

KARAKTÄRISERING AV HUND TK1 FÖR ANVÄNDNING SOM TUMÖRMARKÖR

Cecilia Fröberg

Handledare: Staffan Eriksson, Liya Wang
Inst. för molekylärbiovetenskap, Sektionen för veterinärmedicinsk biokemi

**Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet**

**Examensarbete 2006:54
ISSN 1652-8697
Uppsala 2006**

SAMMANFATTNING	4
ABSTRACT	5
INLEDNING	6
METODER OCH MATERIAL	8
Lymfocytpreparering	8
Preparering av hundfibroblaster.....	9
Bestämning av proteinkoncentration	9
Bestämning av enzymaktivitet.....	9
Framställande av hund TK1	9
Test av antikroppar mot hund TK1 samt humant TK1	10
Ouchterlony – immunodiffusion.....	10
RESULTAT	10
TK1 aktivitet hos extrakt av hundlymfocyter och hundfibroblaster.....	10
Framställande av hund TK1	10
Test av antikroppar mot hund TK1	11
Test av antikroppar mot humant TK1	13
Ouchterlony – immunodiffusion.....	15
DISKUSSION.....	15
TACK.....	17
REFERENSER	18

SAMMANFATTNING

Thymidin kinas 1 (TK1) är ett intracellulärt enzym som är involverat i "the salvage pathway" där de ofärdiga byggstenarna till DNA omvandlas till DNA precursorer. TK1 uttrycks cellcykelspecifikt, med det största uttrycket i S-fas när DNA-syntesen är mest aktiv. En form av TK1 finns i serum och ökad aktivitet av TK1 i serum avspeglar antingen nivån av DNA-syntes i kroppen eller antalet celler som dör i stadier av DNA replikation. Detta kan användas och används som markör för prognos och utvärdering av behandling för bland annat leukemi och lymfom inom humanmedicin. Det har gjorts studier där testen som utvecklats för humanmedicin använts på serum från hundar med malignt lymfom för att utvärdera om serumnivåer av TK1 även kan användas som prognos för sjukdomsstadie och överlevnad på hund och resultaten ser lovande ut. De test som finns kommersiellt tillgängliga idag riktar sig till humanmedicin och använder sig av radioaktivitet, vilket gör att det inte är praktiskt eller ekonomiskt möjligt att använda dessa kliniskt inom veterinärmedicinen. Det behövs därför en metod som möjliggör ett billigt och enkelt test. I denna studie utvärderas om specifika anti-hund TK1 antikroppar kan framställas och därmed lägga grund för en ELISA. Antikroppar har framställts genom att kaniner immuniserats med en syntetisk peptid från hund TK1 och serum från dessa kaniner har sen samlats och blandats med hundcellsextrakt med TK1-aktivitet och sänkningen av aktiviteten har använts som mått på om antikropparna kunde binda hund TK1. I studien visas att det går att skapa arts specifika antikroppar som binder hund TK1 bra, samt antikroppar som binder både hund och humant TK1. Detta öppnar för vidare studier av antikropparna för att kunna utveckla en ELISA som är både billig och säker.

ABSTRACT

Thymidine kinase 1 (TK1) is an intracellular enzyme involved in "the salvage pathway" where the uncomplete parts of DNA are transformed into DNA precursors. The expression of TK1 is cell cycle specific, with the highest level during S-phase when DNA-synthesis is most active. One kind of TK1 is present in serum and an increase in TK1 activity in serum is due to either the level of DNA synthesis in the body or the number of cells dying in a state of replication. This can be used and is used as a marker for prognosis and evaluation of treatment in human patients with leukaemia and lymphoma. A study has been performed in which the test evaluated for human medicine has been used on serum from dogs with malignant lymphoma. The purpose of the study was to evaluate whether serum levels of TK1 could be used as prognostic tumour marker in dogs as well as humans and the results are promising. The test commercially available today has been evaluated for human medicine and uses radioactivity, which makes it neither practical nor clinically useful in veterinary medicine. For this reason, a method enabling a simple and less expensive test is required. The purpose of this study is to explore the possibility of making specific anti- dog TK1 antibodies to be used in an ELISA. Antibodies have been produced by immunizing rabbits with a synthetic piece of a peptide of dog TK1. Serum from these rabbits was collected and mixed with dog cell extract with TK1 activity. The reduced activity has been used as a measurement of the antibodies capacity to bind dog TK1. This study shows that it is possible to produce antibodies specific to canine TK1 with adequate binding capacity. It has also been shown that these antibodies bind both human and canine TK1. These findings pave the way for further studies of these antibodies in order to develop an ELISA that is both cheap and reliable.

INLEDNING

Thymidinkinase 1 (TK1) är ett intracellulärt enzym som är involverat i ”the salvage pathway” där ribonukleosider eller deoxyribonukleosider, det vill säga de ofärdiga byggstenarna till DNA, bestående av en bas och en sockermolekyl, omvandlas till DNA precursorer med tre fosfatgrupper. TK1 fosforilerar dThd (2'-deoxythymidine) och dUrd (2'-deoxyuridine) till monofosfaterna dTMP (deoxythymidin monofosfat) respektive dUMP (deoxyuridine monofosfat). ATP är i första hand fosfordonator. TK1 hämmas av slutprodukten dTTP. Enzymet förekommer i homodimer eller homotetramer form där varje subenhet är ca 24 kDa. Den humana TK1 genen är klonad och är i sin helhet 12,9 kb. Den har sju exoner och cDNA är 1241 bp och kodar för ett 234 aminosyror långt protein. TK1 eller TK1-liknande gener verkar vara vanligt förekommande i många organismer, både vertebrater/ryggradsdjur och ickevertebrater samt växter, bakterier och virus. (Eriksson et al., 2002; Jacobsson, 1998) Gener för humant- och hund TK1 uppvisar en aminosyrorsekvenslikhet på 88,5 % och en diversitet på endast 9,1 %, där de flesta olikheterna finns i C-terminala delen av proteinet (Pub Med Accession number: XP_540462). (Fig. 1)

TK1 uttrycks cellcykelspecifikt med det största uttrycket i celler i S-fas när DNA-syntesen är som mest aktiv (Eriksson et al., 2002). En form av TK1 finns i serum och en ökad aktivitet av TK1 i serum avspeglar antingen nivån av DNA-syntes i kroppen eller antalet celler som dör i stadier av DNA replikation (von Euler et al., 2004). TK1 läcker dessutom från mitotiska maligna celler och nivån av TK1 (s-TK1) i blodet kan då användas som prognostisk markör (Jacobsson, 1998). Mätning av sTK1 används idag inom humanmedicin för prognos och utvärdering av behandling för bland annat leukemi, multipla myelom, Hodgkins lymfom och non-Hodgkins lymfom (von Euler et al., 2004).

Malignt lymfom är en av de vanligaste tumörerna som diagnostiseras och står för mellan 5 – 7 % av alla tumörer hos hund (Ettinger, 2003). Den förekommer hos djur i alla åldrar, men drabbar oftast hundar i medelåldern, 5-9 år. Den delas upp i fyra former efter var den är lokaliserad: alimentär, kutan, mediastinal och multicentrisk form. Den senare formen är vanligast (ca 80 % av alla maligna lymfom) och ger generellt förstörade lymfknutor, den är ofta asymptomatisk men kan ge symptom som anorexi, kräkningar, diarré, melena och feber. Vid mediastinal form kan dyspné och minskad arbetstolerans förekomma, samt hypokalcemi i vissa fall. Den kutana formen kan ha många olika utseenden från en solitär tumör till generaliserade förändringar. Vid alimentär form är det tunntarmen som infiltreras och symptomen är kräkningar, diarré och melena. Sjukdomen graderas också histologiskt i låg, intermediär och hög grad av malignitet där prognos och behandling varierar mellan de olika graderna. Låggradigt malignt lymfom fortskrider långsamt och svarar dåligt, eller bara delvis, på kemoterapi. Höggradigt malignt lymfom har ett snabbare förlopp med hög mitotisk aktivitet och svarar bättre på kemoterapi. Sjukdomen delas dessutom i stadier från I som är tidigt stadium där en lymfknuta är affekterad, till V som är sent stadium då blod och benmärg också är drabbade. Detta görs idag baserat på klinisk undersökning, blod- och urinprover, röntgen och cytologi på vävnader och benmärg. (Ettinger, 2003; McGavin et al., 2001)

Malignt lymfom går ej att bota helt hos hund, men tidig upptäckt och välfungerande kemoterapi kan kontrollera sjukdomen och därför är tidig diagnos och fortsatt utvärdering av klinisk status hos hundar med malignt lymfom väldigt viktig. Detta sker idag med hjälp av histopatologi och cytologi vilket innebär att fall där det är svårt att få vävnadsprov ej får samma uppföljning och kontroll. I dessa fall skulle en icke-invasiv diagnostik vara extra värdefull (Nakamura, 1997).

En studie har gjorts där ett test som utvecklats för humanmedicin använts på serum från hundar med malignt lymfom för att utvärdera om aktivitet av sTK kan användas som tumörmarkör för prognos och utvärdering av behandlig (von Euler et al., 2004). Serum från 98 hundar med malignt lymfom, icke-hematologiska tumörer eller friska hundar testades för initial sTK aktivitet (Fig. 2). Hundarna med malignt lymfom (44 stycken) behandlades och deras sTK aktivitet mättes före och fyra veckor efter behandling fram till de fick återfall. Dessa hade signifikant högre aktivitet jämfört med de normala hundarna. Genomsnittligt sTK hos hundar med malignt lymfom i fullständig remission var ej signifikant avvikande från den hos de friska kontrollerna. Genomsnittligt sTK minst tre veckor före återfall, samt vid återfall var signifikant högre än aktiviteten mätt vid fullständig remission. Hundar med malignt lymfom som hade sTK i den högre delen av skalan hade signifikant kortare överlevnadstider. Dessutom avspeglade sTK den kliniska graderingen av malignt lymfom. Att mäta sTK kan alltså användas som tumörmarkör för prognos och för att förutsäga återfall av malignt lymfom hos hundar. (von Euler et al., 2004) Detta gör att det är av stort intresse att kлона fram hund TK1, både för att kunna testa om humant och hund TK1 liknar varandra till struktur och substrat specificitet, samt för att i framtiden kunna tillverka ett artspecifikt test för hund sTK1.

Ett sätt att mäta förekomsten av TK1 i serum är att mäta dess aktivitet, kortfattat genom att ge det ett substrat att omvandla/katalysera och sen mäta mängden produkter (förändrat substrat) per tidsenhet, detta kräver att man använder sig av ett radioaktivt substrat. Den metoden finns tillgänglig som ett kommersiellt test på humansidan, TK-REA (radioenzymatic assay), (TK Prolifen assay, DiaSorin AB, Sverige). Nackdelen med detta, från ett veterinärmedicinskt perspektiv, är att det är få eller inga kliniker idag som har ekonomisk möjlighet eller patientunderlag att sätta upp ett sådant test med de krav som användandet av radioaktiva ämnen medför (von Euler et al., 2005). Ytterligare ett sätt att mäta förekomst av TK1 i blod är med ett ELISA-test, vilket förutsätter att man har antikroppar mot substratet eller mot TK1 beroende på om man vill mäta TK1 aktivitet eller enbart serumkoncentration av TK1. En metod som använder sig av antikroppar mot den fosforylerade varianten av thymidinanalogen AZT, AZTMP, har provats på både human och hund TK1 med liknande resultat som vid TK-REA analys (von Euler et al., 2005; Öhrvik et al., 2005). Det finns också beskrivet att man mätt sTK1 med anti-human TK1 antikroppar (He et al., 2000). Däremot har det ej beskrivits någon metod som använder sig av antikroppar mot hund TK1. Därför vore det intressant och värdefullt att framställa anti-hund TK1 antikroppar och utvärdera om det skulle vara en ytterligare bättre och enklare metod som kan användas inom veterinärmedicin som prognostisk tumörmarkör hos hund.

Hund	MSCINLPTVLPGPSKTRGQIQVILGPMFSGKSTELMRRVRRFQIAQYKCLVIKYAKDTRYS	80
Human	MSCINLPTVLPGPSKTRGQIQVILGPMFSGKSTELMRRVRRFQIAQYKCLVIKYAKDTRYS	80
Hund	LRDVAQEALGVAVIGIDEGQFFPDI	160
Human	LRDVAQEALGVAVIGIDEGQFFPDI	160
Hund	AYTKRLGSEKEVEVIGGADKYHSVCLRCYFKKASG	243
Human	AYTKRLGTEKEVEVIGGADKYHSVCLRCYFKKASG	235

Fig 1. Jämförelse mellan hund och human TK1 aminosyresekvens. Röd färg visar aminosyror som skiljer mellan de två sekvenserna och gul färg visar konserverade ändringar. Peptidsekvensen som använts vid immuniseringen är i boxen.

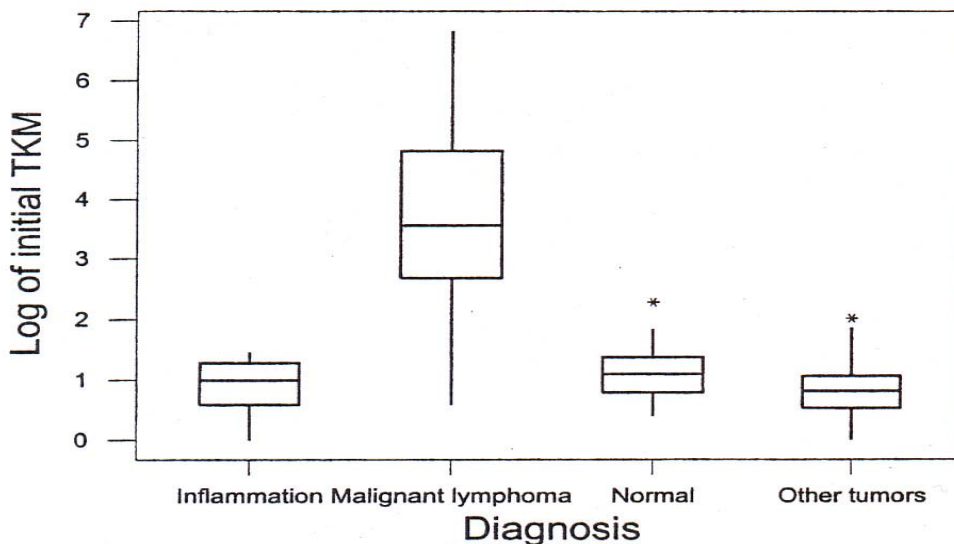


Fig 2. Distribution av serum tyimidinkinas (sTK) aktivitet hos friska hundar, hundar med inflammatorisk sjukdom, hundar med malignt lymfom samt hundar med andra tumörer. (Från von Euler et al., 2004)

METODER OCH MATERIAL

Lymfocytpreparering

Blod från hundar som provtagits vid den kliniska verksamheten vid Smådjurskliniken, SLU och godkänts för användning av djurägarna, användes för cellpreparering. Blod med heparin som antikoagulantia användes och blandades med rumstempererad PBS 1:1. I små centrifugrör hälldes Ficoll- Paque lösning och därefter skiktades blod-PBS blandning ovanpå och detta centrifugerades. Lymfocytlagret pipetterades sedan över till ett rent centrifugrör och tvättades tre gånger. Därefter räknades cellerna och späddes i RPMI 1640 medium plus HEPES buffert, med tillsats av penicillin och streptomycin (PEST) 1 %, hästserum 10 % och Lectin (Phytohemagglutinin) 1,5 %, till en koncentration på 1 miljon celler per ml. Detta delades sen upp i små cellodlingsflaskor (25 cm²) och inkuberades i två dagar i 37°C med 5 % CO₂. Efter två dagar räknades cellerna och fick mer medium samt Lectin och inkuberades ytterligare tre dagar innan de skördades.

Ett celledextrakt av de erhållna lymfocyterna gjordes på följande sätt. Cell- medium-lösningen centrifugerades, supernatanten hälldes av och cellerna tvättades två gånger och därefter resuspenderades cellerna i extraktionsbuffert och fördes över till Eppendorfrör. Därefter vortexerades provet, sen frystes det på torris och etanol

och tinades, efter det behandlades provet med ultraljud och sen centrifugerades det. Supernatanten fördes sen över till eppendorfrör och frystes ned i -80° .

Preparering av hundfibroblaster

En T-75 flaska med fibroblaster preparerade av en juvertumör från en hund erhöles från Tikomed AB och odlades i D-MEM medium med tillsats av Fetalt Bovint Serum (FBS) 10 % och PEST 1 %. När cellerna efter cirka sju dagar täckte flaskans botten delades de genom att trypsin tillsattes så att cellerna lossnade från ytan, därefter späddes de i D-MEM medium och delades upp i fem flaskor och inkuberades återigen i 37°C med 7,5 % CO_2 . Efter sex dagar delades cellerna en gång till och skördades efter ytterligare fyra dagar genom att de lossades från flaskans botten enligt ovan och därefter tvättades och behandlades som lymfocyterna ovan.

Bestämning av proteinkoncentration

Proteinkoncentrationen i cellextrakt bestämdes med spektrofotometri (Bio-Rad protein assay). Som referens användes BSA (Bovin Serum Albumin) och som kontroll ett extrakt av en normal humancell. I Bio Rad-reagent i kyvett tillsattes 0-15 μL av de olika extrakten och en referensgraf skapades med BSA och dess absorbanser vid olika koncentrationer. Med hjälp av funktionen till grafen kunde provets samt humancellens proteinkoncentrationer bestämmas.

Bestämning av enzymaktivitet

Enzymaktiviteten bestämdes med en radiokemisk metod (Ives et al., 1969). Enzymet i lymfocytextraktet fick det radioaktivt märkta substratet $^3\text{H-dThd}$ att fosforilera, med ATP som fosfordonator. Reaktionen startades genom att cellextraktet med enzym i och $^3\text{H-dThd}$ blandades och reaktionen stoppades genom att blandningen sattes på ett jonbytarfilter (DE-82). Detta gjordes efter 0, 10, 20 och 30 minuter för att kunna se om enzymet var aktivt och hur dess bildande av produkt förändrades över tid. Därefter tvättades filterpappren och skillnaden i laddning mellan substrat och produkt användes för att behålla endast produkten på filtret. Som kontroll droppades lite kvarvarande blandning av substrat och enzym på ett filterpapper som ej tvättades och därmed behöll all sin radioaktivitet, vilket användes som mått på den totala aktiviteten i lösningen. I scintillationsräknare mättes aktiviteten genom att mäta sönderfallet från produkten på de olika filterpappren.

Framställande av hund TK1

En inte helt komplett cDNA-klon (647 av 760 bp) av hund TK1 i plasmidvektor pcDNA2.1 i E. coli beställdes (Open Biosystems, AL, USA) och cDNA förlängdes ca 80 bp med hjälp av extra långa primrar och DNA polymeras, därefter klonades det in i pET-14b vektor och bakterien BL21 (DE3) PlysS transfekterades med vektorn. Den odlades ut på LB-agar med ampicillin och kloramfenikol. Därefter togs en koloni till 10 ml flytande LB-medium och inkuberades i 37°C över natten. Därefter fördes övernattekulturen över till 500 ml LB-medium och inkuberades i 37°C . När celldensiteten (OD 600 nm) nådde 0.6 tillsattes IPTG (för att starta uttryckandet av TK1-genen) och de inkuberades ytterligare 3 timmar i 37°C . Sen centrifugerades odlingen och supernatanten

hålldes av och samlade bakterierna i Falconrör. För att frigöra proteinet från cellerna frystes och tinades provet tre gånger och därefter sonikerades det i tre minuter och sen centrifugerades lösningen och supernatanten togs till proteinrening.

Test av antikroppar mot hund TK1 samt humant TK1

Tre kaniner (Ullrika, Kurtis, Dingo) immuniserades med en hund TK1 peptid (aminosyra 196 till 223, se Fig. 1). Immuniseringen gjordes av Agrisera AB (Umeå, Sverige). Serum från före (preserum), samt 2v efter tredje (serum III) och fjärde (serum IV) immuniseringen samlades. För att se om det fanns antikroppar mot hund TK1, blandades olika mängder serum med en bestämd mängd cellextrakt från hundlymfocyterna eller hundfibroblasterna och inkuberades i en timme i 4°C. Därefter tillsattes Protein A Sepharose CL-4B som binder till antikropparna och blandningen inkuberades ytterligare en timme i 4°C. Lösningen centrifugerades därefter för att enzym-antikropps-Sepharose-komplexen skulle fångas i pelleten och supernatanten togs därefter omedelbart till enzymaktivitetsbestämning enligt ovan, för att mäta aktiviteten hos kvarvarande enzym. Preserum och serum IV för respektive kanin testades dessutom för hämning av humant TK1 med humant cellextrakt (CEM-extrakt, från humana T-lymfocyt celler) enligt ovan. Ett nollprov gjordes också där hund eller humant cellextrakt blandade med enbart buffert och Protein A Sepharose för att se den ursprungliga enzymaktiviteten i extrakten.

Ouchterlony – immunodiffusion

En gelplatta med 1 % agaros göts på en plastfilm och brunnar stansades ur gelen i en cirkel, med bestämt avstånd efter en mall. I mitten stansades en större brunn. De små brunnarna fylldes med 10 µl serum från vardera Ullrika, Kurtis och Dingo; humant cellextrakt och renat human TK1. Brunnen i mitten fylldes med 20 µl extrakt av hundfibroblaster. Detta fick sen stå ett dygn i fukt-kammare i rumstemperatur så att antikroppar och antigen/enzym fick diffundera mot varandra och bilda komplex, därefter tvättades gelen från fritt protein och färgades för att eventuella antigen-antikropps-komplex skulle framträda. Av fällningen kunde det utläsas om antikropparna bundit till samma epitop, då smälter linjerna för de olika komplexen ihop. Om man däremot kan se separata linjer har de bundit till olika epitop.

RESULTAT

TK1 aktivitet hos extrakt av hundlymfocyter och hundfibroblaster

En mätning av enzymaktiviteten hos cellextraktet av hundlymfocyterna gjordes och aktiviteten var 1204 - 1264 pmol/min/mg. I cellextraktet av hundfibroblaster gjordes också en mätning av aktiviteten, som befanns vara 24 - 25 pmol/min/mg.

Framställande av hund TK1

Hund TK1 cDNA blev förlängt och klonat in i plasmidvektorn men uttrycka hund TK1 proteinet visade sig vara problematiskt. Därför gick det ej att få fram tillräcklig mängd rekombinant TK1 för karakterisering under projekttiden. Detta kan bero på bakterien eller vektorn som användes för att uttrycka det klonade DNA:t hade förändrats och en ny konstruktion krävdes.

Test av antikroppar mot hund TK1

Först användes samma mängd cellextrakt och preserum eller serum (10 μ l) och aktiviteten hos TK1 i cellextraktet mättes. Aktiviteten i proven med preserum från alla tre kaniner låg nära den för den positiva kontrollen, ingen eller väldigt låg hämning kunde ses. Proven med tillsats av serum III (det vill säga efter andra immuniseringen) uppvisade en tydligt sänkt aktivitet, med liten inbördes skillnad, alla tre hämmade TK1. Dock visade provet för Ullrika en något högre hämning och Dingo en något lägre hämning. I proven med serum IV kunde en ytterligare lägre aktivitet ses, med samma trend att Dingo uppvisade den något lägre hämningen (Fig. 3). I senare prov då olika mängder serum IV från de olika kaninerna blandades med en bestämd mängd cellextrakt, uppvisade alla tre en snarlik kurva för aktivitetsförändring. Aktiviteten sänktes med ökad mängd serum och det gick ej tydligt att skilja dem från varandra (Fig. 4). Slutligen gjordes en titrering då antikropparna från Kurtis serum IV, som renats i en peptidaffinitetspelare med TK1-peptidbiten hos Agrisera AB, tillsattes i olika spädningar till en bestämd mängd cellextrakt. Vi fann en tydlig korrelation mellan koncentrationen av antikroppar och hämning av TK1 i cellextraktet (Fig. 5). Se tabell 1 och 2.

Tabell 1. Hund TK1 aktivitet i supernatant efter tillsats av anti-hund TK1 antikroppar.

Serumtyp	Mängd	Aktivitet
Preserum		
Ullrika	10 μ l	75,1 - 94,7 %
Kurtis	10 μ l	78,6 - 95,9 %
Dingo	10 μ l	80,6 - 95,3 %
Serum III		
Ullrika	10 μ l	8,5 %
Kurtis	10 μ l	18,7 %
Dingo	10 μ l	24,8 %
Serum IV		
Ullrika	9 μ l	11,6 %
	5 μ l	5,9 - 14,4 %
	3 μ l	73,5 %
Kurtis	10 μ l	15,2 %
	9 μ l	5,8 %
	5 μ l	18,5 - 21,8 %
	3 μ l	30,8 %
Dingo	10 μ l	20,9 %
	9 μ l	4,1 %
	5 μ l	6,5 - 24,7 %
	3 μ l	30,9 %

Tabell 2. Hund TK1 aktivitet i supernatant efter tillsats av renade antikroppar från Kurtis serum IV.

Kurtis, renade antikroppar, koncentration 0,25 mg/ml	Volym	Aktivitet
	0,02 µl	61,6 %
	0,05 µl	50,2 %
	0,1 µl	49,5 %
	0,2 µl	49,2 %
	1 µl	4,7 %
	1,67 µl	3,4 %
	10 µl	1,6 %

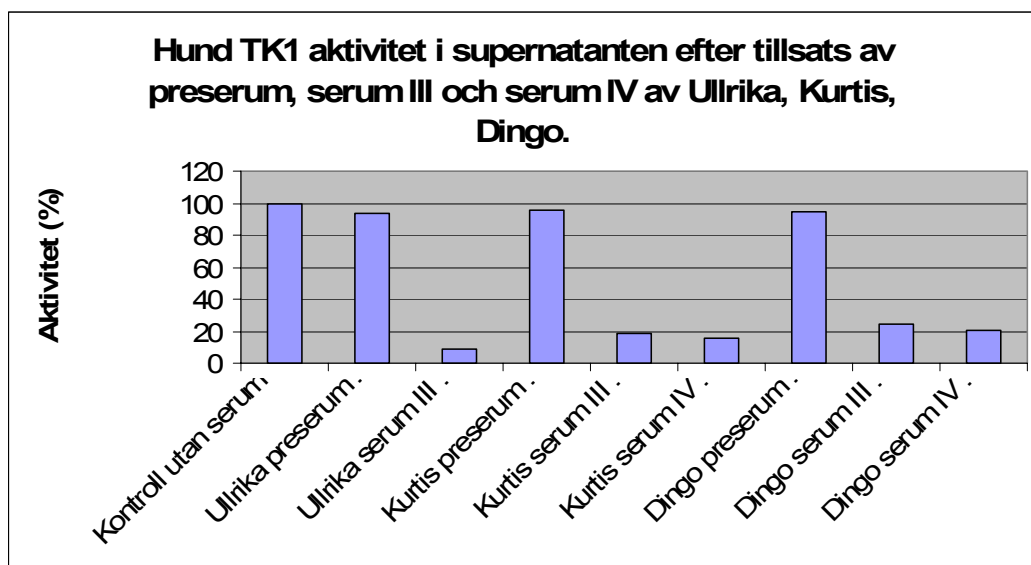


Fig. 3. Hund TK1 aktivitet i supernatant efter tillsats av preserum, serum III och serum IV av Ullrika, Kurtis, Dingo.

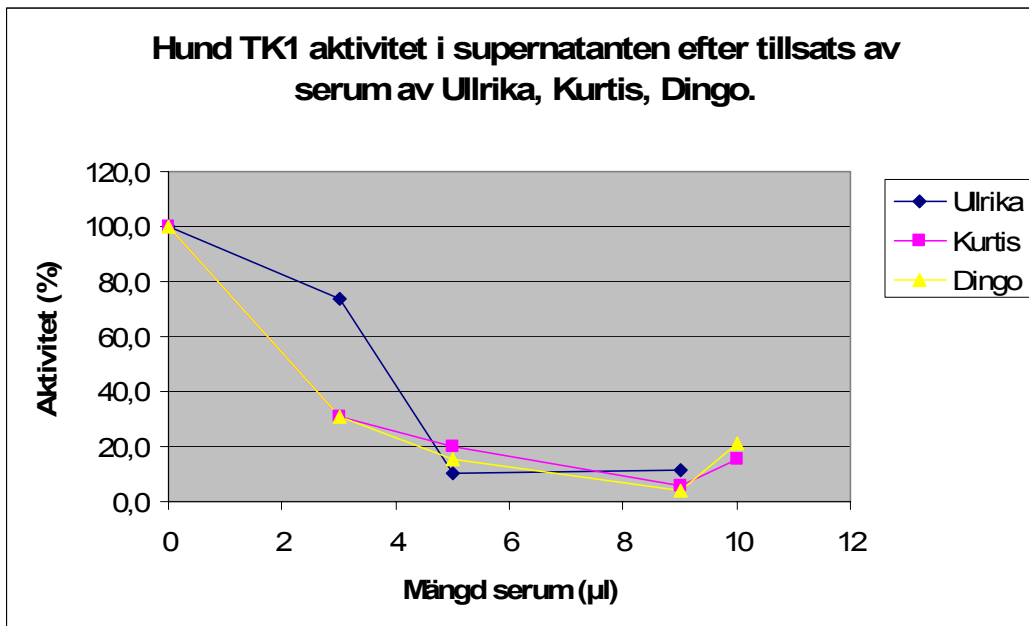


Fig. 4. Hund TK1 aktivitet i supernatant efter tillsats av serum av Ullrika, Kurtis, Dingo.

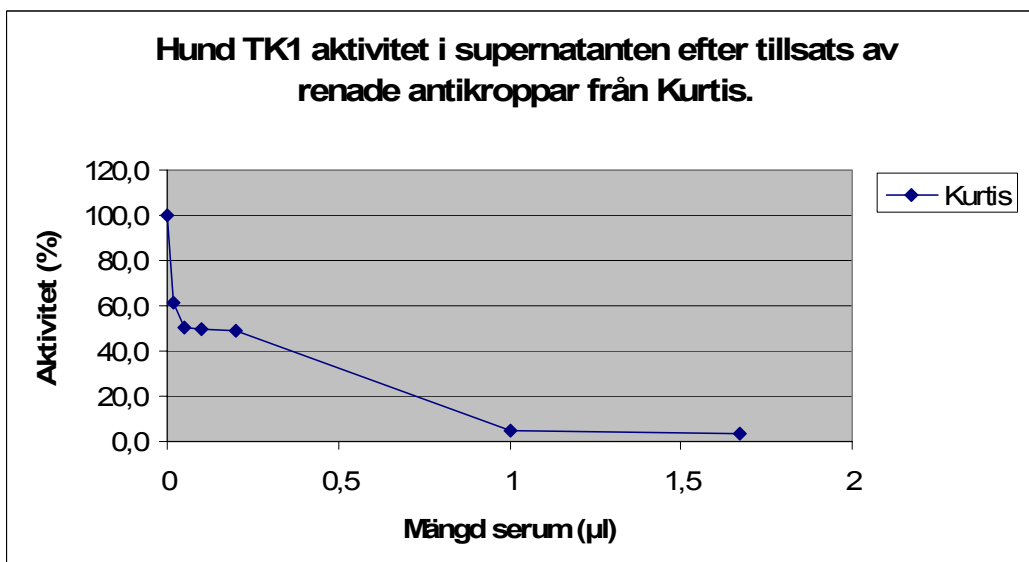


Fig. 5. Hund TK1 aktivitet i supernatant efter tillsats av renade antikroppar från Kurtis.

Test av antikroppar mot humant TK1

Ett test med samma mängd human CEM celledextrakt och serum, 10 µl, gjordes först. I de prov som gjordes med preserum låg aktiviteten för Ullrika, Kurtis och Dingo nära den för den positiva kontrollen utan serum, de uppvisade ingen eller mycket låg hämning. Proven med serum IV visade en aktivitet för Ullrika och Kurtis som låg nära den positiva kontrollen. Serum IV-provet för Dingo uppvisade dock en hämning, aktiviteten var tydligt sänkt (Fig. 6). Därefter gjordes en titrering med olika mängd serum till en bestämd mängd extrakt, med Kurtis och Dingos serum IV. Där sågs aktiviteten i Kurtis prov vara fortsatt opåverkat hög vid de olika volymerna, medan däremot provet för Dingo uppvisade en tydlig hämning redan vid låga volymer serum (Fig. 7). Se tabell 3.

Tabell 3. Humant TK1 aktivitet i supernatant efter tillsats av anti-hund TK1 antikroppar.

Serumtyp	Mängd	Aktivitet
Preserum		
Ullrika	10 µl	94,3 - 98,9 %
Kurtis	10 µl	90,5 - 91,7 %
Dingo	10 µl	87,1 - 95,1 %
Serum IV		
Ullrika	10 µl	90,1 - 109,2 %
Kurtis	10 µl	86,5 - 109,2 %
Dingo	10 µl	23,8 - 58,3 %
Serum IV		
Kurtis	2,5 µl	111,1 %
	10 µl	103,4 %
	20 µl	99,3 %
	40 µl	88,6 %
Serum IV		
Dingo	1 µl	40,5 %
	2 µl	6,4 %
	4 µl	5,1 %
	6 µl	6,4 %
	8 µl	6,8 %
	10 µl	3,7 - 7,7 %
	20 µl	4,7 - 8,7 %
	40 µl	18,6 %

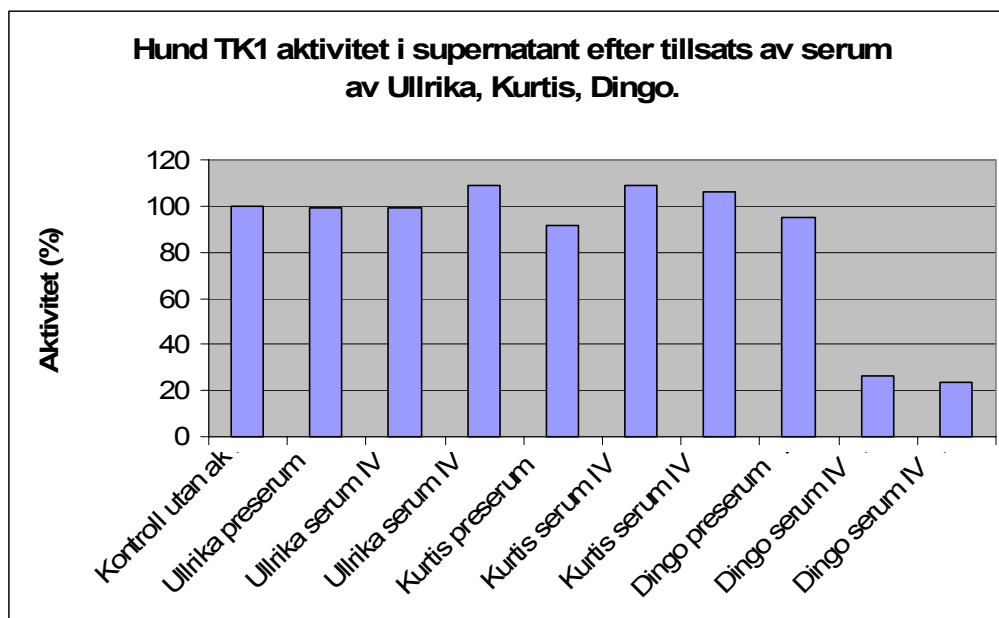


Fig 6. Hund TK1 aktivitet i supernatant efter tillsats av serum av Ullrika, Kurtis, Dingo.

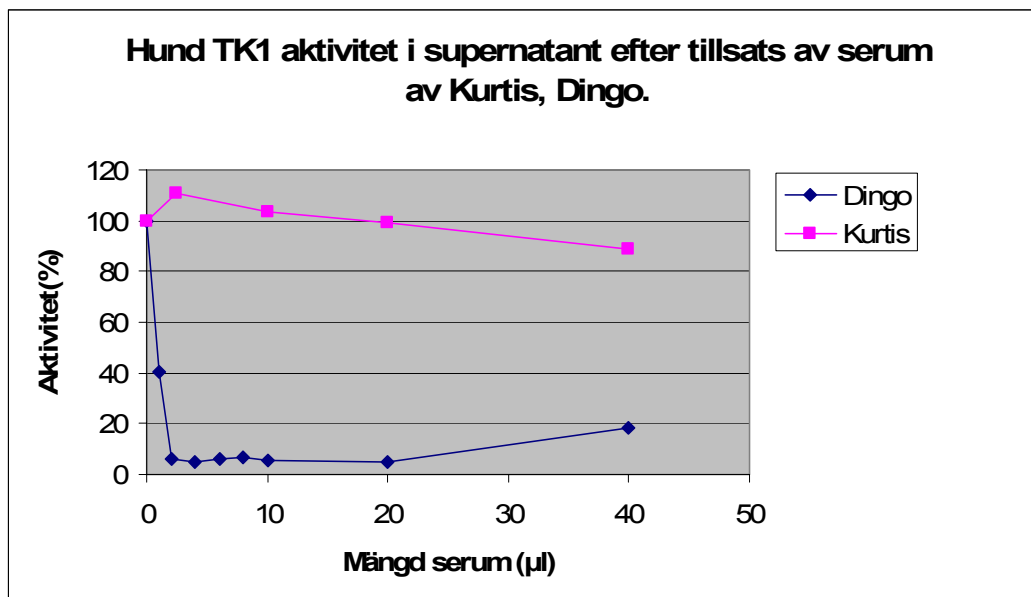


Fig 7. Hund TK1 aktivitet i supernatant efter tillsats av serum av Kurtis, Dingo.

Ouchterlony – immunodiffusion

Immunodiffusionen enligt Ouchterlony visade inga linjer mellan antigen och antikroppar, vilket troligen beror på att mängden antigen och antikroppar var så liten att de inte kunde skönjas ens efter färgning. Om immunodiffusion skall göras igen bör mer koncentrerade antigen- och antikroppslösningar användas.

DISKUSSION

Aktiviteten i extrakten av hundceller var för lymfocyterna i genomsnitt 1234 pmol/min/mg och för fibroblasterna i genomsnitt 25 pmol/min/mg. Att extraktet av lymfocyter skulle ha den högsta aktiviteten var väntat då lymfocyterna hade stimulerats med PHA och antal celler i S-fas då är förmodligen högt. Fibroblaster däremot är mer långsamt växande och förväntas ha lägre koncentration TK1, vilken kan förklara den lägre aktiviteten i fibroblastextraktet. Dock kom fibroblasterna från en juvertumör hos en hund vilket skulle kunnat ge celler med högre mitotisk aktivitet och därmed fler celler i S-fas, men då TK1 aktiviteten var låg, kan man anta att den mitotiska aktiviteten hos fibroblasterna också var låg.

Peptiden som användes för immuniseringen var syntetiskt framställd och bestod av 28 aminosyror, nr 196 till 223 av hund TK1. Detta är i enzymets C-terminala del där human och hund TK1 är mest olika. Den längsta identiska sträckan mellan human och hund i aminosyresekvensen för peptiden är 7 aminosyror (nr 213 till 219) och en ak kan känna igen 8-10 aminosyror, troligt är att den kanin (Dingo) som binder både hund och human TK1 känner igen just det området.

Serum från alla tre kaniner hämmade hund TK1 aktivitet tydligt vilket visar att antikropparna binder enzymet så att det kan centrifugeras bort och lämnar en supernatant med låg koncentration TK1 och därmed låg aktivitet, jämfört med den positiva kontrollen utan tillsatt serum. I de försök där 10 µl serum blandades med cellextrakt kunde man se en skillnad mellan de olika kaninerna, serum från Ullrika hämmade mest, med endast 8,5 % aktivitet kvar. Kurtis hamnade på 18,7

% aktivitet och Dingo 24,8 %. Skillnaden kvarstod vid försök med 9 µl serum, men i senare försök med olika mängder cellextrakt kvarstod inte skillnaderna, vilket kan bero på att kvaliteten på cellextrakten i de senare försöken var sämre och därmed gav mer osäkra resultat. Det kan också bero på slumpmässig variation. Detta är något som bör undersökas ytterligare i framtiden. En av de tre kaninerna, Dingo, hade antikroppar som även band till och hämmade humant TK1, vilket innebär att de tre antikropparna känner igen olika epitop, trots att alla tre visats binda till och hämma hund TK1. Detta kan antas bero på att hund och humant TK1 är lika, om ej identiska, i den del som kaninerna i det här försöket immuniserades mot, den C-terminala delen och att immuniseringen i kaninen Dingo skett mot epitop som är lika hos både hund och humant TK1, medan immuniseringen hos de andra två skett mot epitop som bara finns hos hund TK1.

En av utmaningarna i studien har varit att framställa hundcellsextrakt med tillräcklig aktivitet av TK1 för att kunna utvärdera funktionen hos antikropparna. Bland annat kan detta bero på bristande erfarenhet att odla hundceller samt svårighet att få tag i tillräckliga mängder hundmaterial (vävnad, blod etc).

Användning av serumtester för TK1 förekommer inom humanonkologin och dess användning väntas öka. Det finns intresse för studier av serum TK1 vid fler former av cancer än leukemi, multipla myelom, Hodgkins lymfom och non-Hodgkins lymfom där det redan används för utvärdering av behandling och prognos. De kommersiellt tillgängliga test för sTK1 som finns på humansidan är inte ett reellt alternativ för veterinärmedicinskt bruk då de innebär användande av radioaktivitet vilket ej är praktiskt och ekonomiskt möjligt även om de har visats vara en god indikator för prognos och överlevnad hos hund med malignt lymfom. Då har en ELISA med specifika antikroppar större möjlighet att vara billig och användarvänlig. För att kunna framställa sådana tillräckligt känsliga, robusta och kliniskt användbara tester krävs det att man kan framställa antikroppar med hög specificitet som är riktade mot olika epitop. Det är alltså av stort veterinärmedicinskt intresse att följa utvecklingen inom humanmedicin och göra billiga serumtester för hund samt fler av våra sällskapsdjur, för flera betydelsefulla former av cancer, bland annat malignt lymfom. Dessa innebär ofta idag både en utmaning för den kliniskt verksamma veterinären att diagnostisera, bedöma prognos och värdera framgång av behandling, likaså innebär de ett ekonomiskt lidande för djurägaren och ett lidande för djuret. Att tidigt kunna bedöma om det är meningsfullt att behandla ett djur samt utvärdera om eventuell behandling ger önskat resultat skulle bespara både veterinär och djurägare onödigt besvär samt djuret onödigt lidande. Resultaten i denna studie visar att det går att framställa antikroppar mot hund TK1 som binder till olika epitop. Detta är värdefullt och tillsammans med tidigare studier där antikroppar använts för att mäta serumnivåer av TK1 i humant serum öppnar de för en billig och enkel ELISA för malignt lymfom hos hund att använda inom veterinärmedicin. Detta test skulle kanske också kunna få användning inom andra cancerformer hos hund och andra sällskapsdjur, eftersom celler i S-fas troligen läcker TK1 och cancerceller oftare befinner sig i S-fas än normala celler. Ytterligare kan antikroppar mot hund TK1 användas för immunohistokemi på biopsier från tumörvävnad eller misstänkt tumörvävnad.

TACK

Tack till Tikomed AB som tillhandahållit juvertumörceller. Stort tack till Henrik von Euler som engagerat sig i detta arbete och hjälpt mig att få fram det hundmaterial som behövts för att genomföra studien. Till sist vill jag tacka mina handledare, Staffan Eriksson och Liya Wang för deras stora tålamod och stöd.

REFERENSER

- Eriksson, S & Munch-Petersen, B & Johansson, K & Eklund, H (2002) Structure and function of cellular deoxyribonukleosid kinases. *Cell Mol Life Sci* 59, 1327-1346.
- Ettinger, S.N. (2003) Principles of treatment for canine lymphoma. *Clin Tech Small Anim Pract* 18, 92-97.
- von Euler, H. & Einarsson, R. & Olsson, U. & Lagerstedt, A-S. & Eriksson, S. (2004) Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: A potent marker for prognosis and monitoring the disease. *J Vet Intern Med* 18, 696-702.
- von Euler, H. & Öhrvik, A. & Eriksson, S. (2005) A non-radiometric method for measuring serum thymidine kinase activity in malignant lymphoma in dogs. *Res Vet Sci*. E-pub Sep 05.
- He, Q. & Zou, L. & Zhang, P.A. & Lui, J.X. & Skog, S. Fornander, T. (2000) The clinical significance of thymidine kinase 1 measurement in serum of breast cancer patients using anti-TK1 antibody. *Int J Biol Markers* 15, 139-146.
- Ives, D, Durham, J. & Tucker, V. (1969) Rapid determination of nucleoside kinase and nucleotidase activities with tritium-labeled substrates. *Anal Biochem* 28, 192-205.
- Jacobsson, B. (1998) The metabolism of HIV RT inhibitors. Biochemical and clinical studies. Diss. Stockholm: Karolinska Institutet
- McGavin, M.D. & Carlton, W.W. & Zachary, J.F. 2001. *Special Veterinary Pathology*, 3rd ed. Mosby, Inc. 370pp.
- Nakamura, N. & Momoi, Y. & Watari, T. & Yoshino, T. & Tsujimoto, H. & Hasegawa, A. (1997) Plasma thymidine kinase activity in dogs with lymphoma and leukaemia. *J Vet Med Sci* 59(10), 957-960.
- Öhrvik, A. & Lindh, M. & Einarsson, R. & Grassi, J. & Eriksson, S. (2004) Sensitive nonradiometric method for determining thymidine kinase 1 activity. *Clin Chem* 50:9, 1597-1606.