



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Serglycin, en prognostisk biomarkör för aggressiv cancer i hund

**Serglycin, a prognostic biomarker for
canine metastatic cancer**

Lovisa Jönsson

*Uppsala
2019*

Serglycin, en prognostisk biomarkör för aggressiv cancer i hund

Serglycin, a prognostic biomarker for canine metastatic cancer

Lovisa Jönsson

Handledare: Magnus Åbrink, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Claudia Lützel Schwab, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Caroline Fossum, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: serglycin, cancer, metastaser, elakartad, malign, hund, canine, biomarkör, glykoprotein, qPCR

Key words: serglycin, cancer, dog, canine, metastatic, malignant, metastases, biomarker, glycoprotein, qPCR

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Juvertumörer är en av de fem vanligaste kliniska diagnoserna som ställs på hundar i Sverige och cancer är en av de vanligaste dödsorsakerna. Cirka 50 % av alla juvertumörer är elakartade (maligna) och för ökade möjligheter till tidig behandling av cancer behöver prognostiska biomarkörer identifieras.

Serglycin är en proteoglykan som framför allt uttrycks i immunförsvarsceller, men serglycin kan även uttryckas i höga nivåer av tumörceller. Inom human cancerforskning har flertalet studier visat ett förhöjt serglycinuttryck från tumörceller vid bröst-, prostata- och coloncancer. Maligna tumörer med en invasiv tillväxt och metastasering uttrycker högre nivåer av serglycin än benigna tumörer. Ett högt serglycinuttryck har dessutom korrelerats med sämre prognos. En robust metod som kvantifierar serglycinuttrycket skulle därför kunna användas för att bedöma prognosen för cancerpatienten.

I denna studie har serglycinuttrycket analyserats i tumörprover och normal vävnad från formalinfixerat och paraffinbäddat material från hund. Analysen gjordes i realtid med ”quantitative polymerase chain reaction” (qPCR) där uttrycket i tumörproverna jämfördes med motsvarande normal vävnad. Ett försök att kartlägga normalvariationen av serglycin i blodprover från hund gjordes också, men dessa prover behöver behandlas ytterligare innan analys med qPCR kan ske.

Resultatet från denna studie visar att benign tumörvävnad från juver uttrycker lägre nivåer av serglycin än motsvarande normal juvervävnad. Malign tumörvävnad från colon och juver uttrycker dock högre nivåer av serglycin än motsvarande normal vävnad, vilket är i linje med resultat från tidigare studier på människa. Innan serglycin kan användas som biomarkör på kliniken för hundar med cancer behöver dock fler prover analyseras och jämföras med normal vävnad, gärna från samma individ. Vidare behöver ett enkelt och billigt sätt att mäta uttrycket tas fram och kunskap om normalvariationen i serglycinuttryck för hund kartläggas.

SUMMARY

Tumours in the mammary glands are one of the five most common diagnoses in dogs in Sweden and cancer is one of the most common causes of death. Approximately 50% of mammary tumours are malignant and the identification of a prognostic biomarker would be highly valuable to be able to start an early and efficient treatment.

Serglycin is a proteoglycan that, apart from its effect in hematopoietic cells, is expressed at high levels in tumour cells. In human cancer research elevated expression of serglycin has been found in breast-, prostate- and colon cancer. Malignant tumours with metastasis and a more invasive growth expressed higher levels of serglycin than more benign tumours. A high level of serglycin has also been related to a poor prognosis. A robust method to quantify serglycin can thereby give information on the prognosis of the disease.

The aim of this study was to analyze the expression of serglycin by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using formalin fixed and paraffin embedded tumour tissue from dogs. These samples were then compared to the expression from normal tissue, also formalin fixed and paraffin embedded. An attempt to plot the normal variation of serglycin in blood samples was also done, but these samples need more work before analysis with qPCR.

The results from this study shows that benign mammary tumours express less serglycin compared to normal mammary tissue. Malignant tumours from colon and mammary glands on the other hand express elevated levels of serglycin compared to normal tissue, in accordance with studies of human cancer material. However, more samples need to be analyzed and compared to normal tissue, preferably from the same individual, before serglycin can be used as a biomarker in the dog cancer clinic. In addition, an easy and cheap way to analyze the expression must be developed and the normal variation of the expression levels in dogs must also be established.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	1
Cancer hos hund	1
Proteoglykaner	1
Serglycin och inflammation	2
Serglycin och cancer	2
MATERIAL OCH METODER	3
Prover	3
Analys av serglycin	3
RESULTAT	4
Isolering av RNA	4
Syntes av cDNA	6
qPCR FFPE-prover	7
DISKUSSION	10
Isolering av RNA	10
Analys av serglycin	10
Cq-värden	11
Signifikans	12
Metodval	12
Serglycin som biomarkör	13
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	13
Inledning	13
Litteraturöversikt	13
Material och metod	14
Resultat och diskussion	15
TACK	15
REFERENSER	16
BILAGOR	1
Bilaga 1	1
Bilaga 2	4

INLEDNING

Juvertumörer är enligt Agria Djurförsäkring (2013) den tredje vanligaste diagnosen som ställs på hundar i Sverige. De är dessutom maligna i cirka 50 % av fallen (Pawłowski *et al.*, 2013) och cancer är en av de vanligaste kända dödsorsakerna hos våra hundar (Bonnett *et al.*, 2005). En prognostisk biomarkör är därför av stort värde för bedömning och behandling av patienterna.

Serglycin är en proteoglykan som framförallt uttrycks av immunförsvarsceller (Korpetinou *et al.*, 2014; Scully *et al.*, 2012), där serglycin till exempel har visats påverka bildning av granula i mastceller samt lagring och sekretion av proteaser, serotonin och histamin i dessa celler (Henningsson *et al.*, 2006; Åbrink *et al.*, 2004). Senare studier inom human cancer har även visat en korrelation mellan uttrycket av serglycin från tumörceller och malignitet hos cancer. Aggressiv cancer med hög grad av metastasering har i dessa studier haft ett högre uttryck av serglycin (Korpetinou *et al.*, 2013, 2015; Li *et al.*, 2011). Kvantifiering av serglycin i cancerpatienter skulle därmed kunna indikera tumörers malignitet och användas i prognostiskt syfte.

Denna studie syftar till att utvärdera om man genom att mäta uttrycket av serglycin i tumörprover hos hund och jämföra detta med normal vävnad kan påvisa graden av malignitet. Vi ville också skapa en bild av normalvariationen av serglycinuttrycket i blodet. Till studien samlades blodprover från undervisningshundar vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) och patienter på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala in samt väl diagnosticerade tumörprover från avdelningen för patologi (BVF, SLU) för analys med qPCR.

LITTERATURÖVERSIKT

Cancer hos hund

Cancer är en av de vanligaste kända dödsorsakerna hos våra hundar (Bonnett *et al.*, 2005) och juvertumörer den tredje vanligaste diagnosen som ställs på hundar i Sverige (Agria Djurförsäkring, 2013). Cirka 50 % av juvertumörerna är dessutom maligna (Pawłowski *et al.*, 2013). Trots kirurgi är det vanligt med återfall av tumörer antingen i juver eller metastaser i andra organ och majoriteten av tikarna avlivs till följd av detta (Misdorp & Hart, 1979).

Proteoglykaner

Proteoglykaner är makromolekyler bestående av en proteinkedja med negativt laddade glukosaminoglykaner (GAGs) bundna till sig. Beroende på celltyp kan proteoglykanerna dekoreras med GAGs bestående av polysackariderna chondroitin sulfat (CS), dermatan sulfat, heparin, heparan sulfat och keratan sulfat. Heparin som uttrycks av mastceller är kroppens mest negativt laddade GAG och dekorerar framförallt serglycin i dessa celler. Proteoglykaner syntetiseras av alla celler och delas in i tre grupper beroende på lokalisering; cellyta, extracellulärt matrix och intracellulärt (Korpetinou *et al.*, 2014). Den största gruppen är extracellulära och de agerar bl.a. co-ligand för positivt laddade cytokiner, kemokiner och tillväxtfaktorer. De är därmed involverade bland annat vid inflammation och kommunikation mellan celler (Pomin & Mulloy, 2018).

Serglycin och inflammation

Serglycin tillhör de intracellulära proteoglykanerna (Korpetinou *et al.*, 2014), men har även visats utsöndras extracellulärt och interagera med celltor och extracellulärt matrix (Kolset & Tveit, 2008). Tidigare har serglycin framför allt beskrivits i hematopoetiska celler (Kolset & Tveit, 2008; Korpetinou *et al.*, 2014; Scully *et al.*, 2012) med visad funktionell effekt i mastceller, neutrofiler, makrofager och cytotoxiska T-celler.

I mastceller, neutrofiler och cytotoxiska T-celler är serglycin viktig vid syntes och lagring av granula (Henningsson *et al.*, 2006; Åbrink *et al.*, 2004; Kolset & Tveit, 2008; Kolset & Zernichow, 2008). Vid studier i så kallade knockout-möss där genen för serglycin inaktiverats kunde en kraftig minskning av mogen granula i cytotoxiska T-celler påvisas (Grujic *et al.*, 2005). Granula av lägre mognadsgrad kunde dock påvisas, till skillnad från mastceller där betydligt färre och enbart tomma vesiklar kunde ses i de serglycin-defekta mastcellerna (Åbrink *et al.*, 2004). En annan studie av mastceller visade nära nog samma antal vesiklar oberoende av närvaro av serglycin, däremot var innehållet mer amorft när serglycin saknades (Henningsson *et al.*, 2006). Serglycin verkar enligt Henningsson *et al.* (2006) inte påverka mastcellers syntes av granula, degranuleringsförmåga eller sortering av proteaser till granula – men däremot lagringen av vissa serglycinberoende proteaser.

Makrofager och monocyter innehåller normalt inte granula och det sker ingen upplagring av serglycin i dessa celler. Istället pågår en låg konstitutiv sekretion av serglycin som ökar vid inflammation (Kolset & Zernichow, 2008). Enligt Kolset och Zernichow (2008) resulterade inhibering av serglycin i en minskad utsöndring av flertalet proteiner motsvarande storleken på kemokiner, cytokiner, tillväxtfaktorer och proteaser från dessa celler.

Serglycin och cancer

I cancerceller är serglycin oftast dekorerad med CS som GAG och ett flertal studier inom humanmedicin har visat att tumörceller uttrycker högre nivåer av serglycin än motsvarande frisk vävnad (Korpetinou *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2011; Theocharis *et al.*, 2015). I coloncancer, prostatacancer och bröstcancer har ett ökat uttryck av serglycin påvisats i mer aggressiva tumörer med högre grad av metastasering och mer invasiv karaktär jämfört med mindre aggressiva tumörer, vilket tyder på att serglycin påverkar malignitet hos sjukdomen (Korpetinou *et al.*, 2015; Theocharis *et al.*, 2015). Enligt en studie av Li *et al.* (2011) minskar tumörcellers motilitet, migration och invasion då serglycin hämmas – däremot inte tumörens tillväxthastighet. Ett högt uttryck av serglycin har även visats korrelera med dålig prognos och låg överlevnadsgrad för humana cancerpatienter (Purushothaman *et al.*, 2017).

Närmiljön, det vill säga extracellulärt matrix, blodkärl, immunförsvarsceller och signalmolekyler, är viktig för tumörers tillväxt och metastasering. CD44, ett transmembrant glykoprotein, har visats vara av stor betydelse för signalöverföring mellan tumören och komponenterna i närmiljön, vilket ger ökad proliferation och metastasering (Goodison *et al.*, 1999). Serglycin har i ett flertal studier visats agera ligand till CD44, vilket är en möjlig förklaringsmodell till dess effekt på spridning och tillväxt av tumörsjukdomar (Chu *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017). Serglycin ökar även uttrycket av CD44 genom positiv feedback, vilket ger ytterligare stimulering av tumörens tillväxt och spridning (Chu *et al.*, 2016).

Som tidigare nämnts påverkar serglycin utmognad av granula och lagring av proteaser i immunförsvarsceller (Henningsson *et al.*, 2006; Åbrink *et al.*, 2004; Kolset & Tveit, 2008; Kolset & Zernichow, 2008). En studie av Purushothaman *et al.* (2017) visade att serglycin har effekt på syntes och frisättning av exosomer från tumörceller. Studien visade ingen signifikant skillnad mellan antalet exosomer eller exosomstorlek hos celler med serglycinuttryck (serglycinpositiva celler) jämfört med celler vars uttryck av serglycin hämmats med siRNA (serglycinnegativa celler). Detta tyder på att serglycin inte påverkar syntes av eller storlek på exosomerna. Däremot var skillnaden mellan exosomerna gällande proteininnehåll stor. Exosomer från serglycinpositiva celler innehöll betydligt mer protein än de från serglycinnegativa. Serglycinnegativa exosomer visades sakna proteiner involverade vid translation, celladhesion och intracellulär transport. Studien av Purushothaman *et al.* (2017) visade även att serglycinpositiva exosomer genererade kraftigare proliferation av tumörceller jämfört med serglycinnegativa exosomer.

MATERIAL OCH METODER

Prover

Blodproverna till studien samlades från ineliggande patienter på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala, undervisningshundar på Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) samt från privatägda hundar (studenter vid SLU). Tumörprover med histopatologisk diagnos erhöles från avdelningen för patologi på (BVF, SLU) i form av formalinfixerade- och paraffinbäddade preparat (FFPE-prover).

Analys av serglycin

Isolering av RNA

RNA från proverna isolerades enligt ett modifierat protokoll med TRIzolTM Reagent (se bilaga 1). Kloroform tillsattes för att separera DNA och protein från RNA och för precipitering av RNA användes isopropanol. Proverna tvättades med 75 % etanol, späddes med RNase-fritt vatten och förvarades därefter i -80°C. Från varje blodprov gjordes två RNA-prov och koncentrationen RNA mättes i samtliga prover spektrofotometriskt med NanoDrop för att bedöma om isolering av RNA hade lyckats.

Avlägsnande av paraffin

Före isolering av RNA med TRIzol från FFPE-proverna avlägsnades fixeringen med paraffin enligt protokollet beskrivet av Ma (2012). Två snitt á 20 µm gjordes från varje paraffinblock. För att smälta paraffinet användes 100 % Xylene i två omgångar. Provet tvättades därefter två gånger med 100 % etanol och proteinas K tillsattes för att bryta ner proteiner och vävnadsstrukturer innan RNA isolerades med TRIzol. Vid isolering av RNA från FFPE-proverna tillsattes även glykogen tillsammans med isopropanol för att öka precipitering av RNA.

Syntes av cDNA

För syntes av cDNA från isolerat RNA följdes ett protokoll med Superscript III och DNase II Invitrogen AMPD1 (se bilaga 3). De primers som användes var lika delar Oligo dT, "random

hexamer primers” samt ”reverse primers” för referensgenerna och serglycin. I formalinfixerat och paraffinbäddat material måste man räkna med nedbrytning av långa RNA-kedjor. Genom att tillsätta random hexamer primers inkluderas fler av de korta, nedbrutna RNA-sekvenserna i cDNA-syntesen.

Analys med qPCR

Genuttrycket av serglycin (SGN) mättes med qPCR enligt protokollet i bilaga 4. I denna studie användes två referensgener (HPRT och EEF2). Tre rör förbereddes med ”forward” och ”reverse primers” för respektive gen. Det cDNA som skulle analyseras späddes med RNase-fritt vatten till 1:5.

För varje gen och prov gjordes en negativ kontroll med prover utan ”reverse transcriptase”. Dessa prover ska således vid qPCR-analysen inte innehålla något DNA (genomiskt DNA) och inga gener ska då kunna mätas. För att kontrollera kontamination och dimerbildning av primers gjordes även ”non template controls” med RNase-fritt vatten istället för cDNA.

Statistik

För att jämföra uttrycket av serglycin i normal vävnad med tumöromvandlad vävnad användes Livak-metoden (“Real-Time PCR Experimental Design | LSR | Bio-Rad,” n.d.) och två referensgener (EEF2 och HPRT). För att kompensera för eventuella skillnader i hur mycket generna uttrycks i respektive vävnad normaliserades serglycinuttrycket mot det geometriska medelvärdet av de två referensgenerna. Ett FFPE-prov med normal vävnad användes som kalibreringsprov och fold change från tumörproverna jämfördes med det från normal vävnad.

För beräkning av signifikans och p-värde användes Student t-test med Welsh correction i programmet GraphPadPrism. Eftersom studien endast innefattar två prover av normal vävnad har de statistiska beräkningarna gjorts på benign och malign tumörvävnad.

RESULTAT

Isolering av RNA

Absorbansvärden för samtliga prover analyserades i NanoDrop för att bedöma om isoleringen av RNA lyckats. Koncentrationen RNA varierade mellan 550 ng/μl och 2350 ng/μl i FFPE-proverna och mellan 65 ng/μl och 1195 ng/μl i blodproverna. Större delen av proverna visar tecken på kontamination, både av protein genom värden på kvoten 260/280 utanför intervallet 1,8–2,1 samt organiska ämnen som TRIzol genom värden på kvoten 260/230 under och över 2,0. Se tabell 1 och 2.

Tabell 1. Resultat av mätning med NanoDrop av RNA-koncentration i FFPE-prover

Individ	FFPE-prov	Koncentration (ng/μl)	260/280	260/230
1	7	2332	1,58	1,62
	8	1951	1,55	1,09
	9	550,0	1,28	0,35
2	16	1262	1,48	0,71
	17	2061	1,60	1,11
	18	1307	1,49	0,65
	19	1264	1,68	0,71
	20	1154	1,58	0,60
	21	1466	1,73	0,73
	22	1416	1,61	0,67
3	30	1017	1,53	0,69
	31	921,9	1,29	0,67
	32	1440	1,65	0,91
	33	754,1	1,50	0,54
	34	593,5	1,10	0,42
4	4	1082	1,60	0,54
	5	1165	1,63	0,74
	6	963,7	1,50	0,46
5	14	1660	1,31	0,93
	15	1096	1,33	0,60
6	23	963,0	1,46	0,50
	24	825,8	1,38	0,45
	25	1042	2,00	4,32
	26	1653	1,70	2,75
	27	1774	1,68	2,58
	28	1079	1,69	0,64
	29	958,9	1,48	0,72
7	1	1073	1,64	19,48
	2	1359	1,73	0,84
	3	1915	1,74	1,39
8	10	768,6	1,30	0,46
	11	1911	1,75	2,22
	12	1965	1,55	7,45
	13	1436	1,54	0,76

Tabell 2. Resultat av mätning med NanoDrop av RNA-koncentration i blodprover (två prover från vardera individ)

Blodprov	Koncentration (ng/μl)	260/280	260/230
1 (1')	107,4 (125,4)	1,67 (1,61)	0,31 (0,32)
2 (2')	199,6 (90,78)	1,60 (1,57)	0,41 (0,30)
3 (3')	105,1 (65,76)	1,58 (1,49)	0,32 (0,25)
4 (4')	273,6 (356,4)	1,82 (1,87)	0,62 (0,86)
5 (5')	287,4 (215,4)	1,79 (1,71)	0,63 (0,42)
6 (6')	784,0 (736,5)	1,74 (1,71)	1,13 (0,52)
7 (7')	723,8 (569,0)	1,63 (1,63)	0,44 (0,27)
8 (8')	623,3 (591,4)	1,60 (1,64)	0,34 (0,30)
9 (9')	427,7 (575,6)	1,86 (1,57)	1,22 (0,37)
10 (10')	325,8 (325,8)	1,82 (1,83)	0,82 (1,02)
11 (11')	1192 (1087)	1,85 (1,79)	1,33 (0,89)
12 (12')	962,0 (979,7)	1,70 (1,72)	0,50 (0,45)
13 (13')	311,8 (221,3)	1,84 (1,77)	0,80 (0,45)
14 (14')	573,2 (415,6)	1,56 (1,85)	0,33 (1,12)
15 (15')	446,0 (291,1)	1,90 (1,73)	1,46 (0,61)
16 (16')	785,2 (599,9)	1,57 (1,51)	0,56 (0,30)
17 (17')	384,4 (356,4)	1,78 (1,73)	1,13 (0,86)
18 (18')	647,5 (464,3)	1,55 (1,73)	0,36 (1,12)
19 (19')	352,6 (415,3)	1,69 (1,67)	0,88 (1,02)
20 (20')	460,9 (445,8)	1,85 (1,85)	2,12 (1,62)
21 (21')	387,4 (363,8)	1,79 (1,75)	1,18 (0,94)
22 (22')	231,7 (209,2)	1,63 (1,61)	0,51 (0,42)
23 (23')	590,3 (267,7)	1,42 (1,58)	0,31 (0,57)

Syntes av cDNA

FFPE

Efter syntesen av cDNA gjordes en PCR och gel elektrofores på två av FFPE-proverna, nummer 8 och 9 (tumöromvandlad och normal colon), för att kontrollera att protokollet och syntesen fungerat. Gelen visade tydliga PCR-produkter av förväntad storlek för båda kontrollgenerna samt serglycin, utan primerdimers eller andra PCR-produkter av fel storlek. Detta indikerar att primerdesignen för qPCR av de två referensgenerna och serglycin är bra.

Blodprover

Eftersom protokollet för isolering av RNA samt syntes av cDNA från blodprover testats i ett tidigare projekt (Löfqvist, 2018) gjordes ingen PCR och gel elektrofores innan första omgången kördes i qPCR (prov 1–8). Då resultatet från proverna 1–8 inte blev som förväntat gjordes en

PCR och gel elektrofores i efterhand av dessa prover. Syntesen av cDNA hade inte lyckats varför vi bestämde att inte köra qPCR på resterande blodprover.

qPCR FFPE-prover

FFPE-prov nummer 1, 2, 3 och 10 från individ 7 och 8 var snitt av melanom från hud och munhåla. Då vi saknade motsvarande normal vävnad att jämföra serglycinuttrycket med beslutades att inte gå vidare med qPCR-analys av dem.

Colon

Av proverna som samlats in kom tre stycken från colon, varav två var tumörprover (prov 7 och 8) och ett var av normal vävnad (prov 9). Alla prover från colon kom från individ 1, både normal vävnad och tumörvävnad. Den normala vävnaden användes som kalibrering med värdet 1,0 och beräkning med Livak-metoden gav ett fold change från tumörerna som var 2,9 respektive 3,3 (se tabell 3).

Tabell 3. Resultat qPCR FFPE colon (medelvärde på C_q för duplikat)

Individ	Prov	SGN	EEF2	HPRT	Fold change
1	9	34,07	29,32	32,10	1,0 (Kalibrator)
	7	26,82	23,36	27,11	2,9
	8	29,66	26,21	29,48	3,3

Juver

Av snitten från juvertumörer var åtta stycken benigna och 18 stycken maligna. Juverproverna kom från fem olika individer där två hade benigna tumörer (individ 2 och 3) och fyra hade maligna tumörer (individ 2, 4, 5 och 6). Individ 2 uppvisade alltså både benigna och maligna tumörer. Från individ 2 fanns även ett preparat med normal juvervävnad (prov nummer 22) vilket användes till kalibrering och normalisering av uttrycket. Fold change från de benigna tumörerna var från alla fall utom ett under kalibreringsvärdet 1,0 (se tabell 4) till skillnad från de maligna tumörerna där fold change i majoriteten av fallen var över 1,0 (se tabell 5).

Sex stycken maligna prover hade ett serglycinuttryck under 1,0 (prov nummer 18, 23, 24, 26, 27 och 29). Prov nummer 23, 24, 26, 27 och 29 kommer från individ 6 med cancer i tubuli där mängden tumörvävnad var liten till mycket liten i förhållande till normal vävnad. Från individ 6 analyserades även två snitt av lymfknutor dit tumören metastaserat, prov nummer 25 och 28. Fold change från lymfknutan har ett värde på 6,9 respektive 5,1, det vill säga över värdet för normal vävnad (se tabell 6).

Sex prover från juvervävnad saknade värden på uttrycket av en eller flera gener. Prov nummer 21 saknade endast värdet på uttrycket av HPRT och fold change kunde därför beräknas med endast en referensgen (EEF2). De prover där uttrycket från båda referensgenerna eller serglycin saknas går dock inte att ta med i beräkningen.

Tabell 4. Resultat qPCR FFPE benigna juvertumörer (medelvärde på Cq för duplikat)

Individ	Prov	SGN	EEF2	HPRT	Fold change
2	22	37,42	31,03	38,20	1,0 (Kalibrator)
2	19	37,31	28,15	39,27	0,5
	20	38,02	34,26	38,86	2,7
	21	39,29	32,24	-	0,7
3	30	37,90	31,97	34,72	0,3
	31	38,79	32,18	35,57	0,3
	32	32,78	27,37	31,46	0,7
	33	37,49	28,64	33,01	0,1
	34	36,32	29,95	33,07	0,3

Tabell 5. Resultat qPCR FFPE maligna juvertumörer (medelvärde på Cq för duplikat)

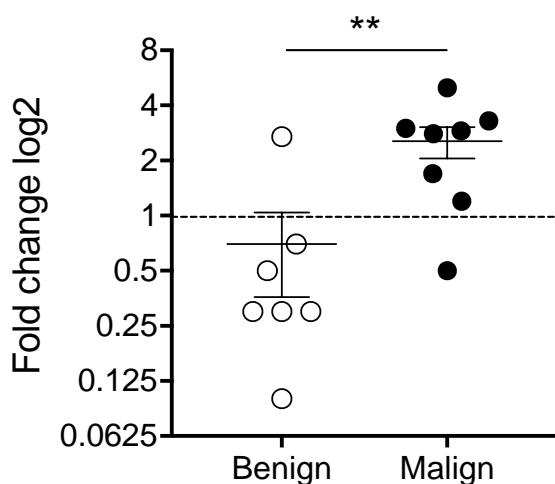
Individ	Prov	SGN	EEF2	HPRT	Fold change
2	22	37,42	31,03	38,20	1,0 (Kalibrator)
2	16	-	-	-	-
	17	35,21	31,29	33,78	1,2
	18	35,06	29,93	32,00	0,5
4	4	35,39	32,81	33,53	1,7
	5	34,96	31,91	35,24	3,0
	6	-	-	-	-
	11	38,29	36,88	38,36	5,0
	12	-	33,71	37,59	-
	13	37,56	34,77	37,68	2,8
5	14	-	39,32	-	-
	15	-	-	-	-
6	23	38,38	29,99	36,89	0,2
	24	37,16	30,90	36,13	0,6
	26	34,94	30,18	32,79	0,7
	27	36,61	31,20	33,26	0,4
	29	33,36	28,61	31,00	0,7
6 (lymfknota)	25	34,66	34,87	34,06	6,9
	28	34,14	32,29	34,74	5,1

Tabell 6. Resultat qPCR FFPE maligna juvertumörer tubuli (medelvärde på Cq för duplikat)

Individ	Prov	SGN	EEF2	HPRT	Fold change
2	22	37,42	31,03	38,20	1,0 (Kalibrator)
6	23	38,38	29,99	36,89	0,2
	24	37,16	30,90	36,13	0,6
	26	34,94	30,18	32,79	0,7
	27	36,61	31,20	33,26	0,4
	29	33,36	28,61	31,00	0,7
6 (lymfknota)	25	34,66	34,87	34,06	6,9
	28	34,14	32,29	34,74	5,1

Högre uttryck av serglycin i malign tumörvävnad

Fold change jämfördes mellan benigna och maligna tumörer och prövades statistiskt med student t-test med Welsh correction i programmet GraphPadPrism (se figur 1). Vid beräkningen användes inte data från den individ med enbart värdet på ena referensgenen (prov nummer 21) samt individ 6 med tumörer endast i tubuli då dessa inte ansågs representativa på grund av den lilla mängden tumörceller. Resultatet av beräkningen visade ett p-värde på 0,0095, det vill säga en signifikant skillnad i serglycinuttryck. De benigna tumörerna hade ett medelvärde på 0,7 med en standardavvikelse "standard error of means" (SEM) på 0,3409. De maligna tumörerna hade ett medelvärde på 2,55 med SEM på 0,4946.



Figur 1. Fold change för uttrycket av serglycin från benigna och maligna tumörer.

DISKUSSION

Isolering av RNA

Även om isoleringen av RNA från blod och FFPE-material lyckades visade större delen av proverna tecken på kontamination, både av protein genom värden på kvoten 260/280 utanför intervallet 1,8-2,1 samt organiska ämnen genom värden på kvoten 260/230 under och över 2,0. En svårighet med TRIzol är steget efter separationen då supernatanten innehållandes RNA pipetteras bort från interfasen och bottenkiktet av organiska ämnen som DNA och proteiner (Grabmüller *et al.*, 2015). Detta steg är ett riskmoment för kontamination, vilket tillsammans med otillräcklig tvättning och rester av TRIzol kan vara orsaken till kontaminationen i denna studie. Det är även en möjlig anledning till problemet som uppstod vid syntes av cDNA från blodproverna. För att gå vidare med blodproverna behöver kontaminationen minska via ytterligare tvättning.

Ett annat riskfyllt steg i protokollet med TRIzol är precipiteringen och steget därefter då supernatanten ska pipetteras bort utan att pelleten med RNA störs. En studie av Eimans *et al.* (2013) visade att RNA ofta delvis, eller helt, förlorades i detta steg. Det kan ha skett i denna studie och är en tänkbar en förklaring till de stora skillnaderna i RNA-koncentration.

Analys av serglycin

Cancer i colon är ofta aggressiv och har i tidigare studier på människa visats uttrycka förhöjda nivåer av serglycin (Korpetinou *et al.*, 2015). I denna studie analyserades två colontumörer i FFPE-prover och jämfördes med ett FFPE-prov av normal colonavävnad. Alla prover från colon kom från en och samma individ – individ 1. Fold change för tumörproverna var 2,9 respektive 3,3, vilket är ett signifikant högre uttryck än i normal vävnad. Tumörsnitten från colon klassades båda som karcinom och en stor andel av snitten omfattades av tumörvävnad utan nekroser. Snitten var alltså mycket lämpliga för analys då de innefattade många tumörceller med genuttryck att studera, vilket också ger tydliga resultat. Det är dock viktigt att fortsätta med analys av fler colontumörer från hund för att kunna dra mer definitiva slutsatser eftersom studien endast omfattar två tumörprover från en enda individ, även om resultaten visar på samma fenomen som studien av Korpetinou *et al.* (2015).

Av snitten från juvertumörer var åtta stycken benigna, 18 stycken maligna och ett av normal vävnad (prov nummer 22). Av de maligna tumörerna hade majoriteten ett fold change på över 1,0, vilket innebär att serglycinuttrycket i dem var högre än det i normal vävnad. Detta är i linje med flertalet andra studier (Chu *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017; Korpetinou *et al.*, 2013, 2015; Li *et al.*, 2011). De benigna tumörerna kom från två individer (individ 2 och 3) och hade i alla fall utom ett (prov nummer 20) ett fold change under kalibreringsvärdet 1,0 (se tabell 4), det vill säga ett lägre uttryck av serglycin jämfört med normal vävnad. Liknande resultat har inte redovisats i några andra studier, vilket är intressant. En tänkbar orsak till det låga serglycinuttrycket är att antalet levande celler i tumörvävnad kan vara färre än antalet celler i normal vävnad på grund av nekros.

Det benigna tumörprovet nummer 20 från individ 2 klassades som en ”benign blandtumör”, men kapseln var väldigt diffus vilket gjorde den svårbedömd. Individ 2 hade både benigna tumörer (prov 19, 20 och 21) och maligna tumörer (prov 16, 17 och 18) och prov 20 kan tänkas

vara en tumör i övergång mot en mer malign form, vilket skulle kunna förklara det avvikande och förhöjda värdet av serglycin.

Förekomst av nekroser gör resultatet från de maligna tumörproverna än mer intressanta då de uppvisar ett högre uttryck av serglycin jämfört med normal vävnad, trots att det låga viabla cellantalet i tumörvävnaden borde ge motsatt effekt på serglycinuttrycket. Prov nummer 4, 5, 11, 12 och 13 kommer alla från individ 4 och är klassade som maligna tumörer med endast lite nekroser. Samtliga har ett fold change över 1,0 och därmed ett högre serglycinuttryck än normal vävnad. Även prov nummer 17 från individ 2 har ett fold change på över 1,0. Prov nummer 18 däremot, vilket kommer från samma tumör och individ som prov nummer 17, innehöll stora nekroser och fold change är då endast 0,5. En viktig aspekt att ta hänsyn till vid analys av FFPE-prover tycks alltså vara att välja snitt utan allt för mycket nekroser. Risken är annars att mängden tumörceller som uttrycker generna är för liten för att ge en representativ bild.

Sex stycken maligna prover hade ett serglycinuttryck under 1,0 (prov nummer 18, 23, 24, 26, 27 och 29). Prov nummer 18 kommer som tidigare nämnts från samma individ som prov nummer 17, men innehöll stora nekroser vilket som sagt kan påverka serglycinuttrycket negativt. Prov nummer 23, 24, 26, 27 och 29 kommer alla från individ 6 (se tabell 6). Tumörvävnaden var i dessa snitt endast lokaliserad i tubuli och mängden tumörvävnad var väldigt liten jämfört med mängden normal vävnad, vilket tillsammans med nekros är en möjlig förklaring till det låga serglycinuttrycket.

Från individ 6 analyserades även två snitt från det angripna juvrets dränerande lymfknota dit cancer spridit sig. Det är prov nummer 25 och 28. Dessa snitt har ett fold change på 6,9 respektive 5,1 och har alltså ett förhöjt serglycinuttryck, vilket är i linje med resterande resultat. Viktigt att poängtera är dock att serglycin även uttrycks i immunförsvarsceller (Åbrink *et al.*, 2004, 2004; Grujic *et al.*, 2005, 2005; Henningsson *et al.*, 2006; Kolset & Zernichow, 2008; Korpetinou *et al.*, 2014), vilket det finns mycket av i lymfknotor. Eftersom lymfknotorna som snittats är angripna av cancer kan vi anta att de även är immunologiskt reaktiva med ökad närvaro av immunförsvarsceller, vilket i sig kan ge ett högre uttryck av serglycin. Fördelningen och aktiviteten på cellerna i lymfknutan varierar också med bl.a. infektion och ålder, så ett normalvärde kan vara svårt att uppmäta. I denna studie fanns ingen normal lymfknota att jämföra med och prov nummer 25 och 28 är därför jämförda med prov 22 av normal juvervävnad, eftersom processen i lymfknutan är densamma som i snitten av juvertumörer. Skillnaderna mellan vävnaden i juver och lymfknota gör dock dessa värden riskabla att dra några slutsatser från, även om lymfknutan var tydligt angripen av cancer.

Cq-värden

Sex prover från juvervävnad saknade värden på uttrycket av flera eller enstaka gener. Dessa prover har därför inte kunnat tas med i våra beräkningar. De mest troliga anledningarna till att inga värden kunde uppmätas från dessa gener och prover är misslyckad syntes av cDNA eller felaktig pipettering, antingen vid blandning och tillsats av primers eller tillsats av cDNA. Eftersom de primers som användes testades vid flertalet tillfällen genom ”non template control” utan tecken på felaktigheter är det inte troligt att själva produkten är problemet. Om så vore fallet borde samtliga gener för de primers med dålig funktion saknas. Om syntes av cDNA är

det fallerande steget borde varken serglycin eller kontrollgenerna kunnat uppmätas, vilket stämmer överens med prov nummer 6, 15 och 16 – däremot inte med prov nummer 14 och 21 där endast ett genuttryck vardera saknas. För prov nummer 14 och 21 är det därför mer troligt att problemet ligger i pipetteringen. Alla prover testades dock i duplikat i qPCR-körningen och i de prover som gav bra värden var duplikaten nära varandra i Cq-värde vilket indikerar bra pipettering. De prover som inte gav något resultat i första körningen behöver alltså analyseras en gång till.

Många av proverna i studien har ett relativt högt Cq-värde vilket kan förekomma då metoden tappar i känslighet. Ett fenomen som kan uppstå vid tappad känslighet är stora spridningar i Cq-värden mellan duplikaten (Fossum, C., Sveriges Lantbruksuniversitet, pers. medd. 2019-01-12). Skillnaden mellan duplikaten i denna studie är dock som tidigare nämnts mycket liten, vilket tyder på att metoden fungerar väl. De höga Cq-värdena kan istället bero på att mängden genetiskt material som analyserats är förhållandevis liten.

Signifikans

Med ett p-värde på 0,0095 finns en signifikant skillnad i serglycinuttryck mellan benign och malign tumörvävnad. För att gå vidare med en liknande studie är, förutom mer data, även fler prover med tumöromvandlad vävnad och normal vävnad från samma individ av stor betydelse. Detta för att minimera effekten av individskillnader i genuttryck, även om dessa skillnader kompenseras för med referensgener och kalkylering med Livak-metoden. Fler analyserade prover stärker även möjligheten att dra slutsatser från resultatet och använda informationen kliniskt.

Metodval

Det finns flera olika sätt att isolera RNA och enligt Grabmüller *et al.* (2015) finns inte en metod som är bäst i alla aspekter. Samtliga metoder har både styrkor och svagheter. Isolering med TRIzol gav i studien av Grabmüller *et al.* (2015) näst högst kvalitet på RNA, men näst lägsta koncentration. TRIzol var dock tidseffektivt och förhållandevis billigt. Den metod som fick bäst resultat i studien var NucleoSpin, med TRIzol på tredje plats av fem. Även i en studie av Eikmans *et al.* (2013) gav NucleoSpin bäst kvalitet och koncentration. TRIzol konstaterades där vara en snabb metod, men med sämre resultat. För blodproverna kan alltså en annan metod för isolering av RNA övervägas, men eftersom TRIzol fungerat för FFPE-proverna finns inget behov av att ändra metoden där.

Eftersom nekroser och en väldigt liten mängd tumörvävnad visat sig vara ett problem och en källa till fel i denna studie behövs en metod för att ta sig runt detta. Urvalet av prover skulle till exempel kunna vara mer strikt, där snitt med mycket nekroser väljs bort. Från snitten skulle också nekroser och normal vävnad kunna skäras bort så att endast den tumöromvandlade vävnaden analyseras. Detta kan till exempel göras genom mikrodissektion i ljusmikroskop. Det skulle ge ett värde på serglycinuttrycket från enbart tumörvävnaden, oavsett hur förhållandet mellan antalet tumörceller och normala celler eller nekros var från början.

I denna studie har analysen av serglycinuttrycket gjorts med qPCR. En annan möjlig metod för att analysera uttrycket av serglycin är immunohistokemi. Immunohistokemi är att föredra då du

inte enbart vill mäta uttrycket, utan även få en uppfattning om var i cellerna eller vävnaden serglycin finns. Genom immunohistokemi kan kvantiteten idag bedömas i olika dataprogram, men resultatet beror på mängden ljus som fluorescerar och hur bra antikropparna binder till serglycin utan att ge bakgrundsinfärgning. Immunohistokemi ger i dagsläget inte samma exakta data som vid qPCR. För att kvantifiera serglycinuttrycket, vilket var syftet med denna studie, är alltså qPCR att föredra då det ger mer exakt resultat i form av värden som kan beräknas statistiskt.

En ”Reverse Transcriptase PCR” (RT-PCR) går även att använda för att studera huruvida vävnaden uttrycker genen i fråga, med den metoden ger inga uppgifter om kvantiteten på genuttrycket – vilket var vad som skulle analyseras i denna studie.

Serglycin som biomarkör

Denna studie, likt tidigare studier, visar på en korrelation mellan uttrycket av serglycin och malignitet hos cancer. För att serglycin ska kunna användas som en prognostisk biomarkör krävs dock ett enkelt och billigt sätt att analysera uttrycket, i provmaterial som är lätt att samla – t.ex. perifert blod. För att kunna bedöma resultatet av ett sådant test behövs även kunskap om normalvariationen av serglycin både för provmaterialet och för arten i fråga.

Eftersom serglycin utsöndras från tumörceller finns goda möjligheter att även kunna mäta nivåerna av serglycin som protein i perifert blod, vilket tillsammans med qPCR skulle öka säkerheten i analysen. Detta skulle vara värdefullt ur ett kliniskt perspektiv. När anrikningen av RNA från blodproverna lyckas bättre bör serglycinnivåerna i dem kunna analyseras och då är hoppet stort om att i framtiden kunna använda serglycin som en prognostisk biomarkör hos patienter med cancer.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Inledning

Cancer är en av de vanligaste kända dödsorsakerna hos våra hundar och juvertumörer är den tredje vanligaste diagnosen som ställs på hundar i Sverige. För att välja rätt behandling och hantering av patienten är kunskap om utsikterna för överlevnad viktig. Ett nytt och förhoppningsvis möjligt sätt att studera hur pass elakartad cancer en patient har drabbats av är att mäta nivåerna av serglycin. Serglycin är en proteoglykan, det vill säga en struktur uppbyggd av proteiner och kolhydrater, som bland annat är aktiv i kroppens immunförsvar. Ny forskning har även visat att serglycin är involverad vid tillväxt och spridning av tumörer, där elakartade tumörer utsöndrar mer serglycin jämfört med godartade tumörer. Att mäta serglycin i ett blodprov skulle alltså kunna ge en antydning om utsikterna för patienten.

Litteraturoversikt

Cancer hos hund

Cancer är som tidigare nämnts en av de vanligaste kända dödsorsakerna hos våra hundar och juvertumörer är den tredje vanligaste diagnosen som ställs på hundar i Sverige. Cirka 50 % av juvertumörerna är dessutom elakartade och även om tumören opereras bort är det vanligt med

återfall där cancer har spridit sig till andra delar av kroppen. Till följd av detta avlivs då majoriteten av de drabbade tikarna.

Proteoglykaner

Proteoglykaner är strukturer uppbyggda av proteiner och kolhydrater som finns inuti, utanför och utanpå celler i kroppen. De flesta proteoglykanerna finns inuti cellerna där de bidrar till signalöverföringen som ger cellen sina funktioner. Det gör att proteoglykaner i det stora hela är involverade vid olika reaktioner i kroppen, som till exempel inflammation.

Serglycin och immunförsvaret

Serglycin är en proteoglykan som tidigare framför allt har ansetts uttryckas av celler involverade i immunförsvaret. Ett flertal immunförsvarsceller har så kallad granula, eller vesiklar, där kemiska substanser lagras för att sedan frisättas vilket ger reaktioner som ses vid inflammation – till exempel svullnad och rodnad. Serglycin påverkar hur dessa kemiska substanser lagras i cellerna och då serglycin inte är närvarande saknas vissa av dem vilket påverkar kroppens förmåga att försvara sig mot infektioner, skador och sjukdomar.

Serglycin och cancer

Förutom serglycins effekt i immunförsvaret har ett flertal studier visat att mycket serglycin även uttrycks av cancerceller hos människor. Det verkar även finnas ett samband mellan hur pass elakartad tumören är och hur mycket serglycin den uttrycker. En mer elakartad tumör som växer in i intilliggande vävnad och sprider sig till andra organ i kroppen har visats uttrycka mer serglycin än godartade tumörer som växer innesluten i en kapsel och inte sprider sig till andra organ. Ett högt uttryck av serglycin har också varit ett tecken på dålig prognos och mindre chans till överlevnad.

Material och metod

I denna studie har uttrycket av serglycin från tumörceller hos hund mätts och jämförts med normal vävnad av samma sort, det vill säga juvertumör har jämförts med normal juvervävnad. Ett försök att mäta och kartlägga de normala nivåerna av serglycin i blod från hund har också gjorts.

Blodproverna till studien samlades från ineliggande patienter på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala, undervisningshundar på Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) samt privatägda hundar från studenter vid SLU. Tumörproverna, som var fixerade i formalin och inbäddade i paraffin, vilket görs för att förhindra föruttelse, har samlats från avdelningen för patologi på Sveriges Lantbruksuniversitet. Urvalet av tumörprover och bedömningen om huruvida tumören var elakartad eller godartad gjordes tillsammans med en patolog på SLU.

Statistik

För att jämföra uttrycket av serglycin i tumörer med det i normal vävnad användes en statistisk metod vid namn Livak-metoden. Anledningen till detta är att värdena som fås från qPCR inte kan jämföras rakt av då hänsyn måste tas till eventuella skillnader i hur mycket gener varje vävnad uttrycker totalt. Efter beräkningen fås en kvot (ett så kallat "fold change") som kan jämföras med det för normal vävnad, vilket har värdet 1,0. Ett värde över 1,0 innebär alltså att

vävnaden uttrycker mer serglycin än normalt och ett värde under 1,0 innebär att vävnaden uttrycker mindre serglycin än normalt.

Resultat och diskussion

Alla godartade tumörer utom en hade i denna studie ett fold change på under 1,0, det vill säga ett lägre uttryck av serglycin än normal vävnad. Majoriteten av de elakartade tumörerna hade ett fold change på över 1,0, med andra ord ett högre uttryck av serglycin än normal vävnad. Sex stycken elakartade tumörer hade dock ett fold change på under 1,0, med andra ord uttryckte de mindre serglycin än normal vävnad. En trolig anledning till detta är att mängden tumörvävnad var väldigt liten i förhållande till normal vävnad i dessa prover, antingen för att tumören vuxit på ett sådant sätt som gjort att många celler dött eller att tumören inte hade hunnit växa sig större innan den upptäcktes. Detta gör att antalet celler som uttrycker mycket serglycin är en väldigt liten andel av det totala antalet celler som analyseras. Det sammanlagda och uppmätta uttrycket blir då relativt sett lägre.

Resultatet av denna studie visar dock att elakartade tumörceller från hund uttrycker mer serglycin än både godartade tumörer och normal vävnad, vilket är i linje med tidigare studier på cancer hos människa. För att säkerställa slutsatsen från denna studie behöver fler tumörprover från hund analyseras och jämföras med normal vävnad, gärna från samma individ. Det kan också vara bra att analysera prover bestående av mycket tumörvävnad, för att undvika den möjliga felkällan att antalet tumörceller är för få.

Ett viktigt steg innan serglycin kan användas som en mätbar variabel för bedömning av cancers aggressivitet och patientens framtidsutsikter är att ta reda på vad som är normala nivåer av serglycin. Det är även viktigt att kunna analysera serglycin i en från patienten lättillgänglig vävnad, till exempel ett blodprov. För att kunna göra detta behöver arbetet med blodproverna i denna studie fortsätta genom vidare bearbetning av de insamlade proverna och därefter analys av serglycin.

TACK

Jag vill rikta ett stort tack till Magnus Åbrink för hans engagemang, tålamod och vilja att inkludera mig i alla steg som ett forskningsarbete innebär. Din handledning har varit ovärderlig och jag har lärt mig oerhört mycket. Jag vill också tacka Claudia Lützelschwab för all tid hon har lagt ner på att lära mig laborationsrutinerna, förklara protokollen och för det stöd hon har varit genom alla steg från uppstart till färdiga resultat. Er kunskap och hjälp har gjort det här arbetet möjligt.

Tack också till Fredrik Södersten och Karin Vargmar på enheten för patologi på SLU för att ni tagit er tid att leta efter lämpligt material och gått igenom snitt från arkivet med mig, samt Albin Norman och Vidar Andersson för att ni visat mig hur man skär snitt från FFPE-block.

Sist men inte minst vill jag även tacka Caroline Fossum, Bernt Hjertner, Stina Hellman och Zhiqiang Li på enheten för immunologi för alla lärorika möten och diskussioner kring mitt och era arbeten.

REFERENSER

- Åbrink, M., Grujic, M. & Pejler, G. (2004). Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 40897–40905.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M405856200>
- Bonnett, B., Egenvall, A., Hedhammar, Å. & Olson, P. (2005). Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995–2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46, 105–120. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-46-105>
- Chu, Q., Huang, H., Huang, T., Cao, L., Peng, L., Shi, S., Zheng, L., Xu, L., Zhang, S., Huang, J., Li, X., Qian, C. & Huang, B. (2016). Extracellular serglycin upregulates the CD44 receptor in an autocrine manner to maintain self-renewal in nasopharyngeal carcinoma cells by reciprocally activating the MAPK/β-catenin axis. *Cell Death & Disease*, 7, e2456.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2016.287>
- Eikmans, M., Rekers, N.V., Anholts, J.D.H., Heidt, S. & Claas, F.H.J. (2013). Blood cell mRNAs and microRNAs: optimized protocols for extraction and preservation. *Blood*, 121, e81–e89.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-438887>
- Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Molecular Pathology*, 52, 189–196.
- Grabmüller, M., Madea, B. & Courts, C. (2015). Comparative evaluation of different extraction and quantification methods for forensic RNA analysis. *Forensic Science International - Genetics*, 16, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.01.006>
- Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M.-L., Knight, S.D., Pejler, G. & Åbrink, M. (2005). Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 33411–33418.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M501708200>
- Guo, J.-Y., Hsu, H.-S., Tyan, S.-W., Li, F.-Y., Shew, J.-Y., Lee, W.-H. & Chen, J.-Y. (2017). Serglycin in tumor microenvironment promotes non-small cell lung cancer aggressiveness in a CD44-dependent manner. *Oncogene*, 36, 2457–2471. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.404>
- Henningsson, F., Hergeth, S., Cortelius, R., Åbrink, M. & Pejler, G. (2006). A role for serglycin proteoglycan in granular retention and processing of mast cell secretory granule components. *FEBS Journal*, 273, 4901–4912. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05489.x>
- Kolset, S.O. & Tveit, H. (2008). Serglycin – structure and biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 1073–1085. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7455-6>
- Kolset, S.O. & Zernichow, L. (2008). Serglycin and secretion in human monocytes. *Glycoconjugate Journal*, 25, 305–311. <https://doi.org/10.1007/s10719-007-9073-9>
- Korpetinou, A., Papachristou, D.J., Lampropoulou, A., Bouris, P., Labropoulou, V.T., Noulas, A., Karamanos, N.K. & Theocharis, A.D. (2015). Increased expression of serglycin in specific carcinomas and aggressive cancer cell lines. *BioMed Research International*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/690721>
- Korpetinou, A., Skandalis, S.S., Labropoulou, V.T., Smirlaki, G., Noulas, A., Karamanos, N.K. & Theocharis, A.D. (2014). Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy. *Frontiers in Oncology*, 3, 327. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00327>
- Korpetinou, A., Skandalis, S.S., Moustakas, A., Happonen, K.E., Tveit, H., Prydz, K., Labropoulou, V.T., Giannopoulou, E., Kalofonos, H.P., Blom, A.M., Karamanos, N.K. & Theocharis, A.D.

- (2013). Serglycin is implicated in the promotion of aggressive phenotype of breast cancer cells. *PLoS ONE*, 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078157>
- Li, X.-J., Ong, C.K., Cao, Y., Xiang, Y.-Q., Shao, J.-Y., Ooi, A., Peng, L.-X., Lu, W.-H., Zhang, Z., Petillo, D., Qin, L., Bao, Y.-N., Zheng, F.-J., Chia, C.S., Iyer, N.G., Kang, T.-B., Zeng, Y.-X., Soo, K.C., Trent, J.M., Teh, B.T. & Qian, C.-N. (2011). Serglycin is a theranostic target in nasopharyngeal carcinoma that promotes metastasis. *Cancer Research*, 71, 3162–3172. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3557>
- Löfqvist, K. (2018). Development of a method for the analysis of serglycin proteoglycan gene expression in canine blood samples. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health (Bachelor thesis - Biology with Specialization in Biotechnology). [WWW Document]. URL <https://stud.epsilon.slu.se/13860/> (accessed 1.3.19).
- Ma, Z. (2012). Total RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks. *BIO-Protocol*, 2. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.161>
- Misdorp, W. & Hart, A. a. M. (1979). Canine mammary cancer. *Journal of Small Animal Practice*, 20, 395–404. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1979.tb06744.x>
- Pawłowski, K.M., Homa, A., Bulkowska, M., Majchrzak, K., Motyl, T. & Król, M. (2013). Expression of inflammation-mediated cluster of genes as a new marker of canine mammary malignancy. *Veterinary Research Communications*, 37, 123–131. <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9554-1>
- Pomin, V.H. & Mulloy, B. (2018). Glycosaminoglycans and proteoglycans. *Pharmaceuticals*, 11. <https://doi.org/10.3390/ph11010027>
- Purushothaman, A., Bandari, S.K., Chandrashekar, D.S., Jones, R.J., Lee, H.C., Weber, D.M. & Orłowski, R.Z. (2017). Chondroitin sulfate proteoglycan serglycin influences protein cargo loading and functions of tumor-derived exosomes. *Oncotarget*, 8, 73723–73732. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20564>
- Real-Time PCR Experimental Design | LSR | Bio-Rad [WWW Document], n.d. URL <http://www.bio-rad.com/en-se/applications-technologies/real-time-pcr-experimental-design?ID=LUSNJVIVK#7> (accessed 12.12.18).
- Scully, O.J., Chua, P.-J., Harve, K.S., Bay, B.-H. & Yip, G.W. (2012). Serglycin in health and diseases. *Anatomical Record*, 295, 1415–1420. <https://doi.org/10.1002/ar.22536>
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Neill, T., Multhaupt, H.A.B., Hubo, M., Frey, H., Gopal, S., Gomes, A., Afratis, N., Lim, H.C., Couchman, J.R., Filmus, J., Sanderson, R.D., Schaefer, L., Iozzo, R.V. & Karamanos, N.K. (2015). Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1855, 276–300. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.03.006>

BILAGOR

Bilaga 1

Protocol RNA extraction

Revised by: *Claudia Lützel Schwab*
date: 2018-05-16

Experiment:

Assay

This protocol is a modification of the TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Life Technologies) manufactures protocol for total RNA from canine blood sample.

Reagents

Invitrogen TRIzol™ Reagent
Chloroform
Isopropanol
75% ethanol
RNAse free water

In the original TRIzol™ protocol prescription of RNA is performed by adding 0.5 mL of isopropanol to the aqueous phase, per 1 mL of Trizol and the incubation time proposed is 10 min. We changed the volume of isopropanol to the same volume as the aqueous phase obtained from the chloroform extract, and the incubation time after addition of isopropanol to 30 min. This to obtain a better precipitation and higher yield of RNA.

All individual samples should be prepared in triplicates, to obtain back up RNA samples.

species: Canine (Dog).

Table 1, Regnant calculations using excel to obtain the correct volumes.

<i>Animal</i>	<i>Id</i>	<i>sample Nr</i>	<i>blood volume</i> <i>μl</i>	<i>volume of Trizol</i> <i>μl</i>	<i>volume of Chloroform</i> <i>μl</i>	<i>volume of Isopropanol</i> <i>μl</i>	<i>volume of 75 % ethanol</i> <i>μl</i>
		1	100	500	100	same volume of aqueous phase obtained from the chloroform extract	500
		2	100	500	100	same volume of aqueous phase obtained from the chloroform extract.	500
		3	100	500	100	same volume of aqueous phase obtained from the chloroform extract.	500

Procedure

Always work in sterile hoods and use gloves, sterile pipettes/tips/tubes etc. Wipe the hood surface with clorin 10% and then with ETOH 70%

Turn on the centrifuge

In sterile hood

1. Mark 3 tubes with sample Nr from above and, then add transfer 100 μ l of blood into the clean tubes.
2. Add 500 μ l TRIzol™ Reagent to each Eppendorf tube (volume according to the table above).
3. Vortex the tubes vigorously, 2 min, and incubate at room temperature, 15 min
4. To each Trizol treated tube add 100 μ l of chloroform, vortex and incubate at room temperature for 5 min.
5. Centrifuge the sample for 15 min at 12,000 x g at 4 °C.
6. Mark 3 new, clean tubes with sample Nr and RNA, then transfer the colorless aqueous phase containing the RNA into the new tubes*
7. Add the same volume of isopropanol as the aqueous phase obtained from the chloroform extract, and incubate at room temperature, 30 min. (Around 300-500 μ l)
8. Centrifuge the sample for 10 min at 12,000 x g at 4 °C.
9. Discard the supernatant with micropipettes, avoid the RNA pellet (a white gel-like pellet at the bottom of the tube).
10. Wash the RNA pellet, add 500 μ l 75% ethanol (volume according to the table above).
11. Vortex briefly the sample to resuspend the RNA pellet, then centrifuge for 5 min at 7500 x g at 4 °C.
12. Discard the supernatant carefully with micropipette.
13. Air dry the RNA pellet for 5h 10 min, and then resuspend the pellet by adding 30 μ l of RNase free water*

From each sample/tube take a 3 μ l aliquote in a new, clean tube for RNA quantitation by NanoDrop

Stored the rest at h 80 °C until further use.

*Important to avoid the interphase, therefore do not pipette too close.

* If the RNA pellet does not dissolve properly, vortex until it become fully dissolved in the water.

NanoDrop™ measurement

Materials:

RNA samples
RNA samples diluent
Micropipette tips 10 μ L
Gloves
Tissue paper
Molecular grade water

Procedure

- 1- Bring RNA samples as well as the water used to elute them on ice to the NanoDrop spectrophotometer.
- 2- Wash the sample reader with molecular grade water and dry with a tissue paper.
- 3- Following the software's instructions, load 2 μ L of water use to resuspend the sample (blank) and initialize the system. Change the computer's setting to RNA and click the blank button.
- 4- Load 2 μ L of the RNA sample and click the measure button
- 5- Wipe the sample reader with a clean, dry tissue paper and load the next. Alternatively, you can use the software to load and read multiple samples simultaneously
- 6-After the read is complete, record the A260/A280 and A260/A230 ratios as well as the amount of RNA recovered (in ng/ μ L) manually or, select from the software menu to print screen or save an image of the report.

Very pure RNA will have an A260/A280 ratio of ~2.1. Anything higher than 1.8 is considered to be of acceptable purity, and a ratio of <1.8 indicates potential DNA or protein contamination.

A low A260/A280 ratio is likely due to mixing phases when removing the upper aqueous phase of the Trizol separation or is also more common in samples with a very low yield of RNA.

The A260/A230 ratio should also be above 2.0. A low A260/230 ratio indicates contamination with the wash solutions, chaotropic salts, phenols or protein.

Bilaga 2

Protocol cDNA synthesis of total RNA with DNase I step

Original protocol: *Stina Hellman*

Revised: *Claudia Lützelschwab*

Date: 2018-09-10

DNase I treatment

Reagents

Promega DNase I Kit Lot # :

DEPC treated water

RNA sample

sample Nr	conc ug/ul	volume for 1,2ug RNA	Vol DEPC water
Dog	█	#DIV/0!	█ #DIV/0!
Dog	█	#DIV/0!	█ #DIV/0!
Dog	█	#DIV/0!	█ #DIV/0!
Dog	█	#DIV/0!	█ #DIV/0!
Dog	█	#DIV/0!	█ #DIV/0!
Dog	█	#DIV/0!	█ #DIV/0!

Procedure

(The original DNase protocol is a 10µl reaction using 1µg RNA. We use 1,2µg RNA so that it can be split into 1 and 0,2 µg for +RT and –RT reactions, respectively. It is therefore scaled up to a 12 µl volume reaction)

Clean Room (NO NUCLEIC ACIDS!)

In the hood:

1. Mark clean microcentrifuge tubes with sample numbers from above and "RT+" then, from the kit add:
 - 1,2 µl 10x Rxn buffer
 - DEPC-H₂O, volume according to above table.
 - 1,2 µl (1 U/µg RNA) DNase I*
2. Prepare a tube with enough volume of DNase Stop solution to an eppendorf tube for later use in template room. 8µl are sufficient for 6 samples.

Template Room

In the hood:

DNase I reaction

1. Fill a box with ice and set the double heating block to 70°C and 59°C.
2. Add 1,2 µg RNA to RT+ tubes (volume of sample according to table above to get 12 ul total volume).
3. Incubate at 25°C, 15 min.
4. Add 1,2 µl DNase-stop (now you have a 13,2 ul total volume).
5. Incubate at 70°C for 10 min, spin down the tubes briefly and transfer to ice to chill.
6. Store at -80°C, or keep on ice for further use.

cDNA synthesis SupertScript III Kit

Clean Room

1. Fill a box with ice
2. In a clean tube, prepare the primer mix: specific REV primers + random hexamer primers + Oligo dT primers (see CALCULATION TABLE). Keep on ice until use
3. Prepare enough volume of the cDNA **Master Mix I** for the number of samples (see CALCULATION TABLE). Keep on ice until use
4. In 2 separate, clean tubes prepare the cDNA **Master Mixes II** for the RT+ and RT- reactions (see CALCULATION TABLE). Keep on ice until use.

Template room

1. Fill a box with ice
2. Turn on the heating block and set up the temperatures: 59°C for annealing and 55 °C for the cDNA synthesis.
3. Annealing: For each RNA sample prepare a PCR tube (labelled RT+). Add 2,4 ul/tube of **Master Mixture I** and 13,2 ul (1,2 ug) of template (DNase I treated total RNA) from each sample. The final volume is 15,6 ul of reaction.
4. Incubate the tubes at 59°C during 5 min and then transfer the tubes to an ice bath for at least 1 minute.

5. From each sample, transfer 2,6 ul of the above reaction to a PCR tube (Labelled RT-). Now you have two PCR tubes for each sample. Add RT+ or RT- Master Mix II to the corresponding tubes (see CALCULATION TABLE).
6. Incubate the tubes at 25 °C (room temperature) for 15 min and then place the tubes in the heat block at 55°C for 60 min.
7. Set the other heating block at 70 °C.
8. After incubation, inactivate the reaction by heating the samples (both RT+ and RT-) at 70°C for 15 min.
9. Centrifuge the tubes briefly and freeze at -20°C until use.

Bilaga 3

qPCR dog cDNAs

CLEAN ROOM

- 1- Thaw the SYBRGreen Master mix (second drawer from bottom, Immunologi freezer), the nuclease free water and the diluted primers (2uM). Keep them on ice.
Put a plastic bag for the waste container
- 2- Label 4 tubes, one for each gene's master mix: EEF2, HPRT, SGN
- 3- Prepare de Master mixes according to the table:

		EEF2	SGN	HPRT
N° Rxns -->	1			
Master mix	12,5	0	0	0
primer Fw 400 nM	5	0	0	0
primer Rev 400 nM	5	0	0	0
water	0,5	0	0	0
total	23	0	0	0
DNA each indv	2	2	2	2
final volume	25			

- 4- Bring only the tubes to the template room. Clean the hood with Chlorine 10% and 70% ETOH (waste in plastic bag to the template room as well).
- 5- Take the nuclease free water and a white plate BioRad (sideboard close to the door, 3rd shelf) and a plastic seal (be careful not to touch the glossy surface!).

TEMPLATE ROOM

- 6- Put the master mixes on ice and the cDNAs:
 - a. -RT Ctrls (only when available)
 - b. cDNAs diluted 1/5
 - c. Water
 - d.
- 7- Set up the qPCR plate under the hood according with the design. ADD FIRST THE MASTER MIX (23 ul) and SECOND THE cDNA (2 ul). Use an unopened filter tip box as a guide.

Plate design:

		1	2	3
A				
B				
C				
D				
E				
F				
G				
H				

Final volume should be 25 ul/ well.

- 8- Seal the plate with the plastic membrane, glossy surface up.
- 9- Clean the hood with 10% Chlorine, 70% ETOH and UV during 30 minutes.

POST-PCR ROOM

- 10- Spin down the plate for 2 min at 3000 rpm.
- 11- Turn on the equipment: CFX Real Time System, C100 touch Thermal Cycler BioRad. Log in to the computer
- 12- Folder Kristin dog- Settings saved as First PCR settings (3 step)
Settings: import "qPCR dog SGN" settings:

Protocol

1: 95,0°C for 3:00

2: 95,0°C for 0:15

3: 59,0°C for 0:30

4: 72,0°C for 0:30

Plate Read

5: GOTO 2, 39 more times

6: Melt Curve 65,0°C to 95,0°C: Increment 0,5°C 0:05

Plate Read