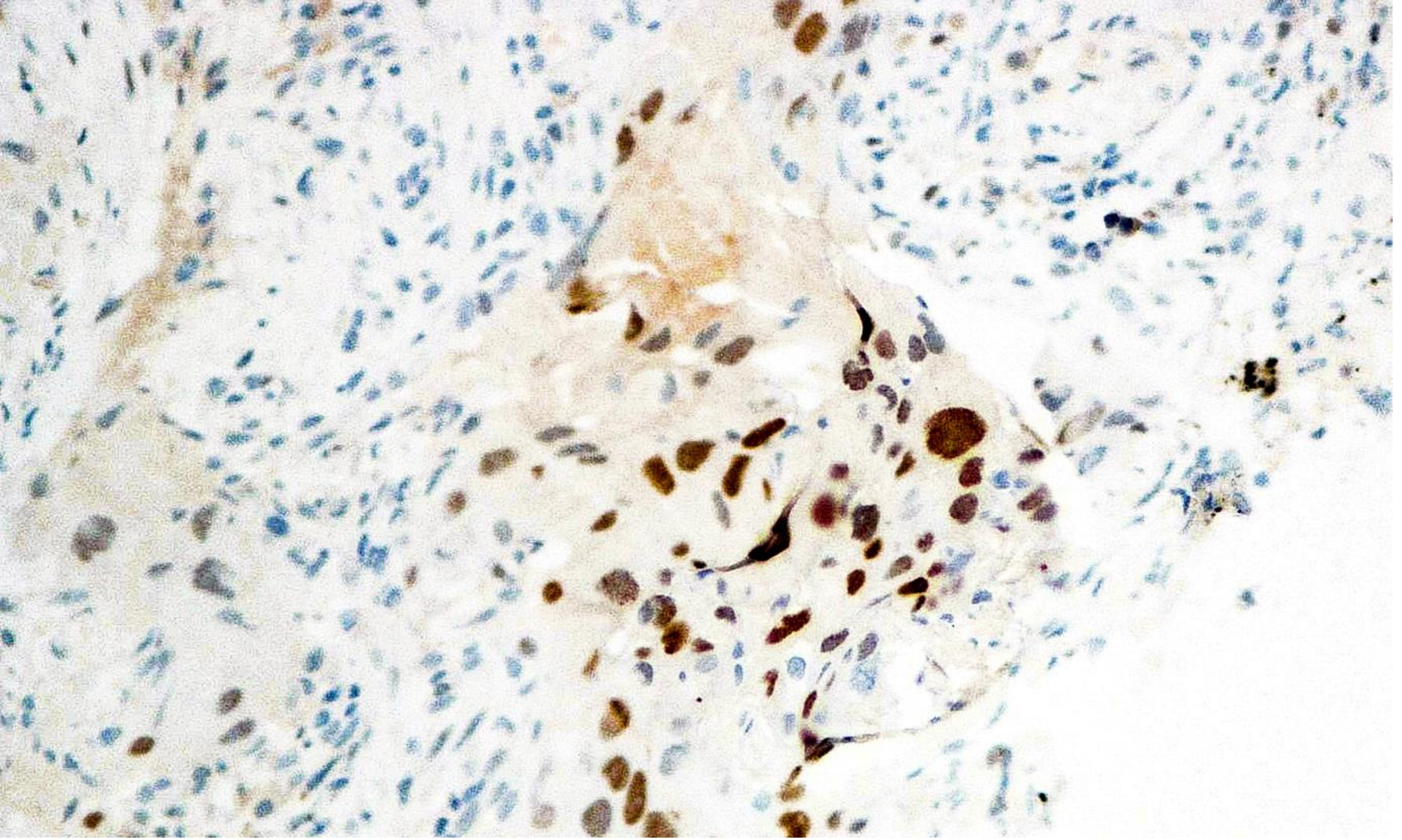


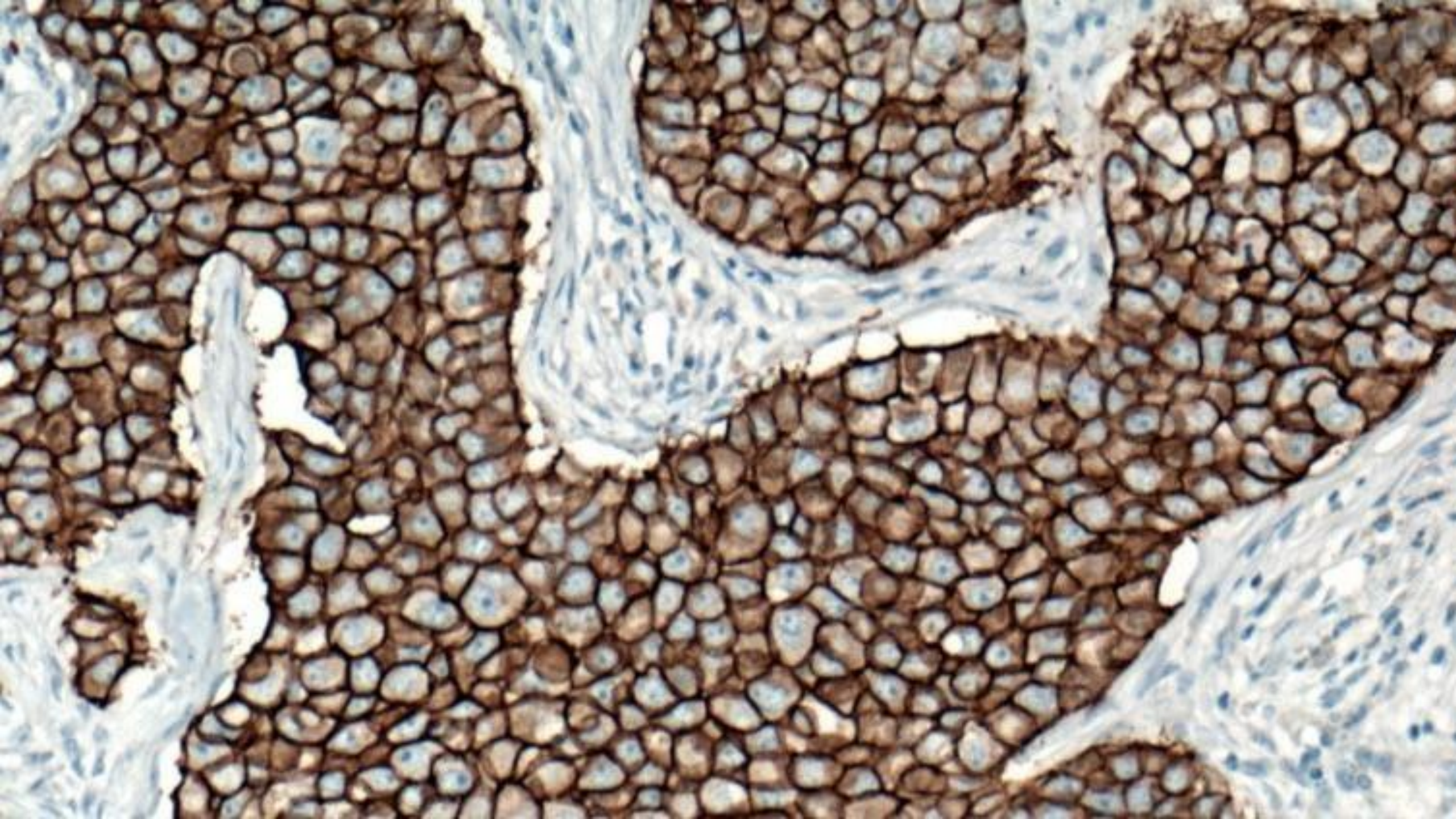


Metoder som brukes innenfor patologi

- Immunhistokjemi
- FISH
- PCR
- Sekvensering
- MLPA
- CGH



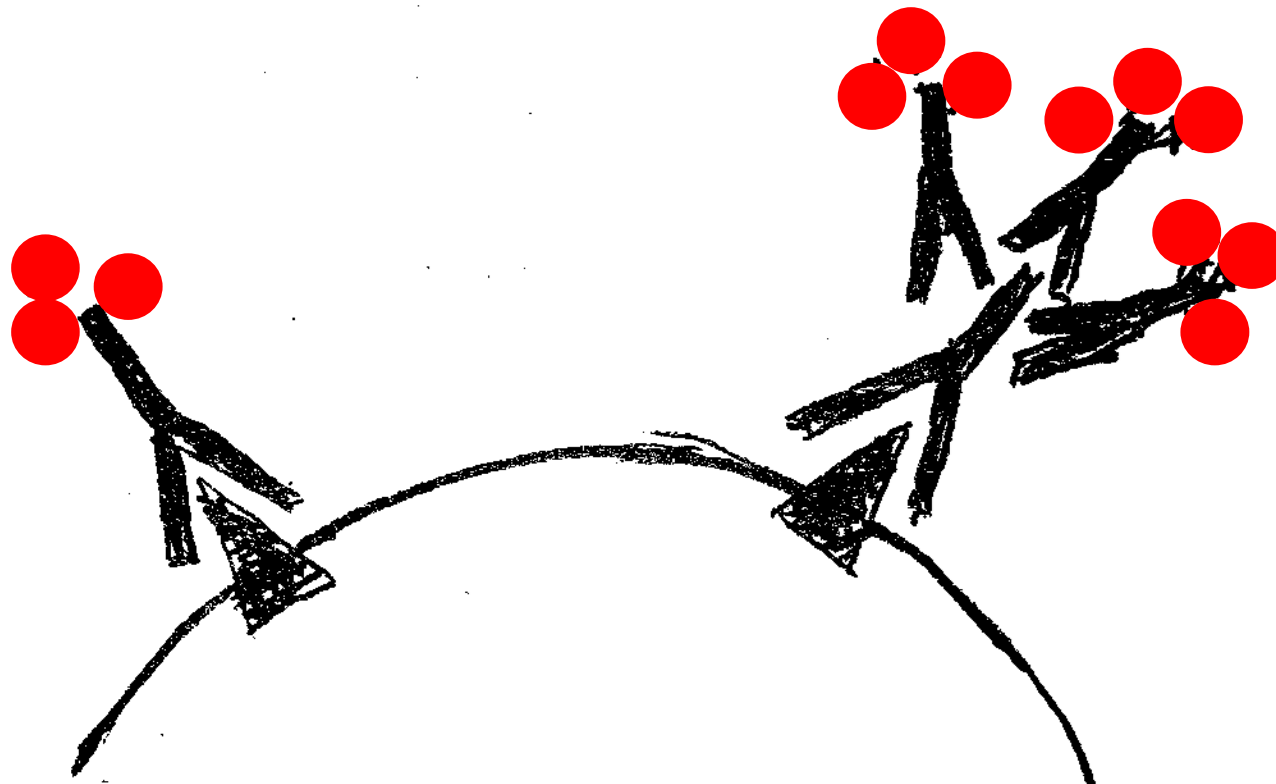




Immunhistokjemi

Direkte

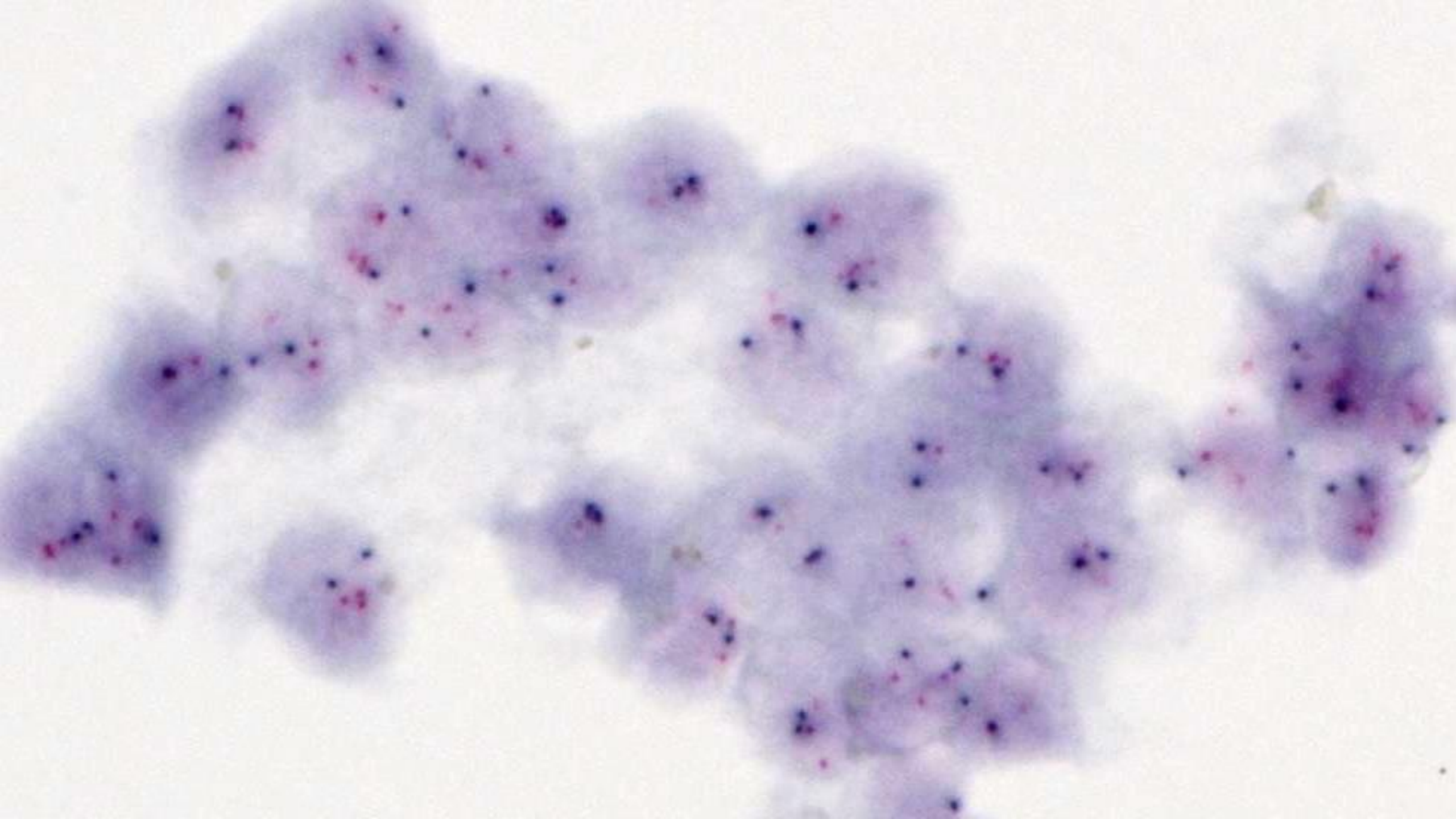
Indirekte



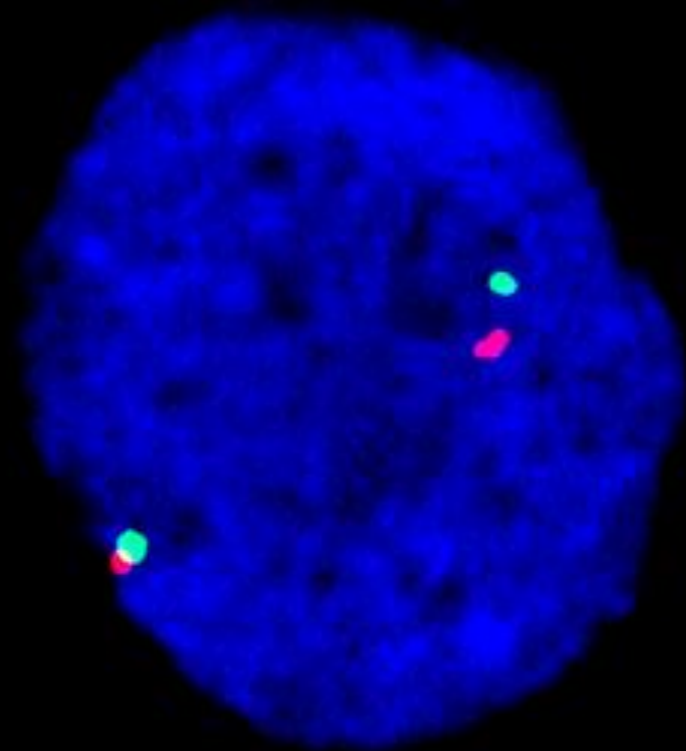
Detekterer proteiner

- Funksjonelt protein
- Dysfunksjonelt protein, for eksempel et protein som er «skadet» som følge av en mutasjon.
 - BRAF V600E
 - Tilstede/ikke tilstede kan være avgjørende for videre behandling.

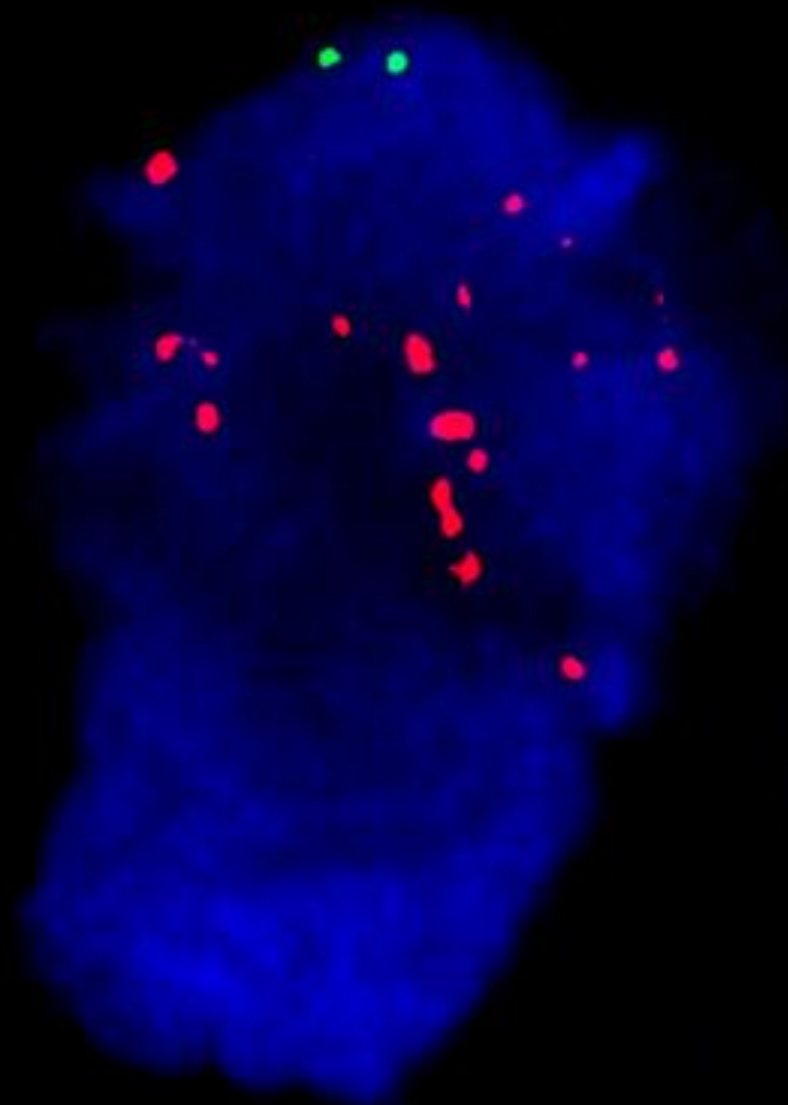
- Deparaffinisering
- Antigen gjenervervelse
- Blokkering av endogen peroksidase med hydrogenperoxid (H₂O₂)
 - Reduserer bakgrunnsfarging
- Farging med primært /eventuelt sekundært
- Tilsette deteksjonssystem
- Tilleggsfarging, oftest med hematoxylin
- Dehydrering og montering på objektglass

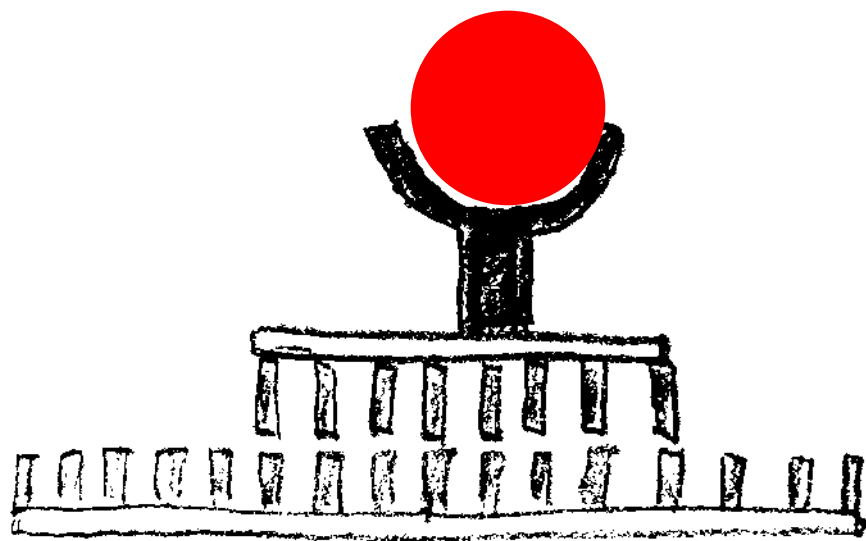


a



b



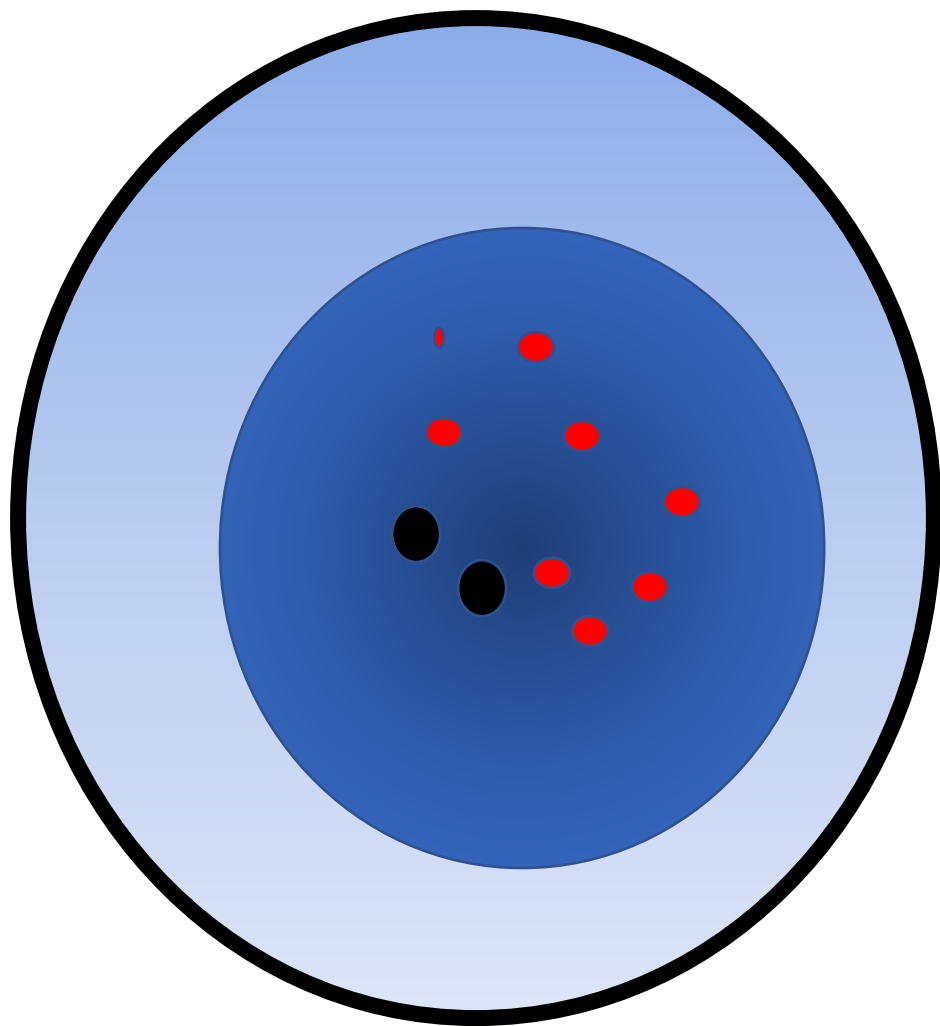


Detekterer DNA

- Telle antall kopier av et gen
- Gener eller segmenter av et kromosom som er tapt
- Rearrangering av gener
 - Diagnose
 - Behandling

- Fiksering
- Forbehandling, e.g., permeabilisering av celler og vev
- Denaturering av DNA (ikke nødvendig ved prober mot mRNA)
- Tilsetning av prober/ hybridisering
- Vask
- Immuncytokjemi/tilleggsfarging
- Mikroskopi

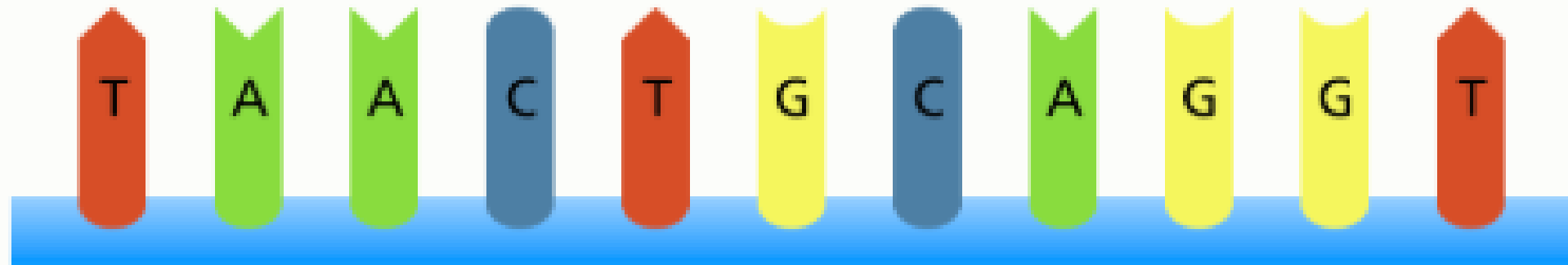
- In situ hybridisering og immunhistokjemi er teknikker der man kan visualisere proteiner eller genforandringer direkte i morfologisk kontekst.



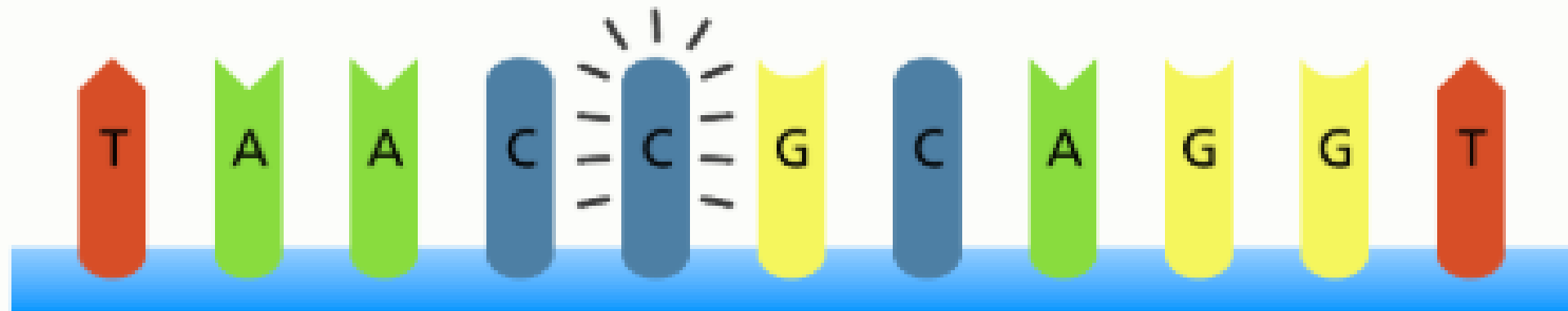


- 2 meter DNA i en celle
- 800 millioner kilometer DNA blir syntetisert/dag
 - 147 millioner kilometer fra jorden til solen
 - 20000 ganger rundt ekvator

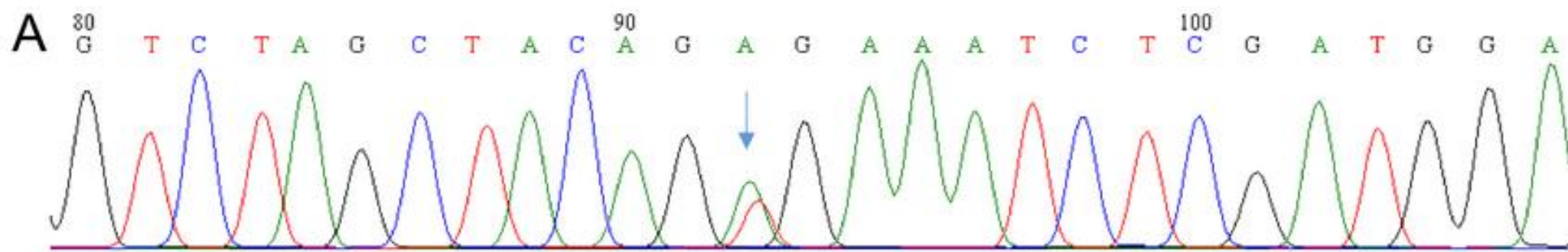
Original sequence



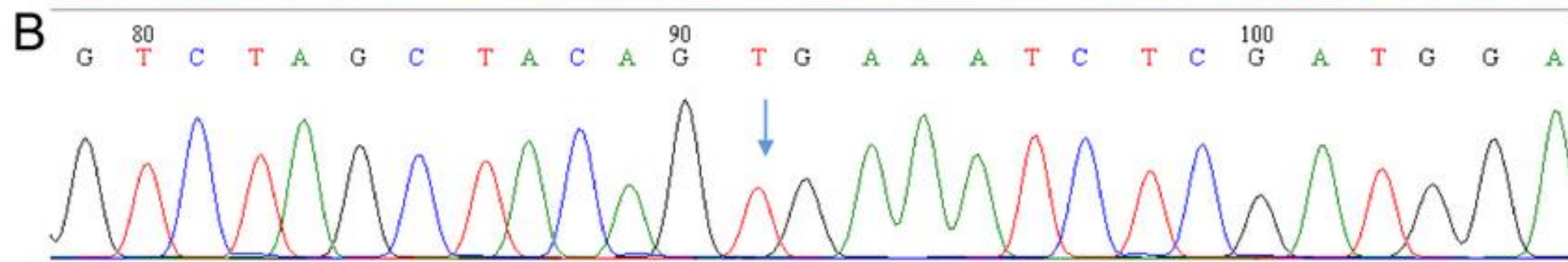
Point mutation



Mutasjon

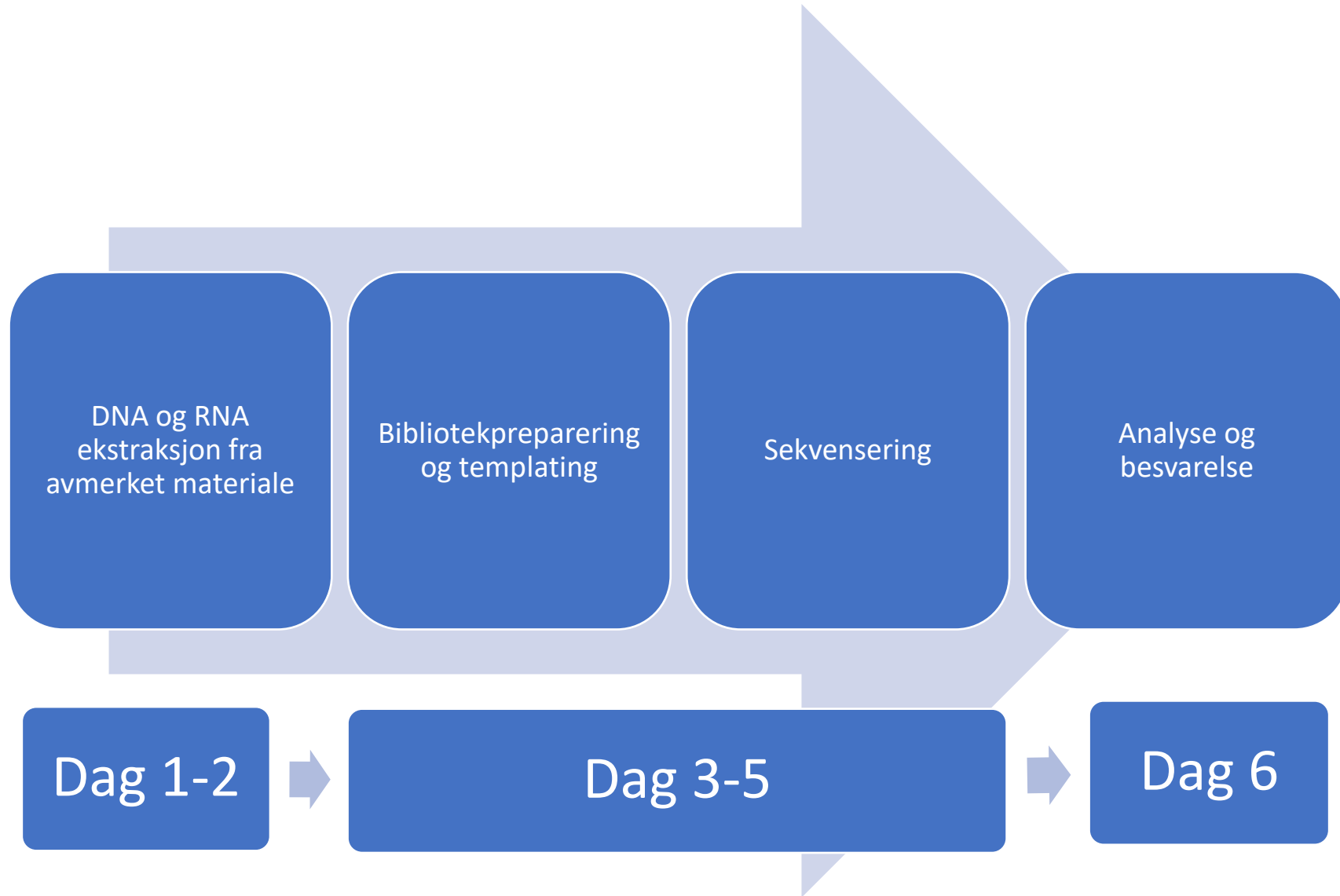


Referanse



PCR

- Tallrike typer PCR
 - qPCR
 - RT-PCR
 - Digital droplet PCR
- ...og resultatene kan måles på flere måter
 - Fragmentanalyse, for eksempel ved bestemmelse av størrelsen på fragmenter der det er homopolymerer.
- Mange likhetstrekk



Ekstraksjon av nukleinsyrer

- Etterstreber renest mulig tumorvev
- Litt forskjellige metoder avhengig av hvor mye materiale det er og om det er DNA, RNA eller begge deler som skal undersøkes videre.
- Mengden måles

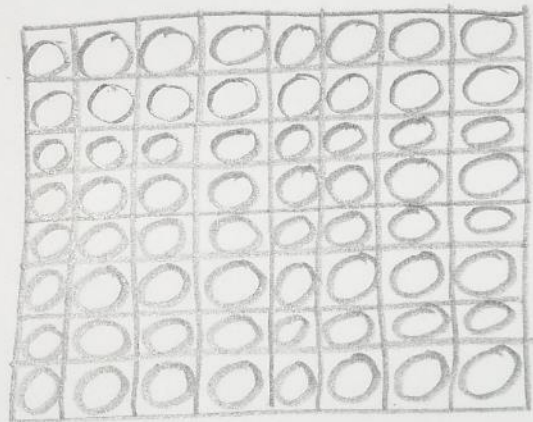
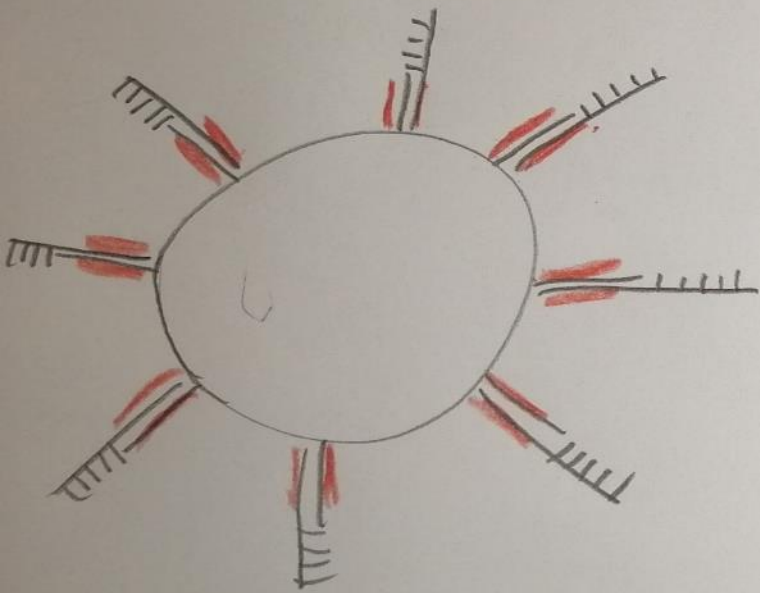
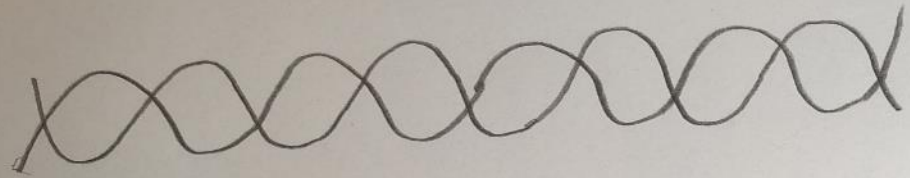
Bibliotekspreparering og templating

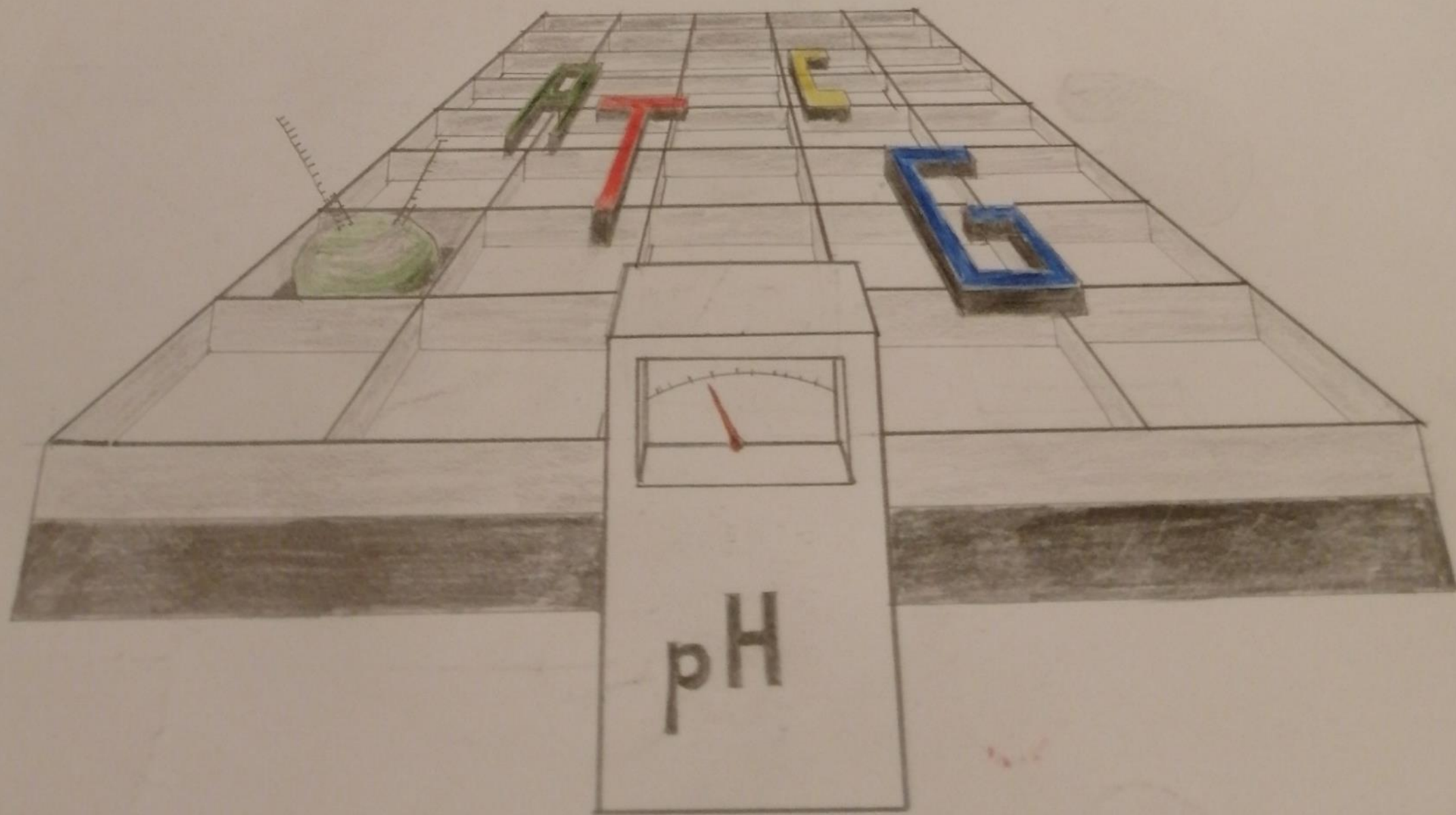
- Fragmentering
- Tilsette adaptore
- Amplifikasjon

Sekvensering

- Tilsette baser, en og en.
- Disse binder seg til komplementære baser
- Maskinen måler endring i pH (IonTorrent) eller fluorescence (Illumina) ved hver basetilsetning.

DNA





- Assembly – aligning and merging fragment of DNA to reconstruct the original sequence
- Find overlaps between reads

```

CTAGGAGCTGTTGCAGGCTTACTCTCCTCTCCTTT
CTAGGAGCTGTTGCAGGCTTACTCTCCTCTCCTTT
TAGGAGCTGTTGCAGGCTTACTCTCCTCTCCTTTG
GAGCTGTTGCAGGCTTACTCTCCTCTCCTTTGGGC
GCTGTTGCAGGCTTACTCTCCTCTCCTTTGGGCGG
TGCAGGCTTACTCTCCTCTCCTTTGGGCGGTTTAA
CAGGCTTACTCTCCTCTCCTTTGGGCGGTTTAATA
CCTCTCCTTTGGGCGGTTTAATATTGCTAATTCA
TCTCCTTTGGGCGGTTTAATATTGCTAATTCAGT
CCTTTGGGCGGTTTAATATTGCTAATTCAGTGTT

```

- Assemble reads into contigs

```

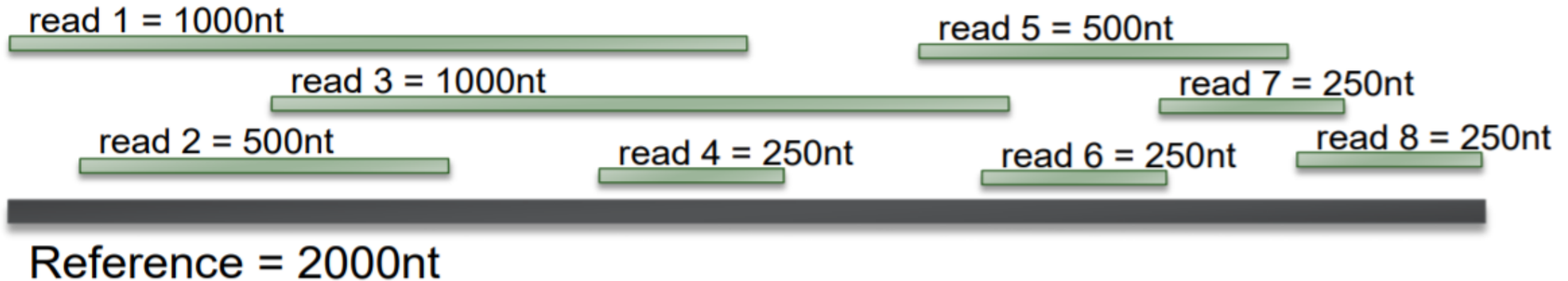
CTAGGAGCTGTTGCAGGCTTACTCTCCTCTCCTTTGGGCGGTTTAATATTGCTAATTCAGTGTT

```

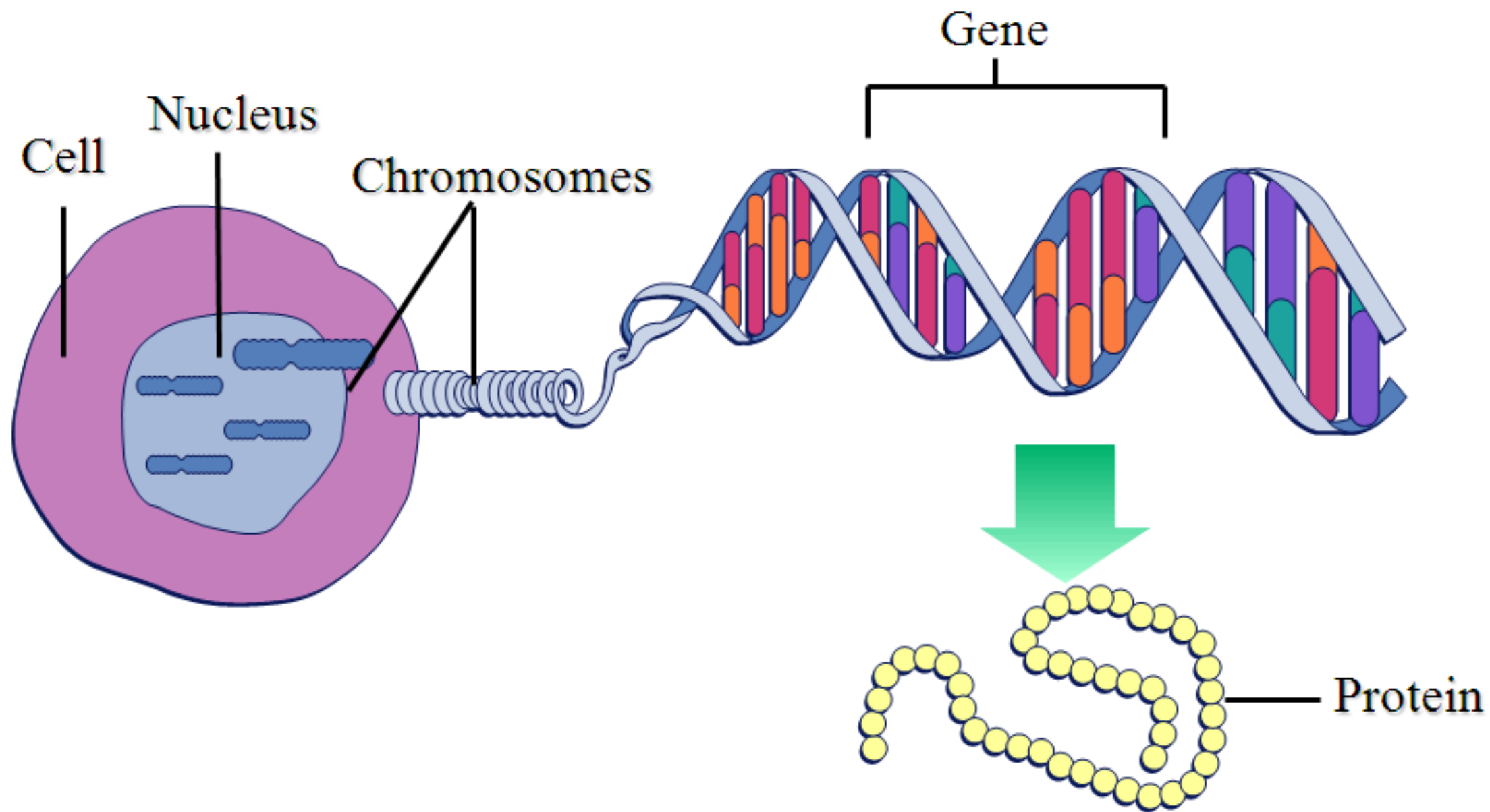
- Assemble contigs into scaffolds



- An example of coverage depth
 - Number of reads = 8
 - An average read length = 500nt
 - Length of the target = 2000nt



$$\text{Coverage (x)} = 8 \times 500 / 2000 = 2x$$



Viktige momenter

- Reflekter over hva som undersøkes
 - DNA/RNA
 - Protein
- DNA – RNA –protein
- Vær kritisk til alle metoder, alltid. Ingen metode er perfekt.
 - Ikke nødvendigvis feil om det er diskrepante resultater mellom to forskjellige metoder som undersøker antatt samme mål.
- Sette seg inn i styrker og svakheter ved metodene.



SLUTT