



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Injektionsassocierade sarkom hos katt

Utgör tumörsuppressorgenen p53 en roll för tumörutvecklingen?

Philip Yngvesson

*Uppsala
2017*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2017:83

Injektionsassocierade sarkom hos katt – utgör tumörsuppressorgen p53 en roll för tumörutvecklingen?

**Feline Injection Site Sarcomas – does the tumour
suppressor gene p53 participate in the tumourigenesis?**

Philip Yngvesson

Handledare: Eva Hellmén, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator: Eva Tydén, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2017:83

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

Nyckelord: FISS, injektionsassocierade, sarkom, katt, p53

Key words: FISS, injection-site, sarcoma, feline, p53

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
MATERIAL OCH METODER	3
LITTERATURÖVERSIKT	3
FISS	3
Förekomst.....	4
Etiopatogenes	4
Behandling och prognos.....	5
p53	5
Funktion	5
Dysfunktion.....	6
Detektering.....	6
p53 och FISS	7
DISKUSSION	8
LITTERATURFÖRTECKNING	11

SAMMANFATTNING

Sedan början av 1990-talet har vaccinationer och andra injektioner kopplats till uppkomsten av aggressiva sarkom hos katt. Trots att sjukdomen är relativt ovanlig och endast uppkommer hos 0,32 till 10 katter per 10 000 vaccinationsdoser så bidrar den dåliga prognosen till stor oro hos veterinärer och djurägare världen över. Tumörerna, som uppträder vid injektionsplatsen, är av typiskt mesenkymalt ursprung, där fibrosarkom är vanligast, och har fått namnet FISS efter engelskans "feline injection-site sarcoma". Trots en hel del forskning på området har man inte kunnat fastställa en exakt etiopatogenes för sjukdomen, men den mest etablerade hypotesen är att den kritiska rollen i tumörutvecklingen utgörs av en kvarstående inflammation som induceras vid vaccination eller andra injektioner. Den låga prevalensen av FISS tyder dock på en multifaktoriell etiopatogenes som inkluderar både inflammatoriska och genetiska processer där drabbade katter tillhör en subpopulation av känsliga individer med endogena förutsättningar för tumörutveckling.

Denna litteraturstudie syftar till att utröna betydelsen för vilken roll tumörsuppressorgen p53 har vid utveckling av FISS. p53-genen kodar för ett nukleärt protein som spelar en nyckelroll för cellens respons vid skada på DNA genom sin förmåga att reglera celcykeln och initiera apoptos i skadade celler. Mutationer i p53 är vanligt förekommande vid human cancer och kan ha betydelse för både initiering och utveckling av tumörer, vilket gör den till en intressant kandidat även för uppkomsten av FISS.

Med de studier som gjorts på sambandet mellan muterat p53 och uppkomst av FISS som grund finns i dagsläget inga konkreta bevis som stödjer hypotesen att mutationer i p53-genen ligger bakom tumörutvecklingen. Däremot är både onormal förekomst av p53-protein och mutationer i genen för p53 ett vanligt förekommande fenomen i tumörceller från FISS, vilket dessutom har visat sig leda till en försämrad överlevnadsprognos för drabbade katter. Detta tyder på att p53-mutationer ändå kan vara en del av den multifaktoriella verkningsmekanismen som ligger till grund för tumöruppkomsten vid FISS.

SUMMARY

Since the early 1990s, vaccinations and other injections have been linked to the emergence of aggressive sarcomas in cats. Although the disease is relatively rare and only occurs in 0.32 to 10 cats for every 10 000 doses of vaccine, the poor prognosis of affected cats contributes to a great concern to veterinarians and pet owners worldwide. The tumours, which develop at the site of injection and are thus called “feline injection-site sarcoma” (FISS), are of typical mesenchymal origin, where fibrosarcoma is most common. Despite a lot of research, scientists and veterinarians have failed to establish a specific etiopathogenesis of the disease, but the most recognized hypothesis states that the critical role in tumour development consists of a persistent inflammation induced by vaccination or other injections. The low prevalence of FISS, however, indicates a multifactorial etiopathogenesis which includes both inflammatory and genetic processes in which affected cats belong to a subpopulation of susceptible individuals with endogenous conditions that support tumour development.

This study aims to determine the importance of the role that the tumour suppressor gene p53 might play in the development of FISS. The p53 gene encodes a nuclear protein that plays a key role in cellular response to DNA damage through its ability to regulate the cell cycle and initiate apoptosis in damaged cells. Mutations in p53 are commonly found in human cancer cells and may have implications for both the initiation and development of these tumours, making it an interesting candidate for the emergence of FISS as well.

Studies done on the relationship between mutated p53 and the emergence of FISS have found no concrete evidence to support the hypothesis that mutations in the p53 gene underlie tumour development. However, both the abnormal presence of p53 protein and mutations in the p53 gene seem to be a common phenomenon in tumour cells from FISS which, additionally, has been shown to lead to poorer survival prognosis in affected cats. This suggests that p53 mutations may still be part of the multifactorial mechanism underlying the onset of tumourigenesis in FISS.

INLEDNING

Injektionsassocierade sarkom hos katt, eller FISS (från engelskans "Feline injection-site sarcoma"), är ett relativt nytt fenomen som för första gången beskrevs i USA i början av 1990-talet. Tumörerna, som uppträder vid injektionsplatsen, uppkommer främst till följd av injektion med vaccin mot rabies eller felint leukemivirus (FeLV), men har även visats uppstå vid platsen för injektion med andra slags preparat. Den exakta etiopatogenesen för FISS är okänd, men det finns evidens som tyder på att inflammation spelar en viktig roll. Kronisk inflammation kan leda till neoplastisk omvandling av fibroblaster vilket ger upphov till sarkom och epidemiologiska studier har visat ett starkt samband mellan FISS och vaccination (Macy & Hendrick, 1996). Det råder därför en brett accepterad hypotes att den kritiska rollen i tumörutvecklingen utgörs av en kvarstående inflammation som induceras vid vaccination eller andra injektioner. Tumörformen är dock ovanlig, vilket tyder på att även andra faktorer spelar in utöver inflammationsprocessen. Posttraumatiska okulära sarkom och sarkom på platsen för tidigare fraktur är exempel som tyder på att katter tycks vara genetiskt predisponerade för utveckling av maligna tumörer vid trauma (Fry & Jukes, 1995; Dubielzig *et al.*, 1990). Den låga prevalensen av FISS tyder alltså på att drabbade katter tillhör en subpopulation av känsliga individer där endogena faktorer är en förutsättning för tumörutveckling. Tumörsuppressorgenen p53 kodar för ett nukleärt protein som spelar en nyckelroll för cellens respons vid skada på DNA genom sin förmåga att reglera cellcykeln och initiera apoptos. Mutationer i p53 är vanligt förekommande vid human cancer och kan ha betydelse för både initiering och utveckling av tumörer. Denna litteraturstudie syftar till att utröna betydelsen för vilken roll tumörsuppressorgenen p53 har vid utveckling av FISS.

MATERIAL OCH METODER

Litteratur till studien inhämtades från databaserna PubMed, Web of Science och Google Scholar genom sökorden (FISS OR "injection-site" OR "vaccine associated") AND (*sarcoma* OR tumor OR neoplas* OR cancer) AND (feline OR cats). Även kombinationen p53 AND (feline OR cats) AND (FISS OR "injection-site" OR "vaccine associated" OR *sarcoma* OR tumor OR neoplas* OR cancer) användes för att finna studier som gjorts på p53:s inverkan på etiopatogenesen för FISS. Även översiktsartiklar har använts för att finna referenser.

LITTERATURÖVERSIKT

FISS

FISS kallades från början "vaccine-associated sarcoma" (VAS) eftersom tumörerna uppkommer vid typiska platser för vaccinering hos katt. VAS är dock inte längre en passande benämning sedan man upptäckt att tumörömvandlingen även kan uppkomma efter andra typer av injektioner, så som NSAID (meloxicam), steroider (metylprednisolon), långverkande penicillin, samt mikrochipimplantation (Carminato *et al.*, 2011; Munday *et al.*, 2011; Kass *et al.*, 2003).

Förekomst

FISS står för ungefär 13% av alla hudtumörer hos katt (Wilcock *et al.*, 2012). Tumörerna är av typiskt mesenkymalt ursprung där fibrosarkom är vanligast men även andra typer av sarkom, så som osteosarkom, rhabdomyosarkom, kondrosarkom och histocytiskt sarkom, har påvisats (Hendrick & Brooks, 1994). Lokalisationen för tumörerna skiljer sig från land till land. I Storbritannien är intraskapulär lokalisation vanligast (84%), medan man i USA sett en minskande trend i detta område sedan riktlinjer om att vaccinera distalt på bakbenen implementerats. Proportionen av FISS i den intraskapulära regionen hos amerikanska katter har minskat från 53,4% till 39,5% och istället ökat i höger bakben (rekommenderad plats för rabiesvaccinering) från 1,1% till 9,5%, samt vänster bakben (rekommenderad plats för FeLV-vaccinering) och vänstra laterala abdomen från 11,4% till 13,8% (Shaw *et al.*, 2009; Kass *et al.*, 2003). Kirurgisk behandling av tumörer på dessa platser är smärtsamma, dyra och ofta vanställande. Detta har resulterat i att många praktiserande veterinärer idag väljer att vaccinera sina patienter i svansen eftersom det ger förutsättning för ett enklare kirurgiskt ingrepp i de fall där katten utvecklar FISS (Hendricks *et al.*, 2014).

Prevalensen av FISS skiljer sig mellan olika studier och olika länder. I Nordamerika varierar den rapporterade prevalensen mellan 1/1000 och 1/10 000 administrerade vaccinationsdoser (McEntee & Page, 2001), men enligt en omfattande webbaserad studie kan prevalensen dock vara lägre – 0,32/10 000 doser (Gobar & Kass, 2002). I Europa är litteraturunderlaget för prevalensen mer sparsamt, men verkar ligga på liknande nivå som i Nordamerika (Dean *et al.*, 2013).

Etiopatogenes

Den exakta etiopatogenesen för FISS är okänd, men det finns evidens som tyder på att inflammation spelar en viktig roll. Kronisk inflammation kan leda till neoplastisk omvandling av fibroblaster vilket ger upphov till sarkom och epidemiologiska studier har visat ett starkt samband mellan FISS och vaccination. (Macy & Hendrick, 1996). Studier på vaccinering mot rabies och FeLV har visat att reaktionen är additiv och risken för tumörutveckling ökar med antalet simultana eller upprepade injektioner på samma område. Risken för att en katt utvecklar sarkom ökar med 50% efter en enkel dos jämfört med en katt som ej vaccinerats, vid två doser ökade risken med 127% och tre eller fyra vaccinationsdoser givna samtidigt resulterade i en ökning med 175% (Hendrick, 1999). Vissa virus har förmågan att initiera tumörutveckling hos drabbade individer och kan smitta antingen via miljön eller genom en kontamination av vaccin. I studier där man undersökt förekomsten av olika virus hos drabbade katter för att se om det finns någon association mellan dessa och uppkomsten av FISS kunde man dock konstatera att det är osannolikt att varken felint leukemivirus, feline foamy virus, felint papillomavirus, polyomavirus eller felint immunosuppressivt virus skulle vara involverat i utvecklingen av FISS (Kidney *et al.*, 2002; Kidney *et al.*, 2001a; Kidney *et al.*, 2001b; Kidney *et al.*, 2001c; Kidney *et al.*, 2000). Det råder därför en brett accepterad hypotes att den kritiska rollen i tumörutvecklingen utgörs av en kvarstående inflammation som induceras vid vaccination eller andra injektioner. Tumörformen är dock ovanlig, vilket tyder på att även andra, hittills odefinierade, endogena faktorer spelar in utöver inflammationsprocessen.

Behandling och prognos

Aggressiv kirurgi i ett tidigt skede anses vara det mest effektiva sättet att behandla FISS. För att minska risken för tumöråterfall och öka det sjukdomsfria intervallet (DFI) rekommenderas dock ofta en multimodal behandling där kirurgi kombineras med strålbehandling. Studier har visat att denna typ av behandling kan vara fördelaktig då DFI förlängs till mellan 398 och >1000 dagar jämfört med 60 till >480 dagar vid endast kirurgisk behandling (Saba, 2017). Eftersom lokala recidiv är vanligt trots både aggressiv kirurgi och strålbehandling använder vissa praktiserande veterinärer även kemoterapi för att ytterligare försöka förlänga DFI. Man vet dock relativt lite om vilken roll kemoterapi spelar vid behandlingen av FISS och studier har inte visat på någon signifikant förbättring för behandlingsformen (Saba, 2017; Bregazzi *et al.*, 2001).

p53

Tumörsuppressorgenen p53 kodar för ett nukleärt protein vilket fungerar som en multifunktionell transkriptionsfaktor som i sin tur är viktig för kontrollen av cellulär proliferation. Proteinet spelar en nyckelroll för cellens respons vid skada på DNA genom sin förmåga att reglera cellcykeln och initiera apoptos. Vid skada på DNA kommer mängden p53-protein i cellen stiga i proportion till skadan, dels genom en aktivering som ökar halveringstiden genom att proteinet stabiliseras men förmodligen också på grund av en uppreglering av själva produktionen av p53-protein inne i cellen (Levine, 1997). Detta hindrar cellen från att avancera genom cellcykeln innan reparation av arvsmassan genomförts. I de fall där skadan är irreversibel kommer p53-proteinet inducera apoptos i cellen för att förhindra att en defekt genetisk kod fortskrider till nästa generation dotterceller (Harris, 1996; Pellegata *et al.*, 1996).

Funktion

Aktivering av p53-protein i en cell kan initieras av olika typer av stressande situationer, så som hypoxi eller skada på DNA i form av mutationer eller dubbelsträngsbrott framkallat av γ -strålning, UV-strålning eller kemisk skada. Ett aktiverat p53-protein kan påverka processer i cellen antingen genom direktsignalering eller genom att aktivera och förstärka transkriptionstakten hos en rad gener, exempelvis p21, GADD45 och BAX. Proteinet från p21 kan binda till olika cyklin- och CDK-komplex och på så sätt inhibera dess kinaseffekt, vilket i sin tur leder till cellcykelarrest eftersom dessa komplex behövs för den autonoma kontrollen av cellcykeln. GADD står för ”growth arrest and DNA-damage inducible” och aktiverad GADD45 är involverat i både hämning av cellcykeln och reparation av skadat DNA genom nucleotide excision repair. BAX är en del av Bcl-2 familjen och kan initiera apoptos från sin plats i mitokondriemembranet genom att stimulera frisättning av cytokrom C, ett viktigt signalprotein i apoptoskaskaden (Levine, 1997).

Förutom sina funktioner som ”genomets väktare” har man även sett att p53 spelar en viktig roll för differentieringen av stamceller. Under normala omständigheter kan en stamcell som differentierat ut till en somatisk cell inte återgå till att bli stamcell igen. Differentierade celler som saknar p53 har dock visats kunna återgå till pluripotent stamcellsstadie. Detta kan utnyttjas för att generera så kallade inducerade pluripotenta stamceller (iPSC). Dessa celler är en typ av

pluripotenta stamceller som framställts genom omprogrammering av somatiska celler i en process som kallas dedifferentiering. Typiskt sker detta till följd av att man inkorporerar viralt genom till gensekvensen för Oct4, Sox2, cMyc och Klf4, vilka är fyra gener som kodar för transkriptionsfaktorer associerade med pluripotens. När detta görs i fibroblastceller från möss med intakt p53 kommer man endast se en dedifferentiering till iPSC i 0,1% av fallen, eftersom p53 kraftigt försämrar effekten av transkriptionsfaktorerna. Vid förlust av p53 kommer dock dedifferentieringen ske med en frekvens av 20% vilket gör att cellidentiteten hos individer med icke-fungerande p53 utan större problem kan skifta reversibelt mellan iPSC- och fibroblaststadie. Dessutom behöver man vid förlust av p53 endast uppreglera två av transkriptionsfaktorerna (Oct4 och Sox2) för att stimulera fibroblaster till att dedifferentiera tillbaka till iPSC. Forskning tyder på att tumöromvandling och iPSC-generering delar liknande utveckling och man kan därför tänka sig att cancerstamceller skulle kunna genereras genom omprogrammering till följd av förlust av säkerhetssystem så som p53. Genom att återaktivera den normala aktiviteten av p53 hos cancerstamceller med PSC-liknande egenskaper kan p53 hämma dessa egenskaper hos cancerstamcellerna, vilket begränsar deras invasivitet, metastaserande förmåga och proliferativa potential (Lin & Lin, 2017).

Dysfunktion

Genen för p53 innefattar elva exoner som tillsammans kodar för ett 53kDa protein bestående av 393 aminosyror. Mutationer i p53-genen kan uppkomma genom både endogena och exogena mutagena mekanismer och är vanligt förekommande vid human cancer där de kan ha betydelse för både initiering och utveckling av tumörer. De flesta mutationer uppkommer i så kallade "hot spots" vilka främst ligger i exon fem till och med åtta (Greenblatt *et al.*, 1994). Missensmutationer (en sorts punktmutation där en nukleotid byts ut, vilket resulterar i att fel aminosyra kodas) i p53-genen leder till ett förändrat protein medan frameshift- eller nonsensmutationer leder till att cellen tappar sin förmåga att skapa p53-protein på grund av förskjuten läsram respektive felaktigt insatt stoppkodon.

Detektering

Normalt p53-protein är vanligtvis inte detekterbart med hjälp av immunhistokemisk infärgning eftersom proteinets halveringstid är så kort (15–20 minuter). Endogena eller exogena faktorer så som mutationer eller skada i gensekvensen för p53 kan dock leda till konformationsändringar i proteinet som därmed stabiliseras, får en ökad halveringstid och följaktligen ackumuleras till detekterbara nivåer i cellkärnan (Greenblatt *et al.*, 1994; Hollstein *et al.*, 1991). Ett relativt smidigt sätt att upptäcka muterat p53 är därför att bedöma styrkan av en immunkemisk infärgning; en signifikant korrelation mellan mutation i genen för p53 och immunkemiskt detekterbara proteinnivåer i cellen har påvisats (Nambiar *et al.*, 2000). I en studie på human bröstcancer kunde man påvisa att en kombination av olika antikroppar var en känsligare mätmetod än att använda endast en ensam typ av antikropp för att påvisa muterat p53 i tumörceller (Elledge *et al.*, 1994). Två antikroppar som kan användas för att färga in p53-protein är CM-1 och mAb240, även kallad PAb240. CM-1 är en polyklonal antikropp med ursprung från kanin, den kan binda till både normalt och muterat p53-protein. mAb240 är en monoklonal antikropp med ursprung från mus och som binder specifikt till muterat p53-protein. Båda dessa antikroppar är utformade för att binda till humant p53-protein, men de har även

visats kunna användas för immundetektion av p53-protein hos flera domesticerade djur, däribland katt (Albaric *et al.*, 2001).

Ett annat sätt att undersöka om en vävnad innehåller celler med muterat p53-protein är att med hjälp av polymeraskedjereaktion (PCR) amplifiera gensekvensen för p53 och därmed kunna hitta olika typer av mutationer direkt i gensekvensen för p53-genen.

p53 och FISS

Kattens p53-gen har blivit fullständigt sekvenserad och är homolog med människans p53 till 82% (Okuda *et al.*, 1993). För att undersöka den eventuella roll som en muterad p53-gen kan ha för uppkomsten av FISS har flera studier gjorts där man antingen studerat mängden p53 i tumörceller med hjälp av immunhistokemi eller genom att studera delar av DNA från tumörceller med hjälp av PCR och kolla på sambandet mellan mutationer i p53-genen och förekomst av tumörbildning och prognos för FISS.

I en studie där man tagit DNA från neoplastisk och frisk vävnad från 21 konstaterade fall av FISS och undersökt dessa vävnader för tre stora regioner av p53-genen med hjälp av PCR fann man att tumörceller i 24% av fallen innehöll mutationer. De 21 vävnader som valts ut kom från en tidigare studie där de färgats in immunhistokemiskt med antikroppen CM-1. Åtta av vävnaderna var starkt infärgade (hög förekomst av p53-protein) och 13 av vävnaderna var svagt infärgade eller saknade infärgning. Med hjälp av PCR kunde man se att neoplastiska celler från 62.5% av vävnaderna med stark infärgning uppvisade missensemutationer inom p53-genen vid sekvensanalysen, medan inga mutationer upptäcktes i tumörvävnaderna med svag eller avsaknad infärgning. Icke-neoplastisk vävnad som angränsat till tumörvävnaden saknade mutationer för samtliga 21 fall (Nambiar *et al.*, 2000). Samma forskargrupp publicerade ett år senare en studie där man färgat in 40 vävnader från diagnostiserade fall av FISS med hjälp av immunhistokemi. Resultatet visade stark infärgning med CM-1 antikroppar för p53-protein i cellkärnorna hos 42.5% av tumörcellerna (Nambiar *et al.*, 2001).

En annan studie, som med hjälp av immunhistokemi undersökt prevalensen av muterat p53-protein i tumörceller från FISS, resulterade i en prevalens på 56%. Av de 50 sarkom som behandlats med CM-1 var det 28 fall där intensiv infärgning av p53 kunde påvisas i cellkärnan hos tumörcellerna. (Nieto *et al.*, 2003)

Ytterligare en immunhistokemisk studie, genomförd av Hershey *et al.* (2005), kunde påvisa ett samband mellan FISS och förekomst av p53-protein i tumörcellerna. I denna studie ville man dels undersöka om det förekom förändringar i uttrycket av p53-protein i tumördrabbade celler från FISS och dels jämföra skillnader i resultat beroende på vilken typ av antikroppar som använts till infärgning av cellerna, man räknade dessutom på om det fanns någon signifikant skillnad mellan förekomst av p53-protein, i cellkärnan respektive cytoplasman, och överlevnadstid eller tid till återfall hos drabbade katter. Studiepopulationen bestod av 80 tumörvävnader från 80 katter med FISS och man använde initialt fem olika typer av antikroppar (CM-1, DO1, DO7, 1801, 204). Tre av de monoklonala antikropparna (DO1, DO7, 1801) reagerade dock inte med någon av vävnaderna, vilket ansågs bero på en bristande homologi

med felint p53-protein. Den slutliga uppsättningen antikroppar som användes i studien blev därmed den polyklonala antikroppen CM-1 och den monoklonala antikroppen 240 (mAb240). Ett positivt resultat definierades som en nukleär eller cytoplasmatisk infärgning av maligna fibroblaster som var mer intensiv än omgivande icke-neoplastisk vävnad. Man fann att av de 80 vävnader som infärgats var 81% positiva med mAb240 och 55% var positiva med CM-1. Av de 65 prover som färgats positivt med mAb240 var infärgningen begränsad till cellkärnan i 15 fall (23,1%), endast cytoplasmatisk infärgning sågs i 36 av fallen (55,4%), medan en kombination av nukleär och cytoplasmatisk infärgning sågs i 14 fall (21,5%). Av de 44 prover som färgats positivt med CM-1 var infärgningen begränsad till cellkärnan i 30 fall (68,2%), endast cytoplasmatisk infärgning sågs i 12 av fallen (27,3%), medan en kombination av nukleär och cytoplasmatisk infärgning sågs i 2 fall (4,5%). För de katter där man kände till det kliniska utfallet (n = 61) kunde man se en signifikant (P = 0.0284) skillnad i tiden för återfall mellan katter där man funnit cytoplasmatisk p53 immunreaktivitet och de som haft nukleär immunreaktivitet. För de katter där man sett en positiv cytoplasmatisk infärgning av p53-protein kunde man konstatera en kortare tid till tumöråterfall postoperativt (135 dagar) än hos de katter där man sett en positiv nukleär infärgning (325 dagar).

I en studie, som med hjälp av PCR-analys undersökt somatiska förändringar i exon 5 till och med 8 i genen för p53 från tumörceller hos 27 katter som drabbats av FISS, kunde man genom nukleotidsekvensanalys finna åtta olika typer av enbaspolymorfi (SNP). 74% av katterna i studien uppvisade heterozygositet vid minst en av dessa polymorfa platser i genen. Av dessa katter uppvisade 60% loss of heterozygosity (LOH) i p53-genen från tumörceller. Katterna i studien följdes upp för regelbunden undersökning under minst tre års tid efter kirurgisk behandling av FISS och skillnader i sjukdomsfria intervaller (DFI) och allmän överlevnad analyserades. Man fann då att LOH-positiva katter (katter som var drabbade av en p53-deletion) var signifikant (P < 0.001) associerade med både snabbt tumöråterfall och reducerad allmän överlevnad till skillnad från LOH-negativa katter (katter utan den somatiska förlusten av p53 i sin tumörvävnad). Man genomförde även en regressionsanalys för att studera om andra faktorer så som ålder, vikt, tid sedan vaccination, tumörstorlek och kön påverkade sjukdomsutfallet, men kunde inte se någon signifikant skillnad mellan dessa parametrar och sjukdomsåterfall. Dock kunde sambandet mellan LOH i p53-genen och tumöråterfall bekräftas (RR = 42.35, P = 0.001) även med denna analysmetod (Banerji & Kanjilal, 2006).

DISKUSSION

Sedan början av 1990-talet har vaccinationer kopplats till uppkomsten av aggressiva sarkom hos katt. Trots att sjukdomen är relativt ovanlig och endast uppkommer hos 0.32 till 10 katter per 10,000 vaccinationsdoser så bidrar den dåliga prognosen till en stor oro hos veterinärer och djurägare världen över. Detta har lett till en rad forskningsinsatser som likväl, än idag, ej kunnat fastställa en klar verkningsmekanism bakom tumöruppkomsten. Detta tyder på en komplicerad multifaktoriell etiopatogenes som inkluderar både inflammatoriska och genetiska processer. Aggressiv kirurgi i ett tidigt skede anses vara det mest effektiva sättet att behandla tumörformen, medan adjuvant behandling i form av strålterapi kan vara gynnsam. Cytostatika har ej bevisats förbättra prognosen men används ändå av vissa praktiserande veterinärer i ett försök

att minska risken för tumöråterfall. Denna spridda praxis tyder på ett behov för mer omfattande studier där en uttalad metod för bästa möjliga behandling kan fastställas.

Den låga prevalensen av FISS tyder på att drabbade katter tillhör en subpopulation av känsliga individer där endogena faktorer är en förutsättning för tumörutveckling. I miljön som uppstår efter en vaccination, där inflammation, nekros och cellproliferation kan förekomma, är ett fungerande p53 viktigt för att säkerställa DNA-replikationen och initiera apoptos i celler där skada på arvsmassan ej går att reparera. Celler som saknar p53 eller där proteinet tappat sin funktion på grund av mutationer kan därmed genomgå cellcykeln obehindrat, vilket kan ge upphov till avvikande kloner och malign transformation. Detta kan ses hos människor som lider av Li-Fraumeni syndrom, vilket betyder att de föds med endast en funktionell kopia av p53-genen, vilket medför en predisposition för en rad olika tumörtyper, så som sarkom, bröstcancer och hjärntumörer, om den andra (normala) allelen drabbas av somatisk mutation. I studien av Nambiar *et al.* (2000) undersöktes vaccinassocierade sarkom från 21 katter och man fann missensemutationer i p53-genen hos 24% av fallen. De närliggande celler som ej var tumöromvandlade saknade dock mutationer i p53 för samtliga 21 tumörer. Detta tyder på att en genetiskt nedärvd mutation i p53-genen, så som i fallet med Li-Fraumeni syndrom hos människa, ej sannolikt är orsaken bakom den ökade tumörkänsligheten hos katter som drabbas av FISS.

Att undersöka om vävnader innehåller mutationer genom att använda PCR är en arbetskrävande och kostsam process. Dessutom återfinns 87% av alla mutationer i genen för p53 hos människa mellan exon 5 och exon 8. Dessa två faktorer medför att många av de studier som genomförts på FISS har utgått ifrån att begränsa sin PCR-analys till detta intervall och följaktligen riskerar man att underskatta prevalensen av p53. Även mutationer i någon av genens tio introner har visats kunna ge upphov till fenotypiska förändringar, så en underskattning av prevalensen kan även ske om mutationer uppkommit i någon av dessa icke-kodande regionerna (Greenblatt *et al.*, 1994). Fler studier där man analyserar hela gensekvensen för p53, både exoner och introner, är därför önskvärd för att få ett bättre mått på den sanna prevalensen av p53-mutationer i tumörvävnader från FISS.

Två faktorer som kan spela in när man mäter prevalensen av mutationer i genen för p53 med hjälp av immunhistokemi är dels typen av mutation som drabbat genen och dels valet av antikropp. Frameshiftmutationer och nonsensmutationer kan leda till att produktionen av p53 sätts ur spel (Greenblatt *et al.*, 1994) vilket gör att immunhistokemiska infärgningen visar ett falskt negativt resultat eftersom inget protein kan detekteras. Prevalensen av mätbara halter p53-protein i tumörceller från FISS har visats ligga mellan 42.5 – 56% vid användning av antikroppen CM-1 (Hershey *et al.*, 2005; Nieto *et al.*, 2003; Nambiar *et al.*, 2001) medan prevalensen vid användning av antikroppen mAb240 visats ligga på 81% (Hershey *et al.*, 2005), vilket tyder på att många immunokemiska studier grundats på infärgning med en antikropp som med stor sannolikhet leder till underskattning av den sanna prevalensen. Studien av Elledge *et al.* (1994) påvisade dessutom att en kombination av olika antikroppar är en känsligare mätmetod än att använda endast en ensam typ av antikropp. Dessa är ytterligare tecken på att prevalensen av mutationer i p53 kan vara underskattad i studier som genomförts på FISS.

Prevalensen för ackumulering av p53-protein i tumörceller från FISS som detekterats med hjälp av immunhistokemi skiljer sig i olika studier mellan 42.5–81% (Hershey *et al.*, 2005; Nieto *et al.*, 2003; Nambiar *et al.*, 2001; Nambiar *et al.*, 2000). Detta antyder att mutationer i genen för p53 kan vara ett gemensamhetsdrag för FISS som spelar en roll för verkningsmekanismen vid denna typ av cancer. Mer forskning på området behövs dock för att kunna fastställa huruvida muterat p53 har en faktisk effekt på själva tumörutvecklingen eller om det är en oberoende respons på annan DNA-skada eller andra faktorer; normalt p53 har i vissa fall påvisats med immunhistokemi på grund av stabiliserande faktorer till följd av interaktion med virala proteiner eller i celler som ökat uttrycket av p53 på grund av stress och yttre påtryckningar (Vojtesek & Lane, 1993; Maltzman & Czyzyk, 1984). Man bör därför vara försiktig med att dra för stora växlar på resultat som endast baseras på kvantifiering av immunhistokemiska svaret.

Enligt studien av Hershey *et al.* (2005) var det relativt vanligt med cytoplasmatisk infärgning av p53-protein i tumörceller från FISS när mAb240 antikroppar användes. Detta stämmer överens med forskning gjord på människa där man sett att flera typer av tumörer ofta har onormal förekomst av p53-protein i cytoplasman hos cancerceller. Att man i studien även sett ett signifikant samband mellan cytoplasmatisk förekomst av p53-protein och tiden för återfall är mycket spännande ur behandlingssynpunkt. Immunhistokemisk undersökning för påvisning av p53-protein är en relativt enkel metod och skulle därför kunna utformas till ett diagnostiskt hjälpmedel för att bättre kunna beräkna prognosen för drabbade patienter. Det behövs dock mer forskning på området och större försöksgrupper för att kunna bekräfta att sambandet gäller för en större patientgrupp. Viss forskning på human cancer stödjer hypotesen att en onormal förekomst av p53-protein i cytoplasman från tumörceller korrelerar med sämre prognos (Pukkila *et al.*, 2002; Flamini *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1992).

Det finns i dagsläget inga konkreta bevis som stödjer hypotesen att mutationer i p53-genen ligger bakom tumörutvecklingen vid FISS. Däremot är både onormal förekomst av p53-protein och mutationer i genen för p53 ett vanligt förekommande fenomen i tumörceller från FISS, vilket tyder på att p53-mutationer kan vara en del av en multifaktoriell verkningsmekanism. Dessutom har både loss of heterozygosity (LOH) i p53-genen och förekomst av p53-protein i cytoplasman hos tumörceller från FISS visat sig leda till en försämrad överlevnadsprognos för drabbade katter (Banerji, 2006; Hershey 2005). Eftersom tumörer med p53-mutationer ofta är mer aggressiva skulle därför en metod för att indikera p53-status hos patienten kunna utgöra ett intressant diagnostiskt verktyg för att beräkna prognosen för katter som drabbats av FISS.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Albaric, O., Bret, L., Amardeihl, M. & Delverdier, M. (2001). Immunohistochemical expression of p53 in animal tumors: a methodological study using four anti-human p53 antibodies. *Histology and Histopathology* 16(1), 113-121.
- Banerji, N. & Kanjilal, S. (2006). Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *American Journal of Veterinary Research* 67(10), 1766-1772.
- Bregazzi, V.S., LaRue, S.M., McNiel, E., Macy, D.W., Dernell, W.S., Powers, B.E. & Withrow, S.J. (2001). Treatment with a combination of doxorubicin, surgery, and radiation versus surgery and radiation alone for cats with vaccine-associated sarcomas: 25 cases (1995-2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218(4), 547-550.
- Carminato, A., Vascellari, M., Marchioro, W., Melchiotti, E. & Mutinelli, F. (2011). Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Veterinary Dermatology* 22(6), 565-569.
- Dean, R.S., Pfeiffer, D.U. & Adams, V.J. (2013). The incidence of feline injection site sarcomas in the United Kingdom. *BMC Veterinary Research* 9(17)
- Dubielzig, R.R., Everitt, J., Shaddock, J.A. & Albert, D.M. (1990). Clinical and morphologic features of posttraumatic ocular sarcomas in cats. *Veterinary Pathology* 27(1), 62-65.
- Elledge, R.M., Clark, G.M., Fuqua, S.A.W., Yu, Y.Y. & Allred, D.C. (1994). P53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Research* 54(14), 3752-3757.
- Flamini, G., Curigliano, G., Ratto, C., Astone, A., Ferretti, G., Nucera, P., Sofo, L., Sgambato, A., Boninsegna, A., Crucitti, F. & Cittadini, A. (1996). Prognostic significance of cytoplasmic p53 overexpression in colorectal cancer. An immunohistochemical analysis. *European Journal of Cancer* 32A(5), 802-806.
- Fry, P.D. & Jukes, H.F. (1995). Fracture associated sarcoma in the cat. *Journal of Small Animal Practice* 36(3), 124-126.
- Gobar, G.M. & Kass, P.H. (2002). World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220(10), 1477-1482.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. & Harris, C.C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 54(18), 4855-4878.
- Harris, C.C. (1996). Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute* 88(20), 1442-1455.
- Hendrick, M.J. (1999). Feline vaccine-associated sarcomas. *Cancer Investigation* 17(4), 273-277.
- Hendrick, M.J. & Brooks, J.J. (1994). Postvaccinal sarcomas in the cat - histology and immunohistochemistry. *Veterinary Pathology* 31(1), 126-129.
- Hendricks, C.G., Levy, J.K., Tucker, S.J., Olmstead, S.M., Crawford, P.C., Dubovi, E.J. & Hanlon, C.A. (2014). Tail vaccination in cats: a pilot study. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16(4), 275-280.
- Hershey, A.E., Dubielzig, R.R., Padilla, M.L. & Helfand, S.C. (2005). Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Veterinary Pathology* 42(6), 805-811.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. (1991). P53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015), 49-53.
- Kass, P.H., Spangler, W.L., Hendrick, M.J., McGill, L.D., Esplin, D.G., Lester, S., Slater, M., Meyer, E.K., Boucher, F., Peters, E.M., Gobar, G.G., Htoo, T. & Decile, K. (2003). Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223(9), 1283-+.
- Kidney, B.A., Ellis, J.A., Haines, D.M. & Jackson, M.L. (2000). Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues obtained from vaccine site-associated sarcomas of cats for DNA of feline immunodeficiency virus. *American Journal of Veterinary Research* 61(9), 1037-1041.
- Kidney, B.A., Ellis, J.A., Haines, D.M. & Jackson, M.L. (2001a). Comparison of endogenous feline leukemia virus RNA content in feline vaccine and nonvaccine site-associated sarcomas. *American Journal of Veterinary Research* 62(12), 1990-1994.

- Kidney, B.A., Haines, D.M., Ellis, J.A., Burnham, M.L. & Jackson, M.L. (2001b). Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for polyomavirus DNA and antigen. *American Journal of Veterinary Research* 62(6), 828-832.
- Kidney, B.A., Haines, D.M., Ellis, J.A., Burnham, M.L. & Jackson, M.L. (2002). Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from feline vaccine site-associated sarcomas for feline foamy virus DNA. *American Journal of Veterinary Research* 63(1), 60-63.
- Kidney, B.A., Haines, D.M., Ellis, J.A., Burnham, M.L., Teifke, J.P., Czerwinski, G. & Jackson, M.L. (2001c). Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *American Journal of Veterinary Research* 62(6), 833-839.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3), 323-331.
- Lin, T. & Lin, Y. (2017). p53 switches off pluripotency on differentiation. *Stem cell research & therapy* 8(1), 44.
- Macy, D.W. & Hendrick, M.J. (1996). The potential role of inflammation in the development of postvaccinal sarcomas in cats. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 26(1), 103-&.
- Maltzman, W. & Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Molecular and Cellular Biology* 4(9), 1689-1694.
- McEntee, M.C. & Page, R.L. (2001). Feline vaccine-associated sarcomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15(3), 176-182.
- Munday, J.S., Banyay, K., Aberdein, D. & French, A.F. (2011). Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13(12), 988-991.
- Nambiar, P.R., Haines, D.M., Ellis, J.A., Kidney, B.A. & Jackson, M.L. (2000). Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *American Journal of Veterinary Research* 61(10), 1277-1281.
- Nambiar, P.R., Jackson, M.L., Ellis, J.A., Chelack, B.J., Kidney, B.A. & Haines, D.M. (2001). Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Veterinary Pathology* 38(2), 236-238.
- Nieto, A., Sanchez, M.A., Martinez, E. & Rollan, E. (2003). Immunohistochemical expression of p53, fibroblast growth factor-b, and transforming growth factor-alpha in feline vaccine-associated sarcomas. *Veterinary Pathology* 40(6), 651-658.
- Okuda, M., Umeda, A., Matsumoto, Y., Momoi, Y., Watari, T., Goitsuka, R., O'Brien, S.J., Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (1993). Molecular cloning and chromosomal mapping of feline p53 tumor suppressor gene. *Journal of Veterinary Medical Science* 55(5), 801-805.
- Pellegata, N.S., Antoniono, R.J., Redpath, J.L. & Stanbridge, E.J. (1996). DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(26), 15209-15214.
- Pukkila, M.J., Kumpulainen, E.J., Virtaniemi, J.A., Johansson, R.T., Halonen, P.M., Kellokoski, J.K., Kosunen, A.S.T., Nuutinen, J. & Kosma, V.M. (2002). Nuclear and cytoplasmic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: Prognostic implications. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* 24(8), 784-791.
- Saba, C.F. (2017). Vaccine-associated feline sarcoma: current perspectives. *Veterinary Medicine-Research and Reports* 8, 13-20.
- Shaw, S.C., Kent, M.S., Gordon, I.K., Collins, C.J., Greasby, T.A., Beckett, L.A., Hammond, G.M. & Skorupski, K.A. (2009). Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association* 234(3), 376-380.
- Sun, X.F., Carstensen, J.M., Zhang, H., Stal, O., Wingren, S., Hatschek, T. & Nordenskjold, B. (1992). Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 340(8832), 1369-1373.
- Vojtesek, B. & Lane, D.P. (1993). Regulation of p53 protein expression in human breast cancer cell lines. *Journal of Cell Science* 105, 607-612.
- Wilcock, B., Wilcock, A. & Bottoms, K. (2012). Feline postvaccinal sarcoma: 20 years later. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 53(4), 430-434.