



Från intestinala kryptstamceller till ekvina colonoider

Karaktärisering av genuttryck och histologi hos
colonoider från häst

Alma Lundin

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2025



Från intestinala kryptstamceller till ekvina colonoider – Karaktärisering av genuttryck och histologi hos colonoider från häst

*From intestinal crypt stem cells to equine colonoids – Characterization of gene
expression and histology in equine colonoids*

Alma Lundin

Handledare:	Eva Tydén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Bitr. handledare:	Fredrik Södersten, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Bitr. handledare:	Julia Andersson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Examinator:	Magnus Åbrink, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper

Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2025
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	häst, 3D organoid, colonoid, colon, stamceller, epitel, in vitro modeller

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Organoider är små, tredimensionella (3D) cellstrukturer som odlas fram från stamceller i laboratoriemiljö. Ekvina colonoider är en typ av intestinal organoid med ursprung från stamceller från hästens colon (tjocktarm). Med en relevant sammansättning celler och principiell arkitektur som efterliknar ursprungligt tarmepitel i colonvävnad, är dessa användbara som *in vitro* modeller inom flera områden av den biomedicinska forskningen. I dagsläget finns endast ett fåtal studier som berör ekvina colonoider. För att komplettera nuvarande forskning och främja fortsatta framsteg var syftet med denna studie att testa och utvärdera en odlingsmetod för odling av ekvina colonoider. Målet var att odla fram colonoider för att sedan undersöka förekomsten av epiteliala celler (inkl. stamceller) genom transkriptionell och histologisk analys. Studien lyckades etablera och odla fram ekvina colonoider från colonstamceller. Vid karaktärisering av genuttrycket med RT-qPCR påvisades flera olika celltyper som finns närvarande i ursprungligt colonepitel. Histologiska analyser visade att colonoiderna hade ett likartad histomorfologiskt utseende jämfört med deras motsvarighet *in vivo*. Bägarceller och delande celler kunde även identifieras histologiskt. Sammanfattningsvis demonstrerar studien att metoden för odling och karaktärisering av ekvina colonoider fungerar. Även om framtida studier kan fokusera på att förfinas ytterligare, kan intestinala organoider beskrivas som lovande *in vitro* modeller för framtida forskning inom flertalet områden. I synnerhet för djurslaget häst som i dagsläget saknar etablerade cellinjer, vilket annars räknas som en av de vanligaste förekommande metoderna för *in vitro*-studier.

Nyckelord: häst, 3D organoid, colonoid, colon, stamceller, epitel, *in vitro* modeller

Abstract

Organoids are small, three-dimensional (3D) cell structures that are cultivated from stem cells in a laboratory environment. Equine colonoids are a type of intestinal organoid derived from stem cells of the horse's colon (large intestine). With relevant cell composition and basic architecture that mimics the original intestinal epithelium in colon tissue, these organoids are valuable *in vitro* models in various areas of biomedical research. Currently there are few studies focusing on equine colonoids. To complement current research and add to the ongoing development, this study aimed to develop and describe the method for cultivation of equine colonoids. The goal was to culture colonoids and subsequently investigate the presence of epithelial cells (including stem cells) through transcriptional and histological analysis. The study successfully established and cultured equine colonoids from colon stem cells. Gene expression characterization performed by qPCR demonstrated presence of several different cell types found in the native colon epithelium. Histological analysis showed that our cultivated colonoids had similar histomorphological appearance compared to their *in vivo* counterparts. Among other epithelial cells in the colonoids, the study identified goblet cells and proliferating cells histologically. In summary, the study demonstrated that the method used for cultivating and characterizing equine colonoids was successful. While future research may focus further on refining the technique, intestinal organoids are promising *in vitro* models for future research in several fields. This is particularly significant for the equine species which currently lacks established cell lines, a method commonly used for *in vitro* studies.

Keywords: horse, 3D organoids, colonoid, colon, stem cells, epithelium, *in vitro* models

Innehållsförteckning

Förkortningar	9
1. Inledning	11
1.1 Inledning och syfte	11
2. Litteraturoversikt.....	12
2.1 Gastrointestinala epitelets uppbyggnad.....	12
2.1.1 Regeneration av tarmepitelets celler	12
2.2 Organoider som modell för det intestinala epitelet	13
2.2.1 Metod för organoidodling	14
2.2.2 Cellmarkörer för karaktärisering av organoider	15
2.3 Ekvina intestinala organoider	15
2.3.1 Ekvina enteroider	15
2.3.2 Ekvina colonoider	16
2.3.3 2D organoider för exponering av apikal yta	17
3. Material och metod	18
3.1 Hästar och provinsamling	18
3.2 Kryptisolering	18
3.3 Odling av colonoider	18
3.4 Isolering av RNA och cDNA syntes	20
3.5 Karaktärisering med qPCR	20
3.6 Gelelektrofores	21
3.7 Histologisk analys och infärgning av snitt	23
3.8 Statistisk analys	23
4. Resultat	24
4.1 Hästarna.....	24
4.2 Odling av colonoider	24
4.3 Karaktärisering med qPCR	26
4.4 Gelelektrofores	27
4.5 Histologisk analys	29
5. Diskussion	31
5.1 Odling av colonoider	31
5.2 Karaktärisering av genuttryck	32
5.3 Histomorfologisk analys	34
5.4 Konklusion.....	35
Referenser.....	36
Populärvetenskaplig sammanfattning	39
Tack	40

Bilaga 1.....	41
Bilaga 2.....	43
Bilaga 3.....	46
Bilaga 4.....	48
Bilaga 5.....	50
Bilaga 6.....	52
Bilaga 7.....	56
Bilaga 8.....	57

Förkortningar

Förkortning	Betydelse
3R	Replace, Reduce and Refine
BSA	Bovine Serum Albumin
CHGA	Chromogranin A
DCLK1	Doublecortin-like kinase 1
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LYZ	Lysozyme
MUC2	Mucin 2
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PBS	Phosphate-buffered saline
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
SOX9	SRY-Box Transcription Factor 9

1. Inledning

1.1 Inledning och syfte

Nya framsteg inom stamcellsforskningen har lett till mer utvecklade metoder för cellodling, särskilt för det som brukar refereras till som organoider (Lancaster & Knoblich 2014). Organoider är små, tredimensionella (3D) cellstrukturer som odlas fram i laboratoriemiljö från stamceller. Organoiderna har en principiell arkitektur och cellulär sammansättning som ska efterlikna verklig vävnad, vilket gör dem lämpliga som *in vitro*-modeller för det organ som stamcellerna ursprungligen härstammar ifrån (Bartfeld & Clevers 2017). Genom att använda sig av stamcellernas egenskaper är det numera möjligt att ta fram multicellulära 3D cellkulturer som idag kan efterlikna olika former av vävnadstyper, där det intestinala epitelet är en av dem.

Användningsområdena för de intestinala organoiderna anses vara många och förhoppningarna är stora för denna sofistikerade forskningsteknologi (Csukovich et al. 2022). Dessutom beskrivs de som användbara modeller i en rad olika forskningssammanhang och kan hjälpa oss att förstå mekanismer för tarmens normal- och patofysiologi (Rahmani et al. 2019). Immunologiska studier och sjukdomsmodellering med särskilt fokus på patogen-värdinteraktioner framhålls som några av de främsta applikationerna för gastrointestinala organoider inom såväl human- som veterinärmedicin (Barrila et al. 2018; Beaumont et al. 2021).

I dagsläget rapporteras det om få genomförda studier på veterinärmedicinska patienter (Stewart et al. 2018). De studier som finns refererar ofta till människa och mus, även om det på senaste tiden dykt upp enstaka studier på gris, nöt, får, fjäderfä och häst (Beaumont et al. 2021). De i dagsläget genomförda studier som berör ekvina enteroider är relativt få och utgörs till större delen av enteroider från tunntarmsegment (Hellman 2021; Windhaber et al. 2024). Det finns idag endast en studie som har odlat fram och karaktäriserat ekvina colonoider (Windhaber et al. 2024). Med andra ord finns det ännu ingen riktigt väletablerad metod för att ta fram colonoider från häst, vilket är nödvändigt för att kunna utveckla och standardisera teknologin för fortsatta forskningsframsteg (Beaumont et al. 2021; Windhaber et al. 2024).

Syftet med studien var att testa och utvärdera en beskriven metod för odling av ekvina colonoider med ursprung från kryptstamceller från hästens colon. Målet var att odla fram colonoider för att sedan undersöka förekomst av epiteliala celler (inkl. stamceller) genom transkriptionell analys (qPCR) och histologi.

2. Litteraturöversikt

2.1 Gastrointestinala epitelets uppbyggnad

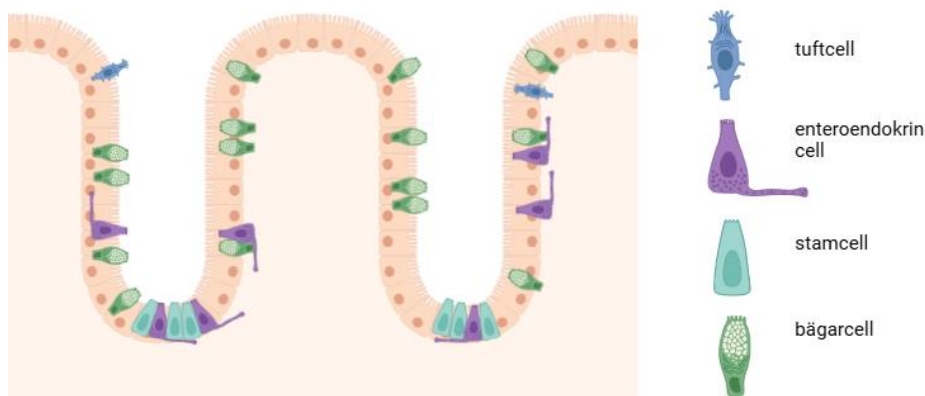
Det gastrointestinala systemet är ett komplext organsystem med flertalet viktiga funktioner (Klunder et al. 2017). I sin helhet delas den in i olika segment, där varje enskilt segment är tilldelad egna strukturella och funktionella egenskaper. Förutom absorption av näringsämnen, elektrolyter och vatten, utgör tarmepitelet dessutom en viktig barriärfunktion och är central i diverse värd-patogen-interaktioner.

Medan tunntarmsepitel formar villi- och kryptstrukturer, saknar tjocktarmsepitel utskotten som kallas villi (van der Flier & Clevers 2009). Mukosan formar i stället enbart kryptor, se figur 1. De specialiserade celltyperna som utgör det enkelskiktade lagret i tarmen varierar i typ och uppsättning mellan de olika tarmsegmenten. Även om uppsättningen av celler i colon och tunntarm är till viss del likartade, finns vissa signifikanta skillnader. Cellpopulationen i colon utgörs till störst del av absorptiva enterocyter som är viktiga för upptaget av näringssubstanser från lumen till cirkulationen (Pawlina & Ross 2020). Andra förekommande celler är mukusproducerande bägarceller som finns i högre utsträckning i colon jämfört med tunntarm. Bägarcellernas produktion av mukus både smörjer och skyddar tarmslemhinnan (Houghton 2021). Dessutom fungerar mukuslagret som en antimikrobiell barriär mellan det luminala utrymmet och tarmepitelet. De enteroendokrina cellerna är i stället få till antalet och utspridda längs med tarmepitelet (Pawlina & Ross 2020). Dessa celler aktiveras via neuroendokrin signalering i samband med födointag och frisätter en rad olika peptidhormon som reglerar bland annat enzymsekretion och tarmmotorik (Pawlina & Ross 2020; Houghton 2021). Till skillnad från tunntarmen, saknar colonepitelet de klassiska panethcellerna som frisätter bland annat antimikrobiella substanser (Date & Sato 2015). I stället har colon en motsvarande celltyp som kallas för paneth-lik celler.

2.1.1 Regeneration av tarmepitelets celler

För att behålla tarmslemhinnans integritet är det viktigt att det råder en balans mellan cellförnyelse och avstötning av gamla, skadade epitelceller (van der Flier & Clevers 2009). Den stora majoriteten av cellerna i tarmepitelet byts ut inom 3-4 dagar mot nya färdigt differentierade celler som alla härstammar från kryptregionen (Bjerknes & Cheng 2006). Samtliga av de epiteliala cellerna i colon har sitt ursprung från samma stamcellsstam, vilka är lokaliserade i basen av kryptorna. Det är således intestinala multipotenta stamceller som ansvarar för den kontinuerliga cellförnyelsen av colonepitelet bestående av enterocyter, bägarceller och enteroendokrina celler (Peterson & Artis 2014). I processen för att skapa nya

epitelceller genomgår stamcellerna en snabb differentieringsprocess som ger upphov till en mängd nya dotterceller, vilka även kallas för Transit-amplifying cells (TA-celler) (Bjerknes & Cheng 2006). TA-celler befinner sig i ett stadie mellan stamcell och färdig differentierad cell. Dottercellerna genomgår sedan i sin tur vidare differentiering och proliferation till någon av de förekommande epitelcellerna i tarmen. Samtidigt som det bildas nya celler sker en successiv migration av de färdigt differentierade cellerna från kryptorna i riktning mot den luminala ytan för att fylla på den kontinuerliga förlusten av celler som stöts bort.



Figur 1. Schematisk bild av intestinala epitelet i colon med de olika celltyper som finns representerade. Stamceller är lokaliserade i basen av kryptorna. I takt med en ökad differentieringsgrad sker en successiv migration av enterocyter, bägarceller, tuft celler och enteroendokrina celler i riktning mot lumen. Skapad med BioRender.com

2.2 Organoider som modell för det intestinala epitelet

Organoider beskrivs som tredimensionella organiska modeller med den principiella cellulära arkitektur och funktionalitet som dess ursprungliga motsvarighet har (Lancaster & Knoblich 2014). Definitionen av en organoid är enligt litteraturen en flercellig struktur med förmåga till egen organisering och funktion. Organoiderna odlas i en särskilt matrixgel som ska efterlikna basalmembranet. Tillsammans med specifika tillväxtfaktorer i odlingsmediet kan cellerna därmed differentiera till en 3D-struktur med likartad sammansättning celler som i det ursprungliga organet *in vivo* (Bartfeld & Clevers 2017).

Med en relevant cellulär sammansättning är intestinala organoider användbara inom många områden, bland annat för modellering av sjukdomar och studier av patogen-värd interaktioner på en mer detaljerad nivå (Nakamura 2019). Exempelvis är det möjligt att studera hur olika mikroorganismer fysiskt interagerar med de epiteliala cellerna i samband med en infektion. Flertalet studier har använt sig av

organoidtekniken för att studera patogenesen för bakteriella infektioner som orsakas av bland annat *Salmonella* och *Escherichia coli* men också infektion av andra mikroorganismer som *Cryptosporidium parvum* och *Toxoplasma gondii* (Seeger 2020). Andra har skapat en experimentiell modell med organoider för att på ett representativt sätt simulera infektioner med tre olika gastrointestinala nematoder hos häst. I modellen exponerades organoider för infektiösa larvstadier (L3) av *Parascaris univalens*, Cyathostominae spp. och *Strongylus vulgaris* varpå interaktionen mellan organoid och nematod studerades (Hellman et al. 2024).

Ur djuretiskt perspektiv är användandet av organoider i forskningssammanhang viktigt eftersom det på sikt kommer minska antalet levande djur i experimentella försök (Beaumont et al. 2021; Kar et al. 2021)

2.2.1 Metod för organoidodling

Att odla organoider görs genom en initial isolering av stamceller, en process som kallas för kryptisolering (Bartfeld & Clevers 2017). Det är möjligt att odla organoider från adulta stamceller (ASCs), inducerade pluripoteinta stamceller (iPSCs) eller embryonala stamceller (ES) vilka även brukar kunna inkluderas bland iPSCs. De adulta stamceller samlas från färdigutvecklad vävnad exempelvis tarm eller hud (Kar et al. 2021), vilket även är den metod som detta arbete kommer fokusera på. Vid iPSCs erhålls pluripotenta celler i stället genom omprogrammering av färdigt differentierade somatiska celler.

Efter isolering tillsätts kryptorna till ett gelliknande medium (Matrixgel™) innehållande extracellulära matrixproteiner och en rad olika tillväxtfaktorer (Beaumont et al. 2021). Matrixgelen främjar 3D-växt genom att fungera som ett slags stabiliserande ramverk för organoiderna och dessutom motverkas celldöd. Efter den initiala uppodlingen tillsätts regelbundet näring och olika tillväxtfaktorer som påverkar utvecklingen av stamcellerna. På så vis skapas förutsättningar för fortsatt celldifferentiering av stamceller till färdigt differentierade organoider. Målet med organoidodlingen är att skapa en själv-organiserande 3D-cellkultur som i stora drag behåller några av de viktigaste fenotypiska egenskaper dess *in vivo* motsvarighet har (Meneses et al. 2016; Stewart et al. 2018; Hellman 2021; Windhaber et al. 2024).

Tidigare studier rapporterar om en variation i hur väl en organoidodling etablerar sig (Stewart et al. 2018; Hellman 2021). Begreppet benämns som odlings effektivitet och erhålls genom att räkna antalet sfäroider eller organoider som bildas varje 24 timme dividerat på det antal kryptor som tillsattes från början. Odlings effektiviteten beskrivs variera från cirka 20 % till 82 % mellan olika odlingar. Det finns flera orsaker till de varierande resultaten. Biologisk variation är en faktor

och kan vara svår att utvärdera. Andra faktorer som på senare tid har utvärderats är lagringstid innan odling (Stewart et al. 2022). Den proliferativa potentialen hos organoiderna påverkas negativt av en förlängd lagringstid. Anestesi och dess duration innan provtagning kan också anses som en potentiellt påverkande faktor till försämrad odlingseffektivitet vid etablering av organoidkulturer från kryptor (Hellman 2021).

2.2.2 Cellmarkörer för karaktärisering av organoider

Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) är en väl beskriven metod för att kvantifiera uttryck av specifika gener. Att använda sig av qPCR för att mäta genuttryck är ett vanligt förekommande sätt att utvärdera om de etablerade organoiderna kan anses representativa för deras motsvarighet *in vivo* (Zhao et al. 2022). För att kartlägga den cellulära sammansättningen hos organoider används cellmarkörer som representerar de olika celltyper som finns i den aktuella vävnaden, i den här rapporten de intestinala epitelcellerna. Cellmarkörer som analyseras i den här studien har använts tidigare och ska vara representativa för epitelceller (EPCAM), proliferativa celler (PCNA), intestinala stamceller (LGR5), proliferativa celler inkl. stamceller (SOX9), enteroendokrina celler (CGA), bägarceller (MUC2), tuft celler (DCLK1) och panethceller (LYZ) (Hellman 2021).

2.3 Ekvina intestinala organoider

Metoderna för *in vitro*-odling av intestinala organoider, närmare bestämt enteroider och colonoider är idag väl etablerade hos människa och mus (Bartfeld & Clevers 2017). På senare tid har även organoider från lantbruksdjur kommit att utvecklas på flera håll (Kar et al. 2021). Begränsat arbete har däremot gjorts vad gäller ekvina intestinala organoider. Hittills har de rapporter som publicerats främst fokuserat på att optimera protokoll för odling och karaktärisering av ekvina enteroider med tillräcklig validitet och reproducerbarhet (Stewart et al. 2018; Hellman 2021). Protokollen är dessutom många gånger tagna direkt från etablerade protokoll från människa och mus (Beaumont et al. 2021). Det finns i dagsläget endast en rapport som odlat och karaktäriserat colonoider hos häst (Windhaber et al. 2024). Utvecklingen av ekvina intestinala organoider beskrivs ha en viktig betydelse då sjukdomar kopplat till magtarmsystemet är vanligt förekommande hos häst.

2.3.1 Ekvina enteroider

En av de första rapporterna som berör ekvina enteroider visade på principerna för isolering och odling av enteroider från jejunum (Stewart et al. 2018). Materialet kom från fem hästar och 3D-enteroider med ett centralt lumen och utbuktande

kryptstrukturer kunde odlas från samtliga. Med immunofluorescens-infärgning och transkriptionell analys (qPCR) påvisades cellmarkörer som kan associeras till flertalet celltyper som kan förväntas finnas i det motsvarande *in vivo*-segmentet. Positiv immunofluorescerande reaktion erhöles för epitelceller, sekretoriska enteroendokrina celler, bägarceller och panethceller. I enteroiderna konfirmerades uttrycket av bland annat stamcellsmarkören LGR5 med qPCR.

Vidare utvärderades möjligheterna för kryopreservering av organoida odlingskulturer (Stewart et al. 2018). Materialet lagrades i frysförvaring med flytande kväve i tre veckor till fyra månader. Studien lyckades etablera organoidkulturer från det nedfrysta materialet, även om initiala tillväxten blev något fördröjd. Liknande studier har rapporterat ett motsvarande resultat vad gäller uppodling av organoider efter frysförvaring under en tid både hos häst och nöt (Töpfer et al. 2019; Hellman 2021). Möjligheterna till kryopreservering ökar tillgängligheten och öppnar upp för ett mer kostnadseffektivt användande av organoid-teknologin (Töpfer et al. 2019).

2.3.2 Ekvina colonoider

En nyligen publicerad studie beskriver odling av ekvina colonoider (Windhaber et al. 2024). Studien syftade till att etablera cellkulturer och anpassa ett protokoll för optimala tillväxtförhållanden för differentiering av stamcellerna från colon och jejunum. Organoiderna odlades i tillväxtmedier med olika sammansättning för att sedan karaktäriseras och jämföras mot den ursprungliga vävnaden från varje enskild häst. Histomorfologiska och transkriptionella analyser användes för utvärdering av likheterna mellan ursprungligt tarmsegment och enteroiden/colonoiden. Resultatet blev uppodling av colonoider och enteroider som uppvisade vissa avgörande likheter med det ursprungliga tarmsegmentet, både vad gäller fenotyp och genuttryck. Dessutom visade studien på att optimala odlingsförhållanden för aktuell vävnad verkar vara artspecifik, och att det även finns en vävnadsspecifik faktor. Följaktligen blir det viktigt att anpassa aktuella odlingsförhållanden till respektive art eftersom det finns artspecifika behov för tillväxt och differentiering (Windhaber et al. 2024).

Trots framgångsrika studier med väldifferentierade cellkulturer är det fortfarande få som gjort jämförande analyser mot *in vivo*-segmenten (Windhaber et al. 2024). Det behöver göras fler komparativa studier av intestinala organoider och deras ursprungliga motsvarighet *in vivo*. Tekniken behöver dessutom fortsatt förfinas och anpassas till aktuellt djurslag (Stewart et al. 2018). Förhoppningarna är att teknologin som finns utformad för andra djurslag ska kunna appliceras till viss del till häst.

2.3.3 2D organoider för exponering av apikal yta

En påtaglig begränsning för användningen av 3D-enteroider är deras stängda morfologi (Nakamura 2019). Ett stängt lumen påverkar tillgängligheten till den luminala ytan i vissa experimentella sammanhang, såsom vid studier av patogen-värdinteraktioner. Ett sätt att utveckla organoidteknologin har följaktligen varit att odla organoiderna i tvådimensionella (2D) monolager. Denna odlingsmetod har redan utvecklats en del på bland annat människa och mus, men har på senare tid även testats på djurslaget häst (Kozuka et al. 2017; Hellman 2021).

En studie har publicerats som undersökte möjligheterna att ta fram odlingar organiserade i 2D-monolager med ursprung från 3D ekvina enteroider (Hellman 2021). Syftet med att odla 2D odlingskulturer var för att öka tillgängligheten till den apikala ytan till epitelet. Även här användes konventionell qPCR för karaktärisering av den cellulära kompositionen hos enteroiderna och 2D-odlingarna. Odlingskulturernas cellulära sammansättning var likartade den *in vivo* i både 3D och 2D-kulturerna, men en viss skillnad noterades i det relativa uttrycket av cellmarkörer. Uttrycket av cellmarkörerna var även stabilt under flera på varandra följande passager vilket indikerar att odlingskulturerna är stabila och inte förändrar sin sammansättning över tid. Att genuttrycket är stabilt över en längre period anses vara en viktig hörnsten för att kunna visa på en reproducerbarhet av studiers resultat (Beaumont et al. 2021).

3. Material och metod

3.1 Hästar och provinsamling

Vävnadsmaterial insamlades från totalt fem svenska varmblood (3 ston, 1 valack, 1 hingst) i åldrarna 15, 16, 17 respektive 8 och 1 år gamla. Fyra av hästarna donerades till Institutionen för kliniska vetenskaper (SLU, Uppsala) och vävnadsmaterial från en häst kommer från ett lokalt slakteri i Uppland. Ingen av hästarna led av någon sedan tidigare känd gastrointestinal sjukdom. Hästarna avlivades av olika orsaker men som inte var relaterad till studien. Innan provinsamling hade fyra av hästarna varit under allmän anestesi i upp till sex timmar och vävnadsmaterial från samtliga hästar togs inom en timme efter att avlivning genomförts.

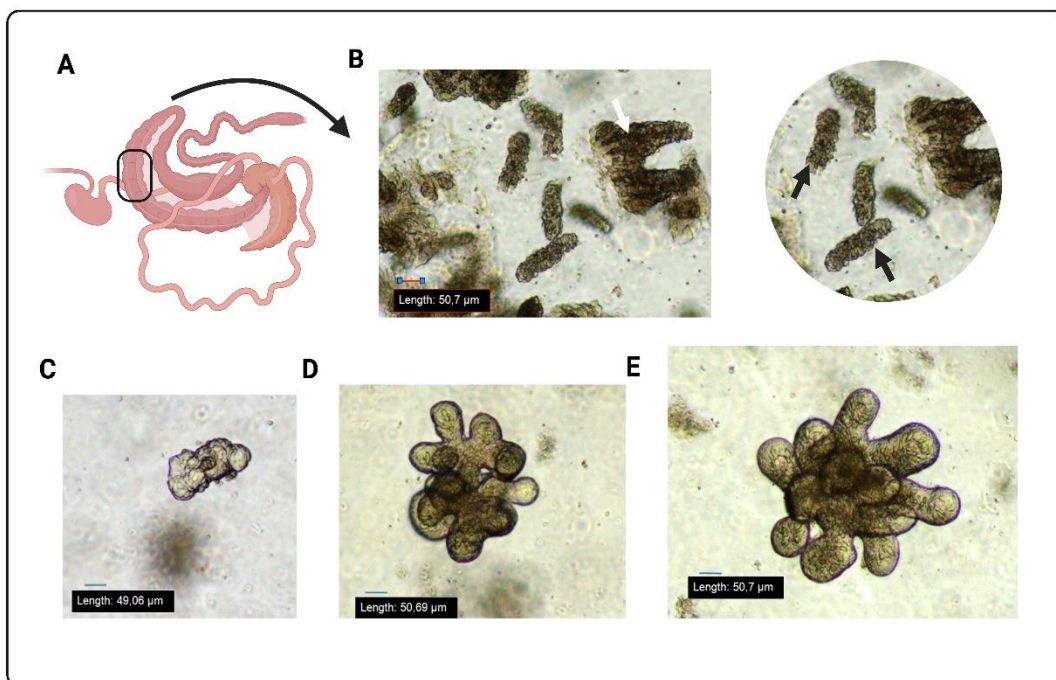
3.2 Kryptisolering

Isolering av kryptostamceller och efterföljande odling genomfördes enligt ett tidigare publicerat protokoll (Stewart et al. 2018; Hellman 2021) som optimerats för studiens ändamål. Inför kryptisolering samlades vävnadsmaterial, ca 10*10 cm från andra colonläget. Vävnadsmaterialet tvättades initialt med iskall icke-steril fosfatbuffrad saltlösning (PBS) och delades i mindre bitar ca 2*1 cm. Materialet överfördes sedan i 50 ml provrör innehållande iskall PBS med 30mM EDTA, 1mM DTT och 10 µM Y27632. Rören sattes på is och placerades på ett skakbord ca 60 rpm i 30 min där rören skakades häftigt varje 5 min. Materialet överfördes sedan till 30 ml förvärmad PBS med 30mM EDTA och 10 µM Y27632 som inkuberades i 37 °C under 10 min med häftig skakning varje 2–3 min. Vävnad tillsattes till nytt rör med iskall PBS med 2 % PEST och 1 µg/ml Fungizone (Amphotericin B) som sattes på is på ett skakbord ca 60 rpm i 5 min, rören vändes upp och ner manuellt varje 30 sek. För att lösgöra kryptorna från epitelet överfördes materialet på nytt till nya rör med iskall PBS med 2 % PEST och 1 µg/ml Fungizone vilka skakades ordentligt ca 20–30 ggr. Efter varje omgång utvärderades förekomsten av kryptor och villiliknande strukturer i tvättlösningen med ljusmikroskop. Proceduren upprepades till dess att fler kryptor syntes än övriga epitelstrukturer. För flödesschema, se figur 2.

3.3 Odling av colonoider

Etableringen av organoidodlingarna inleddes med tvätt av isolerade kryptor med iskall PBS + 0,1 % BSA. Förekomst av kryptor verifierades i ljusmikroskop, där ett riktvärde har beskrivits vara upp till 50 kryptor/synfält (Stewart et al. 2018; Hellman et al. 2024). I praktiken var det svårbedömt och innebar att stor mängd material skulle gå förlorad, varvid 50–200 kryptor/50 µl ansågs vara godtagbart i den här studien. Därefter centrifugerades provet vid 200×g i 4°C under 5 min.

Supernatanten avlägsnades och pelleten suspenderades till kall matrigel (Corning) innehållande tillväxtfaktorlösning. För pipettering användes kylda pipettspetsar som innan användning doppats i PBS lösning med 0,1 % BSA för att förhindra adherens av kryptorna på ytan inuti pipetten. 50 µl matrigel med kryptor pipetterades sedan ut per brunn i en förvärmad odlingsplatta med 24 brunnar som sedan inkuberades vid 37 °C i 30 min. Därefter tillsattes 0,5 ml av förvärmad over-lay medium innehållande DMEM/F12, 1 % N-2, 2 % B-27, 2 % PEST och 1 % Hepes i varje brunn på odlingsplattan. Plattorna förvarades fortsättningsvis vid 37 °C i 7 % CO₂ med tillsats av nya tillväxtfaktorer (se bilaga 1) varje 48 h och byte av medium med tillväxtfaktorer varje 96 h. Efter uppodling i ungefär 7–9 dagar eller vid tecken på tydlig överväxt genomfördes en passage av colonoidkulturerna. Det innebär fragmentering av colonoiderna i PBS-lösning för att sedan tillsätta fragmenten på nya odlingsplattor. Passage av organoider är ett sätt att förvalta och expandera odlingarna. Dessutom bidrar det till en maximal användning av odlat material eftersom det reducerar behovet av att på nytt isolera kryptor från vävnad.



Figur 2. Schematiskt upplägg från isolering av kryptor till utvecklade colonoider i efterföljande passager. A: Vävnadssegment från andra colonläget B: Isolerade kryptor (svarta pilar) med villi-liknande strukturer (vit pil) C: Colonoid efter 2 dagars odling i tredje passagen D: Colonoid vid 4 dagars odling i tredje passagen E) Colonoid vid 6 dagars odling i tredje passagen. Skapad med BioRender.com.

3.4 Isolering av RNA och cDNA syntes

För karaktärisering av genuttryck från både vävnadsprover och odlade colonoider är extraktion av RNA nödvändig. Isolerat RNA används sedan för syntetisering av cDNA som sedan fungerar som templat för vidare amplifiering vid qPCR. I den här studien isolerades RNA från vävnadsprover enligt protokoll från NucleoSpin RNA-kit (Macherey-Nagel), se bilaga 2. Mängd fryst vävnadsmaterial från tarm som användes för isoleringen var mellan 15–20 mg. Isolering av RNA från organoider gjordes genom protokoll från NucleoSpin RNA Plus XS-kit (Macherey-Nagel), se bilaga 3. Organoidmaterial samlades ihop genom att matrigel löstes upp med PBS + BSA där odlingsmaterial från en 24-brunns odlingsplatta poolades i ett 15 ml rör. Organoiderna pelleterades och frystes sedan i -80 °C. Pelleterade organoider som töats på is och centrifugerats vid 400×g i 5 min användes sedan för RNA extraktion enligt protokollets instruktioner. Koncentrationen RNA samt dess kvalitet mättes med hjälp av spektrofotometri (NanoDrop, ND-1000, NanoDrop Technologies) och elektrofores (TapeStation, RNA ScreenTape Analysis). För att minska DNA kontamination i proverna genomfördes DNase behandling enligt beskrivning från protokollet Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen), se bilaga 4.

Syntes av cDNA inför qPCR gjordes enligt protokollet SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen), se bilaga 5. En negativ kontroll (RT-) användes och kördes parallellt med testerna. Färdigt cDNA späddes slutligen i 1:5 lösning med RNase-fritt vatten och förvarades i frys tills fortsatt användning.

3.5 Karaktärisering med qPCR

För karaktärisering av både organoider och vävnadsprover användes RT-qPCR. I studien användes QuantiTect SYBR Green PCR-kit (Qiagen) (Bilaga 6), tillsammans med utvalda primers presenteras i tabell 1 och har använts i tidigare publikation (Hellman 2021). Utvalda primers binder till specifika gensekvenser vilka representerar epitelceller (EPCAM), proliferativa celler (PCNA), intestinala stamceller (LGR5), proliferativa celler inkl. stamceller (SOX9), enteroendokrina celler (CHGA), bägarceller (MUC2), tuft celler (DCLK1) och panethceller (LYZ). qPCR kördes även för utvalda house-keeping gener (SDHA, HPRT och GAPDH) vilka användes som referensgener för tidigare nämnda cellmarkörer. House-keeping gener räknas som grundläggande gener för cellöverlevnad och uttrycks ungefär i lika höga nivåer i alla friska celler (Joshi et al. 2022).

För varje enskild analys användes 2 µl cDNA med tillsats av 23 µl QuantiTect SYBR Green PCR mastermix som sedan kördes i CFX96 Touch PCR-maskin (BioRad). Primerkoncentration var mellan 0,4–0,5 µM för utvalda gener och 0,3–

0,4 μM för HK-gener. Körprogrammet var utformat med en första denaturerande cykel på 15 min i 95 °C, följt av 40 cykler med tre steg. Steg ett med 15 sek i 95 °C, steg två 30 sek i specifik annealing temperatur för avsett primer-par och ett sista tredje steg på 72 °C i 30 sek. På följande sätt erhöles Cq-värden som anger när den specifika produkten har bildats i en tillräckligt stor mängd och en smältkurva som användes för att korrekt kunna verifiera förekomst av den PCR-produkt som har amplifierats.

Med hjälp av kalkylblad användes erhållna Cq-värden för beräkning av skillnaden i relativt genuttryck för varje cellmarkör i vävnad respektive colonoid mot utvalda referensgener (SDHA, HPRT, GAPDH). Medelvärde av genuttrycket (Cq) för varje enskild genmarkör har normaliserats till uttrycket av HK-generna/referensgenerna. På detta vis fås ett relativt värde av genuttryck i vävnad och colonoid jämfört med uttrycket av referensgenerna. Följaktligen erhöles värden för ΔCq som sedan räknades om till $2^{-(\Delta\text{Cq})}$. För ytterligare jämförande analys av genuttrycket i ursprunglig colonvävnad kontra colonoid beräknades även $\Delta\Delta\text{Cq}$, som sedan ställdes upp som $2^{-(\Delta\Delta\text{Cq})}$ i den statistiska analysen.

3.6 Gelelektrofores

Genom gelelektrofores erhöles information om qPCR-produkternas basparslängd (storlek) samt förekomst av icke-specifika produkter eller s.k. primer-dimers, där primersekvenserna bundits till varandra. Gelelektrofores användes för verifiering av ett urval av amplifierade produkterna från qPCR-analysen. Urvalet inkluderar en representativ produkt som bedömdes ha normal smältkurva samt utvalda produkter med avvikande smältkurva. Gelen gjordes genom att 2 % agarosgel löstes i TBE-buffert 0,5M och 6 μl gelred tillsattes. Gelen laddades med en 100 bp-stege (3 μl). 10 μl PCR-produkt och 2 μl loading buffert laddades i varje brunn. Spänningen var 100 V och elektroforesen kördes i 40 min. Om produkterna hade en avvikande smältkurva tillsammans med ospecifika resultat från gelen, exkluderades dessa från analysen. Se tabell 1 och 3 för förväntad basparslängd.

Tabell 1. Lista över använda primers och referensgener. ^a= primer överlappar mellan två olika exon. ^b= primers ligger på samma exon.

Celltyp	Gen	Primersekvens	Storlek (bp)	Annealing temp. (° C)	Källa
Epitelceller	EPCAM	F: TGA CCA CAA ACT GCT CTG TGA R: GAG CCC GTC GTT ATT CTG GAT	168	59	(Stewart et al. 2018)
Proliferativa celler	PCNA	F: AAG CCA CTC CAC TGT CTC CTA R: CTA GGA TGC GTC CTC ATC CTC	170	59	(Hellman 2021)
Intestinala stamceller	LGR5	F: AGC CTG GTG GTT CTG CAT CT ^a R: AAC GCT TTC TCG GGG ATC AG	179	61	(Stewart et al. 2018)
Proliferativa celler inkl. stamceller	SOX9	F: CCT TGA GAA GAC CGT AGA CAA AG ^b R: ATT CGG TAC GAG TTG CCT TTA G ^b	145	60	(Hellman 2021)
Panethceller	LYZ	F: CAC CAT GAA GGT TCT CCT GAC R: CCA TCT GGC CAA ACA GAC C	164	58	(Hellman 2021)
Enteroendokrina celler	CHGA	F: CTG CGA GGA GAT GAA CGG AT ^a R: AGA ACC TCT GCG AGT TCG TC	189	60	(Stewart et al. 2018)
Tuft celler	DCLK1	F: TGC TAC AGC ATC TAG TGT ACA GAA T R: CCT GCA TTC TTC GGA GCT G	163	59	(Hellman 2021)
Referensgener					
	GAPDH	F: ATC TGA CCT GCC GCC TGG AG R: CGA TGC CTG CTT CAC CAC CTT C	120	64	(Hellman 2021)
	HPRT	F: AAT TAT GGA CAG GAC TGA ACG G ^a R: ATA ATC CAG CAG GTC AGC AAA G	139	57	(Hellman 2021)
	SDHA	F: GAG GAA TGG TCT GGA ATA CTG ^{a,b} R: GCC TCT GCT CCA TAA ATC G ^b	66	57	(Hellman 2021)

3.7 Histologisk analys och infärgning av snitt

Inför histologisk utvärdering av colonoiderna preparerades det odlade materialet enligt särskilt protokoll som tidigare använts för enteroider från häst (Hellman 2021). I korthet extraherades over-lay medium från brunnarna och formalin tillsattes. Efter inkubering i 30–45 min i rumstemperatur samlades fixerade colonoider in från en hel odlingsplatta (24 brunnar) och poolades till ett 50 ml rör. Organoidmaterialet pelleterades genom centrifugering vid $250\times g$ i 5 min och supernatanten avlägsnades. Därefter suspenderades förvärmad 2 % agarosgel (low melting) i röret som centrifugerades på nytt vid $150\times g$ i 3 min. Röret sattes sedan på is för att låta gelen stelna och därefter togs gelen ut från röret. Gelen bäddades senare in i paraffin och snittades inför infärgning med hematoxylin och eosin (HE) samt Alcian Blue – Periodic Acid Schiff (AB-PAS) enligt protokoll, se bilaga 7 och 8. Vävnadsmaterial från colon fixerades i formalin inför inbäddning och snittning. Det ursprungliga vävnadsmaterialet färgades in med HE och ABPAS enligt samma protokoll som för colonoiderna. Inbäddning och infärgning av histologiska snitt gjordes av Albin Norman på Enheten för patologi, Institutionen för husdjurens biovetenskaper (SLU).

Histologisk analys av colonoiderna gjordes på tre av de totalt fem hästarna. Inledningsvis gjordes en övergripande morfologisk bedömning i ljusmikroskop. Vidare räknades antalet bägarceller och aktiva mitoser i preparaten, varvid den sistnämnda representerar delande celler. Förekomst av cellerna beräknades genom att identifiera dessa celltyper i vävnadssnitt och colonoidsnitt i totalt 15 olika synfält i 40x förstoring.

3.8 Statistisk analys

Statistisk analys gjordes med hjälp av Graph Pad Prism version 10.4.0. Genom beräkningar av skillnader i relativa genuttryck mot referensgener samt skillnader i genuttryck mellan colonvävnad och colonoid erhöles ΔCq - respektive $\Delta\Delta Cq$ -värden. Dessa plottades som $2^{-(\Delta Cq)}$ respektive $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ i Graph Pad. Kruskal-Wallis test (icke-parametriskt) med multiple comparisons (ANOVA-test) användes för att undersöka signifikanta skillnader i genuttryck. Kruskal-Wallis test användes också för att undersöka signifikanta skillnader i förekomst av bägarceller och mitoser hos colonoid respektive colonvävnad från tre av hästarna. Ett p -värde $<0,05$ anses som signifikant.

4. Resultat

4.1 Hästarna

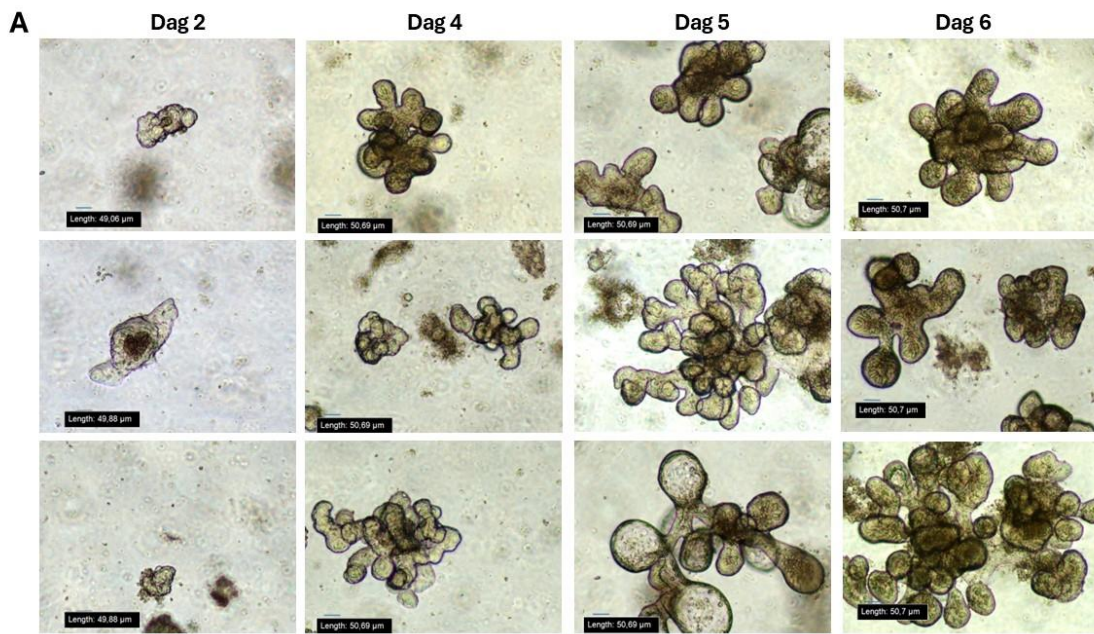
I studien ingick totalt 5 hästar. Av praktiska och ekonomiska skäl ingick inte alla hästar i samtliga delar av studien. Odling materialet härstammar från två av de totalt fem hästarna som ingick i studien. Vid studiens början isolerades intestinala kryptor från tre hästar och initial uppodling inleddes. Organoidmaterialet frystes ner i väntan på fortsatt användning. I samband med detta gick material från två hästar förlorat och kunde inte odlas upp igen. Av ekonomiska skäl etablerades inga fler organoidodlingar än de som listas nedan i tabell 2.

Tabell 2. Övergripande lista över hästarna och var dessa ingick i studien.

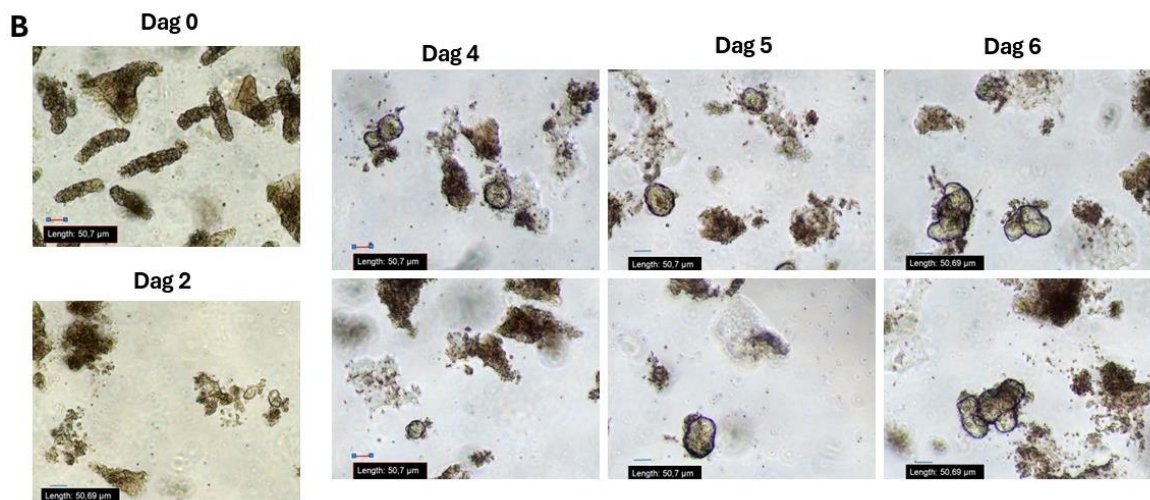
Häst	Odling	qPCR	Histologi (vävnad)	Histologi (colonoid)
Häst 1	X	X	X	-
Häst 2	-	X	X	-
Häst 3	-	X	X	-
Häst 4	X	X	-	X
Häst 5	X	-	-	-

4.2 Odling av colonoider

Ekvina colonoider lyckades framställas från intestinala kryptamceller med ursprung från colon, vilket illustreras i figur 3 och figur 4. Colonoiderna från första passagen formar tydliga sfäriska strukturer först från dag 4. Därefter följer en vidare utveckling med tendenser till utbuktande utskott från dag 6 (figur 4). Colonoider från tredje passagen hade utvecklat en mer komplex morfologi med utskott vid dag 4 (figur 3). Efter 5–6 dagar av odling började colonoiderna i tredje passagen bli mörkare till utseendet, vilket är en indikation på celldöd. På enstaka ställen sågs en förändrad morfologi med uppblåsta utskott och förtunnat epitel, se figur 3.



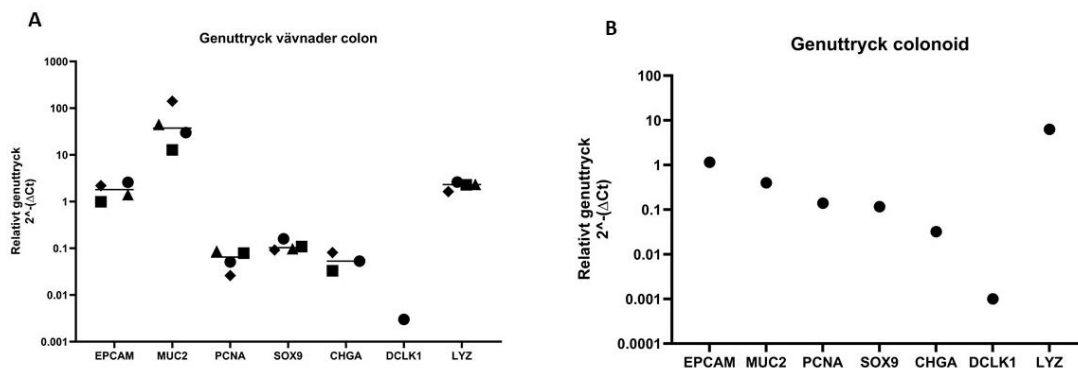
Figur 4. Representativa bilder av colonoider tagna med ljusmikroskop i 4x förstoring från tredje passagen i odlingsmedia vid dag 2, 4, 5 och 6. Colonoider med ursprung från Häst 1.



Figur 3. Representativa bilder av colonoider tagna med ljusmikroskop i 4x förstoring från kryptor till dag 6 i odlingsmedia. Bilder tagna vid dag 0, 2, 4, 5 och 6. Colonoider med ursprung från Häst 5.

4.3 Karaktärisering med qPCR

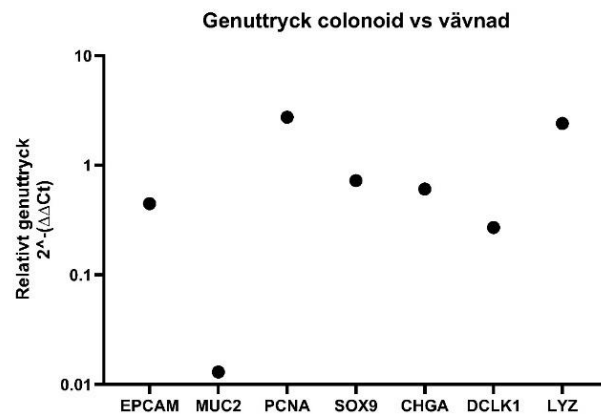
Genomförd qPCR-analys konfirmerade uttryck av genmarkörerna EPCAM, PCNA, SOX9, LYZ, CHGA, MUC2 och DCLK1 från de etablerade colonoid-kulturerna som odlats fram med intestinala kryptstamceller från colon. I colonoiden var genuttrycket av markören LYZ högst och uttrycket av DCLK1 var lägst jämfört med referensgenerna. EPCAM hade ett uppmätt genuttryck i colonoiden som var i ungefär samma nivå som referensgenerna (=1), se figur 5. Relativa uttrycket av MUC2, PCNA, SOX9, CHGA och DCLK1 uppmättes till <1 i colonoiden, vilket innebär lägre uttryck än referensgenerna. I colonvävnad var det relativa genuttrycket <1 för generna PCNA, SOX9, CHGA och DCLK1, medan LYZ och MUC2 hade ett värde >1. Även i vävnad återfanns ett relativt värde för EPCAM runt 1. I ursprunglig colonvävnad från hästarna var genuttrycket av MUC2 högst, signifikant högre än uttrycket för PCNA och CHGA ($p < 0,0015$), se figur 5. Lägsta uttrycket i vävnader återfanns för DCLK1. Den interindividuella variationen i genuttryck mellan de olika hästarna var generellt låg.



Figur 5. Karaktärisering av genuttryck i colonvävnad (A) och colonoid (B). Genuttryck av cellmarkörerna EPCAM, MUC2, PCNA, SOX9, CHGA, DCLK1 och LYZ i colonvävnad från fyra hästar samt colonoid. Genuttrycket för varje enskild genmarkör har normaliserats till det geometriska medelvärdet för tre referensgener (GAPDH, SDHA, HPRT) och plottas som $2^{-(\Delta Cq)}$ i grafen. Varje geometrisk figur representerar en individ.

Uttrycket av LGR5 kunde inte detekteras i något av de tekniska replikat för vävnaderna efter att cut-off sattes på $Cq > 38$. I två tekniska replikat kunde ett lågt uttryck detekteras i colonoiden ($Cq > 34$). CHGA saknar ett replikat på grund av för lågt uttryck. Uttryck av DCLK1 kunde endast identifieras i ett av de totalt fyra replikaten, varför den endast har en punkt, se figur 5A.

Vid jämförelser av det relativa uttrycket mellan colonoid och colonvävnad var genuttrycket av PCNA och LYZ cirka 2 gånger högre i colonoiden jämfört med colonvävnad, se figur 6. Enligt datan från studien var uttrycket av MUC2 lägre i colonoiden jämfört med ursprungsvävnaden.



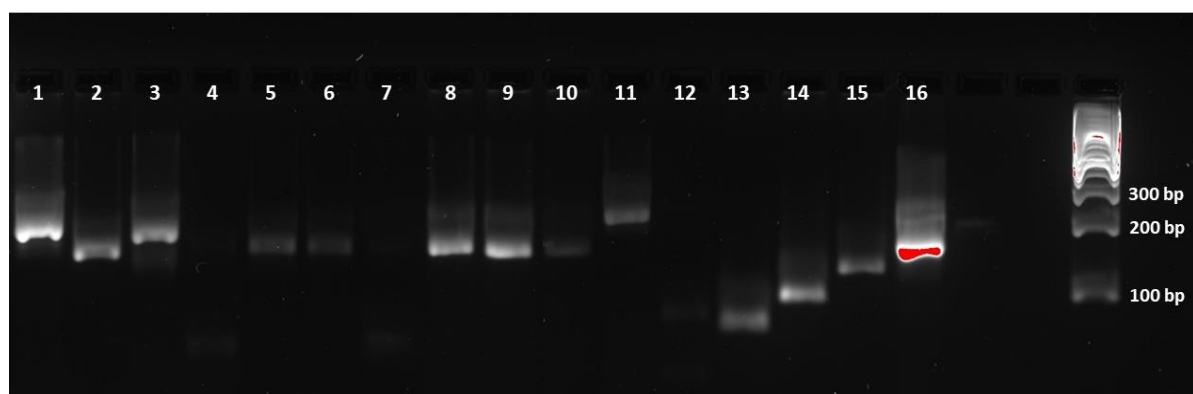
Figur 6. Normalisering av uppmätt genuttryck i colonvävnad till colonoid med ursprung från samma häst. Relativa genuttryck av cellmarkörerna EPCAM, MUC2, PCNA, SOX9, CHGA, DCLK1 och LYZ i colonvävnad och colonoid har jämförts i relation till varandra och ställts upp som $2^{-(\Delta\Delta C_q)}$. Ett värde på 1 innebär likartat uttryck i vävnad som i colonoiden.

4.4 Gelelektrofores

Genom elektrofores verifierades förekomst av korrekt amplifierad qPCR-produkt för genmarkörerna PCNA, MUC2, CHGA, GAPDH, SDHA HPRT, LYZ, se figur 7. Produkterna har synliga band i anslutning till förväntad basparslängd enligt stegens markering (bp). Ett tydligt band syns i brunnen som laddades med EPCAM, men produkten ger intrycket av att vara något större än förväntat. Sekvensering kan göras för att bestämma exakt storlek. Lågt uttryck av korrekt DCLK1 kan också påvisas, eftersom band med svag intensitet syns i brunn 5 och 6. LGR5 produkt kan inte specificeras då det i brunn 11 och 12 förekommer ospecificerade produkter (flera band vid överexponering) med felaktig förväntad storlek.

Tabell 3. Förväntad basparsstorlek på använda primersekvenser.

Primer	Storlek (bp)
EPCAM	168
PCNA	170
MUC2	211
DCLK1	163
SOX9	145
CHGA	189
LGR5	179
GAPDH	66
SDHA	120
HPRT	139
LYZ	164

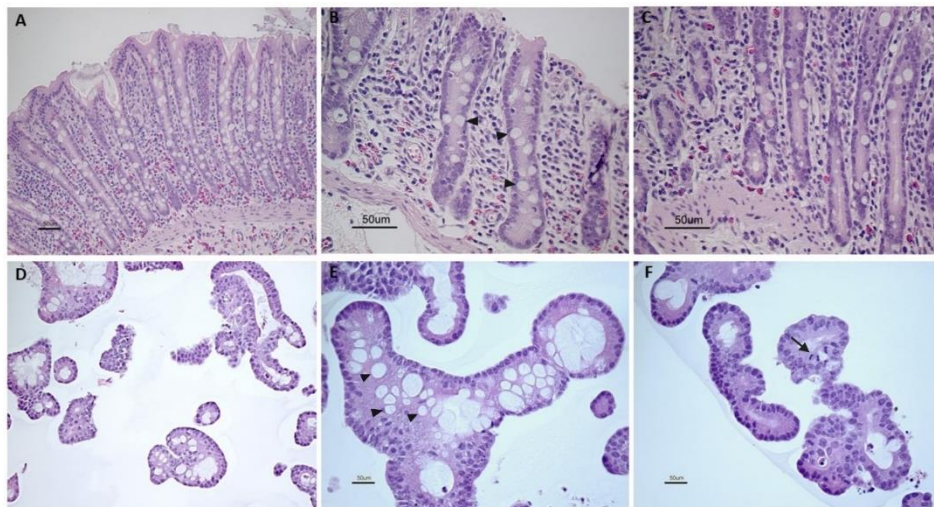


Figur 7. Gelelektrofores laddat med representativt urval av PCR-produkter från varje genmarkör samt utvalda avvikande produkter baserat på analys av smältkurva. 1: EPCAM, 2: PCNA, 3: MUC2, 4–7: DCLK1, 8: SOX9, 9–10: CHGA, 11–12: LGR5, 13: GAPDH, 14: SDHA, 15: HPRT, 16: LYZ. Stege med 100–1000bp.

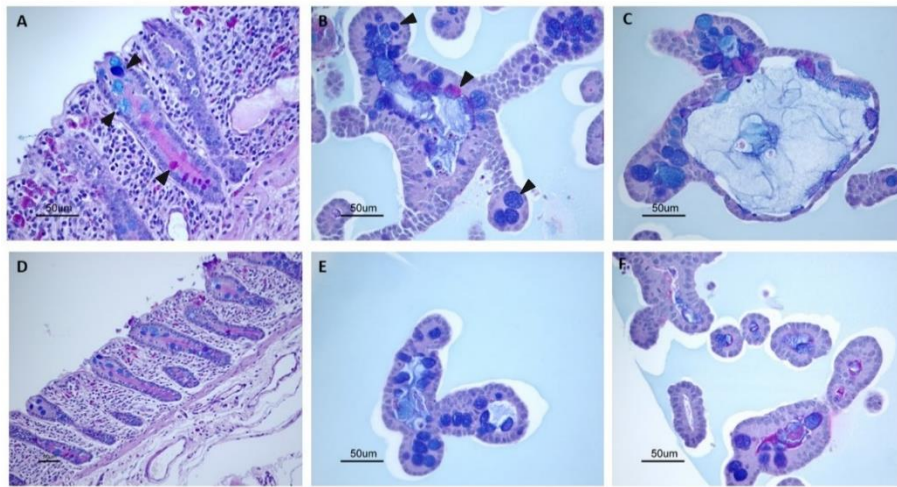
4.5 Histologisk analys

H&E och AB-PAS färgning gjordes av snitt från ursprunglig colonvävnad samt odlade colonoider i odlingsmedia. Colonoiderna formade kryptlika utskott som till större del utgjordes av intakt enkelskiktat epitel. Inuti lumen av colonoiderna fanns varierande grad av celldebris och mukus. Mukusproducerande celler (bägarceller) kunde identifieras bland colonoidernas epitelceller i både H&E-färgning, se figur 8, och i PAS-färgning, se figur 9.

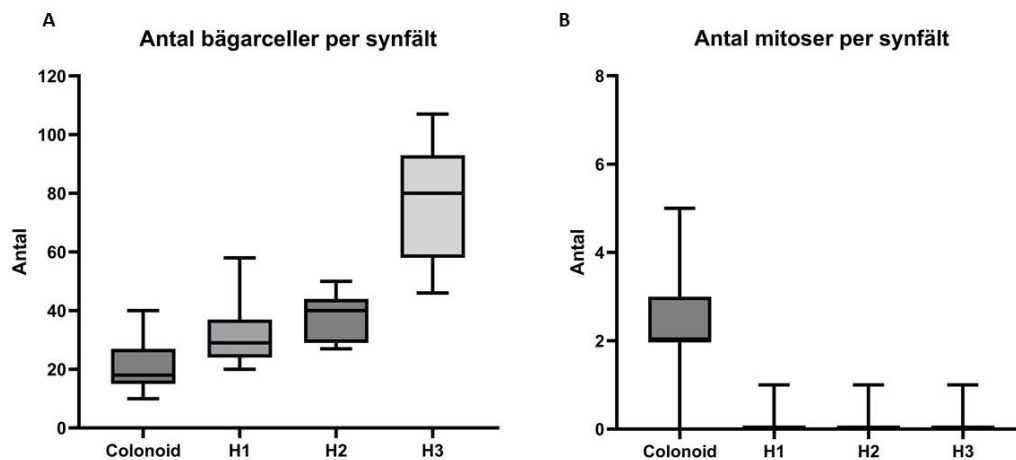
Den interindividuella variationen på proteinnivå (antal celler) var generellt sett större jämfört med qPCR. Förekomst av antalet bägarceller per synfält var störst i Häst 3. Lägst förekomst av bägarceller identifierades i colonoiden, signifikant mindre än Häst 2 och 3 ($p < 0,0001$). Ingen signifikant skillnad kunde identifieras mellan Häst 1 och colonoiden, se figur 10. Antalet mitoser förekom i högre utsträckning i colonoiden jämfört med epitelet i colonvävnad hos alla tre hästarna ($p < 0,0001$), se figur 10.



Figur 8. Representativa bilder tagna på histologiska snitt i HE-färgning föreställande colonepitel (A-C) och colonoider (D-F) i 20x och 40x förstoring. Bägarceller kunde identifieras i colonepitel (B) och colonoid (E), se svarta markeringar. Mitoser identifierades i flertalet colonoider (F), se svart pil. Skapad med BioRender.com



Figur 9. Representativa bilder tagna på histologiska snitt i PAS-färgning föreställande colonepitel (A,D) och colonoider (B,C,E,F) i 20x och 40x förstoring. Bägarceller kunde identifieras i colonepitel (A) och colonoid (B), se svarta markeringar. Skapad med BioRender.com



Figur 10. Boxplot som visar förekomst av antalet celler per synfält före respektive prov. Graf A visar antalet bägarceller per synfält. Colonoiden hade signifikant lägre uttryck på proteinnivå än H2 och H3. Ingen signifikant skillnad mellan H1 och colonoiden ($p < 0,0001$). Graf B visar antalet mitoser per synfält. Colonoiden hade högre mitosaktivitet än samtliga vävnadsprov ($p < 0,0001$)

5. Diskussion

Syftet med studien var att testa och utvärdera metoden för odling av ekvina colonoider från kryptstamceller från hästens colon för att vidare utföra karaktärisering av genuttryck och histologisk analys av de odlade colonoiderna. Resultat från studien visar på framgångsrik isolering av stamceller och efterföljande odling av 3D ekvina colonoider upp till passage 3. I odlade colonoider påvisas både förekomst av delande celler/stamceller och differentierade celler. Dessutom bildar colonoiderna utbuktande kryptlika strukturer med ett centralt lumen som är likartat det utseende som ursprungliga colonepitelet har *in vivo*. Som tidigare nämnts finns idag ingen väletablerad och standardiserad metod för odling av ekvina intestinala organoider. Resultatet från denna studie kommer därför komplettera tidigare publicerad forskning och kan komma att bidra till fortsatt utveckling och standardisering av odling av ekvina colonoider.

5.1 Odling av colonoider

Colonoiderna i odlingskulturerna formar 3D strukturer som saknar tydligt definierbar form, har lumen och växer med utbuktande kryptlika utskott i varierande omfattning som utgår från centrala kroppen. Under de första dagarna under odlingstiden syns colonoiderna som mer sfäriska, amorfa strukturer som sedan växer i storlek och utvecklar en mer komplex morfologi. Morfologin hos odlade colonoider i den här studien är likartad den som beskrivits i tidigare studie (Windhaber et al. 2024).

Det noterades en skillnad i utveckling och tillväxttakt mellan Häst 1 och Häst 5. Medan colonoider från Häst 5 syntes som små cellklumpar, hade colonoider från Häst 1 redan vid dag fyra ökat i storlek och utvecklat multilobulära komplexa kryptlika strukturer. Resultat från den här studien pekar mot snabbare utveckling av colonoiderna med ursprung från fragmenterade organoider jämfört med när isolerade kryptstamceller tillsatts i odlingsmedia, även om det för definitiva slutsatser krävs fler biologiska replikat och statistiska jämförelser. En trolig förklaring skulle kunna vara att fragment från redan etablerade colonoider har lättare att regenerera än enskilda kryptor som dessutom stressats i samband med isoleringsprocessen. Vid etableringen av organoider från Häst 5 gjordes mindre korrigeringar i intervallet för tillsats av tillväxtfaktorer och byte av media. I stället för att tillsätta tillväxtfaktorer varannan dag och byta media (med tillväxtfaktorer) var fjärde dag, byttes mediat med tillväxtfaktorer tre dagar efter kryptisoleringen. Detta gjordes i syfte att bromsa odlingstakten något då organoiderna växte för snabbt vid första omgången. Följaktligen skulle detta också kunna ha en

avgörande påverkan på tillväxten i dessa odlingskulturer. Dessutom är faktorer som biologisk variation något att ha i beaktande. Det går därmed inte att utesluta att det rör sig om något som skett under processen för kryptisolering eller att tarmvävnaden tagit skada från exempelvis anestesi innan provinsamling. Från tidigare studier vet vi att odlingseffektivitet verkar ha en ganska omfattande inter-individuell variation (Stewart et al. 2018; Hellman 2021). Det går inte att utesluta att anestesi skulle kunna ge upphov till en försämrad tillväxt av colonoiderna i första skedet av odlingen. Däremot är det mindre sannolikt att den skulle ha en påverkan i efterföljande passager. Detta är ännu inte helt klarlagt, varför mer studier måste kartlägga den interindividuella variation samt vilka faktorer som påverkar tillväxt och avkastning av organoiderna.

Liksom andra modeller finns det svårigheter och begränsningar med som är avgörande för den fortsatta användningen av organoidmodellen. Exempelvis går det att ifrågasätta organoidteknologin ur djuretiskt perspektiv då den specifika matri-gelen innehåller komponenter som utvinns från tumörer hos möss (Csukovich et al. 2022). Dessutom är det svårt, och kanske nästintill omöjligt att skapa en exakt kopia av det ursprungliga organet under artificiella förhållanden. Organoider är bara en modell för att studera och beskriva verkligheten. Samtidigt är det mycket som tyder på att den här teknologin är ett bra verktyg för den moderna forskningen. Särskild betydelse skulle intestinala organoider ha för häst då sjukdomar relaterat till magtarmsystemet är vanligt förekommande. Därmed bör framtida studier fokusera på att utveckla och standardisera tekniken för odling av ekvina intestinala organoider.

5.2 Karaktärisering av genuttryck

Med hjälp av qPCR undersöktes den cellulära kompositionen av både colonvävnad och colonoid. Genuttryck av cellmarkörer som är representativa för epitelceller, proliferativa celler inkl. stamceller, enteroendokrina celler, bägar-celler, tuft celler och panethceller (paneth-lika celler) identifierades både i vävnad och colonoid. Således indikerar detta att epiteliala celler, såväl differentierade celler som stamceller, finns representerade i colonoiderna. Därmed pekar studiens resultat på att de celltyper som finns i den ursprungliga vävnaden också återfinns i colonoiderna. Liknande resultat har beskrivits för enteroider (Stewart et al. 2018; Hellman 2021). Vidare var den interindividuella variationen avseende genuttryck i colonvävnad mellan de olika hästarna mycket liten, vilket talar för att det inte krävs isolering av kryptor från väldigt många olika individer för att förstå individuella skillnader i populationen. I stället räcker det med ett mindre antal som gör de experimentella studierna mer praktiskt genomförbara.

Till skillnad från tidigare studier uppvisar colonoider i denna studie ett uttryck av MUC2 som är förhållandevis lågt jämfört med det uppmätta uttrycket i colönvävnad. Samtidigt konfirmerades förekomst av bägarceller vid den histomorfologiska analysen. Vidare beskriver litteraturen bägarcellerna som en av de dominerande celltyperna i colonepitelet (Pawlina & Ross 2020). Baserat på de motstridiga resultaten kan man fundera kring hur väl qPCR fungerar som metod för kartläggning av organoider. Uttryck på gennivå respektive proteinnivå verkar kunna skilja sig åt och behöver inte korrelera med varandra. Samtidigt är qPCR en etablerad och tillgänglig metod som är användbar för att utvärdera förekomst av fler olika cellmarkörer. För definitiva slutsatser gällande hur väl celltyperna i originalvävnaden är representerade i colonoider krävs fler biologiska replikat och statistiska jämförelser. Vidare kan skillnader i genuttryck mellan colonoid och vävnad påverkas av faktorer som är relaterade till studiens utformning. Exempelvis som att det i vävnadskontrollerna även finns andra vävnadstyper däribland mukosa och submukosa, medan det i colonoiderna enbart finns epitelceller representerade.

Genuttryck av LYZ uppmättes till höga nivåer både i vävnad och i colonoider. Detta är intressant då litteraturen beskriver att colon saknar panethceller, i stället finns krypt-liknande panethceller (Date & Sato 2015). Då primersekvenserna är ärvda från ett tidigare försök (Hellman 2021), är det svårt att uttala sig vidare om primernas specificitet och sekvensering skulle behöva göras för ett utförligare resultat. En teori är att cellmarkören LYZ även kan inkludera paneth-liknande celler då dessa också visat sig uttrycka LYZ i colon hos människa (Wang et al. 2019), men det skulle även kunna förekomma andra celltyper. I likhet med resultat från Hellmans (2021) studie, uppmättes endast låga uttryck av DCLK1 i colonoiden och i ett replikat av colönvävnad. Uttrycket av DCLK1 i vävnaden var svårt att identifiera med qPCR och gav höga Cq-värden, vilket indikerar lågt uttryck av dessa celler. Därför genomfördes gelelektrofores som kunde verifiera korrekt storlek av produkterna, men med svaga band vilket talar för låga uttryck av cellmarkören. DCLK1 uppges vara en specifik markör för tuftceller i tarmen (Middelhoff et al. 2017) och är en typ av kemosensoresk cell som bland annat deltar i försvaret mot patogener. Celltypen har visat uppreglering på gennivå i enteroider efter exponering av parasitiska nematoder (Hellman 2024). Mer forskning om genuttryck av DCLK1 i intestinala organoider kan bidra till ett förbättrat kunskapsläge om patogen-värdinteraktioner i magtarmsystemet.

I kontrast till tidigare resultat (Stewart et al. 2018), kunde genuttryck av LGR5 inte detekteras i någon större utsträckning och på dessa grunder uteslöts markören från vidare analys. Liknande resultat har erhållits i andra studier (Hellman 2021),

och öppnar följaktligen upp för diskussion om hur lämplig den använda stamcellsmarkören LGR5 är som genmarkör för ekvina stamceller.

5.3 Histomorfologisk analys

Histomorfologisk undersökning genomfördes där antalet bägarceller och aktiva mitoser analyserades. I den här studien konfirmerades förekomst av bägarceller och mitoser i colonoiderna. Vad gäller förekomst av mitoser var den signifikant högre i colonoiderna än i colonvävnaden. Resultatet korrelerar väl med ett högre genuttryck av delande celler (PCNA, SOX9) från qPCR-analysen. Tillsammans skulle detta kunna tyda på en ökad mitosaktivitet i organoiderna, vilket inte är omöjligt med tanke på de optimala tillväxtförhållanden som råder. Dessutom kan man också tänka sig att man i dessa omständigheter selekterar för delande celler och stamceller.

I den här studien var antalet bägarceller per synfält signifikant lägre i colonoiderna än Häst 2 och 3, men i liknande nivå som Häst 1. Dessutom uppmättes ett förhållandevis lågt genuttryck av MUC2 i colonoider jämfört med colonvävnad. Ändå kunde bägarceller konfirmeras i majoriteten av colonoiderna i det histologiska preparatet. Med detta sagt är det svårt att dra definitiva slutsatser om resultatet. Sammantaget behöver metoden för karaktärisering förfinas ytterligare för att få mer tillförlitliga resultat. Dessutom finns andra felkällor kopplat till den histologiska analysen. Medan vävnadspreparaten är betydligt mer kondenserade och innehåller andra celltyper än epitelceller, är colonoidsnitten luftiga och utgörs enbart av epitelceller. Fler studier görs på en ökad studiepopulation för att kunna utvärdera förekomsten av bägarceller på en mer generell nivå.

Att använda sig av immunofluorescens (IF) är ett sätt att vidareutveckla den här studien. Med hjälp av fluorescerande antikroppar riktade för särskilda målprotein är det möjligt att mer specifikt lokalisera och visualisera proteiner eller andra biomolekyler av intresse i colonoiderna. En liknande studie har använt immunofluorescerande antikroppar för att märka ut målprotein som uttrycks av bägarceller och mitotiskt aktiva celler i cecaloider (Duque-Correa et al. 2022). Med hjälp av immunofluorescerande mikroskop genereras sedan en bild baserat på detektion av det fluorescerande ljuset. Följaktligen är den här metoden intressant då den ger en mer detaljerad bild av målproteinerna och deras fördelning i vävnaden respektive organoiden.

5.4 Konklusion

Den här studien har framgångsrikt odlat fram tredimensionella ekvina colonoider med kryptstamceller från colon. Colonoiderna i den här studien har en likartad cellulär sammansättning och delar genetiska kännetecken med det ursprungliga colonepitelet *in vivo*. Intestinala organoider kan beskrivas som lovande *in vitro* modeller för framtida forskning inom flertalet områden som rör magtarmsystemet. I synnerhet när det i dagsläget inte finns några etablerade cellinjer hos häst, vilket annars räknas som en av de vanligaste förekommande metoderna för *in vitro*-studier inom den biomedicinska forskningen. Dessutom stämmer organoidmodellen väl överens med 3R-begreppet som syftar till att ersätta, reducera och förfina experimentella försök där levande djur ingår.

Referenser

- Barrila, J., Crabbé, A., Yang, J., Franco, K., Nydam, S.D., Forsyth, R.J., Davis, R.R., Gangaraju, S., Ott, C.M., Coyne, C.B., Bissell, M.J. & Nickerson, C.A. (2018). Modeling host-pathogen interactions in the context of the microenvironment: three-dimensional cell culture comes of age. *Infection and Immunity*, 86 (11), 10.1128/iai.00282-18. <https://doi.org/10.1128/iai.00282-18>
- Bartfeld, S. & Clevers, H. (2017). Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *Journal of Molecular Medicine*, 95 (7), 729–738. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1531-7>
- Beaumont, M., Blanc, F., Cherbuy, C., Egidy, G., Giuffra, E., Lacroix-Lamandé, S. & Wiedemann, A. (2021). Intestinal organoids in farm animals. *Veterinary Research*, 52 (1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00909-x>
- Bjerknes, M. & Cheng, H. (2006). Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Methods in Enzymology*, 419, 337–383. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)19014-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)19014-X)
- Csukovich, G., Pratscher, B. & Burgener, I.A. (2022). The world of organoids: Gastrointestinal disease modelling in the age of 3R and One Health with specific relevance to dogs and cats. *Animals*, 12 (18), 2461. <https://doi.org/10.3390/ani12182461>
- Date, S. & Sato, T. (2015). Mini-gut organoids: Reconstitution of the stem cell niche. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31 (1), 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125218>
- Duque-Correa, M.A., Goulding, D., Rodgers, F.H., Gillis, J.A., Cormie, C., Rawlinson, K.A., Bancroft, A.J., Bennett, H.M., Lotkowska, M.E., Reid, A.J., Speak, A.O., Scott, P., Redshaw, N., Tolley, C., McCarthy, C., Brandt, C., Sharpe, C., Ridley, C., Moya, J.G., Carneiro, C.M., Starborg, T., Hayes, K.S., Holroyd, N., Sanders, M., Thornton, D.J., Grencis, R.K. & Berriman, M. (2022). Defining the early stages of intestinal colonisation by whipworms. *Nature Communications*, 13 (1), 1725. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29334-0>
- van der Flier, L.G. & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, 71, 241–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
- Hellman, S. (2021). Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are responsive to microbial mimics. *Veterinary Research*, 52 (1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00976-0>
- Hellman, S., Martin, F., Tydén, E., Sellin, M.E., Norman, A., Hjertner, B., Svedberg, P. & Fossum, C. (2024). Equine enteroid-derived monolayers recapitulate key features of parasitic intestinal nematode infection. *Veterinary Research*, 55, 25. <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01266-1>

- Houghton, C.A. (2021). Chapter 14 - The gut microbiome: its role in brain health. I: Ghosh, D. (red.) *Nutraceuticals in Brain Health and Beyond*. Academic Press. 193–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820593-8.00014-8>
- Joshi, C.J., Ke, W., Drangowska-Way, A., O'Rourke, E.J. & Lewis, N.E. (2022). What are housekeeping genes? *PLoS Computational Biology*, 18 (7), e1010295. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010295>
- Kar, S.K., Wells, J.M., Ellen, E.D., Te Pas, M.F.W., Madsen, O., Groenen, M.A.M. & Woelders, H. (2021). Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Veterinary Research*, 52 (1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00904-2>
- Klunder, L.J., Faber, K.N., Dijkstra, G. & van IJzendoorn, S.C.D. (2017). Mechanisms of cell polarity–controlled epithelial homeostasis and immunity in the intestine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9 (7), a027888. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027888>
- Kozuka, K., He, Y., Koo-McCoy, S., Kumaraswamy, P., Nie, B., Shaw, K., Chan, P., Leadbetter, M., He, L., Lewis, J.G., Zhong, Z., Charmot, D., Balaa, M., King, A.J., Caldwell, J.S. & Siegel, M. (2017). Development and characterization of a human and mouse intestinal epithelial cell monolayer platform. *Stem Cell Reports*, 9 (6), 1976–1990. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.013>
- Lancaster, M.A. & Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345 (6194), 1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>
- Meneses, A.M.C., Schneeberger, K., Kruitwagen, H.S., Penning, L.C., van Steenbeek, F.G., Burgener, I.A. & Spee, B. (2016). Intestinal organoids—current and future applications. *Veterinary Sciences*, 3 (4), 31. <https://doi.org/10.3390/vetsci3040031>
- Middelhoff, M., Westphalen, C.B., Hayakawa, Y., Yan, K.S., Gershon, M.D., Wang, T.C. & Quante, M. (2017). Dclk1-expressing tuft cells: critical modulators of the intestinal niche? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 313 (4), G285–G299. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00073.2017>
- Nakamura, T. (2019). Recent progress in organoid culture to model intestinal epithelial barrier functions. *International Immunology*, 31 (1), 13–21. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy065>
- Pawlina, W. & Ross, M.H. (2020). *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Peterson, L.W. & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14 (3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Rahmani, S., Breyner, N.M., Su, H.-M., Verdu, E.F. & Didar, T.F. (2019). Intestinal organoids: A new paradigm for engineering intestinal epithelium in vitro. *Biomaterials*, 194, 195–214. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.12.006>

- Seeger, B. (2020). Farm animal-derived models of the intestinal epithelium: Recent advances and future applications of intestinal organoids. *Alternatives to Laboratory Animals*, 48 (5–6), 215–233. <https://doi.org/10.1177/0261192920974026>
- Stewart, A.S., Freund, J.M. & Gonzalez, L.M. (2018). Advanced three-dimensional culture of equine intestinal epithelial stem cells. *Equine Veterinary Journal*, 50 (2), 241–248. <https://doi.org/10.1111/evj.12734>
- Stewart, A.S., Schaaf, C.R., Veerasammy, B., Freund, J.M. & Gonzalez, L.M. (2022). Culture of equine intestinal epithelial stem cells after delayed tissue storage for future applications. *BMC Veterinary Research*, 18 (1), 445. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03552-6>
- Töpfer, E., Pasotti, A., Telopoulou, A., Italiani, P., Boraschi, D., Ewart, M.-A. & Wilde, C. (2019). Bovine colon organoids: From 3D bioprinting to cryopreserved multi-well screening platforms. *Toxicology in Vitro*, 61, 104606. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104606>
- Wang, Y., Song, W., Wang, J., Wang, T., Xiong, X., Qi, Z., Fu, W., Yang, X. & Chen, Y.-G. (2019). Single-cell transcriptome analysis reveals differential nutrient absorption functions in human intestine. *The Journal of Experimental Medicine*, 217 (2), e20191130. <https://doi.org/10.1084/jem.20191130>
- Windhaber, C., Heckl, A., Csukovich, G., Pratscher, B., Burgener, I.A., Biermann, N. & Dengler, F. (2024). A matter of differentiation: equine enteroids as a model for the in vivo intestinal epithelium. *Veterinary Research*, 55 (1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01283-0>
- Zhao, Z., Chen, X., Dowbaj, A.M., Sljukic, A., Bratlie, K., Lin, L., Fong, E.L.S., Balachander, G.M., Chen, Z., Soragni, A., Huch, M., Zeng, Y.A., Wang, Q. & Yu, H. (2022). Organoids. *Nature Reviews Methods Primers*, 2 (1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00174-y>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Organoider är små mini-organ som odlas fram i laboratoriemiljö med målet att de ska efterlikna de strukturella och funktionella egenskaperna hos riktiga organ. ”Häst-colonoider” är en specifik typ av organoid som härstammar från stamceller i hästars tjocktarm (colon). Dessa organoider har en sammansättning celler och struktur som påminner om tarmens naturliga epitelvävnad, men på en basal nivå. Eftersom organoider har visat sig dela vissa avgörande likheter med tarmens epitel är organoider användbara som modeller för att illustrera verkligheten och framför allt med fokus på olika aspekter kopplat till magtarmsystemet.

Mycket forskning har hittills fokuserat på organoider från människa och mus. Därmed är det fortfarande relativt få studier som fokuserar på andra djurslag som exempelvis häst och forskningen inom det området befinner sig fortfarande i ett tidigt skede. Syftet med den här studien var att beskriva metoden för att odla häst-colonoider för att sedan undersöka förekomsten av olika celler som normalt förekommer i tarmens epitel. Resultatet från studien visade på en lyckad odling av colonoider från colonstamceller. Det odlade organoidmaterialet från studien analyserades både på cellnivå i mikroskop samt avseende specifika gener. Genanalysen visade att de odlade colonoiderna innehöll flera olika typer av celler som normalt finns i tarmen. I den mikroskopiska undersökningen identifierades även aktivt delande celler och bägarceller. Bägarceller producerar slem och är en vanligt förekommande celltyp i hästens tjocktarm.

Kartläggning av organoiderna och vad de består av är viktigt för att bättre förstå hur de fungerar och hur de kan användas i framtida forskning. Organoider har stor potential som modell för närmare studier av magtarmsystemet och sjukdomar relaterat till det. För att ytterligare förbättra och förfina användningen behöver framtida forskning fokusera på att utveckla odlingstekniken samt utveckla metoder för att kartlägga organoiderna på ett mer detaljerat sätt.

Tack

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Eva Tydén och biträdande handledare Fredrik Södersten för er stöttning och hjälp under hela arbetets gång. Tack till biträdande handledare och forskningsassistent Julia Andersson för allt stöd och vägledning i det laborativa arbetet. Jag vill också tacka Magnus Åbrink för ditt engagemang och värdefulla feedback i rollen som examinerare.

Tack till Ove Wattle som generöst bidragit med färskt vävnadsmaterial. Tack till Faringe Slakteri som också bidragit med vävnadsmaterial. Jag vill också tacka Albin Norman för hans arbete med de histologiska snitten.

Slutligen vill jag särskilt tacka min kursare Agnes Söderqvist för ditt ovärderliga stöd och fina samarbete under det här arbetet.

Bilaga 1

SOP	Stina Hellman
cultivation	
Reagent stocks	
DMEM/F12	
Matrigel	
N2	
B27	
PEST	
HEPES	
Noggin	
R-spondin	
EGF	
Wnt3a	
Y27632	
SB202190	
LY2157299	
CHIR 99021	
Corning® Cell Recovery Solution, 100 mL	
<u>GF-mix for 500 ul matrigel (10 wells)</u>	<u>overlay medium (20 wells)</u>
Noggin (stock 25ug/ml) 2 ul	DMEM/F12+glut 9.5 ml
R-spondin (stock 100ug/mL) 2.5 ul	N2 (1%) 100 ul
EGF (stock 10 ug/mL) 2.5 ul	B27 (2%) 200 ul
Wnt3a (stock 20 ug/mL) 2.5 ul	PEST (2 %) 200 ul
Y27632 (stock 1 mM) 5 ul	HEPES (1%) 100 ul
SB202190 (stock 1 mM) 5 ul	
LY2157299 (stock 50 uM) 5 ul	
CHIR 99021 (stock 1 mM) 1.25	
<u>Day1</u>	
Newly isolated crypts or thaw crypts (see crypt isolation or cryostor)	
1. Wash in ICE COLD PBS+BSA three times - 1300 rpm for 5 min	
2. count crypts after final wash - approx 30 crypts/dome - ALWAYS dip tip in PBS+BSA before pipetting	
3. add fragmented crypts to matrigel + GF-mix - pipet in mix without bibbels to get smaller pieces	
4. Plate 50ul domes (use COLD TIPS)	
5. incubate for 30 min in 37C	
6. add 1 ml of prewarmed overlay medium (0.5 ml/well)	
<u>Day 3 (48 h)</u>	
add GF mix, see lazy dog	
<u>Day 5 (96 h)</u>	
change medium and add GF (ALWAYS preward medium)	
Keep on	

Day 7-9 passage enteroids

preparations

prewarm 24 well plates in **37C minimum 30 min**

thaw matrigel on ICE

make a GF mix keep on ICE

Make overlay medium DMEM/F12 and **prewarm to 37C**

make **(ICE COLD)** PBSv+ 0.1% BSA (**alwas pre-wet tips for avoiding enterids to stick to pipett surface**)

cold tips for matrigel

OBS work with prewt tips in PBS+BSA

1. Aspirate overlay medium
2. add 1 ml of cell recovery solution **(ICE COLD)** incube on **ICE 5 min**
3. pipett gently to detach matrigel domes
4. Transfer to 15 ml tube
5. Incubte on **ICE for 15 min- iverte tubes every 2 min**
6. centrifuge **1300 rpm 5 min**
7. two washes in ICE cold PBS+BSA **1300 rpm 5 min**
8. count crypts after final wash - approx 30 crypts/dome - ALWAYS dip tip in PBS+BSA before pipetting c
9. remove supernatant - add pipetting steps if more fragmentation is needed
10. Add fragments into matrigel + GF
11. Plate 50ul domes (use **COLD TIPS**)
12. incubate for **30 min in 37C**
13. add 1 ml of prewarmed overlay medium (0.5 ml/well)

after 48 H add GF

after 96 h change medium and add GF

Bilaga 2

5 NucleoSpin® RNA protocols

5.1 RNA purification from cultured cells and tissue

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer RA3 and rDNase were prepared according to section 3.

1 Homogenize sample

Disrupt up to **30 mg** of **tissue** (for sample amounts see section 2.2; for homogenization methods see section 2.3).



**Disrupt
sample**

Up to **5 x 10⁶** eukaryotic cultured cells can be collected by centrifugation and lysed by addition of Buffer RA1 directly.

2 Lyse cells

Add **350 µL Buffer RA1** and **3.5 µL β-mercaptoethanol (β-ME)** to the cell pellet or to ground tissue and vortex vigorously.



**+ 350 µL RA1
+ 3.5 µL
β-ME**

For appropriate sample and lysis buffer amounts see section 2.2.

Note: As alternative to β-ME the reducing agent DTT or TCEP may be used. Use a final concentration of 10–20 mM DTT or TCEP within the Lysis Buffer RA1.

3 Filtrate lysate

Reduce viscosity and clear the lysate by filtration through **NucleoSpin® Filter (violet ring)**: Place NucleoSpin® Filter in a Collection Tube (2 mL), apply the mixture, and centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



**11,000 x g,
1 min**

The lysate may be passed alternatively ≥ 5 times through a 0.9 mm needle (20 gauge) fitted to a syringe.

In case of visible pellet formation (depending on sample amount and nature) transfer supernatant without any formed pellet to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not supplied).

Important: To process higher amounts of cells (> 1 x 10⁶) or tissue (> 10 mg), the lysate should first be homogenized using the 0.9 mm needle (20 gauge), followed by filtration through NucleoSpin® Filters.

4 Adjust RNA binding conditions

Discard the NucleoSpin® Filter and add **350 µL ethanol (70 %)** to the homogenized lysate and mix by pipetting up and down (5 times).



**+ 350 µL
70 % ethanol**
Mix

Alternatively, transfer flowthrough into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided), add **350 µL ethanol (70 %)**, and mix by vortexing (2 x 5 s).

After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible which will not affect the RNA isolation. Be sure to disaggregate any precipitate by mixing and load all of the precipitate on the column as described in step 5. Do not centrifuge the ethanolic lysate before loading it onto the column in order to avoid pelleting the precipitate.

5 Bind RNA

For each preparation take one **NucleoSpin® RNA Column (light blue ring)** placed in a Collection Tube. Pipette lysate up and down 2–3 times and **load the lysate** to the column. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Place the column in a new Collection Tube (2 mL).



Load lysate
**11,000 x g,
30 s**

Maximal loading capacity of NucleoSpin® RNA Columns is 750 µL. Repeat the procedure if larger volumes are to be processed.

6 Desalt silica membrane

Add **350 µL MDB** (Membrane Desalting Buffer) and centrifuge at **11,000 x g** for **1 min** to dry the membrane.



**+ 350 µL
MDB**
**11,000 x g,
1 min**

Salt removal will make the following rDNase digest much more effective. If the column outlet has come into contact with the flowthrough for any reason, discard the flowthrough and centrifuge again for 30 s at 11,000 x g.

7 Digest DNA

Prepare DNase reaction mixture in a sterile 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided): For each isolation, add **10 µL reconstituted rDNase** (also see section 3) to **90 µL Reaction Buffer for rDNase**. Mix by flicking the tube.



**+ 95 µL
rDNase
reaction
mixture**

Apply **95 µL DNase reaction mixture** directly onto the center of the silica membrane of the column. Incubate at **room temperature** for **15 min**.

**RT,
15 min**

8 Wash and dry silica membrane**1st wash**

Add **200 µL Buffer RAW2** to the NucleoSpin® RNA Column. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Place the column into a new Collection Tube (2 mL).

Buffer RAW2 will inactivate the rDNase.



**+ 200 µL
RAW2**
**11,000 x g,
30 s**

2nd wash

Add **600 µL Buffer RA3** to the NucleoSpin® RNA Column. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flowthrough and place the column back into the Collection Tube.

Note: Make sure that residual buffer from the previous steps is washed away with Buffer RA3, especially if the lysate has been in contact with the inner rim of the column during loading of the lysate onto the column. For efficient washing of the inner rim flush it with Buffer RA3.



+ 600 µL RA3
**11,000 x g,
30 s**

3rd wash

Add **250 µL Buffer RA3** to the NucleoSpin® RNA Column. Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** to dry the membrane completely. Place the column into a nuclease-free Collection Tube (1.5 mL, supplied).

If for any reason, the liquid level in the Collection Tube has reached the NucleoSpin® RNA Column after centrifugation, discard flowthrough, and centrifuge again.



+ 250 µL RA3
**11,000 x g,
2 min**

9 Elute RNA

Elute the RNA in **60 µL RNase-free H₂O**, (supplied) and centrifuge at **11,000 x g** for 1 min.

If higher RNA concentrations are desired, elution can be done with 40 µL. Overall yield, however, will decrease when using smaller volumes.



**+ 60 µL
RNase-free
H₂O**
**11,000 x g,
1 min**

For further alternative elution procedures see section 2.4.

Bilaga 3

5 NucleoSpin® RNA Plus XS Protocol

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer WB2 was prepared according to section 3.

1 Homogenize and lyse sample

Disrupt and clarify the sample according to one of the methods described in section 2.3 by using **100 µL Lysis Buffer LB1**.



100 µL LB1
100 µL LB2

Note: Lysis tube is not included in the kit. Addition of reducing agent (e.g., β -mercaptoethanol, DTT, or TCEP) is not necessary.

Add **one volume Lysis Buffer LB2** to the lysate (typically 100 µL) and mix.

Note: For sample types consisting of less than 20 µL in volume (e.g., 1 mg tissue or low titer cultured cells in medium or PBS) a volume of 100 µL Lysis Buffer LB1 is sufficient. If a higher sample volume shall be processed (e.g., 20 µL cell suspension) or more lysate is desired increase volume of Lysis Buffer LB1, LB2, and Binding Solution BSXS proportionally (e.g., 150 µL LB1 + 150 µL LB2 + 225 µL BSXS). Be aware that 180 µL (per Buffer LB1) should not be exceeded due to the maximal volume of the Collection Tube (650 µL).

2 Remove gDNA and filtrate lysate

Place a **NucleoSpin® gDNA Removal Column XS** (yellow ring) in a Collection Tube (2 mL, provided), **transfer** the homogenized **lysate** (~200 µL) to the column, and centrifuge for **2 min** at **50 x g** followed by **10 s** at **11,000 x g**.



50 x g,
2 min



11,000 x g,
10 s

Discard the column and **continue with the flow-through**.

Note: Ensure that no liquid remains on the column membrane after centrifugation. If necessary, repeat the centrifugation until all liquid has passed through the membrane. The low-g centrifugation allows efficient DNA removal.

3 Adjust RNA binding conditions

Add **150 µL Binding Solution BSXS** (1.5 volumes relative to LB1) to the flow-through and mix well by moderate vortexing or by pipetting up and down several times.



150 µL BSXS
Mix

Note: If mixing is done by vortexing, be careful in order to avoid spilling, because the Collection Tube does not contain a lid.

4 Bind RNA

Transfer the whole **lysate** (~350 µL) to the **NucleoSpin® RNA Plus XS Column** (light blue ring) preassembled with a Collection Tube.



load lysate
300 x g,
1 min

Centrifuge for **1 min at 300 x g** followed by **10 s at 11,000 x g**.



11,000 x g,
10 s

Note: The flow-through may remain in the collection tube.

5 Wash and dry silica membrane

1st wash

Add **100 µL Wash Buffer MDB** onto the column.



100 µL MDB

Centrifuge for **10 s at 11,000 x g**.



11,000 x g,
10 s

Discard the flow-through with collection tube and place the column into a new 2 mL Collection Tube (provided).

2nd wash

Add **500 µL Buffer WB2** onto the column.



500 µL WB2

Centrifuge for **10 s at 11,000 x g**.



11,000 x g,
10 s

Discard the flow-through and reuse the collection tube.

3rd wash

Add **200 µL Buffer WB2** onto the column.



200 µL WB2

Centrifuge for **2 min at full speed** (<20,000 x g) to dry the membrane.



<20,000 x g,
2 min

Place the column into a **Collection Tube** (1.5 mL, provided).

Note: If for any reason, the liquid level in the Collection Tube has reached the column after centrifugation, discard flow-through and centrifuge again.

6 Elute RNA

Add **10–20 µL RNase-free H₂O** and centrifuge **1 min at 11,000 x g**.



10–20 µL
RNase-free
H₂O

Note: Elution volume may be varied from 5 µL to 30 µL.

11,000 x g,
1 min

Bilaga 4



Deoxyribonuclease I, Amplification Grade

Cat. No. 18068-015

Conc.: 1 U/ μ l

Size: 100 Units

Store at -20°C in a non-frost-free freezer.

Description:

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I, Amp Grade) digests single- and double-stranded DNA to oligodeoxy-ribonucleotides containing a 5'-phosphate. It is suitable for eliminating DNA during critical RNA purification procedures such as those prior to RNA-PCR amplification. DNase I, Amp Grade is purified from bovine pancreas and has a specific activity of $\geq 10,000$ U/mg.

Components:

18068-015	DNase I, Amp Grade
Y02340	10X DNase I Reaction Buffer
Y02353	25 mM EDTA (pH 8.0)

Unit Definition:

One unit increases the absorbance of a high molecular weight DNA solution at a rate of $0.001 A_{260}$ units/min/ml of reaction mixture at 25°C .

Storage Buffer:

20 mM sodium acetate (pH 6.5)
5 mM CaCl_2
0.1 mM PMSF
50% (v/v) Glycerol

Unit Assay Conditions:

0.1 M sodium acetate (pH 5.0)
5 mM MgCl_2
50 $\mu\text{g/ml}$ calf thymus DNA

10X DNase I reaction Buffer:

200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl_2 , 500 mM KCl

Doc. Rev.: 012802

This product is distributed for laboratory research only. CAUTION: Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.

For technical questions about this product, call the Invitrogen Tech-LineSM U.S.A. 800 955 6288

Quality Control:

The ability to digest double-stranded DNA to oligonucleotides is confirmed. DNase I and components are tested for the absence of RNase activity by incubating with 0.24-9.5 Kb RNA Ladder; gel analysis shows no degradation of the RNA ladder as compared to a no-DNase I control.

The enclosed buffers were assayed with the enzyme and met quality control specifications.

Protocols:

Preparation of RNA Sample Prior to RT-PCR:

Prepare duplicate tubes if positive and negative reverse transcriptase (RNA) samples are to be used in the amplification reaction. Add the following to an RNase-free, 0.5-ml microcentrifuge tube on ice:

- 1 µg RNA sample
- 1 µl 10X DNase I Reaction Buffer
- 1 µl DNase I, Amp Grade, 1 U/µl
- DEPC-treated water to 10 µl

NOTE: To work with larger amounts of RNA, scale up the reaction (including volume) linearly.

Incubate tube(s) for 15 min at room temperature. Inactivate the DNase I by the addition of 1 µl of 25 mM EDTA solution to the reaction mixture. Heat for 10 min at 65°C. The RNA sample is ready to use in reverse transcription, prior to amplification.

NOTE: It is important not to exceed the 15-minute incubation time or the room-temperature incubation. Higher temperatures and longer time could lead to Mg^{++} -dependent hydrolysis of the RNA. Additionally, it is vital that the EDTA be added to at least 2 mM prior to heat-inactivation to avoid this problem.

Bilaga 5



SuperScript[™] III Reverse Transcriptase

[Learn More](#)

Cat. No. 18080-093	Buy Now	Size: 2,000 units
18080-044	Buy Now	10,000 units
18080-085	Buy Now	4 × 10,000-unit kit

Conc: 200 U/μl

Store at -20°C (non-frost-free)

Description

SuperScript[™] III Reverse Transcriptase is an engineered version of M-MLV RT with reduced RNase H activity and increased thermal stability. The enzyme is purified to near homogeneity from *E. coli* containing the modified *pol* gene of Moloney Murine Leukemia Virus (1,2). The enzyme can be used to synthesize first-strand cDNA at temperatures up to 55°C, providing increased specificity, higher yields of cDNA, and more full-length product than other reverse transcriptases. It can generate cDNA from 100 bp to >12 kb.

Component	2,000 U Kit	10,000 U Kit
SuperScript [™] III RT (200 U/μl)	10 μl	50 μl
5X First-Strand Buffer*	1000 μl	1000 μl
0.1 M DTT	500 μl	500 μl

*[250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at room temperature), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂]

Unit Definition

One unit incorporates 1 nmol of dTTP into acid-precipitable material in 10 min at 37°C using poly(A)•oligo(dT)₂₅ as template-primer (3).

Storage Buffer

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glycerol

Storage

Store all components at -20°C (non-frost-free). Thaw 5X First-Strand Buffer and 0.1 M DTT at room temperature just prior to use and refreeze immediately.

Part no. 18080.pps

Rev. date: 7 Dec 2004

For technical support, email tech_support@invitrogen.com.
For country-specific contact information, visit www.invitrogen.com.

First-Strand cDNA Synthesis

The following 20- μ l reaction volume can be used for 10 pg–5 μ g of total RNA or 10 pg–500 ng of mRNA.

1. Add the following components to a nuclease-free microcentrifuge tube:
 - 1 μ l of oligo(dT)₂₀ (50 μ M); *or* 200–500 ng of oligo(dT)₁₂₋₁₈; *or* 50–250 ng of random primers; *or* 2 pmol of gene-specific primer
 - 10 pg–5 μ g total RNA *or* 10 pg–500 ng mRNA
 - 1 μ l 10 mM dNTP Mix (10 mM each dATP, dGTP, dCTP and dTTP at neutral pH)
 - Sterile, distilled water to 13 μ l
2. Heat mixture to 65°C for 5 minutes and incubate on ice for at least 1 minute
3. Collect the contents of the tube by brief centrifugation and add:
 - 4 μ l 5X First-Strand Buffer
 - 1 μ l 0.1 M DTT
 - 1 μ l RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Cat. no. 10777-019, 40 units/ μ l). Note: When using less than 50 ng of starting RNA, the addition of RNaseOUT™ is essential.
 - 1 μ l of SuperScript™ III RT (200 units/ μ l)*

*If generating cDNA longer than 5 kb at temperatures above 50°C using a gene-specific primer or oligo(dT)₂₀, the amount of SuperScript™ III RT may be raised to 400 U (2 μ l) to increase yield.
4. Mix by pipetting gently up and down. If using random primers, incubate tube at 25°C for 5 minutes.
5. Incubate at 50°C for 30–60 minutes. Increase the reaction temperature to 55°C for gene-specific primer. Reaction temperature may also be increased to 55°C for difficult templates or templates with high secondary structure.
6. Inactivate the reaction by heating at 70°C for 15 minutes.

The cDNA can now be used as a template for amplification in PCR. However, amplification of some PCR targets (those >1 kb) may require the removal of RNA complementary to the cDNA. To remove RNA complementary to the cDNA, add 1 μ l (2 units) of *E. coli* RNase H and incubate at 37°C for 20 minutes.

Bilaga 6

Protocol: Real-Time PCR and Two-Step RT-PCR Using Applied Biosystems Cyclers and Other Cyclers

This protocol is intended for use with most real-time cyclers, including Rotor-Gene cyclers and instruments from Applied Biosystems, Bio-Rad, Cepheid, Eppendorf, Roche, and Agilent. If using the **LightCycler 1.x** or **LightCycler 2.0**, follow the protocol on page 15.

Reaction volume

A reaction volume of 50 µl should be used with most real-time cyclers. However, the reaction volume should be reduced to 25 µl if using the **Applied Biosystems 7500 Fast System** or a **SmartCycler® system** or to 10 µl if using a **LightCycler 480**.

When reducing the reaction volume, remember to reduce the volume of master mix used in the reaction: the volume of 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix should always be half of the final reaction volume. In addition, be sure to keep the concentration of primers, template, and UNG the same as described in Table 1.

Important points before starting

- For the highest efficiency in real-time PCR using SYBR Green I, targets should ideally be **100–150 bp in length**.
- The PCR must start with an **initial incubation step of 15 min at 95°C** to activate HotStarTaq DNA Polymerase.
- Always start with an **initial Mg²⁺ concentration of 2.5 mM** as provided in 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix.
- Always readjust the threshold value for analysis of every run.
- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix contains dUTP, which allows the use of a uracil-N-glycosylase (UNG) pretreatment of the reaction.
- When using the **ABI PRISM® 7000**, we strongly recommend using optical adhesive covers to seal PCR plates. Do not use final reaction volumes of less than 25 µl when using this instrument.
- If using **QuantiTect Primer Assays**, please follow the protocols in the *QuantiTect Primer Assay Handbook*, which can be downloaded at www.qiagen.com/HB/PrimerAssay.
- If using the **iCycler iQ®, iQ5, or MyiQ™**, well factors must be collected at the beginning of each experiment. Well factors are used to compensate for any system or pipetting nonuniformity. For details, refer to the user manual supplied with the instrument or Appendix A (page 24).
- If using the **Applied Biosystems 7500**, it may be necessary to adjust the preset threshold value to a lower value. For details, see Appendix B (page 25).

Procedure

1. **Thaw 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (if stored at -20°C), template DNA or cDNA, primers, and RNase-free water. Mix the individual solutions.**
2. **Prepare a reaction mix according to Table 1.**

Due to the hot start, it is not necessary to keep samples on ice during reaction setup or while programming the real-time cycler.

Note: We strongly recommend starting with an initial Mg^{2+} concentration of 2.5 mM as provided by 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix. For a few targets, reactions may be improved by using Mg^{2+} concentrations of up to 5 mM.

Table 1. Reaction setup

Component	Volume/reaction	Final concentration
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*	25 μl [†]	1x
Primer A	Variable	0.3 μM [‡]
Primer B	Variable	0.3 μM [‡]
Template DNA or cDNA (added at step 4)	Variable	≤ 500 ng/reaction
RNase-free water	Variable	
Optional: Uracil-N-glycosylase	Variable	0.5 units/reaction
Total reaction volume	50 μl	

* Provides a final concentration of 2.5 mM MgCl_2 .

[†] If using a total reaction volume other than 50 μl , calculate the volume of 2x master mix required using this formula: Volume of 2x master mix (μl) = $0.5 \times [\text{Total reaction volume } (\mu\text{l})]$

[‡] A final primer concentration of 0.3 μM is usually optimal. However, for individual determination of optimal primer concentration, a primer titration from 0.2 μM to 1 μM can be performed. SmartCycler users should use a final primer concentration of 0.5 μM for each primer; if necessary, a primer titration from 0.5 μM to 1 μM can be performed to determine the optimal primer concentration.

3. **Mix the reaction mix thoroughly, and dispense appropriate volumes into PCR tubes or plates.**
4. **Add template DNA or cDNA (≤ 500 ng/reaction) to the individual PCR tubes or wells containing the reaction mix.**

For two-step RT-PCR, the volume of the cDNA added (from the undiluted RT reaction) should not exceed 10% of the final PCR volume.

5. Program your real-time cyclers according to the program outlined in Table 2.

Data acquisition should be performed during the extension step. After performing melting curve analysis (see step 7, page 14), an additional data acquisition step for further runs with the same target can be integrated (for details, see steps 8 and 9, page 14).

Table 2. Real-time cycler conditions

Step	Time	Temperature	Additional comments
Optional: UNG (carryover prevention)	2 min	50°C	UNG will eliminate any dUMP-containing PCR products resulting from carryover contamination
PCR initial activation step	15 min	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase is activated by this heating step
3 (4)-step cycling:			
Denaturation*	15 s	94°C	
Annealing	30 s	50–60°C	Approximately 5–8°C below T_m of primers
Extension	30 s	72°C	Perform fluorescence data collection, unless an additional data acquisition step has been integrated
Optional: Data acquisition	15 s	x°C	T_m dimer < x < T_m product: see steps 8 and 9 for details
Number of cycles	35–45		The number of cycles depends on the amount of template DNA

* SmartCycler users can reduce denaturation time to 1 s to take advantage of cycling capacities.

6. Place the PCR tubes or plates in the real-time cycler, and start the cycling program.

If using the Applied Biosystems 7500, we recommend adjusting the default “Manual Ct” threshold value of 0.2 to a lower value (e.g., 0.02) in order to analyze the data properly. For details, see Appendix B, page 25.

7. Perform a melting curve analysis of the PCR product(s).

We strongly recommend performing this analysis routinely to verify the specificity and identity of PCR products. Melting curve analysis is an analysis step built into the software of real-time cyclers. Please follow the instructions provided by the supplier. Generally, melting curve data between 65°C and 95°C should be acquired.

Note: The T_m of a PCR product depends on buffer composition and salt concentration. T_m values obtained when using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit may differ from those obtained using other reagents.

Depending on primer design and copy number of target, primer–dimers may occur. These can be distinguished from the specific product through their lower melting point.

8. Optional: Repeat the previous run, including an additional data acquisition step.

To suppress fluorescence readings caused by the generation of primer–dimers, an additional data acquisition step can be added to the 3-step cycling protocol (see Table 2, page 13). The temperature should be above the T_m of primer–dimers but approximately 3°C below the T_m of the specific PCR product. This method can increase the dynamic range and reliability of quantification by several orders of magnitude if primer–dimers are coamplified.

9. Optional: Check the specificity of PCR product(s) by agarose gel electrophoresis.

Bilaga 7

HE – Hematoxylin-Eosin

Lösningar och kemikalier

Mayer's hematoxylin (köps färdig)

Eosin Y 0,2 % (köps färdig, tillsätt 1 mL HAc/ca 200 mL)

Utförande

Inkubera glasen i 60 C värmeskåp, 40 minuter

Avparaffinering/Rehydrering:

Xylen I, 15 minuter

Xylen II, 15 minuter

ABS I, 5 minuter

ABS II, 5 minuter

95 % alk., 5 minuter

70 % alk., 5 minuter

Skölj i rinnande kranvatten, 5 minuter

Mayer's hematoxylin, 5 minuter

Skölj i rinnande kranvatten, 20 minuter

Eosin, 30-60 sek

Dehydrering:

95 % alk., blaska snabbt

95 % alk., blaska snabbt

ABS I, 2 minuter

ABS II, 2 minuter

ABS III, 5 minuter

Xylen I, blaska

Xylen II, blaska

Xylen III, 2+ minuter

Montering av täckglas med pertex

Resultat

Kärnor – blå

Bindväv, erythrocyter, cytoplasma – röd/rosa/orange

Bilaga 8

ABPAS – Alcian Blue - Periodic Acid Schiff

Lösningar och kemikalier

Mayers hematoxylin (köps färdig)

0,5 % Perjodsyra (blandas, färsk, 0,5g/100ml avjoniserat vatten)

Schiffs reagens (köps färdig, förvaras kyld och ljusskyddad, återanvänds)

Alcian Blue pH 2,5 (köps färdig)

Utförande

Inkubera glasen i 60 C värmeskap, 40 minuter

Rehydrering:

Xylen I, 15 minuter

Xylen II, 15 minuter

ABS I, 5 minuter

ABS II, 5 minuter

95 % alk., 5 minuter

70 % alk., 5 minuter

Avjoniserat vatten

Alcian Blue, 20 minuter

Skölj i avjoniserat vatten

0,5 % Perjodsyra, 5 minuter

Skölj noga i avjoniserat vatten

Schiffs reagens, 20 minuter

Skölj i rinnande kranvatten, 10-15 minuter

Mayers hematoxylin, 1 minut

Skölj i rinnande kranvatten, 15 minuter

Dehydrering:

95 % alk., blaska snabbt

95 % alk., blaska snabbt

ABS I, 2 minuter

ABS II, 2 minuter

ABS III, 5 minuter

Xylen I, blaska

Xylen II, blaska

Xylen III, 2+ minuter

Montering av täckglas med pertex

Resultat

Glykogen, glykoprotein, proteoglykaner – magenta

Sura muciner – ljust blå

Neutrala muciner – magenta

Blandning av neutrala och sura muciner – mörkblå/lila

Kärnor – mörkblå/violetta

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>

☒ JA, jag ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.