



UPPSALA
UNIVERSITET

Uppsala Universitet

Institutionen för kvinnors och barns hälsa

Biomedicinska analytikerprogrammet, 180 hp

Examensarbete, 15 hp, VT-14

***Detection of Thymidine Kinase 1 Activity in Whole Blood
Using an Oligonucleotide System***

Heba Abdelfatah Possnert

Handledare: Sofia Magnusson

cSens AB, Dag Hammarssköldsväg 17

ABSTRACT

In today's medical science studies, many tumor markers are being used to monitor cancer cell proliferation, but the number of assays for analysis of these markers are few. The aim of this study was to find an easier and more time-efficient way to measure the activity of a specific tumor marker called thymidine kinase 1 (TK1). This tumor marker is an important enzyme involved in cell proliferation and is a key enzyme in the salvage pathway. TK1 activity is related to the occurrence of hematological malignancies and cell activity and therefore have been used as a marker when monitoring this group of patients in treatment. Measurement of the enzyme activity in this study was performed by using an oligonucleotide assay. Detection of the enzyme activity in whole blood and in plasma has not previously been shown. The TK1 activity measured in whole blood and plasma correlated with TK1 activity measured in serum ($R^2=0,8651$ and $R^2 =0,9845$, respectively). It was found that it is possible to determine the TK1 activity in whole blood but only if the activity was measured on the same day as the blood samples were taken. The results shows that the activity measurement of TK1 in plasma and whole blood can be used as a marker to verify patients' therapy in cancer care. This study is only the beginning and further investigations should be made in the future to determine if the method that is subject to this study has the requested effects.

KEYWORDS

Deoxyribonucleoside kinases, cell proliferation markers, salvage pathway, hematological malignancies, therapy monitoring

INTRODUKTION

Hematologiska maligna sjukdomar utgör den tredje vanligast förekommande cancerformen efter lung- och prostatacancer i Sverige¹. Etiologin bakom dessa cancersjukdomar är inte helt känd men många olika faktorer spelar in, framför allt förändringar i arvsmassan. Den primära förändringen sker sannolikt under DNA-syntesen. Ökad proliferation hos normala celler medför större DNA-skada i nybildade celler, vilket kan leda till olika former av cancerutveckling. Lymfom samt akuta och kroniska leukemier är exempel på hematologiska maligna sjukdomar.

Det finns olika traditionella screeningmetoder som kan användas för diagnostik av cancer, exempelvis röntgen, mammografi och differentialräkning. Dessa undersökningar kan dock enbart diagnostisera ett specifikt organ [1]. Tidig upptäckt av cancertumörer och uppföljning av cancer kan öka överlevnadslängden och livskvaliteten hos cancerpatienter [2]. Nästa steg är val av behandling. Idag finns flera olika metoder för behandling av cancer, till exempel kemoterapi, radioterapi, kirurgi och endokrinterapi. För att välja rätt behandling behövs specifika uppgifter om cancertillväxt, celltyp och spridning. Efter val av rätt terapi är det viktigt att följa upp behandlingen eftersom en uppföljning kan ge en uppfattning om hur väl den valda terapeutiska metoden fungerar. Om en reducerad cancercellsproliferation observeras kan detta innebära att patienten svarar på behandlingen [1]. Celldelningen kan mätas indirekt genom att mäta nivåerna av olika biomarkörer som också är cellproliferationsmarkörer [3].

Tymidinkinas (TK), Ki67 och "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA) är exempel på biomarkörer som kan användas som cellproliferationsmarkörer. Det finns studier som visar att TK kan vara en effektivare, känsligare och mer pålitlig proliferationsmarkör jämfört med de andra tillgängliga markörerna, framför allt vid hematologiska cancersjukdomar både inom human- och veterinärmedicin [3]. TK beskrivs även som den enda proliferationsmarkör som kan mätas i blodprover för att följa upp terapibehandling för hundpatienter med leukemi eller lymfom [4]. Hos eukaryota celler finns två olika isoformer av TK, Tymidinkinas 1 (TK1) och tymidinkinas 2 (TK2). De här enzymerna tillhör gruppen deoxyribonukleosidkinaser (dNK). Det finns fyra dNK-enzymmer som är specifika för deoxyribonukleosidfosforylering, cytosoliskt

¹ ([http://www.lakemedelsverket.se/upload/om-lakemedelsverket/publikationer/lakemedelsboken/LB-2011-2012/Hematologiska % 20maligniteter.pdf](http://www.lakemedelsverket.se/upload/om-lakemedelsverket/publikationer/lakemedelsboken/LB-2011-2012/Hematologiska%20maligniteter.pdf))

deoxycytidinkinas (dCK), deoxyguanosinkinas (dGK), TK1 och TK2. TK1 skiljer sig från resten av dNK-enzymerna eftersom det bara accepterar deoxyuridin (dU) och deoxytymidin (dT) som substrat med hög affinitet, medan resten av dNK-enzymerna kan fosforilera olika typer av substrat [5]. TK1 finns i cytosolen och är associerad med cellproliferation samt bildning av cellulärt DNA, medan TK2 är lokaliserat i cellens mitokondrier och medverkar till syntes av mitokondriellt DNA [6].

TK1 är involverad i "salvage pathway" som är den process där nedbrutna nukleotider återvinns till DNA-syntes. Detta sker genom att fosfatgrupper kopplas på olika nukleosider i tre steg med hjälp av katalyserande enzym. TK1 fosforilerar dT vid närvarandet av energimolekylen adenosintrifosfat (ATP) till tymidinmonofosfat (TMP). Med hjälp av de komplementärerande enzymerna, nukleosid monofosfatkinas (TMPK) och nukleosid difosfatkinas (NdPK), kommer sedan TMP att omvandlas till tymidintrifosfat (TTP). Omvandlingen av dT till TTP sker i de prolifererande cellerna via salvage pathway [4, 5, 6]. TK1 uttrycks vid övergång från G1 till S-fasen i cellcykeln, d.v.s. när DNA-syntesen är mest aktiv. Sedan kommer TK1 att brytas ned intracellulärt av proteasomen i "ubiquitin proteasome pathway" och detta sker i G2 fasen [7, 8]. Ökning av extracellulär TK1-aktivitet återspeglar graden av DNA som syntetiseras under cellcykeln samt antal döende celler. TK1-nivån i kroppsvätskor är väldigt låg men vid närvaro av maligna celler frigörs TK1 i stora mängder till serum eller plasma när dessa celler dör. Med ökad cellproliferation följer en ökad mängd av TK1, vilket kan vara ett tecken på neoplas. Detta förklarar varför TK1 kan användas som celldelningsmarkör [6, 7].

TK1 används som markör för framför allt hematologiska maligna sjukdomar [4], men det finns studier som visar att TK1 även kan användas som tumörmarkör hos patienter med lungcancer. I dessa studier visades ett signifikant samband mellan höga TK1-nivåer och överlevnadslängd hos cancerpatienter. Ökade serumnivåer av TK1 indikerar att patienten inte svarar på behandlingen medan låga nivåer indikerar motsatsen [9]. Studier på patienter med malignt melanom, bröstcancer och kolorektalcancer visar att användande av TK1 som tumörmarkör kan leda till bättre prognos [10].

Tidigare har ingen studie som handlar om att mäta TK1-aktiviteten i helblod eller plasma publicerats. Alla tidigare studier är istället gjorda på mätning av TK1-mängden eller aktiviteten i serum.

Det finns många metoder som kan användas för att mäta TK1-mängden i serumprover, men

väldigt få kan mäta TK1-aktiviteten. Metoden som användes i den här studien är ett realtidsoligonukleotidssystem och bygger på en ny teknik som utvecklades 2012 för att mäta TK1-aktiviteten i serum [11].

Metoden består av två steg: Första steget är en enzymkomplementering där komplementenzymer (NdPK och TMPK) tillsammans med TK1 från provet bildar TTP på samma sätt som i salvage pathway. Det andra steget är inkorporering av produkten TTP i ett oligonukleotidssystem. Oligonukleotidssystemet består av en primer, ett templat och en dubbelmärkt probe. När primern och proben binder till templatet bildas ett mellanrum som består av tre baspar mellan proben och primern. Taq-polymeraset kommer då att inkorporera tymin (T) från TTP som basparar med det första komplementerande kvävebasen adenin (A) i templatsekvensen. Sedan kommer Taq-polymeraset att inkorporera dATP, som basparar med de andra komplementerande kvävebaserna (T och T) och därigenom fylla ut det fria utrymmet mellan proben och primern.

Proben har en fluorofor i sin 5' ände som kallas för reporter samt en quencher i sin 3' ände. När reportern och quenchern befinner sig nära varandra sker ingen fluorescensregistrering. Under inkorporeringssteget kommer Taq-polymeraset med sin 5'-nukleasaktivitet att klyva bort reportern från proben. Detta medför att reportern emitterar ljus efter att den friats från quencherens påverkan. Det emitterade ljuset detekteras av PCR-maskinen. Fluorescensökning är kopplat till ökning av TK1-aktiviteten i blodet därför att TK1-aktiviteten är kopplat till bildning av TTP i reaktionen [10].

I arbetet undersöktes två olika alternativ till analys i serum; helblod och plasma. Eftersom nuvarande reagensmix var anpassad till analys i serum gjordes ett försök där olika reagensmixar testades i syfte att anpassa nuvarande reagensmix till helblod och plasma för att ytterligare säkerställa de alternativa provunderlagens underlättande av TK1-analys. Slutligen undersöktes hur länge blodet kunde förvaras och samtidigt ge säkra analysresultat. När blodet lagras kan förekomst av hemolys i blodet öka kraftigt, vilket kan störa analysen. Blodet togs i tre olika rörtyper för att hitta den mest effektiva metoden för analys av TK1-aktiviteten i helblod och plasma. Rören innehöll olika tillsatser som kan orsaka en viss hämning vid mätning av TK1-aktiviteten i blodet. Resultatet jämfördes med serum (guldstandard) för att ta reda på den totala inhibitionen av TK1-aktiviteten i både helblod och plasma.

Syftet med den här studien var att undersöka om alternativa provunderlag kan underlätta analys av TK1-aktiviteten hos leukemi- och lymfombehandlade patienter. Ett av de provunderlag som undersöktes var helblod som, om det visar sig underlätta analys av TK1-aktiviteten, kan användas till patientnära analyser i framtiden.

MATERIAL OCH METOD

Oligonukleotidsystem

I försöken användes ett oligonukleotidsystem bestående av primer, en prob och ett templat. Oligonukleotiderna hade specifika syntetiska sekvenser som var designade för denna metod, primer (5'ACGGTGATCT3'), templat (5'TACTAAGCACTGTCTTTTAAGATCACCGTCCTG3') och prob (5'-6FAM-AAGACAGTGCTTA-BHQ1-3'). Proben var märkt med en 6-FAM fluorofor som sitter i 5' änden och en quencher BHQ-1 (Black Hole Quencher®) i 3' änden. Oligonukleotiderna beställdes från Biomers.net. Robust taq-polymeras (KAPA2G K5023, KapaBiosystems) användes för inkorporeringen av DNA byggstenar.

Slutkoncentrationen av provmaterial i samtliga försök var 10 % (v/v) i reagensmixen. Reagensmixen bestod av nukleasfritt vatten, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 9 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 4 mM ATP (A3377, Sigma-Aldrich), 0,1 mM dATP (R0141, Fermentas), 0,1 mM dT (T9250, Sigma-Aldrich), 0,1 mM dC, 0,0005 mM templat, 0,0006 mM primer, 0,0035 mM probe, 0,080 % (w/v) BSA (00066587, Fermentas), 8 mM DL-Ditiotreitol (DTT, D9163, Sigma-Aldrich), 0,000037 U/μl TMPK (E-TMPK, Megazyme), 0,00015 U/μl jäst NdPK(N0379, Sigma-Aldrich) och 0,0264 U/μl Robust Taq blandades och förvarades mörkt i -70°C för vidare användning. Varje prov gjordes i duplikat eller triplikat. Därefter fördes 20 μl av reagensmixprovlösningen över till PCR-rör (49-3001-002, Techtum) som förseglades med lock. PCR-rören placerades sedan i en Realtids-PCR maskin (Rotor-Gene 3000, Qiagen). Proverna analyserades i två timmar enligt följande: 30 min preinkubation vid 37°C, sedan startades cykler med 30 sek 37°C med fluorescensinfångning till FAM kanalen sedan 30 sek 37°C där ingen fluorescens registreras. Varje cykel upprepades 90 ggr.

Analyseringen av proverna i den här studien följer samma princip som för realtids-PCR, där ett tröskelvärde, cykeltröskelvärde (Ct-värde) och mått av fluorescensnivå används. Ct-värdet motsvarar den cykel där provets fluorescensökning har passerat tröskelvärdet som är 0,1 för den här studien. Då sker en parallell mätning av Ct-värdet för kalibratorer med kända TK-aktiviteter erhöles provernas TK1-aktivitet i U/L, i analysen. Genom att använda standardkurvans ekvation tillsammans med de uppmätta Ct-värdena för de okända proverna, beräknades TK1-aktiviteten i U/L. Resultatet bedömdes enligt fluorescensnivån för varje prov och jämfördes med blankenvärden.

I syfte att optimera analysen av TK1-aktiviteten i EDTA-blod testades olika $MgCl_2$ koncentrationer: 7 mM, 9 mM, 11 mM, 13 mM och 15 mM.

Prover

Blodprov från en frisk givare (man, 60 år) samlades i fyra olika rörtyper: citrat, heparin och EDTA eller utan tillsats. Blodet från alla rörtyper fördes över till små rör för separation av plasma och serum. Rören centrifugerades därefter i 10 min 2000 x g och supernatanten (plasma eller serum) förvarades sedan i $-20^{\circ}C$. Blodprover för färskt serum togs i rör utan tillsats. Serumrören inkuberades 30 min i rumstemperatur innan de centrifugerades. Den här studien räknades som en förstudie där inget etiskt tillstånd krävdes för blodprovtagning². Flera försök (n=7) utfördes för att undersöka möjligheten att mäta TK1-aktivitet i helblod. TK1-aktiviteten mättes även i serum, plasma och buffertlösning.

En stamlösning (3200 pg/ μ l) bestående av humant rekombinant tymidin kinas (hrTK) enzym (Liya Wang, SLU, institution för anatomi, biokemi och fysiologi) användes för att spika proverna. Målet med spikningen var att få minst tre spikade prover med olika hrTK1 mängd (pg), för att efterlikna ett patologiskt prov då patologiska prover ej var tillgängliga. Ett blankprov bestående av ospikat provmaterial användes vid varje försök.

I ett försök undersöktes hur länge blodet kan förvaras utan att TK1-aktiviteten påverkas. Blodet förvarades vid $+6 - 8^{\circ}C$ och analyserades 1 timme, 24 timmar, 48 timmar och 6 dagar efter provtagning.

² http://www.med.lu.se/expmed/om_emv/haelsa_miljoe_och_saekerhet_hms/laboratoriearbete/blodprovstagning

Standardkurva

TK1-aktiviteten mättes i okända prover med hjälp av en standardkurva som användes vid varje analystillfälle. Standardkurvan bestod av fyra kalibratorer kal 1, kal 2, kal 3 och kal 4. Två olika kalibratorbatcher användes under arbetet, där kal 1 och kal 2 hade olika koncentrationer. I ena batchen hade kal 1 och kal 2 med 0,0124 U/ml respektive 0,0493 U/ml (126599, DiaSorin). I andra batchen hade kal 1 och kal 2 0,0112 U/ml respektive 0,0449 U/ml (128736, DiaSorin). Kal 3 och kal 4 bereddes genom spädning 1:2 av kal 1 och kal 2 respektive med spädningsbuffert. En buffertlösning bereddes för att användas som spädningsbuffert och som renhets och känslighets kontroll. Buffertlösningen bestod av nukleasfritt vatten (AM9930, Ambion), 0,05 M Tris-HCL pH 7,6 (Sigma Aldrich), 0,080 % (w/v) BSA, 0,1 % (w/v) Triton TMX-100, 4 mM MgCl₂, 2,5 mM ATP (A6559 SIGMA) och 0,18 M KCl.

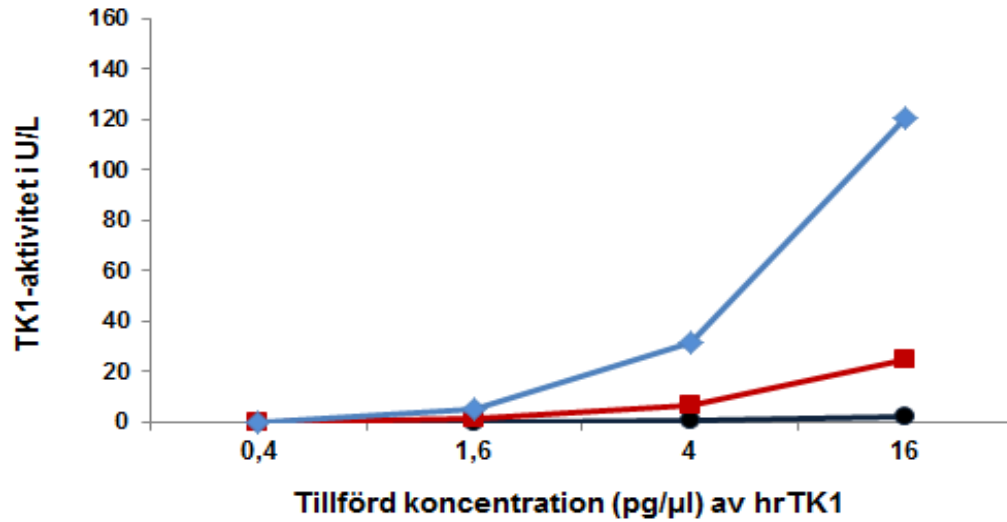
Metodens känslighet

“Limit of blank (LOB)” är det högsta uppenbara analytiska värde som förväntas erhållas när replikat av ett blankprov ska testas. Den lägsta TK1-aktiviteten som kan detekteras kallas för “limit of detection (LOD)”. LOB och LOD beräknades för varje provunderlag enligt Armbruster [11] för att analysera metodens känslighet. $LOB = \text{medelvärde för blanken} + 1,654 * \text{standardavvikelse för blanken}$. $LOD = LOB + 1,654 * \text{standardavvikelse för den lägsta uppmätta värdet}$.

RESULTAT

Undersökning av TK1-aktivitet i helblod i tre olika rörtyper

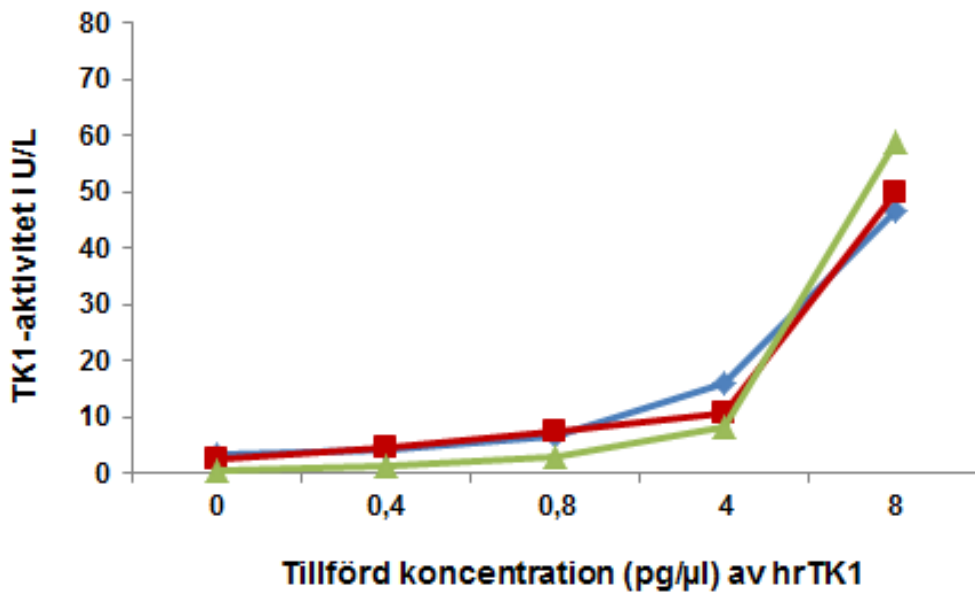
Den uppmätta TK1-aktiviteten i citrat-, heparin- och EDTA-blod visade en skillnad, där aktiviteten var högst i citratblodproverna och lägst i heparinblodproverna (Figur 2). TK1-aktiviteten i heparinhelblod var inte detekterbar med den här metoden.



Figur 2: Skillnader i TK1-aktivitetsnivåerna mellan heparinblodprover (●), citratblodprover (◆) och EDTA-blodprover (■).

Undersökning av TK1-aktivitet i plasma som har tagits i två olika rörtyper

Proverna som undersöktes var EDTA-, citratplasma och buffertlösning som spikades med hrTK1 till fyra olika koncentrationer (Figur 3).



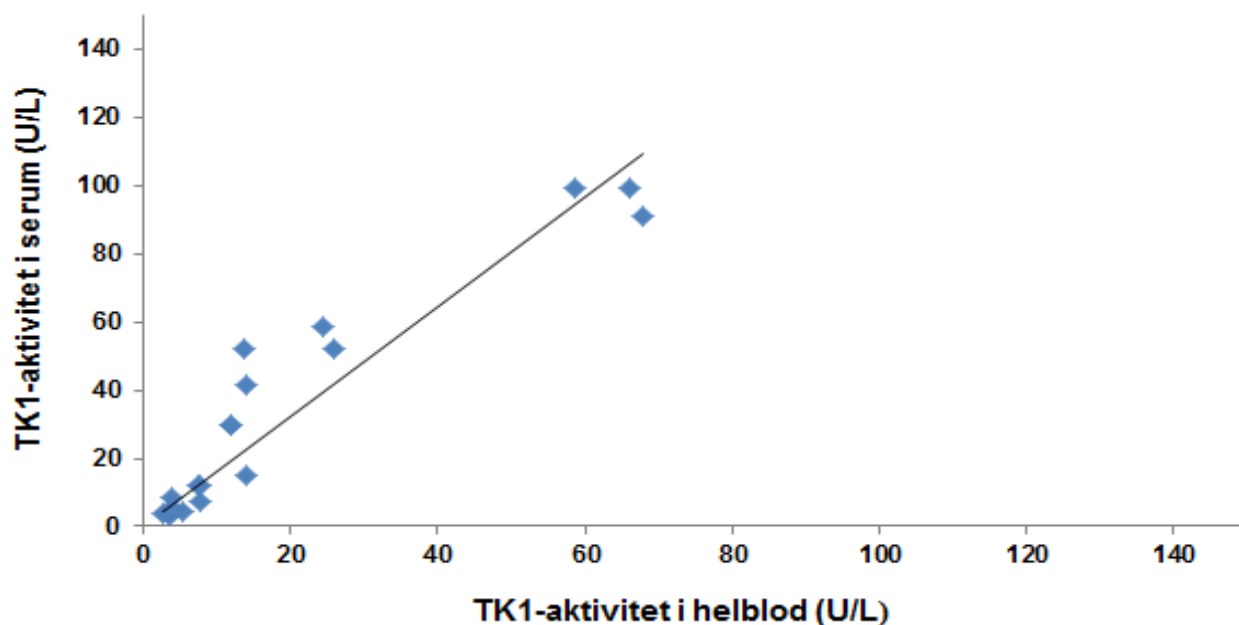
Figur 3. Den uppmätta TK1-aktiviteten för de spikade proverna i citratplasma (◆), EDTA-plasma (■) och i buffertlösning (+).

Bestämning av absolut grad av aktivitetsinhibition (%) i helblod och plasma

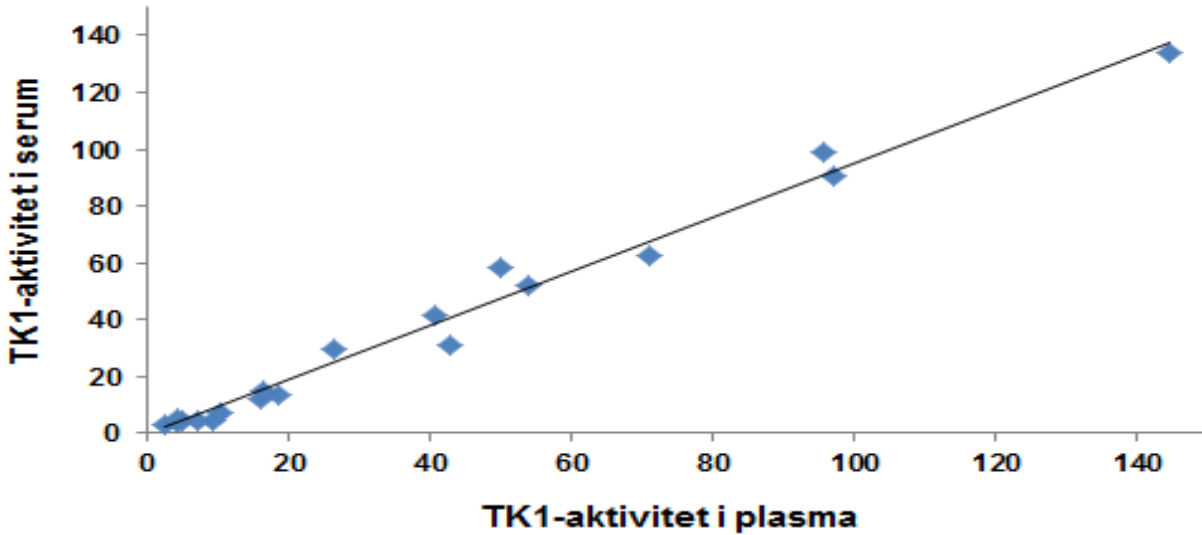
Inhibitionsgraden bestämdes utifrån den katalytiska aktiviteten av TK1 (U/L) i serum (100 %) för respektive prover. Inhibitionsgraden i EDTA-helblodsprover var ca 20-30 % högre än inhibitionen i citrathelblodprover i respektive prov. Inhibitionsgraden var däremot lägre i EDTA-plasma än i citratplasmaproverna. Hämningsgraden var 6-13 % högre i citratprover än EDTA-prover, vilket är betydligt lägre än i helblod.

Jämförelse av TK1-aktiviteten i helblod, plasma och serum

Serum användes som kontroll för att bestämma vilken kombination av prov- och rörtyp som ger resultat som ligger närmast serumvärdena. För att visa hur mycket av TK1-aktiviteten som inhiberas i helblod (i EDTA-rör) samt i plasma gjordes en jämförelse med serum (Figur 4 och 5).

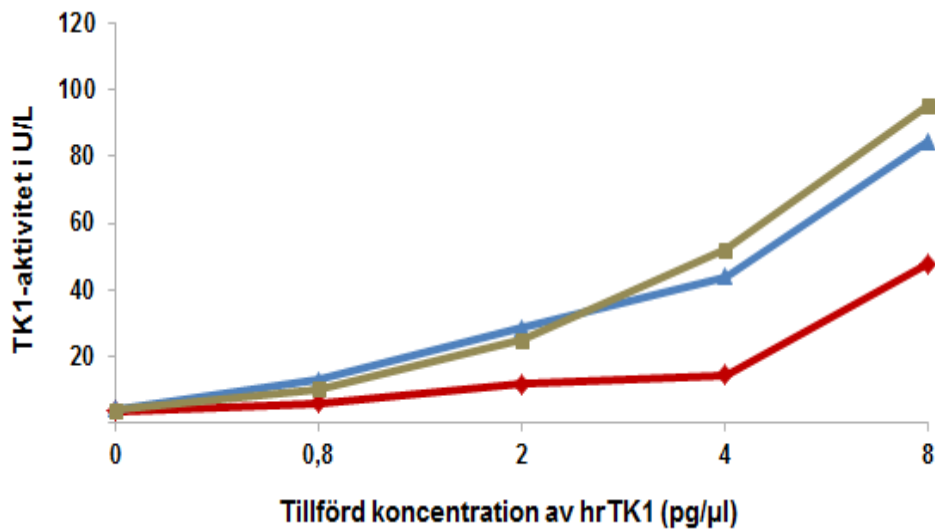


Figur 4. Jämförelse mellan TK1-aktiviteten i serum och helblodprover (EDTA-blod), regression $R^2 = 0,8757$. Symbolen (◆) motsvarar ett prov.



Figur 5. Korrelation i TK1-aktiviteten (U/L) mellan serum och plasma (i EDTA-rör), $R^2 = 0,9845$. Symbolen (◆) motsvarar ett prov.

Den uppmätta TK1-aktiviteten (U/L) var ungefär lika hög i plasmaprover som i serumprover, medan TK1-aktiviteten var lägre i helblod (Figur 7). Figuren visar data från fyra olika försök.

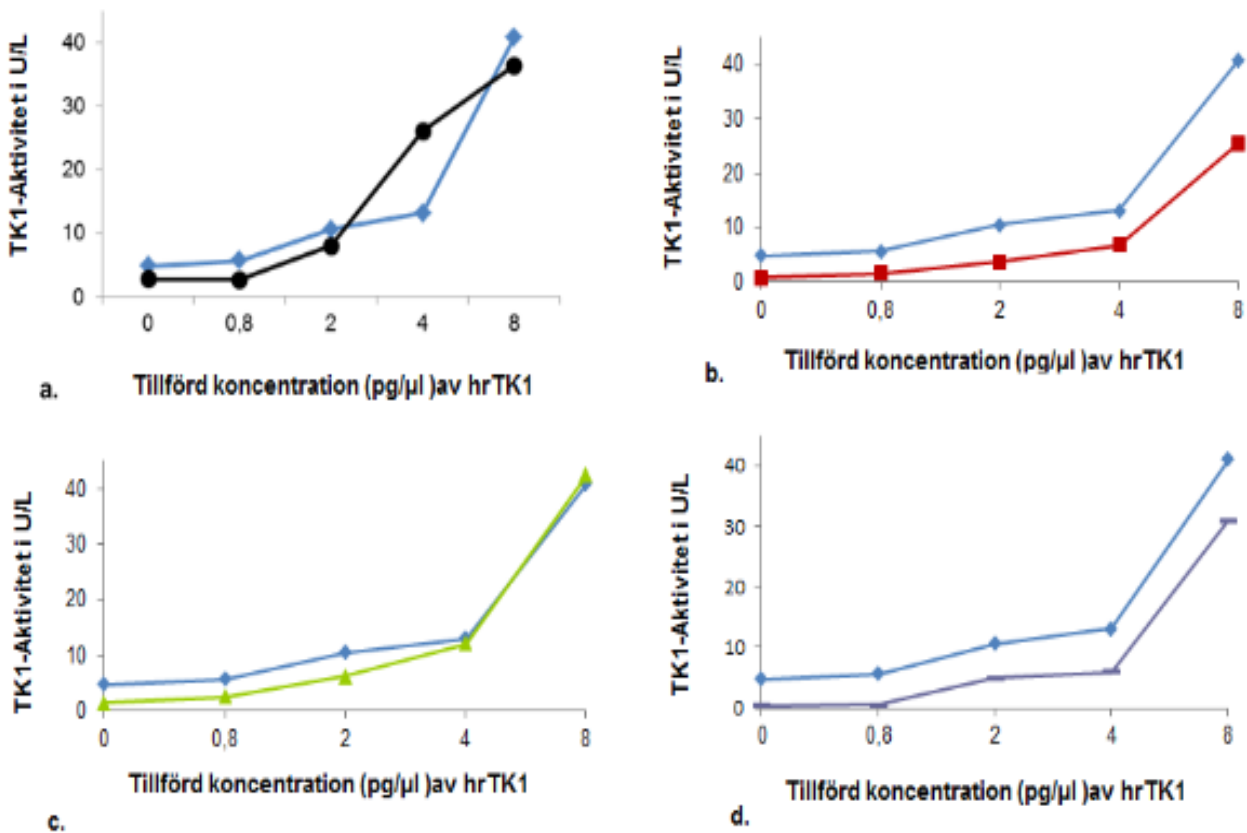


Figur 6. Medelvärden av den uppmätta TK1-aktiviteten i U/L ($n=4$) i EDTA-helblod (◆), EDTA-plasma (▲) och serumprover (■) för alla hrTK1-spikade prover i fyra upprepade försök.

Optimering av MgCl₂ koncentrationen

Optimering med fem olika koncentrationer av MgCl₂, 7 mM, 9 mM, 11 mM, 13 mM och 15 mM utfördes i syfte att förbättra känsligheten vid mätning av TK1-aktiviteten i EDTA-helblod.

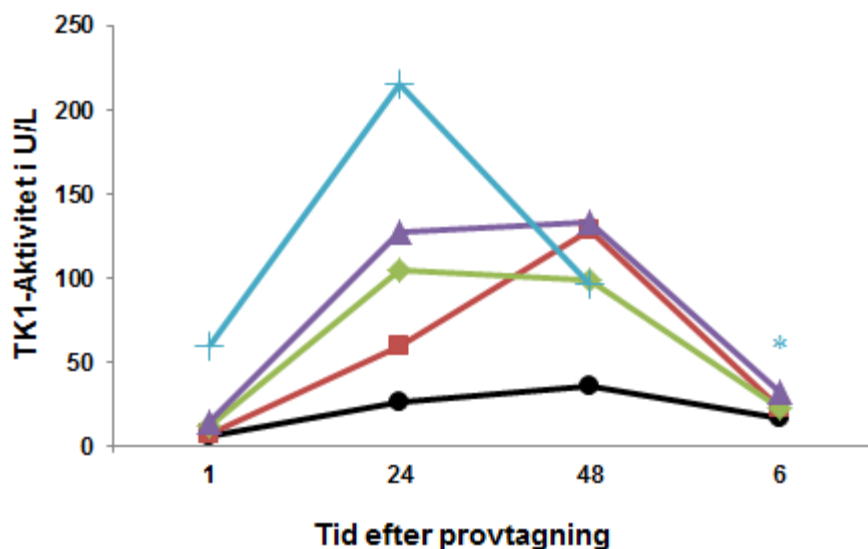
Reagensmix med 9 mM MgCl₂, som användes vid de första försöken, var optimerad endast för mätning av TK1-aktivitet i serum. Blodet från EDTA-rör spikades med hrTK1 enzym till fyra olika koncentrationer (Figur 7). Eftersom 9 mM MgCl₂ var guldstandard jämfördes den med de övriga koncentrationerna. Reagensmixoptimeringen indikerar att en MgCl₂ koncentration högre än 9 mM ger reducerad TK1-aktivitet (figur 7b, 7c och 7d). Reagensmix med 7 mM MgCl₂ visades en högre TK1-aktivitet än i 9 mM MgCl₂ reagensmix, endast för de blodproven med hög TK1 d.v.s. vid 8 pg/μl och 4 pg/μl (Figur 7a).



Figur 6. Medelvärdet av de uppmätta TK1-aktiviteterna i U/L (n=2) för de spikade EDTA-blodprover samt blanken i de olika reagensmixarna med fem olika MgCl₂ koncentrationerna. Figur 6a. visar två olika reagensmixar med 7 mM MgCl₂ (●) respektive 9 mM MgCl₂ (◊). Figur 6b. visar reagensmix med 9 mM MgCl₂ (◊) och 11 mM MgCl₂ (■). Figur 6c. visar 13 mM MgCl₂ (▲) med 9 mM MgCl₂ (◊) reagensmix. Figur 6d. visar reagensmix med 15 mM MgCl₂ (■) och 9 mM MgCl₂ (◊).

Påverkan av förvaring av EDTA-blod

Förvaring av helblod vid +6 - 8 °C påverkade TK1-aktiviteten påverkas i relation till förvaringstiden. Resultatet visade en hög ökning i TK1-aktiviteten efter bara 24 timmar förvaring, ökningen fortsatte under 6 dagars förvaring, då TK1-aktiviteten reducerades och stabiliserades igen (Figur 8).



Figur 8. Den uppmätta TK1-aktiviteten jämförs med tid efter provtagning (1-, 24- och 48 timmar samt efter 6 dygn). Svart linje (●) motsvarar prov spikat med 0 pg/μl hrTK1. Röd linje (■) motsvarar prov spikat med 0,8 pg/μl hrTK1. Grön linje (◆) motsvarar prov spikat med 2 pg/μl av hrTK1. Lila linje (▲) motsvarar prov spikat med 4 pg/μl hrTK1. Blå linje (+) motsvarar prov spikat med 8 pg/μl hrTK1. Asterisken (*) markerar att analys av prov spikat med 8 pg/μl hrTK1 inte utfördes efter 6 dygn. Proverna förvarades i + 6 - 8°C.

Metodens känslighet

Medelvärde av LOB och LOD från fyra olika försök visas nedan:

LOB= 4 U/L och LOD= 4 U/L är den högsta TK1-aktiviteten för blankenvärden respektive den lägsta värden där TK1-aktiviteten kan med hög säkerhet detekteras i EDTA-helblod. Dessa värden ligger nära EDTA-plasma- och serumvärden, då LOB= 4,1 U/L och LOD= 4,1 U/L samt LOB= 3,8 U/L och LOD= 4 U/L för EDTA-plasma respektive serum. Metoden kan däremot inte detektera TK1-aktiviteten under 4 U/L i något provunderlag.

DISKUSSION

I denna studie mättes TK1-aktiviteten som ett sätt att följa upp cancerbehandlade patienter. Målet med arbetet var att undersöka möjligheten att med hjälp av en ny metod som bygger på ett realtidsoligonukleotidsystem, mäta TK1-aktivitet i helblod och plasma i stället för serum. TK1-aktiviteten, d.v.s. omvandlingen av mängden substrat (dT) till tymidinmonofosfat per tidsenhet, är enligt tidigare forskning direkt korrelerad till den proliferativa aktiviteten för cancerceller [11, 13]. I arbetet undersöktes TK1-aktiviteten hos en frisk blodgivare. Då tillgången på patologiska färskta blodprover med hög TK1-aktivitet var begränsad, spikades proverna med hrTK1 för att i möjligaste mån efterlikna patologiska prover. Det låga provantalet begränsade möjligheten att uppnå resultat som visar statistisk signifikans. Därför utfördes inga statistiska tester, som "student's t-test", som skulle kunna ge trovärdigare resultat.

Resultatet visar att det är möjligt att mäta TK1-aktiviteten i både helblod och plasma (Figur 2, 3 och 4). LOB och LOD beräknades för TK1-aktiviteten (U/L) i serum, helblod och plasma. Resultatet i Figur 2 indikerar stor inhibition av TK1-aktivitet i heparinblodet, vilket medförde att fluorescensnivåer var låga. Detta kan bero på att antikoagulantia (inklusive heparin) orsakar en stor hämning av TK1-aktiviteten i heparinblod eftersom heparinet antas hämma Taq-polymeraset, vilket i sin tur reducerar inkorporering av TTP och därmed TK1-aktiviteten. Hämningen av TK1-aktiviteten var mindre i EDTA- och citrathelblod (Figur 2), varför TK1-aktivitetsmätningarna i fortsättningen gjordes i citrat- och EDTA-blodprover.

En skillnad i den uppmätta TK1-aktiviteten mellan EDTA- och citratblod (Figur 2) tyder på att det finns en större hämning i EDTA- än citratblod. Färre inhibitoriska faktorer och mindre risk för hemolys i plasma jämfört med helblod förklarar den mindre skillnaden vid mätningar i EDTA- och citratplasmaprover (Figur 3). Detta förklarar i sin tur varför det fanns en högre korrelation mellan plasma och serum (Figur 5) än mellan helblod och serum (Figur 4) för TK1-aktiviteten. Resultatet i Figur 6 indikerar att undersökning av TK1-aktiviteten är lika känslig i plasma som serum, men fler försök bör utföras för att undersöka detta. Då hemolys och lysning av blodceller förekommer naturligt i blod efter en viss tid undersöktes EDTA-blod i syfte att ta reda på hur länge blodet kan förvaras efter provtagning samtidigt innan det används till aktivitetmätning.

Användning av helblod som provmaterial skulle underlätta undersökningen av patienter,

eftersom mätningen då kan ske direkt efter provtagningen och, till skillnad från serum, inte är beroende av en specifik rörtyp. Helblod innehåller dock olika hämningsfaktorer och kan hemolysa, vilket bl.a. orsakar förvaringsproblem. Detta bör utforskas först, innan användning av den här metoden i helblod kan ske vid patientnära analyser. Plasma kan däremot förvaras under lika lång tid som serum, samtidigt som de tas i olika rörtyper och inte kräver preinkubation före centrifugering.

En misstanke om att TK1-aktiviteten inhiberades i EDTA-blod pga bindning av EDTA till Mg^{2+} joner, utgjorde basen till ett försök för att förbättra aktivitetsmätning av TK1 i EDTA-blod. Mg^{2+} är en kofaktor för aktivering av Taq-polymeras, därför kan eventuell bindning av EDTA till Mg^{2+} joner medföra att Taq-polymerasetts aktivitet reduceras. Hypotesen var att en ökad Mg^{2+} koncentration medför ökad TK1-aktivitet i EDTA-helblod, men resultatet i Figur 7 indikerade att hypotesen var felaktigt. Resultatet visade att ju högre koncentration av $MgCl_2$ som tillsattes desto lägre blev TK1-aktiviteten och vice versa. Detta kan förklaras av att ett överskott av Mg^{2+} joner ger en hämmande effekt då det bidrar till en sämre miljö för Taq-polymeraset.

Figur 8 visar att TK1-aktiviteten bör mätas inom kort tid efter provtagning men detta skall inte påverka användning av metoden för patientnära analyser eftersom mätningar skall ske snabbt med den minsta blodvolymen. När cellerna lyseras och dör frigörs höga mängder av TK1 i provet. Detta medför i sin tur en kraftig ökning av TK1-aktivitet vilket förklarar varför TK1-aktiviteten var ungefär dubbelt så hög vid mätningar efter 24 och 48 timmar som visas i Figur 8. Aktivitetsmätning som sker efter 24 eller 48 timmar kan med stor sannolikhet ge falskt positiva svar. TK1-aktiviteten började stabilisera sig efter 6 dygn och en anledning till detta kan vara att enzymernas aktivitet har reducerat efter en lång förvaringstid, även om enzymnivåerna var höga i provet. Även andra okända faktorer kan ha varit avgörande.

I en tidigare studie har användning av TK1-koncentration och aktivitet i serum för att följa upp hundpatienter före och efter behandling studerats. Då undersöktes inaktiv TK1 proteinnivå och aktivitet hos patienter med hematologiska maligna sjukdomar och en annan grupp av patienter med fasta tumörer. Resultatet visade att TK1-aktivitetsnivåerna var signifikant högre i prover med hematologiska maligna sjukdomar än i fasta tumörer. Detta tyder på att TK1 aktiviteten är ett effektivt mått på behandlingsuppföljning för hematologiska maligna sjukdomar. Behovet av nya metoder för TK1-aktivitetsmätning har dock blivit större [14].

Möjligheten av att använda TK1-aktivitet som markör i andra cancerformer än hematologiska

maligna sjukdomar undersöktes också i andra studier [14]. Då ingen stor inducering av enzymaktivitet sker i fasta tumörer behövs fler studier med en metod som har hög sensitivitet och kan skilja mellan normala och patologiska prover med en hög specificitet [15].

I en tidigare studie, där TK1-aktiviteten mättes med TK-REA metoden, i plasma hos hundar med olika hematologiska cancersjukdomar (leukemier, lymfom) samt från grupper av icke-hematologiska cancersjukdomar, rapporteras att normal TK1-aktivitet i hundplasma var 6 U/L. TK1-aktiviteten i hundprover med leukemi och lymfom var mellan 6,8 - 430 U/L [16]. Gränsvärdet för normala serumprover är ca 7 U/L i hund och människor med realtidsoligonukleotid system metoden som använts i denna studie och med TK-REA. Realtidsoligonukleotiden kan dock mäta en mycket lägre TK1-aktivitets nivå [11]. LOB- och LOD-värdena i denna studie visade inte en stor skillnad mellan de testade provmaterialen. Detta kan tyda på att metoden är lika känslig för plasma och blod som för serum (guldstandard). Metoden har låg känslighet vid mätning av TK1-aktiviteten under 4 U/L för alla provunderlag.

TK1-aktiviteten kan mätas med flera olika metoder, TK-REA (TK-radioenzymatic assay) var bland de första metoderna och guldstandard som användes i humanmedicin och veterinärmedicin. TK-REA metoden bygger på ett radioaktivt inmärkt substrat. TK-REA metoden används inte längre på humansidan och väldigt sällan i veterinärmedicin. Metoden har många nackdelar så som dyr utrustning, tidskrävande och den är inte specifik för aktivitetsmätning av TK1 utan mäter också TK2-aktiviteten [17]. På grund av att metoden utnyttjar radioaktivitet är den också riskabel och miljöfarlig [11, 17]. En icke-radioaktiv metod som använder sig av en kompetitiv ELISA teknik validerades med TK-REA. Fördelen med denna metod var att den inte använder radioaktiva substanser och är specifik för TK1 [18]. I en studie från 2014 testades en ny metod (DiviTum™) för undersökning av TK1-aktiviteten i serum. Även denna bygger på ELISA teknik. Den här metoden har visat en bra korrelation med TK-REA men den största nackdelen var inkubationstiden, som var 20 timmar totalt [19].

En viktig fördel med att använda realtidsoligonukleotid metoden som använts i denna studie är att detektionen sker samtidigt som reaktionen pågår, till skillnad från de ovan nämnda metoderna som enbart mäter vid slutpunkten. Andra fördelar med realtidsmetoden är känsligheten, säkerheten, specificiteten för TK1-aktivitetsmätning och snabb analys av prover [11].

Slutsatsen av den här studien är att aktivitetsmätning av TK1 i plasma och helblod kan användas

som en markör för att kontrollera patienternas terapi inom cancervården. Realtidsoligonukleotid metoden uppvisar stor potential för framtida användning inom patientnära analyser. Fler studier och ytterligare utveckling av metoden för undersökning i helblod och plasma krävs dock innan detta ska bli verklighet, eftersom realtidsmaskinen inte kan användas för patientnära analyser med hänsyn till apparatens storlek. Tester av TK1-aktiviteten i kapillära blodprover bör undersökas i framtiden som ett optimeringsteg. Detta kan bli möjligt då undersökning av aktiviteten kräver små blodvolymmer och eftersom att, som den här studien har visat, TK1-aktiviteten kan uppmätas direkt i blodet. Utvecklingen kan också ske genom fler studier på patologiska helblodprover med ett representativ antal som kan ge mer data kring metodens känslighet och reproducerbarhet. Fler studier som undersöker TK1-aktiviteten i de olika provunderlagen med realtidoligonukleotidsmetoden behövs för att avgöra metodens specificitet hos fasta och hematologiska maligna tumörer.

ACKNOWLEDGEMENT

Jag skulle vilja tacka mina handledare Per Stålhandske och Sofia Magnusson som har hjälpt mycket under arbetet och bidragit till detta arbete. Tack Sofia för ditt stöd och din förståelse.

REFERENSER

- [1] Kobayashi T, Kawakubo T. Prospective investigation of tumor markers and risk assessment in early cancer screening. *Cancer*. 1994 Apr 73(7):1946-53.
- [2] Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, Zucknick M, Nees J, Schott S, Cuk K, Riethdorf S, Trumpp A, Pantel K, Sohn C, Schneeweiss A, Surowy H, Burwinkel B. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 May. Tillgängligt: <http://link.springer.com/>
- [3] Mao Y, Wu J, Skog S, Eriksson S, Zhao Y, Zhou J, He Q. Expression of cell proliferating genes in patients with non-small cell lung cancer by immunohistochemistry and cDNA profiling. *Oncol Rep* 2005 May;13(5):837-46.
- [4] Kiran Kumar J, Sharif H, Westberg S, von Euler H, Eriksson S. High levels of inactive thymidine kinase 1 polypeptide detected in sera from dogs with solid tumours by immunoaffinity methods: implications for in vitro diagnostics. *Vet J*. 2013 Sep;197(3):854-60.
- [5] Kosinska U, Carnrot C, Sandrini MP, Clausen AR, Wang L, Piskur J, Eriksson S, Eklund H. Structural studies of thymidine kinases from *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* provide insights into quaternary structure and conformational changes upon substrate binding. *FEBS J*. 2007 Feb;274(3):727-37.
- [6] Von Euler H, Einarsson R, Olsson U, Lagerstedt AS, Eriksson S. Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease. *J Vet Intern Med* 2004 Sep-Oct;18(5):696-702.
- [7] Doi S, Naito K, Yamada K. Serum deoxythymidine kinase as a progressive marker of hematological malignancy. *Nagoya J Med Sci*. 1990 Mar;52(1-4):19-26.
- [8] Zhu C, Harlow LS, Berenstein D, Munch-Petersen S, Munch-Petersen B. Effect of C-terminal of human cytosolic thymidine kinase (TK1) on in vitro stability and enzymatic properties. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2006;25(9-11):1185-8.
- [9] Xu Y, Shi QL, Ma H, Zhou H, Lu Z, Yu B, Zhou X, Eriksson S, He E, Skog S. High

thymidine kinase 1 (TK1) expression is a predictor of poor survival in patients with pT1 of lung adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 2012 Apr;33(2):475-83.

[10] Bolayirli M, Papila C, Korkmaz GG, Papila B, Aydoğan F, Karataş A, Uzun H. Serum thymidine kinase 1 activity in solid tumor (breast and colorectal cancer) patients treated with adjuvant chemotherapy. *J Clin Lab Anal.* 2013 May;27(3):220-6.

[11] Stålhandske P, Wang L, Westberg S, von Euler H, Groth E, Gustafsson SA, Eriksson S, Lennerstrand J. Homogeneous assay for real-time and simultaneous detection of thymidine kinase 1 and deoxycytidine kinase activities. *Anal Biochem.* 2013 Jan 15;432(2):155-64.

[12] Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* 2008 Aug;29(1):49-52.

[13] Hannigan BM, Barnett YA, Armstrong DB, McKelvey-Martin VJ, McKenna PG. Thymidine kinases: the enzymes and their clinical usefulness. *Cancer Biother.* 1993;8(3):189-97.

[14] Kiran Kumar J, Sharif H, Westberg S, von Euler H, Eriksson S. High levels of inactive thymidine kinase 1 polypeptide detected in sera from dogs with solid tumours by immunoaffinity methods: implications for in vitro diagnostics. *Vet J.* 2013 Sep;197(3):854-60.

[15] Von Euler H, Eriksson S. Comparative aspects of the proliferation marker thymidine kinase 1 in human and canine tumour diseases. *Vet Comp Oncol.* 2011 Mar;9(1):1-15.

[16] Nakamura N, Momoi Y, Watari T, Yoshino T, Tsujimoto H, Hasegawa A. Plasma thymidine kinase activity in dogs with lymphoma and leukemia. *J Vet Med Sci.* 1997 Oct;59(10):957-60.

[17] Von Euler H, Ohrvik AB, Eriksson SK. A non-radiometric method for measuring serum thymidine kinase activity in malignant lymphoma in dogs. *Res Vet Sci.* 2006 Feb;80(1):17-24.

[18] Ohrvik A, Lindh M, Einarsson R, Grassi J, Eriksson S. Sensitive nonradiometric method for determining thymidine kinase 1 activity. *Clin Chem.* 2004 Sep;50(9):1597-606.

[19] Bacovsky J, Myslivecek M, Minarik J, Scudla V, Pika T, Zapletalova J, Petrova P, Bartkova M, Adam T, Gronowitz SJ. Analysis of thymidine kinase serum levels by novel method

DiviTum™ in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance - comparison with imaging methods 99mTc-MIBI scintigraphy and 18F-FDG PET/CT. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2014 Feb. Tillgängligt: <http://biomed.papers.upol.cz>.