



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Undersökning av genuttrycket av homeoboxen HOX A6 vid pyometra samt försök att bygga upp en *in vitro*-modell för pyometra

Kristina Berggren

Uppsala

2011

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:25

Undersökning av genuttrycket av homeoboxen HOX A6 vid pyometra samt försök att bygga upp en *in vitro*-modell för pyometra

Kristina Berggren

Handledare: Ragnvi Hagman, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Helena Wensman, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp

Nyckelord: pyometra, in vitro-infektion, E. coli, genuttryck, homeobox, HOX A6

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:25

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning	2
Syfte	2
Bakgrund och litteraturöversikt	2
Metod och material	6
Cellinje och bakterietyp	6
Infektionsförsök	7
Immunohistokemi	8
Realtids-PCR	10
Resultat	12
Infektion av livmoderceller, immunohistokemi	12
Infärgning av vävnadssnitt med immunohistokemi	13
Infektion av livmoderceller, Realtids-PCR	19
Diskussion	21
Realtids-PCR	21
Infärgning av infekterade celler med immunohistokemi	22
Infärgning av vävnadssnitt med immunohistokemi	23
Konklusion	24
Tack	25
Litteraturförteckning	26

SAMMANFATTNING

Pyometra innebär en varbildande inflammation i livmodern och drabbar i genomsnitt ca 25 % av alla okastrerade svenska tikar före 10 års ålder. Sjukdomen är allvarlig och ger allmänna symtom som polyuri, polydipsi, inappetens och nedsatt allmäntillstånd. Oftast är de drabbade tikarna medelålders eller äldre och i efterlöpsperioden. I de flesta fall kan bakterier odlas fram från livmoderinnehållet och vanligast förekommande är *Escherichia coli* (*E. coli*).

Homeoboxar är transkriptionsfaktorer som har en DNA-sekvens gemensamt, den så kallade homeodomänen. De är viktiga under embryoutvecklingen där de bestämmer olika kroppsdelars positioner. Homeoboxgenerna delas grovt in i två klasser. Den första innehåller gener som sitter i grupper medan den andra innehåller gener som sitter utspridda i genomet. Tidigare studier har visat att två specifika homeoboxar (HOX A10 och HOX A11) krävs för att implantation av foster ska ske hos möss (*Taylor 2000*). En annan studie gjord med PCR-analys visade att uttrycket av HOX A6 nedregleras vid livmoderinflammation hos hund (*Hagman et al, 2009*).

Syftet med denna studie var dels att sätta upp en *in vitro*-modell för pyometra med humana epitelceller, hTERT.EEC (*Hombach-Klonisch et al, 2005*), från livmoder och en känd *E. coli*-stam isolerad från en pyometra. Den andra delen av studien bestod av att med hjälp av immunohistokemi och realtids-PCR undersöka hur en specifik homeoboxgen, HOX A6, uttrycktes vid en *in vitro* infektion med *E. coli*. Immunohistokemi användes även till att undersöka uttrycket av HOX A6 i livmodern hos tikar med pyometra.

Resultaten från immunohistokemin visar att genuttrycket av HOX A6 nedregleras i de humana livmodercellerna och i körtelepitelceller i vävnadssnitt av livmödrar från tikar med pyometra, efter infektion. Färgningen av vävnadssnitten visar även att uttrycket uppreglas i bindväven, både i immunceller och i fibroblastcellkärnor. Den använda primern som användes vid realtidsPCR-analysen fungerade inte optimalt, men resultaten tyder även här på att det sker en nedreglering av genuttrycket av HOX A6 i denna *in vitro*-modell av pyometra, precis som i den tidigare studien (*Hagman et al, 2009*). En skillnad mellan den tidigare studien och den som beskrivs här är att den tidigare studien använde sig av alla lager i livmoderväggen medan denna studie undersökte uttrycket av HOX A6 i epitelceller.

SUMMARY

Pyometra, a purulent infection of the uterus, affects about 25 % of unspayed bitches in Sweden before ten years of age. It is a serious systemic illness with symptoms such as polyuria, polydipsia, anorexia and depression. The affected bitches are usually middle-aged or older and in metoestrus. There are, in most cases, positive bacterial cultures from the uterine content, and the dominating microorganism found is *Escherichia coli* (*E. coli*).

Homeoboxes are transcription factors which have a DNA-binding sequence in common, the homeodomain. These genes are important during the embryogenesis and regulate the anatomic positions of different parts of the body. Homeobox genes are grossly divided into two groups. The first is composed of genes which appear in clusters and the second of genes dispersed in the genome. The results of one earlier study showed that two specific Homeobox genes (HOX A10 and HOX A11) are necessary for the implantation of the foetus in mice (Taylor 2000). Another study, performed with real time PCR-analysis showed that the expression of HOX A6 is downregulated in pyometra (Hagman et al, 2009).

The aim of this study was to create an *in vitro*- model of pyometra with human epithelial cells, hTERT.EEC (Hombach-Klonisch et al, 2005), from the uterus and a known *E. coli* pyometra strain. The other part of the study was to examine the expression of a specific homeobox gene, HOX A6, with immunohistochemistry and real time PCR during an *in vitro* infection with *E. coli*. Immunohistochemistry was also used to examine the expression of HOX A6 in the uteri of bitches with pyometra.

The results from the immunohistochemistry showed a downregulation of HOX A6 gene expression in the human epithelial cells after infection, and in the glandular epithelium in sections of uteri from dogs with pyometra. The sections also showed that the expression of HOX A6 was upregulated in the connective tissue, both in the immune-cells and in the nuclei of fibroblasts. The primer used in the real time PCR analysis was not optimal, but the results in this part of the study, also point to a downregulation in the gene expression of HOX A6 in the presence of *E. coli*. This is the same result as in the earlier study (Hagman et al, 2009). One difference between this study and the earlier one, is that the earlier study used all the layers in the uterine wall, while this study examined the expression of HOX A6 in the epithelial cells.

INLEDNING

Syfte

Syftet med detta examensarbete var att studera vad som händer vid allvarlig bakteriell infektion i livmodern genom att sätta upp en *in vitro*- modell för pyometra. Vidare var syftet också att med hjälp av immunohistokemi och realtids-PCR undersöka hur en specifik homeoboxgen, HOX A6, uppför sig vid en *in vitro* infektion med en känd patogen stam av *Escherichia coli* (*E. coli*) samt att med hjälp av immunohistokemi undersöka uttrycket av HOX A6 i livmodervävnad hos tikar med pyometra.

Bakgrund och litteraturöversikt

Pyometra

Pyometra (varbildande livmoderinflammation) är en vanlig sjukdom hos okastrerade tikar som kan få allvarliga konsekvenser om den inte upptäcks snabbt

och behandlas adekvat. Trots mycket kunskap och forskning inom ämnet är det fortfarande mycket som inte är känt om den inverkan sjukdomen och den systemiska infektionen har på cellnivå.

Den varbildande inflammationen i livmodern drabbar ca 25 % av okastrerade svenska tikar före 10 års ålder (*Egenvall et al., 2001*). Det är en systemisk sjukdom som framför allt drabbar tikarna i metöstrus (efterlöpsperioden) (*Hardy and Osborne, 1974*). Det är oftast medelålders och äldre tikar som inte har valpat som drabbas av sjukdomen (*Sandholm et al, 1975*) men även yngre tikar samt tikar som har haft valpkullar insjuknar (*Dow, 1958*). Vanliga symtom är polydipsi, polyuri och flytningar från vulva (*Sandholm et al, 1975*) men även nedsatt allmäntillstånd, inappetens, utspänd buk, kräkningar och i sällsynta fall diarré kan uppstå (*Dow, 1958*).

Etiologin till pyometra är komplex och består av en kombination av hormonpåverkan och bakteriell infektion. Eftersom sjukdomen inträffar under efterlöpsperioden är progesteron det hormon som dominerar. En förlängd frisättning av progesteron eller överdrivet svar på normala nivåer anses därför vara en faktor med betydande roll i sjukdomsutvecklingen. Progesteron ökar sekretionen hos körtlarna i livmodern samt stimulerar deras proliferation. Detta tillsammans med det faktum att progesteron även håller livmoderhalsen slutet samt minskar myometriets förmåga att kontrahera gör att vätska kan ansamlas i livmodern. En livmoder som är under påverkan av progesteron är dessutom känsligare för infektion. Östrogen å andra sidan gör så att cervix dilaterar, livmodermuskulaturens aktivitet ökar och neutrofiler får lättare att förflytta sig till livmodern (*Hardy and Osborne, 1974*).

Pyometra har inte kunnat framställas experimentellt hos hundar enbart med experimentellt tillfört östrogen. Behandling med höga doser progesteron samt terapeutiska doser administrerade efter medicinering med östrogen har däremot gett förändringar i livmodern liknande dem vid den naturliga sjukdomen (*Dow, 1959b*).

I de flesta fall av pyometra kan bakterier odlas fram från livmodern. Oftast isoleras den Gramnegativa bakterien *E. coli*. I en undersökning förekom *E. coli* i 72 % av fallen (*Vandeplassche et al, 1991*), medan det i en annan studie var hela 85 % som hade renkultur med *E. coli* i livmodern (*Sandholm et al, 1975*). En experimentell studie lyckades även framkalla livmoderinflammation genom att operativt införa *E. coli* i livmoderhornen hos hundar. Dag 11-30 efter LH-toppen (LH, luteiniserande hormon) var det flest tikar som drabbades av pyometra (90,9 % dag 11-20 och 78,9 % dag 21-30 efter LH-toppen). Dag 1-10 samt dag 51-60 efter LH-toppen var det däremot endast 20 % som utvecklade pyometra. Enligt resultaten av den forskningsstudien var det alltså under tidig metöstrus som det var störst risk för tikarna att insjukna i livmoderinflammation (*Tsumagari et al, 2005*).

I en svensk undersökning gjord på data på över 200 000 hundar ur försäkringsbolaget Agria djurförsäkringars databas visades en raspre disposition för att utveckla pyometra. Några raser som oftare drabbades av sjukdomen var Rottweiler, Cavalier King Charles spaniel, Berner Sennenhund och Golden

retriever. Raser som visade sig ha låg risk att drabbas av sjukdomen var drever, schäfer, och tax (Egenvall et al., 2001).

Livmoderns uppbyggnad

Livmodern är ett tubulärt organ som innerst har ett tomrum, lumen. Livmoderväggen är uppbyggd av tre lager. Livmoderns yttersta lager består av bindväv (adventitia) eller bindväv täckt med ett lager epitelceller (serosa) i de delar där livmodern befinner sig i bukhålan. Innanför detta lager kommer myometriet som är ett tjockt lager av glatt muskulatur. Livmoderns innersta lager kallas för endometriet och består av epitelceller (körtelepitel och ytepitel) och bindväv med kärl. (Junqueira, L. C., Carneiro, J., 2005)

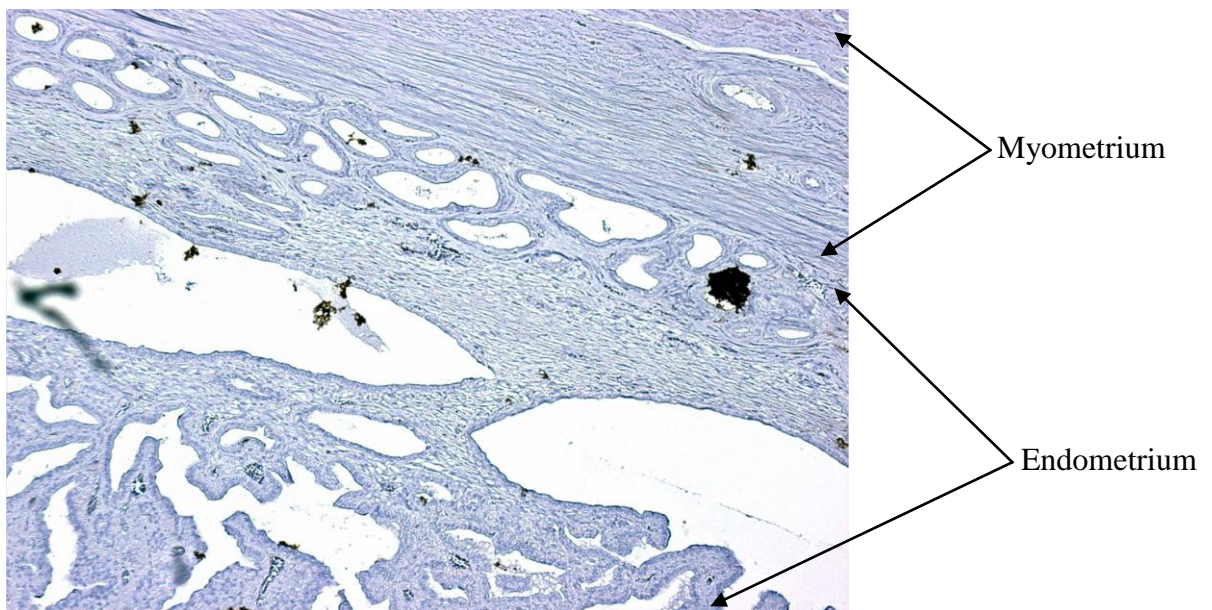


Foto över endometriet och myometriet från livmodervävnad hos en tik med frisk livmoder från denna studie (P 1756-08). I detta foto har endometriet och myometriet markerats med pilar.

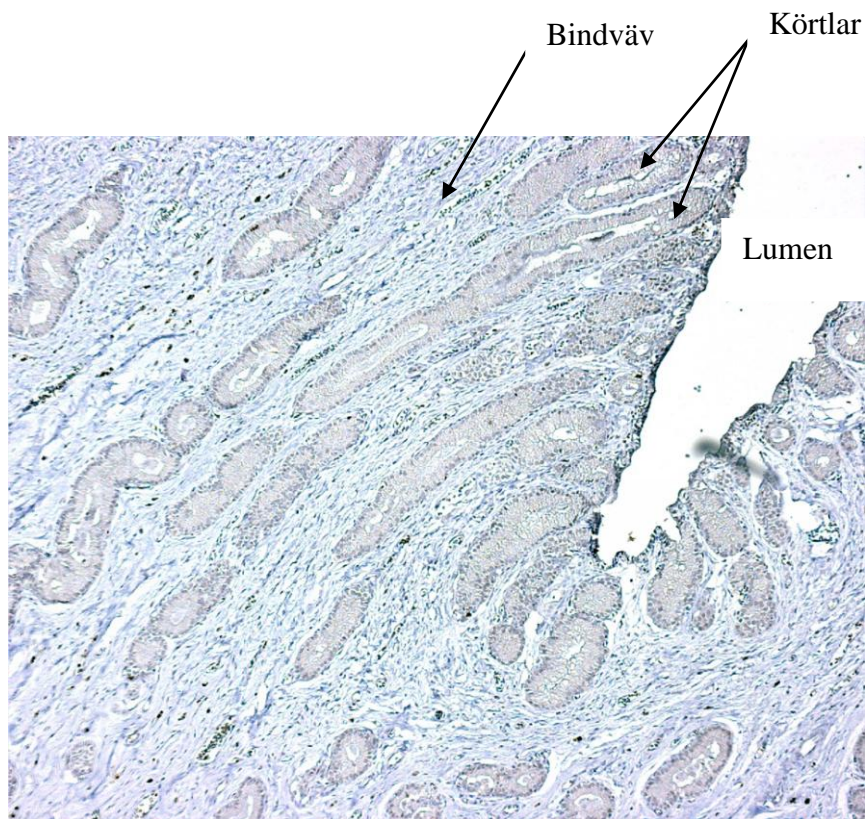


Foto över endometriet i livmodervävnaden hos en tik med frisk livmoder som ingick i denna studie (P 1847-08). Här har bindväv, körtlar och lumen markerats med pilar. Körtlarna är infärgade med antikropp mot HOX A6, vilket gör att de lättare kan utskiljas.

Homeoboxar

En homeoboxgen är en kort DNA-sekvens på 180 baspar varav en homeodomän, 60 aminosyror lång, kodar för ett DNA-bindande protein. Dessa sekvenser är väl konserverade mellan en mängd olika arter av djur och har visat sig vara viktiga i embryoutvecklingen där de bestämmer olika kroppsdelars positioner. Väl studerade är homeoboxgenerna hos *Drosophila*, mer känd som bananflugan, där en mutation gör att kroppsdelar byter plats med varandra. Till exempel kan en mutation i ett visst område resultera i att ben växer ut på huvudet istället för antenner (McGinnis *et al.*, 1985; Alberts *et al.*, 2002).

Homeoboxarna är transkriptionsfaktorer som binder till och aktiverar eller trycker ner uttrycket av ett stort antal andra gener och detta leder alltså till utveckling av en särskild kroppsdel (Taylor, 2000). Homeoboxarna regleras i sin tur av vissa proteiner, bl.a. Fibroblast growth factor (Nunes *et al.*, 2003). Homeoboxgenerna delas grovt in i två klasser, den första innehåller gener som sitter i grupper, HOXgener. Den andra klassen innehåller gener som sitter utspridda i genomet. HOXgenerna är bland annat involverade i celltillväxt och celldifferentiering, samt interaktioner mellan olika celler och mellan celler och extracellulärt matrix. Människor har 39 HOXgener som i sin tur delas in i fyra grupper, HOX A, B, C och D (Abdel-Fattah *et al.*, 2006).

Hos människa och mus har man sett att uttrycket av HOXgener fortsätter även i vuxen ålder i fortplantningsorganen. En möjlig orsak till detta kan vara att vävnaden ska bibehålla sin förmåga att utvecklas. Livmodern är ett organ som

hela tiden förändras i takt med östralcykeln. Denna förändring har många likheter med den embryonala utvecklingen. Två HOXgener, HOX A10 och HOX A11 har visat sig vara nödvändiga för att möss ska vara fertila. Möss som inte uttrycker dessa två gener (knock-out möss, det vill säga möss där en eller flera gener avsiktligt stängts av) kan producera normala embryon som överlever hos en surrogatmamma, men de implanteras inte i livmodern hos knock-out mössen. Detta trots att knock-out mössens livmödrar ofta ser normala ut histologiskt (Taylor, 2000).

Hos människa regleras dessa gener av både östrogen och progesteron. Uttrycket av båda homeoboxgenerna ökar kraftigt under mitten av lutealfasen, då implantationen sker, och är sedan högt under hela lutealfasen (Taylor, 2000). Människor med endometriosis har ofta problem med sänkt fertilitet. Vid endometriosis ses inte ovan nämnda stegring i uttrycket av HOX A10-11 vilket kan vara anledningen till minskad implantation hos de drabbade kvinnorna (Taylor et al, 1999).

Homeoboxar har även studerats i samband med undersökningar av livmödrar med livmoderinflammation hos hundar. Resultaten av den studien visade att ca 700 gener nedreglerades påtagligt, och dessa gener dominerades av homeoboxar och zink-finger-faktorer. Av de 700 nedreglerade generna var 16 homeoboxar, och en av dem HOX A6. Antalet uppreglade gener i livmodern vid pyometra var ca 800 st. Av dessa var endast tre homeoboxar eller zink-fingrar, och dessa fanns inte med bland de 100 mest uppreglade generna (Hagman et al, 2009).

Den ovan nämnda studiens resultat är mycket intressanta och ger mer information om homeoboxars betydelse och funktion utöver embryogenesen. Denna studie går vidare med dessa resultat för att dels se om de kan upprepas med en *in vitro*-modell av pyometra samt dels undersöka uttrycket av HOX A6 i olika celltyper i livmodern vid pyometra.

METOD OCH MATERIAL

Cellinje och bakterietyp

Cellinjen som användes under studien heter hTERT-EEC (Hombach-Klonisch et al, 2005) och kommer från Dr. Thomas Klonisch. Det är en human cellinje med epitelceller från endometriet och växer i ett enskiktat lager. Odlingsmediumet Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 ham (Sigma-Aldrich, Tyskland) användes som bas. Utöver det tillsattes även 10 % kalvserum och 1 % L-glutamin. 1 % antibiotika, penicillin och streptomycin, (SVA, Sverige) tillsattes till mediet utom under själva infektionsförsöket.

Då *E. coli* är den bakterie som vanligen orsakar pyometra- infektioner, valdes denna bakterieart för studien. Tre bakteriestammar som tidigare har isolerats från livmodern hos tikar med pyometra valdes ut till projektet. Bakteriestammarna har serotypats och genotypats med nedbrytning med hjälp av restriktionsenzym samt puls-fält-gel-elektrofores. Isolaten har därefter testats för antimikrobiellt resistensmönster. Den *E. coli*-stam som användes för genomförandet av detta

projekt var den av de tre utvalda stammarna som växte ut bäst på LB-agarplatta (European bacteriological agar for microbiology use, tryptone, jästextrakt från Pronadisa, Spanien och natriumklorid från Merck, Tyskland), då det var önskvärd med en så aktiv stam som möjligt. Agarplattorna inkuberades i 37 °C i ca 24 timmar. Den utvalda stammen är mucin- och hemolysproducerande med följande antigen: O6: K14: H31 där O står för cellväggsantigen, K för kapselantigen och H för flagellantigen.

Infektionsförsök

Cellerna odlades sterilt och de cellflaskor som användes vid försöken hade celler som täckte ca 80-90 % av botten. Cellerna från en cellodlingsflaska räknades med hjälp av en Bürkerkammare och resultatet blev drygt 6 200 000 celler. Okulär kontroll av cellerna skedde med hjälp av mikroskop innan infektionsförsöket påbörjades för att verifiera att cellerna hade normal morfologi. På eftermiddagen dagen före det planerade försöket inokulerades den utvalda *E. coli*-stammen i flytande LB-medium (lysogeny broth, innehåller tryptone, jästextrakt från Pronadisa, Spanien och natriumklorid från Merck, Tyskland samt avjonat vatten) för att bakterierna skulle vara aktiva vid infektionen. En sträng bakteriekolonimaterial blandades ut i ett sterilt rör med 5 ml autoklaverat LB-medium med hjälp av en steril 10 µl plastögla. Röret sattes sedan i en ”skak” som höll en temperatur på 37 °C och 210 varv/minut i ca 14 h.

Bakterielösningens grumlighet, optical density, (OD) mättes vid 600 nm våglängd och med PBS (phosphate buffered saline, fosfatbuffrad natriumkloridlösning) som referens. Lösningen blandades ut till $OD \approx 1$ med PBS efter att LB-mediet tvättats bort av två tvättar med PBS. Därefter späddes bakterielösningen till olika koncentrationer i de olika infektionsförsöken. Dessa slutliga bakterielösningar användes till cellinfektionsdelen av försöket enligt följande: 125 µl användes som hög infektionsdos medan 12,5 µl användes som låg infektionsdos. Utifrån denna lösning gjordes även en spädningsserie för att kunna räkna ut antal CFU (colony forming units) /ml. Sedan racklades 50 µl av spädningarna ut på varsin LB-agarplatta (LB-medium och European bacteriological agar for microbiology use, Pronadisa, Spanien) och inkuberades efter detta i 37 °C i 24 h. Utifrån detta beräknades antal CFU (colony forming units)/ ml av bakterielösningarna.

Parallellt med odlingen av de infekterade cellerna odlades i de två senare infektionsförsöken även celler i likadant antibiotika-fritt medium som de infekterade cellerna, men istället för bakterielösning tillsattes här endast PBS. Dessa kontrollceller odlades i samma temperatur, 37 °C, och i samma inkubator som de infekterade cellerna så länge försöket pågick.

Totalt utfördes tre infektionsförsök med sex olika infektionsdoser. I första infektionsförsöket var infektionsdosen 2 663 000 respektive 266 300 CFU (hög-respektive låg infektionsdos), 24 600 respektive 2 460 CFU i andra infektionsförsöket och 284 respektive 28 CFU i tredje och sista infektionsförsöket. I första försöket användes sex cellodlingsflaskor, i de två senare försöken adderades en odlingsflaska med kontrollceller. Cellerna

undersöktes vid tre olika tillfällen: 0, 3 och 24 timmar efter infektion (rekommendation enligt G. Pejler). För varje undersökningstidpunkt användes två flaskor med celler, en med hög infektionsdos av bakterier och en med låg infektionsdos. Efter 24 timmar undersöktes dessutom kontrollcellerna i de två senare försöken.

Innan själva infektionsdelen av försöket kunde påbörjas byttes cellernas medium till ett utan antibiotika (samma medium men utan tillsats av antibiotika) efter det att cellerna tvättats två gånger med PBS. Därefter tillsattes nytt odlingsmedium i varje cellodlingsflaska och slutligen tillsattes bakterielösningen med valda infektionsdoser (hög respektive låg dos).

Vid varje undersökningstidpunkt pipetterades cellodlingsmediet upp ur de två (eller tre vid 24 timmar efter infektion) flaskor som var avsedda för undersökning den specifika tidpunkten. Därefter tvättades cellkulturerna med PBS och tvättmediet pipetterades bort. Därefter tillsattes Trypsin för att lösa upp cellkontaktorna så att cellerna lossnade från flaskorna och varandra. Flaskorna inkuberades därefter i 37°C i ca 2 minuter tills cellerna lossnade från flaskan. När detta var gjort tillsattes nytt cellodlingsmedium och cellerna blandades ordentligt med mediet med hjälp av pipett. Sedan överfördes hälften av vardera medium- och cellblandning till ett rör som märktes upp. Rören centrifugerades därefter och mediet pipetterades sedan bort, varefter cell-pelleten frystes in i -20 °C tills det var dags att påbörja PCR- analyserna.

Den resterande volymen av cellodlingslösningarna användes till att centrifugera ut cellerna på särskilda objektglas (Superfrost® Plus, Thermo Scientific, Tyskland) för senare färgning med immunohistokemi. Detta gjordes med hjälp av en cytopinn- centrifug. 12 stycken glas gjordes för varje bakteriedos (hög- respektive låg infektionsdos) per undersökningstidpunkt. Glasen med cellerna märktes sedan upp och fick därefter torka 1 h i rumstemperatur innan de frystes ner och förvarades i -20 °C fryst i väntan på färgning.

Immunohistokemi

Innan försöket startade hade infärgning med antikroppen mot HOX A6 skett för att finna den optimala spädningen (1:150) för antikroppen. Dessutom färgades små bitar av normalvävnad från olika humana organ samt vävnadssnitt från livmodern hos några av de tikar som skulle ingå i studien. Genom att jämföra infärgningen i human livmoder med infärgningen i livmodervävnad från tikar verifierades att antikroppen, som tagits fram för humana celler, även fungerade på hund.

Infekterade celler

I första färgningsomgången med immunohistokemi användes de celler från första infektionsförsöket som infekterats med 266 300 CFU av den utvalda *E. coli*- stammen (0, 3 samt 24 timmar efter infektion). Ytterligare tre färgningar gjordes men då med de sju cellkulturer från det tredje, och sista, infektionsförsöket. Infektionsdoserna var då 283 respektive 28 CFU.

Vävnadssnitt

Livmodervävnad som fixerats i 4 % fosfatbuffrad formaldehyd och paraffinbäddats valdes ut från 4 hundar med pyometra och 4 hundar med frisk livmoder och snittades med en tjocklek av 5 µm. Montering skedde på likadana objektglas som användes till de infekterade cellerna. De vävnadssnitt med livmödrar från tikar med pyometra som användes var P 1368-08 A, 1369-08 B, 1449-08 och 1511-08. De vävnadssnitt med friska livmödrar som användes var P 1654-08, 1756-08, 1847-08 och 2299-08. Det senast nämnda snittet valdes dock bort då endast några kärl med innehållande blodkroppar och enstaka andra celler ses. Resten av cellerna uppvisar förändringar liknande de man ser vid förfettnings. Tre snitt färgades två gånger: P 1449-08, 1654-08 och 1511-08. Övriga snitt färgades endast en gång på grund av försökets snäva tidsram.

Färgningsprocedur

Två glas användes för varje vävnad/cellkultur. Det ena färgades in med antikropp och det andra, den negativa kontrollen utan. Första steget var att fixera cytopinn-glasen i 4 % buffrad formaldehyd i 15 min för att cellerna och vävnaden skulle få samma typ av fixering. Samtidigt avparaffinerades och rehydrerades vävnadssnitten. Därefter tryckkokades alla glasen i en blandning av antigenretrieval-buffert och avjonat vatten i 125 °C i 4 minuter och 90 °C i 4 min och en ring ritades runt cellerna/vävnaderna med en fettpenna. Sedan applicerades peroxidas-block (DAKO EnVision™+ System, HRP, Dako, Danmark) över cellerna/vävnaden för att blockera det endogena peroxidaset som finns bland annat i blodkroppar. Glasen inkuberades i 5 minuter. Nästa steg var att späda getserum (SVA, Sverige) till 1:50 med 1x TBS-buffert (Tris-buffered Saline, saltbuffert) och tillföra detta över cellerna. Efter en timmes inkubation späddes antikroppen, HOX A6 (Institutionen för genetik och patologi, Uppsala universitet, Sverige), 1:150 med TBS-buffert. Antikroppen applicerades över hälften av glasen medan de negativa kontrollerna istället täcktes med TBS-buffert. Efter ytterligare en timmes inkubering tillfördes peroxidasmärkt polymer, sekundär antikropp (DAKO EnVision™+ System, HRP Labelled Polymer, Dako, Danmark) till alla glas och inkubering skedde i 30 minuter. Nästa steg var att tillföra en substratkromogenlösning av Dab och substratbuffert (Dako, Danmark) som binder till peroxidaset i den sekundära antikroppen och resultatet blir en brun infärgning på platsen. Glasen inkuberades i detta steg i 7 minuter.

Innan en ny reagens tillsattes togs den gamla bort. Alla inkuberingar skedde i rumstemperatur, de längre än 30 minuter skedde i fuktighetskammare.

Till sist sänktes glasen ner i vattenbaserat hematoxylin (Mayer) i 30 sekunder. Överskottsfärg togs bort genom vattenbad i 10 minuter. Därefter dehydrerades objektglasen och monterades med Pertex.

Realtids-PCR

Preparering av RNA

Total rening av RNA skedde med NukleoSpin® II RNA (Machery-Nagel, Tyskland). Först lyserades cellerna med en blandning av β -mercaptoetanol och en medföljande buffert, RA1. Därefter filtrerades lysatet genom centrifugering och DNA band sedan in till ett filter efter tillsats av 70 % etanol genom ytterligare centrifugering. Sedan genomgick filtret en avsaltningssprocess med hjälp av en buffert. Denna process gjorde att DNase som därefter tillsattes bröt ner DNA mer effektivt. I detta steg ingick en inkubering i 15 minuter i rumstemperatur. Medföljande buffert RA2 användes för att inaktivera DNaset och proverna centrifugerades på nytt. Därefter följde två tvättar med ytterligare en buffert, RA3, samt centrifugering. Sista steget var att tillsätta RNase-fritt vatten till filtret och därefter inkubera i en minut i rumstemperatur innan proverna centrifugerades en sista gång. I detta steg löste sig RNA:t från filtret ner i vattnet. Detta färdigpreparerade RNA frystes in i -20°C för att användas vid framställning av cDNA vid senare tillfälle.

Cellkulturer som inte hade någon synlig cell-pellet eller några synliga celler på cytopinn-glasen valdes bort då det troligtvis inte fanns kvar några celler och därmed inte något RNA i dessa prover. De som valdes bort var celler från infektionsförsök ett och två, 24 h efter infektion (infektiosdoser 2 663 000 CFU, 266 300 CFU, 24 600 CFU samt 2 460 CFU). Totalt preparerades RNA från 16 cellkulturer. I alla steg fram till PCR- analysen förvarades prov och reagenser på is om inte annat anges.

Bildande av cDNA

Det första steget i detta moment var att det preparerade RNA:t från de 16 cellkulturerna blandades med random hexamers vilket är korta kedjor av slumpvis sammansatta nukleotider som fungerar som primers och binder in till motsvarande RNA-sekvens, (50 ng/ μl) och fria nukleotider, dNTPs, (deoxyribonukleosidtrifosfater, 2 mM). Denna blandning ställdes efter vortexning på ett värmeblock som höll 65°C i fem minuter. Därefter sattes blandningen på is i två minuter och centrifugerades sedan snabbt. Efter detta tillsattes 5x strand buffer (buffrar pH samt innehåller bl.a. magnesium som transkriptas behöver för att fungera) och 0,1 M DTT (ditiotreititol, är ett reduktionsmedel, skyddar thiolerade nukleinsyror samt skyddar oxidationskänsliga enzymer) och det blivande cDNA:t blandades med pipett innan det inkuberades i rumstemperatur i två minuter. Sista tillsatsen var superscript II (omvänt transkriptas), som omvandlade RNA:t till DNA. Blandningen vortexades och inkuberades i rumstemperatur i 10 minuter. Därefter ställdes röret på värmeblock som höll 42°C i 50 minuter och avslutningsvis 70°C i 15 minuter. Därefter förvarades det färdiga cDNA:t i -20°C fryr fram till PCR- analysen.

Realtids-PCR

Det första som gjordes var en kontroll av primerna, s.k. ”primer efficiency”. För att göra detta användes det prov som troddes vara mest positivt. Då tidigare undersökning visade en nedreglering av HOX A6 vid pyometra användes cDNA från kontrollcellerna. Primerna (en framåt och en bakåt) förvarades i -20 C° och var i pulverform. HOX A6 fwd (forward) var 21 baser lång: 5'- CTC GGG CAG TGG CAA GCA GAG-3' och HOX A6 rev (reverse) var 20 baser lång: 5'- ACA GCA CCC GCG CAG GAG TT -3' (Integrated Device Technology, USA). Frystorkad primer löstes i RNase-fritt vatten och HOX A6 fwd och HOX A6 rev blandades ihop. Detta utgjorde primermixen.

Tre olika spädningar av kontrollcellernas cDNA användes för att kontrollera primern; 1:1, 1:10 samt 1:100. Alla prover sattes som dubletter och två ”blanka brunnar” gjordes i ordning med mastermix och RNase-fritt vatten istället för cDNA för kontroll av eventuell kontamination eller pipetteringsfel.

Mastermixen innehöll SYBR Mix (polymeras samt cyber green- fluorescerande färg som fäster till dubbelsträngat DNA), Referens dye (referens som styrkan av fluorescensen från cyber green kan normaliseras mot), Primer mix (200 nM) samt RNase-fritt vatten (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Brunnarna som användes markerades och 9 µl mastermix och 1 µl cDNA (i de olika koncentrationerna) tillsätts till varje brunn utom de två ”blanka brunnarna”. Därefter sätts plattan med alla brunnar in i PCR- apparaten och antalet cykler ställs in enligt följande:

- 50° C i 2 minuter
- 95° C i 10 minuter

- 95° C i 15 sekunder X 40
- 60° C i 1 minut

Vid uträkning av primerns effektivitet användes lutningen på spädningsserien som plottades mot log-koncentrationen. Spädning 1:1 gav log 0, 1:10 -1 och 1:100-spädningen gav log -2. Lutningen på linjen skulle vara $-3.1 \geq -3.6$. Primerns effektivitet var då nära 100 %. Effektiviteten räknades ut genom formeln $x = 10^{(-1/linjens\ lutning) - 1}$.

Vid 100 % effektivitet blev värdet 1 vid användning av ovanstående formel.

Då lutningen på linjen i första körningen blev ca -2, vilket gav en effektivitet på över 200 %, upprepades proceduren och koncentrationen primer ändrades till 300 nM respektive 150 nM för att se om detta kunde ändra effektiviteten till 100 %. Detta gav dock inte bättre resultat, och lutningen på linjen var ca -1,9. Därför upprepades proceduren en gång till, med den skillnaden att alla prover kördes samtidigt på grund av en snäv tidsram.

Spädningsserien för att räkna ut primerns effektivitet gjordes som tidigare, men 200 nM primermix användes som i första omgången då detta gav en effektivitet som var närmast det önskvärda. Samma mastermix användes till mina prover som

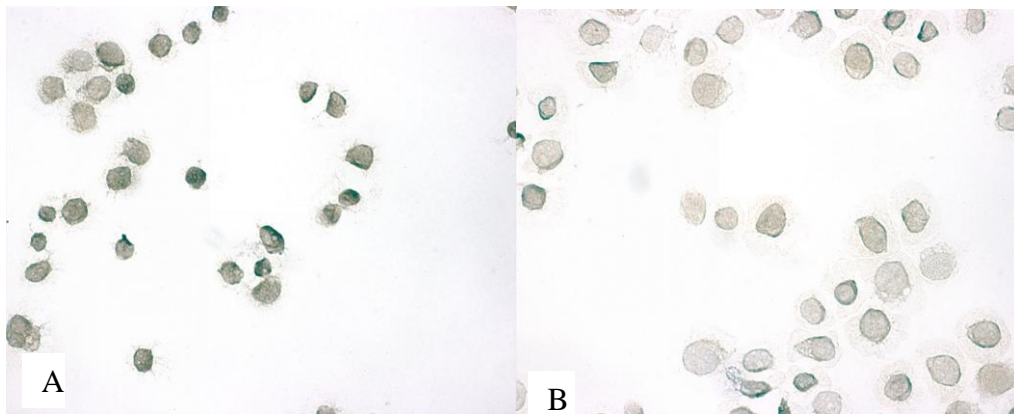
även de sattes i dubbletter. Utöver detta gjordes ytterligare en mastermix med en primer för en human "house-keeping gene" som finns i alla humana celler, GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enzym som till exempel är inblandat i glykolysen), och mina prover sattes i dubbletter även här. Denna gen var till för att se att replikationen fungerade som den skulle.

RESULTAT

Infektion av livmoderceller, immunohistokemi

Från första färgningsomgången fanns det relativt många celler som hade synlig cytoplasma från 0 och 3 timmar efter infektion. Cellerna hade framför allt ett kärnuttryck vid de båda tidpunkterna, men även i cytoplasman kunde ett visst uttryck av HOX A6 ses. Subjektivt såg det ut som att uttrycket av transkriptionsfaktorn generellt var starkare 0 timmar efter infektion, men det fanns ett fåtal celler från båda tidpunkterna som bedömdes ha ungefär samma styrka på proteinuttrycket. Inga levande celler sågs 24 timmar efter infektion i infektionsförsök ett och två.

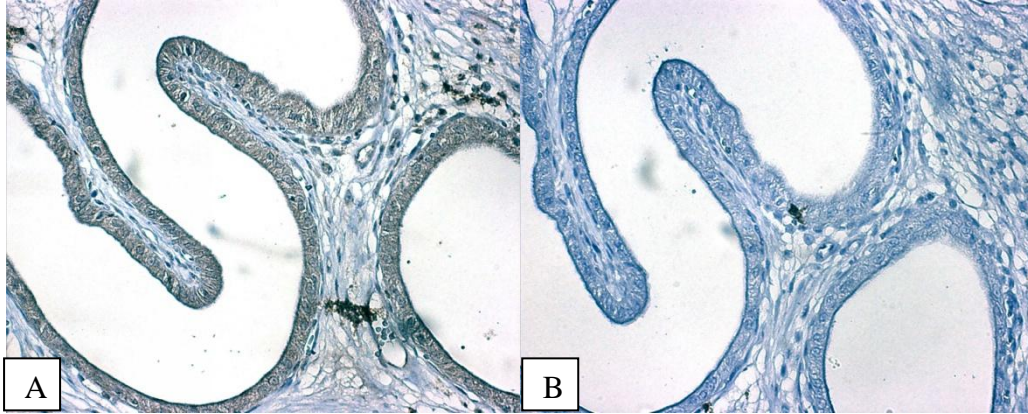
Cellerna från de senaste färgningarna hade av någon anledning generellt inte någon synlig cytoplasma, vilket gjorde det svårt att bedöma om uttrycket av HOX A6 finns i cytoplasman, och/ eller i kärnan. Det enda man kunde utläsa från dessa glas var en färgskillnad mellan de glas som var färgade med antikropp och de som var negativa kontroller. Detta innebär alltså att cellerna uttrycker HOX A6, men det går inte att säga var någonstans i cellen det uttrycks.



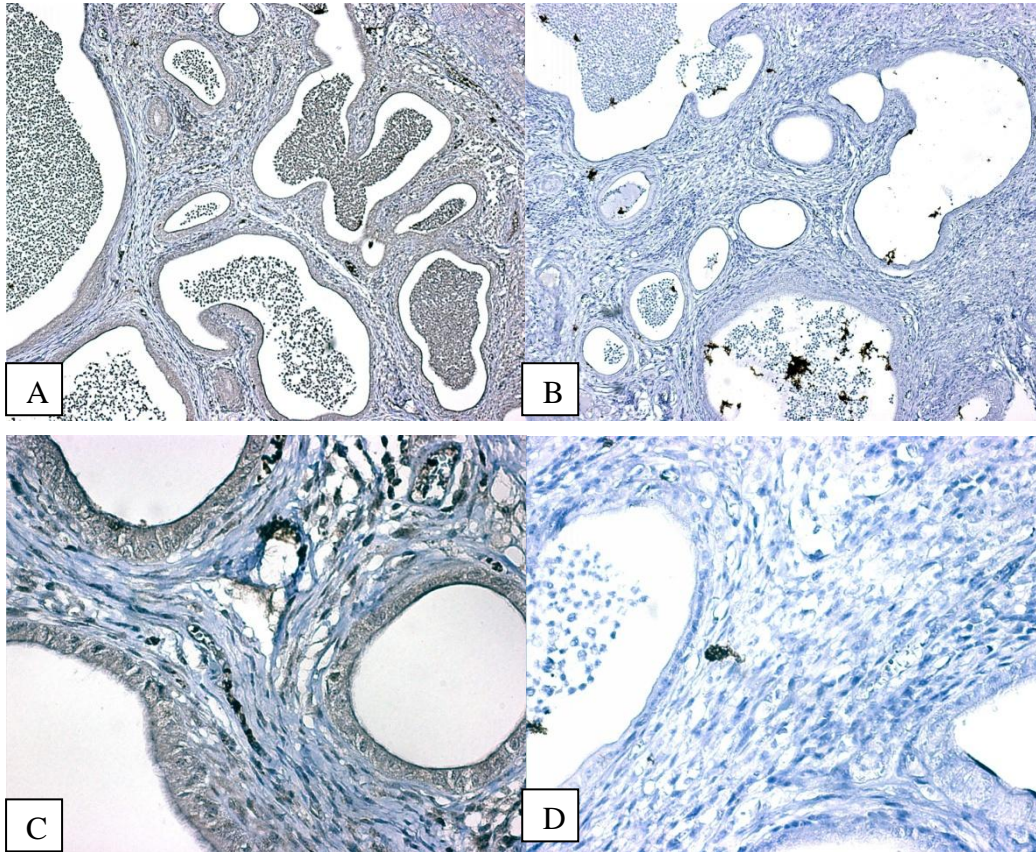
A. Till vänster ses ett foto från första färgningsomgången av hTERT-EEC celler som är infärgade med antikropp mot HOX A6, direkt efter infektion har skett. Cellkärnorna har ett relativt starkt uttryck av HOX A medan cytoplasman generellt inte uttrycker transkriptionsfaktorn. B. Till höger ses ett foto tre timmar efter att infektion har skett från samma färgningsomgång som A. Även här är uttrycket framför allt lokaliserat till cellkärnorna, men uttrycket är svagare än direkt efter infektionen.

Infärgning av vävnadssnitt med immunohistokemi

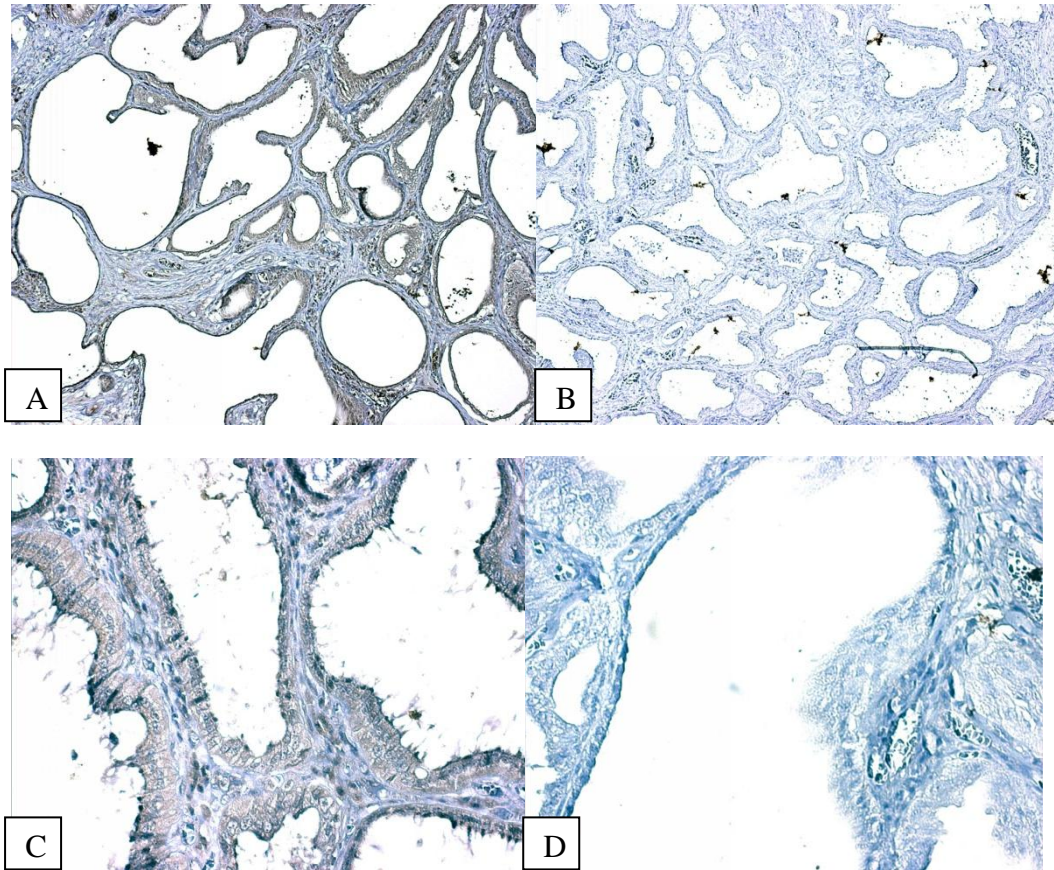
Livmodrar från tikar med pyometra



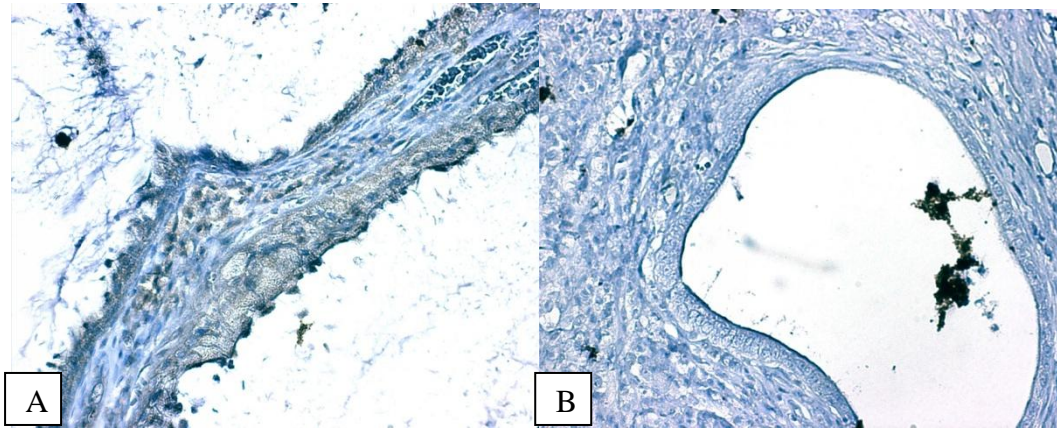
Vävnadssnitt från livmodern hos en tik med pyometra (P 1368-08 A). A. Fotot visar den bruna infärgningen som antikroppen mot HOX A6 ger. Uttryck av HOX A6 ses i både cytoplasma och cellkärna i körtelepitelet, diffust utspritt. Även fibroblaster och immunceller i bindväven uttrycker homeoboxen, men här framför allt i kärnorna. I vissa fall ser dessa kärnuttryck nästan svarta ut. Cellkärnorna i glatta muskelceller visar även uttryck av transkriptionsfaktorn i vissa områden i preparatet (utanför detta foto), ibland starkare än i körtelepitelet. B. Den negativa kontrollen visar att det inte sker någon ospecifik inbindning av sekundärantikroppen.



Vävnadssnitt från livmodern hos tik nummer två med pyometra (P 1369-08 B). A. Bilden visar att uttrycket av HOX A6 (färgas brunt) framför allt är lokaliserat till körtelepitelcellerna samt i området närmast körtellumen. B. Fotot visar en negativ kontroll i samma preparat. C. Större förstoring av A. Här ses att vissa cellkärnor i körtelepitelet uttrycker homeoboxen, men uttryck ses även i cytoplasman. Relativt mycket uttryck av HOX A6 ses i cellkärnor i bindväven, både fibroblaster och immunceller. Ofta har cellkärnorna i bindväven starkare uttryck än de i körtelepitelet. Enstaka kärnor i den glatta muskulaturen uttrycker homeoboxen och även i cytoplasman ses ett svagt uttryck (ses ej i bilden). D. Fotot är en större förstoring av B. och ingen ospecifik inmärkning av sekundäantikropp kan ses.

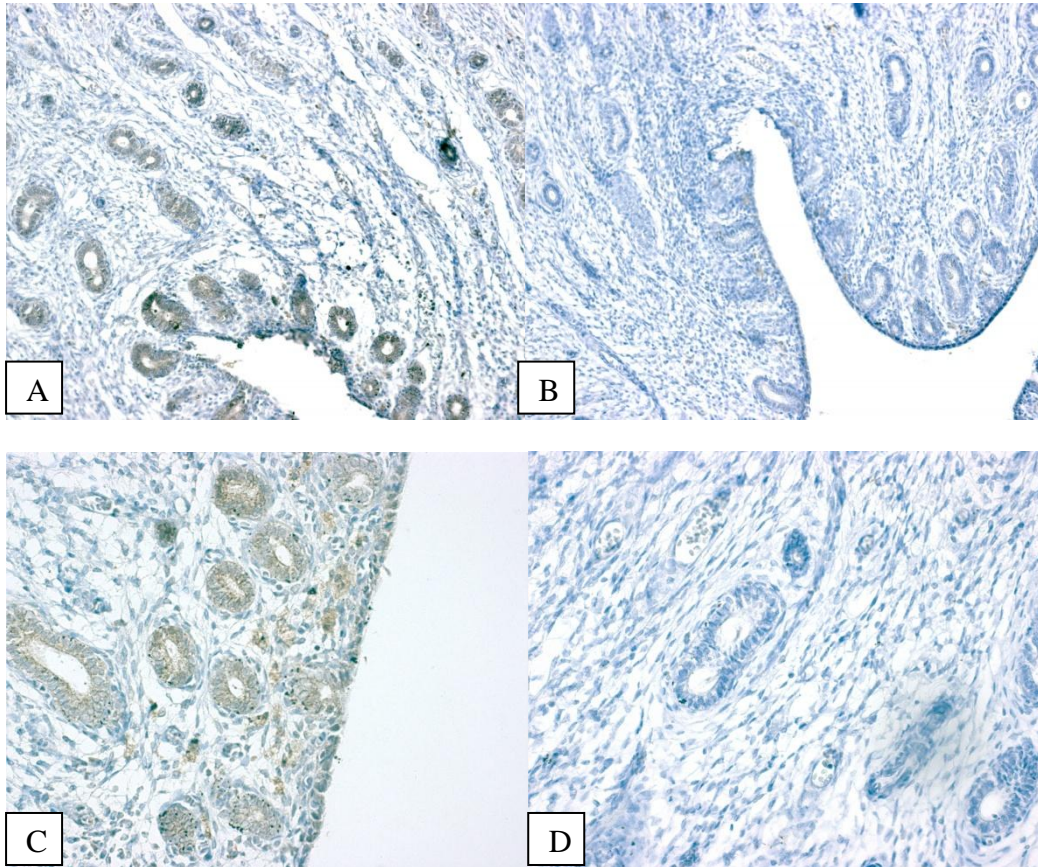


Vävnadssnitt från livmodern hos tik nummer tre med pyometra (P 1449-08). A. Fotot visar att uttrycket av HOX A6 framför allt ligger i anslutning till körtlarnas lumina. B. Detta foto visar motsvarande negativa kontroll, alltså binder ingen sekundäantikropp in ospecifikt. C. Bilden är en större förstoring av A. På vissa ställen i vävnaden är det framför allt ett kärnuttryck, på andra ställen är det framför allt cytoplasman som uttrycker HOX A6. På något ställe ser uttrycket i cytoplasman ut att vara punktformig. Relativt mycket cellkärnor i bindväven uttrycker transkriptionsfaktorn, fibroblaster och immunceller. Den längssnittade glatta muskulaturen närmast epitelet har svagt positivt uttryck diffust i cellerna, enstaka av de tvärsnittade glatta muskelcellerna har kärnuttryck. D. Fotot visar en större förstoring av B.

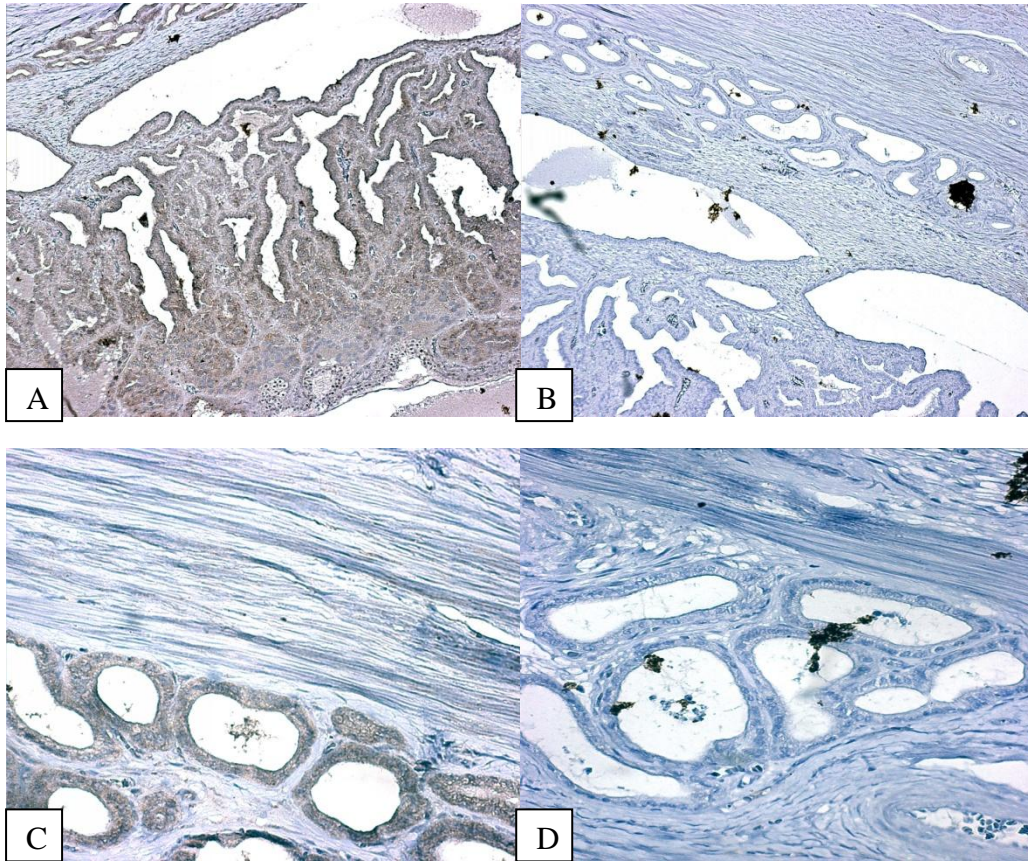


Vävnadssnitt från livmodern hos tik nummer fyra med pyometra (P 1511-08). A. Fotot visar ett relativt svagt uttryck av HOX A6 i körtelepitelet. På vissa ställen i preparatet är lokaliseringen av proteinuttrycket i körtelepitelcellerna diffus i både cytoplasma och lite i kärnan. I vissa områden, framför allt nära körtelepitelet, uttrycks HOX A6 i många cellkärnor i bindväven. Detta är immunceller och fibroblaster. Enstaka cellkärnor i den glatta muskulaturen har ett svagt uttryck av transkriptionsfaktorn, liksom även cytoplasman (ses inte på fotot). B. Bilden visar negativ kontroll i samma livmodervävnad.

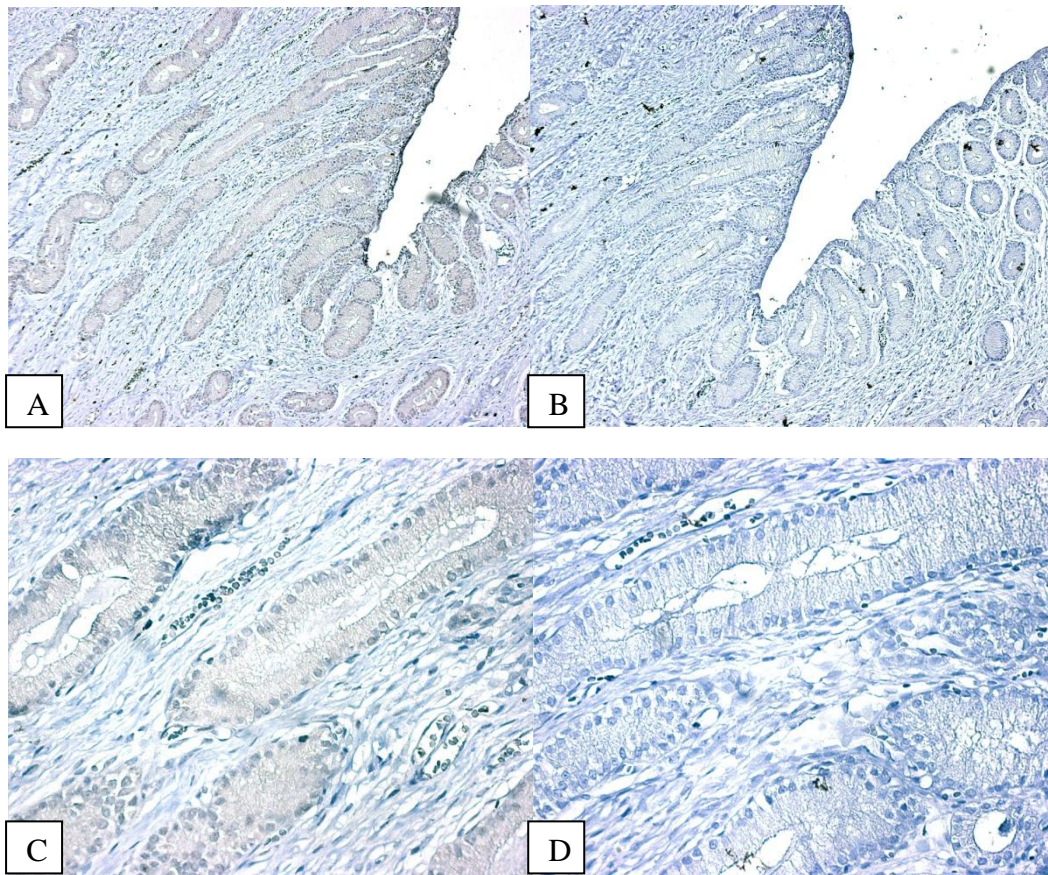
Livmodrar från friska tigar



Livmodervävnad från tik nummer ett med frisk livmoder (P 1654-08). A. Fotot visar ett relativt starkt uttryck av HOX A6 i cellerna närmast körtlarnas lumina. B. Detta är motsvarande negativa kontroll till bild A. C. Förstoring av bild A. Här ses att transkriptionsfaktorn framför allt är lokaliserad till cytoplasman och ser på vissa ställen ut att ha en punktformig distribution, då ofta nära cellkärnorna. Ett fåtal cellkärnor uttrycker transkriptionsfaktorn. Basalt i cellerna ses pigment som färgas svart, vilket även ses på den negativa kontrollen. Enstaka immunceller i bindväven visar proteinuttryck, dessa finns framför allt i kärlen. Inget uttryck ses i musklerna (detta ligger utanför bilden). Dock är preparatet inte helt där de tvärskurna musklerna är, vilket gör det svårt att bedöma. D. Fotot visar en större förstoring av B, det vill säga preparatets negativa kontroll. Inte heller i denna förstoring ses någon ospecifik inbindning av sekundäantikroppen. Däremot ses precis som i infärgningen med antikropp, på vissa ställen svarta pigmentfläckar punktformigt i cytoplasman i körtelepitelet, framför allt basalt i cellen.



Livmodervävnad från tik nummer två med frisk livmoder (P 1756-08). A. Fotot visar att områdena närmast körtellumina har ett relativt starkt uttryck av HOX A6. B. Detta foto visar motsvarande negativa kontroll, det vill säga här ses ingen ospecifik inmärkning av sekundäantikroppen. C. Fotot är en större förstoring av A. Även i denna förstoring ses ett relativt starkt uttryck av HOX A6, framför allt i cytoplasman. Lokaliseringen av transkriptionsfaktorn ser på flera ställen i snittet ut att vara punktformig, och då ofta runt cellkärnorna. Ingen starkt kärnuttryck kan ses. Ett fåtal celler i bindväven uttrycker transkriptionsfaktorn. Cytoplasman hos glatta muskelceller har ett svagt uttryck, med enstaka cellkärnor infärgade, men detta är utanför bildens gränser. D. Bilden är en förstoring av B.



Livmodervävnad från tik nummer tre med frisk livmoder (P 1847-08). A. Bilden visar ett relativt svagt uttryck av HOX A6 i området runt körtellumina. B. Fotot visar motsvarande negativa kontroll. C. Fotot är en förstoring av bild A. Vävnaden har ett relativt svagt uttryck av transkriptionsfaktorn, vilket gör det svårt att utvärdera resultatet fullt ut. Det är ett relativt diffust uttryck, som är något starkare i cellkärnorna men även synligt i cytoplasman i körtelepitelet. Enstaka celler i bindväven uttrycker HOX A6, framför allt blodceller i kärlen men även enstaka fibroblast-cellkärnor. I den glatta muskulaturen visar cytoplasman ett svagt proteinuttryck, men inget uttryck i cellkärnorna ses (den glatta muskulaturen ligger utanför fotot). D. Fotot är en förstoring av B, det vill säga förstoring av den negativa kontrollen. Inte heller i den större förstoringen ses någon ospecifik inbindning av sekundäantikroppen.

Infektion av livmoderceller, Realtids-PCR

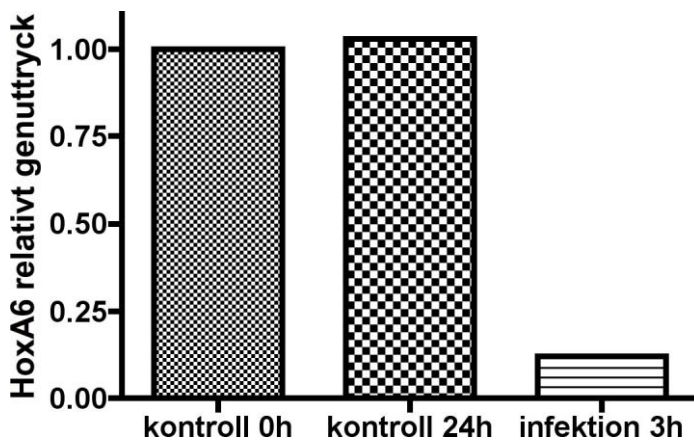
Eftersom primern som användes i detta försök inte har en effektivitet på ca 100 % fås inte absoluta tal ut från amplifieringen, men däremot kan tendenser skönjas. Trenden enligt detta försök var att uttrycket av HOX A6 nedreglerades vid infektion, vilket är i enlighet med tidigare studie (Hagman, Rönnberg, Pejler, 2009). Dock är det inte ett helt entydigt resultat, men majoriteten (fyra av sex jämförda prov-par) av proverna visar en nedreglering. Smältkurvorna från PCR-analyserna på resultaten som används i grafen nedan visar endast en topp, vilket visar att det med största sannolikhet bara var en produkt som hade amplifierats.

I diagrammen nedan har ett prov valts ut som de andra sedan jämförs med. I båda fallen användes proverna tagna direkt efter infektion som referens då dessa bör vara opåverkade av infektionen, uttrycket i dessa prover sattes till 1.

Först räknades skillnaden i tröskelvärde ut, ΔCt , dvs. den cykel då genen har amplifierats tillräckligt mycket för att komma över ett tröskelvärde i den exponentiella delen av amplifieringskurvan. $\Delta Ct = \text{medelvärdet av de två tröskelvärdena för duplikaten HOX A6 i provet} - \text{medelvärdet av motsvarande tröskelvärden för GAPDH}$.

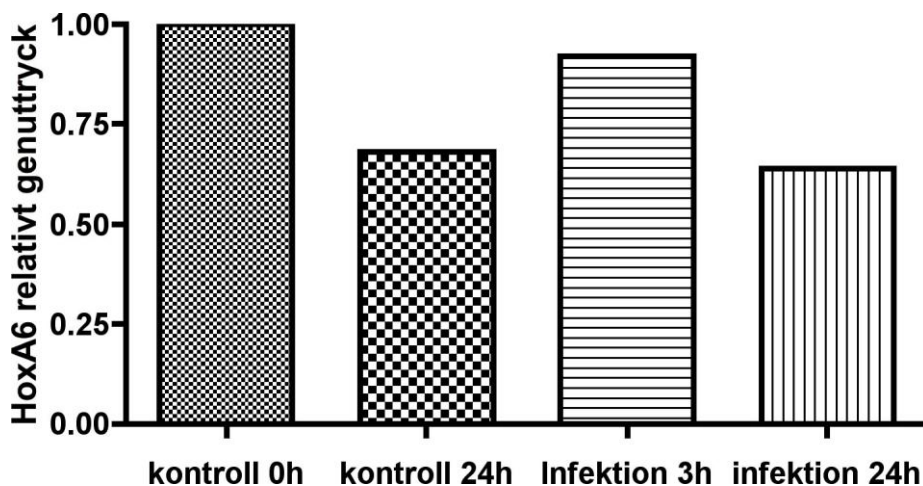
För att sedan jämföra proverna mot referensproverna nämnda två stycken upp tas provets skillnad i tröskelvärde minus referensprovets, $\Delta \Delta Ct$. Slutligen utförs ytterligare en beräkning, $2^{(-\Delta \Delta Ct)}$.

Uttryck av HOX A6 vid infektionsdos 2463 CFU *Escherichia coli*



Figur 1. De båda kontrollerna (0 timmar efter infektion (0h) respektive 24 timmar utan infektion (24 h)) ligger i nivå med varandra avseende uttrycket av HOX A6. Tre timmar efter infektion med 2463 Colony forming units *Escherichia coli* (infektion 3 h) har genuttrycket för HOX A6 minskat till ca 1/9 av uttrycket hos kontrollen 0h.

Uttryck av HOX A6 vid infektionsdos 28 CFU *Escherichia coli*



Figur 2. De båda kontrollerna (0 timmar efter infektion (0h) respektive 24 timmar utan infektion (24 h)) uppvisar olika uttryck av HOX A6. Kontrollen efter 24 h har ca 35 % mindre uttryck av homeoboxen jämfört med kontroll 0h. Cellerna efter 3 h infektion har ca 8 % lägre uttryck av HOX A6 jämfört med kontroll 0h. Däremot ligger kontrollcellerna efter 24 h ca 25 % lägre än de infekterade cellerna efter 3 h i genuttrycket av HOX A6. Cellerna som varit infekterade i 24 h har ca 36 % lägre genuttryck än kontroll 0h, ca 30 % lägre än 3 h efter infektion och ca 6 % lägre uttryck jämfört med kontroll 24h. CFU=Colony forming units.

DISKUSSION

Realtids-PCR

Enligt det utförda försöket tenderade uttrycket av HOX A6 nedregleras vid infektion, vilket är samma resultat som man sett i tidigare nämnd studie (Hagman et al, 2009.) Detta samstämmiga resultat visar att *in vitro*-modellen för pyometra som har framarbetats under denna studie har fungerat för att undersöka hur uttrycket av HOX A6 ändras under infektion. Om en jämförelse mellan PCR-resultaten från den tidigare studien (Hagman et al, 2009) och denna studie hade varit möjlig att göra hade man kunnat förvänta sig en större nedreglering i resultaten från denna studie. Detta på grund av att denna studie har visat att uttrycket av HOX A6 nedregleras i vissa celler i livmodern vid pyometra medan det uppreglas i andra. Denna studies PCR- resultat visar enbart genuttrycket i epitelceller, där genuttrycket av HOX A6 nedregleras, medan den tidigare studien använt sig av livmoderns alla lager med celler, det vill säga även de lager där cellernas uttryck av transkriptionsfaktorn ökar.

Uttrycket av HOX A6 jämfördes mellan de prover som hade samma infektionsdos och i fyra fall av sex nedreglerades genuttrycket av HOX A6. Dock sågs även motsatsen i två fall. En anledning till att uttrycket ökade efter infektion i de två ovan nämnda fallen skulle kunna vara att det fanns mer cDNA i dessa prover, alltså fler levande livmoderceller. Därigenom behövdes det färre cykler i realtidsPCR-analysen för att amplifiera den önskade genen så att mängden översteg tröskelvärde. Eftersom vi inte har mätt koncentrationen av RNA eller

cDNA är det svårt att säga om detta är orsaken. Dock användes ungefär samma mängd celler inom varje försök, vilket gör att det inte bör ha haft någon större effekt på resultatet. En annan förklaring skulle kunna vara att primern inte var specifik utan även amplifierade annat än den önskade genen. Dock kontrollerades smältkurvorna för de prover som användes i diagrammen och dessa hade endast en topp, vilket visar att det troligtvis endast var en produkt som uppförökades. Eftersom primern inte fungerade optimalt kan hela problemet ligga här. Formeln för uträkning av uttrycket av HOX A6 med hjälp av de värden som realtidsPCR-analysen gav utgick från att mängden av HOX A6 fördubblades i varje cykel. Då primern som användes i detta försök hade en effektivitet på över 100 % kan uträkningarna ha blivit felaktiga. Därför bör en ny realtidsPCR-analys utföras, helst med en primer som fungerar ännu bättre, för att se om resultatet blir likadant som med den nu använda primern.

Anledningen till att primerns effektivitet var över 100 % är svår att uttala sig om. Det troligaste från början var att primern var ospecifik och även band in och amplifierade icke önskade DNA-avsnitt. Men som tidigare har nämnts visar smältkurvorna, med endast en topp, på att så inte är fallet.

Infärgning av infekterade celler med immunohistokemi

Enligt resultaten av denna studie har de infekterade cellerna, hTERT-EEC, som färgades med immunohistokemi generellt ett lägre uttryck av HOX A6 tre timmar efter infektion jämfört med vad som uttrycks precis efter infektion. Detta resultat är i linje med resultaten från en tidigare studie, gjord med PCR-teknik, där genuttrycket av bland annat HOX A6 nedreglerades vid pyometra (*Hagman et al, 2009*). Den tidigare studien använde sig dock som tidigare påpekats av hela livmodervävnaden från tikar med pyometra, det vill säga många olika sorters celler, medan infektionsdelen av denna studie endast omfattat humana epitelceller från livmodern. I epitelcellerna var uttrycket av HOX A6 framför allt lokaliserat till kärnan, vilket är logiskt då HOX A6 är en transkriptionsfaktor och därmed har sin verkan i kärnan. Ett svagt uttryck av homeoboxen fanns även i epitelcellernas cytoplasma. För att utreda om HOX A6 har någon funktion i cytoplasman eller om de där endast utgör en lagringspol behövs fler studier.

I denna studie användes även en annan bakteriestam än i den tidigare studien, vilket kan tänkas påverka hur mycket uttrycket av HOX A6 förändras i vävnaden vid pyometra, även om bakteriearten är lika. Det bör även nämnas att bedömningen av de infekterade cellerna är subjektiv och gjord med hjälp av okulär besiktning av cellerna i mikroskop. En objektiv mätmetod av infärgningen hade naturligtvis varit att föredra men skillnaden i hur starkt cellerna färgas in är relativt stor vilket bör minska risken för feltolkningar.

Det finns flera tänkbara anledningar till att cytoplasman ser ut att saknas hos de infekterade cellerna i denna studie, framför allt i de senare färgningsomgångarna. En förklaring skulle kunna vara att cellerna blivit sköra efter infektionen och att cytoplasman därmed kunnat sköljas bort vid tvättningarna. Dock såg de icke infekterade cellerna, kontrollcellerna, likadana ut. Även om det finns en liten risk

att få in bakterier till kontrollcellerna är det inte troligt att detta har skett vid upprepade tillfällen i olika cellodlingar. Dessutom ser cellerna från den första färgningsomgången mycket bättre ut morfologiskt, trots samma behandling. Vid sista färgningsomgången utfördes tvättningarna väldigt försiktigt för att minimera risken för eventuell bortsköljning av cytoplasman, men resultatet var likadant som färgningen innan. Det troligaste är därför att det är något i själva fixerings- och färgningsmetoden som inte fungerar optimalt. För att få reda på mer om fördelningen av HOX A6 i epitelcellerna i livmodern bör färgningen av cellerna upprepas för att se om man kan hitta och åtgärda orsaken till att cytoplasman inte syns hos alla celler.

Eftersom det visade sig vara svårt att få cellerna att överleva med den *E. coli*-stam som användes vid denna studie, kan man gå vidare med att utsätta cellerna för delar av bakterien istället, t.ex. LPS (lipopolysackarid, endotoxin) eller en peptidoglykan. Dessa känns igen av cellerna på samma sätt som bakterier, men har inte samma negativa påverkan på cellerna som levande bakterier har. Ett annat sätt är att använda sig av avdödade bakterier, alternativt välja en mindre virulent bakteriestam. För att titta på genuttryck, såsom HOX A6, räcker det dock att cellerna överlever tre till fyra timmar då dessa uttryck ändras relativt snabbt.

Infärgning av vävnadssnitt med immunohistokemi

Hypotesen för delförsöket med infärgning med immunohistokemi var att uttrycket av HOX A6 skulle nedregleras under infektion med bakterier. Vid okulär bedömning av de infärgade preparaten i denna studie observerades nedreglering av HOX A6 vid pyometra. Detta överensstämmer helt med resultaten av en tidigare studie (*Hagman et al, 2009*) där livmodervävnad hos tikar med pyometra undersökts med hjälp av PCR.

I de friska livmödrarna sågs uttrycket av HOX A6 framför allt i cytoplasman, medan uttrycket i livmödrarna med pyometra varierade mellan de olika tikarna och även mellan olika områden i ett och samma preparat. Någon tydlig translokation av HOX A6 till cellkärnan från cytoplasman var alltså inte påvisbar. Däremot verkar det enligt resultaten av denna studie som om HOX A6-uttrycket i cellkärnan ökar vid pyometra, i olika grad i olika preparat, men att det även finns kvar i cytoplasman. Vid pyometra förstörs livmodervävnadens arkitektur och antalet immunceller ökar kraftigt i livmodern, vilket gör att det blir svårare att jämföra dessa vävnadssnitt med de från normala livmödrar.

Något som sågs i alla vävnadssnitt från tikar med pyometra jämfört med friska livmödrar var ett ökat uttryck av HOX A6 i bindväven. Till viss del kan detta bero på infiltration i vävnaden av immunceller som färgades in starkt, men även vissa fibroblast-cellkärnor färgades in, framför allt i närheten av körtelepitemet. Orsaken till detta är ännu inte känd.

En anledning till att vävnaden från de friska livmödrarna inte visar helt lika uttryck av HOX A6-genen skulle kunna bero på skillnader mellan olika individer, eller att hundarna kan ha varit i olika stadier av östralcykeln då livmodern togs bort. Generellt kastreras tikar under efterlöpsperioden (metöstrus), men det är

möjligt att någon tik kan ha befunnit sig i viloperioden (anöstrus) mellan två löpningar. När man tittar på vävnadssnitten från de normala livmödrarna utan mikroskop ser livmoderslemhinnan från en av tikarna (p 1847-08) mer voluminös ut än de andra två, vilket skulle kunna bero att tiken kastrerades under metöstrus.

En livmoder från en av de friska tikarna var svagt infärgad (P 1847-08). Om detta berodde på snittets tjocklek, att antikroppen mot HOX A6 av någon anledning färgats in i lägre grad i just detta preparat eller helt enkelt lägre uttryck av HOX A6 är svårt att uttala sig om. Dock användes samma färgningsmetod och tid vid samtliga preparat vilket gör att den troligaste anledningen är ett lägre genuttryck av HOX A6 i detta vävnadssnitt. Preparatet färgades endast en gång, ytterligare en färgning av ett vävnadssnitt från denna tiks livmoder skulle kunna ge mer information om anledningen till den svagare bruna infärgningen.

Denna studie pekar på att det i vissa celler i livmodern blir ett minskat uttryck av HOX A6 vid livmoderinflammation (till exempel körtelepitelceller), medan det ökar i andra celler (till exempel fibroblaster). Vad homeobox-transkriptionsfaktorer har för roll vid inflammation och infektion är inte fastställt.

KONKLUSION

Enligt resultaten av denna studie nedregleras genuttrycket av HOX A6 i livmoderns körtelepitelceller vid pyometra. Däremot verkar det uppregleras i bland annat fibroblaster. *In vitro*-modellen för pyometra som utarbetades under studien fungerade väl för att undersöka hur uttrycket av HOX A6 förändrades vid en infektion. I dessa infekterade celler sågs, förutom nedregleringen av HOX A6, att uttrycket av transkriptionsfaktorn framför allt var lokaliserat i epitelcellernas kärnor. För att få reda på orsaken till det ändrade genuttrycket av HOX A6 och vad det har för betydelse i praktiken behövs fler studier.

TACK

Ett stort tack till

Ragnvi Hagman, min handledare, som verkligen har engagerat sig i detta examensarbete och kommit med konstruktiv kritik samt många glada tillrop under arbetes gång

Helena Wensman, biträdande handledare, som har varit ett stort stöd under de delar av projektet som tillbringades på labb

Dr. Thomas Klonisch som storsint bidragit med humana livmoderceller (hTERT-EEC) så att detta projekt kunde genomföras

Erika Karlstam, SVA, som har utfört den histopatologiska undersökningen på livmödrarna

LITTERATURFÖRTECKNING

- Abdel-Fattah, R., Xiao, A., Bomgardner, D., Pease, C-S., Lopes, M.B.S., Hussaini, IM. 2006. Differential expression of HOX genes in neoplastic and non-neoplastic human astrocytes. *J Pathol* 209, 15-24
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. 4 ed. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, 385-386, 1191
- Dow, C. 1958. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Vet Rec* 69, 1102-1110
- Dow, C. 1959 b. Experimental reproduction of the cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *J Pathol Bacteriol* 78, 267-278
- Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B.N., Hedhammar, Å., Olson, P., Lagerstedt, A-S. 2001. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *J Vet Int Med* 15, 530-538
- Hagman, R., Rönnerberg, E., Pejler, G. 2009. Canine uterine infection induces upregulation of proteolysis-related genes and downregulation of homeobox and zinc finger factors. *PLoS One* 4, e8039
- Hardy, R.M., Osborne, C.A. 1974. Canine Pyometra: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment of Uterine and Extra-Uterine Lesions. *J Am Anim Hosp Assoc* 10, 245-268
- Hombach-Klonisch, S., Kehlen, A., Fowler, P. A., Huppertz, B., Jugert, J. F., Bischoff, G., Schlüter, E., Buchmann, J., Klonisch, T. 2005. Regulation of functional steroid receptors and ligand-induced responses in telomerase-immortalized human endometrial epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 34, 517-534
- Janqueira, L. C., Carneiro, J. 2005. 11 ed. Basic Histology, text and atlas. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc, 444-446
- McGinnis, W., Regulski, M., Harding, K., Kostriken, R., Karch, F., Levine, M. 1985. Homeobox genes of the Antennapedia and bithorax complexes of *Drosophila*. *Cell* 43, 71-80
- Nunes, F.D., de Almeida, F.C.S., Tucci, R., de Sousa, S.C.O.M. 2003. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. *Pesqui Odontol Bras* 17, 94-98
- Sandholm, M., Vasenius, H., Kiwistö, A-K. 1975. Pathogenesis of canine pyometra. *J Am Vet Med Assoc* 167, 1006-1010
- Taylor, H.S. 2000. The role of the HOX genes in human implantation. *Hum Reprod Update* 6, 75-79
- Taylor, H. S., Bagot, C., Kardana, A., Olive, D., Arici, A. 1999. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 14, 1328-1331
- Tsumagari, S., Ishinazaka, T., Kamata, H., Ohba, S., Tanaka, S., Ishii, M., Memon, M.A. 2005. Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features. *Anim Reprod Sci* 87, 301-308
- Vandeplassche, M., Coryn, M., De Schepper, J. 1991. Pyometra in the bitch: cytological, bacterial, histological and endocrinological characteristics. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr* 60, 207-211