

THYMIDINKINAS 1 SOM TUMÖRMARKÖR VID JUVERTUMÖRER HOS TIK

Per Nyberg

Handledare: Henrik von Euler
Inst. för Kliniska Vetenskaper, Avdelningen för hund, katt och andra smådjur.

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

**Examensarbete 2007:66
ISSN 1652-8697
Uppsala 2007**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
ABSTRACT	2
INLEDNING	3
BAKGRUND	5
Tumörförekomst	5
Etiologi	5
Klassificering	6
Diagnos	6
Behandling	7
Prognos	8
MATERIAL OCH METODER	9
Framställande av hund TK-1	9
Proteinrening	10
Bestämning av enzymernas aktivitet	10
Utvärdering av antikroppar mot hund TK-1	10
Provinsamling	11
RESULTAT	11
Framställande av dTK-1	11
Rening och koncentrationsbestämning av proteinerna	12
Aktivitetsmätning	12
Test av de artspecifika antikropparna	13
Provinsamlingen	13
DISKUSSION	14
TACK	17
LITTERATURFÖRTECKNING	18

SAMMANFATTNING

Aktivitetmätning av thymidinkinas 1 (TK-1) i serum används som tumörmarkör inom både human- och veterinärmedicinen. TK-1 är ett intracellulärt enzym som ingår i "the salvage pathway" vid cellens DNA-syntes och uttrycks cellcykelspecifikt. Uttrycket är som störst och aktiviteten är som högst i cellen när DNA-syntesen är som mest aktiv, dvs. i övergången mellan G1- och S-fas. Hos friska celler avtar sedan TK-aktiviteten snabbt när de går in i G2-fas. Vid neoplastiska sjukdomar är cellproliferationen mer uttalad och därmed också DNA-syntesen vilket leder till en högre TK-aktivitet i cellen. Den ökade aktiviteten går att mäta i serum vilket gör TK-1 till en användbar markör för diagnostik av neoplastiska sjukdomar, för bedömning av prognos samt för att utvärdera resultat av påbörjade behandlingar. För att mäta TK-aktivitet på humansidan finns ett radioaktivt baserat test och en studie har visat att detta är applicerbart även inom veterinärmedicinen. En begränsning ur veterinärmedicinsk synpunkt är att testet är dyrt och medför hantering av radioaktiva ämnen. Inom humanmedicinen har man med framgång börjat använda antikroppar för att mäta koncentrationen av TK-1 i serum hos patienter med solida tumörer som t.ex. bröstcancer. Denna typ av mätning har visat sig vara användbar och skulle vara mycket intressant att utvärdera även inom veterinärmedicinen. I denna studie har vi uttryckt och framställt två rekombinanta varianter av hund TK-1, dTK1 Δ C12 och dTK1 Δ C38. De två varianterna har använts för att utvärdera artspecifika hund TK-1 antikroppar och visats fungera som positiv respektive negativ kontroll för antikropparna. De rekombinanta varianterna kan i senare studier användas för att öka antikropparnas specificitet. Vidare utgör rekombinanterna ett viktigt och centralt steg i en framtida utveckling av en metod med vilken man kan detektera och mäta koncentration av hund TK-1 i vävnad och serum med hjälp av antikroppar.

ABSTRACT

Determination of serum thymidine kinase 1 (TK-1) activity is used as a tumour marker in both human and veterinary medicine. TK-1 is an intracellular enzyme involved in a salvage pathway of DNA synthesis. The expression of TK-1 is cell cycle dependent and the activity increases markedly after the G1 to S transition in the cell cycle and then declines rapidly in G2. The pronounced proliferative activity in tumour cells result in a higher TK-1 enzyme activity within the cell. The fact that the increased TK-1 activity can be measured in serum makes TK-1 a useful marker in diagnostics of neoplastic diseases and it provides information regarding prognosis and treatment effectiveness. In human medicine a radioactive based test is used to determine the TK-1 serum activity. A study has proved that the test also can be used to determine the TK-1 serum activity in dogs. The test is, however, limited in a more general use in veterinary practice since it is expensive and requires handling of radioactivity. Recently in human medicine antibodies has been used to measure the serum concentration of TK-1 in patients with solid types of tumours, e.g. breast cancer. This type of measurements has been successful and would be interesting to evaluate in veterinary medicine. In this study we have expressed two recombinant types of dog TK-1, dTK1 Δ C12 and dTK1 Δ C38. The two types have been used to evaluate specific dog TK-1 antibodies and have been showed to work as respectively positive and negative controls for the antibodies. In subsequent studies the recombinants can be used to increase the antibodies specificity. The recombinants are also important and central in a future development of a method in witch is possible to detect and measure dog TK-1 in tissue and serum by using specific antibodies.

INLEDNING

Juvertumörer är hundens vanligaste tumörform och ca 25-50 % av alla tikar drabbas. Alla raser kan utveckla juvertumörer och vanligen drabbas medelålders till äldre tikar. Av tumörerna är ca hälften maligna och av dessa är ca 40-50 % carcinom och 5-10 % är sarkom. De benigna tumörerna utgörs framförallt av olika typer av blandtumörer eller adenom (Ettinger, 2005). Hos drabbade tikar är det inte ovanligt att fler tumörformer förekommer samtidigt och de kan då ha sitt ursprung från olika typer av vävnad. Det som kliniskt kännetecknar maligna tumörer är att de oftare växer invasivt i omkringliggande vävnad samt att de i högre grad än benigna tumörer metastaserar till andra platser i kroppen. Metastaseringen sker oftast via blod eller lymfvätska och de vanligaste platserna man finner metastaser från juvertumörer är i regionala lymfknutor och lungor (Ettinger, 2005).

Inom humanmedicinen har man relativt länge använt sig av olika typer av tumörmarkörer som hjälpmedel vid diagnostik av neoplastiska sjukdomar, för bedömning av prognos samt för att utvärdera resultat av påbörjade behandlingar. En markör kan vara ett ämne som produceras av maligna celler eller av normala celler som svar på att en tumörsjukdom föreligger. Tumörmarkörer är ett område som under senare år även har fått ökat intresse inom veterinärmedicinen och forskning bedrivs nu runt flera olika typer av markörer. En av dessa är thymidinkinas (TK). TK är ett intracellulärt enzym som är involverat i "the salvage pathway" vid cellens DNA-syntes (von Euler et al., 2004). TK medverkar här i fosforyleringen av deoxythymidin till deoxythymidinmonofosfat och förekommer i två olika former, TK-1 samt TK-2. TK-1 förekommer i cellens cytoplasma och medverkar vid cellproliferation. TK-2 finns i mitokondrierna och medverkar vid syntes av mitokondriellt DNA (von Euler et al., 2004, von Euler et al., 2006). TK-1 uttrycks cellcykelspecifikt och aktiviteten är som högst i cellen när DNA-syntesen är som mest aktiv, dvs. i övergången mellan G1 till S-fas. Hos friska celler avtar sedan TK-aktiviteten snabbt när de går in i G2-fas (von Euler et al., 2004). Aktiviteten av TK-1 går att mäta i serum och aktiviteten avspeglar då nivån av DNA-syntes i kroppen och antalet celler som dör under stadier av DNA-replikation (von Euler et al., 2004). Vid neoplastiska sjukdomar är cellproliferationen mer uttalad och därmed också DNA-syntesen vilket i sin tur leder till en högre TK-aktivitet i cellen. Det förekommer även en mer uttalad celldöd och läckaget från de sjuka cellerna är större (von Euler et al., 2006). Detta medför att man vid vissa typer av tumörsjukdomar kan uppmäta en signifikant högre aktivitet av TK-1 i serum jämfört med den aktivitet som förekommer hos friska individer (Li et al., 2004).

Aktivitetsmätningar av TK-1 i serum är en potent tumörmarkör vid leukemi och lymfom som karakteriseras av en mycket hög proliferationshastighet hos de tumöromvandlande cellerna (Li et al., 2004). Inom humanmedicinen används idag TK-mätningar för att bedöma prognos och utvärdera behandlingar av bland annat leukemi, multipla myelom, Hodgkins lymfom samt non-Hodgkins lymfom (von Euler et al., 2004). Inom veterinärmedicinen används aktivitetsmätningar av TK-1 i serum bland annat för att avgöra vilket sjukdomsstadie en hund med malingt lymfom befinner sig i samt för att avgöra patientens prognos (von Euler et al.,

2006). Forskning har visat att aktiviteten av TK-1 i serum ökar i relation till tumörens malignitet (Li et al., 2004). Efter tumörbehandling har man observerat att aktiviteten snabbt går ner till basala nivåer under förutsättning att behandlingen varit lyckad. Vid återfall har man funnit att aktiviteten stiger signifikant innan patienten visar några kliniska symtom på sjukdom (von Euler et al., 2004). TK-aktiviteten är därmed kopplad till tumörförekomst och grad av malignitet. För att mäta aktiviteten av TK-1 i serum finns det ett kommersiellt test på humansidan, Prolifigen TK-REA (Radioenzymatic assay). Detta test går kortfattat ut på att man tillsätter en radioaktiv substratanalog till TK-1. Man mäter sedan mängden omvandlat substrat per tidsenhet vilket korrelerar med TK-aktiviteten i serum. von Euler och kollegor har i en studie visat att testet fungerar bra för TK-aktivitetsmätningar på hund med malignt lymfom (von Euler et al., 2004). En begränsning med testet ur veterinärmedicinsk synvinkel är att det är dyrt och medför hantering av radioaktiva ämnen. I dagsläget har sannolikt få veterinärkliniker det patientunderlag och den ekonomi som krävs för att säkert kunna sätta upp testet.

Som tidigare nämnts är aktivitetsmätningar av TK-1 i serum en potent tumörmarkör vid olika typer av leukemi och lymfom. På solida tumörer, som t.ex. juvertumörer, är resultatet av aktivitetsmätningarna sämre (Li et al., 2004). Man vet inte varför men en teori är att TK-1 befinner sig i någon annan form och är därmed hindrat att utöva någon aktivitet under mätningarna. Inom humanmedicinen har man med framgång börjat använda antikroppar för att mäta *koncentrationen* av TK-1 i serum i samband med lung- och bröstcancer (Li et al., 2004). Denna typ av mätning har visat sig vara användbar för att följa behandlingar samt för att avgöra prognos och skulle vara mycket intressant att utvärdera även inom veterinärmedicinen. Li och kollegor använde sig av anti-human TK-1 antikroppar med epitop på den C-terminala delen på humant TK-1. Eftersom det tidigare inte funnits antikroppar mot hund TK-1 finns det ingen metod beskriven där man använder sig av antikroppar mot hund TK-1 för att mäta dess koncentration i serum. Jämförelser mellan humana TK-genen och hund TK-genen visar en likhet i aminosyrasekvens som uppgår till 88,5 %. Diversiteten uppgår till 9,1 % och de flesta olikheterna i sekvensen ser man i proteinets C-terminala del (Pub Med Accession number XP_540462). Under ett examensarbete vid Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, sektionen för veterinärmedicinsk biokemi (SLU) har artspecifika antikroppar utvecklats genom att immunisera kaniner med en syntetisk peptid från hund TK-1 (Fröberg, 2006). Antikropparna har visats binda bra till hund TK-1 och är en viktig länk för att kunna utveckla en billigare och säkert metod för att mäta koncentration av TK-1 vid neoplastiska sjukdomar hos hund.

Syftet med denna studie är att uttrycka och framställa två olika varianter av rekombinant hund TK-1 och använda dessa för att utvärdera de artspecifika hund TK-1 antikropparna som nämnts ovan. Vid efterföljande studier skall de två varianterna kunna användas som positiv respektive negativ kontroll vid t.ex. koncentrationsmätningar av hund TK-1. Ett vidare mål med arbetet har varit att samla in blodprover från tikar med juvertumörer. Dessa blodprover kommer att analyseras i en senare studie för att se om det föreligger något samband mellan TK-koncentrationen i serum och tumörernas malignitet.

BAKGRUND – JUVERTUMÖRER HOS TIK

Tumörförekomst

Juvertumörer är som tidigare nämnts en av hundens vanligaste tumörform. I en svensk studie som gjorts på mer än 80. 000 försäkrade hundar har man visat att 1 av 100 tikar per år drabbas av någon form av juvertumör. Vidare har studien visat att incidensen ökar med stigande ålder. På en 6-årig hund är incidensen 1 %, på en 8-årig hund 6 % och på en 10-årig hund 13 % (Egenvall et al., 2005). De flesta hundarna utvecklar juvertumörer runt 10-11 års ålder (Withrow, 2007).

Alla raser kan drabbas men en viss raspre disposition föreligger. Engelsk springer spaniel, boxer, dobermann, tax, och pudel är exempel på några raser som drabbas mer frekvent av juvertumörer (Zatloukal et al., 2005).

Etiologi

Juervävnaden regleras normalt av olika hormoner. Östrogen och progesteron har en central roll i regleringen och utövar sin effekt genom att binda till receptorer i juervävnaden. Etiologin till juvertumörer okänd men sannolikt spelar hormoner en betydelsefull roll i uppkomst och utvecklande av juvertumörer (Withrow, 2007).

När progesteron och östrogen binder till respektive receptor stimuleras den mitogena aktiviteten i juervävnaden vilket sannolikt är en bidragande orsak till uppkomsten av juvertumörer (Withrow, 2007). Ett stöd för denna teori och för att det finns en hormonell bakgrund till juvertumörer är att okastrerade tikar löper större risk att drabbas jämfört med tikar som kastreras tidigt i livet. Om en tik kastreras innan sitt första lopp är risken att hon drabbas av juvertumörer senare i livet 0,5 %. Vid kastrering mellan 1:a och 2:a löpet är risken 8 % och vid kastration efter 2:a löpet har risken ökat till 26 % (Schneider et al., 1969). Om kastration sker efter 3:e löpet eller senare är risken för att benigna tumörer skall utvecklas något lägre. Detta kan bero på att benigna tumörer ofta innehåller, och uppstår vid, ett ökat antal östrogen- och progesteronreceptorer i juervävnaden. Risken att utveckla maligna tumörer minskar dock inte vid senare kastrationer vilket sannolikt beror på att vissa maligna tumörtyper, t.ex. carcinom, saknar normalt juverepitel och därmed har ett minskat antal östrogen- och progesteronreceptorer (Rutteman et al., 1988). I en studie där man med hjälp av immunohistokemi undersökt uttryck av östrogen- och progesteronreceptorer hos 228 juvertumörer fann man uttryck av en eller båda receptorerna i 96 % hos de benigna tumörerna och 66 % hos de maligna tumörerna (Martin de las Mulas et al., 2005). I sju av fallen man undersökte hade metastasering till lymfknotor skett. I dessa fall kunde man inte finna något uttryck från någon av receptorerna i vare sig primärtumören eller metastasen vilket indikerar att maligna tumörer inte är steroidberoende i samma utsträckning som benigna tumörer (Whitrow, 2007).

För att förhindra lopp hos tikar används ibland syntetiska progestiner, t.ex. medroxyprogesteronacetat (MPA). I en studie har man funnit att dessa ökar risken för utveckling av benigna tumörer men inte av maligna tumörer (Misdorp et al., 1991). Vidare har man funnit att administrering av progestiner leder till en ökad produktion av tillväxthormon (GH). Parallellt med den ökade GH-produktionen

kan en ökning av insulin-like growth factor I (IGF-I) och IGF-II ses i blodet vilket kan leda till proliferation av juvervävnaden (Mol et al., 1997). Den hormonellt inducerade produktionen av tillväxtfaktorer har sannolikt betydelse för utvecklingen av juvertumörer men hur är ännu inte känt (Withrow, 2007).

Klassificering

Som tidigare nämnts är ca hälften av juvertumörerna hos hund maligna. Av dessa klassificeras 40-50% som någon typ av carcinom. Carcinom är tumörer som utgår från epitelial vävnad. Ca 5-10% klassificeras som sarcom. Sarcom är tumörer som utgår från mesenkymal vävnad (t.ex. bindväv, fett, brosk, ben och muskler). Det finns även en ovanlig malign tumörtyp som kallas carcinosarkom. Denna typ av tumör består av celler som har sitt ursprung från både epitelvävnad och bindväv. Benigna tumörer utgörs ofta av olika typer av adenom, fibroadenom eller blandtumörer. Blandtumörerna består av celler med epitelialt samt mesenkymalt ursprung (Withrow, 2007).

Det finns flera olika sätt att klassificera juvertumörer. Det vanligaste är att klassificeringen görs baserat på cellernas morfologiska utseende och histogenetiska ursprung. En svaghet med dessa system ur klinisk synvinkel är att olika histologiska tecken på malignitet inte alltid korrelerar med det kliniska förloppet och den framtida prognosen (Withrow, 2007). World Health Organisation (WHO) har omarbetat ett histologiskt klassificeringssystem och förutom morfologi även inkluderat en prognostisk faktor (Midorp et al., 1999) (Se tabell 1). I detta system har man bland annat gjort en underindelning av carcinomen och rankat dessa i stigande malign potential.

Diagnos

Diagnosen, juvertumörer, ställs idag genom kliniska fynd, dvs. att man palpatoriskt känner en eller flera tumörer i juvervävnaden. I ca 65-70% av fallen uppkommer tumörer i de två bakersta juverparen, dvs. del 4 och 5. Detta beror sannolikt på att det är större mängd juvervävnad i dessa delar (Whitrow, 2007). Palpatoriskt kan man inte med säkerhet avgöra om en tumör är benign eller malign. Benigna juvertumörer är dock ofta små, runda, välavgränsade och fasta i sin konsistens. Maligna tumörer uppvisar oftare en snabbare tillväxt och känns vid palpation inte lika avgränsade. Vidare adhererar oftare maligna tumörer till omgivande vävnad vilket kan leda till inflammation och ulcerationer (Whitrow, 2007). När man konstaterat att en patient har en juvertumör bör man göra en klinisk gradering av tumören innan behandling inleds. Vid den kliniska graderingen bör man utvärdera primärtumören med avseende på dess storlek, tillväxthastighet och hur den växer i förhållande till omgivande vävnad. Man bör vidare undersöka om det föreligger inflammation eller ulceration i området för tumören. Regionala lymfknutor bör palperas för att påvisa eventuell metastasering. Lungor bör röntgas för metastaskontroll (Withrow, 2007).

Tabell 1. WHO's histologiska klassificering av juvertumörer hos hund

1. Malignant tumours

- Noninfiltrating (*in situ*) carcinoma
- Complex carcinoma
- Simple carcinoma
 - Tubulopapillary carcinoma
 - Solid carcinoma
 - Anaplastic carcinoma
- Special types of carcinomas
 - Spindel cell carcinoma
 - Squamous cell carcinoma
 - Mucinous carcinoma
 - Lipid-rich carcinoma
- Sarcoma
 - Fibrosarcoma
 - Osteosarcoma
 - Other sarcomas
- Carcinosarcoma
- Carcinoma or sarcoma in benign tumour

2. Benign tumours

- Adenoma
 - Simple adenoma
 - Complex adenoma
 - Basaloid adenoma
 - Fibroadenoma
 - Low-cellularity fibroadenoma
 - High-cellularity fibroadenoma
 - Benign mixed tumor
 - Duct papilloma
-

Behandling

Behandlingen är kirurgisk och hur mycket juvervävnad som skall avlägsnas beror på tumören/tumörernas omfattning och antal. Nodulektomi (Lumpektomi) innebär att endast själva tumören avlägsnas tillsammans med ett tunt lager av omkringliggande vävnad. Detta kan vara indikerat på enstaka solitära tumörer som är mindre än 0,5 cm i diameter, fasta i konsistensen och väl avgränsade till omkringliggande vävnad. Om patologianatomisk diagnos (PAD) visar att tumören är benign krävs inget ytterligare ingrepp. Om PAD visar att tumören är malign krävs ingen ytterligare operation under förutsättning att den är liten, välavgränsad och omgiven av 1-2 cm frisk vävnad i alla riktningar. Om tumören är ofullständigt avlägsnad eller avlägsnad med för liten marginal bör en mer radikal operation utföras (Withrow, 2007). Vid mer omfattande juvertumörer kan regional mastektomi utföras. Denna metod är baserad på de olika juverdelarnas lymfatiska dränage. Det lymfatiska dränaget är komplext och kan ske mellan alla juverdelar (1-5) inom samma juverrad. Studier har dock visat att juverdel 1-3 i huvudsak har gemensamt lymfatiskt dränage till axillarlymfknutan och juverdel 4-5 har

gemensamt dränage till inguinallymfknutan. Detta innebär att vid en tumör i juverdel 1, 2 eller 3 skall samtliga av dessa juverdelar avlägsnas i ett stycke. Det är sällsynt att axillarlymfknutan är involverad vid juvertumör hos hund. Om den är förstörd eller cytologiskt positiv för maligna celler bör den avlägsnas om möjligt. Vid en tumör i juverdel 4 eller 5 skall båda dessa avlägsnas i ett stycke tillsammans med inguinallymfknutan (Withrow, 2007). Vid multipla och mellan juverdelarna mer spridda tumörer kan så kallade totala mastektomier utföras vilket innebär att hela juverraden på en sida avlägsnas. Detta är ett relativt omfattande ingrepp men bör övervägas vid multipla tumörer spridda i många juverdelar samt på yngre tikar där det finns misstanke om en aggressiv tumörform (Withrow, 2007).

Kompletterande behandlingsmetoder till kirurgi kan vara t.ex. strålning, cytostatika och hormonbehandling. Dessa används inte rutinmässigt i Sverige och det finns få studier som visar att någon av dessa metoder i kombination med kirurgi ger ett bättre behandlingsresultat jämfört med enbart kirurgi.

Prognos

En mycket viktig prognostisk faktor vid juvertumörer är tumörens histologiska utseende. Vid benigna tumörer är överlevnaden mycket god. Vid maligna tumörer har hundar som drabbats av carcinom bättre prognos jämfört med de som drabbas av sarkom eller carcinosarkom (Kurzman et al., 1986). För histologisk klassificering av juvertumörer se tabell 1. Några övriga faktorer med prognostiskt värde vid juvertumörer är (Withrow, 2007):

- Tumörens storlek
- Om metastasering till regional lymfknuta eller lungor skett
- Om tumören är avgränsad eller växer invasivt
- Om tumören är ulcerativ
- Om intravaskulär inväxt förekommer
- Om det finns steroidreceptoraktivitet i den tumöromvandlade vävnaden

För sammanfattning av prognostiska faktorer vid juvertumörer hos hund se tabell 2.

Tabell 2. Sammanfattning av prognostiska faktorer vid juvertumörer hos hund

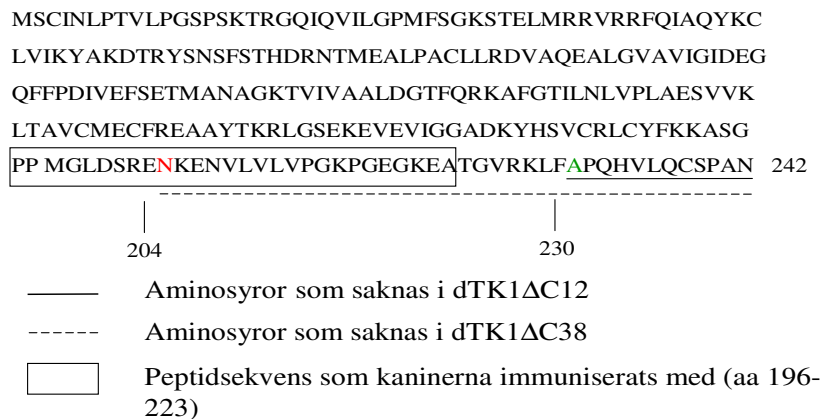
Bra	Dåligt
<3 cm i diameter	>3 cm i diameter
Välavgränsad	Invasiv, ulcererad
Lymfknutor: negativa	Lymfknutor: positiva
ER och PR: positiv	ER: negativ
Histologisk undergruppering (carcinom – väldifferentierad, complex, tubulärt/papillärt)	Histologisk undergruppering (carcinom – odifferentierade, simplex, solida, anaplastiska; inflammatoriska carcinom; sarcom)

Några faktorer som sannolikt inte är av prognostisk relevans är ålder, ras, vikt, antal tumörer, vilka juverdelar som är drabbade samt typ av operation (under förutsättning att all drabbad vävnad avlägsnas med god marginal) (Withrow, 2007).

MATERIAL OCH METODER

Framställande av hund TK-1

Liya Wang vid Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, sektionen för veterinärmedicinsk biokemi (SLU), har framställt två olika cDNA-konstrukt av hund-thymidinkinas 1 (dTK1), dTK1ΔC38 respektive dTK1ΔC12. dTK1ΔC38 saknar de 38 sista aminosyrorerna i C-terminala delen och består av totalt 204 aminosyror (figur 1). dTK1ΔC12 saknar de 12 sista aminosyrorerna i den C-terminala delen och består av totalt 230 aminosyror (figur 1). De två konstrukterna är separat klonade till plasmiden pEXP5-NT/TOPO. Efter kloningen gjordes en sekvensering som visade att cDNA:t låg korrekt i plasmidens insertionsplats. Därefter transfekterades klonerna till bakteriestammen BL21 (DE3) plysS.



Figur 1. Aminosyrasekvens för dTK-1 (242 aa), dTK1ΔC12 (230 aa), dTK1ΔC38 (204 aa) samt peptidsekvens som kaninerna immuniserats med.

Bakteriestammen (BL21 (DE3) plysS) med respektive klon (dTK1ΔC12 samt dTK1ΔC38) ströks på separata LB-plattor innehållande ampicillin (Amp, 50μg/ml) och kloramfenikol (CA, 50μg/ml). Plattorna inkuberades över natten i 37°C. Därefter överfördes 4 st kolonier från respektive platta till separata rör med 0,8 ml flytande LB-medium med Amp och CA. Lösningarna inkuberades i 37°C på skakinkubator över natten. Bakteriekulturerna inducerades sedan med 0,1 mM IPTG i 2 timmar på skakinkubator i 37°C. Därefter analyserades totalproteinextrakten med SDS-PAGE (12 %) för att kontrollera totalt uttryck av dTK-1. Sedan isolerades en koloni av vardera klon (dTK1ΔC12 samt dTK1ΔC38), som föreföll ha ett bra uttryck av dTK-1, från plattorna med BL21 (DE3) plysS. Dessa inokulerades i 25 ml LB med Amp och CA och inkuberades på skak i 37°C över natten. Övernattskulturerna inokulerades sedan till 1 liter LB med 10 ml glukos (40 %), 100 ml M9-salt, 1 ml MgSO₄, 1 ml Amp samt 1 ml CA och inkuberades på skak i 37°C tills OD₆₀₀ > 0,6. Därefter inducerades

cellkulturerna med 0,1 mM IPTG i 37°C under ca 2 timmar för att starta uttryck av dTK-1. Cellerna skördades sedan genom centrifugering i 20 minuter (4500 RPM i 4°C). Respektive pellet resuspenderades i 20 ml buffert bestående av 25mM Tris-HCl pH 7.6, 0.4 M NaCl, 0.5% NP-40 samt 1 mM MgCl₂. För att förstöra bakterierna frystes lösningarna på kolsyreis och tinades sedan upp igen. Efter upptining sonikerades lösningarna i 3 minuter (amplitud 25 och 5 sekunders pulser). Därefter centrifugerades lösningarna i 30 minuter (4500 rpm i 4°C) och supernatanten var klar för proteinrening. Innan proteinreningen analyserades supernatanterna med SDS-PAGE. För att kontrollera att de innehöll dTK1ΔC12 samt dTK1ΔC38 utfördes en Western Blot med anti-His antikroppar enligt protokoll från Amersham Biosciences.

Proteinrening

Proteinerna renades fram genom metallaffinitetskromatografi och gravity flow purification. Ni-NTA (Qiagen) tillsattes till två kolonner. Därefter tvättades kolonnerna med vatten och Binding buffer (25 mM Tris-HCl pH7.6, 0.4 M NaCl, 5 mM Imidazol, 0.1% NP-40). Sedan tillsattes supernatanterna (med dTK1ΔC12 samt dTK1ΔC38). Kolonnerna tvättades åter med Binding buffer. Därefter tvättades kolonnerna med en Binding buffer som hade högre koncentration med Imidazol (30 mM) för att bli av med överflödiga icke önskvärda protein. dTK1ΔC12 samt dTK1ΔC38 eluerades sedan ut med en elueringsbuffert (25 mM Tris-HCl pH7.6, 0.4 M NaCl, 500 mM Imidazol, 0.1% NP-40) och samlades i små fraktioner. För att kontrollera fraktionernas innehåll utfördes en SDS-PAGE. Fraktionerna med mest proteininnehåll poolades och proteinkoncentrationerna beräknades genom absorbansmätningar vid 280 nm.

Bestämning av enzymernas aktivitet

Mätning av enzymernas aktivitet gjordes med en radiokemisk metod (Ives et al., 1996). Till enzymerna, dTK1ΔC12 och dTK1ΔC38, tillsattes det radioaktivt märkta substratet ³H-dThd. Substratet börjar då att fosforyleras av enzymerna med ATP som fosfordonator. För att få ett mått på enzymernas aktivitet och hur bildandet av produkt förändras över tiden avbröts reaktionerna efter 10, 20 samt 30 minuter genom att små fraktioner av blandningen fördes över till ett jonbytarfilter (DE-81). Därefter tvättades filterpappren i en buffert så att endast den bildade produkten kvarstod på filtret. Sedan mättes sönderfallet av produkten på de olika filterpappren, i en scintillationsmätare, vilket blir ett mått på enzymernas aktivitet. Som kontroll och ett mått på lösningens totala aktivitet användes filterpapper som ej tvättats.

Utvärdering av antikroppar mot hund TK1

Under ett examensarbete vid Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi, sektionen för veterinärmedicinsk biokemi (SLU) har artspecifika antikroppar utvecklats genom att 3 olika kaniner (Kurtis, Dingo och Ulrika) immuniserats med en syntetisk peptid från dTK-1 (Fröberg, 2006).

5, 10 samt 100 ng av dTK1ΔC12 och dTK1ΔC38 tillsattes på 4 st SDS-PAGE. Även 100 ng humant TK-1 tillsattes på respektive gel. Proteinerna blottades sedan över till nitrocellulosamembran genom semi-dry transfer. Membranen

inkuberades i Blocking buffert (1xPBS, TWEEN samt 5 % mjölkpulver utan fett) över natten. Därefter inkuberades membran 1 med antiserum från Ulrika, membran 2 med antiserum från Dingo och membran 3 med antiserum från Kurtis. Samtliga antiserum som användes var framtagna 4 veckor efter kaninernas första immunisering och var spädda 50 x. Membran nr 4 inkuberades i pre-serum från Ulrika. Inkuberingen genomfördes på skakinkubator under 2 timmar. Membranen framkallades sedan genom tillsatts av konjugerade anti-kanin IgG antikroppar följt av framkallningsreagens ("enhanced chemiluminescent" (ECL) detection, Amersham Bioscience).

Provinsamling

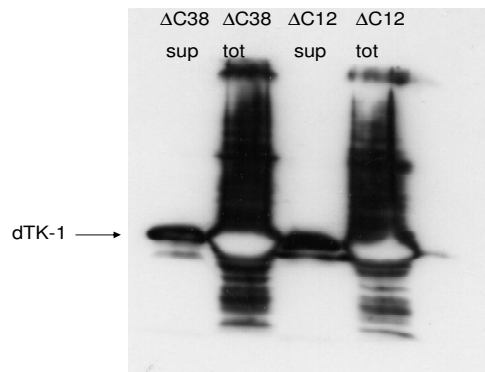
Prover till studien samlades in mellan januari och oktober 2007 efter godkännande från djurägare. Provtagningarna skedde vid Universitetsdjurdjuket vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), vid Falu Djursjukhus samt vid Arninge Djurklinik. Totalt provtogs 16 stycken tikar som hade en eller fler palpatoriskt konstaterade juvertumörer och var lämpliga kandidater för mastektomi. Samtliga av tikarna i studien tappades på serum preoperativt i samband med operationstillfället. Vid stygntagning, ca 10-14 dagar efter operationen togs ett uppföljande serumrör på 10 st av de opererade tikarna. Ett uppföljande prov från samtliga tikar i studien var önskvärt men patientbortfall möjliggjorde inte detta. De insamlade proverna kommer att analyseras senare i uppföljande studier.

Nybildningarna skickades i samtliga fall till patologen på SVA eller till BioVet för patolog anatomisk diagnos (PAD). Syftet med det preoperativa serumprovet som togs på samtliga tikar var att undersöka om det föreligger något samband mellan TK-koncentrationen i serum och tumörernas malignitet. Syftet med det postoperativa serumprovet var att undersöka om det föreligger en förändring i TK-koncentrationen pre- och postoperativt.

RESULTAT

Framställande av dTK1

Vi har uttryckt och framställt två olika varianter av rekombinant dTK-1, dTK1 Δ C12 samt dTK1 Δ C38, i *E. coli*. Innan proteinerna renades genomfördes en SDS-PAGE på de totala lysaten och supernatanterna från respektive variant. Som kontroll och för att få ett mått på totala uttrycket av dTK-1 protein genomfördes en Western blot med anti-His antikroppar. Denna visade att supernatanterna innehöll dTK1 Δ C12 respektive dTK1 Δ C38 (figur 2).



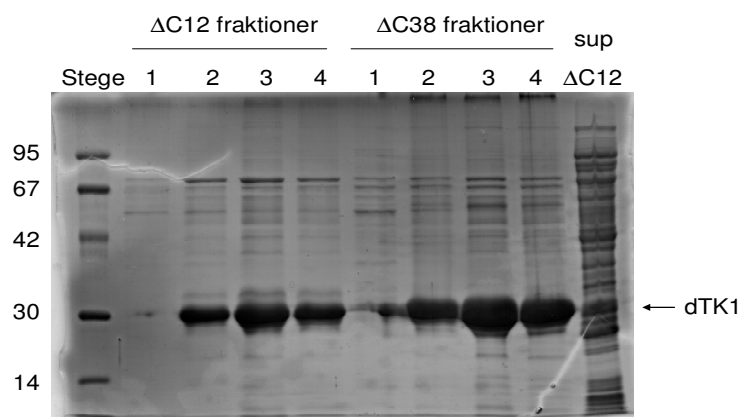
Figur 2. Western blot utförd på supernatanterna samt totala lysaten för dTK1ΔC12 samt dTK1ΔC38

Rening och koncentrationsbestämning av proteinerna

Proteinerna renades genom metallaffinitetskromatografi. Efter tvätt av kolonnerna eluerades respektive protein ut i 6 stycken fraktioner. För att kontrollera fraktionernas med avseende på innehåll och renhet genomfördes en SDS-PAGE (figur 3) på fraktion 1-4 för respektive protein. Fraktion 1 för både dTK1ΔC12 och dTK1ΔC38 visade sig innehålla lite protein. De övriga fraktionerna 2-4 för respektive variant innehöll rikligt med protein och reningen hade fungerat tillfredställande. Vi poolade fraktion 2-6 från respektive kromatografi och bestämde proteinkoncentrationen genom absorbansmätning i OD₂₈₀. Koncentration av dTK1ΔC12 var 0.97 mg/ml. Totalvolym var 3.5 ml vilket ger en total mängd dTK1ΔC12 på ca 3.4 mg. Koncentrationen av dTK1ΔC38 var 2.34 mg/ml. Total volym var 4 ml vilket ger en total mängd av dTK1ΔC38 på 9.4 mg.

Aktivitetsmätning

Genom en radiokemisk metod mätte vi aktiviteten av dTK1ΔC12 samt dTK1ΔC38. Högst aktivitet uppmättes hos dTK1ΔC38, 1012 nmol/min/mg. Aktiviteten hos dTK1ΔC12 uppmättes till 727 nmol/min/mg.



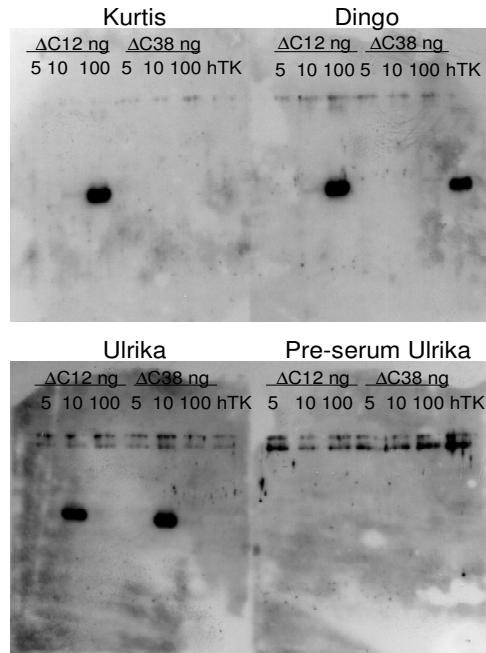
Figur 3. SDS-PAGE på fraktion 1-4 från *dTK1ΔC12* samt *dTK1ΔC38* efter proteinrening. Som kontroll användes supernatanten från $\Delta C12$ innan rening.

Test av de artspecifika antikropparna

En Western blot genomfördes med olika mängder av *dTK1ΔC12* och *dTK1ΔC38* samt humant TK-1 för att utvärdera antikropparna som tagits fram på de olika kaninerna (Kurtis, Dingo och Ulrika). Antikropparna från Kurtis visade sig binda endast till *dTK1ΔC12* (100 ng). Dingos antikroppar visade sig binda till *dTK1ΔC12* (100 ng) samt till humant TK-1. Antikropparna från Ulrika visade sig binda till *dTK1ΔC12* (10 ng) samt *dTK1ΔC38* (10 ng). På den Western som genomfördes på Ulrikas pre-serum kunde inga band detekteras vilket visar att detta serum inte innehåller antikroppar för hund eller human TK-1. Se figur 4.

Provinsamlingen

På samtliga tikar togs ett blodprov vid operationstillfället. På tik 1-10 togs även ett uppföljande blodprov 10-14 dagar efter operationen. För PAD och förteckning över provtagna hundar se tabell 3. Proverna kommer att analyseras i senare studier.



Figur 4. Western blot som genomförts med olika mängder av dTK1ΔC12 och dTK1ΔC38 samt humant TK-1 (hTK) för att utvärdera antikropparna från respektive kanin samt Ulrikas pre-serum.

DISKUSSION

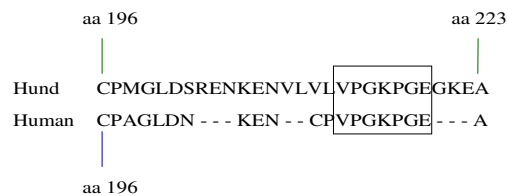
I denna studie har vi framställt två olika varianter av rekombinant dTK-1, dTK1ΔC12 samt dTK1ΔC38. Vi fick en tillfredställande koncentration och totalmängd av båda proteinerna. Högst koncentration (2.34 mg/ml) och störst totalmängd (9.4 mg) fick vi av dTK1ΔC38. En förklaring till detta kan vara att den kortare C-terminala delen hos dTK1ΔC38 gör proteinet mer stabilt jämfört med dTK1ΔC12 (figur 1). Aktivitetsmätningar av proteinerna visade att de hade normal aktivitet. dTK1ΔC38 uppvisade högre aktivitet vilket sannolikt också beror på att det är stabilare än dTK1ΔC12.

Det var till en början svårt att uttrycka både dTKΔC12 och dTKΔC38 från den glycerolstock med BL21 (DE3) plysS vi började med. En orsak till detta kan vara att cDNA:t för de båda proteinerna inte satt rätt i plasmiderna. Vi övergick därför till en stam med BL21 (DE3) plysS som nyligen transfekterats med plasmider där det med sekvensering var konstaterat att cDNA:t för proteinerna satt rätt i plasmiderna.

Den syntetiska peptid som användes vid immuniseringen av kaninerna bestod av 28 aminosyror, nr 196-223 (figur 1). När vi testade antikropparna på dTK1ΔC12 och dTK1ΔC38 fann vi att alla tre kaniners antikroppar band till dTK1ΔC12 (figur 4). Detta var väntat eftersom dTK1ΔC12 utgörs av 230 aminosyror och endast saknar 12 aminosyror i sin C-terminala del. Därmed innehåller dTK1ΔC12 hela den sekvens som kaninerna immuniserats med (figur 1). Detta innebär att dTK1ΔC12

utgör en lämplig positiv kontroll för samtliga kaniners antikroppar. I Kurtis och Dingos fall har antikropparna bundit till den största mängden dTK1ΔC12 som tillsatts, 100 ng. Ett svagt positivt fält kan i båda dessa fall även ses på 10 ng. I Ulrikas fall har antikropparna bundit till fältet där vi tillsatt 10 ng dTK1ΔC12 och inte till fältet med 100 ng. Detta är oväntat och kan t.ex. bero på misstag i spädningsserien eller i pippeteringens ordningsföljd. dTK1ΔC38 utgörs av 204 aminosyror eftersom det saknar de 38 sista aminosyrorerna i sin C-terminala del. Därmed innehåller dTK1ΔC38 endast de 9 första aminosyrorerna i peptidsekvensen som kaninerna immuniserats med (figur 1). Kurtis och Dingos antikroppar fäste inte in till dTK1ΔC38 vilket sannolikt innebär att deras antikroppars epitop till största del utgörs av aminosyror som ligger någon stans mellan nummer 205 - 230 i hund TK-sekvensen. dTK1ΔC38 kan därför utgöra en negativ kontroll för Kurtis och Dingos antikroppar. Ulrikas antikroppar visade sig binda till dTK1ΔC38 vilket innebär att epitopen i detta fall sannolikt ligger inom en annan aminosyrasekvens. En antikropp kan känna igen en sekvens på ca 8 - 10 aminosyror vilket innebär att epitopen eventuellt kan utgöras av de 9 sista aminosyrorerna i dTK1ΔC38 som är identiska med de 9 första i den peptid kaninerna immuniserats med. Resultatet visar att dTK1ΔC38 inte är lämplig som negativ kontroll på Ulrikas antikroppar. Ulrikas pre-serum innehöll som väntat inga antikroppar mot hund eller humant TK.

Dingos antikroppar var de enda som visades binda även till humant TK (figur 4). Vid jämförelser mellan human och hund TK är den längsta identiska aminosyrasekvensen, inom peptiden som kaninerna immuniserats med, 7 aminosyror (nr 213 – 219). Det är därför högst sannolikt att epitopen för Dingos antikroppar utgörs av detta område (figur 5).



Figur 5. Jämförelse mellan den hundaminosyrasekvens som kaninerna immuniserats med och motsvarande sekvens i humana TK-1. Boxen visar den längsta identiska aminosyrasekvensen inom peptiden. Sekvensen kan utgöra epitop för Dingos antikroppar.

Forskning inom humanonkologin har visat att antikroppar kan användas för att mäta koncentrationen av TK-1 i serum. Denna typ av mätning har visat sig vara användbar för att följa behandlingar och avgöra prognos hos patienter med solida tumörer, t.ex. bröstcancer, och skulle vara mycket intressant att utvärdera även

inom veterinärmedicinen. Vi har framställt två rekombinanta varianter av hund TK-1 som kan fungera som positiv respektive negativ kontroll för Dingos och Kurtis antikroppar. De rekombinanta varianterna tillsammans med de arts specifika antikropparna utgör ett viktigt och centralt steg i utvecklingen av en metod med vilken man kan detektera och mäta koncentration av hund TK-1 i vävnad och serum. Vidare kan de rekombinanta varianterna användas för att rena hund TK-antikroppar från serum och därmed öka antikropparnas specificitet.

Tabell 3. Förteckning över serumprover insamlade, mellan januari och oktober 2007, från tikar med en eller fler palpatoriskt konstaterade juvertumörer. På samtliga tikar togs ett blodprov vid operationstillfället. På tik 1-10 togs även ett uppföljande blodprov 10-14 dagar efter operationen

Hund Nr	Namn	Ras	PAD
1	Katsie	Cavalier K.C. Spaniel	Benign blandtumör
2	Molly	Dvärgpudel	Komplext adenom, duktpapillom, lobulär körtelhyperplasi (inga hållpunkter för malignitet)
3	Pina	Schäfer	Fibrosarcom, benign blandtumör, komplext adenom, lobulär körtelhyperplasi, mjölkgångsektasier
4	Astrid	Labrador Retriever	Cystiskt ductulärt papillom och komplext adenom
5	Tasti	Tib. Spaniel	Carcinoma simplex av tubulopapillärt typ, adenoma simplex
6	Alice	Blandras	Carcinoma komplex av solid typ
7	Tova	Tollare	Tubulopapillärt carcinoma simplex
8	Dida	Kelpie	Tubulopapillärt carcinom med metastasering till regional lymfknuta, lobulär körtelhyperplasi samt mjölkgångsektasier
9	Wilma	Cairnterrier	Adenoma komplex
10	Tilda	Golden	Benign blandtumör
11	Ida	Cavalier K.C. Spaniel	Kronisk mastit med gångektasier (inga fynd av neoplasier)
12	Svartie	Blandras	Adenoma komplex, juvercysta, benign blandtumör
13	Bella	Engelsk Springer Spaniel	Benigna blandtumörer
14	Skorpan	Tax	Duktulärt papillom, lobulär hyperplasi
15	Ella	Golden Retriever	Karcinosarkom
16	Minna	Engelsk Springer Spaniel	Benign blandtumör, cystiskt ductulärt papillom

TACK

Ett stort tack till Staffan Eriksson och Liya Wang som engagerat sig i mitt arbete. Tack Liya som uppvisat ett enormt tålamod och varit en inspirationskälla under arbetets laborativa del. Ett stort tack till min handledare, Henrik von Euler för värdefulla synpunkter, stöd och inspiration. Tack till smådjurskliniken på Universitetsdjursjukhuset (SLU) samt Falu Djursjukhus för hjälp med provinsamling.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Chun R., Garret L. (2005). Urogenital and Mammary Gland Tumors. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Editors: Ettinger S.J. & Feldman E.C. 6th edition. Elsevier Saunders. pp 788-789
- 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 Int Med* 18, pp 696-702.
- von Euler H.P., Öhrvik A.B., Eriksson S.K., (2006). A non-radiometric method for measuring serum thymidine kinase activity in malignant lymphoma in dogs. *Res in Vet Sci* 80, pp 17-24.
- Li H.X., Zhang S., Lei D.S., Wang X.Q., Skog S., He Q. (2004). Serum thymidine kinase 1 is a prognostic and monitoring factor in patients with non-small cell lung cancer. *Oncology reports* 13, pp 145-149.
- Fröberg C. (2006). Karakterisering av hund TK1 för användning som tumörmarkör. *Examensarbete, SLU, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet*. 2006:54, ISSN 1652-8697.
- Egenvall A., Bonnett BN., Öhagen P. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80. 000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med* 69, pp 109-127.
- Lana S.E., Rutteman G.R., Withrow S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In: *Small animal clinical oncology*. Editors: Withrow S.J., Vail D.M. 4th edition. Elsevier Saunders. pp 619-628.
- Zatloukal J., Lorenzova J., Tichy F. (2005). Breed and age as risk factors for canine mammary tumors. *Acta vet Brno* 74, pp 103-109.
- Schneider R., Dorn C.R, Taylor D.O.N (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst* 43, pp 1249-1261.
- Rutteman G.R., Misdorp W., Blankenstein M.A. (1988). Oestrogen (ER) and progesterin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in nonmalignant and malignant states. *Br J Cancer* 58, pp 594-599.
- Martin de las Mulas J., Millan Y., Dios R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease free perios in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 42, pp 200-212.
- Misdorp W. (1991). Progestogens and mammary tumors in dogs and cats. *Acta Endocrinology* 125 (supl), pp 27-31.
- Mol J.A., Selman P.J., Sprang E.P.M. (1994). The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *J Reprod Fertil Suppl* 51, pp 339-344.
- Misdorp W., Else R., Hellmén E. (1999). Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. In: *World Health Organisation international histological classification of tumors of domestic animals*. Series 2, vol 7, no 2.
- Kurzman I.D., Gilbertson S.R. (1986). Prognostic factors in canine mammary cancer. *Semin Vet Med Surg* 1, pp 25-32.