

Metodutveckling för analys av serglycinuttrycket i blodet hos hundar

Boel Sandros

**Handledare: Gunnar Pejler
Inst. för Anatomi och Fysiologi
Biträdande handledare: Patricio Rivera
Inst. för Kliniska Vetenskaper**

INNEHÅLL

Abstract	4
Sammanfattning	5
Bakgrund	6
Serglycin – en intracellulär proteoglykan	6
Mastceller	6
Mastcellstumörer hos hund	7
Serglycin som markör för mastcelltumörsjukdom	8
Material och metod	10
Material	10
Hantering	10
Kvantitativ PCR	10
Preparering av mRNA	11
RT PCR	12
Primerdesign för qPCR	12
Mastermix	13
Utformning av qPCR	13
Resultat	14
Diskussion	17
Tack	19
Referenser	20

Bilaga 1 – Protokoll för RT PCR

Bilaga 2 – Primrar för qPCR

Bilaga 3 – Protokoll för egen mastermix till qPCR

ABSTRACT

The development of quantitative, real-time PCR (qPCR) combined with the mapping of the canine genome opens new possibilities in veterinary medicine. This method provides a quick and accurate quantification of the expression of a specific gene at a given point in time and thereby also information of how the gene expression for a certain protein is influenced by various conditions and diseases. One possible area of application is identifying bio markers for cancer. Recently the protein serglycin (the core protein of an intracellular proteoglycan) was found to act as a selective marker for the disease acute myeloid leukemia in humans (Niemann et al, 2007). Serglycin is produced by most hematopoietic cells, although mast cells account for the largest amount of serglycin. The expression of serglycin in dogs remains to be explored. As mast cell tumours are common in this species, it would be of interest to find out whether serglycin can be used as a marker for these tumours, to facilitate diagnosis and prognosis as well as evaluation of how well a patient is responding to treatment.

The aim of this study is to develop a qPCR-analysis of serglycin expression in canine blood, to serve as a starting point for further research. Several parameters, such as the optimum temperature for the PCR-reaction, primer design and DNA-concentration, have been established. The resulting PCR-analysis is functioning, although still in need of further modifications in order to achieve the desired efficiency and reproducibility.

SAMMANFATTNING

Utvecklandet av kvantitativ, direktanalyserad PCR (qPCR, realtidsPCR) öppnar tillsammans med kartläggningen av hundens genom nya möjligheter inom veterinärmedicinen. Med denna metod kan man snabbt och noggrant kvantifiera uttrycket av en specifik gen och på så vis få information om hur genuttrycket för ett visst protein påverkas vid olika tillstånd. Ett möjligt användningsområde är att identifiera biomarkörer för olika cancersjukdomar. Nyligen konstaterades proteinet serglycin (som utgör kärnan i en intracellulär proteoglykan) vara en selektiv markör för sjukdomen akut myeloid leukemi hos människa (Niemann et al, 2007). Serglycin förekommer hos flertalet hematopoietiska celler, dock svarar mastcellerna för den högsta produktionen. Till min vetskap har serglycinuttrycket hos hund ännu ej studerats. Eftersom mastcellstumörer är vanliga hos detta djurslag vore det intressant att ta reda på om serglycin kan användas som biomarkör för dessa, att användas såväl prognostiskt och diagnostiskt som för uppföljning av insatt behandling.

Syftet med detta arbete är att utveckla en qPCR-analys av serglycinuttryck i hundblod som kan ligga till grund för fortsatta studier. Olika parametrar, såsom optimal temperatur för PCR-reaktionen, primerdesign och DNA-koncentration, har fastslagits. Slutresultatet blev en fungerande qPCR-analys för hundserglycin, som dock behöver ytterligare modifieringar för att uppnå önskad effektivitet och reproducerbarhet.

BAKGRUND

Serglycin – intracellulär proteoglykan

En proteoglykan består av en förhållandevis liten proteindel, core protein, till vilken långa kedjor av glykosaminoglykaner, GAGs, är kopplade. Proteoglykanernas funktion i det extracellulära rummet och på cellytan har studerats i detalj; de skänker struktur och stadga åt cellmatrix samt möjliggör celladhesion, migration, proliferation och differentiering etc. Det är främst GAG-kedjorna som, genom sin negativa laddning och de många möjligheterna till vätebindningar och elektrostatiska interaktioner med andra proteiner eller proteoglykaner, utgör proteoglykanets biologiskt aktiva del. I exempelvis bindväv är proteoglykaner viktiga för cellmigration och matrix förmåga att binda vatten. Som komponenter i cellmembranets yta har proteoglykaner betydelse för bland annat signalöverföring och endocytos. (Zernichow et al 2006; Kolset et al, 2004)

De intracellulära proteoglykanerna har inte studerats lika ingående, och deras roll här är i mångt och mycket ännu oklar. Dock anses de behövas för paketering och lagring av granulakomponenter i främst hematopoietiska celler, såsom neutrofiler, cytotoxiska T-lymfocyter och mastceller, men intracellulära proteoglykaner har också påvisats i endotelceller och endokrina celler etc. (Kolset et al, 2004; Zernichow et al, 2006)

Medan det finns en mängd olika core proteiner extracellulärt har man hittills endast identifierat ett i de hematopoietiska cellernas granula, nämligen serglycin (Kolset et al, 2004). Detta protein har ett flertal bindningsställen för GAG-kedjor, vilka utgörs av heparin eller kondroitinsulfat. Den proteoglykan som de tillsammans bildar antas ha till uppgift att förpacka, lagra och utsöndra granulinnehåll, som exempelvis proteaser eller histamin (Kolset et al, 2004).

Hundens serglycinmolekyl har en kalkylerad vikt om ca 17 kDa (NCBI's databas). Efter ribosomernas syntes av serglycinmolekylen sker i Golgi-apparaten en initiering och polymerisering av GAG-kedjor. Den så kallade linkerregionen (xylos-galaktos-galaktos-glukuronsyra) fästs till aminosyran serin i core proteinet och förlängs därefter med omväxlande glukuronsyra och antingen N-acetylgalaktosamin (hos kondroitinsulfat) eller N-acetylglukosamin (om det är heparin som syntetiseras), i långa, oögrnade kedjor. Slutligen sulfateras vissa, bestämda regioner av såväl hexosaminer (N-acetylgalaktosamin respektive N-acetylglukosamin) som hexuronsyror (glukuronsyra och hos heparin även iduronsyra) (Lundequist et al, 2006; Kolset et al, 2004).

Mastceller

Mastcellerna ingår i immunsystemet, där de främst verkar genom frisättning av olika substanser, som till exempel histamin och olika proteaser. Dessa kan i sin tur dels ha en direkt effekt mot parasiter, bakterier och andra främmande agens, dels orsaka en inflammatorisk reaktion i vävnaden för att attrahera andra immunceller. Mastcellerna beskrevs först av Ehrlich (år 1877), som även namngav dem utifrån deras välfyllda utseende, med rikligt med granula i cytoplasman. De är av

hematopoietiskt ursprung, men lämnar den röda benmärgen som omogna celler för att sedan mogna utanför blodbanan, i vävnaderna. Mastceller förekommer i alla kroppens vävnader och är särskilt talrika i luftvägar, mag-tarmkanalen och huden. De mogna mastcellerna har en lång livslängd, upp till flera år, och återhämtar sig efter degranulering.

Aktivering av mastcellsdegranulering kan ske på många sätt, varav det IgE-medierade hör till de mest studerade. Mastcellens högaffinitetsreceptor för IgE gör den till en betydande faktor i allergiska reaktioner. Dock kan degranulering orsakas av en mängd andra mekanismer: genom komplement, TLR (toll-like receptors som känner igen lipopolysackarider uttryckta hos bakterier), cytokiner/kemokiner, fysikaliska stimuli och cell-cellinteraktioner, för att nämna några. Vid aktivering av mastceller frisätts således preformerade substanser, lagrade i granula i cytoplasman, dessutom ökar de novo syntesen av vissa inflammationsmediatorer. Eftersom mastcellen kan degranulera upprepade gånger behöver även syntes av granulakomponenter ske efter degranulering. Det är rimligt att anta att också uttrycket av serglycin ökar, då detta protein visat sig vara nödvändigt för upplagringen av granulainnehåll (Åbrink et al, 2004).

Mastcellstumörer hos hund

Liksom hos människor förekommer hundars mastceller i alla kroppens vävnader, men framför allt i slemhinnor och hud. Dock är det hos hund, till skillnad från hos människa, oftast i huden som symtom på mastcellsmedierade tillstånd uppträder. Ett typiskt exempel är klåda till följd av allergier. Hundar drabbas också i betydligt större utsträckning än människor av mastcellstumörer, och då företrädesvis i huden.

Mastcellstumörer är den vanligaste hudtumörformen hos hund då de utgör mellan 16 och 21 % av samtliga hudtumörer (vilka, i sin tur, sägs stå för ungefär en tredjedel av samtliga tumörer hos djurslaget). Viscerala tumörer förekommer, de är dock sällan primära. Tumören drabbar främst äldre individer (med en genomsnittsålder på nio år), men kan uppträda i alla åldrar. Vissa raser är predisponerade för att utveckla tumörformen, som exempelvis labrador, beagle och schnauzer. Boxer får ofta mastcellstumörer, dock vanligen lågradiga, mindre maligna sådana. Ingen skillnad mellan könen har rapporterats.

Symtom på mastcellstumör kan vara både lokala och systemiska. Majoriteten av tumörerna är solitära och långsamväxande (över flera månader). Beroende på tumörens malignitet kan även multipla, snabbväxande, eventuellt ulcererade hudlesioner förekomma. Ibland ses, vid manipulation av de mer maligna tumörerna, en lokal reaktion med rodnad och utslag i huden runtom tumören. Detta fenomen är en följd av degranulering och kallas Darier's sign. Systemiska symtom benämns ofta mastocytos och orsakas även de av mastcellsdegranulering; Frisättning av histamin, heparin och andra vasoaktiva aminer kan ge upphov till bland annat blodtrycksfall, ulcerationer i mag-tarmkanalen med – eventuellt blodiga – kräkningar och diarréer, koagulationsrubbningar och dyspné. Även tumörmetastasering, vilket refereras till som systemisk eller disseminerad

mastocytos, kan ge symptom från det organ som drabbas. Metastaser förekommer oftast i mag-tarmkanal, mjälte och lever, medan lungmetastaser är ovanliga.

Det finns stor variation i graden av mastcellstumörers malignitet och man har identifierat ett antal prognostiska faktorer, bland andra:

- Histologisk grad – hundar med lågdifferentierade mastcellstumörer, som endast lokalbehandlas (oftast med kirurgi) har dålig prognos, medan denna behandling vanligen är tillräcklig för hundar med en högt differentierad tumör.
- Kliniskt stadium - bestäms av tumörens histologiska grad, antalet tumörer, huruvida regionala lymfknutan är affekterad samt om systemiska symptom eller metastasering förekommer.
- Dessutom cellproliferationstakt, tillväxttakt, tumörens lokalisering och mikrokärldensitet (ju fler kärl, desto mer invasiv tumör).

Den kutana mastcellstumören kallas ibland en förklädnadernas mästare, då dess utseende kan variera kraftigt och den lätt kan förväxlas med andra hudtumörer, såväl benigna som maligna. De diagnostiska metoder som idag står till buds är dels cytologisk undersökning av finnålsaspirat från nybildningen, dels histologisk undersökning (PAD) av biopsimaterial eller exciderad tumör. PAD är nödvändig för att fastställa graden av malignitet och därmed prognos. Recidiv efter behandling upptäcks vanligen först när hunden fått nya, synliga tumörer.

Den gängse behandlingen av mastcellstumörer är kirurgisk (i en del länder används även strålning). Dock krävs vid excision vida marginaler, minst 2 cm i varje plan, något som inte alltid är praktiskt genomförbart. Hela tumören skickas för patologianatomisk diagnostik, PAD, för bedömning av histologisk grad och huruvida tumören avlägsnats i sin helhet. (Thamm et al, 2007)

För närvarande pågår även kliniska försök med kemoterapeutisk behandling med substansen Paclitaxel av olika tumörsjukdomar, däribland mastcellstumör, vid SLU:s universitetsdjursjukhus. I dagsläget tycks dock praxis ännu vara att man avlägsnar misstänkta eller konstaterade mastcellstumörer kirurgiskt, med varierande marginaler beroende på omständigheterna.

Serglycin som markör för mastcellstumörsjukdom

Såväl diagnostik och prognos som behandling och uppföljning av mastcellstumörer bjuder ibland på vissa svårigheter för klinikern. Om man lyckas identifiera en tumörmarkör som går att mäta i ett vanligt blodprov skulle det kunna innebära flera fördelar:

- Provtagningen är i jämförelse med finnålsaspirat enkel att utföra och innebär mindre risk för falskt negativt resultat, då kvaliteten hos ett cytologiskt preparat från finnålsaspirat är mycket beroende av provtagarens skicklighet. Även bedömningen av preparatet är avhängig av erfarenheten hos personen som analyserar det. För djurets del innebär en

blodprovstagning betydligt mindre påfrestning än biopsitagning eller excidering, då dessa ingrepp förutsätter att djuret sövs.

- Med kännedom om tumörens typ och grad kan adekvat behandling sättas in redan från början - eftersom mastcellstumörerna är kända för sin förmåga att kamouflera sig likväl som för benägenheten att breda ut sig utanför knölens makroskopiska avgränsning skulle exempelvis kirurgisk behandling kunna kompletteras med medicinsk, om blodprovet indikerar att tumören är aggressiv.
- Som uppföljning av insatt behandling skulle en tumörmarkör i blodprov ge möjlighet att upptäcka och behandla recidiv långt innan kliniska symtom uppträder.
- Inom forskningen: ett objektiva mått på exempelvis behandlingsmetoders framgång ger experimentet ökad reproducerbarhet.

Serglycingenen uttrycks konstitutivt hos mastceller, vilket torde göra den särskilt lämplig som tumörmarkör; den kan, till skillnad från många andra gener, förväntas uttryckas även hos lågt differentierade mastceller. Syftet med detta arbete är att utveckla en metod för att mäta serglycinuttrycket genom att analysera mRNA i hundblod, för att man förhoppningsvis i ett senare skede ska kunna undersöka serglycinets lämplighet som tumörmarkör.

MATERIAL OCH METOD

Material

Blod från två friska hundar, samlat i 2 ml EDTA- samt heparinrör, användes: från en sexårig boxerhane respektive en åtta år gammal labradortik. Även blod från en hund med diagnosticerad mastcellstumörsjukdom analyserades (samlat i 2 ml heparinrör). Provrören lades på is och blodet blandades inom en timme med RNA/DNA Stabilizing Reagent for Blood/Bone Marrow (Roche) enligt instruktion från tillverkaren. Denna reagens lyserar celler och stabiliserar nukleinsyror – som annars har en mycket begränsad hållbarhet – genom hämning av nukleaser. Efter stabilisering förvarades rören i -20°C.

Fördelen med att använda helblod framför buffy coat är dels att det innebär enklare hantering vid provtagningen på kliniken, dels att man inte riskerar att förlora eventuella mastceller i blodet, då dessa på grund av sin höga vikt lätt kan skiljas bort tillsammans med erytrocyterna.

Hantering

De åtgärder som vidtogs för att minska risken för kontaminering eller oönskad tillförsel av RNaser till blod, reagenser och produkter var: regelbunden avspnitning av ytor, konsekvent användning av engångshandskar och autoklaverade eller garanterat RNAsfria pipettspetsar, eppendorfrör samt brunnar för PCR. Bara dubbeldestillerat vatten (ddH₂O) användes. Under arbetet hölls provmaterial och reagenser kylda på is.

Kvantitativ PCR

RealtidsPCR eller kvantitativ PCR är en förhållandevis ny metod för att mäta genuttryck i olika vävnader. Med denna metod kan man detektera och bestämma mängden DNA som amplifieras under PCR:ens gång. Detta uppnås med hjälp av fluorescerande ämnen som binder till dubbelsträngat DNA (eller enkelsträngat, beroende på vilken teknik som används) och en PCR-maskin som mäter fluorescens. Det DNA som används för kvantitativ PCR (qPCR) är så kallat cDNA, eller complimentary DNA, vilket framställs från messengerRNA, mRNA, med hjälp av ett reverse transcriptase-enzym (RT). RealtidsPCR:en är följaktligen uppdelad i två steg, en reverse transcriptase-reaktion (RT PCR) och en kvantifierande reaktion, nedan kallad qPCR.

Ämnet som används för att detektera dubbelsträngat DNA under PCR:en kallas SYBR Green. Detta är ett ämne som binder ospecifikt till dubbelsträngat DNA och då utsänder fluorescens, men som är i princip inaktivt i obunden form. Fluorescenssignalen mäts i slutet av varje PCR-cykel och är proportionell till mängden dubbelsträngat DNA i provet. (Bustin, 2000)

qPCR:en delas upp i fyra faser: 1) Den linjära grundfasen, då mängden amplifierat DNA ännu inte är stor nog för att generera fluorescens som överstiger

bakgrundsnivån. Denna fas utgör vanligen de 10-15 första PCR-cyklerna. 2) Tidig exponentiell fas, då fluorescensen är tillräckligt stor för att ge utslag utöver baslinjen (vilken beräknas utifrån den linjära grundfasen). Den cykel i ordningen, då detta sker, kallas C_t (threshold cycle). C_t är proportionell mot logaritmen av den ursprungliga mängden cDNA i provet. 3) Den exponentiella fasen är PCR:ens optimala amplifieringsfas, och under ideala förhållanden fördubblas här mängden PCR-produkt vid varje cykel, vilket syns som en linjär ökning av fluorescensen. 4) Den fjärde och sista fasen kallas platåfas och avser den fas då reaktionskomponenter börjar sina. Fluorescensen i platåfasen kan inte användas för att beräkna resultat. (Wong et al, 2005)

För att kunna jämföra uttrycket av målgenen mellan individer och hos en och samma individ vid olika tidpunkter, oberoende av provets volym, är det nödvändigt med så kallad normalisering. För normalisering kan endogena housekeepinggener användas, det vill säga gener som uttrycks i en konstant nivå oberoende av vävnadstyp och experimentella förhållanden. Utifrån housekeepinggenens och målgenens respektive C_t kan man sedan beräkna koncentrationen av den senare i förhållande till den förstnämnda.

I den aktuella RT qPCR:en analyserades förutom uttrycket av seryglycingenen även det av housekeepinggenerna HPRT (hypoxantinfosforibosyltransferas), ARP (ett ribosomalt fosfoprotein) och GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenas).

Preparering av mRNA

I blod och provrör finns ämnen som inhiberar PCR, både naturliga (till exempel hemoglobin) och tillförda (antikoagulantia/heparin). För framrening av mRNA ur det lysterade och stabiliserade blodet användes ett kit, mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche):

1. Magnetiska glaspartiklar, MGP, tillsätts till blodet. Nukleinsyroras naturliga benägenhet att ospecifikt binda till kiselglasytor gör att DNA/RNA i provet fäster till MGP under inkubation.
2. MGPs separeras genom centrifugering och med hjälp av magnetisk separator. Obundet material tvättas bort.
3. Nukleinsyror elueras från MGPs.
4. mRNA skiljs från övriga nukleinsyror genom tillsats av biotin-labeled oligo(dT) och streptavidintäckta magnetiska partiklar, SMP.
5. SMP separeras i magnetisk separator och obundet material tvättas bort.
6. mRNA elueras genom tvätt.

Slutprodukten, som för ett 2ml blodprov blev 12µl ddH₂O med mRNA, användes i RT PCR eller hölls förvarat i -80°C.

RT PCR

Den reverserade transkriptionen av mRNA till cDNA skedde med hjälp av enzymet Superscript II (Invitrogen). Som primers användes random hexamers, vilka binder slumpmässigt till allt mRNA i lösningen, och för elongering av cDNA nyttjades dNTPs (fria nukleotider). DTT (dithiothreitol) tillsattes för att förhindra/klyva disulfidbindningar hos proteinet. För fullständigt protokoll, se bilaga 1.

RT PCR:en utfördes vid sju tillfällen, från såväl nypreparerat som fryst mRNA. Det erhållna cDNA:t koncentrationsbestämde i spektrofotometer och koncentrationen varierade mellan ca 700 och över 2000 ng/ μ l. Variationen i cDNA-koncentration tycktes inte bero på om mRNA varit färskt eller fryst. Efter RT PCR användes cDNA direkt i realtidsPCR eller förvarades i -20°C .

Primerdesign för qPCR

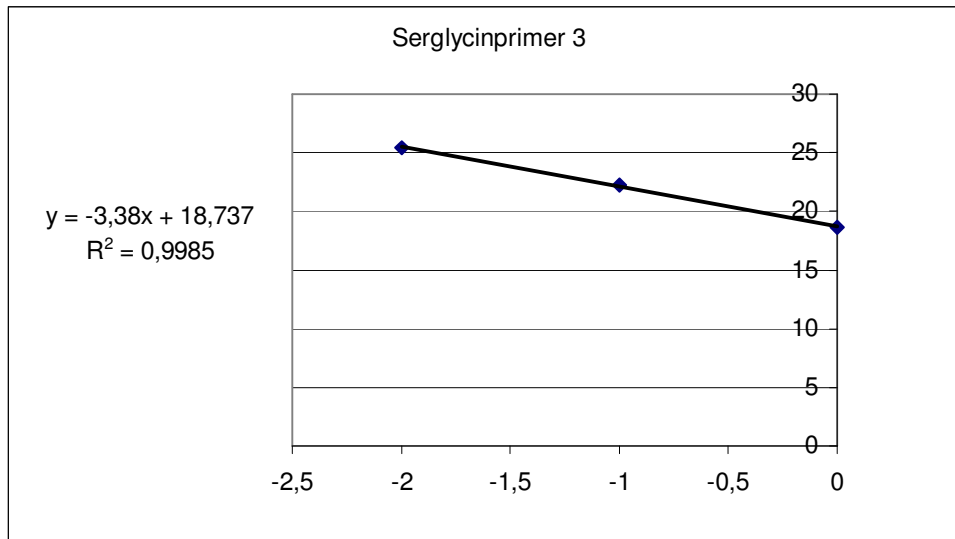
Det ställs höga krav på primrar för qPCR; ampliconet (den DNA-sekvens som amplifieras) bör vara ca 100 baspar långt och specifikt för den gen som analyseras. Ett kort amplicon amplifieras snabbare och denatureras lättare. Åtminstone en av primrarna bör sträcka sig över en exonjunction, för att inte cDNA ska förväxlas med eventuellt kontaminerande, genomiskt DNA. Primrarnas annealingtemperatur (den temperatur vid vilken de binder till DNA-strängen) bör ligga i samma intervall och de bör, i möjligaste mån, inte ge upphov till sekundärstrukturer i form av hairpins eller primerdimerer. Primersekvensen ska helst inte ha en för hög andel G/C-innehåll, då dessa bindningars styrka kan göra primern mer ospecifik. Inte heller för många A/T i en följd är önskvärt, framför allt i början eller slutet av primern, då dessa kan ge en för svag bindning till DNA-strängen. (Bustin, 2000; Rybicki, 2001)

Transkriptsekvenser för såväl serglycin som housekeepinggener erhöles från hundgenomdatabasen (www.ensembl.org) och kontrollerades mot National Center for Biotechnology Information, NCBI:s databas (www.ncbi.nlm.nih.gov). Primrar designades med hjälp av programmet Primer Express™ Version 1.0 enligt kriterierna i föregående stycke. För att bekräfta primrarnas genspecificitet utfördes BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) på NCBI:s databas (adress enligt ovan). För ytterligare information om de primersekvenser som valdes, se tabell i bilaga 2.

En av de viktigaste egenskaperna hos primrarna är deras effektivitet. Helst ska de ge en fördubbling av ampliconet vid varje PCR-cykel, vilket innebär en effektivitet på 100 %. Det anses dock att effektiviteter mellan 90 och 100 % är tillräckliga för att ge analysen validitet. Effektiviteten beräknas genom att testa primrarna i en PCR-analys av ett och samma cDNA i tre spädningar (1:1, 1:10 och 1:100). Sedan plottas C_t för varje cykel i ett diagram med 10-logaritmen på x-axeln: en effektivitet på 90-100 % motsvarar en lutning på $(-3,1) - (-3,6)$ hos trendlinjen.

Exempel:

Ett primerpar för serglycin hade i de olika spädningarna C_t på 18.66, 22.27 respektive 25.42 och visade sig alltså ha en god effektivitet.



Mastermix

Förutom primrar och cDNA behövs en mastermix för att reaktionen ska kunna äga rum. En mastermix innehåller bland annat buffertlösning, fria nukleotider, Taqpolymeras och $MgCl_2$. För qPCR:en användes huvudsakligen en färdig mastermix, iQSYBRGreen (BioRad), men också mastermix efter ett eget protokoll testades (se bilaga 3).

Utformning av qPCR

Den kvantitativa PCR-analysen utfördes i en BioRad MiniOpticon. Volymen i varje reaktion var 25 μ l, varav 2,5-3,0 μ l utgjordes av cDNA. Varje analys bestod av 40 cykler om 30s i 95°C (denaturering), följt av 20s i 57-60°C (annealing) och slutligen 20s i 72°C (förlängning). Fluorescensen i brunnarna avlästes efter varje steg. Avslutningsvis genererades en så kallad melting curve, då temperaturen höjdes stegvis med 0,8°C från 50 till 90°C. Vid en amplikonspecifik temperatur klyvs det dubbelsträngade DNAt vilket syns som en topp i melting curve-analysen. På detta sätt försäkras man sig om att rätt DNA-sekvens har amplifierats.

För att optimera effektiviteten testades primerkoncentrationer mellan 200 och 400 nM i olika annealingtemperaturer (se ovan). Även cDNA-koncentrationen varierades; som lägst gav 1:1-spädningen ca 1000 ng per reaktion (motsvarande 40 ng/ μ l) och som högst 3000 ng (120 ng/ μ l). Mängden mastermix var 12,5 μ l per reaktion och resterande utgjordes av ddH₂O. De negativa kontrollerna innehöll mastermix, primerpar och ddH₂O.

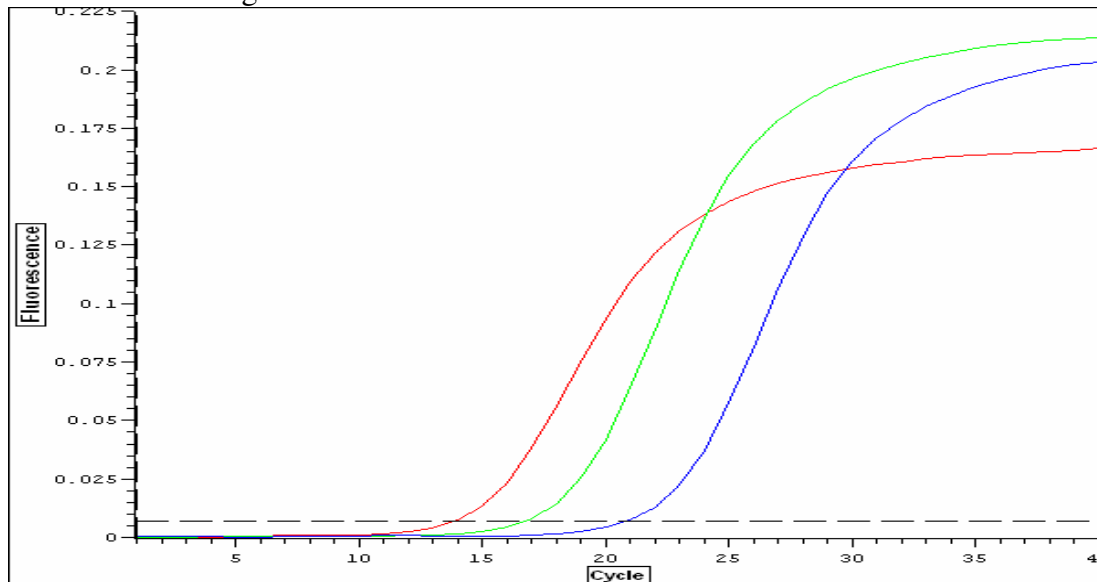
RESULTAT

I samtliga PCR-analyser kunde serglycin påvisas i blodet från de tre hundarna, med hjälp av de primerpar som tagits fram. Av primrarna för housekeepinggener var Htrp1 och Htrp3 de som fungerade bäst.

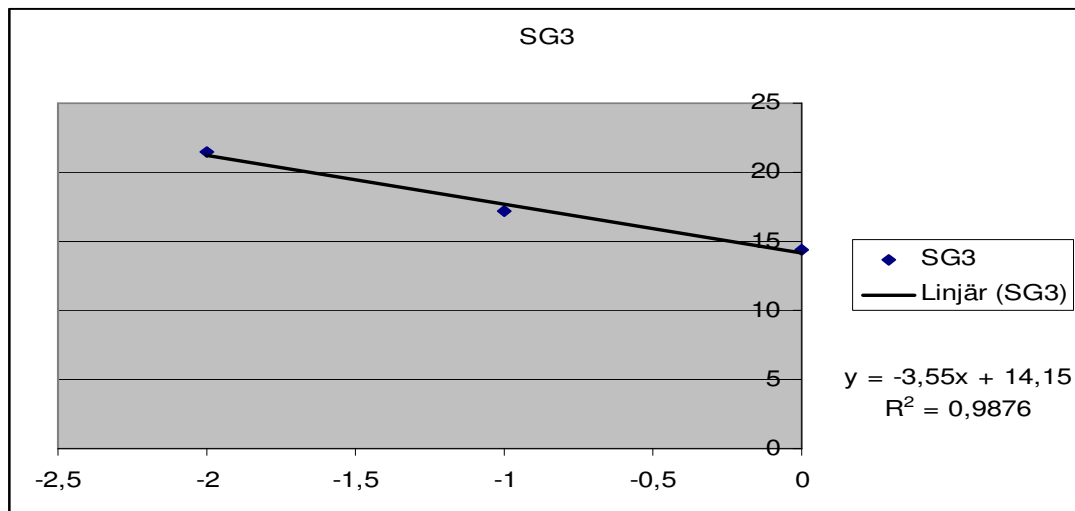
Följande grafer visar Ct och melting curves i en PCR utförd på blodet från den friska labradortiken. Annealingtemperaturen var 58°C vilket var den temperatur som i försöken gav bäst resultat för de olika primerparen. cDNA-mängden i reaktionerna med högst koncentration (spädning 1:1) var ca 2100 ng/brunn (motsvarande 84 ng/μl). Primerkoncentrationen var 300nM.

Röd linje betecknar den högsta koncentrationen cDNA och blå den lägsta. De streckade linjerna motsvarar bakgrundsfluorescensen, basnivån.

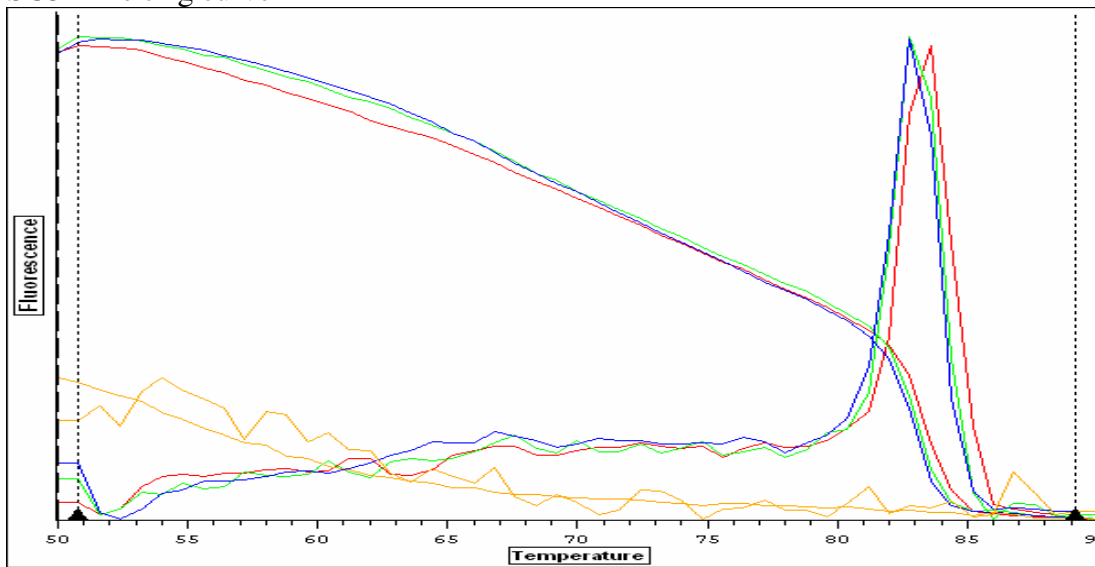
SG3 - kvantifiering



C_t-värdena för de olika spädningarna var 14.38, 17.24 och 21.48, vilket gav en effektivitet på nära 100 %. Se beräkning nedan:

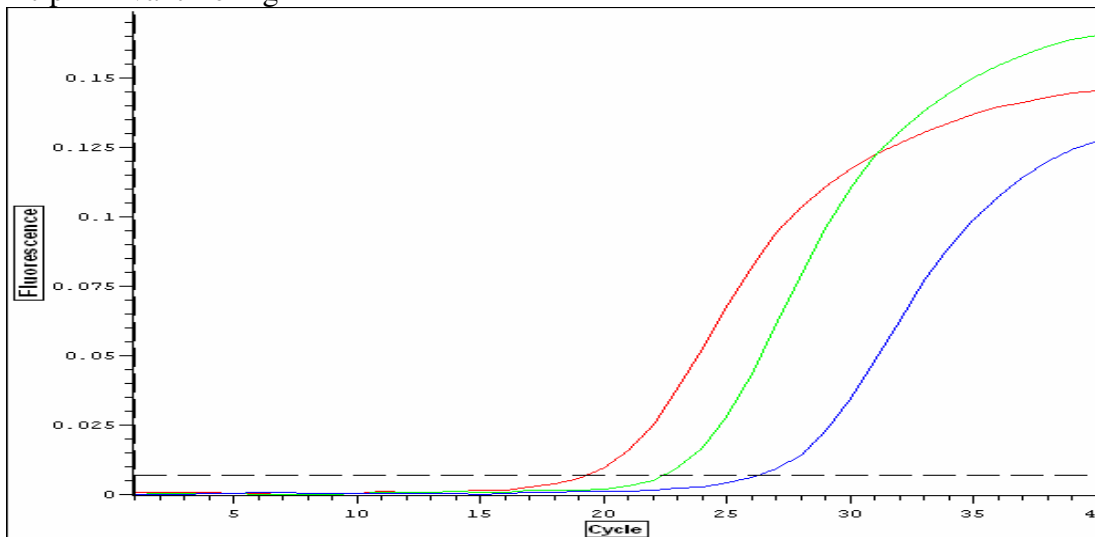


SG3 – melting curve

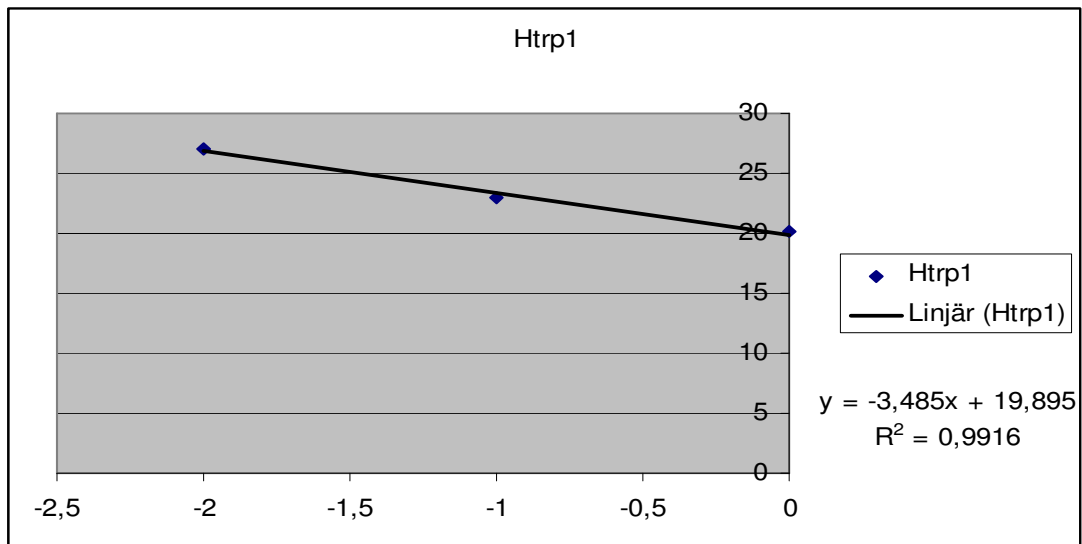


Meltingtemperaturen peakade vid ca 83°C. Den gula linjen avser negativ kontroll och har, tillfredsställande nog, ingen peak.

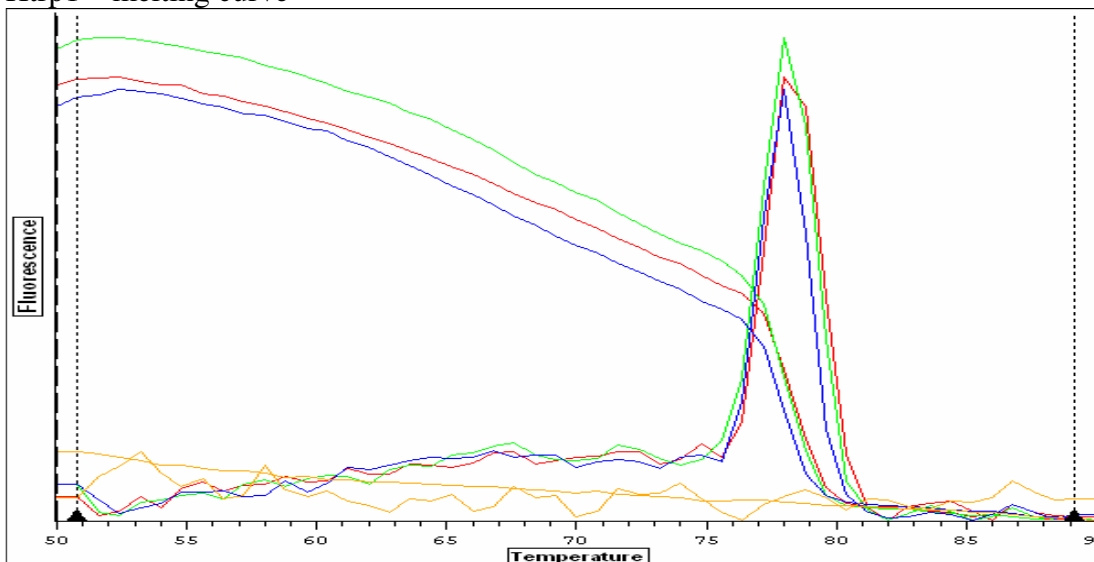
Htrp1 – kvantifiering



C_t här var 20.08, 23.01 och 27.05. Effektiviteten ligger nära den för SG3-primrarna:



Htrp1 – melting curve



Meltingtemperaturen var 78°C. Inte heller här finns det någon peak i den negativa kontrollen.

I övriga PCR-analyser kunde inte resultaten ovan upprepas utan effektiviteten var oftast låg och fluktuerande. Vid ett antal tillfällen visade sig de brunnar med högst koncentration cDNA, som alltså förväntades ha lägst C_t , vara de där reaktionen fungerade sämst. Då värdena för dessa reaktioner plottades fick kurvan snarast formen av en hängmatta, där den högsta och lägsta koncentrationen fungerade sämst, medan 1:10-spädningen hade bäst signal.

De sex PCR-analyser som utfördes med den hemgjorda mastermixen hade alla en peak i negativ kontroll (som saknades i de övriga brunnarna) vilket tyder på antingen kontamination med genomiskt DNA eller primerdimerer, men gav annars resultat som var jämförbara med analyserna gjorda med kommersiell mix.

DISKUSSION

Tyngdpunkten i detta arbete har legat vid utformandet av en kvantitativ PCR för serglycin i hundblod, som ska ha god specificitet, sensitivitet och tillförlitlighet. De parametrar jag har testat är temperatur, primerdesign, koncentration av primrar respektive cDNA, samt i viss mån mastermixens sammansättning. Fyra av primerparen visade sig ha tillräckligt god effektivitet för att lämpa sig för qPCR, nämligen SG2, SG3, Hprt1 och Hprt3. Den annealingtemperatur som verkade mest förmånlig för dessa primerpar var 58°C.

Jag kunde inte komma till någon entydig slutsats beträffande optimal koncentration av cDNA. Det är tänkbart att låga koncentrationer ger ett falskt negativt resultat, då reaktionskoncentrationer omkring 40ng cDNA/μl gav mycket låg effektivitet hos PCR:en. I mina försök visade sig dock även höga cDNA-koncentrationer vara ofördelaktiga; i en del fall gav helt ospätt cDNA liten eller ingen signal i PCR-analysen, medan samma cDNA utspätt 10 och 100 gånger amplifierades förhållandevis väl. Detta fenomen upprepades vid olika temperaturer och primerkoncentrationer. Den troligaste förklaringen vore att det tillsammans med det ospädda cDNA:t förekom inhibitorer av PCR, som när de spädades inte åstadkom en lika framträdande effekt. Sådana inhibitorer kan exempelvis ha följt med från den föregående RT PCR:en, såsom:

- DTT, dithiothreitol – detta ämne klyver eller förhindrar disulfidbindningar och optimerar RT-enzymets funktion. Dock verkar det hämmande på kinetiken hos qPCR:en. (Wong, 2005) Man har funnit att uteslutande av DTT i RT PCR:en har gett bättre sensitivitet och noggrannhet i kvantitativ PCR-analys av framför allt sådant mRNA som förekommer i små mängder (Lekanne et al, 2002).
- Även reverse transcriptaset har en hämmande effekt på qPCR. (Wong, 2005) Dock finns indikationer om att en del primrar är mer känsliga för RT än andra (Suslov et al, 2005).
- dNTPs, fria nukleotider – medan en för liten mängd av dessa innebär att reaktionen inte kan fungera effektivt ("byggstenarna" räcker inte) verkar en för stor mängd inhiberande genom att de binder till sig Mg²⁺, som bör finnas obundet i lösningen för qPCR. Mg²⁺ påverkar polymerasets effektivitet positivt, samt bildar komplex med dNTPS, vilket är nödvändigt för att dessa ska kännas igen av enzymet. Dessutom höjer Mg²⁺ DNAs melting temperature (T_m, den temperatur då DNA klyvs i två enkelsträngar), vilket försvårar amplifiering. (Bustin, 2000.)

Andra hämmande faktorer kan ha följt med från tidigare steg, såsom hemoglobin och heparin från blodproven, dock är detta mindre troligt, med tanke på skillnaderna i tillvägagångssätt: I framreningen av mRNA separeras detta från supernatanten med hjälp av en magnetisk separator, medan produkten i RT PCR:en inte separeras alls från de använda reagenserna inför nästa steg i qPCR:en.

Enligt min uppfattning kan en känslig och säker qPCR-analys avsedd att påvisa och kvantifiera serglycinuttryck i hundblod sannolikt utvecklas, när man väl övervunnit svårigheterna som uppstår när provmaterialet (och därmed mRNA-

mängden) är litet. Möjliga tillvägagångssätt skulle kunna vara att utesluta DTT ur RT-reaktionen, att på något vis rena produkten från RT-reaktionen eller att prova ut en egen formel för mastermix, för att på så sätt öka effektiviteten och reproducerbarheten hos den kvantitativa PCR:en. För att erhålla optimal sammansättning av mastermixen bör man lämpligen räkna ut den relativa mängd Mg^{2+} respektive dNTP som behövs för att PCR-reaktionen skall vara i jämvikt.

Även andra analysmetoder kan testas: En möjlighet vore att med hjälp av antikroppar påvisa själva serglycinet, i en så kallad immunoassay. Dock innebär detta praktiska svårigheter, eftersom serglycinmolekylen, i sin egenskap av core protein, är täckt av glykosaminoglykaner och därför svåråtkomlig för en antikropp att binda till.

En ytterligare, och kanske mer framgångsrik, möjlighet är att i qPCR:en använda sig av TaqManprob istället för SYBR Green: I likhet med SYBR Green använder sig TaqMan av fluorescerande ämnen, men till skillnad från SYBR Green (som ger fluorescens i närvaro av allt dubbelsträngat DNA, även exempelvis primerdimerer) binder TaqManproben specifikt till amplikonet. Metoden innebär att en enkelsträngad oligonukleotid, specifik för amplikonet, binder till motsvarande del av det denaturerade DNA:t. PCR-reaktionen sker som vanligt, med hjälp av taqpolymeras och forward/reverse primrar, men när taqpolymeraset når sekvensen där TaqManproben sitter bunden, klyvs den senare från DNA-strängen och sänder i samband med detta ut en fluorescerande signal. Metoden är mer kostsam än SYBR Green, men kan ha en större känslighet i detektionen av, i synnerhet, små mängder mRNA.

TACK

Stort tack till Annette Duelli, som med en ängels tålamod har delat med sig av sina kunskaper om och erfarenheter av qPCR. I synnerhet vill jag tacka för all hjälp med att designa primrar och i det praktiska arbetet. Tack också till min biträdande handledare Patricio Rivera, som bistått med såväl hundblod och källlitteratur som engagemang och agerande av bollplank. Sist men inte minst: tusen tack till min handledare Gunnar Pejler, för att alltid ha tagit sig tid att ge mig stöd, kloka synpunkter och uppmuntrande ord.

REFERENSER

Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000 25, s 169-193

Kolset SO, Prydz K, Pejler G (2004) Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 2004 Apr 15;379(Pt 2) s217-27

Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AF (2002) Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem* 2002 Aug 1;307(1) s63-9

Lundequist A, Åbrink M, Pejler G (2006) Mast cell-dependent activation of pro matrix metalloprotease 2: A role for serglycin proteoglycan-dependent mast cell proteases. *J Biol Chem* 2006 Oct-Nov;387(10-11) s1513-9.

Niemann CU, Kjeldsen L, Ralfkiaer E, Jensen MK, Borregaard N (2007) Serglycin proteoglycan in hematologic malignancies: a marker of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007 Dec;21(12) s2406-10

Rybicki EJ (2001) PCR primer design and reaction optimisation. *Molecular Biology Techniques Manual*, 3rd ed.

Suslov O, Steindler DA (2005) PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res* 2005 Nov 27;33(20):e181

Thamm DH, Vail DM (2007) Mast cell tumors. *Small Animal Clinical Oncology*, 4th ed. Withrow SJ, Vail DM. Saunders. s402-424

Wong ML, Medrano JF (2005) Real time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005 Jul;39(1) s75-85

Zernichow L, Åbrink M, Hallgren J, Grujic M, Pejler G, Kolset SO (2006) Serglycin is the major secreted proteoglycan in macrophages and has a role in regulation of macrophage tumor necrosis factor-alpha secretion in response to lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2006 Sep 15;281(37) s26792-801.

Åbrink M, Grujic M, Pejler G (2004) Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. *J Biol Chem* 2004 Sep 24;279(39) s40897-905

Bilaga 1

Protokoll för RT PCR

5 µl total mRNA
3 µl random hexamers (50ng/µl)
5 µl dNTPs (2mM)

upphettas till 65 grader i 5 minuter
nedkyles på is i 2 minuter
kort centrifugering

tillsats av:

4 µl 5x strand buffer (Invitrogen)
2 µl 0,1M DTT

- mixas försiktigt
- inkuberas i 25 grader i 2 minuter

1 µl Superscript II (Invitrogen) tillsättes

- inkuberas i 25 grader i 10 minuter
- därefter i 42 grader i 50 minuter
- sedan 70 grader i 15 minuter

Bilaga 2

Primrar för qPCR

Gen	Forward	Reverse	Tm
Serglycin 1	CAG TTC AAG GTT CTC CTG TGA AGA	CTG GAA GTA GGT CAA ACA TTG GTT C	59 grader
Serglycin 2	ACT GAA GTG AAC TGG TCA CGA TG	CTC TTC ACA GGA GAA CCT TGA ACT G	i.u.
Serglycin 3	CAG TCC TGA CAG TAA TTC CGC AA	GGG ATC TTG ACA TTG AAG AAC GG	60/61 grader
HPRT 1	GCT GAC CTG CTG GATT AT ATC AAA G	TGG TCA TTA CAG TAG CTC TTC AGT CTG	59 grader
HPRT 2	GTG GAG ATG ATC TCT CAA CTT TAA CTG	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GC	58 grader
HPRT 3	GGA CAT AAA AGT AAT TGG TGG AGA TG	GGT CCT TTT CAC CAG CAA GC	58/58 grader
ARP 1	CCC TGG AGA AAC TGT TGC CTC	GAC TTC ACA TGG AGC TAT GGC AC	60 grader
ARP 2	CTC GCT TCT TGG AGG GTG TC	CAG GAC CCG CTT GTA TCC AT	58 grader
GAPDH	CTG GGG CTC ACT TGA AAG G	CAA ACA TGG GGG CAT CAG	i.u.

Bilaga 3

Protokoll för egen mastermix till qPCR

För 100 µl (räcker till åtta reaktioner):

- 15 µl KCl (1M)
- 6 µl Tris pH 8,4
- 30 µl dNTPs (2mM)
- 37,5 µl MgCl₂ (25mM)
- 2,4 µl Taq (5 u/µl)
- 9 µl SYBR green (1:1000)
- 5,1 µl glykol (87%)
- 33 µl BSA (5ng/µl)
- 12 µl ddH₂O