



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Mastocytom hos hund

Analys av serglycinuttryck och proteasaktivitet i serum

Canine mastocytoma

Analysis of the serglycin expression and protease activity in serum

Elvira Palmborg

Uppsala

2020

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Mastocytom hos hund

Analys av serglycinuttryck och proteasaktivitet i serum

Canine mastocytoma

Analysis of the serglycin expression and protease activity in serum

Elvira Palmborg

Handledare: Magnus Åbrink, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Caroline Fossum, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2020

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

Nyckelord: mastocytom, cancer, serglycin, proteaser, tryptas, kymas, kallikrein, plasmin, trombin, substrat-assay, ELISA, peptidprofilering, MALDI-TOF, qPCR, biomarkör

Key words: mastocytoma, mast cell tumour, cancer, serglycin, proteases, tryptase, chymases, kallikrein, plasmin, thrombine, substrate assay, ELISA, peptide profiling, MALDI-TOF, qPCR, biomarker

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

En av de vanligaste dödsorsakerna hos hundar i Sverige är cancer, där hudtumörer är den tredje vanligaste ställda diagnosen. En av de vanligaste hudtumörerna är mastocytom, som är en tumörtyp bestående av mastceller som ansamlas och infiltrerar organ. På hund förekommer denna oftast i kutan form men kan spridas till intilliggande lymfknotor och även metastasera till andra organ i kroppen. Histologiskt kan mastocytom graderas i 3 steg medan sjukdomen istället kan delas in i 5 stadier baserat på den kliniska bilden. För att hantera denna vanligt förekommande tumör krävs snabba och säkra detektions- och analysmetoder för diagnosställning och avgörande av prognos. Här kan forskning på biomarkörer för maligna cancerformer hjälpa.

Serglycin är en proteoglykan som uttrycks av flera olika celltyper men som framförallt kopplats till immunförsvarets celler och är där viktig för lagring, funktion och frisättning av biologiskt aktiva molekyler. Serglycin har dessutom funnits ha betydelse för tumörutveckling och metastasering, där ett högre uttryck påvisats hos många maligna cancerformer i jämförelse med normalvävnad och benigna former hos människa. Serglycin bör därför utvärderas som en potentiell biomarkör för aggressiv cancer i hund.

Förekomst och aktivitet av proteaser är något som också studerats som möjliga markörer för cancer och dess progression. Proteaser är enzymer som bland annat katalyserar nedbrytningen av proteiner till mindre beståndsdelar och är delaktiga i många fysiologiska och patologiska tillstånd. Likaså har studier på peptidprofiler vid patologiska tillstånd, inklusive cancer, utvecklats som metod för att hitta nya biomarkörer.

Då studier på biomarkörer hos hund med mastocytom är få, var målet med denna studie att skapa en bild över huruvida serglycin kan fungera som markör och om det finns andra biomarkörskandidater. Proteasaktiviteten studerades med substrat-assay, peptidprofilering genomfördes med MALDI-TOF, serglycinuttrycket undersöktes med qPCR och ELISA användes för kontroll av förekomst av serglycin, kallikrein samt CD44S. Samtliga metoder utfördes på serum från friska hundar samt individer med mastocytom. Dessutom analyserades serglycinuttrycket med qPCR på formalinfixerat och paraffinbäddat tumörmaterial från mastocytompatienter.

Resultatet visade en spridd bild. Inga signifikanta skillnader kunde detekteras efter MALDI-TOF analys eller ELISA. Proteasaktiviteten visade sig vara signifikant minskad hos mastocytomindividerna för det mastcellsspecifika proteaset tryptas, medan det för övriga testade proteaser (kallikrein, trombin, plasmin och kymas) inte gick att beräkna någon statistiskt signifikant skillnad. Serglycinuttrycket i serum hos mastocytompatienterna var både sänkt och förhöjt beroende på individen, något som skulle kunna kopplas till klassificeringsgraden då den individ med högst uttryck hade mastocytom av grad III. Dessutom sågs ett signifikant minskat uttryck hos mastocytompatienterna med grad I när de jämfördes med normalgruppen. Trots att resultaten inte alltid visat någon stark signifikans indikerar denna studie ändå på trender som skulle vara intressanta att undersöka vidare med ett utökat patientmaterial som grund.

SUMMARY

One of the most common causes of death among dogs in Sweden is cancer, where skin tumours make up a third of all diagnosed patients and where mast cell tumours, *i.e.* mastocytoma, are one of the most common skin cancers. In mastocytoma mast cells pool together and infiltrate organs. In dogs the mast cell tumour often presents as cutaneous mastocytoma but can also spread to regional lymph nodes and form metastasis in other organs. Histologically, the mast cell tumours can be graded in 3 tiers while the disease clinically can be divided into 5 stages. In order to tackle this frequently occurring disease, swift and safe methods of detection are needed to diagnosticate and determine a prognosis. The research on biomarkers for malignant cancer could facilitate this issue.

Serglycin is a proteoglycan that is expressed by a number of different cell types, but is especially related to cells of the immune system, where the proteoglycan plays an important role for function, as well as storage and release, of biologically active molecules. Serglycin has also been shown to be of importance for tumour development and the forming of metastasis, where an elevated expression of serglycin has been correlated to more aggressive forms of cancer, in comparison to healthy tissue and benign forms. Therefore, serglycin needs to be evaluated as a potential biomarker for aggressive cancer in dogs.

Protease levels and activity have been studied as possible markers for cancer and its progression in the past. Proteases are enzymes that catalyses the degradation of proteins to smaller compounds and are involved in many physiological and pathological states. In addition, peptide profiles have been studied in connection to several pathological states, including cancer, as methods for identification of new biomarkers.

In this study, protease activity has been measured with substrate assay, peptide profiles generated with MALDI-TOF, serglycin expression studied with qPCR, and ELISA has been used to evaluate levels of serglycin, kallikrein and CD44S in dogs. All methods have been executed on blood serum from healthy dogs, as well as individuals with mastocytoma. Furthermore, the serglycin expression has been analysed with qPCR on formalin fixed paraffine embedded tumour material from mast cell tumours.

The results have been inconclusive. No significant differences could be detected with MALDI-TOF analysis or ELISA. The protease activity showed a significant decrease in the serum from mastocytoma patients for the mast cell specific protease tryptase, while the other analysed proteases (kallikrein, thrombin, plasmin and chymases) showed no significant divergence. In comparison to healthy dogs, the expression of serglycin in serum from mastocytoma patients was both decreased and increased, depending on the individual. The expression of serglycin could potentially be an indication of the classification of the mast cell tumour. The individual with the highest expression had been diagnosed with a grade III mastocytoma, while the other patients had a grade I and these showed a significant decrease of expression compared to the control group. In conclusion, this study shows trends that could be of value to further evaluate, although with a larger patient material in the future.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Serglycin.....	2
Serglycin och mastceller	3
Serglycin och cancer	3
Mastocytom.....	5
Proteasaktivitet	6
Peptidprofilering.....	7
MATERIAL OCH METODER	8
Substrat-assay.....	8
MALDI-TOF-MS analys.....	8
Anrikning med magnetkolor	8
Serglycinanalys	9
RNA isolering	9
Hantering av FFPE prover.....	9
cDNA syntes	9
qPCR	9
ELISA.....	10
Statistik.....	10
RESULTAT	10
Substrat-assay.....	10
MALDI-TOF analys.....	14
qPCR	16
ELISA.....	19
DISKUSSION	21
Substrat-assay.....	21
MALDI-TOF-MS.....	21
RNA extraktion	22
qPCR analys	22
ELISA.....	23
KONKLUSION.....	24
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING.....	25

Inledning och litteraturoversikt	25
Material och metoder	25
Resultat och diskussion	25
REFERENSER.....	27
BILAGOR	1
Bilaga 1	1
Bilaga 2	3
Bilaga 3	4
Bilaga 4	8

INLEDNING

Med mer avancerad och bättre veterinärvård lever våra husdjur längre och längre. Med ökad ålder uppstår dock nya problem och sjukdomar, exempelvis cancer, som inte tidigare förekommit i samma utsträckning. Då våra husdjur lever i samma typ av miljö som vi är risken stor att även de i många avseenden exponeras för samma typer av cancerogena ämnen. Enligt Bonnett *et al.* (2005) är cancer en av de vanligaste dödsorsakerna hos hundar i Sverige. Statistik från Agria djurförsäkring (2019) har dessutom registrerat hudtumörer som den tredje vanligaste diagnosen som ställs och studier från andra länder har visat att mastocytom är en av de vanligaste neoplasier som förekommer i huden (Baioni *et al.*, 2017; Dobson *et al.*, 2002; London and Thamm, 2013). Mastocytom är en tumörtyp bestående av mastceller som ansamlas och infiltrerar organ, dock ofta huden (London and Thamm, 2013).

För att hantera den ökande förekomsten av cancer, inklusive mastocytom, krävs snabba och säkra detektions- och analysmetoder för att ställa diagnos och avgöra prognos. Därför är forskning på framtagandet av biomarkörer för maligna cancerformer högst aktuell.

Serglycin är en proteoglykan som uttrycks av flera olika celltyper men som framförallt kopplas till inflammatoriska immunceller. Där har proteoglykanen en påverkan på immunförsvarets funktion samt lagring och frisättning av biologiskt aktiva molekyler (Korpetinou *et al.*, 2014). Serglycin har även setts ha betydelse för tumörutveckling och metastasering, där ett högre uttryck påvisats hos många maligna cancerformer i jämförelse med normalvävnad och benigna former (He *et al.*, 2013; Korpetinou *et al.*, 2015, 2013; Li *et al.*, 2011). Serglycin bör därför utvärderas som en potentiell biomarkör för aggressiv cancer även hos hund.

Förekomst och aktivitet av proteaser är också något som studerats som möjliga markörer för cancer och dess progression. Proteaser är enzymer som bland annat katalyserar nedbrytningen av proteiner till mindre beståndsdelar och är delaktiga i många fysiologiska och patologiska tillstånd (López-Otín and Bond, 2008). Likaså har studier på peptidprofiler vid patologiska tillstånd, däribland cancer, utvecklats som metod för att hitta nya biomarkörer (Lu *et al.*, 2018; Widłak, 2011).

Syftet med detta examensarbete var därför att undersöka om serglycin kan fungera som biomarkör för mastocytom hos hund. I examensarbetet utvärderades även förekomst och aktivitet av flera proteaser i ett försök att hitta möjliga biomarkörer för mastocytom. Ett mål var också att skapa en viss förståelse för normalvariationen gällande proteasaktivitet, serglycinuttryck och peptidförekomst i blodet. I examensarbetet analyserades serglycinuttrycket i blod samt i arkiverat formalinfixerat och paraffinbäddat (FFPE) tumörmaterial. Aktiviteten i serum av kallelirein, trombin och plasmin samt mastcell-tryptas och kymas mättes och peptidprofilen i serum från mastocytompatienter undersöktes.

LITTERATURÖVERSIKT

Serglycin

Serglycin är en proteoglykan (Bourdon *et al.*, 1985; Kjellén *et al.*, 1989). Proteoglykaner består av ett protein till vilken kedjor av glykosaminoglykaner (GAG) binder. GAG är negativt laddade polysackarider av olika längd och uppbyggnad. De GAG-kedjor som binder till proteoglykaner är chondroitinsulfat, dermatansulfat, keratansulfat, heparin samt heparansulfat (Korpetinou *et al.*, 2014). I regel brukar proteoglykanerna delas in i tre grupper, de extra- och intracellulära samt de kopplade till cellytan. Serglycin tillhör de intracellulära (Kolset and Pejler, 2011) och består av ett 18 kDa stort protein (Korpetinou *et al.*, 2014) beklätt med GAG-kedjor av heparansulfat, heparin eller chondroitinsulfat (Scully *et al.*, 2012). Då proteoglykaner syntetiseras av alla celler i kroppen har de i många avseenden betydelse för normal fysiologisk funktion men även för en mängd patologiska tillstånd (Korpetinou *et al.*, 2014). Proteoglykanens funktion varierar beroende på typ av cell som uttrycker den samt utbredningen av GAG-kedjans sulfatering. GAG-kedjans sulfateringsgrad påverkar hur mycket negativ laddning som proteoglykanen bär med sig. Den negativt laddade GAG-kedjan kan binda in positivt laddade proteiner och proteoglykanen kan då bilda ett multiproteinkomplex, där inbundna proteiner står för den biologiska aktiviteten. Typen av GAG-kedja varierar också med avseende på celltyp (Kolset and Pejler, 2011). Hematopoetiska celler, såsom neutrofiler, lymfocyter, mastceller, monocyter, makrofager och blodplättar uttrycker serglycin i stor utsträckning (Scully *et al.*, 2012) men uttrycker även hos många andra celltyper, till exempel endotelceller, chondrocyter och glatta muskelceller. Likväl hos ett antal förändrade eller sjukliga celler såsom olika cancerformer (Korpetinou *et al.*, 2014). Serglycin tycks även vara den enda proteoglykan som uttrycks av blodplättar och hos möss som saknar serglycin har en påverkad hemostas observerats (Scully *et al.*, 2012).

Serglycin har studerats i stor utsträckning hos flertalet immunförsvarsceller, där dess uttryck har setts vara av särskild betydelse. I flera av dess celltyper – mastceller, cytotoxiska T-lymfocyter, neutrofiler och monocyter/makrofager – har serglycin en viktig roll i lagring och frisättning av biologiskt aktiva molekyler, som proteaser och cytokiner (Scully *et al.*, 2012). Syntes och sekretion av serglycin i inflammatoriska celler kan påverkas av olika former av inflammatoriskt stimuli, till exempel lipopolysackarider från bakterier (Korpetinou *et al.*, 2014). Hos möss som saknade serglycin sågs en fördröjd nedreglering av CD8+ celler vid virusinfektion (Grujic *et al.*, 2008). Även en ökad bakteriell virulens har setts hos möss som saknar serglycin och injicerats med *Klebsiella pneumonia* (Niemann *et al.*, 2007). Trots detta verkar serglycin inte vara helt nödvändigt för att bekämpa infektion (Scully *et al.*, 2012). En studie på serglycin-defekta cytotoxiska T-cellers förmåga att inducera apoptos hos målceller kunde inte heller påvisa någon signifikant skillnad i jämförelse med de serglycin-kompetenta cytotoxiska T-cellerna (Grujic *et al.*, 2005). Frisatt serglycin har visats interagera med CD44, vilket tyder på att det kan ha betydelse för interaktionerna mellan celler vid immunreaktioner (Kolset and Tveit, 2008). Komplexet serglycin/CD44 påverkar även aggressiviteten hos cancer då migration och invasionsförmågan hos cancerceller visades vara beroende av CD44 (Guo *et al.*, 2017).

Serglycin har också kopplats till komplementsystemet. Komplementsystemet är en del av det medfödda immunförsvaret och har betydelse för bekämpningen av patogener och undanrensning av förändrade eller skadade celler och immunkomplex. I en studie av Skliris *et al.* (2011) där serglycin studerades i cancerformen multipelt myelom sågs serglycin inhibera komplementsystemets klassiska och lektinväg och därmed stoppa aktiveringen. Liknande fynd gjordes även i en studie av bröstcancer av Korpetinou *et al.* (2013). Båda studierna spekulerar huruvida serglycins inverkan på komplementsystemet kan vara ett sätt att skydda cancercellerna från angrepp från kroppens egna immunförsvaret. I vissa former av immunoterapi mot cancer aktiveras komplementsystemet, något som canceren då kan motverka med hjälp av serglycins inhibering av systemet. Genom att även inkludera ämnen som inhiberar serglycin skulle terapivikt kunna motverkas.

Serglycin och mastceller

En av de inflammatoriska cellerna som serglycin förefaller ha störst koppling till är mastceller, det är även hos dessa celler som funktionen av serglycin studerats i störst detalj (Kolset and Pejler, 2011).

Hos mastceller är serglycin nödvändigt för utmognaden av granula. I en studie av Åbrink *et al.* (2004) upptäcktes att mastceller hos möss, där serglycinuttrycket inaktiverats via knockout (så kallade "knockout möss"), saknade de tydligt infärgade granula som återfanns hos normala mastceller. Istället var mastcellernas förstorade vesiklar helt tomma på material. I en jämförelse av mastceller från normala och serglycin-negativa möss uppvisade mastcellerna tomma vesiklar i ett tidigt skede av mognadsprocessen oavsett genotyp, medan mastcellernas granula hos de normala mössen senare under utmognaden fylldes med material. Med andra ord sker en störning av själva mognaden av mastcellsgranula om serglycin saknas.

Mastceller syntetiserar och lagrar proteaser av olika former i sina granula. I serglycin-negativa möss sågs, förutom tomma granula, en kraftig minskning i aktiviteten hos dessa enzymer. Störningen i mognadsprocessen ger alltså upphov till en nedsatt förmåga att lagra dessa proteaser och därmed en minskad aktivitet (Åbrink *et al.*, 2004).

Serglycin har även visats ha betydelse för apoptos hos mastceller. Apoptos kan triggas när lysosomers membran skadas så att bland annat proteaser frisätts till cytosolen, vilket kan leda till proteolytisk aktivering av diverse pro-apoptotiska ämnen tillsammans med degraderingen av anti-apoptotiska ämnen. En studie av Melo *et al.* (2011) visade att serglycin-defekta mastceller hade en betydligt lägre känslighet för lysosomatisk skada och därmed apoptos. Medan normala mastcellers granula tömdes på innehåll vid tillsats av ett lysotropt ämne förblev de serglycin-negativa cellernas granula intakt.

Serglycin och cancer

Serglycin har i flera studier visats medverka vid tumörutveckling och metastasering och verkar uttryckas i ökade nivåer hos ett flertal aggressiva cancerformer (He *et al.*, 2013; Korpetinou *et al.*, 2015, 2013; Li *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2016). Dessa egenskaper gör serglycin till en potentiell biomarkör för cancer.

I en studie av ett antal olika humana cellinjer sågs ett ökat serglycinuttryck hos de mer aggressiva formerna av lungcancer, prostatacancer samt coloncancer i jämförelse med de mer benigna varianterna (Korpetinou *et al.*, 2015). En studie av serglycinuttryck vid bröstcancer visade även den på ett ökat uttryck hos de mindre differentierade, kraftigt invasiva cellerna i jämförelse med de mer godartade. Studien visade även tecken på serglycins involvering i cellproliferation då ett ökat uttryck av intakt serglycin gav ett större antal kolonier vid en längre tids odling av primära tumörceller. Överuttryck av serglycin inducerade dessutom cellmigration (Korpetinou *et al.*, 2013). Nasopharyngealt carcinom är ytterligare en cancerform vars cellinjer har studerats och en koppling mellan högt uttryck av serglycin och cellinjer med god metastaserande förmåga har påvisats. Studien undersökte även serglycinuttryck i levermetastaser jämfört med primärtumören och fann då en uppreglering i levermetastaserna. Genom att inaktivera serglycinuttrycket i de nasopharyngeala carcinomcellerna kunde forskarna bromsa migrations- och invasionsförmågan hos tumörcellerna. Samma studie tittade även på inaktivering av serglycin *in vivo*, vilket sågs ge upphov till en signifikant minskad metastaseringstakt (Li *et al.*, 2011). Studier har även visat att serglycin uttrycks i signifikant högre utsträckning vid hepatocellulärt carcinom (HCC) jämfört med närliggande normal levervävnad. Korrelationsanalys indikerade också en koppling mellan serglycinuttryck hos HCC patienter och vaskulär invasion, längre gången cancer och tidigt återfall (He *et al.*, 2013).

I en studie av Roy *et al.* (2016) med ”knockout-möss” visades att serglycin var absolut nödvändig för metastasering till lunga i en bröstcancer-musmodell som bildar spontana juvertumörer. Inte en enda makroskopisk eller mikroskopisk metastas återfanns i lungan hos de serglycin-negativa mössen, medan de serglycin-positiva hade ett flertal vid ”endpoint”. Ingen skillnad kunde ses bland primärtumörerna, varken gällande storlek eller vaskulariseringsgrad.

Epitelial-mesenchymal transition (EMT) innebär den förändring som epitelialceller genomgår vid omvandling till mesenchymala celler. EMT involverar förlust av cellpolaritet, cell till celladhesion och cell till matrixadhesion, samt förvärvande av migratoriska och invasiva egenskaper. EMT är fundamentalt för embryoutvecklingen men spelar även en viktig roll för cancers metastaserande egenskaper (He *et al.*, 2013). Hos tumörceller involverar det nedregleringen av epiteliala gener som E-cadherin. I studien av Roy *et al.* (2016) sågs att serglycin-negativ primär tumörvävnad hade signifikant högre nivåer av E-cadherin jämfört med serglycin-positiv vävnad, något som indikerade en mindre invasiv fenotyp hos de serglycin-negativa cellerna. Detta sågs även i en studie av hepatocellulärt carcinom där ökade nivåer av serglycin följde minskade nivåer av E-cadherin (He *et al.*, 2013).

Vid en studie av multipelt myelom i en musmodell som injicerades med serglycin-inaktiverade celler jämfört med möss som injicerades med kontrollceller, observerades att de som fick kontrollcellerna utvecklade större tumörer medan de som fick serglycin-inaktiverade celler utvecklade mindre eller inga tumörer alls (Purushothaman and Toole, 2014). I kontrast till detta visade en studie av Hamilton *et al.* (2015) att frånvaron av serglycin i en musmodell, som utvecklar spontana betacellstumörer i pankreas och är immunokompetenta, bidrog till större tumörer på grund av en högre proliferation samt en mer välutvecklad kärlförsörjning. De såg därmed tecken på att serglycin kan motverka tumörexansionen och är viktig för kärlstrukturen.

Studier på hund och serglycinuttryck är än så länge få, då majoriteten fokuserar på människa eller möss. I en studie av Jönsson (2019) undersöktes uttrycket av serglycin i formalinfixerat paraffinbäddat (FFPE) material från tumörer på hund och där sågs en signifikant ökning av serglycinuttrycket i de tumörprover som bedömts som maligna jämfört med benigna.

Mastocytom

En av de vanligaste dödsorsakerna hos hundar i Sverige är cancer (Bonnett *et al.*, 2005) och enligt statistik från Agria djurförsäkring (2019) är hudtumörer den tredje vanligaste diagnosen som ställs på hund. Denna statistik stöts av en studie av försäkringsstatistik från Storbritannien som fann att hud och mjukvävnad var den vanligaste lokaliseringen för neoplasi hos hund (Dobson *et al.*, 2002). Den konstaterade även att mastocytom var en av de vanligare hudtumörerna. En studie från Italien visade att huden var det näst vanligaste organet för lokalisering av neoplasi (Baioni *et al.*, 2017), och att mastocytom var en av de vanligaste diagnoserna även här. Enligt London and Thamm (2013) utgör de kutana mastocytomen mellan 16 och 21 % av alla hudtumörer.

Mastocytom är främst en sjukdom hos äldre hundar och då den verkar dyka upp oftare hos vissa raser, till exempel labrador och golden retrievers, schnauzer och bulldogsraser (boxer, mops, boston terrier), misstänks en genetisk koppling. För det mesta uppträder mastocytom som enstaka noduli i hud eller underhud. En visceral form, så kallad systemisk mastocytos, förekommer också men föregås i de flesta fall av en malign primärtumör i huden. Vid systemisk mastocytos är det vanligt att se spridning till lymfknutor, lever, mjälte och benmärg (London and Thamm, 2013).

Utseendet på de kutana mastocytomen varierar, i regel beroende på dess malignitet. De kan uppträda som små solitära långsamväxande noduli till stora, snabbväxande, ulcererade lesioner. Beroende på lokalisering och malignitet förekommer olika typer av symptom. De benigna formerna har en god prognos medan de mer aggressiva formerna i regel innebär en sämre prognos med kort överlevnadstid (London and Thamm, 2013)

Hos hund ställs diagnos med hjälp av finnålsaspirat och histologisk granskning av den påvisade förändringen medan det hos människa, som i större utsträckning drabbas av systemisk mastocytos, har ställts upp ett antal kriterier som bör täckas upp för att diagnos ska kunna ställas. Ett av kriterierna är ökade nivåer av tryptas, ett mastocellsproteas, i serum (Willmann *et al.*, 2019). Detta går att mäta med kommersiellt tillgängliga ELISA-kit (Gotlib *et al.*, 2018). Tryptasvärdet går även att använda för uppföljning av cancerprogressionen och behandlingseffekt. Detta mätvärde är ej utvärderat på hund idag men skulle kunna vara av värde för uppföljning i framtiden (Willmann *et al.*, 2019).

Baserat på den histopatologiska undersökningen av förändringen kan mastocytomet delas in i ett 3-gradigt system (så kallat "Patnaik system"), där grad I innebär en väldifferentierad morfologi återfunnen i dermis och grad III en odifferentierad bild som trängt sig djupare ner i subkutana vävnader (Patnaik *et al.*, 1984). Även ett 2-stegs system har senare beskrivits ("Kiupel

systemet”) där mastocytomen histologiskt delas in i hög- eller lågradiga tumörer, med uppställda kriterier gällande antal mitoser, multipla nucleus och andra morfologiska förändringar för de 2 graderna (Kiupel *et al.*, 2011).

Mastocytom kan även delas in i 5 olika stadier (0-IV) utifrån den kliniska bilden där 0 innebär en solitär tumör utan involvering av närliggande lymfknutor och IV en tumör med metastasering, inklusive involvering av blod eller benmärg (London and Thamm, 2013).

Proteasaktivitet

Proteaser är enzymer som katalyserar nedbrytningen av proteiner till mindre peptider/aminosyror genom hydrolys av peptidbindningar. Baserat på mekanismen i den katalytiska fickan som används för klyvning av proteiner kan proteaserna delas in i sex klasser – asparagin, glutamin och metalloproteaser, cystein, serin och treonin proteaser (López-Otín and Bond, 2008). Dessa enzymer är delaktiga och ansvariga för en mängd olika reaktioner i levande organismer. Proteaser reglerar genom sin katalys aktiviteten hos många proteiner, bildar nya bioaktiva molekyler, påverkar interaktioner mellan proteiner, genererar signalmolekyler etc. Genom sin aktivitet influerar proteaserna bland annat cellproliferation och differentiering, vävnadsomlagring, angiogenes, sårhäkning, ovulation, inflammation, apoptos och blodkoagulering. Eftersom proteaserna är viktiga för så många olika typer av reaktioner vid både normala fysiologiska och patologiska tillstånd har de blivit intressanta både som potentiella biomarkörer och som målmolekyler för läkemedel vid olika sjukdomstillstånd (López-Otín and Bond, 2008).

Proteaser har även studerats som möjliga biomarkörer för olika former av cancer. Till exempel ”urokinase plasminogen activator”, vilken konverterar plasminogen till plasmin, samt matrix metalloproteinaser och cathepsiner har setts spela stor roll för invasion och metastasutveckling. Bland annat uttrycks dessa proteaser i större utsträckning i maligna tumörtyper jämfört med benigna eller normalvävnad i till exempel lung- och bröstcancer samt pankreascancer hos människor. Ökande nivåer korrelerades även till kortare överlevnadstid (Pulz and Strefezzi, 2017). Resultaten kring dessa proteasfamiljer är dock omdiskuterat, då en del studier inte kunnat upprepa försöken. På hund finns få studier inom området men de som existerar verkar peka på en liknande trend där ökade nivåer kopplas till mer maligna fenotyper (Pulz and Strefezzi, 2017).

”Kallikrein-related peptidases” är en familj av serinproteaser med ca 15 medlemmar. Kallikreiner är involverade i en mängd olika normala fysiologiska processer samt vid patologiska tillstånd, däribland cancerutveckling. Flera av kallikreinerna har föreslagits som markörer för cancerprogression. De gynnar cancercellmigration och invasion genom inverkan på det extracellulära matrixet och har en påverkan på cellproliferationen i många cancerformer. Typen av kallikrein varierar mellan olika cancerformer och huruvida de uppregleras eller nedregleras beror också på typ. Generellt har dock kallikreinuttryck i olika former kopplats till en sämre prognos (Kryza *et al.*, 2016).

Mastceller lagrar många typer av bioaktiva molekyler i sina sekretoriska granula, däribland cytokiner, histamin och proteaser. Förutom ett antal ospecifika proteaser uttrycker mastcellerna några som är direkt specifika för celltypen. Dessa är kymas, tryptas och carboxypeptidas A. Kymas och tryptas verkar bägge ha betydelse för immunförsvaret, bland annat i svaret mot vissa

parasit- och bakterieangrepp (Pejler *et al.*, 2010). Både kymas och tryptas har även kopplats till tumörangiogenes, en viktig del i cancerprogression, varför både kymas och tryptas kan vara intressanta kandidater som biomarkörer och som målmolekyler för läkemedel (de Souza Junior *et al.*, 2015).

Peptidprofilering

Flera studier har försökt att kartlägga proteinspektrumet vid olika typer av cancer för att på så sätt hitta nya biomarkörer (He, 2014; Kycko and Reichert, 2014; Lu *et al.*, 2018; Widłak, 2011). En metod för att genomföra detta är användandet av matrix-assisted laser desorption/ionization spectrometry time-of-flight (MALDI-TOF). Med hjälp av denna metod går det att analysera blodprover, där proteomet med lägre molekylvikt verkar vara en lovande källa till nya biomarkörer. Genom denna metod kan flera peptider analyseras samtidigt och skillnader mellan patientgrupper kan jämföras (Widłak, 2011).

I en studie på peptidprofilering med hjälp av MALDI-TOF på serum från patienter med huvud och hals-, lung- och colorektalcancer sågs en signifikant skillnad för två molekylvikter mellan alla dessa typer av cancer, jämfört med serum från friska patienter. Fortsatt analys av dessa två komponenter skulle potentiellt kunna ge två nya typer av biomarkörer för cancer (Widłak, 2011).

En annan studie på papillär sköldkörtelcancer med MALDI-TOF kunde identifiera 6 olika peptidtoppar som visade på skillnader mellan de två grupperna av patienter. Genom att använda sig av flera markörer samtidigt skulle differentieringen mellan friska och sjuka kunna bli säkrare hävdar Lu *et al.* (2018). Här kunde de skilja de maligna formerna mot de benigna och de friska patienterna. De använde sig av en form av rening med hjälp av svagt an-ioniska magnetiska metallkuler innan MALDI-TOF-analysen för att fokusera på identifiering av peptider med lägre molekylvikter (Lu *et al.*, 2018).

En ytterligare studie använde sig av MALDI-TOF för identifiering av potentiella biomarkörer för benmetastasering vid hepatocellulärt carcinom i serum. 10 peptider skiljde gruppen med benmetastasering från övriga. Av dessa 10 kunde 7 identifieras med hjälp av peptidsekvensering och 1 av peptiderna visade sig härstamma från serglycin. Förekomst av dessa 7 peptider i serum skulle kunna vara ett tidigt sätt att identifiera patienter med metastasering till ben som annars kan vara svårt att upptäcka kliniskt (He, 2014).

Masspektrometri har även använts för att studera mastocytom hos hund, där en studie fann 13 polypeptider som differentierade mellan mer aggressiva former av mastocytom jämfört med benigna former. 4 av dessa proteiner identifierades med koppling till skydd mot stress för tumörceller, 5 associerades med cellmotilitet och metastasering, medan resten hade blandade funktioner (Kycko and Reichert, 2014).

MATERIAL OCH METODER

Materialet i studien bestod av blodprover insamlade från patienter med mastocytom samt friska hundar vid Universitetsdjursjukhuset i Uppsala, och av tumörprover med en histopatologisk diagnos från avdelningen för patologi (BVF) vid Sveriges lantbruksuniversitet. Tumörproverna var i form av formalinfixerade och paraffinbäddade preparat (FFPE). Material från patienter vid Universitetsdjursjukhuset är insamlat med ett etiskt tillstånd (C12/15) från Uppsala djurförsöksetiska nämnd gällande provtagning av friska och sjuka hundar och katter inom ramen för Biobanken samt med djurägarnas signerade tillåtelse om användning av materialet för forskning.

Substrat-assay

För att analysera proteasaktiviteten i serum användes 5 olika chromogena substrat, S-2302 (för kallikrein), S-2403 (plasmin), S-2238 (trombin), S-2288 (tryptas) samt L-1595 (kymas).

Microtiter-plattor med 8 x 12 brunnar användes och laddades med 1 µl serum, 10 µl substrat och 99 µl milli-q vatten eller PBS som spädningvätska. Detta gjordes för 5 mastocytomprover samt 5 normalprover, vars serum tinades. Varje prov analyserades i duplikat för ökad säkerhet. Plattorna lästes av med hjälp av Multiscan EX vid 405 nm för mätning av substratets absorbans. Detta gjordes vid 0, 10, 20, 30, 60, 120 och 240 minuter efter att substratet tillsatts.

MALDI-TOF-MS analys

Innan analys med MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry) spädades serumprover 40 gånger med avjoniserat (Milli-Q) vatten, eller genomgick en magnetkuleanrikning (se nedan).

1 µl prov placerades på metallplattan för analys och 1 µl Bruker HCCA matrix (alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid) tillsattes och fick lufttorka innan analys av peptidspektrumet med MALDI-TOF-MS. Peptidspektrumet analyserades mellan 0 och 20 kDa i molekylmassa. Varje punkt på plattan besköts med laser i 3 omgångar med 40 skjutningar per omgång.

Anrikning med magnetkolor

Innan analys med MALDI-TOF-MS anrikades serumproverna med Invitrogens Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid (catalog number 65012) med ett ”Two-step coating procedure without NHS” enligt protokoll från tillverkaren, för anrikning av peptiderna med lägre molekylvikt. Som sista steg lades en elueringsprocess med 0,1 M citrat till, för att kunna använda lösningen i MALDI-TOF-MS apparaten utan risk för skada på grund av magnetkulorna.

Serumproverna anrikades vid två olika tillfällen, första gången användes 1 µl serum, nästa gång 50 µl serum och en mängd av 100 µl dynabeads användes vid bägge tillfällen.

Serglycinanalys

RNA isolering

För att isolera RNA användes ett modifierat protokoll från Invitrogen med TRIzol™ Reagent, se bilaga 1. Detta protokoll användes på helblod. Först tillsattes TRIzol för lysning av provet, följt av kloroform för separation av DNA och RNA från protein. Efter centrifugering insamlades den övre transparenta fasen av provet där extra vikt lades vid att inte nudda interfasen för att minska kontamination av störande ämnen. För att fälla RNA:t användes isopropanol. 75 % etanol användes för tvätt av RNA pelleten som därefter spädades med RNase-fritt vatten innan förvaring i -80° C tills vidare hantering.

För ytterligare rening av RNA i blodproverna utfördes även isoleringen med hjälp av Nucleospin RNA clean-up XS (ref 740903.50) enligt Macherey-Nagels protokoll för att minimera kontamineringen från exempelvis fenoler. Initial hantering med TRIzol och kloroform enligt ovan. Därefter tillsattes buffer RCU till provet för att inaktivera RNAsen och möjliggöra bindning till kolonnens membran. Detta följdes av två tvättsteg med buffer RA3 för avlägsnande av kontaminanter, varpå RNA eluerades med 30 µl RNase-fritt vatten och därefter förvarades i -80° C.

För bestämning av RNA koncentration i proverna analyserades de spektrofotometriskt med NanoDrop (se bilaga 2).

Hantering av FFPE prover

Innan FFPE proverna kunde genomgå RNA isolering avlägsnades fixeringen enligt protokoll från (Ma, 2012). Paraffinblocken snittades i storleken 20 µm x2 för varje block. Paraffinet smältes i 50° C och tvättades med 100 % xylene (2 ggr) följt av en tvätt i 100 % etanol. Proteinase K 500 µg/ml användes för nedbrytning av protein och vävnad, vilket tillsattes proverna för inkubation vid 55° C i 3 h. Därefter kunde RNA isoleras enligt TRIzol metoden ovan.

cDNA syntes

För syntes av cDNA från det framrenade totalRNA:t användes DNase I och ett Superscript III kit från Invitrogen enligt en modifiering av tillhörande protokoll, se bilaga 3. Som primers för syntesen användes både "random hexamer primers" och oligo dT (för att täcka så stor del av RNA:t som möjligt och generera många olika längder på cDNA), tillsammans med specifika "reverse primers" för serglycin samt de valda referensgenerna HPRT och EEF2.

Protokollet för syntesen skalades upp efter rening av RNA med Nucleospin för att tillgodogöra den lägre RNA koncentration som uppstod. Mängden RNA ändrades även i en del av proverna från 1,2 µg till 0,6, 0,3 samt 0,15 µg, det vill säga i steg om "2", för att kunna använda samma protokoll för samtliga prov.

qPCR

Uttrycket av serglycin mättes med qPCR analys, se bilaga 4 för protokoll. Som nämnt ovan användes referensgenerna HPRT och EEF2 och för varje gen (inklusive serglycin) förbereddes

en mix som inkluderade ”forward” och ”reverse primers”. cDNA:t späddes 1:5 med RNase-fritt vatten 1:5. Som negativ kontroll förbereddes även proverna utan ”superscript III reverse transcriptase”, detta för varje gen. Om korrekt utfört ska dessa inte ge någon mätbar signal vid qPCR analysen då inget DNA ska finnas med i provet efter DNAase I behandlingen. En ytterligare negativ kontroll endast bestående av varje gens mix lades till, detta för att kontrollera att de olika blandningarna inte på något sätt blivit kontaminerade längs vägen. Alla prover analyserades i duplikat för alla gener.

ELISA

Färdiga ”enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) kit för hund från MyBioSource användes för detektion av serglycin (catalog number MBS067302), kallikrein 7 (KLK7) (catalog number MBS031217), prekallikrein (catalog number MBS2606726) samt sCD44 (catalog number MBS012093). Protokoll från tillverkaren efterföljdes där serglycin, KLK7 och sCD44 hade ett identiskt tillvägagångssätt medan prekallikrein hade ett eget. I en så kallad ”sandwich ELISA”, som de olika kätten var baserade på, binder antigen in till de specifika antikropparna i plattan följt av tillsättning av enzymmärkta antikroppar vilka även de binder till antigenet. Ett substrat tillsätts i senare steg för att ge en detekterbar signal. Absorbansen avlästes sedan med hjälp av Multiscan EX vid 450 nm. Proverna för test av kätten sattes i en spädningsserie om 5 steg, medan proverna som analyserades i fungerande kit späddes i 2 steg.

Statistik

För analys av resultaten genererade i substrat-assay:n användes Mann-Whitney U-test, för bedömning av eventuella signifikanta skillnader mellan grupper, i programmet GraphPadPrism.

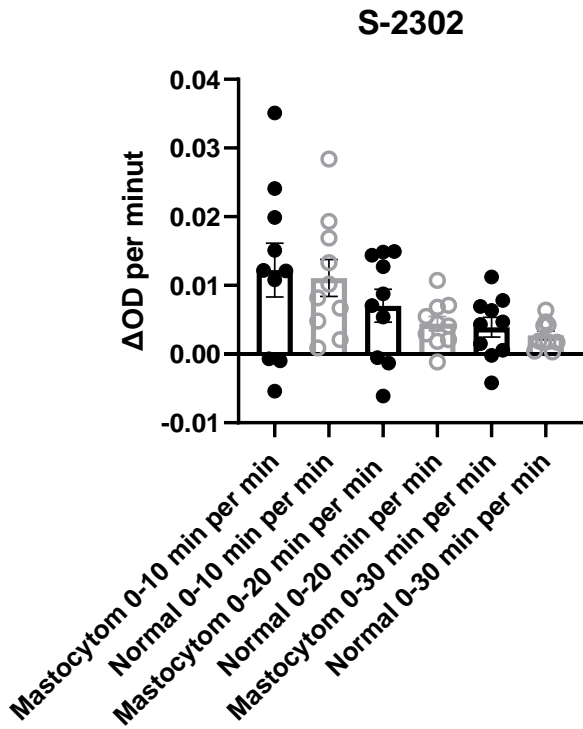
Resultaten av MALDI-TOF analysen analyserades dels i programmet FlexControl kopplat till MALDI-TOF:en samt dels i GraphPadPrism där Mann-Whitney U-test återigen användes för bedömning av skillnader mellan peptidutslagen i de olika grupperna.

För jämförelse av serglycinuttrycket mellan mastocytompatienter och friska individer användes Livak och Hellemans metod (Hellemans *et al.*, 2007) för beräkning av fold change, för att på så sätt kunna avgöra om uttrycket ökar, minskar eller förblir detsamma hos de sjuka djuren.

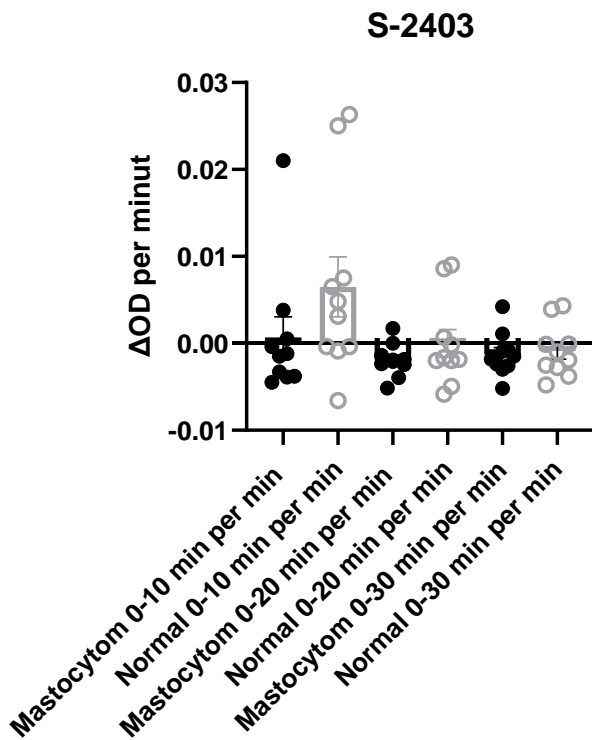
RESULTAT

Substrat-assay

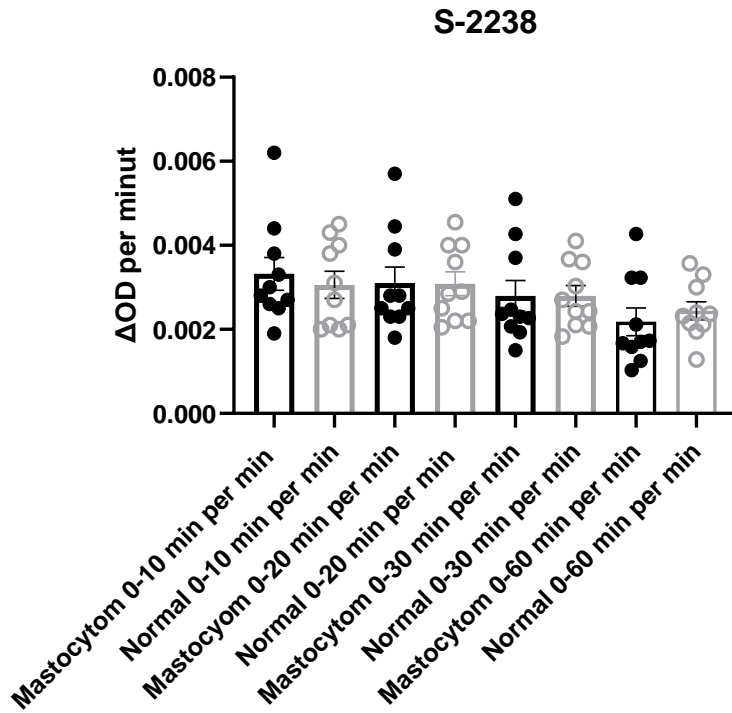
Samtliga substrat-assay genererade absorbansvärden. Baserat på dessa beräknades skillnaden (delta) i absorbans (delta OD, optical density) per minut för varje tidsintervall som absorbansen mättes under. Följande diagram (figur 1–5) redovisar skillnaden mellan mastocytomgruppen och normalgruppen för varje analyserat substrat, och i tabell 1 redovisas medelvärde och SEM för ΔOD för varje analyserat tidsintervall.



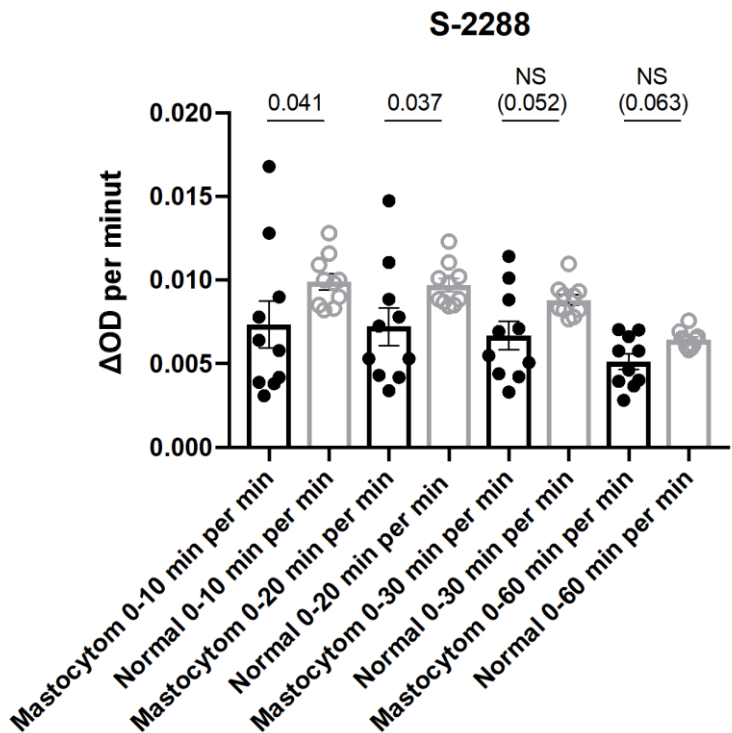
Figur 1. Resultat av jämförelse mellan mastocytom och normalgrupp för substrat-assay med chromogent substrat 2302 (kallikrein).



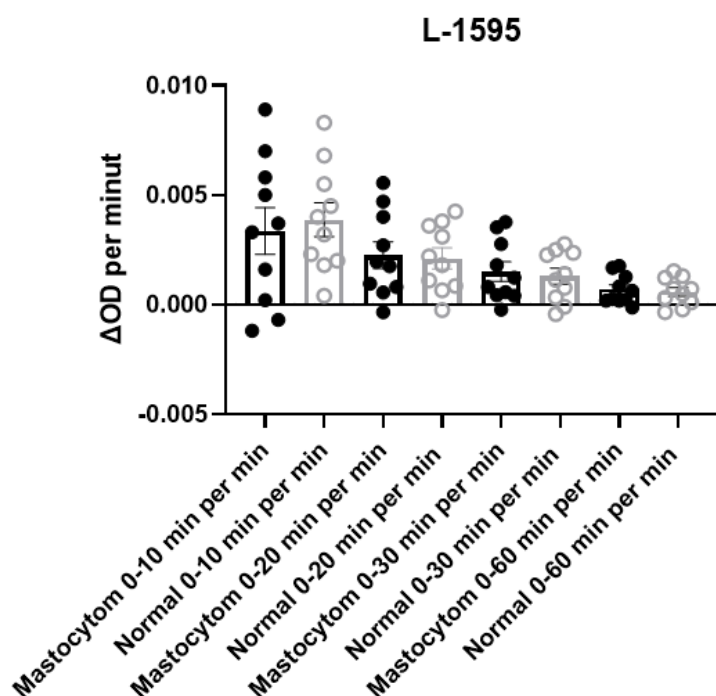
Figur 2. Resultat av jämförelse mellan mastocytom och normalgrupp för substrat-assay med chromogent substrat 2403 (plasmin).



Figur 3. Resultat av jämförelse mellan mastocytom och normalgrupp för substrat-assay med chromogent substrat 2238 (trombin).



Figur 4. Resultat av jämförelse mellan mastocytom och normalgrupp för substrat-assay med chromogent substrat 2288 (tryptas). P-värde markerat överst i figuren.



Figur 5. Resultat av jämförelse mellan mastocytom och normalgrupp för substrat-assay med chromogent substrat L-1595 (kymas).

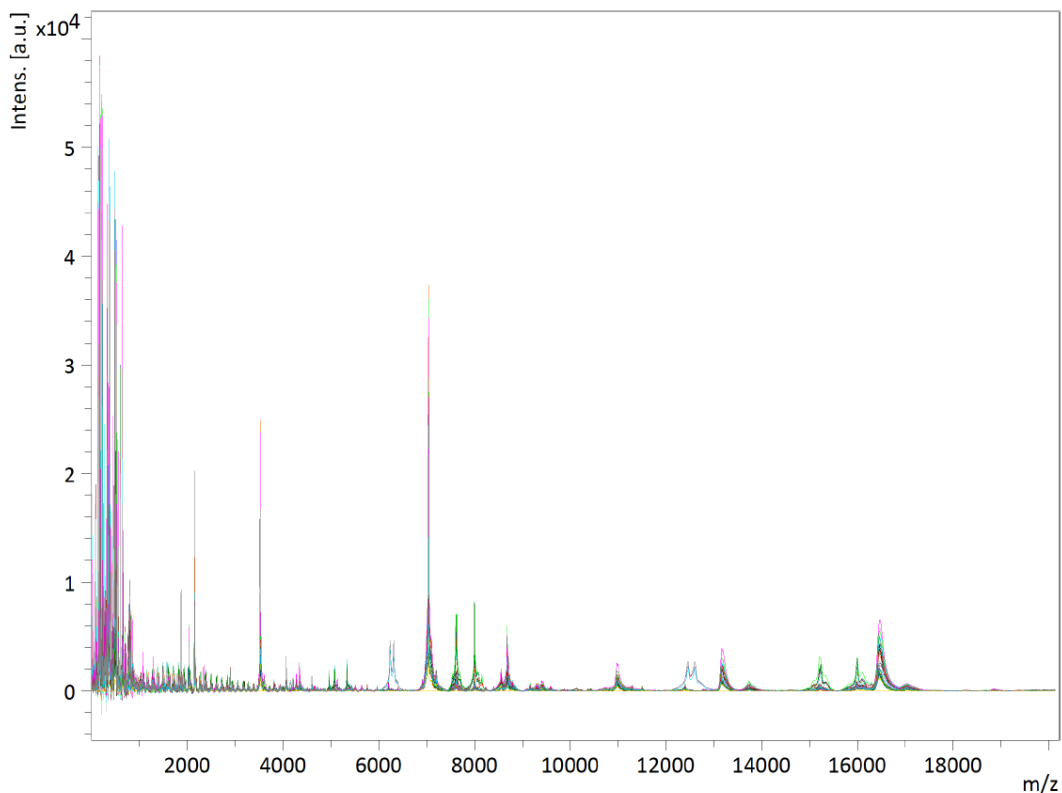
Tabell 1. Resultat av substrat-assay för samtliga chromogena substrat angivet i **medelvärde** av $\Delta OD \pm SEM$ beräknat för angivna tidsintervall

Substrat		ΔOD 0-10 min/min	ΔOD 10-20 min/min	ΔOD 20-30 min/min	ΔOD 30-60 min/min
S-2302	Mastocytom	0,0122 $\pm 0,0039$	0,0018 $\pm 0,0018$	-0,0023 $\pm 0,0022$	
	Normal	0,0111 $\pm 0,0027$	-0,0022 $\pm 0,0010$	-0,0003 $\pm 0,0007$	
S-2403	Mastocytom	0,0007 $\pm 0,0024$	-0,0046 $\pm 0,0017$	0,0001 $\pm 0,0015$	
	Normal	0,0065 $\pm 0,0035$	-0,0065 $\pm 0,0014$	-0,0026 $\pm 0,0007$	
S-2238	Mastocytom	0,0033 $\pm 0,0004$	0,0029 $\pm 0,0004$	0,0022 $\pm 0,0004$	0,0016 $\pm 0,0003$
	Normal	0,0031 $\pm 0,0003$	0,0031 $\pm 0,0003$	0,0022 $\pm 0,0002$	0,0021 $\pm 0,0002$
S-2288	Mastocytom	0,0074 $\pm 0,0014$	0,0071 $\pm 0,0009$	0,0056 $\pm 0,0006$	0,0036 $\pm 0,0003$
	Normal	0,0099 $\pm 0,0005$	0,0095 $\pm 0,0005$	0,0071 $\pm 0,0003$	0,0041 $\pm 0,0001$
L-1595	Mastocytom	0,0034 $\pm 0,0012$	0,0012 $\pm 0,0003$	0,000 $\pm 0,0002$	-0,0001 $\pm 0,0001$
	Normal	0,0039 $\pm 0,0008$	0,0003 $\pm 0,0003$	-0,0003 $\pm 0,0003$	-0,0001 $\pm 0,0001$

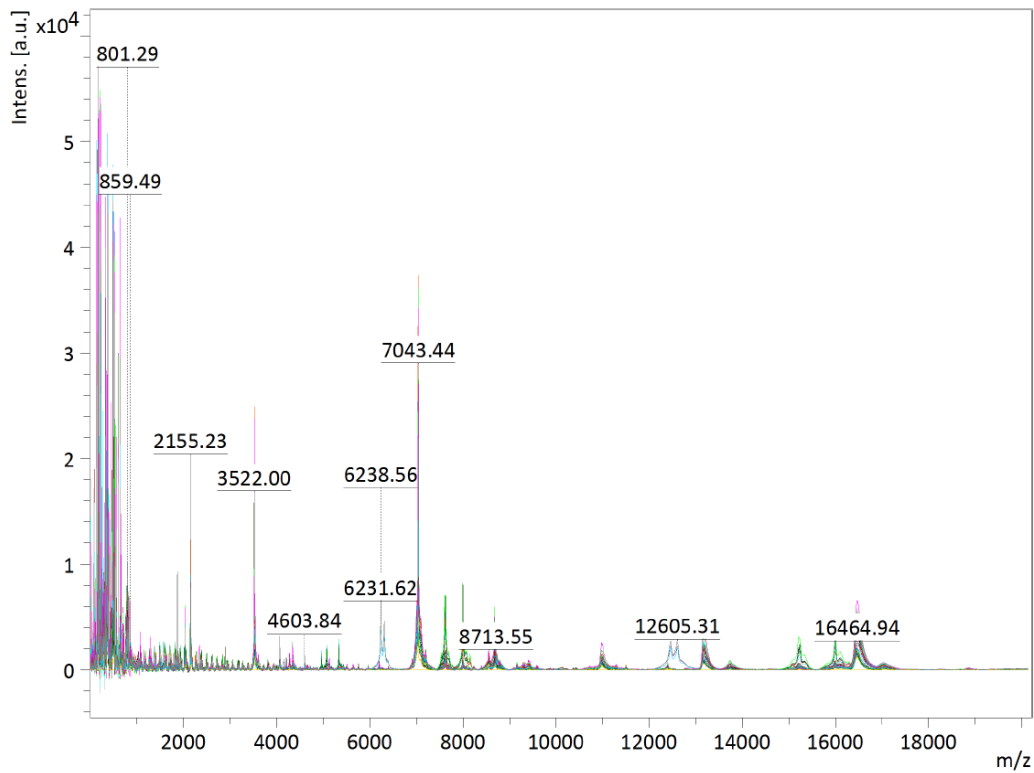
För kallikrein (S-2302) tycks det finnas en tendens till ökning av substrataktiviteten hos mastocytompatienterna jämfört med de normala. Genom beräkning med Mann-Whitney U-test konstaterades att denna dock ej är signifikant. För övriga substrat kan inte samma tendens ses, utan vid tillfällena istället en minskning hos hundarna med mastocytom. Denna är dock inte heller signifikant, med undantag för S-2288 (tryptas) där en signifikant skillnad kan ses vid mätning efter 10 (p=0,041) och 20 min (p=0,037), samt intervallen 10-20 och 20-30 min. Denna skillnad innebär en lägre nivå hos mastocytomhundarna jämfört med de normala proven.

MALDI-TOF analys

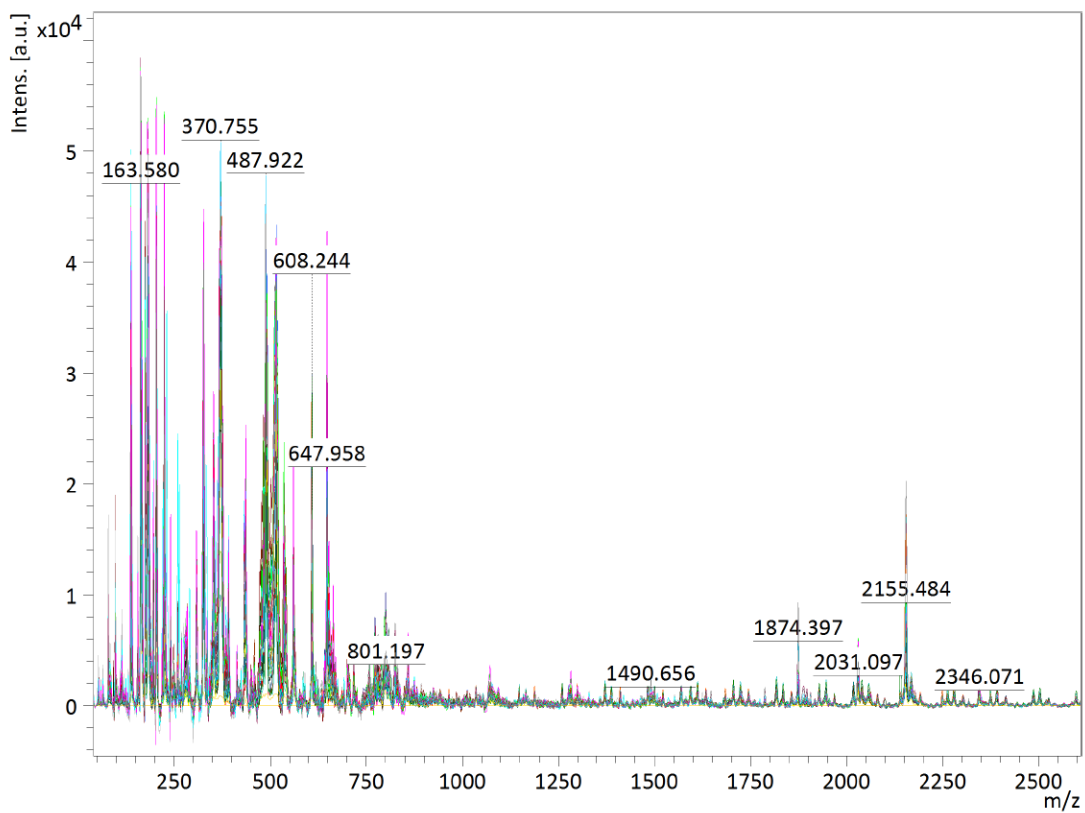
Vid analys av serumprover spädda 40 gånger för 7 mastocytompatienter och 7 normalindivider genererades ett peptidspektrum enligt figur 6. På y-axeln ses intensiteten för varje topp och på x-axeln massa-till-laddnings kvoten (m/z), ett värde som vanligtvis tolkas som molekylmassan eftersom joner med en laddning på +1 råder (Alexandrov, 2012). Av topparna studerades 6 stycken närmare – 607,8 ($\pm 0,53$), 647,6 ($\pm 0,41$), 1873,8 ($\pm 1,26$), 2154,7 ($\pm 1,12$), 3521,2 ($\pm 2,2$) och 7041,9 ($\pm 2,72$).



Figur 6. Peptidspektrum vid MALDI-TOF av serum spätt 40x där samtliga individer är inkluderade (7 mastocytompatienter samt 7 normalindivider).



Figur 7. Peptidspektrum MALDI-TOF med molekylmassa för några av de högre topparna utmärkt.



Figur 8. Peptidspektrum MALDI-TOF, förstorat över området 0-2500 m/z.

För de 6 utvalda topparna jämfördes intensiteten mellan mastocytompatienterna och normalindividerna med hjälp av Mann-Whitney u-test. Ingen signifikant skillnad kunde ses för någon av topparna.

Den anrikning med magnetkolor som genomfördes för en bättre analys av de peptiderna av lägre intensitet misslyckades, inget peptidspektrum kunde genereras med hjälp av MALDI-TOF.

qPCR

För bedömning av hur väl RNA isoleringen lyckats analyserades proverna i NanoDrop. I tabell 2 är RNA:t i alla blodprover extraherat med hjälp av nucleospin RNA XS column med undantag av individ 1 och 13. Individ 1-8 är friska individer medan 9-13 är mastocytompatienter. A260/280 och A260/230 ratio är båda mått för att utvärdera mängden kontamination i provet. Ett värde på ungefär 2,0 för A260/280 och 2,0-2,2 för A260/230 räknas som "rent" gällande RNA. Alla prover visar därmed mer eller mindre tecken på kontamination, från protein, fenoler eller andra kontaminanter. Koncentrationen RNA varierade mellan 15,21 och 200,2 ng/μl.

Tabell 2. Resultat för RNA-koncentration med NanoDrop mätning i blodprover

Individ	Koncentration (ng/μl)	A260/280	A260/230
1	200,2	1,63	0,43
2	56,47	1,83	1,65
3	47,25	1,84	1,55
4	56,64	1,64	0,89
5	38,38	1,71	0,46
6	15,21	1,58	1,16
7	55,43	1,84	1,53
8	33,93	1,82	1,7
9	19,65	1,63	1,3
10	40,58	1,76	1,41
11	24,72	1,64	0,65
12	32,36	1,66	0,82
13	178,8	1,68	0,47

Tabell 3. Resultat för RNA-koncentration med NanoDrop mätning av FFPE-prover, där de olika proverna representerar olika FFPE-block från samma individ och där M står för mastocytomvävnad och F frisk vävnad

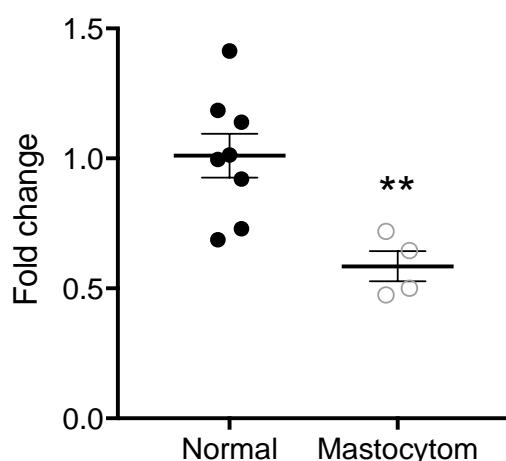
Individ	Prov	Koncentration (ng/μl)	A260/280	A260/230
1	1	371,1	1,72	0,76
	2	103,4	1,63	0,4
2	1	100,8	1,42	0,25
	1M	149,8	1,43	0,32
	1F	469,4	1,77	2,17
	2	915,6	1,51	0,49
3	1	238,6	1,57	0,54
	2	195,2	1,51	0,41
4	1	158,5	1,53	0,34
	2	142,5	1,49	0,3
5	1M	202,1	1,51	0,43
	1F	816,6	1,47	0,42
	2	310,4	1,59	0,74
	4F	212	1,58	0,45
	4M	264,6	1,61	0,61

Samma tecken på kontamination kan ses för FFPE proverna (tabell 3) som för blodproverna. Flera FFPE-block förekommer för samma individ, därmed multipla prov. Där det var möjligt delades även FFPE-blocken i 2 delar när snitten gjordes för att skilja frisk- och mastocytomvävnad från varandra och på så sätt få en inbördes kontroll, till exempel är 1M för individ 2 prov 1:s mastocytomdel och 1F den friska delen från samma block. Koncentrationen RNA varierade mellan 100,8 och 915,6 ng/μl.

Tabell 4. Resultat av qPCR från blodprover, medelvärde av Cq för duplikaten för generna. Individ 1–8 normaler, 9–13 mastocytompatienter

Individ (RNA mängd, μg)	SGN	EEF2	HPRT	Fold change
1 (1,2)	20,78	22,64	25,21	0,92
2 (0,6)	21,74	23,66	26,39	1,01
3 (0,6)	21,44	24,16	25,74	1,18
4 (0,6)	23,20	25,20	26,82	0,73
5 (0,6)	22,32	25,61	26,56	1,41
6 (0,15)	27,67	29,63	31,16	0,69
7 (0,6)	21,60	24,06	25,66	1,00
8 (0,6)	21,09	23,72	25,37	1,14
9 (0,3)	24,53	25,85	28,48	0,65
10 (0,6)	22,78	24,33	26,81	0,72
11 (0,3)	24,80	26,16	27,98	0,50
12 (0,6)	23,05	24,24	26,24	0,47
13 (1,2)	18,97	22,39	23,61	1,70

Då mängden RNA varierar mellan de olika blodproverna på grund av anpassat protokoll efter RNA koncentrationen går inte Cq-värdena för serglycingenen att jämföras rakt av. Däremot genom en beräkning av fold change för mastocytompatienterna och för normalindividerna, med hjälp av Hellemans metod för beräkning med flera referensgener (Hellemans *et al.*, 2007), kunde ändå uttrycket jämföras. En fold change på >2 innebär en signifikant ökning av uttrycket medan en på <0,5 innebär en signifikant minskning. Fold change för mastocytompatienterna varierade mellan 0,47 (vilket innebär en signifikant minskning av genuttryck för serglycin i serum hos patienten) och 1,70 (vilket närmar sig en signifikant ökning av genuttrycket), se tabell 4.



Figur 9. Jämförelse av fold change för normaler och mastocytom grad I (individ 9-12).

Fold change jämfördes även mellan normalgruppen och individerna med mastocytom grad I (0-12), dvs de individer med ett minskat uttryck, se figur 9. Ett signifikant ($p=0,0081$) minskat uttryck av serglycin kan därmed ses hos mastocytompatienterna av grad I.

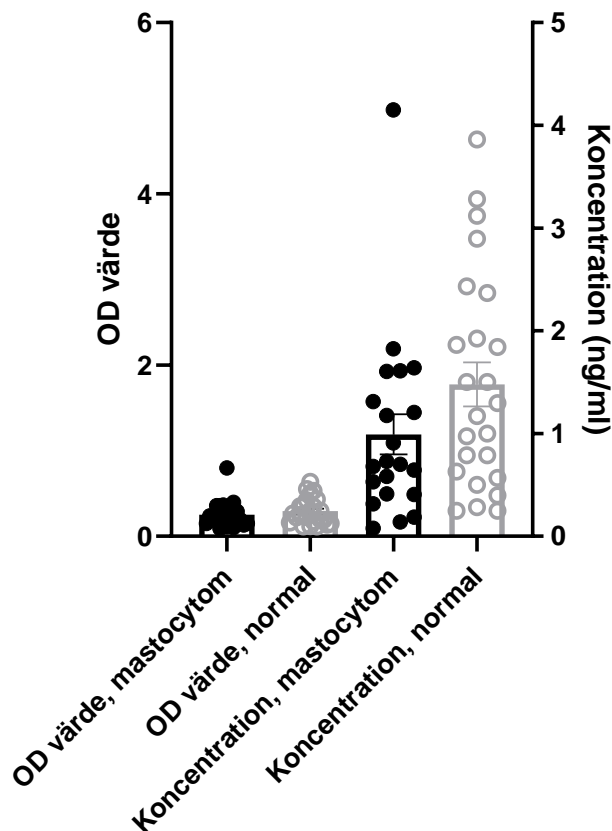
Tabell 5. Resultat av qPCR på FFPE-prover, medelvärde av Cq för duplikaten samt fold change för de prov med värden för samtliga gener

Individ	Prov	SGN	EEF2	HPRT	Fold change
1	1	30,52	37,59	37,04	110,97
	2	31,43	34,73	33,67	6,80
2	1	35,87	-	36,57	-
	1M	-	-	-	-
	1F	36,23	-	-	-
	2	38,80	-	40,98	-
3	1	31,16	35,20	39,20	63,39
	2	38,60	-	-	-
4	1	-	-	-	-
	2	29,67	34,30	33,91	21,62
5	1F	-	37,03	38,03	-
	1M	35,81	-	37,16	-
	2	32,69	-	35,45	-
	4F	32,37	31,99	33,77	1,00
	4M	33,64	39,19	37,96	21,59

I tabell 5 redovisas resultaten för qPCR analysen för FFPE-proverna. Ett flertal individer saknade helt värden för några av de mätta generna och ett stort antal individer gav endast enstaka värden istället för de duplikat som analyserats. Detta gjorde att beräkning av fold change inte gick att utföra för alla prov. För de prov där samtliga gener gett en signal beräknades fold change och en ökning i uttryck mellan 6,8 och 110,97 gånger sågs i mastocytomproven jämfört med det enstaka prov som användes som normal kontroll.

ELISA

Alla ELISA-kit testades till en början med 3 individer för att få en uppfattning om huruvida ELISA-kitten fungerade för provmaterialet. För alla individer genomfördes en spädningsserie i 5 steg. För serglycin, CD44S samt prekallikrein var resultatet negativt. De OD värden som uppmättes vid analys av serglycin följde inte standardserien. Prekallikrein gav upphov till en mycket låg signal och CD44S även den hade en relativt låg signal med små förändringar mellan spädningar, som för en av de testade individerna inte följde spädningsserien. För testet av KLK7-kittet däremot såg resultaten annorlunda ut, varför fler individer analyserades. 8 normal-individer och 7 mastocytompatienters serum analyserades med 3 mätpunkter för varje individ (i spädningsserie om 3 steg). Resultaten av detta visas i figur 10.



Figur 10. Jämförelse mellan normal och mastocytomgrupp vid ELISA på KLK7.

Vid analys av koncentration mellan grupperna verkar normalindividerna ha en högre koncentration jämfört med mastocytompatienterna men statistisk beräkning ger ingen signifikant skillnad. Ingen signifikant skillnad kan ses mellan grupperna för OD värdena heller. Medel för OD värdet är 0,251 med SEM \pm 0,034 för mastocytomgruppen och 0,293 med SEM \pm 0,031 för normalgruppen. För koncentrationen är medelvärdet 1,190 ng/ml med SEM \pm 0,235 för mastocytomgruppen och 1,479 ng/ml med SEM \pm 0,215 för normalgruppen.

DISKUSSION

Substrat-assay

Studierna kring proteasförekomst och koppling till olika cancerformer är motsägelsefulla. En del verkar kunna påvisa att ökade nivåer är kopplade till bland annat kortare överlevnadstid medan andra har svårt att upprepa resultaten (Pulz and Strefezzi, 2017). Analysen i detta arbete har haft svårt att påvisa några signifikanta skillnader. Resultatet för kallikrein verkar peka på en ökning hos mastocytompatienter jämfört med normala speciellt vid beräkningen av skillnaden vid 10-20 min då p-värdet närmar sig 0,1 vilket inte är signifikant vid ett 95 % konfidensintervall men på väg. Det är möjligt att om fler prover varit inkluderade hade resultatet kunnat bli signifikant. Det resultat som däremot noterades som signifikant var en minskning av tryptas-nivåer hos mastocytompatienter jämfört med normalindivider vid mätning vid 0-10, 0-20, 10-20 samt 20-30 min. Vid qPCR analysen av serglycinnivåerna sågs hos två av individerna en signifikant minskning av uttrycket något som skulle kunna kopplas ihop med de minskade nivåerna av tryptas. I studien av Åbrink *et al.* (2004) fann man hos serglycin-negativa möss en minskning av proteasaktivitet, däribland det mastcellspecifika tryptas.

MALDI-TOF-MS

Analysen av det spädda serumet med MALDI-TOF map peptidprofil genererade inga signifikanta skillnader mellan normalindivider och mastocytompatienter. Trots att MALDI-TOF-MS teknologin har kommit att ha stor betydelse för både kvalitativ och kvantitativ analys för framtagning av nya biomarkörer likväl som för diagnostisk forskning inom många områden hävdar ett flertal forskargrupper att ett av analysmetodens största brister är den något låga förmågan till upprepning av försök (Merlos Rodrigo *et al.*, 2014)

I en studie av Albalat *et al.* (2013) visade de att till exempel spädning och koncentrationen i prover har stor betydelse för vilka peptider/proteiner som kan detekteras vid analysen. Studien konstaterade även att inte alla peptider når en maximal intensitet vid samma spädning och mycket information kan gå förlorad om ett för snävt spädningsintervall används. Utifrån detta kan det tänkas att spädningen på 40 ggr i det här försöket inte varit optimal för att identifiera de molekylvikter som skiljer sig i intensitet mellan mastocytompatienter och friska individer.

Kvaliteten på den data som genereras vid MALDI-TOF är också kraftigt beroende av vilka inställningar och programmetoder som utnyttjas vid analysen. Resultaten innehåller dessutom ofta stora mängder ”brus”, dvs extra information från kemikalier, instrumentinställningar och liknande, som kan störa de resultaten som är av intresse. För att reducera detta krävs rätt program och rätt inställningar (Merlos Rodrigo *et al.*, 2014). I detta försök justerades en del av de inställningar som kan tänkas behövas, såsom korrektion efter baslinjer och utjämning av linjerna, men vid kontakt med det ansvariga företaget för maskinen (Bruker Daltonics) föreslog de att en annan programvara skulle kunna förbättra vårt resultat.

Peptidprofilering av serum med MALDI-TOF är något begränsad till detektion och kvantifiering av de proteiner/peptider som förekommer i riklig mängd medan andra går förlorade. De serumproteiner som finns beskrivna för cancer ligger ofta i ett lägre detektionsspänn, under 1 kDa, än vad inställningarna i MALDI-TOF:en för exjobbsanalysen klarade av att mäta (Merlos

Rodrigo *et al.*, 2014). För att komma runt detta problem gjordes försöken med anrikning med hjälp av magnetkolor, dock utan framgång och resultat. Vid kontakt med tillverkarna av MALDI-TOF:n (Bruker) föreslogs att ett särskilt matrix för ändamålet hade varit av värde.

RNA extraktion

RNA extraktion från både blodprover samt FFPE-tumörmaterial genererade mätbara nivåer RNA vid analys i NanoDrop, dock med stor variation och tydliga tecken på kontamination. Resultaten för blodproverna där RNA:t isolerats med hjälp av NucleoSpin ledde generellt till mindre tecken på kontamination mätt med kvoterna A260/280 och A260/230 jämfört med de prover där endast TRIzol metoden använts. Trots detta klassas de inte som "rena". TRIzol är en fenollösning som absorberar UV ljus vid både 230 nm och 270 nm vilket innebär att den är möjlig förklaring till de brister i både A260/280 och A260/230 kvoterna som ses. I en studie av Kim *et al.* (2014) jämfördes 3 kit för RNA extraktion där TRIzol metoden och NucleoSpin kittet var två av dem. I enlighet med våra resultat fann de att endast TRIzol gav upphov till en högre grad kontamination jämfört med Nucleospin men även att RNA koncentrationerna var lägre efter användning av NucleoSpin. Detta noterades även i detta examensarbete. Protein och DNA är också möjliga kontaminanter vid RNA extraktionen och för att minska denna ytterligare är ett ökat antal tvättar eventuellt en möjlig lösning.

Något som kan förklara den stora variationen i koncentration som observerades framförallt mellan FFPE-proverna, är brister vid fällning av RNA vilket enligt Eikmans *et al.* (2013) är ett mycket kritiskt steg som ofta leder till att RNA pelleten helt eller delvis går förlorad.

qPCR analys

Kvaliteten på qPCR-resultaten för FFPE-proverna varierade. Ett flertal individer saknade helt värden för några av de mätta generna och ett stort antal individer gav endast enstaka värden istället för de duplikat som analyserats. Detta gör resultaten opålitliga och svåra att dra slutsatser kring. En misslyckad cDNA syntes är en möjlig förklaring men då den upprepades för en del av individerna utan någon förbättring i resultat är det mindre troligt. Brister i pipetteringen är en annan förklaring. En tidigare studie av Jönsson (2019) som utförde motsvarande analys på FFPE tumörmaterial, dock av annan vävnads och tumörtyp, lyckades bättre. Detta kan tänkas bero på själva vävnaden och tumörerna som studerats. Exempelvis hos individ 5, där resultaten varierar i kvalitet, härstammar vävnaden från ett öra som generellt innehåller mindre celler och kan tänkas ge upphov till ett sämre uttryck. Det kan även tänkas vara kopplat till tumörtypen och graden av degradering. Det är möjligt att mastocytompreparaten, som innehåller en stor mängd mastceller och dess specifika och ospecifika proteaser och andra biologiskt aktiva molekyler, haft en snabbare degradering och resulterat i en sämre vävnad innan fixeringen hunnit ske.

Något som kan haft påverkan på resultaten av RNA isoleringen från blodproverna är lagringen. I studien av Eikmans *et al.* (2013) undersöktes även lagringens inverkan på RNA:ts kvalitet. De fann att lagring av blod i TRIzol i -20 °C gav upphov till en lägre kvalitet hos det framrenade RNA:t och en lägre qPCR signal efter cDNA syntes. Denna minskning var dock inte signifikant vid statistiska beräkningar och ändå den lagringsformen som rekommenderas. Det skulle dock

kunna ha en påverkan på prover som lagras en längre tid och går inte att utesluta då proverna i Eikmans *et al.* (2013) studie endast lagrats som längst i 6 dagar medan proverna i vår utförda studie stått i frysen flera veckor upp till ett år.

För ett flertal cancerformer har ett ökat serglycinuttryck korrelerats till en aggressivare cancerform, när resultaten för den maligna formen jämförts med den benigna formen eller med normalvävnad (He *et al.*, 2013; Korpetinou *et al.*, 2015, 2013; Li *et al.*, 2011). Detta är dock inte studerat specifikt för mastocytom i någon större utsträckning tidigare och än mindre på hund. I detta arbete har det blivit svårt att dra slutsatser då patientmaterialet för de sjuka individerna varit litet och spridningen gällande skillnaden i uttryck (fold change) jämfört med de friska individerna stor. En tänkbar förklaring till detta skulle kunna vara mastocytomgraden. Den individ med högst fold change (1,70), vilket var individ 13, är också den enda individen som diagnosticerats med mastocytom grad III. Grad III innebär en mer odifferentierad bild som trängt sig djupare ner i subkutana vävnader och visar större tecken på malignitet (Patnaik *et al.*, 1984). För individen finns dock inga uppgifter om mastocytomet spridit sig till närliggande lymfknutor eller andra organ. De andra individerna i qPCR analysen, som har en fold change mellan 0,47 och 0,72, har alla fått klassificeringen grad I. Två av individerna ligger precis vid signifikansvärdet för en minskning i uttryck av serglycin jämfört med normalvävnaden, om de endast studeras som enstaka individer. Vid jämförelse mellan alla fyra mastocytomindivider med grad I och normalgruppen kunde dock en signifikant minskning i serglycinuttryck ses för mastocytompatienterna. I en studie av Duelli *et al.* (2009) fann man att serglycinuttrycket hos mastceller är starkt kopplat till cellernas mognadsgrad, där omogna mastceller uttrycker lägre nivåer eller ingen serglycin alls medan de mogna mastcellerna uttrycker höga nivåer. En förklaring till varför fold change för individer med mastocytom grad I är minskat i uttryck jämfört med normalvävnad skulle därför kunna vara att en ökad mängd omogna mastceller finns i cirkulationen hos dessa patienter.

Om någon slutsats ska dras kring resultaten för FFPE materialet, trots begränsad tillförlitlighet, ses en tydlig ökning i fold change och därmed genuttryck för serglycin hos mastocytomproven jämfört med det enstaka normalprov som kunde användas för beräkning. Inga uppgifter finns kring varför dessa individer avlivats men en förklaring kan vara problem kopplat till mastocytomet varför ett rimligt antagande skulle vara att dessa är av en allvarligare klassificeringsgrad. Det höga genuttryck som genererats är därför inte helt omöjligt som sanning, i enlighet med tidigare studier på serglycinuttryck och aggressivitet.

ELISA

Resultaten för spädningsserien som skapades av proverna för serglycin ELISA:n följde inte den redan fastställda standardkurvan varför det är rimligt att anta att detta kit inte fungerar för den här typen av prov. Inga ytterligare analyser genomfördes med avseende på detta. För prekalikrein var absorbanssignalen mycket låg något som kan vara tecken på en felaktig hantering av kittet men också att förekomsten i proverna var låg och därmed inte av värde att undersöka vidare. Detsamma gäller CD44S där signalen också noterades som relativt låg och skillnaden mellan stegen i spädningsserien var liten. För de 3 individer som testades var det dessutom en som inte följde standardkurvan för CD44S.

De resultaten som erhöles vid ELISA på KLK7 var däremot av bättre kvalitet. Då samtliga individer följde den fastställda standardkurvan antogs kittet fungera och fler individer analyserades. Resultatet kunde inte uppnå några signifikanta skillnader i koncentration mellan mastocytom och normalgrupp men trenden tyder på en minskning hos mastocytompatienter av KLK7. KLK7 har i andra cancerformer ett varierat uttryck. En studie av Shen *et al.* (2015) visade en minskad nivå av KLK7 vid prostatacancer hos människa jämfört med benign prostatahyperplasi och normal prostatavävnad. I motsats till detta erhöil Li *et al.* (2014) resultat som visade att KLK7 nivåerna i serum hos patienter med livmoderhalscancer var signifikant högre jämfört med patienter med benign livmoderhals sjukdom eller friska kontroller. Det är därför möjligt att mastocytom på hund är en av cancerformerna där KLK7 nedregleras.

KONKLUSION

Trots att resultaten i mångt och mycket inte haft någon stark signifikans visar detta examensarbete ändå på att det finns trender som är intressanta att fortsätta undersöka med ett större patientmaterial som grund. Det skulle vara intressant att få tillgång till individer med olika mastocytomgrad och jämföra resultaten för dessa för att se hur graden av sjukdom spelar roll för möjligheten till identifikation av biomarkörer. Serglycin verkar trots något bristfälliga resultat ha betydelse och är av värde att fortsatt studera som en potentiell biomarkör.

Ett av målen med examensarbetet var att bilda sig en uppfattning om normalvariation för de utförda analyserna på hund. Då normalgruppen varit av större antal än mastocytomgruppen har detta mål uppnåtts och en viss uppfattning och insamling av data gällande normalhundar för de analyserade parametrarna avklarats.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Inledning och litteraturöversikt

Cancer är en av de vanligaste dödsorsakerna hos hund i Sverige. Hudtumörer förekommer så ofta att det är den tredje vanligaste ställda diagnosen enligt källor. En av de vanligaste förekommande tumörtyperna är mastocytom, vilket är en tumör som utgår från kroppens mastceller. Mastceller är en cell som tillhör immunförsvaret och finns på många ställen i kroppen, däribland huden. Mastocytom uppträder ofta i huden men det då mastcellerna även finns i andra delar av kroppen kan det bildas mastocytom på flera platser. De mastocytom som finns i huden kallas kutana mastocytom. Dessa kan graderas på olika sätt, antingen baserat på hur den ser ut histologiskt, det vill säga vid undersökning i mikroskop, eller utifrån om/hur den spridit sig från huden till lymfknutor, blod och/eller benmärg. I bägge fallen gäller att en högre gradering innebär en mer aggressiv och elakartad förändring. Graderingen hjälper på så vis behandlande veterinär att välja behandling och bidrar till att ge en prognos för individens överlevnad.

Det finns ett ämne, serglycin, vilket på olika sätt påverkar mastceller. Det är också ett ämne som man i tidigare studier kopplat till cancer. Bevis finns för att ämnet serglycin uttrycks i högre nivåer hos ett flertal aggressiva cancerformer jämfört med godartade cancerformer och normal vävnad. Detta gäller för till exempel lungcancer, prostatacancer och coloncancer hos människa. Målet med den här studien var därför att undersöka huruvida serglycinnivåer kan användas på liknande sätt för mastocytom hos hund. I studien inkluderades även andra ämnen (olika typer av proteaser, peptidprofil och CD44), vilka även dessa setts vara kopplade till aggressiv cancer på andra djurslag. Detta för att se om dess nivåer och/eller aktivitet kunde kopplas till mastocytomets allvarlighetsgrad.

Material och metoder

Studien bygger på blodprover insamlade från patienter med mastocytom och friska hundar vid Universitetsdjursjukhuset i Uppsala, samt av tumörprover med en histopatologisk diagnos från avdelningen för patologi (BVF) vid Sveriges Lantbruksuniversitet. Dessa prover har sedan genomgått flera olika analyser såsom substrat-assay, MALDI-TOF-MS, qPCR och ELISA. Resultat från dessa analyser har sedan bearbetats statistiskt för att se om det föreligger någon statistiskt signifikant skillnad mellan individer med mastocytom och friska hundar.

Resultat och diskussion

Efter statistisk bearbetning kunde inga signifikanta skillnader gällande peptidprofilering och resultat från ELISA analys i serum ses mellan hundar med mastocytom och friska hundar. Proteasaktiviteten var signifikant mindre för det mastcellspecifika proteaset tryptas, men för övriga studerade proteaser kunde ingen signifikant skillnad mellan sjuka och friska individer ses. Serglycinuttrycket varierade mellan individerna med mastocytom och var hos vissa sänkt och hos andra förhöjt jämfört med de friska individerna. Det är möjligt att detta skulle kunna vara kopplat till mastocytomets klassificeringsgrad då den individen med högst serglycinuttryck var den individ med högst graderat mastocytom. Dessutom sågs en signifikant minskning i serglycinuttryck hos de individer med lägre klassificeringsgrad jämfört med de friska individerna.

Trots att resultaten inte alltid visat någon stark signifikans visar denna studie ändå på trender som skulle vara intressanta att undersöka vidare med ett utökat patientmaterial som grund.

TACK

Jag skulle vilja börja med att ge ett stort tack till min handledare Magnus Åbrink för hans oändliga entusiasm, tålamod och engagemang för allt vad mitt arbete inneburit. All stöttning och handledning längs vägen har varit ovärderlig.

Jag skulle även vilja tacka Fredrik Södersten på enheten för patologi på SLU för hjälp med att identifiera preparat i arkivet, och Albin Norman och Vidar Andersson för instruktioner i hur snitt skärs från FFPE-block.

Sist vill jag också tacka Bernt Hjertner för hjälp på labb och med beräkningar, och Caroline Fossum för den input jag fått om mitt arbete i hennes egenskap som examinator.

Stort tack!

REFERENSER

- Albalat, A., Stalmach, A., Bitsika, V., Siwy, J., Schanstra, J.P., Petropoulos, A.D., Vlahou, A., Jankowski, J., Persson, F., Rossing, P., Jaskolla, T.W., Mischak, H., Husi, H., 2013. Improving peptide relative quantification in MALDI-TOF MS for biomarker assessment. *Proteomics* 13, 2967-2975 <https://doi.org/10.1002/pmic.201300100>
- Alexandrov, T., 2012. MALDI imaging mass spectrometry: statistical data analysis and current computational challenges. *BMC Bioinformatics* 13, S11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S16-S11>
- Baioni, E., Scanziani, E., Vincenti, M.C., Leschiera, M., Bozzetta, E., Pezzolato, M., Desiato, R., Bertolini, S., Maurella, C., Ru, G., 2017. Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. *BMC Veterinary Research* 13, 203. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1126-0>
- Bonnett, B.N., Egenvall, A., Hedhammar, Å., Olson, P., 2005. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 46, 16. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-46-105>
- Bourdon, M.A., Oldberg, A., Pierschbacher, M., Ruoslahti, E., 1985. Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 1321-1325. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.5.1321>
- de Souza Junior, D.A., Santana, A.C., da Silva, E.Z.M., Oliver, C., Jamur, M.C., 2015. The role of mast cell specific chymases and tryptases in tumor angiogenesis. *BioMed Research International* 2015, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2015/142359>
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L.N., 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice* 43, 240-246. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x>
- Duelli, A., Rönnerberg, E., Waern, I., Ringvall, M., Kolset, S.O., Pejler, G., 2009. Mast cell differentiation and activation is closely linked to expression of genes coding for the serglycin proteoglycan core protein and a distinct set of chondroitin sulfate and heparin sulfotransferases. *The Journal of Immunology* 183, 7073-7083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900309>
- Eikmans, M., Rekers, N.V., Anholts, J.D.H., Heidt, S., Claas, F.H.J., 2013. Blood cell mRNAs and microRNAs: optimized protocols for extraction and preservation. *Blood* 121, e81-e89. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-438887>
- Gotlib, J., Horny, H.-P., Valent, P., 2018. Mast cells and mastocytosis. *Hematology (Seventh Edition)*, pp. 1170-1186. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00072.X>
- Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M.-L., Knight, S.D., Pejler, G., Åbrink, M., 2005. Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *Journal of Biological Chemistry* 280, 33411-33418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501708200>
- Grujic, M., Christensen, J.P., Sørensen, M.R., Åbrink, M., Pejler, G., Thomsen, A.R., 2008. Delayed contraction of the CD8⁺ T cell response toward lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice lacking serglycin. *The Journal of Immunology* 181, 1043-1051. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1043>
- Guo, J.-Y., Hsu, H.-S., Tyan, S.-W., Li, F.-Y., Shew, J.-Y., Lee, W.-H., Chen, J.-Y., 2017. Serglycin in tumor microenvironment promotes non-small cell lung cancer aggressiveness in a CD44-dependent manner. *Oncogene* 36, 2457-2471. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.404>
- Hamilton, A., Basic, V., Andersson, S., Åbrink, M., Ringvall, M., 2015. Loss of serglycin promotes primary tumor growth and vessel functionality in the RIP1-Tag2 mouse model for spontaneous insulinoma formation. *PLoS ONE* 10, e0126688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126688>

- He, J., 2014. Mass spectrometry-based serum peptide profiling in hepatocellular carcinoma with bone metastasis. *World Journal of Gastroenterology* 20, 3025. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i11.3025>
- He, L., Zhou, X., Qu, C., Tang, Y., Zhang, Q., Hong, J., 2013. Serglycin (SRGN) overexpression predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Medical Oncology* 30, 707. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0707-4>
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8, R19. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Jönsson, L., 2019. Serglycin, en prognostisk biomarkör för aggressiv cancer i hund. Examensarbete, Uppsala: Sveriges Lantbruksuniversitet. <https://urn.kb.se/resolve?urn:nbn:se:slu:epsilon-s-10601>
- Kim, J.-H., Jin, H.-O., Park, J.-A., Chang, Y.H., Hong, Y.J., Lee, J.K., 2014. Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. *SpringerPlus* 3, 76. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-76>
- Kiupel, M., Webster, J.D., Bailey, K.L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C.J., Fitzgerald, S.D., Gamble, D., Ginn, P.E., Goldschmidt, M.H., Hendrick, M.J., Howerth, E.W., Janovitz, E.B., Langohr, I., Lenz, S.D., Lipscomb, T.P., Miller, M.A., Misdorp, W., Moroff, S., Mullaney, T.P., Neyens, I., O'Toole, D., Ramos-Vara, J., Scase, T.J., Schulman, F.Y., Sledge, D., Smedley, R.C., Smith, K., W. Snyder, P., Southorn, E., Stedman, N.L., Steficek, B.A., Stromberg, P.C., Valli, V.E., Weisbrode, S.E., Yager, J., Heller, J., Miller, R., 2011. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology* 48, 147–155. <https://doi.org/10.1177/0300985810386469>
- Kjellén, L., Pettersson, I., Lillhager, P., Steen, M.L., Pettersson, U., Lehtonen, P., Karlsson, T., Ruoslahti, E., Hellman, L., 1989. Primary structure of a mouse mastocytoma proteoglycan core protein. *Biochemical Journal* 263, 105–113. <https://doi.org/10.1042/bj2630105>
- Kolset, S.O., Pejler, G., 2011. Serglycin: A structural and functional chameleon with wide impact on immune cells. *The Journal of Immunology* 187, 4927–4933. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100806>
- Kolset, S.O., Tveit, H., 2008. Serglycin – Structure and biology. *Cellular and Molecular Life Sciences Sci.* 65, 1073–1085. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7455-6>
- Korpetinou, A., Papachristou, D.J., Lampropoulou, A., Bouris, P., Labropoulou, V.T., Noulas, A., Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., 2015. Increased expression of serglycin in specific carcinomas and aggressive cancer cell lines. *BioMed Research International* 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/690721>
- Korpetinou, A., Skandalis, S.S., Labropoulou, V.T., Smirlaki, G., Noulas, A., Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., 2014. Serglycin: At the crossroad of inflammation and malignancy. *Frontiers in Oncology* 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00327>
- Korpetinou, A., Skandalis, S.S., Moustakas, A., Happonen, K.E., Tveit, H., Prydz, K., Labropoulou, V.T., Giannopoulou, E., Kalofonos, H.P., Blom, A.M., Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., 2013. Serglycin is implicated in the promotion of aggressive phenotype of breast cancer cells. *PLoS ONE* 8, e78157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078157>
- Kryza, T., Silva, M.L., Loessner, D., Heuzé-Vourc'h, N., Clements, J.A., 2016. The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression. *Biochimie* 122, 283–299. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.002>
- Kycko, A., Reichert, M., 2014. Proteomics in the search for biomarkers of animal cancer. *Current Protein & Peptide Science* 15, 36–44. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140221110945>
- Li, W., Zhao, Y., Ren, L., Wu, X., 2014. Serum human kallikrein 7 represents a new marker for cervical cancer. *Medical Oncology* 31, 208. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0208-0>

- Li, X.-J., Ong, C.K., Cao, Y., Xiang, Y.-Q., Shao, J.-Y., Ooi, A., Peng, L.-X., Lu, W.-H., Zhang, Z., Petillo, D., Qin, L., Bao, Y.-N., Zheng, F.-J., Chia, C.S., Iyer, N.G., Kang, T.-B., Zeng, Y.-X., Soo, K.C., Trent, J.M., Teh, B.T., Qian, C.-N., 2011. Serglycin is a theranostic target in nasopharyngeal carcinoma that promotes metastasis. *Cancer Research* 71, 3162–3172. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3557>
- London, C.A., Thamm, D.H., 2013. Mast cell tumors, In: *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier, pp. 335–355. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00020-7>
- López-Otín, C., Bond, J.S., 2008. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry* 283, 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>
- Lu, Z., Chen, Y., Jing, X., Wang, N., Zhang, T., Hu, C., 2018. Detection and identification of serum peptides biomarker in papillary thyroid cancer. *Medical Science Monitor* 24, 1581–1587. <https://doi.org/10.12659/MSM.907768>
- Ma, Z., 2012. Total RNA Extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) blocks. *Bio-protocol* 2, e161. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.161>
- Melo, F.R., Waern, I., Rönnberg, E., Åbrink, M., Lee, D.M., Schlenner, S.M., Feyerabend, T.B., Rodewald, H.-R., Turk, B., Wernersson, S., Pejler, G., 2011. A role for serglycin proteoglycan in mast cell apoptosis induced by a secretory granule-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry* 286, 5423–5433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176461>
- Merlos Rodrigo, M.A., Zitka, O., Krizkova, S., Moulick, A., Adam, V., Kizek, R., 2014. MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 95, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.007>
- Niemann, C.U., Åbrink, M., Pejler, G., Fischer, R.L., Christensen, E.I., Knight, S.D., Borregaard, N., 2007. Neutrophil elastase depends on serglycin proteoglycan for localization in granules. *Blood* 109, 4478–4486. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001719>
- Patnaik, A.K., Ehler, W.J., MacEwen, E.G., 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology* 21, 469–474. <https://doi.org/10.1177/030098588402100503>
- Pejler, G., Rönnberg, E., Waern, I., Wernersson, S., 2010. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 115, 4981–4990. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-257287>
- Pulz, L.H., Strefezzi, R.F., 2017. Proteases as prognostic markers in human and canine cancers: Proteases as prognostic markers in cancers. *Veterinary and Comparative Oncology* 15, 669–683. <https://doi.org/10.1111/vco.12223>
- Purushothaman, A., Toole, B.P., 2014. Serglycin proteoglycan is required for multiple myeloma cell adhesion, *in vivo* growth, and vascularization. *Journal of Biological Chemistry* 289, 5499–5509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.532143>
- Roy, A., Femel, J., Huijbers, E.J.M., Spillmann, D., Larsson, E., Ringvall, M., Olsson, A.-K., Åbrink, M., 2016. Targeting serglycin prevents metastasis in murine mammary carcinoma. *PLoS ONE* 11, e0156151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156151>
- Scully, O.J., Chua, P.-J., Harve, K.S., Bay, B.-H., Yip, G.W., 2012. Serglycin in health and diseases. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 295, 1415–1420. <https://doi.org/10.1002/ar.22536>
- Shen, Z.-J., Dai, J., Rui, W.-B., Zhang, C.-Y., Zhu, Y., 2015. Expression of kallikrein-related peptidase 7 is decreased in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology* 17, 106. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.137613>
- Skliris, A., Happonen, K.E., Terpos, E., Labropoulou, V., Børset, M., Heinegård, D., Blom, A.M., Theocharis, A.D., 2011. Serglycin inhibits the classical and lectin pathways of complement via its glycosaminoglycan chains: Implications for multiple myeloma. *European Journal of Immunology* 41, 437–449. <https://doi.org/10.1002/eji.201040429>

- Widłak, P., 2011. Comparison of peptide cancer signatures identified by mass spectrometry in serum of patients with head and neck, lung and colorectal cancers: Association with tumor progression. *International Journal of Oncology* <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1186>
- Willmann, M., Hadzijasufovic, E., Hermine, O., Dacasto, M., Marconato, L., Bauer, K., Peter, B., Gamperl, S., Eisenwort, G., Jensen-Jarolim, E., Müller, M., Arock, M., Vail, D.M., Valent, P., 2019. Comparative oncology: The paradigmatic example of canine and human mast cell neoplasms. *Veterinary and Comparative Oncology* 17, 1–10. <https://doi.org/10.1111/vco.12440>
- Åbrink, M., Grujic, M., Pejler, G., 2004. Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. *Journal of Biological Chemistry* 279, 40897–40905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405856200>

BILAGOR

Bilaga 1

Protocol RNA extraction

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

Experiment:

Assay

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

Reagents

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

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

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

species: Canine (Dog).

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

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

Procedure

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

Turn on the centrifuge

In sterile hood

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

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

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

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

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

Bilaga 2

NanoDrop™ measurement

Materials:

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

Procedure

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

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

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

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

Bilaga 3

Protocol cDNA synthesis of total RNA with DNase I step

Original protocol: *Stina Hellman*

Revised: *Claudia LützelSchwab*

Date: 2018-09-10

DNase I treatment

Reagents

Promega DNase I Kit Lot # :

DEPC treated water

RNA sample

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

Procedure

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

Clean Room (**NO NUCLEIC ACIDS!**)

In the hood:

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

Template Room

In the hood:

DNase I reaction

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

cDNA synthesis Superscript III Kit

Clean Room

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

Template room

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

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

CALCULATION TABLE

CLEAN ROOM				TEMPLATE ROOM			
DNase treatment Mix for each RNA RT+ sample				DNase treatment Mix for each RNA RT+ sample			
			Vol (ul)				Vol (ul)
10x xRxn Buffer			1,2	RNA			□
DEPC water			5	DNase treatment Mix			12
DNase I Invitrogen AMPD1			1,2	Mix gentle and incubate at RT* for 15 min			
Total			12				
Prepare:				DNase stop			
DNase stop solution 8 ul/ 6 reactions				Total RNA treated			
				Incubate at 70°C, 10 min, chill on ice, spin down!			
cDNA Mastex Mix I				cDNA Mastex Mix I for EACH RNA			
N° Reactions		1,2		RNA treated			13,2
Primer mix **		1,2	0	Master Mix I			2,4
dNTPs mix 10 mM		1,2	0	Total			15,6
Total		2,4	0	Anneal at 65°C 5 min and on ice > 1 min			
Primer mix **		0 ul of each (REV, Hexa and Oligo dT)					
cDNA Mastex Mix II				cDNA Mastex Mix II for EACH reaction			
N° Reactions		1				RT+	RT-
5X First-Strand Buffer		4	0	Master Mix II		7	1,4
0,1M DTT		1	0	Template RNA treated		13	2,6
SuperScript III RT (200U/ul)		1	0	Total			20
Nuclease free water		1	0	Incubate at 25°C for 15 min			
total volume (ul)		7	0				
				Incubate at 55°C for 60 min			
				Inactivate reaction at 70°C for 15 min			

Bilaga 4

qPCR dog cDNAs

CLEAN ROOM

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

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

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

TEMPLATE ROOM

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

Plate design:

		1	2	3
A				
B				
C				
D				
E				
F				
G				
H				

Final volume should be 25 ul/ well.

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

POST-PCR ROOM

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

Protocol

- 1: 95,0°C for 3:00
- 2: 95,0°C for 0:15
- 3: 59,0°C for 0:30
- 4: 72,0°C for 0:30

Plate Read

- 5: GOTO 2, 39 more times
- 6: Melt Curve 65,0°C to 95,0°C: Increment 0,5°C 0:05

Plate Read