

# **Undersökning av global epigenetisk metyleringsstatus hos juvertumörer på hund**

**Maria Norell**

**Handledare: Henrik von Euler  
Inst. för kirurgi och medicin smådjur**

---

**Sveriges lantbruksuniversitet**

**Fakulteten för veterinärmedicin och  
husdjursvetenskap**

**Veterinärprogrammet**

**Examensarbete 2006:16  
ISSN 1652-8697**

**Uppsala 2005**

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>SAMMANFATTNING</b> .....	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUKTION</b> .....	<b>4</b>
<b>LITTERATURÖVERSIKT</b> .....	<b>5</b>
Anatomi .....	5
Juvertumörer hos hund .....	5
Olika tumörtyper som drabbar hundens mammarkörtlar .....	6
<i>Benigna</i> .....	6
<i>Maligna</i> .....	6
Metastasering .....	7
Etiologi och patogenes .....	7
<i>Ålder</i> .....	7
<i>Endokrina faktorer</i> .....	7
<i>Genetiska faktorer</i> .....	8
<i>Predisponerade raser</i> .....	8
<i>Nutrition</i> .....	8
Behandling .....	9
<i>Kirurgi</i> .....	9
<i>Hormonell terapi</i> .....	9
<i>Cytostatika</i> .....	9
Klassificering av tumörer .....	10
DNA metylering och gensuppression .....	11
<i>CpG-öar</i> .....	11
<i>DNA-metylering</i> .....	11
<i>Histonmodifiering – acetylering och deacetylering</i> .....	12
<i>Metylering av histoner</i> .....	13
<b>MATERIAL OCH METODER</b> .....	<b>14</b>
Insamling av prover .....	14
Utvinning av DNA .....	14
Bestämning av metyleringsstatus .....	15
<i>LUMA-metoden</i> .....	15
<b>RESULTAT</b> .....	<b>18</b>
<b>DISKUSSION</b> .....	<b>22</b>
<b>TACK TILL</b> .....	<b>23</b>
<b>LITTERATURFÖRTECKNING</b> .....	<b>24</b>

Bilaga 1  
– *Ordlista*

## **SAMMANFATTNING**

Juvertumörer är den vanligaste tumörformen hos tikar. Trots att det har utförts många studier om juvertumörer finns ännu en hel del kvar att lära om denna tumörtyp.

Man har sedan en längre tid tillbaka haft kunskapen om att adderandet respektive eliminerandet av metylgrupper till gener kan hämma respektive aktivera dessa geners uttryck. Metylering och demetylering är en i kroppen helt normalt förekommande företeelse och den är essentiell för individens utveckling och fortlevnad. Risken för att utveckla en tumörsjukdom ökar dock om den globala metyleringsstatusen i kroppen ändras; om onkogener demetyleras (aktiveras) eller om tumörsuppressorgener metyleras (inaktiveras). Inom humanmedicinen har man sett att det finns skillnader i metyleringsstatus mellan olika tumörer.

I denna studie undersöktes tumör- och normalvävnad från tio olika hundar med avseende på metyleringsstatus. Resultaten visade att det inte fanns något klart samband mellan metyleringsstatus hos normal respektive tumörvävnad, ibland var normalvävnaden hypermetylerad jämfört med tumörvävnaden och ibland var den hypometylerad i jämförelse. Det samband man däremot kunde urskilja, var att de maligna juvertumörerna tenderade att vara hypermetylerade i jämförelse med de benigna

## **SUMMARY**

Mammary tumors are the most frequent type of tumors in bitches in Sweden. Many studies have been published concerning mammary tumors, but there is still much to be learned about this disease.

One has, since some time ago, had the knowledge that addition to or removal of methyl groups to genes can inhibit or activate gene-expression. Methylation and demethylation is a normal phenomenon in the body and it is essential for the development and survival of the individual. The risk of developing a tumor disease is increased if the global methylationstatus is changed; if oncogenes demethylates (activates) or if tumor suppressor genes methylates (inactivates). In the human medicine one has seen that there are differences in methylationstatus between different tumors.

In this study tumor and normal tissue from ten dogs were examined with regard to methylationstatus. The results showed that there were not clear connections between the methylationstatus at the normal- or tumor tissue respectively, sometimes the normal tissue was hypermethylated in comparison to the tumor tissue and sometimes it was hypomethylated in comparison. The connection that one could see was that the malignant tumors tended to be hypermethylated in comparison to the benign tumors.

## INTRODUKTION

Juvertumörer är den vanligaste tumörtyper hos okastrerade tikar. Drygt 50 % av tumörerna är maligna. Framförallt drabbas medelålders och äldre tikar. De godartade tumörerna utgörs framförallt av benigna blandtumörer och olika adenom. De elakartade tumörerna utgörs till största delen av carcinom medan endast en liten del består av sarkom, carcinosarkom och andra maligna tumörformer.

Tumörutveckling har tidigare endast beskrivits som en process i den somatiska evolution där en cellinje förvärvar speciella fördelar gentemot övriga celler med hjälp av en ackumulering av diverse slumpmässiga förändringar i genomet. I decennier har man känt till att många av de cancerassocierade genförändringarna härstammar från tillägg till, förlust av eller förändring av det genetiska materialet i varje enskild cell. Nu har det emellertid visat sig att sek *epigenetisk modulering*, dvs. ärftliga förändringar i genernas funktion, och inte bara ändringar i gensekvensen, också kan spela en viktig roll i utvecklandet av många cancersjukdomar.

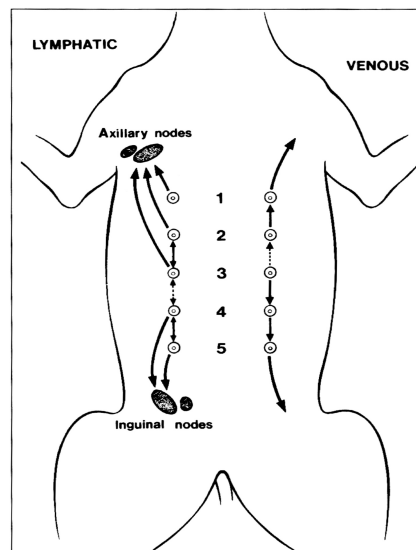
Epigenetisk modulering innebär att utvalda gensekvenser kan hindras från att uttrycks genom en rad olika komplicerade mekanismer vilka bl.a. innefattar metylering och deacetylering. Om en gen metyleras kommer olika proteiner att rekryteras, dessa kommer rent fysikaliskt att förhindra att denna gen uttrycks. Man har inom humansjukvården sett att gener som har som uppgift att förhindra tumöruppkomst metyleras vid vissa typer av cancer men även att onkogener som normalt skall vara metylerade förlorar sin metylgrupp och på så vis bidrar till utvecklandet av tumörer.

Syftet med det här arbetet har varit att undersöka huruvida det finns någon skillnad i metyleringsstatus mellan maligna och benigna tumörer i hundens juver.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Anatomi

Hunden har vanligen fem mammarkörtlar på vardera sidan av buken (Dyce, Sack & Wensing, 2002). Juverdelarna på samma sida är ej separerade från varandra men de på vänster sida är separerade från de på höger sida. Det lymfatiska dränaget från de tre främsta mammarkörtlarna sker genom axillarlymfknotorna. De två bakre juverdelarna dräneras genom den ytliga inguinallymfknutan. Lymfatisk kommunikation sker mellan den första, andra och tredje juverdelen och mellan den fjärde och femte, dessutom kan också kommunikation finnas mellan den tredje och fjärde mammarkörteln (Sorenmo, 2003; Hellmén, 1989).



*Bild 1. Schematisk skiss över den lymfatiska- och blodets kommunikation mellan hundens olika juverdelar. Bilden visar även de lymfknotor (axillar- och inguinal) som dränerar juvret. Bilden kommer från BSAVA Manual of Canine and feline oncology*

Juvret är uppbyggt av körtelvävnad och stödjevavnad (fett, bindväv, kärl osv.). Spene, spenkanal och mjölkgångar består av varierande lager av epitel. Hunden har flera spenkanaler vilka mynnar i spenen (Dyce, Sack & Wensing, 2002).

### Juvertumörer hos hund

Juvertumörer är den vanligaste tumörtypen hos okastrerade tikar. Drygt 50 % av tumörerna är maligna. (Fossum, 2002; Sorenmo, 2003; Queiroga *et al*, 2005; Novosad, 2003). Över 60 % av de drabbade tikarna har mer än en juvertumör, ofta är flera olika juverdelar affekterade. Man bör analysera alla nybildningarna eftersom de inte alltid består av samma tumörtyp. Multipla tumörer behöver inte innebära sämre prognos (Sorenmo, 2003). De bakersta juverdelarna drabbas mer ofta än de främre, troligen på grund av att de är större (Dobson & Lascelles, 2003). Tumörens lokalisering, d.v.s. om den är belägen kranialt eller kaudalt i juverraden, verkar inte påverka prognosen (Sorenmo, 2003).

## Olika tumörtyper som drabbar hundens mammarkörtlar:

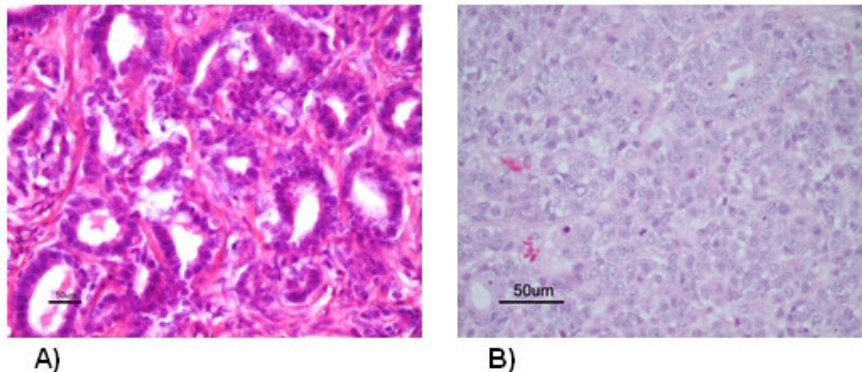
### **Benigna**

Benigna tumörer klassificeras ofta som *adenom*, *fibroadenom* eller *mesenkymaltumörer* (Fossum, 2002). Ett adenom är en nybildning som utgår från själva mammarkörteln (aden = körtel), adenofibrom är en blandtumör som består av både körtelvävnad och bindväv. Mesenkymaltumörer är ett samlingsbegrepp på nybildningar som utgår från stödjevavnad (t.ex. brosk, ben eller fett), muskulatur eller kärl (Lindskog, 1997).

### **Maligna**

De flesta maligna tumörerna är *carcinom* (40-45 % av totalantalet juvertumörer), *sarkom* (5-10 %) eller *carcinosarkom* (ovanligt) (Fossum, 2002).

Carcinomen är elakartade tumörer uppbyggda av epitelceller. Papillära eller tubulära carcinom har bättre prognos än solida eller anaplastiska carcinom (Fossum, 2002). Papillära och tubulära juvertumörer har bibehållit delar av den normala tubulära juverstrukturen, de solitära tumörerna är så förändrade att de saknar den normala strukturen och är på så vis mer allvarliga (Sorenmo, 2003).



*Bild 2. A) Histologisnitt, adenom. Adenomet uppvisar en myoepitelial och körtelepitelial proliferation, körtelstrukturen är fortfarande intakt. Mitosaktivitet saknas och cellpopulationen saknar atypi. Bild B) Histologisnitt, carcinom. Tumörcellerna invaderar den normala juvervävnaden vilken i stort sett är upphävd. Mitosaktiviteten är hög och cellerna uppvisar uttalad atypi. Båda histologibilderna kommer från tumörer från hundar som varit med i studien.*

Sarkom är en elakartad tumörtyp som utgår från mesenkymal vävnad (stödjevavnad/bindväv). De *primära* sarkomen är inte så vanliga och man tror att de uppkommer från redan existerande benigna blandtumörer genom en malign

transformation eller att de uppstår från det interlobulära stromat (Sorenmo, 2003). Sarkomen indelas i A. högt differentierade, där sarkomens ursprung är tydligt t.ex. fibrosarkom, osteosarkom, liposarkom och angiosarkom, och B. lågt differentierade (anaplastiska) med ofta oklart organursprung och ofta indelade efter förhärskande celltyp t.ex. spol-, rund- eller polymorfcelliga. De högt differentierade har vanligen bättre prognos än de lågt differentierade (Lindskog, 1997). Hundar med sarkom har kortare överlevnadstid än hundar med carcinom (Hellmén, 1989).

Ett carcinosarkom är en blandtumör som består av epitelceller och mesenkymal vävnad (Lindskog, 1997). Dessa tumörer är oftast en blandning mellan carcinom och osteosarkom. Prognosen för hundar med maligna blandtumörer är dålig och de flesta hundarna utvecklar metastaser inom ett år (Sorenmo, 2003).

Inflammatoriska carcinom är lågt differentierade och mycket maligna. De växer ofta invasivt och involverar vanligen båda juverraderna (Fossum, 2002; Novosad, 2003). Dessa kan vara svåra att skilja från mastit (juverinflammation) både via fysiologisk och cytologisk undersökning (Fossum, 2002). Prognosen är extremt dålig och medelöverlevnaden är 25 dagar från diagnos (Sorenmo, 2003).

## **Metastasering**

Maligna tumörer kan spridas via lymfa och blod framförallt till regionala lymfknotor och lungor (Fossum, 2002). Andra mindre vanliga spridningsområden för metastaserande juvertumörer är binjuror, njurar, hjärta, lever, ben, hjärna och hud (Fossum, 2002; Hellmén, 1989). Alla maligna juvertumörer har förmågan att metastasera. Metastasrisken påverkas av bland annat av tumörtyp och histologisk differentiering (Sorenmo, 2003). Runt 30 % av carcinomen och 75 % av sarkomen ger upphov till metastaser. Carcinomen sprids framförallt via lymfsystemet tillskillnad från sarkomen som främst har hematogen spridning. Maligna tumörer som vid radiologisk metastaskontroll visar sig ha spridits till lungorna, tumöromvandlade lymfknotor, spridning över till andra juverraden, kranial eller kaudal infiltration och satellittumörer mellan juvertumören och regionala lymfknotor kan sällan behandlas enbart kirurgiskt (Hellmén, 1989).

## **Etiologi och patogenes**

Mekanismerna bakom utvecklandet av juvertumörer är långt ifrån helt kartlagda, men man har sett ett flertal samverkande faktorer.

### ***Ålder***

Juvertumörer före två års ålder är sällsynt, incidensen ökar långsamt efter fyra års ålder för att sedan öka markant mellan sex och tio års ålder, därefter minskar risken igen (Dobson & Lascelles, 2003).

### ***Endokrina faktorer***

De båda hormonerna östrogen och progesteron har stor betydelse för den normala utvecklingen av juvervävnad men dessa hormoner medverkar även vid uppkomsten

av juvertumörer (Sorenmo, Shofer & Goldsmith, 2000; Fossum, 2002; Queiroga *et al*, 2005). Man har funnit östrogen- och eller progesteronreceptorer i 80 % av hundens juvertumörer (både maligna och benigna). Hundar vars tumörer innehåller östrogen eller progesteronreceptorer lever längre än de utan (Fossum, 2002). Risken för att utveckla juvertumörer ökar från 0,5 % till 8 % och till 26 % beroende på om tiken kastreras före första, andra, tredje eller senare löpet (Fossum, 2002; Sorenmo, 2003; Novosad, 2003). Östrogen är *promotor* (genuttrycksreglerare) för styrning av transkriptionen av flera *proto-onkogener* (onkogenen påverkar celltillväxten och kan vara tumörframkallande) (Sorenmo, Shofer & Goldsmith, 2000; Sorenmo, 2003). Progesteron påverkar uppreglerandet av growth hormone (GH)- produktionen i mammarkörteln, GH har en direkt tillväxtstimulerande effekt på juvervävnaden. Progesteron verkar även indirekt genom uppreglerande av insulin growth factor I (IGF-I). IGF I spelar en stor roll i både normal och malign celltillväxt (Sorenmo, 2003).

Exponering av ovariella (äggstocks) hormoner eller deras syntetiska derivat i högre doser än de fysiologiska och under en längre tid kan också stimulera utvecklingen av juvertumörer. En kombination av östrogen och progesteronpreparat i hög dos medför en ökning av risken för utvecklande av maligna juvertumörer (Fossum, 2002; Dobson & Lascelles, 2003).

### **Genetiska faktorer**

Förändringar i struktur och funktion av gener spelar en stor roll i utvecklandet av juvertumörer. *Aktivering av onkogener* är en påverkande faktor, *inaktivering av tumörsuppressorgener* (skyddande gener som reparerar DNA skador och reglerar celltillväxt) är en annan (Dobson & Lascelles, 2003). Tumörsuppressorgen p53 är den mest frekvent muterade genen vid cancer hos människan (Sengupta & Harris, 2005). Studier har visat att det även finns ett samband mellan mutationer i denna gen och utvecklandet av juvertumörer hos hund (Chu, Rutterman & Kong, 1998). Ett annat exempel på genetiska faktorer som bidrar till utvecklandet av juvertumörer är överuttryck av onkogenen c-erb B2, vilket påvisats i flera fall (Sorenmo, 2003). Cytophotometri av nukleärt DNA kan ge information om tumörpatogenes och malignitet. Man har funnit att 50-60 % av alla juvertumörer innehåller aneuploida tumörceller (Dobson & Lascelles, 2003). Detta är celler som har ett onormalt kromosomantal (Lindskog, 1997). Även benigna tumörer kan innehålla aneuploida celler och detta kan vara orsaken till att benigna tumörer kan omvandlas och utvecklas till maligna (Dobson & Lascelles, 2003). Hundar med benigna tumörer löper en mer än tre gånger högre risk att utveckla maligna tumörer (Fossum, 2002).

### **Predisponerade raser**

Flertalet studier visar att vissa raser drabbas mer ofta av juvertumörer. De tio, i Sverige, mest drabbade raserna inkluderar: Engelsk springer spaniel, Doberman, Boxer, Softcoated wheaten terrier, Amerikansk cocker spaniel, Yorkshire terrier, Leonberger, Bichon frisé, Schäfer och Papillon (Egenvall *et al*, 2005).

### **Nutrition**



Fetma vid ett års ålder är en annan riskfaktor för utvecklandet av juvertumörer (Sorenmo, 2003; Novosad, 2003).

## **Behandling**

### ***Kirurgi***

Kirurgi är den enda accepterade behandlingsmetoden för hundar med juvertumörer, det finns inga andra vedertagna behandlingsrekommendationer (Fossum, 2002; Dobson & Lascelles, 2003; Novosad, 2003). Att operera bort tumören är den enda och mest effektiva metoden för lokal tumörkontroll (Dobson & Lascelles, 2003). Typen av kirurgi verkar inte påverka överlevnaden hos patienten så länge som all tumörvävnad avlägsnas med bred marginal (Sorenmo, 2003; Novosad, 2003). Då tumörceller kan spridas via lymfatisk vävnad bör juvervävnaden avlägsnas med åtanke på det lymfatiska dränaget (Dobson & Lascelles, 2003). Det är ingen mening med att operera bort inflammatoriska carcinom då dessa är extremt aggressiva och kirurgi varken botar eller förlänger patientens liv (Fossum, 2002).

Innan operationen bör man röntga hundens brösthåla (både lateral Dux. et sin samt en vd projektion) för att utröna om en eventuell metastasering till lungorna (Fossum, 2002; Novosad, 2003). Lungan är den vanligaste platsen för metastaser och metastasering är alltid förenat med en dålig prognos (Sorenmo, 2003).

### ***Hormonell terapi***

Inom humanmedicinen förekommer hormonell terapi som ett komplement till kirurgi vid behandling av bröstcancer. Hos kvinnor vars tumörer uttrycker östrogenreceptorer vill man förhindra ytterligare östrogenstimulation av cancercellerna och kan då tillföra patienten bl.a. östrogenreceptorblockerande läkemedel (Tamoxifen). 50-80 % av de maligna juvertumörerna hos hund uttrycker också östrogenreceptorer. Hundens livmoder och äggstockar utsöndrar östrogen, och det är, som tidigare nämnts, mycket ovanligt med juvertumörer hos tidigt kastrerade tikar. Tidigare har man *inte* kunnat se att ovariehysterektomi av redan drabbade tikar skulle kunna påverka prognosen, men en ny retrospektiv studie visade att hundar med juvertumörer levde signifikant längre om de kastrerades i samband med tumörexstirpationen jämfört med hundar där man bara opererade bort tumören och lät livmodern vara kvar (Sorenmo, Shofer & Goldsmith, 2000; Sorenmo, 2003). Vid Tamoxifenbehandling av hund med juvertumörer uppstår flera oönskade biverkningar (framförallt östrogenrelaterade) som gjorde att de flesta individer som ingått in en studie avbröt behandlingen in förtid (Morris, Dobson & Bostock, 1993).

### ***Cytostatika***

Det finns mycket begränsad information angående kompletterande cytostatikabehandling av juvertumörer hos hund. Enstaka rapporter visar på en förlängd överlevnad hos patienter med metastaser, det finns mycket få studier gjorda och framförallt ingen med stort patientunderlag. En nyligen publicerad studie med 16 tikar, vilka drabbats av carcinom, visade på en signifikant överlevnad hos de åtta patienter som både opererats och behandlats med cytostatika jämfört med dem som

enbart opererats. Medelöverlevnaden var 6 månader hos gruppen som enbart opererades jämfört med 24 månader hos gruppen som även behandlades med cytostatika (Sorenmo, 2003).

### **Klassificering av tumörer**

Att utvärdera tumören kliniskt innan en eventuell operation är viktigt. För att man skall kunna utvärdera prognos och behandlingsstrategier har WHO gjort en sk TNM-klassificering. Klassificeringen leder till att kunna dela in tumören i fyra olika kliniska stadier (I–IV).

#### ***T : Primär Tumörstorlek***

- T1 < 3cm i diameter
- T2 3-5cm i diameter
- T3 >5cm i diameter
- T4 inflammatoriskt carcinom

#### ***N: Status i regional lymfknuta (Node)***

- N0 Ingen metastas
- N1 Metastas till ipsilateral lymfknuta
- N2 Metastas till kontralateral lymfknuta

#### ***M: Distal Metastas***

- M0 Ingen metastas
- M1 Distal metastas

#### ***Klinisk klassificering***

- I T1, N0, M0
- II T0-1, N1, M0
- III T3, N0-N2, M0
- IV T1-T4, N0-N2, M0-M1

## DNA-metylering och gensuppression

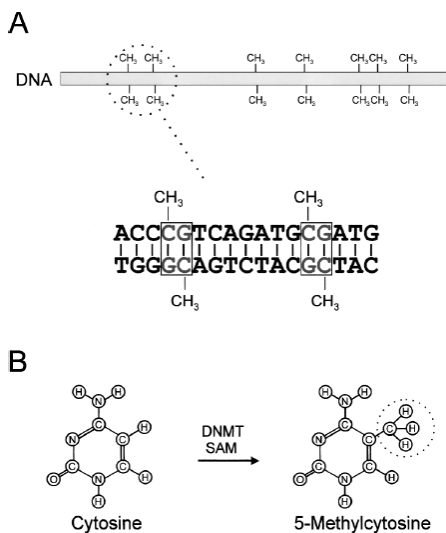
Epigenetik kan definieras som mitotiska och/eller meiotiska ärftliga egenskaper i genfunktion som inte primärt beror på DNA-sekvensen (Pers medd. Professor Tomas Ekström). Den epigenetiska påverkan av en gen är en mekanism som förutom mutationer bl.a. kan leda till att produktionen av tumörsuppressorgener störs och att en tumör kan uppstå. Man tror att metylering kan vara en lika vanlig orsak till gensuppression som mutationer (Baylin, Futscher & Wensing, 2004).

### CpG-öar

DNA-strängen är uppbyggd av fyra olika nukleotidbaser; Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) och Thymin (T), dessa kan bilda 16 olika par s.k. dinukleotider. Cytosin-Guanin- dinukleotiden (CpG-dinukleotiden) återfinns mer sällan i genomet än vad som är sannolikt förutom i små sekvenser där de uppträder mer frekvent än vad som är sannolikt. Dessa områden med frekventa CpG-dinukleotider kallas för CpG-öar. CpG-öarna är ofta belägna nära sek *promotorregioner* i sek "housekeeping" gener (Baylin, Futscher & Wensing, 2004). En promotorregion är en sekvens av DNA-strängen där transkriptionen från DNA till RNA initieras och en housekeeping-gen är en gen som har hand om cellens basala funktioner (Alberts *et al*, 2002).

### DNA-metylering

Om en CpG-ö metyleras kommer delar av arvsmassan att förändras rent fysikaliskt så att transkription av DNA omöjliggörs vilket resulterar i att genen inte kommer att uttryckas (Baylin, Futscher & Wensing, 2004). En frisk cell använder sig normalt av metylering t.ex. vid sek *imprinting* eller vid inaktivering av x-kromosomen (Worm & Guldborg, 2002; Teodoridis *et al*, 2004). Eventuellt använder sig kroppen även av metylering för att tysta ner främmande DNA som inkorporerats i cellens arvs massa (Pelham, Irwin & Kay, 2003).



*Bild 3. När CpG-öarna i promotorregionen metyleras kommer genen att hämmas. Detta sker t.ex. vid inaktivering av x-kromosomen och är en helt normal företeelse. Om däremot en tumörsuppressor-gen metyleras kommer detta att häva ett av kroppens skydd mot tumöruppkomst och på så vis bidra till utvecklingen av en eventuell tumör.*

*Bild från Worm, J. & Guldborg, P. 2002. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. J Oral Pathol Med 31, 443-449 pp.*

I den normala cellen är de flesta CpG-dinukleotiderna som återfinns i nära anslutning till promotorregioner *inte* metylerade till skillnad från de CpG-dinukleotider som återfinns i det övriga genomet vilka vanligen är metylerade. Att CpG-öarna vid promotorregionen *inte* är metylerade visar således att aktiv gentranskription av DNA sker, d.v.s. att genen uttrycks (Baylin, Futscher & Wensing, 2004).

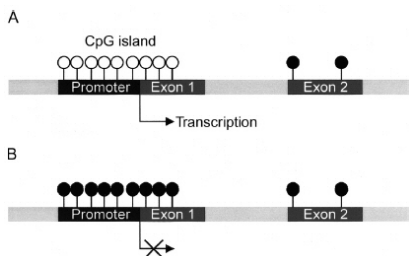


Bild 4. Figur A visar den ometylerade promotorregionen där aktiv transkription tillåts. Figur B visar en metylerad promotorregion, metyleringen medför att genen *inte* transkriberas. Bild från Worm, J. & Guldberg, P. 2002. *DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. J Oral Pathol Med* 31, 443-449 pp.

Metyleringen av DNA-strängen utförs framförallt av tre olika DNA metyltransferas enzymer (DNMT's), vilka använder S-adenosyl-methionin som metyldonator (Sake, Axiao & Allis, 2004).

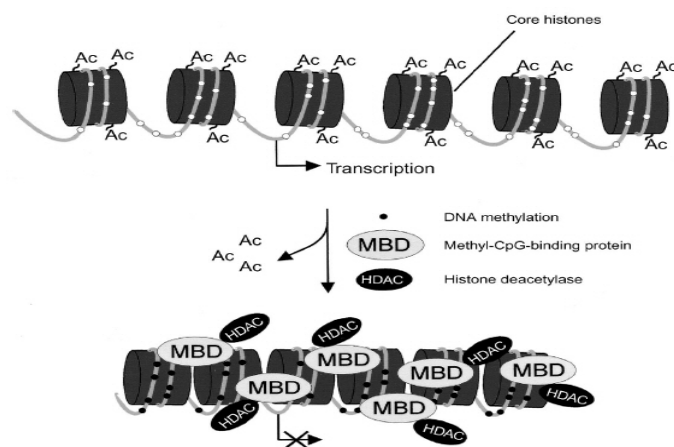
Hos cancerceller är det ofta så att de CpG-öar som är lokaliserade vid tumörsuppressorgenernas promotorregioner är metylerade. Metyleringen innebär alltså att tumörsuppressorgenens *inte* transkriberas, d.v.s. det skydd som cellen har för att förhindra uppkomst av eller korrektion av DNA-skador fungerar *inte* (Baylin, Futscher & Wensing, 2004). Tumörhämmande funktioner som påverkas av metyleringen inkluderar bl.a. cellcykelkontroll, apoptosignalering, och DNA-reparation (Worm & Guldberg, 2002).

### **Histonmodifiering –acetylering och deacetylering.**

Histoner är små positivt laddade proteiner som binder till DNA-strängen och gör att denna kan packas ihop till kromatin (Alberts *et al*, 2002). Generellt finns det två olika typer av kromatin; *heterokromatin* och *eukromatin*. Heterokromatinet är mycket kompakt i sin struktur vilket leder till att genssekvensen *inte* kan transkriberas – genen uttrycks *inte*. Eukromatinet däremot har en mer öppen konfiguration som tillåter genssekvensen att transkriberas – genen uttrycks (Sake, Axiao & Allis, 2004).

Mekanismerna bakom genreglering beror på en komplex serie av enzymatiska modifieringar av histoner (Baylin, Futscher & Wensing, 2004; Teodoridis *et al*, 2004), vilka bl.a. utförs med hjälp av histonacetyltransferaser (HATs), histondeacetylaser (HDACs), histonmetyltransferaser och histonkinaser (Sake, Axiao & Allis, 2004). Man har sett att histoner som är acetylerade bildar eukromatin som, vilket tidigare nämnts, tillåter transkription. När en CpG-ö i DNA-strängen metyleras kommer särskilda proteiner s.k. metyl-CpG-bindande proteiner att binda till den speciella DNA-sekvensen och rekrytera *deacetylaser* (HDACs) till

metyleringsområdet. Deacetylaserna kommer att plocka bort acetylgrupperna från histonerna och på så vis medföra att kromatinet konverteras till heterokromatin som inte längre kan transkriberas (Worm & Guldborg, 2002; Teodoridis *et al*, 2004). Dessutom existerar en samverkan mellan DNA-metylering och histonmetylering, se nedan. I den normala cellen sker hela tiden en balans mellan acetylering, deacetylering, metylering och fosforylering av histoner (Sake, Axiao & Allis, 2004).



Figur 3. Den övre delen av bilden visar eukromatin. Om DNA-strängen är ometylerad kommer histonerna att vara acetylerade och DNA kommer att kunna transkriberas. Om DNA-strängen däremot metyleras kommer metylbindande proteiner att rekryteras till området. De metylbindande proteinerna kommer i sin tur att rekrytera deacetylaserna vilka eliminerar acetylgrupperna från histonerna. Eukromatinet kommer då att konverteras till heterokromatin som inte kan transkriberas. Bild från Worm, J. & Guldborg, P. 2002. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med* 31, 443-449 pp.

### Metyleing av histoner

Metyleing av histoner kan ske på lysin- och argininrester och kan antingen leda till aktivering eller inaktivering av en gen. Om lysin 4 på histon H3 metyleras kommer genen att *aktiveras*, om däremot lysin 9 och 27 på histon H3 metyleras kommer genen att *inaktiveras* (Sake, Axiao & Allis, 2004).

Man tror att DNA metyleing kan leda till hämmandet av vissa gener genom att DNA-metylbindande proteiner i sin tur rekryterar histonmetyleerande enzymer, vilka metyleerar lysin 9 på Histon H3 och på så vis hämmar gentranskription (Sake, Axiao & Allis, 2004).

Histondeacetylering, histonmetyleing och DNA-metylering samverkar för att få en effektiv och verksam avstängning av vissa gener. Anmärkningsvärt är att dessa epigenetiska avstängningsmekanismer kan riktas mot ektopiska gener och därmed påverka kromatinet på ett sådant sätt att hämningen av genen nedärvs över flera

cellgenerationer. Epigenetiska mekanismer har också utvecklats så att vissa specifika gener inte bara hämmas utan också aktiveras vid precis rätt tillfälle i cellcykeln och under den övriga utvecklingen, exakt hur detta går till vet man ännu inte (Sake, Axiao & Allis, 2004).

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Insamling av prover**

Samtliga hundar opererades på Klinikcentrum vid veterinärhögskolan i Uppsala. I samband med operationen togs ett vävnadsprov från den avlägsnade juvertumören samt ett vävnadsprov från den normala juvervävnaden. Storleken på vävnadsbitarna varierade något men var på minst 3 mm<sup>3</sup> vardera. Resterande tumörvävnad skickades till SLU patologen för PAD. Proverna placerades därefter i kryorör (speciellt fryståliga provrör) och frystes sedan ner till -70°C. DNA bör förvaras i -70°C för att inte falla sönder.

### **Utvinning av DNA**

Nästa steg i processen omfattade DNA-isolering från de olika vävnadstyperna och utfördes med hjälp av Gen Elute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit enligt tillverkarens protokoll (Sigma, St. Louis, MO, USA). Allt laboratoriearbete utfördes på Centrum för molekylär medicin, CMM, vid Karolinska sjukhuset i Stockholm.

#### **1. Bearbetning av vävnaden.**

40-50 mg tumör- eller normalvävnad vägdes och placerades i 1.5ml mikrocentrifugrör, vävnaden modifierades mekaniskt till mindre bitar.

#### **2. Vävnadsdigerering.**

200 µl "Lysis solution T" följt av 20µl Proteinase K tillsattes till mikrocentrifugröret och allt blandades varefter en homogen delvis lyserad lösning erhöles. Därefter inkuberades provet i 55°C i ett vattenbad i ca 2 timmar för ytterligare digering. Efter två timmar sattes 20 µl RNase till lösningen, för att erhålla ett RNAfritt DNA, och provet inkuberades i rumstemperatur i två minuter.

#### **3. Lysering av celler.**

200 µl "Lysis Solution C" pipetterades sedan ner i provet (lysatet) och blandningen skakades. Därefter inkuberades lysatet i 70°C i tio minuter.

#### **4. Preparering av kolonnen.**

500 µl "Column Preparation Solution" tillsattes till varje "GenElute Miniprep Binding Column" och dessa centrifugerades därefter i 12 000 × g. Varje bindningskolonn befinner sig inuti ett 2 ml uppsamlingsrör. Överskottet av "Preparation Solution", vilket inte hade bundit till bindningskolonnen utan passerat ner i uppsamlingsröret, hälldes ut efter centrifugeringen. Att förbehandla kolonnerna med "Column Preparation Solution" medför en bättre bindning av DNA till kolonnen.

### **5. Förberedelse för bindning.**

200 µl etanol tillsattes till provet och blandningen skakades för att erhålla en homogen lösning. Alkoholen medför att DNA binder när lysatet passerar genom silikonmembranet i bindningskolonnens mikrocentrifugrör.

### **6. Ladda lysatet.**

Hela provet överfördes sedan till bindningskolonnen varefter allt centrifugerades i  $\geq 6500 \times g$  i en minut. Efter centrifugeringen kasserades uppsamlingsröret som bindningskolonnen befunnit sig i, även överskottsvätskan som med hjälp av centrifugeringen passerat genom bindningskolonnen och ner i uppsamlingsröret, kasserades. Bindningskolonnen placerades därefter i ett nytt 2 ml uppsamlingsrör.

### **7. Första tvätten.**

Detta moment utförs för att rena lysatet så att endast DNA återstår. 500 µl "Wash Solution Concentrate" (utspädd m etanol) pipetterades över till bindningskolonnen och denna centrifugerades i  $\geq 6500 \times g$  i en minut. Den vätska som passerat genom bindningskolonnen och ner i uppsamlingsröret kasserades tillsammans med uppsamlingsröret. Bindningskolonnen placerades därefter i ett nytt uppsamlingsrör.

### **8. Andra tvätten.**

Ytterligare 500 µl "Wash Solution Concentrate" sattes till bindningskolonnen. Lysatet centrifugerades därefter i  $12\,000 \times g$ , i tre minuter. Detta för att torka bindningskolonnen. Slutligen placerades bindningskolonnen i ett nytt uppsamlingsrör och det föregående uppsamlingsröret med dess innehåll (överskottsvätska som centrifugerats genom bindningskolonnen) slängdes.

### **9. Utvinn DNA.**

200 µl "Elution Solution" pipetterades centralt i bindningskolonnen. Därefter inkuberades provet i rumstemperatur i ca 30 min. Sedan centrifugerades provet en sista gång i  $6500 \times g$ , i en minut. I uppsamlingsröret hade nu rent DNA centrifugerats ned. Bindningskolonnen slängdes, och uppsamlingsröret vilket nu innehöll DNA, sparades i  $-8^{\circ}\text{C}$  över natten.

## **Bestämning av metyleringsstatus**

När DNA utvunnits från vävnadsproverna bestämdes metyleringsstatus hos var och en av dessa med hjälp av Luminometric Methylation Assay (LUMA); en nyutvecklad metod framställd vid CMM, Karolinska institutet av Mohsen Karimi och Tomas Ekström.

### **LUMA-metoden**

5 µl av det utvunna DNA från varje vävnadsprov pipetterades ner i två brunnar vardera i en 96 hålsplatta (varje ursprungsprov representerades alltså i två brunnar). Tjugo prover (från tumör respektive normalvävnad) fyllde således 40 brunnar i 96-hålsplattan. Därefter utfördes exakt samma procedur en gång till, så att proverna nu

fyllde 80 brunnar i 96-hålsplattan. Till det ena provet från ursprungslösningen tillsattes sedan en blandning av enzymerna EcoRI och HpaII, och till det andra tillsattes en blandning av enzymerna MspI och EcoRI. (New England Biolab, Ipswich, MA, USA). Därefter inkuberades de 80 proverna i 37°C i fyra timmar.

Enzymet EcoRI klyver DNA strängen i alla GAATTC sekvenser och lämnar således ett 5'-AATT-överhäng. Enzymet HpaII klyver DNA-strängen vid alla CCGG-sekvenser som *inte* är CG-metylerade och lämnar ett 5'-CG-överhäng. Enzymet MspI klyver på samma sätt som HpaII även om CG-metylering finns.

När provet inkuberats i fyra timmar har enzymerna verkat och DNA-strängarna i proverna har nu klippts i olika stora fragment. Det DNA som bearbetats av HpaII/EcoRI-enzymerna har AATT överhäng och GC överhäng. Det DNA som bearbetats av MspI/EcoRI-enzymerna har också klippts i olika stora fragment och har också AATT och CG överhäng. Skillnaden mellan de två proverna är, som tidigare nämnts, att HpaII *inte* klyver vid metylerade CG-sekvenser vilket däremot MspI gör. Eftersom EcoRI klipper överallt vid GAATTC-sekvenser fungerar den som intern kontroll för mängd DNA, och man kan därför räkna ut en kvot mellan HpaII och MspI med EcoRI som normalisator. Denna kvot anger hur metylerat DNA i provet är. Om provets CG-sekvenser är 100 % metylerade kommer HpaII inte att kunna klyva DNA-et någonstans; kvoten HpaII/MspI kommer då att närma sig 0. Om Provets CG-sekvenser däremot inte är metylerade överhuvudtaget kommer HpaII att klyva överallt; kvoten HpaII/MspI kommer då att bli nära 1,0.

Tillsatsen av EcoRI till *alla* prover gör att man inte behöver veta exakt hur mycket DNA man har i provet, EcoRI kommer att användas för att normalisera mängden DNA i båda proverna.

Efter den specifika klyvningen av DNA tillsattes polymeras och nukleotider i en speciell ordning. Först adderades dATP $\alpha$ -S, därefter dCTP och dGTP, därefter dTTP och slutligen dCTP och dGTP ytterligare en gång.

När dATP (dATP $\alpha$ -S) tillsätts kommer det att fylla i alla TT-överhäng. Då detta sker kommer 2 st pyrofosfat-molekyler (PPi) att frigöras vid varje tillsats. PPi kommer att med hjälp av enzymet *Sulfurulase* att omvandla ADP (som finns i lösningen) till ATP. När ATP reagerar med enzymet *Luciferas* och dess substrat Luciferin (som finns tillsatt i lösningen) kommer energi att frigöras och ljus att uppstå. Ljuset registreras av en CCD-kamera och kan sedan, med hjälp av en dator, omvandlas till en graf i ett diagram. Ju mer ljus, desto fler klyvningar har skett och desto högre blir peaken i grafen i diagrammet.

När dCTP och dGTP tillsätts kommer de att fylla i CG-överhängen och två peakar bildas.

Samma sak gäller för när dTTP adderas; AA-överhängen fylls i och ytterligare en peak bildas. Slutligen tillsätts dCTP och dGTP ytterligare en gång. Detta är en kontroll på att den tidigare reaktionen har gått till fullbordan. Denna gång vill man

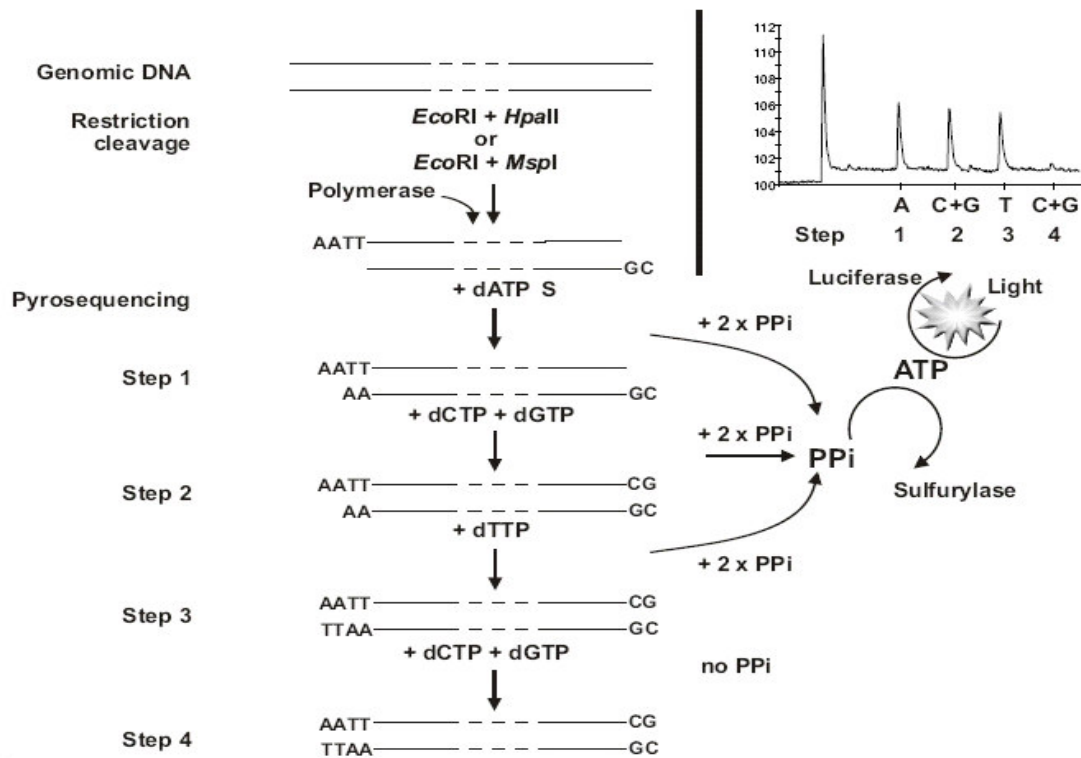


inte få någon ljusblxt då de nyligen tillsatta nukleotiderna inte skall kunna fylla ut några överhäng eftersom detta redan gjorts första gången dCTP och dGTP tillsattes.

Till sist låter man en dator räkna ut de olika höjderna på peakarna, samt kvoten mellan HpaII/EcoRI, respektive MspI/EcoRI. Det prov som klyvts med HpaII/EcoRI kommer att få annorlunda peakhöjder för CG-tillsatserna jämfört med det prov (från samma ursprungsprov) som klyvts med MspI/EcoRI. Kvoten mellan HpaII och MspI kommer att visa hur metylerat provet var.

Eftersom provuppsättningen i 96-hålsplattan duplicerades (det blev 80 st prover) har man således analyserat DNA från samma ursprungsprov två gånger, tack vare detta kan man jämföra analys 1 med analys 2 av samma prov och på så vis räkna ut medeltal och standardavvikelse. Att köra samma prov två eller flera gånger ökar säkerheten i analysmetoden.

### Schematisk skiss över hur LUMA-analysen fungerar



## RESULTAT

### *Patienthundarna*

*Tabell 1. Den patologanatomiska diagnosen (PAD) visade att tre av hundarna hade maligna tumörer (carcinom), de övriga sju hundarna hade benigna tumörer (adenom, fibroadenom och blandtumörer)*

Prov	Diagnos
01/2184	Carcinom
05/4797 ( P221/05)	Carcinoma simplex
05/5690	Carcinoma simplex
97/6583 ( P224/05)	Tubulärt adenoma simplex
01/4742 ( P267/05)	Komplext adenom
04/656 ( P228/05)	Komplext adenom
05/4879 ( P227/05)	Komplext adenom
05/5223 ( P250/05)	Benign blandtumör
05/5427	Komplext adenom
05/5429	fibroadenom

*Metyleringsstatus hos tumörerna*

*Tabell 2. Analyserna visade att de maligna tumörerna tenderade att vara hypermetylerade jämfört med de benigna som generellt var hypometylerade*

Tumörtyp	Prov	Analys- omgång 1 HpaII/ MspI	Analys- omgång 2 HpaII / MspI	Medel värde	Standard- avvikelse
Malign	01-2148	0,52	0,51	0,52	0,010409
Malign	05-4797	0,41	0,41	0,41	0,002637
Malign	05-5690	0,53	0,52	0,53	0,007361
Benign	97-6583	0,57	0,61	0,59	0,023561
Benign	01-4742	0,46	0,47	0,47	0,010186
Benign	04-656	0,53	0,53	0,53	0,006164
Benign	05-4879	0,64	0,76	0,70	0,087054
Benign	05-5223	0,53	0,49	0,51	0,024884
Benign	05-5427	0,68	0,87	0,78	0,13512
Benign	05-5429	0,47	0,47	0,47	8,1x10 <sup>5</sup>

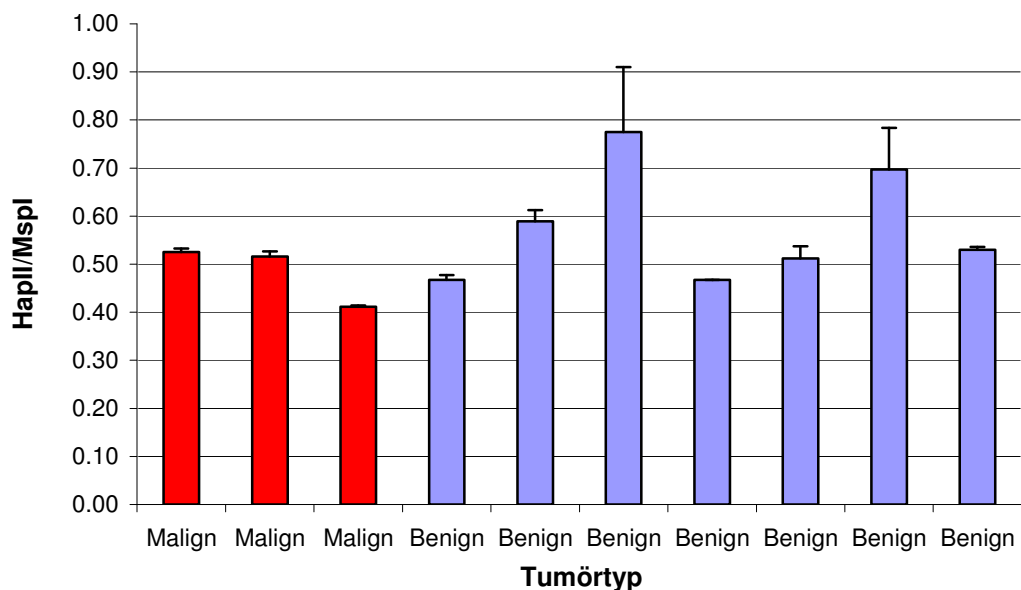
Om DNA i ett prov är mycket metylerat kommer kvoten HpaII och MspI att vara nära noll (eftersom HpaII då inte kommer att klippa någonstans). Om DNA däremot är lite metylerat kommer kvoten HpaII och MspI att hamna nära 1 (eftersom HpaII då kommer att klippa lika ofta som MspI).

Tabell 3. Skillnaden i metyleringsstatus mellan den normala juvervävnaden och tumörvävnaden hos varje hund

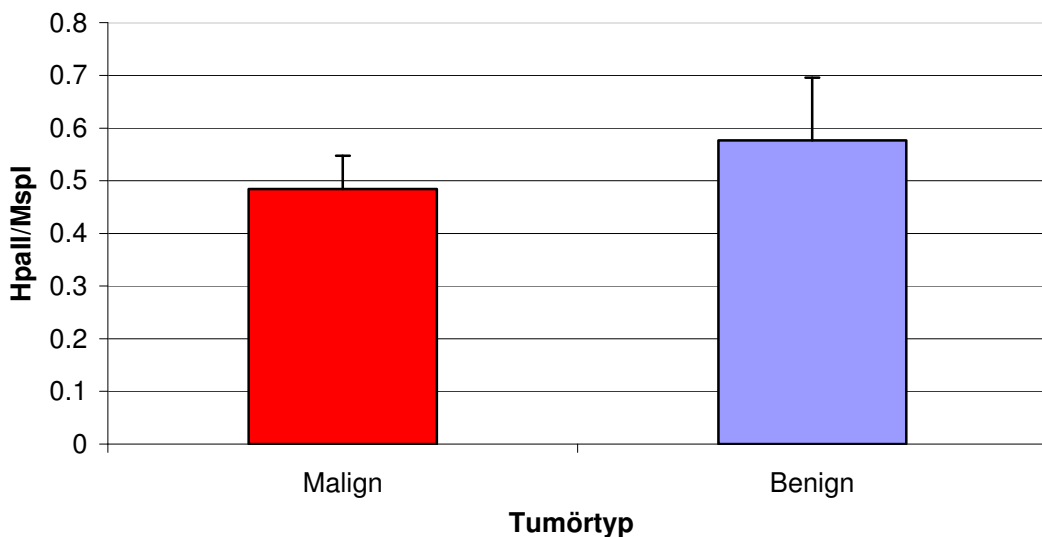
Prov	Analys 1 HpaII/ MspI	Analys 2 HpaII / MspI	Medel- värde	Standard- avvikelse
01-2148-N	0,50	0,53	0,52	0,026107
01-2148-T	0,52	0,51	0,52	0,010409
05-4797-N	0,56	0,48	0,52	0,055484
05-4797-T	0,41	0,41	0,41	0,002637
05-5690-N	0,58	0,52	0,55	0,043194
05-5690-T	0,53	0,52	0,53	0,007361
97-6583-N	0,56	0,48	0,52	0,054005
97-6583-T	0,57	0,61	0,59	0,023561
01-4742-N	0,51	0,48	0,49	0,018168
01-4742-T	0,46	0,47	0,47	0,010186
04-656-N	0,67	0,63	0,65	0,031323
04-656-T	0,53	0,53	0,53	0,006164
05-4879-N	0,50	0,53	0,51	0,019388
05-4879-T	0,64	0,76	0,70	0,087054
05-5223-N	0,60	0,55	0,57	0,034948
05-5223-T	0,53	0,49	0,51	0,024884
05-5427-N	0,53	0,48	0,51	0,032637
05-5427-T	0,68	0,87	0,78	0,13512
05-5429-N	0,68	0,55	0,61	0,092117
05-5429-T	0,47	0,47	0,47	8,1x10 <sup>5</sup>

De två proven; 05-5427 (komplext adenom) och 05-5429 (fibroadenom), hade de högsta standardavvikelserna (0,0135 respektive 0,092), de övriga låg under 0,08. Histologiskt visade ingen av de två proverna någon avvikelse jämfört med de övriga benigna proverna; båda var välavgränsade och uppvisade en mild cellatypi samt låg mitosaktivitet.

Om DNA i ett prov är mycket metylerat kommer kvoten HpaII och MspI att vara nära noll (eftersom HpaII då inte kommer att klippa någonstans). Om DNA däremot är lite metylerat kommer kvoten HpaII och MspI att hamna nära 1 (eftersom HpaII då kommer att klippa lika ofta som MspI).



Figur 1 visar skillnaden i metyleringsgrad mellan maligna och benigna tumörer samt standardavvikelserna. Om provet är 100 % metylerat kommer kvoten HpaII/MspI att bli 0. Om provet är 0 % metylerat kommer kvoten att bli 1. Som figuren visar ligger de flesta standardavvikelserna (alla utom två) inom en rimlig gräns.



Figur 2 visar skillnaden mellan medelmetyleringen hos maligna och benigna tumörer. Om provet är 100 % metylerat kommer kvoten HpaII/MspI att bli 0. Om provet är 0 % metylerat kommer kvoten att bli 1. Det sammanlagda medelvärdet hos de maligna tumörerna visar att de är hypermetylerade i jämförelse med medelvärdet hos de benigna.

## DISKUSSION

Analyserna visar att det finns en viss skillnad i metyleringsstatus mellan maligna och benigna tumörer; de maligna tumörerna tenderar att vara hypermetylerade och de benigna hypometylerade. Däremot kunde inget klart samband påvisas mellan metyleringsstatus hos normal respektive tumörvävnad, ibland var normalvävnaden hypermetylerad jämfört med tumörvävnaden och ibland var den hypometylerad i jämförelse. Kanske det kan vara så att även normalvävnaden är påverkad t.ex. av inflammation eller av något annat. Ekström *et al* visade på en åldersmässig förändring i metyleringsstatus hos friska människors lymfocyter; ju äldre människa desto högre var metyleringsgraden, det finns således flera faktorer att väga in vid analys av data.

Det finns vissa svagheter med den utförda studien: har vi verkligen fått med enbart tumörceller? Tänk om det är andra celler också; dessa lär ju vara annorlunda metylerade. Idealet vore att titta på tumörerna histologiskt och utifrån den informationen ta sitt prov.

En annan svaghet med den utförda studien är att vi hade för få tumörer för att kunna göra en säker bedömning angående skillnaden i metyleringsstatus och för att kunna utföra tillförlitlig statistik. För att få ordentlig signifikans borde man göra en kompletterande studie och då inkludera fler patienter. Det finns för närvarande en plan på att, inom en snar framtid, utföra ytterligare en studie. Den nya studien skall då inkludera fler patienter.

Att patientgruppen inte var homogen, hundarna hade olika ålder och var av olika raser, är också en svaghet. Ekström *et al* visade, som tidigare nämnts, att det fanns en åldersrelaterad metyleringsskillnad hos olika människors lymfocyter och man kan ju anta att det den principen även går att applicera på hundarna i studien. Det är således svårt att utifrån vår patientkategori uttala sig generellt angående ett eventuellt samband mellan metyleringsstatus hos maligna och benigna juvertumörer.

Vad skall man nu använda den här informationen till? Om man på sikt skulle kunna utveckla en billig och enkel metod för att bestämma metyleringsstatus i olika vävnader skulle det vara intressant att veta att det föreligger en skillnad mellan maligna och benigna tumörers metyleringsgrad. Kanske skulle kirurgen, genom ett enkelt test, redan innan en operation kunna bestämma med hur stor vävnadsmarginal tumören skulle opereras bort med, eller huruvida hela juverraden borde avlägsnas eller inte. En framtida kunskap om tumörers metyleringsstatus skulle också kunna leda till att patienter inte opererades överhuvudtaget; aberrant metylering skulle kunna användas som en, till röntgen och klinisk undersökning, kompletterande prognostisk faktor.

**Tack till:**

**Tomas Ekström** för korrekturläsning av mitt arbete samt för konstruktiv, rak kritik och informativa föreläsningar. Tack också för att jag fick förmånen att spendera en tid hos er på CMM, jag uppskattade verkligen att få ta del av er vardag.

**Mohsen Karimi** for your excellent supervising in the laboratory and for all the help with the computer. Thank you for taking the time.

**Fredrik Södersten** för hjälpen att få fram de fina histologibilderna.

**Alla i datasalen** som kommit till undsättning lite nu och då. Ni är fantastiska.

**Henrik von Euler** för oklanderlig handledning och intressanta diskussioner samt för snabb korrespondens.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K & Walter, P. 2002. *Molecular biology of the cell*. 4<sup>th</sup> edition. Garland science. USA. 207-208 pp.
- Baylin, S.B. Futscher, B.W. & Gore, S.D. 2004. Understanding DNA Methylation and Epigenetic Gene Silencing in cancer. *Symposium held June 4, in New Orleans, Louisiana, USA*. 1-22 pp.
- Chu, LL. Rutterman, G.R. & Kong, J.M. et al. 1998. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Res Treat* 50, 11-25pp.
- Dobson, J.M. & Lascelles, B.D.X. 2003. *BSAVA Manual of Canine and feline oncology*. 2<sup>nd</sup> edition. Rutterman;G.R. & Kirpensteijn, J. 234-242 pp.
- Dyce, K.M. Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. 2002. *Textbook of veterinary anatomy*. 3<sup>rd</sup> edition. Saunders Elsevier Science. USA. 363-365 pp.
- Egenvall, A. Bonnett, B.N. Öhagen, P. Olson, P. Hedhammar, Å. & von Euler, H. 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1992 to 2002. *Preventive veterinary medicine* 69, 109-127 pp.
- Hellmén, E. 1989. *Mammary tumors in the female dog A study of tumor histogenesis and DNA ploidy in relation to histology, prognosis and tumor progression*. 1<sup>st</sup> edition. Merkantil tryckeri, Uppsala.
- Lindskog, B.I. 1997. *Medicinsk terminologi*. Nordiska bokhandels förlag. Sverige. 27, 348, 486-487 pp.
- Morris, J.S. Dobson, J.M. & Bostock, D.E. 1993. Use of Tamoxifen in the control of mammary neoplasia. *Vet. Rec Nov 27; 133 (22)*, 539 – 542 pp.
- Novosad, C.A. 2003. Principles of Treatment for Mammary Gland Tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18, 107-109 pp.
- Pelham, J.T. Irwin, P.J & Kay, P.H. 2003. Genomic hypomethylation in neoplastic cells from dogs with malignant lymphoproliferative disorders. *Research in veterinary science* 74, 101-104pp
- Queiroga, F.L. Pérez-Alenza, M.D. Silvan, G. Peña, L. Lopes, C. & Illera, J.C. 2005. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *The Journal Of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94,181-187 pp.
- Sake, SB. Axiao, A. & Allis, CD. 2004. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *British journal of cancer* 90, 761-769 pp.
- Sengupta, S & Harris C.C. 2005. P53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature reviews molecular cell biology* 1, 44-55 pp.
- Sorenmo, U.K. Shofer, F.S. & Goldsmith, M.H. 2000. Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs with Mammary Carcinoma. *Journal of Veterinary Medicine* 14, 266-270 pp.
- Sorenmo, K. 2003. Canine mammary gland tumours. *The veterinary clinics small animal practice* 33, 573-596 pp.
- Teodoridis, J.M. Strathdee, G. Plumb, J.A & Brown, R. 2004. CpG-island methylation and epigenetic control of resistance to chemotherapy. *Biochemical society transactions* 32, 916-917 pp.
- Welsh Fossum, T. 2002. *Small animal surgery*. 2<sup>nd</sup> edition. Mosby, Inc. USA. 632-637 pp.
- Worm, J. & Guldberg, P. 2002. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med* 31, 443-449 pp.



## Bilaga 1.

### Ordlista

---

Adenom	Godartad körteltumör
Anaplastisk	Förlust av differentieringsförmåga hos cellerna
Aneuploid	Tillstånd med onormalt kromosomantal
Carcinom	Malign epitelcellstumör
Eukromatin	Luckert kromatin som kan transkriberas
Growth hormone	Tillväxthormon
Heterokromatin	Kraftigt förtätat kromatin som ej kan transkriberas
Histonacetyltransferas	Enzym som acetylerar histoner
Histondeacetylas	Enzym som plockar bort acetylering från histoner
Histonmetyltransferas	Enzym som metylerar histoner
Housekeeping-gen	Gener som svarar för cellens basala funktioner
Imprinting	Genetisk prägling
Insulin growth factor	Tillväxthormon
Mesenkymal vävnad	Binväv/stödjevävnad
Metylgrupp	CH <sub>3</sub>
Metyltransferasenzym	Enzym som donerar metylgrupper
Onkogen	Gen som har med celledelning att göra, kan bidra till tumöruppkomst
P53	Tumörsuppressorgen som hindrar tumöruppkomst
Promotor	Del av gen som styr transkription men som ej själv uttrycks
Sarkom	Elakartad mesenkymal tumör
Transkription	Avläsningsprocess då DNA översätts till RNA
Tumörsuppressorgen	Gen som har som uppgift att hämma tumörutveckling t.ex. p53

---